

## UROLOGÍA ONCOLÓGICA - TRABAJO DE INGRESO

# LA INTERFERENCIA DEL ARN MITOCONDRIAL NO CODIFICANTE LARGO ANTISENTIDO (ARNMTNC-AS) CON ANDES-1537 COMO UN NUEVO TRATAMIENTO PARA EL CÁNCER RENAL

## Antisense Long Noncoding Mitochondrial (AS-ncmtRNA) Interference with Andes-1537 as a New Treatment for Kidney Cancer

Mariela Araya<sup>1,4</sup>, Francisca Guevara<sup>1</sup>, Jaime Villegas PhD<sup>1,4</sup>, Luis Alarcón MD<sup>2</sup>, Luis O. Burzio PhD<sup>1\*</sup>, Vincenzo Borgna MD PhD<sup>1,2,3,\*</sup>.

<sup>1</sup>Andes Biotechnologies SpA; Fundación Ciencia & Vida; <sup>2</sup>Servicio de Urología, Hospital Barros Luco-Trudeau; <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago; <sup>4</sup>Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile. \*Autor Correspondiente.

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La familia de ARN mitocondriales no codificantes (ARNmtnc), ARNmtnc y ARNmtnc-Antisentido se expresan diferencialmente dependiendo del estatus proliferativo de la célula. La interferencia del transcrito ARNmtnc-Antisentido con Andes-1537 genera una masiva muerte celular en líneas tumorales. El objetivo fue evaluar los efectos del uso de esta droga en líneas y cultivos primarios de pacientes con cáncer renal, así como su valor terapéutico en modelos *in vivo*.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Los efectos de Andes-1537 en líneas de cáncer renal humano (A-498, CAKI-1, 798-O) y cultivos primarios de pacientes se evaluaron para diferentes estadios. La muerte celular fue cuantificada con ensayo de azul de tripán y la apoptosis mediante Annexina V. Proteínas involucradas en el ciclo celular fueron evaluadas mediante Western Blot. Para los ensayos *in vivo* se utilizaron modelos de xenoinjerto con células de cáncer renal humano y con un modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) de cáncer renal.

**RESULTADOS:** La interferencia con Andes-1537 indujo >70% de muerte celular, tanto en líneas celulares como en cultivos primarios. Se demostró una disminución de la expresión de proteínas del ciclo celular y antiapoptóticas, tales como Survivina, así como también una disminución en el número de esferas. En los estudios *in vivo*, el tratamiento

### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The non-coding mitochondrial RNAs family, including RNAmtn and antisense-RNAmtn are differentially expressed depending on the proliferative cell status. Interference of the antisense-RNAmtn transcript with Andes-1537 leads to massive cell death in tumoral cell lines. Aim of the study was to evaluate the impact of this newly developed drug on renal cell cancer (RCC) cell lines and primary cell cultures, in addition to its therapeutic effect in *in vivo* models.

**MATERIAL AND METHODS:** Andes-1537 effects on RCC cell lines (A-498, CAKI-1, 798-O) and on primary cultures were evaluated for different stages. Cell death was assessed with blue trypan and apoptosis with Annexin VI. Cell-cycle proteins were assessed by Western Blot. *In vivo* assays were performed with RCC xenograft cells and with a RCC patient-derived xenograft (PDX) model.

**RESULTS:** Andes-1537 interference induced >70 % of cell death in tumoral cell lines as well as in primary cultures. A significant reduction of cell-cycle protein expression, such as Survivin, was observed. The case was the same for number of spheres. *In vivo* assays revealed suppression of tumor growth in the A498 model and a significant reduction of mean tumor size in the PDX model.

suprimió el crecimiento tumoral en el modelo A498 y disminuyó el tamaño tumoral promedio en el modelo PDX.

**CONCLUSIONES:** La interferencia del ARNm<sub>mtc</sub>-Antisentido induce una apoptosis masiva en líneas celulares de cáncer renal humano y cultivos primarios, demostrando un aumento en la supervivencia en los modelos *in vivo*. Estos resultados apoyan la exploración de Andes-1537 como terapia para el cáncer renal.

**PALABRAS CLAVE:** Cáncer renal, ARN antisentido, apoptosis, xenoinjerto, oligonucleótido.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer renal (CR) corresponde al 2,2% de todos los cánceres siendo el noveno cáncer más común en hombres y el décimo en mujeres con la segunda mortalidad más alta de cánceres urogenitales en los Estados Unidos [1]. La incidencia de cáncer de riñón en el mundo en el año 2018 fue de 403.000 [2] y en Chile, la tasa de incidencia el 2012 fue de 6,9 x 100.000 hab., y la mortalidad alcanzó los 175.090 personas el 2018 a nivel global. Alrededor del 70% de los pacientes que son diagnosticados con CR tiene un tumor localizado dentro del riñón, cuya enfermedad es controlada fácilmente mediante nefrectomía parcial o radical, con una supervivencia de 89% a 5 años. Sin embargo el otro 20-30% de los pacientes debutan con metástasis cuando son diagnosticados, y su supervivencia es de 9% a 5 años[1].

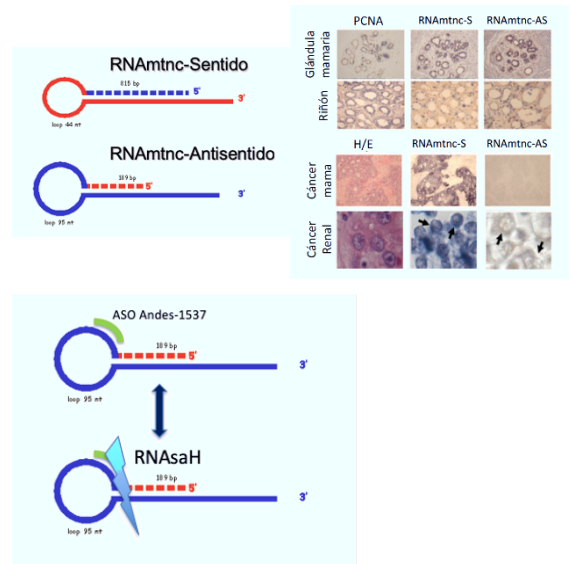
El concepto de utilizar oligonucleótidos antisentido (ASO) los cuales son complementarios al ARN mensajero (ARNm) blanco y generan un efecto específico en la expresión de un gen en particular fue descrito por Stephenson y Zamecnik en 1978[3]. Los ASO son pequeños segmentos de ADN simple hebra que contienen entre 8 y 50 nucleótidos de largo e hibridan en parte o en su totalidad en un ARN blanco, a través de apareamientos tipo Watson-Crick modulando su expresión o función. Esta estrategia se ha utilizado con éxito en humanos como en las terapias antivirales (HIV) o contra moléculas involucradas en cáncer (Bcl-2), mostrando un perfil de bioseguridad aceptable demostrado en estudios de fase I llegando a estudios de fase III sin mayores complicaciones. Esta selectividad por el blanco como su inocuidad, hacen que la terapia antisentido sea una herramienta importante para el desarrollo de nuevas terapias moleculares[4].

En nuestro laboratorio, hemos descrito y caracterizado una familia de ARN mitocondriales no codificantes (ARN<sub>mtc</sub>), ARNm<sub>mtc</sub>-Sentido y ARNm<sub>mtc</sub>-Antisentido (AS) los cuales se expresan diferencialmente dependiendo del estatus proliferativo de la célula. Mediante hibridación in situ (HIS) hemos demostrado que en células normales en

**CONCLUSION:** *Interference of antisense-RNA<sub>mtc</sub> induced massive apoptosis in RCC cell lines and primary cultures, in addition to an increased survival in in vivo models. These findings support further research of Andes-1537 as a novel therapeutic approach in RCC.*

**KEYWORDS:** *Kidney cancer, antisense RNA, apoptosis, xenograft, oligonucleotide.*

proliferación se expresan dos familias (sentido y antisentido). Sin embargo, en células tumorales en cultivo y en biopsias de pacientes el ARNm<sub>mtc</sub>-AS es reprimido[5]. Por otro lado, nuestros resultados muestran que en ensayos in vitro el uso de oligonucleótidos antisentido complementarios al ARNm<sub>mtc</sub>-AS (Andes-1537) genera una masiva muerte celular en diferentes líneas celulares tumorales y la baja en los niveles de Survivina, un factor antiapoptótico sobreexpresado en células tumorales. Lo interesante es que el uso de este ASO en células normales como keratinocitos humanos (HKF) y células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) no afectan su viabilidad[6].



**Figura 1. Izquierda:** Familia de RNA<sub>mtc</sub>, RNA<sub>mtc</sub> Sentido y Antisentido. **Derecha:** Perfil de detección de los RNA<sub>mtc</sub> en tejidos normales y tumorales humanos mediante Hibridación In Situ. H/E: Hematoxilina/Eosina; PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular. **Abajo:** Mecanismo de degradación de la molécula RNA<sub>mtc</sub>-AS mediada por RNAsaH posterior a la hibridación del oligonucleótido antisentido (ASO) Andes-1537..

En ensayos pre-clínicos, en melanoma agresivo (B16)[7] y de cáncer renal murino (RenCa)[8] hemos demostrado que la administración sistémica de ASO, induce retardo

en el crecimiento tumoral e inclusive remisión del tumor. Además, el tratamiento ha mostrado un importante efecto sobre la inhibición de las metástasis en ambos modelos. Uno de los problemas que surgen al utilizar este tipo de modelos es la poca representatividad que significa el utilizar células de origen murino. En el presente trabajo, hemos estudiado los efectos del uso de Andes-1537 en líneas de cáncer renal humano (A-498, CAKI-1, 798-O) y cultivos primarios de pacientes en diferentes estadios, como su valor terapéutico en modelos in vivo de xenoinjerto con células de cáncer renal humano y en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) de cáncer renal de células claras.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CULTIVO CELULAR

#### LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares correspondientes a carcinoma renal humano A-498 (VHL mutado), 786-O (VHL mutado)[9] y Caki-1 (VHL wild type) fueron adquiridas desde ATCC (Manassas, VA, USA). La línea A-498 (ATCC HTB-44) se cultivó en Medio esencial Eagle's Minimum (EMEM) suplementado con SFB 10% (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 100 U/mL penicilina G, 100ug/mL, sulfato de estreptomycin. La línea Caki-1 (ATCC HTB-46) correspondiente a carcinoma de células claras humanas, se cultivó en medio McCoy's 5A con Glutamax (modificado) (Gibco, Cat N° 36600021), suplementado con SFB 10% (Hyclone), 100 U/mL penicilina G, 100ug/mL, sulfato de estreptomycin. Y la línea 786-O (ATCC CRL-1932), se cultivó en Medio RPMI-1640 (Gibco, Cat N° 61870036) suplementado con SFB 10% (HyClone) 100 U/mL penicilina G, 100ug/mL, sulfato de estreptomycin. Todas las líneas fueron mantenidas en una estufa de cultivo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> cambiándose el medio de cultivo cada 2-3 días.

#### CULTIVOS PRIMARIOS

Los tejidos de ccCR se obtuvieron a partir de nefrectomías o metastasectomías de pacientes con cáncer renal de células claras con la aprobación del comité de ética del Servicio de Salud Metropolitano Sur (Memo 450/2015) y la autorización mediante consentimiento informado del paciente.

Para la obtención de cultivos primarios de tejido tumoral de riñón humano, se extrajo un trozo representativo de la pieza tumoral posterior a la cirugía. El tumor renal se disgregó mecánicamente con una hoja de bisturí obteniéndose trozos de 1-2 mm<sup>3</sup>. Se realizó digestión enzimática con una mezcla que contiene Colagenasa I (1 mg/mL), Colagenasa II (1mg/mL), Colagenasa IV (2 mg/mL), Dispasa (1mg/mL), Hialuronidasa (20ug/mL) y DNAsa (2000 U/mL), 2mM de CaCl<sub>2</sub> en medio DMEM (Gibco). Se incubó

a 37°C con agitación constante a 200rpm por 45 min en incubador (IKA Shaker, KS 4000 i control). La suspensión se centrifugó a 1200rpm durante 5 minutos, y el pellet fue resuspendido en PBS 1X y centrifugado por 5 minutos a 200X g. La suspensión se sembró en botellas T75 cubiertas con Colágeno I (Nunc) en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con SFB 10% (Hyclone), Hidrocortisona 50ug/mL, 1X de suplemento Insulina (1 g/L), Selenio (0,00067 g/L), Transferrina (0,55 g/L) (Gibco). Se incubó en estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Para la obtención de cultivos primarios de tejido normal de riñón humano, se extrajo un fragmento de tejido normal desde el espécimen removido a partir de la nefrectomía radical, que fue puesto en suero fisiológico dentro de un tubo Falcon y transportado en hielo al laboratorio. El tejido normal fue digerido de la misma forma que el tejido tumoral y el pellet final de células fue suspendido en medio Renal Epithelial Cell Basal Medium (ATCC PCS-400-030), suplementado con Renal Epithelial Growth Kit (ATCC PCS-400-040) que contiene Triiodothyronine (10 nM), rh EGF (10 ng/mL), Hydrocortisona Hemisuccinate (100 ng/mL), rh Insulina (5 µg/mL), Epinefrina (1 µM), L-Alanyl-L-Glutamina (2.4 mM), Transferrina (5 µg/ml) y Suero Fetal Bovino (SFB) 0.5%. Los cultivos primarios de riñón normal se incubaron en estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### TRANSFECCIÓN CELULAR CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

Se utilizaron oligonucleótidos antisentido (ASO) que contienen 100% de uniones fosforotioato (PS) sintetizados en LGC Biosearch Technology Inc. (Novato, CA, USA). Las secuencias de ASO utilizadas fueron para el ASO Andes-1537 5' CACCCACCCAAGAACAGG 3' y para el ASO no relacionado (ASO-NR) 5' TTATATTTGTGTAGGGCTA 3'. Para evaluar citotoxicidad y los efectos en la proliferación celular se transfectó con ASO Andes 1537 o ASO-NR en concentraciones de 100 a 400nM (en triplicado o duplicado), utilizando como agente de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen), para lo cual se sembró 20.000 o 40.000 células/pocillo en 0,5 o 1 mL de medio de las células respectivas, en placas de 24 o 12 pocillos (Nunc) (para líneas celulares y cultivos primarios, respectivamente) y se dejó incubando en estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El día de la transfección (24h post siembra para líneas celulares; 24 o 96h post siembra según el cultivo primario) se eliminó el sobrenadante de cada pocillo y se agregó 900 µL de Optimem (Gibco) suplementado con 5.56% de SFB (Hyclone). Para la mezcla de ASO Andes-1537 o ASO-NR (100nM a 400nM) con lipofectamina, se agregó el volumen de ASO en medio Optimem solo (volumen final de 50uL), a la mezcla de lipofectamina (2 a 3 µg/mL) en Optimem solo (50µL de volumen final), se incubó por 15 min a TA y los 100µL de la mezcla de complejos formados ASO-Li-

poftamina se agregaron a los pocillos correspondientes, obteniendo una concentración final de SFB de 5% para cada pocillo.

### EVALUACIÓN DE MUERTE CELULAR

Para evaluar citotoxicidad y los efectos en la proliferación celular post transfección con ASO Andes-1537 y ASO-NR, la transfección se dejó por 24h a 96h horas y la viabilidad celular se midió mediante conteo en cámara de Neubauer con azul de tripan, cuantificando células vivas, muertas y totales al inicio de la transfección (hora 0) y a las 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la transfección. Se realizó el conteo de 50-100 células por muestra en triplicado o duplicado (líneas celulares y cultivos primarios, respectivamente). Otra manera en la que se evaluó muerte celular fue mediante ensayo de exclusión por yoduro de propidio (PI) (Sigma-Aldrich) cuantificado por citometría de flujo. A las 48 o 96 horas post-transfección se retiró el sobrenadante guardándolo en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se tripsinizó las células adheridas con tripsina 4X por 5 a 10 min (según el cultivo celular) en estufa a 37°C, se agregó las células tripsinizadas al tubo que contenía el sobrenadante y se centrifugó a 1.200 rpm por 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 200 µL de PBS 1X frío + SFB 5% y se traspasó a tubos de citometría de 5mL, trasladándose en hielo hasta el citómetro. Inmediatamente previo a la lectura, las células se incubaron con 1 µL de PI (1mg/mL). La lectura se realizó en citómetro de flujo BD-FACS-Canto-II. (Fundación Ciencia Para La Vida) y se evaluó un mínimo de 10.000 eventos por ensayo.

### ENSAYO DE ANEXINA V POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se evaluó la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular a las 24 y 48 horas posterior al protocolo de transfección descrito en el punto anterior, utilizando concentraciones de ASO Andes 1537s de 100nM a 400nM. Se utilizó el kit "Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis" (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante tinción con yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) y anexina V. El análisis se realizó mediante citometría de flujo en BD FACS Canto-II (Fundación Ciencia Vida) analizándose 10.000 eventos por muestra.

### EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Se evaluó la expresión de proteínas de ciclo celular, apoptosis e inhibición de metástasis, posterior al tratamiento con ASO Andes 1537s o ASO-NR, para lo cual se sembró placas de 12 pocillos con 40.000 células/pocillo de cultivo primario por cada uno de los tratamientos (No tratado/ ASO-NR/ ASO Andes 1537s) y a las 24 horas se recolectaron las células en tubos falcon de 15 mL posterior a la

tripsinización con tripsina 4X. Las células fueron centrifugadas a 1000xg por 10 minutos a 4°C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mL de PBS 1X frío para homogenizar. Se centrifugó nuevamente a 1000xg por 10 minutos en frío, se eliminó el sobrenadante y se añadió la solución previamente preparada de buffer de lisis RIPA + cocktail de inhibidores de proteasa 1X (Promega) + PMSF 1X. Se homogenizó procurando dejar el pellet completamente disgregado y se incubó 15 min en hielo. Luego, se centrifugó a 14.000xg por 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Para el análisis de Western Blot, se cargó 35ug de proteínas en gel de poliacrilamida al 12% con buffer de carga 4X, y se realizó SDS-PAGE durante 2 horas en Buffer de Corrida (Tris 0,025M/Glicina 0,192M, SDS 0,1%(p/v)) a 100 Volt, luego se transfirieron las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF (Biorad®) según el protocolo descrito por la marca. La transferencia se llevó a cabo a 2.5A por 30min, en cámara de transferencia Transblot BioRad. Posteriormente se bloqueó la membrana con solución de bloqueo (leche descremada 5% en buffer TBS 1X-Tween 0,02%) a TA por 1 hora. Luego, se incubó con anticuerpo primario durante 2 horas en solución de bloqueo con su dilución correspondiente [Survivina pAb Abcam (3:1000), Parp-1 pAb Cell signaling (3:1000), N-Caderina mAb Thermo Scientific (2:1000), E-caderina y P-caderina mAb Abcam (2:1000), CycB1 y CycD1 mAb BD Pharmigen (2:1000), MMP9 pAb Abcam (2:1000), Caspasa3 pAb Cell signaling (3:1000), Bcl-XL pAb Cell Signaling (2:1000), β-Actina mAb Abcam (1:1000)]. Después de lavar 3 veces con TBS-Tween, se incubó las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente (ratón o conejo mAb Abcam (1:5000) por 1 hora a TA. Se lavó las membranas 3 veces con TBS-Tween y posteriormente se reveló con sustrato quimioluminiscente EZ-ECL (incubación 3 min), y las membranas fueron puestas en Scanner Western Blot C-Digit por 12 min. Las cuantificaciones de las bandas de cada proteína para los distintos tratamientos se realizó mediante el programa ImageJ, normalizando cada proteína con el control de carga β-Actina respectivo.

### ENSAYO DE FORMACIÓN DE ESFERAS

Para evaluar si las células A498 pierden las capacidades tumorigénicas (invasividad y propiedades "stem cell") posterior al tratamiento in vitro por 48h con ASO Andes 1537s, se sembraron 10.000 células sobre agar blando en placas de 6 pozos de ultra-baja adherencia (Corning). Se agregó medio RPMI completo al pocillo. A los 10 días se evaluará la formación de esferas, considerando positivas a aquellas mayores a 70µg de diámetro se realizó la cuantificación de células mediante microscopía (Olympus BX 51) contando 5 campos representativos.

## ESTUDIOS EN ANIMALES

Los estudios animales se realizaron siguiendo las guías de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) y aprobados por el comité de ética de Fundación Ciencia para la Vida. Se utilizaron ratones inmunocomprometidos NOD/SCID de 8 semanas de edad, obtenidos desde los laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME, USA) y mantenidos en el bioterio de Fundación Ciencia para la Vida bajo condiciones libres de patógenos (Tecniplast, Buguggiate, Italia), en una sala con temperatura controlada con calendario de 12/12 horas de luz/oscuridad, con alimentación estéril y agua ad libitum. Los modelos de xenoinjertos de cáncer renal utilizando la línea A-498 fue realizado de forma similar a la descrita previamente.  $2.5 \times 10^6$  células A-498 en 100  $\mu$ L de suero fisiológico estéril fueron inyectados de forma subcutánea (sc) en el flanco izquierdo de 10 ratones NOD/SCID. El crecimiento tumoral fue monitorizado cada 3 días mediante un calíper electrónico. El volumen tumoral fue estimado con la fórmula: volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) = largo  $\times$  2 ancho  $\times$  0,5236. Cuando los tumores alcanzaron el volumen de  $50\text{mm}^3$ , los ratones fueron randomizados en dos grupos de 5 ratones cada uno.

Para los tratamientos, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (ip) cada 48 horas con 200ul de ASO no relacionado o con tratamiento con 100ug de Andes-1537. Para el desarrollo del modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) de cáncer renal, se utilizó un trozo de tumor obtenido a partir de un paciente con diagnóstico histopatológico de carcinoma renal de células claras sometido a Nefrectomía Radical en el Hospital Barros Luco-Trudeau. El protocolo para este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Servicio Metropolitano Sur. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado en acuerdo con la declaración de Helsinki.

El tumor fue preservado en DMEM estéril + antibióticos a  $4^\circ\text{C}$  grados y procesado en el laboratorio dentro de 3 horas post quirúrgicas. El tumor fue cortado en fragmentos de  $3\text{mm}^3$  e implantados bajo anestesia de forma subcutánea en el flanco izquierdo de ratones NOD/SCID de 8 semanas de edad.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre dos grupos fueron analizadas por el test t de Student de dos colas o, cuando los datos no sigan una distribución normal, por el test U no paramétrico de Mann-Whitney U-test. Para todos los análisis, un valor de P igual o menor a 0,05 será considerado significativo. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el software GraphPad Prism 6.

## RESULTADOS

### EL USO DEL OLIGONUCLEOTIDO ANTISENTIDO ANDES-1537 INDUCE APOPTOSIS EN LÍNEAS Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER RENAL HUMANO SIN AFECTAR LA VIABILIDAD DE CÉLULAS RENALES NORMALES.

Para la evaluación de muerte celular posterior a la transfección con oligonucleotidos antisentido en contra del ARNm<sub>tnc</sub>-AS, se utilizaron células de cáncer renal humano A-498, Caki-1 y 786-O. Posterior a las 48 horas de tratamiento con Andes 1537 a una concentración de 200nM, se evaluó la muerte celular mediante citometría de flujo, a través de la prueba de incorporación de la tinción vital yoduro de propidio. En la Figura 2, se visualiza para las líneas celulares A-498 y 786-O una masiva muerte celular (sobre el 80%) en comparación con los controles con oligonucleotido dirigido contra un blanco no relacionado. Para Caki-1, Andes 1537 no induce una muerte celular masiva sin embargo células dejan de proliferar, incluso posterior a las 120h post tratamiento (datos no incluidos).

Para un mayor acercamiento a una eventual respuesta clínica en pacientes, se evaluó de forma in vitro, el efecto de Andes-1537 en 7 cultivos primarios de pacientes con el diagnóstico de CR en diferentes estadios. Como se ve en la Figura 3, posterior a las 48 horas de tratamiento, sobre el 70% presentan masiva muerte celular, independiente del estadio.

El tratamiento con Andes 1537 no afecta la viabilidad ni proliferación de las células normales de riñón tratadas por 48 horas, observándose una muerte celular entre un 8-15% en comparación con el control positivo Estaurosporina (Figura 4).

Se evaluó la apoptosis celular mediante el ensayo de Anexina V, que cuantifica la traslocación de fosfatidilserina a la membrana externa de la membrana plasmática, hito importante en la apoptosis temprana. En la Figura 5 se ve que el tratamiento con Andes-1537 induce la apoptosis tardía (PI+, Anexina V +) a las 48 horas de tratamiento en el 75 % de las células en comparación a los controles.

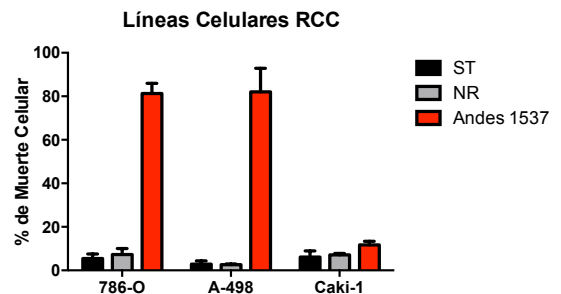
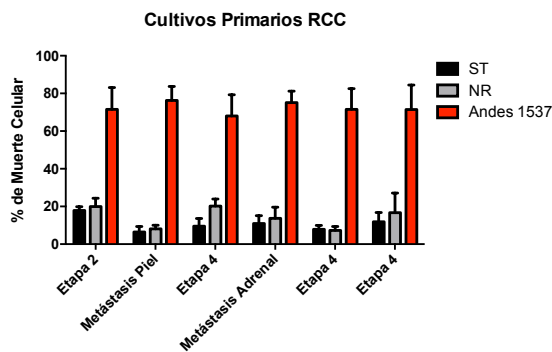
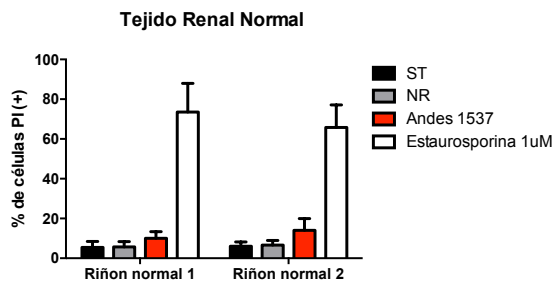


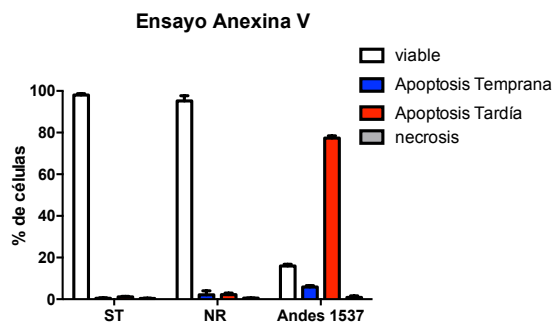
Figura 2. Muerte celular medida por citometría de flujo posterior al tratamiento con Andes-1537 en líneas celulares de cáncer renal humano.



**Figura 3.** Muerte celular medida por citometría de flujo posterior al tratamiento con Andes-1537 en cultivos primarios de pacientes con CR de diferentes estadios.



**Figura 4.** Muerte celular medida por citometría de flujo posterior al tratamiento con Andes-1537 en cultivos primarios de tejido renal normal.



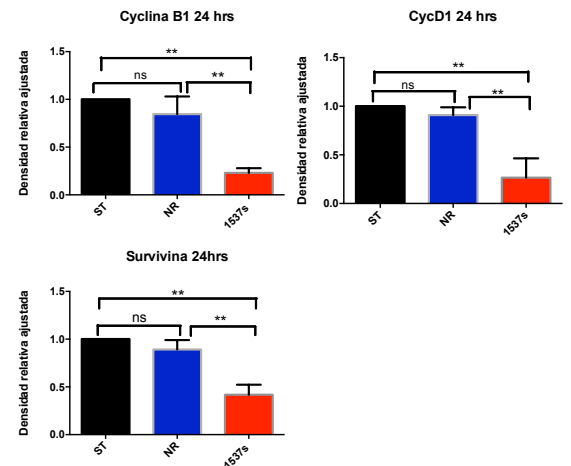
**Figura 5.** Evaluación de Apoptosis mediante ensayo de Anexina V medida en Citometría de flujo a las 48 hrs post tratamiento con Andes-1537.

**ANDES-1537 INDUCE UNA DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES DE FACTORES ANTI-APOPTOTICOS Y PROTEINAS DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS A-498.**

La muerte celular por apoptosis depende fino balance entre factores pro y anti apoptóticos. En estudios previos, se ha visto que la interferencia del ARNmtnc-AS con Andes 1537 induce la regulación negativa de una proteína antiapoptótica como survivina.

Para corroborar esto en este modelo, cuantificamos me-

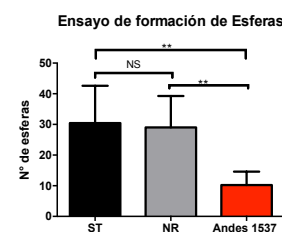
dante western blot los niveles de survivina posterior al tratamiento. Como se ve en la Figura 6, a las 24 horas se ve una disminución de un 60% en los niveles de la proteína Survivina. Se cuantificaron los niveles de proteínas involucradas en el ciclo celular como ciclina B1, ciclina D1 posterior a la interferencia del ARNmtnc-AS. Posterior a las 24 hrs se evidenció una disminución estadísticamente significativa en los niveles de todas las proteínas previamente descritas.



**Figura 6.** Evaluación de proteínas involucradas en ciclo celular y antiapoptosis 24 horas posterior a tratamiento con ASO Andes-1537.

**LA DISMINUCIÓN DEL ARNMTNC-AS MEDIANTE EL USO DE ANDES 1537 DISMINUYE LA INVASIVIDAD Y PROPIEDADES “STEM CELL” EN CÉLULAS A-498.**

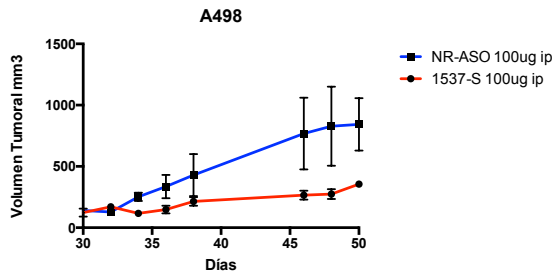
Las células “madre” cancerígenas (CSC), son un subtipo celular que teóricamente tendrían la capacidad de poder migrar desde el tumor primario, sobrevivir en el torrente sanguíneo y anidar a distancia. Uno de los ensayos clásicos para determinar la pérdida de “tumorigenicidad” o de disminución en el número de este tipo particular de células es el ensayo de formación de esferas. Como se observa en la Figura 7, 10 días posterior a la siembra de células tratadas con Andes-1537 por 48h, se produce una disminución estadísticamente significativa en el número de esferas en comparación a los controles.



**Figura 7.** Disminución del número de CSC posterior al tratamiento con Andes-1537 evaluado 10 días posterior a la transfección, mediante ensayo de formación de esferas.

### EL TRATAMIENTO CON ANDES-1537 INHIBE EL CRECIMIENTO TUMORAL EN UN MODELO SUBCUTÁNEO A-498.

Para evaluar el efecto in vivo de la interferencia con el oligonucleótido antisentido utilizamos un modelo de xenoinjerto subcutáneo con la línea de CR A-498. Inyectamos 2,5 x 10<sup>6</sup> células (sc) en el flanco izquierdo de 10 ratones NOD-SCID. Cuando los tumores alcanzaron el volumen promedio de 50 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron randomizados en 2 grupos de 5 ratones cada uno en relación a su volumen tumoral. Los ratones fueron inyectados de forma intraperitoneal (ip) cada 48 horas en forma ciega con 200 μL de suero fisiológico o conteniendo 100 μg de Andes-1537. El tamaño tumoral promedio del grupo no relacionado fue de 840 mm<sup>3</sup> en comparación a 355 mm<sup>3</sup> del grupo tratado con Andes-1537, diferencia que fue estadísticamente significativa (Figura 8).

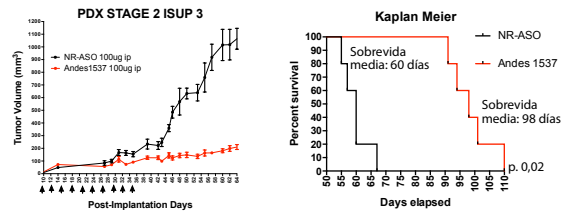


**Figura 8.** Supresión del crecimiento tumoral posterior al tratamiento con 10 dosis intraperitoneales de Andes-1537 en un modelo de cáncer renal humano A498.

### EVALUACION DE LA TERAPIA CON ANDES-1537 EN UN MODELO DE XENOINJERTO DERIVADO DE PACIENTE (PDX) DE CÁNCER RENAL.

Uno de los modelos más representativos de la realidad clínica, es utilizar un modelo del tipo xenoinjerto derivado de pacientes (PDX) que consiste en la implantación de un trozo de tumor fresco de forma subcutánea en un ratón inmunodeprimido.

Para este modelo se utilizó un tumor renal del tipo célula clara con estadio clínico: Etapa 2 ISUP 3. Se implantaron 15 ratones con trozos de 5 mm<sup>3</sup>, se monitorizó el crecimiento tumoral 2 veces a la semana, y cuando los tumores alcanzaron en promedio 50 mm<sup>3</sup>, se dividieron de forma aleatoria en relación al tamaño, en dos grupos. Los ratones fueron inyectados de forma intraperitoneal (ip) cada 48 horas en forma ciega con 200 μL de ASO no relacionado o conteniendo 100 μg de Andes-1537. El tamaño tumoral promedio a los 60 días del grupo no relacionado fue de 1100 mm<sup>3</sup> en comparación a 160 mm<sup>3</sup> del grupo tratado con Andes-1537, diferencia que fue estadísticamente significativa. La supervivencia media del grupo control fue de 60 días mientras que el tratamiento con Andes-1537 prolongó la supervivencia a 98 días (p.0,02)(Figura 9).



**Figura 9.** Evaluación de la terapia con Andes-1537 en un modelo in vivo de PDX de CR. Supresión de crecimiento tumoral y curva de supervivencia.

## DISCUSIÓN

De igual forma que en otros tipos de cáncer, el ARNm<sup>ntc</sup>-AS se encuentra expresado en las células normales de riñón y su expresión disminuida en el carcinoma renal[5][10]. Esta disminución de los niveles de expresión visto en múltiples biopsias de diferentes tipos de neoplasias, sugerirían que este evento representaría un nuevo hito en la carcinogénesis general. Esta disminución universal en los niveles de la molécula ARNm<sup>ntc</sup>-AS lo convertirían en una nueva molécula supresora de tumores, la cual sería necesaria para el mantenimiento en el control de la proliferación celular. En estudios previos se ha descartado la presencia de pseudogenes mitocondriales codificados en el genoma nuclear, por lo cual estos transcritos quiméricos serían de origen completamente mitocondrial[11].

A pesar de ser un factor evidenciado de forma universal[12], los factores involucrados en la baja de este transcrito es aún desconocido. En modelos inducidos por virus como el del papiloma humano (VPH), parecería que fuese mediado por el oncogen E2[13][14].

La masiva apoptosis inducida por el oligonucleótido antisentido Andes-1537 presentada en este trabajo tanto en líneas de cáncer renal como en cultivos primarios de pacientes es independiente del background genético (se utilizaron líneas celulares con el gen de Von Hippel Lindau mutado y wild type) e independiente del estadiaje de los tumores[15][16].

Esta potente apoptosis posterior a la interferencia del ARNm<sup>ntc</sup>-AS pudiese ser asociada a la disminución en los niveles de algunas ciclinas, cadherinas, metaloproteasas, proteínas de la familia Bcl y en particular de Survivina [6], este último, un miembro importante de la familia de inhibidores de la apoptosis (IAP) que se encuentra sobre-expresado en la mayoría de los cánceres, este efecto sinérgico explicaría estos resultados de muerte celular en diversas líneas tumorales.

Una hipótesis del motivos por los cuales las células normales no serían objeto de esta apoptosis masiva, sería que éstas presentan altos niveles de la molécula ARNm<sup>ntc</sup>-AS[5], los cuales la terapia con ASO no es capaz de lle-

varlos a niveles indetectables como ocurre en las células tumorales[6]. Por otra parte, como se mencionó previamente, la disminución de los niveles de la proteína survivina sería uno de los fenómenos mediados en la apoptosis posterior al uso de Andes 1537, este evento no tendría valor en células normales ya que la proteína survivina estaría presente exclusivamente en tejidos tumorales, no detectándose en tejidos normales[17].

Un trabajo recientemente publicado por nuestro grupo postularía que el procesamiento del ARNmtnc-AS por ARNsa H resultaría en generación de ARNmi de origen mitocondriales (hsa-miR-4485) que en combinación con otros ARNmi nucleares inducirían la caída del transcrito ARNmtnc-AS e inhibiendo consecuentemente la traducción de los ARNs mensajeros de proteínas reguladoras del ciclo celular[18].

A pesar de los alentadores resultados de este trabajo, el uso de ratones inmunodeprimidos hace poco representativo y extrapolable a la realidad, ya que la interacción del sistema inmune y el tumor es fundamental en el control del crecimiento tumoral. Otra variable limitante importante en el uso de el modelo PDX subcutáneo es la poca capacidad metastásica que tienen estos modelos los cuales pueden ser eventualmente corregidos con modelos ortotópicos.

La terapia génica “antisentido” es una tecnología innovadora que ofrece un enfoque específico para el tratamiento de tumores y otras enfermedades. Dentro de estos, existe una familia de nuevos medicamentos llamados ASO fosforotioatos. Se han aprobado tres productos farmacéuticos en esta clase en Estados Unidos: formivirsén, como inyección intraocular para el tratamiento de rinitis producida por Citomegalovirus, Mipomersén, para el tratamiento de hipercolesterolemia familiar[19] de forma subcutánea y eteplirsén, aprobado el 2016 para pacientes con distrofia muscular de Duchenne[20]. Existen diferentes estudios en fase clínica con ASO fosforotioatos contra diferentes blancos en pacientes con cáncer de páncreas, melanoma, glioma y próstata con mínimos efectos adversos y siendo muy bien tolerados. Se ha demostrado que el uso de ASO en diferentes medios de administración (subcutáneo, intraperitoneal o endovenoso) logran similares perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos por lo cual no existirían diferencias significativas entre ellas.

Posterior a estudios farmacológicos, farmacocinéticos y toxicológicos efectuados en animales, Andes-1537 fue el primer medicamento en latinoamérica en conseguir el IND de FDA y su uso en humanos fue evaluado recientemente en UCSF, San Francisco, EEUU. en un estudio clínico Fase 1a (NCT02508441) en pacientes con tumores sólidos terminales refractarios a las terapias convencionales. El protocolo de este estudio estableció como vía de administración del medicamento mediante inyecciones semanales de forma subcutánea.

Como resultado de este estudio, no se evidenciaron efectos adversos grado 3 ni 4. Los pacientes presentaron reacciones en el sitio de inyección con dosis elevadas. Se evidenció actividad indirecta en pacientes con cáncer de páncreas y colangiocarcinoma[21].

Actualmente se encuentra en desarrollo el primer estudio de Fase Ib en Latinoamérica, probando la terapia Andes-1537 en 6 cohortes de pacientes chilenos, en los cuales está incluido el cáncer renal metastásico.

## CONCLUSIONES

Nuestro estudio muestra que la interferencia del ARNmtnc-AS induce una apoptosis masiva en diferentes líneas celulares de cáncer renal humano y cultivos primarios, demostrando un aumento en la sobrevida en los modelos in vivo. Estos resultados apoyan el uso de Andes-1537 como una nueva terapia para el cáncer renal. Resultados clínicos serán evaluados en un futuro cercano.



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2018," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 1, pp. 7–30, 2018.
- [2] H. I. Wettersten, O. A. Aboud, P. N. Lara, and R. H. Weiss, "Metabolic reprogramming in clear cell renal cell carcinoma," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 13, no. 7, pp. 410–419, 2017.
- [3] M. L. Stephenson and P. C. Zamecnik, "Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1978.
- [4] C. F. Bennett and E. E. Swayze, "RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2010.
- [5] V. A. Burzio et al., "Expression of a family of noncoding mitochondrial RNAs distinguishes normal from cancer cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009.
- [6] S. Vidaurre et al., "Down-regulation of the antisense mitochondrial non-coding RNAs (ncRNAs) is a unique vulnerability of cancer cells and a potential target for cancer therapy," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 39, pp. 27182–27198, 2014.
- [7] L. Lobos-González et al., "Targeting antisense mitochondrial ncRNAs inhibits murine melanoma tumor growth and metastasis through reduction in survival and invasion factors," *Oncotarget*, 2016.
- [8] V. Borgna et al., "Mitochondrial ASncmtRNA-1 and ASncmtRNA-2 as potent targets to inhibit tumor growth and metastasis in the RenCa murine renal adenocarcinoma model," *Oncotarget*, 2017.
- [9] X. Yao et al., "VHL deficiency drives enhancer activation of oncogenes in clear cell renal cell carcinoma," *Cancer Discov.*, 2017.
- [10] E. Landerer et al., "Nuclear localization of the mitochondrial ncRNAs in normal and cancer cells," *Cell. Oncol.*, 2011.
- [11] J. Villegas et al., "Expression of a novel non-coding mitochondrial RNA in human proliferating cells," *Nucleic Acids Res.*, 2007.
- [12] J. Villegas, V. Borgna, and V. A. Burzio, "Different cancers, same target?," *Aging*, 2017.
- [13] C. Villota et al., "HPV-18 E2 protein downregulates antisense noncoding mitochondrial RNA-2, delaying replicative senescence of human keratinocytes," *Aging (Albany, NY)*, 2019.
- [14] C. Villota et al., "Expression of mitochondrial non-coding RNAs (ncRNAs) is modulated by high risk human papillomavirus (HPV) oncogenes," *J. Biol. Chem.*, 2012.
- [15] V. Borgna et al., "191 The antisense long non-coding mitochondrial RNA (AS-ncmtRNA) as target for a novel treatment of renal carcinoma," *Eur. Urol. Suppl.*, 2014.
- [16] M. Araya, F. Guevara, J. Villegas, L. Alarcón, L. Burzio, and V. Borgna, "MP21-19 THE ANTISENSE LONG NON-CODING MITOCHONDRIAL RNA (AS-NCMTRNA) INTERFERENCE WITH ANDES-1537 AS A NOVEL TREATMENT FOR RENAL CARCINOMA," *J. Urol.*, 2019.
- [17] G. Ambrosini, C. Adida, and D. C. Altieri, "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma," *Nat. Med.*, 1997.
- [18] C. Fitzpatrick et al., "Mitochondrial ncRNA targeting induces cell cycle arrest and tumor growth inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cells through reduction of key cell cycle progression factors," *Cell Death Dis.*, 2019.
- [19] D. A. Bell, A. J. Hooper, and J. R. Burnett, "Mipomersen, an antisense apolipoprotein B synthesis inhibitor," *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2011.
- [20] J. S. Charleston et al., "Eteplirsen treatment for Duchenne muscular dystrophy," *Neurology*, 2018.
- [21] M. S. Dhawan et al., "Phase 1 study of ANDES-1537: A novel antisense oligonucleotide against non-coding mitochondrial DNA in advanced solid tumors," *J. Clin. Oncol.*, 2018.

## INFORME TRABAJO DE INGRESO DR. VINCENZO BORGNA CHRISTIE

El manejo de tumores renales metastásicos ha presentado grandes cambios en los últimos 15 años con el advenimiento de terapias sistémicas dirigidas además de la inmunoterapia, si bien el objetivo aún apunta a la paliación. Numerosos ensayos clínicos han mostrado resultados positivos con la implementación de estas herramientas, derivando en la aprobación de numerosas drogas por las respectivas agencias. Sin embargo, este campo se encuentra aún en plena evolución, con una persistente y significativa necesidad de mejoría de desenlaces, al ser limitado el impacto de las nuevas terapias sistémicas en la sobrevida de estos pacientes.

En ese contexto, el presente trabajo apunta a evaluar el rol de un nuevo tratamiento para este escenario clínico. Se trata del Andes-1537, un oligonucleótido antisentido (ASO), ideado y desarrollado integralmente en nuestro país por la Fundación Ciencia y Vida y Andes Biotechnologies. El oligonucleótido ejerce su acción antineoplásica al ligarse selectivamente al ARN mitocondrial no codificante antisentido (ARNmtncAS) e induciendo apoptosis de células tumorales al alterar la consiguiente expresión génica. En este caso, se altera la traducción del ARNmtncAS, la cual está basalmente muy disminuida en células tumorales. De esta manera, se genera una masiva muerte celular al liberarse mecanismos inhibitorios de apoptosis. Esto lleva eventualmente a la remisión tumoral. Este efecto ha sido demostrado en múltiples tumores sólidos en estudios pre-clínicos así como en diversas líneas celulares. Por otro lado, y siendo esto muy relevante, no existe un efecto en células normales.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la interferencia del ARNmtncAS con Andes-1537 como un nuevo tratamiento para el cáncer renal en modelos in vitro e in vivo. La metodología es adecuada para el objetivo, cumpliendo además con todos los estándares de calidad, bioseguridad y bioética. Dentro de los resultados obtenidos destacan los siguientes:

1. Andes-1537 induce apoptosis en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer renal humano, sin afectar la viabilidad de células renales normales (estudio in vitro)
2. Andes-1537 induce una disminución en los niveles de factores antiapoptóticos (Survivina) y proteínas involucradas en el ciclo celular (Ciclina B1 y Ciclina D1) en la línea celular (A-498) (estudio in vitro)
3. Andes 1537 disminuye la invasividad y propiedades tumorigénicas en línea celular A-498 (estudio in vitro)
4. Andes-1537 inhibe el crecimiento tumoral en un

modelo subcutáneo con A-498 (estudio in vivo)

5. Andes-1537 inhibe el crecimiento tumoral y aumenta sobrevida en un modelo de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) con tumores renales humanos (estudio in vivo)

Todos estos resultados indican un potencial rol del Andes-1537 como un novedoso tratamiento del cáncer renal, basado en su selectividad con el ARNmtncAS, que a su vez se perfila como un potente blanco terapéutico. Su rol como supresor tumoral pareciera ser un relevante paso en la carcinogénesis. De esta manera, al estar disminuido en células tumorales (expresado como una mínima presencia) existe un significativo aumento de propiedades proliferativas e invasoras de la célula.

Los procedimientos realizados en este estudio cumplen adecuadamente todas las etapas preclínicas de evaluación de agentes antitumorales, incluyendo evaluaciones in vitro con líneas celulares establecidas y con cultivos primarios de células tumorales de pacientes con cáncer renal. Los estudios in vivo en modelos murinos confirman la acción antineoplásica del Andes-1537, destacando aquellos obtenidos en el modelo PDX. Este modelo se ha constituido en un estándar en la investigación del cáncer, al mantener características histológicas y genómicas similares en comparación con tumores primarios así como permitir estudios de eficacia de drogas. Desventajas como la falta de interacción con el sistema inmunológico, así como la poca capacidad metastásica, son adecuadamente mencionadas como limitaciones por el autor.

Se puede concluir de esta manera, que la terapia del cáncer renal con Andes-1537 está en condiciones de ser evaluada en estudios clínicos. De hecho, están disponibles los resultados del primer estudio fase I con Andes-1537 en tumores sólidos en etapa terminal, mostrando un favorable perfil de morbilidad y respuestas duraderas en algunos casos. Por otro lado, es importante mencionar que existen ya tres productos farmacéuticos basados en ASOs para el tratamiento de enfermedades benignas (Hipercolesterolemia familiar, rinitis por CMV y distrofia muscular de Duchenne). De esta manera, la comunidad urológica estará atenta a futuros estudios clínicos con Andes-1537.

En definitiva Sr. Presidente, Sres. Miembros del Directorio y colegas en general, el trabajo que nos presenta el Dr. Borgna constituye un reporte único en nuestro medio. En mi opinión personal como revisor, se trata de un valioso ejemplo de investigación traslacional al más alto nivel, esfuerzo de muchos años llevado a cabo por un clínico formalmente entrenado en investigación, insertado en un equipo multidisciplinario de ciencias básicas, logrando de esta manera la interacción necesaria para el éxito de una empresa como esta. Es muy importante destacar esto, considerando las múltiples dificultades existentes para el desarrollo de actividades de investigación en nuestro país,

propias de uno en vías de desarrollo.

El Dr. Vincenzo Borgna Christie vive en Santiago con Mariela, su pareja y colega. Estudió medicina en la Universidad Andrés Bello, recibiendo el 2009. Posteriormente realizó su Doctorado en Biotecnología en la misma casa de estudios, titulándose en 2015 con la máxima distinción Summa Cum Laude, obteniendo ese año incluso el Premio Alumni UNAB por la Mejor Tesis Doctoral.

Desde ese momento ha mantenido una intensa actividad académica como Profesor Adjunto en la Fundación Ciencia y Vida, trabajando principalmente en inmunoterapia celular. En ese contexto, se adjudicó el año 2019 un proyecto Fondecyt Iniciación como Investigador Principal. El proyecto trata acerca del rol antitumoral de linfocitos intratumorales con fenotipo residente en cáncer renal. Es además Director Alterno en un proyecto Fondef Idea evaluando una nueva terapia para el cáncer de próstata resistente a castración.

En su corta carrera, el Dr. Borgna ha participado como autor en 18 publicaciones indexadas, en 3 de ellas como primer autor. Posee además participación en 3 capítulos de libros. Sus éxitos académicos se manifiestan también en la obtención de numerosos premios en congresos chilenos de urología, destacando entre ellos los 1eros lugares en 2015 y 2017 con trabajos experimentales en cáncer de vejiga y renal. Desde el punto de vista clínico, el Dr. Borgna realizó su formación como urólogo en el Hospital Barros Luco-Trudeau con la Universidad de Santiago, obteniendo su título de especialista en 2018. Completó posteriormente un Fellowship en Endourología y Cirugía Minimamente Invasiva en la Clínica Indisa en 2020. Actualmente se desempeña como urólogo en el Hospital Barros Luco-Trudeau y en la Clínica Cordillera, cumpliendo actividades académico-docentes en el primero como Instructor de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Santiago. Todo lo anterior demuestra como el Dr. Borgna ha logrado compatibilizar las actividades clínico-asistenciales propias de nuestra especialidad con una actividad académica de primer nivel. Destaca además su activo rol como Cirujano del Cuerpo de Bomberos de Santiago.

Sr. Presidente, Sres. miembros del Directorio y colegas de la Sociedad Chilena de Urología, agradezco la oportunidad de poder revisar el trabajo de ingreso del Dr. Vincenzo Borgna. Su destacadísima formación académica, sus atributos personales y finalmente su trabajo de ingreso me permiten recomendarlo decididamente como socio titular de nuestra Sociedad.

### **Dr. Mario I. Fernández**

Profesor Asociado  
Urología – Centro de Genética y Genómica  
Facultad de Medicina  
Clínica Alemana Universidad del Desarrollo