

# Onkolitička viroterapija

---

**Kavšek, Alan**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2014**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:463674>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2022-01-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

# ONKOLITIČKA VIROTERAPIJA

## ONCOLYTIC VIROTHERAPY

SEMINARSKI RAD

ALAN KAVŠEK

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate Study of Molecular Biology

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dijana Škorić

Zagreb, 2014.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. ONKOLITIČKAVIROTERAPIJA.....	2
3.UVJETI ZA USAVRŠAVANJE TERAPIJE ONKOLITIČKIM VIRUSIMA.....	5
3.1. Zaobilaženje imunosnog sustava.....	5
3.1.1. Izmjena serotipa virusa.....	6
3.1.2. Kemijske modifikacije virusnih antigena.....	7
3.1.3. Transport virusa stanicama.....	7
3.2. Selektivnost virusa za tumorske stanice .....	10
3.3. „Naoružavanje“ onkolitičkih virusa.....	12
3.3.1. Imunoterapija.....	14
3.3.2. „Naoružavanje“ virusa s obzirom na tumorsku epigenetiku.....	16
4. ZAKLJUČAK.....	18
5. LITERATURA.....	18
6. SAŽETAK.....	19
7. SUMMARY.....	20

## **1. Uvod**

Zahvaljujući napretku u znanosti, današnje se društvo lakše suočava s mnogim problemima pa i s opasnostima koje predstavljaju različite bolesti. No, usprkos brojnim istraživanjima na području onkologije, rak je i dalje jedan od najčešćih uzročnika smrti. Sama činjenica da je u 2010. godini od te bolesti umrlo oko 8 milijuna ljudi sugerira da je potrebno pronaći efikasan način njenog suzbijanja.

Zbog nastalih mutacija unutar genoma tumorske se stanice razlikuju od normalnih po nekontroliranom i brzom rastu, povećanoj metaboličkoj aktivnosti te nemogućnosti poticanja anti-virusnog imunskog odgovora (Forbes et al., 2013). U radu autora Smith et al. (2014) opisana je i hijerarhija tumorskih stanica te tumorski mikrookoliš. Najmanju populaciju stanica u tumorskom mikrookolišu predstavljaju tumorske matične stanice koje su ujedno i najagresivnije. Ove su stanice, baš kao i ostale vrste matičnih stanica, definirane sposobnošću samoobnavljanja i diferencijacije, a odlikuju se i malim brojem dioba te su stoga otporne na kemijske spojeve toksične za stanice u diobi. Dokazano je da ovaj tip stanica može inducirati nastanak tumora, kao i da potiču rast normalnih stanica radi uspostave specifičnog tumorskog mikrookoliša. Tumorski mikrookoliš je ključan za uspješnu proliferaciju i razvitak tumorskih stanica, a odlikuje se hipoksičnim uvjetima, nepravilnim rasporedom krvnih žila te supresivnošću imunskog sustava. Hipoksični uvjeti nastaju kada angiogeneza više ne može pratiti brzinu proliferacije tumorskih stanica te potiču aktivaciju specifičnih transkripcijskih faktora („hypoxia-inducibile factors“), koji dovode do ekspresije gena potrebnih za povećanje stope staničnog preživljavanja, diferencijacije te „regrutacije“ preteča endotelnih stanica. Slaba prokrvljenost pojedinih dijelova tumora je uzrok njegovoj izoliranosti pa je širenje kemoterapeutika i imunskih stanica u samu srž tumora onemogućeno.

U navedenom članku se spominje i kako ovaj tip stanica može potaknuti ponovni nastanak tumora pa je zastupljeno mišljenje da su povezane s nastankom metastaza.

Cilj svih terapija za suzbijanje raka je uništavanje tumorskih stanica. Osim efikasnog uklanjanja „zloćudnih“ stanica, potrebno je osigurati i sigurnost same terapije, odnosno što više poboljšati njezinu specifičnost za tumorske stanice. S obzirom na prirodu samih tumorskih matičnih stanica, jasno je da bi upravo te stanice trebale postati glavne „mete“ modernih terapija. Nažalost, radio- i kemoterapije nisu pokazale očekivane rezultate u slučaju tumorskih matičnih stanica, vjerojatno

zbog pojačane ekspresije ABC-transportera pomoću kojih matične stanice iz citoplazme izbacuju lijekove korištene prilikom terapija. Nadalje, te stanice eksprimiraju i gene za sprječavanje ulaska u apoptozu, kao i različite enzime uključene u popravak DNA, što ih čini vrlo zahtjevnim „metama“.

Danas se tumori uklanjaju različitim kirurškim zahvatima, a ponovni rast i razvitak preostalih neuklonjenih tumorskih stanica se sprječava kemo- ili radioterapijom. Usprkos sve boljoj opremi i konstantnom unapređivanju terapija, liječenje raka često nije uspješno. Izoliranost tumora, različite prilagodbe tumorskih stanica te sam tumorski mikrookoliš čine liječenje tumora istinskim izazovom.

Pokušaj pronalaska jednostavne i uspješne terapije za liječenje raka doveo je i do nove ideje o korištenju onkolitičkih virusa za suzbijanje tumora. Iako je ovu metodu liječenja potrebno dodatno unaprijediti i utvrditi njezinu sigurnost, rašireno je mišljenje da su onkolitički virusi „ključ“ u borbi protiv raka.

## **2. Onkolitička viroterapija**

Onkolitička viroterapija se posljednjih godina ubrzano razvija, a temelji se na sposobnosti onkolitičkih virusa da inficiraju samo tumorske stanice. Zahvaljujući selektivnosti ovih virusa neće doći do oštećenja drugih, normalnih stanica, što ovoj metodi daje prednost nad kemo- i radioterapijama.

Već je početkom 20. stoljeća primijećena povezanost regresije raka i virusnih infekcija, kada su zabilježeni slučajevi u kojima su infekcije virusima hepatitisa ili vodenih kozica dovele do ublažavanja simptoma leukemije (Sze et al., 2013). Nedugo nakon tih zapažanja (oko 1940.), virusi se po prvi put počinju koristiti za liječenje raka, a prvi modelni organizam je bio miš. Od tada, mnoga su istraživanja usmjerena na primjenu onkolitičkih virusa za suzbijanje raka u ljudskoj populaciji. Iako u Zapadnom svijetu onkolitički virusi još uvijek nisu probili svoj put do tržišta, u Kini je od 2005. godine dozvoljena upotreba ljudskog adenovirusa prilikom suzbijanja karcinoma vrata i glave (Sze et al., 2005).

Zahvaljujući napretku na područjima virologije i onkologije te molekularne biologije općenito, danas se prirodni onkolitički virusi sve češće modificiraju, kako bi se ostvario što veći efekt

terapije. Modificirani virusi, osim što liziraju tumorske stanice, mogu poslužiti kao vektori za različite transgene, čija bi ekspresija utjecala na integritet tumorskih stanica.

Trenutno se klinički ispituje devet virusnih porodica: *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Reoviridae*, *Poxviridae*, *Retroviridae* i *Rhabdoviridae* (Slika 1.), a virusi navedenih porodica, osim *Reoviridae* i *Parvoviridae*, također se i genetički modificiraju (Miest et al., 2013).

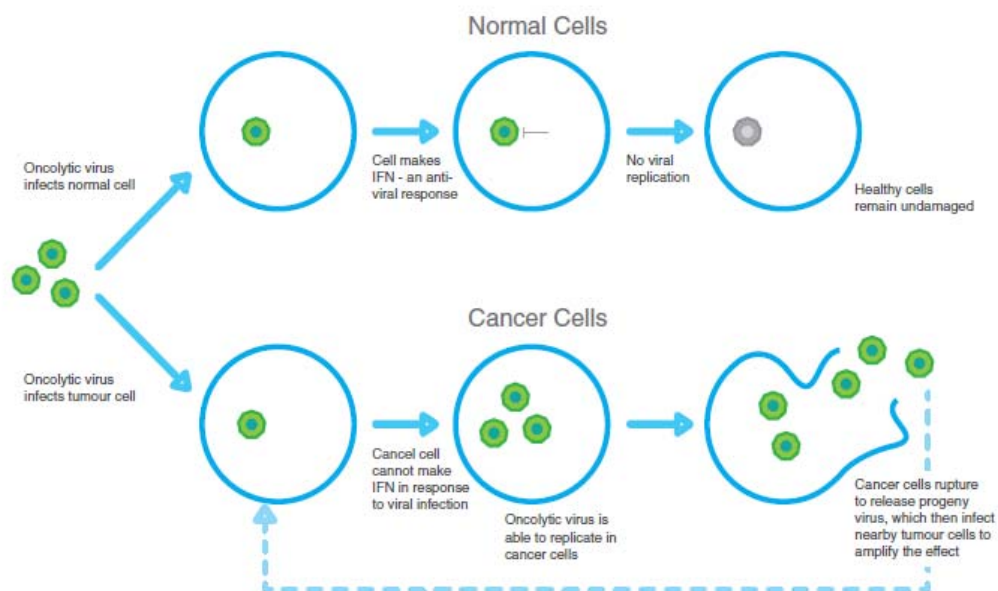
Virus family	Phase and type of clinical trial	Virus name	Genetic changes*	Route	Combination therapy	NCT number
<b>DNA viruses</b>						
 <i>Herpesviridae</i>	Phase III complete; melanoma, primary end point met	Talimogene laherparepvec	<ul style="list-style-type: none"> <li>Armed with GM-CSF</li> <li>Tumour-specific replication: ICP34.5 deleted, US11 altered</li> <li>Enabled antigen presentation: ICP47 deleted</li> </ul>	Intratumoural	None	<a href="#">NCT00769704</a>
 <i>Adenoviridae</i>	Phase II and III; bladder cancer	CG0070	<ul style="list-style-type: none"> <li>Armed with GM-CSF</li> <li>Preferential replication in RB-deficient tumours</li> </ul>	Intravesicular	None	<a href="#">NCT01438112</a>
	Approved therapeutic (China); SCCHN	Oncorine (H101)	Preferential replication in tumours: E1B-55k deleted	Intratumoural	Cisplatin	<a href="#">PMID15601557</a>
 <i>Poxviridae</i>	Phase IIB; hepatocellular carcinoma	JX-594 (Pexa-Vec)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Armed with GM-CSF</li> <li>Preferential replication in tumours: thymidine kinase deleted</li> </ul>	Intratumoural	None	<a href="#">NCT01387555</a> ; <a href="#">PMID23396206</a>
 <i>Parvoviridae</i>	Phase I and II; glioma	ParvOryx	None	Intravenous; intratumoural	None	<a href="#">NCT01301430</a>
<b>RNA viruses</b>						
 <i>Paramyxoviridae</i>	Phase I; myeloma	MV-NIS	<ul style="list-style-type: none"> <li>Armed with human NIS</li> <li>Preferential replication in tumours (incompetent to block STAT1 and MDA5)</li> </ul>	Intravenous	Cyclophosphamide	<a href="#">NCT00450814</a>
 <i>Picornaviridae</i>	Phase I; glioma	PVS-RIPO	Translation controlled by the internal ribosome entry site of another virus	Intratumoural	None	<a href="#">NCT01491893</a>
 <i>Rhabdoviridae</i>	Phase I; hepatocellular carcinoma	VSV-hIFN $\beta$	Armed with human IFN $\beta$	Intratumoural	None	<a href="#">NCT01628640</a>
 <i>Retroviridae</i>	Phase I and II; glioma	Toca 511	Armed with cytosine deaminase	Intratumoural; intravenous; into resection cavity	5-fluorocytosine	<a href="#">NCT01156584</a> ; <a href="#">NCT01470794</a> ; <a href="#">NCT01985256</a>
 <i>Reoviridae</i>	Phase III; SCCHN	Reolysin	None	Intravenous	Carboplatin paclitaxel	<a href="#">NCT01166542</a>

GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; hIFN $\beta$ , human interferon- $\beta$ ; ICP, infected cell protein; MDA5, melanoma differentiation-associated protein 5; MV, measles virus; NCT, national clinical trial; NIS, sodium-iodide symporter; PVS, poliovirus Sabin; RB, retinoblastoma protein; RIPO, Rhinovirus-poliovirus hybrid; SCCHN, squamous cell carcinoma of the head and neck; STAT1, signal transducer and activator of transcription 1; US, unique sequence; VSV, vesicular stomatitis virus. \*Changes can be in addition to intrinsic virus properties that favour oncolysis.

Slika 1. Porodice s primjerima virusa koje trenutno prolaze kroz klinička istraživanja (slika preuzeta iz Miest et al., 2013).

U pogledu sigurnosti terapije, prema dosadašnjim podacima ne dolazi do prijenosa onkolitičkih virusa s jedne na drugu osobu. Kao jedina nuspojava zabilježeno je pojavljivanje simptoma gripe (Miest et al., 2013). Selektivnost virusa za tumorske stanice temelji se na nesposobnosti tumorskih stanica da sintetiziraju interferon ili „odgovore“ na njegovu prisutnost te na promijenjenoj regulaciji određenih metaboličkih putova, npr. Ras signalnog puta (Donnelly et al., 2013).

Istraživanja su pokazala da oko 65-70% tumora ne može proizvoditi ili reagirati na interferon tipa 1, čija je funkcija pokretanje protumikrobnih procesa unutar stanice te aktiviranje imunskog sustava (Slika 2.). Zbog toga u tumorskim stanicama ne može doći do pojačane ekspresije gena induciranih interferonom čija je funkcija sprječavanje infekcije virusom ili poticanje apoptoze (TNF-  $\alpha$ , TRAIL) (Forbes et al., 2013).



Slika 2. Zbog nastalih mutacija tumorske stanice ne mogu sintetizirati interferon pa ne mogu spriječiti infekciju onkolitičkim virusima (slika preuzeta iz Donnelly et al., 2013).

Aktivacija Ras onkogeni u tumorskim stanicama onemogućava aktivaciju protein kinaze R, proteina zaslužnog za prepoznavanje virusne RNA. Zbog toga su takve stanice izvrsni domaćini za virusnu replikaciju, koja je u potpunosti neometana (Donnelly et al., 2013).

Za uspješnost terapije onkolitičkim virusima potrebno je osigurati lokaliziranost virusa u tumorskom mikrokolišu. Najefikasnija primjena virusa bila bi direktno iniciranje u tumor, no ponekad je tumor teško izolirati, a i sama procedura izolacije može biti opasna za pacijenta. Ostali načini distribucije podrazumijevaju oralno ili sistemsko unošenje virusa. Oralno unošenje virusa nije efikasno, budući da se određena količina virusa inaktivira u probavnom sustavu zbog niskih pH vrijednosti i probavnih enzima (Sze et al., 2013). Sistemska distribucija putem krvi smatra se najprikladnijom i najjeftinijom, iako postoje određeni nedostaci ovog pristupa. Naime, prilikom sistemske distribucije imunosti sustav i nespecifično vezanje virusa za sastojke krvi ili stijenke krvnih žila naglo smanjuju broj slobodnih virusnih čestica. Samim time je onemogućeno lokaliziranje virusa na području tumora (Sze et al., 2013).

Prema članku Willmona i suradnika (2009), već 30 minuta nakon intravenske inokulacije virusa vazikularnog stomatitisa nije moguće naći neaktiviranu ili nevezanu virusnu česticu. Iako se intravensko rasprostranjivanje virusa po tijelu na prvi pogled čini dosta neefikasnim, zahvaljujući razvitku metoda koje omogućuju uspješno sakrivanje ili transport virusa, ovaj način distribucije bi u budućnosti trebao postati najisplativijim.

### **3. Uvjeti za usavršavanje terapije onkolitičkim virusima**

Iako je mehanizam djelovanja onkolitičkih virusa u teoriji logičan i predvidljiv, potrebno je obratiti pažnju na ostale elemente koji bi mogli utjecati na efikasnost ove terapije. U ovom poglavlju će se detaljno opisati tri najvažnija uvjeta, koja je potrebno zadovoljiti kako bi se terapija onkolitičkim virusima u budućnosti mogla primijeniti u kliničkim slučajevima (zaobilazanje imunostnog sustava, selektivnost za tumorske stanice i „naoružavanje“ virusa), kao i ideje za njihovo zadovoljavanje.

#### **3.1. Zaobilazanje imunostnog sustava**

Imunostni sustav predstavlja najveću prepreku uspješnoj distribuciji onkolitičkih virusa budući da ne može razlikovati „opasne“ od „korisnih“ virusa. Supresija imunostnog sustava pacijenta omogućila bi neometano širenje virusa, no čak je i sama pomisao na narušavanje „glavne obrambene linije“ organizma uznemiravajuća. Budući da supresija tog sustava nije naročito

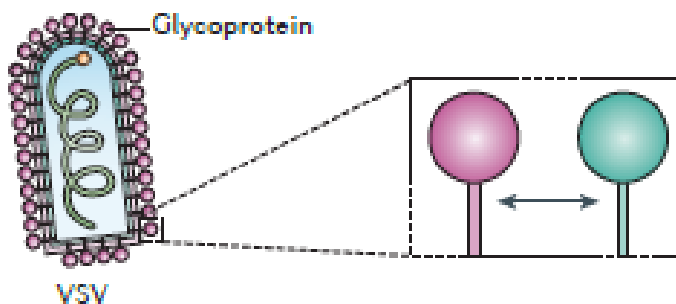


dobro rješenje, potrebno je nekako „nadmudriti“ funkcionalni imunski sustav pacijenta. Kako bi virusi uspješno došli do svoje konačne destinacije, potrebno ih je zaštititi od komponenata krvne plazme, stanica imunskog sustava te samih protutijela. Pronalazak rješenja je od neizmjerne važnosti za efikasnost ove terapije, a trenutno se istražuje nekoliko metoda za „sakrivanje“ virusa.

### 3.1.1. Izmjena serotipa virusa

Prema Miest et al. (2014) ova strategija se temelji na zaštiti virusa od protutijela promjenom epitopa ili cijelog antigena na površini virusa. U članku autori opisuju i načine izmjene serotipa. Ako određena vrsta virusa ima više serotipova, moguće je drugačiji serotip „zalijepiti“ na odabrani virus. Kao primjer je naveden virus vezikularnog stomatitisa, čiji se epitopi, prepoznatljivi imunskom sustavu, nalaze na glikoproteinu VSV-G. U ovom se slučaju promjena serotipa provodi zamjenom ishodišnog gena novim, što će dovesti do nastanka novog serotipa (Slika 3.). Naravno, što više virusnih površinskih proteina sadrži epitope to je promjena serotipa teža. Zbog toga je adenovirus primjer „zahtjevnijeg“ virusa.

#### **a Envelope protein exchange within virus species**



Slika 3. Izmjena serotipa virusa vezikularnog stomatitisa (slika preuzeta iz Miest et al., 2013).

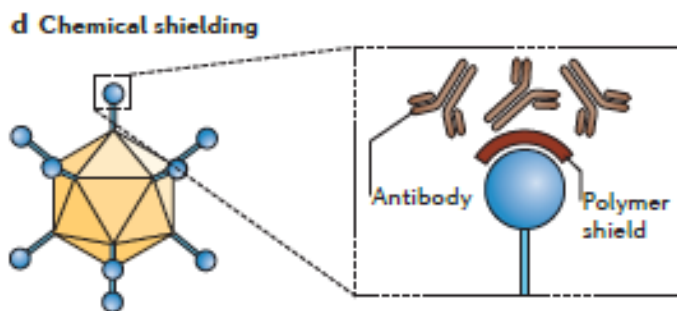
U slučaju virusa koji imaju samo jedan serotip, moguće je provesti zamjenu serotipa zahvaljujući drugim odgovarajućim vrstama virusa. U spomenutom je članku naveden primjer u kojem su glikoproteini virusa ospica zamijenjeni glikoproteinima virusa štenećaka (*canine distemper*).

Ovako modificirani virus neće biti neutraliziran protutijelima protiv virusa ospica (*Morbilivirus*) pa je ovakav način „skrivanja“ virusa uspješan.

Jedini nedostatak ove metode je to što virusi koji se koriste prilikom izmjene serotipa moraju sadržavati kapsidne proteine sličnih karakteristika. Drugim riječima, mora postojati ravnoteža između različitosti (zbog uspješnog izbjegavanja imunskog sustava) i strukturnih sličnosti zamijenjenih proteina radi uspješnog slaganja virusne kapside (Miest et al., 2014).

### 3.1.2. Kemijske modifikacije virusnih antigena

Cilj ove metode je „maskiranje“ virusnih epitopa, kako bi se onemogućilo njihovo prepoznavanje (Slika 4.). Prema članku autora Miest et al. (2014), kemijska zaštita se vrlo često koristi kod porodica *Adenoviridae*, *Rhabdoviridae* i *Poxviridae*, a temelji se na „odlaganju polimera na virusnu česticu radi fizičke zaštite epitopa“. Često korišteni polimeri su polietilenglikol i poli-N-(2-hidroksipropil)-metakrilamid. Prilikom kemijske modifikacije virusa, korišteni polimer ne smije utjecati na migracijska svojstva virusa, a ne smije niti ometati vezanje virusa na stanicu. Jedini nedostatak ove metode je nezaštićenost virusnog potomstva, koje će biti izloženo djelovanju imunskog sustava.



Slika 4. Virusni epitopi su zaštićeni polimerima pa ne dolazi do vezanja antitijela na viruse (slika preuzeta iz Miest et al., 2013).

### 3.1.3. Transport virusa stanicama

Transport onkolitičkih virusa stanicama domaćina rješava jedan od glavnih problema virusne terapije budući da je izbjegnuta neutralizacija virusa imunskim sustavom. Korištenje stanica kao

transportera ne samo da omogućava zaštitu virusa, već dovodi i do njihove amplifikacije te brže i preciznije lokalizacije na području tumorskog mikrookoliša.

Prema autorima Willmon et al. (2009), virusi se mogu vezati za stanicu ili mogu inficirati stanice transportere. Uvijek je potrebno uskladiti asocijaciju stanica transportera i virusa s vremenom potrebnim za dolazak stanica transportera na konačno odredište. Naime, potrebno je osigurati da ne dođe do lize stanica transportera (neophodno je znati brzinu replikacije korištenog virusa), kao niti do disocijacije virusa vezanih na te stanice prije nego što se stanice nađu u tumorskom okolišu.

U članku je opisano kako se vezanje retrovirusnih čestica za T-stanice, specifične za tumorske antigene, pokazalo vrlo efikasnim (virusi su detektirani na tumorskim stanicama). Inficiranje stanica transportera virusima omogućava i njihovu amplifikaciju, do koje ne dolazi prilikom vezanja virusa na površinu stanica transportera. Uvijek je potrebno lokalizirati što veću količinu virusa na području tumora, kako bi infekcija tumorskih stanica bilo što učinkovitija. Najvažniji uvjet za provođenje ove metode je uspješna replikacija onkolitičkih virusa u stanicama transporterima. No, budući da su onkolitički virusi specifični isključivo za tumorske stanice, infekcija netransformiranih stanica transportera mogla bi predstavljati problem. Prema autorima Willmon et al. (2009), najjednostavnije je rješenje ovog problema korištenje tumorskih stanica za transport virusa. Naveden je i podatak da su tumorske stanice inficirane virusom vezikularnog stomatitisa uspješno „transportirale“ viruse do metastaza koje su se nalazile u plućima miša s aktivnim imunskim sustavom. Iako distribucija onkolitičkih virusa pomoću tumorskih stanica u teoriji dobro zvuči, potrebna su daljnja istraživanja radi provjere sigurnosti ove metode. Pokazalo se da je onkolitičkim virusima moguće inficirati i netumorske stanice, a kao primjer su navedene CIK-stanice („cytokine-induced killer cells“).

Da bi transport virusa stanicama bio u potpunosti uspješan, potrebno je obratiti pozornost na još jedan uvjet – usmjerenost transporterskih stanica prema tumoru. Naime, virus može inficirati tumorske stanice samo ako je „isporučen“ u tumorskom mikrookolišu. U protivnom će, s vremenom, doći do lize stanica transportera i neutralizacije virusa od strane imunskog sustava. Istina je i da će s vremenom sistemski distribuirane stanice transporteri „naletjeti“ na tumorske stanice, no teško je procijeniti kad će se dogoditi taj susret, a to je od iznimne važnosti za uspješnost terapije. Najvjerojatnije bi došlo i do lize stanica zbog amplifikacija virusa.

Sve u svemu, planiranje terapije koja bi se zasnivala na vjerojatnosti bilo bi jako teško i zahtijevalo bi puno vremena i resursa. Iz upravo navedenog proizlazi da bi transporterske stanice trebale biti usmjerene prema tumoru, odnosno da mora postojati interakcija na molekularnoj razini između ovih dvaju tipova stanica.

Prema autorima Willmon et al. (2009), tumorski „kod“, koji prepoznaju transporterske stanice, može biti povezan direktno s tumorskim stanicama, biološkim svojstvima tumorskog mikrokoliša ili s anatomskim položajem tumora. Autori opisuju tri tipa stanica za pronalazak tumora. Pokazali su da T-stanice mogu prepoznati specifični antigen na tumorskim stanicama te da je to temelj njihove usmjerenosti prema tumoru. Nažalost, T-stanice prepoznaju antigene koje se nalaze i na ostalim stanicama, a i sam uzgoj takvih specifičnih T-stanica bio bi naporan i skup. Stanice CIK je lakše pripremiti za određenog pacijenta, no njihova tumorska specifičnost je manja. Treću skupinu stanica čine makrofagi, koje se može naći u tumorskom mikrokolišu, budući da ih privlače hipoksični uvjeti. Lokalizacija makrofaga na području tumora može biti još specifičnija ako se na makrofage vežu metalne čestice. Tada se, pod uvjetom da se zna položaj tumora, može pomoću magneta usmjeriti makrofage prema tumoru.

Sve se više proučava mogućnost transporta onkolitičkih virusa matičnim stanicama, od kojih se najviše istražuju neuronske i mezenhimske matične stanice (Ahmed et al., 2011b). Naime, primijećeno je da matične stanice migriraju prema nekim vrstama tumora što ih čini jednim od glavnih kandidata za transport virusa. U staničnoj komunikaciji između tumorskih i matičnih stanica sudjeluju citokini, faktori rasta te određeni tipovi receptora. Blokiranjem nekih receptora (npr. CXCR4 i VEGFR2) neuronskih matičnih stanica pomoću protutijela dolazi do smanjenja migracije tih stanica prema tumoru što jasno ukazuje na uključenost tih receptora u komunikaciji među navedenim stanicama (Ahmed et al., 2011b).

U svrhu određivanja što boljeg staničnog transportera, Ahmed i suradnici (2011b) su usporedili neuronske i mezenhimske matične stanice. Zaključili su da su neuronske matične stanice prikladnije za migraciju kroz mozak jer ne ometaju moždane funkcije. Uočili su i da te stanice bolje podržavaju replikaciju virusa CRAd-S-pk7 od mezenhimalnih matičnih stanica, jer je virusno potomstvo oslobođeno iz mezenhimalnih stanica bilo manje. Mezenhimske stanice su također bile podložnije lizi virusom CRAd-S-pk7. Tvrde i da je nedostatak neuronskih matičnih stanica taj što mogu izazivati protuupalni odgovor, dok mezenhimske matične stanice ne

izazivaju imunosni odgovor te dodatno suprimiraju imunosni sustav, što je vrlo korisno za „skrivanje“ virusa.

Zanimljivo je da transport virusa CRAd-S-pk7 pojačava specifičnost migracije neuronskih matičnih stanica prema tumoru, što nije slučaj i sa mezenhimskim matičnim stanicama. Autori pretpostavljaju da je uzrok tome pojačana ekspresija gena koji kodiraju za receptore neuronskih matičnih stanica, bitnih za komunikaciju s tumorskim stanicama.

Ahmed i suradnici (2011a) također procjenjuju transporterske sposobnosti neuronskih matičnih stanica. Proučavali su transport virusa CRAd-S-pk7 na mišjem modelu zaraženim multifornim glioblastomom. Zaključili su da jedan replikacijski ciklus virusa unutar neuronskih matičnih stanica traje oko 72 sata te da se najviše virusnog potomstva oslobađa 96 sati nakon početka infekcije. Kao što su i očekivali, virus oslobođen iz stanica transportera bio je jednako efikasan u suzbijanju tumora kao i virusi nanesen direktno na tumorske stanice. Ahmed i druga grupa autora opisuju (2011b) svoje zapažanje da se učestalost spontane migracije neuronskih matičnih stanica prema tumoru povećava nakon infekcije tih stanica virusom. Kao i u prethodno spomenutom radu (Ahmed et al., 2011a) ta se pojava objašnjava povećanjem transkripcije gena za receptore CXCR4 i VEGFR2.

### **3.2. Selektivnost virusa za tumorske stanice**

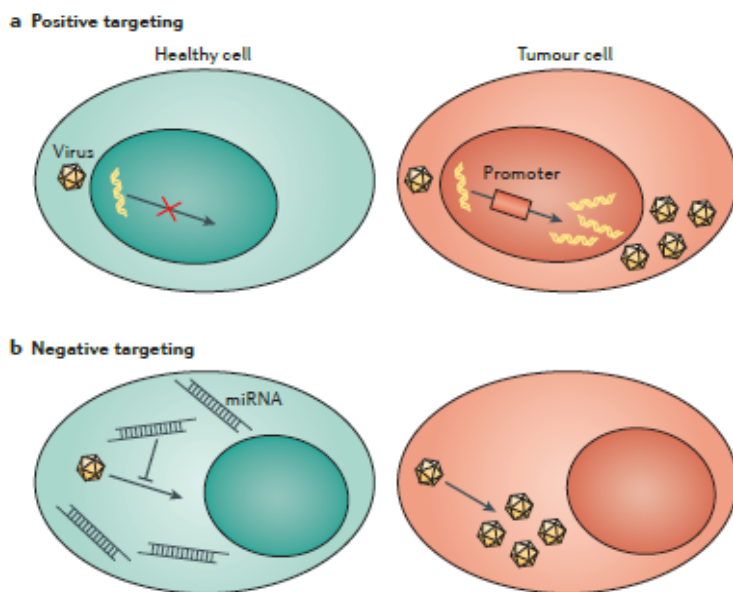
Da bi terapija onkolitičkim virusima bila sigurna, virusna infekcija se mora ograničiti samo na tumorske stanice. Potrebno je postići što viši stupanj specifičnosti virusa za tumorske stanice kako bi došlo do što jače infekcije. Kako bi se povećala specifičnost virusa, moguće je u genom virusa unijeti gen za protein koji je specifičan za određeni antigen. Tada će vezanje virusa za tumorske stanice biti specifičnije. Također, moguće je modificirati virusne proteine i pomoću specifičnih domena jednonančanih protutijela (Miest et al., 2014).

Nadalje, virusna se replikacija također mora ograničiti samo na tumorske stanice. Budući da uvijek postoji vjerojatnost da se inficira i „normalna“ stanica, potrebno je onemogućiti virusnu replikaciju u svim stanicama osim tumorskima. Jedno od rješenja je modificiranje virusa na način da se virusna replikacija može odvijati samo u tumorskim stanicama. Prema autorima Miest et al.

(2014) postoje dva načina za osiguravanje specifične infekcije, čak i nakon što je virus u stanicu unio svoj nasljedni materijal.

Pozitivno ciljanje („positive targeting“) se temelji na činjenici da u tumorskim stanicama dolazi do jake ekspresije određenih gena, što nije slučaj u „normalnim“ stanicama. Drugim riječima, prepisivanje virusnih gena se kontrolira pomoću promotora specifičnih za transkripcijsku mašineriju tumorskih stanica (Slika 5.a). Zbog toga je ekspresija virusnih gena vrlo visoka samo u tumorskim stanicama. No, ova strategija nije primjenjiva za viruse koji kodiraju vlastitu polimerazu budući da je nužno da transkripcija virusnih gena ovisi o staničnim enzimima.

Drugi način ciljanja je negativno ciljanje („negative targeting“) koje onemogućava infekciju svih netumorskih stanica (Slika 5.b). Ovaj tip ciljanja se provodi ugradnjom specifičnih sekvenci u netranslatirane regije virusnog transkripta. Zbog komplementarnosti će doći do povezivanja specifičnih sekvenci virusnih transkripata i staničnih miRNA (mikroRNA), što će onemogućiti daljnju translaciju, odnosno nastanak virusnih proteina. Specifične sekvence se odabiru s obzirom na razinu ekspresije određenih miRNA u tumorskim i ostalim stanicama.



Slika 5. Dva mehanizma „ciljanja“ tumorskih stanica (slika preuzeta iz Miest et al., 2013)

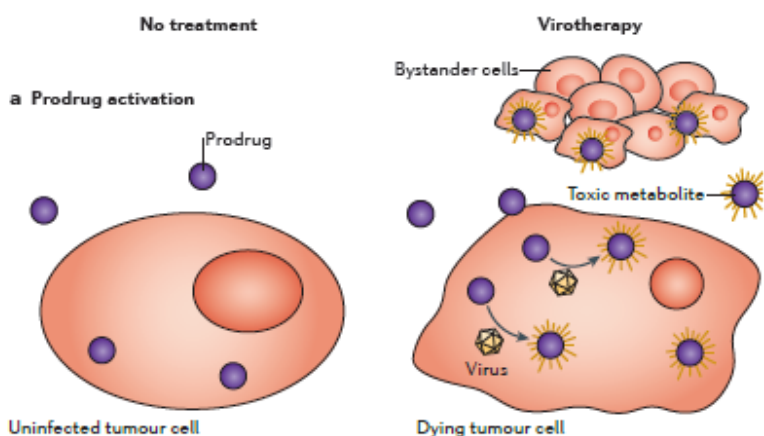
a) pozitivno ciljanje – do ekspresije transgena dolazi samo u tumorskim stanicama, zahvaljujući specifičnosti promotora za enzimsku mašineriju tumorskih stanica;

b) negativno ciljanje – miRNA molekule onemogućavaju replikaciju virusa u „normalnim“ stanicama

### **3.3. „Naoružavanje“ onkolitičkih virusa**

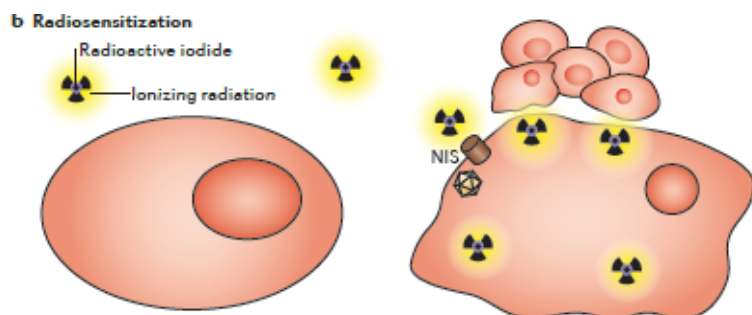
Uklanjanje cijelog tumora je konačni cilj svih terapija, no vrlo je teško ukloniti sve tumorske stanice iz tijela pacijenta. Kako bi se ostvarila što uspješnija terapija, provode se mnoga istraživanja na području genetičke modifikacije onkolitičkih virusa. U viruse se najčešće unose geni čiji produkti pogubno djeluju na tumorske stanice ili dodatno stimuliraju imunosti sustav pacijenta. Zahvaljujući specifičnosti onkolitičkih virusa prema tumorskim stanicama, moguće je lokaliziranje protu-tumorskih produkata na točno određenom području. Potrebno je, dakako, još mnogo istraživanja kako bi se omogućilo što efikasnije suzbijanje tumora, ali i postigla sigurnost prilikom korištenja ovog tipa terapije.

Do ekspresije transgena dolazi nakon infekcije tumorskih stanica. Za uspješnost terapije je važno da transgenski produkt može difundirati, kako bi uzrokovao lizu i ostalih stanica tumorskog mikrookoliša („bystander cell killing“) (Slika 6.). Naravno, potrebno je obratiti pozornost na doseg difuzije tog produkta kako bi se njegovo djelovanje ograničilo samo na područje tumora. Miest i suradnici (2013) opisali su nekoliko produkata pogubnih za tumorske stanice. Enzimi poput timidin-kinaze, citozin-deaminaze ili purin-nukleozid-fosforilaze pretvaraju netoksične prekursore u toksične pa dolazi do lize stanica koje ekspimiraju te enzime. Autori tvrde da timidin-kinaza HSV-a (herpes simplex-virusa) uspješno fosforilira ganciklovir (bazni analog gvanina) pri čemu nastaje toksični ganciklovir-trifosfat. Također tvrde da citozin-deaminaza katalizira nastanak toksičnog 5-fluoruracila iz 5-fluorcitozina, a da purin-nukleozid-fosforilaza pretvara fludarabin-fosfat u toksični 2-fluoroadenin. Nastali toksični produkti se prilikom replikacije ugrađuju u DNA pri čemu blokiraju dalju sintezu te molekule, a zbog toga na kraju dolazi do stanične smrti. Radi sigurnosti i uspješnosti terapije važno je ustanoviti minimalnu potrebnu sistemsku koncentraciju prekursora čijom aktivacijom nastaje dovoljno toksičnih produkata za suzbijanje cijelog tumora. Potrebno je također obratiti pozornost i na utjecaj transgena na produkciju i stanje samog virusa jer virusno potomstvo mora što efikasnije inficirati ostale tumorske stanice. Citozin-deaminaza i purin-nukleozid-fosforilaza su primjeri spojeva koji ne djeluju štetno na sam virus pa se mogu koristiti u kombinaciji s mnogim sojevima virusima.



Slika 6. Ekspresijom unesenog transgena nastaju enzimi koji pretvaraju netoksične spojeve u toksične. Toksični spojevi difundiraju i do neinficiranih stanica te potiču njihovo uništavanje (slika preuzeta iz Miest et al., 2013).

Onkolitički virusi se mogu koristiti i u radioterapiji. Ugradnjom transgena za stanični simporter natrija i joda moguće je koncentrirati radioaktivni jod u tumorskim stanicama (Slika 7.). Koncentriranje radioaktivnih iona dovodi do trovanja i smrti tih stanica (Miest et al., 2014).



Slika 7. Smrt tumorskih stanica može se potaknuti trovanjem radioaktivnim jodom koji u stanice ulazi zahvaljujući Na-I simporteru kodiranom u preinačenom virusnom genomu (slika preuzeta iz Miest et al., 2013). Vrlo je popularno i „naoružavanje“ onkolitičkih virusa transgenima za stimulaciju imunskog sustava (Bauzon et al., 2014).



### 3.3.1. Imunoterapija

Nakon što onkolitički virusi liziraju tumorske stanice dolazi do imunskog odgovora, budući da je došlo do smrti stanice i otpuštanja tumorsko-specifičnih antigena. Iako različiti rezultati upućuju da dolazi do aktivacije urođene i stečene imunosti nakon virusom potaknute lize tumorskih stanica (Bauzon et al., 2014), ponekad je potrebno jače potaknuti imunski sustav kako bi došlo do dovoljno jakog protu-tumorskog odgovora. Stimuliranje imunskog sustava je strategija borbe protiv tumora koja je „primjenjiva na više vrsta tumora, omogućuje trajnu obranu od tumora, uzrokuje malo nuspojava te je dovoljno potentna“ za uspješnu borbu protiv tumora (Bauzon et al., 2014, prijevod A. K.). Stimulacija imunskog sustava podrazumijeva poticanje, odnosno jačanje imunskog sustava pacijenta, utišavanje supresije imunskog sustava od strane tumorskih stanica te pojačavanje antigenosti tumora radi postizanja što jačeg imunskog odgovora. Najuspješniji pristup za poticanje imunskog sustava je upotreba modificiranih onkolitičkih virusa s ugrađenim transgenom za čimbenik poticanja granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF) (Miest et al., 2013). Spomenuti čimbenik stimulira aktivaciju i nastanak granulocita i monocita te pojačava njihova fagocitna i citotoksična svojstva.

Jedna od glavnih strategija tumorskih stanica za izbjegavanje imunskog sustava jest njegova supresija. Bauzon i suradnici (2014) opisuju nekoliko mehanizama pomoću kojih tumori utječu na aktivaciju i samu aktivnost imunskih stanica. Neke vrste tumora (npr. melanom) eksprimiraju inhibirajući receptor CTLA-4 ("cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4"), koji ima veći afinitet za ligande B7.1 i B7.2. Navedeni ligandi bi vezanjem za receptor CD28 potaknuli aktivaciju T-limfocita, no zbog ekspresije CTLA-4 na tumorskim stanicama do toga ne dolazi pa tumorske stanice vješto „izbjegavaju“ imunski sustav. Kao moguću terapiju autori navode terapiju protutijelom koje se veže za CTLA-4 i onemogućava njegovo djelovanje (sprječavanje aktivacije T-stanica). Isti autori također navode da su pacijenti s melanomom bili tretirani protutijelom „ipilimumab“ protiv CTLA-4 te da je životni vijek tih pacijenata bio produžen za 3,5 mjeseca u odnosu na druge pacijente koji nisu bili liječeni tim protutijelom. Također, dokazano je da mnogi tumori (melanom, tumor pluća, jajnika) eksprimiraju i ligand PDL1. Funkcija liganda PDL1, kao i liganda PDL2, jest vezanje na PD1 („programed cell death“)

receptore T-stanica, B-stanica i NK-stanica. Zbog vezanja na receptor dolazi do inhibicije aktivnosti tih stanica.

Bauzon et al. (2014) konstatiraju da je do danas provedeno vrlo malo predkliničkih istraživanja koja kombiniraju upotrebu onkolitičkih virusa i tvari za sprječavanje supresije imunskog sustava. U članku se spominje da je testirana učinkovitost virusa vezikularnog stomatitisa s ugrađenim genom za antitijelo protiv CTLA-4 receptora. Autori tvrde da su rezultati pokazali da je došlo do uklanjanja makroskopskih implantata tumora u mnogih životinja na kojima su provedena istraživanja.

Onkolitički virusi omogućuju transport spojeva za uklanjanje supresije imunskog sustava na točno određeno mjesto, što čini ovaj tip terapije vrlo sigurnim. Također, ovaj pristup je i ekonomski isplativ, tim više što jedan virus može transportirati više različitih transgena. Usprkos tome, potrebna su još mnoga istraživanja kako bi se isključila mogućnost nastanka autoimunih i upalnih procesa (Bauzon et al., 2014).

Poticanje imunogenosti tumorskih stanica je vrsta imunoterapije koja se temelji na pojačavanju signala potrebnih za izazivanje imunskog odgovora. Prema istraživanjima Guo et al. (2014), infekcija tumorskih stanica onkolitičkim virusima uzrokuje imunogenu staničnu smrt zbog koje dolazi do aktivacije imunskog sustava. Pod imunogenom staničnom smrću se podrazumijevaju tipovi stanične smrti kod kojih dolazi do otpuštanja molekula koje potiču nastanak imunskog odgovora. Takve molekule mogu biti stranog porijekla (strane DNA, RNA, glikoproteini, lipoproteini itd.) ili domaćeg, tj. staničnog, porijekla (stanični proteini, DNA, RNA, proteini HMGB1 ("high-mobility group box 1 proteins"), proteini inducirani povišenjem temperature, ATP, mokraćna kiselina...). Za razliku od klasične apoptoze, pokazalo se da stanice tretirane onkolitičkim virusima ili citotoksičnim tvarima prilikom ulaska u apoptozu pojačano eksprimiraju proteine inducirane povišenom temperaturom ("heat shock proteins") kao i kalretikulin. Ti proteini su prilikom apoptoze izloženi na površini membrane zbog čega u konačnici dolazi do nastanka imunskog odgovora. Mnogi drugi spojevi također mogu potaknuti imunski odgovor. Prilikom infekcije stanica ljudskog melanoma virusom ospica, dolazi do otpuštanja citokina te proteina HMGB1, zaslužnih za nastanak protu-tumorskog odgovora. Prilikom infekcije tumorskih stanica onkolitičkim virusima često se otpuštaju spojevi kao ATP i mokraćna kiselina, koji se također tumače kao „signali opasnosti“. Zbog navedenih razloga se onkolitički virusi pokušavaju modificirati kako bi izazvali, odnosno "naveli", stanicu na put

imunogene stanične smrti (“imunogena apoptoza, nekroza i stanična smrt autofagijom“) (Guo et al., 2014). Budući da mnogi tumori ne ekspimiraju apoptotičke gene ili pojačano ekspimiraju protu-apoptotičke gene, moguće je potaknuti apoptozu infekcijom ovih stanica modificiranim onkolitičkim virusima u koje su ugrađeni geni za poticanje apoptoze. Autori članka tvrde kako bi takvo ugrađivanje gena za poticanje apoptoze ili nekroze u onkolitičke viruse uzrokovalo ponovnu aktivaciju određenog tipa stanične smrti u zaraženim tumorskim stanicama.

### 3.3.2. „Naoružavanje“ virusa s obzirom na tumorsku epigenetiku

Promjena genetičke informacije može potaknuti transformaciju stanica ukoliko je došlo do narušavanja funkcije produkata esencijalnih gena. Promjene se u tumorskim stanicama događaju i na epigenetičkoj razini, a dovode do utišavanja ili aktivacije određenih gena. U članku autora Forbes et al. (2013) opisane su epigenetičke promjene koje značajno utječu na fenotip tumorskih stanica (npr. hipermetilacija DNA je česta u tumorskim stanicama). Dvije fenotipske promjene nastale zahvaljujući modifikacijama epigenetičkog koda su „skrivenost“ tumorskih stanica od imunskog sustava i nemogućnost obrane od virusne infekcije.

Autori objašnjavaju da se „skrivenost“ tumorskih stanica temelji na nemogućnosti imunskog sustava da razlikuje normalne od transformiranih stanica. Mnogi tumori (npr. limfomi) izbjegavaju imunski sustav zahvaljujući nefunkcionalnoj antigenskoj prezentaciji. Prezentacija antigena je nužna kako bi imunski sustav mogao razlikovati tumorske od ostalih stanica te kako bi se mogao pokrenuti protu-tumorski imunski odgovor. Razlog nefunkcionalnosti puta za prezentaciju antigena su epigenetičke modifikacije (npr. deacetilacije ili metilacije DNA) koje uzrokuju utišavanje gena *MHC2TA* čiji je produkt transkripcijski faktor CIITA. Taj transkripcijski faktor je ključan za ekspresiju gena zaslužnih za prezentaciju antigena (molekule MHC skupine 1 i 2). Budući da ne dolazi do ekspresije molekula MHC, ne dolazi ni do prezentacije antigena na površini tumorskih stanica, a samim time niti do prepoznavanja tumorskih stanica od strane T-limfocita.

Ugradnjom gena za tumorski specifične antigene u genom onkolitičkih virusa može se potaknuti prezentacija antigena. Također, korištenje epigenetičkih modifikatora poput histonskih deacetilaza

(HDAC) pokazalo se korisnim prilikom poticanja prezentacije antigena, odnosno protutumorskog imunskog odgovora.

Za uspješnost onkolitičke terapije vrlo je važna činjenica da tumorske stanice ne mogu pokrenuti odgovor protiv virusnih čestica budući da većina tumorskih stanica ne može sintetizirati ili odgovoriti na interferon. Uzrok tome može biti „hipermetiliranost promotora gena uključenih u put interferona tipa 1 (npr. gen za IRF7) ili, u slučaju raka gastro-intestinalnog sustava, metiliranost gena *IRF 4,5,7* i *8* (Forbes et al., 2013, prijevod A.K.).

Replikaciju virusa osigurava i nemogućnost ulaska tumorskih stanica u apoptozu, što je posljedica epigenetičke utišanosti gena uključenih u poticanje apoptoze (npr. geni *Apo2/TRAIL*). Pokazalo se da su ti geni utišani u slučaju melanoma i leukemija.

Ugradnjom gena za 5-AZA (5-aza-2'-deoksicitidin), koji je inhibitor DNA-metiltransferaze, u genom onkolitičkih virusa, moguća je ponovna aktivacija epigenetički utišanih gena. Zahvaljujući inhibitoru 5-AZA može se potaknuti „TRAILom uvjetovan“ ulazak u apoptozu kao i odgovor stanica raka crijeva na interferon koji je onemogućen metilacijom gena *STAT 1-3*.

Zanimljivo je da se kombinacijom onkolitičkih virusa i inhibitora HDAC može postići replikacija virusa u tumorskim stanicama koje ne podržavaju virusnu replikaciju zbog sposobnosti tih stanica da sintetiziraju i odgovaraju na interferon. Ova strategija je od posebne važnosti za tumorske stanice koje umanjuju efikasnost virusne replikacije. U članku autora Tamura et al. (2012) objašnjeno je kako je moguće provesti terapiju protiv multififormnog glioblastoma budući da stanice tog tipa tumora ne podržavaju virusnu replikaciju. Koristili su oHSV (oncolytic *Herpes simplex virus*) te su zaključili da replikacija tog virusa nije efikasna u stanicama multififormnog glioblastoma. Kako bi optimizirali terapiju protiv ovog tipa tumora, u genom virusa su ugradili gen za citokin TRAIL čija je funkcija poticanje apoptoze. Budući da je replikacija oHSV-a u malom postotku ipak moguća u stanicama multififormnog glioblastoma, iako je jako usporena, dolazi i do ekspresije gena *TRAIL* te ulaska tumorskih stanica u apoptozu.

#### **4. Zaključak**

Na temelju svih spomenutih radova može se zaključiti da se onkolitička viroterapija ubrzano razvija, no i da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se osigurala njena efikasnost i uspješnost. Iako u teoriji ova terapija nema nedostataka, potrebno je provesti određene mjere sigurnosti prije njenog uvođenja u svakodnevnu kliničku praksu. Trenutno se klinički ispituje devet virusnih porodica *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Reoviridae*, *Poxviridae*, *Retroviridae* i *Rhabdoviridae*. Postoji opasnost da bi modificirani virusi mogli evoluirati i postati veća opasnost od samoga raka. Zbog toga je od iznimne važnosti predvidjeti i istražiti međudjelovanje virusa i različitih agensa, kao i kvalitetno opremiti laboratorije kako bi se izbjegla kontaminacija, tj. nekontrolorani rasprostranjivanje virusa. Također bi se i sami virusi trebali modificirati kako bi se moglo kontrolirati njihovo umnažanje pogotovo u slučaju da dođe do njihovog nepredviđenog rasprostranjivanja.

Kombiniranje onkolitičkih virusa s ostalim terapijama za suzbijanje tumora moglo bi biti efikasno i isplativo, no prije takvog pothvata je potrebno osigurati da primijenjeni lijekovi ne mijenjaju prirodu onkolitičkih virusa. Također je potrebno predvidjeti hoće li interakcije onkolitičkih virusa s virusima pacijenata imati kakve nepoželjne posljedice.

Rak je bolest koja do danas nije u potpunosti razjašnjena u velikoj mjeri zbog kompleksnosti tumora te sposobnosti tumorskih stanica da se prilagođavaju na nove uvjete. Smatram da bi terapiju onkolitičkim virusima, kombinacijom različitih terapijskih metoda te primjenom znanja stečenog istraživanjem tumora bilo moguće optimizirati i početi primjenjivati u kliničkoj praksi.

#### **5. Literatura:**

Ahmed A., Thaci B., Alexiades N., Han Y., Qian S., Liu F., Balyasnikova I., Ulasov I., Aboody K., Lesniak M., 2011a. Neural stem cell-based cell carriers enhance therapeutic efficacy of an oncolytic adenovirus in a northotopic mouse model of human glioblastoma. *Molecular Therapy* **19**, 1714-26

Ahmed A., Tyler M., Thaci B., Alexiades N., Han Y., Ulasov I., Lesniak M., 2011b. A comparative study of neural and mesenchymal stem cell-based carriers for oncolytic adenovirus in a model of malignant glioma. *Molecular Pharmaceutics* **8**, 1559-1572

Bauzon M., Hermiston T., 2014. Armed therapeutic viruses – a disruptive therapy on the horizon of cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology* **5:74**

Donnelly O., Harrington K., Melcher A., Pandha H., 2013. Live viruses to treat cancer. *Journal of the Royal Society of Medicine* **106**, 310-4

Forbes N., Abdelbary H., Lupien M., Bell J., Diallo J., 2013. Exploiting tumor epigenetics to improve oncolytic virotherapy. *Frontiers in genetics* **4:184**

Guo Z., Liu Z., Bartlett D., 2014. Oncolytic immunotherapy: dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity. *Frontiers in Oncology* **4:74**

Miest T., Cattaneo R., 2014. New viruses for cancertherapy: meeting clinical needs. *Nature Reviews Microbiology* **12**, 23-34

Smith T., Roth J., Friedman G., Gillespie Y., 2014. Oncolytic viral therapy: targeting cancer stem cells. *Oncolytic virotherapy* **3**, 21-33

Sze D., Reid T., Rose S., 2013. Oncolytic virotherapy. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* **24**, 1115-22

Tamura K., Wakimoto H., Agarwal A., Rabkin S., Bhere D., Martuza R., Kuroda T., Kasmieh R., Shah K., 2012. Multimechanistic Tumor Targeted Oncolytic Virus Overcomes Resistance in Brain Tumors. *Molecular therapy* **21**, 68-77

Willmon C., Harrington K., Kottke T., Prestwich R., Melcher A., Vile R., 2009. Cell carriers for oncolytic viruses: Fed ex for cancer therapy. *Molecular Therapy* **17**, 1667–1676

## **6. Sažetak**

Usprkos brojnim dosad razvijenim terapijama, rak je jedan od najčešćih uzročnika smrti današnjice te njegovo liječenje predstavlja pravi izazov. U posljednje se vrijeme intenzivno radi na razvijanju onkolitičke viroterapije, koja se ističe svojom efikasnosti i sigurnosti uslijed ograničenosti djelovanja na tumorske stanice. Ovaj oblik terapije podrazumijeva korištenje onkolitičkih virusa koji selektivno inficiraju i liziraju tumorske stanice. Trenutno se klinički ispituje devet virusnih porodica: *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Reoviridae*, *Poxviridae*, *Retroviridae* i *Rhabdoviridae*. Za usavršavanje onkolitičke terapije potrebno je zadovoljiti nekoliko uvjeta koji se odnose na zaobilazanje imunskog

sustava, pojačavanje selektivnosti virusa za tumorske stanice te na „naoružavanje“ virusa. Sprječavanje neutralizacije virusa djelovanjem imunskog sustava najčešće se provodi metodama izmjene serotipa, kemijskim modifikacijama virusnih epitopa ili korištenjem stanica transportera. Sve se više proučava mogućnost transporta onkolitičkih virusa matičnim stanicama budući da neke od njih pokazuju svojstvo spontane migracije prema određenim vrstama tumora. Selektivnost za tumorske stanice može se dodatno poboljšati unošenjem gena čiji će produkti specifično vezati virusni antigen. Infekcije netransformiranih stanica mogu se spriječiti metodama negativnog i pozitivnog „ciljanja“. „Naoružavanje“ onkolitičkih virusa provodi se njihovim modifikiranjem, kojim se dodatno potiče liza tumorskih stanica, a može se i stimulirati imunski sustav pacijenta. Uništavanje tumorskih stanica pojačava se, na primjer, opremanjem virusa transgenima za enzime koji pretvaraju netoksične prekursore u toksične produkte unutar tumorskog mikrookoliša ili koncentriranjem radioaktivnog joda u tumorskim stanicama pomoću transgena za stanični simporter natrija i joda. „Naoružavanje“ se može provesti i s obzirom na tumorsku epigenetiku budući da prilikom transformacije stanica dolazi do promjene epigenetičkog koda. Jedna od obećavajućih strategija borbe protiv tumora je i imunoterapija, koja podrazumijeva poticanje imunskog sustava pacijenta, ublažavanje supresije imunskog sustava od strane tumorskih stanica te pojačavanje imunogeničnosti tumora radi postizanja što jačeg imunskog odgovora.

## **7. Summary**

In spite of the many therapies developed so far, cancer is still regarded as one of the most common death causes and it therefore presents a real challenge. Much effort has lately been devoted to development of oncolytic virotherapy because of its effectiveness and safety, due to its ability to specifically target tumor cells. This therapy uses oncolytic viruses to selectively infect and to lyse tumor cells. Currently, nine different families of viruses are used in clinical trials: *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Reoviridae*, *Poxviridae*, *Retroviridae* i *Rhabdoviridae*. There are several conditions that have to be satisfied for further improvement of oncolytic virotherapy, and they relate to bypassing the immune system, modifying viruses in order to enhance their specificity for tumor cells and “virus arming”. Neutralization of viruses by the immune system is most commonly overcome through

serotype exchange, chemical modification of virus epitopes, or by using cell carriers. Much research focuses on employing stem cells to carry oncolytic viruses because some stem cell types spontaneously migrate towards certain types of tumors. Tumor cell specificity can be further enhanced by introducing genes whose products specifically bind viral antigens. Infection of untransformed cells can be prevented by positive or negative targeting. “Arming” of oncolytic viruses is achieved by modifying them so as to further enhance the lysis of tumor cells and stimulate the patient’s immune system. Destruction of tumor cells can be promoted in various ways, for example by arming viruses with transgenes for enzymes that convert non-toxic precursors into toxic metabolites in the tumor microenvironment, or by employing transgenes for sodium-iodide symporter which concentrate radioactive iodide ions in tumor cells. “Arming” of viruses can also be carried out with regard to tumor epigenetics since transformation of cells alters the epigenetic code. One of the promising strategies in fighting cancer is immunotherapy, which involves boosting the patient’s immune system, decreasing the tumor-induced immunosuppression as well as increasing the immunogenicity of the tumor in order to strengthen the immune response.