



Türkiye Klinikleri

TIBBİ GENETİK

ÖZEL

Cilt / Vol : 1

Sayı / No : 2

Yıl / Year : 2016

GENOM TEKNOLOJİLERİNİN KLİNİKTE KULLANIMI ÖZEL SAYISI

Sayı Editörü: Prof.Dr. Oğuz ÖZTÜRK

- 1 Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri ve Sağlıkta Uygulama Alanları Aydan SARAÇ, Bayram YÜKSEL
- 8 Genom Analiz Teknikleri Hüseyin DEMİRCİ
- 13 Prenatal Tanıda Genomik Uygulamalar Seher BAŞARAN
- 18 Sitogenomik Mikroarrayler 2016: Standart Uygulamalar ve Yeni Yaklaşımlar Gökçe ALTAY TÖRÜNER
- 24 Genom Çağında Klinik Genetik Asuman KOPARIR
- 28 Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Genomik Uygulamalar Fatih Süheyl EZGÜ
- 37 Bağışıklık Yetmezliğine Yeni Nesil Yaklaşım Elif Sibel ASLAN
- 42 Kişiselleştirilmiş Tedavinin Önemi ve Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojilerinin Katkısı Abdullah ECE, Elif Sibel ASLAN
- 46 Doku Tiplemede Yeni Nesil Yaklaşım İbrahim PİRİM, Aslı ÖZKIZILCIK KOÇYİĞİT
- 51 Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin Adli Tıptaki Uygulamaları Kemal Murat CANTÜRK, Bilgin KÜTÜKÇÜ, Ramazan EMRE
- 57 Diyabet ve Genetik Muhammed Yunus ALP, Ahmet YEŞİLYURT
- 64 Nörogenetik Hastalıklarda Genomik Uygulamalar Adnan YÜKSEL, Asuman KOPARIR
- 69 Otizm Spektrum Bozukluğuna Genetik Yaklaşım ve Genomik Uygulamalar Erkan KOPARIR, Mahmut Cem TARAKÇIOĞLU
- 75 DNA Editing Teknolojilerinin Genetik Hastalıkların Tedavisindeki Rolü Nadir KOÇAK
- 80 FDA Onaylı İlk Onkolitik Viral Terapi Ajansı Talimogene Laherpaprepvec'in (IMLYGIC?) Öyküsü Yunus Emre EKŞİ, Salih ŞANLIOĞLU
- 90 Genç Ani Kardiyak Ölümelerde Genomik Teknolojilerin Önemi Gülay ÖZEL CAVLAK, Ayşe Begüm CEVİZ, Allison Pınar ERONAT, Hülya YILMAZ AYDOĞAN, Oğuz ÖZTÜRK

FDA Onaylı İlk Onkolitik Viral Terapi Ajanı Talimogene Laherparepvec'in (IMLYGIC™) Öyküsü

Talimogene Laherparepvec (IMLYGIC™) as
FDA Approved First Oncolytic Viral Therapy Agent

Yunus Emre EKŞİ,^a
Salih ŞANLIOĞLU^a

^aGen ve Hücre Tedavi Merkezi,
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Antalya

Yazışma Adresi/Correspondence:
Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Gen ve Hücre Tedavi Merkezi,
Antalya, TÜRKİYE
ssanlioglu@icloud.com

ÖZET Onkolitik viruslar sistemik antitümör bağışıklık indüksiyonu ve selektif tümör hücre ölümü sağlayabilen çift yönlü etki mekanizmasıyla antitümör yanıt oluşturan kanser tedavisinde yeni bir terapötik ajan sınıfını temsil eder. Bu olayın moleküler ve hücresel mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olsa da, transforme edilen hücrelerde virus replikasyonu tümör hücre ölümüne sebebiyet vererek doğal ve kazanılmış bağışıklık mekanizmalarını aktive eder. Bu etkilerin ortaya çıkmasında; kanser tipi, viral vektörün karakteristik özelliği, virusun tümörle ve konakçının bağışıklık sistemiyle interaksyonu belirleyici rol oynar. Bu bağlamda, tümör hücrelerinde selektif replikasyon yaparak antitümör bağışıklığın aktivasyonunu sağlayacak tarzda geliştirilmiş, genetiği değiştirilerek zayıflatılmış herpes simpleks virus tabanlı bir virus; BioVex firması tarafından Talimogene laherparepvec (IMLYGIC™) adıyla farklı kanser tiplerinde kullanılmak üzere onkolitik viral terapi ajanı olarak geliştirilmektedir. Nihayetinde 2015 yılının Ekim ayında, Talimogene laherparepvec (T-VEC), cerrahiyle tedavisi mümkün olmayan kutanöz, subkutanöz ve nodal lezyonlu melanom hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere ABD Gıda ve İlaç Dairesi'nce onaylanan ilk onkolitik viral terapi ilacı olarak tarihe geçmiştir.

Anahtar Kelimeler: Viral terapi; onkolitik virüsler; herpesvirus 1, insan; gen tedavisi

ABSTRACT Selective tumor cell elimination and the activation of systemic anti-tumor immunity are the two joint avenues followed by oncolytic viruses to promote anti-tumor immune response. Although the molecular and cellular mechanisms of action of this new class of therapeutic agents are unknown, it involves replication of the virus within infected cells, leading to tumor-cell death and thereby the activation of both innate and adaptive immune response. The tumor type, the characteristics of the viral vector, as well as the interaction between the virus, tumor tissue, and the host immune system determine the outcome and therefore, the success of oncolytic viral therapy. One such oncolytic agent Talimogene laherparepvec (T-VEC) developed by BioVex is a genetically modified herpes simplex virus type 1 designed for the intralesional treatment of various cancers, including but not limited to malignant melanoma. Surprisingly, in October 2015, T-VEC became the first FDA approved oncolytic viral therapy product suggested for the treatment of recurrent malignant melanoma.

Key Words: Viral therapy; oncolytic viruses; herpesvirus 1, human; gene therapy

Türkiye Klinikleri J Med Genet-Special Topics 2016;1(2):80-9

Onkolitik virüsler, sağlıklı hücelere zarar vermeden spesifik olarak tümör hücrelerini hedef alarak onları yok eden virüslerdir. Bu özellikleri ile bir çok kanser türünde etkin bir tedavi ajanı olarak kullanılmaya potansiyelleri söz konusudur. Onkolitik virüsler, kanser hücrelerinin içerdiği transgenin özelliğine göre virüs aracılı sitotoksik etki oluşturarak hücre ölüm mekanizmalarının (apoptoz, nekroz, otofaji) aktivasyonu ile veya tümör kan damarlarının yıkılması, sis-

temik anti-tümöral immunitenin uyarılması gibi dolaylı yollardan etki ederek onların ölmelerini sağlarlar.¹

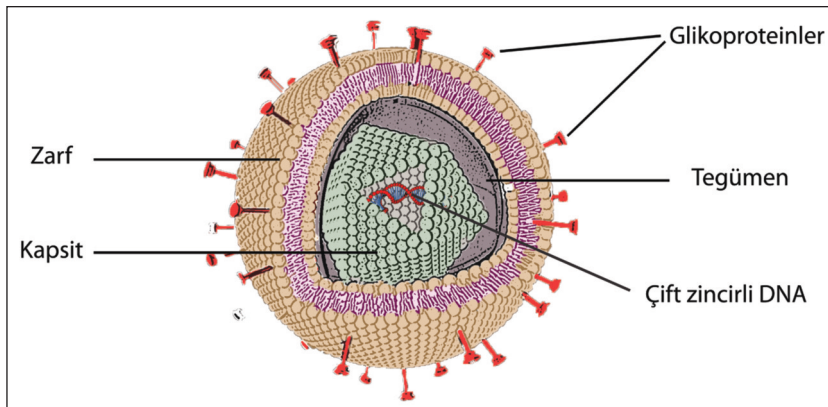
Kanser tedavisinde virüslerin kullanılması fikri ilk olarak 1950'lerde kanser hücre hatlarının ve kanser hayvan modellerinin ortaya çıkmasıyla başlamıştır. Modern manada ilk onkolitik viroterapi çalışması ise 1991 yılında nörovirulans özelliği indirgenmiş timidin kinaz negatif herpes simpleks virüs (Dlsptk) ile fare glioblastoma modeli üzerinde yapılmıştır.² Bu döneme kadar onkolitik viroterapide yabancı tip virüslerin doğal tümör öldürücü özellikleri kullanılırken bu çalışma ile ilk kez genetik olarak yapısı değiştirilmiş bir virüs anti-tümöral bir ajan olarak kullanılmıştır. Elde edilen gözle görülür başarılı sonuçlar bir çok bilim insanının dikkatini çekmiş ve bu yöndeki çalışmaların hızla artmasını sağlamıştır. Bu amaca yönelik olarak adenovirüs (AV), vesiküler somatitis virüs (VSV), herpes simpleks virüs (HSV) gibi kanser hücresi seçiciliği olmayan bir çok virüs türü genetik yapısı değiştirilerek kanser seçici hale getirilmiş, Moloney lökemi virüs, Newcastle hastalığı virüsü, reovirüs gibi kanser seçiciliği bulunan bir çok virüs türü de daha etkin ve güvenli hale getirilerek klinik çalışmalarda kullanılmıştır.²

Bu bağlamda Talimogene laherparepvec (IMLYGIC™) HSV-1 tabanlı, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. FDA) ve Avrupa Komisyonu (E.C.) tarafından onaylanan ilk onkolitik viral terapi ajanı olarak tarihe geçmiştir. Cerrahi müdahale sonrası tekrarlayan kutan, subkutan ve nodal melanoma tümörlerinin lokal tedavisi için kullanımı önerilmektedir. Bu derlemenizde

HSV'nin genel özellikleriyle beraber onkolitik bir ajan olarak tercih edilme sebebine değinip IMLYGIC'in geliştirilme ve onaylanma sürecini sizlere daha yakından aktarmaya çalışacağız.

HERPES SİMPEKS VİRÜS

Herpesvirüs ailesi (Herpesviridae) alfa, beta, gama olarak üç altgruba ayrılmıştır. Bu üç alt grupta toplamda 120'den fazla virüs tanımlanmıştır.³ Bunların içerisinde sekiz tür insan patojeni olarak yaşam döngüsünü sürdürür. Herpesvirüs ailesinin bütün üyeleri doğrusal, ikosaedral yapıda bir kapsid içerisinde paketli, çift zincirli genomik DNA'ya sahiptir. Kapsitin çevresi çeşitli proteinler içeren tegümen ile çevrilidir. Erişkin virüs partikülü (viriyon) ayrıca tegümen katmanını çevreleyen, üzerinde konak hücreye entegre olabilesini sağlayan glikoproteinleri içeren çift katmanlı bir lipid membrana sahiptir (Resim 1).⁴ Alfa herpesvirüs alt ailesi üyesi HSV-1 ve HSV-2, insanda herpesvirüs kaynaklı enfeksiyonların en sık rastlanan suçlarıdır. Her iki virüs de vücutta sadece belli bölgelerde enfeksiyona yol açarlar. HSV-1 ağız çevresinde, HSV-2 ise genital bölgede herpes (uçuk) sebep olur. Enfeksiyon hayat boyu sürer. Alfa herpes virüsler kendilerini nöronlarda gizlerler. İmmün sistemin zayıflaması sonrasında özellikle epitel doku hücrelerinde etkilerini gösterirler. Bu nedenle immün yetmezliği bulunan kişilerde, insan immün yetmezliği virüsü (HIV) enfeksiyonu bulananlarda ve yeni doğanlarda ölümcül sonuçlara neden olabilirler. Bulaşıcıdır, insanlar arası geçiş fiziksel temas yolu ile olur.⁴



RESİM 1: Herpes simpleks virüsünün yapısı. HSV-1 viriyonu dıştan içe doğru zarf, tegümen ve bir kapsitten oluşmuştur. Zarf yapısı, konak hücre yüzeyinde bulunan ve viral bağlanmayı sağlayan faktörler (heparin sülfat, nectin-1, eşlenik immünglobin benzeri tip 2 reseptör alfa (PILRα), herpes virüs invazyon sağlayıcı (HVEM), membran füzyon aktivatörleri) ile virüsün etkileşimini sağlayan glikoproteinlerle çevrilidir. Tegümen içerisinde konak hücreye girişin ardından immün yanıtı durdurularak viral genomun replikasyonu için hücrenin hazır hale getirilmesini sağlayan ICP0, ICP4, US11 gibi proteinler yer alır. En iç kısımda ise çift zincirli DNA formundaki genomu içinde bulunduran kapsit yapısı bulunmaktadır.

(Renkli hâli için Bkz. <http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/tibbi-genetik-ozel-dergisi/547/tr-index.html>).

Genetik yapı olarak HSV-1 ve HSV-2 birbirine çok benzerler. Her ikisinin genomu bir uzun özgün bölge (UL) ve bir kısa özgün bölge (US) içerir. UL ve US bölgeleri ile beraber toplamda 74 açık okuma çerçevesine (ORF) sahiptirler. Bazı kaynaklarda bu sayının 94'ü bulunduğu iddia edilmektedir.⁵ Bu 74 ORF'dan 56'sı UL bölgesi içerisinde yer alırken, 12 tanesi US bölgesindedir. Bunların dışında LRP1, LRP2, RL1/ICP34,5, LAT, enfekte hücre proteini 0 (ICP0) ve RS1 bölgeleri genomda yer alır. Konak hücreye girişin ardından viral genlerin transkripsiyonu konak hücrenin RNA polimeraz II enzimi tarafından gerçekleştirilir. Viral girişin ardından ilk olarak 'acil öncelikli genler' eksprese edilir. Bu genlerin ürünü olan proteinler viral DNA replikasyonu ve viral zarf glikoproteinlerinin sentezini sağlayan 'erken genler' ile olgun viriyon partikülünün oluşumunu sağlayan 'geç genler'in ekspresyonunu kontrol eder.⁵

ONKOLİTİK BİR AJAN OLARAK HERPES SİMPEKS VİRÜS

HSV moleküler yapısından etki mekanizmasına kadar geniş pek çok sebepten dolayı günümüzde potansiyel bir onkolitik ajan olarak değerlendirilmektedir; (i) Öncelikle patojenitesi iyi tanımlanmıştır. Bağışıklık sistemi yetkin erişkinlerde, nadir ataklar ile sınırlı lokal bir hastalığa yol açar. (ii) İstenmeyen bir enfeksiyon durumunda ya da viral toksisite gelişiminde kullanılmak üzere, acyclovir ve famciclovir gibi güvenli anti-HSV ilaçları bulunmaktadır. (iii) HSV, tek reseptöre bağlanma özelliğine sahip diğer virüslerden farklı olarak, birçok hücre tipinde eksprese edilen dört hücresel reseptörden herhangi birine bağlanarak hücre içerisine girebilmektedir. Bu nedenle geniş bir hücre tropizmasına sahiptir. (iv) HSV tarafından gerçekleştirilen litik enfeksiyon, hedef hücreleri diğer virüslerden daha hızlı öldürür. Örneğin HSV enfeksiyonu olan hücre kültürlerinde yalnızca 2 gün süresince görünür plaklar tespit edilirken, adenovirüste bu süre 7 ile 9 gün arasında değişmektedir.⁶ In vitro çalışmalar ile 0,01 MOI HSV nin kültüre edilmiş kanser hücrelerinin tamamına yakını öldürdüğü gösterilmiştir. Adenovirüsün aynı miktar hücreyi öldürmesi için daha çok virüs partikülü ve daha uzun bir süre gerekmektedir. (v) HSV ile onkolitik tedavi sırasında insersiyonel mutagenез olma riski minimaldir çünkü HSV genomu nadiren hücresel DNA içerisine entegre olur.⁶ HSV-1'in genomunun ve fonksiyonlarının daha ayrıntılı olarak çalışılmış olmasından dolayı onkolitik herpes virüslerin birçoğu HSV-1 kökenlidir.

HSV-1 viriyonu dıştan içe doğru zarf, tegümen ve bir kapsitten oluşmuştur. Zarf yapısı, konak hücre yüzeyinde bulunan ve viral bağlanmayı sağlayan faktörler (he-

parin sülfat, nektin-1, eşlenik immünglobin benzeri tip 2 reseptör alfa (PILR α), herpes virüs invazyon sağlayıcı (HVEM), membran füzyon aktivatörleri) ile virüsün etkileşimini sağlayan glikoproteinlerle çevrilidir. Tegümen ise konak hücreye girişin ardından viral genomun replikasyonu için hücrenin hazır hale getirilmesini sağlayan ICP0, ICP4, US11 gibi proteinlerle donatılmıştır.⁷ En iç kısımda ise çift zincirli DNA formundaki genomu içinde bulunduran kapsit yer almaktadır. Viral enfeksiyonu takiben kapsit DNA replikasyonu için konak hücre çekirdeğine taşınır. HSV-1 litik hücre döngüsüne sahip bir virüstür ve bu döngü birbirini takip eden üç temel basamaktan oluşur. İlk olarak α veya diğer ismiyle acil öncelikli genlerin (IE) transkripsiyonu ve translasyonu gerçekleşir. IE proteinlerinden beş tanesi (ICP0, ICP4, ICP27, ICP47), viral DNA replikasyonu ve viral zarf glikoproteinlerinin sentezini sağlayan β veya erken genler (E) ile olgun viriyon partikülünün oluşumunu sağlayan γ veya geç genlerin (L) ekspresyonunu kontrol ederken aynı zamanda doğal ve kazanılmış bağışıklığın baskılanmasını sağlarlar. IE ICP4'ün viral genom ile etkileşimini takiben E genlerinin transkripsiyonu başlar.⁷ Birçok E geni viral DNA replikasyonunda görev alır. Bununla beraber çekirdek içerisinde virüs partikülünü oluşturacak diğer yapıların da bir çoğunun oluşumunda görev alırlar. Litik döngünün son basamağı L genlerinin ekspresyonu ile olgun viriyon partiküllerinin oluşup çekirdekten hücre membranına taşınması ve yeni konak hücreleri enfekte etmek üzere hücreden salınmaları şeklinde gerçekleşir. Bu şekilde tam bir litik döngü 8 ila 24 saat arasında tamamlanır. HSV-1 aynı zamanda periferik nöronlara yerleşerek hayat boyu enfeksiyona sebep olur. HSV-1 postmitotik safhadaki hücrelerde litik döngüye girmez. Bu sebeple nöron hücrelerinde litik döngüye sebep olmaz.⁷

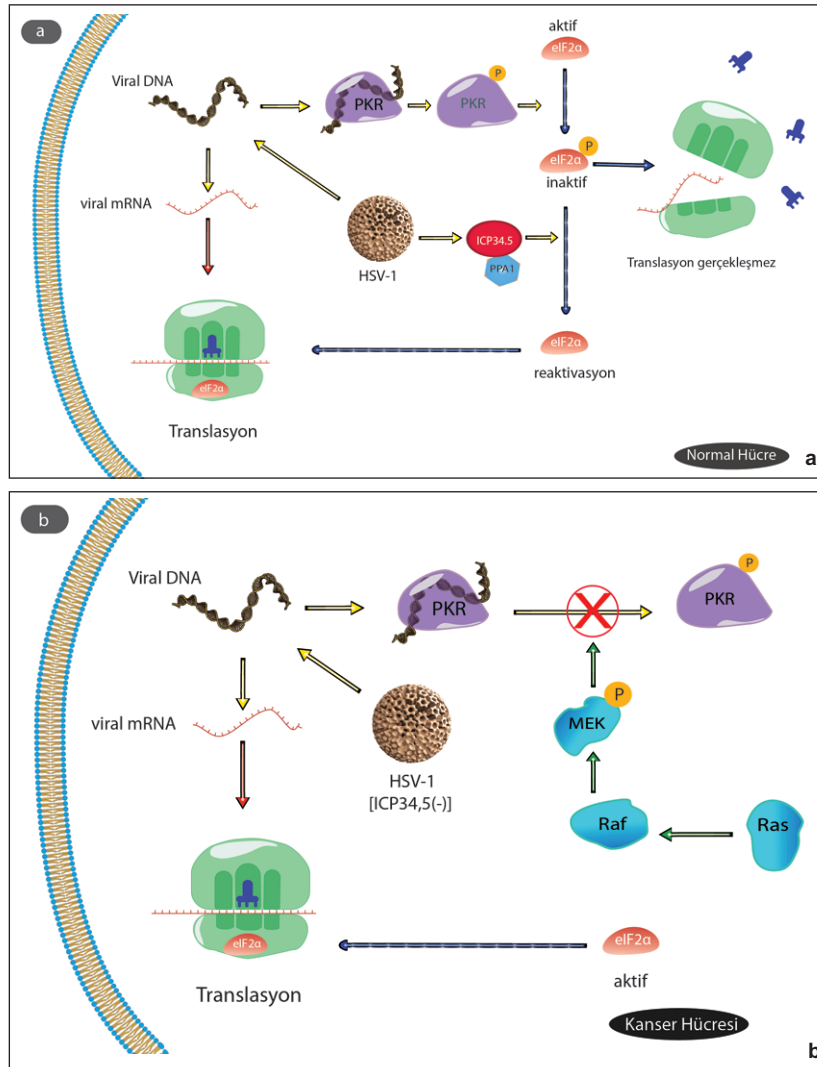
HSV-1 genomu ortalama 152 kilobaz çifti (kbç) (Genbank Referans No: X14112) uzunlukta olup yaklaşık 74 gen içerir.⁵ Diğer küçük virüslerin aksine genomunda yeni virüs partikülü oluşumu için esansiyel olmayan bir çok gen bölgesi bulunur. Bu özelliği araştırmacılara HSV-1'in, viral litik döngüsüne zarar vermeden nörovirülans özelliği ile beraber patojeniteye sebep olan genlerinin çıkarılarak onkolitik HSV-1 (oHSV-1) haline getirilmesine olanak sağlamıştır. oHSV-1 tasarlanırken sadece kanser hücrelerini hedef alması, kanser hücrelerinin kendine has özellikleri göz önüne alınarak sağlanmıştır. Kanser hücrelerinin genel bir ortak özelliği sürekli bölünmeleridir. Bu nedenle DNA replikasyonunun sürekli aktif bir şekilde gerçekleşebilmesi için zengin bir serbest nükleotid havuzuna sahiptirler. Normal hücreler ise mitoz sonrası evrede serbest nükleotid

havuzu bakımından fakirdirler. HSV-1 bu eksikliğin üstesinden gelebilmek ve postmitotik evredeki hücrelerde de replike olabilmek için bazı özelleşmiş genlere sahiptir. Bunlardan ilki E genlerinden UL23/timidin kinaz (TK) enzimidir. TK çok fonksiyonlu bir enzim olup viral DNA sentezi için öncül 5'-fosfat deoksitimidin (dTTP) oluşumunu katalize eder. Bunun yanı sıra nükleosit ve deoksitidinlerin fosforilasyonunu da sağlar. TK aktivitesinin kaybı bölünmeyen hücrelerde HSV-1 replikasyonunu baskılar.⁸ Dlsptk, birincil nesil (tek gen mutant) TK negatif HSV tabanlı ilk onkolitik virüstür. Yapılan denemelerde bu virüsün U87 glioblastoma hücrelerini seçerek öldürürken normal hücrelere zarar vermediği gözlenmiştir.² Fakat nörovirülans özelliğinin halen devam ediyor olması bu vektörün kullanımının yeterli miktarda güvenilir olmadığını göstermiştir.² Viral replikasyon için gerekli nükleotid metabolizmasının gerçekleşmesinde bir diğer önemli faktör ICP6/UL39 geni ürünü ribonükleotid redüktaz enzimidir. Ribonükleotid redüktaz, ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere (dNTP) dönüşümünü kataliz eder. HSV-1 viral genomunun sentezlenmesi için yeterli miktarda dNTP'nin ortamda bulunması gereklidir. ICP6, HSV'nin bölünmeyen hücrelerde replike olabilmesi için gereklidir.⁹ Yokluğunda virüs sadece bölünen hücrelerde çoğalabilir. Bu özellik sebebiyle ICP6 negatif (ICP6-) oHSV-1 seçici olarak bölünen hücreleri öldürebilir. Yapılan fare çalışmalarında ICP6- oHSV-1'in yabancı tip virüse oranla daha güvenli oluşu saptanmıştır.¹⁰ İnsanda epidermal ve kemik iliği progenitörleri ile aktif immun hücreler dışında bölünen hücrelere pek rastlanmaz. Bu nedenle ICP6'nın delesyonu veya inaktivasyonu sadece aktif olarak büyüyen tümörleri hedef alan güvenli bir oHSV oluşumunu sağlar. ICP6 delesyonu (ICP6Δ) oluşturulmuş rRp450 serotipi karaciğer tümörlerinin tedavisi için klinik deneme aşamasında olup halen devam etmekte olan faz 1 çalışmasının da (NCT01071941) Mayıs 2016'da tamamlanması öngörülmektedir.¹¹

HSV-1, viral döngü için gerekli ürünlerin oluşumunu sağlayan, yukarıda bir kısmının özelliklerini saydığımız özel proteinlerin yanı sıra memeli hücrelerinin viral enfeksiyonlara karşı gösterdiği antiviral immuniteye ve apoptozis gibi yeni viral partiküllerin oluşumunu engelleyecek hücresel yolların aktivasyonuna karşı da özel bir takım proteinlere sahiptir. Bunlardan ilki bir çok oHSV vektöründe delesyona uğratan, fonksiyonel birçok özelliğe sahip γ 34,5/RL1 proteinidir. γ 34,5 geni HSV-1 genomunda iki kopya halinde kalıtılır. Viral patojenitede oldukça önemli işlevlere sahip bu protein, hücresel protein fosfat 1 α (PP1 α)'yı aktive ederek hü-

resel translayon başlatma faktörü 2 α (eIF2 α)'nın hızlı defosforilasyonuna sebep olur.¹² γ 34,5 proteini olgun viriyon partikülünün tegümeninde yer alır ve hücreye girişin ardından tegümeninden ayrılarak etkisini hemen gösterir. eIF2 α , normal koşullarda hücresel translayonun başlayabilmesi için gerekli bir proteindir. Aktif formu defosforile halidir. Fosforilasyona uğradığında diğer bir translayon başlatma faktörü olan hücresel eIF2 β 'nın fonksiyon göstermesine engel olur. Bunun neticesinde metiyonin-tRNA ribozoma yüklenemez ve translayon engellenir. eIF2 α , çevresel etmenlerle veya viral DNA, çift zincirli RNA gibi patojen ilişkili moleküllerler (PAMPs) ile aktive olan bir çok kinaz (PKR, GCN2, PERK, HRI) tarafından fosforilasyona uğrar ve inaktif forma geçer.¹² PP1 α ile bağlanan, protein fosfat 1 regülatör alt ünite 15A (GADD34) aracılığı ile defosforile olarak translayon yeniden başlar. γ 34,5 proteininin C-terminal ucu GADD34 ile homologtur ve yerini alır.¹³ Bu sayede viral enfeksiyon sonrası aktif kinazlar aracılığı ile aktivitesi indirgenen eIF2 α yeniden aktif hale geçer ve viral proteinlerin ekspresyonu gerçekleşir (Şekil 2a). γ 34,5 yokluğunda HSV sağlıklı hücrelerdeki PKR aktivitesi nedeniyle replike olamaz. Tümör hücreleri, normal hücrelerin aksine hassas bir translayonel kontrol mekanizmasına veya antiviral yanıt sistemine sahip olmadıklarından γ 34,5Δ oHSV-1 virüsü tümör hücrelerinde çoğalabilir ve litik döngü tamamlanır (Şekil 2b).¹³ HSV-1'in virülans özelliğini korunmasını sağlayan bir diğer protein ICP47/US12'dir. ICP47, antijen transport proteini (TAP) kanallarını bloke ederek majör histokompatibilite kompleks I (MHCI)'e antijen yüklenmesini engeller.¹⁴ Bu sayede enfekte hücre HSV-1 spesifik CD⁸ T hücrelerinden gizlenerek viral partiküllerin oluşumu sağlanır. Fakat hücre yüzey MHCI miktarının azalması aynı zamanda doğal öldürücü (NK) hücre aktivitesine de neden olabilir.¹⁵ ICP47 proteininin TAP kanallarını bloke etmesi türler arasında farklılık göstermektedir. Örneğin HSV-1 ICP47 insan TAP kanallarını bloke ederken fare TAP kanalları üzerinde etkisi yok denecek kadar azdır.¹⁴ ICP47 birçok oHSV-1 serotipinde (G47Δ, OncoVEXGMCSF, oHSV-TRAIL, NV1034 gibi) delesyona uğratarak anti-tümöral immünitenin artırılması hedeflenmiştir.¹⁶

Araştırmacılar viral genlerin fonksiyonlarının değiştirilmesinin yanı sıra genetik mühendisliğinin getirdiği avantajlar ile aynı zamanda terapötik etki gösterebilecek proteinleri kodlayan genlerin oHSV'lere yerleştirilmesini sağlamışlardır. Klasik homolog rekombinasyon aracılı gen aktarımı yöntemlerinin yanı sıra son yıllarda bakteriyel yapay kromozomu (BAC) ve en güncel gen modifikasyon yöntemlerinden biri olan RNA



RESİM 2: Yabani tip ve ICP34.5 mutant HSV-1'in normal ve kanser hücrelerinde etki mekanizması. **(a)** HSV-1 enfeksiyonu sonrasında sağlıklı hücrelerde enfeksiyona karşı PKR aracılığı ile anti-viral yanıt oluşur. PKR, viral DNA ile karşılaştığında fosforilasyona uğrayarak aktif forma geçer. Fosforile PKR, hücresel translasyon faktörü eIF2α'yı fosforile ederek inaktivasyonuna sebep olur. Neticede eIF2α ribozom üzerindeki görevini yerine getiremez ve viral mRNA'nın translasyonu engellenir. Fakat HSV-1 sahip olduğu ICP34.5 proteini ile bu hücrel immün yanıtı kaçar. ICP34.5, viral enfeksiyon neticesinde inaktif olan eIF2α'nın, viral DNA'nın eliminasyonu sonrasında defosforilasyonu ile yeniden aktif hale geçmesini sağlayan hücrel GADD34-PP1α yapısında GADD34'ün yerini alır. Oluşan ICP34-PP1α yapısı, eIF2α'yı hızla defosforile ederek viral mRNA'nın translasyonunun gerçekleşmesini sağlar. Bu yüzden ICP34.5 geninin delesyonu HSV-1'in sağlıklı hücrelerde replikasyonunu engeller. **(b)** Kanser hücrelerinde ise düzgün işlev gösteren bir hücrel immün yanıt sistemi yoktur. Bu hücrelerde yüksek derecede aktif olan Ras-Raf-MEK yolağı etkisi ile PKR'nin fosforilasyonu engellenir. Neticede PKR inaktif formda kalır. PKR inaktif olduğundan eIF2α fosforilasyona uğramaz ve aktif formda işlevini yerine getirir. Bu yüzden HSV-1, kanser hücrelerinde ICP34.5 proteinine gerek kalmadan litik yaşam döngüsünü tamamlayabilir. eIF2α; translasyon başlatma faktörü 2 alfa, PP1α; hücrel protein fosfat 1 alfa, GADD34;protein fosfat 1 regülatör alt ünite 15A, PKR; fosfokinaz R, HSV-1; Herpes simpleks virüs 1. (Renkli hâli için Bkz. <http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/tibbi-genetik-ozel-dergisi/547/tr-index.html>).

aracılı kümelenmiş düzgün aralıklı palindromik tekrar dizileri (CRISPR) ve CRISPR ilişkili protein 9 (Cas9) sistemi (CRISPR&Cas9) kullanılarak hedef viral DNA'ya istenen teröpatik veya reporter genlerin aktarımı veya hedef viral genlerde mutasyon oluşturulması daha efektif ve kolay şekilde yapılabilmektedir.^{17,18} oHSV-1'in anti-tümöral etkinliğini arttırmak ve immün stimülatör etki göstermesini sağlamak için bir çok transgen çeşitli HSV serotiplerine aktarılmıştır. Sitozin deaminaz (CD)

insanda eksprese olmayan 5-florositozini (5-FC), 5-florourasile (5-FU) dönüştüren bir enzimdir.¹⁹ 5-FU yüksek oranda toksik bir pirimidin antimetabolitidir ve bulunduğu hücrenin ölümüne yol açar. CD 5-FU oluşumunu sağlayarak toksik etki oluşturur. Eksprese olduğu hücreyi zehirleyerek öldürdüğünden bu tip genlere 'inti har genleri' adı verilmiştir.¹⁹ HSV-1yCD ve M012, CD eksprese eden oHSV serotipleridirler. 5-FC ile hedef hücreye verildiklerinde tümör büyümesinde anlamlı oranda

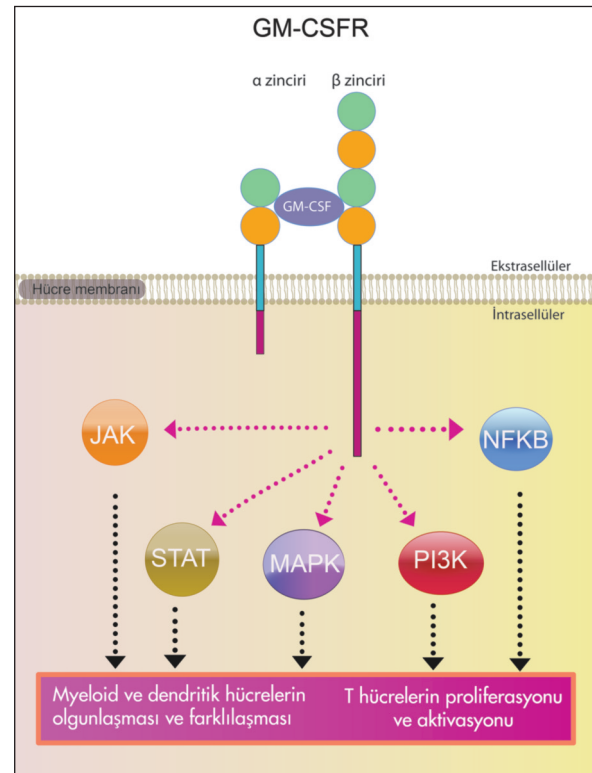
gerileme ve tümör hücre öldürme etkinliğinde yüksek oranda artış gözlenmiştir.²⁰ İntestinal karboksisteraz (CE), bakteriyel nitroredüktaz (NTR), sıçan sitokrom P450 (CYP2B1) gibi diğer bir çok intihar genleri kullanılarak birçok yeni oHSV-1 (sırasıyla MGH2, HSV1790, rRp450) vektörü oluşturulmuştur.^{21,22}

Farklı bir strateji olarak tümör mikroçevresini değiştirmek ve/veya tümör spesifik immüniteyi arttırmaya yönelik terapötik transgenler içeren oHSVler de türetilmiştir. Bir çok tümör kendine özgü bir mikroçevre oluşturarak tümör büyümesini ve çevre dokulara invazyonunu hızlandırır. Hızla gelişen tümör daha fazla besine ve oksijene ihtiyaç duyar ve bu durum yeni damarlanmalar (neovaskülarizasyon) ile karşılaşır. Neovaskülarizasyon temel olarak, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve anjiyogenik diğer faktörlerin etkisiyle gerçekleşir.²³ oHSVlerden G47Δ-mAngio, anti-anjiyogenik anjiostatin geni taşır. Yapılan çalışmalarda G47Δ-mAngio oHSV-1'in glioblastoma kök hücreleri üzerinde ve ortofik tümör oluşumlarında etkin antitümoral etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.²⁴ Onkolitik virüsler ile yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen bilgiler, etkin bir anti-tümör yanıt için transgenin ve/veya virüsün sitotoksik etkilerinin yanında tümör spesifik immün sistem aktivasyonunun da gerekli olduğunu göstermiştir. Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) hemapoietik büyüme faktörlerinden biri olup koloni uyarıcı faktörler (CSFs) ailesinin bir üyesidir.²⁵ GM-CSF, küçük, α-heliks yapıda antiparalel dört alt ünitenin yumak şeklinde katlanması ile oluşmuş, salgılanan bir sitokindir. Bu küçük sitokin miyeloid hücreleri, T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler (DC) gibi hemapoietik hücrelerin yanında endotel hücreleri, kemik iliği ve periferel doku fibroblastları, kondrositler, osteoblastlar gibi hemopoietik sistemin dışında kalan hücrelerden de salınır.^{25,26} Hatta bazı tümör hücreleri ile tümör mikroçevresinde yer alan stromal hücrelerde de sekresyonu vardır.²⁶ GM-CSF heterodimerik yapıdaki GM-CSF reseptörüne (GM-CSFR) bağlanır.²⁶ Reseptör bir düşük bağlanma afinitesine sahip α zinciri (GM-CSFRα) ile sinyal iletiminin sağlayan β zincirinden (GM-CSFRβ) oluşur. GM-CSFR aktivasyonu non-reseptör tirozin kinaz 2 (JAK2)'nin GM-CSFβ aracılı transfosforilasyonunu sağlar. Aynı zamanda GM-CSFβ zincirinin hücre içi etkin bölgesinin de fosforilasyonu gerçekleşir. Bu, sinyal iletili ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) 5 ile STAT3 proteinleri için bağlanma bölgesi oluşturur ve JAK-STAT yolağı aktive olur. JAK-STAT yolağının aktivasyonu diğer birçok alt yolağın (mitojen-aktif protein kinazlar (MAPKs), fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K)-Akt

ve nükleer faktör kapp (NFKB)) aktivasyonunu tetikler (Şekil 3).²⁶ GM-CSF kemik iliğinde ve periferel dokularda hemapoietik progenitor kök hücrelerden miyeloid hücrelerin üretimi ve farklılaşmasını sağlar. Aynı zamanda DC'lerin gelişim ve olgunlaşmasında, T hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonunda GM-CSF kilit rol oynar. GM-CSF'in DC1 popülasyonunun genişlemesine ve DC aracılı anti-tümör yanıtın artmasını sağladığı gösterilmiştir.²⁶ Bu özellikleri nedeniyle GM-CSF immün aracılı anti-tümör aktivitenin sağlanması için önemli bir proteindir.

TALİMOGENE LAHERPAREPVEC (T-VEC/ IMLYGIC™)

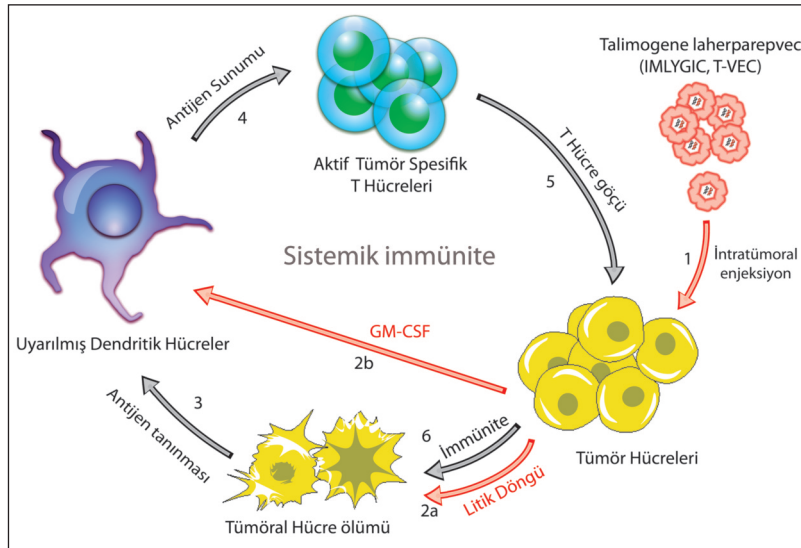
Eski adıyla "OncoVEXGM-CSF" olarak bilinen T-VEC, HSV-1'in bir klinik izolatından (JS1) Robert Coffin ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir.²⁷ Laboratuvar or-



RESİM 3: GM-CSF reseptörü yapısı ve işlevi. GM-CSF heterodimerik yapıdaki GM-CSF reseptörüne (GM-CSFR) bağlanır. Reseptör, bir düşük bağlanma afinitesine sahip α zinciri (GM-CSFRα) ile sinyal iletiminin sağlayan β zincirinden (GM-CSFRβ) oluşur. Reseptör aktivasyonu ile JAK-STAT, PI3K, MAPKs, NFKB gibi bir çok alt yolağın aktive olarak beyaz kan hücrelerinin olgunlaşması, proliferasyonu ve migrasyonu sağlanır. GM-CSF; Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör, MAPKs; mitojen-aktif protein kinazlar, PI3K; fosfatidilinositol 3 kinaz, NFKB; nükleer faktör kapp, STAT; sinyal iletili ve transkripsiyon aktivatörü protein.

Renkli hâli için Bkz.

<http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/tibbi-genetik-ozel-dergisi/547/tr-index.html>.



RESİM 4: T-VEC etki mekanizması. İntratümoral enjeksiyon ile tümör hücrelerine verilen T-VEC (1), bir yandan viral litik döngü ile tümör hücrelerini öldürürken (2a) diğer taraftan bu hücrelerden yüksek oranda GM-CSF salgılanmasını (2b) sağlar. GM-CSF, dendritik hücrelerin olgunlaşarak tümör bölgesine göçünü tetikler. Tümör antijenlerinin dendritik hücreler tarafından tanınması ile dendritik hücreler uyarılır (3) ve T hücrelerine antijen sunumu yaparak aktifleşmelerini sağlarlar (4). Aktif tümör spesifik T hücreleri tümör bölgesine yönelerek (5) tümör hücrelerinin eliminasyonunu sağlarlar (6). Aynı zamanda kazanılmış bir immün hafıza oluştuğundan sistemik olarak farklı bölgelerdeki tümör hücreleri de immün aracılı sitotoksikite ile öldürülür.

(Renkli hâli için Bkz. <http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/tibbi-genetik-ozel-dergisi/547/tr-index.html>).

tamında korunmuş bir virüs soyu yerine taze bir klinik izolatin seçilmesinin sebebi, laboratuvar pasajlarının virüsün litik kabiliyetini azaltacağını düşünülmesidir. T-VEC konstraktında γ 34,5 geninin iki kopyası da silinmiştir. ICP47 geni de silinerek yerine GM-CSF kodlayıcı dizisi yerleştirilmiştir.²⁷ Yapılan bu modifikasyonlar ile virüsün tümör hücrelerindeki litik döngü aktivitesi artırılmış, aynı zamanda içerdiği anti-tümöral immüniteyi tetikleyen transgen sayesinde de sistemik anti-tümöral bağışıklığın aktivasyonu sağlanmıştır. Bu yüzden T-VEC “onkolitik immünoterapi” sağlayan “onkolitik aşı” olarak da tanımlanmaktadır (Şekil 4). Preklinik çalışmalar, OncoVEXGM-CSF’in etkin bir şekilde tümörü küçülttüğünü ve gelişen anti-tümöral immünitenin, yeniden tümör oluşumunu engellediği göstermiştir.²⁷ Daha sonra, OncoVEXGM-CSF’i geliştirmek için kurulan ticari BioVex şirketi, bir faz 1 denemesi, bir faz 1/2 denemesi ve iki faz 2 denemesini de kapsayan klinik çalışmalara finansman desteği sağlamıştır.²⁸⁻³¹ Virüs, 4×10^8 pfu’ya kadar tekrarlayan dozlarda iyi derecede tolere edilebilmektedir. Ulaşılabilen melanoma lezyonlarına direkt enjeksiyonu, %28 oranında cevap alınmasını sağlamıştır. Cevap alınan bütün hastalarda, direkt onkolitik ve immün aracılı antitümöral etkilerinin kanıtı olarak, enjekte edilen ve edilmeyen tüm lezyonlarda gerileme görülmüştür. BioVex şirketi, 2011 yılında Amgen tarafından satın alınmış ve virüsün adı Talimo-

gene laherparepvec (T-VEC) olarak değiştirilmiştir. T-VEC’in klinik potansiyeli Faz 3 denemesinin tamamlanmasıyla daha da netlik kazanmıştır.³² Bu denemede virüs, rezekte edilemeyen IIIB ve IV evresinde melanomaya sahip 291 hastaya intralezyonel olarak enjekte edilmiştir. Subkutan GM-CSF verilen 127 hasta da kontrol grubunu oluşturmuştur. T-VEC ile i) uzun süreli cevap oranı (T-VEC: %16 , GM-CSF: %2), ii) objektif cevap oranı (%26’ya %6), iii) tam cevap oranı (%11’e %1). T-VEC ve GM-CSF verilen grup arasındaki ortalama yaşam süreleri farkı 4.4 ay olarak belirlenmiştir.³² Bu bulgular ile T-VEC, FDA Oncologic Drugs Advisory Committee (ODAC) ve Cellular, Tissue and Gene Therapies Advisory Committee (CTGTAC)’in son toplantısında 22’ye 1 olumlu oylanarak, rezekte edilemeyen ve tekrarlayan melanomaya sahip hastaların tedavisi için onay alması önerilmiştir. Nihai olarak, FDA onayı 27 Ekim 2015 tarihinde alınmıştır. 18 Aralık 2015 tarihinde de Avrupa Komisyonu tarafından da onaylanarak, Avrupa’nın 28 ülkesinde kullanımı söz konusudur. Böylelikle T-VEC, malignant hastalıklara karşı terapötik ajan olarak kullanılan ilk onkolitik virüs olma özelliğini kazanmıştır.

YAN ETKİLERİ

Malign melanomalı hastalarda intratümöral T-VEC enjeksiyonu genel olarak iyi tolere edilebilir bir profil göstermiştir. Faz III OPTIM denemesinde, T-VEC uygula-

ması yapılan hastaların tamamına yakınında (%99) belirlenen yan etkilerden en az biri gözlenmiş, subkutan GM-CSF verilen kontrol grubunda ise bu değer %95 olarak bulunmuştur. Ortalama tedavi süresi ise T-VEC için 23, GM-CSF için 10 hafta olarak belirlenmiştir. T-VEC ve GM-CSF tedavilerine bağlı ciddi (3. ve 4. derece) yan etkiler, sırasıyla hastaların %11 ve %5'inde görülmüştür.³² Ayrıca T-VEC verilen hastaların %4'ünde, GM-CSF verilenlerin ise %2'sinde hastalık progresyonu gözlemlendiğinden tedaviye devam edilememiştir. En sık rapor edilen yan etkiler (her iki grupta da $\geq$ %20) yorgunluk (T-VEC tedavisinde %50, GM-CSF tedavisinde %36), titreme (sırasıyla %49, %9), yüksek ateş (%43, %9), bulantı (%36, %20), grip benzeri hastalık (%31, %15), enjeksiyon bölgesi ağrısı (%28, %6), kusma (%21, %9), enjeksiyon bölgesi kızarıklığı (%5, %26) olarak belirlenmiştir.³² Yüksek ateş, titreme ve grip benzeri belirtiler tedavinin ilk 3 ayında daha yaygın gözlenmiştir. Daha nadir saptanan diğer yan etkiler ise vitiligo (%5, %0,8; 2. evre ya da daha düşük evrelerde) ve herpetik enfeksiyonlar olmuştur. 3. derece veya daha yüksek yan etkiler T-VEC verilenlerin %36'sında, GM-CSF verilenlerin %21'inde belirlenmiştir ($p=0,003$).³² 3. veya 4. derece yan etkiler her iki grupta da $\geq$ %1,0 olarak bulunmuştur. Bu yan etkilerin en yaygınları selülit (%2,1, %0,8), yorgunluk (%1,7, %0,8), kusma (%1,7, %0), ekstremitte ağrısı (%1,4, %0,8), solunum güçlüğü (%1,0, %1,6), enjeksiyon bölgesi ağrısı (%1,0, %0) olarak sıralanmıştır.³² Ölümcül yan etkiler ise T-VEC alan 10, GM-CSF alan ise 2 hastada görülmüştür, ancak bunların hiçbirinin tedavi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Gerek OPTIM gerekse OPTIM'in uzantısı olarak yapılan bir başka denemede, T-VEC ile 91, GM-CSF ile yapılan ortalama 100 haftalık tedavi sürecinde, en sık gözlenen yan etkiler titreme ve yüksek ateş olarak belirlenmiştir.³²

DOKU YAYILIMI

Yapılan fare deneylerinde intratümöral T-VEC uygulaması sonrasında viral DNA tümör dokusunda, kan, dalak, lenf nodları, karaciğer, kalp ve böbreklerde gözlenirken kemik iliği, göz, nazal mukoza, gözyaşı bezleri ve dışkıda rastlanmamıştır (TVEC 3). Son virüs enjeksiyonun ardından viral DNA, tümör dokusunda 84 güne kadar, kanda ise 14. güne kadar tespit edilebilmektedir (TVEC 3). Intratümöral T-VEC enjeksiyonu yapılan kutan veya subkutan metastazik malign melanoma hastalarında, 10^8 PFU/ml'ye kadar yapılan tekli veya çoklu enjeksiyon denemelerinde bu hastaların kan veya idrar örneklerinde viral DNA'ya rastlanılmamıştır. Evre IIIc ve IVM1c me-

lanoma hastalarında ilk enjeksiyonun ardından 24-72. saatler arasında alınan swap örnekleri ile 1-48. saatler arasında alınan idrar örneklerinde viral DNA'ya rastlanılmamıştır.³⁰

DEVAM EDEN KLİNİK ÇALIŞMALAR

Intratümöral T-VEC uygulaması sonrası virüsün gösterdiği doku dağılımı profilinin belirlenmesi için halihazırda yürümekte olan, evre IIIB ve IVM1c melanoma'ya sahip 61 hastayı içeren Nisan 2016'da sonuçlanması öngörülen bir klinik deneme bulunmaktadır (NCT02014 441). Bu denemede geline nokta bu hastaların %85'inin kan örneklerinde, %20'sinin de idrar örneklerinde viral DNA saptanmıştır.³³ Aynı zamanda hastaların %15'inin enjeksiyon bölgesinde enfeksiyöz virüs partiküllerinin varlığı tespit edilmiştir.³³ Mayıs 2014'te Amerika Birleşik Devletleri ve Ekim 2014'te İsviçre merkezli iki faz IIIB çalışması (sırasıyla NCT02147951, NCT022 97529) cerrahi müdahale yapılmamış, yürümekte olan herhangi bir diğer T-VEC faz çalışmalarında yer almayan evre IIIB ve IVM1c melanoma hastalarında başlatılmıştır. Bunların dışında Amgen firması tarafından açık etiketli, Şubat 2015 başlangıçlı T-VEC'in neoadjuvant terapi aracı olarak kullanılması amaçlayan faz II (NCT02211131) çalışması ile intratümöral CD⁸ hücre oranı ile toplam cevap süresi arasındaki ilişki sorusuna cevap aranan bir diğer faz II (NCT02366195; TVEC-325) çalışması devam etmektedir. Her iki çalışmanın 2018 yılında tamamlanması öngörülmektedir.³³ 2014 yılında Merck firması ortaklığı ile Amgen evre IIIB ve IVM1c melanoma hastalarında çok uluslu, doz bağımlı toksisite (faz Ib) ve toplam hayatta kalım (faz III) sorularının yanıtlarının arandığı klinik çalışmalar da (NCT02263508; MASTERKEY-265) başlatılmıştır. Bu çalışmaların bitiş zamanı 2023 olarak belirlenmiştir.³³

SONUÇ

T-VEC, ticari ismiyle IMLYGIC, genetik mühendislik yöntemleri aracılığı ile oluşturulan klinik kullanımı onaylanmış viral bir teröpatik ajan olarak, virüs aracılı gen tedavi yöntemlerinin hastalıkların tedavisindeki etkin olduğunu gösteren iyi bir çalışma örneği olmuştur. Avrupa Tıp Ajansı (EMA) onaylı ilk virüs aracılı gen tedavi ilacı olan Glybera'nın 2012 yılında Avrupa marketlerine girmesinin üzerinden çok vakit geçmeden FDA tarafından T-VEC'in onaylanması, aynı zamanda hastalıkların tedavisi noktasında sunduğu başarılı çözümler ile beraber dünyada virus aracılı gen nakline (viroterapiye) karşı olan ilginin ve güvenin

gittikçe arttığını gösterir. Virüs aracılı gen tedavisi, özellikle kanser gibi günümüzde kullanılan tedavi yöntemlerinin yeterliliğinin ve etkinliğinin tartışıldığı hastalıklarda yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle şu anki yapılan klinik denemeler göz önüne alındığında önümüzdeki yıllarda yeni birçok viral gen terapi aja-

nının marketlerde yerini alacağını artık rahatlıkla söyleyebiliriz.

Teşekkür

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK-215S820)'nun yardımlarıyla desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Russell SJ, Peng KW. Viruses as anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28(7):326-33.
- Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 2012;30(7).
- Davison AJ. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* 2002;86(1-2):69-88.
- Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* 2006;9(4):423-9.
- McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* 2006;117(1):90-104.
- Zhang SX. Turning killer into cure -- the story of oncolytic herpes simplex viruses. *Discov Med* 2015;20(111):303-9.
- Peters C, Rabkin SD. Designing herpes viruses as oncolytics. *Molecular Therapy-Oncolytics* 2015;2.
- Field HJ, Wildy P. The pathogenicity of thymidine kinase-deficient mutants of herpes simplex virus in mice. *J Hyg (Lond)* 1978;81(2):267-77.
- Asada T. Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer* 1974;34(6):1907-28.
- Kubo S, Haga K, Tamamoto A, Palmer DJ, Ng P, Okamura H, et al. Adenovirus-retrovirus hybrid vectors achieve highly enhanced tumor transduction and antitumor efficacy in vivo. *Mol Ther* 2011;19(1):76-82.
- Currier MA, Gillespie RA, Sawtell NM, Mahller YY, Stroup G, Collins MH, et al. Efficacy and safety of the oncolytic herpes simplex virus rRp450 alone and combined with cyclophosphamide. *Mol Ther* 2008;16(5):879-85.
- Breitbart CJ, Burke J, Jonker D, Stephenson J, Haas AR, Chow LQ, et al. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 2011;477(7362):99-102.
- Serganova I, Ponomarev V, Blasberg R. Human reporter genes: potential use in clinical studies. *Nucl Med Biol* 2007;34(7):791-807.
- Tomazin R, van Schoot NE, Goldsmith K, Jugovic P, Sempe P, Fruh K, et al. Herpes simplex virus type 2 ICP47 inhibits human TAP but not mouse TAP. *J Virol* 1998;72(3):2560-3.
- Huard B, Fruh K. A role for MHC class I down-regulation in NK cell lysis of herpes virus-infected cells. *Eur J Immunol* 2000;30(2):509-15.
- Power AT, Bell JC. Taming the Trojan horse: optimizing dynamic carrier cell/oncolytic virus systems for cancer biotherapy. *Gene Ther* 2008;15(10):772-9.
- Oliere S, Arguello M, Mesplede T, Tumilasci V, Nakhaei P, Stojdl D, et al. Vesicular stomatitis virus oncolysis of T lymphocytes requires cell cycle entry and translation initiation. *J Virol* 2008;82(12):5735-49.
- Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Nedeljkovic-Kurepa A, DeBenedetti A, Li XL, Odaka Y, et al. Cancer-specific targeting of a conditionally replicative adenovirus using mRNA translational control. *Breast Cancer Res Treat* 2008;108(1):43-55.
- Nakamura H, Mullen JT, Chandrasekhar S, Pawlik TM, Yoon SS, Tanabe KK. Multimodality therapy with a replication-conditional herpes simplex virus 1 mutant that expresses yeast cytosine deaminase for intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil. *Cancer Res* 2001;61(14):5447-52.
- Guffey MB, Parker JN, Luckett WS Jr, Gillespie GY, Meleth S, Whitley RJ, et al. Engineered herpes simplex virus expressing bacterial cytosine deaminase for experimental therapy of brain tumors. *Cancer Gene Ther* 2007;14(1):45-56.
- Hermiston T. Gene delivery from replication-selective viruses: arming guided missiles in the war against cancer. *J Clin Invest* 2000;105(9):1169-72.
- Tyminski E, Leroy S, Terada K, Finkelstein DM, Hyatt JL, Danks MK, et al. Brain tumor oncolysis with replication-conditional herpes simplex virus type 1 expressing the pro-drug-activating genes, CYP2B1 and secreted human intestinal carboxylesterase, in combination with cyclophosphamide and irinotecan. *Cancer Res* 2005;65(15):6850-7.
- Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med* 2013;19(10).
- Zhang W, Fulci G, Wakimoto H, Cheema TA, Buhrman JS, Jeyaretna DS, et al. Combination of oncolytic herpes simplex viruses armed with angiostatin and IL-12 enhances antitumor efficacy in human glioblastoma models. *Neoplasia* 2013;15(6):591-9.
- Kaufman HL, Ruby CE, Hughes T, Slingluff CL Jr. Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother Cancer* 2014;2:11.
- Wicks IP, Roberts AW. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12(1):37-48.
- Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C, Reay P, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther* 2003;10(4):292-303.
- Hu JC, Coffin RS, Davis CJ, Graham NJ, Groves N, Guest PJ, et al. A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 2006;12(22):6737-47.
- Harrington KJ, Hingorani M, Tanay MA, Hickey J, Bhide SA, Clarke PM, et al. Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2010;16(15):4005-15.

30. Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, Nemunaitis M, Reid T, Daniels G, et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2009;27(34):5763-71.
31. 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;17(3):718-30.
32. Andtbacka R, Kaufman H, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015.
33. Greig SL. Talimogene laherparepvec: first global approval. *Drugs* 2016;76(1):147-54.