

## Desarrollo de nuevas estrategias inmunoterapéuticas en la Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil

### 1. Equipo investigador

#### Investigador principal

**Dr. Segundo González Rodríguez**, Catedrático de Inmunología y Jefe del Grupo de Inmunología Tumoral del ISPA y del Instituto Universitario Oncológico del Principado de Asturias (IUOPA). Despacho D02, 4ª planta, Facultad de Medicina. Oviedo. España. Teléfono: 600864704. Email: [segundog@uniovi.es](mailto:segundog@uniovi.es)

#### Investigadores colaboradores

El presente proyecto será llevado a cabo por un equipo multidisciplinar formado por la unión de 3 grupos: Investigadores básicos del grupo de Inmunología Tumoral del ISPA/IUOPA, investigadores matemáticos del Grupo de Problemas Inversos, Optimización y Aprendizaje Automático de la Universidad de Oviedo y por investigadores clínicos especialistas en oncología infantil del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) (oncólogos y hematólogos pediátricos). El equipo investigador está formado por:

**Dra. Pilar Palomo Moraleda**, Adjunto especialista de área de Hematología Pediátrica y trasplante del HUCA.

**Dr. José Antonio Villegas Rubio**, FEA de Pediatría Oncológica, HUCA.

**Dra. Ana Pilar González Rodríguez**, FEA del Servicio de Hematología, HUCA. Profesora Asociada de Hematología de la Universidad de Oviedo y miembro del Grupo de Inmunología Tumoral del ISPA/ IUOPA.

**Dr. Juan Luís Fernández**, Catedrático del Departamento de Matemáticas, Universidad de Oviedo. Grupo de Problemas Inversos.

**Dra. María Zulima Fernández Muñiz**, Profesora Titular del Departamento de Matemáticas, Universidad de Oviedo. Grupo de Problemas Inversos.

**Dr. Enrique de Andrés Galiana**, ayudante doctor del departamento de Matemáticas, Universidad de Oviedo. Grupo de Problemas Inversos.

**Dr. Alejandro López-Soto**, ayudante doctor del departamento de Bioquímica, Universidad de Oviedo. Miembro del Grupo de Inmunología Tumoral del ISPA/ IUOPA.

**Dra. Seila Lorenzo Herrero**, investigadora postdoctoral del Grupo de Inmunología Tumoral del ISPA/IUOPA, Universidad de Oviedo.

**Christian Sordo Bahamonde**, investigador predoctoral del Grupo de Inmunología Tumoral del ISPA/IUOPA, Universidad de Oviedo.

**Alejandra Martínez Pérez**, investigador predoctoral del Grupo de Inmunología Tumoral del ISPA/IUOPA, Universidad de Oviedo.

## 2. Resumen del proyecto

La respuesta inmune antitumoral está frecuentemente inhibida en cáncer por proteínas co-inhibidoras, denominadas *checkpoints*, como PD-1 o CTLA-4. El bloqueo de estos *checkpoints* está obteniendo un éxito notable en el tratamiento de múltiples cánceres, mejorando no solo la supervivencia de los pacientes, sino su calidad de vida gracias a su baja toxicidad. Los receptores LIR (*Leukocyte Immunoglobulin-Like receptors*) son una nueva familia de *checkpoints* cuyo papel en cáncer está aún por dilucidar. Nuestro grupo ha descrito que un miembro de esta familia, ILT2, desempeña un papel relevante en la evasión inmune en la leucemia linfática crónica y, mediante análisis preliminar *in silico*, hemos observado que también podría estar implicado en la patogenia de la leucemia linfoblástica aguda (LLA). El objetivo de este proyecto es analizar la aplicación potencial de los receptores LIR como nuevas dianas terapéuticas en la LLA. Para ello se pretende: (1) Analizar *in silico* el papel de los receptores de la familia LIR en la patogenia de la LLA. (2) Determinar su expresión en las células leucémicas e inmunes de pacientes con LLA infantil y correlacionar su expresión con las características clínicas de los pacientes. (3) Analizar *ex vivo* si el bloqueo de los receptores LIR o su delección mediante CRISPR-Cas9 incrementa la actividad antitumoral de células inmunes en la LLA. (4) Analizar *ex vivo* la toxicidad causada sobre células inmunes por el bloqueo de los receptores LIR. Los resultados de este proyecto podrían favorecer el desarrollo de nuevas estrategias inmunoterapéuticas en esta enfermedad que podrían aumentar la supervivencia de los pacientes y reducir la toxicidad de las terapias actuales, lo que mejoraría la calidad de vida de los pacientes.

## 3. Antecedentes

El sistema inmunitario, y en especial los linfocitos T, son capaces de eliminar o limitar el desarrollo del cáncer gracias a su capacidad de reconocer antígenos (Ag) tumorales presentados por las células presentadoras de antígeno (APC). Además de presentar el Ag, las APC co-expresan una serie de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras (también llamadas *checkpoint proteins*) que determinan la activación o supresión de los linfocitos T [1]. Durante la progresión tumoral, las células tumorales desarrollan múltiples mecanismos de evasión inmune, entre los que destaca la sobreexpresión de proteínas *checkpoint* inhibidoras, como CTLA-4, PD-1, TIM-3 o LAG-3 [2,3]. La señalización sostenida a través de estas moléculas co-inhibidoras induce el agotamiento funcional de los linfocitos T (fenómeno conocido como *exhaustion*), que pierden la capacidad de proliferar, de secretar citocinas y de eliminar células tumorales. Las células NK son células citotóxicas innatas que también están implicadas en la respuesta inmune antitumoral [4]. Son capaces de reconocer a las células tumorales a través de una serie de receptores activadores (i.e. NKG2D) e inhibidores (i.e. KIR) que detectan cambios en la expresión de sus ligandos en las células tumorales. Además de estos receptores, las células NK también expresan proteínas *checkpoint* que regulan su actividad, aunque su papel en estas células ha sido menos estudiado.

El bloqueo de *checkpoints* inmunológicos, como CTLA-4 o PD-1/PD-L1, se ha convertido en una terapia exitosa en diversos tipos de cáncer, como el melanoma o cáncer de pulmón, ya que ha conseguido, por ejemplo, prolongar la supervivencia de los pacientes con melanoma

metastásico de forma significativa [2,3]. También ha sido ampliamente comprobada la implicación de ciertos *checkpoints*, como PD-1, en las malignidades linfoides [5]. De hecho, diversos regímenes terapéuticos que emplean anticuerpos monoclonales (mAb) anti-PD-1 han mostrado eficacia en el tratamiento de linfomas de Hodgkin, folicular y difuso de células grandes.

Una de las ventajas de la inmunoterapia sobre la quimioterapia es su baja toxicidad. La quimioterapia tiene una toxicidad elevada sobre las células sanas, especialmente en proliferación, causando frecuentemente inmunosupresión, pérdida de pelo, alteraciones gastrointestinales y otros múltiples efectos secundarios, no solo a corto y medio plazo, sino también a largo plazo. La gravedad de los efectos secundarios dicta la intensidad con la que la quimioterapia puede ser utilizada en los pacientes. La toxicidad en la inmunoterapia es, generalmente, mucho menor que la causada por la quimioterapia y está mediada fundamentalmente por el desencadenamiento de fenómenos autoinmunes [6]. Por ejemplo, la terapia con pembrolizumab en cáncer pulmonar causa efectos secundarios mucho menores que la quimioterapia, apareciendo efectos de grado 3-4 en el 10% de los pacientes. Además, el uso creciente de la inmunoterapia está ayudando a un mejor manejo de la toxicidad en estos pacientes. En conjunto, por su eficacia y baja toxicidad, se está promoviendo un cambio de paradigma en el tratamiento de muchos tipos de cáncer, pasando de la quimioterapia a la inmunoterapia [7].

### **Leucemia linfoblástica aguda**

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se caracteriza por la infiltración de la médula ósea por blastos de estirpe linfoide [8]. Es el cáncer infantil más frecuente y la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años es del 80%. Atendiendo a la clasificación inmunológica (EGIL), la LLA se divide en dos grandes grupos: LLA de línea B (85-90% de casos y mejor pronóstico) y LLA de línea T (10-15% de casos y peor pronóstico). La estratificación de los pacientes en grupos de riesgo con el objetivo de adaptar la intensidad del tratamiento quimioterápico al riesgo de recaída se realiza en base a las características clínicas, las características de las células leucémicas (inmunofenotipo, citogenética, diagnóstico molecular para determinar la presencia de genes de fusión) y a la respuesta al tratamiento. Además, mediante análisis genómico de alta resolución y análisis mutacionales se han identificado alteraciones génicas que cooperan con las alteraciones cromosómicas en la generación de este tipo de leucemia. Estas alteraciones han permitido caracterizar nuevos subtipos de LLA, particularmente subtipos de precursores de linfocitos B, como t(9;22)(BCR-ABL), t(1;19)(E2A-PBX1), t(12;21)(TEL-AML1), LLA con reordenamiento del gen *MLL* en el cromosoma 11q23 y cariotipo hiperdiploide con más de 50 cromosomas. Dichas alteraciones cuentan con valor pronóstico y permiten identificar subtipos con pobre respuesta o refractariedad al tratamiento [9]. El tratamiento de la LLA infantil se organiza en distintas fases: inducción, consolidación, reinducción y mantenimiento. En éstas, se combinan distintos agentes quimioterápicos, entre los que destacan los corticoesteroides, las antraciclinas, el metotrexato o la citarabina, entre otros [8]. Los mayores problemas de la quimioterapia es la aparición de pacientes quimioresistentes y su alta toxicidad, que se asocia con la aparición de secuelas a largo plazo que comprometen la calidad de vida de los supervivientes de cáncer infantil en la vida adulta. Todo ello está potenciando el estudio de la inmunoterapia como alternativa terapéutica en estos pacientes.

## El sistema inmune e inmunoterapia en la LLA

El papel de los linfocitos T y células NK en el control de la LLA no se ha dilucidado en profundidad. No obstante, existen evidencias que indican la falta de respuesta inmune antileucémica y, en particular, que las células leucémicas de la LLA son muy resistentes a la citotoxicidad mediada por células NK [10]. Esto se debe fundamentalmente a que las células leucémicas no expresan la mayoría de los ligandos de los receptores activadores de las células NK. Adicionalmente, algunas moléculas inhibitoras, como PD-L1 y PD-1, están aumentadas en pacientes con LLA en recaída y refractarios a blinatumomab (BiTE anti CD3/CD19) [11]. Esto sugiere que la evasión inmune desempeña un papel importante en la patogenia de esta enfermedad. Sin embargo, el efecto injerto vs leucemia observado en los pacientes de LLA trasplantados con progenitores hematopoyéticos corrobora que un sistema inmune competente puede desarrollar una respuesta inmune antileucémica eficaz y que la inmunoterapia puede ser una alternativa terapéutica en esta enfermedad [12].

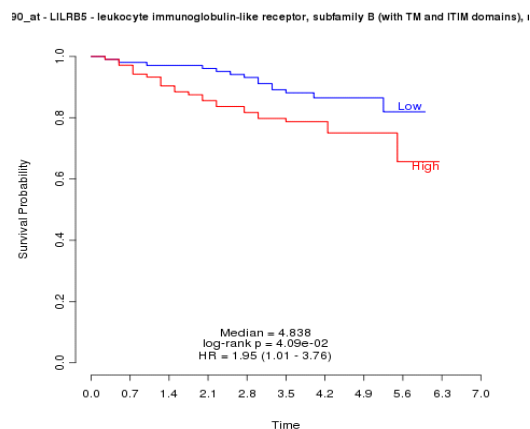
Como hemos mencionado anteriormente la inmunoterapia se está convirtiendo en una alternativa para el tratamiento de los pacientes quimiorresistentes debido a su eficacia y su baja toxicidad. En este campo, el anticuerpo anti-CD20 rituximab se ha usado con éxito en el tratamiento de la LLA de linfocitos B maduros del adulto (linfoma de Burkitt), en niños con LLA refractaria al tratamiento y en leucemias pro-B que expresan CD20 [13]. Además, nuevas estrategias inmunoterapéuticas, como los linfocitos T CAR o el anticuerpo biespecífico (BiTEs) blinatumomab, suponen una revolución en el tratamiento de este tipo de cáncer, especialmente en pacientes quimiorresistentes [14], remarcando el potencial del sistema inmune en la patogenia y el tratamiento de esta enfermedad.

Es de destacar que las respuestas antileucémicas se pueden inducir en las células inmunes efectoras, linfocitos T y células NK, mediante la estimulación con ligandos de receptores activadores o el bloqueo de *checkpoints* inhibidores [15], sugiriendo un papel importante de las proteínas *checkpoint* en la patogenia de esta enfermedad. Sin embargo, el bloqueo de PD-1/PD-L1 o de otros *checkpoint* inhibidores no ha alcanzado hasta ahora la relevancia que se ha obtenido en otros cánceres hematológicos y no hematológicos [16]. Esto apoya la búsqueda de nuevas moléculas *checkpoint* implicadas en la inhibición de la respuesta inmune antitumoral en la LLA.

En este proyecto planteamos el estudio de una familia de *checkpoints* denominada receptores LIR (*leukocyte immunoglobulin-like*), formada por las subfamilias LILRA1-5 y LILRB1-5, cuyo papel en cáncer ha sido poco estudiado. Los genes de estos *checkpoints* se encuentran codificados en una región del genoma relativamente pequeña denominada LRC (*Leukocyte Receptor Cluster*) que se localiza en cromosoma 19. Estos receptores tienen como ligandos principales a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. La subfamilia B de receptores LIR (LILRB1-5) ha sido hasta ahora la más estudiada. Su estructura está formada por 2-4 dominios tipo inmunoglobulina extracelulares, un dominio transmembrana y 2-4 motivos inhibidores citoplasmáticos denominados "*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*" (ITIMs). Sus ligandos son, fundamentalmente, las moléculas de MHC de clase I clásicas (HLA-A, HLA-B, y HLA-C) y no clásicas (HLA-E, HLA-F y HLA-G) y transduce señales negativas que inhiben la respuesta inmune y previenen la autoinmunidad [17,18]. A pesar de no haber sido estudiado en profundidad, se ha descrito que algunos

miembros de la familia *LILRB* participan en la evasión inmune en diferentes tipos de cáncer [19]. El más estudiado es el receptor *ILT2* (*Ig-like transcript 2*; también llamado *CD85j*, *LILRB1*, o *LIR-1*) que se expresa en linfocitos B, linfocitos T, células NK y otras células inmunes y ejerce una función inhibidora cuando interacciona con las moléculas MHC de clase I principalmente no clásicas que están frecuentemente desreguladas en cáncer. Así, se ha detectado una sobreexpresión de HLA-G en varios tipos de tumores, incluyendo cánceres hematológicos como la leucemia linfática crónica (LLC), donde ha sido descrito como un mecanismo de escape que promueve la progresión tumoral [20]. Nuestro grupo ha descrito que la expresión de *ILT2* está significativamente reducida en los pacientes con LLC, mientras que está sobreexpresado en linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 y células NK [21,22]. En este tipo de leucemia, *ILT2* suprime la respuesta inmune antitumoral, y consecuentemente, el bloqueo de *ILT2* restaura la actividad antileucémica de los linfocitos T y células NK de los pacientes de LLC, lo que incrementa la sensibilidad de las células leucémicas a la apoptosis mediada por agentes quimioterápicos. De estas observaciones experimentales se deduce que *ILT2* puede ser una diana potencial para la inmunoterapia en la LLC.

Estudios preliminares *in silico* realizados por nuestro grupo empleando datos transcriptómicos de pacientes de LLA obtenidos de las bases de datos The Cancer Genome Atlas Program (TCGA), Gene Expression Omnibus (GEO) y The Georgetown Database of Cancer (G-DOC) nos indican que la expresión de diversos miembros de la familia de receptores LIR, incluido *LILRB1/ILT2*, está desregulada en las células cancerígenas de diversos cánceres hematológicos derivados de linfocitos B, como el linfoma folicular, linfoma difuso, mieloma múltiple y LLA, y, además, su alta expresión se asocia con un peor pronóstico de estos pacientes, sugiriendo que la familia de receptores LIR podría desempeñar un papel relevante en la evasión inmune de los tumores derivados de linfocitos B. Como ejemplo mostramos el efecto de *LILRB5* en la supervivencia de los pacientes pediátricos de LLA (Figura 1).



**Figura 1.** Asociación de *LILRB5* a la supervivencia de los pacientes pediátricos de LLA. Los datos transcriptómicos y clínicos fueron obtenidos de la base de datos TCGA.

En base a los antecedentes descritos, el objetivo principal de este proyecto es la búsqueda de nuevas dianas inmunoterapéuticas en la LLA infantil que mejoren, no solo la supervivencia a largo plazo de los pacientes, sino su calidad de vida gracias a terapias menos

agresivas y, que, por tanto, originarían menos secuelas a largo plazo que los tratamientos quimioterápicos de uso actual. A este respecto, el bloqueo de proteínas *checkpoint* clave en la LLA, como por ejemplo ILT2 u otros miembros de la familia LIR, podría suponer una estrategia alternativa para el manejo clínico de este tipo de cáncer.

#### 4. Hipótesis y objetivos

La actividad antitumoral de los linfocitos T y las células NK está frecuentemente inhibida en cáncer debido a la sobreexpresión de diversos receptores inhibidores inmunológicos denominados *checkpoints*, como, por ejemplo, PD-1 o CTLA-4. El bloqueo de estas vías inhibitoras inmunes se está convirtiendo en una estrategia exitosa en el tratamiento de diversos tipos de cáncer debido a su alta eficacia y baja toxicidad. En este contexto, los receptores LIR son una nueva familia de *checkpoint* que inhibe la actividad de linfocitos T y células NK y cuyo papel en cáncer está aún por dilucidar. Nuestro grupo ha observado que un miembro de esta familia, ILT2, desempeña un papel relevante en la evasión inmune en la LLC y puede ser una nueva diana terapéutica en esta enfermedad. Aunque no se conoce la implicación de ILT2 en la LLA infantil, resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo mediante un análisis *in silico* muestran que la expresión de ILT2 y otros miembros de su familia podría también estar implicada en la patogenia de este cáncer, abriendo la puerta al estudio de su potencial como diana terapéutica en esta enfermedad.

Este proyecto tiene como **objetivo principal** analizar el papel del sistema inmune en la LLA infantil y la aplicación potencial de una nueva estrategia inmunoterapéutica en su tratamiento como alternativa a la quimioterapia convencional que presenta efectos adversos y toxicidad significativa. Para ello, se pretende analizar el papel de ILT2 y otros miembros de la familia de receptores LIR como nuevas dianas terapéuticas en la LLA. Asimismo, se determinará los efectos tóxicos de estos nuevos tratamientos en la viabilidad de células inmunes sanas y se comparará con los tratamientos quimioterápicos convencionales. Esto permitirá evaluar el posible impacto de su administración en la toxicidad causada a los pacientes, determinando si supondrían una disminución en la misma respecto a las líneas clásicas de tratamiento.

Los **objetivos específicos** de este estudio son:

- Analizar *in silico* del papel de los receptores de la familia LIR en la patogenia de la LLA.
- Determinar la expresión de los receptores LIR más relevantes y sus ligandos en las células leucémicas e inmunes de pacientes con LLA infantil y correlacionar su expresión con las características clínicas de los pacientes.
- Analizar *ex vivo* si el bloqueo de los receptores LIR o su delección mediante CRISPR-Cas9 incrementa la actividad antitumoral de células inmunes en la LLA.
- Analizar *ex vivo* la toxicidad causada por el bloqueo de los receptores LIR en las células inmunes.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Predicción computacional mediante análisis *in silico*:

El análisis bioinformático *in silico* será realizado a partir de datos clínicos, genéticos y transcriptómicos de pacientes de LLA pediátrica obtenidos de bases genéticas, de *microarrays* y transcriptómicas de The Cancer Genome Atlas Program (TCGA), Gene Expression Omnibus (GEO) y The Georgetown Database of Cancer (G-DOC). Dicho estudio será liderado por los investigadores del Departamento de Matemáticas de la Universidad de Oviedo y el Grupo de Problemas Inversos, Optimización y Aprendizaje Automático de la Universidad de Oviedo (JL Fernández, Zulima Fernández y Enrique deAndres) en colaboración con el Centro de Inteligencia Artificial de Gijón.

Métodos: Obtendremos los datos transcriptómicos, genómicos, clínicos y de respuesta a la terapia de pacientes pediátricos de LLA. A partir de estos datos, serán determinados los *checkpoint* inmunológicos, incluidos los miembros de la familia LIR, que se expresan diferencialmente y se correlacionará su expresión con la supervivencia, respuesta al tratamiento y las características clínicas de los pacientes. Para ello aplicaremos técnicas de inteligencia artificial empleando algoritmos del estado del arte de la predicción y, en particular, diferentes técnicas de muestreo descritas por nuestro grupo en diferentes publicaciones que servirán para determinar el poder predictor de las variables monitorizadas en cada problema de predicción, establecer la firma predictiva a pequeña escala y entrenar diferentes predictores (robots biomédicos) que realizarán predicciones con su incertidumbre asociada. Estos algoritmos pueden actualizarse dinámicamente según vayan llegando nuevos datos utilizando en diferentes centros utilizando las técnicas de aprendizaje federado. Mediante un estudio preliminar *in silico* que ya hemos realizado hemos observado la potencial implicación de los diversos receptores inhibidores de la familia LIR en la patogenia y desarrollo de la LLA infantil, lo que valida la viabilidad de esta aproximación.

### 5.2. Análisis de la expresión de los receptores LIR en los pacientes de LLA. Implicaciones clínicas:

Analizaremos 10-15 muestras de pacientes con LLA infantil procedentes del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA, Oviedo) y un número similar de controles sanos. La Dra. Pilar Palomo, el Dr. Villegas y la Dra. Ana P González se encargarán del reclutamiento de los pacientes y de realizar los datos clínicos y analíticos de los pacientes, así como de su seguimiento. En ambos casos, se obtendrá el pertinente consentimiento informado previo a la recogida de las muestras. Una vez obtenidas dichas muestras, se purificarán las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) por centrifugación en gradiente de Ficoll y, en algunos casos, se aislarán las diferentes subpoblaciones linfocitarias (linfocitos B, linfocitos T y/o células NK) empleando kits comerciales de purificación. Asimismo, también se emplearán líneas celulares derivadas de pacientes de LLA en los experimentos pertinentes.

El fenotipado de las células inmunitarias se realizará mediante citometría de flujo. Las distintas poblaciones serán definidas de la siguiente manera: linfocitos B (CD19+), linfocitos T CD4 (CD3+CD4+), linfocitos T CD8 (CD3+CD8+), células NK (CD3-CD56+) y células NKT (CD3+CD56+). Las células leucémicas se determinarán en base a los siguientes marcadores: LLA

común (CD10+CD19+HLA-DR+), LLA de linfocitos T (CD3+CD5+CD7+) y LLA de linfocitos B (CD19+CD20+). En estas poblaciones se analizará la expresión de aquellos *checkpoint* candidatos seleccionados por los estudios *in silico*, incluido ILT2. Asimismo, se evaluará la expresión de los ligandos de dichas moléculas (moléculas de MHC de clase I) en líneas celulares derivadas de LLA, así como en células leucémicas de pacientes con LLA. En paralelo, se analizará la expresión de las proteínas de interés en muestras de individuos sanos *ex vivo*. Los datos fenotípicos obtenidos serán correlacionados con las características clínicas, genéticas y citogenéticas de los pacientes para poder establecer el papel de estas moléculas en la patogenia de la enfermedad.

### **5.3. Papel de los receptores LIR en la respuesta inmune en la LLA infantil.**

La actividad de ILT2 y aquellos receptores LIR más relevantes obtenidos en los estudios *in silico* será analizada funcionalmente. Estos experimentos serán realizados mediante el co-cultivo *ex vivo* de células inmunes y células leucémicas, o líneas tumorales de LLA, en los que ILT2 y los receptores de la familia LIR seleccionados serán bloqueados usando anticuerpos monoclonales bloqueantes (cuándo estén disponibles) o serán delecionados en linfocitos T o células NK usando la técnica CRISPR-Cas 9 siguiendo la estrategia publicada por Mathewson et al, Cell, 2021 para eliminar la expresión en linfocitos T del *checkpoint* CD161 y otras moléculas inmunológicas relevantes. Estos experimentos serán realizados en colaboración con la Dra. Juana María García Pedrero del grupo de Cabeza y Cuello de la FINBA. El efecto del bloqueo o la deleción de los receptores LIR será evaluado mediante el análisis de su efecto en la activación de las células inmunes (análisis de CD69, CD25, CD137 mediante citometría de flujo) y proliferación de las diferentes poblaciones inmunes (técnica de CFSE), la producción de citocinas (marcaje intracelular y citometría de flujo y/o ELISA) y la citotoxicidad contra células leucémicas de la LLA (producción de granzima y perforina, análisis de la expresión de CD107a y técnica de la calceína-AM).

Asimismo, se estudiará si el bloqueo/eliminación de los receptores LIR tiene un efecto cooperativo con diferentes agentes quimioterápicos en la eliminación de las células leucémicas mediante el estudio de la apoptosis de las células leucémicas purificadas y en presencia de células inmunes efectoras.

### **5.4. Efecto del bloqueo de los receptores LIR en la toxicidad de células inmunes sanas.**

Para analizar el efecto tóxico en células inmunes sanas, se obtendrán PBMCs de controles sanos que se cultivarán en presencia de dosis crecientes del tratamiento y se calculará la IC<sub>50</sub> para cada una de las poblaciones inmunes (linfocitos B, linfocitos T CD4 y CD8, células NK y monocitos). La viabilidad y apoptosis de las distintas poblaciones linfocitarias se analizará mediante el marcaje con DIOC<sub>6</sub>(3) y posterior análisis mediante citometría de flujo. En paralelo, se comparará la toxicidad sobre las células del sistema inmune producida por tratamientos quimioterápicos de primera línea en la LLA.

## **6. Distribución de tareas**

Los investigadores del Grupo de Problemas Inversos (JL Fernández, Z. Fernández, E deAndres) realizarán los estudios *in silico*.



La Dra. Palomo, Dr. Villegas y AP Gonzalez se encargarán del reclutamiento de los pacientes, de los análisis clínicos y de laboratorio pertinentes y del seguimiento de los pacientes.

Las muestras de los pacientes serán enviadas al laboratorio de Inmunología Tumoral donde serán realizados los estudios *in vitro* y *ex vivo* por A Lopez, S Lorenzo y C Sordo. La estudiante de doctorado Alejandra Fernández realizará parte de su Tesis Doctoral en este proyecto.

Los experimentos de CRISPR-Cas9 serán realizados en colaboración con la Dra. Juana García y el grupo de Cabeza y Cuello de la FINBA.

## 6. Novedad, relevancia científica e interés de la investigación

A pesar de la efectividad de la quimioterapia en la LLA infantil, esta línea de terapia presenta una elevada toxicidad y no es efectiva en todos los pacientes, lo que ha promovido la investigación de nuevos tratamientos que sean menos tóxicos y que puedan beneficiar a pacientes en recaída y resistentes a la quimioterapia. En este contexto, la inmunoterapia puede suponer una alternativa muy prometedora para la LLA infantil, ya que existe una acumulación creciente de datos que indica que la respuesta inmunitaria antitumoral juega un papel muy relevante en la patogenia de numerosos tipos de cáncer y en especial en este tipo de cáncer. La introducción de los BITEs o los linfocitos T CAR está cambiando rápidamente las perspectivas del tratamiento de la LLA infantil, especialmente en pacientes refractarios, lo que remarca la potencialidad del sistema inmunitario en el manejo clínico de la LLA infantil y en la mejora de la calidad de vida de estos pacientes. En este contexto, el estudio de moléculas inhibitoras o *checkpoints* de la respuesta inmune, como PD-1, en cáncer es uno de los campos más activos y atractivos de investigación en la actualidad. La eficacia del bloqueo de PD-1 en melanoma está suponiendo una revolución en el tratamiento del cáncer, lo que ha abierto la puerta para su estudio y su aprobación en otros tipos de tumores, como el cáncer microcítico de pulmón o el linfoma de Hodgkin, aunque hasta ahora no ha alcanzado la misma relevancia en la LLA.

El presente proyecto pretende estudiar el papel de nuevas proteínas *checkpoint* en la respuesta inmune antitumoral en la LLA infantil. El estudio de nuevas moléculas inmunomoduladoras, como la familia de receptores LIR, puede proporcionar nuevas dianas terapéuticas que superen la efectividad de las líneas de tratamiento actuales y/o disminuyan la comorbilidad en estos pacientes. Además, se pretende estudiar si el bloqueo/delección de ILT2 o de otros *checkpoint* puede tener un efecto cooperativo con los tratamientos clásicos de esta enfermedad, como la quimioterapia. Esto podría permitir el diseño de nuevas terapias combinadas en LLA infantil. Por último, el desarrollo de terapias basadas en la modulación del sistema inmune a través del bloqueo de *checkpoints* inmunológicos puede proporcionar una alternativa con menor toxicidad asociada en comparación con los regímenes de tratamiento empleados actualmente en la LLA infantil, que incluyen quimioterapia. Esto potencialmente reduciría sustancialmente las secuelas a largo plazo y mejoraría significativamente la calidad de vida de estos pacientes, otro de los objetivos principales del presente proyecto.

En resumen, este estudio puede servir a nivel práctico para:

1. Obtener un mejor conocimiento de la respuesta inmune en la LLA y el posible papel de las moléculas *checkpoint* en la patogenia y pronóstico de dicha enfermedad.
2. Determinar si la activación del sistema inmunitario con inhibidores de *checkpoints* inmunológicos puede restaurar la respuesta inmune anti-leucémica y puede convertirse en una nueva estrategia inmunoterapéutica en esta enfermedad.
3. Favorecer el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en la LLA basadas en la combinación del bloqueo de *ILT2*, o de otros *checkpoint*, con la quimioterapia convencional.
4. Describir terapias alternativas que reduzcan la aparición de efectos adversos a largo plazo en los pacientes de LLA infantil, mejorando la calidad de vida de los supervivientes en la vida adulta.

## 7. Relevancia de la colaboración entre 2 grupos diferentes

Este proyecto establece una colaboración entre diferentes grupos de investigación tanto básicos como clínicos y la colaboración de profesionales de diferentes ámbitos y formación como son médicos, biólogos, bioquímicos y matemáticos. En este proyecto colabora un grupo clínico formado por hematólogos y oncólogos infantiles (Dra. Palomo y Dr. Villegas) del Hospital Universitario Central de Asturias que se encargarán del reclutamiento y estudios clínicos de este proyecto. Junto con un grupo de investigadores matemáticos del Grupo de Problemas Inversos de la Universidad de Oviedo especialistas en la Minería de Datos y Análisis Bioinformáticos (Dr. JL Fernández, Dra. Zulima Fernández, Dr. E. deAndres) que se encargarán de los estudios *in silico* y estadísticos de este proyecto. Por último, también participa el grupo de Inmunología Tumoral del ISPA/IUOPA al que pertenece el IP del proyecto y que se encargará de los estudios experimentales de este proyecto (Dr. Alejandro Soto, Dra. Seila Lorenzo y los investigadores predoctorales Christian Sordo y Alejandra Fernández). La técnica de CRISPR-Cas9 será desarrollada en colaboración con otro grupo del ISPA, liderado por la Dra. García Pedrero y el Dr. Llorente del grupo de Cabeza y Cuello de la FINBA.

En resumen, consideramos que la unión de clínicos e investigadores básicos se presenta como la forma más adecuada para poder sacar adelante proyectos traslacionales como éste, que permitan la transferencia de conocimientos básicos al entorno clínico y derive en beneficios para los pacientes.

## 8. Presupuesto

Una gran parte del proyecto se basa en análisis fenotípico y funcional de muestras de pacientes y controles sanos. Por ello, se requiere presupuesto para el siguiente fungible:

1. Kits y reactivos para la **extracción y purificación** de células inmunológicas y células leucémicas: 800 euros.

2. Medios y material de **cultivo celular** para cultivo de células procedentes de pacientes con LLA infantil e individuos sanos, así como para líneas celulares: 600 euros.

3. Reactivos para llevar a cabo los estudios de la **función inmune**, entre los que se incluyen los ensayos de proliferación (CFSE assay), producción de citocinas (ELISA o citometría de flujo) o citotoxicidad (métodos fluorimétricos o citometría de flujo): 1.200 euros.

4. Anticuerpos y reactivos para **citometría de flujo**. Tanto el fenotipado de poblaciones linfocitarias y células leucémicas como el estudio de marcadores de diferenciación, activación, etc., conllevan el uso de anticuerpos marcados con fluorocromos: 1.200 euros.

5. Uso del **servicio de citometría** de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo: 1.000 euros.

Presupuesto estimado de fungible: 4.800 euros.

Coste de personal: 5.200 euros para financiar a tiempo parcial la implicación de un investigador predoctoral que se forme con el desarrollo de este proyecto.

Coste total: 10.000 euros.

## 9. Referencias bibliográficas

1. Dunn, G.P.; Bruce, A.T.; Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **2002**, *3*, 991-998, doi:10.1038/ni1102-991.
2. Darvin, P.; Toor, S.M.; Sasidharan Nair, V.; Elkord, E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med* **2018**, *50*, 1-11, doi:10.1038/s12276-018-0191-1.
3. Topalian, S.L.; Drake, C.G.; Pardoll, D.M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 450-461, doi:10.1016/j.ccell.2015.03.001.
4. Morvan, M.G.; Lanier, L.L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* **2016**, *16*, 7-19, doi:10.1038/nrc.2015.5.
5. Xia, Y.; Jeffrey Medeiros, L.; Young, K.H. Signaling pathway and dysregulation of PD1 and its ligands in lymphoid malignancies. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1865*, 58-71, doi:10.1016/j.bbcan.2015.09.002.
6. Naidoo, J.; Page, D.B.; Li, B.T.; Connell, L.C.; Schindler, K.; Lacouture, M.E.; Postow, M.A.; Wolchok, J.D. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann Oncol* **2015**, *26*, 2375-2391, doi:10.1093/annonc/mdv383.
7. Waldman, A.D.; Fritz, J.M.; Lenardo, M.J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* **2020**, *20*, 651-668, doi:10.1038/s41577-020-0306-5.
8. Inaba, H.; Mullighan, C.G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **2020**, *105*, 2524-2539, doi:10.3324/haematol.2020.247031.
9. Terwilliger, T.; Abdul-Hay, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* **2017**, *7*, e577, doi:10.1038/bcj.2017.53.
10. Romanski, A.; Bug, G.; Becker, S.; Kampfmann, M.; Seifried, E.; Hoelzer, D.; Ottmann, O.G.; Tonn, T. Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol* **2005**, *33*, 344-352, doi:10.1016/j.exphem.2004.11.006.

11. Feucht, J.; Kayser, S.; Gorodezki, D.; Hamieh, M.; Doring, M.; Blaeschke, F.; Schlegel, P.; Bosmuller, H.; Quintanilla-Fend, L.; Ebinger, M., et al. T-cell responses against CD19+ pediatric acute lymphoblastic leukemia mediated by bispecific T-cell engager (BiTE) are regulated contrarily by PD-L1 and CD80/CD86 on leukemic blasts. *Oncotarget* **2016**, *7*, 76902-76919, doi:10.18632/oncotarget.12357.
12. Passweg, J.R.; Tiberghien, P.; Cahn, J.Y.; Vowels, M.R.; Camitta, B.M.; Gale, R.P.; Herzig, R.H.; Hoelzer, D.; Horowitz, M.M.; Ifrah, N., et al. Graft-versus-leukemia effects in T lineage and B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* **1998**, *21*, 153-158, doi:10.1038/sj.bmt.1701064.
13. Dworzak, M.N.; Schumich, A.; Printz, D.; Potschger, U.; Husak, Z.; Attarbaschi, A.; Basso, G.; Gaipa, G.; Ratei, R.; Mann, G., et al. CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. *Blood* **2008**, *112*, 3982-3988, doi:10.1182/blood-2008-06-164129.
14. Aldoss, I.; Bargou, R.C.; Nagorsen, D.; Friberg, G.R.; Baeuerle, P.A.; Forman, S.J. Redirecting T cells to eradicate B-cell acute lymphoblastic leukemia: bispecific T-cell engagers and chimeric antigen receptors. *Leukemia* **2017**, *31*, 777-787, doi:10.1038/leu.2016.391.
15. Cardoso, A.A.; Seamon, M.J.; Afonso, H.M.; Ghia, P.; Boussiotis, V.A.; Freeman, G.J.; Gribben, J.G.; Sallan, S.E.; Nadler, L.M. Ex vivo generation of human anti-pre-B leukemia-specific autologous cytolytic T cells. *Blood* **1997**, *90*, 549-561.
16. Batlevi, C.L.; Matsuki, E.; Brentjens, R.J.; Younes, A. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol* **2016**, *13*, 25-40, doi:10.1038/nrclinonc.2015.187.
17. Colonna, M.; Navarro, F.; Bellon, T.; Llano, M.; Garcia, P.; Samaridis, J.; Angman, L.; Cella, M.; Lopez-Botet, M. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* **1997**, *186*, 1809-1818, doi:10.1084/jem.186.11.1809.
18. Cosman, D.; Fanger, N.; Borges, L.; Kubin, M.; Chin, W.; Peterson, L.; Hsu, M.L. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* **1997**, *7*, 273-282, doi:10.1016/s1074-7613(00)80529-4.
19. Deng, M.; Chen, H.; Liu, X.; Huang, R.; He, Y.; Yoo, B.; Xie, J.; John, S.; Zhang, N.; An, Z., et al. Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B: therapeutic targets in cancer. *Antib Ther* **2021**, *4*, 16-33, doi:10.1093/abt/tbab002.
20. Rebmann, V.; Nuckel, H.; Duhrsen, U.; Grosse-Wilde, H. HLA-G in B-chronic lymphocytic leukaemia: clinical relevance and functional implications. *Semin Cancer Biol* **2007**, *17*, 430-435, doi:10.1016/j.semcancer.2007.06.011.
21. Villa-Alvarez, M.; Sordo-Bahamonde, C.; Lorenzo-Herrero, S.; Gonzalez-Rodriguez, A.P.; Payer, A.R.; Gonzalez-Garcia, E.; Villa-Alvarez, M.C.; Lopez-Soto, A.; Gonzalez, S. Ig-Like Transcript 2 (ILT2) Blockade and Lenalidomide Restore NK Cell Function in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Immunol* **2018**, *9*, 2917, doi:10.3389/fimmu.2018.02917.
22. Villa-Alvarez, M.; Lorenzo-Herrero, S.; Gonzalez-Rodriguez, A.P.; Lopez-Soto, A.; Payer, A.R.; Gonzalez-Garcia, E.; Huergo-Zapico, L.; Gonzalez, S. Ig-like transcript 2 (ILT2) suppresses T cell function in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1353856, doi:10.1080/2162402X.2017.1353856.