

## MEMORIA DEL PROYECTO

### **Título:** Silenciamiento “in vitro” de genes implicados en tolerancia como estrategia de inmunoterapia antitumoral

#### **1) ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en los países desarrollados. Los avances de los últimos años en la investigación del tratamiento del cáncer y la mayor comprensión de los mecanismos mediante los cuales las células tumorales son capaces de evadir al sistema inmunitario están posibilitando la aparición de nuevos fármacos basados en la inmunoterapia.

Para que se desencadene una respuesta inmunitaria eficaz se deben producir dos señales simultáneamente: 1) el reconocimiento, por parte del receptor T de los linfocitos, del antígeno asociado a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) presente en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC) y 2) la interacción de las moléculas coestimuladoras CD28, presente en la superficie de los linfocitos, y B7.1/B7.2 presente en la superficie de las APC. En ausencia de la señal de coestimulación, se produce tolerancia o anergia. El fracaso de la respuesta inmunitaria antitumoral en pacientes con cáncer se debe a la instauración de una respuesta inmunosupresora de tolerancia al tumor. Ésta está mediada principalmente por los linfocitos T reguladores (Treg), que expresan las moléculas inmunosupresoras CTLA4 (en la superficie de la célula) y Foxp3 (factor de transcripción intracelular) cuya expresión confiere características reguladoras a los linfocitos T (1). En los últimos años, se han publicado una serie de trabajos demostrando la existencia de la resistencia inmune adaptativa (2), que consiste en la desactivación de los linfocitos T por parte de las células tumorales. Al reconocer los antígenos tumorales, los linfocitos T se activan y expresan moléculas reguladoras, como Foxp3, CTLA4 y el receptor PD1. La confianza en la inmunoterapia como alternativa real a las terapias convencionales del cáncer con quimioterapia se ha visto reforzada tras la aprobación por parte de la FDA del ipilimumab (anticuerpo anti-CTLA4) en 2011 y la de pembrolizumab (anticuerpo anti-PD1) en 2014 (3). En el año 2013 la revista Science consideró en la inmunoterapia como el avance científico más importante del año. En el congreso de 2016 de la Sociedad Americana de Oncología Médica también se reconoce la inmunoterapia como el avance del año 2015. .

Los anticuerpos monoclonales anti-CTLA4 (principalmente ipilimumab) prolongan la fase de activación (4-6) inmunitaria y han demostrado ser capaces de alargar la vida de estos pacientes (7,8). Sin embargo, existen algunas limitaciones: a) alrededor de sólo el 10-15% de los pacientes consiguen respuestas duraderas; b) pueden producir reacciones adversas relacionadas con respuestas de autoinmunidad; y c) el tratamiento tiene un elevado coste. También se ha explorado el bloqueo de la interacción entre el receptor PD-1 y su ligando PD-L1 mediante anticuerpos (Nivolumab y pembrolizumab) para activar los linfocitos T y conseguir una respuesta antitumoral (9-11) más efectiva. Sin embargo, hasta la fecha no se ha diseñado ninguna estrategia farmacológica para bloquear la expresión del factor de transcripción intracelular Foxp3 (implicado en la diferenciación de linfocitos T en linfocitos T reguladores), en pacientes con cáncer.

Dadas las limitaciones presentes en el tratamiento con anticuerpos, se han estudiado otras estrategias para limitar la expresión de estas proteínas, basadas en el silenciamiento génico, que consiste en inhibir la expresión de un gen a nivel del DNA o mRNA, mediante el uso de oligonucleótidos. El silenciamiento génico posee las siguientes ventajas: 1) los oligonucleótidos disponibles para otras enfermedades ya están en fase de ensayos clínicos (12-17); 2) los oligonucleótidos antisentido utilizados para el silenciamiento génico han sido modificados para resistir la degradación de las nucleasas circulantes, lo que permite su administración parenteral (iv, ip, im, sc); 3) la eficacia del silenciamiento del gen puede ser evaluada previamente *in vitro*; 4) se puede abordar el silenciamiento de cualquier gen con independencia del lugar de destino intra o extracelular de la proteína que codifica; 5) es posible desarrollar sinergias mediante el silenciamiento combinado de varios genes implicados en los mecanismos reguladores de la respuesta supresora; 6) tras la identificación de la diana de interés terapéutico, la nueva molécula terapéutica de silenciamiento génico se puede desarrollar con rapidez; 7) existen unos nucleótidos antisentido de tercera generación, ss-siRNA (single strand siRNA) basados en la modificación de oligonucleótidos de

cadena simple (ASO) que utilizan la ruta de silenciamiento génico del RNA interferente propia de los microRNA y siRNA, que ha demostrado ser incluso más eficaz (18). Por tanto, son herramientas de gran eficacia y versatilidad. En estudios recientes de nuestro grupo, utilizando un modelo de melanoma en ratón, la combinación del silenciamiento génico de CTLA4 o Foxp3 previo a la vacunación terapéutica con células tumorales (inactivadas mediante irradiación) modificadas genéticamente para producir GM-CSF (factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos), consiguió una supervivencia del 20% y 50% (19), respectivamente, mientras que fallecieron todos los animales del grupo control. Estos resultados indican que es posible recuperar la eficacia de las vacunas preventivas y coinciden con trabajos recientes de silenciamiento génico *in vitro* de Foxp3 (utilizando siRNA), en los que se observó un retraso en el crecimiento del tumor (20). Además, otro estudio previo de silenciamiento de Foxp3 en un modelo de leucemia murina, utilizando un vector lentiviral codificando shRNA, consiguió también retrasar el crecimiento del tumor y prolongar la supervivencia de los animales (21).

En el presente proyecto proponemos trasladar el procedimiento de silenciamiento génico del modelo murino al modelo humano. Como primera fase, se diseñarán oligonucleótidos antisentido de 2ª generación (ASO, que actúan a través de la vía de silenciamiento de la RNasa H) y 3ª generación (ASO-interferente o ss-siRNA, basados en el silenciamiento mediado por el RNA interferente, que actúan a través de la vía Dicer). En ambos casos, los oligonucleótidos antisentido utilizados serán resistentes a la degradación mediada por nucleasas. Esto permitirá silenciar con alta eficacia los genes humanos Foxp3 y CTLA4, implicados en la supresión de la respuesta inmunitaria contra el tumor. La eficacia de este silenciamiento se evaluará en líneas celulares humanas con capacidad para expresar estos genes (KARPAS 299, melanoma humano). Los ASOs de mayor eficacia de silenciamiento serán objeto de patente. Si el proyecto tiene éxito, dispondremos de las herramientas necesarias para evaluar la oportunidad de llevar a cabo un ensayo clínico que permita determinar su seguridad y eficacia clínica.

## 2) DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS O EXPERIENCIAS PRELIMINARES

En este momento, la eficacia del procedimiento ya ha sido contrastada con éxito por nuestro grupo, en modelo murino. En este sentido, se ha demostrado que la transfección con ASOs anti-Foxp3 permite un descenso en la expresión del gen tras la implantación de un tumor cuando se compara con el control. Esto permite frenar la formación de linfocitos Treg y así minimizar la respuesta de inmunotolerancia que facilita el desarrollo y crecimiento del tumor. A continuación se muestra la reducción en la expresión del mRNA de Foxp3 en los ratones tratados.

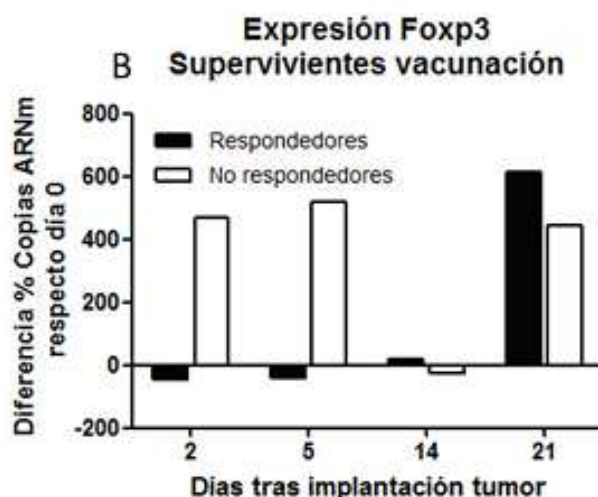


Figura 1. Eficacia de silenciamiento del gen Foxp3 en ratones tras la implantación del tumor y la vacunación con ASOs anti-Foxp3

Asimismo, la combinación de la vacunación terapéutica (posterior a la implantación del tumor) con células tumorales modificadas genéticamente para producir GM-CSF asociado al silenciamiento

génico previo de las moléculas inmunosupresoras CTLA4 o Foxp3 consiguió un 20% y 50% de supervivencia respectivamente, mientras que fallecieron todos los animales del grupo control. A continuación se muestra el gráfico de supervivencia de los ratones tratados.

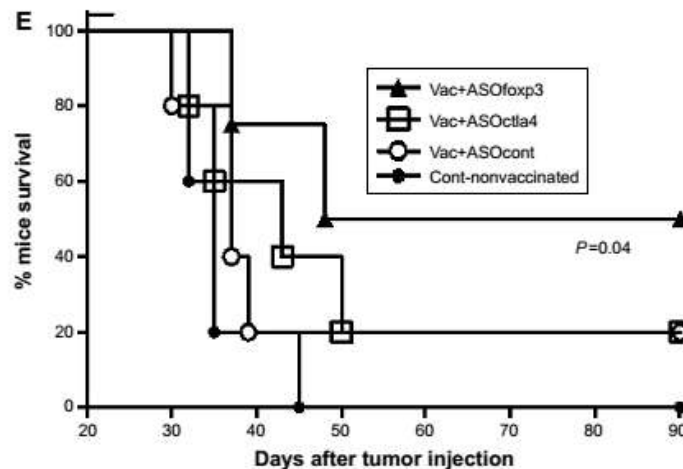


Figura 2. Curvas de supervivencia de los ratones tratados. Vac=vacunación con células tumorales productoras de GM-CSF. ASOs=oligonucleótidos antisentido anti-Foxp3/anti-CTLA4/Cont=control

### 3) DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO A DESARROLLAR

#### Objetivo principal:

Desarrollar oligonucleótidos antisentido (ASO) que permitan un silenciamiento génico eficaz de genes humanos implicados en la regulación negativa de la respuesta de activación inmunitaria, con el fin de reactivar y fortalecer de forma prolongada la respuesta inmunitaria antitumoral.

#### Objetivos concretos:

1. Desarrollar oligonucleótidos antisentido (con modificaciones 2-OMe-fosforotioatos) capaces de inhibir la expresión de moléculas mediadoras del freno de la respuesta inmunitaria anti-tumoral, tales como: Foxp3, CTLA4, PD1, PDL1
2. Estudiar la capacidad de entrada de los oligonucleótidos antisentido en la célula, utilizando líneas celulares que expresen el gen Foxp3, como KARPAS 299 (para Foxp3) y en células de melanoma humano (CTLA4).
3. Evaluar la toxicidad celular *in vitro* de cada uno de los oligonucleótidos antisentido diseñados.
4. Evaluar la eficacia de silenciamiento de los genes escogidos en las líneas celulares empleadas mediante la comparación en la expresión de los genes en las células tratadas con los oligonucleótidos antisentido específicos frente a células tratadas con oligonucleótidos antisentido de secuencia "scrambled", en las líneas celulares que expresan los genes de manera natural.

### **METODOLOGÍA**

#### Células

En el presente proyecto se utilizarán líneas celulares que expresen los genes diana que pretendemos silenciar (Karpas 299, melanoma). Las células se cultivan *in vitro* a 37°C y en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo RPMI 1640 (o DMEM) + 2mM Glutamina, suplementado con penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y suero bovino fetal (concentración final 10%). Las células se utilizan cuando alcanzan la fase exponencial de crecimiento. Todas las manipulaciones de los cultivos celulares se realizan en condiciones estándar de esterilidad, y periódicamente se realizan pruebas de contaminación por micoplasmas.

#### Diseño de oligonucleótidos antisentido

Se diseñarán oligonucleótidos antisentido complementarios a diferentes regiones del mRNA de los genes a estudio. Los oligonucleótidos antisentido utilizados tendrán modificaciones químicas 2-OMe-

fosforotioato que han demostrado conferir a los oligonucleótidos estabilidad frente a la degradación por parte de las nucleasas y facilitar su entrada en la célula. El diseño de los nucleótidos antisentido de uso humano se realizará en base a la secuencia y localización de los utilizados de manera eficaz en el ratón.

Existe un mecanismo natural endógeno que también controla la expresión de muchos genes a nivel de mRNA, la vía de los microRNAs (miRNAs). Estos miRNAs son oligonucleótidos de cadena corta que se unen a secuencias diana del mRNA de diferentes genes y reprimen su expresión a través de la vía Dicer de silenciamiento, que es la más eficiente. Tratando de sacar provecho de este mecanismo, se han diseñado estrategias terapéuticas que consisten en la síntesis de cadenas dobles de RNA cortas de interferencia (siRNA) con capacidad para unirse a secuencias diana de mRNA de genes concretos con el fin de silenciar la expresión de los mismos por esta misma vía Dicer. Aunque se trata de una estrategia realmente interesante, muestra las siguientes limitaciones: a) la cadena doble dificulta el acceso del siRNA al interior de las células y b) al tratarse de RNA, son susceptibles de ser degradados por las nucleasas circulantes, impidiendo así su inyección por vía sistémica. Con el fin de evitar estas limitaciones, recientemente han sido descritos los oligonucleótidos antisentido de 3ª generación (también llamados single strand siRNA o ss-siRNA, (22)) que presentan ventajas respecto a los anteriores. En el presente proyecto, se emplearán oligonucleótidos antisentido de cadena simple (ASO, ss-siRNA) porque pueden alcanzar las células con mayor facilidad sin ser degradados por las nucleasas circulantes, que se comprarán a la casa comercial Biomers.net GmbH.

#### Entrada del ASO en la células

Para evaluar la entrada de los oligonucleótidos antisentido (ASO, ss-siRNA) al interior de la célula se incubarán las líneas celulares con diferentes concentraciones de los oligonucleótidos antisentido marcados con el fluorocromo FAM y se realizarán citometrías de flujo a diferentes tiempos (1h, 2h y 24h). Para confirmar la localización intracelular de los oligonucleótidos se realizarán citometrías de flujo con imagen (citómetro AMNIS) o microscopía confocal.

#### Prueba de toxicidad/viabilidad celular

Se evaluará la viabilidad y/o toxicidad celular de los oligonucleótidos antisentido mediante la prueba de metabolización de ésteres de calceína (calcein-AM special packaging, Applied Biosystems) y mediante el test MTT.

#### Silenciamiento génico *in vitro* mediante oligonucleótidos antisentido

Se diseñarán oligonucleótidos antisentido para los genes humanos a estudio. Las líneas celulares se incubarán en presencia de los diferentes oligonucleótidos a diferentes tiempos (1-48 h) y concentraciones (10 nM-100 µM). Transcurrido el tiempo de incubación, se extraerá el RNA de las células y se evaluará el número de copias de mRNA de cada uno de estos genes mediante RT-PCR y PCR cuantitativa. La eficacia del silenciamiento se obtendrá comparando el número de copias de mRNA de estos genes en los grupos tratados con respecto a células tratadas con oligonucleótidos antisentido de secuencia "scramble" (control).

#### Cuantificación de DNA y mRNA de Foxp3 y CTLA4 mediante RT-PCR cuantitativa

Se aislará el RNA total a partir de las células utilizadas mediante un kit comercial (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA se obtendrá utilizando hexámeros aleatorios y la enzima retrotranscriptasa. Se utilizará RT-PCR y PCR cuantitativa para cuantificar el número de copias de DNA y mRNA de los genes. A partir de curvas dosis-respuesta obtendremos el número de copias de RNA por célula (índice de transcripción). Al comparar el índice de transcripción de los grupos control con aquellos a los que se les ha silenciado el gen obtendremos la eficacia del silenciamiento génico. Los experimentos se realizarán por duplicado con el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los juegos de "primers" se encargarán a la casa Thermo Life Scientific.

## **Tareas**

Entrada de ASO en las células. Se evaluará la entrada de ASO marcados con fluorescencia en células humanas

Desarrollo y evaluación de la eficacia de los diferentes ASO diseñados en el silenciamiento "in vitro" de los genes Foxp3 y/o CTLA4, PD1, PDL1.

El silenciamiento "in vitro" de los genes se llevará a cabo en las diferentes líneas celulares. Se probarán diferentes ASO para cada gen a diferentes concentraciones y se evaluará tanto la toxicidad celular como la eficacia de silenciamiento. La toxicidad/viabilidad celular se evaluará mediante la técnica de metabolización de ésteres de calceína y con el test de citotoxicidad MTT. La eficacia de silenciamiento génico de las diferentes moléculas, se evaluará mediante la comparación y análisis de número de copias de cDNA (por PCR cuantitativa) de los grupos tratados con cada una de las moléculas respecto al grupo control (tratado con oligonucleótidos antisentido de secuencia "scramble").

## **4) IMPACTO PREVISIBLE**

En la actualidad se han diseñado diferentes estrategias terapéuticas de inmunoterapia con el fin de silenciar genes implicados en la tolerancia inmunológica como CTLA4 y PD1. No obstante, hay otros elementos implicados en esta respuesta. En el melanoma se ha descrito una correlación entre una expresión elevada de Foxp3 y una mayor probabilidad de progresión tumoral. Sin embargo, no se ha diseñado ninguna estrategia farmacológica para bloquear su expresión en pacientes con cáncer. En este proyecto se aborda el silenciamiento del gen Foxp3 para reducir la producción de linfocitos Treg, que son los principales implicados en el desarrollo de la tolerancia del sistema inmunitario. Además, se pretende silenciar el gen CTLA4, que está directamente relacionada con el mecanismo de represión de la respuesta inmunitaria frente al tumor. El diseño de los nucleótidos antisentido se realiza en base a la secuencia y localización de los utilizados de manera eficaz en el ratón. El método propuesto es seguro y los oligonucleótidos antisentido son fácilmente caracterizables como medicamentos. Una de las principales novedades que queremos aportar es introducir el silenciamiento génico como alternativa al tratamiento con anticuerpos que ya se está empleando. Además, silenciando el gen Foxp3, fundamental para el desarrollo y función de los linfocitos T reguladores, conseguimos inhibir la expresión de este gen inmunosupresor que no puede ser bloqueado mediante anticuerpos, ya que se trata de una proteína intracelular a la que el anticuerpo no tiene acceso. A pesar de que en los últimos 4 años se han producido grandes avances en el tratamiento del cáncer, en la mayoría de casos la mejoría en la supervivencia se limita a unos pocos meses. Precisamos tratamientos más efectivos. En la actualidad, se están realizando ensayos clínicos en los que se combinan varias moléculas con actividad inmunoestimuladora (ipilimumab y nivolumab, (19)) para mejorar los resultados obtenidos con una sola de estas moléculas. En este ámbito, la búsqueda de sinergias mediante el silenciamiento de la expresión de los genes Foxp3 y CTLA4, y/o PD1, PDL1, se configura como una estrategia de gran interés porque permitiría silenciar la respuesta de inmunotolerancia frente al tumor a diferentes niveles.

### ***Potencial traslacional del proyecto propuesto***

En estos momentos, ya ha sido probada la eficacia de este procedimiento para silenciar el gen CTLA4 y Foxp3 en el modelo murino. El presente proyecto pretende, utilizando este conocimiento, trasladar esta estrategia terapéutica a la práctica clínica y, por ello, se van a realizar los experimentos en líneas celulares humanas, con el fin de cubrir la última etapa preclínica (obtención del medicamento para uso humano) antes de iniciar un posible ensayo clínico. Asimismo, se contempla estudiar dicho procedimiento para silenciar otros genes (tales como PD-1 y PD-L1) implicados en la respuesta de inmunotolerancia.

## 5) PLAN DE TRANSFERENCIA Y EXPLOTACIÓN

En el caso de que los resultados así lo indiquen, contamos con la colaboración de diferentes clínicos que estarían dispuestos a iniciar un ensayo clínico utilizando los oligonucleótidos antisentido diseñados en combinación con las estrategias terapéuticas vigentes en la actualidad.

## 6) EQUIPO INVESTIGADOR

El Profesor Salvador F. Aliño, Investigador principal del presente proyecto, cuenta con una dilatada experiencia en el campo de la terapia génica. Concretamente, ha trabajado en el desarrollo de vacunas antitumorales desde los años 90, habiendo conseguido resultados relevantes utilizando vacunas antitumorales preventivas en ratones (tesis doctoral de la Dra. María José Herrero), con tasas de supervivencia del 100% de los animales tratados. En el marco del Microcluster de Investigación de Terapia Génica No Viral, que el IP coordina, el grupo dispone de miembros de diferente ámbito y formación que permitirán el desarrollo completo del proyecto propuesto (principalmente los Doctores Luis Sendra y Antonio Miguel). Así pues, el equipo dispone de clínicos, biólogos moleculares y farmacólogos que vienen trabajando juntos en el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas tanto en la terapia génica de implementación como de silenciamiento, como así lo demuestra el registro de publicaciones en revistas indexadas del grupo.

## 7) PARTICIPACIÓN DE EMPRESAS

En estos momentos colaboramos con empresas y las OTRIs de nuestras instituciones, cuya actividad principal será la búsqueda de socios comerciales para el desarrollo y/o explotación del producto derivado.

## 8) ENTREGABLES

Los trabajos que se deriven del presente estudio serán enviados para su publicación en las principales revistas del área, tales como: Journal of Investigative Dermatology, Cancer Research, Gene Therapy, Human Gene Therapy, Molecular Therapy, Cancer Gene Therapy, J Gene Medicine, J Molecular Medicine, Vaccine, OncoTarget and Therapy.

Se solicitaría la concesión de proyectos en convocatorias autonómicas y nacionales

Se realizará la solicitud de propiedad intelectual del producto. Si los resultados fueran positivos, se contactará con empresas con interés en la explotación del mismo para realizar un ensayo clínico.

## 9) BIBLIOGRAFÍA RELEVANTE

1. Josefowicz SZ et al. Regulatory T cells: Mechanisms of ... Annu Rev Immunol. 2012; 30:531–564.
2. Ribas A et al. The future of cancer therapy... Clin Cancer Res 2014;20:4982–4.
3. Sznol M et al. Release the Hounds!...N Engl J Med 2015;372:374
4. Melero I et al. Immunostimulatory monoclonal...Nat Rev Cancer 2007;7: 95-106.
5. O'Day SJ et al. Targeting cytotoxic T-lymphocyte...Cancer 2007;110:2614 -27.
6. Cranmer LD, et al. The role of the CTLA4 blockade... Cancer Invest 2007;25:613-31.
7. Hodi S et al. Improved survival with ipilimumab ... N Engl J Med 2010;363:711-23.
8. Robert C et al. Ipilimumab plus Dacarbazine...N Engl J Med 2011;364:2517-26
9. Topalian SL et al. Safety, activity, and immune...N Engl J Med 2012;366:2443-54.
10. Robert C et al. Nivolumab in previously untreated...N Engl J Med 2015;372:320-30.
11. Robert C et al. Anti-programmed-death-receptor-1 t... Lancet. 2014;384:1109-17.
12. Bogdahn U et al. Targeted therapy for...Neuro Oncol. 2011;13:132-42.
13. Morse MA et al. Depleting regulatory T cells...Cancer Gene Ther. 2012;19:30-7.
14. Veldman C et al. Inhibition of the Transcription Factor Foxp3...J Immunol 2006;176:3215-22.
15. Kinali M et al. Local restoration of dystrophin expression ... Lancet Neurol 2009;8:918-28.
16. Siomi M. Short interfering RNA-mediated...Advanced Drug Delivery reviews 2009;61:668-71.
17. de Almagro MC et al. Polypurine hairpins directed...J BiolChem 2009;284:11579-89.
18. Hu J et al. Recognition of c9orf72 Mutant... Nucleic Acid Ther. 2017 Apr;27(2):87-94
19. Miguel A. et al. Silencing Foxp3 enhances...Oncotargets and Therapy 2017 Jan 23;10:503-514.

**20.** Franco-Molina MA et al. Silencing of Foxp3 delays ... OncoTargets and Therapy 2016, 9:243-253. **21.** Tsai BY et al. Lentiviral-mediated Foxp3 RNAi ... Gene Ther. 2010 Aug;17(8):972-9. **22.** Lima WF et al. Single-stranded siRNAs... Cell. 2012 Aug 31;150(5):883-94.

## **10) PRESUPUESTO**

Para esta fase de traslación de la estrategia de silenciamiento génico del modelo murino al humano, calculamos que se requerirán aproximadamente 50.000 euros para financiar el salario de un año de un investigador postdoctoral con dedicación exclusiva al proyecto (34.000 €), el diseño y construcción de los oligonucleótidos antisentido y el material para cultivo celular y análisis de los resultados (16.000 €) y entre 12 y 15 meses de trabajo.

