



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Talimogene laherparepvec como terapia oncolítica**

Autor: Cristina Jiménez Núñez

D.N.I.: 53266823L

Tutor: Luis Miguel Bedoya Del Olmo

Convocatoria: 23 de Junio de 2016

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	2
3. OBJETIVOS.....	6
4. METODOLOGÍA.....	6
5. RESULTADOS.....	7
6. DISCUSIÓN.....	13
7. CONCLUSIONES.....	15
8. BIBLIOGRAFÍA.....	16

## **1. RESUMEN**

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, y son múltiples las terapias estudiadas y desarrolladas para intentar vencerlo. Entre ellas, la terapia oncolítica constituye un avance prometedor en la lucha contra el cáncer.

Los virus oncolíticos son aquellos que atacan a células tumorales sin dañar al tejido sano. Han sido objeto de estudio durante muchos años, pero en 2015 ha sido aprobada por la FDA la primera terapia basada en uno de ellos: Talimogene laherparepvec (T-VEC) para el tratamiento de melanoma metastásico no extirpable en estadios IIIb a IV.

T-VEC es un virus derivado del Virus Herpes Simple tipo 1 (HSV-1), modificado genéticamente para atacar y destruir selectivamente células cancerosas, y a su vez generar una potente respuesta inmune antitumoral. T-VEC ha sido testado en ensayos preclínicos en animales y ensayos clínicos en pacientes con cáncer, mostrando una elevada tasa de respuesta con reducción del tamaño de los tumores tanto locales, en el punto de inyección del virus, como de las metástasis, y un aumento en la tasa de supervivencia a 1 año. Ha mostrado ser una terapia segura, ya que conlleva baja toxicidad asociada, con reacciones adversas leves.

## **2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

Según la Organización Mundial de la Salud, en 2012 hubo 14,1 millones de casos nuevos de cáncer en el mundo y 8,2 millones de muertes por cáncer, representando el 22% de todas las defunciones por enfermedad no transmisible<sup>1</sup>. De forma global, el melanoma representa aproximadamente el 1,5% de todos los tumores en ambos sexos<sup>2</sup>. Se sitúa en el 4% de tumores malignos de la piel, aunque es el responsable del 80% de las muertes por este tipo de tumores<sup>3</sup>. De entre todas las terapias utilizadas y estudiadas, la terapia inmunológica es la que más interés ha causado en los últimos años, y particularmente con múltiples datos preclínicos, se ha situado como prometedora la terapia oncolítica<sup>4</sup>.

Los virus oncolíticos son aquellos que se propagan y dañan de forma selectiva a células tumorales, sin afectar a tejido sano<sup>5</sup>. Entendiendo la forma en que los virus infectan y destruyen tejidos, no es sorprendente que desde el punto de vista farmacológico se haya buscado la forma de utilizar virus para atacar a células tumorales. Esto es así desde hace más de cien años, cuando se notificaron casos donde remisiones tumorales coincidían con infecciones por virus naturales<sup>6</sup>. Las primeras investigaciones sobre virus oncolíticos se remontan a los años 50<sup>7</sup> y desde entonces se han llevado a cabo hasta la actualidad, donde ha resurgido un enorme interés científico en este tipo de terapia, alcanzando su punto culmen en

2015 donde la FDA ha aprobado la primera terapia viral oncolítica, usando Talimogene laherparepvec (T-VEC), para melanoma recurrente no extirpable<sup>8</sup>.

La orientación específica de los virus hacia células tumorales es la cuestión a resolver más importante en el desarrollo de la terapia oncolítica<sup>5</sup>. Mientras que algunos virus de forma inherente presentan mayor especificidad para replicarse en células cancerosas que en células sanas<sup>9</sup>, en la mayoría ha de potenciarse esta capacidad, y existen diversos mecanismos para ello:

1. Focalización pro-apoptótica: para facilitar su propia replicación, muchos virus retrasan la apoptosis de la célula infectada mediante la codificación de proteínas que alteran a genes reguladores de la muerte celular programada (como p53 o pRB). Eliminando la posibilidad de codificar tales proteínas, los virus sólo serán capaces de propagarse en células donde los reguladores de la apoptosis sean no funcionales, como es el caso de las células tumorales, ya que en las células sanas se induciría la apoptosis de forma prematura. Por tanto, la delección de genes del virus que codifican esas proteínas, implica la especificidad del virus hacia células cancerosas.
2. Focalización transaccional: la respuesta a una infección viral por parte de una célula es la liberación de interferón de tipo I (IFN), impidiendo la replicación viral en las células adyacentes. Sin embargo, las vías de señalización del IFN se encuentran alteradas en células neoplásicas, por lo que se puede focalizar la infección viral a éstas mediante la potenciación de la liberación de IFN, que permita a las células sanas defenderse frente a la infección viral evitando su replicación, siendo ésta sólo posible en las células alteradas.
3. Focalización transcripcional: consiste en la inserción de promotores específicos de tejidos o específicos de tumores en el genoma viral, que regulen la expresión genética del virus, cuyos productos son esenciales para la propagación viral.
4. Focalización transduccional: consiste en explotar el hecho de que las células tumorales expresen una elevada cantidad de receptores específicos de tumores, para orientar específicamente a los virus hacia ellas.
5. Estrategias de orientación basadas en el microambiente tumoral: para mantener el crecimiento incontrolado del tumor, las células modifican su alrededor dando lugar a hipoxia, angiogénesis y síntesis de ciertas proteasas, entre otros aspectos. Virus capaces de replicarse selectivamente en situaciones de hipoxia estarán orientados a propagarse en tejidos tumorales.

6. Orientación hacia el tumor usando células como vehículo del virus: las células cancerosas liberan gran número de citoquinas que permiten el transporte de células inmunitarias al tumor. Estas células pueden ser utilizadas como vehículo de transporte de los virus oncolíticos hacia el lugar deseado, en este caso, el tumor.<sup>10</sup>

Hoy en día, no se conocen por completo los mecanismos por los cuales los virus oncolíticos median la reducción de los tumores. Los virus oncolíticos pueden destruir las células cancerosas infectadas de muchas maneras. Cuando infectan las células tumorales, éstos toman el control sobre su maquinaria molecular, dando lugar a la muerte celular sólo cuando los recursos celulares se han aprovechado al máximo para la síntesis y el ensamblaje de nuevos virus.

- Por sí mismos, pueden provocar la lisis celular como resultado de su propia replicación, pudiendo repetirse el ciclo amplificándose este efecto a más células cancerosas.
- Puede darse también la síntesis de proteínas durante la replicación viral, que son tóxicas para la célula infectada.
- Otro mecanismo de destrucción de células cancerosas es la inducción viral de una respuesta inmune antitumoral, tanto específica como inespecífica, de la que carecen las células malignas ya que consiguen evadirla.
- Se ha utilizado además la terapia oncolítica para aumentar la sensibilidad tumoral a otros tratamientos como la quimioterapia o la radioterapia, es decir, realizando una terapia combinada que resulte sinérgica.
- Un mecanismo más sofisticado es la expresión de transgenes terapéuticos insertados en el genoma viral, generando virus “armados” que dan lugar a proteínas activas contra el tumor<sup>11</sup>.
- Además, pueden afectar a células cancerosas sin haberlas infectado, influyendo sobre la vascularización del tumor<sup>5</sup>.

Se han estudiado múltiples virus para utilizarse en el tratamiento del cáncer:

**Adenovirus:** se trata de un virus desnudo, que contiene doble cadena de DNA y que posee un extenso genoma lo que permite la incorporación de largas cadenas de DNA y múltiples modificaciones por ingeniería genética. Para la replicación en la célula que invade, este virus se traslada al núcleo donde induce la expresión de los genes E1A y E1B, que inhiben la acción de las proteínas supresoras de tumores pRB y p53, permitiendo que la célula

comience su ciclo de división, que dará lugar a la apoptosis celular y liberación de la progenie viral<sup>12</sup>. Se han desarrollado adenovirus con deleciones de los genes E1A y E1B<sup>13,14</sup>, siendo más selectivos de propagarse en células tumorales ya que es sabido que éstas expresan formas no funcionales de pRB y p53, lo que hace prescindible para el adenovirus la expresión de E1A y E1B. La posibilidad de codificar extensos transgenes externos y de atenuar fácilmente la patogenicidad viral hace del adenovirus un virus atractivo para desarrollarse como oncolítico<sup>15</sup>.

**Virus Vaccinia:** este virus contiene también un extenso genoma compuesto por doble cadena de DNA y completa su ciclo únicamente en el citoplasma celular, sin afectar al núcleo. Tiene la capacidad de infectar a un gran rango de células y se ha demostrado su tropismo por células cancerosas<sup>16</sup>. Además, la infección por este virus genera una elevada respuesta inmunitaria, que interesa ser potenciada contra células tumorales. Por todo ello, es un virus muy estudiado para terapia antitumoral.

**Reovirus:** es un virus no envuelto, de doble cadena de RNA, que tiene una selectividad natural por neoplasias debido a que en células cancerosas con *ras* activado la PKR (proteín kinasa activada por dsRNA), que en condiciones normales acabaría con la infección viral, está inhibida por *ras*<sup>17,18</sup>. Debido a que el 30% de las células cancerosas presentan mutación activa de *ras*, reovirus se presenta como un agente con alto potencial oncolítico<sup>19</sup>. Sin embargo, la población está comúnmente expuesta al virus desde la infancia<sup>20</sup>, generando anticuerpos contra él, lo que puede ser un obstáculo para un desarrollo efectivo<sup>21</sup>.

**Virus Coxsackie:** este virus ha demostrado tener un tropismo natural a determinados tipos de cáncer como mieloma, melanoma y cáncer de mama, que sobreexpresan las proteínas ICAM-1 y DAF, a través de las cuales el virus penetra en las células que invade<sup>22</sup>. Además, genera una fuerte respuesta inmune estimulando la secreción de IFN, activando células NK, linfocitos T-CD8, y favoreciendo la presentación antigénica<sup>23</sup>. Por tanto, sin manipulación genética el virus posee selectividad por células tumorales, y provee de una fuerte respuesta inmune a la infección.

**Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV):** es un virus RNA de cadena simple, aviar, ampliamente estudiado como agente oncolítico. Es un virus no patogénico en humanos, debido a que es altamente sensible a la respuesta mediada por IFN-I, que sus propias proteínas generan en las células humanas. Esta sensibilidad al IFN-I es la que le confiere la especificidad por células tumorales<sup>24</sup>. NDV induce apoptosis de las células cancerosas y activa el sistema inmunitario innato a través del aumento de citoquinas y la presentación antigénica<sup>25</sup>.

**Virus Herpes Simple-1 (HSV-1):** HSV-1 es un virus envuelto, de doble cadena de DNA, con un gran genoma y una gran cantidad de genes que no son esenciales para la infección viral, por lo que pueden ser modificados. Su replicación ocurre en el núcleo pero no causa mutagénesis por inserción de genes. Es capaz de infectar múltiples tipos de células, y raramente produce daños severos en adultos inmunocompetentes, siendo además muy sensible al tratamiento con aciclovir que puede ser utilizado para detener la replicación viral<sup>19</sup>. Es el virus oncolítico que se ha mostrado más prometedor debido a que el T-VEC, virus basado en el HSV-1, ha sido aprobado como primera terapia oncolítica por la FDA<sup>6</sup>. Por tanto, este trabajo se centrará en el HSV-1 y en concreto en el T-VEC, virus oncolítico que ha llegado más lejos que el resto en su desarrollo clínico.

**Otros virus:** otros virus han sido estudiados como posibles terapias antineoplásicas, tales como el poliovirus, el virus Measles, parvovirus, retrovirus, virus Seneca-Valley y rhabdovirus<sup>15</sup>.

### 3. OBJETIVOS

Los objetivos de esta revisión fueron analizar, desde la literatura científica publicada, los siguientes aspectos:

- Describir el mecanismo de acción de Talimogene laherparepvec como virus oncolítico.
- Evidenciar que la terapia con Talimogene laherparepvec es un tratamiento eficaz para la indicación para la que ha sido aprobada.
- Demostrar que Talimogene laherparepvec es seguro, y describir los efectos adversos que puede conllevar el tratamiento.

### 4. METODOLOGÍA

Para este trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica para la cual se utilizó la base de datos PubMed, y se accedió a otros artículos mediante la herramienta Google académico. También se consultaron las páginas web de la Organización Mundial de la Salud, la Sociedad Española de Oncología Médica y la Asociación de afectados de melanoma y cáncer de piel.

Las palabras claves utilizadas para la búsqueda fueron: *talimogene laherparepvec*, *oncovex*, *T-vec*, *T-vec and melanoma*, *oncolytic hsv*. En total se revisaron 3 páginas web, y 40 artículos, de los cuales destacamos 7 sobre son los ensayos preclínicos y clínicos realizados con el virus estudiado (referencias: 28, 36-41).

## 5. RESULTADOS

De todos los virus oncolíticos investigados en diversos estudios, el Virus Herpes Simplex (HSV) es uno de los más usados clínicamente. Las características que hacen de este virus un agente ideal en la lucha contra el cáncer son múltiples. En primer lugar, su patogenicidad es bien conocida, y principalmente resulta en enfermedad local autolimitada, existiendo solamente raros episodios de enfermedad mortal en adultos inmunocompetentes. Por otro lado se encuentra el hecho de que el HSV es capaz de infectar a la mayoría de tipos celulares, y su gran velocidad de replicación dentro de ellas, que termina con la temprana muerte de la célula infectada. HSV, además, contiene un largo genoma, capaz de manipularse fácilmente y donde pueden insertarse gran cantidad de transgenes. Otra ventaja que ofrece frente a otros virus es la sensibilidad a fármacos anti-HSV como el aciclovir y similares, que puede resultar útil en caso de que la infección se descontrole o de que aparezca toxicidad. Es de señalar a su vez, que el riesgo de introducción de mutaciones por inserción por parte del virus en el DNA huésped es mínimo, debido a que HSV raramente se integra en el DNA celular. Además de estas características, HSV ha mostrado en diversos estudios que en combinación con radioterapia o quimioterapia produce acción sinérgica<sup>26,27</sup>.

El HSV posee dos serotipos, HSV-1 y HSV-2, de los cuales el que más se ha investigado como agente oncolítico es el HSV-1 debido a que se ha estudiado más y se tienen más datos sobre él<sup>26</sup>. Numerosos virus derivados del HSV-1 han sido estudiados en diversos ensayos, como vemos en la siguiente tabla (Tabla 1)<sup>27</sup>:

**Tabla 1: Tipos de virus derivados del Virus Herpes Simplex estudiados como virus oncolíticos.** Tomado de: Liu S L, et al. Advance in herpes simplex viruses for cancer therapy. 2013

Name	Mutation	Tumor type	Therapeutic traits
Dlspk	Deletion of viral thymidine kinase (TK) gene	Malignant human gliomas cells	Dlspk virus has significant safety concerns. Its neurotoxicity is seen at high doses.
R3616	Deletion of two copies of $\gamma$ -34.5 genes	Pancreatic cancer; colon carcinoma cell	R3616 induced a greater number of infiltrating T cells, macrophages and dendritic cells than chemotherapy.
DM33	Deletions of $\gamma$ -34.5 and LAT gene	Human gliomas and glioma cell lines	Mutations in DM33 are based on the McKrae strain, enhancing the virus to better kill cancer cells with attenuated virulence.
G207	Deletions of two copies of the $\gamma$ -34.5; insertion of an <i>Escherichia coli</i> LacZ	Prostate adenocarcinoma; glioblastoma; hepatocellular carcinoma; colorectal cancer	G207 induces systemic anti-tumor immunity with an increasing cytotoxic T lymphocyte activity specific to tumor cells.
G47 delta	Derived from G207 with additional deletion of $\alpha$ 47 gene	Prostate adenocarcinoma; glioblastoma; rectal cancer; nasopharyngeal carcinoma; breast cancer	G47 delta has better efficacy than that of G207.
NV1020	Deletion of a 15-kb region at the UL/S junction and 700 bp deletion in thymidine kinase (tk) locus	Pancreatic cancer; colon carcinoma; bladder cancer; pleural cancer	Its efficacy and safety have been tested in clinical trials.
HF10	Deletion of 3.9 kbp in the right end of the UL and UL/IRL junction	Breast cancer; malignant melanoma; pancreatic cancer	HF10 enhances angiogenesis and induced a cytotoxic T lymphocyte response directed against tumor cells.
HSV1716	Derived from HSV-1(17+) strain with the deletion of $\gamma$ -34.5 genes	Glioblastoma multiforme; anaplastic astrocytoma; oral squamous cell carcinoma	HSV1716 is safe and well tolerated at high dose up to $1 \times 10^5$ PFU.

El primer virus oncolítico aprobado por la FDA como terapia fue Talimogene laherparepvec (T-VEC), en octubre de 2015. La estrategia utilizada para dar selectividad al virus por células cancerosas fue la delección del gen  $\gamma$ -34.5<sup>28</sup>, el de mayor neurovirulencia del HSV-1<sup>29</sup>. La proteína que codifica este gen, ICP34.5, actúa sobre diversas rutas, que dan lugar al desbloqueo de la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula huésped inducida por la infección, y contribuye a la replicación del virus en células que no se encuentran en división, como son las neuronas adultas, pudiendo derivar en encefalitis<sup>31</sup>. Por tanto, la delección del gen que codifica ICP34.5 supuso una disminución en la neuropatogenicidad del HSV-1 en células sanas, y mayor selectividad por células cancerosas, donde se encuentra activada la vía Ras/MAPK permitiendo la replicación de HSV deficientes en  $\gamma$ -34.5<sup>27</sup>. Diversos estudios han mostrado seguridad en el uso de derivados del HSV con delección en el gen  $\gamma$ -34.5, y replicación selectiva en distintos tipos de tumores, sin embargo ésta mostró ser menos eficiente que en el virus salvaje<sup>31-34</sup>.

Para aumentar el rendimiento en la replicación viral en las células malignas, se eliminó el gen  $\alpha$ -47, que codifica ICP47<sup>28</sup>. Esta delección afecta al gen US11, aumentando su expresión y dando lugar a una mayor replicación viral al aumentar la síntesis de proteínas de la célula hospedadora. Con esta estrategia además, se consigue aumentar la respuesta inmune debido a que en condiciones normales el HSV evade la respuesta inmunitaria gracias a que ICP47 bloquea la acción del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 1 (CMH-1) en la superficie de la célula infectada. Eliminando ICP47 se aumenta, por tanto, la presentación antigénica y la respuesta inmune antitumoral<sup>35</sup>.

Además, buscando el aumento de la respuesta inmune antitumoral generada por la liberación de antígenos debida a la replicación del HSV, se insertó la secuencia de codificación de GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) en el DNA viral<sup>28</sup>.

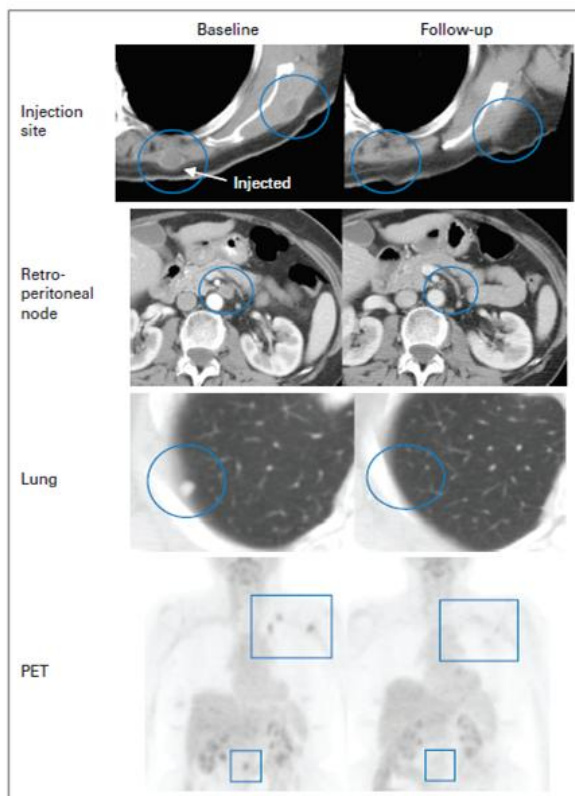
El virus obtenido aplicándole estas modificaciones, se denominó en primer lugar Oncovex<sup>GM-CSF</sup>, y posteriormente Talimogene laherparepvec, y fue testado en diversos ensayos. En los estudios preclínicos, sobre ratones, cepas con delección de  $\gamma$ -34.5 mostraron una mayor replicación y aumento de la muerte de células tumorales comparado con cepas originales. La eliminación del gen  $\alpha$ -47 dio lugar a mayores efectos antitumorales, y un aumento de CMH-1 en la superficie celular en comparación con células infectadas con cepas del virus sin esta modificación. Se midió el efecto de la incorporación del gen que codifica GM-CSF, y se obtuvo una mayor reducción del tamaño del tumor, un mayor porcentaje de

curación y un aumento de los niveles de IFN- $\gamma$  debidos a la adición de GM-CSF. Además se probó que la administración del virus genera protección inmunitaria contra tumores posteriores, y que el efecto antitumoral del HSV oncolítico no se ve afectado si el individuo es seropositivo frente a HSV<sup>28</sup>.

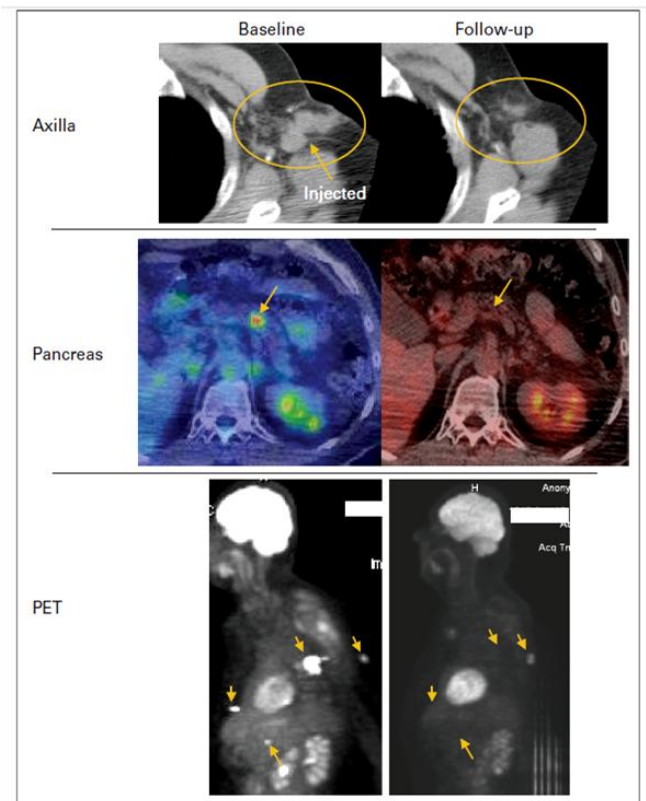
El estudio en fase I<sup>36</sup> fue realizado por inyección intratumoral del virus en pacientes con metástasis cutánea o s.c. de cáncer de pulmón, cabeza, cuello o gastrointestinal o melanoma maligno, estudiándose regímenes de dosis única y multidosis (tres inyecciones con concentraciones crecientes del virus). La tolerancia al virus fue buena, y los efectos secundarios principales fueron inflamación local, eritema y fiebre autolimitada, siendo más evidentes en pacientes seronegativos que en seropositivos al HSV, y reducidos en el régimen multidosis. Todos los pacientes seronegativos sufrieron la seroconversión 3 o 4 semanas después de su primera dosis. Los pacientes seropositivos tuvieron un aumento en el índice de anticuerpos anti-HSV con cada inyección, siendo el mejor régimen el de dosis de  $10^6$ - $10^8$ - $10^8$  pfu/ml cada 2-3 semanas según la duración de las reacciones adversas. Se detectó un aumento en la expresión de GM-CSF proporcional a la dosis, alcanzando el máximo en  $10^7$  pfu/ml, y con variabilidad en dosis superiores lo que pudo deberse a las diferencias en los tipos de tumores o la serología. El virus inyectado en la mayoría de los casos se quedó localizado en el sitio de inyección, no encontrándose en orina o sangre, ni en la superficie del tumor. Las biopsias post-inyección mostraron necrosis del tejido tumoral inyectado y no inyectado, provocada por el virus, y ausencia de necrosis en tejido sano. Muchos pacientes mostraron mejoría clínica, con estabilización de la enfermedad o aplanamiento del tumor. Otros resultados fueron poco concluyentes debido a que el seguimiento fue solo de 6 semanas post-inyección.

El estudio en fase II<sup>37</sup> se realizó sobre 50 pacientes con melanoma metastásico en estadio IIIc o IV, mediante inyección intratumoral. El régimen de dosis utilizado fue el previamente explicado, con una primera dosis de  $10^6$  pfu/ml (para conseguir la seroconversión) y sucesivas dosis cada 2 semanas de  $10^8$  pfu/ml hasta un máximo de 24. La tasa de respuesta objetiva fue alta, consiguiendo el estado de “no evidencia de enfermedad” en 13 pacientes (26%), y se logró una tasa de supervivencia a un año del 58% de los pacientes. La duración de los efectos se mostró considerable, entre 16 y 40 meses después de la aplicación de la primera dosis. No hubo correlación entre la respuesta y haber tenido terapia previa, el número de terapias previas o el estado serológico a HSV. Como ejemplos, un

paciente que en menos de un año pasó del diagnóstico por una lesión ulcerosa en el hombro izquierdo a adenopatía retroperitoneal, lesiones subcutáneas en ambos hombros, pulmón y lesiones hepáticas. Tras un tratamiento ineficaz con quimioterapia, comienza con el tratamiento oncolítico, sufriendo las inyecciones en un punto del hombro izquierdo. 8 meses después de comenzar las inyecciones, todas las lesiones se habrían resuelto (Figura 1). Otro paciente, fue diagnosticado por nódulos metastásicos axilares, que fueron primeramente tratados con cirugía, radiación, IFN- $\alpha$ , GM-CSF y la vacuna NY-ESO-1 durante 4 años, donde el cáncer progresó con metástasis en el páncreas y lesiones en el pecho y el brazo derecho. El paciente recibió las 24 dosis, y como vemos en la Figura 2, tras 12 meses las lesiones se redujeron, y a los 24 meses se consideró el estado de “no evidencia de enfermedad”.



**Figura 1**



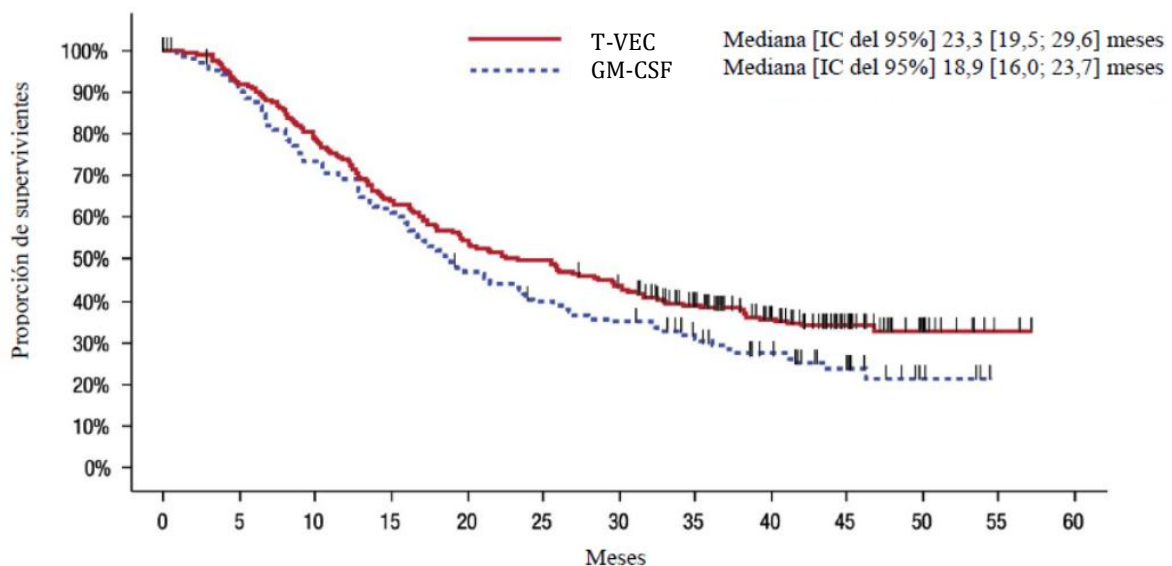
**Figura 2**

**Figura 1:** imágenes de TC (tomografía computarizada) y PET de las lesiones en el sitio de inyección del hombro, la región retroperitoneal y el pulmón antes (baseline) y después de 3 a 8 meses de terapia (follow-up) en un paciente del ensayo clínico en fase II. **Figura 2:** imágenes de TC y PET del sitio de inyección de la axila, el páncreas y lesiones en axila, páncreas y parte superior del brazo antes (baseline) y después de 12 a 16 meses de tratamiento con T-VEC (follow-up) de un paciente del ensayo clínico en fase II. Tomado de: Senzer NN, et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. 2009.

Otro ensayo en fase II<sup>38</sup> se centró en comparar la respuesta inmune desarrollada en el punto de inyección, es decir, local, con la respuesta sistémica medida en sangre periférica. Llegó a la conclusión de que las lesiones melanoma-metastásicas inducen supresión de células CD4+, Tregs, CD8+, Ts and MDSC, y que el tratamiento intratumoral con T-VEC disminuye la supresión y además induce una respuesta local y sistémica de células CD8+. Es decir, se consigue una potente inmunidad local y sistémica mediada por células T, en pacientes con melanoma tratados con T-VEC.

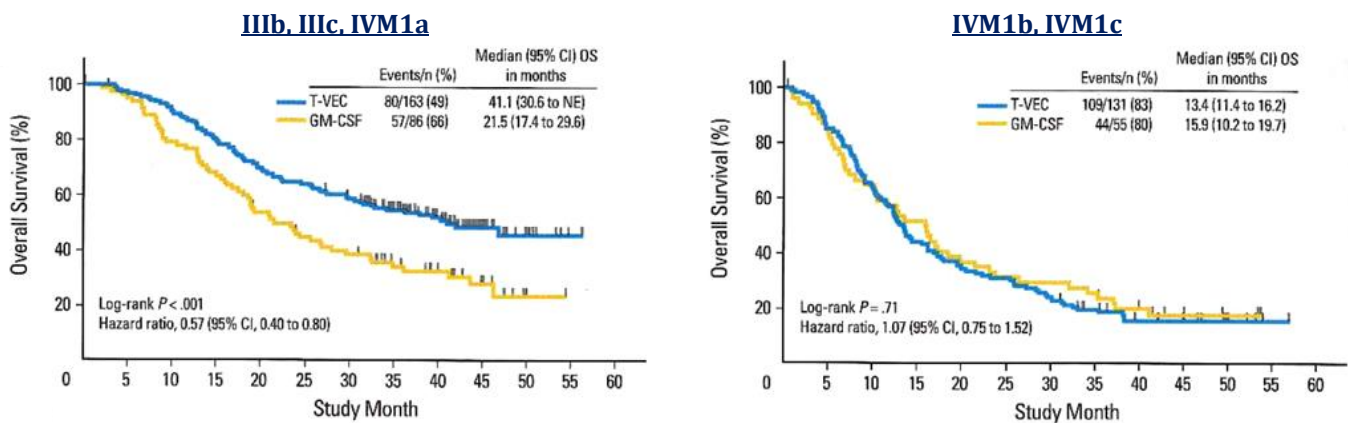
Un ensayo en fase I/II<sup>39</sup> quiso estudiar la seguridad y eficacia del virus oncolítico en combinación con quimioterapia (cisplatino) en pacientes con cáncer de células escamosas en cabeza y cuello. El tratamiento combinado fue bien tolerado, y un 93% logró la remisión completa. No se desarrollaron recurrencias.

En el ensayo clínico en fase III<sup>40</sup>, se demostró el aumento de la tasa de respuesta duradera mediante un estudio multicéntrico de 436 pacientes con melanoma en estadios IIIb a IV. Se realizó el estudio de la eficacia del tratamiento con T-VEC en comparación con pacientes tratados con GM-CSF. Las tasas de respuesta duradera y global fueron significativamente superiores en el grupo con T-VEC que en el grupo con GM-CSF, y altas en comparación con otros agentes inmunoterápicos. También se observó diferencia significativa favorable a T-VEC en las tasas de supervivencia globales (Figura 3).



**Figura 3:** Gráfica de Kaplan-Meier - Supervivencia global estimada. Adaptado de: Andtbacka RH, et al. Talmogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients with Advanced Melanoma. 2015.

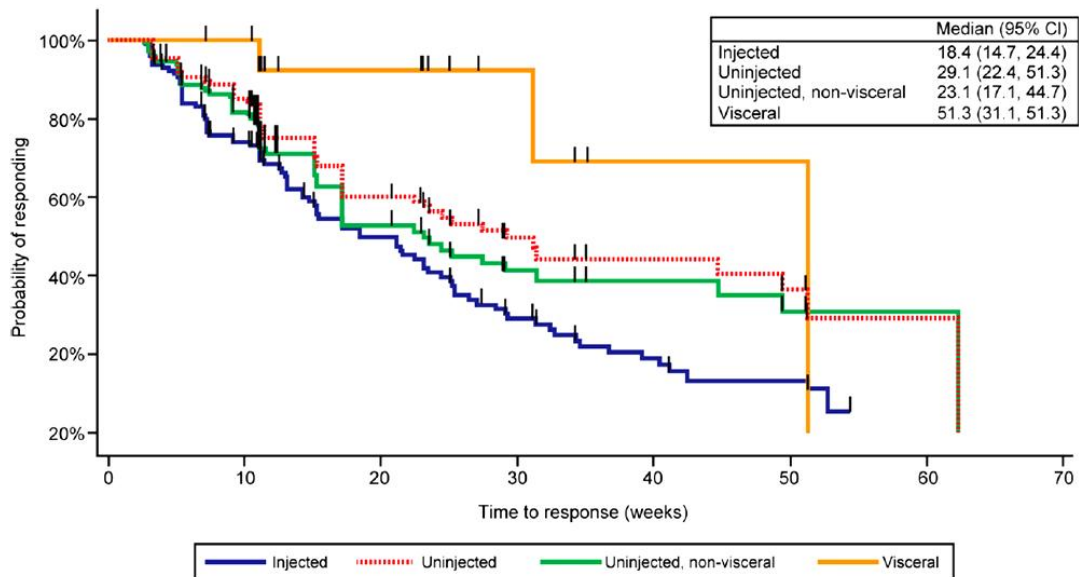
Las tasas de supervivencia fueron mayores en pacientes sólo con enfermedad cutánea, subcutánea o nodal que en pacientes con metástasis en otros órganos viscerales, es decir, los pacientes en estadios IIIb, IIIc y IVM1a se beneficiaron en mayor medida del tratamiento con T-VEC que aquellos con una enfermedad más avanzada (Figura 4). El efecto sistémico fue observado, ya que el 34,3% (lesiones no viscerales) y el 11,3% (lesiones viscerales) de los pacientes lograron una disminución global >50% en lesiones no inyectadas.



**Figura 4:** Comparación entre las gráficas Kaplan-Meier de supervivencia global estimada para enfermedad en estadios IIIb, IIIc, IVM1a (izquierda) y para enfermedad en estadios IV1b, IV1c (derecha). Tomado de: Andtbacka RH, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients with Advanced Melanoma. 2015.

También se observó una mayor tasa de respuesta en aquellos pacientes que recibieron T-VEC como tratamiento de primera línea respecto a los que habían sido tratados previamente. Los pacientes tratados con T-VEC redujeron el riesgo de muerte en un 21%. El tratamiento resultó tolerable, con reacciones adversas leves, similares a síntomas gripales.

Posteriormente se realizó otro ensayo multicéntrico en fase II<sup>41</sup>, para valorar la respuesta local frente a la sistémica, comparando el efecto del tratamiento entre las lesiones inyectadas, las no inyectadas y las viscerales. Se obtuvo la resolución completa del 46,1% de las lesiones inyectadas, 30,1% de las no inyectadas-no viscerales, y 9,4% de las lesiones no inyectadas viscerales. Proporciones similares pero con valores superiores se obtuvieron para respuestas parciales (>30% de reducción). Se midió el tiempo de respuesta a T-VEC de los distintos tipos de lesiones, y se obtuvo un menor tiempo en las lesiones inyectadas, seguidas de las no inyectadas-no viscerales y por último de las viscerales (Figura 5), resultado coherente con un inicio local de respuesta inmune antitumoral, y una respuesta sistémica retardada a T-VEC.



**Figura 5:** Niveles de tiempo de respuesta a T-VEC por lesiones inyectadas (azul), no inyectadas (rojo), no inyectadas-no viscerales (verde), y viscerales (naranja). Tomado de: Kaufman HL, et al. Systemic versus local responses in melanoma patients treated with talimogene laherparepvec from a multi-institutional phase II study. 2016.

## 6. DISCUSIÓN

Desde que se comenzaron a estudiar los virus como posibles agentes antitumorales, se han ido sucediendo múltiples ensayos clínicos en sus distintas fases con buen número de virus oncolíticos, si bien ninguno había conseguido pasar de la fase III<sup>11</sup>. Los avances científicos y tecnológicos, entre los que destacan el desarrollo de conocimientos sobre recombinación genética y el progreso de la inmunoterapia han posibilitado el perfeccionamiento de nuevas técnicas de modificaciones de los virus para tratar de conseguir el fin perseguido: destruir las células tumorales causando el menor perjuicio en el tejido sano.

Es en este contexto donde se aprueba la primera terapia con virus oncolíticos por la FDA. Talimogene laherparepvec, un virus derivado del Virus Herpes Simple tipo 1, del que se busca su efecto citolítico directo propio de un virus como tal, y a su vez, proporcionar *in situ* una vacuna antitumoral al paciente. Es decir, un virus con capacidad de destruir células tumorales de forma local, y de inducir una respuesta inmune a nivel sistémico influyendo sobre las metástasis a distancia<sup>28</sup>.

T-VEC ha sido modificado desde el HSV-1, a través de la delección de dos genes virales no esenciales y la inserción de un gen no viral. Con la eliminación de  $\gamma$ -34.5 se atenuó la patogenicidad y peligrosidad del virus, a la vez que se aumenta la selectividad por tumores. La delección del gen  $\alpha$ -47 aumenta la presentación antigénica y la expresión del gen US11

que potencia la replicación. Por último, la inserción del gen que codifica GM-CSF aumenta la respuesta inmune generada por los antígenos virales. Por lo tanto, con las modificaciones realizadas en el DNA viral, se ha conseguido un virus capaz de atacar selectivamente a células tumorales, aumentar su tasa de replicación en éstas, además de generar y potenciar una respuesta inmune contra estas células<sup>28</sup>.

La eficacia de la terapia con T-VEC ha sido principalmente estudiada en pacientes con melanoma, ya que mostraron ser las células tumorales mejor respondedoras en las primeras fases de las investigaciones y por la necesidad de nuevas terapias para el tratamiento de este tipo de cáncer<sup>36</sup>. T-VEC ha mostrado una alta tasa de respuesta, con disminución del tamaño de los tumores tanto de forma local en los lugares de inyección del virus, como sistémica en zonas metastásicas distanciadas del punto de inyección. También se midió la eficacia del tratamiento mediante la tasa de supervivencia a un año, que mostró ser mayor del doble que con otras terapias utilizadas. De esta forma, esta terapia aparece como prometedora para el tratamiento de estos casos de melanoma metastásico no extirpable, al mostrar mayor tasa de respuesta que otros inmunoterápicos y aumentar la tasa de supervivencia a 1 año<sup>40, 41</sup>.

T-VEC se mostró seguro en los diversos ensayos clínicos, siendo los principales efectos adversos similares a los síntomas de una gripe: fiebre, fatiga, escalofríos, náuseas, vómitos, cefaleas. Además fueron frecuentes las reacciones locales en el punto de inyección como dolor, eritema e inflamación. La gran mayoría de estos efectos adversos mostraron ser de grado 1 o 2, siendo raros los de grado 3 y normalmente no estando asociados al tratamiento, sino más bien al progreso de la propia enfermedad. Por tanto, en comparación con otras terapias para el melanoma, T-VEC se ha asociado a una menor toxicidad, siendo notable la baja tasa de efectos adversos de grado 3 y 4, que son mucho más frecuentes en inmunoterapias combinadas particularmente<sup>40, 42</sup>. También se ha demostrado que el virus tras la inyección permanece localizado en ese punto, sin encontrarse en la mayoría de los casos ni en sangre, ni en orina ni en la superficie del tumor<sup>36</sup>.

Un aspecto interesante a estudiar en la terapia con virus oncolíticos es la influencia sobre la terapia del estado serológico de los pacientes, es decir, la presencia de anticuerpos anti-HSV generados en el individuo tras una exposición. En el caso del HSV, esto es sumamente importante, ya que se estima que el 70% de los adultos han estado expuestos al HSV-1 y tienen anticuerpos contra el virus<sup>43</sup>. Siendo tan habitual, es fundamental conocer si

existen diferencias de seguridad o eficacia de la terapia en pacientes con serología positiva y negativa al virus HSV-1. Se demostró que los pacientes seronegativos sufrían la seroconversión alrededor de 3 a 7 semanas después de la primera administración del tratamiento, logrando niveles de anticuerpos similares a los pacientes inicialmente seropositivos<sup>37</sup>. Se ha demostrado que las reacciones adversas asociadas a la terapia son más frecuentes y pronunciadas en los pacientes inicialmente seronegativos, sin embargo éstas siguen siendo leves y autolimitadas en el tiempo<sup>36</sup>. En cuanto a la eficacia, no se han revelado diferencias respecto a tasa de respuesta o a reducción de tamaño de los tumores entre pacientes seropositivos y seronegativos<sup>28</sup>. Por tanto, no es relevante el hecho de que la mayoría de la población haya estado expuesta al virus.

Con la aprobación de la terapia con Talimogene laherparepvec, la terapia oncolítica ya no se encuentra como una posibilidad de tratamiento sino como una realidad. Es cierto que la aprobación se encuentra acotada a una sola indicación, limitada a casos de gravedad extrema, como es el tratamiento de melanoma metastásico en fase IIIb, IIIc a IVM1a, con afectación regional o a distancia y sin metástasis óseas, cerebrales, pulmonares u otras metástasis viscerales. Sin embargo, los buenos resultados que han conducido a esta terapia a ser aprobada por la FDA son prometedores, ya que ofrecen ventajas frente a terapias actuales y también la posibilidad de usarse en combinación con ellas aportando sinergismo a sus acciones. Por todo esto, parece que la terapia con virus oncolíticos tiene aún mucho por recorrer y puede en un futuro próximo aportar mucho a la lucha contra el cáncer.

## **7. CONCLUSIONES**

- La terapia con el virus oncolítico Talimogene laherparepvec (T-VEC) consiste en la dualidad de acción del virus: por un lado la lisis directa de células tumorales y por otro lado el aumento de la respuesta inmune antitumoral, que genera respuesta tanto de forma local como sistémica.
- El tratamiento con este virus aporta alto porcentaje de frecuencia y duración de respuesta objetiva, y mayor tasa de supervivencia a 1 año que otras terapias contra el melanoma.
- La administración del virus ha mostrado ser segura, con una baja toxicidad siendo las reacciones adversas leves. Los efectos adversos de mayor frecuencia son síntomas parecidos a los de la gripe, y reacciones cutáneas en el punto de inyección.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi:10.1002/ijc.29210.
2. Asociación de afectados de melanoma y cáncer de piel. *Epidemiología del melanoma* [online]; 2015 [actualizado 25 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.aamelanoma.com/el-melanoma/epidemiologia-del-melanoma>
3. Sociedad Española de Oncología Médica. *Epidemiología del melanoma* [online]; 2015 [actualizado 25 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/melanoma?start=1#content>
4. Turnbull S, West EJ, Scott KJ, Appleton E, Melcher A, Ralph C. Evidence for Oncolytic Virotherapy: Where Have We Got to and Where Are We Going? *Viruses*. 2015 Dec 2;7(12):6291-312. doi: 10.3390/v7122938.
5. Russell SJ, Peng K-W, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nature Biotech* 2012 Jul 10;30(7):658-70. doi: 10.1038/nbt.2287.
6. Kelly E, Russell SJ. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther*. [online] 2007 [consultado 14 Abr 2016]; 15(4):651-9. Disponible en: <http://www.nature.com/mt/journal/v15/n4/full/6300108a.html>
7. Moore A.E. Viruses with oncolytic properties and their adaptation to tumours. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1952;54:945-952. doi: 10.1111/j.1749-6632.1952.tb39969.x.
8. Pol J, Kroemer G, Galluzzi L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2015 Dec 8;5(1):e111564. doi: 10.1080/2162402X
9. Roberts MS, Lorence RM, Groene WS, Bamat MK. Naturally oncolytic viruses. *Curr Opin Mol Ther*. [online] 2006 [consultado 14 Abr 2016]; Aug; 8(4):314-21. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16955694>
10. Singh PK, Doley J, Kumar GR, Sahoo AP, Tiwari AK. Oncolytic viruses & their specific targeting to tumour cells. *Indian J Med Res*. [online] 2012 [consultado 14 Abr 2016] Oct;136(4):571-84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23168697>
11. Meerani S, Yao Y. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Eur J Sci Res*. [online] 2010 [consultado 25 Abr 2016]; 40: 156-171. Disponible en: <http://www.givetolife.org/mike/Presentation/Sources/Oncolytic%20Viruses%20in%20Cancer%20Therapy.pdf>
12. Uusi-Kerttula H, Hulin-Curtis S, Davies J, Parker AL. Oncolytic Adenovirus: Strategies and Insights for Vector Design and Immuno-Oncolytic Applications. *Viruses*. 2015 Nov 24;7(11):6009-42. doi: 10.3390/v7112923.

13. Chen G, Zhang S, He X, Liu S, Ma C, Zou X-P. Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives. *Oncotarget*. 2014;7:1901-1909. doi:10.2147/OTT.S50483.
14. Larson C, Oronsky B, Scicinski J, Fanger GR, Stirn M, Oronsky A, et al. Going viral: a review of replication-selective oncolytic adenoviruses. *Oncotarget*. [online] 2015 [consultado 25 Abr 2016] Aug 21;6(24):19976-89. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Going+viral%3A+a+review+of+replication-selective+oncolytic+adenoviruses>
15. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2015 Sep;14(9):642-62. doi: 10.1038/nrd4663
16. Parato KA, Breitbach CJ, Le Boeuf F, Wang J, Storbeck C, Ilkow C, et al. The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol Ther*. 2012 Apr;20(4):749-58. doi: 10.1038/mt.2011.276
17. Marcato P, Shmulevitz M, Lee PW. Connecting reovirus oncolysis and Ras signaling. *Cell Cycle*. 2005 Apr; 4(4):556-9. doi:10.4161/cc.4.4.1600.
18. Gong J, Mita MM. Activated ras signaling pathways and reovirus oncolysis: an update on the mechanism of preferential reovirus replication in cancer cells. *Front Oncol*. 2014 Jun 26;4:167. doi: 10.3389/fonc.2014.00167.
19. Mullen JT, Tanabe KK. Viral oncolysis. *Oncologist*. 2002;7(2):106-19. doi: 10.1634/theoncologist.7-2-106.
20. Selb B, Weber B. A study of human reovirus IgG and IgA antibodies by ELISA and western blot. *J Virol Methods*. 1994 Apr; 47(1-2):15-25. doi:10.1016/0166-0934(94)90062-0.
21. Kemp V, Hoeben RC, van den Wollenberg DJ. Exploring Reovirus Plasticity for Improving Its Use as Oncolytic Virus. *Viruses*. 2015 Dec 24;8(1). Pii: E4. doi:10.3390/v8010004
22. Shafren DR, Au GG, Nguyen T, Newcombe NG, Haley ES, Beagley L, et al. Systemic therapy of malignant human melanoma tumors by a common cold-producing enterovirus, coxsackievirus a21. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):53-60. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-0690-3.
23. Miyamoto S, Inoue H, Nakamura T, Yamada M, Sakamoto C, Urata Y, et al. Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2012 May 15;72(10):2609-21. doi: 10.1158/0008-5472
24. Elankumaran S, Chavan V, Qiao D, Shobana R, Moorkanat G, Biswas M, Samal SK. Type I interferon-sensitive recombinant newcastle disease virus for oncolytic virotherapy. *J Virol*. 2010 Apr;84(8):3835-44. doi: 10.1128/JVI.01553-09

25. Zamarin D, Palese P. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future Microbiol.* 2012 Mar;7(3):347-67. doi: 10.2217/fmb.12.4
26. Zhang SX. Turning killer into cure -- the story of oncolytic herpes simplex viruses. *Discov Med.* [online] 2015 Nov [consultado 29 Abr 2016];20(111):303-9. Disponible en: <http://www.discoverymedicine.com/Shawn-X-Zhang/2015/11/turning-killer-into-cure-the-story-of-oncolytic-herpes-simplex-viruses/>
27. Liu S, Dai M, You L, Zhao Y. Advance in herpes simplex viruses for cancer therapy. *Sci China Life Sci.* 2013;56(4):298-305. doi: 10.1007/s11427-013-4466-4
28. Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C, Reay P, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther.* 2003 Feb;10(4):292-303. doi:10.1038/sj.gt.3301885.
29. Chou J, Kern ER, Whitley RJ et al. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 34.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science.* 1990; 250: 1262–1266
30. Varghese S, Rabkin SD. Oncolytic herpes simplex vectors for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther.* 2002 Dec; 9 (12), 967–978. doi:10.1038/sj.cgt.7700537
31. McKie EA, MacLean AR, Lewis AD, Cruickshank G, Rampling R, Barnett SC, et al. Selective in vitro replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ICP34.5 null mutants in primary human CNS tumours--evaluation of a potentially effective clinical therapy. *Br J Cancer.* [online] 1996 Sep [consultado 7 May 2016];74(5):745-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2074706/>
32. Mace AT, Ganly I, Soutar DS, Brown SM. Potential for efficacy of the oncolytic Herpes simplex virus 1716 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2008 Aug;30(8):1045-51. doi: 10.1002/hed.20840
33. Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, et al. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther.* 2004 Nov;11(22):1648-58. doi:10.1038/sj.gt.3302289.
34. Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Brennan D, et al. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther.* [online] 2000 May [consultado 9 May 2016];7(10):859-66. Disponible en: <http://www.nature.com/gt/journal/v7/n10/pdf/3301184a.pdf>
35. Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, Johnson PA. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 May 22;98(11):6396-401. doi: 10.1073/pnas.101136398

36. Hu JC, Coffin RS, Davis CJ, Graham NJ, Groves N, Guest PJ, et al. A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res.* 2006 Nov 15;12(22):6737-47. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0759
37. Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, Nemunaitis M, Reid T, Daniels G, et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 1;27(34):5763-71. doi: 10.1200/JCO.2009.24.3675.
38. Kaufman HL, Kim DW, DeRaffele G, Mitcham J, Coffin RS, Kim-Schulze S. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2010 Mar;17(3):718-30. doi: 10.1245/s10434-009-0809-6.
39. Harrington KJ, Hingorani M, Tanay MA, Hickey J, Bhide SA, Clarke PM, et al. Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2010 Aug 1;16(15):4005-15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0196.
40. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients with Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* 2015 Sep 1;33(25):2780-8. doi: 10.1200/JCO.2014.58.3377
41. Kaufman HL, Amatruda T, Reid T, Gonzalez R, Glaspy J, Whitman E, et al. Systemic versus local responses in melanoma patients treated with talimogene laherparepvec from a multi-institutional phase II study. *J Immunother Cancer.* 2016 Mar 15;4:12. doi: 10.1186/s40425-016-0116-2.
42. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010 Aug 19;363(8):711-23. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
43. Organización Mundial de la Salud. Virus del herpes simple [online]; 2016 [actualizado 25 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/es/#vhs1>