

# Leucemia linfática crónica (LLC): efecto de los inhibidores de la tirosina quinasa Syk, Fostamatinib (R406) y Entospletinib (GS-9973), sobre los linfocitos T y la acción anti-tumoral del rituximab.

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): effect of the Syk  
kinase-inhibitors, Fostamatinib (R406) and Entospletinib  
(GS-9973), on T cell function and rituximab activity.

Colado A<sup>1</sup>; Almejún M<sup>1</sup>; Podaza E<sup>1,2</sup>; Risnik D<sup>1,2</sup>;  
Fernandez Grecco H<sup>3</sup>; Cabrejo M<sup>3</sup>; Cranco S<sup>4</sup>; Burgos RA<sup>4</sup>;  
Sánchez Ávalos JC<sup>4</sup>; Bezares FR<sup>5</sup>; Giordano M<sup>1,2</sup>;  
Gamberale R<sup>1,2</sup>; Borge M<sup>1,2</sup>.

<sup>(1)</sup>Laboratorio de Inmunología Oncológica, IMEX-CONICET-Academia Nacional de Medicina, CABA, Argentina. <sup>(2)</sup>Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA, Argentina. <sup>(3)</sup>Sanatorio Dr. Julio Méndez, CABA, Argentina. <sup>(4)</sup>Instituto Alexander Fleming, CABA, Argentina. <sup>(5)</sup>Hospital Teodoro Álvarez, CABA, Argentina.

PREMIO AL MEJOR TRABAJO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA  
EN EL MARCO DEL XXII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE HEMATOLOGÍA.

mercedesborge@hotmail.com

Fecha de recepción: 15/08/2015  
Fecha de aprobación: 15/09/2015



ARTÍCULO  
ORIGINAL

HEMATOLOGÍA  
Volumen 19 n° 3: 206-211  
Septiembre - Diciembre 2015

**Palabras clave:** Leucemia Linfática crónica,  
Syk,  
GS-9973,  
Entospletinib,  
Fostamatinib,  
R406,  
inhibidores de quinasas,  
BCR,  
rituximab.

**Keywords:** Chronic Lymphocytic Leukemia,  
Syk,  
GS-9973,  
R406,  
Entospletinib,  
Fostamatinib,  
kinase inhibitors,  
BCR,  
rituximab.

## Abstract

Leukemic cells from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients proliferate within lymphoid tissues in particular areas called proliferation centers, where they are in close contact with non-leukemic cells including activated CD4<sup>+</sup> T cells, stroma and myeloid cells<sup>(1, 2)</sup>. There, CLL cell proliferation, survival and resistance to cytotoxic agents is driven by molecules such as CD40L, expressed by activated T cells<sup>(3)</sup>, the chemokines CCL19, CCL21

and CXCL12 secreted by stromal and myeloid cells<sup>(4,5)</sup>, and stimulation through the B-cell antigenic receptor (BCR)<sup>(6)</sup> favoring disease progression. At the present CLL is an incurable disease. Current therapies are effective in inducing initial remission in most patients but they are not curative and relapse is inevitable<sup>(7)</sup>. In the past few years several inhibitors targeting kinases involved in the BCR-signaling have been developed, such as the Syk inhibitors

R406 and GS-9973, the Btk inhibitor ibrutinib and the PI3K $\delta$  inhibitor idelalisib. Results obtained in clinical trials with these agents have generated great excitement because of their clinical efficacy and excellent tolerability<sup>(7)</sup>. We<sup>(8)</sup> and others<sup>(9-11)</sup> have recently reported that BCR-associated kinases inhibitors have immunomodulatory effects on the tumor microenvironment from CLL patients. Thus, we found that ibrutinib impaired the phagocytosis of rituximab-coated leukemic cells from CLL patients by human macrophages<sup>(8)</sup> and others found that ibrutinib inhibits the activation of Th2 cells after TCR stimulation<sup>(12)</sup>, reducing the signals that drive leukemic cell expansion. Here, we aimed to evaluate the effect of R406 and GS-9973 on:

1) the physiology of CD4<sup>+</sup> T from CLL patients and 2) macrophage mediated phagocytosis of rituximab-coated CLL cells. We first asked whether R406 and GS-9973 were able to inhibit T cell activation and proliferation. We used clinically relevant doses of the drugs and confirmed that these doses (between 0.1 and 5  $\mu$ M) did not induce T cell apoptosis (not shown). In order to induce T cell activation, peripheral blood mononuclear cells from CLL patients were cultured in the presence of anti-CD3 antibodies with R406, GS-9973 or the vehicle of

## Introducción

El clon leucémico de los pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) prolifera principalmente dentro de los ganglios linfáticos en estructuras histológicas llamadas centros proliferantes. En estos sitios las células LLC perciben señales de supervivencia a través del receptor antigénico (BCR) e interactúan con un microambiente tumoral, constituido por linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, estroma y células de estirpe mieloide<sup>(1, 2)</sup>, que favorece su supervivencia y proliferación gracias a la expresión de moléculas como el CD40L por parte de los linfocitos T CD4<sup>(3)</sup> y quimiocinas como CCL19, CCL21 y CXCL12 por parte del estroma<sup>(4)</sup>, entre otros factores. Si bien la LLC continúa siendo una enfermedad incurable, en los últimos años se han desarrollado moléculas que inhiben distintas quinasas involucradas en la transducción de señal a través del BCR, como los inhibidores de Syk, R406 y GS-9973, inhibidores de la tirosina kinasa de Bruton (Btk) como el ibrutinib, y el inhibidor de PI3K $\delta$ , idelalisib, generando una alta expectativa en el campo de la LLC y otras patologías

the drugs as a control (DMSO). We found that both inhibitors impaired the expression of the activation markers CD25, CD69 and CD40L on CD4<sup>+</sup> T cells, evaluated by flow cytometry at 24 hs ( $p < 0.05$ ) and the T-cell proliferation evaluated by the CFSE dilution assay at 5 days ( $p < 0.05$ ). We also observed, by using the Transwell system assay, that both drugs inhibited T cell migration towards CCL19 and CCL21 ( $p < 0.05$ ), key molecules involved in T cell homing to lymph nodes. Finally, we found that R406 and GS-9973 inhibited macrophage-mediated phagocytosis of CLL cells coated with the anti-CD20 antibody rituximab as evaluated by flow cytometry ( $p < 0.05$ ).

Our results suggest that R406 and GS-9973 affect the tumor microenvironment, by inhibiting CD4<sup>+</sup> T cell activation and thus reducing the supportive signals given to the malignant clone. Nevertheless, these results also suggest that in patients treated for long periods with these agents, the T cell-mediated immune response might be affected. We also found that both R406 or GS-9973 interfere with the macrophage-mediated anti-tumor activity of rituximab suggesting that the sequential and not the concurrent administration might enhance their anti-tumor activity *in vivo* and improve CLL therapy.

oncohematológicas debido a las excelentes respuestas que se obtuvieron en los ensayos clínicos<sup>(7)</sup>. En el año 2014 la FDA (*Food and Drug Administration*) de los EEUU aprobó el uso de ibrutinib e idelalisib en pacientes con LLC, el primero como monodroga y el segundo en combinación con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab<sup>(13)</sup>. Más allá de los efectos que estas drogas tienen sobre el clon leucémico, recientemente se han reportado diversos trabajos, uno de ellos realizado en nuestro laboratorio<sup>(8)</sup>, donde se observó que el ibrutinib afecta también a otras poblaciones celulares de los pacientes, como los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, modulando su perfil de activación y también sobre los macrófagos, inhibiendo la fagocitosis de células LLC opsonizadas con rituximab, hecho que podría disminuir la efectividad de las terapias que combinan al inhibidor de Btk junto con anticuerpos monoclonales<sup>(8-10,12)</sup>.

## Objetivo

Debido al rol central que tienen los linfocitos T

CD4<sup>+</sup> en la patogénesis de la LLC y a la importancia de los macrófagos en la acción anti-tumoral del rituximab, nos propusimos como objetivos de este trabajo evaluar el efecto de los inhibidores R406 y GS-9973 sobre: **1)** la funcionalidad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes con LLC y **2)** la capacidad de los macrófagos de fagocitar células LLC opsonizadas con rituximab.

### Materiales y métodos

Se trabajó con muestras de sangre periférica de pacientes con LLC y de dadores sanos, todos ellos reclutados previo consentimiento informado y aprobación del Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina, cumpliendo con todas las normas bioéticas nacionales e internacionales y preservando el anonimato de los pacientes y las reglas de confidencialidad. Los pacientes incluidos en el estudio estaban libres de tratamiento por al menos 6 meses antes de la toma de la muestra. El número de pacientes incluidos en cada experimento se detalla en las figuras. La purificación de células mononucleares totales (CMT) de sangre periférica se realizó mediante centrifugación diferencial en Ficoll-Hypaque. Para cumplir con el primer objetivo, se activaron a los linfocitos T (LT) cultivando las CMT en presencia de anticuerpos específicos para CD3 inmovilizados en placa de forma de entrecruzar a su receptor antigénico (TCR/CD3). La activación se realizó en presencia de dosis clínicamente relevantes de los inhibidores R406 o GS-9973 o en presencia del vehículo de las drogas (DMSO) como control. Previamente confirmamos que estas concentraciones de droga no inducían la apoptosis de los LT (resultados no mostrados). Al cabo de 24 horas se evaluó por citometría de flujo la expresión de los marcadores de activación CD25, CD69 y CD40L sobre los LT CD4<sup>+</sup>. Para evaluar la proliferación se utilizó la técnica de dilución de CFSE. Para esto se marcaron a las CMT con CFSE (1 $\mu$ M) y luego se activaron a los LT tal como se describió arriba, al cabo de 5 días se evaluó el porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> con marca baja de CFSE, que corresponden a las células que sufrieron algún evento de división celular. La migración de los LT en respuesta a las quimiocinas CCL19 y CCL21 se realizó utilizando 1  $\mu$ g/ml de las quimiocinas mediante el método de Transwell<sup>(14)</sup>. Para el segundo objetivo se diferenciaron macrófagos a partir del cultivo de monocitos de

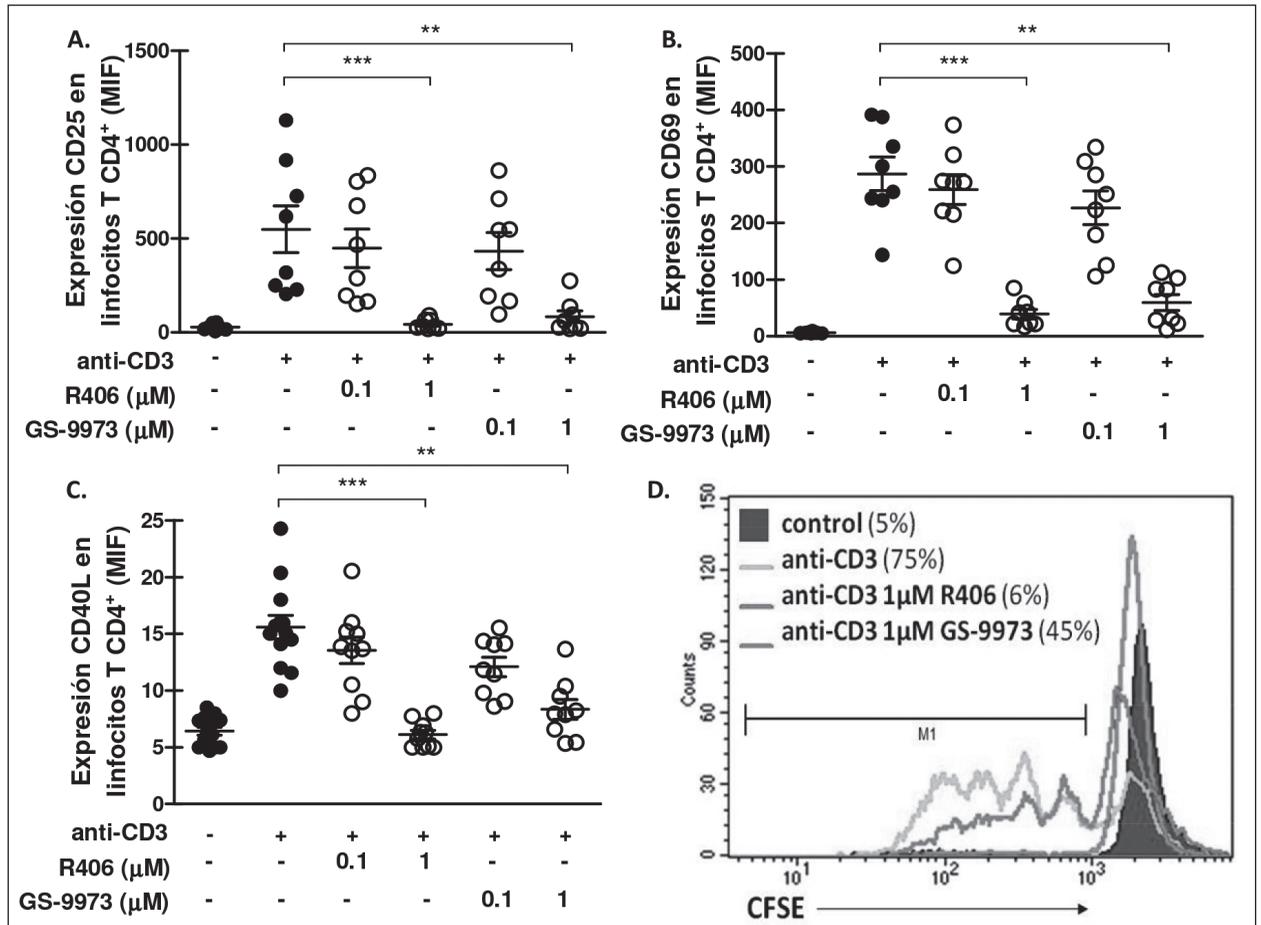
dadores sanos en presencia de 50 ng/ml de M-CSF por 6 días. El ensayo de fagocitosis se realizó tal como está descrito<sup>(8)</sup>.

Brevemente, las células LLC fueron marcadas con CFSE y recubiertas en frío con rituximab (50 $\mu$ g/ml), para luego ser co-cultivadas con los macrófagos a 37°C por 1 hora en presencia de R406, GS-9973 o DMSO como control. La fagocitosis se cuantificó por citometría de flujo y se confirmó por microscopía confocal determinando el número de macrófagos positivos para CFSE. Las pruebas estadísticas utilizadas se detallan en la leyenda de cada figura.

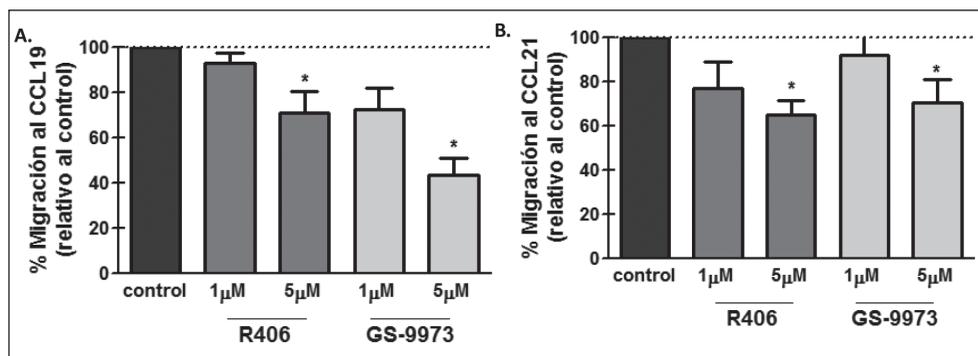
### Resultados

Al evaluar el efecto de R406 y GS-9973 en la activación de los LT a través del receptor antigénico encontramos que dosis clínicamente relevantes de ambos inhibidores disminuyeron significativamente la expresión de los marcadores de activación celular CD25 (**Figura 1 A**), CD69 (**Figura 1 B**) y CD40L (**Figura 1 C**) sobre los LT CD4<sup>+</sup>. Asimismo, y tal como se muestra en la **Figura 1D** encontramos que la activación a través del TCR/CD3 indujo la esperable proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes con LLC (8 $\pm$ 1,4% de proliferación para el control y 67  $\pm$ 4% de proliferación para los cultivados con anti-CD3), la cual se redujo significativamente por la presencia de ambos inhibidores siendo mayor la inhibición inducida por el R406 (8 $\pm$ 1,6% de proliferación en presencia de 1 $\mu$ M R406 y 49 $\pm$ 5% en presencia de 1 $\mu$ M de GS-9973). La **Figura 1D** muestra el histograma de un experimento representativo de 16 pacientes evaluados.

Luego decidimos evaluar el efecto de los inhibidores sobre la migración de los LT CD4<sup>+</sup> en respuesta a las quimiocinas CCL19 y CCL21, las cuales guían el reclutamiento de estas células hacia los órganos linfáticos secundarios, sitio donde contactan con el clon leucémico. Tal como puede observarse en la **Figura 2** encontramos que ambos inhibidores redujeron significativamente la migración en respuesta a CCL19 y CCL21 a una concentración de 5 $\mu$ M, cercana a las concentraciones de R406 y GS-9973 encontradas en el plasma de los pacientes LLC tratados con estas drogas (entre 1 y 4  $\mu$ M)<sup>(15, 16)</sup>. En ninguno de los casos analizados los inhibidores modificaron la expresión del receptor para CCL19 y CCL21, el CCR7, al evaluar su expresión por citometría de flujo (resultados no mostrados).



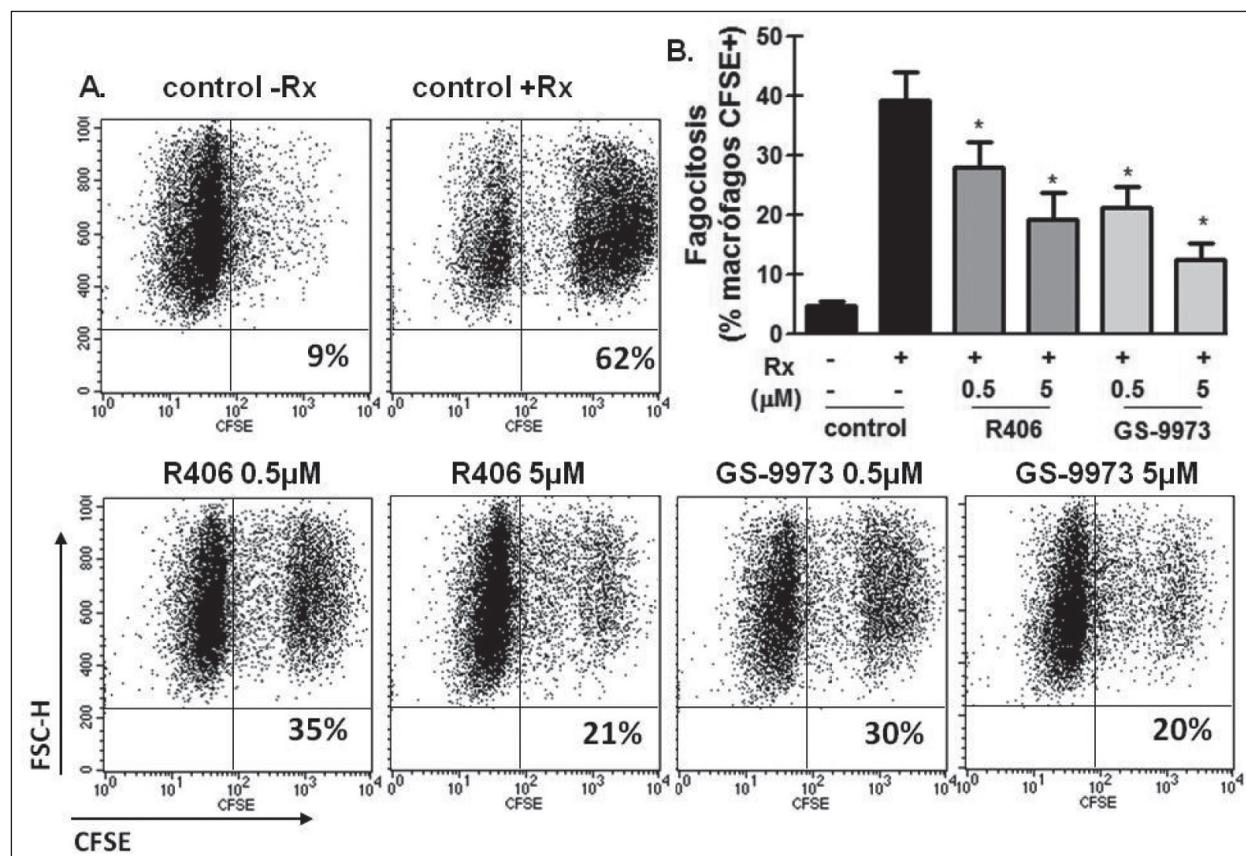
**Figura 1. El R406 y el GS-9973 inhiben la activación y proliferación de los linfocitos T CD4 de pacientes con LLC.** Se activaron los linfocitos T (LT) de pacientes LLC a través de su receptor antigénico con anti-CD3 en presencia o ausencia de los inhibidores. Se muestra la expresión de CD25 (A), CD69 (B) y CD40L (C) sobre los linfocitos T CD4 analizada por citometría de flujo como media de intensidad de fluorescencia (MIF). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ , Friedman test, Dunn's Multiple Comparison Test. **D.** Se analizó la proliferación de los LT CD4 en respuesta a anti-CD3 en presencia o ausencia de los inhibidores por citometría de flujo mediante la técnica de dilución del CFSE. Se muestra el histograma de un experimento representativo ( $n = 16$ ). Entre paréntesis se muestra el porcentaje de LT CD4 con CFSE bajo, es decir los LT que han proliferado (M1). ( $p < 0.05$ , Friedman test, Dunn's Multiple Comparison Test, control vs R406 1μM y GS-9973 1μM).



**Figura 2. El R406 y el GS-9973 inhiben la migración de LT CD4 en respuesta a las quimiocinas CCL19 y CCL21.** Se realizaron ensayos de migración como se explica en el texto. Se muestran la media  $\pm$  ES del % de migración de LT CD4 en respuesta a las quimiocinas CCL19 (A) y CCL21 (B) tomando como 100% la migración de las células control sin inhibidor. \* $p < 0.05$ , Wilcoxon Signed Rank Test,  $n = 10$ .

Por último evaluamos el efecto de los inhibidores sobre la fagocitosis de células LLC opsonizadas con rituximab, mediada por macrófagos humanos. Tal cómo puede verse en la **Figura 3**, encontramos que

dosis clínicamente relevantes de ambas drogas inhibieron significativamente la fagocitosis de células LLC opsonizadas con rituximab.



**Figura 3.** El R406 y el GS- 9973 inhiben la fagocitosis de células LLC opsonizadas con rituximab por parte de macrófagos humanos. **A.** Se muestran dot plots de un experimento representativo donde se muestra la marca de CFSE en la población de macrófagos. El cuadrante superior derecho del dot plot corresponde a los macrófagos positivos para CFSE, que son aquellos que fagocitaron células LLC, el porcentaje de macrófagos CFSE<sup>+</sup> se muestra en la figura. **B.** Se muestra la media ± ES del % de fagocitosis que corresponde al % de macrófagos con marca de CFSE analizada por citometría de flujo. \* $p < 0.05$ , Friedman test, Dunn's Multiple Comparison Test,  $n = 15$ .

### Discusión y conclusiones

Nuestros resultados demuestran que los inhibidores R406 y GS-9973, además de los efectos ya reportados sobre el clon leucémico<sup>17,18</sup> tienen efectos sobre células del microambiente tumoral de los pacientes con LLC. Encontramos que inhiben la activación, proliferación y migración de los LT CD4 de pacientes con LLC, reduciendo de ese modo las señales que favorecen la acumulación del clon leucémico. Sin embargo, estos resultados también sugieren que en tratamientos prolongados con estas drogas la respuesta inmune celular de los pacientes tratados podría estar comprometida. Por último, dado que observamos que los inhibidores interfieren con la

acción del rituximab, nuestros resultados sugieren que en terapias combinadas sería conveniente la administración secuencial y no simultánea de rituximab y GS-9973 o R406.

### Declaración de conflictos de interés:

Romina Gamberale: ha recibido honorarios por conferencias, actividades educativas, consultorías o asesorías por parte de Janssen, Roche y ABBVie. Fernando R. Bezares: ha recibido honorarios por conferencias de Janssen, Novartis, Varifarma y ha participado como asesor externo para Roche. El resto de los autores declara no poseer conflictos de interés.

**Bibliografía**

1. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligiaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009;114(16):3367-3375.
2. Stein H, Bonk A, Tolksdorf G, Lennert K, Rodt H, Gerdes J. Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas. *J Histochem Cytochem*. 1980;28(8):746-760.
3. Patten PE, Buggins AG, Richards J, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*. 2008;111(10):5173-5181.
4. Arai J, Yasukawa M, Yakushijin Y, Miyazaki T, Fujita S. Stromal cells in lymph nodes attract B-lymphoma cells via production of stromal cell-derived factor-1. *Eur J Haematol*. 2000;64(5):323-332.
5. Schrottner P, Leick M, Burger M. The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact. *Ann Hematol*. 2010;89(5):437-446.
6. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563-574.
7. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2015.
8. Borge M, Almejún B, Podaza E, et al. Ibrutinib impairs the phagocytosis of rituximab-coated leukemic cells from Chronic Lymphocytic Leukemia patients by human macrophages. *Haematologica*. 2015 Apr;100(4):e140-2.
9. Da Roit F, Engelberts PJ, Taylor RP, et al. Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumour activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. *Haematologica*. 2015 Jul 17. pii: S0167-4889(15)00245-1.
10. Kohrt HE, Sagiv-Barfi I, Rafiq S, et al. Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2014;123(12):1957-1960.
11. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood*. 2010;116(12):2078-2088.
12. Dubovsky JA, Beckwith KA, Natarajan G, et al. Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes. *Blood*. 2013;122(15):2539-2549.
13. Sanford DS, Wierda WG, Burger JA, Keating MJ, O'Brien SM. Three Newly Approved Drugs for Chronic Lymphocytic Leukemia: Incorporating Ibrutinib, Idelalisib, and Obinutuzumab into Clinical Practice. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15(7):385-391.
14. Borge M, Nannini PR, Galletti JG, et al. CXCL12-induced chemotaxis is impaired in T cells from patients with ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2010;95(5):768-775.
15. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(13):2578-2585.
16. Sharman J, Hawkins M, Kolibaba K, et al. An open-label phase 2 trial of entospletinib (GS-9973), a selective spleen tyrosine kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;125(15):2336-2343.
17. Buchner M, Fuchs S, Prinz G, et al. Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2009;69(13):5424-5432.
18. Burke RT, Meadows S, Loriaux MM, et al. A potential therapeutic strategy for chronic lymphocytic leukemia by combining Idelalisib and GS-9973, a novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor. *Oncotarget*. 2014;5(4):908-915.