



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
DEPARTAMENTO DE DESARROLLO  
BIOTECNOLÓGICO



---

# TERAPIA GÉNICA DEL CÁNCER APROBADA PARA USO CLÍNICO

---

SANTIAGO ARROTCHAREN |

JUAN MANUEL DURÁN |

RENZO FERNÁNDEZ |

JOAQUÍN VÁZQUEZ |

TUTORA: M. GABRIELA KRAMER

GRUPO 68

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<i>CÁNCER: DEFINICIÓN Y SITUACIÓN ACTUAL</i>	5
<i>TERÁPIA GÉNICA</i>	9
<b>GENDICINA</b>	<b>14</b>
<b>ONCORINE</b>	<b>19</b>
<b>ONYX – 015</b>	<b>21</b>
<b>TALIMOGENE LAHERPAREPVEC (T-VEC)</b>	<b>23</b>
<b>CÉLULAS T CONTRA ANTÍGENOS TUMORALES (T-CAR)</b>	<b>25</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>33</b>

## RESUMEN

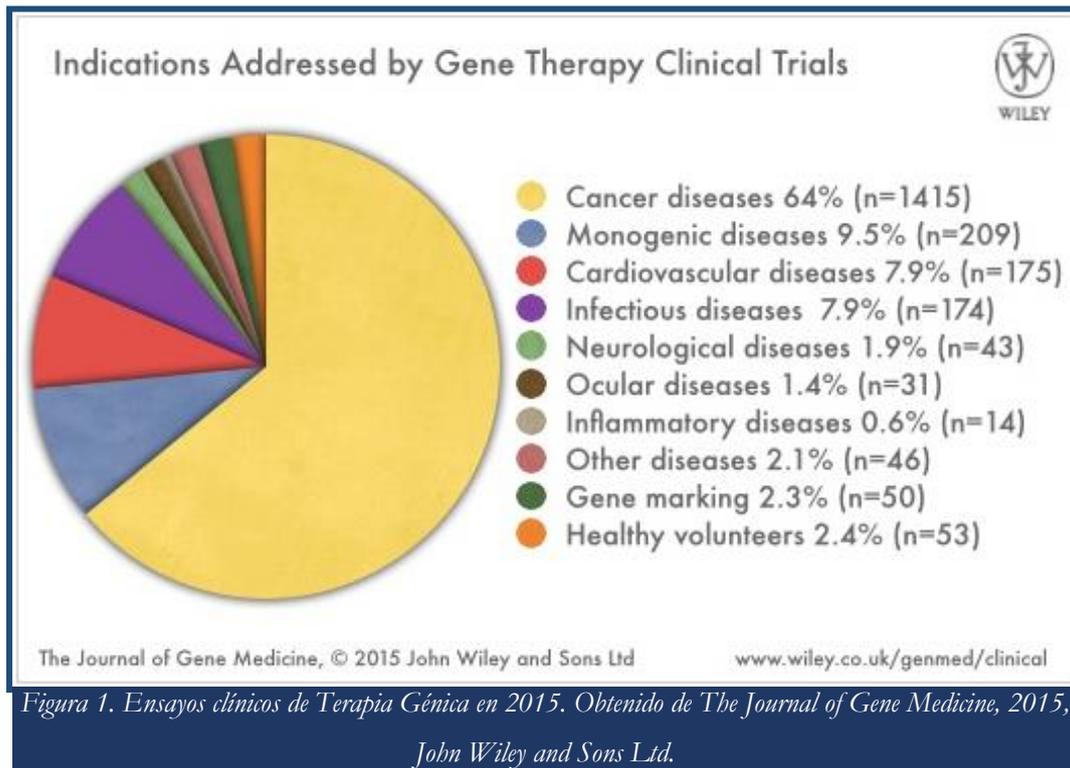
El cáncer es responsable de más de 8 millones de decesos anuales a nivel mundial, siendo la segunda causa de muerte entre enfermedades no transmisibles. Es por ello que la investigación oncológica adquiere gran relevancia para optimizar los tratamientos existentes y desarrollar nuevas estrategias. Los tratamientos actuales si bien son eficaces en determinadas situaciones, lo hacen bajo un alto costo/beneficio y muchas veces tienen una finalidad únicamente paliativa. Esta revisión se centra en describir los avances de la terapia génica antitumoral como alternativa terapéutica innovadora. La terapia génica se basa en la introducción de material genético en células diana del organismo empleando vectores específicos con fines terapéuticos. Actualmente se han aprobado tres tratamientos génicos contra el cáncer: Gendicina, Oncorine y T-VEC. También existen estrategias en desarrollo, donde se destacan los sistemas T-CAR como más prometedores. La Gendicina consiste en el gen p53 asociado a un vector de origen adenoviral y fue el primer fármaco aprobado para su uso clínico en tumores escamosos de cabeza y cuello. Dentro de la viroterapia oncolítica se destacan Oncorine y T-VEC, siendo ambos diseñados para destruir selectivamente células tumorales. Oncorine deriva de un adenovirus modificado estratégicamente para que replique en células que carecen de p53, mientras que T-VEC deriva un virus del herpes recombinante capaz, tanto de destruir células tumorales, como de generar una respuesta inmune anti-tumoral sistémica. T-VEC fue aprobado por la FDA para el tratamiento de melanoma en 2015. Estas terapias han demostrado su mayor eficacia combinadas con tratamientos convencionales. Por otro lado, los sistemas T-CAR constan de un anticuerpo quimérico contra antígenos tumorales específicos introducidos con vectores de terapia génica en células T y han demostrado hasta 90% de eficacia en ensayos clínicos contra cánceres hematológicos. Los resultados obtenidos hasta la fecha auguran un futuro prometedor para la terapia génica del cáncer.

**Palabras clave:** Cáncer, Terapia Génica, Gendicina, Oncorine, T-VEC, T-CAR.

## INTRODUCCIÓN

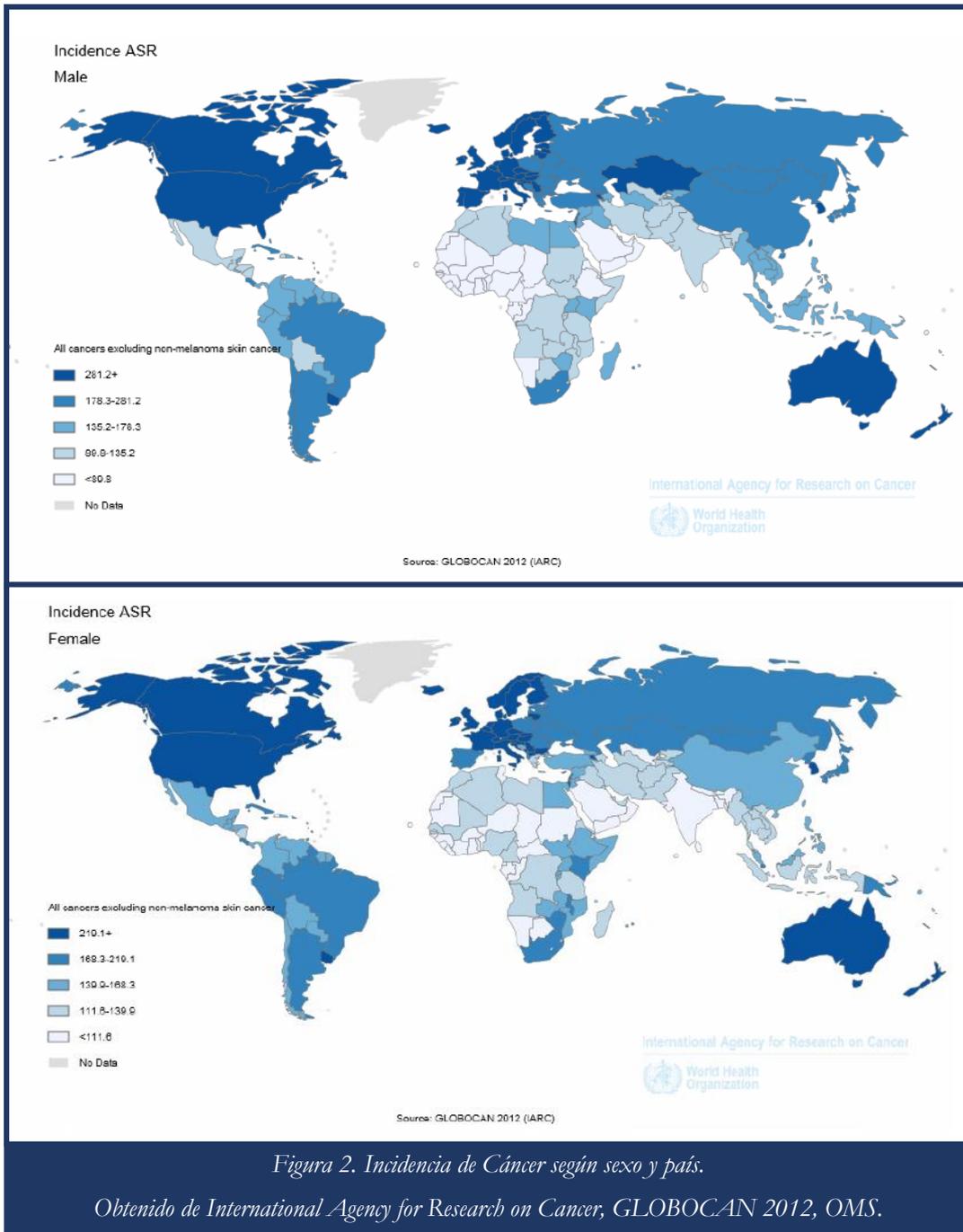
La patología oncológica es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En nuestro país es la segunda causa de muerte con cifras promedio de 8 mil muertes anuales en la última década, únicamente superada por las causas cardiovasculares (1). El cáncer ha sido descrito desde la antigüedad y se han realizado innumerables esfuerzos para desarrollar terapias que puedan mejorar la sobrevida y curar esta enfermedad. A partir de esta necesidad médica y considerando que las opciones terapéuticas convencionales son fuente de preocupación por sus graves efectos tóxicos, surge la terapia génica como un tratamiento innovador y con horizontes prometedores. Esta se basa en la introducción de material genético (ADN o ARN) en células diana del organismo con la finalidad de restablecer una función defectuosa, introducir una nueva función o cesar una actividad no deseada, obteniéndose de esta manera un efecto terapéutico. Para el tratamiento del cáncer se han empleado múltiples estrategias, incluyendo la introducción de genes supresores de tumor, la transferencia de genes “suicidas” o que codifican proteínas con función anti-angiogénica, hasta distintas estrategias de inmunoterapia génica y viroterapia oncolítica.

La terapia génica evoluciona a partir de la observación inicial de que las enfermedades monogénicas hereditarias son causadas por la herencia de un gen funcionalmente defectuoso, y en teoría, estas podrían curarse con la inserción y posterior expresión de una copia normal del gen defectuoso. En sus comienzos, la terapia génica fue utilizada para el tratamiento de enfermedades hereditarias como la deficiencia congénita de Adenosindeaminasa o la fibrosis quística. Si bien los primeros resultados clínicos distaron de lo esperado, representaron un avance crucial al demostrar que era posible la transferencia de material genético exógeno a células del organismo empleando un virus como vector. Para el año 1995 hubo un crecimiento exponencial en el interés de los investigadores en esta terapia y se lograron aprobar cerca de 100 ensayos clínicos por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos. A finales de los 90 y comienzo del nuevo siglo se dan los primeros informes de éxito en enfermedades genéticas como la inmunodeficiencia severa combinada (SCID-X1). Hoy en día casi dos terceras partes de los ensayos clínicos mundiales sobre terapia génica se centran en el cáncer (Figura 1). Hasta 2015 se realizaron 1415 ensayos en más de 30 países, lo que permite ver el enorme crecimiento de estas terapias en el campo oncológico.



## CÁNCER: DEFINICIÓN Y SITUACIÓN ACTUAL

La OMS define el cáncer como “un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo (...). Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis” (2). En el año 2012 se registraron aproximadamente 8,2 millones de muertes por esta enfermedad en el mundo (2)(3). En nuestro país el cáncer es responsable de un 23,8% de los decesos anuales según cifras del año 2010, registrándose un promedio de 7.859 muertes/año en el periodo 2006-2010 (1). La incidencia de esta patología registrada en el Registro Nacional del Cáncer en el periodo 2006-2010 fue de 74.277 casos incidentes de tumores malignos, aproximadamente 14.855 casos nuevos cada año (1). En la Figura 2 podemos observar la ubicación relativa de Uruguay en el contexto internacional. La estimación de tasas de incidencia estandarizadas por edad del cáncer en general (a excepción del cáncer de piel no melanoma) reflejado que nuestro país ocupa el quintil de mayor incidencia, confirmando la importancia del problema en el perfil sanitario del país (3).



*Figura 2. Incidencia de Cáncer según sexo y país.*

*Obtenido de International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2012, OMS.*

Se considera al cáncer como una enfermedad de base genética, ya que los mecanismos por los cuales se inicia este proceso son mutaciones del ADN y cambios epigenéticos como el aumento focal de la metilación del ADN y las alteraciones de las histonas, que pueden deberse a mutaciones adquiridas en los genes que regulan estos cambios (4). Se define mutación como aquellos cambios permanentes en la secuencia de ADN que determinan un daño genético no letal para la célula. Estas pueden ser adquiridas, siendo estas las más frecuentes, ya sea por agentes ambientales o producidas de forma espontánea. También existe el llamado síndrome de predisposición hereditaria donde estas mutaciones son heredadas a través de la línea germinal. Los tumores malignos en la mayoría de los casos se forman a partir de la expansión clonal de una célula transformada, es decir, que en un inicio la mayoría de los tumores son monoclonales.

Esta transformación está dada por cambios genéticos y epigenéticos, que se acumulan constituyendo el proceso de carcinogénesis. Estos cambios conducen a la transformación maligna y a la progresión de dicho tumor. Por lo tanto, en la evolución de dicho proceso la población tumoral deja de ser monoclonal, ya que las células van adquiriendo características que las diferencian a las unas de las otras constituyendo múltiples clonas celulares, por lo que decimos que son policlonales o heterogéneos (4). Las alteraciones fenotípicas de las células tumorales van a determinar cambios morfológicos y funcionales. A nivel funcional existen 6 grandes características que generan que estas células puedan sobrevivir, crecer y diseminarse en el organismo; y que son distintivas de las células cancerosas (Figura 3A) (5):

1. Son capaces de evadir el sistema inmune, evitando ser reconocidas y eliminadas por dicho sistema del huésped.
2. Presentan autonomía e independencia en lo que al crecimiento y replicación respecta, es decir, que no necesitan de las señales extracelulares para llevar a cabo dichos procesos.
3. La replicación es ilimitada, ya que existe una alteración que está dada por la presencia, en el 90% de los casos, de una enzima llamada telomerasa que impide el acortamiento del telómero. En condiciones normales esta enzima se encuentra únicamente en las células germinales.
4. Existe en estas células una insensibilidad a los factores inhibitorios del crecimiento, lo que hace que puedan proliferar en presencia de estímulos frente a los cuales células normales no lo harían.
5. Se estimula la capacidad de formación de neovasos (angiogénesis) con lo cual se mantiene el aporte de nutrientes a la masa tumoral favoreciendo su crecimiento. Por otra parte, esta angiogénesis permite a células que se desprenden de la masa tumoral primaria migren por el torrente sanguíneo a sectores alejados, pudiendo determinar la metástasis.
6. La invasión y metástasis, por vía sanguínea y/o linfática, se considera como el principal causante de morbilidad y mortalidad por cáncer.

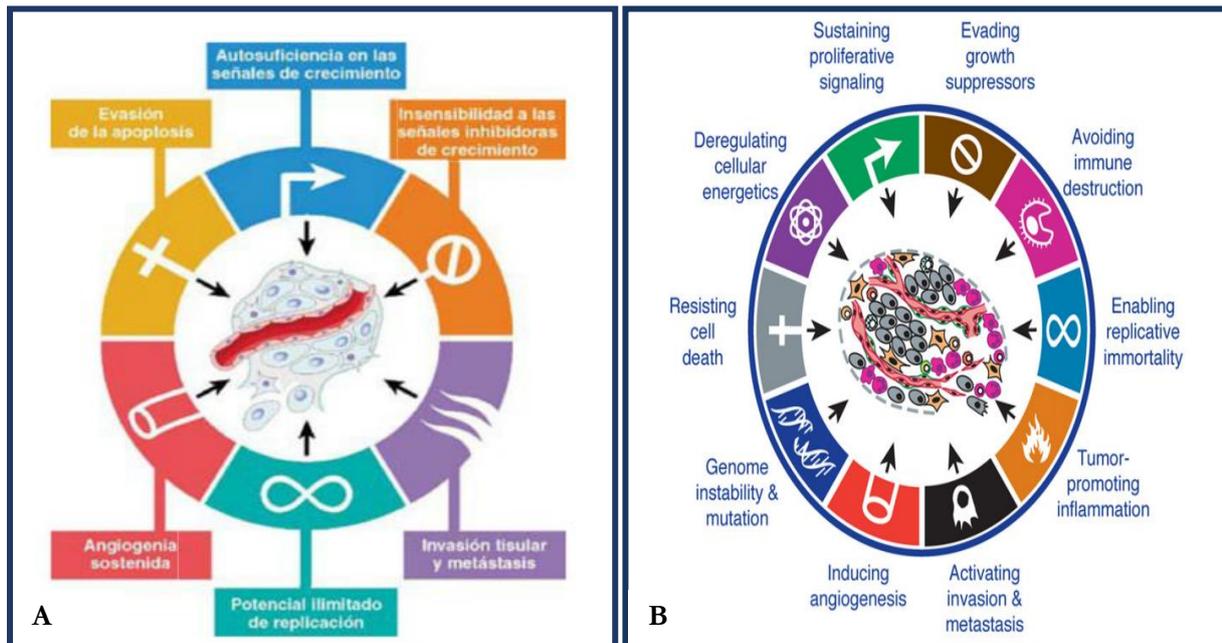


Figura 3. Características distintivas del cáncer. A. Propiedades adquiridas por la mayoría de las células tumorales.

B. Factores que determinan la progresión tumoral.

Obtenido de Hanahan D, Weinberg RA; *The Hallmarks of Cancer*. Cell. 2000 y 2011.

Los principales grupos de genes involucrados en el desarrollo de cáncer se pueden dividir en: oncogenes, supresores de tumor, reparadores del ADN y genes reguladores de la apoptosis. Normalmente ejercen su función ya sea activándose como inactivándose. En la célula normal se encuentran proto-oncogenes que estimulan el crecimiento y la diferenciación celular. Existen cambios en la estructura del gen o en la regulación de su expresión que determinan una sobreactivación patológica del mismo, transformándose en oncogenes. En el caso de los genes supresores de tumor codifican proteínas que participan en el control del ciclo celular, la regulación de la apoptosis, y si las condiciones no son las adecuadas para la división detienen el proceso, es decir, impiden el crecimiento descontrolado. Se los puede clasificar en 2 grandes grupos: “gobernadores” y “guardianes”. Dentro de los gobernadores encontramos al gen del retinoblastoma (RB), un supresor tumoral clásico que actúa como freno del ciclo celular. Por el lado de los “guardianes” encontramos el gen p53, frecuentemente alterado en células tumorales (hasta 70% de los casos). La proteína codificada por este gen posee la función de detener el ciclo celular y reparar el ADN, y cuando el daño es demasiado grande como para ser reparado induce la apoptosis. En condiciones normales el ADN sufre mutaciones inducidas por factores ambientales (radiaciones ultravioletas, carcinógenos del tabaco, dieta, etc.) o debidas a errores en la replicación; es aquí donde los genes reparadores del ADN cumplen su rol. Si estos genes se encuentran activos, como normalmente sucede, reparan las mutaciones. Sin embargo, si se encuentran inactivos se acumulan mutaciones en cualquier gen celular, como sucede en los

oncogenes, por ejemplo, y de esta manera se desencadena la llamada inestabilidad genómica que favorece la transformación maligna de dicha célula. La apoptosis es regulada a nivel genético por genes promotores y genes inhibidores de la misma, encontrándose normalmente en equilibrio. Cuando este balance se inclina hacia los genes anti-apoptóticos se favorece la transformación maligna (4). En el proceso de progresión y metástasis también intervienen modificaciones en el microambiente tumoral (Figura 3B).

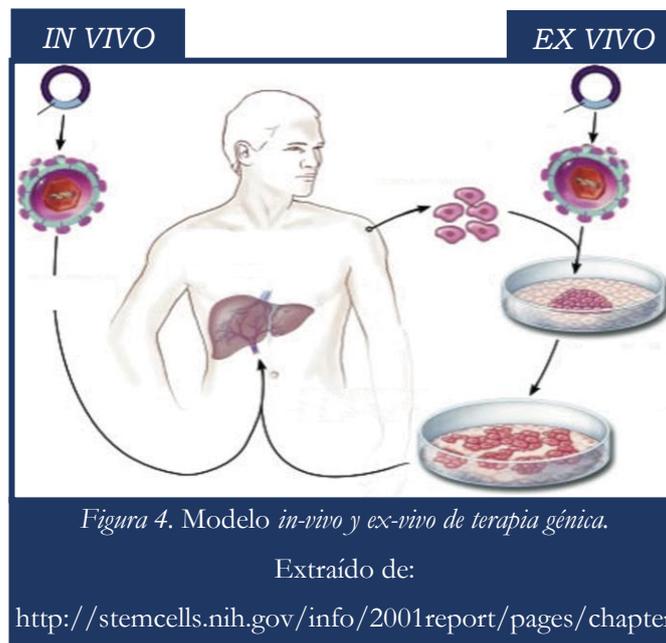
Actualmente las estrategias terapéuticas oncológicas son multidisciplinarias, integran y adaptan intervenciones quirúrgicas, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y hormonoterapia. La extirpación quirúrgica es el tratamiento fundamental, ya que es con el que se obtienen los mejores resultados. Radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia constituyen los tratamientos pre y post quirúrgicos en la enfermedad localizada. En los pacientes con metástasis, las terapias médicas ocupan la primera línea, mientras que la radioterapia y procedimientos quirúrgicos son complementarios (6). La inmunoterapia, basada en la estimulación del sistema inmune del huésped contra las células tumorales, ha significado un gran avance en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer. Sin embargo, la poca respuesta de algunos tumores a las estrategias actuales hace necesario encontrar nuevas alternativas.

## TERÁPIA GÉNICA

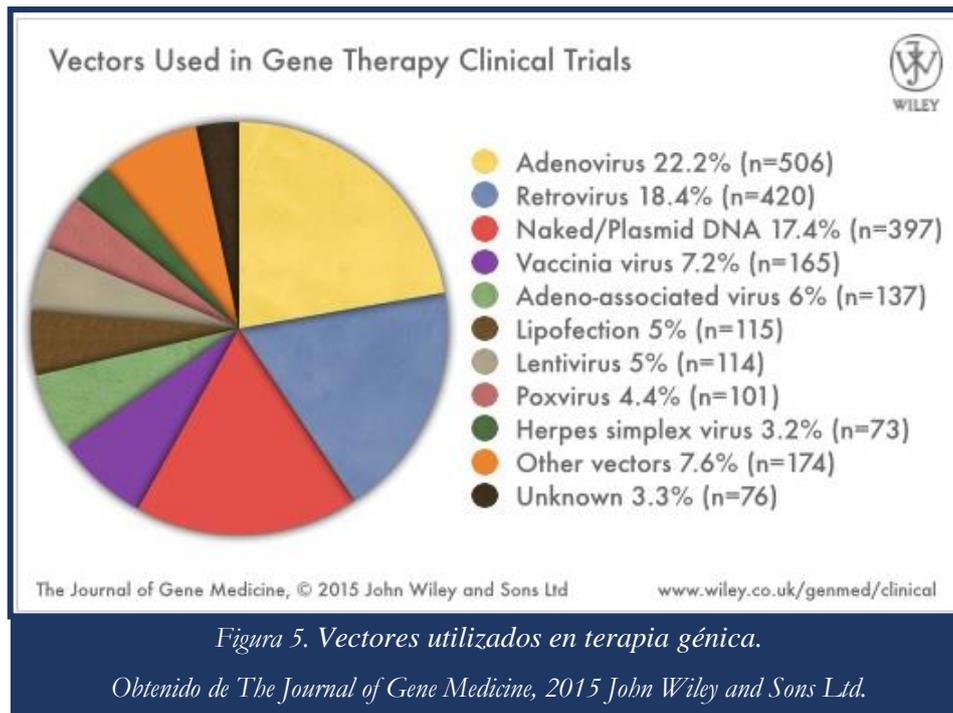
La terapia génica tiene como finalidad la inclusión de material genético, a través de un vector, en células diana del organismo con el fin de restablecer una función celular que está ausente o alterada, inhibir la expresión de genes o generar la síntesis de proteínas con objetivos terapéuticos. Se utiliza tanto para tratar enfermedades monogénicas hereditarias, por ejemplo hemofilia, como para tratar patologías con causa multigénica, como lo es el cáncer, u otras que no son genéticas, por ejemplo las cardiovasculares (7)(8). La terapia génica es una alternativa novedosa para el tratamiento de las enfermedades, y tiene un futuro interesante, manifiesto por el creciente número de investigaciones dirigidas al desarrollo de estrategias que permitan ampliar el rango y optimizar al máximo su aplicación en Medicina.

Los desafíos clínicos de la terapia génica incluyen: incorporar la cantidad de material genético suficiente que se requiera para corregir una deficiencia en un tejido o en las células del organismo, que perdure por el tiempo necesario y que genere el efecto terapéutico deseado con mínimos efectos secundarios o desventajas.

Existen dos formas en las que el material genético se puede introducir dentro de la célula a la que se quiere modificar. Uno de ellos consiste en administrar directamente en el organismo el vector con el material genético para que éste ingrese a la célula objetivo; a esta estrategia se conoce como terapia génica *in-vivo* (9). Por otro lado, existe la posibilidad de extraer las células diana del cuerpo, cultivarlas e integrar el material genético en el cultivo celular, y posteriormente devolver las células modificadas al organismo para que cumplan con su función; esta estrategia se conoce como terapia génica *ex-vivo* (7). Ambas estrategias se representan en la Figura 4. En ambos casos, para poder introducir el material genético en las células se utilizan vectores que actúan como “vehículos”.



Los vectores utilizados pueden clasificarse en vectores virales y no-virales. Los virales derivan de virus modificados capaces de llevar el material genético, introducirlo en la célula de interés y lograr allí una expresión génica con eficiencia. Para transformarlos en vectores, a los virus originales se ha extraído del genoma las secciones que le confieren su efecto patógeno (10). Los vectores virales más utilizados proceden de: Retrovirus, Herpes virus, Adenovirus y Lentivirus (Figura 5). Además, los vectores virales pueden ser divididos en dos categorías, los integrativos y los no integrativos.



Los primeros son aquellos que logran integrar su material genético dentro del genoma de la célula huésped. Los no integrativos no realizan este proceso, sino que su material genético simplemente se introduce en la célula y se expresa de forma episomal. Los diferentes tipos de vectores virales presentan beneficios y desventajas, así es que se selecciona cada uno dependiendo del tipo de patología a tratar, gen a insertar y célula objetivo. Por ejemplo, para los casos de enfermedades monogénicas hereditarias es conveniente tener un vector que logre integrarse el genoma para que el efecto perdure en el tiempo. En cambio, para el cáncer, no siempre será necesario que sean vectores virales integrativos ya que un objetivo es la lisis celular.

Los vectores virales también se pueden clasificar en replicativos y no replicativos. Los replicativos son aquellos capaces de replicarse dentro de la célula y cumplir con su ciclo viral, que normalmente termina con la destrucción celular. Los no replicativos no tienen esta función y por lo tanto solo depositan el material genético en la célula objetivo. Los vectores replicativos han tenido mucho desarrollo en el área de oncolisis ya que son capaces de ingresar la célula tumoral, replicarse, destruir a esta célula e infectar a las adyacentes. Así se logra la perpetuación del ciclo lítico específico para el tumor. Los vectores virales son muy diversos y de diferentes familias y se seleccionan de acuerdo al objetivo buscado.

Para terapias *in-vivo* se utilizan generalmente vectores virales no integrativos, que pueden ser o no replicativos. En la terapia *ex-vivo* se utilizan generalmente vectores virales integrativos no replicativos. En cuanto a los vectores no virales se han realizado investigaciones utilizando plásmidos vehiculizados con liposomas y/o unidos a un ligando específico para la célula huésped. También se han empezado a desarrollar vectores sintéticos realizados a partir de

polímeros (11). Si bien los vectores no virales tienen como desventaja su baja eficiencia en la introducción de material genético a las células diana, para algunas aplicaciones pueden ser beneficiosos, ya que en general no son inmunogénicos.

Para la terapia génica del cáncer, se han utilizado diversas estrategias, con vectores virales y no virales, tanto *in-vivo* como *ex-vivo*, buscando disminuir el tumor primario y sus metástasis. Las estrategias utilizadas se centran en la lisis de células tumorales (incluyendo la oncolisis viral), la activación de la respuesta inmune, la inhibición de la angiogénesis tumoral, la corrección de defectos genéticos, las terapias potenciadoras de quimio y radioterapia, y la activación de profármacos empleando los llamados genes suicidas. Los virus oncolíticos son aquellos agentes virales que pueden replicarse selectivamente en células tumorales, destruyéndolas y generando nuevos agentes con la misma capacidad infectiva para células neoplásicas adicionales. En este caso, los virus empleados pueden infectar células normales pero no pueden replicarse en ellas (12). Este tipo de terapia recibe el nombre de viroterapia y su finalidad es curar completamente o generar remisiones en tumoraciones oncológicas, actuando directamente como un agente antitumoral (13). La estrategia oncolítica actúa a través de la infección de la célula tumoral, replicación viral específica y posterior lisis. Pero en paralelo esta estrategia también puede generar la inducción de inmunidad antitumoral, sensibilización a terapias tradicionales y se puede combinar con la expresión de genes antitumorales adicionales (14).

Por otro lado, se han desarrollado estrategias de inmunización activa para inducir los componentes celulares del sistema inmune e incrementar su capacidad para reconocer los antígenos tumorales en las células malignas. Esta estrategia solo es efectiva para tumores que expresen antígenos tumorales específicos y es difícil la elección del blanco molecular, pero se han demostrado buenos resultados en estudios en donde se activaron varios componentes del sistema inmune, generando una adición de efectos positivos (15).

La anti-angiogénesis también ha sido objetivo de esta herramienta terapéutica, enfocándose en la inhibición de la irrigación tumoral, mediante la utilización de genes que codifican y expresan endostatina y/o inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG). La corrección de defectos genéticos se basa en la premisa de que en las células tumorales hay alteraciones de proto-oncogenes, genes supresores de tumor y genes reparadores de ADN. Por ejemplo, el gen p53 se encuentra mutado en gran parte de los tumores y se puede restablecer con la introducción de dicho gen transportado en un vector adecuado (16).

La terapia suicida, o activación de profármacos, se centra en el empleo de genes con capacidad de transformar un producto no tóxico en otro tóxico capaz de inducir la muerte de la célula tumoral. Con esta estrategia también se ha descubierto la posibilidad de eliminar las células que rodean a la célula que incorpora el gen suicida, por un fenómeno llamado *bystander*, caracterizado por la difusión del producto tóxico a las células vecinas. Un ejemplo de este sistema es está compuesto por el gen timidina quinasa del herpes virus simple, que transforma el profármaco ganciclovir en un producto tóxico que inhibe la ADN polimerasa, frenando la replicación del ADN en células que estén dividiéndose activamente y llevando a la muerte de estas células (17).

Por otra parte, las aplicaciones de terapia génica en cáncer se pueden combinar con tratamientos convencionales como la quimioterapia y la radioterapia, generando un efecto sinérgico y mejorando los resultados de dichos tratamientos por separado.

## GENDICINA

La Gendicina fue el primer producto de terapia génica aprobado y comercializado para su uso clínico en el año 2004. Fabricado por el laboratorio chino Shenzhen SiBiono GeneTech, en el año 2003 fue aprobado por la State Food & Drug Administration (SFDA) de China (18) y obteniendo el reconocimiento de las normas de correcta fabricación (NCF) catapultándose así al mercado internacional. Su uso fue aprobado para tumores de estirpe escamosa de cabeza y cuello (HNSCC), tanto en monoterapia como en combinación con quimioterapia y radioterapia. Existen otros productos similares como el Advexin y el SCH-58500 con origen en Estados Unidos que utilizan el mismo mecanismo, pero que aún no han sido aprobados para su uso clínico (19).

### Mecanismo de acción:

Este tratamiento se basa en la introducción de un gen p53 humano en las células cancerígenas, para lo cual se utiliza como vector el serotipo 5 de un adenovirus modificado. En este virus se sustituyó el gen viral de la proteína E1 por el gen p53 salvaje humano, impulsado por un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) con una cola poli-A de una hormona de crecimiento bovina (BGH). Este vector adenoviral de primera generación (Adp53) no se integra al ADN celular y está limitado a un único ciclo de infectividad ya que es muy inmunogénico, lo que supone una ventaja adicional al sistema para su aplicación (Figura 6).

En las células normales el gen p53 se expresa a bajas concentraciones y aumenta su expresión

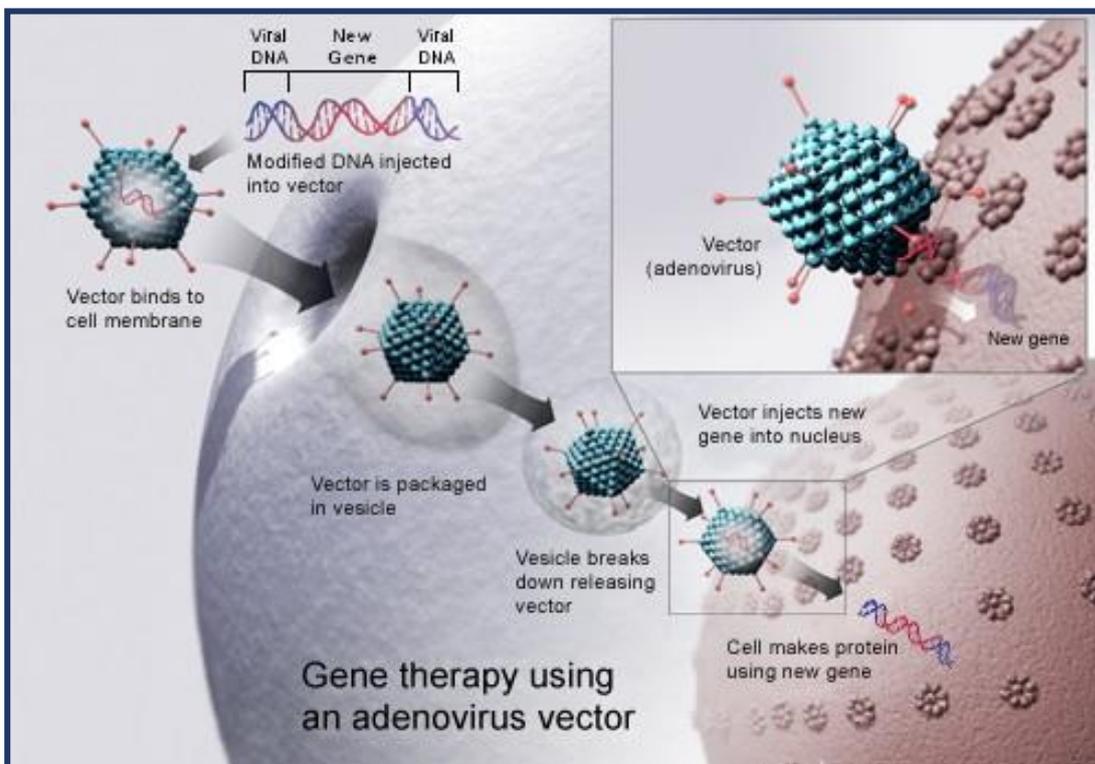


Figura 6. Introducción del gen en la célula blanco mediante un vector derivado de Adenovirus.

Obtenido de U.S. Medicine Library

cuando el ADN celular sufre algún tipo de injuria. La proteína P53 es capaz de detener el ciclo celular para que de esta manera se repare el daño en el ADN, o si el daño es demasiado extenso, se activa el proceso de muerte celular denominado apoptosis. Se ha observado que esta proteína puede estar ausente o es aberrante hasta en el 70% de las neoplasias malignas. Han sido reportadas más de 25.000 mutaciones del gen supresor tumoral p53(20). El hecho de que esté mutado no significa necesariamente que dé lugar a una proteína inactiva, sino que algunas mutaciones pueden dar lugar a una proteína activa que colabora a la malignidad del tumor (21). Una vez que el Adp53 es inyectado en el tumor, el vector infecta a las células blanco del mismo y entrega el genoma de este virus portando el gen terapéutico del p53. De esta manera el gen del p53 se introduce al núcleo celular listo para su transcripción.

Las acciones antitumorales del p53 son variadas y pueden ser multifactoriales. La apoptosis es desencadenada por dos mecanismos independientes y simultáneamente activados, uno dependiente de la transcripción dentro del núcleo y otro independiente de esta transcripción que se da dentro de las mitocondrias (22)(23)(24). En conjunto, hay una inhibición de la reparación del ADN y de los procesos anti-apoptóticos (25). También existe una estimulación del sistema inmune activando a células NK (26). Otra acción importante es la regulación a la baja de la expresión de MDR-1(21), sensibilizando las células tumorales ante la quimio y radioterapia; también disminuye la expresión del gen del crecimiento vascular (VEGF) (27), la captación de glucosa (28) y producción de ATP (29) y por lo consiguiente la nutrición del tumor. Afecta la expresión de la metaloproteínasa de matriz (MMP) para suprimir la adhesión celular, la infiltración y la metástasis (30). Existe también un bloqueo de la transcripción de señales de supervivencia en las células tumorales (31), inhibiendo así el crecimiento de las mismas en cualquier fase del ciclo.

Por otro lado, una vez inyectada la medicación Adp53 en el tumor, el adenovirus desencadena una fuerte respuesta inmunológica, con un gran infiltrado linfocitario y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. De esta manera se ponen en marcha la respuesta humoral, celular y el reclutamiento de las células NK aumentando la efectividad para eliminar las células del tumor. Por lo tanto, la acción terapéutica de Gendicina está determinada tanto por el producto del gen p53, como por el vector viral empleado para su administración celular.

### **Seguridad:**

El serotipo 5 de adenovirus es uno de los de menor patogenicidad dentro de la familia. Pueden presentarse como efectos secundarios al virus sintomatología leve de la esfera respiratoria alta y fiebre. Otros efectos pueden ser dolor en sitio de inyección, escalofríos, fatiga, náuseas y vómitos. La fiebre es el principal efecto secundario, autolimitada, que se produce entre 2 a 4

horas después de inyectado y dura hasta 6 horas (32). Clínicamente es considerada como un efecto secundario a la medicación, pero lo que en realidad refleja es que la Gendicina ha sido efectiva a la hora de movilizar el organismo contra el tumor.

### **Eficacia clínica:**

El adenovirus recombinante Adp53 es capaz de infectar a cualquier célula de cuerpo humano, con eficacia variable, tanto células con alta tasa de división como las de baja tasa. Estas propiedades hacen de la Gendicina un agente antitumoral de amplio espectro.

- En ensayos clínicos en fase I se tomaron 12 pacientes con cáncer avanzado de laringe que llevaban al menos 41 meses de diagnosticados (33). De esos 12, 7 pacientes nunca habían recibido ningún tipo de tratamiento y los 5 restantes ya habían sido intervenidos quirúrgicamente obteniendo malos resultados, es decir, con historia de multi-recurrencia. Se los dividió en 3 grupos a los que se les administró dosis distintas  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  y  $1 \times 10^{12}$  partículas virales (VP) del Adp53, cada dos días hasta llegar a un total de 10 dosis. Entre 36 y 42 meses después se observó que no habían recaídas en ninguno de los 12 participantes. Aun 5 años después no se registraron recaídas, en comparación con los que fueron únicamente intervenidos quirúrgicamente los cuales en un lapso de 3 años tuvieron un porcentaje de recaída cercano al 30%.
- En ensayos clínicos en fase II/III se han demostrado los efectos sinérgicos de la Gendicina en combinación con quimioterapia, radioterapia, cirugía y termoterapia (34)(35). Se realizó un estudio multicéntrico, simultáneamente controlado, aleatorizado del que participaron 135 pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello a los que se administró Gendicina. El 77% de los participantes estaba en un estadio III o IV, o no era posible de cirugía. Un 85% de los casos correspondían a cáncer nasofaríngeo. Se dividieron aleatoriamente a los pacientes en 2 grupos de los cuales a uno se inició tratamiento con Gendicina más radioterapia (GTRT) y otro grupo únicamente radioterapia (RT). No hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en edad, sexo, estadio de la enfermedad, tamaño de tumor o lesión entre los dos grupos (Tabla 1).

Group	Number of patients	Sex		Age, years ( $\bar{X} \pm SD$ )	Clinical stage			
		Male	Female		I	II	III	IV
GTRT	63	43	20	48.09 $\pm$ 12.59	0	15	19	29
RT	72	47	25	52.46 $\pm$ 12.11	0	17	27	28

Group	Number of tumor lesions		Size (mm <sup>2</sup> ) of tumor lesion ( $\bar{X} \pm SD$ )
GTRT	63		1132.49 $\pm$ 1107.29
RT	72		804.84 $\pm$ 673.59

Abbreviations: GTRT, group receiving both gene therapy and radiotherapy; RT, group receiving only radiotherapy; SD, standard deviation;  $\bar{X}$ , mean value.

Tabla 1. Comparación de información general de dos grupos de pacientes con cánceres de células escamosas en cabeza y cuello.

Obtenido de Zhaobui Peng, *Current Status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad – p53 Agent for Treatment of Cancers. Human Gene Therapy. September 2005.*

Se utilizó radioterapia convencional o tridimensional de intensidad 70 Gy y en 35 fracciones administradas en 7-8 semanas, el grupo RT. En el grupo GTRT se administró Gendicina  $1 \times 10^{12}$  VP una vez por semana 3 días previo a cada radioterapia por un total de 8 semanas. La radioterapia en ambos grupos fue la misma. La respuesta tumoral se objetivó mediante tomografía computada (TC) y resonancia magnética (RM) según criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La tasa de respuesta fue de 93% para la Gendicina de la cual un 64% fue regresión completa (CR) y un 29% regresión parcial (PR). Las tasas de respuesta en el grupo de RT fue de 79%, con un 19% CR y el 60% PR. Por lo tanto, las tasas de CR del grupo GTRT fueron 3 veces mayores a las del RT, comprobando de esta manera la existencia de efectos sinérgicos entre la Gendicina y la radioterapia (Tabla 2).

Group	4 weeks					8 weeks					12 weeks (confirmation)				
	No.	CR	PR	SD	PD	No.	CR	PR	SD	PD	No.	CR	PR	SD	PD
GTRT	63	5 (8%)	41 (65%)	17 (27%)	0 (0%)	62	28 (45%)	29 (47%)	5 (8%)	0 (0%)	56	36 (64%)	16 (29%)	4 (7%)	0 (0%)
RT	72	0 (0%)	29 (40%)	41 (57%)	2 (3%)	71	6 (8%)	44 (62%)	20 (28%)	1 (2%)	63	12 (19%)	38 (60%)	13 (21%)	0 (0%)

Abbreviations: CR, complete regression; PR, partial regression; SD, stable disease; PD, progressive disease.

Tabla 2. Comparación de eficiencia real entre Cánceres de células escamosas en cabeza y Cuello.

Obtenido de Zhaobui Peng, *Current Status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad – p53 Agent for Treatment of Cancers. Human Gene Therapy. September 2005.*

- En otro estudio realizado con 88 pacientes con cáncer loco regional avanzado de tipo escamoso en cabeza y cuello o carcinoma adenoide quístico de cabeza y cuello se buscó demostrar la acción sinérgica de la Gendicina con la quimioterapia (36). Para ello se dividieron a los pacientes en 3 grupos aleatorizados como se ve en la Tabla 3. Los pacientes de grupo I fueron tratados con Gendicina en combinación con quimioterapia (n=30), el grupo II recibieron únicamente Gendicina (n=28) y el grupo III únicamente

quimioterapia (n=30). Los sujetos del grupo I y II recibieron 10 ciclos de Gendicina en un lapso de 6 semanas cada 4 días, a dosis de  $1 \times 10^{12}$  y  $2 \times 10^{12}$  VP dependiendo de si tenían catéter uni o bilateral. La quimioterapia para los tumores de tipo escamoso incluyó carboplatino (CP), bleomicina (BLM) y metrotexate (MTX). En el caso de los adenocarcinomas se utilizó CP, 5-fluorouracil (5-FU) y ciclofosfamida (CTX). Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la Tabla 3. El tumor primario de 60 pacientes respondió al tratamiento (CR+PR), de los cuales 21 fueron CR y 39 PR. En el caso de las CR fueron 37% pertenecientes al grupo I, significativamente mayor que en el caso del grupo II y III, 18% y 17% respectivamente. No siendo significativa la diferencia entre las CR del grupo II y III. Los casos de no respuesta (SD o PD) fueron menores en el caso del grupo I en comparación con los pacientes del grupo II y III. La muestra no fue suficiente como para evidenciar diferencias significativas entre los grupos en el caso de metástasis cervicales y a distancia. Concluyendo así que la Gendicina en combinación con la quimioterapia poseen efectos sinérgicos y no aumentan los efectos secundarios en el tratamiento de carcinomas de cuello y cabeza (Tabla 3).

Group	Primary Tumor	Cervical Metastases	Distant Metastases
Gendicine + Chemotherapy	30	19	4
CR	11 (37%)	0 (0%)	0 (0%)
PR	13 (43%)	11 (58%)	3 (75%)
SD or PD	6 (20%)	8 (42%)	1 (25%)
Gendicine alone	28	17	3
CR	5 (18%)	0 (0%)	0 (0%)
PR	13 (46%)	6 (35%)	2 (67%)
SD or PD	10 (36%)	11 (65%)	1 (33%)
Chemotherapy alone	30	18	4
CR	5 (17%)	0 (0%)	0 (0%)
PR	13 (43%)	6 (33%)	2 (50%)
SD or PD	12 (40%)	12 (67%)	2 (50%)

*Tabla 3. Respuesta clínica luego del tratamiento.*

*Obtenido de Zhaohui Peng, Current Status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers. Human Gene Therapy. September 2005*

## ONCORINE

Desarrollado en China por el laboratorio Shanghai Sunway Biotech Co. se encuentra aprobado en ese país desde el año 2005, siendo el pionero en oncolisis a nivel mundial en cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (37).

### **Mecanismo de acción:**

Oncorine o H101 es un adenovirus serotipo 5 al cual se le suprime la región E1B y E3. Debido a esta delección, Oncorine presenta selectividad para células tumorales con una función p53 deficiente, y no puede ejercer su efecto citolítico en células normales. El adenovirus salvaje cuando infecta células normales, induce la expresión de genes que codifican proteínas tempranas (E1A y E1B), estas proteínas son necesarias para perpetuar el ciclo de replicación del virus. La respuesta normal de las células como mecanismo de defensa para la infección es estimular la expresión de p53, al ser sobre-expresada por la célula impide la replicación del virus.

Para evadir los mecanismos relacionados con p53 los adenovirus en estado salvaje codifican a partir de su secuencia génica E1B una proteína fundamental denominada E1B 55 kD cuya función es degradar a p53, lo que en definitiva permite al virus desarrollar su replicación.

Oncorine es un adenovirus modificado genéticamente y no puede degradar con eficacia a p53 debido a que se le elimina la secuencia E1B que codifica la proteína E1B 55 kD. Por esta razón es que Oncorine no puede replicarse en las células normales y sí puede hacerlo en las células cancerosas que presentan una vía deficiente de p53. Estas células son ideales para la replicación viral dado que no pueden defenderse de la infección, frenar la replicación, ni inducir la apoptosis, resultando así la lisis selectiva para células cancerígenas.

### **Eficacia clínica:**

Se realizó en el periodo de octubre de 2002 a marzo de 2004 en 17 hospitales de China un ensayo clínico multicéntrico, abierto, aleatorizado y controlado con 160 pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). Se comparó la tasa de respuesta a 6 meses para un grupo tratado con Oncorine y quimioterapia (cisplatino y 5-FU) frente a un grupo sólo con quimioterapia. Los resultados de eficacia fueron 78.8% para el grupo combinado y 39.6% en el grupo sólo con quimioterapia (Tabla 4). De los 160 ingresados al comienzo, 105 completaron el estudio. Debido a estos resultados tan alentadores la SFDA aprobó el uso clínico de Oncorine (38).

Group	n	Injected lesion, n (%)	Total lesion, n (%)
H101+PF	52	41 (78.8)	40 (76.9)
PF alone	53	21 (39.6)	19 (35.8)
P value		= 0.000	= 0.000

PF regimen (DDP 20 mg/m<sup>2</sup> iv, Day1-5; 5-FU 500 mg/m<sup>2</sup>iv, Day1-5).  
 Statically mean: P value < 0.05 between H101 + PF and PF alone on either Injected lesion or Total lesion.

*Tabla 4. Respuesta a los 6 meses luego de tratamiento diferente entre ambos grupos.*

*Obtenido de Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. Curr Cancer Drug Targets. 2007;7(2):141–8.*

**Seguridad:**

En este estudio no se reportaron muertes y los principales efectos adversos fueron fiebre y síntomas gripales.

## ONYX – 015

Primer virus oncolítico utilizado en ensayos clínicos, en el año 1996 en Estados Unidos, aún continúa en estudios fase III.

### Mecanismo de acción:

Este adenovirus es similar al Oncorine, presenta la misma modificación genómica en E1B, y selectividad para células con p53 defectuosas (39). Ambos fármacos presentan el mismo mecanismo de acción, siendo selectivos en cuanto a su replicación para células con una función p53 mutada. En caso de estar p53 normal, ésta se activa por la presencia de E1A viral conduciendo a la célula a un estado de quiescencia donde el ciclo celular se detiene impidiendo la replicación viral (40). Todo este proceso no ocurre en células tumorales con una función p53 mutada (Figura 7).

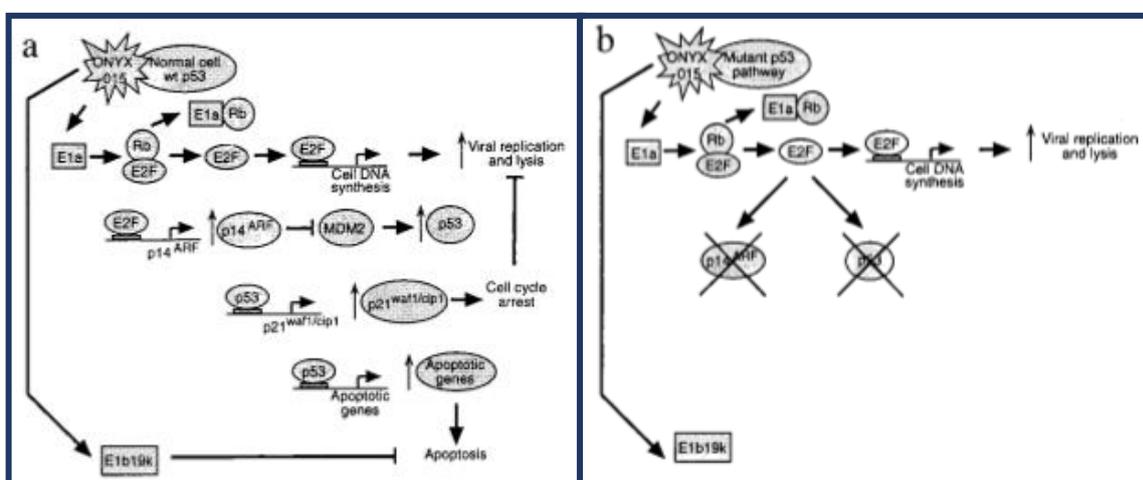


Figura 7. Mecanismo propuesto de acción de ONYX-015. En células normales (a), la infección induce la formación de p53 y posterior limite a la replicación viral y lisis. En células con alteraciones en p53 (b) este proceso será el contrario generando lisis y replicación viral.

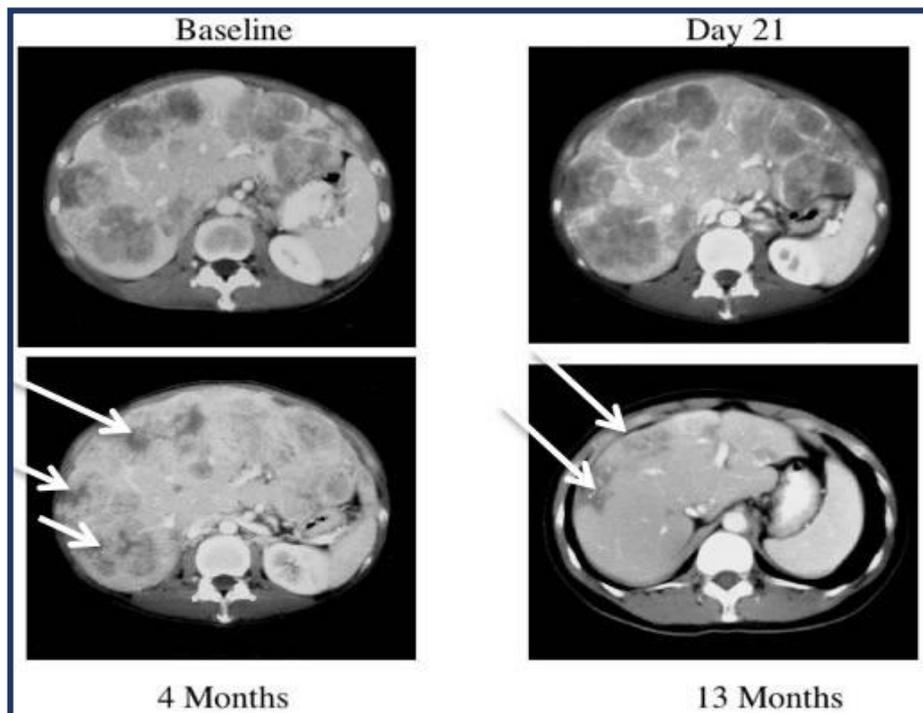
### Eficacia clínica:

Se llevaron a cabo numerosos ensayos en pacientes con diversos tipos de cáncer. En un ensayo clínico fase II llevado a cabo por Nemunaitis *et al.* se realizó una prueba con inyección intratumoral y peritumoral de ONYX-015 en 37 pacientes con carcinoma recurrente de cabeza y cuello. Los pacientes recibieron ONYX-015 en una dosis diaria de  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de placa (PFU) por 5 días en la primera semana de cada ciclo de 3 semanas, o  $1 \times 10^{10}$  PFU dos veces al día por 10 días durante las semanas 1 y 2 de cada ciclo de 3 semanas. Se tomaron biopsias posteriores al tratamiento que informaron la presencia y replicación selectiva de ONYX-015 en el tejido tumoral de 7 de 11 pacientes biopsiados desde el día 5 al 14, pero no en tejido normal adyacente (0 de 11 pacientes,  $p = 0,01$ ). La destrucción de tejidos también fue altamente selectiva: la regresión tumoral significativa ( $> 50\%$ ) se produjo en el 21% de los

pacientes evaluables, mientras que no existió toxicidad ni lisis celular en los tejidos normales peritumorales.

Otro ensayo de fase II Khuri *et al.* abarcó 40 pacientes con HNSCC, recibiendo ONYX 015 por medio de la inyección intratumoral, dos veces al día durante un ciclo de 21 días, el tratamiento dio como resultado un 14% de regresión parcial o completa, lo que indicaba que ONYX 015 era un tratamiento seguro para HNSCC con evidencia de moderada actividad antitumoral (41).

Un estudio realizado por Reid *et al.* informo un patrón de regresión de tumor (Figura 8) después de la inyección intrahepática de ONYX – 015 en combinación con 5-FU para el tratamiento de metástasis colorrectales hepáticas en 11 de 24 pacientes durante 13 meses (41).



*Figura 8. Sucesivas tomografías computadas de paciente incluido en el estudio Las flechas señalan patrón de regresión de las metástasis colorrectales hepáticas a los 13 meses de tratamiento.*

*Obtenido de Reid T, et al. Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. Gene Ther. 2001; 8(21):1618–26.*

### **Seguridad:**

En el estudio de Nemunaitis *et al.* no se registraron muertes, se reportaron efectos secundarios como fiebre (25%), dolor en zona de punción (17,5%), y otros síntomas benignos como cefaleas y nauseas en un 17.5%. En el estudio de Khuri *et al.*, tampoco existieron casos fatales, siendo los síntomas catarrales (30%) los efectos secundarios dominantes, acompañados también de dolor en zona de punción y fiebre (16%).

## TALIMOGENE LAHERPAREPVEC (T-VEC)

Talimogene Laherpaprepvec (T-VEC o Imlyglic) deriva de una forma salvaje del virus del Herpes Simple tipo 1 (HSV-1) humano conocido como JS1, que ha demostrado tener mayor acción oncolítica que otros subtipos de HSV-1 (42)(43). En principio el HSV-1 JS1 fue atenuado mediante la delección de los genes RL1 y US12 que codifican factores de neurovirulencia (ICP34.5 y ICP47, respectivamente), la delección de este último logra la expresión temprana del gen US11 (42)(43). Estas modificaciones genéticas logran que el T-VEC sea capaz de replicar en células malignas efectivamente y no a células sanas; ya que las células tumorales, que se dividen con mayor velocidad, expresan proteínas que junto con la expresión temprana de US11 pueden sustituir funcionalmente al factor de virulencia ICP34.5. (44)(45). Por otro lado, se insertó el gen que codifica el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF por el inglés Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) en los ahora no funcionantes loci de RL1.

### **Mecanismo de acción:**

La inserción del gen de GM-CSF humano al genoma viral modificado y su posterior expresión en contexto oncolítico promueve la respuesta antitumoral (de ahí su nombre comercial OncoVEXGM-CSF) (42)(43), tanto a nivel local como distal del sitio de inyección (46). Esto confiere a T-VEC la habilidad de promover el inicio de una respuesta inmune con contra el tumor (47)(48). La expresión de este gen logra distintas respuestas: inflamación a nivel local, respuesta de las células dendríticas locales, acción anti-angiogénica y aumento de la expresión de antígeno leucocitarios humanos II (HLA II). GM-CSF es el principal mediador de la proliferación, maduración y migración de las células presentadoras de antígeno, entre estas las células dendríticas (las más potentes de la economía inmunológica), siendo este uno de sus principales sitios de acción (49).

### **Seguridad:**

Es importante saber que T-VEC permanece susceptible a las bases terapéuticas contra el HSV-1 como lo es Aciclovir, ofreciendo un buen perfil de seguridad y eventual control contra replicación viral en caso de infección sistémica (50)(51). Los eventos adversos más comunes registrados fueron: fatiga, fiebre y escalofríos. La única toxicidad severa registrada fue celulitis en un 2 % de los pacientes y ningún caso de muertes relacionadas al tratamiento (52).

### **Eficacia clínica:**

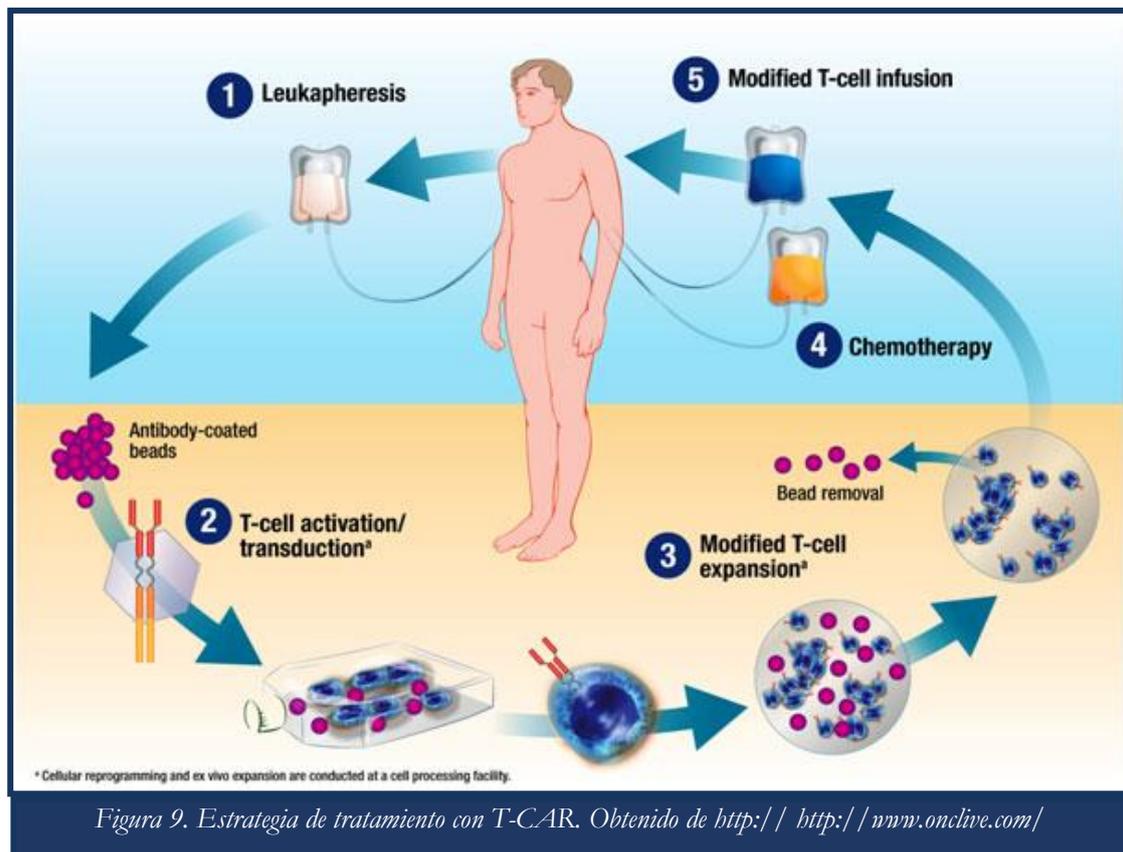
Con el antecedente de los excelentes resultados obtenidos en cáncer de cara y cuello de estadios III y IV avanzados en los cuales se agregó OncoVEXGM-CSG, asociado a dosis de cisplatino, a pacientes en previo tratamiento con quimio y radioterapia (53), la farmacéutica Biovex posteriormente adquirida por Amgen, Inc. anuncia la publicación de resultados de ensayos fase II en melanoma con remisión durable y completa de la enfermedad lograda en un número significativo de pacientes con estadios III y IV de esta enfermedad. Tras los buenos resultados obtenidos en ensayos clínicos en fase I y II con T-VEC, Amgen Inc. decidió iniciar nuevos estudios clínicos (54)(55), incluyendo entre estos OPTiM (OncoVEXGMCSG Pivotal Trial in Melanoma, NCT00769704) (49). En este contexto se estudiaron 436 individuos con melanoma en Estadios IIIb-IV sin oportunidad de resección quirúrgica como posibilidad terapéutica. Para poder comparar, se repartieron aleatoriamente los pacientes en grupos para recibir T-VEC de manera intralesional o GM-CSF subcutáneo. Se compararon los grupos bajos distintos parámetros, el principal de ellos se definió como Rango de Respuesta Duradera (respuestas objetivas continuamente por 6 meses) para cada lesión independiente. En el año 2013 Amgen Inc. mostró los primeros resultados del estudio OPTiM que indican que los pacientes tratados con T-VEC inducían respuestas duraderas significativamente superiores a los que solamente recibían GM-SFC de manera subcutánea (56). Tras estos resultados, en abril de 2015 la FDA de Estados Unidos emitió la primera recomendación formal apoyando el uso de T-VEC para el tratamiento de melanoma en pacientes con lesiones no resecables en piel y nódulos linfáticos (57).

En otro estudio publicado por Journal of Clinical Oncology (53) se comparan las lesiones de pacientes tratados con T-VEC, siendo algunas inyectadas directamente y otras tratadas indirectamente estando el tumor lejos del sitio de punción. La administración de T-VEC mostró una regresión de más de la mitad de la superficie tumoral tanto en lesiones inyectadas (64%, siendo la mitad una resolución completa) como en lesiones que no fueron directamente inyectadas (34% no viscerales y 15% viscerales). El estudio mostró lisis tumoral a través de inyección directa de T-VEC, mientras que la GM-CSF codificada en el virus potencia la respuesta inmune sistémica antitumoral. El papel de la expresión de GM-CSF es fundamental para la regresión de los tumores que no fueron inyectados directamente incluyendo sitios viscerales. Esto fue demostrado en las fases tempranas del estudio y ratificado luego en fases finales del mismo (55). Futuros estudios intentarán identificar los mecanismos específicos por los cuales T-VEC logra la regresión tumoral y las posibilidades de terapias combinadas para mejorar el potencial de este agente en pacientes con cáncer, tanto en melanoma como en otros tumores.

## CÉLULAS T CONTRA ANTÍGENOS TUMORALES (T-CAR):

### Un futuro esperanzador

Una de las estrategias de terapia génica *ex vivo* más prometedoras para el tratamiento del cáncer consiste en la utilización de células T autólogas, a las que se les incorpora un gen que codifica un receptor quimérico de antígeno (CAR, chimeric antigen receptor), para que reconozca específicamente antígenos asociados a tumores (TAAs, tumor associated antigen). Esto hace que las células T modificadas genéticamente (T-CAR) se activen ante antígenos sin necesidad de presentación por parte del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, major histocompatibility complex). También hace que se puedan activar linfocitos T sin necesidad de células presentadoras de antígenos y co-estimulación. Esta nueva alternativa de tratamiento contra el cáncer, que involucra conocimientos en el área de la terapia génica, terapia celular, inmunología e ingeniería de anticuerpos, se esquematiza en la Figura 9.



Desde la primera investigación en este sentido, realizada hace más de dos décadas, se han desarrollado múltiples estrategias para dirigir células T contra las células malignas (63). El mayor logro se ha observado en el campo de la oncología hematológica, donde varios estudios han demostrado la eficacia de esta estrategia terapéutica en cáncer de células B resistentes o refractarios a tratamientos convencionales (58). Así mismo se han desarrollado estrategias

similares dirigidas contra diversos antígenos en tumores sólidos, pero los resultados son aún limitados (59). Hasta diciembre de 2015, en cuanto a investigaciones con células T para cáncer, había más de 200 protocolos, con 8000 pacientes participantes (60), de los cuales un 40% eran con T-CAR que se desarrollan en su mayoría en Estados Unidos o China. De estos estudios, un 65% se efectuaron con cánceres hematológicos, siendo el CAR contra el antígeno CD19 es más ensayado (61).

### **Mecanismo de acción:**

Los CAR más utilizados son receptores quiméricos monoclonales murinos, diseñados para reconocer TAAs y gatillar respuestas antitumorales medidas por células T. La utilización de CAR comenzó en 1989 cuando Eshar et al. desarrollaron un receptor de célula T (TCR, T-cell receptor), que no era parte del MHC, y funcionó como activador de la célula T (62). Cabe recordar, que este proceso de activación de la célula T se da sin presentación antigénica por parte de una célula presentadora de antígeno (CPA) a través del MHC, lo que supone una ventaja frente a las limitaciones que suelen suceder en el contexto tumoral para la activación normal del sistema inmune celular. La simple interacción del antígeno tumoral con el receptor quimérico ya dispara los mecanismos celulares para la activación de los linfocitos T. Este mecanismo ha sido utilizado y modificado por múltiples investigadores para diferentes TAA, así como para diferentes células dentro del sistema inmune. Esta especificidad se logra a través de CARs que poseen dos dominios: el extracelular y otro intracelular. El extracelular es un receptor de antígenos murino, o humanizado (63)(64), que contiene una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) y otra variable de la cadena liviana ( $V_L$ ) de un anticuerpo, para así conformar un fragmento de cadena simple variable (scFv, single-chain fragment variable), que va a ser completado por una secuencia flexible de la cadena constante (tanto pesada como liviana), y se une a través de la membrana con el o los dominios intracelulares. Este dominio extracelular es el que varía de acuerdo con el TAA objetivo, habiéndose diseñado CARs específicos contra CD19, CD20, CEA, PSMA, ERBB2 y  $GD_2$ . También se han utilizados Tándem CAR (TanCAR) que tienen la capacidad de reconocer dos antígenos específicos para su activación. Por ejemplo, se utilizó doble especificidad, para CD19 y HER2/neu, logrando activarse ante el reconocimiento de los dos antígenos (65) (Figura 10).

Otro ejemplo fue el uso de PSCA y PSMA, dos antígenos prostáticos que activaban en combinación un CAR y a su vez un receptor coestimulador quimérico (CCR) (66).

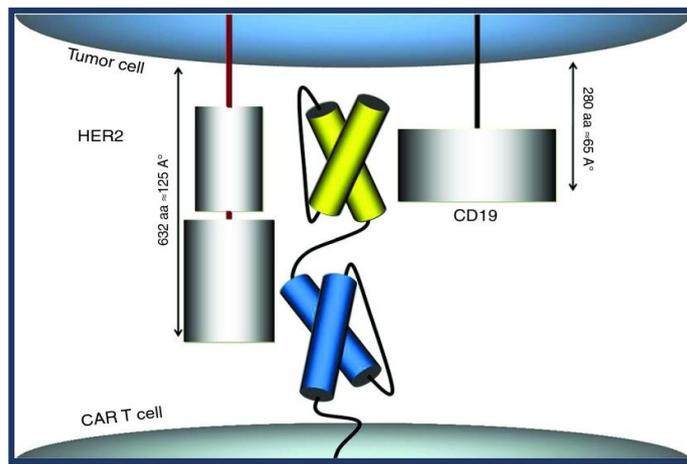


Figura 10. Diseño de TanCar capaz de reconocer Her2 y CD19. Obtenido de Zakaria Grada, Meenaksbi Hegde, Tiara Byrd et al. *TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. Molecular Therapy—Nucleic Acids* (2013)

El dominio intracelular es CD3-ε, CD3-γ, o CD3-ζ (parte de los TCR), siendo estos los que comienzan la respuesta interna en la célula T, frecuentemente a través de motivos de activación del inmuno-receptor basado en tirosina. Los investigadores han partido de un CAR prototípico, con un solo dominio intracelular, y de allí han agregado dominios para disparar una respuesta total del linfocito T, tanto en activación, como proliferación y secreción de citoquinas. Así es que los CARs se clasifican en primera, segunda y tercera generación de acuerdo a la cantidad de dominios intracelulares que tengan (Figura 11).

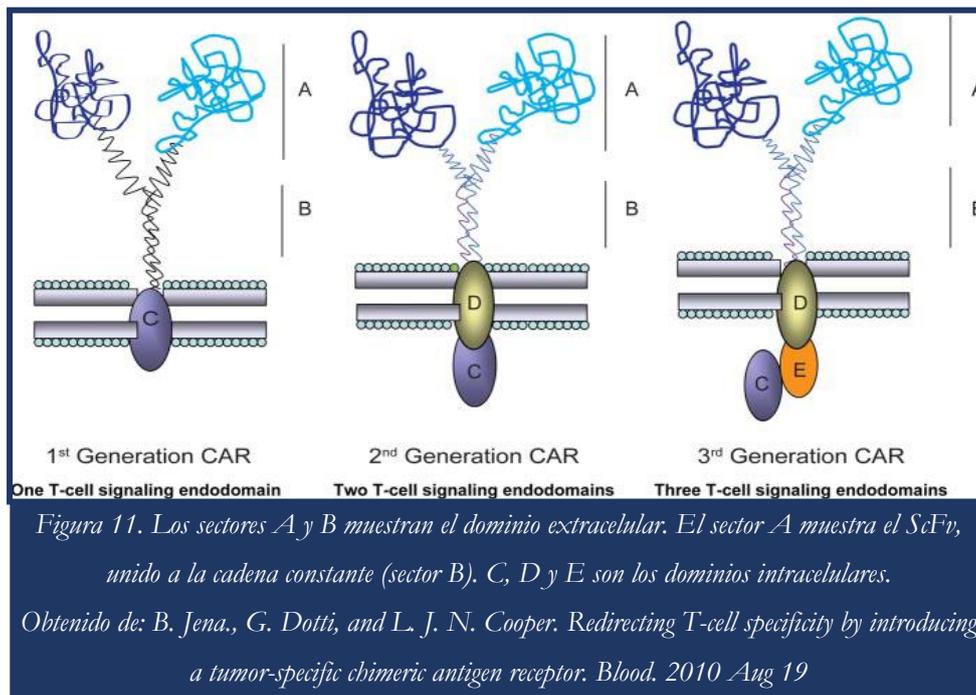


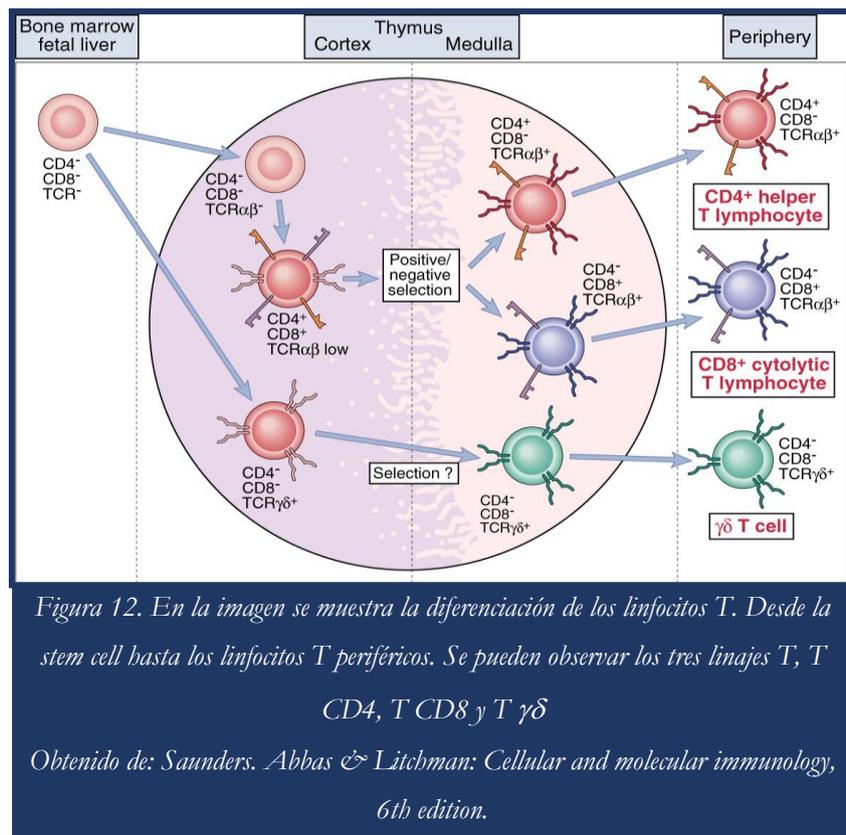
Figura 11. Los sectores A y B muestran el dominio extracelular. El sector A muestra el ScFv, unido a la cadena constante (sector B). C, D y E son los dominios intracelulares. Obtenido de: B. Jena., G. Dotti, and L. J. N. Cooper. *Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. Blood. 2010 Aug 19*

Se han usado como disparador de la respuesta intracelular CD28, CD 134, CD137, Lck y DAP10 (67)(68). La utilización de múltiples dominios intracelulares genera una respuesta integral del linfocito T, que mejora la supervivencia y acción antitumoral de las células modificadas (69). Los linfocitos T estimulados por dos dominios logran con eficacia matar la célula blanco, también necesitan menos co-estimulación externa, aumenta la secreción de citoquinas necesarias, esto favorece la proliferación y diferenciación de linfocitos T (70). Múltiples estudios han demostrado que los T-CARs de segunda generación son mejores en su función antitumoral que los de primera generación. A la tercera generación se le agrega otro dominio intracelular capaz de gatillar nuevas respuestas con el objetivo de mejorar la función antitumoral de dichas células. A esto se le suma la posibilidad de variar la región scFv, seleccionando uniones de alta afinidad para aumentar su eficacia (71).

Para poder introducir el material genético (secuencias codificadoras de CAR) dentro de las células T se han utilizado vectores virales y no virales, mayormente integrativos, siendo los de origen retroviral y lentiviral altamente eficientes en esta tarea (9)(72). También se han realizado ensayos clínicos empleando ADN plasmídico transfertido por electroporación a linfocitos T (73). La integración de ADN en el genoma celular también se puede conseguir empleando el sistema llamado bella durmiente (SB, sleeping beauty), que consiste en la inserción génica de un transposon conteniendo la secuencia CAR mediado por la acción de una transposasa (74). Con este sistema, junto al uso de APC artificiales, se ha logrado una buena eficiencia en la incorporación del material (cerca al 60%) y menor tiempo para lograr cantidades aceptables para la infusión de células T (75).

#### **Tipos celulares modificados con CAR:**

Los CAR pueden incluirse en células T que tengan los  $\alpha\beta$ TCR y también  $\gamma\delta$ TCR (Figura 12). Por lo tanto, se pueden emplear células inmunes que sean o no linfocitos T y que expresen alguno de estos dos receptores. Actualmente los investigadores han modificado genéticamente células NK, monocitos y neutrófilos para que expresen CAR (76)(77). Por otro lado, las células que expresan el  $\gamma\delta$ TCR también han sido modificadas para expresar CAR, con la ventaja de que se pueden hacer proliferar selectivamente mediante el uso de aminobisfosfonato (78). Así se logra abarcar un amplio espectro de células del sistema inmune capaces de actuar contra las células malignas.



### Eficacia clínica:

Uno de los primeros estudios que demostró la eficiencia de los T-CAR fue realizado por investigadores del National Cancer Institute (NCI) de Estados Unidos, en donde se trató a un paciente con linfoma folicular previamente acondicionado con quimioterapia y posteriormente se realizó una infusión de T-CAR de segunda generación contra CD19 y co-estimulado con CD28, logrando remisión parcial de la enfermedad (79).

Los resultados más destacados de terapia antitumoral con T-CAR dirigidos contra CD19 se obtuvieron con pacientes con leucemia linfocítica aguda, en donde se observó la remisión completa en un 70 a 90 % de los casos (80)(81)(82). Otros estudios han demostrado la eficacia de los T- CAR tanto en leucemia linfocítica aguda, como en mieloma múltiple y linfoma B de células grandes (83).

Junto a las estrategias de terapias con T-CAR, se han ensayado combinaciones de terapias inmunológicas para mejorar la respuesta al tratamiento. Un ejemplo de esto fue el uso del anticuerpo monoclonal ibrutinib en conjunto a los T-CAR en pacientes con leucemia linfocítica crónica. En este estudio se vio que la expresión del CAR no se modificaba con los ciclos de ibrutinib, pero sí la expansión de estos linfocitos T modificados. También se generó mayor proliferación en respuesta al antígeno (84).

**Seguridad:**

La evaluación de la seguridad clínica de los T-CAR está aún en desarrollo y necesita mayor número de evidencias para poder confirmar que el beneficio es mayor que el costo de dicha terapia. Las preocupaciones en relación a la seguridad de esta terapia se centran en cuatro aspectos principales. Uno de ellos es la posibilidad de inducir genotoxicidad, ya que existe un riesgo real de mutagénesis insercional debido a la inserción genómica del ADN codificante de CAR en los linfocitos T. Actualmente no se han reportado casos de genotoxicidad en ensayos clínicos y la posibilidad de mutagénesis insercional podría ser disminuida con el empleo de sistemas de trasposición específica del ADN exógeno (85).

Otra aspecto a tener en cuenta es la toxicidad sistémica de la terapia T-CAR, ya que en general es muy difícil proponer CAR contra antígenos que sean absolutamente específicos de tumores, habiéndose evidenciado algunos casos de hepatotoxicidad (86), e incluso se registró daño pulmonar, respuesta inflamatoria sistémica y la muerte de una paciente tratada con células T-CAR contra HER-2/neu (87). Tampoco se puede descartar la posibilidad de aloreactividad, con una reacción de huésped contra injerto. Además, este tratamiento requiere se practique quimioterapia o radioterapia para obtener una aplasia o linfopenia previo a la re-administración de los T-CAR en el paciente, lo que puede afectar su calidad de vida (88). Para mitigar alguno de estos efectos secundarios, se han desarrollado estrategias para aumentar la especificidad “on target” y disminuir los efectos “off tumor” de la terapia, por ejemplo, empleando CARs dirigidos a dos antígenos específicos (TanCAR), en lugar de sólo uno (65). También se han utilizado iCARs, que son CAR inhibitorios utilizando PD-1 y CTL4 para reducir el riesgo de efectos adversos luego de terminado el tratamiento con T-CAR, con buenos resultados en ensayos preclínicos (89).

**Desafíos por superar:**

La elección del tipo celular más efectivo y la definición de las condiciones óptimas para conseguir su activación y supervivencia luego de ser re-infundidas en el organismo son puntos clave en la terapia antitumoral con CAR. A su vez, estas células modificadas, deben llegar al objetivo y superar los mecanismos que se generan en el microambiente tumoral para evitar al sistema inmune. En cuanto a las células utilizadas, actualmente la mayor parte de las investigaciones utilizan células T obtenidas de sangre periférica del paciente. Por esto, se deberá dedicar más atención a dicha selección para tener un mayor control del fenotipo T transferido de acuerdo a la patología a atacar (90). Para mejorar problemas de expansión, proliferación y supervivencia celular se han utilizado múltiples dominios intracelulares que generen co-estimulación, es decir que no sólo activan a dicha célula T sino que también aumenten la producción de IL-2, IL-15 u otras

citoquinas que favorezcan la activación de la células T y el resto del sistema inmune. A esto se ha sumado la posibilidad de aplasia medular o linfopenia por quimioterapia y/o radioterapia, que genera mejor crecimiento y proliferación debido a que se evitan los mecanismos de regulación y supresión (91). El hecho de lograr llegar al o los sitios blanco es un punto clave para lograr atacar a las células malignas. Puede ocurrir que en el conjunto de células T se incluyan poblaciones de células T diferenciadas que son incapaces de llegar a los tumores y esto requieren mayores estudios para seleccionar las poblaciones adecuadas. (92). Los investigadores actualmente se centran en mejorar esta migración potenciando la expresión de receptores de quimiocinas, como lo es CCR4 (93).

El ambiente tumoral se caracteriza por la hipoxia, estrés oxidativo y mecanismos supresores del sistema inmune. Este ambiente hostil es al que deben sobreponerse las células T modificadas al llegar al tumor maligno. Ciertos T-CARs han sido modificados para que expresen receptores de citoquinas y quimioquinas necesarias para la supervivencia de estas células, o capaces de expresar catalasas y heparanasas para evitar el stress oxidativo y lograr mayor penetración en el tumor (94)(95)(96)(97). También, para aumentar el potencial terapéutico de las T-CAR en el tumores sólidos, se le han incluido genes que codifican citoquinas universales, dando lugar a los llamados TRUCKs (T cells Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing) y se ha descubierto que el bloqueo de CTL-4 y PD-1 es importante para evitar la inhibición de la función de las T-CARs en el ambiente tumoral (98)(99).

Los resultados obtenidos hasta el momento hacen pensar que los T-CARs serán parte del arsenal médico para el tratamiento del cáncer en un corto plazo. La superación de los problemas anteriormente nombrados junto a la forma de manufactura, transporte y aplicación de esta terapia serán claves para lograr un tratamiento eficiente y al alcance de todo el sistema Sanitario.

## CONCLUSIONES

El cáncer es una enfermedad de alta prevalencia y mortalidad tanto a nivel mundial como en nuestro país, con múltiples estrategias terapéuticas, pero con una eficacia variable y en muchos casos sólo con posibilidades paliativas. Es por esto que las investigaciones hacia nuevos tratamientos contra el cáncer se encuentran en constante desarrollo y revisión. La terapia génica es una estrategia que ha demostrado eficacia clínica en cáncer de cabeza y cuello y melanoma, sobre todo si se utiliza junto a quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y/o cirugía.

La Gendicina, aprobada por la SFDA en el año 2004, fue la primera terapia génica disponible para su uso clínico a nivel mundial. Se obtuvieron muy buenos resultados cuando fue utilizada en combinación con terapias clásicas gracias a sus efectos sinérgicos, si bien utilizada en monoterapia no se alcanzaron resultados que destaquen por encima de las utilizadas hasta el momento. El Oncorine es el primer tratamiento con virus oncolítico aprobado para uso clínico a nivel mundial en el año 2005, los estudios realizados demostraron su alta eficacia, el doble aproximadamente, al combinarse con la quimioterapia convencional para el tratamiento del carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Onyx 15, un producto similar a Oncorine, se encuentra en estudio Fase III actualmente en los Estados Unidos para diversos tipos de cáncer deficientes en p53, y, al momento, se han documentado buenas experiencias existiendo remisiones importantes en carcinoma epitelial de cabeza y cuello y metástasis hepáticas de cáncer colorrectal. El T-VEC ha probado su eficacia clínica en el cáncer de melanoma logrando ser el primer virus oncolítico aprobado por la FDA de Estados Unidos en 2015. Aunque queda por definir su eficacia junto con otras terapias, de por sí aumenta la sobrevida y reduce el tamaño de los tumores.

Todos los tratamientos que emplean vectores virales, Gendicina, Oncorine y T-VEC, presentan un buen perfil de seguridad y en sus efectos adversos se ven síntomas de impregnación viral y respiratorios altos. Con ninguno de los tres tratamientos se han visto efectos adversos graves, ni muertes. Debido a su eficacia y seguridad estos tratamientos con terapia génica deberían ser tomados en cuenta a la hora de iniciar una estrategia terapéutica en pacientes portadores de patologías tumorales malignas anteriormente mencionadas.

Los T-CAR han demostrado eficacia en múltiples tipos de cáncer, sobretodo hematológicos, logrando la remisión parcial y completa, dependiendo del tipo de cáncer y del uso en conjunto con otras terapias. Aún queda por demostrar y mejorar su eficacia en tumores sólidos. A su vez queda por superar dificultades de manufactura, aplicación y disminución de efectos adversos. A pesar de ello, hay suficientes evidencias para pensar que los T-CAR van a cambiar el plan terapéutico que hoy en día se aplica en el cáncer.

## REFERENCIAS

1. Barrios E, Alonso R, Garau M MC. Situación Epidemiológica del Uruguay en Relación al Cáncer. Montevideo; 2014. Available from: [http://www.comisioncancer.org.uy/index\\_1.html](http://www.comisioncancer.org.uy/index_1.html)
2. OMS. Datos y Cifras sobre Cáncer. 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D BF. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. GLOBOCAN. 2012. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
4. Departameto Básico de Medicina, Facultad de Medicina U de la R. Temas de Neoplasias. Montevideo: Oficina del Libro. FEFMUR; 2009.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
6. A. von Domarus, P. Farreras Valenti CR. *Medicina Interna*. 17th ed. Barcelona, España: Elsevier; 2012.
7. Anderson WF. Human gene therapy. *Science*. 1992 May 8;256(5058):808–13.
8. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*. 1993 May 14; 260(5110):926–32.
9. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL et al. Gene transfer into humans: immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 1990;323(9):570–8.
10. Wu TL, Zhou D. Viral delivery for gene therapy against cell movement in cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(8):671–7.
11. Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells (transferrinfection/transferrin receptors/polylysine/protamine/chicken erythroblasts). 1990;87:3410–4.
12. Rodríguez, Josefa A., Lina M. Martínez NCYALC. Terapia génica para el tratamiento del cáncer. *Colomb Rev*. 2014;18(1):27–40.
13. Arrese I, González P, Miranda P, Perez-Nuñez P, Pascual B, Lobato RD. Tratamiento de los gliomas mediante virus oncolíticos: revisión de la literatura. *Neurocirugia*. 2005;16:158–68.
14. Biederer C, Ries S, Brandts CH, McCormick F. Replication-selective viruses for cancer therapy. *J Mol Med (Berl)*. 2002 Mar; 80(3):163–75.
15. Slos P, De Meyer M, Leroy P, Rousseau C, Acres B. Immunotherapy of established tumors in mice by intratumoral injection of an adenovirus vector harboring the human

- IL-2 cDNA: Induction of CD8 + T-cell immunity and NK activity.
16. Ahn WS, Bae SM, Lee JM, Namkoong SE, Yoo JY, Seo Y-S, et al. Anti-cancer effect of adenovirus p53 on human cervical cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Int J Gynecol Cancer*. 2004 Mar-Apr;14(2):322–32.
  17. Wang J, Lu X-X, Chen D-Z, Li S-F, Zhang Jing Wang L-S, Zhang L-S, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* *World J Gastroenterol* *World J Gastroenterol*. 2004; 10(103).
  18. SFDA. Points to consider for human gene therapy and product quality control. *BioPharm Int*. 2004;
  19. Chen G-X, Zhang S, He X-H, Liu S-Y, Ma C, Zou X-P. Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives. *Onco Targets Ther*. 2014;7:1901–9.
  20. GLOBCAN. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2013. Available from: <http://p53.iarc.fr/TP53SomaticMutations.aspx>
  21. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2000
  22. Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Weber, M.L., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., and Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*. 1998;
  23. Taha T, Johnson K, Obeid L, Bielawski J, Hannun Y, Dbaibo G et al. Down-regulation of sphingosine kinase-1 by DNA damage: Dependence on proteases and p53. *J Biol Chem*.
  24. Bouvard, V., Zaitchouk, T., Vacher, M., Duthu, A., Canivet, M., Choisy-Rossi, C., Nieruchalski, M., and May E. Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene*. 2000;19(5):649–60.
  25. Sah, N.K., Munshi, A., Nishikawa, T., Mukhopadhyay, T., Roth, J.A., and Meyn R. Adenovirus-mediated wild-type p53 radiosensitizes human tumor cells by suppressing DNA repair capacity. *Mol Cancer Ther*.
  26. Yen, N., Ioannides, C.G., Xu, K., Swisher, S.G., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., EL-Naggar, A.K., Cristiano, R.J., Fang, B., Glisson, B.S., Hong, W.K., Khuri, F.R., Kurie, J.M., Lee, J.J., Lee, J.S., Merritt, J.A., MUKHOPADHYay, T., Nesbitt, J.C., Nguyen, D., Ja. Cellular and humoral immune responses to adenovirus and p53 protein antigens in patients following intratumoral injection of an adenovirus vector expressing wild-type p53 (Ad-p53). *Cancer Gene Ther*. 2000;

27. Pal, S., Datta, K., and Mukhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res.* 2001;
28. Schwartzberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M., and Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res.* 2004;
29. Brasseur, G., Tron, P., Dujardin, G., Slonimski, P.P., and Brivet-Chevillotte P. The nuclear ABC1 gene is essential for the correct conformation and functioning of the cytochrome bc1 complex and the neighbouring complexes II and IV in the mitochondrial respiratory chain. *Eur J Biochem.* 1997;
30. Sun Y, Zeng X-R, Wenger L, Firestein GS, Cheung HS. p53 down-regulates matrix metalloproteinase-1 by targeting the communications between AP-1 and the basal transcription complex. *J Cell Biochem.* 2004 May 15; 92(2):258–69.
31. Singh B, Reddy PG, Goberdhan A, Walsh C, Dao S, Ngai I, et al. p53 regulates cell survival by inhibiting PIK3CA in squamous cell carcinomas.
32. Peng Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther.* 2005;16(9):1016–27.
33. Han, d.m., Huang, z.g., Zhang, w., Yu, Z.K., Wang, Q., Ni, X., Chen, X.H., Pan, J.H., and Wang H. Effectiveness of recombinant adenovirus p53 injection on laryngeal cancer: Phase I clinical trial and follow up. *Nat Med J China.* 2003;
34. Chen, C.B., Pan, J.J., and Xu Ly. Recombinant adenovirus p53 agent injection combined with radiotherapy in treatment of nasopharyngeal carcinoma: a phase II clinical trial. *Nat Med J China.* 2003;
35. Zhang, S.W., Xiao, S.W., and Lu Y. Thermosensitized effects of adenovirus-mediated p53 (Ad-p53): Preclinical study and a phase II clinical trial in China. *Jpn J Hypertermic Oncol.* 2003;
36. Li LJ, Huang YD et al. Combination therapy of subselective intraarterial rAd-p53 infusion with induction chemotherapy for locally advanced head and neck carcinoma. *ASGT Annu Conf.* 2006;
37. Sunwaybio. Oncorine [Internet]. Available from: <http://www.sunwaybio.com.cn/en/product.html>
38. Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007;7(2):141–8.
39. Larson C, Oronsky B, Scicinski J, Fanger GR, Stirn M, Oronsky A, et al. Going viral: a review of replication-selective oncolytic adenoviruses. *Oncotarget.* 2015;6(24):19976–89.
40. Dix BR, Edwards SJ, Braithwaite AW. Does the Antitumor Adenovirus ONYX-015 /

- dl1520 Selectively Target Cells Defective in the p53 Pathway ? 2001;75(12):5443–7.
41. Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, Sze D, Andrews J, Romel L, et al. Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Ther.* 2001;8(21):1618–26.
  42. Liu BL, Robinson M, Han Z-Q, 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;10(4):292–303.
  43. Goins WF, Huang S, Cohen JB, Glorioso JC. Engineering HSV-1 Vectors for Gene Therapy. In 2014. p. 63–79.
  44. Cassady K a, Gross M, Roizman B. The herpes simplex virus US11 protein effectively compensates for the gamma1(34.5) gene if present before activation of protein kinase R by precluding its phosphorylation and that of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *J Virol.* 1998;72(11):8620–6.
  45. Cassady K a, Gross M, Roizman B. The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the gamma134.5 genes precludes shutoff of protein synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2alpha. *J Virol.* 1998;72(9):7005–11.
  46. Vacchelli E, Aranda F, Obrist F, Eggermont A, Galon J, Cremer I, et al. Trial watch: Immunostimulatory cytokines in cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2014;3(April):e29030.
  47. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:51–72.
  48. Ranki T, Joensuu T, Jäger E, Karbach J, Wahle C, Kairemo K, et al. Local treatment of a pleural mesothelioma tumor with ONCOS-102 induces a systemic antitumor CD8 + T-cell response, prominent infiltration of CD8 + lymphocytes and Th1 type polarization. *Oncoimmunology.* 2014;3(10):e958937.
  49. Kaufman HL, Bines SD. OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol.* 2010 Jun;6(6):941–9.
  50. De Clercq E, Field HJ. Antiviral prodrugs - the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *Br J Pharmacol.* 2006;147(1):1–11.
  51. Razonable RR. Antiviral Drugs for Viruses Other Than Human Immunodeficiency Virus. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(10):1009–26.
  52. Andtbacka RHI, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene Laherpaprepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* 2015 Sep 1;33(25):2780–8.
  53. K. Harrington, M. Hingorani, M. Tanay, J. Matthews, K. Newbold, L. Renouf, R. S. Coffin, I. McNeish, C. Nutting; Royal Marsden Hospital, London, United Kingdom;

- Institute of Cancer Research, London, United Kingdom; BioVex, Inc., Woburn, MA; Barts and The UK. A phase I/II dose escalation study of OncoVexGM-CSF and chemoradiotherapy in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck.
54. Hu JCC, 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;12(22):6737–47.
  55. 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.
  56. Galluzzi L, Lugli E. Cancer immunotherapy turns viral. *Oncoimmunology.* 2013;2(4):e24802.
  57. FDA approves first-of-its-kind product for the treatment of melanoma. 2015; <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm469571.htm>
  58. Maus M V, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood.* 2014 Apr 24, 123(17):2625–35.
  59. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, et al. A Phase I Study on Adoptive Immunotherapy Using Gene- Modified T Cells for Ovarian Cancer.
  60. Aranda F, Buqué A, Bloy N, Castoldi F, Eggermont A, Cremer I, et al. Trial Watch: Adoptive cell transfer for oncological indications. *Oncoimmunology.* 2015 Nov;4(11):e1046673.
  61. McLaughlin L, Cruz CR, Bollard CM. Adoptive T-cell therapies for refractory/relapsed leukemia and lymphoma: current strategies and recent advances. *Ther Adv Hematol.* 2015;6(6):295–307.
  62. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(24):10024–8.
  63. Hombach A, Schneider C, Sent D, Koch D, Willemsen RA, Diehl V, et al. An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen- positive tumor cells. *Int J Cancer.* 2000;88(1):115–20.
  64. Nolan KF, Yun CO, Akamatsu Y, Murphy JC, Leung SO, Beecham EJ, et al. Bypassing immunization: Optimized design of “designer T cells” against carcinoembryonic antigen (CEA)-expressing tumors, and lack of suppression by soluble CEA. *Clin Cancer Res.* 1999;5(12):3928–41.

65. Grada Z, Hegde M, Byrd T, Shaffer DR, Ghazi A, Brawley VS, et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. 2013
66. Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M, Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. 2013;31(1):71–5.
67. Zhao Y, Wang QJ, Yang S, Kochenderfer JN, Zheng Z, Zhong X, et al. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity. *J Immunol.* 2009;183(9):5563–74.
68. Wang J, Jensen M, Lin Y et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Hum Gene Ther.* 2007;18:712–25.
69. Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, Gonzalez N, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances *in vivo* persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res.* 2006;66(22):10995–1004.
70. Hombach A, Wiczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, et al. Tumor-Specific T Cell Activation by Recombinant Immunoreceptors: CD3 $\zeta$  Signaling and CD28 Costimulation Are Simultaneously Required for Efficient IL-2 Secretion and Can Be Integrated Into One Combined CD28/CD3 $\zeta$  Signaling Receptor Molecule. *J Immunol.* 2001;167(11):6123–31.
71. Pameijer C, Navanjo A, Meechoovet B, Wagner J, Aguilar B, Wright C, et al. Conversion of a tumor-binding peptide identified by phage display to a functional chimeric T cell antigen receptor. *Cancer Gene Ther.* 2007;14:91–7.
72. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. *In Vivo* Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Source Sci New Ser.* 1996 Apr 12;272(5259):263-7.
73. Till BG, Jensen MC, Wang J, Chen EY, Wood BL, Greisman HA, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood.* 2008 Sep 15; 112(6):2261–71.
74. Huang X, Guo H, Kang J, Choi S, Zhou TC, Tammana S, et al. Sleeping Beauty Transposon-mediated Engineering of Human Primary T Cells for Therapy of CD19 + Lymphoid Malignancies HHS Public Access. *Mol Ther.* 2008;16(3):580–9.
75. Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, Vaughn DW, Endy TP, Mammen MP, et al. Redirecting Specificity of T-Cell Populations For CD19 Using the Sleeping Beauty System. *Cancer Res.* 2010;199(10):1442–8.

76. Imai C, Iwamoto S, Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*. 2005 Jul 1; 106(1):376–83.
77. Muller T, Uherek C, Maki G et al. Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(3):411–23.
78. Kondo M, Sakuta K, Noguchi a, Ariyoshi N, Sato K, Sato S, et al. Zoledronate facilitates large-scale *ex vivo* expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*. 2008;10(8):842–56.
79. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Feldman S a, Maric I, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize Brief report Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells. 2010;116(20):4099–102.
80. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Oct 16;371(16):1507-17. doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
81. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia HHS Public Access. *Sci Transl Med* Febr. 2014 ; 19(6224):224–5.
82. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet (London, England)*. 2015 Feb 7; 385(9967):517–28.
83. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RPT, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, et al. Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J Clin Oncol*. 33:540–9.
84. Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruella M, Zheng Z, Barrett DM, et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood*. 2016;127(9):1117–27.
85. Hackett PB, Largaespada DA, Cooper LNJ. A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther*. 2010 Apr; 18(4):674–83.
86. Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, Kruit WH, Kliffen M, Debets R, Gratama JW, Stoter G OE. Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With Autologous T-Lymphocytes Genetically Retargeted Against Carbonic Anhydrase IX : First Clinical Experience. *J Clin Oncol*. 2016;24(13):22–4.

87. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther.* 2010 Apr; 18(4):843–51.
88. Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, Riviere I, Sadelain M. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther.* 2010 Apr;18(4):666–8.
89. Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med.* 2013 Dec 11; 5(215):215ra172.
90. Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther.* 2016;(February):1–7.
91. Wrzesinski C, Paulos CM, Kaiser A, Muranski P, Palmer DC, Gattinoni L, et al. Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *J Immunother.* 2010 Jan; 33(1):1–7.
92. Palendira U, Chinn R, Raza W, Piper K, Pratt G, Machado L, et al. Selective accumulation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells with unique homing phenotype within the human bone marrow.
93. Di Stasi A, De Angelis B, Rooney C, et al. T lymphocytes coexpressing CCR4 and chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in Hodgkin tumor model. *Blood.* 2009;113(25):6392–402.
94. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(8):1145-54. doi: 10.1517/14712598.2015.1046430. Epub 2015 May 18.
95. Pegram HJ, Park JH, Brentjens RJ. CD28z CARs and Armored CARs Clinical experience with CAR T cell treatment of B cell malignancies.
96. Ligtenberg MA, Mougiakakos D, Mukhopadhyay M, Witt K, Lladser A, Chmielewski M, et al. Coexpressed Catalase Protects Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells as well as Bystander Cells from Oxidative Stress-Induced Loss of Antitumor Activity. *J Immunol.* 2016 Jan 15; 196(2):759–66.
97. Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. *Nat Med.* 2015 May; 21(5):524–9.
98. Liu X, Ranganathan R, Jiang S, Fang C, Sun J, Kim S, et al. A Chimeric Switch-Receptor Targeting PD1 Augments the Efficacy of Second-Generation CAR T Cells in Advanced Solid Tumors. *Cancer Res.* 2016 Mar 15; 76(6):1578–90.
99. Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, Wenk S, Kraus F, et al. Impact of a New Fusion Receptor on PD-1-Mediated Immunosuppression in Adoptive T Cell Therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2015 Jun 23; 107(8):djv146–djv146.