

TÍTULO DEL PROYECTO: NUEVO TRATAMIENTO DIRIGIDO Y PERSONALIZADO DE NEUROBLASTOMAS DE ALTO RIESGO

CENTRO DE EJECUCIÓN: INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA LA FE

Laboratorio de Investigación Clínica y Traslacional en Cáncer

INFORME DE RESULTADOS 2018

El objetivo fundamental de este proyecto de investigación es el identificar nuevas dianas terapéuticas y generar nuevos fármacos para el tratamiento dirigido de neuroblastomas con amplificación del oncogén *MYCN*. El abordaje de este proyecto de investigación se ha centrado en dos aproximaciones distintas pero a la vez complementarias. En primer lugar hemos buscado genes regulados por *MYCN* que pudieran estar implicados en su función oncogénica y contra los cuales dirigir farmacología conocida (objetivos 1 y 2). En segundo lugar, en base a la estructura tridimensional de la proteína *MYCN* hemos diseñado dos pequeños compuestos que potencialmente pudieran interaccionar con su superficie y bloquear su actividad biológica. En este segundo apartado vamos a sintetizar las dos nuevas moléculas y vamos a estudiar su actividad biológica *in vitro* y llegado el caso *in vivo* en modelos animales (objetivo 3).

Objetivo 1: Estudio *in vitro* con líneas celulares y cultivos primarios derivados de tumores de pacientes de nuestro hospital de la sensibilidad a AG-221. Con respecto al estudio de genes regulados por *MYCN*, nuestros estudios preliminares con distintas cohortes de pacientes con neuroblastoma nos revelaron que existe una significativa asociación entre la expresión de *MYCN* y la expresión de *IDH2*, una encima del metabolismo que forma parte del ciclo de Krebs. Se ha descrito la mutación oncogénica R140Q de *IDH2* en gliomas y leucemias linfocíticas agudas. Esta mutación es responsable de la sobreproducción de un oncometabolito, el 2-hidroxiglutarato (2HG), que interacciona con el factor de hipoxia *HIF1A* estabilizándolo y aumentando la angiogénesis. Además, 2HG actúa alostéricamente inhibiendo a las dioxigenasas, enzimas encargadas de desmetilar el DNA y las histonas, resultando en cambios epigenéticos notables en todo el genoma de la célula cancerosa.

Con objeto de estudiar si la regulación de *MYCN* sobre *IDH2* es directa, hemos estudiado el promotor de *IDH2* y hemos localizado a -676 y -540 pares de bases del inicio de la transcripción de *IDH2* dos secuencias potenciales de respuesta a *MYCN* (secuencias con las que *MYCN* puede interaccionar). Adicionalmente, hemos visto un tercer sitio consenso de respuesta a *MYCN* en -444 pares de bases (Figura 1). Para estudiar la activación transcripcional del promotor de *IDH2* por *MYCN* hemos amplificado y posteriormente clonado (*NheI/XhoI*) esta región promotora de *IDH2* en el vector pGL4.10 dirigiendo la expresión del gen luciferasa. También hemos clonado *MYCN* en el vector pFlagCMV2 y los hemos cotransfectado en fibroblastos humanos embrionarios MRC-5. Como control de la eficiencia de la transfección hemos incluido

también en todos los casos el vector de expresión de renilla. Mientras que la transfección de pGL4.10prom/*IDH2* no dio lugar a una alta actividad de luciferasa, la transfección conjunta con pFlagCMV2*MYCN* resultó en un aumento de más de 100 veces de actividad luciferasa (Figura 2). Estos resultados confirman la existencia de regiones reguladoras por *MYCN* en el promotor de *IDH2* y apoyan nuestras observaciones iniciales que la sobreexpresión de *MYCN* se asocia con la sobreexpresión de *IDH2*.

Nuestro objetivo en los próximos meses es hacer mutagénesis dirigida en los elementos de respuestas de *MYCN* para demostrar que son estas secuencias las implicadas en la regulación transcripcional de *IDH2*.

>*IDH2* promotor

```
ctttctcccacacatttctgggtaaaaactggccataaattatctgacctacttgtttgcttgcaggtcctaagacc
cctccatcccagagagagtcctgccccgtactcagaaggaaggaatgctgcagagaaaggtcaagaagaatctacacg
gacaggacttgctgggtttccccactcaggttattggcctctcgggtccaatcatatttctttttctggtggttttttt
tttttttttgagacggagtctcactctgttggccaggctggagtgagtgccatgatctcagctcactgcaatctct
gcctctcaggttcaagtgtattctcccgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcgcgccaccatgcccgat
caatttttgatatttttagtagagacaggggtttcattatgtagccagcctggtctcgaactcctgacttcaagtgat
ccgcctgcctgcacctccaaaagttctaggattacagacgtgagccaccgcgcccgcccaagtgcagatttcaact
ctctctacacagctgacagcggactcgcggaggcgcagacgcgcggcggtcttagctcaagaatgaagc
agccgcaactgggctaatacgcctttgggttcagccggcaggcgagggaagcaagagttcgctcagattggcttttgg
gtttaagctaaagcgtcagaaaactgacatccaggtttacatggggcatcctggagagggtcagcctcgcaagcggctc
tgctaatccccagccctgatcccgcctcgcgggtcccgggtgggtctcacgcctgtagctcctgaggagctgggcttc
agcggcgcccagagaagcaccagccgggctggcgcggggtcccggctcccgcgggacgctggaggcgtcggcggcc
ctggccccgcctcctccccggcaaggcccaatggggcggcaggccggcagccccgcgcccggtgGTGCCCGCGCGGCC
AGCGCCCGCCAGGCCAGCGTTAGCCCGCGGCCAGGCAGCCGGGAGGAGCGGCGCGCTCGGACCTCTCCCGCCCTG
CTCGTTCGCTCTCCAGCTTGGGATGGCCGGCTACCTGCGGGTCTGTCGCTCGCTCTGCAGAGCCTCAGGCTCGCGGCC
GGCCTGGGCGCCGGCGGCCCTGACAGCCCCACCTCGCAAGAGCAGCCGCGGCCACTgtgagtgccgcgcggaggg
tc
```

Figura 1. Secuencia de la región promotora de *IDH2*. En mayúsculas se identifica el primer exón. Antes del primer exón se muestra en minúsculas la región promotora con tres sitios consenso de respuesta a *MYCN* en amarillo. La secuencia en minúsculas después del primer exón corresponde al inicio del primer intrón.

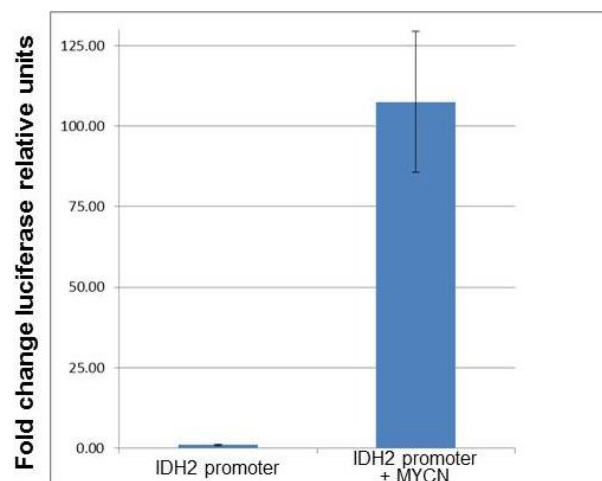


Figura 2. Activación transcripcional del promotor de *IDH2* por *MYCN*. Células MRC-5 se transfectaron con el promotor de *IDH2* regulando la expresión de luciferasa, junto con un vector conteniendo el gen renilla para normalizar la eficiencia de la transfección y junto con un vector pFLAGCMV2 vacío (barra de la izquierda) o conteniendo el gen *MYCN* humano (barra de la derecha). El resultado corresponde a un experimento representativo del promedio de tres transfecciones +/- ES.

Una vez confirmada la regulación de *IDH2* por *MYCN*, hemos pasado a estudiar si la sobreexpresión de *IDH2* constituye uno de los mecanismos de la oncogénesis de *MYCN* en neuroblastomas. Nuestra hipótesis de trabajo es que la amplificación de *MYCN* da lugar a la sobreexpresión de *IDH2* y ésta tiene un efecto similar al *IDH2* mutado, resultando también en la producción del oncometabolito 2-HG. Parte del efecto oncogénico de *MYCN* pudiera deberse a la sobreexpresión de *IDH2* (Figura 3).

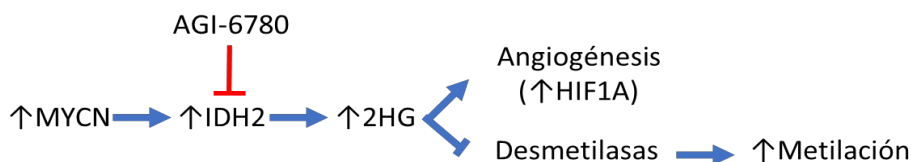


Figura 3. Tratamiento dirigido contra *IDH2* para neuroblastomas con *MYCN* amplificado. Esquema de nuestra hipótesis sobre el potencial mecanismo de acción del AGI-6780 contra células con *MYCN* amplificado. Al inhibir la proteína *IDH2*, la concentración de 2-HG disminuye, disminuyendo a su vez la concentración de HIF1A y, con ello, la angiogénesis. Además, se inhibe la actividad enzimática de desmetilasas del DNA, resultando en el silenciamiento epigenético de supresores como *TP53* o *RB1*. Trabajo fin de grado M. Vidal IISLaFe-UPV 2018.

Hemos estudiado el efecto del inhibidor de *IDH2* AGI-6780 en la proliferación y apoptosis (muerte celular controlada) de dos líneas celulares de neuroblastoma, SH-SY5Y (sin amplificación de *MYCN*) y SK-N-BE(2) (con amplificación de *MYCN*). En primer lugar hemos hecho un cariotipo molecular con SNP arrays para confirmar la amplificación de *MYCN* exclusivamente en la línea celular SK-N-BE(2) (Figura 4).

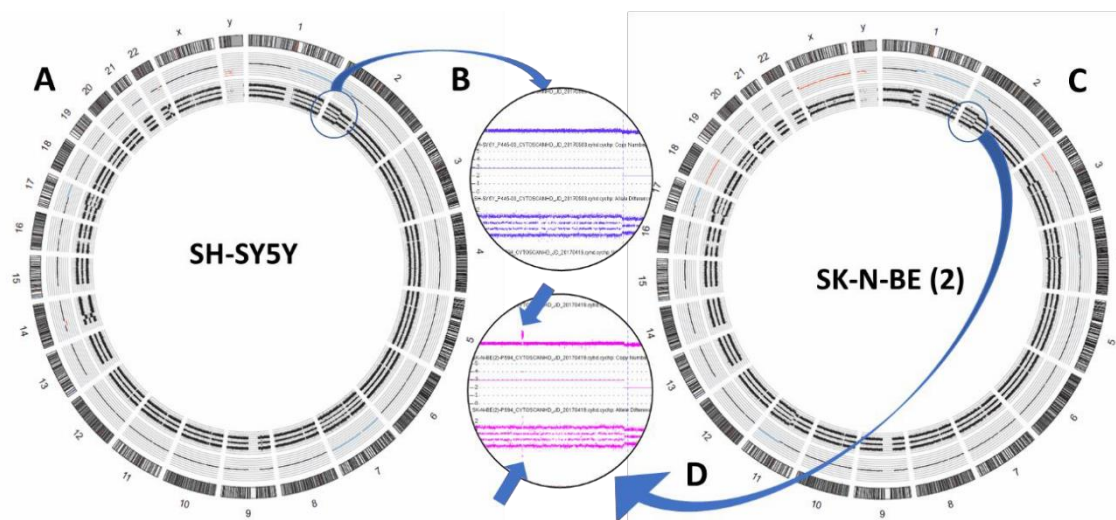


Figura 4. Genotipado de las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE (2). (A) Circos plot del genoma de la línea celular SH-SY5Y; (B) Detalle de la ausencia de ampliación de MYCN en el cromosoma 2. (C) Circos plot de la línea celular SK-N-BE(2); (D) Detalle del cromosoma 2 mostrando la ampliación en 2p24 dónde está ubicado MYCN. TFG M.V. IISLaFe-UPV 2018.

Hemos realizado ensayos de proliferación y supervivencia (colorimetrías con XTT) durante 4 días en diferentes condiciones: un control en el que las células eran tratadas con el disolvente del AGI-6780 (DMSO) y, tres concentraciones crecientes de AGI-6780 (5, 10 y 15 μ M) para determinar la dosis efectiva. Los resultados finales fueron normalizados al tanto por 1 respecto al valor del día 0 de la muestra control, de manera que las gráficas representan el número relativo de células viables respecto al número de células en el día 0 de la muestra control. De este modo, nos aseguramos que los resultados obtenidos en diferentes placas es comparable.

Ayudando nuestra hipótesis en estudio, la línea celular SK-N-BE(2) con *MYCN* amplificado resultó sensible al tratamiento con AGI-6780 (Figura 5). Como era de esperar, la sensibilidad de las células aumenta de manera dosis dependiente del inhibidor. No obstante, a pesar de ser sensibles al tratamiento, no se empieza a percibir el efecto en el crecimiento hasta el tercer día. Confirmando también la hipótesis inicial, la línea celular SH-SY5Y fue resistente al tratamiento a las concentraciones de AGI-6780 estudiadas (Figura 5).

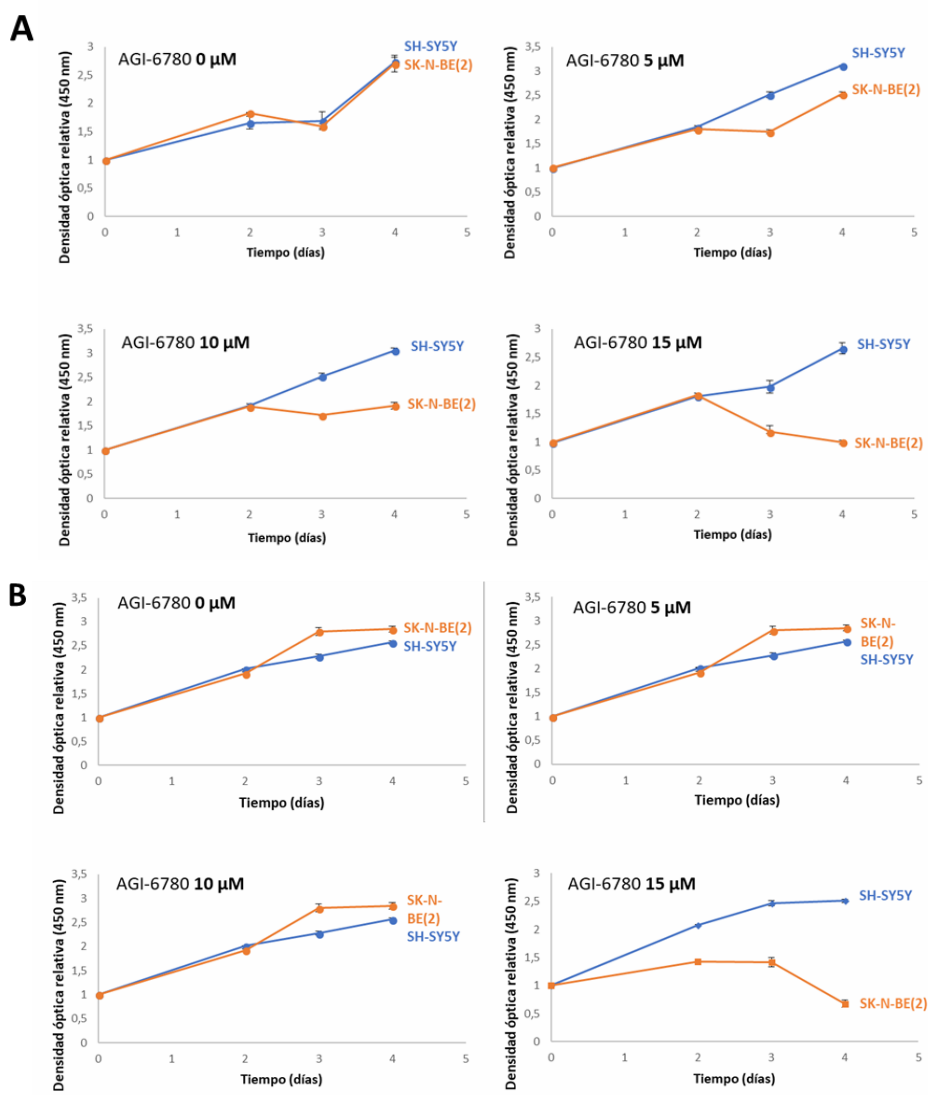


Figura 5. Respuesta de las líneas celulares SH-SY5Y y SK-N-BE(2) de neuroblastoma al tratamiento con AGI-6780. Efecto del tratamiento en curvas de crecimiento celular. Las células de neuroblastoma fueron cultivadas en presencia de AGI-6780 (5, 10 y 15 μM) y con solo con vehículo (DMSO). La línea celular SK-N-BE(2) presenta amplificación de *MYCN*, mientras que la SH-SY5Y no. A y B muestran dos ensayos independientes de días diferentes. TFG M.V. IISLaFe-UPV 2018.

Con objeto de estudiar el sinergismo entre AGI-6780 y otros fármacos frecuentemente utilizados en el tratamiento de neuroblastomas como temozolomida (TMZ), irinotecán (SN-38) y cisplatino (CIS), hicimos un estudio de proliferación y supervivencia combinando cada uno de estos fármacos con el primero y midiendo la colorimetría en el tercer día. Al igual que en los ensayos anteriores, los resultados finales fueron normalizados al tanto por 1 respecto al valor de la muestra control. La línea celular SK-N-BE(2) mostró ser sensible a AGI-6780 a concentración de 10 μM , tal y como muestra en la Figura 6. No se observó sinergismo entre AGI-6780 y el resto de los fármacos

(Figura 6). Las células SH-SY5Y mostraron nuevamente resistencia a AGI-6780 y tampoco se observó en ellas sinergismo entre las drogas (Figura 6).

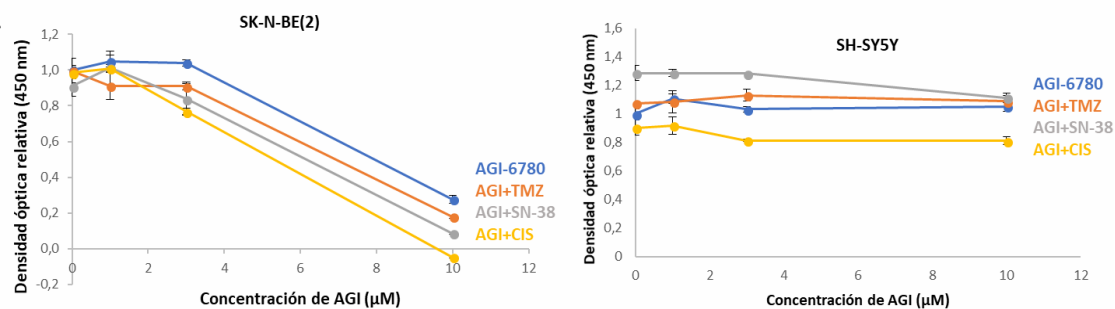


Figura 6. Curvas de proliferación y supervivencia de las líneas celulares de neuroblastoma SK-N-BE(2) y SH-SY5Y al tratamiento con AGI-6780 solo y en combinación con temozolomida (TMZ), irinotecán (SN-38) y cisplatino (CIS). Las células se cultivaron en presencia de AGI-6780 (1, 3, 5 y 10 µM) y con el vehículo solo (DMSO). TFG M.V. IISLaFe-UPV 2018.

Aunque el ensayo colorimétrico valora de manera conjunta la proliferación y supervivencia celulares, no es capaz de discernir si el tratamiento estudiado inflige apoptosis o muerte celular controlada. Para demostrar si el tratamiento con AGI-6780 activa apoptosis en las células SK-N-BE(2) se analizó la activación de caspasa 3 mediante inmunotransferencia. Caspasa 3 es una caspasa al final de la señalización de apoptosis que solo se activa cuando es proteolizada cuando la célula está ya comprometida en el proceso de apoptosis. Como control de muerte celular (C+) se utilizó el extracto proteico obtenido de células SH-SY5Y tratadas con TMZ, olaparib y KU-60019 (Figura 7, muestra de la derecha). La cooperación de estos tres fármacos provoca la muerte celular (Sanmartín *et al.*, 2017). Aunque el inhibidor de IDH2 inhibió la proliferación y supervivencia de la línea celular SK-N-BE(2) con *MYCN* amplificado, no pudimos detectar la presencia de caspasa 3 procesada, indicativa de la señalización de apoptosis (Figura 7). Estos resultados nos indican que AGI-6780 inhibe la proliferación de las células SK-N-BE(2) pero no las mata, por lo que concluimos que AGI-6780 tiene un efecto citostático pero no citotóxico sobre estas células, siendo necesario encontrar algún otro fármaco que en combinación con AGI-6780 sea capaz de causar muerte de manera selectiva sobre estas células.

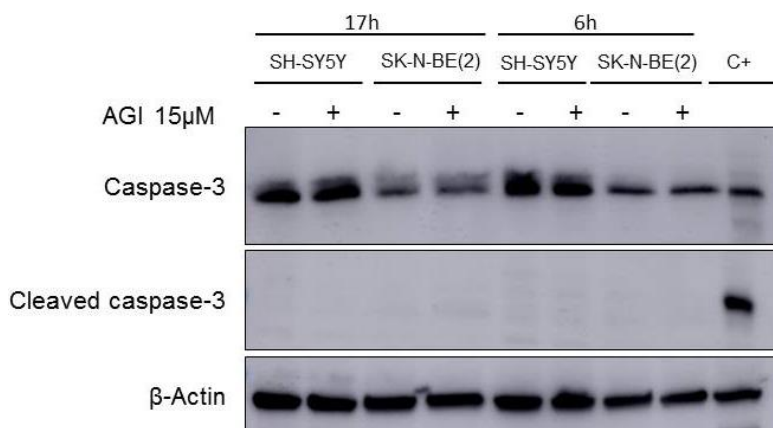


Figura 7. Análisis de inmunotransferencia de la activación de la apoptosis. Líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y y SK-N-BE(2) con y sin tratamiento de AGI-6780 15 µM durante 6 horas y 17 horas según se indica. No se detecta muerte celular en ninguna de las líneas. Como control de muerte (C+), la línea SH-SY5Y se trató con TMZ, Olaparib (inhibidor de PARP) y KU-60019 (inhibidor de ATM). Como control de carga, β- actina.

Trabajo futuro: debido al efecto inhibidor de 2-HG sobre las enzimas desmetilasas, creemos que la combinación de AGI-6780 con 5-Azacitidina (un inhibidor de la metilación del DNA) pudieran tener un efecto sinérgico (y quizás citotóxico) sobre las células SK-N-BE(2). Nos hemos planteado demostrar esta hipótesis en los próximos tres meses.

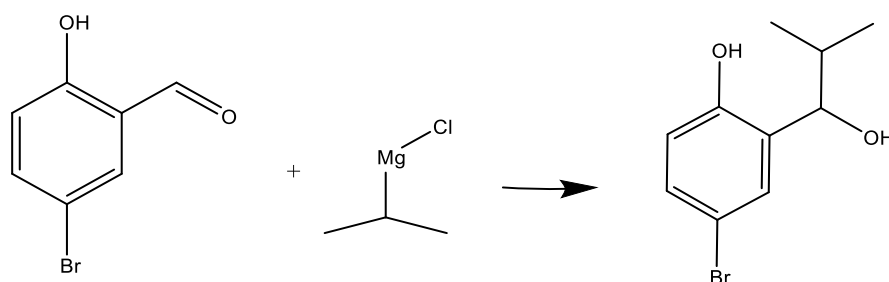
Objetivo 2: Estudio *in vivo* del efecto de AGI-6780 en xenografts con ratones inmunodeprimidos. Este objetivo todavía no se ha iniciado ya que antes tenemos que encontrar un fármaco que, en combinación con AGI-6780, cause citotoxicidad en células de neuroblastoma con MYCN amplificado, además de inhibir la proliferación de las mismas. El objetivo de esta doble actividad biológica es evitar la recaída después de haber cesado el tratamiento.

Objetivo 3: Diseño de compuestos miméticos dirigidos a la superficie de interacción MYCN-MAX. En base a la estructura cristalina resuelta de la interacción MYCN-MAX hemos diseñados dos compuestos con el potencial de interaccionar en la superficie de MYCN e impedir su interacción con MAX. Al no existir compuestos similares previamente sintetizados, el proceso de síntesis es complejo y requiere de iniciar las reacciones de síntesis con compuestos de estructuras bastante más simples. El esquema de síntesis inicial que se planteó en el laboratorio del Dr. Hermenegildo García Gómez y la Dra. Mercedes Álvaro Rodríguez, tenía como etapa clave para introducir los sustituyentes en los anillos bencénicos extremos del compuesto diseñado, la reacción de acilación de Friedel Crafts sobre aril-boronatos. Los intentos llevados a cabo para conseguir la acilación han resultado infructuosos, conduciéndonos a condiciones más drásticas que llevan a la ruptura del enlace C-B.

Se estudió como alternativa la transposición de Fries sobre los aril-boratos, empleando igualmente AlCl_3 anhidro como catalizador. De esta manera los resultados fueron negativos por lo que se concluye que es muy probable que el grupo boronato en presencia de AlCl_3 se convierta en un fuerte desactivador.

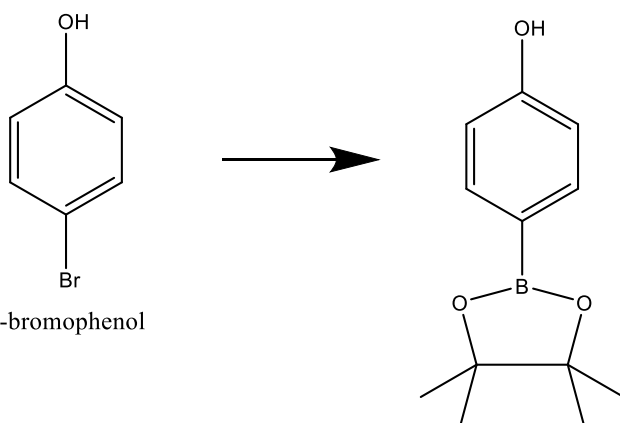
Resultados positivos se han conseguido, sin embargo, partiendo de los análogos aril-bromuros. Ello obligará a replantear la secuencia global de síntesis intercambiando la posición de los grupos boronato por los de bromuro.

En particular las reacciones exitosas han sido:



5-bromo-2-hydroxybenzaldehyde

4-Bromo-2-(1-hydroxy-2-methylpropyl)phenol



4-bromophenol

4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenol

Con este cambio en el protocolo de síntesis esperamos conseguir en el próximo mes el primer intermediario de los compuestos diseñados. Nuestra previsión es de otros 6 meses para la síntesis completa de los dos compuestos.