

## **Identificación de pacientes con cáncer de colon localmente avanzado (CCLA) de alto riesgo de recaída tras abordaje TNT para el empleo de terapias con RNA autoamplificable**

### **INTRODUCCIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA.**

El cáncer colorectal es un problema sanitario de primera magnitud que afecta en la actualidad a más de un millón de personas en todo el mundo. En países occidentales representa el tumor gastrointestinal más frecuente. Su pronóstico es altamente dependiente del estadio de la enfermedad. En lo que respecta al cáncer de colon localizado o localmente avanzado (CCLA), la supervivencia a 5 años para estadios I y II ronda el 80%, siendo del 60% para el estadio III (presencia de afectación ganglionar). La actual clasificación TNM divide a este estadio en IIIA (T1-2, 1-3 ganglios positivos), IIIB (T3-4, 1-3 ganglios positivos) y IIIC (> 3 ganglios positivos), con supervivencia a 5 años del 83, 64 y 44%, respectivamente.

Aunque la cirugía es el único tratamiento potencialmente curativo en el CCLA, existe un amplio consenso respecto al empleo de quimioterapia adyuvante en el estadio III y en algunos casos seleccionados del estadio II. Diversos estudios aleatorizados han mostrado una reducción en el riesgo de recaída con el empleo de combinaciones de oxaliplatino y fluoropirimidinas. La adición de terapias biológicas (cetuximab, bevacizumab) a este esqueleto no ha conseguido mejorar los resultados, e incluso ha demostrado un efecto deletéreo en términos de toxicidad. Por otro lado, es conocido que diversas características histopatológicas y/o moleculares confieren tasas de recaída marcadamente diferentes incluso dentro del mismo estadio. Considerando esta heterogeneidad biológica se han desarrollado durante los últimos años diversas alternativas terapéuticas, entre las que destaca la quimioterapia preoperatoria o neoadyuvante. Incidir sobre enfermedad micrometastásica desde el comienzo, un menor riesgo de afectación de márgenes quirúrgicos y de contaminación tumoral durante la cirugía, la importancia pronóstica del grado de respuesta histológica, la mejor tolerancia respecto a tratamientos adyuvantes y la posibilidad de realizar un test de quimiosensibilidad *in vivo* que ayude a decidir sobre la selección del esquema postoperatorio más adecuado son algunas de

las ventajas de este planteamiento. Diversos grupos, incluido el nuestro, han reportado datos preliminares que demuestran que este abordaje es factible, seguro y no incrementa la morbimortalidad quirúrgica. El estudio más relevante en esta línea, FOxTROT, se diseñó con el objetivo de evaluar la eficacia y factibilidad de la QT neoadyuvante en CCLA. Se trata de un Ensayo Clínico Aleatorizado (ECA) 2:1 que incluye pacientes con CCLA T3 de alto riesgo o T4, N0- 2, M0 diagnosticados por pruebas de imagen (TAC). Los pacientes son randomizados de forma aleatoria en 2 grupos: tratamiento estándar de QT adyuvante (FOLFOX) de 24 semanas tras Cirugía vs. QT neoadyuvante 6 semanas seguido de Cirugía y 18 semanas de adyuvancia. Los análisis iniciales demuestran una buena tolerancia al tratamiento neoadyuvante, menor incidencia de complicaciones postquirúrgicas, un incremento en el grado de regresión histológica y una tendencia a un menor riesgo de recaída a dos años.

En nuestro país, el ensayo clínico ELECLA (NCT04188158), está analizando la supervivencia libre de recaída a 2 y 5 años tras el tratamiento neoadyuvante, bien con el esquema empleado en el estudio FOxTROT o con un esquema TNT, administrando al paciente de forma completa la QT antes de la cirugía. En un marco teórico, se puede justificar la TNT en el CCLA en un intento de incrementar la tasa de remisiones completas patológicas, y por tanto la SLE, y por otro lado en una mejora del grado de cumplimiento terapéutico. Se ha demostrado que aquellos pacientes sometidos a cirugía de colon (estadío III) y que presentan complicaciones mayores postquirúrgicas tienen hasta un 20% de posibilidades de perder la ventana de oportunidad de tratamiento y de no recibir o recibir demasiado tarde la QT adyuvante.

No obstante, estos resultados clínicos deben de acompañarse necesariamente de la aplicación de marcadores que permitan identificar subgrupos con un pronóstico especialmente ominoso para los que resulta imperativo encontrar nuevos enfoques terapéuticos

Durante décadas, el cáncer de colon (CCR) ha sido considerado un tumor poco inmunogénico. La probabilidad de regresiones tumorales espontáneas es excepcional, a diferencia de otros tumores como el melanoma. No obstante, en los últimos años, diversos trabajos han puesto de manifiesto, por un lado, que

los tumores epiteliales expresan diversos antígenos que pueden ser específicamente reconocidos por linfocitos T y, por otro, la existencia de respuestas antitumorales inmunitarias en pacientes con CCR. Entre los antígenos detectados en líneas celulares de CCR capaces de inducir una respuesta inmune se encontrarían el TGFBR-II, SART-3, ciclofilina B, CEA, Ep-CAM (17-1A), HER-2/neu, P56, MAGE-3 y MUC-1.

Hoy en día está ampliamente aceptado que la reacción inmune del huésped frente al cáncer de colon es crítica en el pronóstico de esta enfermedad. La presencia de una reacción linfocitaria ha demostrado ser un factor independiente de supervivencia incluso cuando se analiza de manera conjunta con factores moleculares como la inestabilidad de microsatélites, CIMP, mutaciones el b-raf, k-ras, p53, Cox-2 o hipometilación de LINE-1. El grado de infiltración linfocitaria se correlaciona con una disminución progresiva del riesgo de recaída, independientemente del estadio de la enfermedad. Como ejemplos, una alta densidad de células CD8+ intratumorales se asocia a estadios más precoces y a un menor riesgo de recaída, la presencia de células CD45RO+ (linfocitos CD4+ y CD8+ memoria expuestos a antígenos) se relaciona de manera inversa con la invasión vascular y perineural y por tanto con supervivencias más prolongadas, la presencia de células T reguladoras (FOXP3+) intratumorales se asocia con un pronóstico más favorable en CCLA estadios II y III mientras que una alta densidad de estas células en la mucosa colónica normal confiere un pronóstico adverso, un bajo ratio CD3+/FOXP3+ y una escasa presencia de células CD3+ predice un mayor riesgo de recaída en el cáncer de colon y pacientes con CCR y niveles detectables de Ig M anti-CEA presentan un incremento significativo en la supervivencia a dos años respecto a otros pacientes en quienes los niveles de esta inmunoglobulina son indetectables.

Todos estos hallazgos apuntan a la capacidad innata del sistema inmune para suprimir micrometástasis, a la existencia de un fenotipo tumoral más antigénico que no habría adquirido la habilidad de evadir el sistema inmune o a ambas. La respuesta inmune adaptativa influencia por tanto el comportamiento de los tumores humanos, siendo el cáncer colorrectal (CCR) el tumor en el que este hecho ha sido más ampliamente analizado. La caracterización del tipo, densidad y localización del infiltrado inmune o el perfil de expresión de ciertas citoquinas

mediante análisis de expresión génica y microarrays de expresión tisular (*inmunoscore*) ha demostrado tener mayor capacidad predictiva sobre la supervivencia global de pacientes con CCR que la clasificación AJCC/UICC-TNM. Además, la presencia de un microambiente tumoral específico, permisivo a la infiltración por el sistema inmune, y caracterizado por incrementos en la densidad de células T citotóxicas y células T memoria (CD3+, CD8+, granzyme B y CD45RO+) podría condicionar la eficacia del tratamiento convencional, tal como se ha demostrado en otros tumores. Es conocido que la QT incrementa la expresión de antígenos tumorales y activa vías de señalización mediadas por NKG2D, CD95 o receptores DR4 y DR5, señales de stress que incrementan la susceptibilidad de la célula tumoral a la lisis por células efectoras del sistema inmune. Provoca además una regulación al alza de receptores para la manosa-6 fosfato en la superficie de las células tumorales que las hace particularmente sensibles al efecto citotóxico de la granzima B, una proteasa contenida en los gránulos de los linfocitos T citotóxicos. Respecto a la QT empleada en el CCLA, el 5-Fluorouracilo reduce el número de células mieloides supresoras CD11b+ Gr1+ en el microambiente tumoral, reducción que se correlaciona con un aumento de células CD8+ productoras de IFN $\gamma$  y un retraso en el crecimiento tumoral. El oxaliplatino a su vez causa muerte celular inmunogénica, caracterizada por exposición de calreticulina en la membrana celular, liberación de HMGB1 y ATP (que interactúan con TLR4 y P2Rx7 presentes en la superficie de CD), lo que facilita la presentación antigénica a células T CD8+, y la producción de pro-IL-1 $\beta$ . De hecho, SNPs en TLR4 y P2Rx7 que reducen su afinidad por HGMB y ATP tienen un impacto negativo en el pronóstico de pacientes con CCR estadio III tratados con Oxaliplatino.

Sin embargo, los tumores de CCR pueden escapar del sistema inmunitario mediante mecanismos que incluyen la inducción de células T reguladoras (Tregs), la expresión de puntos de control (*checkpoints*) inmunitarios (PD-L1 y CTLA-4) y la disminución de la expresión de moléculas presentadoras de antígenos (HLA). Estos procesos generan un microambiente inmunosupresor, lo que hace que la inmunoterapia sea muy poco eficiente para tratar el CCR, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias que extiendan la acción de los anticuerpos bloqueantes de *checkpoints* inmunológicos a más pacientes. Por

otro lado, la toxicidad puede ser un problema importante cuando los mAbs se administran sistémicamente, en parte porque pueden inducir respuestas autoinmunes. Esto podría evitarse o reducirse mediante la administración local de mAbs de forma local en el tumor. Una posible forma de lograr esto es mediante el uso de vectores de terapia génica que expresen el mAb en el tumor, lo que podría reducir los efectos secundarios no deseados, como se propone en este proyecto.

**Los nanobodies o anticuerpos monodominio.** La expresión de mAb completos a partir de vectores virales tiene el inconveniente del gran tamaño de los genes que los codifican, siendo necesario expresar las dos cadenas del anticuerpo a partir de un mismo vector. En este proyecto se propone el uso de anticuerpos monodominio derivados de camélidos o “nanobodies”. Estos anticuerpos pequeños tienen algunas ventajas para la transferencia de genes: i) su región variable está codificada por una sola cadena de DNA, que puede subclonarse fácilmente en vectores de terapia génica; ii) son anticuerpos muy pequeños (15 kDa) que constan de un único dominio proteico. Esto permitiría generar anticuerpos multivalentes fusionando varios nanobodies entre sí o anticuerpos multifuncionales fusionando nanobodies de diversas especificidades, iii) a pesar de su pequeño tamaño alcanzan valores de afinidad nanomolar; iv) tienen alta penetrabilidad tisular, lo que podría favorecer su efecto antitumoral; v) su vida media es corta, ya que se eliminan por vía renal, lo que podría reducir su posible toxicidad. Estos nanobodies se obtuvieron a partir de bibliotecas de fagos que expresan en su superficie un repertorio de nanobodies clonados a partir de linfocitos periféricos de llamas inmunizadas con cada uno de los antígenos<sup>20</sup>. En este proyecto se utilizarán también nuevos nanobodies que bloqueen la interacción de LAG3 con sus ligandos MHC II y FGL1

**Inhibidores de checkpoints inmunes basados en ligandos solubles.** Una alternativa al uso de anticuerpos contra *checkpoints* del sistema inmune es el uso de ligandos solubles de estos *checkpoints* capaces de competir con sus ligandos naturales que están anclados a membranas. Entre las ventajas de estos ligandos solubles están su menor tamaño comparado con los anticuerpos (aunque de tamaño similar al de los nanobodies), y su falta de inmunogenicidad ya que se trata de fragmentos de moléculas endógenas. Aunque una desventaja

de estos ligandos es que suelen tener constantes de afinidad mucho más bajas que los anticuerpos, recientemente se han descrito algunas variantes mutadas, por ejemplo, de un dominio soluble de PD-1, con una afinidad extremadamente alta por PD-L1<sup>21</sup>. Esta variante de PD-1 de alta afinidad será empleada en este proyecto.

**Vectores basados en RNA autorreplicativo para terapia antitumoral.** Una estrategia con gran potencial para aumentar las respuestas a los tumores se basa en el uso de virus oncolíticos, ya que pueden inducir reacciones inflamatorias asociadas a la destrucción de las células tumorales y la consecuente liberación de antígenos tumorales<sup>22</sup>. Los vectores de alfavirus, como Semliki Forest virus (SFV), combinan algunas ventajas de los vectores convencionales y los virus oncolíticos: expresan altos niveles de proteínas terapéuticas en el tumor, inducen apoptosis en las células tumorales y respuestas de IFN-I debido a la naturaleza replicativa de su RNA, lo que potencia su efecto antitumoral<sup>23</sup>. Sin embargo, no son virus oncolíticos ya que no pueden propagarse y no expresan proteínas estructurales virales, por lo que son seguros y tienen baja inmunogenicidad. Los vectores basados en SFV contienen un genoma de RNA autorreplicativo (saRNA, de *self-amplifying RNA*) que se puede diseñar para expresar proteínas terapéuticas a niveles muy altos en las células infectadas. De forma muy interesante, los vectores de SFV se pueden usar como partículas virales o directamente como saRNA. En este último caso, su administración *in vivo* requiere el uso de electroporación o de su conjugación con nanopartículas lipídicas. De hecho, este último enfoque se ha utilizado con éxito para administrar SFV saRNA que expresa la proteína de la espícula de SARS-CoV-2 para la vacunación contra Covid-19<sup>26</sup>. Una ventaja del saRNA frente al mRNA convencional es que el primero puede inducir respuestas inmunitarias con dosis mucho más bajas que el mRNA.

**Electroporación en tumores.** La electroporación irreversible (IRE) es una técnica de ablación de tejidos blandos que provoca la muerte de las células tumorales por apoptosis. Esta técnica se utiliza clínicamente para la ablación de tumores que están en contacto con estructuras vasculares o nerviosas vitales, que deben ser conservadas, ya que la electroporación destruye principalmente células tumorales, pero no estructuras de colágeno como vasos y nervios. Al

someter el tumor a un campo eléctrico, se forman poros en las membranas celulares que permiten la entrada de agua provocando la muerte celular<sup>27</sup>. Sin embargo, no todas las células mueren por este procedimiento, y la generación de poros facilita la entrada en estas células de otras moléculas con posible actividad terapéutica, como los vectores de RNA propuestos en este proyecto o agentes citostáticos (quimioelectroporación). Aunque la IRE es una alternativa terapéutica en pacientes con tumores localizados en áreas irresecables, su eficacia terapéutica por sí sola ha sido modesta. Creemos que la electroporación podría ser una forma eficiente y segura de introducir vectores de RNA que expresen inhibidores de *checkpoints* inmunes en las células tumorales.

**Nanopartículas de lípidos catiónicos para llevar saRNA a los tumores.** Entre los métodos más eficientes para la transducción de células con ácidos nucleicos se encuentran las nanopartículas lipídicas catiónicas como las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), que son partículas coloidales compuestas por una matriz lipídica biocompatible y biodegradable de lípidos sólidos. Esta matriz incluye el ingrediente activo que se transportará, liberará y protegerá (el RNA). Alrededor de la matriz y para estabilizarla existe una capa de tensioactivos que actúan como barrera. Las SLN tienen baja citotoxicidad y alta estabilidad en varios sistemas biológicos y los métodos para obtenerlas son fácilmente escalables. En este proyecto se ensayarán nanopartículas catiónicas lipídicas o poliméricas comerciales.

## **HIPÓTESIS**

Los mecanismos de resistencia tumoral frente a la quimioterapia y la inmunoterapia son especialmente activos en el CCR, lo que reduce mucho las opciones terapéuticas para este tipo de cáncer. Una caracterización exhaustiva de los pacientes con mayor riesgo de recaída tras un programa TNT dentro del ensayo ELECLA mediante un análisis mutacional con panel NGS OCA-Plus y un análisis inmunológico definiría un grupo de pacientes para el que proponemos desarrollar a nivel de laboratorio una terapia basada en el uso de RNA autorreplicativo que exprese de forma local en el tumor inhibidores de checkpoints del sistema inmune basados en nanobodies o ligandos solubles de alta afinidad. Estos vectores proporcionarían varias acciones combinadas: 1) la expresión local permitiría alcanzar altos niveles de los inhibidores concentrando

su actividad en el tumor y disminuyendo su toxicidad y 2) la replicación del RNA del vector conduciría a la inducción de respuestas de interferón tipo I que aumentarían la eficacia de estas estrategias inmunoterapéuticas. La administración de los vectores de RNA mediante electroporación o conjugados con nanopartículas lipídicas facilitaría el futuro desarrollo clínico de estas terapias. Por último, el modelo ortotópico que proponemos para evaluar estas estrategias simularía el de pacientes con tumores de CCR accesibles en los que tras el tratamiento neoadyuvante se esperan varias semanas antes de reseñar el tumor, dejando una ventana de tiempo para la intervención con las estrategias propuestas sin comprometer la terapia estándar.

## **OBJETIVOS**

1. Análisis molecular de tumores de CCR para identificar subgrupos de alto riesgo candidatos a nuevas terapias. Se seleccionarán pacientes con CCLA tratados mediante TNT y que presenten fenotipos extremos (ausencia de recaída tras al menos 3 años de seguimiento o recaída en el primer año tras la cirugía)

1.1. Análisis mutacional en biopsias de tumor primario mediante el empleo del panel OCA-Plus

1.2. Análisis de marcadores de inmunosupresión en tumores primarios de CCR

2. Optimización de un modelo de CCR ortotópico en ratones inmunocompetentes

3. Generación de vectores de RNA autorreplicativo que expresen genes inmunomoduladores

3.1. Generación y caracterización de vectores que expresen nanobodies contra checkpoints inmunológicos

3.2. Generación y caracterización de vectores que expresen ligandos solubles de checkpoints inmunológicos

4. Evaluación de tratamientos no virales basados en RNA autorreplicativo en el modelo de CCR ortotópico

4.1. Evaluación de los vectores mediante electroporación in vivo

4.2. Evaluación de los vectores mediante nanopartículas lipídicas



En paralelo a los análisis de muestras de pacientes se llevarán a cabo la generación de los vectores de RNA autorreplicativo (saRNA) y los estudios preclínicos en un modelo de CCR en ratón, tal y como se describe a continuación.

### **Generación de vectores de saRNA que expresen nuevos nanobodies contra checkpoints inmunitarios.**

Recientemente hemos desarrollado nuevos nanobodies contra PD-1 y PD-L1 derivados de llamas inmunizadas. Estos nanobodies pueden bloquear las interacciones de PD-1/PD-L1 tanto de origen humano como de ratón, lo que los convierte en candidatos potenciales para uso clínico. Los resultados preliminares de nuestro grupo han mostrado que los vectores del virus del Bosque de Semliki (SFV), basados en un genoma de saRNA, que expresan estos nanobodies inducen respuestas antitumorales potentes en modelos de tumores de ratón como MC38 (CCR) y B16-OVA (melanoma). La eficacia antitumoral de estos nanobodies aumentó considerablemente cuando se expresaron fusionados a un dominio de Fc de inmunoglobulina, lo que permite su dimerización. Estos resultados se obtuvieron mediante inyección intratumoral de partículas virales. En la actualidad estamos desarrollando nuevos nanobodies contra LAG3 y FGL1 y otros checkpoints inmunológicos. Para ello, hemos inmunizado llamas con proteínas recombinantes LAG3 y FGL1. Todas las llamas generaron títulos de anticuerpos muy elevados contra los antígenos empleados. Hemos obtenido cDNA total a partir de linfocitos de sangre periférica de estas llamas y estamos procediendo a la selección de nanobodies contra LAG3 y FGL1 mediante la técnica de phage-display. Para esta selección se hará primero un ensayo de unión tipo ELISA utilizando placas recubiertas con LAG3 o FGL1 y en una segunda etapa se evaluará mediante citometría de flujo si los nanobodies seleccionados pueden bloquear las diferentes interacciones (LAG3-MHC II, y LAG3-FGL1 humanas y de ratón). Los nanobodies seleccionados se subclonarán en el plásmido pSFVb12A30, generando vectores de SFV capaces de expresar nanobodies anti-FGL1 y anti-LAG3. Estos nuevos vectores de SFV, junto con los que expresan nanobodies contra PD-1 y PD-L1 pasarán a formar parte de la batería de vectores a evaluar en este proyecto.

## **Generación de vectores de saRNA que expresen ligandos solubles de PD-1.**

Además de los vectores que expresan nanobodies contra checkpoints inmunes usaremos una estrategia paralela basada en expresar ligandos solubles de alta afinidad. Recientemente hemos confirmado que un dominio soluble de PD-1 humano mutado con alta afinidad<sup>21</sup> expresado a partir de células de mamífero tiene una altísima capacidad para inhibir las interacciones de PD1 con PD-L1 (datos no publicados). Se generarán vectores de SFV que expresen dicho dominio de forma monomérica o fusionado a un dominio CH3 de inmunoglobulina para permitir su dimerización, ya que esta estrategia incrementa aún más la afinidad de sPD-1 por su ligando<sup>21</sup>.

## **Electroporación de RNA de SFV en tumores de CCR**

El RNA de cada uno los vectores de SFV se sintetizará in vitro con polimerasa de SP6 y en presencia de un análogo de CAP. Posteriormente, se purificará el RNA por precipitación con LiCl, usando un protocolo que ya ha sido optimizado en nuestro laboratorio. También hemos optimizado las condiciones para la electroporación de RNA en tumores subcutáneos de adenocarcinoma de colon MC38 utilizando el sistema de electroporación (BTX) ECM 830. Hemos encontrado que las condiciones óptimas se basaron en la inyección intratumoral de 10 µg de saRNA seguida de ocho pulsos de 0.1 ms y 1200 V/cm. De hecho, cuando electroporamos saRNA de un vector SFV que expresa interleuquina-12 (SFV-IL-12) obtuvimos un 60% de regresiones completas en ratones inmunocompetentes, demostrando la eficacia de esta técnica (Silva-Pilipich et al. artículo en revisión en *Molecular Therapy Nucleic Acids*). La expresión in vivo en los modelos de CCR que empleemos se evaluará usando un saRNA que expresa luciferasa fusionada a GFP (GFP-Luc) midiendo su actividad por bioluminiscencia en ratones vivos utilizando un sistema PhotonImager (Biospace lab) a diferentes tiempos posteriores a la electroporación. Esta técnica se utilizará para evaluar la eficacia antitumoral con los vectores saRNA que expresan nanobodies que se han descrito en el apartado anterior.

## **Generación de nanopartículas catiónicas y optimización de la administración de saRNA en tumores de CCR**

El saRNA se sintetizará in vitro a partir de cada uno de los vectores de SFV y se purificará como se describió en la sección anterior. Las SLN (nanopartículas lipídicas sólidas) que incluyen saRNA se generarán mediante una tecnología desarrollada por el equipo del Dr. Carles Suñé (Instituto López Neyra, Granada) con el que hemos establecido una colaboración activa<sup>29</sup>. Brevemente, se utilizará un método de emulsificación con los siguientes componentes: ácido esteárico, octadecilamina y Ploxómero 188 (5:6:1), utilizando diferentes proporciones de RNA:lípidos. Para estudiar la eficiencia de transfección de estos compuestos in vivo, se generarán SLN que contengan RNA de SFV que exprese Luciferasa (vector SFV-GFP-Luc) y se inyectarán intratumoralmente en ratones C57BL/6 portadores de tumores MC38 subcutáneos. La expresión de luciferasa se analizará cómo se describió en el apartado anterior. Para cuantificar con mayor precisión la expresión en el tumor, se sacrificarán animales y se medirá la luciferasa en homogeneizados tumorales usando un luminómetro estándar. También se analizará la expresión de GFP en secciones histológicas de los tumores con un microscopio de fluorescencia, lo que permitirá estudiar la distribución de las SLN dentro del tumor. El RNA también se extraerá de los tumores y sus niveles se determinarán mediante RT-qPCR. Los datos obtenidos en este apartado nos permitirán determinar la formulación óptima de RNA-lípidos para la transducción tumoral. Los datos preliminares de nuestro grupo han demostrado que estos SLN son muy eficientes para transfectar células en cultivo con saRNA que expresa luciferasa. Paralelamente, también probaremos la eficacia de la transducción in vivo usando dos reactivos comerciales basados en polímeros (JetPEI in vivo y TransilT), que han mostrado un buen desempeño en varios estudios<sup>32</sup>. La mejor estrategia de transfección in vivo también se utilizará para evaluar la eficacia antitumoral con los diferentes vectores de saRNA que expresan los nanobodies que se han descrito en este proyecto.

### **Evaluación de la eficacia antitumoral del saRNA autorreplicante en tumores.**

Estos estudios permitirán probar el efecto antitumoral de cada uno de los vectores descritos en apartados anteriores. Para evaluar la eficacia antitumoral, utilizaremos dos modelos diferentes de tumores de adenocarcinoma de colon basados en la implantación de células MC38: tumores subcutáneos y tumores

ortotópicos de colon. En el último caso, los tumores se implantarán en la última sección del colon. Cuando los tumores alcancen un diámetro promedio de aproximadamente 5 mm, serán tratados de dos formas diferentes: electroporación después de la inyección de saRNA e inyección con saRNA conjugado con nanopartículas. Para simplificar estos estudios, cada modelo de tumor se probará en experimentos separados (al menos  $n = 6$  para cada vector en cada modelo de tumor). En todos los casos utilizaremos como control saRNA de SFV-GFP-Luc o solución salina. Para evaluar el efecto antitumoral, los tumores se medirán cada 2-3 días con un calibrador. También se seguirá la supervivencia a largo plazo de los animales. En estudios paralelos, también se analizarán los niveles séricos e intratumorales de proteínas heterólogas expresadas por vectores a diferentes tiempos posteriores al tratamiento. Esto es importante para determinar que la expresión de estas moléculas ocurre localmente. Además, este análisis nos permitirá determinar si las estrategias propuestas para aumentar la estabilidad y retención tumoral de los nanobodies están siendo efectivas. Además, también se evaluará la posible toxicidad mediante el seguimiento del peso de los animales. Los experimentos in vivo se repetirán al menos dos veces para confirmar su reproducibilidad.

### **Estudio de respuestas inmunes antitumorales en modelos animales.**

Se analizará la inducción de respuestas inmunes antitumorales específicas en ratones tratados en diferentes tiempos postratamiento, utilizando técnicas inmunológicas como IFN- $\gamma$  ELISPOT y "in vivo killing", mediante la estimulación de linfocitos con un péptido celular MC38 dominante (KSPWFTTL). También analizaremos las subpoblaciones de células inmunitarias (CD8+, CD4+, Tregs, MDSCs, etc.) en tumores, ganglios linfáticos de drenaje y sangre periférica mediante citometría de flujo. En este análisis, también incluiremos marcadores de activación, respuesta citotóxica y anergia (CD62L, CD44, granzima B, perforina, PD-1, CTLA-4, TIM3, LAG3, etc.). Las células CD8 específicas del tumor también se evaluarán mediante tinción con tetrámeros conjugados con el péptido KSPWFTTL. Finalmente, la memoria inmunológica se examinará mediante experimentos de "rechallenge" tumoral. Además, evaluaremos la expresión de PD-L1 en células tumorales mediante inmunohistoquímica, RT-qPCR y citometría de flujo.

## Presupuesto

### Material fungible

- Reactivos de biología molecular, enzimas, anticuerpos etc.	5.000€
- Reactivos cultivo celular	4.000€
- Material plástico	2.000€
- Ratones	10.000€
<b>Subtotal:</b>	<b>21.000€</b>

### Servicios

- Mantenimiento animales	8.000€
- Secuenciación	10.000€
- Histologías	5.550€
<b>Subtotal:</b>	<b>23.550€</b>

### Otros gastos

- Publicaciones	3.000€
Subtotal:	3.000€
<b>Total sin gastos indirectos:</b>	<b>47.550€</b>

Gastos indirectos (15%) 7.132,50€

**Total:** **54.682,50 €**