

# El microambiente tumoral en LLC:

donde se incuban las células  
leucémicas más agresivas

## Dra. Romina Gamberale

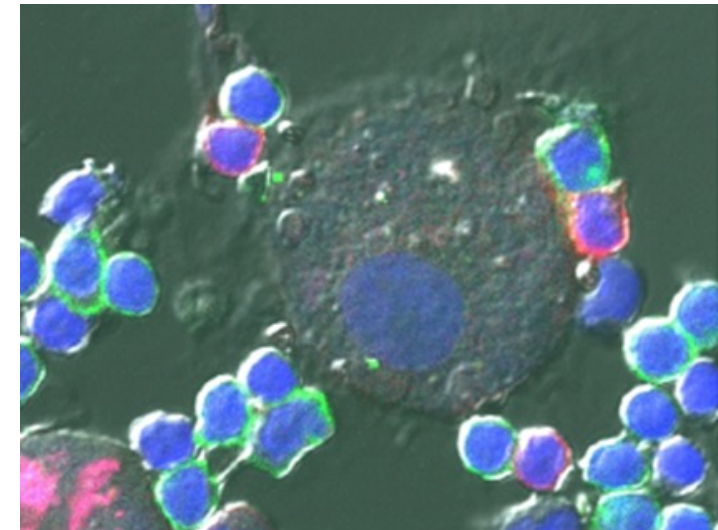
Rominagamberale@gmail.com

- Ex-directora del Instituto de Medicina Experimental (IMEX), Buenos Aires, ARGENTINA
- Co-directora del Lab de Inmunología Oncológica (IMEX).
- Investigadora Independiente de CONICET.
- Docente de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.
- Miembro del *iwCLL Global Partnerships Subcommittee*

CONICET



I M E X



## **Conflictos de interés**

- AstraZeneca: Panelist.
- RedHill Biopharma: MTA, NDA.

## Objetivos de la charla:

1

Presentar la visión tradicional y actual de la LLC.

2

Discutir sobre la importancia del microambiente tumoral en LLC.

3

Presentar la experiencia de nuestro laboratorio con las células T de los pacientes con LLC como actores clave del microambiente tumoral.

4

Comentar los experimentos en curso y las perspectivas de nuestro trabajo.

## Visión tradicional de la LLC:

- Enfermedad acumulativa.
- Defectos en la apoptosis (alto BCL-2).
- Células no proliferantes (G0/G1).

### *Las células leucémicas:*

- mueren in vitro por apoptosis.
- fenotipo activado.
- telómeros cortos.

## VISIÓN ACTUAL :

la LLC es una enfermedad dinámica.

Las células leucémicas proliferan y mueren in vivo.

Esfingosina 1 fosfato (S1P) y su receptor SIPR1  
doi: 10.4049/jimmunol.1400547.

### Diversidad intra clonal en LLC:

Pool proliferante

Pool quiescente

Sangre periférica

G0/G1  
↓ Ki-67  
↑ BCL-2

↑ Ki-67

↑ Bcl-2

# El microambiente tumoral

se comporta como un nicho de supervivencia para el clon leucémico.

Sangre periférica

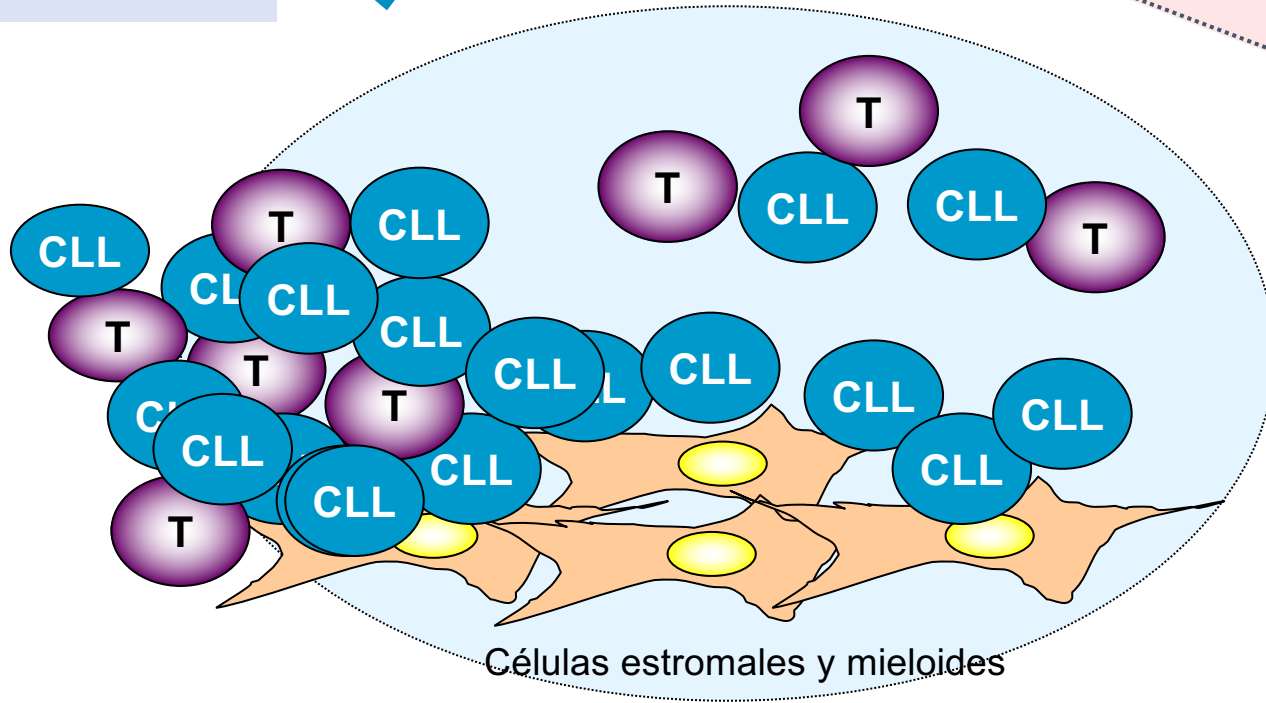


Romina Gamberale, Laboratorio de Inmunología Oncológica, IMEX-CONICET-ANM

Tejidos linfoides

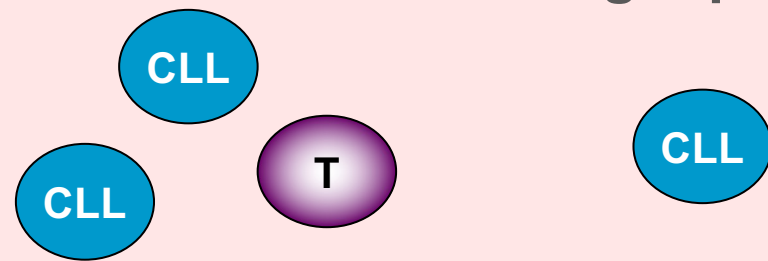
# El microambiente tumoral

se comporta como un nicho de supervivencia para el clon leucémico.



↑ **Ki-67**  
↑ **Bcl-2**

# Sangre periférica



G0/G1  
↓ **Ki-67**  
↑ **BCL-2**

# Tejidos linfoides

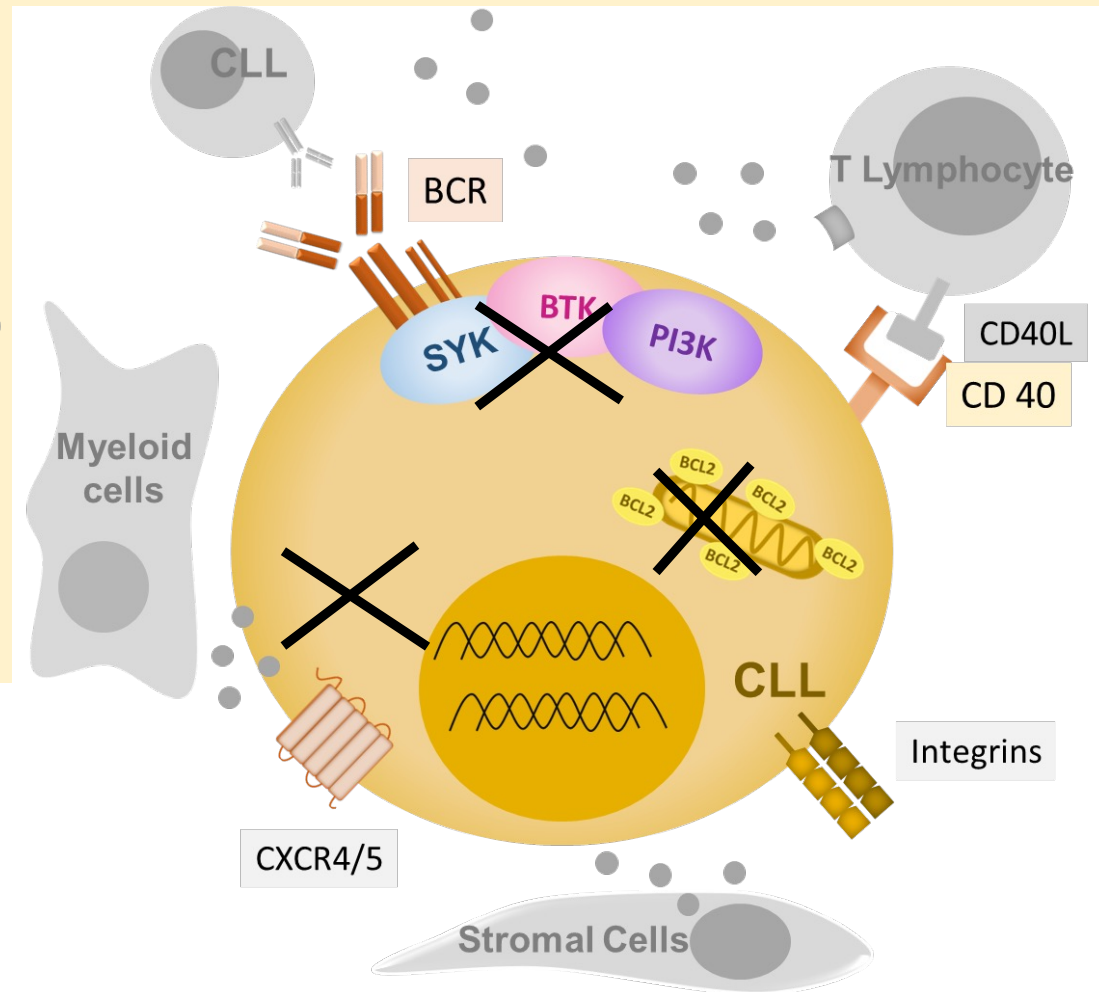
# El tratamiento actual de los pacientes con LLC involucra terapias dirigidas:

## 1- Inhibidores de quinasas asociadas al BCR (BCR-KIs)

Inhiben la señalización a través del BCR y liberan a las células LLC del microambiente tumoral.

## 2- Inhibidores de BCL-2 (VENETOCLAX)

Inhiben a BCL-2 favoreciendo la muerte de las LLC



## Objetivos de la charla:

1

Presentar la visión tradicional y actual de la LLC.

2

Discutir sobre la importancia del microambiente tumoral en LLC.

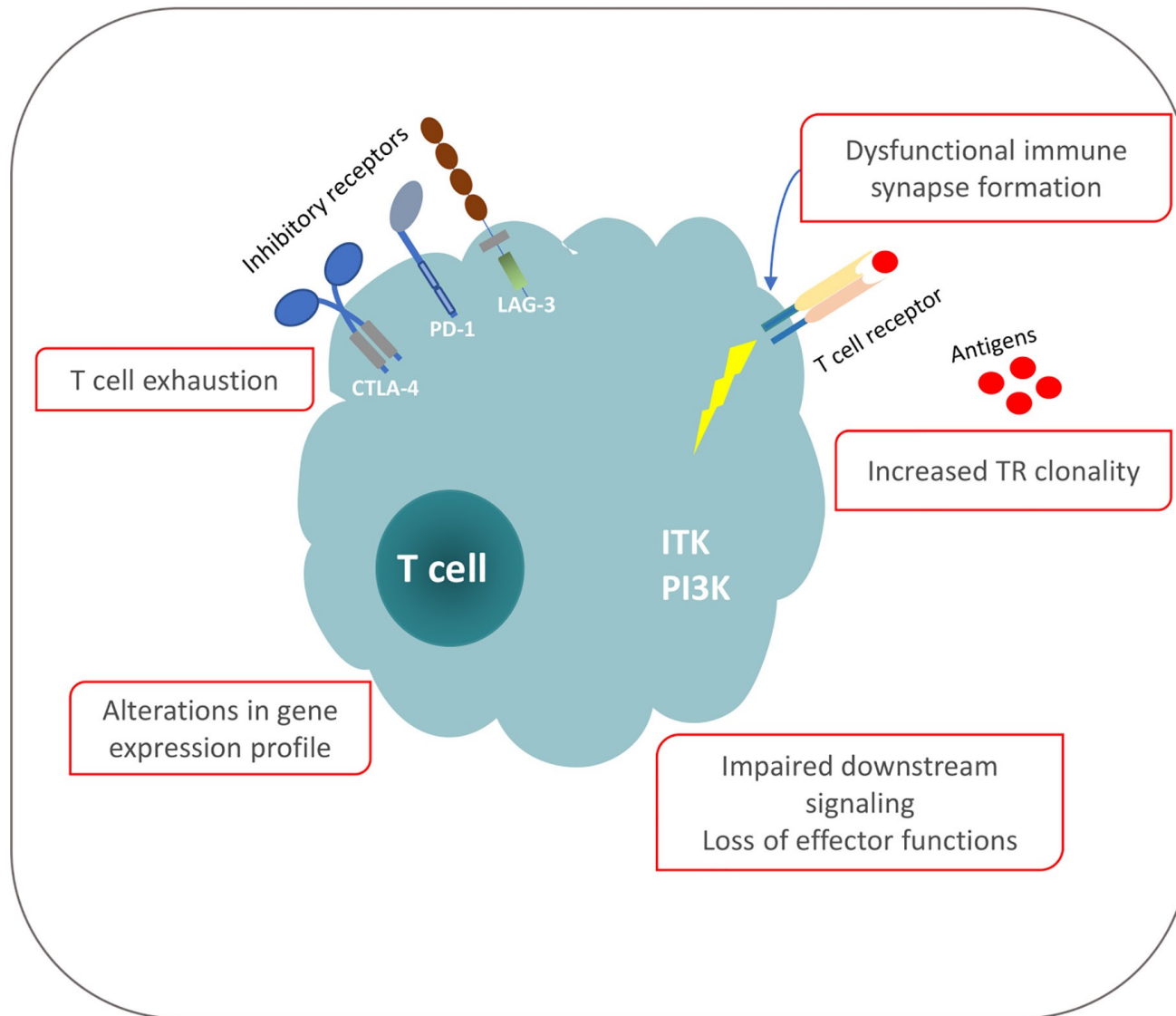
3

Presentar la experiencia de nuestro laboratorio con las células T de los pacientes con LLC como actores clave del microambiente tumoral.

4

Comentar los experimentos en curso y las perspectivas de nuestro trabajo.

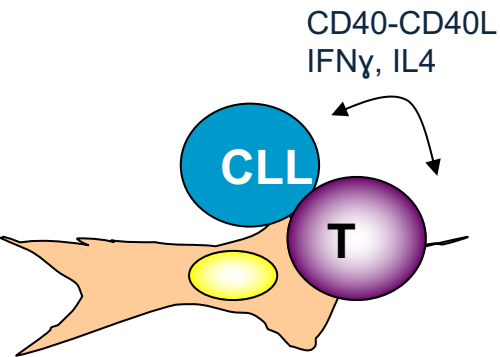
# Los linfocitos T de los pacientes con LLC son disfuncionales



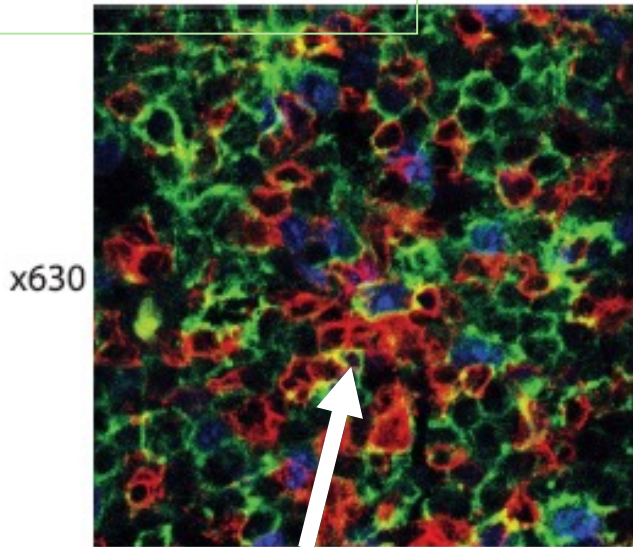
- Menor capacidad de activación, proliferación, función citotóxica y migración.
- Mayor número de células T en comparación con donantes sanos (relación invertida CD4:CD8).
- Mayor proporción de células Treg, TCD8+ agotadas y células TFH en los ganglios linfáticos vs sangre periférica.
- Alteraciones y defectos profundos, algunos de ellos dependientes de la presencia del clon leucémico (reversibles).

# Los linfocitos T de los pacientes con LLC son disfuncionales

**In vitro:** Linfocitos T activados aumentan la proliferación y supervivencia de las células leucémicas, a través de factores secretados y por contacto celular.



CD20: Green Ki67: Blue CD3: Red



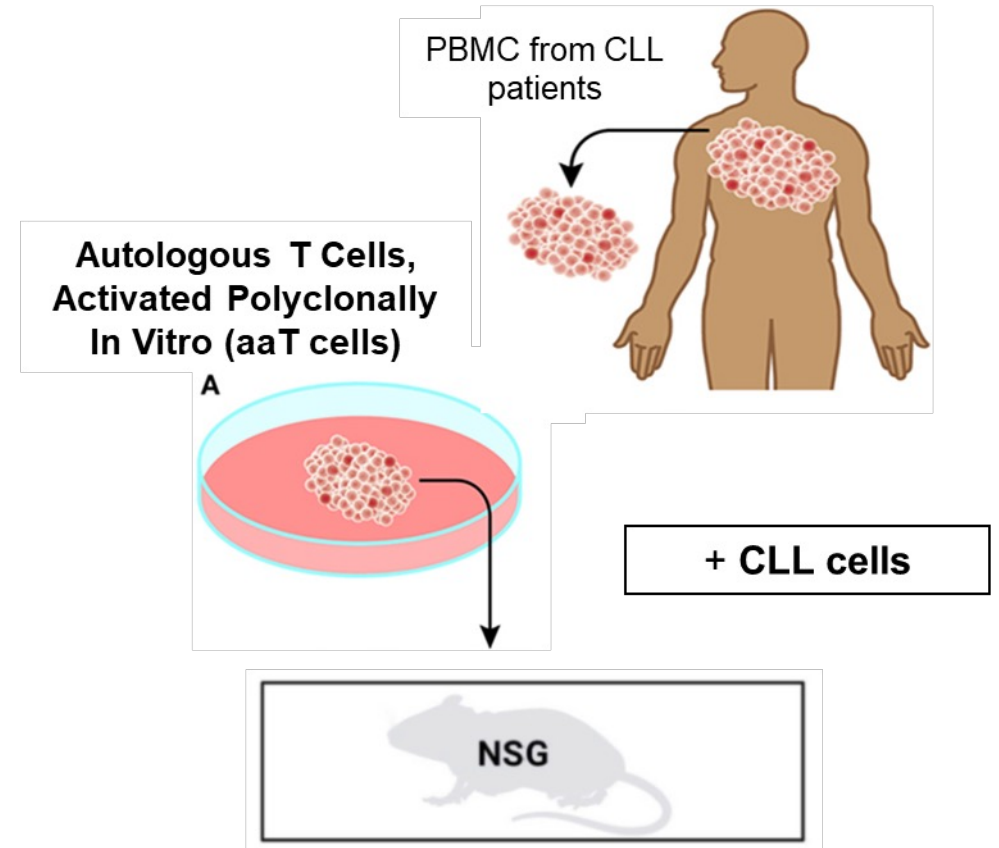
**Microscopía confocal de un corte de nódulo linfático de paciente con LLC.**

(Patten et al. Blood 2008)

*In vivo*

## Patient derived Xenograft model of CLL

(Dr. N Chiorazzi's Lab, The Feinstein Institute for Medical Research, NYC)



**Co-transfer of aaT cells favors CLL growth of CLL cells NSG mice.**

doi: 10.1182/blood-2010-12-324210.

# Los linfocitos T de los pacientes con LLC son disfuncionales

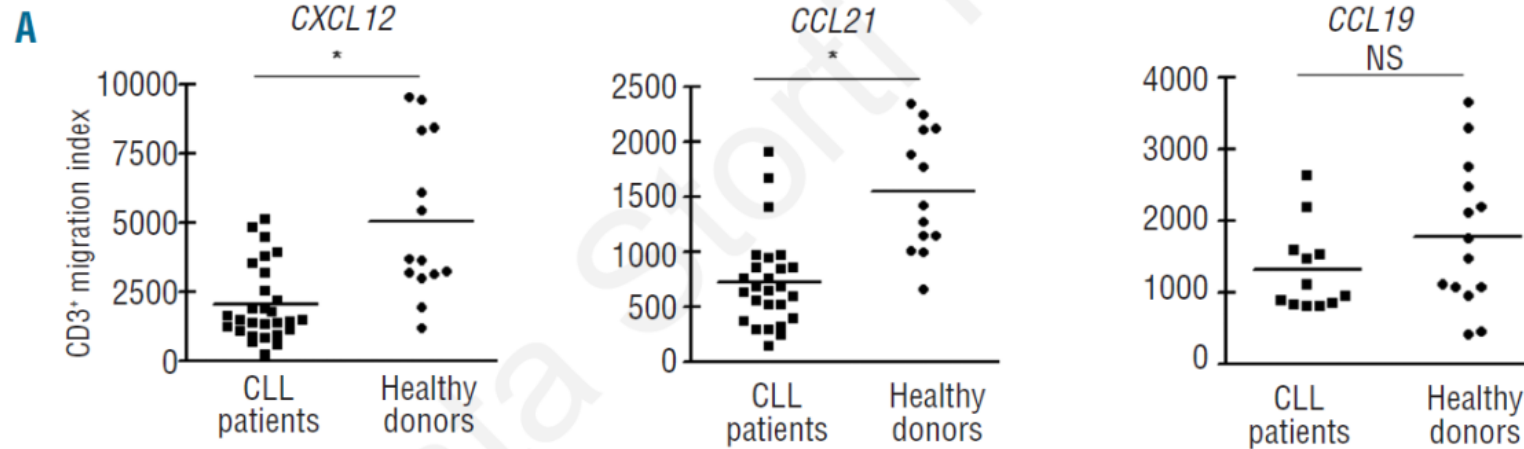
**Los linfocitos T son una fuente fundamental de los estímulos que el con leucémico recibe en el microambiente tumoral**



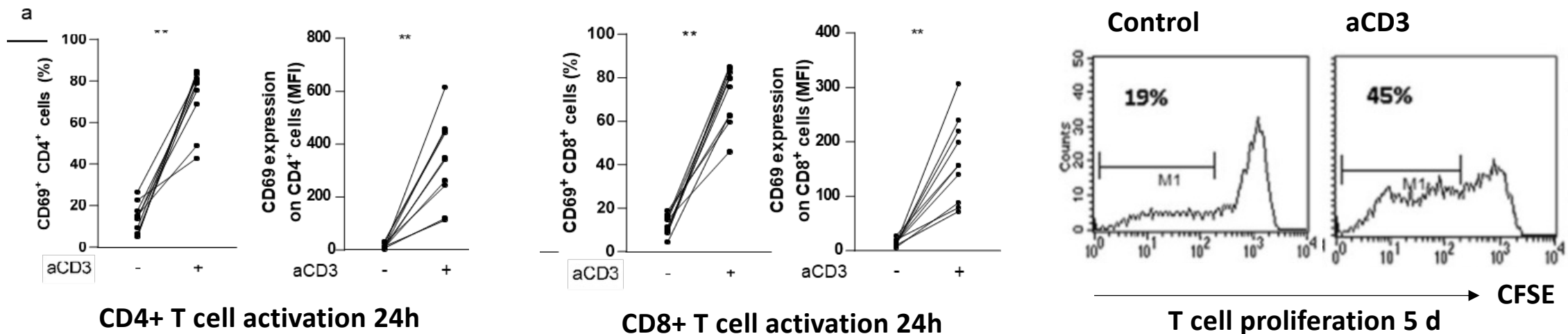
**La respuesta immune T contribuye a suprimir el crecimiento de las células LLC in vivo.  
(Sun C, Blood Advances 2023- NCT00923507)**

# T cells from CLL patients are less responsive to CXCL12 and CCL21 than T cells from HD despite similar CXCR4 and CCR7 expression...

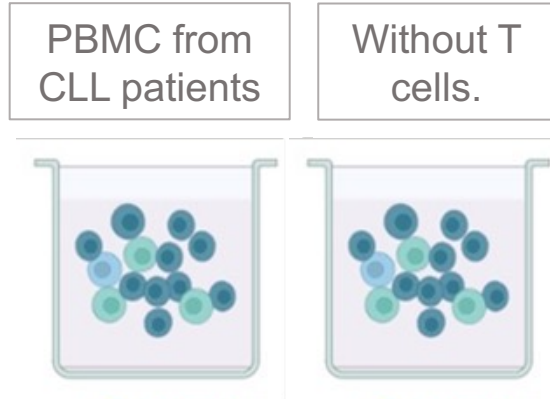
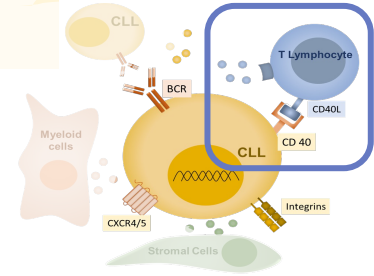
Borge M, Haematologica 2010



..... but they get activated and proliferate upon TCR stimulation.



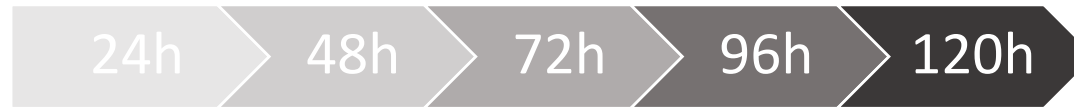
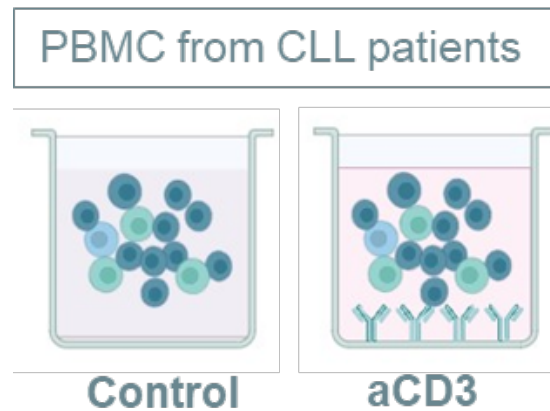
# Can these dysfunctional T cells affect the survival of CLL cells?



CLL cell survival daily checked

Autologous resting T cells do not affect spontaneous CLL apoptosis *in vitro*.

Gamberale R, Leukemia 2001.



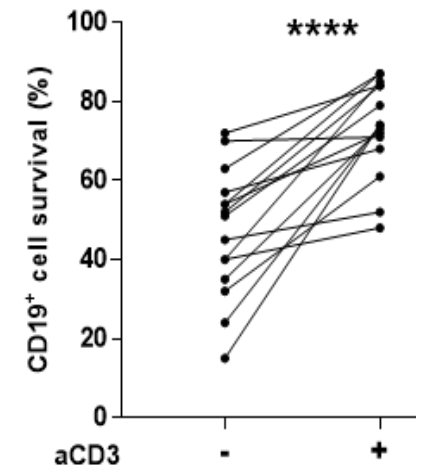
Check T cell activation.

CLL cell survival

Autologous activated T (aaT) cells increase CLL cell survival *in vitro*.

Elias E, Haematologica 2018.

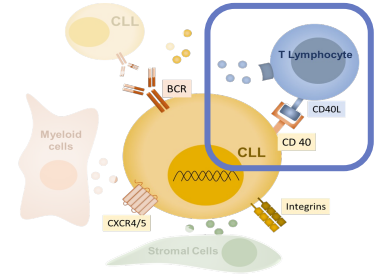
## Survival



# Autologous activated T (aaT) cells favor *in vitro* CLL activation and proliferation.

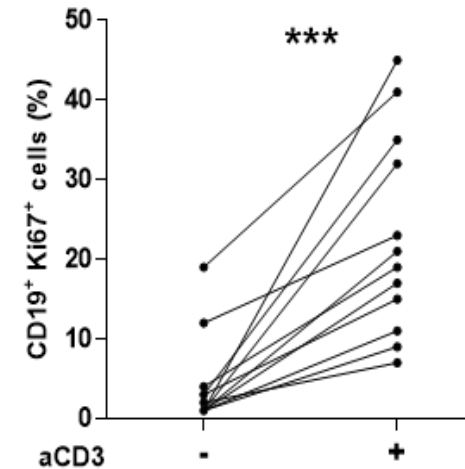
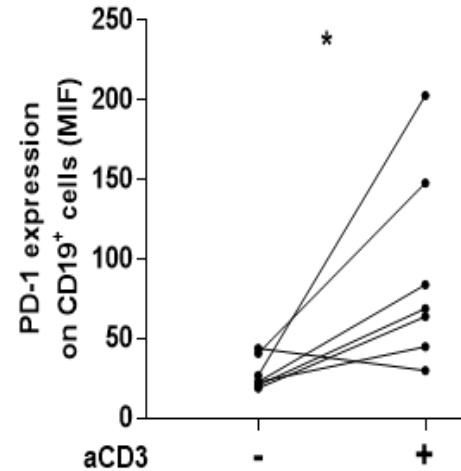
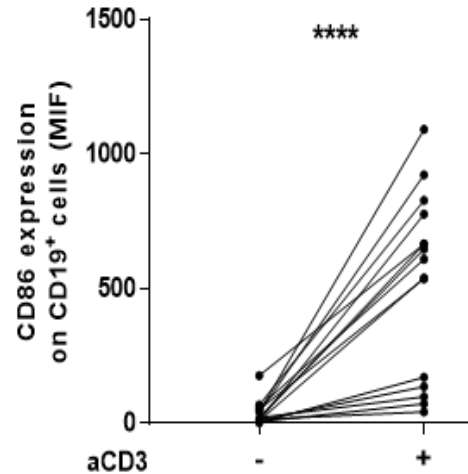
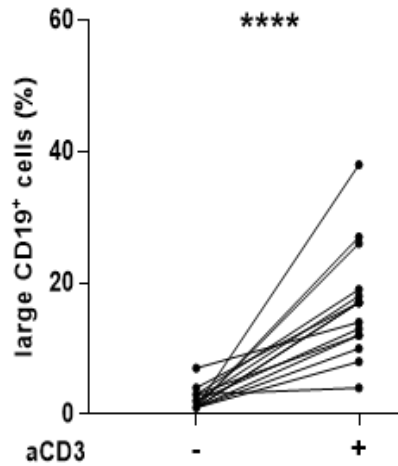
Elias E, Haematologica 2018.

Elias E, Sarapura Martínez V, Cancer Immunol Immunother 2021.



Cell size                      CD86                      PD-1

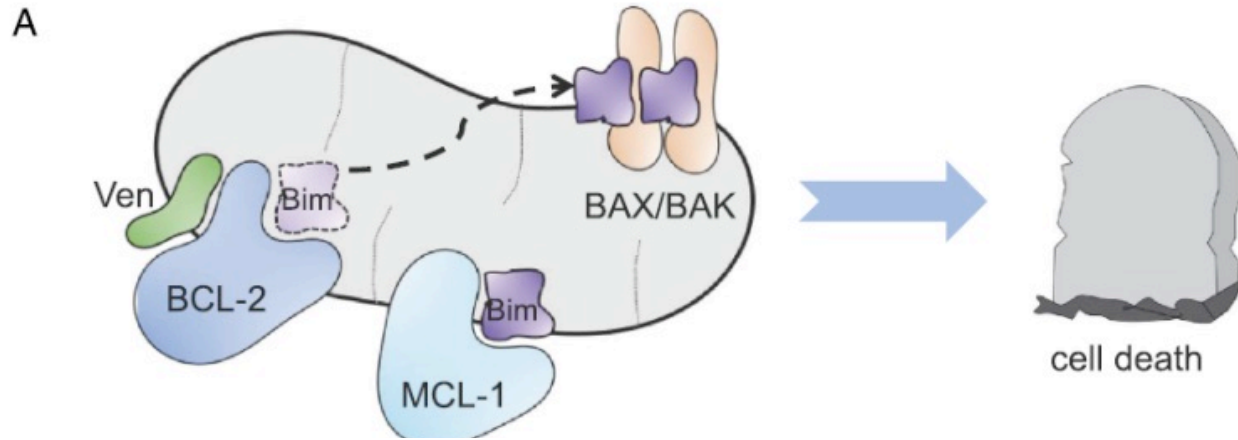
Ki67



120h

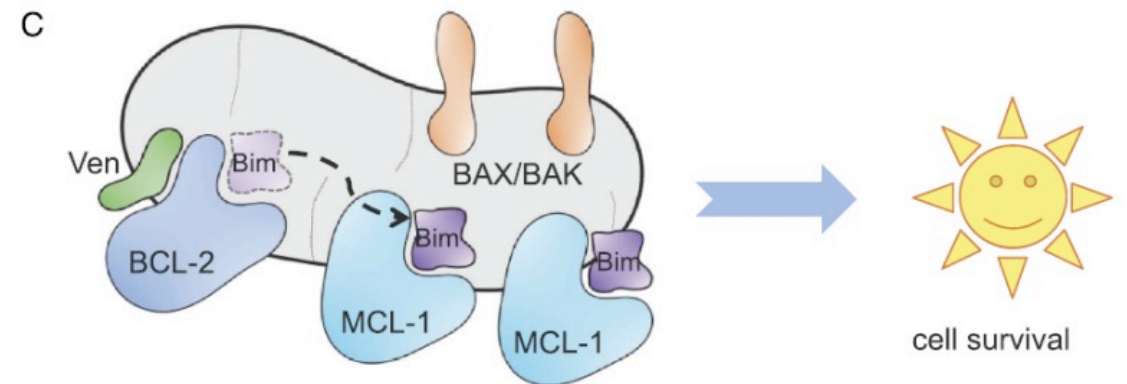
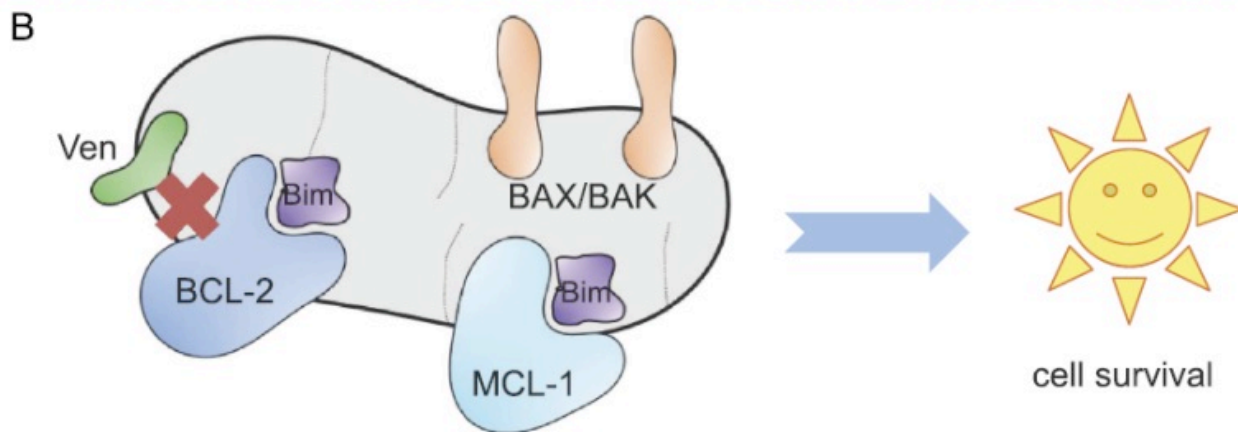
Can aaT cells protect CLL cells from venetoclax-induced cell death?

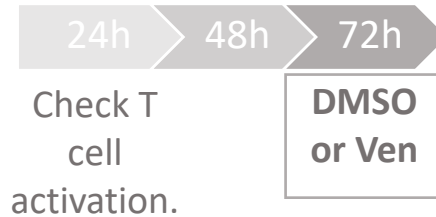
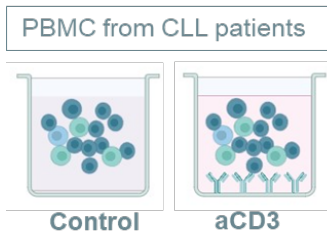
# Mecanismo de acción del VENETOCLAX



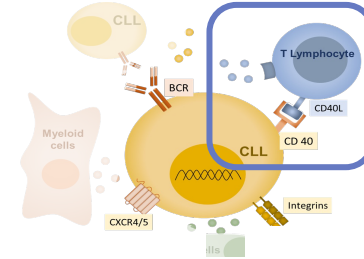
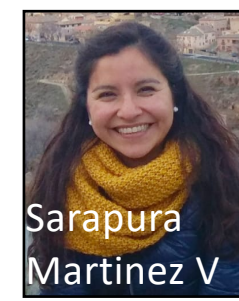
**VENETOCLAX es un inhibidor potente y selectivo del BCL-2.**

## VENETOCLAX RESISTANT CELLS.





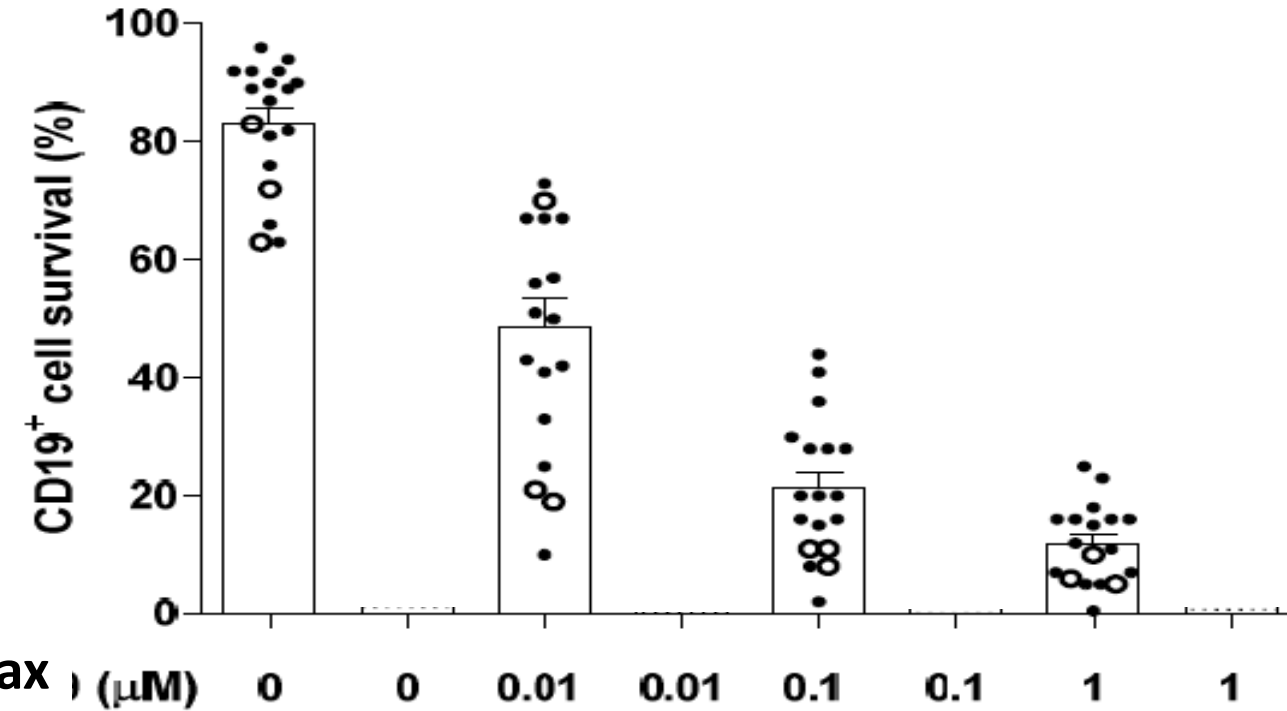
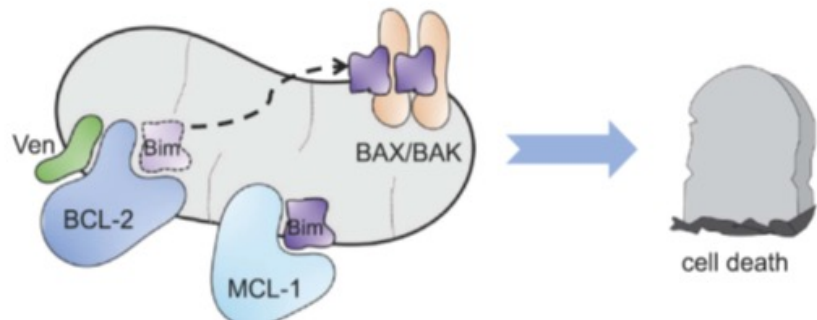
**CLL cell survival by flow cytometry.**

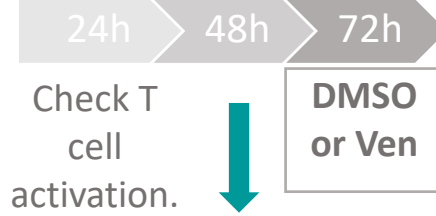
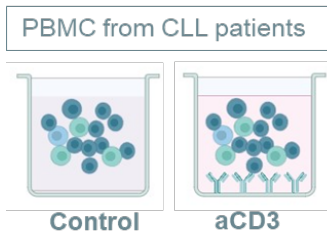


**Autologous activated T cells favor the generation of venetoclax resistant CLL cells.**

Elias E, Haematologica 2018.

Elias E, Sarapura MV, Cancer Immunol Immunother 2021.



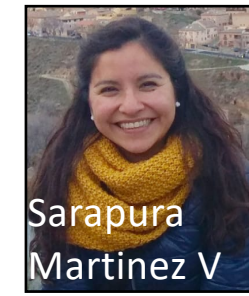


CLL cell survival by flow cytometry.

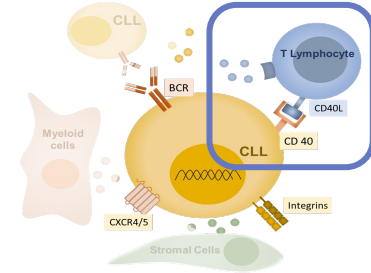
**BCL-XL and MCL-1 expression by western blot in CLL cells.**



Elías E.



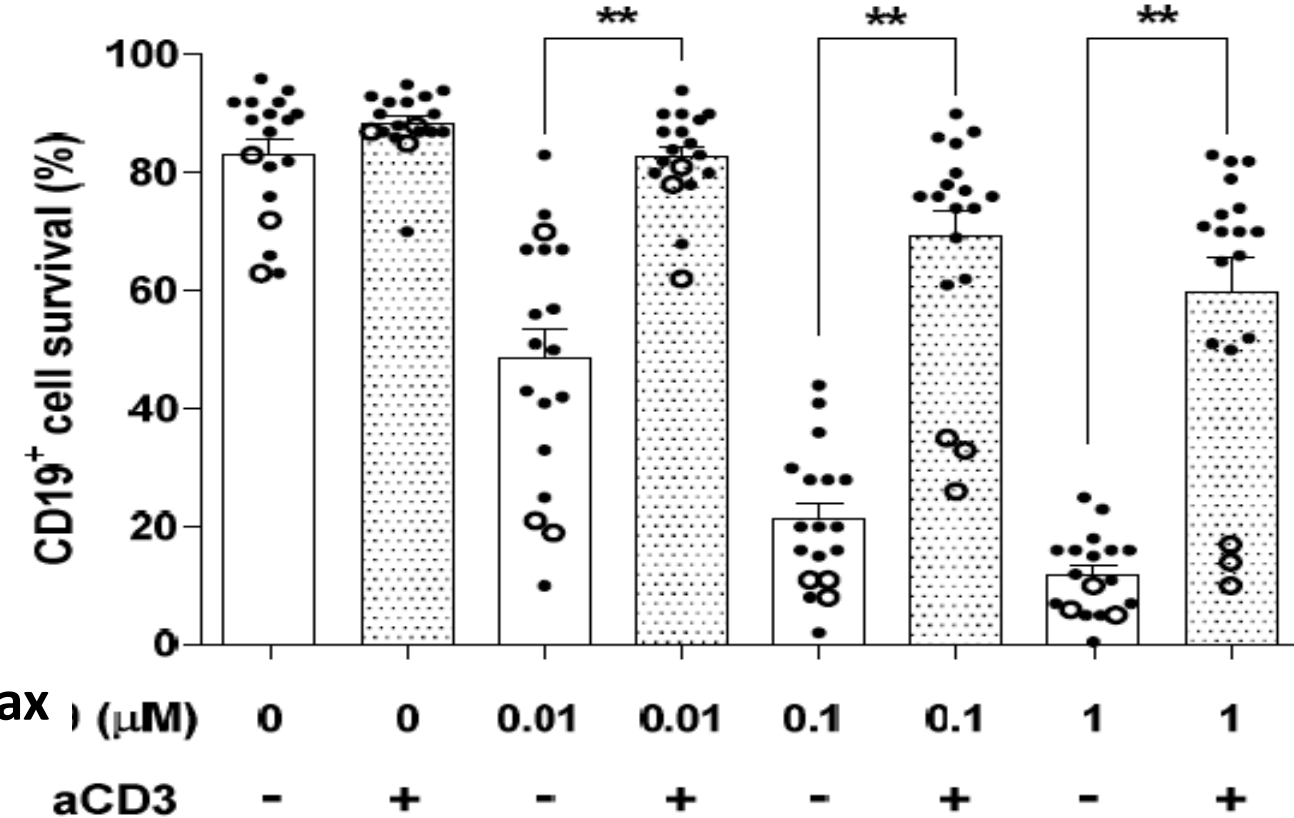
Sarapura Martinez V



# Autologous activated T cells favor the generation of venetoclax resistant CLL cells.

Elias E, Haematologica 2018.

Elias E, Sarapura MV, Cancer Immunol Immunother 2021.

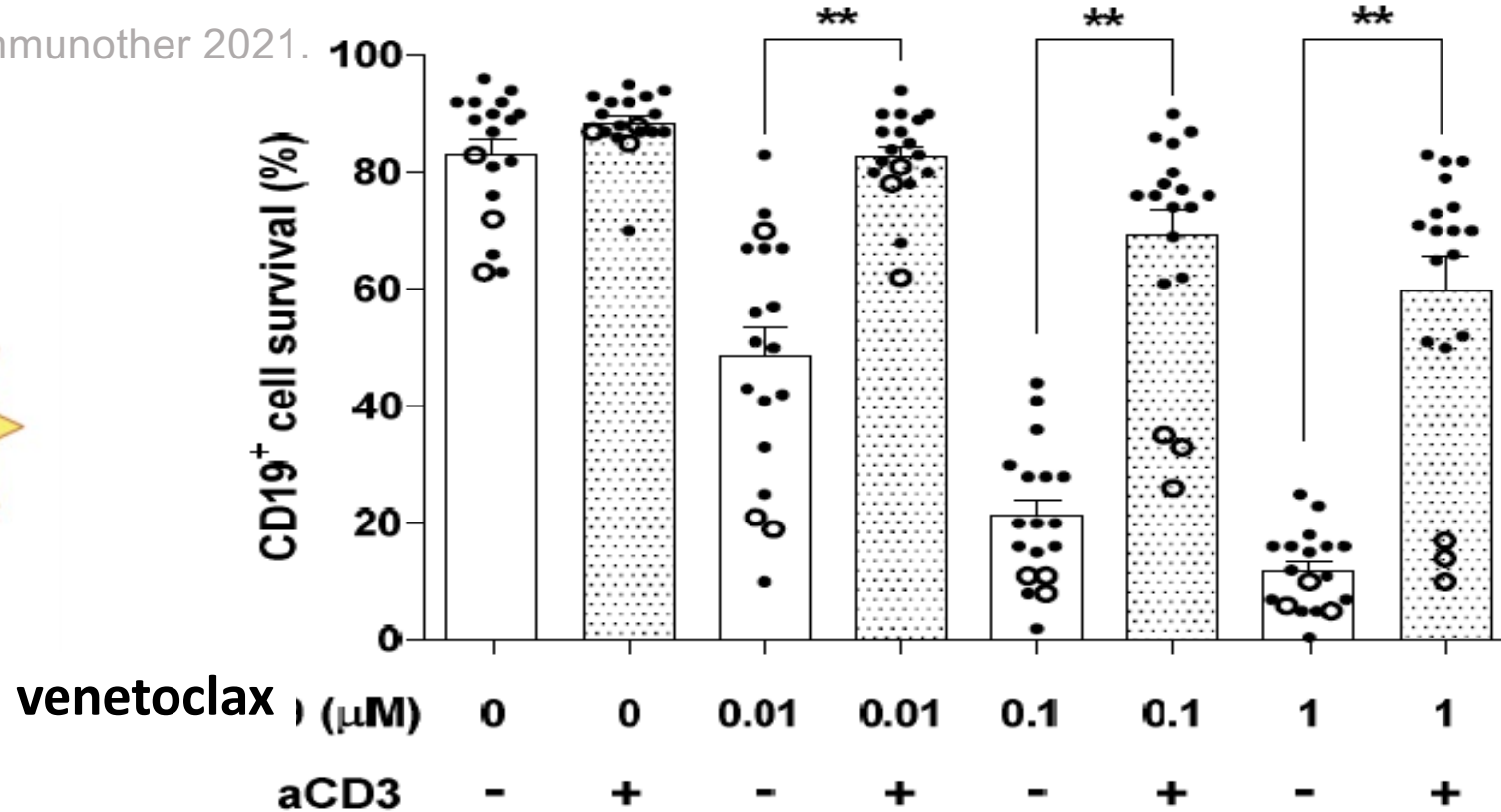
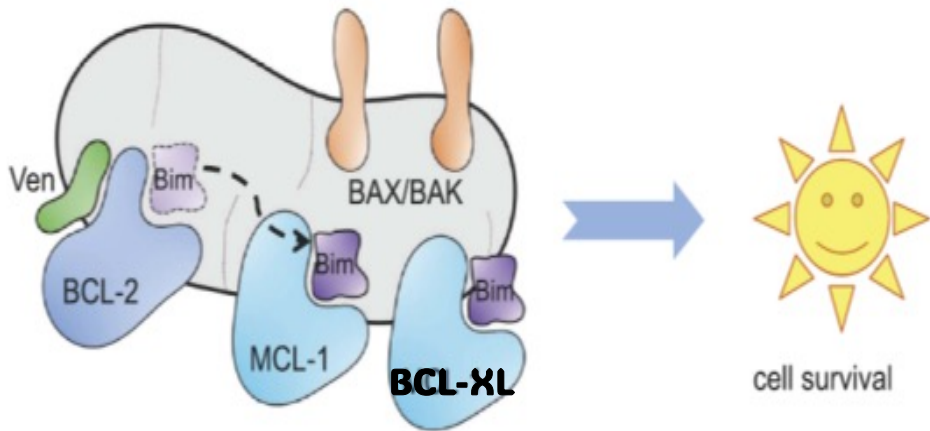
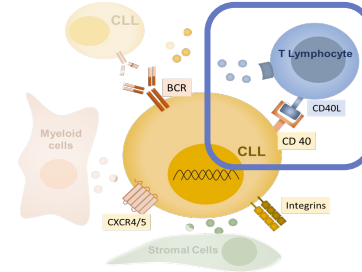
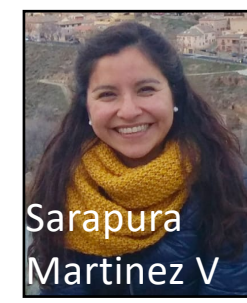


Friedman test followed by Dunn's Multiple Comparison Test, \*\*p<0.01.

# Autologous activated T cells favor the generation of venetoclax resistant CLL cells due to the upregulation of BCL-XL and MCL-1 on the leukemic clone.

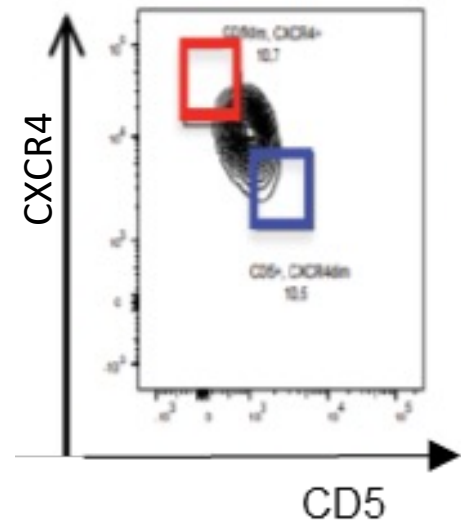
Elias E Haematologica 2018.

Elias E, Sarapura Martinez V, Cancer Immunol Immunother 2021.



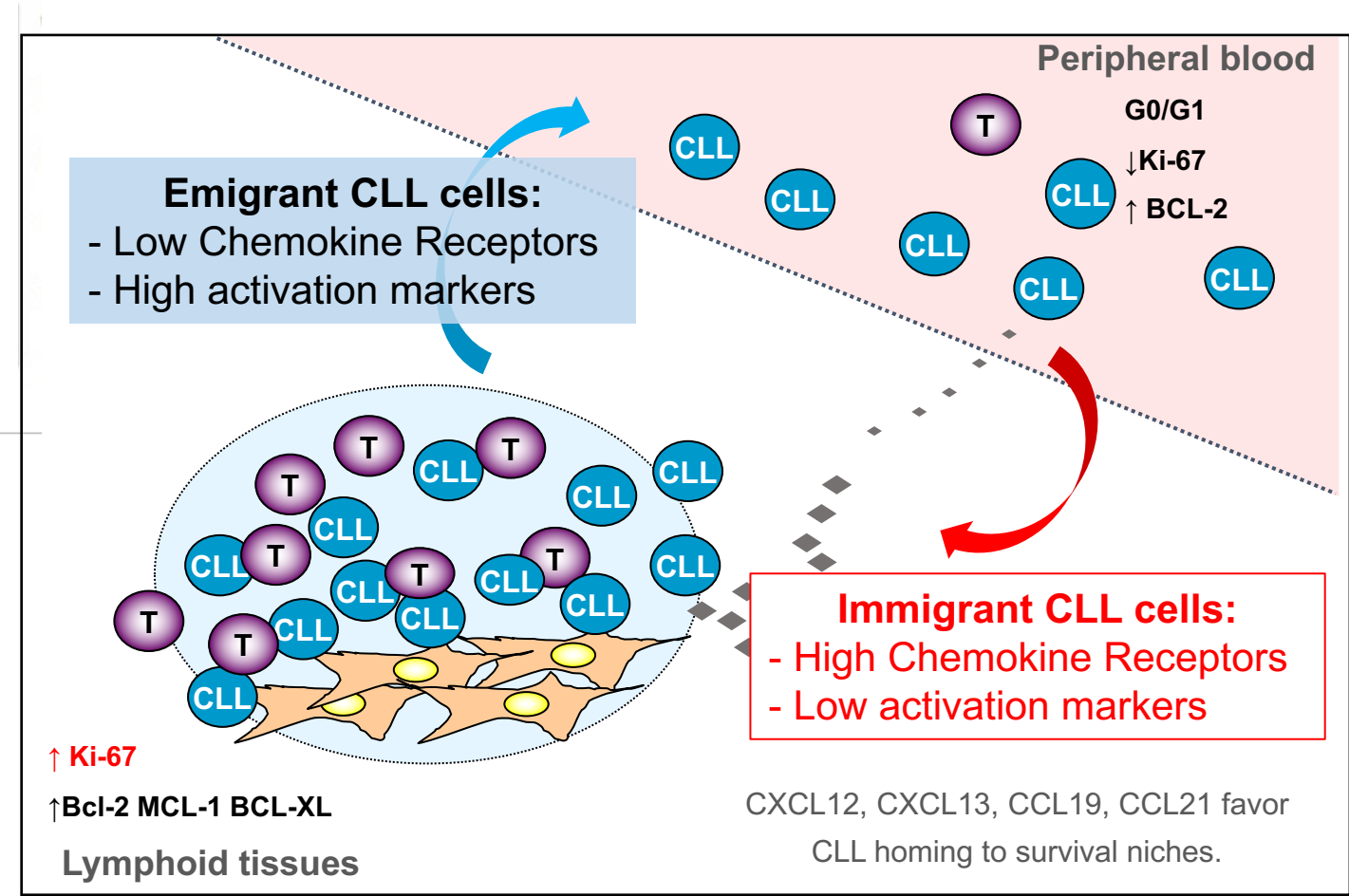
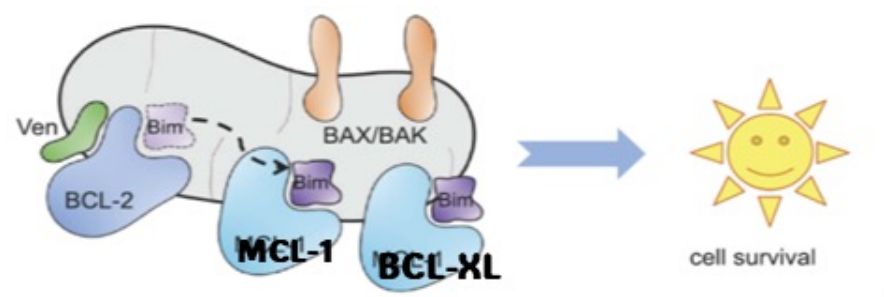
Friedman test followed by Dunn's Multiple Comparison Test, \*\*p<0.01.

Recent emigrants CLL cells have higher Bcl-XL and Mcl-1 expression than cells immigrating back to the lymph node. (Jayappa KD et al Blood Adv. 2021). (Haselager MV, Blood 2020).

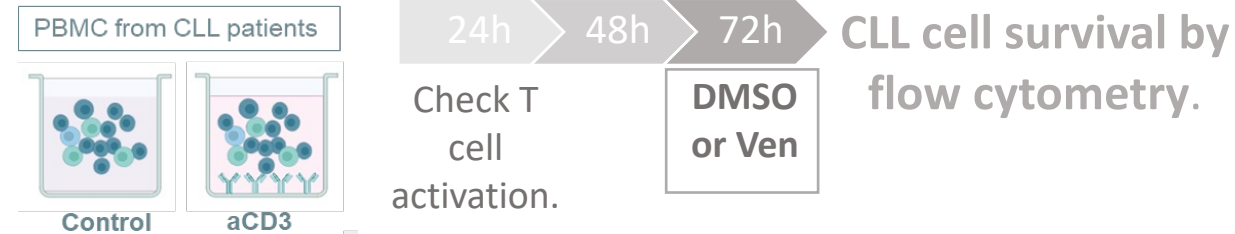


**Immigrant CLL cells: CXCR4 high CD5 dim**

**Emigrant CLL cells: CXCR4 dim CD5 high**



# T cells from CLL patients allow us to establish a MODEL OF VENETOCLAX RESISTANCE.



## Testing drug combinations to:

- avoid the generation of VEN resistance.

Elias E, Haematologica 2018.

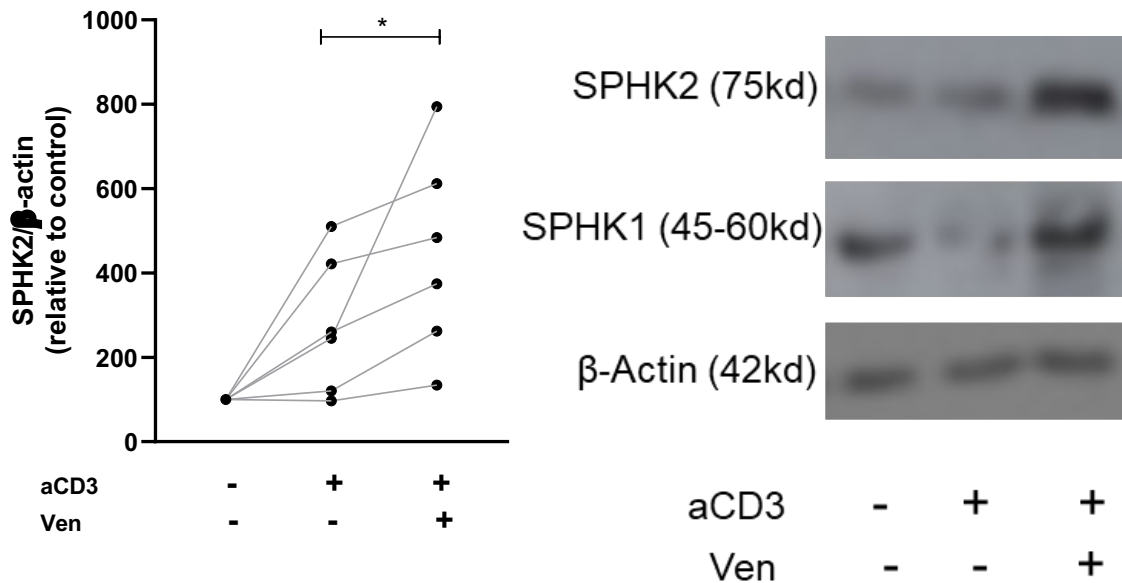
Elias E, Sarapura MV, Cancer Immunol Immunother 2021.

- to induce the cell death of already VEN resistant cells.

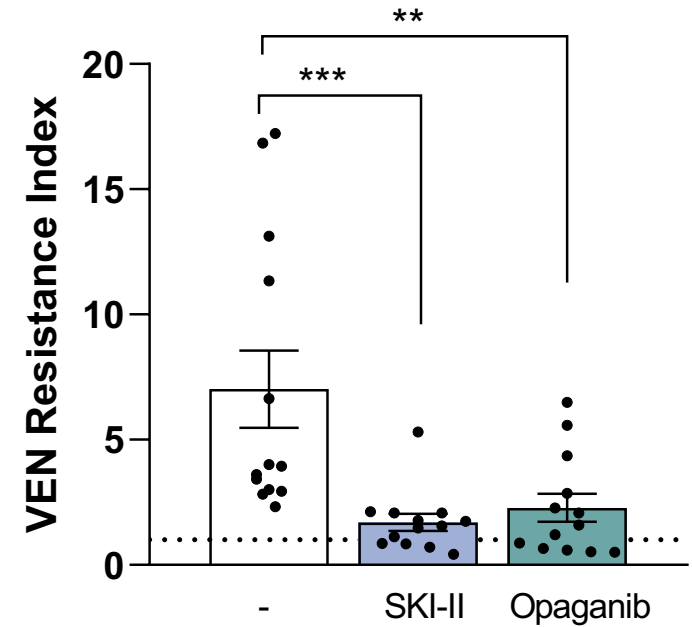
## Characterization of VEN resistant cells to find novel therapeutic targets

**VEN resistant cells showed a very aggressive phenotype:**

increased cell size, higher CD86 and PD-1 expression, superior proliferative capacity and.... express **high levels of sphingosine kinase 2 (SPHK2)**

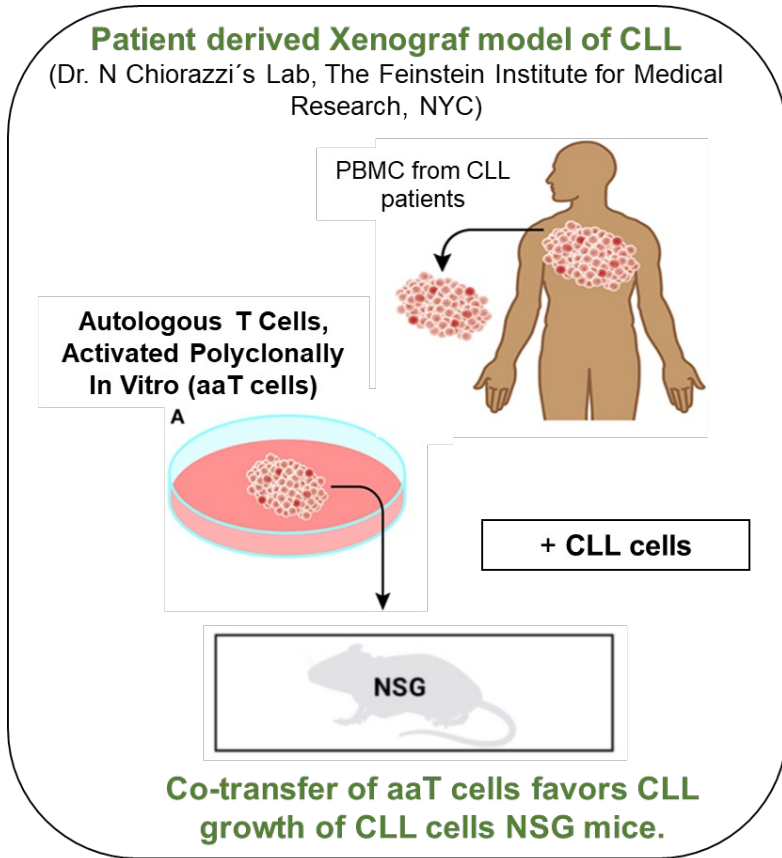


**By using inhibitors of SHPK2 we were able to reduce the generation of VEN resistance.**



**Inhibitors of SHPK2 were able to induce the cell death of already venetoclax resistant cells ex vivo.**

# ONGOING EXPERIMENTS



1) We are now testing venetoclax in combination with SPHK2 inhibitors in a preclinical model in mice.

- MTA to obtain the SPHK2 inhibitor.
- Collaboration with Dr. Nicholas Chiorazzi at the Feinstein Institutes for Medical Research (USA).
- iwCLL fellowship.

2) **MEC-1 cells:** SPHK2, SHPK1, and both kinases were silenced using the CRISPR-Cas9 technique.

# RESUMEN de lo presentado en esta charla

## El microambiente tumoral:

- favorece la supervivencia, activación y proliferación de las LLC.
- actúa como nicho de supervivencia para el clon leucémico.
- permite la selección de células leucémicas más agresivas bajo la presión de un agente terapéutico.

**Empleando células T de los pacientes  
con LLC establecimos un  
MODELO DE RESISTENCIA A  
VENETOCLAX**

- **Testear in vitro combinaciones de agentes terapéuticos para:**
  - evitar la generación de resistencia a VEN.
  - Inducir la muerte de las células ya resistentes a la droga.
- **Encontrar nuevos blancos terapéuticos en las células más agresivas.**

# LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA ONCOLÓGICA.

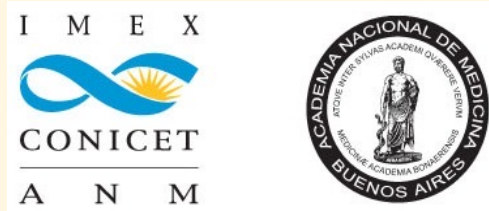
Director: **Mirta Giordano**

Co-Director: **Romina Gamberale**

Miembros:

**Mercedes Borge.**

**Pablo Morande.**



**Valeria Sarapura Martinez Ph.D. Student**

**Chiara Cassarino. Ph.D. Student**

**Agustina Cagnoli. Ph.D. Student**

**Victoria Agote. undergraduate Student**

**Agradecemos a los pacientes con  
LLC que participaron del estudio y  
a sus familiares.**

- Hematólogas/os del Hospital Teodoro Álvarez, Instituto Alexander Fleming, Hospital Alemán y FUNDALEU.
- M. Vermeulen, IMEX-CONICET-ANM
- M Ostrowski and P Pérez, INBIRS-UBA-CONICET
- Sergio Álvarez, IMIBIO, San Luis
- Santiago Miriuka and Lucía Moro, LIAN-FLENI.
  
- Nick Chiorazzi, The Feinstein Institutes for Medical Research, NYC
- P Oppezzo, Institut Pasteur Montevideo, Uruguay
- Marcelo Navarrete, UMAG, Chile.



**EN DEFENSA  
DE LA CIENCIA  
ARGENTINA**

Muchas Gracias!

**RAICYT**

RED DE AUTORIDADES DE INSTITUTOS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

EN DEFENSA DEL DESARROLLO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO NACIONAL

