



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ

*Rolul medicinei personalizate în evaluarea prognosticului și abordării
terapeutice în leucemia acută mieloidă*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. DANIEL CORIU**

**Student doctorand:
BOGDAN POPESCU**

Cuprins

Lucrări științifice publicate	3
Lista cu abrevieri și simboluri.....	5
Introducere.....	7
<i>I. Partea generală.....</i>	<i>11</i>
1. Leucemia acută mieloidă – generalități.....	12
1.1. Date de epidemiologie.....	12
1.2. Diagnosticul leucemiei acute mieloide	13
1.3. Clasificări și grupe de prognostic în leucemia acută mieloidă	16
1.4. Principii de tratament în leucemia acută mieloidă.....	20
2. Elemente de patogeneză moleculară în leucemia acută mieloidă.....	22
3. Rolul medicinei personalizate în leucemia acută mieloidă	28
3.1. Utilizarea NGS pentru caracterizarea profilului mutațional al leucemiei acute mieloide.....	29
3.2. Utilizarea NGS pentru detecția bolii minime reziduale în leucemia acută mieloidă.....	33
3.3. Limitări ale NGS.....	35
3.4. Terapii țintite în leucemia acută mieloidă.....	37
3.4.1. Inhibitorii de FLT3.....	38
3.4.2. Inhibitorii de IDH1/IDH2	40
3.4.3. Inhibitorii de BCL2	41
3.4.4. Inhibitorii meninei.....	42
3.4.5. Terapii anti-CD33.....	42
3.4.6. Terapii cu miARN	42
<i>II. Contribuții personale</i>	<i>46</i>
4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	47
5. Locul chimioterapiei citotoxice în tratamentul actual al leucemiei acute mieloide – chimioterapia secvențială în leucemia acută mieloidă refractară/la recădere.....	49
5.1. Introducere.....	49
5.2. Materiale și metode	50
5.3. Rezultate	51
5.4. Discuții	55
6. Secvențierea de ADN de nouă generație pentru identificarea mutațiilor acționabile clinic în leucemia acută mieloidă.....	57
6.1. Introducere.....	57
6.2. Materiale și metode	58

6.3.	Rezultate	60
6.4.	Discuții	64
7.	Noi terapii personalizate în leucemia acută mieloidă – inhibiția alosterică a SHP2 are eficacitate sinergistică cu inhibitorul de BCL2 venetoclax in leucemia acută mieloidă cu mutații în FLT3 și KIT	68
7.1.	Introducere.....	68
7.2.	Materiale și metode	71
7.3.	Rezultate	78
7.4.	Discuții	93
8.	Potențialul terapeutic al microARN-urilor în medicina personalizată – expresia și țintele moleculare ale miARN-4328 în leucemia acută promielocitară.....	99
8.1.	Introducere.....	99
8.2.	Materiale și metode	101
8.3.	Rezultate	105
8.4.	Discuții	110
	Concluzii	113
	Bibliografie	117
	Anexe.....	142

I. Stadiul actual al cunoașterii

În anul 2015, administrația prezidențială a Statelor Unite ale Americii a lansat în mod public Inițiativa pentru Medicină Personalizată cu scopul de a accelera identificarea de tratamente curative pentru boli care pun probleme importante de sănătate globală, precum cancerul [1]. Acest moment istoric a oferit legitimitate la nivel politic unor eforturi îndelungate ale comunității academice din ultima decadă. Medicina personalizată, sau medicina de precizie presupune integrarea de informații genetice și fenotipice ale fiecărui individ pentru a lua decizii de prevenție și tratament personalizate. Această abordare contrastează cu o paradigmă dominantă utilizată în medicina contemporană – utilizarea ghidurilor terapeutice bazate pe dovezi pentru a trata toate persoanele care suferă de o anumită afecțiune într-o manieră uniformă.

În oncologie, datorită heterogenității genetice a țesuturilor tumorale în raport cu genomul normal al unui individ, tratamentele personalizate care ar putea la nivel teoretic să țintească selectiv cancerul și nu celulele sănătoase au o aplicabilitate în mod particular importantă. De pildă, folosirea inhibitorului de tirozin-kinază imatinib a revoluționat domeniul tratamentelor oncologice; imatinib a fost eficace în tratamentul leucemiei mieloide cronice caracterizată de prezența cromozomului Philadelphia și a tirozin-kinazei mutante BCR-ABL și a ameliorat dramatic supraviețuirea într-o neoplazie cu mortalitate ridicată [2]. Leucemia acută promielocitară, un subtip de leucemie acută caracterizată de complicații adeseori letale, beneficiază astăzi de tratamente care țintesc selectiv patogeneza bolii – acidul all-trans retinoic și trioxidul de arsenic au demonstrat rate impresionante de remisiune și chiar vindecare într-un cancer hematologic considerat multă vreme incurabil [3].

În mod esențial, dezvoltarea medicinei personalizate a fost facilitată de progresele tehnologice reprezentate de tehnicile multi-omice de înalt randament: secvențierea de ADN sau ARN, sau tehnici de proteomică și metabolomică, dar și de algoritmi bioinformatici complecși de analiză a unui volum ridicat de date generate de astfel de analize. Aceste tehnici au cunoscut o amploare majoră în ultimii ani, culminând cu secvențierea genomului uman în cadrul Proiectului Genomului Uman [4]. Cercetarea în domeniul oncologiei este probabil domeniul în care aplicabilitatea tehnicilor de medicină de precizie este maximală și a reprezentat unul dintre obiectivele inițiativei prezidențiale americane de medicină personalizată din câteva considerente. În primul rând, este larg acceptat faptul că în etiopatogenia cancerului sunt implicate leziuni genetice. Acestea pot fi atât mutații genetice

de linie germinală care predispun la dezvoltarea de boli maligne, cât și mutații somatice la nivelul țesutului tumoral care conduc progresia cancerului și îi oferă avantaje de proliferare și eludare a imunității anti-canceroase native. Datorită heterogenității sale genetice, cancerul oferă potențiale ținte specifice pentru terapii personalizate. În al doilea rând, cancerul este o cauză majoră de mortalitate la nivel global, iar identificarea de terapii care să amelioreze supraviețuirea sau chiar să inducă vindecarea este o necesitate majoră din punct de vedere al sănătății globale.

Primul genom de cancer complet secvențiat folosind tehnici de secvențiere de nouă generație (NGS) a fost o probă de leucemie acută mieloidă (AML) [5]. AML este un model de cancer foarte ofertant pentru medicina de precizie, deoarece prezintă o heterogenitate tumorală care subîmparte această entitate clinică în diverse subtipuri caracterizate de prezența de leziuni genetice specifice [6].

AML este o patologie onco-hematologică agresivă, caracterizată de proliferarea malignă clonală a celulelor imature mieloidă la nivelul măduvei osoase hematogene și supresia hematopoiezei fiziologice. Clonele leucemice maligne se deosebesc de progenitorii mieloidi normali prin alterări morfologice, imunofenotipice, genetice și epigenetice. Din punct de vedere al patogenezei, AML este o entitate heterogenă, în prezent fiind descrise multiple mecanisme moleculare responsabile pentru transformarea malignă [7,8]. Studii de secvențiere genomică de mare randament pe loturi mari de pacienți cu AML au evidențiat prezența de mutații oncogenice recurente într-o proporție semnificativă la acești pacienți [9,10]. Aceste mutații sunt heterogene în natură și afectează gene cu funcții critice pentru echilibrul hematopoiezei, precum diferențierea (PML-RARA), semnalizarea intracelulară (FLT3, KIT, NRAS, PTPN11), factori de transcripție (CEBPA, RUNX1, GATA2), metilare a ADN-ului (DNMT3A, TET2, IDH1/2), reglare a cromatinei (ASXL1, rearanjamente MLL), splicing RNA (SRSF2, U2AF1), sau supresie tumorală (WT1, TP53).

Schematic, patogeneza AML poate fi definită prin prezența de leziuni genetice care 1) fac celulele hematopoietice maligne să prolifereze accelerat și 2) induc un blocaj de diferențiere al acestor progenitori în celule mature, funcționale [11]. Totuși, în ciuda caracterizării amănunțite a genomului AML, principala linie de tratament rămâne chimioterapia citotoxică, iar pentru pacienții eligibili, transplantul de celule stem hematopoietice. Deși chimioterapia intensivă induce remisiuni complete, acestea vin cu costul unor toxicități importante și sunt deseori doar tranzitorii, ratele de recădere post-chimioterapie fiind o problemă majoră în managementul AML [12]. Mai mult decât atât, compoziția clonală a leucemiei reziduale se modifică în cursul și sub presiunea de selecție a

tratamentului primit, proces definit sub denumirea de evoluție clonală [13] care impune, deseori, schimbarea liniilor de tratament la care clonele AML dobândesc rezistență.

Terapiile țintite, personalizate, menite să inducă remisiuni de durată sunt, așadar, o necesitate urgentă pentru a maximiza supraviețuirea la pacienții care suferă de acest cancer hematologic agresiv. În prezent, doar câteva molecule țintite sunt disponibile pentru uz clinic.

În lucrarea de față ne-am propus să evaluăm utilitatea medicinei personalizate în mai multe aspecte ale managementului AML – rafinarea diagnosticului, a prognosticului și optimizarea tratamentului, cu un focus pe terapii țintite, personalizate. În prima parte a lucrării am deschis discuția despre medicina personalizată în AML trecând în revistă statusul actual al cunoașterii în materie de patogeneză moleculară, clasificări în funcție de particularitățile genetice și grupe de prognostic, dar și în materie de terapii personalizate folosite sau investigate până în prezent în AML. În partea a doua a acestei lucrări ne-am propus să validăm prin studii experimentale, într-o abordare integrativă, implicațiile medicinei personalizate la multiple niveluri ale managementului AML discutate mai sus – diagnostic, prognostic și terapii țintite. Am utilizat tehnici multi-omice de nouă generație: genomică (secvențiere ADN de mare randament), transcriptomică (secvențiere de ARN), și bioinformatică, precum și modele pre-clinice *in vitro* și *in vivo* pentru a valida un sistem de ipoteze de lucru și a demonstra că tehnicile de precizie moleculară au potențialul de a fi folosite pentru a îmbunătăți prognosticul și alegerea strategiei optime de tratament în AML.

II. Contribuții personale

1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

AML este o entitate heterogenă și dinamică din punct de vedere genomic și fenotipic. Caracterizarea moleculară detaliată a AML permite o stratificare riguroasă în grupe de risc, dar și posibilitatea de a acționa clinic, prin terapii țintite. În plus, înțelegerea fidelă a fondului genetic al AML poate conduce la dezvoltarea de terapii noi, experimentale, care să îmbunătățească prognosticul clinic și să combată rezistența la terapiile actuale.

În această lucrare ne-am propus să validăm prin studii experimentale implicațiile medicinei personalizate în managementul AML la nivel de diagnostic, prognostic și terapii țintite. Am utilizat tehnici multi-omice de nouă generație: genomică (secvențiere ADN bulk de mare randament), transcriptomică (secvențiere de ARN), și bioinformatică, precum și modele pre-clinice *in vitro* și *in vivo* pentru a valida un sistem de ipoteze de lucru și a demonstra că tehnicile de precizie moleculară au potențialul de a fi folosite pentru a îmbunătăți prognosticul și alegerea strategiei optime de tratament în AML.

Pentru validarea ipotezelor acestei lucrări, am urmărit patru obiective generale, alocând fiecărui obiectiv câte un studiu de cercetare independent, astfel:

Obiectivul 1 – Evaluarea rolului chimioterapiei intensive de salvare în tratamentul modern al AML refractare/la recădere. Am demonstrat că utilizarea chimioterapiei citotoxice de salvare oferă un prognostic clinic la fel de limitat ca în urmă cu două decade, subliniind necesitatea de terapii noi, personalizate, pentru ameliorarea supraviețuirii.

Obiectivul 2 – Evaluarea utilității NGS pentru detecția mutațiilor acționabile terapeutice în AML. Am identificat printr-o metodă simplă de NGS dezvoltată *in house* mutații cu valoare prognostică și care pot informa clinic asupra selecției terapiilor țintite optime.

Obiectivul 3 – Evaluarea preclinică a unor terapii țintite inovatoare care adresează limitările terapiilor ghidate genetic aflate curent în practica clinică. Am demonstrat că o combinație farmacologică de inhibitori cu moleculă mică care țintesc concomitent proteina activatoare a cării RAS/MAPK SHP2 și proteina anti-apoptotică BCL2 au activitate antileucemică sinergică în AML cu mutații în FLT3 și KIT, inclusiv în modele *in vitro* și *in vivo* de AML rezistente la inhibitorii de FLT3.

Obiectivul 4 – Evaluarea expresiei diferențiale a miARN-urilor pentru a identifica potențiale ținte pentru terapii experimentale în dezvoltare. Am identificat că expresia

miARN-4328 este substanțial amplificată într-un subtip specific de AML – leucemia acută promielocitară.

Această lucrare constă din patru studii de cercetare independente, realizate pe parcursul studiilor doctorale și efectuate în cadrul Departamentului de Hematologie al Institutului Clinic Fundeni din București, Institutului Național al Sănătății din Statele Unite ale Americii și Diviziei de Hematologie a Departamentului de Medicină al Universității din California San Francisco, Statele Unite ale Americii.

În primul studiu [14] am demonstrat că în pofida standardelor de îngrijire curente, de calitate superioară, utilizarea chimioterapiei citotoxice pentru tratamentul AML refractară sau la recădere oferă un prognostic clinic la fel de limitat ca în urmă cu două decade. Curele intensive de chimioterapie de salvare au toxicități ridicate și trebuie rezervate pentru pacienții care nu pot beneficia de terapii noi, personalizate, cu indice terapeutic superior.

Pentru a putea beneficia de astfel de terapii, este necesar ca probele de AML ale pacienților să fie investigate prin tehnici moleculare pentru identificarea mutațiilor acționabile clinic. În studiul al doilea am demonstrat utilitatea secvențierii de ADN de nouă generație pentru detecția de variante somatice oncogene care pot fi ținte pentru inhibitori selectivi.

Deși inhibitorii selectivi, cum sunt inhibitorii de FLT3 au eficacitate clinică, folosirea lor în monoterapii conduce la fenomenul de rezistență adaptivă prin reactivare feedback a căilor de semnalizare. Dezvoltarea de asocieri de molecule noi, sinergistice, care să acționeze complementar pentru a bloca semnalele asociate cu rezistența este imperativă pentru a menține un răspuns clinic și a îmbunătăți supraviețuirea. În studiul al treilea [15] am evaluat activitatea preclinică a inhibitorului experimental de SHP2 RMC-4550 în combinație cu inhibitorul de BCL2 venetoclax în modele *in vitro* și *in vivo* de AML cu mutații în receptorii de tirozin-kinaze FLT3 și KIT. Am demonstrat că inhibiția SHP2 inhibă semnalizarea prin calea RAS/MAPK și induce modificări transcriptomice care rezultă în creșterea dependenței apoptotice a AML față de BCL2 și augmentează sensibilitatea farmacologică la venetoclax. Am identificat, așadar, o combinație sinergistică de inhibitori țintiți cu un indice terapeutic ridicat care poate fi testată clinic.

În afara terapiilor cu inhibitori selectivi, alte terapii experimentale care ținesc mecanisme intrinsec celulare, precum terapiile cu microARN-uri sunt în dezvoltare. În studiul al patrulea [16] ne-am propus să investigăm dacă într-un model de AML cu un background genetic bine definit, precum leucemia acută promielocitară (APL) putem identifica o expresie deregulată a moleculelor de microARN care au ca ținte gene implicate

în mecanisme patogenice cunoscute. Am demonstrat că hsa-mir-4328, care are ca țintă gena receptorului acidului retinoic (RARA) are o expresie specific scăzută în probe de APL comparativ cu probe de la subiecți fără leucemie. Terapii experimentale cu hsa-mir-4328, ar putea, în mod teoretic să țintească gena RARA și să ridice blocajul de diferențiere patognomonic pentru APL.

Datele experimentale obținute din aceste studii susțin ipoteza generală a lucrării de față – necesitatea medicinei personalizate pentru abordarea terapeutică optimă în AML. O reprezentare schematică a studiilor de cercetare și ipotezelor de lucru este prezentată în figura 1, iar studiile sunt prezentate în rezumat în cele ce urmează.

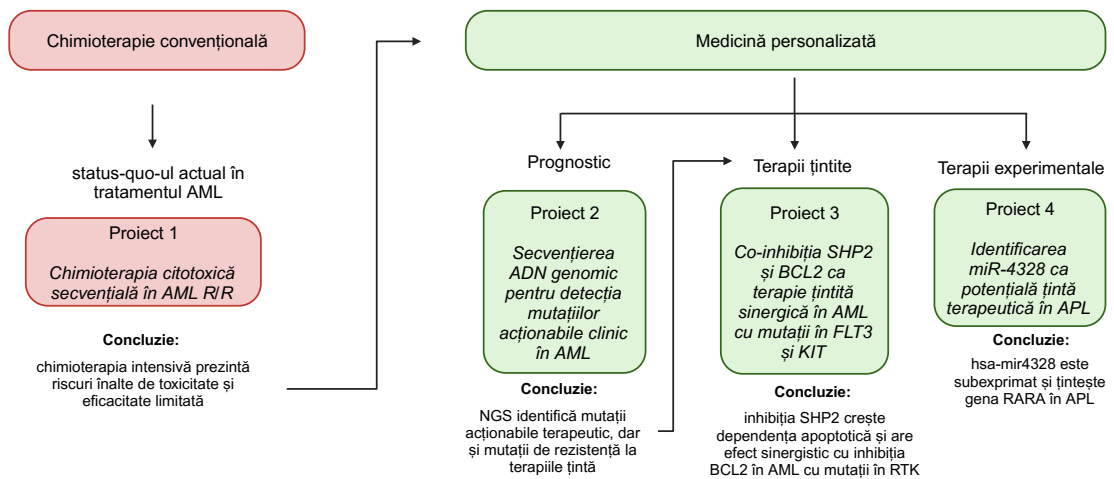


Figura 1 – Reprezentare schematică a studiilor de cercetare și ipotezelor de lucru

2. Locul chimioterapiei citotoxice în tratamentul actual al leucemiei acute mieloide – chimioterapia secvențială în leucemia acută mieloidă refractară/la recădere

2.1. Introducere

Deși în ultimii ani au fost dezvoltate și implementate clinic mai multe terapii pentru AML, care includ terapii moleculare țintite sau terapii biologice, chimioterapia citotoxică rămâne în continuare principala linie din arsenalul terapeutic [17–20]. În primul dintre studiile din această lucrare ne-am propus să evaluăm dacă prognosticul pacienților care primesc chimioterapie standard bazată pe antracicline s-a modificat după decade de utilizare, în prezent, în virtutea îmbunătățirii condițiilor de spitalizare, profilaxie antiinfecțioasă și management al îngrijirii actualizat. Chimioterapia secvențială (CS) este o abordare terapeutică care se deosebește de curele standard prin administrarea defazată a drogurilor componente și presupune administrarea inițială a unei secvențe inițiale de chimioterapie urmată la distanță de o secvență secundară care constă în agenți activi pe ciclul celular în timpul recrutării maxime a celulelor leucemice în faza S a ciclului celular de către secvența inițială inițială [21–23] cu scopul creșterii eficacității și scăderii toxicității chimioterapiei.

2.2. Materiale și metode

Am realizat un studiu unicentric care a inclus o serie de zece pacienți cu AML R/R care au primit cura EMA86 în cadrul Institutului Național de Cardiologie, Pneumologie și Hematologie (NHLBI) din cadrul Institutului Național de Sănătate (NIH) din Statele Unite ale Americii, sub protocoalele NCT00001397 și NCT02527447, aprobate la nivel instituțional de comisiile de etică ale NIH Clinical Center. Metodele de lucru sunt detaliate *in extenso* în lucrarea de doctorat.

2.3. Rezultate

Rata totală de RC după administrarea de EMA-86 a fost de 40%, respectiv de 75% la pacienții cu AML recăzută și doar 17% la pacienții cu AML refractară. În subgrupurile de risc ELN, rata de RC a fost de doar 16.66% (n=1) la pacienții cu risc advers, 50% pentru risc favorabil și 100% (n=2) pentru cei cu risc intermediar. Supraviețuirea globală mediană a fost de 80.5 zile (30-1205), de 41 de zile (30-166) la subgrupul refractar și 332.5 zile (42-1205) la subgrupul la recădere. Doi pacienți au fost refractari primari la EMA-86 și nu au primit niciun tratament suplimentar, iar doi alți pacienți au fost refractari și au fost incluși

în alte trialuri clinice, dar au decedat ulterior din cauza progresiei de boală. Doi pacienți au primit transplant de celule stem hematopoietice în RC. Dintre aceștia, unul a decedat ca urmare a bolii veno-ocluzive, o complicație comună a transplantului, iar celălalt a rămas în RC persistentă la 1000 de zile de la transplant. Doar jumătate dintre pacienți au obținut recuperare a valorilor neutrofilelor circulante la peste 1,000/ μ L și doar 40% au recuperat valorile trombocitelor la peste 100,000/ μ L. Toți pacienții au dezvoltat neutropenie febrilă și șase dintre ei au avut infecții sistemice sau localizate documentate – fungice (n=4), bacteriene (n=2) sau micobacteriene (n=1), necesitând antibioterapie cu spectru larg și terapie antifungică prelungită. Doi pacienți au dezvoltat aspergiloză invazivă, un pacient tuberculoză diseminată și un pacient infecție sistemică cu *Fusarium* spp (pulmonară, sinusală și cutanată) [24], iar doi pacienți au decedat din cauza sepsisului și insuficienței multiple de organ.

Răspuns clinic		
	La recădere (n=4)	Refractar (n=6)
<i>Răspuns, n (%)</i>		
RC	2 (50)	1 (17)
RCi	1 (25)	0 (0)
RD	1 (25)	5 (83)
<i>Recuperare hematologică, n (%)</i>		
neutrofile > 1000/ μ L	4 (100)	1 (17)
trombocite > 100000/ μ L	2 (50)	2 (33)
Supraviețuire globală, zile, mediană (interval)	332,5 (42-105)	41 (33-116)
<i>Cauza decesului, n (%)</i>		
Sepsis	0 (0)	2 (33)
Boală progresivă	1 (25)	3 (50)
Complicații ale transplantului	1 (25)	0 (0)
Durata spitalizării, zile, mediană (interval)	42,5 (38-74)	41 (33-60)

Tabelul 1 – Răspunsul clinic după administrarea curei de salvare EMA86

2.4. Discuții

Pacienții cu AML R/R au un prognostic în general nefavorabil, cu o rată de supraviețuire la 5 ani de doar 5-10% [7]. Dintre tratamentele de salvare bazate pe chimioterapie, nu există un consens în privința superiorității vreunei cure. În studiul nostru unicentric am arătat că 40% dintre pacienții tratați conform protocolului EMA86 au obținut

RC sau RCi (17% dintre cei refractari și 75% dintre cei la recădere), rezultate comparabile cu ale altor studii care investighează cure de chimioterapie de salvare [25,26]

În mod notabil, în ciuda progreselor în privința standardelor de îngrijire suportivă din ultimii 30 de ani, am remarcat toxicități semnificative asociate cu CS EMA-86, similare cu cele raportate de autorii inițiali ai acestei cure la începutul anilor 1990 [27]. Pancitopenii prelungite și decese secundare sepsisului au survenit la 20% dintre pacienți, în timp ce doar 50% au recuperat valorile neutrofilelor la peste 1,000/ μ L. Așadar, beneficiul clinic al chimioterapiei secvențiale prelungite trebuie pus foarte atent într-o balanță cu riscurile asociate citopeniilor prelungite. În concluzie, chimioterapia secvențială de salvare are toxicități majore și trebuie rezervată doar pentru cazuri selecte de pacienți unde scopul terapeutic este efectuarea unui transplant de celule stem și pentru care noile terapii țintite nu sunt o opțiune disponibilă.

3. Secvențierea de ADN de nouă generație pentru identificarea mutațiilor acționabile clinic în leucemia acută mieloidă

3.1. Introducere

În studiul 1 am demonstrat că, deși chimioterapia citotoxică reprezintă în continuare principalul element constitutiv al tratamentului AML, răspunsurile clinice la pacienții R/R nu sunt superioare în prezent celor înregistrate în decursul ultimelor decade. Terapiile țintite sunt din ce în ce mai des folosite în AML și îmbunătățesc supraviețuirea și profilul clinic atunci când sunt asociate la chimioterapie. Identificarea țintelor terapeutice ale inhibitorilor selectivi, cât și a mutațiilor asociate cu rezistența clinică și predicția răspunsului la tratament, este necesară testarea moleculară a celulelor AML izolate de la pacienți pentru detecția variantelor mutante. În ultimii ani, secvențierea ADN de nouă generație (NGS) a regiunilor hotspot din paneluri de gene frecvent mutate în neoplaziile mieloidă s-a profilat ca o metodă selectivă pentru detecția sensibilă a mutațiilor. Deși NGS are potențialul de a furniza informații cu relevanță clinică majoră și informa asupra abordării terapeutice optime, limitări tehnice legate de analiza computațională a datelor ridică provocări importante [28]. În acest context, ne-am propus să evaluăm în acest studiu eficacitatea unei metode de NGS bazate pe secvențiere de ampliconi a unui număr limitat de gene dintr-un panel mieloid alcătuit in house, cu precădere gene ale căror mutații pot fi acționabile farmacologic prin inhibitori selectivi.

3.2. Materiale și metode

Am realizat un studiu retrospectiv care a inclus 98 de pacienți diagnosticați cu AML și cu probe biologice recoltate în scop de cercetare științifică în Departamentul de Hematologie al Institutului Clinic Fundeni. Au fost efectuate teste de laborator de citogenetică, imunofenotipare și RT-PCR precum și teste NGS bazate pe secvențiere de ADN de ampliconi. Materialele și metodele de lucru sunt detaliate *in extenso* în lucrarea de doctorat.

3.3. Rezultate

Dintre pacienții din lotul de studiu, 32,65% (n=32) au prezentat AML cu anomalii genetice definiții pentru AML. Cea mai frecventă anomalie genetică identificată a fost gena de fuziune RUNX1::RUNX1T1 – 6.12% (n=6), urmată de fuziunea CFBF::MYH11 – 4.08% (n=4) și de fuziunile BCR::ABL1 și rearanjamentele genei KMT2A – 1.02% (n=1). Majoritatea pacienților (76.53%) au avut studii citogenetice efectuate la diagnostic. Dintre aceștia, cei mai mulți pacienți au avut cariotip normal (60%), iar 4% au avut cariotip complex, monosomal sau respectiv hiperdiploid. Printre anomaliile citogenetice frecvente am identificat 8+ la 9,3% dintre pacienți, t(8;21) la 6,66%, 5-/5p- la 4%, inv(16) la 2,66%, 7-/7p-,17p- sau t(9;11) la 1,33%. Din punct de vedere al încadrării în grupe de risc prognostic, conform ghidului ELN 2022, majoritatea pacienților au fost incluși în grupa de risc intermediar – 80.61%, 10.20% în grupa de risc favorabil și 9.18% în grupa de risc advers.

Din totalul probelor incluse în studiu, majoritatea (68,36%) au prezentat mutații somatice în oncogene asociate cu AML (figura 2). Cel mai frecvent mutată genă a fost FLT3 la aproape jumătate dintre pacienți (48,9%). Am detectat prezența duplicației interne în tandem (ITD) prin PCR la 43% dintre pacienți, dar și mutații în domeniul tirozin-kinazic (TKD) al genei FLT3 la 6,12% dintre pacienți. Cele mai multe astfel de variante au fost substituții la nivelul codonului D835E/Y/S/V și o substituție D839G, cu frecvențe ale variantelor alelice (VAF) cuprinse între 2 și 28%. Am identificat varianta patogenă mutantă D816Y în gena KIT la un pacient, dar și o varianta considerată non-patogenă, M541L, la 11 pacienți. În plus, am identificat mutații oncogene la nivelul genei NRAS la 7 pacienți și KRAS la 1 pacient. Aceste mutații sunt preponderent hiperactivatoare (NRAS G12D/S/V, Q61L/R, KRAS G12D) și au VAF cuprinse între 4 și 51%. Mutațiile constitutiv activatoare în RAS au o relevanță clinică importantă atunci când sunt asociate cu alte mutații care sunt acționabile clinic prin inhibitori selectivi (i.e. FLT3), pentru că pot conduce la selecția de clone rezistente la terapiile țintite [29]. Am identificat variante mutante în gena IDH1 (R132C/H/P) și IDH2 (R140Q) cu VAF cuprinse între 4 și 36%. În afara genelor IDH1 și

IDH2, am identificat mutații într-o altă genă care codifică pentru regulatori epigenetici, respectiv DNMT3A (R882C/H) la 8 pacienți cu VAF în jurul valorii de 50%. În cele din urmă, am detectat prezența de mutații în gena factorului de transcripție RUNX1 (T111A/P, K110Q, G165C, W196R, R135K, R80H, F163Y, R107C, A149P, R201*) la 10 pacienți cu VAF între 6 și 75%.

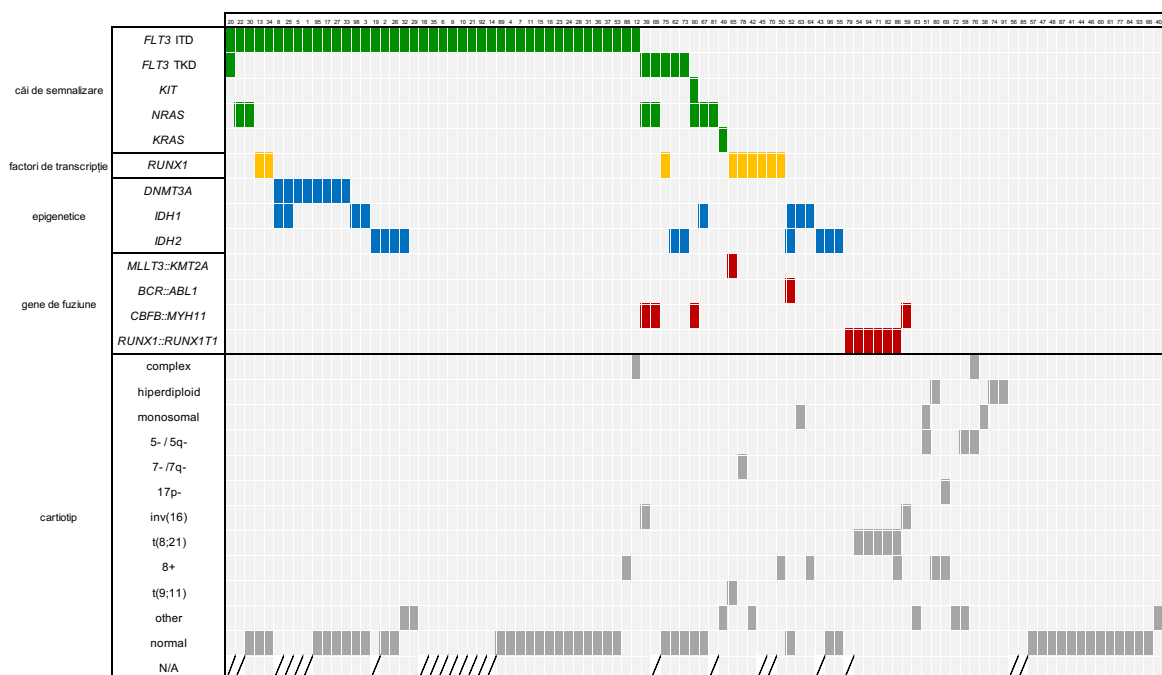


Figura 2 – Grafic oncoplot reprezentând distribuția mutațiilor oncogene, transcriptelor de fuziune și anomaliilor citogenetice identificate în lotul de studiu

3.4. Discuții

Ghidurile recente de diagnostic, inclusiv ghidurile ELN 2022 și NCCN recomandă în prezent folosirea NGS pentru identificarea mutațiilor recurente și integrarea acestora în algoritmi de diagnostic și tratament. Mai mult decât atât, ghidul ELN include prezența unor mutații în gene precum RUNX1, ASXL1, TP53, EZH2, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 sau ZRSR2 în încadrarea în grupa de risc advers [30]. Testele NGS, deși utile, prezintă limitări tehnice și economice semnificative care limitează utilizarea acestora în practica clinică. În acest studiu, am evaluat un test de secvențiere de ADN bazat pe ampliconi pe un panel limitat de gene, cu design *in house* în detecția mutațiilor somatice în AML, cu un focus particular pe mutații acționabile clinic. Simplitatea acestui panel ne-a permis să investigăm fezabilitatea NGS reducând costurile asociate kit-urilor comerciale și adresând limitările de resurse menționate anterior, iar focalizarea pe gene acționabile clinic a avut ca scop

maximizarea beneficiului translațional într-un centru cu resurse limitate. Rezultatele studiului nostru, unul dintre puținele studii de această natură efectuate în România până în prezent, deși a inclus un număr relativ redus de pacienți corespund în mare măsură cu datele raportate de studii efectuate pe cohorte largi [9,10]. Am identificat mutații în genele FLT3, KIT, NRAS, și IDH1/2, care permit folosirea de terapii țintite personalizate și pot prezice răspunsul clinic la astfel de terapii, susținând ideea că secvențierea bulk de ADN furnizează date cu utilitate clinică semnificativă, cel puțin în materie de identificare a țintelor acționabile terapeutic prin terapii personalizate.

4. Noi terapii personalizate în leucemia acută mieloidă – inhibiția alosterică a SHP2 are eficacitate sinergistică cu inhibitorul de BCL2 venetoclax în leucemia acută mieloidă cu mutații în FLT3 și KIT

4.1. Introducere

În studiul 2 am demonstrat că analiza genotipului AML folosind NGS poate identifica cu sensibilitate crescută mutații oncogene acționabile clinic. Dintre acestea, mutațiile în gena FLT3 beneficiază în prezent de cele mai multe terapii țintite aprobate. Deși inhibitorii de FLT3 îmbunătățesc semnificativ supraviețuirea, utilitatea lor clinică este limitată de dezvoltarea rezistenței secundare caracterizate prin clone care activează constitutiv calea de semnalizare Ras/MAPK. Protein-tirozin fosfataza non-receptor 11 (SHP2, codificat de gena PTPN11) este o tirozin fosfatază care are funcția de releu molecular pentru activarea căii de semnalizare RAS/MAPK de către activarea receptorilor de tirozin kinază (RTK). Inhibitorii alosterici de generație nouă ai SHP2 (SHP2i) stabilizează molecula într-o conformație sterică auto-inhibată, închisă, împiedicând atât expunerea domeniului catalitic către substrat, cât și formarea scheletului molecular necesar activării RAS [31,32] și au demonstrat activitate preclinică în multiple modele de neoplazii cu mutații în RTK [32–34] Având în vedere rolul pivotal al SHP2 în semnalizarea stimulate de RTK, am formulat ipoteza că inhibitorii alosterici de SHP2 au activitate în multiple modele de AML cu mutații în RTK și suprimă mecanisme cheie de supraviețuire și rezistență la FLT3i, în special cele datorate mutațiilor în RAS.

4.2. Materiale și metode

Am efectuat un studiu preclinic în care am demonstrat activitatea antiproliferativă și proapoptotică a inhibitorului alosteric de SHP2 RMC-4550, atât în monoterapie cât și în combinație sinergistică cu inhibitorul de BCL2 venetoclax în multiple modele *in vitro* și *in vivo* de AML cu mutații în FLT3 și KIT, dar și modele cu co-mutații în FLT3 și NRAS rezistente la inhibitorii de FLT3. Am folosit modele bazate pe linii celulare, construite cu expresie inductibilă prin doxiciclină a unor mutații transfectate prin vectori virali, tehnici de editare genomică CRISPR/Cas9, teste de expresie genică qPCR și secvențiere transcriptomică RNA-seq, teste de profliare BH3, teste de apoptoză bazate pe citometrie în flux, teste de viabilitate celulară bazate pe chemiluminescență, teste biochimice imunoblot și imunofluorescență pentru a evidenția mecanismele moleculare ale activității RMC-4550, dar și a sinergiei pro-apoptotice cu venetoclax. În cele din urmă am efectuat experimente *in vivo* pe modele murine transplantate cu xenogrefe de linii celulare sau celule leucemice recoltate de la pacienți pentru evaluarea preclinică a combinației RMC-4550-venetoclax care să susțină efectuarea unui trial clinic la pacienții cu AML. Materialele și metodele de lucru sunt detaliate *in extenso* în lucrarea de doctorat.

4.3. Rezultate

Am demonstrat că inhibitorul de SHP2 RMC-4550 suprimă proliferarea liniilor celulare cu mutații în FLT3 și KIT și inhibă încărcarea RAS cu GTP și semnalizarea prin calea Ras/Raf/MEK/ERK. Această activitatea este preservată și în prezența condițiilor de rezistență la inhibitorii de FLT3 precum efectul protectiv al citokinelor din micromediul medular, dar și prezența mutației NRAS G12C, dar nu și a mutației NRAS Q61K, constitutiv activatoare a RAS independent de încărcarea cu GTP. Din punct de vedere transcriptomic, inhibiția SHP2 a supraexprimat o semnătură genetică a țintelor interferonului, dintre care unele au efect pro-apoptotic în cancer. RMC-4550 a crescut expresia proteinei pro-apoptotice BMF cu activitatea inhibitorie a BCL2 și a diminuat expresia MCL1, modificări care au condus la o modificare a dependenței apoptotice a celulelor leucemice în sensul creșterii dependenței de BCL2. În consecință, inhibiția SHP2 a sensibilizat liniile celulare testate la activitatea pro-apoptotică a inhibiției BCL2. Am observat, folosind algoritmi de evaluare a sinergiei farmacologice, că RMC-4550 și venetoclax au activitate sinergistică atât în inhibiția proliferării, cât și în stimularea apoptozei în modele de AML cu mutații în FLT3, KIT, dar și NRAS G12C și că supresia semnalizării prin calea Ras/MAPK efectuată prin blocada SHP2 este exclusiv responsabilă de acest efect. În cele din urmă, am demonstrat că terapia combinatorie cu RMC-4550 și venetoclax a îmbunătățit supraviețuirea și a diminuat

volumul tumoral în modele murine xenogrefate cu linii celulare, dar și cu celule AML derivate de la pacienți.

4.4. Discuții

Rezistența dobândită la inhibitorii de FLT3 este în continuare o limitare majoră a terapiilor țintite în AML cu mutații în FLT3. Date din unele studii preclinice sunt sugestive pentru implicarea semnalizării prin RAS ca principal mediator al supraviețuirii și rezistenței în AML cu mutații în FLT3. Inhibiția SHP2 diminuează semnalizarea oncogenă a căii MAPK prin întreruperea încărcării cu GTP a RAS [35]. În acest studiu, am demonstrat că țintirea farmacologică a SHP2 devoalează o vulnerabilitate a AML cu mutații în RTK prin creșterea sensibilității apoptotice și a dependenței apoptotice de BCL2 prin mecanisme intermediare prin calea de semnalizare a MAPK, rezultând într-o sensibilizare crescută pentru moarte celulară indusă de inhibitorul de BCL2 venetoclax. Rezultatele noastre *in vitro* și *in vivo* reprezintă o dovadă preclinică solidă că terapia combinatorială cu RMC-4550 și venetoclax este o abordare sinergică și eficientă pentru tratamentul AML cu mutații în FLT3 și KIT. Acest studiu argumentează în favoarea ideii că inhibiția SHP2, prin intermediul supresiei semnalizării prin calea MAPK, angrenează modificări pro-apoptotice și o augmentare a dependenței apoptotice de BCL2 care poate fi exploatată oportunistic prin țintirea farmacologică simultană a SHP2 și BCL2. Aceste date susțin în mod univoc că o combinație de inhibitori de SHP2 și BCL2 poate fi explorată într-un trial clinic la pacienți cu AML cu mutații în RTK.

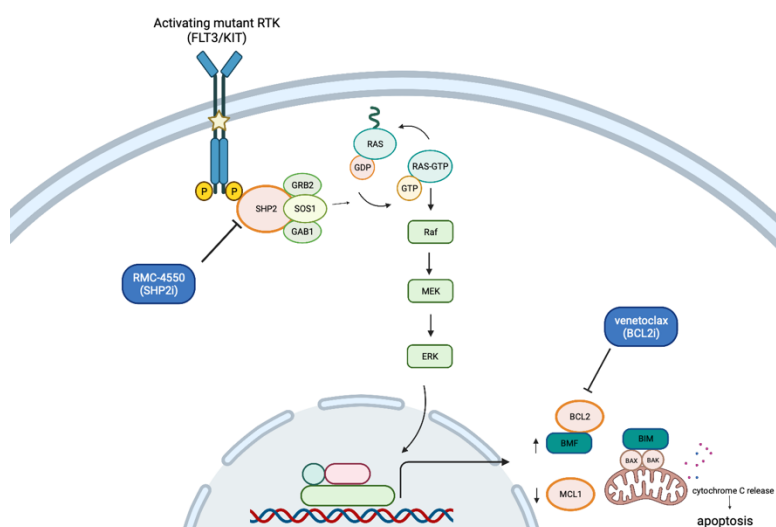


Figura 3 – Reprezentare schematică propusă a mecanismului sinergic dintre inhibitorii de SHP2 și BCL2

5. Potențialul terapeutic al microARN-urilor în medicina personalizată – expresia și țintele moleculare ale miARN-4328 în leucemia acută promielocitară

5.1. Introducere

În studiul 3 am demonstrat că una dintre aplicațiile cu potențial translațional ale medicinei personalizate în AML este dezvoltarea de noi terapii care au capacitatea de a adresa limitările tratamentelor convenționale. În afara terapiilor țintite prin inhibitori cu moleculă mică, alte terapii personalizate, inovatoare, sunt în curs de a fi dezvoltate. Dintre acestea, terapiile celulare sau terapiile cu microARN (miARN) au rezultate promițătoare în studii experimentale preclinice. Terapiile cu miARN exploatează mecanisme biologice intrinseci celulei canceroase pentru a inhiba semnalele oncogenice pro-proliferative sau anti-diferențiere. În studiul 4 ne-am propus să evaluăm dacă există anumite molecule de miARN care au expresie diferențială într-un subtip foarte bine caracterizat de AML, leucemia acută promielocitară (APL), și care pot fi exploatare în viitor pentru generarea de noi terapii. Am selectat pentru studiul nostru APL pentru că este un model de boală cu o patogeneză extrem de clar definită și care beneficiază deja de terapii personalizate foarte eficiente. În acest studiu ne-am propus să evaluăm dacă miARN care au tropism teoretic, calculat bioinformatic, pentru gena RARA au expresie diferențială în probe derivate de la pacienți cu APL și dacă pot fi utilizate ca biomarkeri în acest model de leucemie acută mieloidă.

5.2. Materiale și metode

Am efectuat un studiu de tip observațional în care au fost incluși 20 de pacienți diagnosticați cu APL și tratați în cadrul Institutului Clinic Fundeni, București, precum și 20 de subiecți control fără diagnostic de leucemie acută. Probe de sânge periferice obținute de la acești subiecți au fost investigate prin qPCR pentru evaluarea expresiei unui număr de 6 micro-ARN-uri care au rezultat în urma unei analize de predicție bioinformatică ca molecule cu tropism pentru gena receptorului acidului trans-retinoic RARA. Materialele și metodele de lucru sunt detaliate *in extenso* în lucrarea de doctorat.

5.3. Rezultate

Am efectuat o analiză *in silico* de predicție a miARN care au ca țintă gena RARA, patognomonic mutată în urma translocațiilor cromozomiale specifice APL. Am selectat 6 miARN în urma filtrării bioinformatică a scorurilor de predicție și am realizat teste qPCR pentru evaluarea expresiei acestora în lotul de studiu comparativ cu lotul control. Dintre acestea, hsa-mir-4328 a avut o expresie semnificativ diminuată în lotul de studiu ($p=0,02$,

testul unpaired two-tailed Mann-Whitney U). Analiza bioinformatică funcțională a căilor de semnalizare ale țintelor hsa-mir-4328 a relevat că acest miARN este implicat în transcripția genelor țintă și în reglarea transcripției, dar și în căi funcționale asociate căilor de semnalizare în AML, precum receptorii de tirozin kinază (RTK), factori de creștere și căi de semnalizare ale interleukinelor, calea de semnalizare MAPK sau modularea expresiei factorului de transcripție RUNX1. Analiza rețelelor de interacțiune a țintelor moleculare ale hsa-mir-4328 a identificat că acestea sunt asociate proceselor de diferențiere mieloidă, sugerând implicarea hsa-mir-4328 în patogeneza APL, o boală definită în esență de o alterare a diferențierii progenitorilor mieloidi.

5.4. Discuții

Elementul patognomonic esențial al APL este gena de fuziune PML-RARA. În acest studiu, am investigat expresia unor miARN-uri selectate *in silico* în APL și am identificat că hsa-mir-4328, care țintește gena RARA și este implicat în reglarea transcripției și a factorilor de transcripție, dar și în căi de semnalizare asociate diferențierii mieloidă și a proliferării celulare, are expresie semnificativ diminuată la pacienții cu APL. Conform rezultatelor noastre, identificarea unui nou miARN, cu o expresie semnificativ dereglată în APL, poate prezenta un nou punct de plecare în terapia genică, dar și în monitorizarea răspunsului terapeutic. Datorită sensibilității expresiei miARN în dinamica bolii, recăderea APL ar putea fi anticipată printr-o reducere a expresiei hsa-mir-4328, chiar înainte de detectarea genei de fuziune PML-RARA. În cele din urmă rezultatele noastre pot reprezenta un punct de plecare în dezvoltarea unui panel de miARN pentru monitorizarea răspunsului terapeutic al APL și pentru dezvoltarea de noi terapii personalizate. Folosind tehnici inovatoare de livrare a ARN non-codant, livrarea hsa-mir-4328 *in vivo* în studii preclinice sau clinice, în asociere cu ATRA și trioxid de arsenic poate fi un obiectiv terapeutic realizabil în studii ulterioare. Restabilirea expresiei endogene de hsa-mir-4328 are potențialul, cel puțin la nivel teoretic să țintească forma mutantă a receptorului acidului retinoic și să ridice blocajul de diferențiere patognomonic pentru APL și să reprezinte o soluție terapeutică la pacienții la care standardul de terapie actual nu este suficient pentru inducerea RC și vindecare.

6. Concluzii

Ca urmare a progreselor accelerate în domeniul tehnologiilor multi-omice și a interpretării volumelor mari de date generate de acestea în context clinic și pentru dezvoltarea de noi terapii, asistăm astăzi la o schimbare de paradigmă în management-ul leucemiei acute mieloide. Conform celor mai recente ghiduri, simpla identificare a unor leziuni la nivelul genomului celulelor leucemice poate influența criteriile de diagnostic, încadrarea în grupe de risc și alegerea abordării terapeutice. Unele dintre aceste anomalii genetice specifice AML pot fi țintite prin terapii de precizie care includ inhibitori cu moleculă mică, imunoterapii, terapii celulare și terapii genetice bazate pe ARN non-codant. O serie de terapii țintite, preponderent inhibitori cu moleculă mică, sunt deja în uz clinic, iar multe altele investigate în trialuri randomizate. Mai mult decât atât, răspunsul la tratament poate fi evaluat la nivel molecular prin detecția sensibilă a unui număr extrem de mic de celule leucemice. Toate aceste aplicații sunt diverse fațete ale medicinei personalizate, o abordare inovatoare care are ca scop ultim îmbunătățirea supraviețuirii și a calității vieții pacienților cu AML.

În lucrarea de față ne-am propus să evaluăm printr-un sistem de ipoteze de lucru pe care le-am investigat experimental, utilitatea medicinei personalizate în managementul AML. În sumar, concluziile studiilor științifice efectuate de noi sunt:

- 1) Folosirea chimioterapiei citotoxice pentru a trata recăderile în AML are în prezent o eficacitate la fel de redusă și un profil de toxicitate similar ca acum două decade, iar terapii noi, mai eficiente și mai sigure sunt necesare.
- 2) Terapiile selective țintesc anumite mutații somatice, dar identificarea lor prin analize genomice este critică pentru a putea ghida tratamentul țintit. Secvențierea de ADN de nouă generație bazată pe ampliconi poate identifica cu succes astfel de mutații acționabile terapeutic.
- 3) Una dintre limitările terapiilor țintite este rezistența prin selecția de subclone cu mutații insensibile la acțiunea inhibitorilor, dar medicina personalizată poate adresa astfel de mecanisme de rezistență. O combinație de inhibitori ai SHP2 și BCL2 induce în mod sinergistic moarte celulară programată în AML cu mutații în FLT3 și KIT.
- 4) Terapiile cu ARN non-codant, deși nu încă disponibile clinic, au potențialul să țintească specific gene specifice mutante în AML cu un profil de toxicitate redus. Analiza bioinformatică poate fi predictivă pentru identificarea unor miARN-uri cu complementaritate și acțiune de represie transcripțională genei RARA, patognomonic

mutată în APL, iar miR-4328 este transcripțional supraexprimat la pacienții cu APL, sugerând o potențială aplicație de dezvoltare terapeutică.

Coroborate, concluziile studiilor noastre subliniază importanța medicinei personalizate în abordarea terapeutică modernă a AML. Considerăm, în acest sens, că obiectivele cercetării de față au fost atinse. Câteva dintre provocările ridicate de medicina personalizată cu care ne-am confruntat trebuie totuși precizate.

În primul rând, deși avantajele tehnice ale metodelor multi-omice sunt incontestabile, fezabilitatea din punct de vedere economic a implementării la scară largă a acestor metode este limitată. Identificarea unui tablou genetic complex care să includă identificarea de anomalii ale cariotipului, de transcripte de fuziune rezultate în urma translocațiilor cromozomiale balansate, dar și de mutații la nivelul genelor importante pentru patogeniza leucemică este un ideal dezirabil în cazul fiecărui pacient diagnosticat cu AML. Cu toate acestea, în realitate testele genetice, în special NGS, sunt analize de laborator laborioase, care necesită echipamente costisitoare, protocoale nestandardizate de interpretare bioinformatică a datelor și personal înalt calificat. Centrele cu resurse limitate au un acces restricționat la astfel de teste, restricționând accesibilitatea pacienților la tratamentul optim, conform medicinei personalizate. În studiul al doilea am secvențiat folosind o metodă accesibilă de secvențiere bazată pe ampliconi probe de la 98 de pacienți cu AML și am identificat mutații acționabile clinic sau mutații cu valoare prognostică. Deși aceste rezultate sunt încurajatoare, considerăm că este necesară o standardizare a metodelor NGS folosite și a panelului optim de gene utile pentru diagnosticul și monitorizarea MRD în AML.

În al doilea rând, deși terapiile țintite au un beneficiu clinic important, rezistența la aceste terapii este o provocare clinică majoră. Inhibitorii de FLT3 au suscitad cel mai mare interes în domeniul terapiilor țintite. În ciuda eficacității inițiale, acești inhibitori sunt limitați de fenomenele de rezistență, iar pacienții eventual recad. Rezistența se datorează de obicei selecției sub presiunea inhibitorului a unor clone care activează constitutiv căile de semnalizare prin care receptorul FLT3 își exercită funcția biologică, preponderent calea RAS/MAPK. Activarea RAS se produce biochimic prin ciclarea GDP la GTP, proces în care iau parte mai multe proteine adjuvante printre care și SHP2. În studiul al treilea am demonstrat că inhibitorul alosteric de SHP2 RMC-4550 stabilizează conformația inactivă a proteinei și împiedică încărcarea RAS cu GTP, inhibând proliferarea leucemică a liniilor celulare cu mutații în FLT3, dar și KIT. Țintind activarea RAS în această manieră, am emis ipoteza că RMC-4550 poate preveni rezistența adaptivă la inhibitorii de FLT3, mediată atât prin activarea RAS cu mutații dependente de hidroliza GTP, dar și cea mediată umoral de

citokinele din micromediul tumoral. În studii de validare *in vivo* am demonstrat preclinic că tratamentul cu RMC-4550 plus venetoclax îmbunătățește supraviețuirea și reduce semnificativ volumul tumoral în modele de șoareci cu xenogrefe derivate din linii celulare, dar și din celule recoltate de la pacienți cu AML cu mutații în FLT3. Aceste date susțin în mod univoc investigarea acestei combinații într-un trial clinic. Folosind elemente de medicină personalizată am reușit, deci, să identificăm o vulnerabilitate genetică specifică a AML cu mutații în FLT3 pe care am exploatat-o pentru propunerea de noi terapii țintite. Cu toate acestea, studii ulterioare care să investigheze rezistența prin feedback adaptiv la inhibitorii de SHP2 sunt necesare. Mai mult decât atât, noi terapii țintite cu eficacitate împotriva mutațiilor independente de activitatea hidrolitică a RAS-GTP sunt necesare pentru a acoperi întreg spectrul de rezistență la inhibitorii de FLT3.

În al treilea rând, studii care să dovedească eficacitatea preclinică a tratamentului cu miARN sunt mult mai dificil de efectuat *in vivo*, în special datorită provocărilor ridicate de livrarea ARN-ului non-codant la țesuturi țintă cu degradare minimă. În studiul al patrulea am identificat o expresie semnificativ redusă a miR-4328, care țintește gena RARA, la un lot cu pacienți cu APL. În mod ipotetic, restabilirea nivelului fiziologic al miR-4328 prin administrare terapeutică are potențialul să ridice blocajul de diferențiere caracteristic APL prin țintirea transcriptului RARA mutant. Considerăm că o astfel de abordare ilustrează ideea generală a acestei lucrări că medicina personalizată poate îmbunătăți terapiile actuale în AML, dar această ipoteză va trebui investigată preclinic în studii ulterioare care să includă optimizări ale metodei de livrare *in vivo* a miARN.

Rezultatele celor patru studii ale lucrării de față aduc, în opinia noastră, contribuții notabile în domeniul aplicațiilor medicinei personalizate în AML. O parte dintre concluziile noastre pot genera la rândul lor ipoteze care rămân a fi explorate în studii ulterioare. Sunt necesare eforturi susținute la nivelul grupurilor de lucru internaționale pentru identificarea unei recomandări de consens, bazate pe dovezi, în privința folosirii NGS în managementul AML care să țină cont de creșterea accesibilității metodei astfel încât un număr cât mai mare de pacienți să poată beneficia de terapii personalizate. În al doilea rând, sperăm ca rezultatele preclinice foarte promițătoare ale terapiei cu inhibitori de SHP2 și venetoclax să genereze un interes semnificativ și să fie translatate într-un trial clinic. În ciuda dificultăților noi generate de terapiile personalizate în AML, precum rezistențele adaptive la inhibitori insuficient explorați până în prezent, cercetarea noastră sugerează că medicina personalizată este direcția adecvată în anevoiosul drum către ameliorarea supraviețuirii în acest cancer hematologic cu prognostic extrem de nefast.

Bibliografie selectivă

1. Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med*. 2015 Feb 26;372(9):793–5.
2. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1031–7.
3. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, Ferrara F, Fazi P, Cicconi L, Di Bona E, Specchia G, Sica S, Divona M, Levis A, Fiedler W, Cerqui E, Breccia M, Fioritoni G, Salih HR, Cazzola M, Melillo L, Carella AM, Brandts CH, Morra E, von Lilienfeld-Toal M, Hertenstein B, Wattad M, Lübbert M, Hänel M, Schmitz N, Link H, Kropp MG, Rambaldi A, La Nasa G, Luppì M, Ciceri F, Finizio O, Venditti A, Fabbiano F, Döhner K, Sauer M, Ganser A, Amadori S, Mandelli F, Döhner H, Ehninger G, Schlenk RF, Platzbecker U. Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013 Jul 11;369(2):111–21.
4. Green ED, Watson JD, Collins FS. Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. *Nature*. 2015 Oct 1;526(7571):29–31.
5. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, Dooling D, Dunford-Shore BH, McGrath S, Hickenbotham M, Cook L, Abbott R, Larson DE, Koboldt DC, Pohl C, Smith S, Hawkins A, Abbott S, Locke D, Hillier LW, Miner T, Fulton L, Magrini V, Wylie T, Glasscock J, Conyers J, Sander N, Shi X, Osborne JR, Minx P, Gordon D, Chinwalla A, Zhao Y, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson M, Baty J, Ivanovich J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Walter MJ, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008 Nov 6;456(7218):66–72.
6. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng WJ, Choi JK, Colmenero I, Coupland SE, Cross NCP, De Jong D, Elghetany MT, Takahashi E, Emile JF, Ferry J, Fogelstrand L, Fontenay M, Germing U, Gujral S, Haferlach T, Harrison C, Hodge JC, Hu S, Jansen JH, Kanagal-Shamanna R, Kantarjian HM, Kratz CP, Li XQ, Lim MS, Loeb K, Loghavi S, Marcogliese A, Meshinchi S, Michaels P, Naresh KN, Natkunam Y, Nejati R, Ott G, Padron E, Patel KP, Patkar N, Picarsic J, Platzbecker U, Roberts I, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Tembhare P, Tyner J, Verstovsek S, Wang W, Wood B, Xiao W, Yeung C, Hochhaus A. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul 22;36(7):1703–19.
7. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Sep 17;373(12):1136–52.
8. Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, Bloomfield CD, Estey E, Burnett A, Cornelissen JJ, Scheinberg DA, Bouscary D, Linch DC. Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Mar 10;2:16010.
9. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson AG, Hoadley K, Triche TJ, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Alty A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R,

- Chu A, Chuah E, Chun HJ, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MDM, Vandin F, Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KRM, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 May 30;368(22):2059–74.
10. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O’Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Campbell PJ. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jun 9;374(23):2209–21.
 11. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2011 Sep 14;4:36.
 12. Walter RB, Othus M, Burnett AK, Löwenberg B, Kantarjian HM, Ossenkoppele GJ, Hills RK, Ravandi F, Pabst T, Evans A, Pierce SR, Vekemans MC, Appelbaum FR, Estey EH. Resistance prediction in AML: analysis of 4601 patients from MRC/NCRI, HOVON/SAKK, SWOG and MD Anderson Cancer Center. *Leukemia*. 2015 Feb 12;29(2):312–20.
 13. Morita K, Wang F, Jahn K, Hu T, Tanaka T, Sasaki Y, Kuipers J, Loghavi S, Wang SA, Yan Y, Furudate K, Matthews J, Little L, Gumbs C, Zhang J, Song X, Thompson E, Patel KP, Bueso-Ramos CE, DiNardo CD, Ravandi F, Jabbour E, Andreeff M, Cortes J, Bhalla K, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Konopleva M, Nakada D, Navin N, Beerenwinkel N, Futreal PA, Takahashi K. Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. *Nat Commun*. 2020 Oct 21;11(1):5327.
 14. **Popescu B**, Sheela S, Thompson J, Grasmeyer S, Intrater T, DeStefano CB, Hourigan CS, Lai C. Timed sequential salvage chemotherapy for relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Clin Hematol Int*. 2020 Mar;2(1):27–31.
 15. **Popescu B**, Stahlhut C, Tarver TC, Wishner S, Lee BJ, Peretz CAC, Luck C, Phojanakong P, Serrano JAC, Hongo H, Rivera JM, Xirenayi S, Chukinas JA, Steri V, Tasian SK, Stieglitz E, Smith CC. Allosteric SHP2 Inhibition Increases Apoptotic Dependency on BCL2 and Synergizes with Venetoclax in FLT3 and KIT- Mutant AML. *bioRxiv* [Internet]. 2022 Jan 1;2022.12.01.518665. Available from: <http://biorxiv.org/content/early/2022/12/03/2022.12.01.518665.abstract>
 16. Lupu OT, **Popescu B**, Avram E, Dragomir M, Cimponeriu GD, Mighiu I, Aposteanu S, Coriu D. Downregulation of hsa-miR-4328 and target gene prediction in Acute Promyelocytic Leukemia. *Rev Rom Med Lab*. 2022 Jul 1;30(3):261–72.
 17. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424–47.

18. DeStefano CB, Hourigan CS. Personalizing initial therapy in acute myeloid leukemia: incorporating novel agents into clinical practice. *Ther Adv Hematol*. 2018 May 27;9(5):109–21.
19. DiNardo CD, Perl AE. Advances in patient care through increasingly individualized therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019 Feb 2;16(2):73–4.
20. Lai C, Karp JE, Hourigan CS. Precision medicine for acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2016 Jan 2;9(1):1–3.
21. Vaughan WP, Karp JE, Burke PJ. Long chemotherapy-free remissions after single-cycle timed-sequential chemotherapy for acute myelocytic leukemia. *Cancer*. 1980 Mar 1;45(5):859–65.
22. Karp J, Donehower R, Enterline J, Dole G, Fox M, Burke P. In vivo cell growth and pharmacologic determinants of clinical response in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1989 Jan 1;73(1):24–30.
23. Norsworthy KJ, DeZern AE, Tsai HL, Hand WA, Varadhan R, Gore SD, Gojo I, Pratz K, Carraway HE, Showel M, McDevitt MA, Gladstone D, Ghiaur G, Prince G, Seung AH, Benani D, Levis MJ, Karp JE, Smith BD. Timed sequential therapy for acute myelogenous leukemia: Results of a retrospective study of 301 patients and review of the literature. *Leuk Res*. 2017 Oct;61:25–32.
24. Sheela S, Ito S, Strich JR, Manion M, Montemayor-Garcia C, Wang HW, Oetjen KA, West KA, Barrett AJ, Parta M, Gea-Banacloche J, Holland SM, Hourigan CS, Lai C. Successful salvage chemotherapy and allogeneic transplantation of an acute myeloid leukemia patient with disseminated *Fusarium solani* infection. *Leuk Res Rep*. 2017;8:4–6.
25. Roboz GJ, Rosenblat T, Arellano M, Gobbi M, Altman JK, Montesinos P, O’Connell C, Solomon SR, Pigneux A, Vey N, Hills R, Jacobsen TF, Gianella-Borradori A, Foss Ø, Vetthusand S, Giles FJ. International Randomized Phase III Study of Elacytarabine Versus Investigator Choice in Patients With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Jun 20;32(18):1919–26.
26. Litzow MR, Wang X V., Carroll MP, Karp JE, Ketterling RP, Zhang Y, Kaufmann SH, Lazarus HM, Luger SM, Paietta EM, Pratz KW, Tun HW, Altman JK, Broun ER, Rybka WB, Rowe JM, Tallman MS. A randomized trial of three novel regimens for recurrent acute myeloid leukemia demonstrates the continuing challenge of treating this difficult disease. *Am J Hematol*. 2019 Jan 15;94(1):111–7.
27. Archimbaud E, Leblond V, Michallet M, Cordonnier C, Fenaux P, Travade P, Dreyfus F, Jaubert J, Devaux Y, Fiere D. Intensive sequential chemotherapy with mitoxantrone and continuous infusion etoposide and cytarabine for previously treated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1991 May 1;77(9):1894–900.
28. Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ, Fox EJ, Hiatt JB, Loeb LA. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Sep 4;109(36):14508–13.
29. Kennedy VE, Smith CC. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front Oncol*. 2020;10:612880.
30. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, Larson RA, Levine RL, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Röllig C, Sierra J, Stein EM, Tallman MS, Tien HF, Wang J, Wierzbowska A, Löwenberg B. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022 Sep 22;140(12):1345–77.
31. Nichols RJ, Haderk F, Stahlhut C, Schulze CJ, Hemmati G, Wildes D, Tzitzilonis C, Mordec K, Marquez A, Romero J, Hsieh T, Zaman A, Olivás V, McCoach C, Blakely

- CM, Wang Z, Kiss G, Koltun ES, Gill AL, Singh M, Goldsmith MA, Smith JAM, Bivona TG. RAS nucleotide cycling underlies the SHP2 phosphatase dependence of mutant BRAF-, NF1- and RAS-driven cancers. *Nat Cell Biol.* 2018 Sep;20(9):1064–73.
32. Chen YNP, LaMarche MJ, Chan HM, Fekkes P, Garcia-Fortanet J, Acker MG, Antonakos B, Chen CHT, Chen Z, Cooke VG, Dobson JR, Deng Z, Fei F, Firestone B, Fodor M, Fridrich C, Gao H, Grunenfelder D, Hao HX, Jacob J, Ho S, Hsiao K, Kang ZB, Karki R, Kato M, Larrow J, La Bonte LR, Lenoir F, Liu G, Liu S, Majumdar D, Meyer MJ, Palermo M, Perez L, Pu M, Price E, Quinn C, Shakya S, Shultz MD, Slisz J, Venkatesan K, Wang P, Warmuth M, Williams S, Yang G, Yuan J, Zhang JH, Zhu P, Ramsey T, Keen NJ, Sellers WR, Stams T, Fortin PD. Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature.* 2016 Jul 7;535(7610):148–52.
33. Mainardi S, Mulero-Sánchez A, Prahallad A, Germano G, Bosma A, Krimpenfort P, Lieftink C, Steinberg JD, de Wit N, Gonçalves-Ribeiro S, Nadal E, Bardelli A, Villanueva A, Bernards R. SHP2 is required for growth of KRAS-mutant non-small-cell lung cancer in vivo. *Nat Med.* 2018 Jul;24(7):961–7.
34. Pandey R, Ramdas B, Wan C, Sandusky G, Mohseni M, Zhang C, Kapur R. SHP2 inhibition reduces leukemogenesis in models of combined genetic and epigenetic mutations. *J Clin Invest.* 2019 Dec 2;129(12):5468–73.
35. **Popescu B**, Shannon K. Sidestepping SHP2 inhibition. *Journal of Experimental Medicine.* 2023 May 1;220(5).

Lucrări științifice publicate

Articole in extenso:

1. **Popescu B**, Sheela S, Thompson J, Grasmeder S, Intrater T, DeStefano CB, Hourigan CS, Lai C. Timed sequential salvage chemotherapy for relapsed or refractory acute myeloid leukemia. Clin Hematol Int. 2020;2(1):27-31. (Capitolul 5 – pag. 49-56)
<https://doi.org/10.2991/chi.d.191128.001>
2. **Popescu B**, Stahlhut C, Tarver TC, Wishner S, Lee BJ, Peretz CAC, Luck C, Phojanakong P, Camara Serrano JA, Hongo H, Rivera JM, Xirenayi S, Chukinas AJ, Steri V, Tasian SK, Stieglitz E, Smith CC. Allosteric SHP2 Inhibition Increases Apoptotic Dependency on BCL2 and Synergizes with Venetoclax in FLT3- and KIT-Mutant AML. Cell Rep Med. 2023;4(11). Factor de impact: 14,3. (Capitolul 7 – pag. 69-99)
<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101290>
Pre-print: <https://doi.org/10.1101/2022.12.01.518665>
3. **Popescu B**, Shannon K. Sidestepping SHP2 inhibition. J Exp Med. 2023;220(5). Factor de impact: 15,3 (Capitolul 7 – pag. 69-99)
<https://doi.org/10.1084/jem.20230082>
4. Lupu O, **Popescu B**, Avram E, Dragomir M, Cimponeriu G, Mighiu I, Aposteanu S, Coriu D. Downregulation of hsa-miR-4328 and target gene prediction in Acute Promyelocytic Leukemia. Revista Romana de Medicina de Laborator. 2022;30(3): 261-272. Factor de impact: 0,5 (Capitolul 8 – pag. 100-113)
<https://doi.org/10.2478/rrlm-2022-0022>
5. Celik H, Lindblad KE, **Popescu B**, Gui G, Goswami M, Valdez J, DeStefano CB, Lai C, Thompson J, Ghannam JY, Fantoni G, Biancotto A, Candia J, Cheung F, Sukumar G, Dalgard C, Smith RH, Larochelle A, Dillon LW, Hourigan CS. Highly multiplexed proteomic assessment of human bone marrow in acute myeloid leukemia. Blood Adv. 2020;4(2):367-79 Factor de impact: 7,5 (Capitolul 1 – pag. 22)
<https://10.1182/bloodadvances.2019001124>

Abstracte publicate:

1. **Popescu B**, Lindblad K, Fantoni G, Gui G, Valdez J, Goswami M, DeStefano CB, Lai C, Biancotto A, Candia J, Cheung F, Thompson J, Dillon LW, Hourigan CS. Abstract 3756: Highly multiplexed proteomic assessment of the human acute myeloid leukemia bone marrow microenvironment. *Cancer Research*. 2019;79(13_Supplement):3756-. (Capitolul 1 – pag. 22)
<https://doi.org/10.1158/1538-7445.Am2019-3756>
2. Celik H, Lindblad KE, **Popescu B**, Fantoni G, Gui G, Valdez J, Goswami M, DeStefano CB, Lai C, Biancotto A, Candia J, Cheung F, Thompson J, Ghannam JY, Sukumar G, Smith RH, Dalgard C, Larochele A, Dillon LW, Hourigan CS. A Novel Proteomic Profiling of the Bone Marrow Microenvironment Reveals Elevated Levels of the Chemokine CCL23 Isoforms in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):2709-. (Capitolul 1 – pag. 22)
<https://doi.org/10.1182/blood-2019-122121>
3. **Popescu B**, Stahlhut C, Tarver TC, III, Ferng TT, Peretz C, Wishner S, et al. Allosteric SHP2 Inhibitor RMC4550 Synergizes with Venetoclax in FLT3 and KIT Mutant Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2021;138(Supplement 1):2231-. (Capitolul 7 – pag. 69-99)
<https://doi.org/10.1182/blood-2021-145964>