



This is the **published version** of the bachelor thesis:

Herrera González, Sergi; Álvarez Pérez, Iñaki, dir. Desenvolupament d'una immunoteràpia basada en vesícules de membrana externa d'Escherichia coli per a la presentació de neoantígens tumorals en càncer colorectal. 2025. (Grau en Microbiologia)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/317402>

under the terms of the  license



TREBALL DE FI DE GRAU

Desenvolupament d'una immunoteràpia basada en vesícules de membrana externa d'*Escherichia coli* per a la presentació de neoantígens tumorals en càncer colorectal.

Autor: Sergi Herrera González

Grau: Microbiologia

Facultat: Biociències

Tutor: Iñaki Álvarez Pérez

Tipologia: Projecte de recerca

Data de lliurament: 31/05/2025

Resum

El càncer de còlon és una de les grans causes de mortalitat arreu del món. Encara que hi ha moltes opcions de tractament, un alt nombre de pacients presenten resistència o recidiva, sobretot en tumors amb poca immunogenicitat. Davant d'aquest problema, aquest estudi analitza la possibilitat de desenvolupament d'una estratègia d'immunoteràpia personalitzada basada en vesícules de membrana externa (OMVs) d'*Escherichia coli*, millorades per expressar neoantígens tumorals a la seva superfície provinents dels gens *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* mutats. A través d'eines in silico, es van escollir mutacions que provoquen proteïnes aberrants immunògenes amb alta afinitat pels al·lels HLA més comuns en la població caucàsica. A continuació es dissenyen construccions recombinants per expressar els neoantígens amb proteïnes de superfície externa de les OMVs. Es preveu avaluar l'expressió antigènica, l'activació de cèl·lules immunes in vitro i la resposta antitumoral en models murins humanitzats amb HLA transgènics. Aquest sistema vol presentar una nova estratègia vacunal adaptable al perfil genètic, en context de l'haplotip d'HLA del pacient, amb aplicació directa en tumors MSI-H. Els resultats esperats podrien assentar les bases d'una immunoteràpia segura, eficaç i personalitzada contra el càncer colorectal. A més, es presenta com una ajuda potencial antitumoral amb la combinació amb inhibidors de CheckPoints del sistema immune.

Índex

1.	Antecedents	4
2.	Resultats previs	5
2.1.	Identificació de mutacions candidates a neoantígens.	5
2.2.	Validació in silico dels neoantígens	5
3.	Hipòtesis i objectius.....	6
4.	Materials i mètodes	7
4.1.	Construcció de les fusions gèniques, clonació en vector d'expressió pBAD18s i transformació en <i>Escherichia coli</i> $\Delta tolR$	8
4.2.	Producció i purificació de vesícules extracel·lulars de membrana o OMVs.	9
4.3.	Verificació de la presència i exposició del neoantigen a les OMVs.....	9
4.4.	Avaluació de la presentació antigènica amb PBMCs i limfòcits T.	10
4.5.	Mesura de l'activitat cel·lular immune.....	11
4.6.	Avaluació preliminar de la toxicitat de les OMVs in vitro.	11
4.7.	Assajos in vivo	12
4.8.	Assajos de toxicitat in vivo.....	13
5.	Resultats esperats, impacte social i limitacions	14
6.	Cronograma del projecte.....	15
7.	Pressupost i pla de difusió	15
8.	Referències	17

1. Antecedents

El càncer colorectal (CRC, per les sigles en anglès) és el tercer tipus de càncer més comú i representa la segona causa de mortalitat oncològica a escala mundial. Presenta una elevada taxa de morbiditat i mortalitat, així com mecanismes evolutius propis i ben diferenciats (1–3). La supervivència mitjana se situa al voltant del 65% tot i que varia significativament segons l'estadi en el moment del diagnòstic (4). El desenvolupament del CRC sol ser asimptomàtic en les primeres fases i segueix un procés multietapa. Habitualment s'inicia a partir de pòlips benignes que, a causa de l'acumulació progressiva de mutacions genètiques i alteracions epigenètiques, deriven en transformacions histològiques i morfològiques malignes característiques del CRC (3,5).

Un dels grans reptes clínics és l'elevada heterogeneïtat biològica que presenta, tant en la seva progressió com en la resposta als tractaments, fins i tot entre pacients amb el mateix estadi de la malaltia. Aproximadament el 85% dels casos es caracteritzen per una inestabilitat cromosòmica (CIN/MSS), sovint associada a mutacions puntuals en gens supressors de tumors com *TP53* i *KRAS*. El 15% restant presenta defectes en el sistema de reparació de l'ADN (MMR), originant tumors amb alta inestabilitat de microsatèl·lits (MSI-H), els quals generen un elevat nombre de neoantígens immunògens. Aquesta càrrega mutacional confereix als tumors MSI-H un fenotip "calent", més susceptible a la resposta immune (3–6).

El tractament convencional del CRC inclou combinacions de cirurgia, radioteràpia, quimioteràpia i immunoteràpia estàndard, ajustades a les característiques de cada pacient i a la resectabilitat del tumor. Tot i aquest ampli arsenal terapèutic, prop del 50% dels pacients acaben desenvolupant formes recurrents i incurables de la malaltia, amb una disminució progressiva de la supervivència. A més, s'observen casos de toxicitat elevada, resistència als fàrmacs i presència de tumors amb baixa immunogenicitat ("freds"), factors que limiten l'eficàcia dels tractaments actuals (2,4,7,8).

Davant d'aquest escenari, resulta urgent desenvolupar estratègies terapèutiques més innovadores i eficients. Les immunoteràpies emergents com els inhibidors de CheckPoints (*Pembrolizumab* i *Nivolumab*), i les cèl·lules CAR-T específiques de tumors, han obert noves perspectives clíniques més personalitzades (2,4). Paral·lelament, s'estan explorant enfocaments basats en vectors microbians, com bacteris o virus modificats genèticament, per estimular una resposta immune específica contra les cèl·lules tumorals (8,9).

A causa de la seva facilitat amb la manipulació genètica i la seva capacitat per produir vesícules de membrana externa (OMVs), un dels bacteris més explorats per al desenvolupament de vacunes i immunoteràpies és *Escherichia coli*. Aquestes OMVs mencionades es defineixen com a nanopartícules amb forma esfèrica, d'entre 2 i 200 nm

de diàmetre, que contenen components de la membrana externa i del periplasma de la bactèria, inclòs lipopolisacàrids (LPS), proteïnes de membrana i altres molècules immunoestimulants. Diversos estudis demostren el potencial de les OMVs com a eina en la immunoteràpia contra el càncer. Per exemple, s'ha vist que poden estimular respostes immunitàries adaptatives mitjançant l'activació de limfòcits T CD8+ específiques per antígens tumorals (9–12).

Una línia d'investigació prometedora consisteix a aprofitar la forta immunogenicitat dels tumors MSI-H per dissenyar immunoteràpies capaces d'induir respostes antitumorals. Aquest enfocament, basat en la identificació de neoantígens específics i la seva presentació de manera exògena a partir de OMVs produïdes per *Escherichia coli*, pot donar lloc a vacunes personalitzades capaces de reprogramar el sistema immunitari i millorar la resposta en tumors amb baixa immunogenicitat (9,13–15).

2. Resultats previs

2.1. Identificació de mutacions candidates a neoantígens.

Per la recerca de mutacions potencialment generadores de neoantígens, es va utilitzar la plataforma bioinformàtica *cBioPortal for Cancer Genomics*, aquesta permet l'anàlisi d'una àmplia selecció de dades genòmiques obtingudes de diferents consorcis (16). Específicament, es va seleccionar l'estudi "Colorectal Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)" per l'ampli número mostral que presenta i l'elevada qualitat genòmica. A través del mòdul de mutacions del portal, es van filtrar les mostres classificades com MSI-H.

Es van prioritzar les mutacions de tipus *missense* i *frameshift* localitzades en gens associats al CRC MSI-H, com són *MLH1*, *MSH2* i *MSH6*. Són aquestes les mutacions que es consideren potencials fonts de proteïnes aberrants pel seu impacte directe en la seqüència d'aminoàcids, i per tant les més immunògenes (3,17,18).

2.2. Validació in silico dels neoantígens

Un cop identificades les mutacions més prometedores a generar neoantígens, es va procedir a la seva validació *in silico* mitjançant eines de predicció d'afinitat peptídica als al·lels HLA més freqüents en la població caucàsica. Com ara HLA-A02:01, HLA-A01:01, HLA-B07:02, HLA-B08:01 (tipus I) i HLA-DRB107:01 i HLA-DRB115:01 (de tipus II). Aquest són els més prevalents descrits en estudis recents de seqüenciació massiva d'HLA i que es poden validar amb els mètodes bioinformàtics descrits a continuació (19–21).

Per les mutacions de tipus *missense*, es va modificar manualment la seqüència de la proteïna obtinguda de *UniProtKB*, substituint l'aminoàcid afectat per la versió mutada. Es van seleccionar pèptids d'entre 9 i 15 aminoàcids que continguessin la mutació i es va

introduir als portals *NetMHCpan* (al·lels HLA de classe I) i en *NetMHCIIpan* (al·lels HLA de classe II) amb la configuració de base, modificant només la llargada del pèptid introduït i les formes al·lèliques que es volien provar (esmentades anteriorment). Tot això amb l'objectiu de predir la seva capacitat d'unió (17,22).

En el cas de les mutacions *frameshift*, es va descarregar la seqüència codificant del gen (CDS) des del portal *NCBI* i es va editar el nucleòtid corresponent per simular la mutació. La seqüència resultant es va traduir a la seva forma proteica utilitzant *ExPASy Translate Tool* i la proteïna mutada es va sotmetre igualment a anàlisis amb *NetMHCpan* i *NetMHCIIpan* per predir possibles neoantígens amb alta afinitat per MHCI i MCHII.

Els resultats obtinguts ens mostren que tres dels gens provats amb diferents mutacions tenen afinitat d'unió per alguns dels al·lels HLA descrits anteriorment. El primer gen seleccionat va ser *MLH1* amb les mutacions G67R, R217C, R385H i R497Gfs*11 (del). Aquestes mutacions fan que les pèptids mutats s'uneixin als al·lels HLA-A02:01, HLA-A01:01, HLA-BO7:02, HLA-B08:01 (tipus I) i HLA-DRB107:01 i HLA-DRB115:01 (de tipus II). El següent gen seleccionat va ser *MSH2* amb les mutacions: K353N, R406Q i M83I. Els pèptids aberrants que esdevenen d'aquestes mutacions son capaços d'unir-se a HLA-A02:01, HLA-A01:01, HLA-BO7:02 i HLA-B08:01 (tipus I). L'últim gen identificat va ser *MSH6* amb les mutacions: K13T i H130N, les proteïnes resultants d'aquestes mutacions s'uneixen in silico a HLA-A02:01, HLA-A01:01, HLA-BO7:02, HLA-B08:01 (tipus I) i HLA-DRB107:01 i HLA-DRB115:01 (de tipus II) (Taula 1). Una vegada es van detectar el gens mutats més immunògens es demanen comercialment, de manera que l'empresa optimitzarà els codons perquè es puguin traduir de manera fidel a *Escherichia coli*.

Taula 1: gens i mutacions seleccionades i afinitat HLA de cada neoantígen.

GEN	MUTACIONS	AFINITAT HLA
MLH1	G67R, R217C, R385H i R497Gfs*11 (del)	HLA-A02:01, HLA-A01:01, HLA-BO7:02, HLA-B08:01 (tipus I) i HLA-DRB107:01 i HLA-DRB115:01 (de tipus II).
MSH2	K353N, R406Q i M83I	HLA-A02:01, HLA-A01:01, HLA-BO7:02, HLA-B08:01 (tipus I)
MSH6	K13T i H130N	HLA-A02:01, HLA-A01:01, HLA-BO7:02, HLA-B08:01 (tipus I) i HLA-DRB107:01 i HLA-DRB115:01 (de tipus II).

3. Hipòtesis i objectius

La hipòtesi del projecte planteja que les vesícules de membrana externa (OMVs) derivades d'*Escherichia coli*, modificades genèticament per expressar neoantígens tumorals humans, poden induir una resposta immune eficaç contra el tumor colorectal en models murins humanitzats transgènics per diferents HLA. Amb aquesta base podríem establir tractaments altament personalitzats. Per definir els objectius m'he basat en els resultats previs obtinguts in silico descrits anteriorment.

El primer objectiu consisteix a dissenyar construccions gèniques que permetin l'expressió superficial dels neoantígens mutats seleccionats fusionats a proteïnes de membrana d'*E.coli*, per l'exposició i incorporació a les OMVs. Per tant, es produiran i purificaran OMVs recombinants en condicions controlades de cultiu i es verificarà la presència i l'exposició del neoantigen amb tècniques moleculars.

El segon objectiu permetrà avaluar la capacitat de les OMVs *in vitro* per activar cèl·lules dendrítiques i induir l'activació de limfòcits T CD4+ i CD8+, així com analitzar el potencial tòxic en aquestes línies cel·lulars. Es farà a través de co-cultius i mesures de l'activitat immune a nivell cel·lular amb tècniques d'identificació.

Finalment, l'últim objectiu se centra en la validació *in vivo* de l'eficàcia i la seguretat del sistema, mitjançant l'administració de les diferents formulacions d'OMVs en ratolins transgènics per diferents al·lels HLA amb tumors colorectals establerts. Es monitoraran diferents paràmetres, com el volum tumoral o la infiltració immunitària, així com la toxicitat mitjançant anàlisis histològiques i bioquímiques.

Aquests tres objectius, junt amb les diferents tècniques, permetrà avaluar el potencial de les OMVs com a plataforma vacunal dirigida a neoantígens en contextos HLA definits en models murins transgènics humanitzats.

4. Materials i mètodes

Aquest projecte s'estructura en diferents paquets de treball, amb l'objectiu de definir una metodologia segmentada en fases (Fig. 1). Aquesta divisió permet establir fites parcials que faciliten la detecció de punts crítics en el procés i possibiliten la implementació d'alternatives estratègiques davant possibles riscos.

La divisió esmentada es basa en: l'obtenció d'una fàbrica cel·lular de vesícules de membrana extracel·lular (OMVs) recombinants, l'avaluació de la teràpia *in vitro* i demostració de l'eficàcia *in vivo* amb models murins humanitzats.

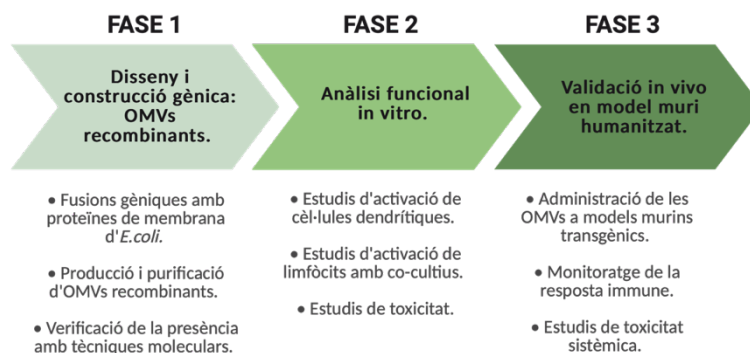


Fig. 1: flux de treball proposat del projecte. Es mostren les diferents fases a seguir que corresponen als objectius establerts en l'apartat anterior. **Font:** elaboració pròpia amb BioRender.

4.1. Construcció de les fusions gèniques, clonació en vector d'expressió pBAD18s i transformació en *Escherichia coli* $\Delta tolR$.

Per a l'expressió dels neoantígens seleccionats en vesícules de membrana externa (*Outer Membrane Vesicles*, OMVs), es dissenyarà una estratègia de fusió gènica amb dues proteïnes d'*Escherichia coli* (Fig. 1). L'objectiu és obtenir una presentació eficient dels pèptids mutats a través tant del complex MHC de classe I com de classe II, maximitzant així la capacitat immunògena de les OMVs recombinants.

Amb aquesta finalitat, se seleccionarà com a proteïna per la fusió la toxina *ClyA*, amb funció transportadora de proteïnes de membrana externa. Aquesta afavoreix la presentació per MHC-I gràcies al processament intracel·lular (12,23). A més, es combinarà amb *OmpA*, una proteïna amb funció estructural que és molt abundant a la membrana externa i que afavoreix la captació de les OMVs per APCs i facilita el processament endosomal, contribuint a la presentació per MCH-II (24,25). Per tant, una doble fusió del neoantigen permetrà una presentació creuada del neoantigen tant per la via citosòlica (MCH-I) com per la via endosomal (MCH-II).

Per garantir una elevada producció de OMVs i facilitar la purificació del sistema, se seleccionarà la soca *E. coli* $\Delta tolR$, una variant modificada que presenta una sobreproducció natural de vesícules de membrana a conseqüència de la disrupció de l'estructura del complex Tol-Pal (26). Es construiran tres fusions gèniques, que es basen en els dos gens esmentats (*ClyA-OmpA*) i un gen mutat a cadascuna: *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* (Fig. 2).

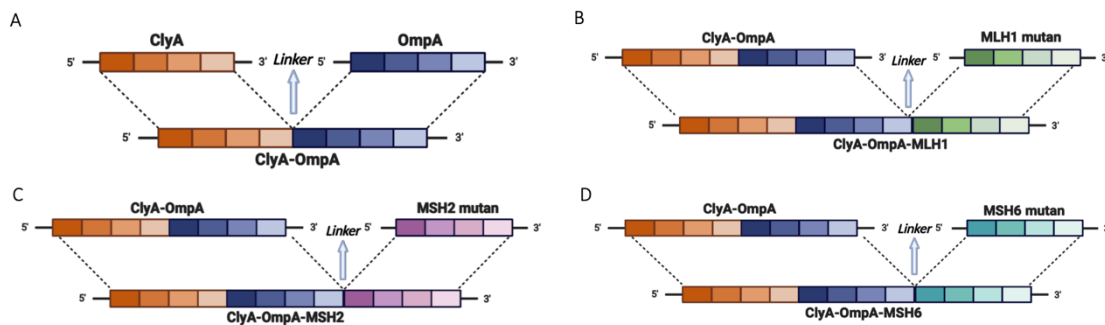


Fig. 2: fusions gèniques transcripcionals emprades en aquest projecte. A) fusió gènica dels gens d'*Escherichia coli* responsables de la localització de les proteïnes aberrants. B) Fusió gènica A amb el gen *MLH1* mutat. C) Fusió gènica A amb el gen *MSH2* mutat. D) Fusió gènica A amb el gen mutat *MSH6*.

Font: elaboració pròpia amb BioRender.

Les seqüències gèniques fusionades es clonaran en un plasmidi de sobreexpressió proteica sota un promotor induïble, *pBAD18s*, per permetre el control de l'expressió i optimitzar la càrrega antigènica de les OMVs. És un promotor regulable per L-arabinosa que evita efectes tòxics derivats de l'expressió proteica, a més, conte una resistència a l'ampicil·lina mitjançant el gen *bla* i una etiqueta 6xHis a l'extrem C-terminal per facilitar la posterior detecció de la proteïna de fusió (27,28) (Fig. 2).

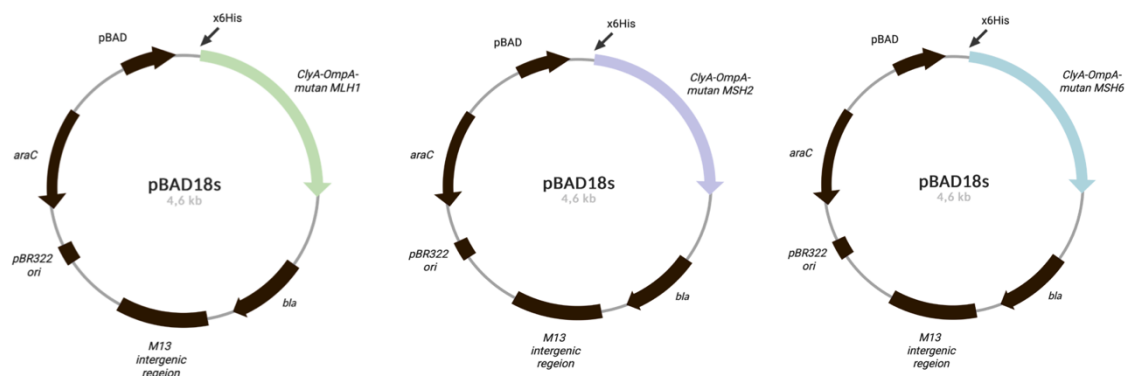


Fig. 3: plasmidi *pBAD18s* amb la construcció de la fusió gènica amb l'insert corresponent. Un plasmidi per cada insert. **Font:** elaboració pròpia amb BioRender.

A continuació, un cop transformades, per electroporació, en les soques esmentades anteriorment (*E. coli ΔtolR*), es cultivaran en condicions controlades per a la producció i posterior purificació de vesícules, que s'utilitzaran en les anàlisis funcionals posteriors.

4.2. Producció i purificació de vesícules extracel·lulars de membrana o OMVs.

Les vesícules de membrana externa es produiran mitjançant una soca hiperproductora d'*Escherichia coli* ($\Delta tolR$), transformada amb un plasmidi recombinant que codificarà la proteïna de fusió ClyA-OmpA-neoantigen. Els cultius es realitzaran en medi LB amb ampicil·lina (100 µg/mL) i s'induirà l'expressió mitjançant L-arabinosa (0,2% p/v) un cop assolit el creixement logarítmic. L'expressió és dura a terme a 16 °C amb agitació durant una incubació prolongada (23,25,27).

Les OMVs es purificaran a partir del sobrenedant del cultiu líquid mitjançant una centrifugació inicial per eliminar les cèl·lules, seguida de filtració (0,22 µm) i posterior ultracentrifugació a alta velocitat. Els pellets obtinguts es rentaran amb PBS estèril i és resuspendran en un volum definit en funció del volum inicial del cultiu. Les vesícules purificades es conservaran a 4 °C fins a la seva anàlisi (25).

4.3. Verificació de la presència i exposició del neoantigen a les OMVs.

Es determinarà la presència i l'exposició del neoantigen amb Western blot, emprant un anticòs específic contra l'etiqueta 6xHis present a la proteïna de fusió. Les mostres d'OMVs obtingudes en l'anterior pas es prepararan en tampó de càrrega, se separaran en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) i es transferiran a una membrana de PVDF. La detecció serà a través de la incubació d'un anticòs primari anti-6xHis i un secundari conjugat amb HRP, aquest reactiu transfereix un senyal quimioluminescent detectable (29,30) (Fig. 4).

És necessari confirmar que el neoantigen és accessible a la superfície de les OMVs. Es realitzarà un tractament en paral·lel amb proteïnasa K. Una al·lquota de les vesícules purificades es tractarà amb proteïnasa K (50 µg/mL, 30 min. a 37°C). Mentre que una al·lquota es mantindrà sense tractament com a control. Després del tractament mencionat, la proteasa s'inactivarà i ambdues mostres s'analitzaran mitjançant Western blot (Fig. 4). Es farà un western blot per cada OMV recombinant, per tant, 3 sense tractament amb proteïnasa K i 3 amb tractament amb proteïnasa K.

Per validar els resultats s'utilitzarà com a control negatiu una proteïna endògena perioplasmàtica de les OMVs, *BT_0766* (no exposada a la superfície) amb l'anticòs primari anti-*BT_0766* (29,30). S'usarà també un control positiu per detectar proteïnes de superfície ClyA lliures (no recombinants) amb un anticòs primari específic anti-ClyA (Fig. 4).

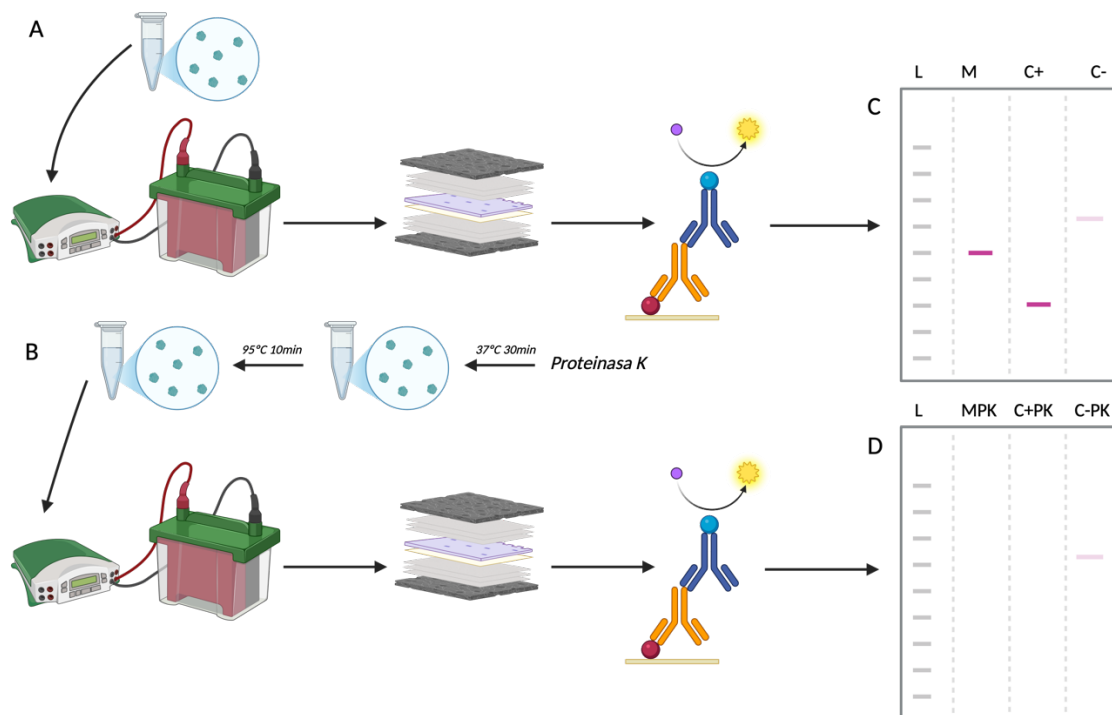


Fig. 4: diagrama genèric dels westerns blots que s'utilitzaran per demostrar la presència i exposició de les proteïnes de fusió a la superfície de les OMVs per augmentar la presentació antigènica. Es farà per cada tipus d' OMV. A) Western blot de les mostres no tractades amb proteïnasa K. B) Western blot de les mostres tractades amb proteïnasa K i inactivades. C) Resultats del western blot amb la mostra sense tractament amb proteïnasa K, es veu banda al carril de la proteïna diana i del control positiu. El control negatiu és un positiu parcial (degradació incompleta de la membrana). D) Resultats del western blot amb la mostra tractada amb proteïnasa K, desapareixen les bandes de la proteïna diana i del control positiu. El control negatiu és un positiu parcial (degradació incompleta de la membrana) **Font:** elaboració pròpia amb BioRender.

4.4. Avaluació de la presentació antigènica amb PBMCs i limfòcits T.

Per analitzar la capacitat immunògena dels neoantígens a les OMVs recombinants, s'aïllaran cèl·lules dendrítiques a partir de cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (PBMCs) a partir de mostres de sang humanes (31).

Les cèl·lules diferenciades s'incubaran durant un dia amb OMVs recombinants en diferents concentracions per identificar una finestra terapèutica (1, 10, 20 i 30 µg/mL) que maximitzi l'efectivitat i minimitzi la toxicitat. S'inclouran controls negatius amb OMVs salvatges buides (servirà per comparar i veure la immunogenicitat basal) i controls positius amb lipopolisacàrids bacterians (LPS).

De manera paral·lela, es faran co-cultius amb limfòcits T aïllats de la mateixa mostra (32), per determinar la capacitat de les cèl·lules dendrítiques carregades amb OMVs per activar cèl·lules T CD8+ i CD4+ (12) (Fig. 5).

4.5. Mesura de l'activitat cel·lular immune.

L'avaluació de l'activació de les cèl·lules dendrítiques carregades amb les OMVs es portarà a terme mitjançant citometria de flux, avaluant els marcadors CD86, CD40 i MHCII. Amb la tècnica ELISA es determina la producció de citocines proinflamatòries, IL-12 i TNF-α (12) (Fig. 5). Amb això es valorarà l'activació de les cèl·lules dendrítiques, principals APCs.

Per veure l'activació dels limfòcits es detecten combinacions de marcadors CD3+, CD4+ i CD69+ per l'avaluació de limfòcits helper activats i CD3+, CD8+ i CD25+ per l'activació de limfòcits citotòxics activats, això com IFN-γ, IL-2 i TNF-α amb enzimimmunoassaig (12) (Fig. 5).

4.6. Avaluació preliminar de la toxicitat de les OMVs in vitro.

Com a pas previ als assajos in vivo, es realitzarà una avaluació bàsica de la viabilitat cel·lular després de l'exposició a OMVs mitjançant *Trypan Blue* 0,4% i assaig de *MTT* (Fig.5). S'incubaran les cèl·lules dendrítiques derivades de PBMCs amb diferents concentracions d'OMVs (1, 10, 20 i 30 µg/mL) durant 24 hores. Posteriorment, es mesurarà la viabilitat cel·lular amb *Trypan Blue* 0,4% i es realitzarà un assaig *MTT*, que analitza l'activitat metabòlica, per determinar possibles efectes citotòxics. Aquesta aproximació permetrà detectar una finestra de seguretat abans de la seva administració in vivo (33,34).

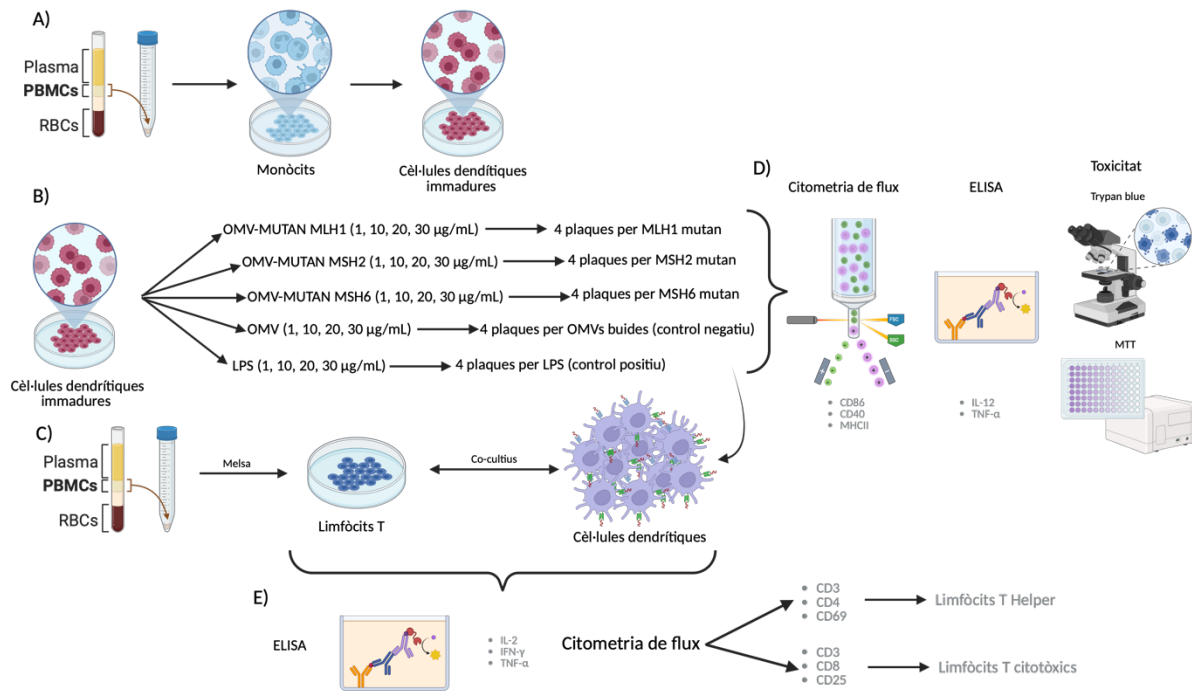


Fig. 5: disseny d'assaig funcional in vitro amb PBMCs de pacients. A) Aïllament de monòcits i diferenciació a cèl·lules plasmàtiques a partir de PBMCs. B) Incubació de quatre plaques de cèl·lules per cada OMVs recombinant i per cada concentració i vuit controls (quatre controls negatius amb OMVs buides i quatre amb LPS per al control positiu). C) Co-cultius de limfòcits T i cèl·lules dendrítiques carregades amb els neoantígens. D) Anàlisi dels cultius de cèl·lules dendrítiques mitjançant citometria de flux per veure marcadors d'activació (CD86, CD40 i MCHII) i ELISA per estudiar citocines (IL-12 i TNF-α). Anàlisi de la toxicitat mitjançant Trypan Blue 0,4% i assaig de MTT. E) Anàlisi dels co-cultius mitjançant citometria de flux per veure poblacions limfocitàries específiques: T helper (CD3+, CD4+ i CD69+) i T citotòxics (CD3+, CD8+ i CD25+) i ELISA per veure IL-2, TNF-α i IFN-γ. **Font:** elaboració pròpia amb BioRender.

4.7. Assajos *in vivo*

Per avaluar l'eficàcia immunoterapèutica de les OMVs recombinants, s'utilitzaran ratolins C57BL/6 amb tumors de còlon establerts (injectats prèviament amb línies cel·lulars tumorals i adquirits comercialment). Seran ratolins transgènics que expressen un sol al·lel HLA humà de manera individual (HLA-A02:01, A01:01, B07:02, B08:01, DRB107:01 o DRB115:01). Cada grup de ratolí transgènic es dividirà en subgrups (n=5). En total s'utilitzaran 25 ratolins de cada HLA, excepte HLA-DRB107:01 i DRB115:01 que seran 20. Rebran una única formulació d'OMVs recombinants per cada ratolí transgènic. Per tant s'usaran 30 ratolins per cada formulació d'OMV, excepte per OMV-MSH2 que seran 20 (Taula 2). S'utilitzarà OMVs buides per saber la immunogenicitat basal pròpia de les OMVs. S'utilitzarà com a control negatiu PBS (no genera resposta immune). Es faran servir el mínim d'animals possibles, amb la mínima capacitat de patiment i es refinaran les tècniques per millorar l'estabulació, sempre seguint el principi de les 3R.

Taula 2: assajos in vivo per validar la resposta específica per HLA.

Ratolins transgènics	OMV-MLH1	OMV-MSH2	OMV-MSH6	OMV	PBS	TOTAL
HLA-A02:01	5	5	5	5	5	25
HLA-A01:01	5	5	5	5	5	25
HLA-B07:02	5	5	5	5	5	25
HLA-B08:01	5	5	5	5	5	25
HLA-DRB107:01	5	0	5	5	5	20
HLA-DRB115:01	5	0	5	5	5	20
TOTAL	30	20	30	30	30	140

La immunització es farà per via subcutània en la regió peritumoral, amb tres dosis (dies 0, 7 i 14) de 25 µg/mL d'OMV per ratolí (identificada segons les proves de toxicitat in vitro). Durant tot l'assaig es monitorarà el volum tumoral per tècniques d'imatge i el pes corporal dels animals com a indicador de toxicitat sistèmica. Es portaran a terme assajos de supervivència per determinar la capacitat de les OMVs de disminuir la mortalitat (12). Els punts finals es determinaran èticament segons criteris establerts de benestar animal (35) (Fig. 6).

Al dia 21 post-tractament, es recolliran mostres de tumor, ganglis limfàtics i melsa per l'anàlisi immunològica posterior. S'aïllaran cèl·lules mononuclears per citometria de flux i s'avaluarà la presència de limfòcits CD4+ i CD8+ activats (CD3+, CD69+, IFN-γ i TNF-α) en ganglis i melsa, així com la infiltració tumoral. També es quantificarà la producció de citocines mitjançant ELISA per determinar la producció de IFN-γ i TNF-α (12) (Fig. 6).

4.8. Assajos de toxicitat *in vivo*

Amb l'objectiu d'avaluar la toxicitat en els assajos in vivo s'estudiarà de manera paral·lela el pes corporal dels animals de manera setmanal, i es registraran els canvis clínics observables a nivell macroscòpic (postural, comportament, estat del pelatge, etc.) mitjançant escales de benestar establertes per detectar signes subclínic (apatia, hipoactivitat, etc.). A dia 21, després del sacrifici, es recolliran mostres de fetge, ronyó, melsa i pulmó, es fixaran amb formol i s'inclouran en parafina, es recolliran talls i es tenyiran amb hematoxilina i eosina (H&E) i s'avaluarà mitjançant microscòpia òptica l'afectació histopatològica que presenten els ratolins a nivell anatomopatològic (Fig.6). En cas necessari, S'obtindran mostres de sèrum per analitzar, durant l'assaig, marcadors bioquímics d'alteració, tant de la funció hepàtica (ALT i AST) com de la funció renal (creatinini) (12).

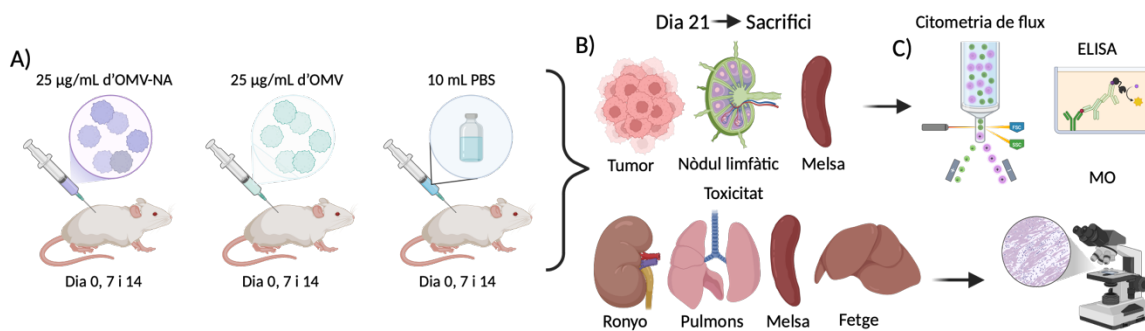


Fig. 6: diagrama assajos in vivo. A) Injecció subcutània de les OMVs recombinants i dels controls. B) En els sacrificis s'obtenen mostres del tumor, ganglis limfàtics, melsa i pels assajos de toxicitat: ronyo, pulmons, fetge i també melsa. C) S'utilitzen tècniques com la citometria de flux i ELISA per detectar activació del sistema immune. La microscòpia òptica s'utilitza per veure afectació anatomopatològica a nivell tissular (toxicitat). **Font:** elaboració pròpia amb BioRender.

5. Resultats esperats, impacte social i limitacions

S'espera que la plataforma de vacunació basada en les vesícules de membrana externa (OMVs) d'*Escherichia coli* modificades genèticament per expressar neoantígens humans derivats de mutacions en *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* sigui capaç d'induir una resposta immune en funció del context HLA del receptor. Concretament, es preveu que, després de la immunització amb OMVs recombinants, es generi una activació de cèl·lules T CD4+ i/o CD8+ específiques.

Aquesta activació específica confirmaria la capacitat de les OMVs com a plataforma vacunal versàtil i segura, amb potencial d'adaptació a cada pacient segons el seu haplotip HLA. L'estratègia proposada, basada en la immunogenicitat de tumors MSI-H, podria combinar-se amb teràpies ja existents. La combinació amb immunoteràpies inhibidores de *CheckPoints* podria augmentar el cas d'èxit produint una sinergia que potenciaria l'activitat específica del sistema immune per lluitar contra el tumor.

Tanmateix, hi ha algunes limitacions que cal tenir en compte. D'una banda, la manera com es presenta el neoantígen a la superfície de les OMVs pot veure's afectada per problemes d'expressió o de plegament de les proteïnes. A més, la resposta immune pot variar en funció de la immunodominància del pèptid i del context inflamatori del microambient tumoral. També és important considerar la complexitat dels models HLA transgènics, ja que la resposta immune que observem pot no ser exactament la mateixa en humans amb haplotips diferents. En diversos estudis es descriu la falta d'expressió de MCHI en pacients amb càncer colorectal, encara que altres mencionen la sobreexpressió d'alguns haplotips de MCHII (36,37). Cal destacar que les proteïnes mutades s'han d'expressar in vivo al tumor perquè la immunoteràpia tingui efecte.

Tot i això, si els resultats obtinguts confirmen les prediccions, aquest projecte podria marcar un gran pas endavant en el món de la immunoteràpia personalitzada. Ofereix una estratègia que és segura, adaptable i que podria ser útil en entorns clínics. En un context on gairebé el 50% dels pacients amb càncer colorectal acaben desenvolupant formes incurables i metàstasi, malgrat els tractaments tradicionals, aquesta proposta podria obrir una nova via per millorar la supervivència i la qualitat de vida dels pacients. L'impacte social seria significatiu, ja que ajudaria a desenvolupar vacunes terapèutiques personalitzades que serien més eficients i amb menys efectes secundaris que les teràpies convencionals, reforçant així la tendència cap a una medicina més individualitzada i racional.

6. Cronograma del projecte

El projecte es desenvoluparà al llarg de quatre anys, començant per la construcció de les fusions gèniques i avançant progressivament cap als assajos preclínics in vitro i in vivo, l'anàlisi de resultats i la difusió científica. A continuació, es presenta la planificació temporal de les diferents etapes experimentals (Taula 3).

Taula 3: cronograma del projecte.

	2026	2027	2028	2029
Disseny i construcció gènica				
Fusions gèniques, clonacions i transformacions				
Producció, transformació d'OMVs				
Verificació de la presència i exposició dels gens recombinants				
Anàlisi funcional in vitro				
Diferenciació de cèl·lules dendrítiques a partir de PBMCs				
Aïllament de limfòcits T a partir de PBMCs				
Mesura de l'activitat cel·lular immune				
Avaluació de la toxicitat in vitro				
Validació in vivo en model murí humanitzat				
immunització i seguiment tumoral				
Anàlisi de resposta efectora i infiltració limfocítica				
Estudis de toxicitat in vivo				
Anàlisi de dades i integració dels resultats				
Difusió i transferència de coneixements adquirits				

7. Pressupost i pla de difusió

El pressupost per aquest projecte, dividit en tres fases, s'estima tenint en compte que es realitzarà en l'Institut d'investigació en Ciències de la salut Germans Trias i Pujol (IGTP). El personal necessari es troben contractats al centre, per tant, els sous són pagats per l'institut o per finançament extern a partir de beques i ajuts (nacionals i europees). La gran maquinària bàsica necessària (centrifugues, ultracongeladors, etc.) es troben al centre. La maquinària més específica es troba a les diferents plataformes científicotècniques (citometria, genòmica, proteòmica i cultius cel·lulars) de l'institut. Tot aquest equipament el proporciona directament l'IGTP.

L'equip de treball consta de l'investigador principal, un tècnic de laboratori, una investigadora postdoctoral amb experiència amb microbiologia molecular, oncologia i genètica i una plaça predoctoral que comenci el projecte. Es té en compte també un veterinari i un tècnic de laboratori amb tasques només d'estabulació i cura d'animals. Aquestes tasques es porten a lloc a l'estabulari CMCiB (Centre de Medicina Comparativa i Bioimatge) també part de l'IGTP.

A continuació es desglossa el pressupost del projecte per paquets, tenint en compte que té una duració aproximada de 4 anys.

- Personal: 0€ (beques externes o personal intern IGTP/CMCiB)
- Cost dels serveis de les plataformes científicotècniques (citometria, genòmica, proteòmica i cultius cel·lulars): 10.000€/any.
- Cost d'estabulari i manteniment animals (per 140 ratolins): 25.000€
 - o Ratolins: 10€x140 ratolins (se'n compren 170) = 1.700€
- Cost de material fungible i reactius: 1.000€ per personal tècnic/mensual (190.000€)
- Cost de difusió: 0€ (convenis de l'IGTP amb editorials).
- Assistència a congressos: 3.000€ per any (12.000€)
- Anàlisis de patentabilitat: 10.000€

Al pressupost se li afegeix un 20% de despeses imprevisibles i indirectes, per tant, el pressupost estimat seria de 390.000€ en total.

Si és possible patentar el producte, llavors el pressupost final podria variar en 100.00€ aproximadament.

El pla de difusió es basa en diferents publicacions al llarg del projecte dels resultats obtinguts en articles científics, publicats en editorials que presenten conveni amb l'IGTP. Es té en compte la propietat intel·lectual i la confidencialitat sí el producte és patentable. Els resultats es publicaran en revistes d'accés lliure i gratuït per fomentar la divulgació científica fàcilment accessible i de qualitat.

8. Referencies

1. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Juny 2019;16(6):361-75.
2. Fan A, Wang B, Wang X, Nie Y, Fan D, Zhao X, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective. *Int J Biol Sci*. 2021;17(14):3837-49.
3. Zhu Y, Li X, Chen T, Wang J, Zhou Y, Mu X, et al. Personalised neoantigen-based therapy in colorectal cancer. *Clinical & Translational Med*. Novembre 2023;13(11):e1461.
4. Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treatment Reviews*. Desembre 2016;51:19-26.
5. Picard E, Verschoor CP, Ma GW, Pawelec G. Relationships Between Immune Landscapes, Genetic Subtypes and Responses to Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 6 Març 2020;11:369.
6. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 19 Juliol 2012;487(7407):330-7.
7. Kumar A, Gautam V, Sandhu A, Rawat K, Sharma A, Saha L. Current and emerging therapeutic approaches for colorectal cancer: A comprehensive review. *World J Gastrointest Surg*. 27 Abril 2023;15(4):495-519.
8. Fan JY, Huang Y, Li Y, Muluh TA, Fu SZ, Wu JB. Bacteria in cancer therapy: A new generation of weapons. *Cancer Medicine*. Desembre 2022;11(23):4457-68.
9. Meng F, Li L, Zhang Z, Lin Z, Zhang J, Song X, et al. Biosynthetic neoantigen displayed on bacteria derived vesicles elicit systemic antitumour immunity. *J of Extracellular Vesicle*. Desembre 2022;11(12):12289.
10. Zhou M, Tang Y, Xu W, Hao X, Li Y, Huang S, et al. Bacteria-based immunotherapy for cancer: a systematic review of preclinical studies. *Front Immunol*. 3 Agost 2023;14:1140463.
11. Kim OY, Park HT, Dinh NTH, Choi SJ, Lee J, Kim JH, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. *Nat Commun*. 20 Setembre 2017;8(1):626.
12. Cheng K, Zhao R, Li Y, Qi Y, Wang Y, Zhang Y, et al. Bioengineered bacteria-derived outer membrane vesicles as a versatile antigen display platform for tumor vaccination via Plug-and-Display technology. *Nat Commun*. 6 Abril 2021;12(1):2041.
13. Nguyen DH, Chong A, Hong Y, Min JJ. Bioengineering of bacteria for cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 15 Juny 2023;14(1):3553.
14. Hayashi K, Zhao M, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, et al. Cancer metastasis directly eradicated by targeted therapy with a modified *Salmonella typhimurium*. *J of Cellular Biochemistry*. 15 Abril 2009;106(6):992-8.

15. Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. Novembre 2010;10(11):785-94.
16. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery*. 1 Maig 2012;2(5):401-4.
17. Rey G. Identificación de neoantígenos a partir de datos de ultrasecuenciación y aplicación posterior en análisis de supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal. [Barcelona]: Universitat Oberta de Catalunya (UOC); 2028
18. Germano G, Lamba S, Rospo G, Barault L, Magrì A, Maione F, et al. Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature*. Desembre 2017;552(7683):116-20.
19. Creary LE, Sacchi N, Mazzocco M, Morris GP, Montero-Martin G, Chong W, et al. High-resolution HLA allele and haplotype frequencies in several unrelated populations determined by next generation sequencing: 17th International HLA and Immunogenetics Workshop joint report. *Human Immunology*. Juliol 2021;82(7):505-22.
20. Matsushita K, Takenouchi T, Kobayashi' S, Hayashi' H, Okuyamal K, Ochiai' T, et al. HLA-DR antigen expression on colorectal carcinomas: influence of expression by IFN- γ in situ and its association with tumour progression. *British Journal of Cancer* (1996) 73, 644-648.
21. Creary LE, Gangavarapu S, Mallempati KC, Montero-Martín G, Caillier SJ, Santaniello A, et al. Next-generation sequencing reveals new information about HLA allele and haplotype diversity in a large European American population. *Human Immunology*. Octubre 2019;80(10):807-22.
22. Reynisson B, Alvarez B, Paul S, Peters B, Nielsen M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research*. 2 Juliol 2020;48(W1):W449-54.
23. Kim JY, Doody AM, Chen DJ, Cremona GH, DeLisa MP. Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality. *J Mol Biol*. 27 Juny 2008;380(1): 51–66.
24. Kulp A, Kuehn MJ. Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. 2012; *Annu Rev Microbiol*. 2010;64: 163–184.
25. Kim SH, Kim KS, Lee SR, Kim E, Kim MS, Lee EY, et al. Structural modifications of outer membrane vesicles to refine them as vaccine delivery vehicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*. Octubre 2009;1788(10):2150-9.
26. Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Raina S, Es RL. *Escherichia coli tol-pal* Mutants Form Outer Membrane Vesicles. *Journal of bacteriology*. Setembre 1998, p. 4872–4878.
27. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J Bacteriol*. Juliol 1995;177(14):4121-30.

28. Nannenga BL, Baneyx F. Enhanced expression of membrane proteins in *E. coli* with a PBAD promoter mutant: synergies with chaperone pathway engineering strategies. *Microbial Cell Factories* 2011, 10:105
29. Valguarnera E, Scott NE, Azimzadeh P, Feldman MF. Surface Exposure and Packing of Lipoproteins into Outer Membrane Vesicles Are Coupled Processes in *Bacteroides*. Ellermeier CD, editor. *mSphere*. 26 de septiembre 2018; 3(6).
30. Bäuerl C, Coll-Marqués JM, Tarazona-González C, Pérez-Martínez G. *Lactobacillus casei* extracellular vesicles stimulate EGFR pathway likely due to the presence of proteins P40 and P75 bound to their surface. *Sci Rep*. 6 Novembre 2020
31. Chometon TQ, Siqueira MDS, Sant'anna JC, Almeida MR, Gandini M, Martins De Almeida Nogueira AC, et al. A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells. Ulrich H, editor. *PLoS ONE*. 9 Abril 2020;15(4):e0231132.
32. Kizhakeyil A, Ong ST, Fazil MHUT, Chalasani MLS, Prasannan P, Verma NK. Isolation of Human Peripheral Blood T-Lymphocytes. En: Verma NK, editor. *T-Cell Motility. Methods in Molecular Biology*; vol. 1930. 2019 p. 11-7.
33. Tyrer PC, Frizelle FA, Keenan JI. *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles are genotoxic to human enterocyte-like cells. *Infect Agents Cancer*. Diciembre 2014;9(1):2.
34. Jones EJ, Booth C, Fonseca S, Parker A, Cross K, Miquel-Clopés A, et al. The Uptake, Trafficking, and Biodistribution of *Bacteroides thetaiotaomicron* Generated Outer Membrane Vesicles. *Front Microbiol*. 6 Febrer 2020;11:57.
35. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 34, 8 de febrero de 2013.
36. Momburg F, Degener T, Bacchus E, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P. Loss of HLA-A,B,C and de novo expression of HLA-D in colorectal cancer. *Intl Journal of Cancer*. 15 Febrer 1986;37(2): 179-84.
37. Matsushita K, Takenouchi T, Shimada H, Tomonaga T, Hayashi H, Shioya A, et al. Strong HLA-DR antigen expression on cancer cells relates to better prognosis of colorectal cancer patients: Possible involvement of c-myc suppression by interferon- γ in situ. *Cancer Science. Gener* 2006; 97(1):57-63.