



## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

ABRIL 2021

En este apartado de inmunología del cáncer, destacan las siguientes presentaciones en formato de póster y comunicación oral:

### **IMMUNOLOGY**

#### **Inflammation and Cancer: Metastasis / Tumor Initiation and Progression**

##### ***HumanKIT<sup>+</sup> myeloid cells facilitate visceral organ colonization by melanoma***

Chun I. Yu, et al.

Para determinar el papel de las células CD33 + en la metástasis del melanoma, utilizamos ratones NSG humanizados mediante injerto de células progenitoras hematopoyéticas CD34 + humanas y expresión transgénica de citocinas hematopoyéticas humanas SCF / GM-CSF / IL-3 (SGM3). Los ratones NSG-SGM3 humanizados (h) permitieron el desarrollo de células mieloides CD33 + humanas en la médula ósea y los tejidos periféricos, y cuando se implantaron subcutáneamente con la línea celular de

melanoma humano, apoyaron la colonización del melanoma del bazo, hígado, pulmón y riñones. El crecimiento del melanoma en órganos distantes dependía de la expresión de SGM3 del huésped y estaba facilitado por células mieloides CD33 + humanas. Una caracterización más profunda atribuyó esta actividad a un raro subconjunto de células progenitoras CD33 + CD11b + CD117 + dependientes de IL-3 y SCF humanas que comprenden <4% de la población total de leucocitos CD45 +. Las células CD33 + infiltrantes de tumores metastásicos de pacientes y ratones hNSG-SGM3 mostraron perfiles transcripcionales convergentes. El análisis de RNAseq de una sola célula identificó una firma genética de un subconjunto de CD33 + que expresa KIT / CD117 que se correlacionó con una disminución de la supervivencia general en las muestras de melanoma TCGA. Por tanto, las células mieloides CD33 + CD11b + CD117 + humanas facilitan la colonización metastásica de órganos distantes por el melanoma, lo que representa un nuevo

Colaboradores Bronze



## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

ABRIL 2021

biomarcador candidato, así como una oportunidad terapéutica para el melanoma metastásico.

### **Adoptive Cell Therapy**

#### ***Clinical Feasibility and Treatment Outcomes with Unselected Autologous Tumor Infiltrating Lymphocyte Therapy in Patients with Advanced Cutaneous Melanoma***

*Robert E. Hawkins, et al.*

Este es un análisis retrospectivo de una experiencia de un solo centro de TIL para el tratamiento del melanoma cutáneo avanzado. Los TIL jóvenes autólogos no seleccionados derivados de tejido tumoral digerido se fabricaron bajo una licencia de MHRA Manufacturing Specials. Los pacientes con melanoma cutáneo avanzado y sin otras opciones de tratamiento recibieron quimioterapia linfodeplectora no mieloablativa (ciclofosfamida 60 mg / kg / dx 2d, fludarabina 25 mg / m<sup>2</sup> / dx 5 d [Cy / Flu]), seguida de

infusión de TIL y post-TIL IL-2 en dosis alta (HD) (600.000-720.000 UI / kg) sobre una base de uso compasivo. La eficacia para 15 pacientes evaluables por imágenes se informó mediante la evaluación del investigador de CT / MRI según RECIST 1.1; Se siguieron 6 pacientes adicionales utilizando imágenes no RECIST 1.1 (PET) y monitorización clínica. Se informaron eventos adversos (EA) clínicamente significativos con inicio posterior a la infusión de TIL para todos los pacientes tratados. Fecha de corte de datos: 31-DIC-2019.

Un total de 21 pacientes con melanoma cutáneo avanzado fueron tratados con Cy / Flu, TIL (mediana 31,9 x 10<sup>9</sup> células infundidas) y HD IL-2 (mediana 8 dosis). Todos tenían enfermedad metastásica de alto riesgo (mediana de 4 sitios, estadio IV M1d [38%]), un promedio de 3 terapias previas (cualquier ICI [91%], PD-1 [57%], BRAFi [52%] y MEKi [24%]). Con una mediana de seguimiento de 52,2 meses, la tasa de respuesta en pacientes evaluables por imágenes (n = 15) fue del 53% con una tasa de RC del 13%; La DCR fue del

Colaboradores Bronce



## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

ABRIL 2021

73%, incluidos 3 (20%) pacientes con enfermedad estable. Se observaron respuestas duraderas adicionales en los 6 pacientes seguidos de PET y monitorización clínica. Las respuestas fueron generalmente consistentes en todos los subgrupos, incluida la edad, el número de sitios de enfermedad, la carga tumoral, las metástasis cerebrales, el número de líneas de terapias anteriores, el bloqueo previo de PD-1, el BRAFi previo y el MEKi previo. Para todos los pacientes tratados, la mediana de supervivencia fue de 21,3 meses. La toxicidad fue generalmente autolimitada y consistente con Cy / Flu y HD IL-2. Los EA frecuentes ( $\geq 20\%$ , cualquier grado) fueron trombocitopenia (62%), pirexia (57%), escalofríos (43%), neutropenia (29%), taquicardia (29%), edema pulmonar (24%) y fuga (24%); no se observaron muertes relacionadas con el tratamiento.

La alta tasa de respuesta observada en esta serie excede el 41% de ORR estimado para TIL en melanoma cutáneo avanzado (metanálisis de Dafni et al. Ann Oncol., 2019) y

destaca la aplicación exitosa de TIL para abordar una necesidad médica insatisfecha en el melanoma avanzado. Está previsto realizar un ensayo multicéntrico de fase 2 de esta terapia en el melanoma avanzado para 2021.

### **Combination Immunotherapies**

#### ***Caloric restriction mimetics as adjuvant to immune checkpoint inhibitors for treatment of melanoma***

*Lauren C. E. Morehead, et al.*

Investigaciones anteriores sugieren que la hipoxia en el microambiente tumoral (TME) disminuye la eficacia de los ICI, y la metformina, un mimético antihiper glucémico y de restricción calórica (CRM), puede revertir esta condición. En este trabajo se eligieron tres CRM para estudiar junto con la metformina: hidroxicitrato, resveratrol y sulforafano. Para identificar las vías y comprender más sobre el efecto de los CRM en la hipoxia tumoral, realizamos un experimento de proteómica en células de melanoma murino B16F10 tratadas con los cuatro CRM. Para determinar el efecto

Colaboradores Bronze



## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

ABRIL 2021

de los miméticos de restricción calórica sobre la eficacia de la inmunoterapia, se inyectarán células B16F10 por vía subcutánea en ratones C57BL / 6J machos y hembras inmunocompetentes, separados en cuatro grupos: 1) sin control de tratamiento, 2) solo terapia ICI, 3) solo terapia CRM, 4) Combinación ICI + CRM.

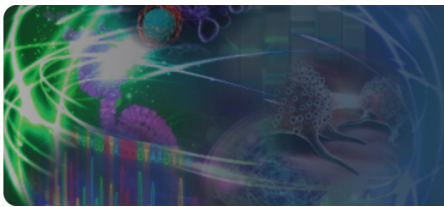
Estos datos preliminares muestran que, como la metformina, los CRM adicionales disminuyen la fosforilación oxidativa en las células cancerosas. Esto apoya la hipótesis de que los otros CRM pueden funcionar de manera similar a la metformina en el TME. Comenzamos a probar el efecto de cuatro CRM sobre el crecimiento tumoral y la hipoxia en un modelo animal.

***Heating it up: Targeting RAS/RAF/PI3K pathway to make melanoma tumors 'immunologically hot' and suitable for checkpoint blockade immunotherapies***

Chi Yan, et al.

Rigosertib (RGS), un mimético de RAS de molécula pequeña no competitivo con ATP, tiene el potencial de bloquear las vías de señalización oncogénicas RAS-RAF-MEK-ERK y / o PI3K-AKT-mTOR. Utilizando modelos de ratón inmunocompetentes de melanoma B16F10 (BRAFWt) y YUMM3.3 (BRAFMut), identificamos que el tratamiento con RGS (300 mg / kg) de ratones portadores de tumores de melanoma es bien tolerado y da como resultado una inhibición de ~ 50% del crecimiento tumoral como monoterapia y ~ 70% de inhibición en sinergia con  $\alpha$ PD1 +  $\alpha$ CTLA4. La inhibición tumoral inducida por RGS depende de la inducción de la expresión de CD40 en las células de melanoma, seguida de la muerte celular inmunogénica, que conduce a un microambiente tumoral inflamado con enriquecimiento de células dendríticas y células Tc CD8 + activadas. En este trabajo, la supresión del crecimiento tumoral iniciada por RGS se invirtió parcialmente o bien mediante la supresión de la expresión de CD40 en las células de

Colaboradores Bronce



---

## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO

### INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

ABRIL 2021

---

melanoma por ARNhc, o el agotamiento de las células Tc CD8 +. El análisis de múltiples estudios de pacientes con melanoma publicados confirma que un alto nivel de expresión de CD40 se correlaciona con CD80, ICOS-L, respuestas beneficiosas de células T tipo I y una mejor supervivencia en pacientes con melanoma. Los niveles de CD40 en las células de melanoma son un pronóstico para la respuesta terapéutica a RGS, inhibidor de RAF e ICB. En particular, el análisis IHC multiplex mostró que el tratamiento con inhibidor de BRAF induce significativamente células de melanoma CD40 + SOX10 + en los tumores de pacientes con melanoma y xenoinjertos derivados de pacientes. Estos datos preclínicos respaldan el uso terapéutico de RGS más  $\alpha$ PD1 +  $\alpha$ CTLA4 en tumores de melanoma activados por la vía RAS / RAF / MEK y / o PI3K y señalan la necesidad de ensayos clínicos para determinar el beneficio clínico de RGS más ICB para pacientes con melanoma metastásico que no responda a ICB solo.

#### Immune Checkpoints

##### **Response and skin toxicity related protein signature in late stage melanoma patients after anti-PD-1 treatment**

*Jakob Vowinckel, et al.*

La toxicidad cutánea después del tratamiento con anti-PD1 en pacientes con melanoma es el tipo más común de efecto adverso relacionado con el sistema inmunológico (irAE) y se ha asociado con una mejor tasa de respuesta general y supervivencia. No obstante, hasta ahora no se han identificado muchos biomarcadores mecánicos que podrían estar asociados con una toxicidad cutánea de bajo grado y buenas tasas de respuesta. En este estudio, se ha abordado esta cuestión analizando muestras de tejido tumoral de pacientes con melanoma en etapa tardía con tratamiento anti-PD1 de primera línea. Utilizando el análisis imparcial como plataforma de descubrimiento, se pudo definir un panel de biomarcadores potencial



---

## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER ABRIL 2021

---

asociado no solo con una respuesta mejorada sino también con una toxicidad cutánea de bajo grado.

El análisis imparcial de 22 muestras de tejido tumoral basales de pacientes con melanoma en etapa tardía tratados en primera línea con anti-PD1 dio como resultado la identificación y cuantificación de más de 8000 proteínas. El análisis de supervivencia libre de progresión mostró diferencias entre los pacientes con toxicidad cutánea de bajo grado informada frente a todos los demás. Por lo tanto, para sPLS-DA se utilizaron ambos factores, presencia / ausencia de toxicidad cutánea y estado de respuesta (en esta cohorte no estaban presentes los no respondedores con toxicidad cutánea de bajo grado). La separación completa de los sujetos se logró con un panel de 21 proteínas. Este panel se utilizó para la agrupación jerárquica y pudo restaurar completamente los tres grupos de pacientes. Entre todas las proteínas identificadas en el panel proteómico, el antígeno C1 asociado al melanoma (MAGEC1)

también se ha evaluado en el análisis transcriptómico dirigido y representa resultados sorprendentemente similares. MAGEC1 también se encuentra como un fuerte predictor en el proyecto Human Protein Atlas. Curiosamente, la familia de proteínas MAGE son antígenos específicos de tumores que pueden ser reconocidos por linfocitos T citolíticos autólogos y podrían servir como un nuevo objetivo de ICI o biomarcador predictivo. En este estudio se confirman observaciones previas de un beneficio de supervivencia relacionado con los irAE después del tratamiento con bloqueo de PD-1 en pacientes con melanoma en etapa tardía. También se objetiva el poder del perfil proteómico profundo y el análisis transcriptómico en la selección de biomarcadores moleculares asociados a la respuesta y los irAE que benefician aún más la supervivencia del paciente.





## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

ABRIL 2021

### ***Distribution and prevalence of LAG-3 expression in samples of melanoma and gastric/gastroesophageal junction cancer***

Lloye M. Dillon, et al.

El gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3) es un receptor de punto de control inmunológico que inhibe la función de las células T efectoras. Los datos preclínicos sugieren que la activación simultánea de las vías LAG-3 y muerte programada-1 da como resultado un mayor agotamiento de las células T que cualquiera de las vías por sí sola, lo que conduce a una respuesta inmunitaria antitumoral deficiente y un mayor crecimiento tumoral. Por lo tanto, LAG-3 puede ser un nuevo objetivo prometedor para la inmunoterapia contra el cáncer. El objetivo de este estudio fue evaluar la distribución de la expresión de LAG-3 en linfocitos en muestras de melanoma, cáncer gástrico (CG) y cáncer de la unión gastroesofágica (GEJC) mediante un ensayo de inmunohistoquímica (IHC).

En este estudio se incluyeron un total de 102 muestras de melanoma, 256 muestras

de GC y 84 muestras de GEJC. La expresión de LAG-3 se detectó en la mayoría de las muestras en todos los tipos de tumores, con mayor expresión en GEJC que en melanoma o GC. La prevalencia de LAG-3 fue similar en todos los subgrupos según el estadio de la enfermedad (melanoma, CG) y el grado (CG). La prevalencia de LAG-3 también fue constante en todos los subgrupos según la edad, el sexo y la etnia (todos los tipos de tumores), así como el consumo de alcohol y los antecedentes de tabaquismo (melanoma y CG). La expresión de LAG-3 se correlacionó débilmente con la expresión de PD-L1 en TC ( $\rho$  de Spearman de 0,31 para GC, 0,41 para GEJC y 0,46 para melanoma) y se correlacionó moderadamente con PD-L1 CPS ( $\rho$  de Spearman de 0,63 para GC y 0,73 para GEJC). Se observaron correlaciones similares después de combinar la puntuación PD-L1 TC y la CPS.

Se identificaron linfocitos que expresan LAG-3 en todos los tipos de tumores evaluados. La expresión de LAG-3 no difirió con la edad, el sexo, la etnia, el consumo de alcohol

Colaboradores Bronce



## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

ABRIL 2021

y los antecedentes de tabaquismo, y pareció estar asociada, pero no fuertemente correlacionada, con la expresión de PD-L1 en todos los tipos de tumores. La expresión de PD-L1 y LAG-3 en las muestras obtenidas puede no reflejar la expresión observada en los ensayos clínicos, y se necesitan más estudios para caracterizar la expresión de LAG-3 en un entorno clínico

### **Immune Monitoring / Clinical Correlates**

#### ***Overall survival in metastatic melanoma correlates with pembrolizumab exposure and T cell exhaustion markers***

*Vishal Navani, et al.*

La evidencia del mundo real ha demostrado que los pacientes con mayor exposición a BIC tienen una mejor respuesta general (BOR) mejorada y una supervivencia más prolongada. El aumento de la expresión de los marcadores de agotamiento de las células T y las firmas de quimiocinas específicas se han

asociado con una respuesta deficiente a la BIC en el melanoma metastásico.

En este trabajo, los pacientes con melanoma metastásico recibieron pembrolizumab en función del peso y se les extrajeron sangre periférica en serie. Los pacientes con mutación BRAF positiva fueron pretratados con terapia dirigida; de lo contrario, el pembrolizumab fue la primera línea. Los niveles mínimos en plasma se evaluaron utilizando el kit de ELISA Abcam® pembrolizumab. El agotamiento de las células T y los marcadores de quimiocinas se determinaron mediante citometría de flujo en BD Science Fortessa® X20. La cohorte se estratificó en concentraciones mínimas de pembrolizumab altas versus bajas, divididas por la mediana. El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de progresión (SSP) y la supervivencia general (SG) se realizó con base en estos grupos.

Se incluyeron 28 pacientes.; la mediana de seguimiento fue de 32,5 meses. Los niveles mínimos plasmáticos de

Colaboradores Bronce





## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER ABRIL 2021

pembrolizumab no fueron significativamente diferentes entre los grupos categóricos de BOR. Los niveles mínimos son un sustituto válido de la exposición al fármaco. No hubo correlaciones significativas entre los niveles mínimos de pembrolizumab y la expresión del agotamiento de las células T y los marcadores de quimiocinas a lo largo del tiempo. El grupo de exposición alta a pembrolizumab experimentó una SG significativamente más prolongada (mediana no alcanzada frente a 48 meses,  $p = 0,014$ ) que el grupo de exposición baja. Se encontró una relación SLP de exposición positiva similar (mediana no alcanzada frente a 48 meses,  $p = 0,045$ ). Hubo una frecuencia significativamente mayor de coexpresión de CXCR6 y TIM3 en células T CD4 + para la EP (media 21,5% IC 14,9% - 26,06%) en comparación con CR (media 12,2% IC 9,40% - 14,99%) ( $p = 0,003$ ) y PR (media 9,9% IC 7,76% - 12,05%) ( $p = 0,0001$ ). También hubo una frecuencia significativamente mayor de coexpresión de CXCR6 y TIM3 en células T CD8 + para la EP (media 32,59% IC 25,76% -

39,43%) en comparación con PR (media 21,9% IC 18,22% - 25,56%) ( $p = 0,032$ )

Globalmente se describe una relación positiva entre la SLP por exposición y la SG por exposición al pembrolizumab en el melanoma metastásico. Los datos indican que la coexpresión de CXCR6 y los marcadores de agotamiento de las células T en las células T CD4 + y CD8 + circulantes son biomarcadores potenciales de la progresión de la enfermedad en pembrolizumab como agente único.

### **WNT signal pathway activation correlates with innate resistant to immune checkpoint therapies in melanoma**

Fuyu Gong, et al.

La activación de la señalización de WNT se cree como una potencial vía de desarrollo de resistencia a inmunoterapia. En este trabajo se infirió que mutaciones somáticas o alteraciones del número de copias somáticas en los elementos de señalización de WNT, incluidos APC, WNT1, WNT4, WNT6,



## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

ABRIL 2021

WNT16, CTNNB1, BCL9L, SMAD3 y SMAD4. En este estudio se han generado 2 cohortes, la cohorte de descubrimiento de TCGA y la cohorte de validación de los pacientes chinos con melanoma. La frecuencia de alteraciones de la vía WNT de la cohorte TCGA fue del 28,4%, y se representaron subconjuntos moleculares mutuamente excluyentes. En la cohorte TCGA, la activación de la señalización de WNT de alteración se asoció con una mediana de SG más corta (22,5 frente a 13,6 meses,  $p = 0,047$ , HR = 0,61 (0,37-0,89)). Las mutaciones que se predice que activarían la vía WNT se asociaron con una resistencia innata al bloqueo del punto de control inmunológico en el melanoma.

### **Therapeutic Antibodies, Including Engineered Antibodies**

#### ***Enhancing the efficacy of antitumor antibodies with immune checkpoint inhibitors and targeted therapy in melanoma***

*Rolando Pérez-Lorenzo, et al.*

A día de hoy no se han desarrollado anticuerpos antitumorales para el tratamiento del melanoma. En este trabajo, utilizando modelos preclínicos de ratón de melanoma (tanto de tumor sólido como de metástasis pulmonar), encontramos que la eficacia terapéutica del anticuerpo antitumoral específico TA99 (anti-TYRP1) mejora significativamente mediante el bloqueo del punto de control inmunológico. Esto se asoció con un mayor infiltrado de células dendríticas, CD8 +, CD8 + / Foxp3 +, NK1.1 + y células dendríticas, lo que sugiere una mayor respuesta inmune antitumoral. Además, la inhibición de MEK (MEKi) aumentó la expresión de antígenos melanosomales en líneas celulares de melanoma de ratón B16 y YUMM in vitro. A continuación, combinamos TA99 y MEKi para tratar el melanoma B16 in vivo y observamos una reducción sinérgica en el crecimiento tumoral. El tratamiento de ratones con melanoma YUMM (mutante BRAF) con TA99 / MEKi dio como resultado la eliminación completa de los tumores en la mayoría de los

Colaboradores Bronce



## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

ABRIL 2021

animales y produjo respuestas duraderas. Además, se objetiva un efecto sinérgico cuando los ratones portadores de tumores B16 fueron tratados con TA99 combinado con MEKi y bloqueo de puntos de control inmunológico (anti-PD1 y anti-CTLA4). Los hallazgos sugieren que MEKi indujo una mayor expresión de antígenos asociados a tumores, que, en combinación con anticuerpos antitumorales, generaron una respuesta antitumoral adaptativa robusta que fue sostenida por la terapia de inhibición de puntos de control inmunológico.

### Overcoming Resistance in the Tumor Microenvironment: Novel Immunomodulatory Agents

#### ***MSC loaded oncolytic virus and expressing immunomodulators have therapeutic efficacy in advanced melanomas***

*Nobuhiko Kanaya, et al.*

El virus del herpes simple oncolítico (oHSV) que se replica selectivamente en las células tumorales e ilícita un efecto

antitumoral a través de la oncolisis y la producción de neoantígenos se encuentra entre las terapias prometedoras recientemente aprobadas para pacientes con melanoma primario. Sin embargo, la neutralización del virus y la extravasación ineficaz son las principales barreras para la administración sistémica eficaz de oHSV para atacar las lesiones tumorales metastásicas en el cerebro. Anteriormente hemos demostrado que las células madre mesenquimales (MSC) armadas con diferentes variantes de oHSV (MSC-oHSV) albergan lesiones tumorales metastásicas y tienen beneficios terapéuticos en modelos de metástasis cerebrales de melanoma (MBM). Para mejorar la eficacia terapéutica para el melanoma metastásico, se ha investigado la nueva terapia combinada utilizando MSC cargada con oHSV y simultáneamente MSC liberando GM-CSF. Basándose en datos de TCGA propios que indican una pérdida significativa de la expresión de PTEN en el melanoma metastásico en etapa tardía, se han probado terapias basadas en MSC en

Colaboradores Bronce



## INFORME 6: MELANOMA CUTÁNEO INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

ABRIL 2021

melanomas de ratón mutantes de PTEN. Se objetiva que el oHSV cargado con MSC mata eficazmente las células tumorales singénicas mutantes de PTEN in vitro. La terapia combinada basada en MSC mostró efectos terapéuticos significativos tanto en el sitio tratado como en el no tratado en comparación con las terapias de control. Curiosamente, cuando estos ratones después de la terapia combinada fueron reexpuestos con células de melanoma de ratón inyectadas en el cerebro, todos los ratones permanecieron libres de tumores. La terapia combinada de MSC indujo células efectoras CD8 de memoria y células CD8 de memoria central en el bazo y no hubo toxicidad en los órganos principales después de la terapia. En conclusión, estos datos indican que la terapia combinada MSC-oHSV / GM-CSF es una terapia novedosa y prometedora para los melanomas avanzados.

Colaboradores Bronce