

Abschlussbericht

1. Thema des Forschungsprojekt

Combining genetic predisposition and drug screening response to predict therapy related toxicity and determine prognostic germline variants in childhood acute lymphoblastic leukemia

2. Projektleiter

Name: Dr. rer. nat. Sanil Bhatia
Affiliation: Clinic of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, University Children's Hospital, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf
Telefon: +49-211-81-04896
Email: sanil.bhatia@med.uni-duesseldorf.de

Name: Dr. rer. nat. Rabea Wagener
Affiliation: Clinic of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, University Children's Hospital, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf
Phone: +49-211-81-04896
Email: rabea.wagener@med.uni-duesseldorf.de

3. Laufzeit des Projekts

01.03.2021 bis 28.02.2023

4. Zusammenfassung des Projektvorhabens

Krebs ist eine der Haupttodesursachen bei Kindern. Durch die intensiven Forschungsarbeiten hinsichtlich der genetischen und molekularen Mechanismen der Leukämieentstehung konnten spezifische Behandlungsstrategien etabliert werden, wodurch heute z.B. die Überlebensrate von Kindern mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) mehr als 90% beträgt. Dennoch bleibt die Leukämie eine der Hauptursachen bei krebsbedingten Todesfällen im Kindesalter. Außerdem sind die Therapien toxisch und oft mit lebenslangen Gesundheitsproblemen verbunden. Ziel ist es daher Therapeutika zu entwickeln, die wirksamer und weniger toxisch für die Patienten sind. Außerdem sollte auch der Einfluss genetischer Veränderungen in der Keimbahn auf das Therapieansprechen der Patienten berücksichtigt werden. Bisher konnten in einigen Studien bei 2-11% der Kinder mit Tumoren genetische Veränderungen in der Keimbahn identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Toxizität und das Therapieansprechen haben könnten. Jedoch wurden diese Befunde nicht funktionell verifiziert.

Ziel dieses Projektes ist es daher, die Toxizität im Zusammenhang mit der (Poly-)Chemotherapie durch Arzneimittel-Screening anhand von Fibroblasten von Kindern mit ALL zu identifizieren und diese Ergebnisse mit den verfügbaren klinischen Daten zur akuten und langfristigen Toxizität sowie zu den genetischen Veränderungen in potenziellen Zielgenen dieser Therapeutika zu korrelieren.

5. Ergebnisse

Die Polychemotherapie zur Behandlung der ALL verursacht akute und langfristige Nebenwirkungen. Etwa 3 % der Patienten sterben aufgrund akuter Nebenwirkungen während der Behandlung. Die häufigsten akuten Nebenwirkungen sind Infektionen durch Immunsuppression, die auch die Haupttodesursache darstellen. Andere, nicht tödliche Infektionen wie die orale Mukositis werden ebenfalls häufig während der Therapie beobachtet und stellen eine große Belastung für die Patienten dar. Des Weiteren verursacht Polychemotherapie Anämien und Thrombozytopenien, die häufig regelmäßige Transfusionen erforderlich machen. Die phänotypische Arzneimittelprüfung ist eine etablierte Methode, die erstmals vor fast einem halben Jahrhundert eingesetzt wurde. Die Integration moderner Techniken ermöglichte jedoch ein Hochskalieren und eine zuverlässigere Anwendung, was zum Hochdurchsatz-Medikamenten-Screening (HTDS) führte.

I. Klärung der Frage, ob *in vitro* HTDS von Fibroblasten zur Modellierung interindividueller Unterschiede bei klinischen unerwünschten Arzneimittelwirkungen als Alternative zu pharmakogenetischen Tests verwendet werden kann

In dieser Analyse wurden Fibroblasten von 41 Patienten mit ALL und zehn Patienten mit anderen malignen Erkrankungen als Vergleichskohorte einbezogen. Bei handelt es sich um die folgenden Krankheiten: AML (N=1), Lymphome (Hodgkin-Lymphom N=1, Burkitt-Lymphom N=2), ZNS-Tumoren (Medulloblastome N=3, Ependymom N=1), Nephroblastom (N=1), Neuroblastom (N=1). Mit Hilfe des HTDS konnten wir zeigen, dass Fibroblasten im interindividuellen Vergleich unterschiedlich auf Medikamente reagieren. Ein Zusammenhang mit der Grunderkrankung (ALL gegenüber anderen malignen Erkrankungen) konnte nicht gesehen werden. Im nächsten Schritt haben wir die Ergebnisse des HTDS mit den klinischen Daten abgeglichen, die von 57 Patienten erhoben werden konnten. Hierbei wollten wir insbesondere herausfinden, ob es einen Zusammenhang zwischen den akuten Nebenwirkungen bis Tag 36 des Protokolls und den interindividuellen Unterschieden bezüglich des Ansprechens auf die während dieses Zeitraums verabreichten Medikamente *in vitro* gibt. Da jedoch nur eines der fünf im ALL-Behandlungsprotokoll verabreichten Medikamente eine interindividuelle abweichende Reaktion im HTDS der Fibroblasten zeigte, war bereits eine eher unzureichende Aussagekraft dieses Modells zu erwarten. Klinische und experimentelle Daten

waren für 39 Patienten vorhanden. Im HTDS zeigten 20 Patienten ein normales Ansprechen auf Daunorubicin, neun waren besonders sensitiv und zehn waren resistent. Zwischen diesen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit oder dem Auftreten von akuten Nebenwirkungen gefunden werden. Daher fanden wir keinen Zusammenhang zwischen dem HTDS und den akuten Nebenwirkungen der Patienten während der ersten 36 Tage. Da jedoch so nur ein Medikament untersucht werden konnte, wurde eine Platte entworfen, die die Medikamentenkonzentrationen des Protokoll IA des BFM 2017 Behandlungsregimes versucht nachzuahmen, um so möglichst alle verabreichten Medikamente zu untersuchen.

Bei diesem Ansatz wurden nur die Chemotherapeutika getestet, die beim Protokoll IA des BFM 2017 Behandlungsplans eingesetzt werden. Hierbei wurden die fünf Arzneimitteln als Kombination in der gleichen Konzentration zueinander wie im Behandlungsprotokoll an den Patienten-Fibroblasten getestet. Insgesamt wurden Fibroblasten von 25 ALL-Patienten auf diesen Platten untersucht. Für die akuten Nebenwirkungen wurde ein Score berechnet, der für jede neu aufgetretene, akute Nebenwirkung einen Punkt vergibt. Wir konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem Drug Sensitivity Score (DSS) der Kombination aus allen fünf Arzneimitteln und des Scores für akute Nebenwirkungen nachweisen (Abbildung 1A). Darüber hinaus wurde eine Korrelationsmatrix mit den DSS- und IC50-Werten aus dem HTDS, der oben beschriebenen Score, der Gesamtzahl der unerwünschten Ereignisse, sowie den extremsten Wert für jede laborchemisch messbare Nebenwirkung berechnet. Auch in dieser Matrix zeigte sich die geringe Korrelation der experimentellen Daten mit den klinischen Daten (siehe Abbildung 1B). Während der Erhebung der klinischen Daten wurde beobachtet, dass das Ausmaß der Myelotoxizität mit dem Gesamtausmaß der schweren akuten Nebenwirkungen zusammenhängt. Daher wurden die DSS-Werte für Patienten mit geringer oder keiner Myelotoxizität mit denen mit hoher Myelotoxizität verglichen (siehe Abbildung 1C). Auch hier waren die mittleren DSS-Werte nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test $p=0,6$). Ebenso zeigten sich keine Unterschiede der DSS-Werte von Patienten mit Hepatotoxizität, Neurotoxizität oder schweren Infektionen verglichen mit Patienten mit geringer oder keiner Myelotoxizität (Kruskal-Wallis-Test $p=0,9348$, siehe Abbildung 1D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine offensichtliche Korrelation zwischen dem Medikamenten-Screening der Fibroblasten und den klinischen Daten bezüglich akuten Nebenwirkungen der Patienten zu erkennen war.

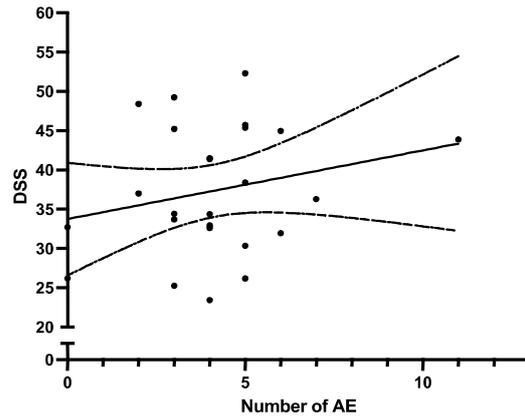
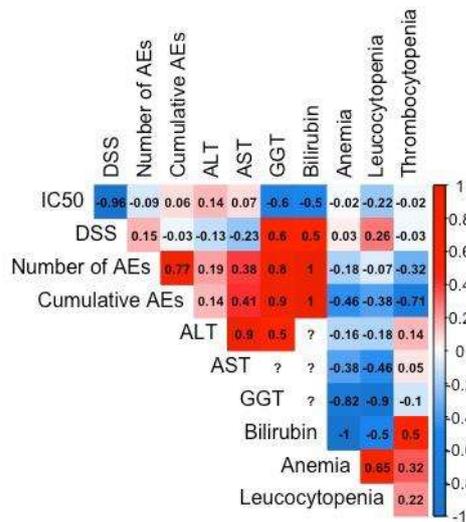
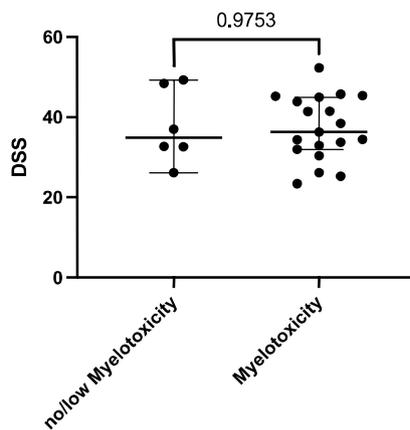
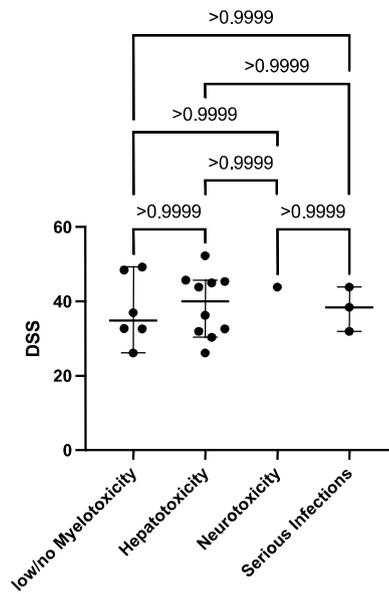
A**B****C****D**

Abbildung 1. (A) Ein Korrelationsdiagramm des Scores mit der Anzahl der neu aufgetretenen akuten Nebenwirkungen (Number of AE) und der DSS-Werte aller Medikamente, die während des Protokoll IA des BFM 2017 Behandlungsregims verwendet werden. (B) Korrelationsmatrix der Arzneimittel-Screening-Daten (DSS und IC50) der protokollbasierten Platten und der Anzahl der akuten Nebenwirkungen (wie oben beschrieben), der kumulativen AE (alle unerwünschten Ereignisse zusammengefasst) und der niedrigsten bzw. höchsten Parameter für die Marker Hepatotoxizität und Myelosuppression. (C) Streudiagramm der DSS-Werte von Patienten mit geringer/keiner oder hoher Myelosuppression. Hohe Myelosuppression wurde definiert als Abnahme aller drei Zelllinien. Es wurde ein Mann-Whitney-U-Test zwischen den Gruppen durchgeführt. (D) Ein Streudiagramm der DSS-Werte von Patienten, die an geringer/keiner Myelotoxizität (weniger als drei Linien vermindert), Hepatotoxizität (mindestens zwei Marker erhöht), Neurotoxizität (mindestens ein neurologisches unerwünschtes Ereignis) oder Infektionen leiden. Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit einem $p=0,93$ und ein Folgetest mit Dunns multiplem Vergleich durchgeführt (p -Werte in der Grafik).

II. Suche nach neuen Wirkstoffen für die Behandlung von Leukämie-Subtypen mit hohem und mittlerem Risiko unter Verwendung etablierter Leukämie-Zelllinien und von Patienten stammenden Tumorzellen

Mit dem HTDS können verschiedene Chemotherapeutika und zielgerichtete Medikamente schnell und effektiv in vitro an Tumorzellen von Patienten in der Klinik getestet werden, um bei Bedarf eine gezielte, patientenspezifische Therapie zu ermöglichen. Hier können auch Chemotherapeutika und zielgerichtete Medikamente getestet werden, die sofort für den klinischen Einsatz zur Verfügung stehen könnten, aber derzeit für andere Krankheiten eingesetzt werden und daher erst umgelenkt werden müssten. In einem nächsten Schritt haben wir mit dem HTDS Chemotherapeutika und zielgerichtete Medikamente bei pädiatrischen Leukämiepatienten mit schlechter Prognose, wie z.B. Patienten mit Down-Syndrom (DS) oder mit Chromosomenveränderungen in den PAX5- oder MLL-Genen, getestet, um potentiell wirksame Medikamente zu identifizieren.

Hierzu haben wir Patientenproben von 34 Leukämiepatienten (9 (DS) CRLF2r, 15 PAX5r, 10 MLLr), 7 humanen etablierten Leukämiezelllinien und 14 peripheren Blutproben gesunder Spender auf der HTDS-Plattform mit einer Bibliothek von über 180 Substanzen untersucht, die von der FDA/EMA zugelassene oder in präklinischen Studien verwendete Substanzen enthält. Wir identifizierten Medikamente die gegen BCL2, HSP90 oder BRD4 gerichtet sind und somit neue therapeutische Angriffsziele für die Therapie gegen Leukämiezellen sein könnten (Abbildung 2). Insgesamt unterstreicht diese Studie den Nutzen von HTDS für das Repurposing von Arzneimitteln, das die Identifizierung wirksamer und klinisch umsetzbarer therapeutischer Wirkstoffe für schwer zu behandelnde Untergruppen der Leukämie bei Kindern ermöglicht.

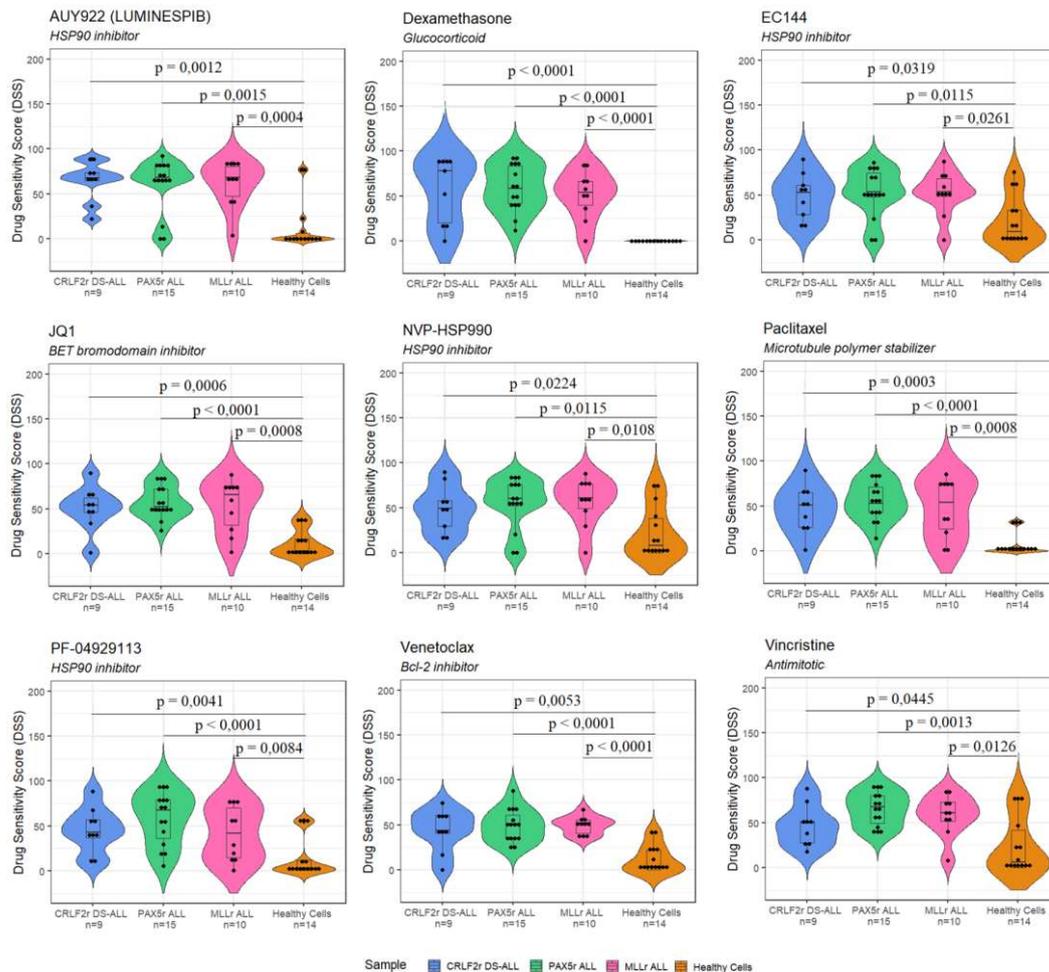


Abbildung 2. Die Grafiken zeigen die unterschiedliche Sensitivität einzelner ALL-Patientenkohorten (CRLF2r DS-ALL N=9, PAX5r ALL N=15, MLLr ALL N=10) im Vergleich zu gesunden Zellen (insgesamt n=14; gesunde lymphoblastoide B-Zelllinien: n=5, hämatopoetische Stammzellen HSCs: n=3, T-Zellen: n=3, PBMCs: n=3) bei Behandlung mit den gezeigten Inhibitoren. Ein positiver mittlerer Rangunterschied weist auf eine höhere Wirksamkeit in ALL-PDX-Proben im Vergleich zu den gesunden Zellen hin.

6. Publikationen

- Chiara Palmi, Silvia Bresolin, Stefanie Junk, Grazia Fazio, Daniela Silvestri, Marketa Zaliova, Athanasios Oikonomou, Katerina Scharov, Martin Stanulla, Anja Moericke, Martin Zimmermann, Martin Schrappe, Barbara Buldini, Sanil Bhatia, Arndt Borkhardt, Claudia Saitta, Marta Galbiati, Michela Bardini, Luca Lo Nigro, Valentino Conter, Maria Grazia Valsecchi, Andrea Biondi, Geertruy te Kronnie, Gunnar Cario, Giovanni Cazzaniga. Definition and prognostic value of Ph-like and IKZF1plus status in children with Down Syndrome and B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Hemasphere*. In Press Originalarbeit; Peer Review; Impact-Factor 8,30
- Sinatra L, Yang J, Schliehe-Diecks J, Dienstbier N, Vogt M, Gebing P, Bachmann LM, Sönnichsen M, Lenz T, Stühler K, Schöler A, Borkhardt A, Bhatia S* and Hansen FK*. Solid-Phase Synthesis of Cereblon-Recruiting Selective Histone Deacetylase 6 Degraders (HDAC6 PROTACs) with Antileukemic Activity. *J Med Chem*. 2022 Dec 22;65(24):16860-16878. doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c01659. Epub 2022 Dec 6. PubMed PMID: 36473103 Originalarbeit; Peer Review; Impact-Factor 8,03
- Reißing N, Schliehe-Diecks J, Watson PR, Sönnichsen M, Cragin AD, Schöler A, Yang J, Schäker-Hübner L, Borkhardt A, Christianson DW, Bhatia S* and Hansen FK*. Development of Fluorinated Peptoid-Based Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors for Therapy-Resistant Acute Leukemia. *J Med Chem*. 2022 Nov 9;. doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c01418. PubMed PMID: 36351184 Originalarbeit; Peer Review; Impact-Factor 8,03

- Bhatia S, Spanier L, Bickel D, Dienstbier N, Woloschin V, Vogt M, Pols H, Lungerich B, Reiners J, Aghaallaei N, Diedrich D, Frieg B, Schliehe-Diecks J, Bopp B, Lang F, Gopalswamy M, Loschwitz J, Bajohgli B, Skokowa J, Borkhardt A, Hauer J, Hansen FK, Smits SHJ, Jose J, Gohlke H, Kurz T. Development of a First-in-Class Small-Molecule Inhibitor of the C-Terminal Hsp90 Dimerization. *ACS Cent Sci.* 2022 May 25;8(5):636-655. doi: 10.1021/acscentsci.2c00013. Epub 2022 Apr 27. PubMed PMID: 35647282; Originalarbeit; Peer Review; Impact-Factor 18,72
- Athanasios Oikonomou, Luigia Valsecchi, Manuel Quadri, Titus Watrin, Katerina Scharov, Simona Procopio, Jia-Wey Tu, Melina Vogt, Angela Maria Savino, Daniela Silvestri, Maria Grazia Valsecchi, Andrea Biondi, Arndt Borkhardt, Sanil Bhatia, Giovanni Cazzaniga, Grazia Fazio, Michela Bardini, Chiara Palmi. High-throughput screening as a drug repurposing strategy for poor outcome subgroups of pediatric B-cell precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biochemical Pharmacology.* Originalarbeit. *Under Review.*

7. Zusammenfassung

Die moderne pädiatrische Onkologie steht bei der Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) vor zwei Herausforderungen: Zum einen führt die etablierte Polychemotherapie zu akuten und langfristigen unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Somit wird die Morbidität und Mortalität von ALL-Patienten erhöht. Zum anderen können Hochrisiko-Subtypen mit den derzeitigen Behandlungsprotokollen häufig nicht erfolgreich oder effektiv genug therapiert. Neue, zielgerichtete Therapien versprechen eine wirksamere und weniger toxische Behandlung zu bieten und somit beide Herausforderungen zu begegnen. In dieser Arbeit wurde das Hochdurchsatz-Medikamentenscreening verwendet, um den Zusammenhang zwischen dem interindividuellen Ansprechen von Fibroblasten auf Chemotherapeutika und den klinischen Daten zu Therapie Nebenwirkungen zu untersuchen. Zudem wurde anhand von Zelllinien und Patientenproben nach vielversprechenden Wirkstoffen für die Behandlung von Hochrisiko-Subtypen gesucht. Bei dem Hochdurchsatz-Screening konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl oder dem Schweregrad akuter Nebenwirkungen und den experimentellen Daten gezeigt werden. Andererseits haben wir HSP90-, BRD4- und BCL2-Inhibitoren als therapeutische Modalitäten identifiziert, die bei Hochrisiko-ALL-Subtypen (CRLF2r DS-ALL, PAX5r und MLLr) wirksam sind, ohne gesunde Zellen zu schädigen.

8. Ausblick

Zusätzlich zu dem HTDS wurden die Patienten-Fibroblasten für ein Whole Exome Sequencing genutzt. Diese Daten beider Versuche zusammen mit den klinischen Daten sollen in der Zukunft mit künstlicher Intelligenz zusammen analysiert werden, um mögliche Einflüsse von Keimbahnmutationen auf Toxizität zu untersuchen. Außerdem ermöglichte uns die HTDS-Plattform, neue therapeutische Modalitäten für Hochrisiko-ALL-Untergruppen zu finden. Daher werden in Zukunft präklinische Tests erforderlich sein, um die Ergebnisse zu validieren, bevor sie in die Klinik eingebracht werden.