

## Inmunoterapia en neuroblastomas pediátricos: Tratamiento dirigido a las células tumorales iniciadoras de la metástasis

Antonio Pérez Martínez, María Vela Cuenca

**Duración:** 3 años

**PALABRAS CLAVE:** Cáncer infantil; Neuroblastoma; Metástasis; Inmunoterapia; Terapia celular; Anticuerpos terapéuticos; Traslacional

### RESUMEN:

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido más común en niños. Los pacientes con enfermedad metastásica presentan una tasa de supervivencia a 5 años <30% con los esquemas de tratamiento actuales. Por tanto, nuevas estrategias terapéuticas resultan imprescindibles. La sobreexpresión del receptor de quimioquinas CXCR4 en NB favorece el desarrollo del tumor primario y su capacidad de generar metástasis a distancia. Recientemente, se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal (ulocuplumab) que bloquea la interacción entre CXCR4 y su ligando, inhibiendo la señalización responsable de la proliferación y migración celulares. Nuestro equipo de investigación ha descrito cómo las células Natural Killer (NK) presentan una elevada actividad citotóxica frente a células iniciadoras del tumor CXCR4+ y disponemos de datos que demuestran la eficacia antitumoral de la terapia combinada NK/ulocuplumab en células de sarcoma. Pretendemos demostrar que dicho efecto se da también sobre las células de NB responsables de la metástasis y la recaída. Se analizará *in vitro* la capacidad de esta inmunoterapia combinada para inhibir la migración e invasión de las células de NB CXCR4+ y de eliminar selectivamente a las células iniciadoras de tumor. Adicionalmente, se empleará un modelo ortotópico de NB en ratones inmunodeficientes para evaluar *in vivo* su efecto sinérgico antitumoral y anti metastásico. Los resultados avalarían el desarrollo de un ensayo clínico siguiendo este esquema pionero de tratamiento.

### ABSTARCT:

#### Immunotherapy in pediatric neuroblastomas: Treatment directed to metastasis initiating cells

Neuroblastoma (NB) is the most common solid tumor in children. Patients with metastatic disease have a 5-year survival rate <30% with current treatment regimens. Therefore, new therapeutic strategies are essential. Overexpression of the CXCR4 chemokine receptor in NB favors the development of the primary tumor and its ability to generate distant metastases. Recently, a monoclonal antibody (ulocuplumab) that blocks CXCR4 interaction with its ligand has been developed, able to inhibit cell proliferation and migration signalling. In addition, our research team has described that Natural Killer (NK) cells show high cytotoxic activity against CXCR4+ tumor initiating cells and we have data showing antitumor efficacy of the combined NK/ulocuplumab therapy in sarcoma cells. We intend to demonstrate that this effect also occurs on the NB cells responsible for metastasis and relapse. The ability of the combined therapy to inhibit the migration and invasion of CXCR4+ NB cells and to selectively remove tumor initiating cells will be analyzed *in vitro*. Additionally, an orthotopic model of NB in immunodeficient mice

will be used to evaluate *in vivo* the anti-tumoral and anti-metastatic synergistic effect. The results would support the development of a clinical trial following this pioneering combined treatment scheme.

## ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

A pesar de los progresos alcanzados en el tratamiento del NB en niños, adolescentes y adultos jóvenes, la aparición de metástasis así como la recaída conllevan una tasa de supervivencia inferior al 30%, sin que dicho dato haya experimentado ninguna mejoría en las últimas décadas (1).

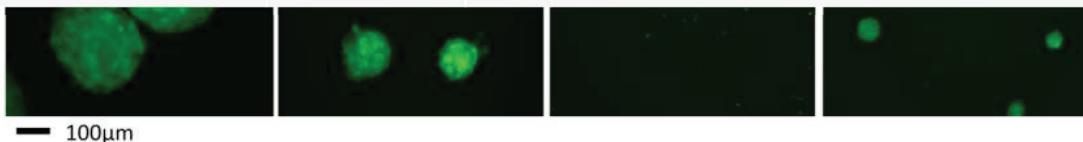
Durante los últimos años, las quimioquinas y su interacción con sus correspondientes receptores han demostrado jugar un papel fundamental en los mecanismos del desarrollo del cáncer y la aparición de metástasis (2). Los niveles de expresión de las quimioquinas y sus receptores se alteran en las células malignas. Es el caso de CXCR4, el receptor de quimioquinas más frecuentemente sobreexpresado en las células tumorales. La interacción de CXCR4 con su ligando, CXCL12, activa una cascada de señalización celular que promueve la supervivencia, proliferación, adhesión y migración de las células tumorales que lo expresan. Todo ello puede desembocar en la recaída del tumor primario, y en el incremento de la capacidad de generar metástasis a distancia en órganos en los que se secreta el ligando, especialmente médula ósea (3,4). Un trabajo reciente, ha hallado una asociación significativa entre la expresión de CXCR4 y una menor tasa de supervivencia y mayor índice de aparición de metástasis en NB (5).

El equipo del Dr. Khune (Bristol-Myers Squibb) ha desarrollado recientemente un anticuerpo monoclonal (mAb), ulocuplumab/MDX-1338, a partir de la inmunización de ratones transgénicos para los genes de las inmunoglobulinas humanas mediante transducción de células de ratón transfectadas con CXCR4 humano. Ulocuplumab es un mAb de alta afinidad, que bloquea CXCR4 e impide la interacción con su ligando CXCL12, inhibiendo los mecanismos celulares a través de los cuales esa interacción promovería la proliferación y migración celular (6). Actualmente, ulocuplumab/MDX-1338 se está utilizando en ensayos clínicos para el tratamiento de hemopatías malignas en la edad adulta, fundamentalmente leucemia linfática crónica y mieloma múltiple (NCT02305563, NCT02666209, NCT01359657). Su efecto antitumoral está producido por la movilización celular de las células de mieloma desde la médula ósea o por inducción directa de apoptosis, no mediada por citotoxicidad celular, ya que se trata de un anticuerpo de isotipo IgG4 (7).

Nuestro equipo de investigación está especializado en la terapia con células Natural Killer para el tratamiento del cáncer infantil de pronóstico más desfavorable. Actualmente, lideramos tres ensayos clínicos usando inmunoterapia con células NK activadas y expandidas en combinación con quimioterapia, en pacientes con leucemia aguda refractaria o en recidiva, linfoma o mieloma múltiple (**Tabla 1**). Dichos ensayos están confirmando un perfil de elevada seguridad de la infusión de NKAE (8,9). Asimismo, hemos descrito el papel fundamental de la interacción del receptor NKG2D de las células NKAE con sus ligandos en las células del sarcoma, favoreciendo su actividad citotóxica frente a ellas. Hemos observado que dicha toxicidad es incluso mayor sobre las células iniciadoras de tumor (TICs) que expresan CXCR4 (**Figura 1**) (10).

**Tabla 1. Ensayos clínicos empleando células NKAE para el tratamiento del cáncer liderados por el Dr. Antonio Pérez Martínez**

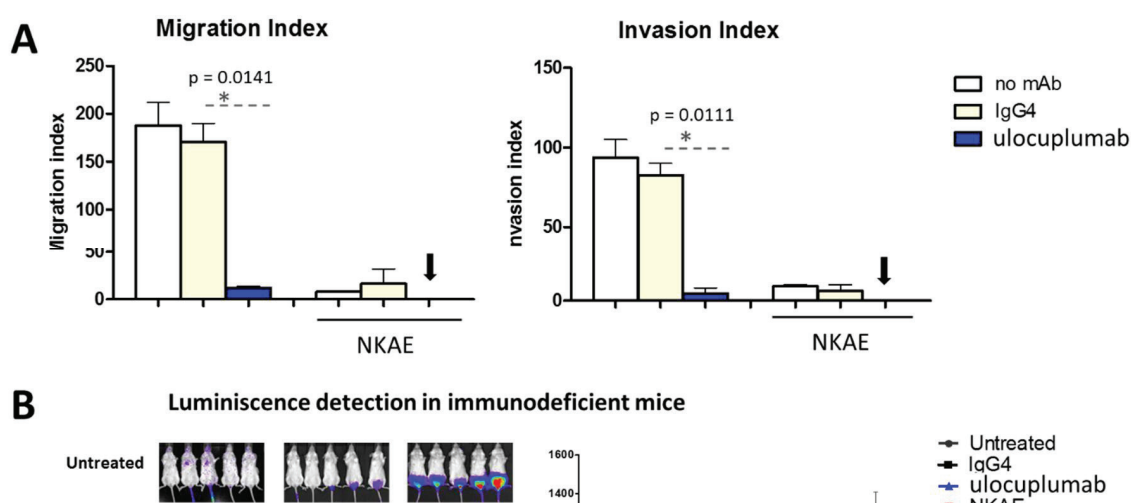
Investigador Principal (Promotor)	EudraCT NCT Fecha inicio Estado actual	Fase	Título
Dr. Antonio Pérez Martínez (Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid)	2012-000054-63 NCT01944982 2013 TERMINADO	I/II	Terapia de rescate con quimioterapia y células Natural Killer en casos pediátricos de <b>leucemia/linfoma linfoblástico de células T refractaria o en recidiva (HNJ-NKAES-2012)</b>
Dr. Joaquín Martínez López & Dr. Antonio Pérez Martínez (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid)	2012-000514-11 NCT02481934 2013 COMPLETADO	I	Ensayo clínico de células NK autólogas expandidas y activadas para el tratamiento del <b>mieloma múltiple (NK-VS-MM)</b>
Dr. Antonio Pérez Martínez (Hospital Universitario La Paz, Madrid)	2012-005146-38 NCT02074657 2013 COMPLETADO	II	"LANK-2": Inmunoterapia con células NK activadas y expandidas junto con quimioterapia de rescate en niños, adolescentes y adultos jóvenes con <b>leucemia aguda refractaria o en recidiva (LYDIA)</b>
Dr. Antonio Pérez Martínez (Hospital Universitario La Paz, Madrid)	2015-001901-15 NCT02763475 2016 EN CURSO	II	Infusión de células Natural Killer como terapia de consolidación en niños y adolescentes con <b>leucemia mieloide aguda (NKCell_LMA_2015)</b>
Dr. Antonio Pérez Martínez (Hospital Universitario La Paz, Madrid)	2016-003578-42 2018 TRÁMITE APERTURA	II	Ensayo Clínico Fase I/II, multicéntrico, abierto, de infusión de células NK activadas para el tratamiento de niños, adolescentes y adultos jóvenes con <b>sarcomas (SANKOMA)</b>



**Figura 1. Las células NKAЕ eliminan las células iniciadoras de tumor (TICs) mediante la interacción NKG2D/NKG2DL.** Células de osteosarcoma MG-63 GFP+ se co-cultivaron durante 4 o 24h con células NKAЕ a un ratio Efector:Diana 10: 1, se filtraron y se cultivaron en medio de formación de esferas. Tras 24 h, las células MG-63 GFP+ vivas restantes son incapaces de crecer como esferas. Sin embargo, cuando las células NKAЕ son previamente tratadas con un anticuerpo bloqueante NKG2D, sí crecen como esferas. *Pérez-Martínez et al. Cancer letters (2015).*

En el presente estudio pretendemos evaluar la sinergia de la terapia celular con NKAЕ y la inmunoterapia con el mAb ulocuplumab a la hora de impedir la aparición de metástasis y la recaída en NB. El fundamento sería una eliminación selectiva de las células TIC de NB por parte de las células NKAЕ combinada con el bloqueo del eje CXCR4/CXCL12 por parte de ulocuplumab. Dicho bloqueo inhibiría por un lado la migración dirigida de las células tumorales hacia órganos distantes, así como el *homing* en la médula ósea de las células NKAЕ (altamente CXCR4+), manteniéndolas en circulación y mejorando su capacidad citotóxica *in vivo*.

Resultados preliminares de nuestro laboratorio ya han demostrado un efecto sinérgico de la combinación de NKAЕ y ulocuplumab a la hora de inhibir la migración, la invasión y la formación de metástasis tanto *in vitro* como *in vivo*, en un modelo de rhabdomiosarcoma alveolar metastásico (**Figura 2**).



**Figura 2. A.** La combinación del tratamiento NKAЕ y ulocuplumab suprime por completo la migración y la invasión *in vitro* de células de sarcoma CXCR4+. **B.** El tratamiento con NKAЕ es suficiente para inhibir de forma eficiente la implantación de células de sarcoma CXCR4+ en la región abdominal de ratones inmunodeficientes. **C.** La combinación de la inmunoterapia NKAЕ y ulocuplumab es necesaria para suprimir por completo las micrometástasis pulmonares de sarcoma CXCR4+ en nuestro modelo *in vivo*.

*Resultados de nuestro laboratorio. Manuscrito en preparación*

La experimentación preclínica planteada constituiría la base para el desarrollo de un ensayo clínico para evaluar la terapia combinada NKAЕ/ulocuplumab en pacientes. La estrategia terapéutica planteada permitiría atacar a las células responsables de la metástasis y de la regeneración del tumor tras las terapias convencionales (cirugía radical y quimioterapia neoadyuvante), impactando directamente en la supervivencia de los pacientes de NB.

#### REFERENCIAS:

1. Landier W, Leonard M, Ruccione KS. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Nursing discipline. Vol. 60, Pediatric Blood and Cancer. 2013. p. 1031–6.
2. Müller a, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature. 2001;410(6824):50–6.
3. Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP, et al. A Possible Role for CXCR4 and Its Ligand, the CXC Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-1, in the Development of Bone Marrow Metastases in Neuroblastoma. J Immunol [Internet]. 2001;167(8):4747–57.
4. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. Vol. 16, Clinical Cancer Research. 2010. p. 2927–31.
5. Russell H V., Hicks J, Okcu MF, Nuchtern JG. CXCR4 Expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases. J Pediatr Surg [Internet]. 2004;39(10):1506–11.
6. Kuhne MR, Mulvey T, Belanger B, Chen S, Pan C, Chong C, et al. BMS-936564/MDX-1338: A Fully Human Anti-CXCR4 Antibody Induces Apoptosis In Vitro and Shows Antitumor Activity In Vivo in Hematologic Malignancies. Clin Cancer Res [Internet]. 2013 Jan 15;19(2):357–66.
7. Kashyap MK, Kumar D, Jones H, Amaya-Chanaga CI, Choi MY, Melo-Cardenas J, Ale-Ali A, Kuhne MR, Sabbatini P, Cohen LJ, Shelat SG, Rassenti LZ, Kipps TJ Cardarelli PM CJ. Ulocuplumab (BMS-936564 / MDX1338): a fully human anti-CXCR4 antibody induces cell death in chronic lymphocytic leukemia mediated through a reactive oxygen species-dependent pathway. OncoTarget. 2016;Jan 19(7 (3)):2809–22.
8. Leivas, Alejandra; Perez-Martinez, Antonio; Blanchard, María Jesús; Martín-Clavero E, Fernández, Lucía; Lahuerta, Juan José; Martínez-Lopez J. Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma. Oncoimmunology. 2016;0(0):e1250051.
9. Pérez-Martínez A, Fernández L, Valentín J, Martínez-Romera I, Corral MD, Ramírez M, et al. A phase I/II trial of interleukin-15-stimulated natural killer cell infusion after haplo-identical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors. Cytotherapy. 2015;17(11):1594–603.
10. Fernández L, Valentín J, Zalacain M, Leung W, Patiño-García A, Pérez-Martínez A. Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner. Cancer Lett. 2015;368(1):54–63.

#### HIPÓTESIS:

El receptor de quimioquinas CXCR4 constituye una atractiva diana terapéutica en NB que no responden a los tratamientos actuales dado que existe una asociación significativa entre la expresión de CXCR4 en NB y una menor supervivencia y una mayor tasa de metástasis.

El tratamiento combinado ulocuplumab / NKAЕ podría ejercer un efecto sinérgico al prevenir la metástasis y refractariedad en NB debido a:

- i) La actividad citotóxica de las células NKAЕ contra las células de NK iniciadoras de tumor (TICs).
- ii) Una mejor biodisponibilidad de las células NKAЕ, por el bloqueo del eje CXCR4/CXCL12 por parte del mAb ulocuplumab, que eviadría el *homing* de las células NKAЕ (CXCR4+) en la médula ósea (donde se expresan elevados niveles de CXCL12).
- iii) La inhibición de la migración de las células de NB CXCR4+ hacia CCL25, disminuyendo su capacidad metastásica, por parte del mAb bloqueante ulocuplumab.

La meta final del estudio es desarrollar la base para el desarrollo de un ensayo clínico fase I/II para evaluar la tolerancia y la efectividad de la inmunoterapia combinada con células NKAЕ y ulocuplumab para el tratamiento y prevención de la metástasis y recaída en pacientes pediátricos y adultos jóvenes afectados de NB.

#### OBJETIVOS:

En este estudio se desarrollarán ensayos *in vitro* que demuestren la capacidad del mAb ulocuplumab de inhibir la migración de diferentes líneas de NB. Además, se establecerá un modelo *in vivo* de NB metastásico en ratones inmunodeficientes y se evaluará el potencial antitumoral y antimetastásico de la terapia combinada de ulocuplumab y de las células NKAЕ.

Los objetivos específicos del presente estudio son:

1. Análisis de la expresión de CXCR4 en diferentes líneas celulares establecidas de NB.
2. Evaluación de la citotoxicidad celular en diferentes líneas de NB mediada por NKAЕ
3. Estudio de la inhibición de la migración celular mediada por el anticuerpo ulocuplumab
4. Generación de células de NB fluorescentes y luminiscentes para su seguimiento en ensayos *in vivo*.
5. Monitorización del crecimiento del tumor primario en un modelo ortotópico de NB CXCR4+ tras el tratamiento combinado ulocuplumab/NKAЕ.
6. Evaluación de la inhibición de la metástasis en un modelo de NB CXCR4+ tras el tratamiento combinado ulocuplumab/NKAЕ.

## METODOLOGÍA:

### **Producción de células NKAE a partir de sangre periférica de donantes sanos.**

La línea celular K562 genéticamente modificada para expresar en su superficie IL15 y el ligando activador 41BBL (K562mbIL15-41BBL) será irradiada con una dosis de 100 Gy y actuará como estímulo de proliferación y activación de las células NK de muestras de sangre periférica de donantes sanos.

En paralelo, se obtendrán células mononucleares a partir de sangre periférica (PBMCs) de voluntarios sanos por centrifugación sobre Ficoll (GE Healthcare). Para expandir la población de células NK (CD56+ / CD3-), se co-cultivarán  $15 \times 10^6$  células PBMC con  $10 \times 10^6$  células K562mbIL15-41BBL durante 3 semanas en medio de crecimiento de células madre (CellGenix) suplementado con suero AB humano al 10% (Sigma) e IL-2 (Miltenyi, 10 UI / ml durante la primera semana y 100 UI / ml posteriormente). Se añadirá medio fresco cada dos días hasta una concentración final de  $1 \times 10^6$  células / ml.

### **Análisis de la expresión de CXCR4 en diferentes líneas celulares establecidas de NB.**

Se evaluará mediante tinción de las diferentes líneas celulares de NB con el anticuerpo anti CXCR4 (BD Pharmingen, clon 12G5) y su posterior análisis en un citómetro de flujo Navios (Beckman Coulter). El ratio de intensidad media de fluorescencia (MFI) se calculará dividiendo la MFI de la muestra teñida con el mAb anti CXCR4 por la MFI de la tinción de la muestra con el mAb control de isotipo. Los datos serán analizados mediante el programa FlowJo v10.

### **Evaluación de la citotoxicidad celular en diferentes líneas de NB mediada por NKAE.**

Las células diana se marcarán con Cell Trace CFSE (Life Technologies) y se cocultivarán con las células efectoras NKAE. Posteriormente, se teñirán con el marcador de viabilidad celular por exclusión 7-actinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences) y se analizaron por citometría de flujo. El análisis del porcentaje de células 7-AAD+ dentro de la población de células marcadas en verde con CFSE permite determinar la proporción de células diana muertas. La lisis específica se calculará como  $100 \times (\% \text{ células diana muertas en la muestra} - \% \text{ células diana muertas de forma espontánea}) / (100 - \% \text{ células diana muertas de forma espontánea})$ .

### **Estudio de la inhibición de la migración celular mediada por el anticuerpo ulocuplumab.**

Las líneas celulares establecidas de NB y/o las células NKAE se incubarán 12h antes del ensayo en medio de *starving* (medio de cultivo - 1%FBS). Se añadirán en la parte superior



de la membrana de placas Transwell (ChemoTX). En la parte inferior de la placa se añadirá medio de migración con la quimioquina ligando de CXCR4 (CXCL12 humana recombinante, R&D) (medio de cultivo - 1% BSA - 100 mM CXCL12). La migración tendrá lugar durante 24h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% humedad. Posteriormente, se retirarán las células no migradas de la parte superior de la membrana. Las células no adherentes presentes en el medio de migración con quimioquina se cuantificarán en un citómetro de flujo Navios (Beckman Coulter). Las células adherentes presentes en la parte inferior de la membrana se fijarán con etanol 70%, se teñirán con cristal violeta y se cuantificarán mediante un microscopio (Zeiss Axio) a 100 aumentos. Se determinará el número de células de un mínimo de cinco campos no consecutivos de cada pocillo de migración empleando el programa Image J.

#### **Generación de células de NB fluorescentes y luminiscentes para su seguimiento en ensayos *in vivo*.**

Se infectará una línea celular establecida de NB CXCR4+ con partículas lentivirales de expresión bicistrónica de luciferasa y GFP bajo el promotor EF1a, y con un gen de selección por resistencia a neomicina bajo el promotor Rsv (Amsbio). Las células de NB se incubarán con las partículas lentivirales en dos ciclos de infección consecutivos de 12 h cada uno. Posteriormente, las células se cultivarán durante una semana con neomicina (Sigma) para seleccionar aquellas transducidas de manera estable. Se confirmará la expresión estable de luciferasa en un sistema de detección de bioluminiscencia IVIS-Lumina II (Caliper Lifesciences) y la de GFP en un citómetro de flujo Navios (Becton Dickinson).

#### **Tratamiento combinado ulocuplumab/NKAE en modelos xenogénicos de NB.**

##### *Inoculación tumoral y tratamiento ulocuplumab/NKAE*

Se emplearán ratones NSG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJLs) (Charles River) estabulados en las instalaciones específicas para animales inmunodeficientes del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIB) siguiendo los procedimientos aprobados para el presente proyecto por el Área de Protección Animal de la Comunidad de Madrid (Código de registro ES 280790000188).

Las células de NB Luc+/GFP+ se administrarán junto con las células NKAE a una ratio 10:1. Se inocularán en la cápsula adrenal izquierda tras realizar una incisión en la línea media que posteriormente se cerrará con grapas quirúrgicas de 9 mm (modelo ortotópico) o de forma intravenosa en la vena caudal (modelo metastásico),

El tratamiento con el anticuerpo ulocuplumab será administrado semanalmente (100 µg) por vía intraperitoneal.

Se establecerán cuatro brazos de tratamiento (n = 6-8 ratones / grupo): NKAES; ulocuplumab; NKAES + ulocuplumab; vehículo.

*Monitorización in vivo del crecimiento tumoral y de las metástasis*

El tamaño del tumor primario y/o las metástasis se monitorizará *in vivo* semanalmente mediante el sistema de detección de luminiscencia IVIS-Lumina II (Caliper Lifesciences), tras inoculación intraperitoneal de D-luciferina (Biosynth; 150 mg/kg).

*Determinación de presencia de células humanas de NB en médula ósea y sangre periférica mediante citometría de flujo*

En el momento de la necropsia, se extraerán muestras de sangre en tubos con EDTA (BD Biosciences) y de médula ósea procedente de ambos fémures. Se procederá a lisis de eritrocitos con cloruro de amonio (StemCell Technologies) y a la tinción de las muestras con anti HLA humano (BD, clon G46-2.6), anti CXCR4 humano (BD, clon 12G5), anti CD56 de ratón (BD, clon 12F8) y 7AAD para determinar el porcentaje de células tumorales humanas en las mismas. Las muestras serán analizadas en un citómetro Navios (Beckman Coulter) y con el programa de análisis FlowJo v10.

*Determinación de presencia de metástasis y micrometástasis en pulmón, hígado y bazo mediante qRT-PCR*

En el momento de la necropsia se tomarán muestras de hígado, pulmón y bazo de los ratones. Una parte del órgano se embeberán en RNA Later (Invitrogen) y se conservarán a 4 °C, 24 h. Posteriormente, se almacenarán a -80 °C o se procesarán para la extracción de RNA mediante el kit RNeasy (Quiagen). El RNA total se retrotranscribirá a cDNA empleando el kit SuperScript IV (Invitrogen). Se determinará el nivel de expresión de genes humanos control y de genes de ratón control (GAPDH, GUS) así como de CXCR4 y CXCL12 humano empleando sondas TaqMan marcadas con colorante 6-FAM y un “quencher” empleando el sistema de detección ABI Prism 7000. La expresión relativa se analizará utilizando el método  $2^{-\Delta CT}$  después de la normalización con un control interno, donde  $\Delta CT = (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ control interno})$ .

*Determinación del número y tamaño de metástasis en pulmón, hígado y bazo mediante inmunohistoquímica*

El resto de hígado, bazo y pulmón serán fijados en PBS - 4% formaldehído, crioprotectados en PBS - 35 % sacarosa y embebidos en OCT (Tissue-Tek) antes de su conservación a -80 °C.

A intervalos de 100  $\mu\text{m}$ , se tomarán secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor con un criostato Leica CM1900. Una sección de cada intervalo de cada órgano será teñida con hematoxilina eosina, otra con anti CXCR4 humano (Abcam, clon UMB2), y otra con anti TurboGFP (ThermoFisher, policlonal). Para identificar número y tamaño de las metástasis en cada uno de los órganos de cada ratón tratado.

## **PLAN DE TRABAJO**

**Etapas de desarrollo y distribución de las tareas de todo el equipo investigador, y las asignaciones previstas para el personal técnico que se solicita. Indicar además el lugar/centro de realización del proyecto.**

La experimentación preclínica se llevará a cabo fundamentalmente por la Dra. María Vela Cuenca en el Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ) con el apoyo de los técnicos de laboratorio Jaime Valentín Quiroga y Pablo González. En dicho centro se llevarán a cabo los ensayos con cultivos de células y de citometría de flujo. Contarán con el Servicio de Animalario del Instituto de Investigaciones Biológicas “Alberto Sols” (IIB) que dispone de una sala para la estabulación y manipulación de animales inmunosuprimidos y con el Servicio de Histología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), con elevada experiencia en el procesamiento y tinción de todo tipo de muestras humanas y animales.

La Dra. Adela Escudero llevará a cabo el análisis de las muestras derivadas de la experimentación animal mediante qRT-PCR en el Instituto de Genética Molecular y Molecular (INGEMM).

La Dra. Fernández, investigadora postdoctoral en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), realizará tareas de asesoramiento y seguimiento del proyecto, aportando su amplia experiencia en terapia celular con NKAE.

Una vez concluido, el Dr. Antonio Pérez Martínez, director del grupo de Investigación Traslacional en Cáncer Infantil, Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular (IDIPAZ) y médico adjunto del Servicio de Oncología Pediátrica del Hospital la Paz, evaluará su potencial traslación a la clínica.

Los Drs. Vela, Fernández y Pérez-Martínez llevarán a cabo el análisis de los resultados preclínicos obtenidos así como su difusión mediante publicaciones científicas y comunicaciones en congresos nacionales e internacionales.

El desarrollo del proyecto se dividirá en tres fases:

1. Fase de experimentación *in vitro*:

Se desarrollará durante los seis primeros cuatrimestres. Consta de los siguientes objetivos o *milestones*:

Análisis de la expresión de CXCR4 en diferentes líneas celulares establecidas de NB.

Evaluación de la citotoxicidad celular en diferentes líneas de NB mediada por NKAE.

Estudio de la inhibición de la migración celular mediada por el anticuerpo ulocuplumab.

2. Fase de experimentación *in vivo*:

Se desarrollará durante los seis últimos cuatrimestres. Consta de los siguientes objetivos o *milestones*:

Generación de células de NB fluorescentes y luminiscentes.  
Monitorización del crecimiento del tumor primario en un modelo ortotópico de NB CXCR4+ tras el tratamiento combinado ulocuplumab/NKAE.  
Evaluación de la inhibición de la metastásis en un modelo de NB CXCR4+ tras el tratamiento combinado ulocuplumab/NKAE (mediante histología, RNA, citometría).

3. Fase de análisis datos y elaboración manuscritos:  
Se desarrollará durante los dos últimos cuatrimestres.

**CRONOGRAMA:**

	CUATRIMESTRE								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Análisis de la expresión de CXCR4 en diferentes líneas celulares establecidas de NB									
Evaluación de la citotoxicidad celular en diferentes líneas de NB mediada por NKAE									
Estudio de la inhibición de la migración celular mediada por el anticuerpo ulocuplumab									
Generación de células de NB fluorescentes y luminiscentes									
Monitorización del crecimiento del tumor primario en un modelo ortotópico de NB CXCR4+ tras el tratamiento combinado ulocuplumab/NKAE									
Evaluación de la inhibición de la metastásis en un modelo de NB CXCR4+ tras el tratamiento combinado ulocuplumab/NKAE (histología, RNA, citometría)									
Análisis datos y elaboración manuscritos									

**EXPERIENCIA DEL EQUIPO**

**Experiencia del equipo investigador sobre el tema.**

El **Dr. Antonio Pérez-Martínez** es Jefe de Servicio de Hemato-Oncología pediátrica del Hospital Universitario La Paz, Investigador Principal del Grupo de Investigación Traslacional en Cáncer Infantil, Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital La Paz (IdiPAZ), responsable de la Unidad de Investigación Clínica en Oncohematología Infantil acreditada por el consorcio europeo Innovative Therapies For Children with Cancer (ITCC), miembro del comité ejecutivo de la Red Europea de Referencia en Trasplante Pediátrico (Transplantchild). Doctor en Pediatría (2006) y Profesor Titular de Pediatría en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) (2017). Ha dirigido cinco tesis doctorales, todas ellas en el área de la terapia en población pediátrica. Ha realizado tres estancias postdoctorales en los Departamentos de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular

del Hospital de St Jude (Memphis, EEUU) (2007-2008), en el Servicio de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos del Hospital Infantil de Tübingen, Alemania (2011) y en el Departamento de Inmunología y Trasplante Hematopoyético del Mason Cancer Center en la Universidad de Minnessota (2017), donde participó como auditor en el ensayo clínico con la citocina IL-15 *in vivo*. Tiene una gran experiencia en células NK y TPH tanto en el laboratorio como en el desarrollo de investigación clínica tal y cómo reflejan la trayectoria investigadora PI09/02393, PI12/01622, PI15/00973, EC08/00291, (NCT01337544), EC11/057 (NCT01944982), siendo un claro ejemplo de médico pediatra investigador. Desde su incorporación al Hospital La Paz en el año 2013 ha desarrollado tres nuevos ensayos clínicos académicos con terapia celular: i) NK autólogas expandidas y activadas en pacientes adultos con mieloma de alto riesgo, junto con el Dr. Martínez-López del Hospital 12 de Octubre (NCT02481934); ii) NK alogénicas expandidas y activadas en pacientes pediátricos con leucemia aguda refractaria (NCT02074657); NK alogénicas expandidas y activadas como terapia de consolidación en pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda (NCT02763475).

La **Dra. Vela**, licenciada en Bioquímica (UAM, 2005), máster en Biotecnología (UAM, 2012), se especializó, durante su tesis doctoral en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB, 2015), en la generación y caracterización de anticuerpos frente a receptores de quimioquinas para el tratamiento del cáncer. Cuenta con amplia experiencia en la realización de experimentos *in vitro* de migración celular, análisis mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica de la expresión de los mismos en diferentes líneas celulares y tejidos, así como manejo y monitorización del crecimiento tumoral por luminiscencia en modelos murinos.

#### PUBLICACIONES RELACIONADAS:

Somovilla-Crespo B; Martín MT, Vela M, Corraliza-Gorjón I, Santamaria S, Garcia-Sanz JA and Kremer L. 92R Monoclonal Antibody Inhibits Human CCR9+ Leukemia Cells Growth in NSG Mice Xenografts. *Front. Immunol.*, 29. 2018.

- Vela M; Aris M; Llorente M; García-Sanz JA; Kremer L. Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: achievements and challenges. *Frontiers in Immunology*. 6 - 12. 2015.

- Chamorro S; Vela M; Franco-Villanueva A; Carramolino L; Gutiérrez J; Gómez L; Lozano M; Salvador B; García-Gallo M; Martínez-A C; Kremer L. Antitumor effects of a monoclonal antibody to human CCR9 in leukemia cell xenografts. *MABs*. 2014.

La Dra. Vela se incorporó al grupo de Investigación Traslacional en Cáncer Infantil, Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular del **Dr. Pérez-Martínez** a finales del año 2015. El principal objetivo del equipo es desarrollar terapias con células NK en niños con cáncer. Dicho equipo cuenta con amplia experiencia en la terapia celular con NKA. El Dr. Pérez-Martínez lidera ensayos clínicos académicos en terapia celular con NK en pacientes pediátricos desde el año 2008 (NCT01337544, NCT02074657, NCT01944982) y colabora en patología de adultos como el mieloma múltiple junto con el Dr. Martínez López del Hospital 12 de Octubre (NCT02481934). El proyecto iniciado por la Dra. Vela en el grupo de investigación ya ha propiciado el desarrollo de un "Ensayo Clínico Fase I/II, multicéntrico, abierto, de infusión de células NK activadas para el tratamiento de niños, adolescentes y adultos jóvenes con sarcoma", actualmente en fase de aprobación por parte de la AEMPS (EudraCT 2016-003578-42).

#### PUBLICACIONES RELACIONADAS:

- Vela M; Corral D; Carrasco P; Fernández L; Valentín J; González B; Escudero A; de Paz R; Torres J; Leivas A; Martínez-López J; Pérez-Martínez A. Salvage chemotherapy and haploidentical IL-15/4-1BBL activated and expanded natural killer cell therapy in children with relapsed and refractory leukemia. *Cancer Letters*. 2018.

Vela M; González P; Valentín J; Fernández L; Escudero A; Bueno D; Pérez-Martínez A. NK cell therapy in combination with anti CXCR4 antibody for the treatment of paediatric sarcomas. *ASCO* 2018.

La **Dra. Fernández Casanova** participará como colaboradora en el proyecto, aportando su amplia experiencia y conocimientos sobre terapia celular y biotecnología a escala clínica.

PUBLICACIONES RELACIONADAS:

- Fernández L, Metais JY, Escudero A, Vela M, Valentín J, Vallcorba I, Leivas A, Torres J, Valeri A, Patiño-García A, Martínez J, Leung W, Pérez-Martínez A. Memory T Cells Expressing an NKG2D-CAR Efficiently Target Osteosarcoma Cells. Clin Cancer Res. 2017.
- Fernández L; Valentín J; Zalacain M; Leung W; Patiño-García A; Pérez-Martínez A. Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner. Cancer Letters. 2015.

## MARCO ESTRATÉGICO

### 1. Capacidad del proyecto de abordar los objetivos y prioridades enmarcadas en el reto Salud, Cambio Demográfico y Bienestar de la Estrategia Española de Ciencia y Tecnología y de Innovación.

### 2. Capacidad del proyecto de fomentar sinergias e impulsar el talento en el SNS.

El cáncer metastásico es hoy en día uno de los principales desafíos de la Oncología. El cáncer infantil arroja cifras de supervivencia alentadoras en tumores localizados, pero no así en aquellos casos en los que la metástasis ya se ha desarrollado. Un ejemplo paradigmático de ello es el neuroblastoma, una patología que constituye aproximadamente el 9.5% de todos los tumores pediátricos, y cuya supervivencia cae dramáticamente en la enfermedad no localizada<sup>1</sup>.

Los tratamientos convencionales con quimioterapia y radioterapia fueron los responsables del aumento de las tasas de supervivencia desde los años 60. Sin embargo, en los últimos años ha quedado demostrado que las células iniciadoras del tumor, responsables también del desarrollo de las metástasis, y de la aparición de recaídas tras haberse logrado una remisión de la enfermedad, son en muchas ocasiones resistentes a dichos tratamientos. Las terapias de segunda línea disponibles para la recaída son limitadas y a menudo no son efectivas. Hay una extrema necesidad, pues, de buscar opciones de tratamiento más allá de los medios convencionales para el tratamiento de estos pacientes.

En la actualidad, existe una disociación entre tratamientos convencionales (quimioterapia, radioterapia y cirugía) y nuevas terapias inmunológicas y celulares. El uso de la terapia celular se restringe a la enfermedad en estadios avanzados. En nuestra opinión, la terapia inmune y celular debe ser una estrategia terapéutica en combinación con tratamientos convencionales. El tratamiento con células NK autólogas y alogénicas es un nuevo enfoque exitoso en los mejores centros de investigación clínica. El presente estudio preclínico validaría el desarrollo un esquema pionero que pretende sumar a la quimio y radioterapia la inmunoterapia celular y humoral, que impacte directamente en la supervivencia de los pacientes con neuroblastoma metastásicos o en recaída.

El proyecto presenta una clara vocación traslacional. Una vez desarrollada la experimentación preclínica que de base a nuestra hipótesis científica, nuestro equipo de investigación cuenta con los medios y experiencia para el desarrollo de un ensayo clínico que evalúe la seguridad y eficacia de las NKAe en el neuroblastoma metastásico. Los resultados preclínicos de nuestro grupo, en relación a la expresión de CXCR4 y la metástasis en sarcomas, ha dado lugar al Ensayo Clínico Fase I/II, multicéntrico, abierto, de infusión de células NK activadas para el tratamiento de niños, adolescentes y adultos jóvenes con sarcomas (EudraCT 2016-003578-42, Promotor Dr. Antonio Pérez Martínez), actualmente

en vías de autorización por parte de AEMPS, y que se iniciará en el Hospital Universitario La Paz (Madrid), Hospital Virgen de La Arrixaca (Murcia) y Hospital de Cruces (Bilbao).

De hecho, la empresa Miltenyi Biotec S.L. ha manifestado su interés por el proyecto y su potencial aplicación clínica (**Carta de Interés Empresarial anexa**). Asimismo, la seguridad del mAb ulocuplumab ya ha sido evaluada en ensayos clínicos de Fase I/II para el tratamiento del mieloma múltiple por parte de la empresa Bristoyl Meyer Squibb. La traslación a la clínica de la presente investigación sería, pues, directa. Una vez completados, los ensayos proporcionarán la base necesaria para la aplicación rutinaria de tales terapias y la consolidación de la inmunoterapia como estrategia terapéutica en neuroblastoma, en combinación con los tratamientos convencionales.

1) Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP). *Registro 1985-2015*.

## SECCIÓN MEDIOS DISPONIBLES

La investigadora principal del proyecto forma parte del grupo de Investigación Traslacional en Cáncer Infantil, Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular en el Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ). Dicho centro cuenta con todas las instalaciones y equipamiento necesario para la experimentación con cultivos de células, así como una plataforma de citometría de flujo dotada con un citómetro Beckman Coulter Navios y dos citómetros Becton Dickinson FACSCalibur. Contará con el Servicio de Animalario del Instituto de Investigaciones Biológicas “Alberto Sols” (IIB) que dispone de una sala para la estabulación y manipulación de animales inmunosuprimidos y del Servicio de Histología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), con elevada experiencia en el procesamiento y tinción de todo tipo de muestras humanas y animales y que cuenta, entre otros equipos, con un criostato Leica CM1900 y un procesador de tejidos Leica TP1020.

El proyecto cuenta actualmente con todas las autorizaciones y certificados éticos necesarios para su desarrollo.

La Comisión de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ) ha evaluado favorablemente el presente proyecto de investigación: “Inmunoterapia en neuroblastomas pediátricos: Tratamiento dirigido a las células tumorales iniciadoras de la metástasis”, considerando que cumple con los requisitos metodológicos necesarios y es viable en todos sus términos, y puede desarrollarse en las instalaciones del IdiPAZ. Se adjunta el certificado correspondiente de dicha Comisión de Investigación y del Director Científico de IdiPAZ.

Por su parte, el Comité de Ética en Experimentación Humana y Animal (CEEHA) Órgano Encargado del Bienestar Animal (OEBA) del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIB/CSIC/UAM) ha aprobado la estabulación y la realización de los procedimientos incluidos en el presente proyecto en las instalaciones de Animalario del IIB. Asimismo, el proyecto cuenta con las autorizaciones preceptivas del Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, como Órgano Habilitado, y del Área de Protección Animal de la Comunidad de Madrid. Se adjuntan los informes de evaluación correspondientes.



**FUNDACIÓN INVESTIGACIÓN  
PARA VENCER EL CÁNCER**  
Calle Princesa de Éboli 9, Local B  
28050 Madrid, España  
T\_ 900 81 30 75  
cris@criscancer.org  
www.criscancer.org

Adicionalmente, el Dr. Antonio Pérez Martínez ha firmado un Acuerdo de Transferencia de Materiales (MTA) con la empresa que ha desarrollado el mAb ulocuplumab, (Bristol Meyer Squibb). Mediante dicho acuerdo, la empresa manifiesta su interés en el desarrollo de las investigaciones planteadas en el presente proyecto y facilita a los investigadores del equipo del Dr. Antonio Pérez-Martínez el mAb del que son licenciatarios, para el desarrollo de la experimentación planteada. Dicho documento también se adjunta a la presente memoria.

DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:

- 1\_ Apoyo al proyecto de la Dirección Científica IdiPAZ
- 2\_ Aprobación del proyecto de la Comisión Investigación IdiPAZ
- 3\_ Aprobación del proyecto Comisión Bienestar Animal IIB
- 4\_ Aprobación del proyecto Órgano Habilitado Experimentación Animal