

TÍTULO: Estudio de los mecanismos de acción de la terapia con Celyvir en tumores infantiles: hacia la optimización de los resultados clínicos.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Manuel Ramírez Orellana

CÓDIGO: PI13/02487

DURACIÓN: 3 AÑOS

IMPORTE CONCEDIDO: 92.565 euros

RESUMEN

Nuestro equipo de investigación ha desarrollado una nueva estrategia de tratamiento para tumores sólidos infantiles refractarios: Celyvir, células mesenquimales autólogas infectadas con un adenovirus oncolítico. En este proyecto nos proponemos mejorar los resultados de la terapia con Celyvir, mediante un mayor conocimiento de la respuesta inmune, tanto antiadenoviral como antitumoral. Para ello validaremos un modelo murino de neuroblastoma espontáneo en animal inmunocompetente, en el que usaremos un adenovirus murino oncolítico. Con estas herramientas podremos estudiar aspectos importantes de la terapia que ya estamos realizando en niños en un ensayo clínico: respuesta inmune antiadenoviral y efecto de las células mesenquimales en la misma, posibilidad de agotar dicha respuesta antiadenoviral para aumentar el efecto oncolítico, cambios inducidos por Celyvir en los linfocitos infiltrantes de los tumores, posibilidad de explotar estrategias de inmunoterapia celular para consolidar los efectos del tratamiento con Celyvir. Esperamos que los resultados de este proyecto sean transferidos en los siguientes protocolos que apliquemos a los pacientes que reciban versiones mejoradas de Celyvir.

OBJETIVOS ALCANZADOS

1. Poner a punto un modelo murino de neuroblastoma espontáneo en el que se puedan reproducir las condiciones más importantes de la terapia con Celyvir:

Como ya se ha apuntado anteriormente, hemos establecido una colonia de ratones THMYCN en el animalario del CIEMAT, centro donde este grupo realiza habitualmente la experimentación animal. Las esferas viables obtenidas de neuroblastomas primarios de animales transgénicos, cedidas por el Dr. Louis Chesler, han sido utilizadas para estudiar la capacidad oncolítica del virus dIE102 en experimentos ex vivo. Además hemos usado dichas células de neuroblastomas para implante en ratones con el mismo fondo genético que el modelo transgénico. Este modelo ha sido utilizado como alternativa a los animales transgénicos. En paralelo se ha producido un lote del adenovirus oncolítico murino dIE102, para experimentos de infección en células mesenquimales. Se ha procedido a la purificación del producto para contar con un stock de alta titulación.

2. Comparar los TILs de los tumores de este modelo animal con los TILs de muestras primarias humanas de neuroblastoma: Durante el año 2016 un miembro del equipo investigador realizó una estancia en el laboratorio de la Dra. Rosa Noguera, del Hospital Clínico Universitario de Valencia, para elaborar "tissue microarrays" (TMA) a partir de las muestras primarias de ratones transgénicos. Además se comenzó a analizar dichos TMA aplicando la tecnología desarrollada por el equipo de la Dra. Noguera para estudiar componentes del estroma tumoral (Oncotarget 2016; 12: 19935). Estos estudios aún no han finalizado.

3. Caracterizar los cambios inducidos por Celyvir en los linfocitos infiltrantes de tumor: En experimentos en el modelo animal hemos comparado la infiltración inmune de tumores de ratones tratados con Celyvir murino versus la de ratones no tratados. Conocemos a fecha de hoy los cambios asociados al tratamiento, en cuanto a los niveles de infiltración totales como a la contribución relativa de subpoblaciones de células de la inmunidad innata (células NK, células dendríticas, células mieloides supresoras, macrófagos asociados a tumor) como de la inmunidad adaptativa (linfocitos T, y subpoblaciones). También hemos cuantificado el efecto sobre los niveles de expresión génica de mediadores de tolerancia relacionados con el microambiente tumoral.

4. Estudiar la respuesta inmune antiadenoviral durante el tratamiento con Celyvir: Hemos recogido muestras de sangre de los ratones tratados y no tratados con Celyvir murino, a partir de las cuales cuantificaremos el título de anticuerpos antiadenovirus mediante el kit EZ-Spot de Charles River. Estos ensayos están pendientes.

5. Determinar la mejor fuente de células para terapia celular adoptiva después de Celyvir, comparando los linfocitos infiltrantes de tumor "in situ" versus los linfocitos movilizados a sangre periférica: Hemos abordado este punto a dos niveles:

a) Los TILs recuperados de los tumores (tratados y no tratados) se han cocultivado con neuroesferas y se ha cuantificado la capacidad proliferativa de los mismos mediante dilución de CFSE y la capacidad de producción de interferón gamma.

b) Hemos analizado mediante "next generation sequencing" el repertorio de TCR-beta (Adaptive Biotechnologies) muestras de tumor y de sangre periférica, en animales que fueron o no movilizados según protocolo clínico (con GCSF).



"Una manera de hacer Europa"