



Clínica Universidad de Navarra

ANÁLISIS DE UNA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA BASADA EN ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS MODIFICADOS E INMUNOMODULACIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE OSTEOSARCOMA INFANTIL

IPs: Ana Patiño García y Marta M. Alonso Roldán

Laboratorio de Pediatría, Dianas Terapéuticas en Tumores Infantiles.

Clínica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra

T. 948/255400 (4257) – 948/194700 (2026)

apatigar@unav.es / mmalonso@unav.es

INTRODUCCIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA:

El osteosarcoma constituye el tumor óseo más frecuente en niños y adolescentes. Está caracterizado por la producción aberrante de osteoide y por su propensión a desarrollar metástasis en más de 80% de los pacientes (Kansara et al, 2014). A pesar de los esfuerzos llevados a cabo con nuevas modalidades terapéuticas la supervivencia se mantiene en 70% en pacientes con un tumor localizado, mientras que es inferior al 30% en pacientes con enfermedad metastásica (Xing et al, 2014). Tanto las secuelas debidas a la agresividad del tratamiento asociadas con una reducción significativa de la calidad de vida como los costes sanitarios derivados agravan aún más este problema sanitario.

Desde el punto de vista del pronóstico, la presencia de metástasis y la pobre respuesta histológica a la quimioterapia neoadyuvante constituyen los dos principales factores asociados con mal curso clínico (Xing et al, 2014). Actualmente, el tratamiento estándar del osteosarcoma de alto grado se basa en la resección quirúrgica junto con la poliquimioterapia pre-y post-operatoria. Tras la quimioterapia neoadyuvante, se establece el grado de necrosis con el que se estratifica a los pacientes en buenos (>90% necrosis) y malos respondedores (≤90% necrosis) (Isakoff et al, 2015; Ando et al, 2013). El factor



más decisivo y determinante asociado con pronóstico desfavorable es la presencia de metástasis, tanto las clínicamente detectadas al diagnóstico como las recidivas tras la resección quirúrgica (Pakos et al, 2009). Sin terapia quimioadyuvante, más del 50% de los pacientes tratados sólo con cirugía desarrollan metástasis en los 6 meses siguientes y más del 80% recidivan en los 2 años tras el diagnóstico. La diseminación metastásica ocurre con frecuencia en estadios tempranos por vía hematógena en 15-30% de forma local en el esqueleto (“skip metastasis”), y en el 95% los pacientes mueren con metástasis pulmonares. Tanto éstos como los que presentan metástasis extrapulmonares, poseen un pronóstico devastador (Xing et al, 2014; Ando et al, 2013).

Las terapias basadas en el uso de adenovirus oncolíticos son **seguras y eficaces** y constituyen una aproximación completamente diferente para el tratamiento del osteosarcoma. Delta-24-RGD es un adenovirus replicativamente competente que ha mostrado eficacia en modelos animales de glioma (Alonso et al., 2007; Fueyo et al., 2003). Lo que es más, existen datos interesantes de un ensayo clínico Fase I/II llevado a cabo en MDACC (Houston, TX) y en nuestro centro (Clínica Universidad de Navarra, España) en glioblastoma multiforme (GBM) de adultos que muestra que el Delta-24-RGD puede replicarse en tumores en un período de semanas a meses, desencadenar una infiltración inmune en el tumor que no se observa con otras terapias y finalmente destruir el tumor e inducir una respuesta completa en el tumor. De igual importancia es que Delta-24-RGD tiene un muy buen perfil de seguridad, sin que se haya demostrado ningún efecto secundario a ninguna dosis. Los resultados preliminares del ensayo mostraron que la inyección intratumoral del virus producía una fase inicial de oncólisis con la consiguiente liberación de antígenos tumorales seguida de una respuesta inflamatoria tardía que finalmente resultaba en la destrucción del tumor con respuesta completa en un subgrupo de pacientes.



El principio de la inmunoterapia contra el cáncer está basada en estimular el propio sistema inmune para amplificar la respuesta humoral y citotóxica contra las células tumorales (Schuster et al, 2006). La inmunoterapia ofrece la posibilidad de desarrollar una citotoxicidad específica de tumor con menos complicaciones (Fenstermaker and Ciesielski, 2004). En este sentido, 4-1BB es un receptor coestimulador que promueve la supervivencia y expansión de células T activadas (Croft, 2003), así como la generación y mantenimiento de células T CD8+ memoria (Hendriks et al., 2005). A pesar de que 4-1BB está sobre expresado en las células CD4+ y CD8+, incluyendo las CD4+CD25+ Treg, la evidencia sugiere que, *in vivo*, 4-1BB coestimula principalmente a las CD8+ y mucho menos a las CD4+ (Wang et al., 2009). Dado que las células T CD8+ juegan un papel fundamental en la inmunidad tumoral, el potenciar la coestimulación de 4-1BB podría potenciar la respuesta inmune anti tumoral.

La capacidad intrínseca para reconocer múltiples dianas del sistema inmune del huésped, hace que el uso de este virus sea ideal para tratar tumores con un pool heterogéneo de proteínas aberrantes, como es el caso de los sarcomas. Basados en nuestros datos preliminares, consideramos que los adenovirus oncolíticos, ya sea en su conformación original o modificados para expresar el ligando 4-1BB, que, como se ha mencionado, podría potenciar la respuesta inmune y, por tanto, el efecto antitumoral, podrían ser una herramienta terapéutica interesante a considerar para algunos tipos de sarcomas.

Este proyecto plantea utilizar modelos *in vitro* con el uso de líneas tumorales derivadas de osteosarcomas primarios y metastásicos (no líneas celulares comerciales) así como modelos murinos de enfermedad con animales inmunocompetentes e inmunodeficientes. Proponemos una nueva herramienta terapéutica biológica que tiene el potencial de incrementar drásticamente el pronóstico de los niños afectados de osteosarcomas pediátricos sin que ello resulte en una toxicidad inaceptable. Más aún, de cumplirse los objetivos de nuestro proyecto, esperamos obtener datos clínicos suficientes para poder



plantear algún ensayo clínico basado en la administración local de adenovirus oncolíticos que tengan la capacidad de “despertar” al sistema inmune del paciente.

BIBLIOGRAFÍA:

- Alonso MM, Gomez-Manzano C, Jiang H, Bekele NB, Piao Y, Yung WK, Alemany R, Fueyo J. Combination of the oncolytic adenovirus ICOVIR-5 with chemotherapy provides enhanced anti-glioma effect in vivo. *Cancer Gene Ther.* 2007;14(8):756-61.
- Ando K, Heymann MF, Stresing V, Mori K, Rédini F, Heymann D. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma. *Cancers (Basel).* 2013;5(2):591-616.
- Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol.* 2003;3(8):609-20.
- Fenstermaker RA, Ciesielski MJ. Immunotherapeutic strategies for malignant glioma. *Cancer Control.* 2004;11(3):181-91
- Fueyo J, Alemany R, Gomez-Manzano C, Fuller GN, Khan A, Conrad CA, Liu TJ, Jiang H, Lemoine MG, Suzuki K, Sawaya R, Curiel DT, Yung WK, Lang FF. Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(9):652-60.
- Hendriks J, Xiao Y, Rossen JW, van der Sluijs KF, Sugamura K, Ishii N, Borst J. During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J Immunol.* 2005;175(3):1665-76.
- Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):3029-35.
- Kansara M, Teng MW, Smyth MJ, Thomas DM. Translational biology of osteosarcoma. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(11):722-35.
- Pakos EE, Nearchou AD, Grimer RJ, Koumoullis HD, Abudu A, Bramer JA, Jeys LM, Franchi A, Scoccianti G, Campanacci D, Capanna R, Aparicio J, Tabone MD, Holzer G, Abdolvahab F, Funovics P, Dominkus M, Ilhan I, Berrak SG, Patino-Garcia A, Sierrasesumaga L, San-Julian M, Garraus M, Petrilli AS, Filho RJ, Macedo CR, Alves MT, Seiwert S, Nagarajan R, Cripe TP, Ioannidis JP. Prognostic factors and outcomes for osteosarcoma: an international collaboration. *Eur J Cancer.* 2009;45(13):2367-75.



- Schuster M, Nechansky A, Kircheis R. Cancer immunotherapy. *Biotechnol J.* 2006;1(2):138-47.
- Wang C, Lin GH, McPherson AJ, Watts TH. Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunol Rev.* 2009;229(1):192-215.
- Xing D, Qasem SA, Owusu K, Zhang K, Siegal GP, Wei S. Changing prognostic factors in osteosarcoma: analysis of 381 cases from two institutions. *Hum Pathol.* 2014;45(8):1688-96.

Los **OBJETIVOS** generales del presente proyecto son los siguientes:

1. Valorar el efecto antitumoral del adenovirus Delta-24-RGD modificado para expresar la proteína ligando 4-1BB, que modula la función de las células del sistema inmunitario en un modelo de osteosarcoma pediátrico (Delta-24-ACT).

En este objetivo, modificaremos el virus Delta-24-RGD para que exprese un agonista proteico (el ligando de 4-1BB) que estimula la función de los linfocitos CD8+. Nuestra hipótesis es que, tras la infección con el nuevo adenovirus, denominado Delta-24-ACT, se replicará lisando las células tumorales. Así, 4-1BB-L estará en la membrana o liberado, activando los linfocitos infiltrantes de tumor, que están en estrecho contacto con las células tumorales. La liberación de esta proteína con el virus, estimulará directamente a la célula T, limitando así los efectos secundarios de una inyección sistémica del ligando agonista 4-1BB.

2. Evaluar el efecto antitumoral del virus Delta-24-ACT en combinación con un anticuerpo antiPDL1.

Se intentará potenciar la eficacia viral combinándolo con un anticuerpo inmunomodulador tal como un anticuerpo antiPDL1, con la idea de que esta combinación tenga una eficacia mayor.

3. Caracterizar la respuesta inmune inducida en los tratamientos de los objetivos anteriores.



En base a los resultados preliminares de pacientes tratados con Delta-24-RGD, pensamos que el efecto antitumoral generado por este virus está basado en el desarrollo de una respuesta inmune eficaz antitumoral. Por tanto, intentaremos caracterizar la respuesta inmune generada por el virus solo o en combinación con un anticuerpo antiPDL1 en modelos experimentales de osteosarcoma.

HIPÓTESIS: el desarrollo de terapias avanzadas basadas en el uso de adenovirus oncolíticos especialmente diseñados para infectar y replicarse en células tumorales y modificados para expresar el ligando 4-1BB (Delta-24-ACT) que active a los linfocitos infiltrantes de tumor podría constituir una mejoría significativa en el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes con osteosarcoma.

Nuestra hipótesis está formulada en base a la experiencia clínica del grupo así como a una importante cantidad de **DATOS PRELIMINARES** generados por nuestro equipo investigador:

- Martínez-Vélez N, Xipell E, Jauregui P, Zalacain M, Marrodan L, Zandueta C, Vera B, Urquiza L, Sierrasesúmaga L, Julián MS, Toledo G, Fueyo J, Gomez-Manzano C, Torre W, Lecanda F, Patiño-García A, Alonso MM. The oncolytic adenovirus Δ 24-RGD in combination with cisplatin exerts a potent anti-osteosarcoma activity. *J Bone Miner Res.* 2014 Oct;29(10):2287-96.
- Martínez-Vélez N, Xipell E, Vera B, Acanda de la Rocha A, Zalacain M, Marrodan L, Gonzalez-Huarriz M, Toledo G, Cascallo M, Alemany R, Patiño-García A, Alonso MM. The Oncolytic Adenovirus VCN-01 as Therapeutic Approach Against Pediatric Osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* 2015 Nov 24. pii: clincanres.1899.
- Vera B, Martínez-Vélez N, Xipell E, Acanda de la Rocha A, Patiño-García A, Saez-Castresana J, Gonzalez-Huarriz M, Cascallo M, Alemany R, Alonso MM. Characterization of the Antiglioma Effect of the Oncolytic Adenovirus VCN-01. *PLoS One.* 2016 Jan 25;11(1):e0147211.



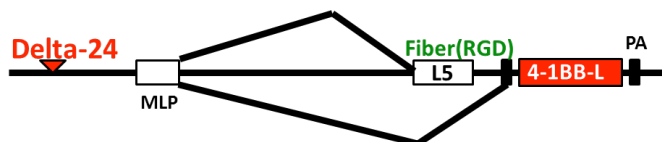
En base a nuestra experiencia preliminar con Delta-24-RGD esperamos que el proyecto que planteamos pueda demostrar que el adenovirus Delta-24-ACT (que expresa 4-1BB-L, capaz de activar los linfocitos CD8+), solo o en combinación con nivolumab, presente un potente efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Es más, esperamos que este efecto antitumoral esté mediado por una respuesta inmune eficaz contra el virus en primera instancia y que se extienda al tumor.

Finalmente, pero de mayor relevancia clínica, esperamos que este proyecto nos ponga en situación de solicitar un ensayo clínico fase I/II con el virus en sarcomas u otros tumores sólidos pediátricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBJ1. Valorar el efecto antitumoral del adenovirus Delta-24-RGD modificado para expresar la proteína ligando 4-1BB, que modula la función de las células del sistema inmunitario en un modelo de osteosarcoma pediátrico (Delta-24-ACT).

La construcción del Delta-24-ACT consiste en la modificación de la estructura



del Delta-24 clonando el ligando 4-1BB en el locus E3 del virus (ver figura superior).

Con objeto de valorar el efecto citotóxico de Delta-24-ACT, usaremos líneas celulares de osteosarcoma, tanto comerciales (143b, U2Os, Saos2,) como las desarrolladas de tejido primario de tumores metastásicos en nuestra unidad (531MII, 595M). También utilizaremos la línea K7M2 proveniente de un



sarcoma murino y que será una herramienta clave de este proyecto. Ya que nos permitirá evaluar *in vivo* el potencial inmunomodular de la estrategia propuesta en este proyecto.

Las células se platearán e infectarán con dosis progresivas de Delta-24-ACT de 0 a 100 MOIs durante 5 días y posteriormente la supervivencia se medirá mediante ensayo colorimétrico (MTT).

Se realizarán ensayos de replicación utilizando el método TCID₅₀ para determinación de la titulación viral, lo que proporcionará una idea de la potencial viral. Además, se medirá mediante Western Blot la expresión de proteínas virales E1A y Fibra y se comparará con la de osteoblastos normales.

La expresión de 4-1BB-L en el interior de la célula tras infección con Delta-24-ACT se analizará mediante PCR cuantitativa, Western blot y citometría, lo que permitirá discriminar la expresión intracelular y de membrana.

Para evaluar la expresión de 4-1BB-L *in vivo*, trataremos ratones a los que se han generado tumores intratibiales con la línea K7M2 previamente mencionadas con Delta-24-ACT intratumoral. Posteriormente extraeremos los tumores y los linfocitos infiltrantes de tumor y se medirá la presencia de Delta-24-ACT mediante Western blot.

OBJ2. Evaluar el efecto antitumoral del virus Delta-24-ACT en combinación con un anticuerpo antiPDL1.

Esperamos que este virus, Delta-24-ACT, desencadene una respuesta inmune exacerbada debida a la inflamación local debida al efecto del ligando 4-1BB. Por ello, se valorará la seguridad y el efecto del virus Delta-24-ACT, con y sin el efecto del inhibidor anti-PDL1. Al bloquear la actividad de PDL1, impediremos que las células T reconozcan y ataquen los tejidos inflamados y las células cancerosas. Por tanto, un anticuerpo antiPDL1 activa una respuesta inmune y bloquea la proteína PD-1 en las células T para que éstas ataquen a las células



tumorales. Esperamos que el efecto conjunto de los dos tratamientos tendrá un efecto antitumoral significativo.

Primeramente se realizará un estudio de escalada de dosis del virus para evaluar una posible toxicidad. Empezaremos por 10^5 pfu (N=3 animales x 2 patitas) y aumentaremos un logaritmo en cada dosis hasta llegar a 10^8 pfu. Este experimento nos dirá si el virus produce toxicidad. Utilizaremos la máxima dosis que no nos haya dado toxicidad en el siguiente experimento de eficacia. Igualmente llevaremos a cabo un experimento de toxicidad con el nivolumab para encontrar la dosis más adecuada

Se tratarán 7 animales por grupo (x 2 patitas) previo desarrollo de lesiones intratibiales por la inyección de 500.000 células de osteosarcoma: Delta-24-ACT (a determinar en el experimento anterior, intralesional) solo, nivolumab (a determinar en el experimento anterior, intraperitoneal), Delta-24-ACT + nivolumab y control (PBS).

Al final del estudio se sacrificarán los animales y se recogerán las tibias para estudio histológico y de la respuesta inflamatoria; se analizará la presencia de diferentes poblaciones: células T, NK, macrófagos y otras.

OBJ3. Caracterizar la respuesta inmune inducida en los tratamientos de los objetivos anteriores.

En este objetivo vamos a tratar de comprender y elucidar el mecanismo inmunológico subyacente el efecto antitumoral de estos tratamientos. Para realizar el seguimiento y analizar la expansión, la activación y la infiltración de células T reactivas al tumor, utilizaremos linfocitos CD8 pmel que reconocen el antígeno gp100 de melanoma (que es poco inmunogénico). A tal fin, hemos clonado el péptido gp100 en el plásmido pcDNA3.1, y hemos generado células estables K7M2-pmel. Estas líneas celulares serán implantados en la tibia y a los ratones se les transferirán linfocitos CD8 pmel adoptivos. La infiltración tumoral y la expansión de los linfocitos CD8 pmel será evaluada después del tratamiento con Delta-24-RGD, Delta-24-ACT o PBS. Los marcadores de



activación y fenotipos de memoria de la CD8 PMEL serán evaluadas por citometría de flujo, y se realizará un seguimiento durante un largo periodo de tiempo en la sangre. Se realizarán experimentos similares con las diferentes combinaciones.

Se realizaron tres sets de experimentos para demostrar que la administración de virus solo o en combinación con las diferentes estrategias induce la regresión del tumor a través de mecanismos basados en el sistema inmune.

I) Papel de las células T. Para obtener una perspectiva de los mecanismos inmunológicos que median el rechazo del tumor y confirmar aún más el papel de la respuesta inmune en el proceso de rechazo tumoral-respuesta inmune/virus se llevarán a cabo estudios de agotamiento de anticuerpos para evaluar el papel de los diversos subconjuntos inmunes en el proceso de rechazo. Ratones portadores de tumor tratados con el Delta-24-RGD o Delta-24-ACT se agotarán de linfocitos CD4 o CD8, usando anticuerpos correspondientes para determinar el papel de los helper CD4 + y subconjuntos de células T CD8 + citotóxicas en el rechazo tumoral. Además, se cuantificará por citometría de flujo la infiltración tumoral de diferentes subtipos de células T.

II) Inducción de memoria inmunológica. Probablemente una de las principales pruebas de una respuesta inmune adaptativa es la presencia de memoria inmunológica. El grado de inducción de memoria inmunológica antitumoral podría ser considerado una medida del efecto antitumoral, ya que la respuesta inmune se mantendrá contra un tumor recurrente continuamente. Los ratones que con los diferentes tratamientos rechazan el tumor serán desafiados con una dosis más alta de las células tumorales correspondientes y la falta de crecimiento del tumor indicará la presencia de memoria inmunológica antitumoral. Estos experimentos



de “rechallenge” se repetirán también con la combinación virus radio y antiPD-L1.

III) Inducción de respuesta inmune contra los antígenos tumorales.

Para determinar si la inyección intratumoral del virus solo o en combinación en los ratones portadores de tumores conduce a la estimulación de respuestas inmunes contra los antígenos tumorales, se realizaron experimentos in vitro para medir la inducción de antígenos de células T específicos de tumores después del tratamiento con Delta-24-RGD o Delta-24-ACT (o las combinaciones) por INF- γ ELISPOT mediante co-cultivo de células tumorales y las células T de ratones portadores de tumor tratados. Además, se realizarán ensayos citotóxicos de liberación de Cr para determinar el grado de las células T CD8 específicas de tumor que han sido inducidas. Estos experimentos también nos darán evidencias de “epitope-spreading” ya que la respuesta inmune in vitro se evaluará frente a las células tumorales sin adenovirus.

En resumen esperamos que los experimentos detallados en esta propuesta nos digan si el Delta-24-ACT solo o combinado con estrategias que estimulan el sistema inmune podría ser eficaz en el tratamiento de osteosarcoma, manteniendo un perfil de toxicidad aceptable. Además, nos ayudará a comprender el mecanismo de acción del virus solo o en combinación con estos tratamientos. Tenemos previsto que al final de la propuesta tengamos datos preclínicos relevantes para proponer una fase I / II con Delta-24-ACT en osteosarcoma.