

TÍTULO DEL PROYECTO

Ensayo para estudiar la viabilidad de combinar viroterapia oncolítica y quimioterapia sistémica en niños y adolescentes con neuroblastoma refractario.

EQUIPO INVESTIGADOR

Manuel Ramírez Orellana (investigador principal).

Lucas Moreno Martín-Retortillo.

David Ruano Domínguez.

Gustavo Javier Melen.

África González Murillo.

Lidia Franco Luzón.

Servicio de Oncohematología. Unidad de Terapias Avanzadas. Hospital Universitario Niño Jesús. Avenida Menéndez Pelayo, 65. 28009-Madrid.

manuel.ramirez@salud.madrid.org

Antecedentes y estado actual del tema

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en los niños. Cerca de la mitad de los casos presenta una enfermedad metastásica o con amplificación del oncogén MYCN¹. En esta situación, llamada de alto riesgo, el pronóstico es todavía muy pobre en la que la mayoría de los pacientes son refractarios al tratamiento de primera línea o experimentan recaídas. Menos del 10% de los pacientes con neuroblastoma en recaída sobreviven a los 5 años. Cuando la primera línea de tratamiento no consigue erradicar la enfermedad existe un ensayo clínico europeo (BEACON-Neuroblastoma)² abierto que combina quimioterapia y terapia antiangiogénica. Si la enfermedad no se controla o vuelve a aparecer tras este ensayo, no existen opciones establecidas como la mejor siguiente línea de terapia, y el pronóstico es muy negativo. Se necesitan estrategias terapéuticas diferentes a las actuales para poder mejorar los resultados de este grupo de niños con NB. Nuestro grupo de investigación lleva más de una década desarrollando un tratamiento basado en la administración de células mesenquimales (MSCs) autólogas que transportan un adenovirus oncolítico, para niños con tumores metastásicos y refractarios en general, y para NB en particular. Denominamos Celyvir a este nuevo medicamento de Terapia Avanzada. Cuatro niños recibieron inicialmente Celyvir y ya fueron presentados en una publicación³. En colaboración con el grupo del Dr. Javier García Castro del ISCIII y del Dr. Ramón Alemany del ICO, hemos terminado el programa de uso compasivo con Celyvir en niños con tumores metastásicos refractarios, y hemos analizado posibles factores asociados a la respuesta clínica. De los 17 niños tratados, 12 tenían NB, por lo que el análisis que se presenta se centra en esos casos. Los niños recibieron multidosis de Celyvir semanalmente (mínimo 4, máximo 70, total de 186) sin tratamientos concomitantes. Las células totales (min. 150×10^6 , máx. 2640×10^6) y las partículas virales totales (min. $4,5 \times 10^{12}$, máx. $2,64 \times 10^{14}$) variaron entre los pacientes. La tolerancia fue excelente, con toxicidades virales muy leves y autolimitadas. Los controles hematológicos y bioquímicos realizados en muestras de sangre en el momento de cada infusión, se encontraron todos en los rangos normales. Las respuestas clínicas fueron evaluadas después de la sexta dosis con el nivel de enolasa suero y con gammagrafía con ¹²³I-MIBG, comparando el número de lesiones pre y post-terapia. Los resultados clínicos fueron progresión (8), enfermedad estable (1), respuesta parcial (3) y la respuesta completa (1). UPN6 recibió Celyvir en 2 ocasiones separadas. El paciente alcanzó una respuesta completa después del primer ciclo, pero presentó recaída cerebral a los 6 meses. Recibió una segunda ronda de Celyvir y logró una respuesta parcial.

TABLA I. Características de los pacientes con Neuroblastoma tratados con Celyvir.

ID	SEXO	LÍNEAS DE TERAPIA	Nº DOSIS	Nº CELLS (x10 ⁶)	VIRUS	PCR PB	RESULTADO
UPN5	F	3	70	2640	2,64E+14	+	SD
UPN6a	M	3	6	226	4,5E+12		CR
UPN6b		5	29	1013	2,3E+13	+	PR
UPN7	F	4	9	520	5,2E+13	ND	PD
UPN10	M	4	6	160	1,6E+13	ND	PD
UPN11	M	4	4	150	1,5E+13	ND	PD
UPN12	F	4	10	340	3,4E+13	ND	PD
UPN13	M	4	8	280	2,8E+13	ND	PR
UPN16	F	3	7	150	1,5E+13	+	PD
UPN18	F	4	14	300	3E+13	+	PD
UPN19	M	4	9	220	2,2E+13	+	PR
UPN20	F	3	6	290	2,9E+13	+	PD
UPN21	M	6	8	176	1,76E+13	+	PD

Table legend: ID, identificación. PCR PB, detección de virus en sangre por PCR. UPN, identificador único. SD, enfermedad estable. PR, respuesta parcial. CR, respuesta completa. PD, progresión.

En el Anexo detallamos los estudios realizados en el contexto de este programa de uso compasivo. El resumen de toda la información comentada en este Anexo ofrece las siguientes conclusiones:

- Celyvir es una terapia factible de implementar en niños con NB refractario.
- El tratamiento con dosis múltiples de Celyvir es seguro y no asocia toxicidades graves.
- A pesar de tratarse de un grupo de niños con enfermedad muy avanzada, Celyvir consiguió un 38% de respuestas clínicas: 1/13 respuesta completa, 1/13 enfermedad estable, 3/13 respuesta parcial.
- Los niños que tuvieron respuestas clínicas presentaban unas cifras de linfocitos T circulantes preCelyvir significativamente más elevadas que los niños que no tuvieron respuesta. Esto sugiere que pacientes linfopénicos no se beneficiarían de esta terapia.
- Los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) se activaron tras la administración de Celyvir, asociado a una respuesta clínica antitumoral. Junto con el punto anterior, este hecho subraya la importancia de la respuesta inmune en el beneficio clínico de Celyvir y abre vías para mejorar / consolidar el potencial de nuestra estrategia.
- Las MSCs de los niños que tuvieron respuestas clínicas expresaban niveles más altos de algunas moléculas relacionadas con migración celular, lo que sugiere que puede existir un fenotipo de MSC más favorable para que el tratamiento sea eficaz.

A continuación de este programa de uso compasivo se comenzó un ensayo clínico “*first-in-child*” de Celyvir en pacientes pediátricos y adultos, liderado y llevado a cabo por nuestro equipo⁴. Este estudio, donde se han tratado 5 pacientes con NB, está a punto de completarse y de analizarse sus resultados, por lo que es preciso planificar el desarrollo clínico posterior de esta terapia prometedora. A la luz de nuestra experiencia con Celyvir proponemos evaluar modificaciones a esta terapia en un nuevo ensayo clínico:

1. Para intentar aumentar la tasa de respuestas queremos combinar Celyvir con quimioterapia que haya demostrado efecto sobre NB.
2. Para intentar explotar al máximo la respuesta inmune antitumoral queremos administrar Celyvir a niños que no presenten linfopenia T, definida como menos de 500 linfocitos T por microlitro. Además, Celyvir siempre se administrará cuando el paciente se haya recuperado de la linfopenia ocasionada por la quimioterapia previa.
3. Para intentar minimizar la variabilidad en las MSCs queremos usar MSCs de donantes, que estén preparadas de antemano, y que presenten un perfil de expresión de moléculas de adhesión / migración similar al de los niños que han obtenido respuesta clínica tras Celyvir.
4. Para intentar consolidar la respuesta mediada por los TILs queremos estudiar si es posible recuperar y expandir dichas células tras el tratamiento con Celyvir. El uso de estas células como terapia celular antitumoral se ha desarrollado durante las últimas décadas, liderado por el grupo del Dr. Steve Rosenberg en pacientes con melanoma maligno, un tumor incurable. Se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos en los que se han explorado las mejores condiciones para conseguir el máximo efecto de esta terapia celular adoptiva⁵. El tratamiento de

melanomas exclusivamente con TILs ha conseguido un índice de respuesta del 50%, con unas tasas de curación completa a más de 5 años del 20%, en una enfermedad mortal con cualquier otro tratamiento.

Todas estas modificaciones han sido ya comentadas con la Agencia Española de Medicamentos, que las ha acogido con interés al tratarse de medidas encaminadas a continuar optimizando la estrategia que venimos desarrollando desde hace años.

Hipótesis

La combinación de Celyvir con quimioterapia puede incrementar los efectos antitumorales de ambas estrategias en niños con NB refractarios. Los TILs pueden incrementar su actividad antiNB con la combinación Celyvir y quimioterapia.

Objetivos

Primario

- Determinar si es factible la adición de viroterapia oncolítica sistémica en el marco del tratamiento multimodal de niños con NB refractarios o en recaída.

Secundario

- Determinar la toxicidad del procedimiento.
- Determinar el tiempo hasta la recaída o la progresión en los pacientes que reciben este protocolo.
- Determinar la tasa de respuestas radiológicas y por MIBG.
- Determinar si es posible la expansión de TILs tras el tratamiento combinado Celyvir más quimioterapia en caso de lesiones accesibles a la cirugía.

Terciario

- Estudiar si el tratamiento con Celyvir resulta en replicación viral en los pacientes.
- Estudiar la respuesta inmune antiadenoviral de los pacientes que reciben Celyvir.
- Determinar la presencia de adenovirus oncolítico en las muestras quirúrgicas.
- Caracterizar cuantitativa y cualitativamente los cambios en el ambiente inmune intratumoral asociados con la administración de viroterapia.

Metodología

Diseño

Se trata de un ensayo abierto, no aleatorizado, para estudiar la viabilidad de combinar viroterapia oncolítica y quimioterapia en niños con NB refractarios o en recaída. Los pacientes serán reclutados en el momento en el que suceda la recaída/progresión/enfermedad refractaria. Se reclutarán 10 pacientes.

Criterios de inclusión

- Niños de entre 6 meses y 21 años de vida, diagnosticados de NB refractario o en recaída
- Obtener el consentimiento informado.
- Lansky $\geq 50\%$, Karnofsky $\geq 50\%$ o ECOG ≤ 3 .
- Esperanza de vida de ≥ 12 semanas.
- Los adolescentes con capacidad de reproducción se deben comprometer a utilizar un método anticonceptivo eficaz, para la duración del tratamiento de estudio y hasta 6 meses después de la última dosis de los fármacos del ensayo. Se debe obtener una prueba de embarazo en orina negativa dentro de 72 horas en mujeres después de la menarquia.

Criterios de exclusión

- Paciente que en el momento de la evaluación para elegibilidad estén dentro de:
 - o Ocho semanas de tratamiento mieloablativo previo con rescate de células madre hematopoyéticas (trasplante autólogo de células madre).
 - o Tres meses desde el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas.
 - o Dos semanas a partir de la última administración de un producto en investigación (PEI) en un ensayo clínico.
- Paciente embarazada o en período de lactancia.
- Cualquier condición médica no controlada que supone un riesgo adicional para el paciente.
- Baja probabilidad de cumplimiento del tratamiento.

Tratamientos

A) QUIMIOTERAPIA

Los pacientes recibirán quimioterapia con un régimen de quimioterapia de eficacia conocida en el neuroblastoma.

- Topotecán/ciclofosfamida.
- Temozolomida.
- Irinotecán-temozolomida.
- Topotecán-temozolomida.
- Etopósido oral.
- Carboplatino-etopósido

B) VIROTERAPIA ONCOLÍTICA.

Se administrará de manera sistémica con Celyvir. La preparación de Celyvir se realizará siguiendo la Norma de Correcta Fabricación (NCF) de Medicamentos y en las instalaciones de la Unidad de Terapia Celular y Terapia Génica del Hospital Niño Jesús, según un protocolo ya validado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos

Sanitarios (AEMPS): en cada ocasión, el paciente recibirá una dosis de entre 10^6 y 2×10^6 células /Kg, y la infección con el adenovirus oncolítico ICOVIR-5 se realizará a dosis de 200 m.o.i.

Esquema del tratamiento

Se mantendrá el esquema clásico quimioterapia y se sumará la viroterapia oncolítica. Se contemplan los siguientes pasos generales:

- 1.- Se realiza el diagnóstico de recaída y/o refractariedad, y estudio de extensión.
- 2.- Comienza con los ciclos de quimioterapia.
- 3.- Se administran dosis de Celyvir intravenoso en el momento de recuperación postquimioterapia, para que haya unas cifras mínimas de linfocitos T circulantes (más de 500 linfocitos T por microlitro en sangre periférica). Esta pauta se mantendrá durante 3 meses, o antes si se objetiva progresión de la enfermedad.

Evaluación de la factibilidad del ensayo

El ensayo tiene como objetivo estudiar si es factible combinar Celyvir con quimioterapia en niños con NB refractario o en recaída. Para ello se calculará el porcentaje de casos reclutados que completan el tratamiento durante 3 meses o antes si se objetiva progresión de la enfermedad.

Evaluación de la toxicidad del procedimiento

Se evaluarán las toxicidades asociadas tanto a la viroterapia como a la quimioterapia. Todos los pacientes del estudio serán considerados evaluables para toxicidad. Los criterios de valoración de seguridad incluyen los eventos adversos, el examen clínico y pruebas de laboratorio, que incluirán hemograma completo y diferenciado, bioquímica y coagulación. Además se hará una tira reactiva de orina para la detección de proteinuria. Se anotarán la aparición y gravedad de efectos secundarios asociados a cada infusión de Celyvir y de quimioterapia, tanto inmediatos como tardíos. Se calcularán los porcentajes de casos con toxicidad (y gravedad de la misma) respecto al total de niños reclutados y de niños que completan el tratamiento.

Evaluación de la respuesta

Se evaluarán las respuestas clínicas utilizando criterios clásicos (RECIST 1.1) y criterios desarrollados para evaluar la actividad de respuestas inmunes en tumores sólidos. Para ello se realizarán pruebas de imagen (TAC, RNM, gammagrafía con MIBG) y de marcadores tumorales (enolasa neuro específica). Se anotará el tiempo desde el día del diagnóstico hasta la recaída o la progresión en los pacientes que reciben este protocolo. Se calcularán los porcentajes de respuesta clínica (y tipo: completa, parcial, estable, no respuesta) respecto al total de niños reclutados y de niños que completan el tratamiento.

Evaluación de los TILs

Siempre que sea posible por la existencia de lesiones tumorales accesibles por cirugía, se propondrá la posibilidad de obtener una muestra tumoral viable, bien del tumor primario o bien de alguna metástasis. La toma de la muestra se realizará en quirófano o mediante radiología intervencionista. En los casos en los que los pacientes tuviesen infiltración de la médula ósea al iniciar el ensayo, la muestra podrá obtenerse mediante aspirado de médula. Se recogerán en medio de transporte ya preparado y se enviarán a la Unidad de Terapias Avanzadas del Hospital Niño Jesús. El cultivo y la expansión de TILs en condiciones NCF para uso en humanos se realizarán según el

protocolo validado por la AEMPS. En caso de que se consiga la expansión de los TILs, se utilizarán tras la quimioterapia siempre que la condición clínica del paciente lo permita y sea recomendable a falta de otras opciones terapéuticas.

Se calcularán los porcentajes de casos en los que se consigan expandir TILs respecto al total de niños reclutados, de niños que completan el tratamiento, y de niños en los que se inicia el cultivo de TILs.

Evaluación de los aspectos biológicos (objetivo terciario)

Detectar replicación viral en los pacientes. Para ello se estudiará la presencia de genoma de adenovirus oncolítico en la sangre de los pacientes durante el tratamiento. Inmediatamente antes de la infusión de cada dosis de Celyvir se obtendrá muestra de sangre para cuantificar la presencia de adenovirus oncolítico circulante. Se realizará una técnica de PCR desarrollada en el laboratorio para este fin. Se calcularán los porcentajes de casos con PCR positiva respecto al total de niños reclutados y de niños que completan el tratamiento, y para cada niño se calculará el porcentaje de análisis positivos respecto al número total de análisis realizados.

Estudiar la respuesta inmune antiadenoviral. Antes de la primera dosis de Celyvir y tras finalizar el último tratamiento, se estudiará el título de anticuerpos antiadenovirus en una muestra de suero. Se calcularán los porcentajes de casos en los que se produce una conversión serológica respecto al total de niños reclutados y de niños que completan el tratamiento,

Determinar la presencia de adenovirus oncolítico en las muestras quirúrgicas. Este estudio sólo se realizará si se consiguen muestras tumorales primarias, tanto antes como después del tratamiento. Se realizará mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo antiadenovirus sobre muestra quirúrgica, o mediante PCR específica. Se calcularán los porcentajes de casos en los que se detecte adenovirus en muestra tumoral respecto al total de niños en los que se puede estudiar muestra tumoral.

Caracterizar cuantitativa y cualitativamente los cambios en el contexto inmune intratumoral asociados con la administración de viroterapia. Este estudio sólo se realizará si se consiguen muestras tumorales primarias, tanto antes como después del tratamiento. La muestra inicial que se obtiene en el momento de la muestra diagnóstica y la muestra que se obtiene en el momento de la cirugía, se procesarán para:

- Citometría de flujo: Se estudiará la presencia y frecuencia de poblaciones de células inmunes: linfocitos T (y subpoblaciones), B, NK, NKT, células mieloides supresoras y células dendríticas.
- Clonalidad del TCR β : Se estudiará la diversidad clonal de los TILs mediante técnica de ultrasecuenciación de los posibles reordenamientos del gen TCR-beta.
- Producción de Interferón- γ : Los TILs (células efectoras) se estimularán con CD3 + CD28 y se cuantificará la producción de IFN γ mediante citometría de flujo (marcaje intracitoplasmático) o mediante cuantificación en el sobrenadante de los cultivos (ELISA). Se hará un análisis estadístico para averiguar si la producción de IFN γ cambia significativamente tras la combinación de quimioterapia y viroterapia (comparación de medias).
- Expresión génica: Para obtener una información sobre el ambiente inmune intratumoral, y el posible efecto que sobre el mismo pueda tener el tratamiento, se cuantificarán los niveles de expresión de diversos genes asociados a la inmunidad tumoral, tanto con los TILs efectoras (CD8, granzima, IFN γ) como con los TILs reguladores (Foxp3), como con moléculas relacionadas con tolerancia inmune: IL10, IDO, TGF- β , IL-6, Arginase 1, iNOS. Se hará un

análisis estadístico para averiguar si los niveles de expresión de estos genes cambian significativamente tras la combinación de quimioterapia y viroterapia (comparación de medias).

Anexo

Hemos comparado diferentes biomarcadores en 2 grupos de los pacientes descritos anteriormente: los que tuvieron una respuesta clínica positiva al tratamiento (ya sea completa, parcial o de estabilización; n = 5), y los que no respondieron (n = 8).

La replicación adenoviral se estudió en muestras de sangre (PB) usando un método de PCR. Encontramos resultados positivos en todos los pacientes estudiados (Tabla I), en el 50% y el 100% de las muestras analizadas, sin diferencias entre los pacientes que respondieron y los que no lo hicieron.

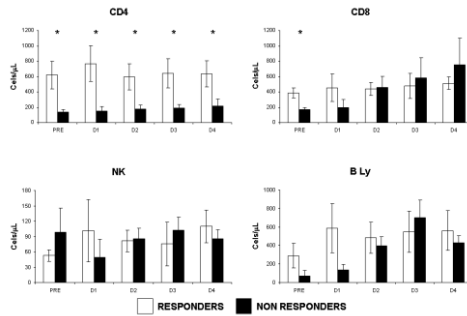


Figura 1. Contajes absolutos de linfocitos T, B y NK antes y tras el tratamiento con Celyvir. *: p < 0,05.

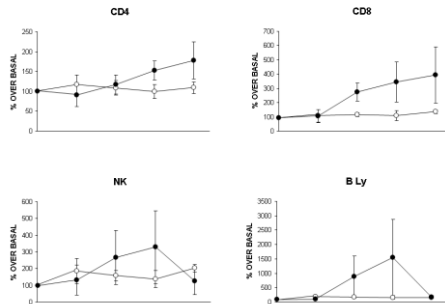


Figura 2. Variación en las cifras de linfocitos T, B y NK antes y tras el tratamiento con Celyvir.

Seguimos el número absoluto de linfocitos circulantes terapia previa y después de Celyvir y encontramos cambios en todos los pacientes. Los pacientes que respondieron tenían significativamente más altos cargos de los linfocitos T pre-tratamiento (p = 0,0157, prueba de Wilcoxon). La diferencia fue tanto en CD4 como en CD8 (Figura 1). Los números absolutos

de linfocitos T se mantuvieron más altos, aunque no de forma significativa para CD8, a lo largo de la terapia en los pacientes que mostraron una respuesta clínica. Las cifras de células NK y de linfocitos B no fueron significativamente diferentes al comparar pacientes respondedores y no respondedores. A partir de los valores pre-terapia, los recuentos de células NK, linfocitos B y los linfocitos T (CD4 y CD8) crecieron durante el tratamiento con Celyvir (Figura 2). Los aumentos por encima de los niveles basales no fueron significativamente diferentes en

pacientes que respondieron a Celyvir frente a los que no lo hicieron. Sin embargo, las variaciones respecto a los valores basales fueron muy leves entre los pacientes que respondieron a Celyvir, mientras que los que no respondieron mostraron aumentos marcados en todas las poblaciones de linfocitos circulantes.

UPN5 era la paciente que recibió el mayor número de infusiones y nos permitió obtener un amplio seguimiento (Figura 3A). Después del diagnóstico, recibió 3 líneas de tratamiento, con progresión después de cada una. Se iniciaron infusiones semanales de Celyvir como única terapia, y se objetivó estabilización de la enfermedad en la primera evaluación (después de los primeros 2 meses). Los linfocitos T de PB mostraron un aumento constante desde bajos niveles basales. Desde un punto de vista clínico, la mejora de su estado general durante el primer año de tratamiento Celyvir fue notable, con una ganancia ponderal del 15%. La exploración clínica se convirtió en normal (excepto, la masa abdominal). Celyvir se interrumpió después de 12 meses y se comenzaron infusiones de interleucina-2 (IL-2), en dosis de 6×10^6 U, con el fin de estimular in vivo la respuesta inmune lograda. Los recuentos de células en PB disminuyeron con este tratamiento, por lo que se decidió reiniciar Celyvir después de 2 meses de IL-2. Con la reinfusión de Celyvir se produjo un aumento inicial de linfocitos T circulantes que duró 3 meses, después de lo cual la enfermedad progresó a una situación terminal. Durante el último periodo de infusiones Celyvir, los recuentos de linfocitos se mantuvieron decrecientes, coincidiendo con el aumento progresivo de los

marcadores bioquímicos del tumor (ver enolasa y LDH curvas en la Figura 3 complementaria). En UPN5 se obtuvieron biopsias del tumor primario antes y después de la terapia con Celyvir. Estudios de inmunohistoquímica en biopsias mostraron la presencia de diferentes poblaciones de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), pre y post terapia Celyvir (Figura 3B). La tinción de Ki67 mostró un aumento en la actividad de los TIL después de la terapia Celyvir, localizados en estructuras linfoides terciarias dentro de la masa tumoral. La citometría de flujo de las biopsias tumorales obtenidas en 2 momentos diferentes durante la terapia Celyvir (estabilización de la enfermedad y enfermedad en etapa terminal) mostraron cambios notables en los porcentajes de TILs CD4 y CD8, y en la distribución de subpoblaciones naïve y memoria (central, efectora y terminal) (Figura 3C).

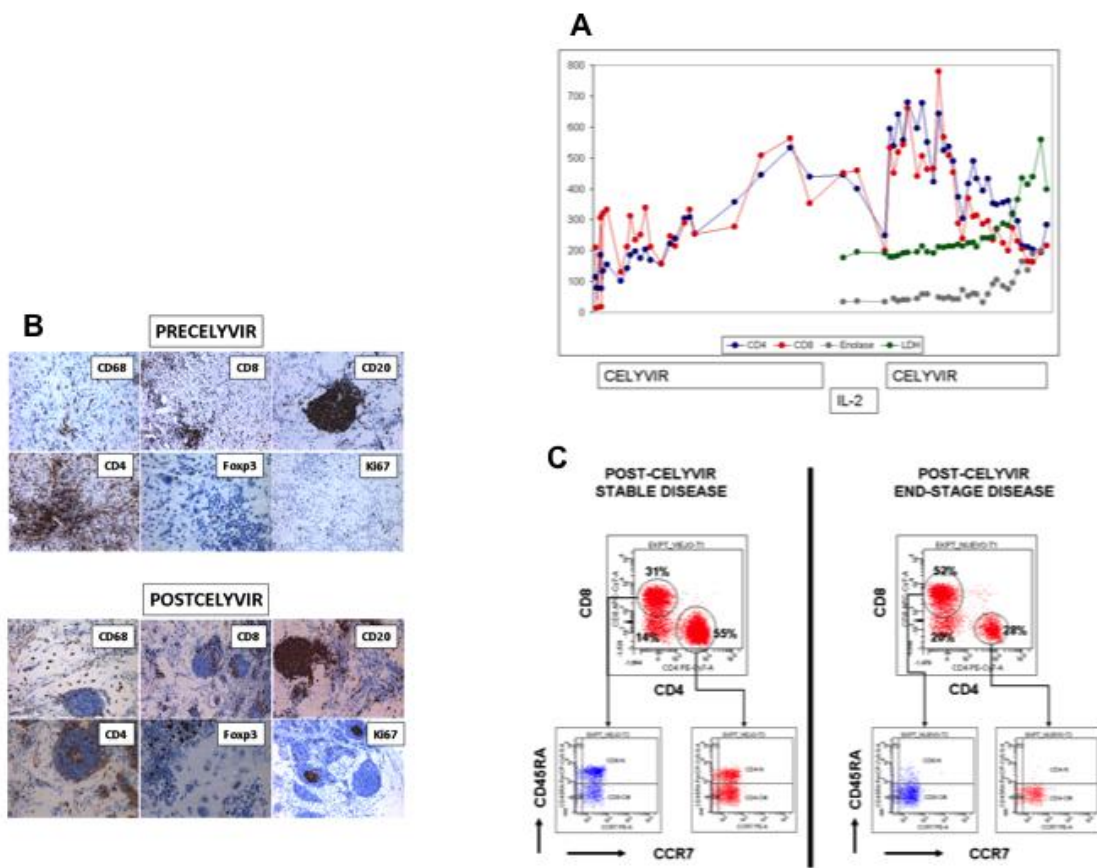


Figura 3. A) Variación en las cifras de linfocitos T, y de marcadores tumorales antes y tras el tratamiento con Celyvir en UPN5. B) Inmunohistoquímica mostrando poblaciones de TILs y activación antes y tras la terapia con Celyvir en UPN5. C) Estudio de TILs por citometría de flujo en dos momentos del tratamiento.

Hemos estudiado los niveles de expresión de varias moléculas de adhesión en la superficie de las células mesenquimales (MSCs) de pacientes tratados con Celyvir, por citometría de flujo. Se llevaron a cabo en el producto Celyvir, es decir, después de que las MSCs se irradiaran y se infectaran con ICOVIR-5. Los niveles de expresión (intensidad media de fluorescencia, MFI) se normalizaron a los de sus respectivos controles de isotipos para cada fluorescencia, para permitir comparaciones. Encontramos que las MSCs de pacientes que tuvieron una respuesta clínica positiva expresaban niveles más altos de CXCR1 y CCR1 de forma significativa ($p < 0,05$) frente a las MSCs de pacientes sin respuesta (Figura 3). Además, los niveles de CXCR4

tienden a ser más alto, casi estadísticamente significativa ($p < 0,1$), en el grupo de pacientes que respondieron después de recibir Celyvir (Tabla II).

Tabla II. Comparaciones de todas las moléculas de adhesión.

MOLÉCULA	RESPONDEDORES	NO RESPONDEDORES	P VALUE
CCR1	2,208	1,29	0,0157
CCR2	1,725	1,09	>0,1
CCR3	4,4	1,01	>0,1
CCR4	1,237	1,14	>0,1
CCR5	1,561	1,14	>0,1
CCR6	0,985	0,84	>0,1
CCR7	3,485	1,87	>0,1
CCR9	3,645	2,22	>0,1
CXCR1	1,027	0,67	0,0424
CXCR2	0,587	0,52	>0,1
CXCR3	0,964	0,88	>0,1
CXCR4	4,09	0,9	0,0882
CXCR5	1,432	1,14	>0,1
CXCR6	4,646	0,95	>0,1
$\alpha 4$ Integrin	2,235	3,01	>0,1
$\alpha 5$ Integrin	1,654	1,27	>0,1
$\beta 1$ Integrin	18,457	23,35	>0,1
$\beta 2$ Integrin	0,808	0,89	>0,1
$\beta 3$ Integrin	0,178	0,16	>0,1
E-SELECTIN	0,986	1,03	>0,1
L-SELECTIN	0,608	0,97	>0,1
P-SELECTIN	0,202	0,17	>0,1
ICAM-1	4,0349	3,14	>0,1
ICAM-2	1,397	1,47	>0,1
ICAM-3	0,586	0,52	>0,1
VCAM-1	0,6368	0,51	>0,1
CD44	75,39	29,62	>0,1
CD105	1,027	0,81	>0,1
IFA-3	1,58	1,38	>0,1

Tabla 3. Comparaciones de niveles de expresión de genes relacionados con respuesta inmune.

MOLÉCULA	RESPONDEDORES	NO RESPONDEDORES	P VALUE
CCL5	0,55	0,40	>0,1
CXCL10	0,45	0,31	>0,1
IDO1	0,14	0,67	0,0527
IFN γ	0,17	1,25	0,0167
IL-10	0,50	1,78	>0,1
IL-6	0,22	0,62	0,0894
IL-8	3,63	13,99	0,0874
TGF β 1	0,67	1,11	>0,1
TGF β 2	0,01	0,01	>0,1
TGF β 3	0,78	1,17	>0,1
TNF α	0,23	0,38	>0,1
VEGF α	1,24	2,04	0,0894

Por otro lado determinamos los niveles de genes expresados por las MSCs infundidas relacionados con un posible papel inmune, utilizando ensayos RTqPCR (Tabla III). Los niveles de expresión se normalizaron a los de MSCs de donantes sanos (disponible comercialmente). Encontramos que IFN γ se expresó en niveles significativamente más bajos en las MSCs de niños con respuestas clínicas (Figura 3A), mientras que los niveles IDO, IL6, IL8 y VEGF α eran casi significativamente menores ($p < 0,1$). También se estudiaron los niveles de expresión de varias moléculas relacionadas con la inmunidad en la superficie de las MSC de pacientes tratados con Celyvir por citometría de flujo. Encontramos que las MSCs de pacientes que tuvieron una respuesta clínica positiva expresaban niveles significativamente

más altos de HLA-DR que las MSC de pacientes sin respuesta ($p < 0,05$).

Dado que los receptores de quimioquinas expresadas por las MSCs se asociaron

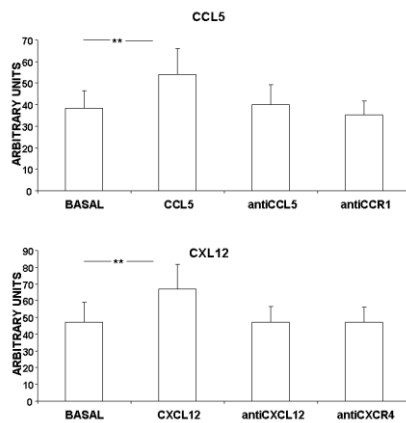


Figura 4. Valores de migración a estímulos quimiotácticos específicos de las MSCs Celyvir. ** $p < 0,01$.

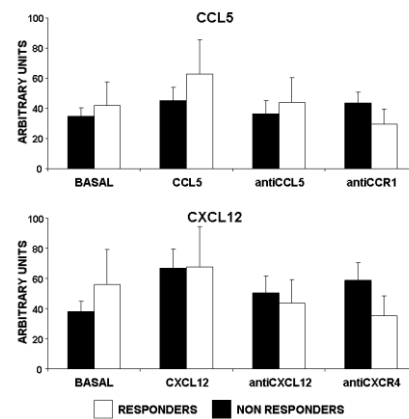


Figura 5. Comparación de migración de las MSCs Celyvir en pacientes respondedores y no respondedores.

con el resultado clínico, estudiamos si los niveles de expresión tenían repercusiones funcionales. En primer lugar, estudiamos si los productos Celyvir utilizados para los pacientes fueron capaces de migrar hacia los estímulos quimiotácticos. Se realizaron 2 tipos de experimentos utilizando ensayos de migración *in vitro*. En primer lugar, se indujo quimiotaxis mediante la adición de quimiocinas individuales (CCL5, ligando para CCR1, o SDF1, ligando para CXCR4) a la cámara inferior de los sistemas de *transwell*. Los resultados mostraron que las MSCs utilizadas en Celyvir respondieron a cada estímulo quimiotáctico, y que dicha migración se inhibió específicamente al bloquear o bien el quimioatrayente o el receptor de quimioquinas (Figura 4). En el segundo conjunto de experimentos, las células de neuroblastoma se colocaron en la cámara inferior y se utilizaron como estímulos quimiotácticos. Las MSCs utilizados en la producción de Celyvir respondieron aumentando significativamente su migración hacia las células tumorales. Finalmente comparamos las respuestas quimiotácticas de productos Celyvir de los pacientes que tuvieron una respuesta clínica positiva frente a los de los pacientes sin respuesta, en los ensayos transwell mencionados. Aunque los valores de migración fueron mayores entre las MSC de pacientes que tuvieron respuestas clínicas, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 5).

Hacia la optimización de las medicinas de terapia avanzada.

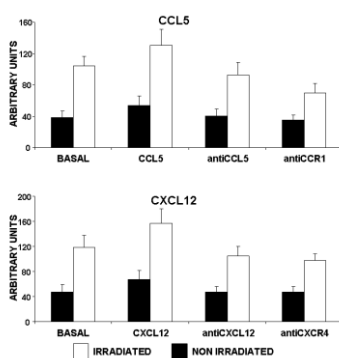


Figura 6. Comparación de migración de las MSCs Celyvir, irradiadas y no irradiadas, en pacientes respondedores y no respondedores.

La preparación de Celyvir implica que las MSCs reciben irradiación letal y son infectadas por un virus oncolítico. La irradiación de MSCs es un requisito de la AEMPS, a causa de los informes controvertidos en la capacidad de las MSCs para favorecer la progresión del tumor. No se sabe cómo esta manipulación puede afectar a la capacidad de las MSCs en productos Celyvir para migrar hacia y anidar en los nódulos metastásicos antes de entregar sus cargamentos oncolíticos. Hemos estudiado los niveles de expresión de moléculas de adhesión celular y la capacidad quimiotáctica de las MSC antes y después de recibir una dosis de 30 Gy, como parte del proceso de producción Celyvir. La

mayoría de las moléculas de adhesión celular estudiados modificaron sus niveles de expresión tras la irradiación. Esto no se tradujo en una mayor capacidad de migración en los ensayos *in vitro*. De hecho, las MSCs irradiadas tenían valores significativamente más bajos de migración hacia las quimiocinas o células de neuroblastoma en comparación con MSCs no irradiadas (Figura 6). Estos resultados no fueron diferentes entre las MSCs de los niños que respondieron a Celyvir o aquellos que no lo hicieron, lo que refleja un efecto universal de la irradiación de dosis alta.

Los resultados más importantes se discuten a continuación. El estado del sistema inmunológico en el momento de iniciar la terapia parece fundamental para lograr un beneficio clínico. Más en concreto, el número de linfocitos T podría necesitar estar por encima de un umbral, ya que los pacientes que no respondieron en nuestra cohorte tuvieron significativamente menos células T circulantes que los pacientes que sí respondieron. No se encontró un papel comparable a otros linfocitos, como las células B o células NK, lo que subraya el valor de los linfocitos T en el ataque inmune antitumoral después de la viroterapia. También encontramos datos que sugieren una

respuesta inmune a la administración de virus, ya que los números de linfocitos se incrementaron desde niveles basales en todos los pacientes. Por lo tanto, a pesar de que existe una respuesta inmune que parece universal entre estos pacientes, sólo aquellos con un repertorio TCR suficientemente diverso (un suficiente número de células T) pueden desarrollar una respuesta inmunitaria antitumoral. Además, la respuesta clínica se asocia a la activación de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), como se muestra por los resultados de inmunohistoquímica Ki67 de muestras primarias. De acuerdo con nuestros resultados en los pacientes, un estudio reciente en ratones⁶ encontró que la terapia intratumoral localizada con virus oncolíticos indujo respuestas inflamatorias, que activaron la infiltración linfoide y efecto antitumoral en tumores distantes (no inyectado con el virus). Los autores sugieren que no eran necesarios altos niveles de replicación viral para alcanzar el efecto, y que la inflamación coincidió con infiltración tumoral con TILs CD4 y CD8. Estos resultados demostraron que la terapia localizada con virus oncolítico activa una infiltración inflamatoria inmune en los tumores. Todavía no se sabe si el efecto de la viroterapia es directo sobre los linfocitos o también puede actuar disminuyendo el microambiente tumoral tolerante.

Las MSCs tienen un papel bien conocido en las respuestas inmunes humanas⁷. En nuestra estrategia, MSCs no sólo pueden actuar como células portadoras sino también podrían modular las respuestas inmunes que tienen lugar después de las infusiones de Celyvir, es decir, la antiadenoviral y las respuestas inmunitarias antitumorales. Estudiamos varias moléculas que pueden tener impacto en el papel de las MSCs en la respuesta inmune. Desde nuestros ensayos de expresión génica, parece que las respuestas clínicas se alcanzaron cuando el MSCs presentaron un perfil proinflamatorio inferior (significativamente menor expresión de IFN γ y una tendencia hacia niveles inferiores de IL6, IL8, IDO y VEGF α). Además, la expresión de HLA de clase II por las mismas MSCs correlacionó con un mejor resultado clínico. No es fácil llegar a una conclusión clara con estos resultados y el hecho de que la inflamación puede favorecer el beneficio de la viroterapia. Se puede argumentar que nuestros estudios no se realizaron con las MSCs in situ, y se sabe que las MSCs modulan su perfil de genes y la expresión de las proteínas dependiendo del entorno en el que se encuentran⁸. Otro factor es el hecho de que las MSCs se irradiaron letalmente en nuestra estrategia, una manipulación que afecta profundamente la función de estas células.

Las MSCs en Celyvir expresaban una gran variedad de moléculas de adhesión celular que les permiten migrar hacia los sitios de metástasis. De todas las moléculas que hemos estudiado, 2 receptores de quimioquinas, CCR1 y CXCR1, se expresaron a niveles significativamente más elevados en los niños que respondieron al tratamiento. Para CXCR4 las diferencias eran casi significativas. En todos los casos, los niveles de los receptores de quimioquinas fueron mayores entre los que respondieron, lo que sugiere una mayor capacidad para la migración hacia los sitios donde se produce la quimiocina correspondiente. La capacidad de migración de las células fue corroborada en ensayos de migración con estímulos individuales o con una línea celular tumoral infantil, lo que demuestra la capacidad de las MSC en Celyvir para responder a los ligandos de estos receptores⁹. Se estudió también el impacto de la irradiación letal en la capacidad de migración de Celyvir, y encontramos un efecto negativo significativo. Nuestros resultados sugieren que la irradiación letal, un requisito de nuestra agencia reguladora, puede disminuir la capacidad potencial de las MSC como células portadoras en viroterapias, poniendo en peligro su rendimiento y los beneficios clínicos.

REFERENCIAS

- ¹ Recent advances in neuroblastoma. Maris JM. *N Engl J Med.* 2010 Jun 10;362(23):2202-11.
- ² Clinicaltrials.gov: Activity Study of Bevacizumab With Temozolomide ± Irinotecan for Neuroblastoma in Children (BEACON). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02308527.
- ³ Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. García-Castro J, Alemany R, Cascalló M, Martínez-Quintanilla J, Arriero Mdel M, Lassaletta A, Madero L, Ramírez M. *Cancer Gene Ther.* 2010 Jul;17(7):476-83.
- ⁴ Clinicaltrials.gov: Safety and Efficacy of Repeated Infusion of CELYVIR in Children and Adults With Metastatic and Refractory Tumors. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01844661.
- ⁵ Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME. *Clin Cancer Res.* 2011 Jul 1;17(13):4550-7.
- ⁶ Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. Zamarin D1, Holmgaard RB, Subudhi SK, Park JS, Mansour M, Palese P, Merghoub T, Wolchok JD, Allison JP. *Sci Transl Med.* 2014 Mar 5;6(226):226ra32.
- ⁷ Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005;105:2214. / Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2005;105:4120. / Li YP, Paczesny S, Lauret E, Poirault S, Bordigoni P, Mekhloufi F, Hequet O, Bertrand Y, Ou-Yang JP, Stoltz JF, Miossec P, Eljaafari A. Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J Immunol.* 2008;180:598. / Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X, Zhu X, Lu C, Liang W, Liao L, Zenke M, Zhao RC. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood.* 2009;113:46. / Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* 2008;111:1327. / Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2:34. / Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 2011;164:1. / Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, Benito A, Ocio E, Sánchez-Guijo FM, Cañizo C, San Miguel JF. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica.* 2008;93:1301.
- ⁸ Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. Bernardo ME, Fibbe WE. *Cell Stem Cell.* 2013 Oct 3;13(4):392-402.
- ⁹ Chemokines in neuroectodermal tumour progression and metastasis. Raffaghello L, Cocco C, Corrias MV, Airoidi I, Pistoia V. *Semin Cancer Biol.* 2009 Apr;19(2):97-102.