



## INFORME 5: MELANOMA CUTÁNEO CIENCIA EXPERIMENTAL Y TERAPIAS MOLECULARES

ABRIL 2021

El apartado de ciencia experimental y de terapias moleculares presenta varios trabajos en formato de póster en relación a nuevas terapias sobretodo, terapias dirigidas y sus posibles mecanismos de resistencia:

### EXPERIMENTAL AND MOLECULAR THERAPEUTICS

#### New targets

#### ***Targeting B-RAF and checkpoint inhibitor resistant melanoma with RSK inhibitor PMD-026 in pre-clinical models***

*Joe William Ramos, et al.*

Los melanomas se encuentran entre los genomas de cáncer más mutados y tienen una alta carga de neoantígenos, lo que se relaciona con una mejor respuesta a las inmunoterapias. Las RSK son serina / treonina quinasas abajo de BRAF / ERK que activan la transcripción, la proliferación y la supervivencia celular. PMD-026 es un inhibidor competitivo con ATP del dominio quinasa N-terminal. Este inhibidor

es muy estable y eficaz en ensayos basados en células con una CI50 promedio de 2 nM y 200-400 nM en agar blando e inhibe el crecimiento tumoral en múltiples modelos de ratón de cáncer de mama administrados de 70 a 100 mg / kg por vía oral. Para explorar la oportunidad de los inhibidores de RSK en el melanoma, examinamos 1.959 modelos de PDx para la expresión de RSK1-4, que se evaluó en función de la RNAseq. En el melanoma, RSK1 y RSK2 se expresaron mucho, a diferencia de RSK3 y RSK4.

En un estudio de 21 casos de melanoma, RSK2 se activó en el 52% de los casos según la localización nuclear utilizando nuestro diagnóstico complementario. Utilizando ensayos basados en FRET, PMD-026 inhibió la unión de RSK2 con un IC50 = 14 nM en comparación con BID1870 con IC50 = 94 nM demostrando una potencia competitiva in vitro. Es importante destacar que PMD-026 inhibe la viabilidad de las células de melanoma, incluidas las que son resistentes al inhibidor de BRAF. Sorprendentemente, también

Colaboradores Bronce



## INFORME 5: MELANOMA CUTÁNEO

### CIENCIA EXPERIMENTAL Y TERAPIAS MOLECULARES

ABRIL 2021

encontramos que reduce significativamente la expresión de PD-L1 en la superficie celular de varias líneas de melanoma. Esto se debe a la regulación a la baja de la transcripción de PD-L1 y la subsiguiente expresión reducida de la superficie celular de PD-L1. PMD-026 puede potenciar los enfoques de inmunoterapia del melanoma y también mejorar la respuesta de los pacientes a las terapias dirigidas BRAFV600E.

#### **Cell Death Pathways and Treatment**

##### ***Targeting immunological and apoptotic cell death to improve therapeutic efficacy in melanoma***

*Niramol Savaraj, et al.*

La muerte celular apoptótica e inmunológica son las dos vías principales que pueden conducir a la desaparición de las células cancerosas. Se ha demostrado que atacar ambas vías mediante la combinación de quimioterapia e inhibidores de puntos de

control es más eficaz en el tratamiento del cáncer de pulmón, pero no en el melanoma, debido al hecho de que las células del melanoma a menudo expresan altos niveles de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (60%) que contribuyen a su resistencia a la quimioterapia. Esto también se observa en tejido de melanoma obtenido de pacientes. En este trabajo se intenta explorar si existe alguna relación entre Bcl-2 y PD-L1 en las células de melanoma utilizando métodos knock in y knock out. Curiosamente, las líneas celulares con alto Bcl-2, sus contrapartes de BMR no mostraron cambios en los niveles de Bcl-2. Sin embargo, en las líneas celulares con alta expresión de PD-L1, los niveles de PD-L1 son incluso más altos cuando se convierten en BMR. Esto podría explicar por qué después del fracaso del inhibidor BRAF / MEK, la respuesta clínica a los inhibidores del punto de control anti PD-1 varía.

La eliminación total de Bcl-2 usando la eliminación de CRISPR (kit adquirido de Origene) da como resultado la muerte celular.



---

## INFORME 5: MELANOMA CUTÁNEO

### CIENCIA EXPERIMENTAL Y TERAPIAS MOLECULARES

ABRIL 2021

---

Por el contrario, la transfección de Bcl2 en la sobreexpresión de PD-L1 da como resultado una disminución de la expresión de PD-L1 de 2 a 4 veces tanto por PCR como por transferencia de western en ambos clones. Sin embargo, no hay cambios discernibles en la superficie PD-L1 por citometría de flujo. La transfección de BCL-2 tampoco afecta a otras proteínas de la familia BCL-2. Se obtuvieron resultados similares con sus homólogos de BMR. A partir de estos datos, parece que la presencia de Bcl-2 (ARN / proteína) podría afectar la expresión intrínseca de PD-L1, sin embargo, la PD-L1 de superficie, que es la clave para unir PD-1, no cambió. Por otro lado, la presencia de ARN / proteína de PD-L1 no tiene un efecto discernible sobre la expresión de Bcl-2.

Se desconoce y se está investigando si la eliminación parcial de BCL-2 o el tratamiento con inhibidor de Bcl-2 pueden conducir a un aumento de la expresión de PD-L1. En general, parece que la combinación de inhibidor de Bcl-2 e inhibidor de punto de control puede ser

más eficaz en pacientes con melanoma con alta expresión de Bcl-2.

#### **Tyrosine Kinase and Phosphatase Inhibitors**

##### ***Antitumor activity of belvarafenib in melanoma brain metastasis and NRAS mutation melanoma models***

*Inhwan Bae, et al.*

Belvarafenib (HM95573 o GDC5573) inhibe fuertemente el crecimiento de varias líneas de células cancerosas que albergan mutaciones BRAF, NRAS o KRAS y demuestra una notable eficacia contra el cáncer en modelos animales preclínicos. Belvarafenib, actualmente en ensayos clínicos de Fase 1, es un inhibidor de quinasa pan-RAF potente y selectivo que muestra una fuerte actividad inhibidora de BRAF WT, BRAF V600E y CRAF.



## INFORME 5: MELANOMA CUTÁNEO

### CIENCIA EXPERIMENTAL Y TERAPIAS MOLECULARES

ABRIL 2021

En primer lugar, se descubrió que belvarafenib podía acumularse en el cerebro de ratones y ratas después de la administración oral. La exposición de belvarafenib en el cerebro fue similar a la del plasma (aproximadamente un 100% de relación entre el cerebro y el plasma). Este nivel de penetración cerebral de belvarafenib difiere significativamente de los inhibidores de BRAF aprobados actualmente que se sabe que tienen una baja penetración cerebral. Belvarafenib mostró una excelente actividad antitumoral en un modelo de tumor cerebral ortotópico utilizando células de melanoma. Belvarafenib aumentó significativamente la supervivencia general de los ratones implantados intracranealmente con células de melanoma BRAF V600E A375SM. En general, nuestros datos demostraron que belvarafenib tiene potencial terapéutico para tratar a pacientes con melanoma por mutación NRAS. De hecho, en el modelo de ratones singénicos de células de melanoma murino NRAS G13D K1735, la combinación de belvarafenib con

atezolizumab (anti-PD-L1) inhibió significativamente el crecimiento tumoral e indujo eficazmente la infiltración de células T citotóxicas en los tejidos tumorales. Estos efectos de belvarafenib identificados en los estudios preclínicos anteriores deben justificarse de inmediato mediante ensayos clínicos apropiados.

#### **Drug Tolerance and Resistance to Targeted Therapies**

#### ***ARAF mutations confer resistance to RAF dimer inhibitors in NRAS and BRAFmutant melanoma***

*Shiva Malek. et al.*

Belvarafenib, un inhibidor del dímero de RAF potente y selectivo, muestra actividad clínica en pacientes con melanoma mutante BRAFV600E y NRAS. Aquí, a través de la generación de células de melanoma mutantes NRAS resistentes a belvarafenib y mediante el análisis del ADN tumoral circulante de pacientes tratados con belvarafenib,



## INFORME 5: MELANOMA CUTÁNEO CIENCIA EXPERIMENTAL Y TERAPIAS MOLECULARES

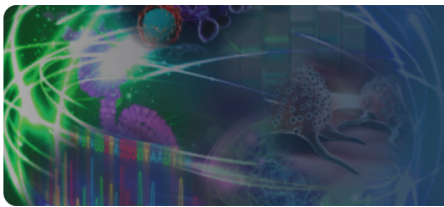
ABRIL 2021

identificamos nuevas mutaciones recurrentes en ARAF, dentro del dominio quinasa. Los mutantes de ARAF conferían resistencia a belvarafenib tanto de forma dependiente de la actividad dímica como de la quinasa. Belvarafenib indujo dímeros mutantes de ARAF y los dímeros que contenían ARAF mutante estaban activos en presencia del inhibidor. Las mutaciones de ARAF pueden servir como un mecanismo de resistencia general para los inhibidores del dímero de RAF ya que los mutantes exhiben una sensibilidad reducida a un panel de inhibidores del dímero de RAF. La combinación de inhibición de RAF más MEK puede usarse para retrasar la resistencia impulsada por ARAF y sugiere una combinación racional para uso clínico. En conjunto, nuestros hallazgos revelan funciones específicas y compensatorias para la isoforma ARAF e implican a las mutaciones ARAF como un impulsor de la resistencia a los inhibidores del dímero RAF.

***Targeting SOX10-deficient cells to reduce resistance to targeted therapy in melanoma***  
Claudia Capparelli, et al.

La heterogeneidad intratumoral y la plasticidad celular permiten que los tumores alteren fenotipos y se adapten a microambientes extraños y resistan inhibidores dirigidos. Estudiamos el factor de transcripción del linaje de la cresta neural, SOX10, en el contexto del melanoma cutáneo y la resistencia a terapias dirigidas. SOX10 se expresa de forma heterogénea en muestras de melanoma. Utilizando bioinformática, así como modelos de melanoma in vivo y 3D in vitro, la pérdida de SOX10 fue suficiente para inducir un fenotipo invasivo pero de proliferación lenta in vitro e in vivo que se asoció con la expresión de un conjunto de genes mesenquimales. Curiosamente, mientras que la desactivación de SOX10 inicialmente indujo un estado tolerante al inhibidor dirigido, una exposición más prolongada de poblaciones mixtas de SOX10 competentes y deficientes en SOX10 a la terapia dirigida impulsa la selección clonal de

Colaboradores Bronce



---

## INFORME 5: MELANOMA CUTÁNEO

### CIENCIA EXPERIMENTAL Y TERAPIAS MOLECULARES

ABRIL 2021

---

células desactivadas de SOX10. Además, las líneas celulares generadas a partir de tumores de xenoinjerto que han adquirido resistencia a vemurafenib, BRAFi que rompe la paradoja o la combinación de BRAFi + MEKi mostraron una expresión de SOX10 drásticamente reducida en comparación con sus contrapartes parentales. En conjunto, estos datos sugieren que los clones resistentes adquiridos pueden surgir de células persistentes tolerantes al fármaco. SOX10 media el cambio fenotípico en el melanoma cutáneo y permite la adaptación del tumor a microambientes alterados y tratamientos farmacológicos que podrían dirigirse utilizando inhibidores de cIAP1 / 2.