

## **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

### **ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS TILS DE TUMOR DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA: APROXIMACIÓN HACIA LA MEDICINA PERSONALIZADA**

#### **MEMORIA CIENTÍFICA**

##### **1. ANTECEDENTES**

El cáncer de mama (BC, del inglés Breast Cancer) es la enfermedad maligna más frecuente en mujeres y la segunda que más muertes produce, después del cáncer de pulmón.

Aunque existen tratamientos, como la quimioterapia, éstos no son siempre eficientes y un gran número de pacientes presentan enfermedad recurrente.

El BC se puede clasificar en diferentes subtipos en función del perfil génico, pero debido a la imposibilidad de realizar este tipo de estudios de forma rutinaria, éstos normalmente se agrupan en tres subtipos según su perfil inmunohistoquímico:

- tumores luminales que expresan receptores de estrógenos (RE) y/o receptores de progesterona (RP);
- tumores HER2-positivos, que sobreexpresan el receptor 2 del factor de crecimiento humano;
- y tumores triple negativos (TN), que no expresan ninguna de estas tres moléculas.

Para los tumores luminales o HER2-positivos existen alternativas terapéuticas de tipo hormonal o fármacos específicos contra la proteína HER-2, aunque no siempre funcionan, pero los BC-TN siguen siendo un gran desafío ya que en su mayoría no responden o lo hacen en un porcentaje muy bajo a los tratamientos disponibles actualmente.

##### **2. DESAFÍO**

Debido a la ausencia de una terapia efectiva, en los últimos años se ha puesto un especial interés en el papel que tiene el sistema inmune en esta enfermedad.

El sistema inmune está formado por un conjunto de moléculas (anticuerpos, citocinas, factores de crecimiento) y células (linfocitos T citotóxicos y T colaboradores) que se encargan de proteger al organismo eliminando patógenos, células infectadas, pero

también de detectar células propias (del mismo individuo) en caso de que se mueran o se conviertan en tumorales.

Por tanto, el sistema inmune en condiciones normales se encarga de mantener el organismo en estado de salud.

La investigación basada en el estudio de los mecanismos anti-tumorales que ejerce el sistema inmune ha dado avances generando diferentes estrategias de tratamiento o inmunoterapia, basadas en:

1. Factores de crecimiento, como el uso del factor GM-CSF para manejar y prevenir la leucopenia y/o neutropenia relacionada con la quimioterapia;
2. Anticuerpos monoclonales contra checkpoints inmunitarios como CTLA-4 o PD-1/PD-L1;
3. Células del sistema inmunitario tras su caracterización para poder manipularlas y diseñar vacunas, en muchos casos personalizadas.

A pesar de todos los avances y esfuerzos, la respuesta inmune contra el cáncer sigue sin conocerse de forma detallada.

El estudio de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs del inglés Tumor Infiltrating Lymphocytes) es otro de los campos de estudio de interés ya que éstos tienen relevancia como potenciales biomarcadores de pronóstico de la enfermedad. La presencia de TILs en los tumores parece ser indicativo de mejor pronóstico.

Aun así, sigue habiendo muy poca información sobre los distintos subtipos celulares de linfocitos T y B presentes o su funcionalidad.

Además, sigue habiendo controversia sobre a partir de qué porcentaje de TILs se considera significativo. Tanto el tipo de células como la cantidad son determinantes cruciales para el resultado global de la respuesta antitumoral.

### **3. ALCANCE Y OBJETIVOS**

Por eso, nuestro proyecto consiste en hacer un análisis exhaustivo de los TILs en pacientes con cáncer de mama, en todos los campos posibles de estudio a partir de una biopsia de tumor.

Teniendo en cuenta los antecedentes, los objetivos que nos hemos planteado son:

1. Evaluar de forma detallada las diferentes subpoblaciones linfocitarias infiltrantes en el tumor;
2. Realizar estudios funcionales de estas células para valorar su capacidad de activación y función efectora;
3. Caracterizar qué antígenos tumorales son reconocidos por las células T citotóxicas que les permiten eliminar a las células tumorales de forma efectiva.

Los resultados preliminares obtenidos a partir del estudio de una biopsia de BC-TN indican que existe diversidad en el tipo de TILs a lo largo de la biopsia tanto en el patrón de moléculas efectoras que secretan, como en su función.

Pero las diferencias interindividuales hacen que se deban de estudiar un número elevado de biopsias para poder sacar conclusiones generales. El estudio exhaustivo de la biopsia permite caracterizar profundamente los TILs a nivel individual que es el inicio de lo que actualmente se llama la medicina personalizada hacia el enfermo.

#### 4. EQUIPO

Los proyectos de investigación que coordinan oncólogos médicos desde el Servicio de Oncología del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid) y el Instituto Oncológico IOB (Madrid y Barcelona), bajo el liderazgo del Doctor Cortés y con el apoyo e implicación de un equipo médico-sanitario de primer nivel y reconocido a nivel nacional e internacional. Numerosos centros nacionales e internacionales colaboran en estos proyectos.

Contamos con el soporte de dos hospitales de referencia en España, que disponen de infraestructuras, equipos científicos y equipamientos de última generación. Nuestra misión y prioridad es poder realizar un diagnóstico precoz, ofrecer un tratamiento multidisciplinar y atender de forma personalizada a nuestras pacientes con cáncer.

#### 5. PRESUPUESTO

##### FUNGIBLES Y SIMILARES

|   | <b>Coste<br/>Unidad</b> | <b>20 biopsias</b>  |   |
|---|-------------------------|---------------------|---|
| Material de cultivos                          |                         | 10.000,00 €         | Medios, antibióticos, suero fetal bovino, suero humano, citocinas, aCD3/aCD28 |
| Anticuerpos y reactivos para citometría       |                         | 12.000,00 €         | aCD4, aCD8, aCD3  |
| Placas y reactivos para análisis de citocinas | 1.500,00 €              | 30.000,00 €         | Kits de análisis multiplex  |
| Reactivos para estudio de los TCRs            | 1.700,00 €              | 34.000,00 €         | Kits SMARTer  |
| Reactivos de biología molecular               | 800,00 €                | 16.000,00 €         | Kits de extracción de RNA, retrotranscripciones y RT-PCRs                     |
| <b>SubTotal</b>                               |                         | <b>102.000,00 €</b> |   |

##### GASTOS DE SERVICIOS

|                        | <b>Coste<br/>Unidad</b> | <b>20 biopsias</b> | <b>Justificación de uso</b>                        |
|------------------------|-------------------------|--------------------|--|
| Servicio de Citometria | 350,00 €                | 7.000,00 €         | Ánalisis de tinciones y sorting celular en cultivo |

|                                    |            |                       |  |
|------------------------------------|------------|-----------------------|--|
| Servicio de Protección Radiológica |            | 2.000,00 €            | Irradiación de células feeder para crecer TILs   |
| Servicio de Secuenciación          | 2.300,00 € | 42.000,00 €           | Secuenciaciones de última generación de los TCRs   |
| Servicio de Criobiología           |            | 3.000,00 €            | Almacenaje y mantenimiento de los bancos celulares   |
| Servicio de Bioinformática         |            | 3.000,00 €            | Ánalisis de la secuenciación de los TCRs   |
| Servicio Proteómica                | 2.500,00 € | 50.000,00 €           | Ánalisis de los péptidos eluidos presentados por células dendríticas pulsadas con líneas tumorales o tumores         |
| Servicios del BST                  | 200,00 €   | 4.000,00 €            | Tipajes de las muestras  |
| Preparación del manuscrito         | 8.000,00 € | 8.000,00 €            | Preparación del manuscrito, gestión de publicaciones y gastos de presentación de los datos en congreso internacional |
| <b>Sub Total</b>                   |            | <b>€ 119.000,00 €</b> |  |

#### FUNGIBLES PARA PROTEOMICA

|                  |  |                      |  |
|------------------|--|----------------------|--|
| x 2 años         |  | 35.000,00 €          | Bolas magnéticas para inmunoprecipitación<br>Material de plástico<br>Enzimas para la digestión de tejido<br>Anticuerpos purificados para inmunoprecipitación<br>Columnas de Sefarosa para inmunoprecipitación<br>Filtros de separación de moléculas de bajo peso molecular |
| <b>Sub Total</b> |  | <b>€ 35.000,00 €</b> |  |

|                                  |  |                     |  |
|----------------------------------|--|---------------------|--|
| <b>Sub Total (Sin Overheads)</b> |  | <b>256.000,00 €</b> |  |
| Overheads (25% del total)        |  | 64.000,00 €         |  |
| <b>TOTAL</b>                     |  | <b>320.000,00 €</b> |  |