

Brevemente para situar nuestro trabajo transcribimos literalmente la hipótesis y objetivos que se propusieron para el proyecto “Nuevas Estrategias Terapéuticas para sPNET”

HIPÓTESIS

El manejo terapéutico de los tumores cerebrales infantiles de alto grado y específicamente los sPNET es subóptimo y se requieren nuevas estrategias terapéuticas que sean más efectivas pero que también tengan unos efectos secundarios asumibles. Los tratamientos actuales dejan unas secuelas cognitivas y hormonales devastadoras para estos niños que las hacen inaceptables sobre todo para los grupos de los menores de 2 años. El objetivo a largo plazo de nuestro laboratorio es mejorar la supervivencia y la calidad de vida de niños con tumores cerebrales de alto grado y específicamente con sPNET. El objetivo concreto de este proyecto es por un lado generar herramientas que permitan el estudio de estos tumores tanto a nivel genómico como biológico y de aplicaciones terapéuticas diseñadas específicamente para ellos. Por otro lado es evaluar la eficacia antitumoral del virus Delta-24-RGD. Nuestra racional se basa en que nuestro grupo ya ha demostrado la seguridad de este agente en la clínica y en algunos pacientes beneficio clínico. Esperamos poder generar evidencia preclínicas sólidas que nos permitan realizar un ensayo clínico en sPNETs.

Hipotetizamos que el Delta-24-RGD puede constituir una alternativa al abordaje terapéutico de los sPNET. Esta terapia nos permitirá reducir la dosis de quimioterapia y/o evitar la radioterapia por la tanto resultando en una mejora significativa del pronóstico y calidad de vida de los niños con sPNET.

Objetivos específicos:

Contrastaremos la hipótesis de central de este proyecto e intentaremos alcanzar el objetivo final de esta aplicación mediante los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Generar líneas celulares a partir de tejidos obtenidos de pacientes que presenten sPNET y desarrollar modelos murinos relevantes que permitan el estudio de la enfermedad.

Existen muy pocas líneas celulares y modelos murinos relevantes que permitan estudiar este tipo de tumores. Por ello un objetivo muy importante es generar las herramientas necesarias que nos permitan llevar a cabo tanto estudios de la biología del tumor como estudios de búsqueda de nuevas terapias.

Objetivo 2. Evaluar el efecto antitumoral como agente único del Delta-24-RGD in vitro e in vivo. Hipotetizamos que el Delta-24-RGD administrado localmente en el tumor demostrará tener un efecto antitumoral significativo en los sPNET ya que presentan aberraciones en la ruta del RB. Para

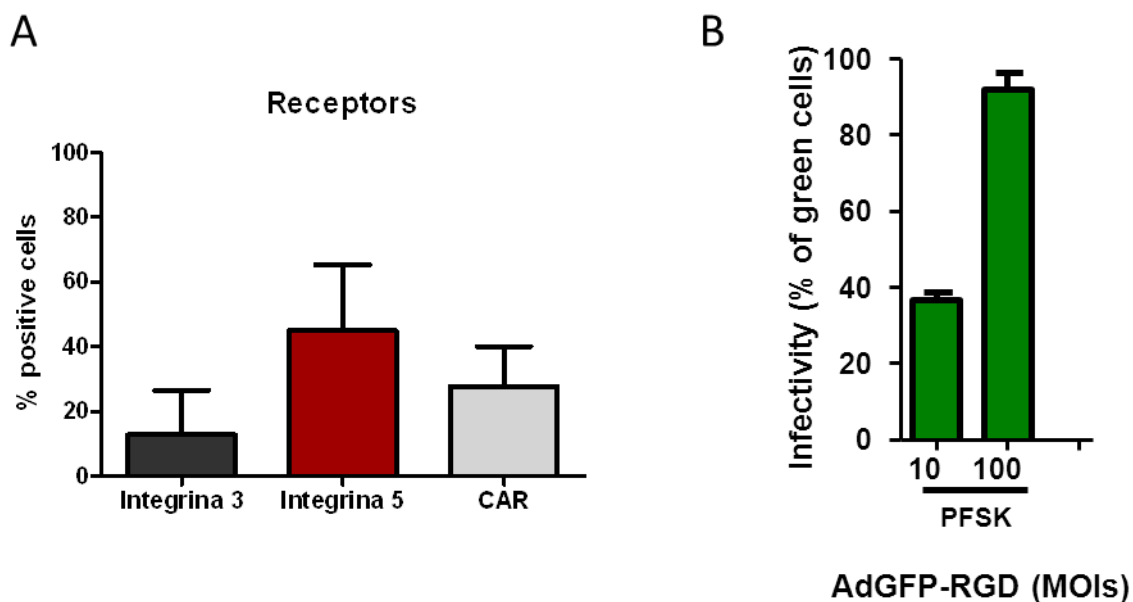
responder a esta pregunta realizaremos estudios in vivo e in vitro utilizando líneas establecidas comerciales y las establecidas en el objetivo 1.

Resultados

Durante estos meses hemos dedicado bastante esfuerzo para intentar conseguir bien de nuestros pacientes o de pacientes de otras instituciones el material necesario para generar líneas adicionales de PNET supratentoriales. Hemos conseguido que dos instituciones internacionales se comprometan a proporcionar células (John Hopkins, Baltimore, a través del Dr. Eric Raabe y el UT Texas Children, Houston, a través del Dr. Xiao Nan Li). Dentro del entorno Nacional tanto Cruces, como la Fé de Valencia (a través de Adela Cañete) y Monte Príncipe (a través de Blanca Lòpez Ibor y de Angel Ayuso) también se han comprometido a colaborar.

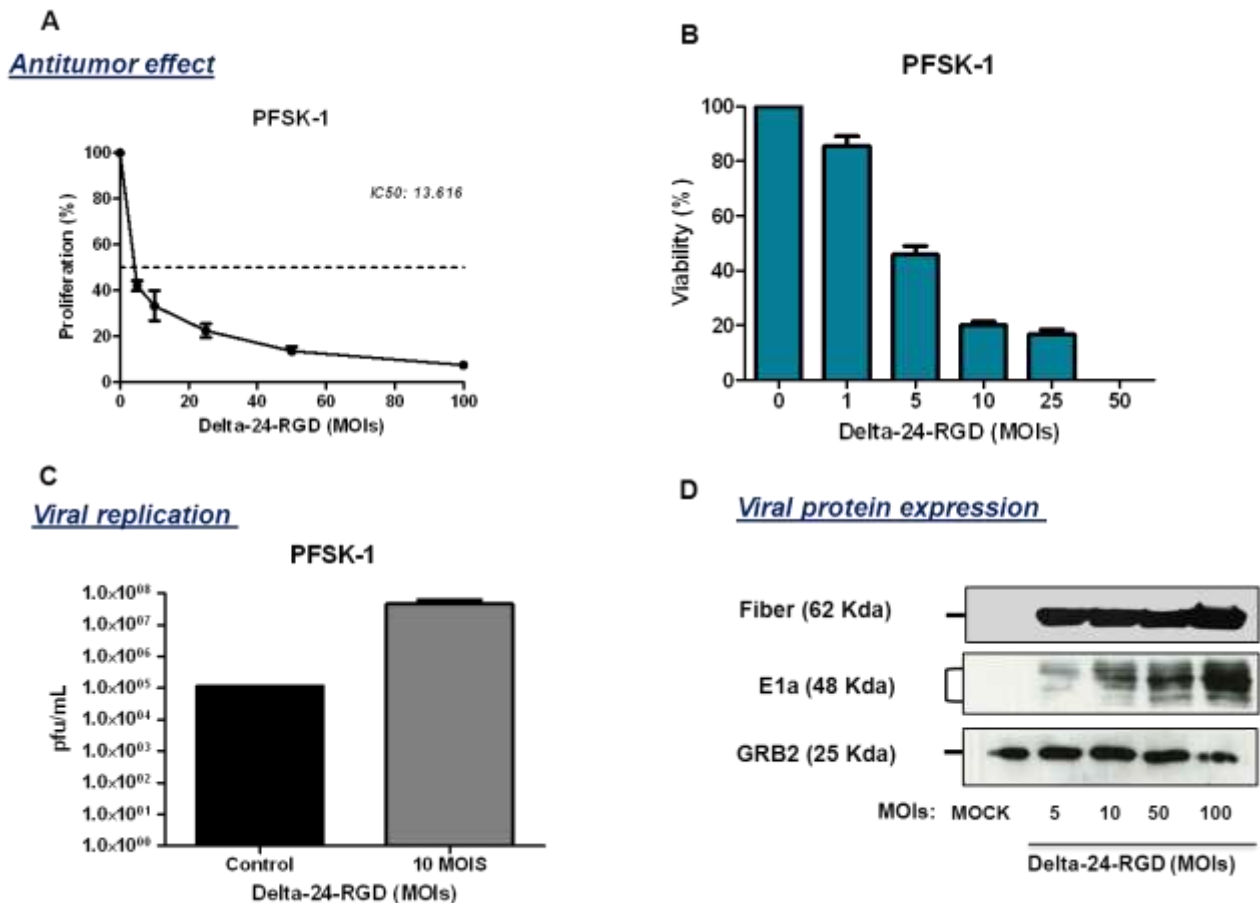
Para comenzar mientras conseguimos generar líneas de tumores primarios hemos adquirido dos líneas comerciales de PNET supratentoriales y hemos comenzado la experimentación con ellas.

Primeramente se procedió a analizar los receptores a través de los cuales el virus infecta para poder evaluar si estas células son susceptibles a la infección viral y por tanto a su efecto. Específicamente CAR (coxsackie adenovirus receptor; que es el receptor nativo del virus) y las integrinas α - β 3 y α - β 5 (Figure 1A)



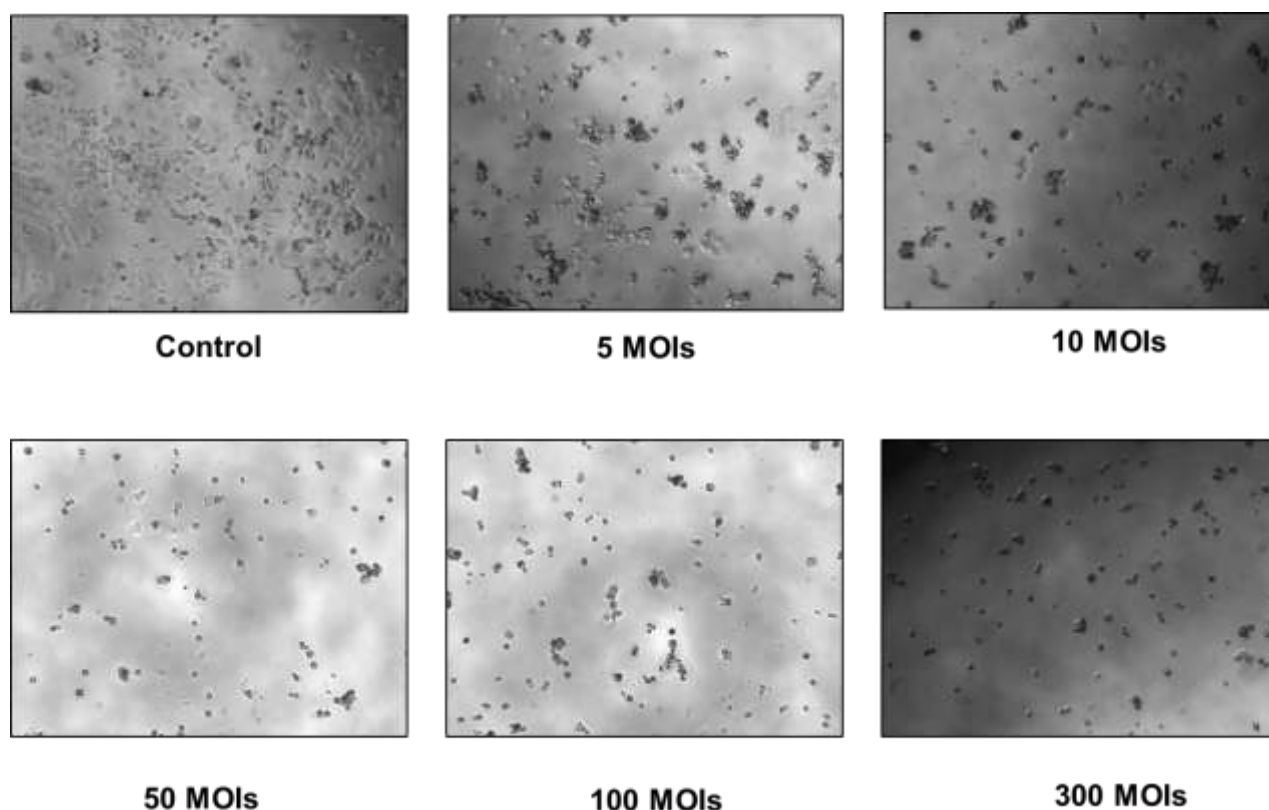
Observamos que esta línea expresaba tanto integrinas como CAR a diferentes niveles siendo la integrina 5 la más abundante. Seguidamente utilizando un virus no replicativo que expresa la proteína fluorescente GFP analizamos la capacidad de infectar del virus (Figura 1B). Observamos que a 10 MOIs (10 unidades de virus por cada célula) el virus era capaz de infectar alrededor del 40% de las células. Mientras que a 100 MOIs prácticamente el 100% de la población estaba infectada. Estos datos sugieren que realmente el virus es capaz de infectar de manera eficaz al menos esta línea de PNETs. Estamos extendiendo el análisis a la otra línea con la que actualmente contamos y esperamos tener pronto 2 líneas más que se ha comprometido a mandarnos del John Hopkins.

Seguidamente pasamos a evaluar el efecto antitumoral del virus en esta línea para ello analizamos tanto el efecto del Delta-24-RGD en la proliferación (Figura 2A) como en la viabilidad (Figura 2B).



Como se puede observar el virus demostró tener un efecto antitumoral dosis dependiente en la línea PFSK con un $IC_{50} = 13.6$ MOIs. Estos resultados son bastante prometedores. Seguidamente analizamos la replicación viral mediante un ensayo funcional donde se miden partículas virales (Figura 2C) y observamos que a 10 MOIs a 48hrs tenemos tres logaritmos de virus más que el control inoculado. Por último analizamos la expresión de proteínas virales relevantes tales como la Fibra y la E1A (Figura 2D). De nuevo observamos que el virus es capaz de expresar proteínas virales clave en la línea PFSK.

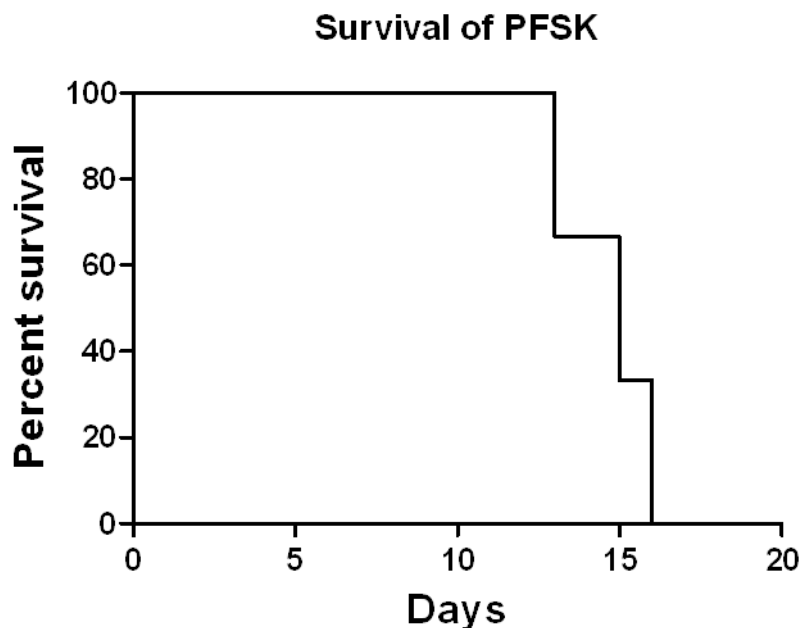
En la Figura 3 se puede observar la morfología de las células PFSK tratadas con el virus a concentraciones crecientes. Como reflejan las micrografías el efecto antitumoral del virus puede observarse incluso a concentraciones bajas como 5 MOIs.



Por último hemos iniciado los experimentos de tumorigenicidad in vivo con las líneas PFSK y la SK-PN-DW. Para ello se han implantado 1×10^6 células intracranalmente a ratones desnudos (N=6 por grupo). El experimento de la cinética de la PFSK ya está terminado y hemos visto que las células anidan en todos los ratones. Además para el día 16 todos los ratones ya han sido sacrificados porque mostraban síntomas asociados con el desarrollo de tumor (tales como parexia, inestabilidad, convulsiones etc). En la Figura 4 hemos representado la curva de supervivencia de estos ratones.

Pensamos que la cinética es demasiado rápida ya que casi no hay ventana para tratar a estos ratones y repetiremos los experimentos con 5×10^5 células. Idealmente nos gustaría tener una media de supervivencia de alrededor de 30 días que nos permita realizar los tratamientos.

El experimento con la SK-PN-DW está en marcha y terminará en las dos próximas semanas.



Por último y aunque en principio no estaba reflejado en el proyecto ha surgido la oportunidad de hacer un screening de drogas altamente relacionadas con la epigenética. Lo cual parece muy adecuado al hilo de los últimos artículos donde se ha caracterizado la genómica de estos tumores. Esto se va a realizar en colaboración con el Dr. Charles Keller (Fort Collins, Colorado) que dirige la institución Children's Cancer Therapy Development Institute. Ellos tienen unas placas ya prefabricadas con las drogas incluidas a varias concentraciones. Pensamos que este es un proyecto muy interesante y que puede darnos datos de drogas que ya están en la clínica o es fases de ensayo clínico que puedan ser posibles alternativas terapéuticas para los PNETs. En la siguiente hoja incluimos las drogas que se van analizar y la idea sería intentar tener al menos 6 líneas de PNETs.

Target

Drug

AKT1-3 AZD5363	NFkB BAY-11-7082	histone lysine demethylases L-a-Hydroxyglutaric acid
H3K27 histone demethylases JMJD3, UTX GSK-J4 HCl	DNA methylation Zebularine	histone-lysine methyltransferase BIX 01294
AURKA/B/C Tozasertib	DOT1L SGC0946	TORC1/2 INK 128
Kit, PDGFR, SFK, Bcr-Abl Dasatinib	EZH2 GSK126	HMGA2 Netropsin Dihydrochloride
BCL-2, BCL-XL, and BCL-W ABT-263	FAK PF 573228	Igf1r OSI-906
BRD JQ1	FGFR1-4 LY2874455	JAK2 Ruxolitinib
Casein Kinase 2 CX-4945	GSK3β BIO	Wee1 MK-1775
CCR5 Maraviroc	GSK3β LY2090314	KDM4 JIB-04
CDK1/2; MuSK Cdk1/2 inhibitor III	AMPKA Metformin HCL	nuclear export CRM1 Inhibitor III
CDK4/6 PD 0332991	HDAC6 (histone, protein targeting) Tubastatin A	Leukotriene B4 LY293111
CDKs Dinaciclib	Survivin YM155	LSD1 LSD1 Inhibitor IV
Chk1 LY2606368	HDACs Panobinostat	Notch RO4929097
CMV Ganciclovir		

MEK

Trametinib

Smo

LY2940680

MET, ALK

Crizotinib

SP1-4

Mithramycin A

mTOR

Sirolimus

Survivin

EM1421

mutant p53

APR-246

HDACs

Entinostat

Cox2

Celecoxib

HMG CoA reductase

Fluvastatin

MDM2

RO5045337

cAMP agonist

Forskolin

anti-folate

Pemetrexed

VEGFRs, c-KIT, PDGFR

Pazopanib

p38 MAPK

LY2228820

sarco/endoplasmic retic.

Ca²⁺ ATPase

Thapsigargin

pan-ERB

AZD8931

Wnt/porcupine

LGK974

PI3K, mTOR

BEZ235

PIM kinase

SGI-1776

PLK1

Volasertib

poly-kinase

PKC412

SMAC mimetic

LCL161