



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

SUPERANT LA RESISTÈNCIA A LES IMMUNOTERÀPIES A TRAVÉS DE LA INHIBICIÓ DE MYC EN CÀNCER DE PULMÓ MUTAT EN KRAS AMB PERFILS MUTACIONALS 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. Resum

El càncer de pulmó és la principal causa de mort per càncer a tot el món. Una de les mutacions més comunes en aquesta malaltia són les que activen l'oncogèn KRAS, fet que confereix un pronòstic dolent i un alt risc de recurrència del tumor.

Malauradament, no hi ha teràpies personalitzades disponibles per atacar la majoria d'aquestes mutacions. Fins i tot la immunoteràpia, que ara mostra eficàcia per a altres indicacions, presenta una activitat limitada en la majoria de tumors mutats per KRAS, possiblement perquè les mutacions concurrents que sovint acompanyen les alteracions de KRAS donen lloc a diferents propietats immunològiques.

Aquí proposem una estratègia terapèutica alternativa centrada en un efector de KRAS crucial en la patogènesi del càncer de pulmó: el factor de transcripció MYC. MYC està desregulat en la majoria dels càncers —si no en tots—, i no només promou la progressió del tumor, cosa que indueix la proliferació cel·lular, sinó que també és responsable de l'evasió immune del tumor, un fenomen que fa que el càncer sigui invisible per al nostre sistema immunitari. Tot i que encara no hi ha un inhibidor directe de MYC disponible a la clínica, ha acabat amb èxit el primer assaig clínic de la miniproteïna Omomyc, un inhibidor excel·lent de MYC en estudis preclínics. Hem demostrat que aquesta miniproteïna té un gran impacte terapèutic en models de ratolí de càncer de pulmó de cèl·lules no petites (NSCLC) impulsat per KRAS i que provoca el reclutament de cèl·lules T al lloc del tumor.

Per tant, la nostra hipòtesi és que la inhibició de MYC per part d'Omomyc en adenocarcinomes de pulmó impulsats per KRAS que presenten les mutacions en els gens supressors tumorals (TSG) més freqüents (*Trp53*, *Lkb1* i *Keap1*) no només aturarà la progressió del tumor, sinó que també promourà un canvi d'un microambient immunosupressor a un de més immunoestimulador, fet que fomentarà una resposta immune antitumoral eficaç que permetria superar, o potencialment prevenir, el desenvolupament de la resistència a les immunoteràpies.

2. Resultats

Per verificar la nostra hipòtesi, hem utilitzat diferents línies cel·lulars isogèniques derivades del model de ratolí transgènic de càncer de pulmó KRAS-G12D (KLA), cadascuna dissenyada prèviament pel Dr. Silvestre Vicent per presentar les mutacions concomitants de TSG més freqüents: TP53, STK11 i KEAP1. Aquestes línies cel·lulars van proporcionar una plataforma robusta per a la nostra investigació. L'objectiu principal era fer una caracterització exhaustiva d'aquestes línies cel·lulars tant *in vitro* com *in vivo*. Vam observar una cinètica de creixement similar en totes les línies cel·lulars KLA, encara que amb una desacceleració subtil en les que portaven mutacions STK11 i KEAP1. A continuació, vam quantificar els nivells endògens de MYC dins de les diferents variants de la línia cel·lular. Curiosament, les nostres anàlisis de *Western blot* van revelar un augment notable dels nivells basals de MYC en totes les línies cel·lulars mutants de TSG, amb una regulació especialment significativa en els mutants STK11 i KEAP1.

A més, vam dur a terme anàlisis transcriptòmiques per caracteritzar encara més les diferents línies cel·lulars. En aquest sentit, les cèl·lules que portaven mutacions al TSG van mostrar una expressió augmentada de gens relacionats amb la migració cel·lular, la reorganització de la matriu extracel·lular i la resposta a l'estrès oxidatiu, i van presentar una regulació a la baixa dels gens relacionats amb la resposta immunitària, la cascada del complement i la migració de leucòcits, en comparació amb la línia cel·lular parental.

Després de les nostres investigacions *in vitro*, vam avaluar el comportament de les línies cel·lulars en un context *in vivo*. Un cop vam establir les condicions d'inoculació adequades, vam determinar que les cèl·lules KLA-Keap1 presentaven un creixement accelerat *in vivo* en comparació amb les altres variants de la línia cel·lular. Després vam procedir a caracteritzar l'infiltrat immunològic en presència de les diferents mutacions de TSG mitjançant citometria de flux. Amb aquesta finalitat, vam analitzar diferents poblacions de cèl·lules immunitàries 3 i 5 setmanes després de la implantació del tumor. Els resultats van mostrar que l'infiltrat immunològic del tumor experimenta canvis temporals, de manera que canvia progressivament cap a un fenotip més immunosuprimit amb el pas del temps, independentment del perfil mutacional del tumor. Tanmateix, el fenotip immunosuprimit era més profund en els tumors mutants

d'STK11, fet que reflecteix les observacions fetes en pacients portadors d'aquesta mutació.

Després vam tornar a l'entorn *in vitro* per investigar la resposta a la inhibició de MYC per part d'Omomyc de les diferents línies cel·lulars. Una dosi estàndard d'Omomyc va donar lloc a una reducció significativa del creixement cel·lular en totes les línies cel·lulars KLA en comparació amb els controls no tractats. Omomyc també va canviar el perfil del cicle cel·lular, i va induir una parada intrigant en la fase S en totes les línies cel·lulars mutants de TSG, però no en la parental.

A continuació, per estudiar com la inhibició de MYC podria influir en la resposta immunitària del tumor, vam analitzar gens relacionats amb l'evasió immune i els processos de presentació d'antigens mitjançant qPCR. Els resultats van indicar alteracions significatives en aquests gens després del tractament amb Omomyc en totes les línies cel·lulars amb deficiència de TSG, amb canvis més pronunciats observats en el model KLA-P53. En particular, cada línia cel·lular va mostrar diferents patrons de regulació a la baixa o a l'alça del gen en resposta a Omomyc. Curiosament, anàlisis transcriptòmiques posteriors van revelar que, en resposta a Omomyc, totes les línies cel·lulars mutants van patir una regulació a la baixa dels gens relacionats amb les vies de senyalització del receptor i una regulació positiva dels gens relacionats amb la resposta immunitària.

Després d'això, vam examinar la resposta a la inhibició de MYC *in vivo* i vam observar que els animals tractats amb Omomyc mostraven un creixement tumoral significativament reduït en comparació amb els controls en les línies cel·lulars parentals (KLA-NT), les mutants de P53 i KEAP1, amb una reducció més pronunciada del model mutant de P53.

També es va observar una modulació del microambient immune del tumor després del tractament amb Omomyc. Els canvis immunològics més profunds es van observar en els models en què Omomyc va poder reduir millor el creixement del tumor, és a dir, en els models mutants d'NT i P53. En canvi, els models mutants d'STK11 i KEAP1 no van mostrar canvis significatius en el microambient immune del tumor. A partir d'aquestes troballes es va procedir a provar la combinació d'Omomyc amb immunoteràpia en models mutants NT i P53. Aquesta combinació va millorar la mitjana de la

supervivència, ja que gairebé tots els ratolins tractats van mostrar una resposta parcial (PR) o completa (CR) amb el tractament en combinació, en comparació amb només la meitat dels ratolins tractats amb immunoteràpia sola.

A més d'avaluar la combinació d'Omomyc amb inhibidors del punt de control immunològic, aquest projecte va oferir l'oportunitat d'explorar la sinergia d'Omomyc amb altres tractaments contra el càncer que s'utilitzen habitualment per a NSCLC mutat en KRAS, específicament els inhibidors de KRAS i MEK1/2. Els nostres resultats van posar de manifest la notable eficàcia terapèutica de combinar aquests inhibidors amb Omomyc, cosa que obre el camí per continuar investigant en aquesta línia de recerca prometedora.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Els fàrmacs actuals contra el càncer tenen com a objectiu atacar funcions redundants de les cèl·lules canceroses, que evolucionen i compensen la funció bloquejada, cosa que dona lloc a la resistència i a la recurrència de la malaltia. A més, sovint causen efectes secundaris indesitjables i toxicitat. En aquest projecte finançat per La Marató hem proposat un enfocament innovador per atacar MYC, una funció no redundant que controla la divisió cel·lular, el reconeixement de cèl·lules immunitàries i la resistència a la teràpia. OMO-103 (Omomyc) és un inhibidor directe de MYC de primera classe, del qual recentment s'ha completat amb èxit un assaig clínic de primera administració en humans (FIH) en pacients amb tumors sòlids avançats. Els resultats de l'assaig han demostrat una seguretat excel·lent, la unió del fàrmac a la diana en funció de la dosi i una activitat clínic en els pacients. L'impacte clínic potencial d'aquest enfocament no té precedents, ja que un inhibidor de MYC de primera classe podria servir per tractar diversos tipus de càncer (si no tots els tipus).

En aquest projecte ens hem centrat en l'NSCLC mutant de KRAS que presenta mutacions concurrents en els gens supressors de tumors més comuns (*TP53*, *KEAP1* i *STK11*). Els pacients amb mutacions KRAS són el segment de pacients més desatesos, ja que no hi ha teràpies dirigides eficaces disponibles per a ells, per la qual cosa actualment se'ls està tractant amb quimioteràpies altament tòxiques i ineficaces. De fet, la majoria de teràpies dirigides per al càncer de pulmó impulsat per KRAS han

fracassat a causa de l'aparició de mecanismes de resistència compensatoris o adaptatius. Aquesta és una limitació clara, que exigeix el desenvolupament de nous enfocaments terapèutics per cobrir tot l'espectre de mutacions de KRAS. Per fer front a aquesta necessitat no satisfeta, en aquest projecte hem demostrat que la inhibició de MYC és una estratègia terapèutica eficaç per tractar tumors mutats en KRAS, fins i tot en presència de diferents mutacions concomitants de TSG, i ha demostrat la màxima eficàcia en els tumors amb mutacions de KRAS i P53, seguits dels que només tenen mutacions en KRAS. A més, hem observat una profunda modulació de la resposta immunitària antitumoral després del tractament amb Omomyc, i ha canviat el microambient tumoral cap a un estat més immunoestimulador. Amb aquests resultats, hem proporcionat la prova de concepte que la inhibició de MYC és beneficiosa per a pacients amb NSCLC impulsat per KRAS amb diferents perfils mutacionals, fet que podria influir en la decisió clínica d'afegir aquests pacients a assajos clínics que avaluïn una teràpia anti-MYC.

La immunoteràpia ha estat recentment aprovada com a monoteràpia de primera línia o en combinació amb quimioteràpia estàndard per al tractament de pacients amb NSCLC avançat. Tot i així, malgrat que alguns pacients han mostrat respostes notables, els inhibidors dels punts de control immunitari (ICI) no mostren eficàcia contra la gran majoria dels tumors amb mutacions de KRAS, a causa de la resistència innata o adquirida. Això es pot explicar per la presència de diferents patrons d'implicació del sistema immunitari desencadenats per mutacions concomitants en gens supressors de tumors com *P53*, *STK11* i *KEAP1*. Els resultats derivats d'aquest projecte sustenten aquesta hipòtesi, ja que hem demostrat que el microambient immunològic tumoral és diferent entre els tumors que presenten aquests perfils mutacionals i que es converteix en un microambient més immunosupressor a mesura que els tumors evolucionen. Aquest grau d'immunosupressió depèn del perfil mutacional, i els tumors menys immunosupressors són aquells amb mutacions KRAS i P53 o amb mutació només de KRAS. De fet, és interessant que aquests dos perfils mutacionals són els que mostren un canvi immune més profund després del tractament amb Omomyc.

Basant-nos en aquests resultats, hem fet experiments per avaluar la sinergia entre la inhibició de MYC i dues immunoteràpies clínicament disponibles. Els nostres resultats han demostrat la notable sinergia terapèutica assolida a través d'aquests tractaments combinats. Identificar estratègies de combinació amb activitat antitumoral sinèrgica,

dissenyades per contrarestar la resistència immunoterapèutica, podria oferir teràpies de primera línia per als pacients amb NSCLC, cosa que permetria personalitzar els tractaments contra el càncer per als diferents subgrups de pacients i, així, revelar noves estratègies d'intervenció per al tractament d'aquest grup de pacients encara altament desatès. És important destacar que, ja que Omomyc s'està provant actualment en assajos clínics, els resultats d'aquest projecte poden tenir un impacte clínic significatiu, ja que proporcionen una base sòlida per a nous braços en estudis de fase I o II per a pacients amb mutacions de KRAS amb perfils mutacionals diversos. En aquests casos, Omomyc es podria utilitzar com a teràpia combinatòria per potencialment erradicar els tumors considerats actualment resistents a la immunoteràpia. Tenint en compte que, fins ara, no hi ha opcions terapèutiques efectives per als tumors amb mutacions en KRAS, aquest projecte proporciona la prova de concepte per a noves combinacions de medicaments que podrien proporcionar als pacients amb càncer de pulmó teràpies més efectives i menys tòxiques, cosa que reduiria substancialment els costos assistencials actuals i milloraria la qualitat de vida dels pacients. És important assenyalar que, atès que les mutacions de KRAS són predominants en el càncer de pàncrees i en el colorectal, l'aplicació potencial d'aquests tractaments combinats a aquests tipus de tumors molt prevalents promet tenir un impacte clínic encara més substancial.

En conclusió, aquest projecte de La Marató ha obert una nova línia de recerca que pot tenir un avanç clínic ràpid i substancial. En aquest context, també estem explorant activament la sinergia terapèutica aconseguida combinant Omomyc amb inhibidors de KRAS que han estat recentment aprovats, una línia d'investigació que ja ha proporcionat resultats molt prometedors.

4. Bibliografia científica generada

Els resultats d'aquest projecte s'han presentat en nombroses conferències estatals i internacionals mitjançant presentacions tant en format de pòster com orals:

- 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, setembre del 2022.

Pòster.

- 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), l'Algarve (Portugal), octubre del 2022.

Pòster.

- 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 del 2022.

Pòster.

- 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, novembre del 2022.

Comunicació 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, desembre del 2022.

Pòster.

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

Mòdul de Biologia del Càncer a la Brunel University, Londres (Regne Unit), febrer del 2023. Ponent convidat.

- 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.

Presentat al Biomarkers of Response in Novel Molecular Therapeutics Minisymposium, a l'ACR 2023 Annual Meeting, Orlando (EUA), abril del 2023.

Ponent seleccionat.

- 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, organitzat per la European Association for Cancer Research (EACR), Barcelona, maig del 2023.

Pòster.

- Laura Soucek *et al.*

Progress in the development of a clinically viable MYC inhibitor.

EACR 2023 Congress: Innovative Cancer Science, Torí (Itàlia), juny del 2023.

Pòster.

- 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, novembre del 2023.

Comunicació 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, novembre del 2023.

Pòster.

El desenvolupament d'aquest projecte ha donat lloc a les publicacions científiques següents:

- Casacuberta-Serra S, González-Larreategui I, Capitán-Leo D, Soucek L.
MYC and KRAS Cooperation: From Historical Challenges to Therapeutic Opportunities in Cancer.

En segona revisió a *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 (comentari editorial).

S'estan preparant altres publicacions científiques que inclouen tots els resultats derivats d'aquest projecte per presentar-les a revistes d'alt impacte.