




**Abordare terapeutică combinatorie bazată pe
transferul adoptiv de celule NK și inhibitor al
TGFBRI/II în melanomul metastatic
PN 23.16.02.02**

CSIII Dr. Gheorghia ISVORANU

LABORATOR BIOBAZĂ



Scopul proiectului este stabilirea profilului molecular al celulelor NK pentru monitorizarea răspunsului antitumoral și identificarea unei metode inovative de imunoterapie în melanom metastatic, având în vedere tendințele actuale ale medicinei de precizie în stadiile avansate de cancer.

- Capacitatea înnăscută a celulelor NK de a elimina celulele tumorale le-a făcut un bun candidat pentru imunoterapia cancerului, imunoterapiile anti-tumorale bazate pe celule NK sunt investigate de zeci de ani. În 2021 erau în desfășurare 288 de studii clinice care utilizau imunoterapii bazate pe celule NK pentru tratamentul tumorilor maligne hematologice sau solide.
 - Suprimarea activității celulelor NK în micromediul tumoral este cauzată de o serie de mecanisme, două dintre cele mai importante mecanisme fiind reducerea expresiei receptorilor de activare de pe celule NK și producerea de citokine cu rol inhibitor al activității citotoxice.
 - Factorul de creștere transformator beta (TGF- β) afectează puternic activitatea celulelor NK prin reducerea producției de IFN- γ , scăderea expresiei receptorilor de activare a celulelor NK (NKG2D, NKp30, NKp46), reducerea capacității citotoxice a celulelor NK și, astfel, a activității lor antitumorale.
-

Studiile anterioare:

Celulele NK au fost reduse ca număr și au un fenotip distinct cu funcție citotoxică afectată în modelele de melanom de șoarece (Isvoranu G et al, *Oncol Lett*, 2019, 17, 4197-4206. doi: 10.3892/ol.2019.10069; Isvoranu et al., *Eur. J. Immunol.* 2021, 51(Suppl. 1), 339, DOI: 10.1002/eji202170200).

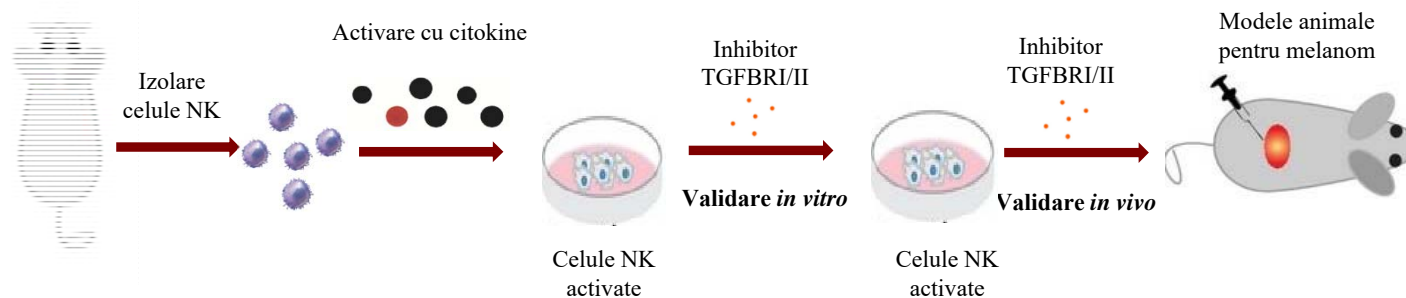
Tratamentul precoce cu IL-15 (IL15/IL-15R α -Fc) a încetinit progresia tumorii și a determinat creștere semnificativă a celulelor NK splenice activate (Isvoranu G. et al, *Farmacia* 2015, 63, 631-636).

Transferul adoptiv de celule NK preactivate de citokine (IL-12, IL-15 și IL-21) la șoarecii purtători de melanom a dus la reducerea volumului tumorii (Isvoranu G. et al, *Eur. J. Immunol.* 2019b, 49 (Suppl. 3): 1801. DOI: 10.1002/eji.201970400).

- ❖ Pe baza experienței anterioare, în acest proiect urmărim activarea celulelor NK cu citokine și administrarea lor împreună cu un inhibitor al receptorului TGF- β . Celulele NK vor deveni mai puțin sensibile la TGF- β și vor fi apte să își exercite capacitatea citotoxică. Această **abordare este una inovativă**, până în prezent nu există niciun studiu referitor la administrarea LY2109761 (inhibitor TGFBR1/II) împreună cu celule NK activate cu citokine ca strategie terapeutică în melanom metastatic.
 - ❖ La sfârșitul acestui proiect, vom putea livra un protocol optimizat și robust pentru activarea cu citokine a celulele NK și, totodată, vom propune un nou protocol de imunoterapie bazat pe administrare de celule NK și inhibitor al TGFBR1/II în tratamentul melanomului.
-

OBIECTIVE

- **O1. Generarea de celule NK activate cu citokine**
- **O2. Validare *in vitro* a activității crescute antitumorale a celulelor NK activate cu citokine și a tratamentului cu inhibitor al TGFBR1/II**
- **O3. Validare *in vivo* a activității crescute antitumorale a celulelor NK activate cu citokine și a tratamentului cu inhibitor al TGFBR1/II ca un potențial candidat pentru terapia cancerului utilizând modele murine de melanom**



OBIECTIVE DE DEZVOLTARE INSTITUȚIONALĂ

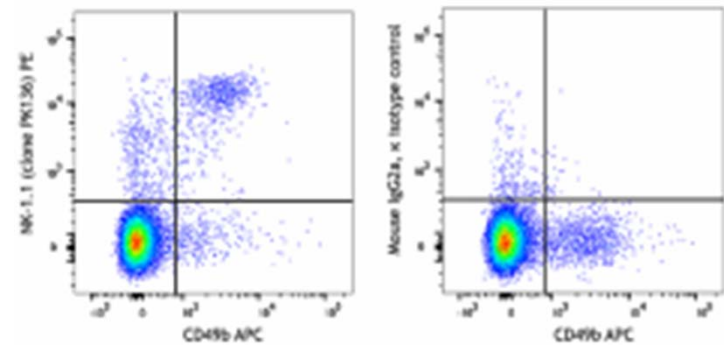
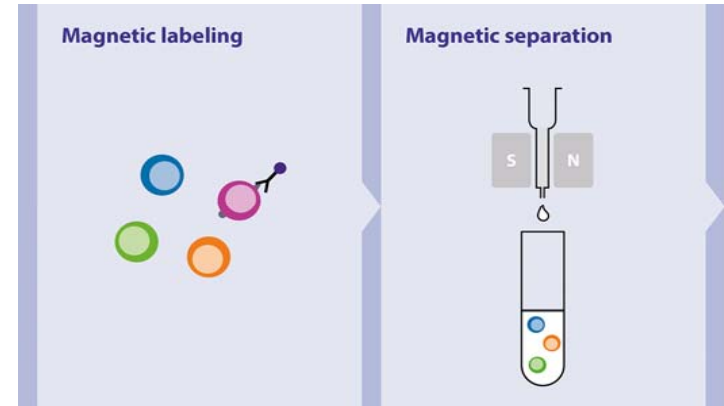
- Implementarea unor metodologii și abordări terapeutice noi bazate pe transferul adoptiv de celule NK în melanomul metastatic
 - Creșterea vizibilității internaționale prin publicații și comunicări științifice în domeniul imunoterapiei în cancer
 - Dezvoltarea carierei științifice a membrilor echipei prin generarea de rezultate originale în domeniul de vârf abordat în proiect
 - Instruirea tinerilor cercetători prin participare activă la un proiect de înalt nivel științific și tehnologic
 - Achiziția de noi echipamente
 - Stabilirea de noi parteneriate și consolidarea colaborărilor existente în domeniul tematicii proiectului
-

Diagrama GANTT

	2023	2024	2025	2026
PL1 Generarea celulelor NK activate cu citokine				
Faza 1 Generarea celulelor NK activate cu citokine				
PL2 Validare in vitro a activității crescute antitumorale a celulelor NK activate cu citokine și a tratamentului cu inhibitor al TGFBRI/II				
Faza 2 Evaluarea funcționalității celulelor NK activate cu citokine și a tratamentului cu inhibitor al TGFBRI/II în sisteme experimentale cu linii tumorale standardizate				
PL3 Validare in vivo a activității crescute antitumorale a celulelor NK activate cu citokine și a tratamentului cu inhibitor al TGFBRI/II ca un potențial candidat pentru terapia cancerului utilizând modele murine de melanom				
Faza 3 Evaluare potențialului terapeutic al transferului adoptiv de celule NK activate cu citokine în model experimental de metastază				
Faza 4 Evaluarea potențialului terapeutic al tratamentului combinat în model experimental de metastază				
Strategie de exploatare a rezultatelor				
Proprietate intelectuală și Cerere de brevet				
Diseminarea rezultatelor				
Prezentări orale/poster la manifestări științifice				
Publicare în reviste încadrate Q1, Q2				
Dezvoltare abilități, plan de carieră				
Supraveghere doctoranzi				
Participare la cursuri, workshop-uri, seminarii				
Stabilirea de noi colaborări, participarea la întâlniri COST, etc				

01. Generarea de celule NK activate cu citokine

- Generarea celulelor NK activate cu citokine:
- Izolare **celulele NK** din splină (Șoareci C57BL/6) și cultivare în prezența **citokinelor** (IL-12, IL-15, IL-18) și **TGF- β**
- Evaluare fenotipică: receptori activatori/inhibitori (NKp46, NKG2D, DNAM-1, KLRG1), receptori pentru chemokine și citokine (CXCR3, CXCR4, CX₃CR1, CD25, CD122, CD132).
- Evaluare funcțională: producția de IFN γ , Perforină, Granzima B.



Generarea de celule NK activate cu citokine - 2023

Ținte/Livrabile

- obținere celule NK cu activitate citotoxică crescută
- protocoale de obținere și activare a celuleor NK
- protocoale de activare a celuleor NK
- metodă de evaluare a activității citotoxice a celuleor NK.

Indicatori

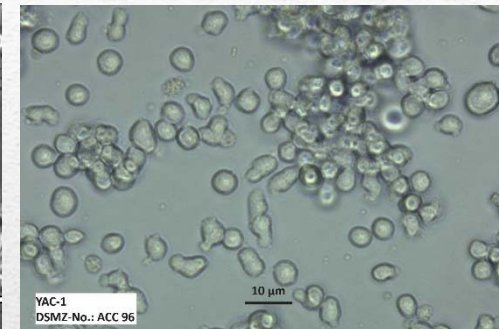
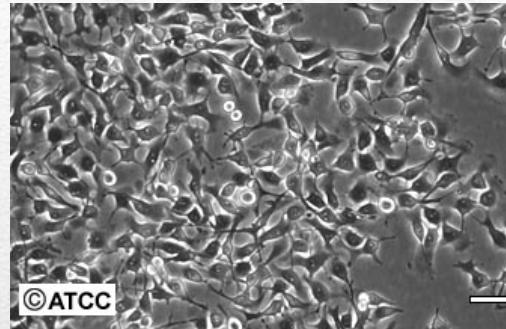
- 1 articol științific;
 - 2 prezentări și/sau postere;
 - 1 studiu de fază
-

Evaluarea funcționalității celulelor NK activate cu citokine în sisteme experimentale cu linii tumorale standardizate

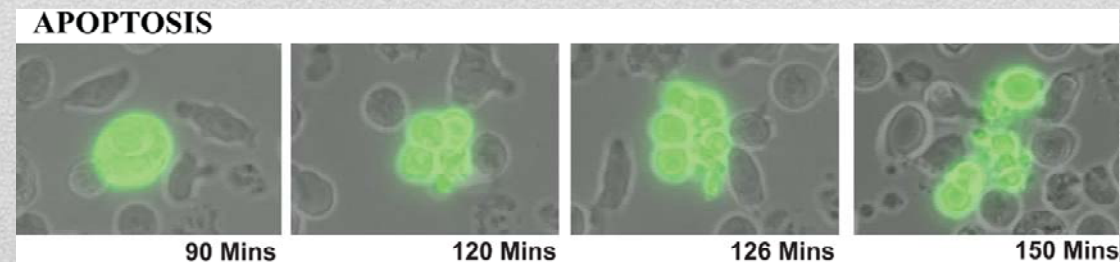
Co-cultură celulelor NK și celulelor tumorale în prezența inhibitorului TGFBR1/II.

Linii celulare standardizate:

- melanom șoarece B16F10
- limfom șoarece YAC-1



- Evaluare fenotipică: markeri de activare, de maturare, receptori ai citokinelor, markeri de metabolism ai celulelor NK, molecule de adeziune
- Evaluare funcțională: producția de IFN γ , Perforină, Granzima B; Capacitatea de degranulare (LAMP-1); Capacitatea citotoxică față de celule țintă.



SS Somanchi et al, PLoS One, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0141074

Evaluarea funcționalității celulelor NK activate cu citokine în sisteme experimentale cu linii tumorale standardizate

Ținte/Livrabile

- identificarea posibili markeri moleculari pe celule NK pentru monitorizarea răspunsului antitumoral
- metodă de evaluare a activității citotoxice a celulelor NK în sisteme experimentale cu linii tumorale standardizate

Indicatori

- 1 articol științific;
 - 2 prezentări și/sau postere;
 - 1 studiu de fază
-

03. Validare *in vivo* activității crescute antitumorale a celuleor NK activate cu citokine și a tratamentului cu inhibitor al TGFBR1/II ca un potențial candidat pentru terapia cancerului utilizând modele murine de melanom

Model melanom metastază pulmonară obținut prin injectare i.v. a celule B16F10.

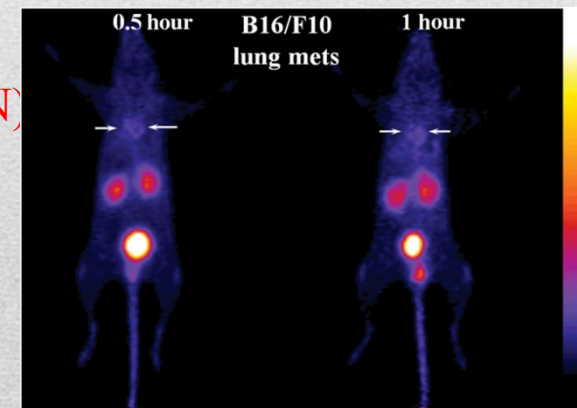


- Șoareci C57Bl/6J și B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J
- Șoareci donatori: C57BL/6J-Ptprc^{em6Lutzy}/J – se vor preleva celule NK pentru transfer adoptiv

Evaluare potențialului terapeutic al transferului adoptiv de celule NK activate cu citokine în model experimental de metastază

Se vor transfera adoptiv, prin inculcare i.v., celule NK activate cu citokine la animale purtătoare de metastaze pulmonare.

- Evaluare fenotipică și funcțională a celulelor NK transferate și ale animalului primitor
- Biodistribuția și persistența celulelor NK transferate (splină, plamâni)
- Monitorizarea *in vivo* a tratamentului (RMN/PET RMN)



J Yang et al, 2018, Sci. Transl. Med. [DOI: 10.1126/scitranslmed.aau444](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau444)

Evaluare potențialului terapeutic al transferului adoptiv de celule NK activate cu citokine în model experimental de metastază - 2025

Ținte/Livrabile

- identificare schemă terapeutică optimă de transfer adoptiv de celule NK în melanomul metastatic
- protocol de transfer adoptiv al celulelor NK
- Metodă de evaluare a potențialului terapeutic al celulelor NK

Indicatori

- 1 articol științific;
 - 2 prezentări și/sau postere
 - 1 studiu de fază
-

Evaluarea potențialului terapeutic al tratamentului combinat în model experimental de metastază

- Se vor administra diferite doze de inhibitor al TGFBR1/II la șoareci purtători de metastaze și se va selecta doza optimă de inhibitor al TGFBR1/II și schema de tratament.
 - Se vor transfera adoptiv celule NK activate și inhibitor TGFBR1/II la animale purtătoare de metastaze pulmonare conform schemei de tratament stabilite.
 - Se vor utiliza și șoareci B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J pentru a valida rolul terapeutic al celulele NK.
-
- Evaluare fenotipică și funcțională a celulelor NK transferate și ale animalului primitor
 - Biodistribuția și persistența celulelor NK transferate (splină, plămâni)
 - **Monitorizarea *in vivo* a tratamentului (RMN/PET RMN)**
-

Evaluarea potențialului terapeutic al tratamentului combinat în model experimental de metastază - 2026

Ținte/Livrabile

- identificare doze optime de TGFBR1/II pentru administrarea preclinică ca tratament în melanomul metastatic
- validarea *in vivo* a activității antitumorale a tratamentului combinat
- protocol de administrarea a inhibitorului TGFBR1/II
- metodă de evaluare a potențialului terapeutic al inhibitorului TGFBR1/II
- soluție de abordare imunoterapeutică inovatoare



Indicatori

- 1 articol științific
- 2 prezentări și/sau postere
- 1 cerere de brevet
- 1 studiu de fază
- 1 Raport final

