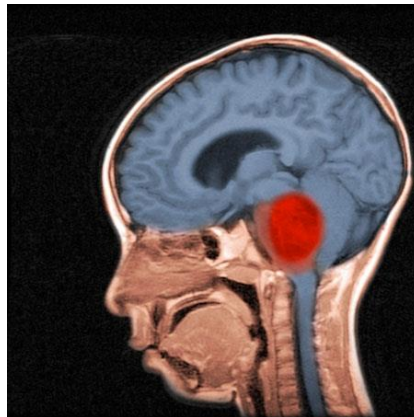


PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN GLIOMA DE LINEA MEDIA

RESUMEN DEL PROYECTO

El glioma difuso de tronco (DIPG, en sus siglas en inglés), ahora reclasificado como glioma difuso de la línea media (DMG), es un tumor que se localiza en tronco encefálico y que afecta principalmente a niños de 6 a 12 años. Es uno de los pocos tipos de cáncer que actualmente sigue sin tener un tratamiento curativo. La incidencia de DMG es de unos 300 niños en Europa anualmente y representa la principal causa de muerte relacionada con tumores cerebrales en menores de 19 años.

La mayoría de los pacientes suelen responder transitoriamente a la radioterapia, único tratamiento que se ha demostrado efectivo, pero al cabo de 6 o 9 meses, en la inmensa mayoría de los casos, el tumor vuelve a crecer hasta provocar el fallecimiento del paciente.



Es un cáncer de rápido crecimiento que invade de forma difusa el tejido cerebral sano, lo que hace que sea imposible extirparlo quirúrgicamente. De hecho, hasta hace pocos años ni tan sólo se podía biopsiar dado los riesgos que implicaba para la vida del paciente. Hoy en día se biopsia en muy pocos hospitales en el mundo. Desde el año 2012, en el Hospital Sant Joan de Déu ya se biopsia a estos pacientes como procedimiento estándar.

Desgraciadamente y a pesar de todos los esfuerzos en investigación, la mayoría de los pacientes siguen muriendo al año del diagnóstico debido a la falta de terapias efectivas. Investigaciones recientes de nuestro grupo de investigación y de otros centros han identificado una mutación específica en la histona H3 que caracteriza al DMG, y que podría ser un objetivo potencial para el tratamiento.

Hay que destacar que el DMG es un tumor completamente distinto al glioblastoma del adulto. Durante muchos años se ha cometido el error de pensar que los tratamientos para el glioblastoma del adulto también podían ser de aplicación para el DMG, pero actualmente se sabe a ciencia cierta que no es así. Es necesario y urgente desarrollar terapias específicas para este tipo de tumor.

Con este objetivo, hemos realizado una serie de experimentos para mapear el proteoma unido a la cromatina de varias neuroesferas derivadas de muestras de pacientes con DMG que tuvieran la histona H3 mutada.

Combinando diferentes enfoques, hemos identificado una docena de genes que parecen estar implicados en la progresión del DMG. El análisis inicial muestra que estos genes son necesarios para mantener el crecimiento de las células del DMG y hemos identificado algunos compuestos que inhiben la proliferación de las neuroesferas de DMG que tengan la mutación de la histona H3.

Esta investigación proporcionaría la base para estudios futuros adicionales que permitan comprender mejor el mecanismo de progresión del DMG en modelos *in vitro* e *in vivo*, utilizando un modelo de organoide cerebral de DMG desarrollado en nuestro laboratorio. Este modelo permitirá identificar los mecanismos implicados en la progresión del DMG y la validación de estos objetivos en organoides cerebrales y en modelos PDX (modelos animales de ratón en los que se implanta el tumor). Aunque desarrollar un tratamiento eficaz para esta enfermedad incurable es un desafío importante, confiamos en que la experiencia y la red de colaboraciones reunidas en este proyecto permitirán avanzar hacia este objetivo.

Este proyecto se llevará a cabo en colaboración entre el laboratorio de investigación del cáncer infantil del Pediatric Cancer Center Barcelona, del Hospital Sant Joan de Déu, que dirige el Dr. Jaume Mora, y el laboratorio del Dr. Luca Di Croce, descrito a continuación.

DESCRIPCIÓN DEL LABORATORIO DE LUCA DI CROCE

Luciano Di Croce es profesor ICREA, líder de grupo senior y coordinador de programas en el Centro de Regulación Genómica de Barcelona (CRG). Desde su formación, el laboratorio de Di Croce se centra en comprender cómo se establecen los cambios en la estructura de la cromatina y cómo afectan la diferenciación y transformación celular. Los principales modelos de cáncer estudiados en el laboratorio son la leucemia y los tumores cerebrales pediátricos.

El laboratorio utiliza una variedad de enfoques, incluidas muestras primarias de pacientes, modelos de ratones PDX y sistemas *in vitro* como organoides, para investigar los vínculos entre las alteraciones epigenéticas y los procesos de carcinogénesis para identificar vulnerabilidades terapéuticas.

En este proyecto, el laboratorio se centrará en DMG, un cáncer infantil poco común con un pronóstico sombrío. El conocimiento del “*modus operandi*” de Polycomb obtenido durante los últimos 15 años de investigación y las nuevas herramientas y reactivos generados en este laboratorio ofrecen una gran ventaja.

Para llevar a cabo el proyecto, será imprescindible contar con las muestras de pacientes de DMG del biobanco del Pediatric Cancer Center Barcelona (PCCB), del Hospital *Sant Joan de Déu*.

Di Croce, quien tiene un fuerte compromiso con la identificación de objetivos terapéuticos para el DMG, estará directamente involucrado en todos los objetivos de la investigación, no sólo con el diseño de los experimentos sino también con el análisis; y será directamente responsable de la realización de cada tarea.

El laboratorio del Luciano Di Croce ya desarrolla varios proyectos en colaboración con el Dr. Jaume Mora, Director Científico del PCCB del Hospital Sant Joan de Déu, como demuestran las publicaciones compartidas y las ayudas de investigación.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

Hasta la fecha, más de 250 ensayos clínicos con diferentes agentes terapéuticos no han demostrado mejoría en el tratamiento del DMG. La implementación de enfoques innovadores e ideas disruptivas podría suponer un gran avance en el manejo terapéutico de este tumor. Actualmente, nuestros datos sólidos y clínicamente relevantes, junto con los modelos experimentales preclínicos que hemos desarrollado durante los últimos años, nos ofrecen una oportunidad única de desarrollar compuestos novedosos para un tratamiento eficaz contra el DMG.

Este proyecto se basa en datos sólidos obtenidos durante los últimos cuatro años. Hemos caracterizado ampliamente el epigenoma, incluida la estructura del genoma 3D, el transcriptoma, el proteoma unido a cromatina y las vulnerabilidades genéticas de líneas celulares derivadas de pacientes (PD).

Este esfuerzo ha producido resultados importantes:

- 1) Recopilación de datos de secuenciación, por un total de aproximadamente 7.500 millones de lecturas.
- 2) Cuantificaciones de aproximadamente 7.000 proteínas
- 3) Análisis de la vulnerabilidad celular a la inactivación selectiva mediante *CRISPR*. Detección de abandono dirigida a aproximadamente 650 factores epigenéticos (algunos resultados están pendientes de publicación).

Todos estos datos se han integrado computacionalmente, revelando alteraciones estructurales y epigenéticas únicas, así como proteínas unidas de manera aberrante en células DMG. **Este proceso nos ha permitido identificar un grupo de objetivos potenciales necesarios para mantener el fenotipo tumoral de DMG.**

Se seleccionaron varios genes clave para una mayor validación funcional y los resultados obtenidos fueron muy esperanzadores. Los compuestos seleccionados contra las proteínas codificadas por estas alteraciones genéticas específicas de DMG **detuvieron eficazmente el crecimiento tumoral en neuroesferas y organoides cerebrales (BO)** derivados de pacientes, que sirven como valiosos modelos preclínicos, y **el tratamiento combinado tuvo efectos antitumorales sinérgicos.** (Figura 1).

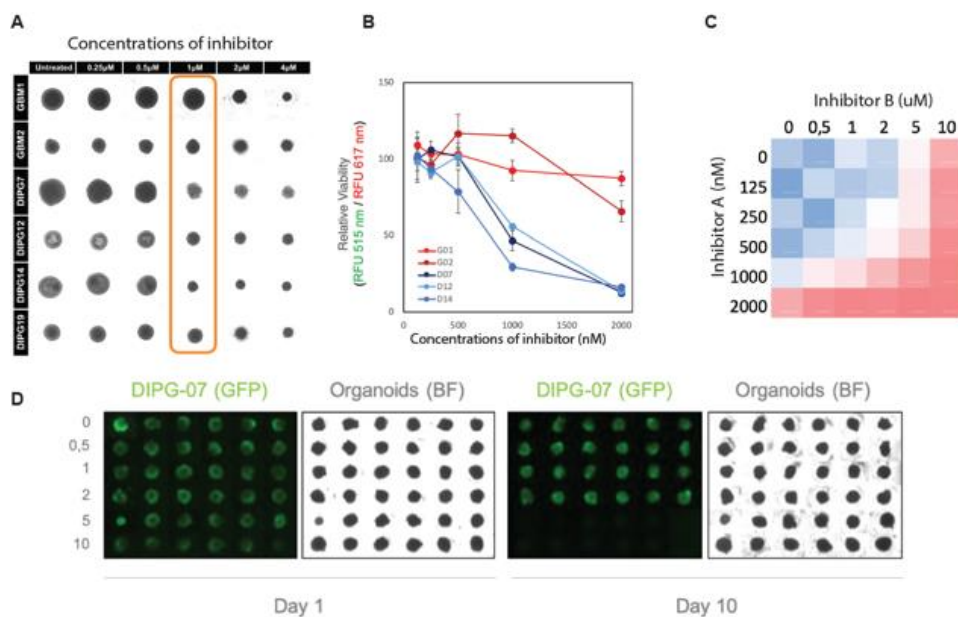


Figure 1. Inhibition of top-priority target in brain neurosphere and organoids. The specific inhibitor was added for 3 days at increasing concentrations. Spheres morphology (A) was then analyzed and were also stained with a live-dead cell viability assay to label live (Calcein in green) and dead (Propidium iodide in red) cells using the EVOS cell imaging system. The data plotted (B) representing the average $\pm$ SD of triplicate measures obtained for several DMG and GBM cell models, indicate that DMG neurospheres growth is significantly affected by chemical inhibition at lower concentrations (1 μ M) than GBM. The combinatory treatment (C) of neurospheres shows a synergistic effect in blocking cell growth. (D) The specific inhibitor was added for 1 day and 3 days at increasing concentrations. DMG cells are expressing GFP reporter, while intact morphology is monitored with bright field (BF).

Con gran entusiasmo, entre los candidatos, **identificamos un objetivo específico**, cuya inhibición mostró la eficacia más prometedora para eliminar las células de DMG. Desafortunadamente, los compuestos disponibles mostraron una pobre permeabilidad a la barrera hematoencefálica (BHE). Por lo tanto, estos nuevos hallazgos sientan las bases para reutilizar compuestos aprobados y clínicamente avanzados en estudios clínicos y para lanzar programas de descubrimiento de fármacos. Ahora, **nuestro objetivo es identificar nuevas estrategias terapéuticas centradas en el objetivo específico que hemos identificado, de máxima prioridad contra el DMG.**

OBJETIVOS DE PROYECTO

Proponemos abordar vulnerabilidades epigenéticas específicas asociadas con mutaciones de la histona H3. Tales alteraciones no solo afectan a la organización y el crecimiento general del tejido, sino que también convierten a H3 en una oncohistona capaz de impulsar la tumorigénesis de DMG.

La oncohistona H3 modifica la arquitectura de la cromatina, provocando cambios en el proteoma unido a la cromatina de la célula cancerosa, lo que contribuye a mantener el fenotipo tumoral. A diferencia de la radioterapia, que generalmente daña el ADN del tejido canceroso, apuntar a vulnerabilidades específicas provocadas por la mutación H3 abordaría eventos específicos que generan DMG. Por lo tanto, nuestro enfoque podría proporcionar tratamientos mejorados para el DMG en comparación con la radioterapia y **finalmente podría proporcionar una solución para detener el crecimiento del DMG**.

Nuestra hipótesis es que los nuevos compuestos contra nuestro objetivo específico de interés, solos o en combinación con otros fármacos, pueden explotarse con fines terapéuticos contra el DMG. Para eso, realizaremos una detección de alto rendimiento (HTS) para identificar nuevos inhibidores de fármacos para el objetivo específico de máxima prioridad (Objetivo 1) y luego validaremos la inhibición de los objetivos utilizando organoides cerebrales y modelos ortotópicos DMG-PDX. (Objetivo 2).

En concreto, nuestros objetivos son:

Objetivo 1 . Ensayo de detección de alto rendimiento (HTS) para identificar nuevos inhibidores de objetivo específico de máxima prioridad.

Nos asociaremos con la Drug Screening Platform (DSP) del *Institut de Recerca Biomèdica* (IRB) Barcelona, que cuenta con una biblioteca de 130.000 compuestos. El IRB y el CRG tienen un acuerdo de colaboración establecido. Planeamos utilizar el ensayo HTS basado en transferencia de energía de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET) contra la biblioteca para medir las interacciones entre proteínas en presencia de inhibidores. Para realizar estas evaluaciones, utilizaremos dominios específicos de nuestro principal objetivo de interés fusionado a la etiqueta glutatión S-transferasa (GST) obtenida de *Escherichia coli* y péptidos de colas H3/H4 acetiladas con histonas disponibles comercialmente. Los compuestos candidatos preseleccionados se analizarán más a fondo mediante una simulación de acoplamiento in silico antes de la validación con el ensayo de unión por resonancia de plasmón superficial (SPR).

Objetivo 2 . "Validación de la inhibición de objetivos tanto en BO como en modelos ortotópicos DMG-PDX".

Utilizando nuestra plataforma BOs, evaluaremos la efectividad y seguridad de los medicamentos identificados en el *Objetivo 1* . Después de la exposición a tratamientos terapéuticos, controlaremos la eliminación de células DMG utilizando ensayos celulares y moleculares solos o en combinación con inhibidores de EZH2 o DNMT. El objetivo de los tratamientos combinados es mejorar la inhibición de objetivos combinándolos sinérgicamente con compuestos ya aprobados en el mercado para otras indicaciones. Los fármacos más prometedores finalmente se validarán en cuanto a eficacia y toxicidad en ratones PDX portadores de tumores DMG. Hemos establecido un sistema para rastrear la presencia y el crecimiento de tumores a través de un sistema de imágenes in vivo (IVIS).

Los éxitos más prometedores formarán la base para la optimización multifactorial (optimización química con eficacia in vivo/potencial PK e IP).

En resumen, este proyecto nos permitiría **identificar y validar compuestos contra el DMG** que actúen frente a nuestro objetivo de máxima prioridad , así como sentar las bases de estudios clínicos para tratar esta enfermedad incurable.

IMPACTO SOCIAL, CIENTÍFICO Y ECONÓMICO DE LA PROPUESTA

La identificación y validación de posibles candidatos para tratar el DMG son una gran necesidad médica insatisfecha. La terapia médica y la tecnología avanzadas han permitido un salto impresionante en la tasa de supervivencia en oncología pediátrica de apenas el 20% en la década de 1960 a más del 85% en la actualidad, en centros altamente especializados. Sin embargo, el **DMG sigue siendo incurable en todas partes**.

A pesar de ser una **enfermedad rara** con solo 300 nuevos diagnósticos por año en Europa, los resultados exitosos de este proyecto podrían tener un profundo impacto social. **El DMG es un cáncer pediátrico sin cura conocida**, y el descubrimiento de un tratamiento eficaz podría marcar una diferencia significativa en la esperanza de vida, la calidad de vida y las perspectivas de los niños afectados y sus familias.

Además, la disponibilidad de un tratamiento reduciría los costes sanitarios asociados al DMG y aliviaría la carga física y emocional asociada con la enfermedad.

El descubrimiento de potenciales nuevos tratamientos para el DMG atraería financiación y recursos para futuras investigaciones y desarrollo, lo que a su vez podría permitir una mejor comprensión de la enfermedad y desarrollar nuevos tratamientos para otros tipos de cáncer cerebral.

Como se mencionó anteriormente, otros tumores cerebrales comunes comparten similitudes con el DMG (*es decir*, inhibición de la actividad represiva de Polycomb). Por lo tanto, es probable que se puedan abordar factores mal regulados iguales o similares basándose en el conocimiento desarrollado dentro de este proyecto.

Un nuevo tratamiento para el DMG podría allanar el camino para avances en la medicina de precisión para otras enfermedades. Sorprendentemente, nuestros hallazgos preliminares revelan que la sobreexpresión pronunciada de nuestro objetivo de máxima prioridad en pacientes con DMG y AML se correlaciona con un mal pronóstico, mientras que su inhibición detiene efectivamente la progresión de la enfermedad (resultados no publicados). Por lo tanto, el programa de detección de fármacos podría transferirse a la identificación y validación de **nuevas terapias para otros tumores cerebrales** además del DMG y, en términos más generales, para otros cánceres.

PRESUPUESTO NECESARIO

Coste Salario postdoctoral de 1 año: 50.000€
Coste de instalación del sistema de detección: 8.000 €
Coste Proyección en el IRB: 16.000€
Coste Reactivos en "revvity.com": 20.000€
Coste Colas de histonas acetiladas y no de EpiCypher: 15.000 €
Expresión de coste de diana en baculovirus: 10.000€
Validación de costes en organoides cerebrales (y en ratones PDX): 40.000 €
Otros costes indirectos: 25.000 €

COSTE TOTAL DEL PROYECTO: 184.000 €
PERIODO DE EJECUCIÓN: 12 Meses