

UNIVERSITATIS
PRAGENSIS
S. PETRI
FACULTATIS
NATURALIARUM
SCIENCIARUM
LIBERARUM ARTIARUM
ET MEDICINAE
1348 400 ANNIVERSARIA

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

VIROTERAPIE: ONKOLYTICKÉ POXVIRY

Martina Verdánová

Školitel: RNDr. Hana Španielová, PhD.

Praha
2007/ 2008

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Haně Španielové, PhD. za velkou ochotu a pečlivost při konzultování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům a sestře za opravy stylistických a gramatických chyb a za podporu během mého bakalářského studia. Poděkování si také jistě zaslouží můj přítel za technickou pomoc při zpracovávání bakalářské práce a za podporu během studia.

Abstrakt

Onkolytické viry nabízejí nový způsob léčby nádorů. Mají schopnost indukovat lysis nádorových buněk pomocí své replikace. Výhodou použití onkolytických virů je amplifikace počáteční dávky díky jejich replikaci v nádorových buňkách. Důležitá je bezpečnost viroterapie, především specifita virů k nádorovým buňkám. Té je možno dosáhnout více cestami. Pomocí genového inženýrství je možné zvýšit onkolytický potenciál mnoha konkrétních virů, mezi něž patří i někteří zástupci poxvirů. Poxviry skýtají určité výhody, například umožňují využití systémové terapie. Některé onkolytické viry se nacházejí v I. a II. fázi klinických studií. Účelem této práce je shrnutí hlavních dosud známých faktů o onkolytických virech, o konkrétním využití virů v boji proti nádorům, o jejich specifickém působení a v neposlední řadě o hlavních problémech spojených s viroterapií. V závěru práce je pozornost věnována konkrétním onkolytickým poxvirům.

Klíčová slova: onkolytické viry, poxviry, protinádorová terapie, viroterapie, nádor

Abstract

Oncolytic viruses offer a new approach in cancer therapy. They are capable of inducing lysis of cancer cells through their replication process. The advantage of using oncolytic viruses in cancer therapy is their replication in cancer cells and therefore amplification of initial dose. Safety of virotherapy is very important, especially with the respect to viral specificity for cancer cells. This may be achieved by different ways. Through the use of genetic engineering is possible to enhance the oncolytic potential of many specific viruses. Some of them belong to poxvirus family. Poxviruses have some advantages over other oncolytic viruses, e.g. they can be used in systemic therapy. Some oncolytic viruses are in phase I. or II. of clinical testing. The purpose of this work is to summarize the main facts known to date about oncolytic viruses, different use of viruses in fight against cancer, their specificity and not at least show main problems with virotherapy. Finally, the work is focused on the specific oncolytic poxviruses.

Key words: oncolytic viruses, poxviruses, cancer therapy, virotherapy, cancer

OBSAH:

1.	Úvod	5
2.	Historie onkolytických virů	5
3.	Mechanismy protinádorové účinnosti	7
3.1	Aktivace protinádorové imunity	8
3.2	Exprese toxických proteinů	9
3.3	Přirozený onkolytický potenciál	9
3.4	„Cross- protekce“ mezi virovými epitopy a nádorem	10
4.	Specifické působení onkolytických virů	10
4.1.	Transkripční mechanismus	10
4.2.	Translační mechanismus	10
4.3.	Transdukční mechanismus	11
4.4.	Anti-apoptotický mechanismus	12
5.	Problémy spojené s viroterapií	14
5.1.	Způsoby podání viru a jeho šíření do nádorových buněk	14
5.2.	Imunitní odpověď hostitele	15
5.3.	Monitorování účinku virů	18
5.4.	Bezpečnost a vedlejší účinky viroterapie	18
6.	Klinické studie s onkolytickými viry	19
7.	Onkolytické poxviry	21
7.1.	Obecná charakteristika	21
7.2.	Virus vakcínie	21
7.3.	Yaba- like disease virus	24
7.4.	Myxoma virus	24
8.	Závěr	26
9.	Seznam zkratek	27
10.	Seznam použité literatury	28

1. Úvod

Nádory jsou důležitým zdravotním problémem, který trápí celý svět. Jednou z možností léčby nádorů je genová terapie, jejíž součástí je také onkolytická viroterapie. Tento způsob léčby nádorů může být účinný především v kombinaci s jinými, konvenčními způsoby terapie jako jsou chemoterapie a radioterapie (Ries a Brandts, 2004). Onkolytické viry mají schopnost indukovat lýzu i maligních buněk pomocí své replikace (Nemunaitis, 1999). Některé viry si vybírají jako hostitelské buňky raději nádorové buňky než buňky normálních tkání proto, že maligní buňky mají specifické genetické a fyziologické rysy. Např. díky mutacím získaly nádorové buňky selektivní výhody růstu. Zároveň mají málo intracelulárních obranných mechanismů, mají sníženou antivirovou odpověď způsobenou selháním kritických komponent interferonového obranného systému. Maligní buňky mohou mít vyšší expresi virových receptorů než normální buňky a jsou tedy vnímavější k infekci. Tento terén je proto výhodný pro replikaci mnoha virů (Vähä- Koskela *et al.*, 2007).

2. Historie onkolytických virů

Již více než 200 let se využívá replikujících se virů jako živých vakcín. Asi nejznámějším příkladem a důležitým historickým milníkem je eradikace pravých neštovic. Zasadil se o ni Edward Jenner, který roku 1796 inokuloval 13- ti letému chlapci virus vakcínie. Virus získal od ženy, která byla infikována kravskými neštovicemi. O rok později byl chlapci podán virus pravých neštovic a chlapec neonemocněl. V průběhu let bylo očkováno proti pravým neštovicím několik milionů lidí a postupně došlo k eradikaci pravých neštovic (Nemunaitis, 1999).

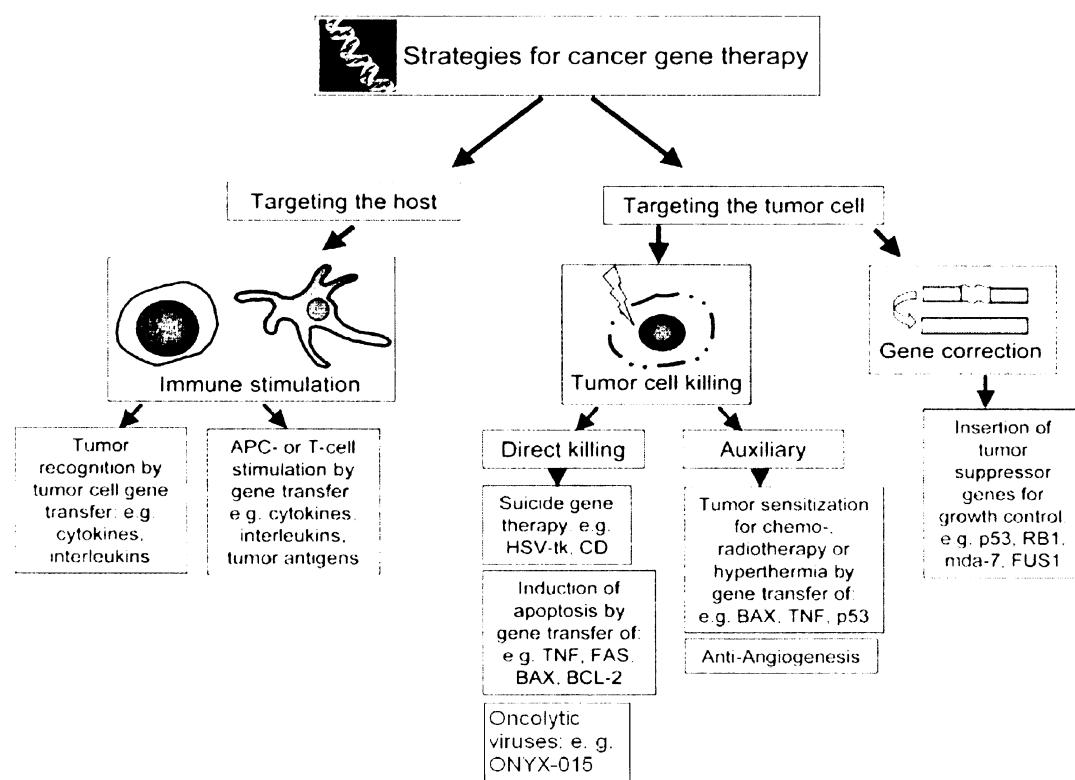
Na začátku 20. století bylo rozpoznáno, že viry mohou hrát důležitou roli při ničení nádorů. Potlačení nádorů se dařilo především u imunosuprimovaných osob, kde nedocházelo k likvidaci virů imunitním systémem. Problémem se však ukázala infekce i normálních tkání (Kelly a Russell, 2007). V roce 1922 bylo objeveno, že virus vakcínie může inhibovat nádory v myších a krysách, což je považováno za první důkaz schopnosti virů potlačovat nádory (Russell, 1994). Během 50- tých a 60- tých let 20. století bylo několik dalších virů experimentálně testováno. Například virus vztekliny byl použit k léčbě 30 pacientů s melanomem, osm z nich vykazovalo ústup nádoru (Bousser a Zittoun, 1965; citováno v Vähä- Koskela *et al.*, 2007).

Během 70- tých let 20. století mnoho vědců opustilo toto pole bádání z důvodu mnoha omezení pro aplikaci terapie pomocí onkolytických virů a s tím souvisejícího neúspěchu při léčbě (Kelly a Russell, 2007).

Ale o pár let později, v 90- tých letech 20. století, kdy se rozvíjelo genové inženýrství, tato problematika vědce opět upoutala (Russell a Peng, 2007). V Dalších letech byly testovány i jiné viry jako adenoviry, flaviviry (Egypt 101), paramyxoviry (virus příušnic), adenoviry (ONYX-015), virus Newcastelské choroby kuřat (Newcastle disease virus), virus chřipky nebo virus vakcínie (Nemunaitis, 1999). První souhlas pro tržní využití onkolytického viru (adenoviru H101 typu 5 obsahující deleci v genech E1B- 55 KD a E3) byl udělen v roce 2005 v Číně. Virus H101 je používán v kombinaci s chemoterapií k léčbě nádorů hlavy a krku. Některé další onkolytické viry jsou nyní v I. a II. fázi klinických studií (Russell a Peng, 2007).

3. Mechanismy protinádorové účinnosti

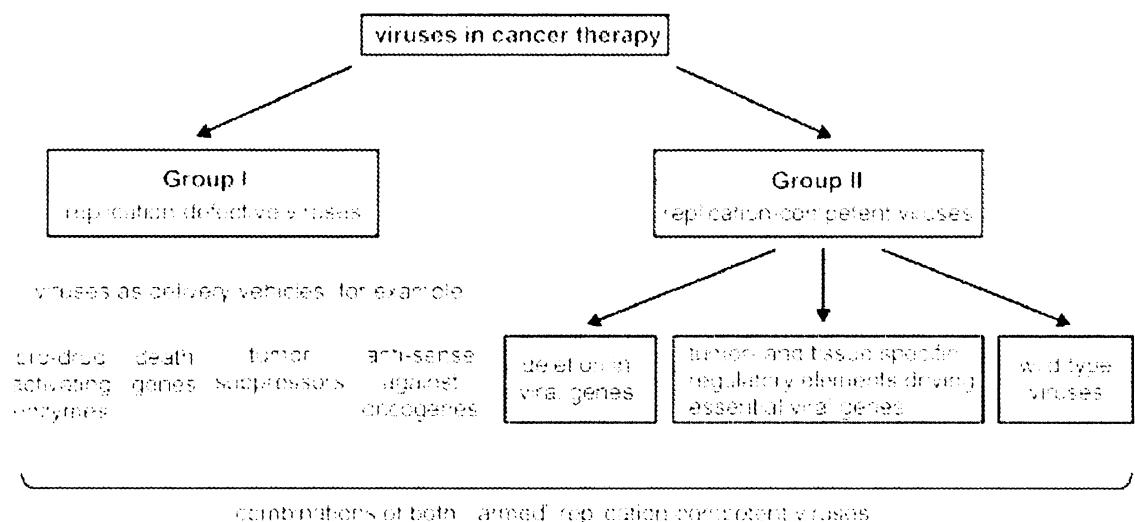
Působení onkolytických virů je jednou z cest genové terapie nádorů. Dalšími cestami genové terapie jsou například inserce nádorově supresorových genů pro kontrolu buněčného růstu do genomu nádorových buněk, indukce apoptózy přesunem genů nebo stimulace imunitního systému (Walther *et al.*, 2007). Znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1: Strategie používané v genové terapii nádorů. Jednou z možností genové terapie nádorů je působení onkolytických virů. Převzato z Walther *et al.* (2007).

Způsoby léčby nádorů pomocí virů můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin. Viry mohou být použity jako nástroje pro dopravu různých terapeutických látek a genů. K tomu se využívají viry, které jsou defektní ve své replikaci.

Druhou skupinu tvoří replikačně kompetentní viry, které mohou být geneticky upraveny tak, aby lépe dosáhly nádorově specifické replikace a následně zničení nádoru. Znázorněno na obrázku 2. Samotná replikace zvyšuje počáteční dávku a pomáhá rozšířit viry i do sousedních nádorových buněk (Biederer *et al.*, 2002).



Obrázek 2: Možnosti využití virů v nádorové terapii. Vary používané v nádorové terapii rozlišujeme dvojího typu. Jedním typem jsou viry defektní ve své replikaci, které se využívají pro dopravu různých terapeutických látek a genů do organizmu, například prekurzorů léčiv či apoptotických genů. Druhým typem jsou replikačně kompetentní viry, které mohou být upraveny ve prospěch své nádorově specifické replikace, například delecí některých virových genů či vložením nádorově nebo tkáňově specifických regulátorů řídících esenciální virové geny. Převzato z Biederer *et al.* (2002).

3.1 Aktivace protinádorové imunity

Chemoterapie nebo radioterapie často způsobuje utlumení imunitní odpovědi a tedy i snížení imunitní kontroly buněčného cyklu. Naproti tomu vniknutí onkolytického viru do organizmu a jeho replikace v nádorových buňkách může vyvolat uvolnění nádorových antigenů bez utlumení imunity hostitele. Léčba nádorů pomocí virů tedy aktivuje protinádorovou imunitu (Tagawa *et al.*, 2006). Konkrétně může být nádorově specifická imunita stimulována produkcí TAA (tumorově asociovaných antigenů) v nádorových buňkách nebo v jiných buňkách. Druhý způsob stimulace nádorově specifické imunitní odpovědi vede přes opsonizaci nádorových buněk protilátkami produkovanými virovými vektory.

Třetím způsobem je lepší rozpoznávání nádorových buněk T buňkami nebo dendritickými buňkami, čemuž by napomáhaly viry kódující imunostimulační cytokíny. (Vähä- Koskela *et al.*, 2007).

Tagawa *et al.* (2006) ve své studii ukázali, že zničení nádoru onkolytickým adenovirem, následné uvolnění nádorových antigenů, stimulace dendritických buněk pomocí Fas ligandu a CD40 ligandu a sekrece cytokínů z rodiny interleukínu 12, znamená zvýšení protinádorových efektů. Tato kombinace strategií by mohla být účinnou protinádorovou terapií. Zjistili, že pokud stimulovali expresi proteinu Fas na dendritických buňkách s Fas ligandem, nedošlo k apoptóze dendritických buněk. Zato došlo ke zvýšení antigen presentující funkce. Také prokázali, že se z aktivovaných dendritických buněk uvolňuje interleukín 12, který může navodit systémovou protinádorovou imunitu.

Také produkci jiných cytokínů, např. TNF- α (tumor necrosis factor – α), mohou některé viry stimulovat (Biederer *et al.*, 2002).

3.2 Exprese toxických proteinů

Některé viry mohou během své replikace exprimovat proteiny, které jsou toxické pro nádorové buňky, např. E3 11.6- kDa protein nebo E4ORF4 protein, oba proteiny produkuje adenoviry (Mullen *et al.*, 2002). Jiným příkladem může být protein apoptin kódovaný VP3 genem viru anémie kuřat, který není toxický pro normální buňky, ale pro nádorové ano (Maddika *et al.*, 2006). Apoptin je také schopen exprimovat onkolytický rekombinantní parvovirus, do kterého je vložen gen kódující apoptin. Tento rekombinantní parvovirus zničí i takový nádor, který je rezistentní ke standardnímu parvoviru (wild-type). K úspěšnému zničení nádoru autonomním parvovirem napomáhá jeho přirozený onkolytický potenciál (Olijslagers *et al.*, 2001).

3.3 Přirozený onkolytický potenciál

V neposlední řadě mají některé viry přirozenou schopnost být nádorově selektivní, např. reoviry, virus Newcastelské choroby kuřat (Newcastle-disease virus), virus vesikulární stomatitidy (VSV) a autonomní parvoviry. Např. syntéza reovirových proteinů je omezena fosforylací a tedy aktivací PKR („double-stranded RNA-activated protein kinases“), která se spouští přítomností časných virových transkriptů v buňce. V nádorových buňkách je často zvýšen stupeň aktivity proteinu Ras a bylo zjištěno, že aktivace PKR může být zablokována prvky hostitelské Ras signální dráhy. Virová replikace v nádorových buňkách, na rozdíl od normálních buněk, tedy může probíhat (Ries a Brandts, 2004; Strong *et al.*, 1998).

3.4 „Cross- protekce“ mezi virovými epitopy a nádorem

Mastrangelo *et al.* (2000) zjistili, že vakcinace proti chřipce snižuje riziko rozvoje melanomu.

Kölmel *et al.* (2005) ukázali, že stejně působí i vakcinace vakcíní. Výzkumníci zde zvažují roli „cross- protekce“ mezi virovými epitopy a nádorem, což znamená, že přítomnost určitého virového epitopu v organizmu udělila hostiteli ochranu před vznikem určitého nádoru.

4. Specifické působení onkolytických virů

Mechanismy, které využívají onkolytické viry pro svou selektivní replikaci v nádorových buňkách lze v zásadě rozdělit do čtyř kategorií (obr. 3). Jedná se o transkripční, translační, transdukční a anti-apoptotický mechanismus (Russell a Peng, 2007).

4.1 Transkripční mechanismus

Jedním ze způsobů jak omezit virovou replikaci pouze na nádorové buňky je rozmístění tkáňově nebo nádorově specifických promotorů před virové geny, které jsou nezbytné pro virovou replikaci (obr. 3a). Tohoto způsobu zvýšení onkolytického potenciálu se využívá u adenovirů, herpes virů a retrovirů (Russell a Peng, 2007). Nejvíce proslavené jsou v této oblasti adenoviry, konkrétně adenovirus CN706. V tomto viru byl gen E1A, který je kritický pro virovou replikaci, pod kontrolou enhanceru/promotoru prostatického specifického antigenu. Tento mutant se předně replikoval ve tkáních, kde byl vysoký stupeň exprese prostatického specifického antigenu, tedy v nádorových buňkách prostaty (Rodriguez *et al.*, 1997).

4.2 Translační mechanismus

Pokud se dostane virus do organizmu, vyvolá protivirovou imunitní odpověď. Tou je většinou produkce interferonů, které navozují protivirový stav. Úspěšné viry ale většinou tuto odpověď inhibují. V nádorových buňkách jsou často poruchy v interferonové obraně. Pokud se do normálních zdravých buněk dostane virus, který je mutován tak, že nedokáže potlačit interferonovou odpověď hostitele, uvolněný interferon z infikovaných buněk signalizuje sousedním buňkám, aby snížily hladinu proteosyntézy, což zabránil replikaci viru. Translační mechanismus účinku onkolytických virů (obr. 3b) je založen na faktu, že nádorové buňky zůstávají k viru vnímavé i přes působení interferonu, protože mají poruchy v interferonových signálních drahách. Konkrétním příkladem může být virus vesikulární stomatitidy. Virem kódovaný M (matrix) protein inhibuje syntézu a uvolňování interferonů.

Proto tedy VSV mutovaný v genu pro M protein není schopen potlačovat interferonovou odpověď organizmu. Takto mutovaný virus se replikuje pouze v nádorových buňkách (Russell a Peng, 2007; Barber, 2005; Stojdl *et al.*, 2000).

Jiný příklad translačního mechanismu ukázali Gromeier *et al.* (2000). Virus dětské obrny u 1-2% nakažených osob vyvolává neurologické komplikace. Tato neuropathogenicita viru dětské obrny závisí na buněčně specifickém IRES (internal ribosome entry site) elementu, což je část 5' netranslatované oblasti m RNA, která je schopna iniciace translace nezávisle na 5' čepičce. IRES elementy kódují buněčně specifická omezení vedoucí k virovému množení. Pokud vyměnili IRES elementy z viru dětské obrny s IRES elementy z lidského rhinoviru typu 2, tak se tato chiméra (PV1, RIPO) velice špatně množila v neuronech. Zato v gliomu se PV1 (RIPO) chiméry množily dobře. Vnímavost gliomových buněk k chiméře PV1 (RIPO) je pravděpodobně způsobena expresí receptoru viru dětské obrny, CD 155, na povrchu gliomů.

4.3 Transdukční mechanismus

Transdukční mechanismus specifického působení onkolytických virů využívá schopnosti virů vstupovat pouze do nádorových buněk (obr. 3d). V některých případech se virové vazebné proteiny přichycují přednostně na receptory, které jsou především na površích nádorových buněk. Druhou možností je umožnění vstupu viru do buňky pouze pokud je virus vystaven činnosti proteáz, které se vyskytují často v mikroprostředí nádorových buněk. Této specificity dosáhneme modifikací virových obalových proteinů. Takto mutované viry jsou méně toxicke pro normální buňky, protože se na ně nemohou přichytit a infikovat je (Russell a Peng, 2007; Ries a Brandts, 2004).

Russell *et al.*, 1993 ukázali, že lze fúzovat gen kódující jednořetězcovou protilátku s genem kódujícím virový obalový protein retrovírus a tím udělit retrovírusu předvídatelnou vazebnou specifitu. Springfield *et al.*, 2006 popsali, že virus spalniček může být aktivován proteázami produkovanými nádorovými buňkami („matrix metalloproteinases“), konkrétně proteázy aktivují obalový fúzogenní protein (F) víru spalniček. Do F proteinu mezi F1 a F2 oblast vložili sekvenci tří aminokyselin, které jsou citlivé k proteázám. V neposlední řadě Tseng *et al.*, 2004 prokázali, že vhodným adeptem na onkolytický virus je Sinbis virus, který se váže na 67- kDa vysoko afinitní lamininový receptor („high- affinity laminin receptor, LAMR), který se často vyskytuje na površích nádorových buněk. Většina LAMR receptoru na nádorových buňkách, na rozdíl od normálních buněk, není obsazena lamininem. Tím pádem se Sinbis virus přednostně váže na nádorové buňky.

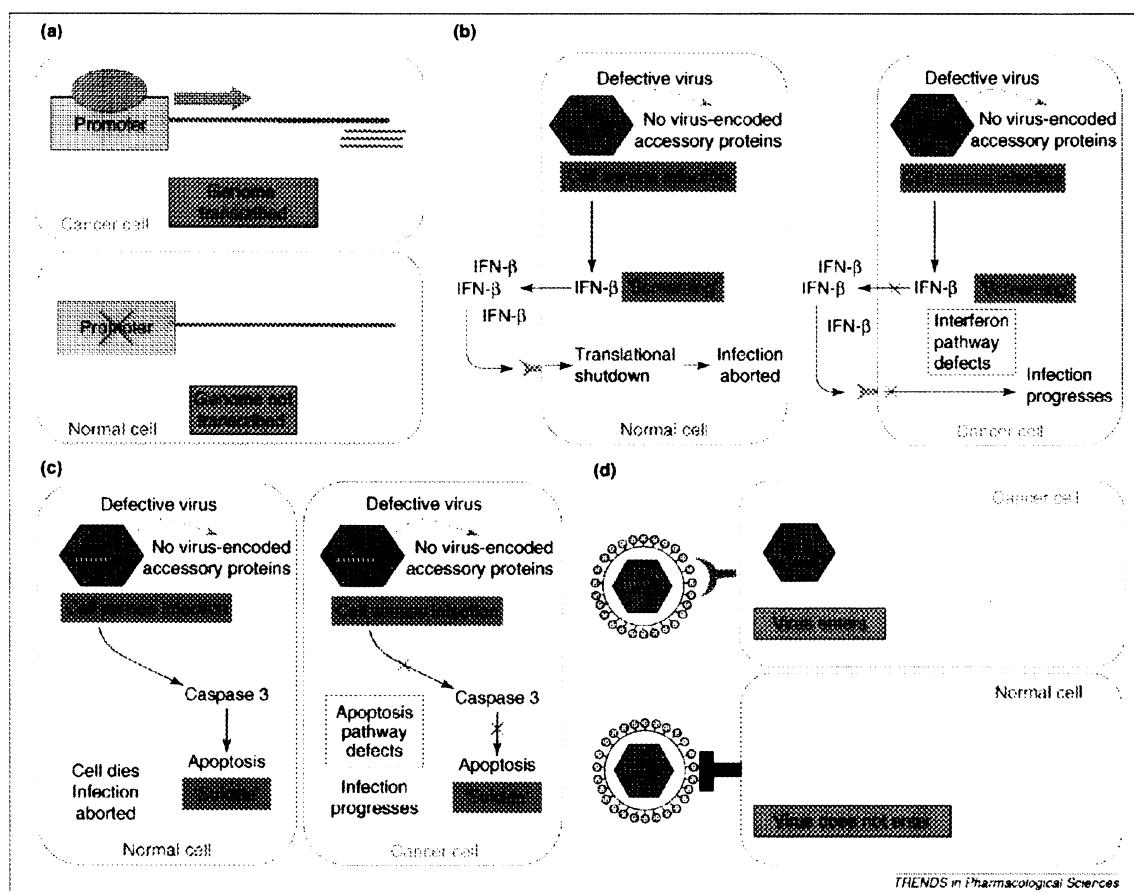
Transdukční mechanismus bývá v jiné literatuře označován také jako buněčný mechanismus (Ries a Brandts, 2004).

4.4 Anti-apoptotický mechanismus

Důležitou součástí replikační strategie mnohých virů je jejich schopnost zabráňovat v rámci protivirové buněčné obrany apoptóze infikovaných buněk.

Proto je možno upravit onkolytický virus tak, aby byly vyřazeny virové antiapoptotické proteiny (obr. 3c). Tím pádem normální infikované buňky podstoupí apoptózu ještě dříve, než se v ní virus stačí pomnožit. Nádorové buňky mají často poškozené signální dráhy vedoucí k apoptóze, proto se virus rozšíří pouze v těchto buňkách. Nádorové buňky mají nedostatky v kontrole buněčného cyklu způsobené mutacemi v proteinech p53 nebo pRb, které jsou označovány jako onkosupresory (Ries a Brandts, 2004; Mullen *et al.*, 2002; Biederer *et al.*, 2002; Russell a Peng, 2007).

Pravděpodobně nejvíce studované viry v této oblasti jsou adenoviry, konkrétně ONYX- 015, který je mutován v E1B genu, který kóduje 55 kDa protein, který se váže na p53 a tím ho inaktivuje a buňka nepodstoupí apoptózu nebo zastavení buněčného cyklu, virová replikace tedy může proběhnout. Replikace viru ONYX- 015 v normálních buňkách je tedy výrazně utlumena. ONYX- 015 se pak přednostně replikuje v nádorových buňkách, které mají často porušenu funkci p53. Vyskytla se ale jedna překážka, bylo zjištěno, že ONYX- 015 se replikuje i v nádorových buňkách, které nemají porušenu funkci p53. Tento jev byl vysvětlen objevem proteinu p14ARF, který funkčně stabilizuje p53. Pokud nádorové buňky, které obsahovaly funkční p53, ztratily p14ARF, ONYX- 015 se v nich také dobře replikoval (Mullen *et al.*, 2002).



Obrázek 3: Specifické působení onkolytických virů. (a) *Transkripční mechanismus*. Umístění virových genů nezbytných pro virovou replikaci pod kontrolu nádorově či tkáňově specifických promotorů. Toto je možné pouze u DNA virů (kromě poxvirů) a retrovírusů.

(b) *Translační mechanismus*. Virus je upravený tak, že nedokáže potlačit interferonovou odpověď hostitele, která v normálních buňkách navozuje protivirový stav. Nádorové buňky mají často poruchy v interferonových signálních drahách, proto je virus upřednostní. (c) *Anti-apoptotický mechanismus*. Virus je modifikován tak, že jsou vyrazeny antiapoptotické proteiny, které zabrání normálním infikovaným buňkám, v rámci protivirové obrany, podstoupit apoptózu. Virus se tedy rozšíří pouze v nádorových buňkách, které mají poškozené signální dráhy vedoucí k apoptóze. (d) *Transdukční mechanismus*. Víry vstupují přednostně do nádorových buněk díky specifickým receptorům. Této specifity můžeme dosáhnout modifikací virových obalových proteinů. Převzato z Russell a Peng (2007).

5. Problémy spojené s viroterapií

5.1 Způsoby podání viru a jeho šíření do nádorových buněk

Základní dvě možnosti podání viru jsou intravenózní (i. v.) a intranádorový způsob (Demers *et al.*, 2003) I. v. podání má své nevýhody v podobě zachycení viru imunitním systémem (blíže diskutováno v kapitole 5.2). Překážku systémového podání viru představuje také pohlcení většiny virových částic játry (obr. 4). Některé virové partikule však tomuto orgánu uniknou a šíří se krví (Parato *et al.*, 2005). K nádoru se viry dostanou extravazací, což je únik tekutiny mimo cévní řečiště do okolní tkáně. Extravazaci ovlivňují dva faktory, propustnost nádorových cév a velikost virové částice. Čím je propustnost cév větší a čím je velikost virové částice menší, tím lépe virus prochází stěnami cév. Větší propustnost cév je pravděpodobně na okraji nádoru. Propustnost cév můžeme zvýšit místní expresí cévního endoteliálního růstového faktoru. Další způsob napomáhající extravazaci je upravení vazebních proteinů virů tak, aby byly specifické k receptorům exprimovaným na endoteliích nádorových cév (Russell a Peng, 2007).

Demers *et al.*, 2003 prokázali, že ke stejné inhibici nádorového bujení je v případě intranádorového způsobu podání onkolytického adenoviru potřeba tisíckrát menší počáteční dávka než při intravenózním způsobu podání viru.

Bilbao *et al.*, 2000 studovali účinnost léčby nádoru jater adenovirovými vektory a zjistili, že existuje fyzická bariéra mezi krví a nádorovými buňkami. Pokud tedy vpravili adenovirový vektor do organizmu intravaskulárně, nedosáhli úspěšné léčby nádoru. Tloušťka a neprostupnost bariéry se zvyšovala s růstem nádoru. Pokud vpravili do organizmu intraarteriálně vasoaktivní látky jako histamin nebo angiotensin II, ještě předtím než do oragismu vpravili adenovirový vektor, zvýšil se přenos vektoru z krve do nádoru. Pomocí vasoaktivních látek tedy lze zmenšit některé bariéry, ale podařilo se to spíše u menších nádorů. Velmi tedy záleží také na morfologii nádoru. Na druhé straně vasoaktivní látky mohou zvýšit riziko uniknutí nádoru.

Usnadnit proniknutí viru do nádoru můžeme také podáním proteolytických enzymů jako kolagenázy nebo hyaluronidázy, které pozmění extracelulární matrix okolo nádorových buněk (Vähä- Koskela *et al.*, 2007). Fyzickou bariérou může být také nekrotická tkáň uvnitř infikovaného nádoru (Ries a Brandts, 2004) nebo tlak tekutiny obklopující buňky při překonávání endotelu cév (obr. 4) (Parato *et al.*, 2005).

Vähä- Koskela *et al.*(2007) poukázali na 3 hlavní závěry, co se týče fyzických bariér v podání a šíření viru. Za prvé, viry, které se šíří v organizmu cévním systémem, musí překonat endotel cév a další vrstvy oddělující endotel od nádorových buněk. Za druhé, pasivní bariéru tvoří také hostitelská pojivová tkán zahrnující bazální membránu a extracelulární matrix nádorových buněk (obr. 4). Za třetí, šíření viru uvnitř nádoru nebude dostatečné, pokud se virus aplikuje intranádorově pouze jednou nebo bude aplikován na vzdálené místo. Účinnější je vícenásobné dávkování nebo podání vasodilatačních látek. Efektivitu podání a šíření viru tedy ovlivňuje především velikost nádoru, ale také umístění nádoru v organizmu.

Pokud se v případě intranádorového způsobu podání viru aplikuje virus pouze na okraj nádoru, výsledkem je únik nádoru. Infekce musí projít skrz celý nádor (Vile *et al.*, 2002).

Zajímavá je nová technologie podání viru, tzv. CED (convection- enhanced delivery), které se využívá také k dodání léků do mozku. CED spočívá v podání léku nebo virus skrze malé plastikové cévky. Mohou tak být podány i látky, které jsou pro organizmus jinak příliš toxické nebo které nemohou procházet skrz bariéry mezi krví a mozkem (Ries a Brandts, 2004).

Kinetika šíření viru v nádoru závisí na typu viru. Lytické viry uvolní své potomstvo v jednom velkém „výbuchu“, naopak nelytické viry jsou plynule uvolňovány z živých buněk. Také záleží na schopnosti virového potomstva difundovat z místa vzniku ke vzdálenějším buňkám nádoru. Šíření virus kontroluje *in vivo* imunitní systém hostitele (Russell, 1994).

Aplikovat virus můžeme tedy mnoha cestami- intravenózně, intraarteriálně, intraperitoneálně, intranádorově, intralymfacytárně nebo pomocí CED. Každý způsob podání virus má své výhody a nevýhody (Varghese a Rabkin, 2002).

5.2 Imunitní odpověď hostitele

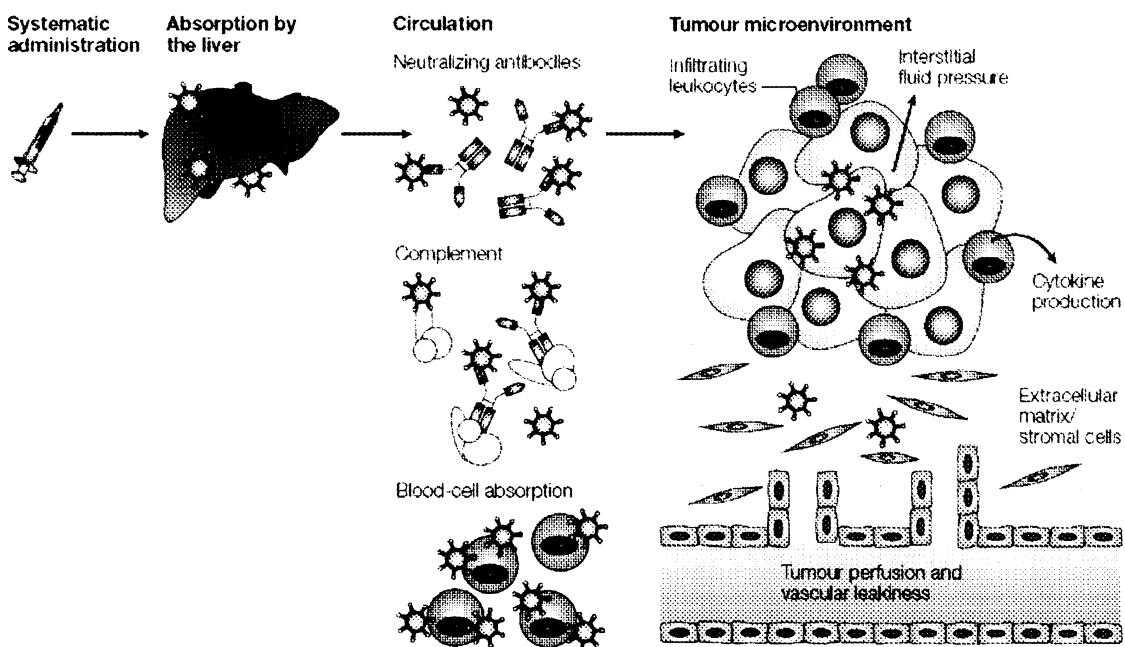
Protivirová imunita hostitele je důležitý faktor, který ovlivňuje působení onkolytických virů. Většinu virů rozpoznává imunitní systém jako cizorodé částice a eliminuje je, což není ve viroterapii žádoucí. Pokud bychom organismus imunosuprimovali, dosáhneme dvojího účinku. Zvýšíme účinnost virové replikace, ale také může dojít k oslabení protinádorových imunitních odpovědí, avšak vždy záleží na více faktorech (Vähä- Koskela *et al.*, 2007). Smakman *et al.*, 2006 studovali působení onkolytického reovirusu na rakovinu tlustého střeva a zjistili, že se účinnost léčby zvyšuje, pokud potlačili imunitní systém hostitele cyklosporínem A. Cyklosporín A brání aktivaci T- lymfocytů.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 5.1, imunitní systém hostitele hraje důležitou roli při systémovém podání viru a jeho šíření krví. Viry v krvi mohou být neutralizovány protilátkami nebo komplementem (obr. 4), mohou se navázat na receptory normálních, ne nádorových, buněk nebo mohou být pohlceny makrofágy. Takto do organizmu vpravené viry jsou tedy rychleji odstraňovány z krve (Russell a Peng, 2007). Varghese a Rabkin, 2002 poukázali na využití onkolytických herpes virů v nádorové terapii a zabývali se také překážkami v podání viru a ukázali několik způsobů, jak překážkám předcházet. Jedním ze způsobů zamezení ztrát viru je zvýšit počáteční dávku viru. Druhým způsobem je chemické obalení viru, které mu umožní být pro imunitní systém hostitele méně rozpoznatelný. Také je možné vpravit do organizmu virus společně s inhibitory komplementu nebo můžeme přechodně potlačit imunitní systém hostitele během podání a šíření viru. Todo *et al.*, 1999 ukázali riziko celkového potlačení imunitního systému hostitele kortikosteroidy při léčbě onkolytickým herpes simplex virem typu 1 (G207). To spočívá v oslabení dlouhodobé účinnosti G207 následkem potlačení nádorově specifických cytotoxických T lymfocytů. Onkolytická aktivita G207 totiž spočívá mimo jiné v indukci protinádorové imunity.

Překážce neutralizace viru protilátkami se můžeme vyhnout, pokud použijeme onkolytický virus vakcínie, konkrétně její extracelulárně obalenou formu (EEV- extracellular enveloped virus), která je rezistentní vůči neutralizujícím protilátkám (Ichihashi, 1996; Parato *et al.*, 2005). Nebo můžeme produkci neutralizujících protilátek přechodně odstranit podáním anti-CD20 protilátek proti B- lymfocytům ještě před aplikací viru. Komplement můžeme přechodně neutralizovat podáním imunosupresivní látky cyklofosfamidu (Ries a Brandts, 2004). U některých poxvirů se zdá, že poskytuje možnost systémové terapie po intravenózním podání. Jednou z možností, jak tohoto docílit, je včlenění proteinů rezistentních ke komplementu do vnější membrány poxvirů (Vile *et al.*, 2002; Vanderplasschen *et al.*, 1998). Power *et al.*, 2007 ukázali, že lze virus dopravit do místa určení uvnitř přepravních buněk, které ukryjí virový antigen před imunitním systémem hostitele. Když je virus dopraven k nádorovým buňkám, je z přepravní buňky uvolněn. Zároveň je tento způsob doručení viru šetrný k normálním buňkám. Skupina vědců ukázala, že pokud jsou přepravní buňky odvozeny od leukemických buněk, virus se může rozšířit po celém těle. Pokud vědci vícekrát intravenózně vpravili do organizmu virus v přepravních buňkách, došlo k celkovému ústupu nádoru. Jedna dávka takto podaného viru nedosáhla stejného účinku. Navíc je možné přepravní buňky upravit tak, aby exprimovaly nádorové antigeny na svém povrchu a tím stimulovaly protinádorovou imunitu.

Součástí přepravních buněk můžou být i inducibilní sebevražedné programy, která zajistí eliminaci přepravních buněk z těla po vykonání své funkce.

Na druhou stranu můžeme imunitní systém hostitele využít ve prospěch onkolytické terapie, nejčastěji pomocí cytokínů a chemokínů. Například exprese interferonu gamma (IFN- γ) z adenovirového vektoru zvyšuje onkolytickou účinnost (Su *et al.*, 2006; citováno v Vähä-Koskela *et al.*, 2007). Podobný efekt na nádor plic v králících má exprese lidského GM-CSF (granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor) z onkolytického viru vakcínie (Kim *et al.*, 2006). V neposlední řadě je dobré říci, že imunitní systém člověka není vyuvinut k odstraňování intravenózně podaného viru v dávkách vyšších než 10^{12} částic. Podobně vysoké dávky se používají v klinických studiích s onkolytickými viry (Vile *et al.*, 2002).



Obrázek 4: Některé bariéry podání a šíření onkolytických virů směrem k nádoru *in vivo*. V případě systémového podání onkolytických virů, např. intravenózního, je většina z nich pohlcena játry. Viry, které játrům uniknou, jsou šířeny krví, kde mohou být neutralizovány protilátkami, komplementem nebo pohlceny krevními buňkami. Aby se viry dostaly k nádoru musí opustit krevní oběh a překonat tlak tekutiny obklopující buňky při přechodu cévním endotelem. Další bariéru představuje extracelulární matrix. Infiltrující leukocyty omezují šíření viru mezi buňkami svou antivirovou aktivitou nebo uvolňováním cytokínů. Převzato z Parato *et al.* (2005).

5.3 Monitorování účinku virů

Monitorování účinku virů po vpravení do organizmu je důležité pro bezpečnost viroterapie, pro sledování změn v organizmu vyvolaných přítomností viru, pro rozvoj a zlepšování viroterapie. Je potřeba zmonitorovat, kolik virových částic dosáhne cíle, zda je virový genom v infikovaných buňkách exprimován, eventuelně v jaké míře, kolik virového potomstva je uvolňováno z infikovaných buněk nebo kdy je virus odstraněn z těla.

Ke studiu účinku onkolytických virů jsou vhodné neinvazivní technologie, pomocí nichž by se dala naměřit exprese virem kódovaných proteinů a zmapovat rozmístění infikovaných buněk. Jednou z možností zviditelnění genové exprese je začlenění markerových genů do virového genomu. Jedním z příkladů je rekombinantní onkolytický virus spalniček (MV-NIS), který kóduje lidský membránový iontový kanál zodpovědný za transport jódu do folikulárních buněk štítné žlázy. Buňky infikované virem MV-NIS soustřeďují radioaktivně značený jód (^{123}I a ^{124}I) z krve. Značený jód se detekuje pomocí technik SPECT (single-photon-emission computed tomography) nebo PET (positron- emission tomography). Jiným příkladem může být herpes simplex virus, který kóduje thymidin kinázu. Ta může fosforylovat a zachytit radioaktivní FIAU (2'-fluoro-2-deoxy-1-β-D-β-arabinofuranozyl-5-jodouracil) ve virem infikovaných buňkách. Viry, které exprimují gen pro thymidin kinázu pak můžeme opět detektovat pomocí SPECT nebo PET (Russell a Peng, 2007).

5.4 Bezpečnost a vedlejší účinky viroterapie

Vpravení živých virů do organizmu může přinášet i nepříjemné následky a komplikace. Pokud se virus dostane do organizmu ve větších dávkách, může vyvolat nechtěné vedlejší účinky (Vähä- Koskela *et al.*, 2007). Proto se při klinických studiích musí v první radě sledovat bezpečnost viroterapie. Toxicita onkolytických virů závisí na druhu použitého viru, mutacích a změnách, které jsou do viru zabudovány a na cestě a dávce podání viru. Na druhé straně onkolytické viry mohou být méně toxické než běžná chemoterapeutika. Onkolytické adenoviry aplikované intravenózně v dávkách 10^{12} částic přechodně vyvolaly zánět jater a druhotně rozptýlené intravaskulární sraženiny (DIC- disseminated intravascular coagulation) (Kirk a Warren, 2002; Reid *et al.*, 2001; citováno v Vile *et al.*, 2002). To, že se při viroterapii musí důsledně dbát na bezpečnost, dokazuje smrt pacienta v důsledku DIC a selhání jater po intraarteriální infúzi adenoviru, defektního ve své replikaci, do jater. Tento pacient neměl nádor. Pokud se však pomocí intraarteriálně vpraveného adenoviru léčili pacienti s nádorem, byl virus tolerován dobře (Vile *et al.*, 2002).

Léčba pomocí vysokých dávek viru může způsobit vyčerpání cytotoxických T lymfocytů nebo interferonů. Tomuto problému můžeme zabránit opakovaným dávkováním onkolytických virů. Vedlejší efekty se mohou objevit i při kombinované terapii, kde více složek léčby může současně působit toxicky (Vähä- Koskela *et al.*, 2007).

V neposlední řadě zůstává otázkou, jaké by způsobila následky rekombinace upraveného onkolytického viru s odpovídajícím standardním virem v populaci. Zajisté je vhodné omezit pacientův kontakt s okolím izolací, dokud virus nebude v těle delší dobu detekován (Vile *et al.*, 2002).

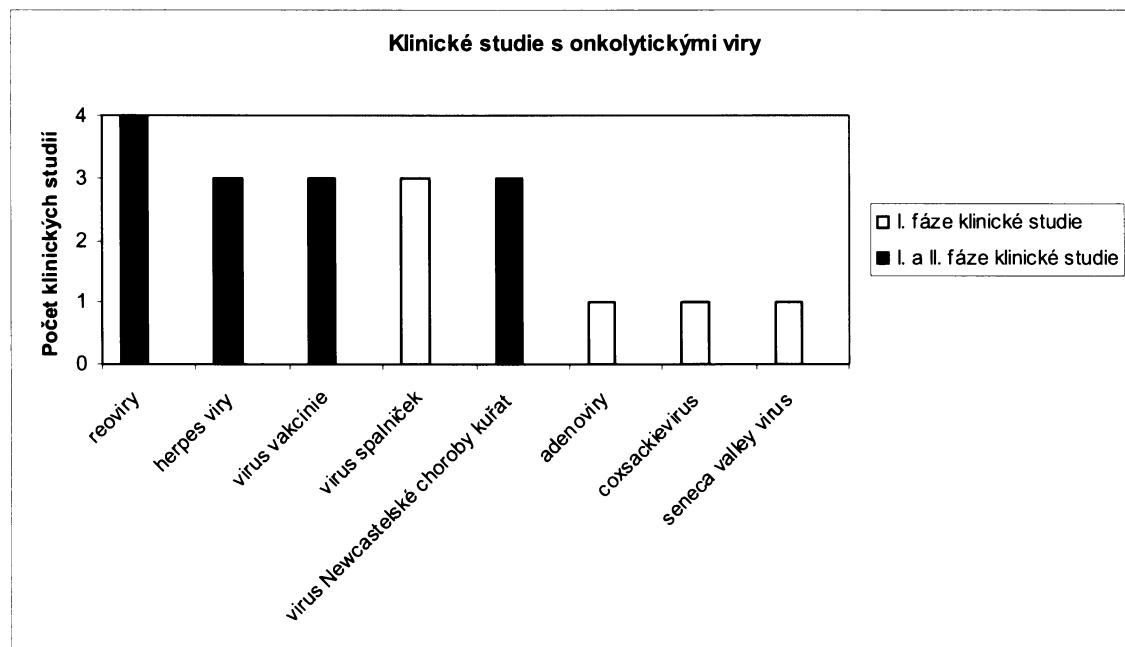
6. Klinické studie s onkolytickými viry

Než je možné přistoupit ke klinickým studiím, je nutné udělat mnoho preklinických testů a nashromáždit mnoho údajů o budoucí léčbě. Příkladem mohou být testy na relevantním zvířecím modelu, zjištění spektra nemocí, které způsobuje příslušný druh viru, schopnosti viru uniknout imunitnímu systému hostitele, zjištění stupně pre-existující imunity k příslušnému viru v populaci a mnoho dalšího.

Klinická studie je plánovaný výzkum, jehož se účastní nemocní a ve kterém probíhá zkoušení nových léčebných postupů (http://www.myeloma.cz/sources/CZ_Klin_studie.pdf).

Klinické studie se dělí do čtyř fází. Fáze I je charakterizována prvním podáním látky malému počtu lidským subjektů, nemá terapeutický cíl a za cíle si klade sledování tolerance léku, farmakokinetiky (distribuce a exkrece léku, jeho biologický poločas, možná akumulace léku) a farmakodynamiky (vztah dávka a odpověď organizmu). Ve fázi II dochází k prvnímu terapeutickému podání léku, optimalizuje se dávkovací režim pro III. fázi a sleduje se odpověď na dávku. Ve III. fázi klinické studie je lék podán velké skupině lidí (1000-3000), potvrdí se efektivita léku, stanoví se profil bezpečnosti léku, dochází ke srovnání s běžně využívanými léky, doplní se všechny informace a instrukce pro bezpečné použití léku. Ve IV. fázi se lék testuje v podmínkách běžné lékařské praxe, zda lze použít v kombinaci s jinými léčivy, shrnou se dodatečné informace zahrnující výhody a nevýhody léku a jeho optimální použití (http://pavouk.fnhk.cz/nove/cze/original/etickakomise/Tabulka_pojmu.pdf a <http://clinicaltrials.gov/ct2/info/understand>).

Od roku 2001 do současné doby (duben 2008) proběhlo nebo probíhá 19 studií s onkolytickými viry. Nejvíce zastoupené jsou reoviry (probíhají 4 z 19 studií). Tři klinické studie probíhají s herpes viry, virem vakcínie a virem spalniček. Nejméně testované v této době jsou adenoviry, virus Newcastelské choroby kuřat, coxsackievirus a seneca valley virus (picornavirus). Všechny tyto klinické studie se nacházejí v I. či II. fázi (graf 1). Nejvíce klinických studií s onkolytickými viry probíhá s pacienty, kteří trpí melanomem. Většina těchto klinických studií probíhá v USA, dále pak v Koreji, Austrálii a Izraeli (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=oncolytic>). Adenoviry byly však hodně testovány v minulosti, například ONYX- 015 úspěšně prošel II. fází klinických studií, ale testování bylo zastaveno výrobcem. Také adenoviry CV706 a CV787 byly testovány ve II. fázi klinických studií (Shen a Post, 2007).



Graf 1: Přehled klinických studií s onkolytickými viry, které proběhly nebo probíhají od roku 2001 do současné doby. V současné době probíhá nejvíce onkolytických klinických studií s reoviry. Všechny dosud známé klinické studie s onkolytickými viry se nacházejí v I. nebo II. fázi. Graf sestaven podle: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=oncolytic>.

7. Onkolytické poxviry

7.1 Obecná charakteristika

Poxviry patří mezi obalené DNA viry. Jejich genomem je lineární dsDNA o velikosti 130-280 kbp. Řadí se k největším virům, dosahují délky 300nm (Vähä- Koskela *et al.*, 2007; Russell a Peng, 2007; Parato *et al.*, 2005).

Jako onkolytický poxvirus se nejčastěji využívá virus vakcínie. Slibně vypadají i další dva zástupci poxvirů- Myxoma virus a Yaba- like disease virus. Mezi hlavní výhody viru vakcínie, potažmo poxvirů, patří poměrně rychlý životní cyklus, zralé potomstvo je utváreno 6 hodin po infekci. Dokáží se efektivně šířit od jedné buňky ke druhé. Poxviry mají obrovský genom, dokáží pojmit přes 25kb vložené DNA, aniž by musela být část jejich genomu vypuštěna. Mezi další výhody viru vakcínie patří schopnost infikovat mnoho typů lidských tkání, přesto nezpůsobuje žádnou dosud známou lidskou chorobu. Podání viru vakcínie vyvolává protivirovou imunitní odpověď, čehož může být využito ke zvýšení hostitelské imunitní odpovědi proti infikovaným nádorovým buňkám (Mullen *et al.*, 2002; Nemunaitis, 1999). V neposlední řadě je výhodou také široké množství znalostí o poxvirech a zkušenosti s vakcinačním programem proti pravým neštovicím (Zeh a Bartlett, 2002).

7.2 Virus vakcínie

Virus vakcínie patří mezi Otrhopoxviry. Přesný původ tohoto viru není znám, stejně jako jeho přírodní hostitel. Uvažuje se, že mohl vzniknout mutací ve viru kravských neštovic nebo mutací ve viru pravých neštovic. Rozeznáváme dvě formy viru vakcínie: extracelulárně obalenou formu (EEV- extracellular enveloped virus) a formu viru, který zraje uvnitř buňky (IMV- intracellular mature virus). EEV je uvolňován z buňky fúzí membrán a může se šířit od buňky k buňce, IMV je uvolňován po lysisi buňky a je produkován v laboratorních podmínkách. Virus vakcínie, stejně jako ostatní poxviry, se vyskytuje celý svůj životní cyklus v cytoplasmě a nikdy nebyla zaznamenána integrace do genomu hostitele. Nepochybou výhodou viru vakcínie je schopnost uniknout imunitnímu systému hostitele, např. jeho EEV forma, která je rezistentní vůči neutralizujícím protilátkám (viz kapitola 5.2). Virus vakcínie také kóduje faktory, cytokíny které jsou schopné narušit imunitní odpovědi hostitele (Zeh a Bartlett, 2002).

McCart *et al.*, 2001 ukázali, že je možná systémová léčba nádorů pomocí mutovaného viru vakcínie, konkrétně mutace znamenala ztrátu genu pro thymidin kinázu (TK) a pro růstový faktor vakcínie (VGF, vaccinia growth factor).

Tento mutant vykazoval významné oslabení v nedělících se buňkách *in vitro* a nádorově specifickou replikaci *in vivo*. V nepřítomnosti TK, virus vyžaduje TTP (thymidin-tri-fosfát) pro syntézu své DNA z dělících se buněk. Proto se přednostně replikuje v dělících se buňkách, což vysvětluje upřednostnění replikace v nádorových buňkách. VGF je protein působící na buňky okolo virové infekce, stimuluje je k dělení. Delece genu pro tento faktor způsobí snížení virové replikace v nedělících se buňkách. Standardní forma vakcínie (wild-type) způsobuje místní destrukci tkáně (nekrozám).

McCart *et al.*, 2000 ukázali, že pokud do léčby nádoru zahrneme virus vakcínie s delecí genu pro TK, který bude exprimovat cytozin deaminázu (mění 5- fluorocytosin na 5- fluorouracil), zvýší se protinádorový efekt při nízkých dávkách viru podaného intranádorově a při vysokých dávkách viru se sníží patogenita viru. 5- fluorouracil inhibuje syntézu DNA. Skupina vědců tedy demonstrovala, že pokud spojíme nádorovou terapii pomocí onkolytického viru s léčbou pomocí chemických sloučenin (tzv. „enzyme/prodrug system“), můžeme dosáhnout slabnějšího výsledku, než pokud bychom tyto dva typy léčení nádorů využívali samostatně.

Virus vakcínie můžeme také použít jako vektor pro dopravu a expresi nádorových antigenů a cytokínů. Například pro *in situ* transfekci nádoru virem s cytokínem podporující protinádorovou imunitu nebo viry s kostimulačními antigeny (Mastrangelo, M. J. a Lattime, E. C., 2002).

Guo *et al.*, 2005 prokázali schopnost mutantů viru vakcínie, kterým chyběly antiapoptotické geny SPI-1 a SPI-2 (vSP), replikovat se přednostně v nádorových buňkách. Toto specifické působení onkolytického viru vakcínie bychom mohli zařadit mezi anti-apoptotický mechanismus působení onkolytických virů (viz kapitola 4.4). Nádorové buňky jsou schopné uniknout apoptóze, protože mají často poškozeny signální dráhy vedoucí k apoptóze. Proto normální buňky infikované mutovaným virem vakcínie vSP, který neobsahuje antiapoptotické geny, umírají rychleji než infikované nádorové buňky a tím pádem v nich nedojde k virové replikaci. Virus tedy upřednostní replikaci v nádorových buňkách. Bezpečnost vSP se zdá být dobrá, myši léčené vSP přežívaly podstatně déle než myši léčené standardním virem vakcínie (wild-type).

Lee *et al.*, 1994 pracovali s rekombinantním virem vakcínie, který exprimoval hemaglutinin nebo nukleoproteinové antigeny z viru chřipky. Tímto virem infikovali myši s nádorem močového měchýře a ukázali, že intravesikulární podání tohoto rekombinantního viru vyvolává protinádorové imunitní odpovědi. Prokázali také, že preimunita k viru vakcínie nebrání intravesikulárnímu podání rekombinantního viru vakcínie.

Další geneticky upravený virus vakcínie JX-594 je nyní v I. a II. fázích klinických studií.

Virus JX-594 je mutovaný virus vakcínie, který nemá TK a exprimuje lidský granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor (hGM- CSF). Kim *et al.*, 2006 sledovali působení JX-594. Intravenózně ho podali dvěma zvířecím modelům- králíkovi s nádorem plic a potkanovi s nádorem jater. JX-594 byl po podání dobře tolerován a vykazoval vysokou účinnost proti nádorům v obou modelech. Replikace a exprese viru v nádorových buňkách byla detekována stupněm exprese hGM-CSF.

Mastrangelo *et al.*, 1999 publikovali závěry z léčby 7 pacientů s nevyléčitelným kožním melanomem. Pacientům intranádorově aplikovali vzrůstající dávky viru vakcínie, který kódoval GM- CSF. Systémová toxicita nebyla vysoká, projevovala se mírnými příznaky chřipky, které ustoupily do 24 hodin. Při vyšších dávkách viru byl zaznamenán místní zánět s tvorbou puchýrků. Funkce exprese genu pro GM- CSF byla zachována i přes přítomnost protilátek proti viru vakcínie. GM- CSF podporuje proliferaci a diferenciaci progenitorových buněk granulocytů a makrofágů a působí tedy stimulačně na imunitní systém hostitele. U dvou pacientů s největším nádorem nedošlo ke zlepšení.

Tři pacienti dosáhli smíšené odpovědi, došlo k ústupu léčených a neléčených kožních metastáz a postupu nemoci jinam. U jednoho pacienta došlo k částečnému ústupu nádoru. Poslední pacient, který měl kožní metastázy pouze na pokožce hlavy, dosáhl celkové remise.

V současné době probíhají nebo se plánují 4 klinické studie s virem JX-594 v I. a II. fázích.

I. fáze jedné klinické studie je již ukončena. Konkrétně se zabývala studiem bezpečnosti a účinnosti transdermální aplikace viru JX-594 do nádoru jater (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=JX-594>).

Další možností je zapojit do léčby nádoru i neonkolytický fowlpox, který patří do rodiny poxvirů. Jeho přirozeným hostitelem jsou ptáci. Vakcína PANVAC může obsahovat rekombinantní virus vakcínie nebo rekombinantní virus fowlpox. Součástí vakcinačního programu PANVAC- VF je podkožní aplikace rekombinantního viru vakcínie a poté udržovací dávka (tzv. „booster“) rekombinantního viru fowlpox. Oba vektory jsou upraveny tak, aby exprimovaly transgeny nádorově specifických antigenů. Vektory také mohou obsahovat transgeny exprimující trojici kostimulačních molekul T- lymfocytů (TRICOM). Účelem vakcinace pomocí PANVAC je stimulace imunitních odpovědí proti nádorovým buňkám. Preklinické studie dokazují účinnost vakcíny *in vitro* a v myších modelech (Madan *et al.*, 2007; Petrilio a Kaufman, 2006). V současné době probíhá III. fáze klinické studie s vakcínou PANVACTM- VF (<http://www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00088660>).

7.3 Yaba- like disease virus

Yaba- like disease virus (YLDV) patří mezi yatapoxviry spolu s Yaba monkey tumor virem (YMTV) a s Tanapox virem. Byl izolován z epizootické infekce hlídačů opic. YLDV je blízce příbuzný s Tanapox virem. YLDV může být použit jako vektor pro nádorovou terapii. Díky dřívější vakcinaci proti viru pravých neštovic má většina pacientů starších 35 let v těle protilátky proti viru vakcíně, které se v organizmu udrží i 50 let. YLDV nevykazuje „cross“ reakci s protilátkami proti viru vakcíně. YLDV roste *in vitro* v buňkách opic a lidí v podobných podmírkách jako virus vakcíně. RNA polymeráza YLDV rozpoznává přírodní a uměle vyrobené promotory, které jsou primárně vytvořeny pro využití ve viru vakcíně.

Transgeny přenášené YLDV tedy mohou být regulovány syntetickými promotory viru vakcíně a mohou být produkovány ve velkém množství.

Nevýhodou YLDV je omezený repertoár hostitelů ve srovnání s virem vakcíně. Replikaci YLDV se nepodařilo prokázat v myších, králících nebo křečcích. Schopnost YLDV zprostředkovat přenos genu do nádoru byla prokázána na myších s lidským nádorem vaječníku. Hlavní výhoda YLDV spočívá ve faktu, že nevyvolává endemie v lidské populaci a tedy neexistuje preimunita proti YLDV (Hu *et al.*, 2001).

7.4 Myxoma virus

Myxoma virus je jedním ze zástupců poxvirů. Má velice úzký repertoár přirozených hostitelů, u králíků způsobuje smrtelnou nemoc myxomatózu. Myxoma virus není patogenní pro všechny ostatní obratlovce včetně člověka. Myxoma virus je schopný infikovat lidské nádorové buněčné linie *in vitro* (Sypula *et al.*, 2004). Lun *et al.*, 2005 však ukázali, že myxoma virus může infikovat i lidské nádorové buňky *in vivo*. Pokusy prováděli na myších imunokomprimovaných modelech lidského gliomu (nádoru nervových gliových buněk).

Intracerebrální aplikace myxoma viru byla dobře snášena, objevil se pouze malý zánět v místě aplikace. Pokud aplikovali myxoma virus pouze do jedné hemisféry, došlo k inhibici růstu nádoru v této hemisféře, ale v opačné hemisféře k inhibici nádoru nedošlo. Zajímavé bylo také zjištění, že myxoma virus je schopný velmi dlouho trvající infekce v nádorových buňkách *in vivo* (nejméně 35 dní). Zdá se tedy, že myxoma virus může být vhodným onkolytickým virem pro léčbu lidských gliomů díky jeho schopnosti být geneticky modifikován, produkovat dlouhotrvající infekci, také díky jeho nepatogenitě v obratlovcích kromě králíka a v neposlední řadě díky nedostatku preeexistujících protilátek v lidské populaci.

Wang *et al.*, 2006 ukázali, že citlivost lidských nádorových buněk k infekci a odstranění myxoma virem souvisí s hladinou fosforylovaného Akt. Akt se také nazývá protein kináza B a má funkci serin/threonin kinázy. Akt hraje hlavní roli v regulaci buněčných procesů, např. v buněčné proliferaci, apoptóze, angiogenezi a metabolismu. Nicholson a Anderson, 2002 potvrdili, že Akt je aktivní v některých typech lidských nádorů (buňky typu I) a že signální dráhy vedoucí přes Akt podporují buněčnou proliferaci a tedy přispívají k rozvoji nádorů. Pokud je aktivace Akt inhibována, nedojde k produktivní infekci myxoma virem. Wang *et al.*, 2006 dále zjistili, že nepřístupné nádorové buňky byly změněny z resistentních na vnímatelné k infekci myxoma virem po expresi Akt a naopak vnímatelné nádorové buňky byly změněny na resistentní po zablokování aktivace Akt. Také se ukázalo, že aktivaci Akt reguluje virový protein M-T5 (ankyrin repeat host range protein). Skupina vědců objevila, že M-T5 je schopen vázat a aktivovat buněčný Akt, což vede k replikaci myxoma viru v různých typech lidských nádorových buněčných liniích. M-T5 reguluje tropismus myxoma viru pro králičí lymfocyty a některé lidské nádory. Pokud je M-T5 odstraněn z myxoma viru, nemůže virus produktivně infikovat lidské nádorové buňky, které nevykazují dostatečnou aktivitu Akt (buňky typu II). Můžeme tedy rozlišit 3 typy lidských nádorových buněk. I. typ buněk vykazuje vysoký stupeň Akt aktivity a je tedy přístupný k infekci myxoma virem. II. typ buněk má nízký stupeň aktivity Akt, ale pomocí virového proteinu M-T5 může také dojít k infekci myxoma virem. III. typ buněk nemá téměř žádnou aktivitu Akt a nemůže být infikován myxoma virem. Závěrem studie Wang *et al.*, 2006 je fakt, že manipulace s Akt může způsobit rozšíření onkolytické aktivity myxoma viru na širší spektrum lidských nádorových buněk. Werden *et al.*, 2007 ukázali, že buněčný protein PIKE-A je funkčně zaměnitelný s M-T5 proteinem myxoma viru. PIKE-A tedy také může poskytnout rozšíření onkolytické aktivity myxoma viru na rozsáhlejší spektrum lidských nádorových buněk.

Stanford *et al.*, 2007 poukázali na možnost využití myxoma viru spolu s inhibitory kinázových signálních drah v nádorové terapii. Pokud léčili nepřístupné lidské nádorové buněčné linie rapamycinem, výrazně se zvýšilo šíření viru *in vitro*. Rapamycin totiž inhibuje mTOR, což je serin/threonin kináza a reguluje buněčný růst pomocí Akt. Pokud rapamycin inhibuje mTOR, zvýší se kinázová aktivita Akt, což je žádoucí pro replikaci myxoma viru. Rapamycin tedy může navodit infekci nádorových buněk typu II myxoma virem, který nemá M-T5. Rapamycin je také používán jako imunosupresivní látka. Stanford *et al.*, 2008 potvrdili pozitivní účinek myxoma viru v kombinaci s rapamycinem na nádoru plic u myší *in vivo*. Rapamycin v tomto pokusu nezpůsobil výrazné zvýšení replikace myxoma viru, zato přispěl k inhibici růstu nádoru a potlačení imunitního systému.

8. Závěr

Využití onkolytických virů představuje novou a zajisté slibnou metodu léčby nádorů. Dosažení ideálního léčebného potenciálu onkolytických virů je možné mnoha způsoby. Výsledek vždy záleží na úpravě viru i na připravenosti hostitele. Viry si často přivlastňují mnoho takových signálních a regulačních drah, které jsou deregulovány v nádorových buňkách (Parato *et al.*, 2005). Ideální onkolytický virus by měl být účinný *in vitro* a *in vivo* proti širokému spektru nádorů a především být bezpečný pro normální buňky (Lun *et al.*, 2005). V současné době jsou mnohé onkolytické viry v I. a II. fázi klinických studií. Ukazuje se, že je stále potřeba optimalizovat využití této protinádorové terapie. Jednou z významných překážek ve viroterapii se ukazuje znovuobnovení růstu nádoru po úspěšné léčbě. Některé překážky by mohla vyřešit kombinovaná terapie- viroterapie a radio-, chemo- nebo imunoterapie. Kombinovaná terapie by mohla pomoci například zcitlivění nádorových buněk k viroterapii a naopak (Vähä- Koskela *et al.*, 2007). Výzkum poxvirů jako onkolytických agens je v počátcích, přesto poxviry disponují určitými výhodami a poskytují možnost i systémové terapie. Nejdále je výzkum týkající se využití poxvirů v nádorové terapii u vakcíny PANVAC, která může zahrnovat léčbu pomocí neonkolytického fowlpoxu. Využití onkolytických virů tedy zůstává slibnou metodou léčby nádorů, avšak bude zapotřebí vyvinout ještě mnoho úsilí a zodpovědět mnoho otázek týkajících se léčby onkolytickými viry. Ale doufejme, že vývoj této metody bude směřovat milovými kroky kupředu.

9. Seznam zkratek

CED	„convection- enhanced delivery“
DIC	rozptýlené intravaskulární sraženiny („disseminated intravascular coagulation“)
EEV	extracelulárně obalená forma viru („extracellular enveloped virus“)
F protein	fúzogenní protein
GM- CSF	granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor
hGM- CSF	lidský granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor
IFN- γ	interferon gamma
IMV	forma viru, který zraje uvnitř buňky („intracellular mature virus“)
IRES	„internal ribosome entry site“
LAMR	vysoko afinitní lamininový receptor („high- affinity laminin receptor“)
M protein	matrix protein
mTOR	„mammalian target of rapamycin“
MV	virus spalniček („measles virus“)
NIS	„natrium iodide symporter“
PANVAC-VF	„PANVAC- vaccinia, fowlpox“
PET	„positron- emission tomography“
SPECT	„single-photon-emission computed tomography“
TAAs	tumorově asociované antigeny
TK	thymidin kináza
TNF α	„tumor necrosis factor α “
TRICOM	„triad of costimulatory molecules“
TPP	thymidin-tri-fosfát
VGF	růstový faktor vakcínie („vaccinia growth factor“)
VSV	virus vesikulární stomatitidy
YLDV	„Yaba- like disease virus“
YMTV	„Yaba monkey tumor virus“

10. Seznam použité literatury

- Barber, G.N. (2005): VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene* 24: 7710–7719.
- Biederer, Carola, Ries, Stefan, Brandts, Christian H., McCormick, Frank (2002): Replication-selective viruses for cancer therapy. *Journal of Molecular Medicine* 80:163-175.
- Bilbao, R., Bustos, M., Alzuguren, P., Pajares, M.J., Drozdzik, M., Qian, C., Prieto, J. (2000): A blood- tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds. *Gene Therapy* 7:1824-1832.
- Bousser, J., Zittou, R. (1965): Remission spontanee prolongee D- une leucemie lymphoïde chromique. *Nouvelle revue française d'hématologie* 5:498-501.
- Demers, G.W., Johnson, D.E., Tsai, V., Wen, S.F., Quijano, E., Machemer, T., Philopena, J., Ramachandra, M., Howe, J.A., Shabram, P., Ralston, R., Engler, H. (2003): Pharmacologic indicators of antitumor efficacy for oncolytic virotherapy. *Cancer Research* 63:4003-4008.
- Gromeier, M., Lachmann, S., Rosenfeld, M.R., Gutin, P.H., Wimmer, E. (2000): Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12):6803–6808.
- Guo, Z. S., Naik, A., O' Malley, M. E., Popovic, P., Demarco, R., Hu, Y., Yin, X., Yang, S., Zeh, H. J., Moss, B., Lotze, M. T., Bartlett, D. L. (2005): The enhanced tumor selectivity of an oncolytic vaccinia lacking the host range and antiapoptosis genes SPI-1 and SPI-2. *Cancer Research* 65(21):9991-9998.
- Hu, Y., Lee, J., McCart, J. A., Xu, H., Moss, B., Alexander, H. R., Bartlett, D. L. (2001): Yaba- like disease virus: an alternative replicating poxvirus vector for cancer gene therapy. *Journal of Virology* 75(21):10300-10308.
- Ichihashi, Y. (1996): Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. *Virology* 217(2):478-485.
- Kelly, E. and Russell, S.J. (2007) History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Molecular Therapy* 15:651–659.
- Kim, J. H., Oh, J. Y., Park, B. H., Lee, D. E., Kim, J. S., Park, H. E., Roh, M. S., Je, J. E., Yoon, J. H., Thorne, S. H., Kirn, D., Hwang, T. H. (2006): Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Molecular Therapy* 14(3):361-370.
- Kirn, D. H., Warren, R. S. (2002): Liver-directed viral therapy for cancer p53- targeted adenoviruses and beyond. *Surgical Oncology Clinics of North America* 11(3):571-588.

Kölmel, K.F., Grange, J.M., Krone, B., Mastrangelo, G., Rossi, C.R., Henz, B.M., Seebacher, C., Botev, I.N., Niin, M., Lambert, D., Shafir, R., Kokoshka, E.M., Kleeberg, U.R., Gefeller, O., Pfahlberg, A. (2005): Prior immunisation of patients with malignant melanoma with vaccinia or BCG is associated with better survival. An European Organization for Research and Treatment of Cancer cohort study on 542 patients. European Journal of Cancer 41:118-125.

Lee, S. S., Eisenlohr, L. C., McCue, P. A., Mastrangelo, M. J., Lattime, E. C. (1994): Intravesical gene therapy: *in vivo* gene transfer using recombinant vaccinia virus vectors. Cancer Research 54:3325-3328.

Lun, X., Yang, W., Alain, T., Shi, Z. Q., Muzik, H., Barett, J. W., McFadden, G., Bell, J., Hamilton, M. G., Senger, D. L., Forsyth, P. A. (2005): Myxoma virus is a novel oncolytic virus with significant antitumor aktivity against experimental human gliomas. Cancer Research 65(21):9982-9990.

Madan, R. A., Arlen, P. M., Gulley, J. L. (2007): PANVAC-VF: poxviral-based vaccine therapy targeting CEA and MUC1 in carcinoma. Expert Opinion on Biological Therapy 7(4):543-554.

Maddika, S., Mendoza, F. J., Hauff, K., Zamzow, C. R., Paranjothy, T., Los, M. (2006): Cancer-selective therapy of the future: apotin and its mechanism of action. Cancer Biology and Therapy 5(1):10-19.

Mastrangelo, M. J., Lattime, E. C. (2002): Virotherapy clinical trials for regional disease: *In situ* immune modulation using recombinant poxvirus vectors. Cancer Gene Therapy 9:1013-1021.

Mastrangelo, M. J., Maguire jr., H. C., Eisenlohr, L. C., Laughlin, C. E., Monken, C. E., McCue, P. A., Kovatich, A. J., Lattime, E. C. (1999): Intratumoral recombinant GM- CSF-encoding virus as gene therapy in patiens with cutaneous melanoma. Cancer Gene Therapy 6(5):409-422.

Mastrangelo, G., Rossi, C.R., Pfahlberg, A., Marzia, V., Barba, A., Baldo, M., Fadda, E., Milan, G., Kölmel, K.F. (2000): Is there a relationship between influenza vaccinations and risk of melanoma? A population- based case- control study. European Journal of Epidemiology 16:777-782.

McCart, J. A., Puhlmann, M., Lee, J., Hu, Y., Libutti, S. K., Alexander, H. R., Bartlett, D. L. (2000): Complex interactions between the replicating oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor regression. Gene Therapy 7:1217-1223.

McCart, J. A., Ward, J. M., Lee, J., Hu, Y., Alexander, H. R., Libutti, S. K., Moss, B., Bartlett, D. L. (2001): Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine dinase and vaccinia growth factor genes. Cancer Research 61:8751-8757.

Mullen, John T., Tanabe, Kenneth K. (2002): Viral oncolysis for malignant liver tumors. Annals of Surgical Oncology 10(6):596-605.

Nemunaitis, John (1999): Oncolytic viruses. Investigational New Drugs 17:375-386.

Nicholson, K. M., Anderson, N. G. (2002): The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling* 14(5):381-395.

Olijslagers, S., Dege, A. Y., Dinsart, C., Voorhoeve, M., Rommelaere, J., Noteborn, M. H., Cornelis, J. J. (2001): Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Therapy* 8(12):958-965.

Parato, K. A., Denver, D., Forsyth, P. A., Bell, J. C. (2005): Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumors. *Nature Reviews Cancer* 5(12):965-976.

Petrilio, C. A., Kaufman, H. L. (2006): Development of the PANVACTM- VF vaccine for pancreatic cancer. *Expert Review of Vaccines* 5(1):9-19.

Power, A. T., Wang, J., Falls, T. J., Paterson, J. M., Parato, K. A., Lichty, B. D., Stojdl, D. F., Forsyth, P. A. J., Atkins, H., Bell, J. C. (2007): Carrier cell- based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Molecular Therapy* 15(1):123-130.

Reid, T., Galanis, E., Abbruzzese, J., Sze, D., Andrews, J., Romel, L., Hatfield, M., Rubin, J., Kirn, D. (2001): Intra- arterial administration of a replication- selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Therapy* 8(21):1618-1626.

Ries, Stefan J., Brandts, Christian H. (2004): Oncolytic viruses for treatment of cancer: current strategies and clinical trials. *Drug Discovery Today* 9(17):759-68.

Rodriguez, R., Schuur, E.R., Lim, H.Y., Henderson, G.A., Simons, J.W., Henderson, D.R. (1997): Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Research* 57:2559–2563.

Russell, S.J., Hawkins, R.E., Winter, G. (1993): Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Research* 21 (5):1081-1085.

Russell, S.J. (1994): Replicating vectors for gene therapy of cancer: risks, limitations and prospects. *European Journal of Cancer* 30A(8):1165-71.

Shen, Y., Post, L. (2007): Viral vectors and their applications: Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds.): *Virology* 5th edition. Lippincott Williams and Wilkins, USA, 539-564.

Smakman, N., van der Bilt, J. D. W., van den Wollenberg, D. J. M., Hřeben, R. C., Rinkes, I. H. M. B., Kranenburg, O. (2006): Immunosuppression promotes reovirus therapy of colorectal liver metastase. *Cancer Gene Therapy* 13:815-818.

Springfeld, C., Messling, V., Frenzke, M., Ungerechts, G., Buchholz, C. J., Cattaneo, R. (2006): Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases. *Cancer Research* 66: 7694–7700.

Stanford, M. M., Shaban, M., Barrett, J. W., Werden, S. J., Gilbert, P. A., Bondy- Denomy, J., MacKenzie, L., Graham, K. C., Chambers, A. F., McFadden, G. (2008): Myxoma virus oncolysis of primary and metastatic B16F10 mouse tumors *in vivo*. *Molecular Therapy* 16(1):52-59.

Stanford, M. M., Barrett, J. W., Nazarian, S. H., Werden, S., McFadden, G. (2007): Oncolytic virotherapy synergism with signaling inhibitors: rapamycin increases myxoma virus tropism for human tumor cells. *Journal of Virology* 81(3):1251-1260.

Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., Bell, J.C. (2000): Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nature Medicine* 6:821-825.

Strong, J. E., Coffey, M. C., Tang, D., Sabinin, P., Lee, P. W. K. (1998): The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *The EMBO Journal* 17(12):3351-3362.

Su, C., Peng, L., Sham, J., Wang, X., Zhang, Q., Chua, D., Liu, C., Cui, Z., Xue, H., Wu, H., Yang, Q., Zhang, B., Liu, X., Wu, M., Qian, Q. (2006): Immune gene- viral therapy with triplex efficacy mediated by oncolytic adenovirus carrying an interferon-gamma gene yields efficient antitumor activity in immunodeficient and immunocompetent mice. *Molecular Therapy* 13:918-927.

Sypula, J., Wang, F., Ma, Y., Bell, J., McFadden, G. (2004): Myxoma virus tropism in human tumor cells. *Gene Therapy and Molecular Biology* 8:103-114.

Tagawa, M., Kawamura, K., Shimozato, O., Ma, G., Li, Q., Suzuki, N., Shimada, H., Ochiai, T. (2006): Virology- and immunology- based gene therapy for cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*: CII 55:1420-1425.

Todo, T., Rabkin, S. D., Chahlavi, A., Martuza, R. L. (1999): Corticosteroid administration does not affect viral oncolytic activity, but inhibits antitumor immunity in replication-competent herpes simplex virus tumor therapy. *Human Gene Therapy* 10(17):2869-2878.

Tseng, J.C., Levin, B., Hurtado, A., Yee, H., Castro, I.P., Jimenez, M., Shamamian, P., Jin, R., Novick, R.P., Pellicer, A., Meruelo, D. (2004): Systemic tumor targeting and killing by Simbis viral vectors. *Nature Biotechnology* 22:70-77.

Väha- Koskela, Markus J.V., Heikkilä Jari E., Hinkkanen Ari E. (2007): Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer letters* 254:178-216.

Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R. B., Smith, G. L. (1998): Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of the host complement control proteins into its envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13):7544-7549.

Varghese, S., Rabkin, S. D. (2002): Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. *Cancer Gene Therapy* 9:967-978.

Vile, R., Ando, D., Kirn, D. (2002): The oncolytic virotherapy treatment platform for cancer: Unique biological and biosafety points to consider. *Cancer Gene Therapy* 9:1062-1067.

Walther, W., Stein, U. S., Schlag, P. M. (2007): Local gene therapy for cancer: Schlag, P. M., Stein, U. S. (eds.): *Cancer drug discovery and development: regional cancer therapy*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 181-195.

Wang, G., Barrett, J. W., Stanford, M., Werden, S. J., Johnston, J. B., Gao, X., Sun, M., Cheng, J. Q., McFadden, G. (2006): Infection of human cancer cells with myxoma virus requires Akt activation via interaction with a viral ankyrin-repeat host range factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(12):4640-4645.

Werden, S. J., Barrett, J. W., Wang, G., Stanford, M. M., McFadden, G. (2007): M-T5, the ankyrin repeat, host range protein of myxoma virus, activates Akt and can be functionally replaced by cellular PIKE-A. Journal of Virology 81(5):2340-2348.

Zeh, H. J., Bartlett, D. L. (2002): Development of replication-selective, oncolytic poxvirus for the treatment of human cancers. Cancer Gene Therapy 9:1001-1012.