



DESCRIPCIÓN PROYECTO TRATAMIENTO DEL NEUROBLASTOMA CON INMUNOTERAPIA

Título: Combinación de nanomedicina e inmunoterapia para el tratamiento del neuroblastoma.

Equipos investigadores: Manuel Ramírez Orellana (Hospital Universitario Niño Jesús). Alejandro Baeza García (Universidad Politécnica de Madrid).

Resumen: Presentamos aquí un proyecto con el objetivo de desarrollar y evaluar en modelos preclínicos una nueva estrategia terapéutica contra el neuroblastoma. Aprovecharemos la capacidad de focalización in vivo de una nueva familia de moléculas desarrollada recientemente por nuestros equipos, combinada con la actividad de varias modalidades de inmunoterapia antitumoral. El objetivo es modular varias de las etapas reconocidas en el ciclo inmune del cáncer para inactivar los mecanismos protumorales y maximizar los efectos antitumorales a través de la acción localizada en el tumor de diversas estrategias, combinadas, tanto en mecanismos de acción como en el tiempo. Se usarán nanotransportadores seguros y efectivos para combinar diferentes modalidades de inmunoterapia, que dividiremos en estrategias basadas en el uso de moléculas y células. Ambos enfoques son compatibles y se utilizarán secuencialmente para lograr una respuesta terapéutica óptima. Realizaremos estudios preclínicos, como paso necesario para justificar, en caso de éxito y con los candidatos más eficaces y menos tóxicos, el traslado a la clínica. Una versión optimizada del modelo murino transgénico de NB TH-MYCN nos permitirá evaluar el efecto local y terapéutico de nuestras estrategias, individualmente y combinadas, sobre la inmunidad y el microambiente tumoral, y también su efecto sistémico, de manera importante, las posibles toxicidades asociadas. Esperamos que los resultados de la experimentación puedan responder las preguntas relevantes relacionadas con estas terapias en pacientes.



Introducción: El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en niños¹, y su forma metastásica se asocia con la tasa de mortalidad más alta en oncología pediátrica. Los tratamientos actuales utilizan medicamentos descubiertos hace más de 40 años y no han aumentado significativamente las tasas de supervivencia en las últimas décadas. Se necesitan nuevas estrategias para mejorar las tasas de curación y reducir la carga de toxicidades a largo plazo. Nuestro grupo de investigación se dedica desde hace más de una década a explorar nuevas estrategias para el cáncer infantil en etapas avanzadas, desarrollando terapias que pueden lograr efectos beneficiosos sin causar toxicidades asociadas, dado que los pacientes candidatos ya acumulan altas dosis de quimioterapia y radioterapia cuando la enfermedad llega a esta situación.

La línea de investigación más desarrollada se centra en Celyvir, un medicamento de terapia avanzada (MTA) que consiste en células mesenquimales que transportan un adenovirus oncolítico en su interior. Nuestros resultados en niños con cáncer que participaron en el primer ensayo clínico² y en un programa de uso compasivo³ han demostrado la seguridad de esta estrategia. También hemos demostrado beneficios clínicos en más del 25% de los pacientes³, debido a los mecanismos relacionados con la respuesta inmune antitumoral. Esto no es sorprendente porque actualmente la viroterapia oncolítica se considera una forma de inmunoterapia⁴. Celyvir es una estrategia para administrar viroterapia oncolítica selectivamente en aquellas áreas en las cuales el tumor primario y sus metástasis están creciendo.

Una línea diferente de investigación que hemos explorado ha sido el desarrollo de agentes de focalización específicos. En el caso de NB, la metadobenzilguanidina (MIBG), un análogo aromático de guatecinidina altamente retenido por neoplasias neuroendocrinas a través del transportador de norepinefrina (NET), puede usarse como tal agente de direccionamiento. Debido a su alta especificidad para NB, feocromocitoma y otros tumores neuroendocrinos, la forma de yodo radioactivo de MIBG se ha convertido en una herramienta para aplicaciones de diagnóstico y tratamiento. En colaboración con el grupo del Dr. Alejandro Baeza, hemos aprovechado esta característica para desarrollar una familia de análogos de MIBG (MABG), y hemos demostrado que estas moléculas son capaces de dirigir un elemento diagnóstico y / o terapéutico específicamente a NB in vivo^{5,6}. Estas moléculas son la base de una patente internacional⁷.

El proyecto que proponemos ahora pretende explotar la capacidad de localización in vivo de nuestros MABG combinados con la actividad de varias modalidades de inmunoterapia antitumoral, incluida la estrategia Celyvir. Para ello utilizaremos nanotransportadores diseñados específicamente para actuar de forma coordinada y combinada. El objetivo es impactar en varias de las etapas reconocidas en el ciclo inmune del cáncer⁸ para inactivar los mecanismos protumorales y maximizar los efectos antitumorales a través de la acción localizada en el NB de varias estrategias, combinadas tanto en mecanismos de acción como en el tiempo. En nuestro trabajo anterior, hemos demostrado experimentalmente la alta especificidad de nanopartículas de sílice mesoporosas (NP) decoradas externamente con MABG y administradas por vía intravenosa⁵ como agentes dirigidos específicamente contra NB.

De manera similar, los MABG pueden conjugarse con moléculas (no NP) de interés según el efecto deseado⁶. Esta estrategia biológicamente segura y efectiva se utilizará en el presente proyecto para combinar diferentes modalidades de inmunoterapia, que dividiremos en estrategias basadas en el uso de moléculas terapéuticas y estrategias celulares. Ambos



enfoques son compatibles y se utilizarán secuencialmente para lograr una respuesta terapéutica óptima. De esta manera pretendemos impactar en:

- Inducción de muerte inmunogénica de células tumorales⁹. Este término se refiere a la liberación de señales por parte de las células que sufren el proceso de muerte. Estas son las llamadas "señales de peligro"¹⁰: las células que sufren estrés, daños, insultos y mueren por mecanismos necróticos (en oposición a la apoptosis), emiten señales moleculares que inducen la maduración de las células dendríticas (DC), que capturan y presentan antígenos de las células dañadas a las células inmunes efectoras (linfocitos T), iniciando una respuesta inmune. La liberación de todas estas señales durante la muerte celular del tumor se puede lograr preferentemente con ciertos agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, antraciclinas y oxaliplatino, creando así un proceso que estimula una respuesta antitumoral por parte del sistema inmunitario. Nuestra propuesta es administrar NP decorados con MABG y cargados con Doxorubicina, para que la liberación del fármaco ocurra una vez que las células NB hayan internalizado los NP. Este control se logra cubriendo los poros del NP mesoporoso con una bicapa lipídica que previene la liberación prematura de la carga hasta que los NP son endocitados por las células tumorales.
- Eliminación de los mecanismos intratumorales de tolerancia inmune. El microambiente del tumor (TME) es el conjunto de elementos celulares y estromales que rodean las células neoplásicas. Uno de los elementos fundamentales son los macrófagos asociados a tumores (TAM). Estas células tienen un efecto protumoral mediado por la producción de diversas moléculas (EGF, IL-6, TNF), enzimas que degradan la matriz extracelular (MMP y catepsinas), agentes proangiogénicos (VEGF α , IL-8), proteínas inmunosupresoras (PDL1, IL-10, TGF β , ARG1). También causan el agotamiento de los linfocitos T a través de la arginasa y / o IDO^{11,12}. Por lo tanto, la eliminación de los TAM disminuirá la inducción de tolerancia por parte del TME. En estudios previos de nuestro laboratorio utilizando un modelo transgénico de NB, hemos confirmado que estos tumores están infiltrados principalmente por células mieloides, especialmente TAM, responsables de la producción de moléculas inmunomoduladoras detectadas en el estroma tumoral¹³. En pacientes que han recibido tratamiento con Celyvir, hemos descrito mecanismos de resistencia a la inmunoterapia virooncolítica en NB asociada con cambios protumorales en el TME¹⁴, tanto a nivel celular (aumento en la infiltración mieloides y disminución en la infiltración linfoides) y a nivel molecular (aumento de TGF β). Nuestra propuesta para atacar la TME protumoral del NB consiste en administrar NP decorados con MABG y cargados con ácido zoledrónico, de modo que la muerte de las células NB (como se explicó anteriormente) esté acompañada por la liberación de ácido zoledrónico en el TME. Esta molécula es tóxica para los TAM, que la incorporarán durante el proceso de fagocitosis de los desechos celulares.
- Terapia celular antitumoral: el desarrollo de la ingeniería genética ha permitido redirigir la especificidad de los linfocitos T mediante la transferencia de un receptor de antígeno quimérico (CAR). Un CAR prototípico consta de tres dominios fundamentales: a) extracelular para la unión al antígeno (utilizando fragmentos de cadena variable de un anticuerpo (scFv), sin restricción por HLA), intracelular para b) activación de células T (comúnmente a través del dominio citoplasmático CD3 ζ) y c) coestimulación (CD28 o 41BB), conectadas por regiones de bisagra y transmembrana¹⁵. En agosto de 2017 se



aprobaron las primeras células CAR-T en los Estados Unidos para tratar casos graves de leucemias linfoblásticas agudas en la infancia y la adolescencia¹⁶, un hecho que seguramente marcará el camino en el desarrollo de las próximas inmunoterapias celulares. Al mismo tiempo, el optimismo sobre las células CAR-T está acompañado por la preocupación por la seguridad, las toxicidades (muy importantes aquellas que afectan los tejidos no tumorales) y el desarrollo de resistencia. El uso de células CAR-T se basa en el reconocimiento por parte de CAR de un antígeno expresado en la membrana de las células tumorales. Este antígeno debe ser específico del tumor para evitar toxicidades en tejidos sanos, pero esta situación es prácticamente inexistente en los pacientes, de ahí los efectos adversos asociados con el tratamiento con células CAR-T. Nuestra propuesta explotará la existencia de anticuerpos anti-fluoresceína (anti-FITC), cuyas secuencias de scFv conocidas ya se han incorporado en CARs^{17,18}. De esta manera podremos dirigir el efecto citolítico de las células CAR-T-FITC específicamente hacia el NB mediante la administración previa de MABG conjugados con FITC.

Nuestra estrategia combinará todas estas herramientas. La administración inicial de los NP-MABG logrará la reducción de la carga tumoral, la activación de las CD, con una mayor presentación de antígenos tumorales, al mismo tiempo que se logrará una disminución de los TAM y sus mediadores. Un efecto similar se logra con la administración de Celyvir: destrucción de células tumorales con inflamación y activación de las CD, más la modulación de TME hacia un perfil menos tolerogénico¹³. La posterior administración de la estrategia de células MABG-FITC + CAR-T-FITC permitirá que su acción se desarrolle en un TME menos tolerante. Cada estrategia representa un enfoque diferente y juntas actúan en diferentes momentos del ciclo inmunológico del cáncer, lo que hace posible su combinación secuencial para optimizar el beneficio clínico. Además de estos efectos directos derivados de la administración de las diferentes estrategias terapéuticas, esperamos lograr una reactivación del efecto antitumoral de los linfocitos infiltrantes de tumores residentes en la NB, fundamentalmente por la disminución de los mecanismos tolerogénicos del TME. Estas células inmunoefectoras se agregarán al efecto terapéutico general que nuestra estrategia pretende lograr.

Esta propuesta realizará estudios preclínicos, como un paso necesario para justificar, en caso de éxito y con los candidatos más eficaces y menos tóxicos, el traslado a la clínica. Nuestro grupo optimizó el modelo murino transgénico de NB TH-MYCN¹⁹ para el estudio de los efectos inmunes asociados con Celyvir¹³. Este modelo se utilizará para el presente proyecto y nos permitirá evaluar el efecto local y terapéutico de nuestras estrategias, individuales y combinadas, sobre la inmunidad y la TME, y su efecto sistémico, en forma capital, las posibles toxicidades asociadas. Los modelos xenogénicos de NB tienen la importante limitación de cualquier sistema inmunodeficiente al estudiar el papel inmune en la respuesta antitumoral. Todos nuestros reactivos para experimentación en ratones se adaptan a este modelo (Celyvir con MSC murino y adenovirus oncolíticos murinos, CAR con secuencias murinas y linfocitos T murinos), de modo que los resultados de la experimentación podrán responder las preguntas relevantes relacionadas con estas terapias en pacientes.



Bibliografía:

- 1.- Matthay KK et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2:16078.
- 2.- Ramirez M et al. First-in-child trial of Celyvir (autologous mesenchymal stem cells carrying the oncolytic virus ICOVIR-5) in patients with relapsed and refractory pediatric solid tumors. *J Clin Oncol* 36, 2018 suppl; abstr 10543.
- 3.- Melen GJ et al. Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells. *Cancer Letters*. 2016; 371:161-170.
- 4.- Lichty BD, et al. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:559-567.
- 5.- Villaverde G et al. New targeting agent in selective drug delivery nanocarriers for treating neuroblastoma. *J. Mater.Chem. B*. 2015;3:4831-4842.
- 6.- Villaverde G et al. Molecular scaffolds as double targeting agents for the diagnosis and treatment of Neuroblastoma. *Angew Chem Int*. 2018. doi: 10.1002/anie.201811691.
- 7.- Baeza A, Villaverde G, Castillo R, Vallet-Regí M, Ramírez M, Melen G, Gonzalez A, Alfranca A. Ligands for enhanced imaging and drug delivery to neuroblastoma cells. EP18382207.1. 26-03-2018.
- 8.- Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39:1-10.
- 9.- Galluzzi L et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17:97-111.
- 10.- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296:301-305.
- 11.- Engblom C et al. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:447-462.
- 12.- Mantovani A et al. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:399-416.
- 13.- Franco-Luzón L et al. Systemic oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal carrier cells modulate tumor infiltrating immune cells and tumor microenvironment in mice with neuroblastoma. Enviado, en revision.
- 14.- Franco-Luzón L et al. Genetic and immune changes associated to neuroblastoma progression under the pressure of oncolytic therapy. Enviado, en revisión.
- 15.- Sadelain M et al. Therapeutic T cell engineering. *Nature*. 2017;545:423-431.
- 16.- www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm574058.htm.
- 17.- Kim MS et al. Redirection of genetically engineered CAR-T cells using bifunctional small molecules. *J Am Chem Soc*. 2015;137:2832-5.
- 18.- Ma JS et al. Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E450-8.
- 19.- Weiss WA et al. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J*. 1997;16:2985.
- 20.- García-García L et al. Optimizing culture conditions for Adoptive Cell Therapy with lymphocytes. 9th Biennial Congress of the Spanish Society for Gene and Cell Therapy, 14-16 March 2018, Palma de Mallorca, Spain.
- 21.- Zheng Z et al. Protein L: a novel reagent for the detection of chimeric antigen receptor (CAR) expression by flow cytometry. *J Transl Med*. 2012;10:29.



Hipótesis: Las terapias dirigidas contra neuroblastoma deberían proporcionar beneficios clínicos que minimicen las toxicidades sistémicas. Atacar el neuroblastoma con estrategias basadas en el sistema inmunológico puede provocar y amplificar los efectos al reactivar las células efectoras antitumorales residentes. Las estrategias combinadas dirigidas a diferentes etapas del ciclo inmunológico del cáncer pueden proporcionar efectos antitumorales aditivos. Todo esto se puede obtener combinando la capacidad de direccionamiento de los análogos de MIBG desarrollados por nosotros, con inmunoterapias de base molecular y / o celular con diferentes mecanismos de acción.

Objetivos: El objetivo principal de la propuesta es desarrollar una nueva estrategia antitumoral para niños con neuroblastoma basada en la capacidad específica de direccionamiento de los análogos de MIBG en combinación con inmunoterapias moleculares y celulares, que nos permitirán aplicar diferentes formas de inmunoterapia para afectar secuencialmente los diversos pasos del ciclo inmunitario del cáncer. Para ello, contemplamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estrategia CAR-T:
 - a. Diseñar y optimizar vectores virales que codifican receptores de antígenos quiméricos murinos que reconocen la molécula de fluoresceína (FITC).
 - b. Producir linfocitos T murinos con capacidad anti-FITC (células CAR-T-FITC) mediante terapia génica.

2. Nano estrategia:
 - a. Fabricar NP y MABG basados en la tecnología previamente patentada por el equipo de investigación:
 - i. NPs decoradas externamente por MABGs y cargadas internamente con un fármaco inmunogénico que induce la muerte (doxorubicina) y otro anti-TAM (ácido zoledrónico).
 - ii. MABG conjugado con FITC.

3. Validación individual *in vitro*:
 - a. Estudiar las capacidades funcionales de los NP en co-cultivos de células NB y TAM.
 - b. Estudiar la capacidad funcional de las células CAR-T-FITC en pruebas *in vitro* para elegir el mejor producto de terapia.

4. Validación individual *in vivo*:
 - a. Evaluar la toxicidad y el efecto antitumoral, en la infiltración inmune y en TME, de las NP en un modelo NB en un animal inmunocompetente.
 - b. Evaluar la toxicidad y el efecto antitumoral, en la infiltración inmune y en TME, de la estrategia de las células MABGFITC + CAR-T-FITC, en un modelo NB en un animal inmunocompetente.

5. Combinación de estrategias *in vivo*:
 - a. Evaluar la seguridad (toxicidad) y la eficacia MABG (efecto antitumoral, en la infiltración inmunológica y en TME) de la administración secuencial de las estrategias validadas en el objetivo 4, más la estrategia de Celyvir, en un modelo NB en un animal inmunocompetente.





Metodología:

Paquete de trabajo 1. Estrategia CAR-T:

a. Diseñar y optimizar vectores virales que codifican receptores de antígenos quiméricos murinos que reconocen la molécula de fluoresceína (FITC). Las secuencias de las regiones scFv de varios anticuerpos monoclonales anti-FITC (4420, 4M5.3 y E2), espaciadores de diferentes longitudes (corto, mediano y largo), dominio transmembrana CD8, dominio citoplasmático CD3 ζ y dominios de señalización CD28 y 4.1BB, se clonarán en plásmidos. Con estos plásmidos se generará un panel de vectores retrovirales para su posterior evaluación funcional. Las secuencias genéticas siempre serán de origen murino para evitar problemas de rechazo inmune en el modelo animal THMYCN. Los plásmidos con las secuencias de empaquetamiento y el esqueleto retroviral, así como los plásmidos con las regiones scFv se obtuvieron del laboratorio del Dr. Michael Jensen en el Seattle Children's Research Institute, donde el investigador principal realizó una estancia durante 2018, en el Programa de ingeniería de linfocitos T avanzado. Entregable 1a: un panel de vectores retrovirales que codifican receptores anti-FITC quiméricos.

b. Producir linfocitos T murinos con capacidad anti-FITC (células CAR-T-FITC) mediante terapia génica. Los linfocitos T se obtendrán del bazo de ratones THMYCN¹³ por separación inmunomagnética. Estos linfocitos T se infectarán con los vectores retrovirales mencionados anteriormente utilizando condiciones de cultivo in vitro que han sido optimizadas por el equipo de investigación²¹. Entregable 1b: sobrenadantes retrovirales y condiciones de transferencia de genes para producir células CAR-T-FITC murinas.

Paquete de trabajo 2. Fabricar NPs y MABGs:

La metodología utilizada para producir los ligandos sintéticos derivados de MIBG, tanto en conformaciones simples como en forma de Y, imitando los patrones de reconocimiento de los anticuerpos, así como la experimentación llevada a cabo para su validación experimental in vitro e in vivo, ha sido desarrollada previamente por los investigadores⁵⁻⁷. Todos estos compuestos serán sintetizados bajo la supervisión del Dr. Alejandro Baeza.

a. NPs decorados externamente con MABG e internamente cargados con anti-TAM y fármacos inmunogénicos que inducen la muerte. El sistema más simple consiste en un núcleo de sílice mesoporoso cubierto por una membrana lipídica decorada con los elementos de vectorización de MABG. Estas partículas se cargarán con doxorubicina y / o ácido zoledrónico. Entregable 2a: NP mesoporosos cargados con diferentes concentraciones (mg de fármaco / mg mesoporoso) de doxorubicina y / o zoledrónica.

b. MABG conjugado con FITC. Usaremos la fluoresceína como molécula conjugada con los análogos por diferentes conformaciones rígidas, por lo que la unión a los receptores de membrana NET ubicados en las células tumorales ocurre sin la internalización de estos receptores y las moléculas FITC permanecen en la capa externa de la membrana plasmática. Entregable 2b: una suspensión de moléculas MABG-FITC.

Paquete de trabajo 3. Validación individual in vitro:

a. Estudiar las capacidades funcionales de los NP en co-cultivos de células NB y TAM. Los macrófagos murinos se purificarán a partir de suspensiones de células de la médula ósea mediante métodos inmunomagnéticos. Las células NB murinas y los macrófagos se cultivarán in vitro en diferentes proporciones célula-célula. Se agregarán a los co-cultivos NP de sílice mesoporosa decoradas con MABG que contienen doxorubicina, ácido zoledrónico o ambos. Se llevarán a cabo experimentos de dosis-respuesta para optimizar las condiciones, incluidos los



controles. Ya hemos generado células NB murinas que expresan GFP, por lo que la fagocitosis de las células apoptóticas puede ir seguida de microscopía fluorescente y / o citometría de flujo. Los efectos de las diferentes NPs serán cuantificados por:

- Viabilidad celular y recuento absoluto de células tumorales.
- Viabilidad celular y recuento absoluto de macrófagos.
- Niveles de TGF β en los sobrenadantes.

El sistema de NP (agente único contra agente doble) que consiga el más alto nivel dentro de las células NB y la mayor eliminación de macrófagos será elegido a partir de los resultados de estas pruebas y validado en un modelo preclínico. Entregable 3b: protocolos para la evaluación cuantitativa de la capacidad funcional del sistema de NP / células del sistema de NP optimizado para la validación in vivo.

b. Estudiar la capacidad funcional de las células CAR-T-FITC en pruebas in vitro para elegir el mejor producto de terapia. En una primera fase, MABG-FITC se utilizará para optimizar la dosis y el tiempo de exposición necesarios para marcar células de neuroblastoma murino. A continuación, las células CAR-T-FITC generadas con los diferentes retrovirus se cultivarán conjuntamente con las células tumorales NB marcadas con FITC. La funcionalidad antitumoral se cuantificará mediante varias pruebas:

- Viabilidad celular y recuento absoluto de células tumorales.
- Viabilidad celular y recuento absoluto de células CAR-T-FITC.
- Proliferación celular de células CAR-T-FITC (ensayo de dilución CFSE).
- Producción de citoquinas (IL2, TNF α , IFN γ) por células CAR-T-FITC.
- Desgranulación y niveles de enzimas citolíticas (perforina, granzima) por las células CAR-T-FITC.

El CAR anti-FITC usado para producir las células CAR-T-FITC que brindan una mejor capacidad antitumoral entre todo el panel de retrovirus diseñado se seleccionará de los resultados de estas pruebas y se validará en un modelo preclínico. Entregable 3b: protocolos para la evaluación cuantitativa de la capacidad funcional de las células CAR-T-FITC / células optimizadas CART-FITC para la validación in vivo.

Paquete de trabajo 4. Validación individual in vivo:

El ratón transgénico THMYCN¹³ recapitula los principales aspectos genéticos y clínicos de NB con MYCN amplificado, y se ha utilizado durante los últimos 20 años en muchos estudios de biología básica e investigación preclínica. Es un modelo inmunocompetente, situación óptima para evaluar estrategias de inmunoterapia antitumoral. Este modelo se utilizará para validar el potencial antineuroblastoma del candidato elegido en los estudios in vitro.

a. Evaluar la toxicidad y el efecto antitumoral, en la infiltración inmune y en TME, de las NP en un modelo NB en un animal inmunocompetente. Primero, evaluaremos una administración de dosis única de dosis-respuesta del sistema NP elegido (punto 4.a anterior). Los grupos de ratones recibirán una dosis de NP por vía intravenosa. Los animales de control recibirán NP vacíos. La toxicidad sistémica se evaluará mediante el estudio de los parámetros celulares y bioquímicos (función hepática y renal) de una muestra de sangre periférica obtenida 24 y 120 horas después de la administración de NP. Los ratones serán sacrificados 120 horas después de la administración de NP, y se recuperará el tumor. El efecto del tratamiento sobre la progresión del tumor se cuantificará mediante la medición del volumen del tumor. Los efectos del tratamiento sobre la infiltración de células inmunes tumorales y TME se evaluarán mediante ensayos ya optimizados por el equipo de investigación, basados en citometría de flujo y RTqPCR¹³. Nos centraremos especialmente en el subconjunto TAM y las moléculas producidas por ellos. Es posible encontrar una dosis máxima tolerada (MTD) al final de estos experimentos de dosis única, y se utilizará en un experimento multidosis. Para esto, los grupos



de ratones recibirán una dosis semanal de NP IV durante 4 semanas. Los animales de control recibirán NP vacíos. La toxicidad sistémica se evaluará mediante el estudio de parámetros de células sanguíneas y bioquímicos (función hepática y renal) de una muestra de sangre periférica obtenida justo antes de cada administración de NP. Los ratones serán sacrificados 120 horas después de la última administración de NP, y se adquirirá el tumor. El efecto del tratamiento sobre la progresión del tumor se cuantificará mediante la medición del volumen del tumor. Los efectos del tratamiento en la infiltración de células inmunes tumorales y TME se evaluarán mediante ensayos ya optimizados por el equipo de investigación, basados en citometría de flujo y RTqPCR¹³. Entregable 4a: validación preclínica de un sistema de NP para la nanoimmunoterapia para el neuroblastoma.

b. Evaluar la toxicidad y el efecto antitumoral, en la infiltración inmune y en TME, de la estrategia de las células MABG-FITC + CAR-T-FITC, en un modelo NB en un animal inmunocompetente. Nuestro trabajo anterior ha demostrado que los NP decoradas con MABG se acumulan en el NB de los ratones en 48-72 horas⁵⁻⁷, por lo que es probable que las moléculas MABG-FITC se acumulen en la membrana plasmática de las células tumorales 48 horas después de la inyección IV. Primero evaluaremos una dosis única de administración de las moléculas MABG-FITC, los ratones se sacrificarán 48 horas después, los tumores se procurarán y analizarán para cuantificar la proporción de células tumorales marcadas con FITC. La dosis que proporciona el mayor etiquetado de células tumorales se utilizará en los experimentos de terapia. Para esto, los grupos de ratones recibirán la dosis elegida de los análogos IV de MABG-FITC. Dos días después, recibirán una dosis única (1 millón por kilo) de células CAR-T-FITC, también IV. Los posibles efectos adversos (síndrome de liberación de citoquinas, toxicidades extra-tumorales) se evaluarán mediante el estudio de supervivencia y el análisis patológico de los animales al final de los experimentos. Buscaremos especialmente signos y síntomas que sugieran un síndrome de liberación de citoquinas dentro de la primera semana de la terapia CAR-T-FITC. Todos los animales se muestrearán el día +7 para cuantificar los niveles de citoquinas circulantes y también las células CAR-T-FITC circulantes. Los ratones se sacrificarán cuando muestren signos de enfermedad tumoral y el tumor se recogerá para estudio. El efecto del tratamiento sobre la progresión del tumor se cuantificará mediante la medición del volumen del tumor. Los efectos del tratamiento sobre la infiltración de células inmunes tumorales y TME se evaluarán mediante ensayos ya optimizados por el equipo de investigación, basados en citometría de flujo y RTqPCR¹³. Usaremos una tinción anti-proteína L para evaluar los linfocitos infiltrantes CAR-T y no-CAR-T por separado²². Podemos considerar un experimento multidosis si encontramos toxicidades menores o ninguna y regresión parcial del tumor en la configuración de dosis única descrita aquí. Se analizarían las administraciones de células MABG-FITC más CAR-T-FITC cada dos semanas, y se seguiría a los ratones como se explica para el experimento de dosis única. Entregable 4b: validación preclínica de una estrategia de células CAR-T para la nanoimmunoterapia para el neuroblastoma.

Paquete de trabajo 5. Combinación de estrategias in vivo:

a. Evaluar la seguridad (toxicidad) y la eficacia (efecto antitumoral, en la infiltración inmunológica y en TME) de la administración secuencial de las estrategias validadas en el objetivo 4, más la estrategia de Celyvir, en un modelo NB en un animal inmunocompetente. Nuestro objetivo final es combinar todas las estrategias mencionadas anteriormente en un protocolo terapéutico antiNB. Los experimentos del objetivo 4 nos mostrarán la dosis optimizada y el tiempo de cada estrategia. En experimentos independientes, trataremos grupos de ratones con la administración secuencial de NP, Celyvir murino y CAR-T-FITC, y evaluaremos la seguridad y la eficacia como se explicó anteriormente. Las terapias individuales servirán como controles. La configuración de dosis única o múltiple se elegirá entre los



mejores resultados obtenidos en el objetivo 4. Entregable 5a: validación preclínica de un protocolo de estrategias combinadas de nanomedicina e inmunoterapia para el tratamiento del neuroblastoma.



Plan de trabajo

Los diferentes pasos de desarrollo del proyecto han sido numerados en la sección de metodología. El grupo tiene experiencia previa que justifica la propuesta experimental incluida en este informe, en términos de la estrategia de nanomedicina, la estrategia de inmunoterapia y el modelo animal de neuroblastoma. Esta experiencia previa aporta credibilidad a la propuesta actual.

Los objetivos concretos han sido diseñados como paquetes de trabajo independientes pero vinculados entre sí, de modo que los resultados de uno de ellos supongan el comienzo del siguiente. Los entregables de cada paquete de trabajo son la base a partir de la cual se comienza a desarrollar el siguiente paquete de trabajo, de modo que los objetivos indicados se desarrollen progresivamente.

Todos los miembros del equipo de investigación participarán en los paquetes de trabajo de acuerdo con su experiencia. El investigador predoctoral estará supervisado principalmente por el Dr. Ramírez, el Dr. González Murillo y el Dr. Melen, y participará en las tareas experimentales de todos los paquetes de trabajo: producción de retrovirus y sobrenadantes, purificación de macrófagos y linfocitos T, generación de CAR Células T-FITC, co-cultivos in vitro y experimentación en el modelo animal. La fabricación de las moléculas NP y MABG-FITC será supervisada por el Dr. Alejandro Baeza, investigador principal del proyecto coordinado por el Dr. Ramírez. Dra. Ana Lourdes Luís participará en la experimentación con el modelo murino, como es habitual en estos proyectos del grupo. El análisis histológico de las muestras murinas para evaluar la posible toxicidad de los tratamientos será realizado por la Dra. Isabel Colmenero.

Todas las tareas propuestas se llevarán a cabo en los laboratorios de investigación del Servicio de Oncohematología del Hospital Niño Jesús, a excepción de la experimentación con animales, que se llevará a cabo en la Instalación de Animales del CIEMAT en Madrid, el centro donde normalmente realizamos estos experimentos in vivo.

Cronograma

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
WP1	Diseñar y optimizar vectores virales que codifican receptores de antígenos quiméricos murinos que reconocen la molécula de fluoresceína (FITC).																																						
	Producir linfocitos T murinos con capacidad anti-FITC (células CAR-T-FITC) mediante terapia génica.																																						
WP2	Fabricar NPs y MABGs.																																						
WP3	Estudiar las capacidades funcionales de las NP en co-cultivos de células NB y TAM.																																						
	Estudiar la capacidad funcional de las células CAR-T-FITC en pruebas in vitro para elegir el mejor producto de terapia.																																						
WP4	Evaluar la toxicidad y el efecto antitumoral, en la infiltración inmune y en TME, de NP en un modelo NB en un animal inmunocompetente																																						
	Evaluar la toxicidad y el efecto antitumoral, en la infiltración inmune y en TME, de la estrategia de las células MABG-FITC + CAR-T-FITC, en un modelo NB en un animal inmunocompetente																																						
WP5	Evaluar la seguridad (toxicidad) y la eficacia (efecto antitumoral, en la infiltración inmunológica y en TME) de la administración secuencial de las estrategias validadas en el objetivo 4, más la estrategia de Celyvir, en un modelo NB en un animal inmunocompetente.																																						





Relevancia de la propuesta de investigación clínico-translacional.

Este proyecto tiene un objetivo traslacional claro: surgió de la observación de un problema clínico particularmente importante (la falta de opciones curativas para el neuroblastoma metastásico) y usará los recursos de investigación básica y preclínica (nanotransportadores, estrategias de inmunoterapia, modelos animales de enfermedad) para intentar de nuevo transferir los nuevos descubrimientos de la investigación experimental a la práctica clínica. Nos basamos en el trabajo previo realizado por nosotros, ya publicado y patentado, lo que da credibilidad a la propuesta actual. Prevemos 3 posibles logros de translación si los resultados son exitosos:

1. Prueba de concepto, toxicidad y eficacia de la información en un modelo preclínico. Toda esta información se puede adjuntar al expediente de Producto En Investigación (PEI) cuando se solicite la aprobación de un ensayo clínico. La colaboración del Dr. Ramírez con el Dr. Jensen en Seattle debería facilitar el proceso de aprobación de dicho ensayo clínico para niños con neuroblastoma.
2. Tener un modelo animal en el que estudiar los efectos del TME en las células CAR-T, un aspecto poco estudiado, pero de gran importancia en el campo.
3. Ampliar el alcance de la propiedad intelectual ya protegida. Este hecho le daría a nuestra institución una posición más sólida al negociar la licencia de la patente para futuros desarrollos. Además de la patentabilidad, las estrategias descritas aquí son susceptibles de un desarrollo clínico posterior, que podría ser de interés para las compañías biofarmacéuticas.