

Informe final publicable de proyecto

Estudio de sistemas de administración de agentes terapéuticos dirigidos a PD-L1.

Código de proyecto ANII: FCE_3_2020_1_162319

Fecha de cierre de proyecto: 01/11/2023

GARCÍA MELIÁN, María Fernanda (Responsable Técnico - Científico)

COUTO SIRÉ, Marcos (Investigador)

DAGROSA, Alejandra (Investigador)

RODRÍGUEZ LÓPEZ, Gonzalo Andrés (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\\

CENTRO ATÓMICO CONSTITUYENTES \\\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA ARGENTINA) \\\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

El objetivo de las terapias dirigidas a dianas moleculares es depositar el fármaco preferentemente en el sitio de lesión, potenciando el efecto terapéutico y disminuyendo los efectos adversos tóxicos sistémicos originados por la administración del fármaco. El desarrollo de inhibidores específicos de la vía PD-1 y PD-L1 es un gran avance en la inmunoterapia contra el cáncer, sin embargo, sólo un pequeño subconjunto de pacientes con cáncer se ha visto beneficiado. En el presente proyecto se exploraron estrategias para la creación de inmunoconjugados portadores de agentes terapéuticos dirigidos a la diana molecular PD-L1. Para la creación de dichos conjugados se incursionó en la síntesis orgánica de nuevos compuestos, estrategias de conjugación y se estudió el potencial terapéutico de 2 tipos de inmunoconjugados.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Inorgánica y Nuclear / Medicina Química

Palabras clave: PD-L1 / Cancer / Terapia /

Introducción

El cáncer es una enfermedad que afecta a millones de personas, siendo la segunda causa de muerte en el mundo.^{1,2} Nuestro cuerpo está conformado por millones de células que, en condiciones normales, poseen estrictos puntos de control que determinan la muerte de células envejecidas o alteradas. Sin embargo, en algunas ocasiones los mecanismos de proliferación o control de la muerte celular fallan y ocurre una proliferación alterada de células anormales, dando lugar a células cancerosas.³ Con el avance de la enfermedad, las células cancerosas invaden los tejidos sanos, alterando la función de los órganos afectados. Si bien en los últimos años se han evidenciado avances en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, algunos tipos de cáncer han mostrado pocos avances y su tratamiento representan un gran desafío.

Actualmente, muchos de los esfuerzos científicos para combatir el cáncer se han enfocado en estudiar de qué manera responde el sistema inmune ante la presencia de un tumor. Uno de los mecanismos por los cuales las células cancerosas evaden el sistema inmune ocurre a través de la interacción de dos moléculas, el receptor de muerte celular programada-1 (PD-1) y su ligando 1 (PD-L1). En condiciones normales, la interacción PD-1/PD-L1 es esencial prevenir que las células T del sistema inmunitario, ataquen a las células sanas de nuestro cuerpo. Sin embargo, algunas células de cáncer poseen cantidades elevadas de PD-L1, impidiendo que las células T destruyan a las células tumorales. Por otro lado, las cantidades elevadas de PD-L1 en las células cancerosas, impulsó el desarrollo de un tipo de inmunoterapia, que utiliza anticuerpos terapéuticos para bloquear dicha interacción y liberar a las células T para combatir el cáncer.^{4,5,6}

En este sentido, considerando la presencia elevada de PD-L1 en las células cancerosas, es que nos propusimos explorar una estrategia química para acoplar 2 tipos de agentes farmacológicos a un anticuerpo terapéutico que es capaz de unirse a PD-L1 y de esta forma transportar el agente terapéutico a la célula tumoral.

Los agentes terapéuticos que se buscó acoplar al anticuerpo anti-PD-L1 basan su efecto en el depósito de radiación con la capacidad de generar daño. Dos tipos de agentes terapéuticos fueron considerados, uno de ellos consistió en la unión de un átomo radioactivo al anticuerpo anti-PD-L1 y otro consistió en la incorporación de una entidad química con alto contenido en boro susceptibles de participar en terapia por captura neutrónica de boro (BNCT). La BNCT, se basa en que una proporción de los átomos de boro (los átomos de boro-10), cuando son irradiados con neutrones son capaces de sufrir una reacción nuclear liberando partículas capaces de dañar a las células.^{7,8}

Con estos objetivos en mente, la primera fase del proyecto se enfocó en la síntesis química de los compuestos pasibles de generar el efecto citotóxico para su posterior acople al anticuerpo de interés. El siguiente paso consistió en trabajar en las condiciones de reacción para lograr el acople de las moléculas sintetizadas a la biomolécula encargada de trasladar la carga a las células tumorales. Para ello, se propuso estudiar el potencial de la reacción bio-ortogonal entre [1,2,4,5]-tetrazinas y trans-cicloocteno (TCO) como plataforma de conjugación modular, de forma de lograr mayor versatilidad y simplicidad en la creación de los inmunoconjugados.⁹ En la última etapa se realizaron experimentos de forma de evidenciar la acumulación de los conjugados obtenidos y de visualizar si existe un efecto deletéreo sobre dichas células.

Metodología/diseño del estudio

La presencia del ligando de interés se estudió una variedad de líneas celulares de cáncer murino y humano mediante la técnica de citometría de flujo. Además, debido a que ha sido demostrado que en ciertas líneas celulares la expresión de PD-L1 se ve regulada por la presencia de interferón gamma (IFN- γ), se evaluó el efecto del mismo en las líneas

empleadas.¹⁰

En segundo lugar, nos enfocamos en los aspectos sintéticos del proyecto, es decir, en la metodología química para generar los compuestos planteados. Si bien, inicialmente las estrategias de síntesis planteadas suponían comenzar a partir de precursores obtenidos de forma comercial, debido al alto costo de estos, se decidió la síntesis de precursores de [1,2,4,5]-tetrazina portadores de un grupo amino.¹¹ Posteriormente se continuó con los procedimientos correspondientes para el acople del quelante macrocíclico DOTA, la incorporación del residuo 6-hidrazinonicotinil (HYNIC) y de las entidades con alto contenido en boro (clúster de boro).^{12,13} Los aspectos relacionados con la caracterización estructural de los compuestos desarrollados se basaron en técnicas espectroscópicas habituales (¹H-RMN, y sus variantes COSY y HSQC, HMBC; ¹³C-RMN, ESI-MS). Para los derivados [1,2,4,5]-tetrazina portadores de clúster de boro fueron estudiadas propiedades químicas tales como logP, logD y estabilidad a distintos pH.

Una vez obtenidos los compuestos de interés se trabajó en las condiciones de reacción para incorporar las moléculas sintetizadas al anticuerpo monoclonal (AcMo) seleccionado para el desarrollo del proyecto (Tencentrique®, atezolizumab) y en la purificación de distintos conjugados que fueron evaluados según los objetivos planteados. La metodología de conjugación seleccionada se basa en antecedentes bibliográficos y de nuestro grupo de trabajo. Así, se propuso incorporar en un primer paso el grupo funcional TCO al AcMo.^{14,15} Brevemente, el derivado hidroxisuccinimidilo, NHS-TCO permite la bioconjugación a residuos amino presentes en el AcMo. La reacción transcurre en medio acuoso básico durante 1 h y luego se purifica por una columna de exclusión molecular.

Para los derivados de 1,2,4,5 tetrazina portadores de DOTA o HYNIC, se estudiaron las condiciones de reacción de forma de incorporar los radionucleidos de interés. Así como también, se determinó la pureza radioquímica y estabilidad de los radiomarcados. Posteriormente se realizó la reacción de cicloadición sobre los conjugados AcMo-TCO en medio acuoso. Las reacciones se evaluaron mediante técnicas cromatográficas en capa fina y de alta performance.

Para la obtención de los conjugados conteniendo el farmacóforo de boro, debido a sus características químicas y de estabilidad, se optó por evaluar dos de ellos para su conjugación al atezolizumab-TCO. Distintas condiciones de cicloadición fueron evaluadas para los derivados tetrazina (Tz) sintetizados. Se exploraron relaciones molares 1:5, 1:10, 1:20 y 1:30 (AcMo:Tz-clúster de Boro).

Por último, los conjugados obtenidos fueron evaluados en algunas de las líneas celulares de cáncer evaluadas previamente. Se realizaron ensayos de unión a células, citotoxicidad mediante el método de sulforodamina B (SRB), captación y cuantificación de boro mediante Espectrómetro de Emisión Óptica Acoplado Inductivamente a un Plasma de Argón (ICP-OES), y microscopía Raman.

Resultados, análisis y discusión

Se caracterizó mediante citometría de flujo la presencia del ligando de interés en dos condiciones distintas de cultivo celular y empleando tres líneas celulares de melanoma murino, una de melanoma humano, una línea de tiroides normal inmortalizada, una de carcinoma de tiroides humana, dos líneas de carcinoma mamario humano y una línea de carcinoma mamario murino, una línea de cáncer de colon murino y una línea de adenocarcinoma de próstata humano. Entre las líneas estudiadas, todas presentaron una expresión del ligando entre intermedia y alta, a excepción de la línea de tiroides normal inmortalizada.

Con relación a la síntesis de derivados de [1,2,4,5]-tetrazina, durante la ejecución del proyecto se avanzó de forma exitosa en la síntesis del bloque sintético derivado de [1,2,4,5]-tetrazina portador del grupo funcional amino en nuestro laboratorio. La obtención de este fragmento nos permitió contar con suficiente masa como para generar una mayor diversidad de moléculas de interés. Esto dio lugar a la obtención de 7 derivados novedosos portadores de entidades con alto contenido en átomos de boro, que contienen entre 10 y 20 átomos de boro por molécula. Además, se generaron dos derivados portadores de grupos quelantes para su posterior marcación con los radionucleidos de interés.

En la siguiente etapa se trabajó en las condiciones de reacción para incorporar los derivados sintetizados al AcMo anti-PD-L1. Para ello se trabajó en la optimización de un sistema de conjugación en dos pasos que implicó en un primer paso la incorporación del grupo químico TCO, y que en un segundo paso reacciona de forma selectiva y eficiente a con el grupo funcional [1,2,4,5]tetrazina. En las condiciones de reacción estudiadas de acople de grupo funcional TCO, se obtuvieron conjugados con un promedio de entre 7 y 8 grupos de TCO por molécula de anticuerpo. Seguidamente se estudiaron distintas condiciones reacción para incorporar los derivados [1,2,4,5]-tetrazina sintetizados a los conjugados previamente descritos. De las condiciones estudiadas para la cicloadición de los derivados portadores de clústeres de boro se obtuvieron rendimientos aceptables de recuperación luego de la purificación, específicamente en aquellos protocolos que se emplearon conjugaciones con relaciones molares 1:5 y 1:10.

Adicionalmente, se determinó el valor del coeficiente de reparto, estabilidad a distintos pH y citotoxicidad en la línea celular de cáncer de tiroides a los 7 derivados portadores de clúster de boro. Un aspecto para destacar sobre la

citotoxicidad es que todos los derivados con alto contenido en boro mostraron valores de IC50 en el rango μM en la línea celular estudiada. Sin embargo, dicho efecto disminuye cuando el derivado es conjugado al AcMo. Los ensayos in vitro de captación de boro se realizaron en el marco de una pasantía en el Centro Atómico Constituyentes de Buenos Aires. Se evaluó la captación intracelular de varios de los conjugados obtenidos en la línea celular 8505c, en presencia y ausencia de IFN- γ . El análisis de las muestras se midió en un equipo de ICP-OES. Sin embargo, la captación de boro intracelular se mantuvo por debajo del límite de detección de la técnica (10 ppb) en las condiciones experimentales ensayadas. Los resultados obtenidos fueron restrictivos para continuar con los ensayos de citotoxicidad mediante la terapia de captura neutrónica de boro tanto in vitro como in vivo. Por otro lado, los mismos nos impulsaron a ensayar otras condiciones de tratamiento y explorar otras metodologías para evidenciar la captación de boro intracelular. Para ello, se estudió la presencia de boro intracelular mediante microscopia Raman confocal. Los resultados obtenidos evidenciando la presencia de boro intracelular en varias de las condiciones ensayadas en la línea celular 8505c, demostrando la viabilidad de la estrategia planteada para acumular boro en líneas celulares de cáncer.

En el caso de los conjugados portadores de agentes quelantes, se estudió la incorporación del radionucleido de interés. Dentro de las condiciones de marcación estudiadas se seleccionó aquella que permitió obtener un rendimiento de reacción superior al 95%. Una vez obtenido el radioconjugado se procedió a evaluar su reconocimiento por las células de cáncer con expresión de PD-L1 mediante ensayos de unión. Mediante los mismos, fue posible corroborar la unión específica del radioconjugado a las células de cáncer con expresión de PD-L1 y también se evidenció un aumento en el porcentaje de unión producto de la inducción con IFN- γ del ligando en estudio.

Los ensayos de citotoxicidad del AcMo sin conjugar, si bien mostraron un efecto citotóxico en algunas de las concentraciones estudiadas, no fue posible encontrar un efecto relacionado con la dosis en las condiciones ensayadas. Para los ensayos de citotoxicidad con los conjugados radioactivos se optimizaron las condiciones del ensayo de forma de detectar el daño celular producto de las radiaciones emitidas por el átomo radioactivo. Los ensayos de citotoxicidad con ^{177}Lu -atezolizumab fueron realizados en las líneas MDA-MB-231 y TM1MT. Para la realización de estos se utilizó el ensayo de (SRB) que por sus características permite la medición colorimétrica en días posteriores a la realización del ensayo, dando lugar al decaimiento radioactivo. Diferentes condiciones de tratamiento (tiempo de incubación y actividad) fueron estudiadas, en presencia y ausencia de IFN-gamma. Por ejemplo, en la línea celular MDA-MB-231 cuando se trató la placa con 1 μCi durante 48 horas, fue posible observar un descenso de la viabilidad celular del 16%. Dicho efecto citotóxico se pronuncia cuando se inhibe uno de los mecanismos de reparación del ADN (mediante la adición de un inhibidor de la enzima Poli(ADP-ribosa) polimerasa). El aumento del efecto citotóxico al bloquear uno de los sistemas de reparación del ADN, sugiere que la presencia del radionucleido terapéutico causa un efecto de daño a nivel del ADN, aunque en las condiciones de realización del ensayo no se evidencie la muerte celular. Resultados similares, de la generación de daño sobre el ADN mediante la administración de ^{177}Lu -atezolizumab fueron observados en la línea celular de melanoma.

Conclusiones y recomendaciones

Durante la realización del presente proyecto se caracterizó la expresión de PD-L1 en una variedad de líneas celulares de cáncer murino y humano, y se evidenció el efecto inductor del IFN- γ sobre la expresión de PD-L1 en las mismas. Se logró sintetizar y caracterizar 9 derivados de [1,2,4,5]-tetrazina, 7 de los cuales son novedosos. Adicionalmente, el uso de la estrategia de conjugación basada en la reacción de cicloadición entre TCO y [1,2,4,5]-tetrazina contribuyó a la generación de una variedad de conjugados de forma rápida y eficiente. De acuerdo con los objetivos específicos del proyecto, se logró la marcación del anticuerpo anti-PD-L1 con dos radionucleidos, obteniéndose altas purezas radioquímicas y se comprobó la unión e internalización del anticuerpo radiomarcado en las células cancerígenas, siendo posible constatar el efecto citotóxico de los radioconjugados obtenidos en algunas de las líneas celulares estudiadas. Sobre los derivados con alto contenido en boro sintetizados, fue posible determinar su estabilidad, coeficiente de reparto y citotoxicidad en una línea celular de cáncer. Si bien se logró la conjugación del AcMo de interés a dichas entidades químicas, en los ensayos in vitro de captación de boro no fue posible acumular las cantidades de boro necesarias para poder evaluar el efecto de la BNCT. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante microscopia Raman confocal, nos alientan a continuar explorando la estrategia planteada como mecanismo de acumulación de boro. Finalmente, se destaca que el proyecto ha permitido consolidar una línea de investigación con perspectivas a futuro, así como también el fortalecimiento de colaboraciones científicas nacionales e internacionales. Ha permitido la formación de recursos humanos en el marco de una tesis de Maestría en Química y una tesina de grado de la Licenciatura en Bioquímica. Hasta el momento, los resultados han sido comunicados en encuentros científicos nacionales (ENAQUI, 2023) y un congreso internacional (World Molecular Imaging Congress, 2023), habiendo dos artículos científicos en proceso de redacción.

Referencias bibliográficas

- 1-Siegel, R. Cancer Statistics. CA. Cancer J. Clin. 2017,67(0):7-30.
- 2-Torre, L. A. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2016, 25(1):16-27.
- 3-Bunz, F. Principles of Cancer Genetics, 1st ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2008.
- 4-Pardoll, DM. Nat Rev Cancer. 2012,12(4):252?264.
- 5- Salmaninejad, A., et al. J. Cell. Physiol. 2019,234(10):16824?16837.
- 6-Dermani, FK., et al. J. Cell. Physiol. 2019;234(2):1313?1325.
- 7-Sgouros, G., et al. Nat. Rev. Drug. Discov. 2020,19:589–608.
- 8-Nedunchezian, K., et al. J. Clin. Diagn. Res. 2016,10(12):ZE01–ZE04.
- 9-Blackman, M., et al. J. Am. Chem. Soc. 2008,130(41):13518–13519.
- 10- García-Díaz, A., et al. Cell reports. 2017,19(6):1189–1201.
- 11- Karver, M. R., et al. Bioconjug. Chem. 2011,22(11):2263–2270.
- 12- Yousefnia, H., et al. J. Radioanal. Nucl. Chem. 2011,287(1):199-209.
- 13- García, M. F., et al. Curr. Radiopharm. 2014,7(2):84–90.
- 14- García, M. F., et al. Bioorganic Med. Chem. 2016,24(6):1209.
- 15- García, M F., et al. Org. Biomol. Chem. 2018,16:5275.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)