

# Primjena onkolitičkih virusa u terapiji tumora

---

Debić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:217:224671>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**PRIMJENA ONKOLITIČKIH VIRUSA U TERAPIJI TUMORA**

**THE APPLICATION OF ONCOLYTIC VIRUSES IN TUMOR THERAPY**

**SEMINARSKI RAD**

Sara Debić

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate study of Molecular Biology)

Mentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2019.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. METODE CILJANJA STANICA RAKA ONKOLITIČKIM VIRUSIMA.....	3
2.1. MODULACIJA PATOGENOSTI ONKOLITIČKIH VIRUSA MUTACIJOM VIRUSNIH GENA.....	3
2.2. CILJANA EKSPRESIJA VIRUSNIH GENA U TUMORSKIM STANICAMA.....	6
2.3. PREUREĐIVANJE RECEPTORA I MEMBRANSKIH FUZIJSKIH PROTEINA VIRUSA ZA CILJANJE TUMORSKIH STANICA.....	8
3. PREUSMJERAVANJE IMUNOSNOG SUSTAVA POMOĆU ONKOLITIČKIH VIRUSA.....	11
4. KOMBINIRANA TERAPIJA S ONKOLITIČKIM VIRUSIMA I DODATNIM ANTITUMORSKIM TERAPIJAMA.....	13
4.1. IMUNOVIROTERAPIJA.....	14
4.2. MODULACIJA TUMORSKOG MIKROOKOLIŠA.....	18
4.3. RADIOVIROTERAPIJA I KEMOVIROTERAPIJA.....	20
5. ONKOLITIČKI VIRUSI U KLINIČKIM ISTRAŽIVANJIMA.....	22
6. PREDNOSTI I MANE PRIMJENE ONKOLITIČKIH VIRUSA U TERAPIJI TUMORA...	24
7. LITERATURA.....	26
8. SAŽETAK.....	29
9. SUMMARY.....	30

## Popis kratica

H-1PV - parvovirus H1

HSV - virus herpesa simplex

CAR - coxsackie i adenovirusni receptor

CEA - karcinoembrionski antigen (engl. *carcinoembryonic antigen*)

MHC - glavni kompleks tkivne snošljivosti

IL-13 - interleukin 13

DAMP - molekularni uzorak povezan s opasnosti (engl. *danger-associated molecular pattern*)

PAMP - molekularni uzorak povezan s patogenima (engl. *pathogen-associated molecular pattern*)

IL-4 - interleukin 4

IL-10 - interleukin 10

TGF- $\beta$  - čimbenik rasta tumora beta

IL-2 - interleukin 2

IL-12 - interleukin 12

IL-18 - interleukin 18

CCL5 - kemokinski ligand 5

T-VEC - Talimogene laherparepvec

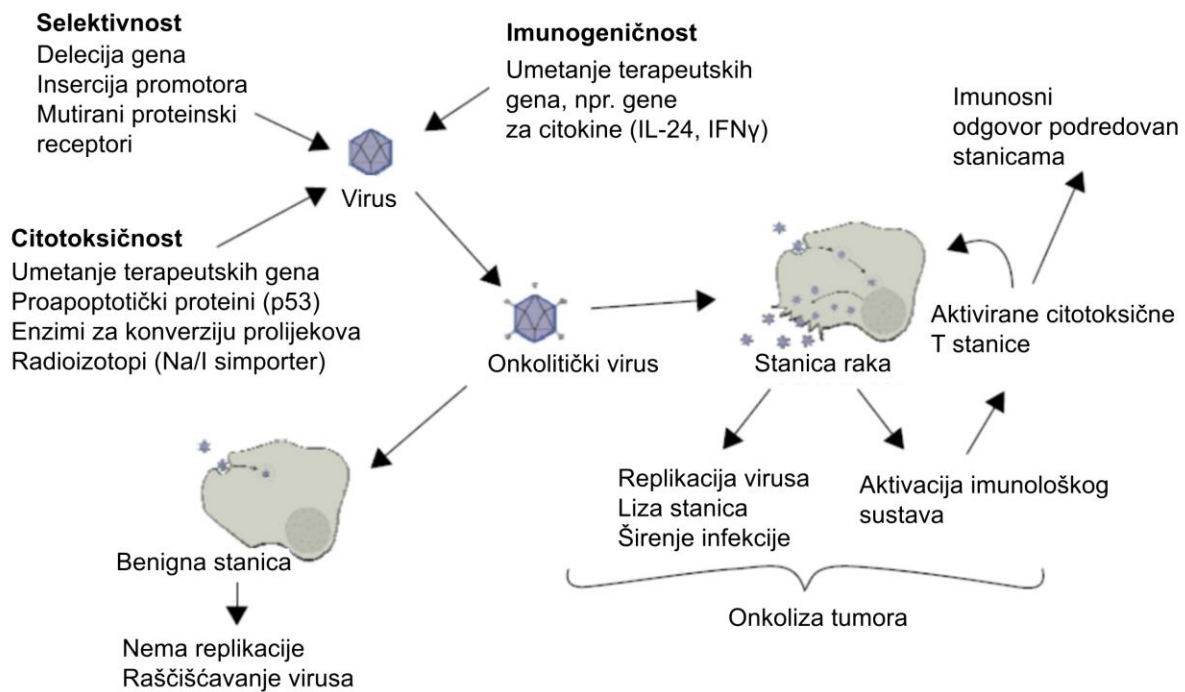
GM-CSF - granulocitno-makrofagni čimbenik stimulacije rasta kolonija

TNF- $\alpha$  - čimbenik nekroze tumora alfa

IFN- $\gamma$  - interferon gama

## 1. UVOD

Onkolitički virusi su definirani kao virusi koji inficiraju, repliciraju se unutar, i liziraju stanice raka, a nisu sposobni inficirati benigne stanice normalnih tkiva (Aref i sur., 2016; Tsun i sur., 2016). Ideja da su replicirajući virusi sposobni ubiti maligne stanice je postavljena početkom 20. stoljeća. Već u 1904. godini, Dock je opisao dva slučaja povlačenja kronične leukemije kada su pacijenti bili inficirani virusom influenze, iako su oba slučaja u konačnosti završila s povratkom leukemije (Dock, 1904). Tijekom 1970-ih godina, objavljeno je mnoštvo radova koji opisuju dramatično poboljšanje stanja pacijenata s limfoblastičnom leukemijom, Hodginskim limfomom, i Burkittovim limfomom tijekom infekcije s divljim tipom virusa ospica (Pasquinucci, 1971; Zygiert, 1971; Ziegler, 1976). Razvoj metoda za uzgajanje kultura stanica tijekom 1940-ih godina je omogućilo proučavanje i razumijevanje propagaciju virusa i također je pokazalo ciljno inficiranje tumorskih staničnih linija s onkolitičkim virusima, što je značajno pridonosilo istraživanjima o njihovom terapijskom potencijalu (Sanford i sur., 1948). Međutim, onkolitički virusi nisu ozbiljno shvaćeni kao metoda terapije raka zbog zabrinutost oko javne sigurnosti, i tek tijekom 1990-ih godina kada su razvijene metode genetskog inženjerstva oni se opet intenzivno istražuju. Metode genetskog inženjerstva omogućile su ciljano preuređivanje gena virusa za infekciju isključivo tumorskih stanica, što se pokazalo neophodno za njihovu uporabu u terapiji protiv raka. Metode genetskog inženjerstva su također omogućile kombiniranje terapije onkolitičkim virusima s drugim terapijama, na primjer kemoterapijom ili imunoterapijom (Tsun i sur., 2016). U novije vrijeme prihvaćena je činjenica kako onkolitički virusi pridonose terapiji tumora ne samo kroz direktnu citotoksičnu lizu stanica raka, nego i kroz aktivaciju adaptivnog imunološkog odgovora koji ih ciljano ubija (Pol i sur., 2016). Područje koje istražuje primjenu onkolitičkih virusa u razvoju imunosti protiv tumora naziva se onkolitička imunoterapija (Tsun i sur., 2016). Mogućnost genetske modifikacije onkolitičkih virusa i spoznaja da je infekcija s onkolitičkim virusima sposobna preusmjeriti imunosti sustav na prepoznavanje i ubijanje stanica raka upućuje na njihov veliki potencijal u terapiji tumora (Slika 1).

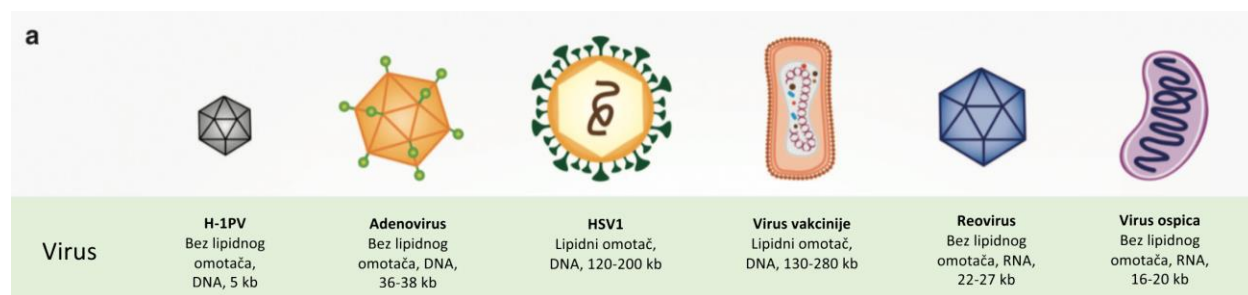


Slika 1. Shematski prikaz djelovanja onkolitičkih virusa

Izvor: [https://www.dovepress.com/cr\\_data/article\\_fulltext/s53000/53858/img/fig1.jpg](https://www.dovepress.com/cr_data/article_fulltext/s53000/53858/img/fig1.jpg)

## 2. Metode ciljanja stanica raka onkolitičkim virusima

U onkolitičkoj viroterapiji tumora bitno je primijeniti viruse koji su sposobni inficirati i replicirati se unutar stanica raka i tumorskog mikrookoliša, a koji istovremeno ne ciljaju benigne stanice tkiva. Iako mnogi virusi, na primjer reovirus, virus Newcastle-ove bolesti (engl. *Newcastle disease virus*), virus zaušnjaka (engl. *mumps virus*), i virus molonijeve leukemije (engl. *Moloney leukemia virus*) pokazuju prirodni tropizam prema stanicama raka, mnogi virusi koji se trenutno istražuju kao onkolitički virusi u terapiji tumora su genetski promijenjeni da specifično inficiraju stanice raka (Slika 2) kao na primjer adenovirus, virus ospica, i virus herpesa simplex (Russell i sur., 2012). Primjeri metoda koje se koriste za ciljanje malignih stanica su: 1) mutacija gena potrebnih za patogenost virusa, 2) regulacija ekspresije i translacije esencijalnih virusnih proteina pomoću čimbenika iz signalnih puteva prisutnih isključivo u tumorskim stanicama, i 3) ciljano mijenjanje virusnih membranskih fuzijskih proteina u svrhu prepoznavanja receptora specifičnih za stanice raka (Russell i sur., 2012).



Slika 2. Primjeri virusa koji se koriste u onkolitičkoj terapiji tumora

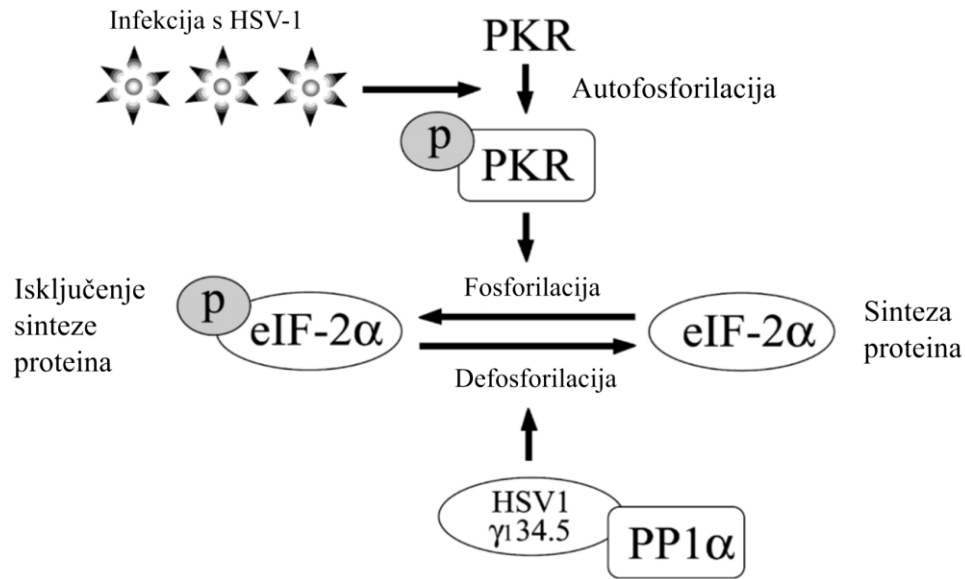
Izvor: Ungerechts i sur., 2016

## 2.1. Modulacija patogenosti onkolitičkih virusa mutacijom virusnih gena

Mnogo virusnih proteina sudjeluje u obrani virusa od imunskog sustava domaćina i u replikaciji unutar stranih stanica, a mutacije u genima određenih ključnih proteina onesposobljuju virus za uspješnu infekciju stanice. Ova činjenica se može iskoristiti u ciljanju stanica raka onkolitičkim virusima. Stanice raka često imaju defektne procese antivirusne obrane i veće količine proteina uključenih u replikaciji stanice što omogućuje mutiranim virusima da se tamo repliciraju. Postoji mnogo uspješno mutiranih virusnih sojeva za ciljanu infekciju tumorskih stanica.

Modificirani virus herpesa simplex-a (HSV) se istražuje kao prigodni kandidat za onkolitičku viroterapiju, i konstruirano je mnoštvo različitih mutanata pomoću tehnika genetskog inženjerstva za modulaciju patogenosti virusa (Sokolowski i sur., 2015). HSV tip 1 i tip 2 prirodno inficiraju ljudske stanice koje se ne dijele, na primjer neurone, stoga ovi virusi u genomu sadrže gene koji kodiraju viralne homologe proteina uključenih u metabolizam nukleotida i sintezu DNA. Mutant *dlsp<sup>tk</sup>* HSV-1 sadržava deleciju unutar gena *UL23* (engl. *unique long region 23*) koji kodira viralni homolog timidin kinaze, dok mutant *hrR3* sadržava insercijsku mutaciju unutar gena *UL39* za veliku podjedinicu ribonukleotid reduktaze. Ovi delecijски mutanti se stoga repliciraju samo u stanicama raka koje se intenzivno dijele i pojačano ekspimiraju enzime timidin kinazu i ribonukleotid reduktazu. Mutant HSV-1 R3616 sadržava mutacije u genu *RL1* (engl. *repeat long region 1*) koji je neophodan za neurovirulentnost HSV-a. Ovaj gen kodira protein ICP34.5, čija je funkcija defosforilacija eIF-2 $\alpha$  (engl. *eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$* ) i pri tome omogućuje početak translacije virusnih proteina unutar stanice domaćina (Slika 3). Inače stanica domaćina kao odgovor na stres ili virusnu infekciju pomoću protein kinaze R fosforilira eIF-2 $\alpha$ , što uvjetuje prestanak translacije i zatim inhibiciju replikacije virusa. Mutant HSV-1 R3616, pošto ne producira protein ICP34.5 koji omogućuje translaciju unutar stanice domaćina, jedino se replicira u stanicama raka koje su karakterizirane nekontroliranom sintezom proteina. Spomenute mutante su pokazale mješovite rezultate u kliničkim istraživanjima, i novije razvijeni sojevi mutiranih onkolitičkih HSV-a sadržavaju kombinacije više mutacija u svrhu sprječavanja mogućnost povratka u virulentni soj (Sokolowski i sur., 2015).





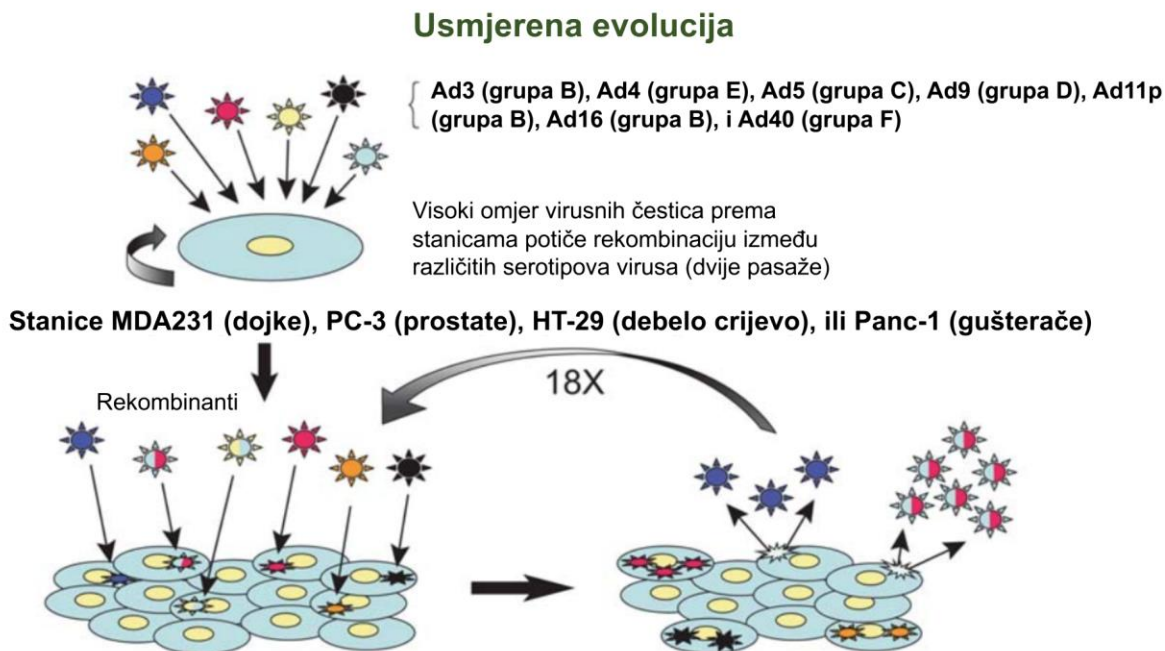
Slika 3. Slikovni prikaz regulacije inicijacijskog čimbenika eIF-2a

Izvor: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/64/7/2561>

Primjer genetički modificiranog adenovirusa koji se često koristi u istraživanjima onkolitičke viroterapije je adenovirus koji potječe iz Ad5 serotipa s 24 izbrisanih nukleotida iz gena koji kodira protein E1A. Protein E1A je prva transkripcijska jedinica adenovirusa, i omogućuje disocijaciju kompleksa retinoblastoma (Rb)/E2F što rezultira sa slobodnom E2F jedinicom koja aktivira daljnje rane transkripcijske jedinice virusa E1B, E2, E3, i E4 (Shaw i Suzuki, 2016). Stoga se mutantni adenovirus s nefunkcionalnim E1A isključivo može replicirati u stanicama raka koje imaju visoku razinu slobodnog E2F-a.

Uz ciljano mutiranje određenih virusnih gena, znanstvenici su također razvili onkolitičke viruse pomoću takozvane usmjerene evolucije (Kuhn i sur., 2008). Ova metoda podrazumijeva pasažiranje raznih tumorskih staničnih linija s više različitih serotipova jedne virusne vrste, što omogućuje rekombinaciju između serotipova i razvoj novih potentnih virusnih varijanti bez nužnog poznavanja mehanizama zaslužnih za razvoj boljeg terapijskog potencijala. Pomoću usmjerene evolucije (Slika 4) je razvijen kimerni adenovirus ColoAd1, koji je rekombinantni produkt virusnih serotipova Ad11p i Ad3 i pokazuje povišenu razinu terapijske aktivnosti za otprilike dva log intervala u odnosu na najistraženiji adenovirusni serotip Ad5. ColoAd1 je osobito

prilagođen za infekciju stanica raka debelog crijeva, i dokazano je da može primiti transgene čiji produkti imaju terapijsku aktivnost bez poremećaja životnog ciklusa virusa (Kuhn i sur., 2008).



*Slika 4. Slikovni prikaz metode usmjerene evolucije za razvoj potentnog onkolitičkog adenovirusa*

Izvor: Kuhn i sur., 2008

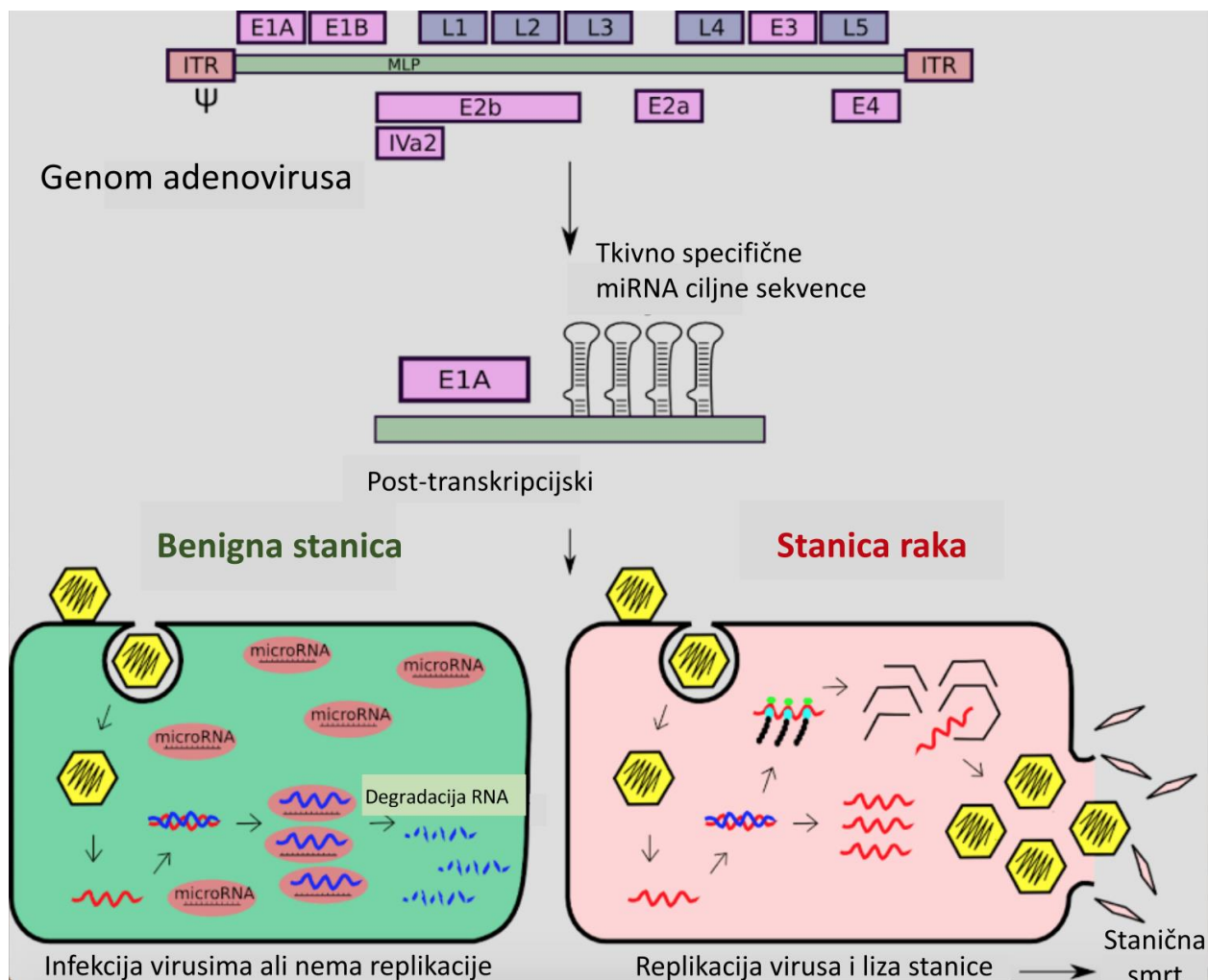
## 2.2. Ciljana ekspresija virusnih gena u tumorskim stanicama

Iako su delecijske mutante virusa pokazale uspješnost u ciljanju tumorskih stanica, često inaktivacija ključnih virusnih gena izaziva blaži onkolitički učinak (Sokolowski i sur., 2015). Da bi se to spriječilo počeli su se konstruirati virusi koji reguliraju ekspresiju virusnih gena pomoću tkivno-specifičnih promotora. Na primjer, mutant virusa herpesa simplexa G92A sadržava gen *RL1* koji kodira esencijalni virusni transkripcijski promotor ICP4 pod kontrolom albuminskog promotora eksprimiranog isključivo u stanicama jetre (Miyatake i sur., 1997). Također postoje mutante virusa herpes simplex G209 koje imaju *RL1* gen pod kontrolom *B-myb* promotora ili promotora aktiviranog nestinom (Chung i sur., 1999; Kambara i sur., 2005). *B-myb* je transkripcijski regulator uključen u stanične puteve proliferacije i diferencijacije i manje je

ekspresiran u benignim stanicama tkiva, a nestin je protein intermedijarnih filamenti čija ekspresija je utišana kod odraslih ali je pojačano ekspresirana u malignim gliomima (Sokolowski i sur., 2015).

Ekspresija virusnih gena se također može utišati pomoću microRNA (miRNA) molekula (Slika 5) specifičnih za određena tkiva (Russell i sur., 2012). MicroRNA su regulirajuće RNA molekule koje se vežu za komplementarnu 3' netranslatirajuću regiju (engl. *3' untranslated region*) gena i blokiraju njegovu ekspresiju (Sokolowski i sur., 2015). Stanice raka često imaju nižu razinu ekspresije endogenih miRNA u usporedbi sa stanicama normalnog tkiva, što znači stanice raka nisu uvijek sposobne inhibirati ekspresiju gena pomoću miRNA. Koristeći ovu činjenicu dobiveni su značajni rezultati na virusu Coxsackie (engl. *Coxsackievirus*) A21, snažnom onkolitičkom virusu koji uz tumorske stanice inficira i mišićne stanice i uzrokuje fatalni miozitis. Dodatkom slijeda koji cilja miRNA specifične za mišićno tkivo u 3' netranslatirajuću regiju virusnog genoma se sprečava virusna infekcija mišićnog tkiva i ne oslabljuje se onkolitička aktivnost virusa (Kelly i sur., 2008). U virusni genom se može dodati više miRNA ciljnih slijedova, što inhibira replikaciju virusa u više različitih tkiva. Tako je onkolitički virus ospica prerađen da sadrži tri ciljna miRNA slijeda koje sprečavaju ekspresiju virusnih gena u mozgu, jetri, i gastrointestinalnom sustavu (Aref i sur., 2016). Također jedan soj virusa herpesa simplexu sadržava čak četiri microRNA ciljna slijeda u 3' netranslatirajuću regiji gena za glikoprotein H (Sokolowski i sur., 2015).

Jedan od nedostataka upotrebe microRNA u regulaciji patogenost virusa je opasnost da ciljni slijedovi microRNA mutiraju, dakle microRNA gubi sposobnost vezanja za virusni genom, i tako vodi do infekcije neciljanih stanica (Russell i sur., 2012). Ovo se može spriječiti korištenjem dva ili više mehanizama za kontrolu ekspresije virusnih gena; na primjer, jedan onkolitički adenovirus je reguliran promotorom specifičnim za telomerazu i s microRNA koja cilja gen za E1 replikacijski inicijacijski protein (Sugio i sur., 2011).



Slika 5. Shema uporabe miRNA u onkolitičkoj viroterapiji

Izvor:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Oncolytic\\_adenovirus\\_controlled\\_by\\_microRNA\\_response\\_element.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Oncolytic_adenovirus_controlled_by_microRNA_response_element.png)

### 2.3. Preuređivanje receptora i membranskih fuzijskih proteina virusa za ciljanje tumorskih stanica

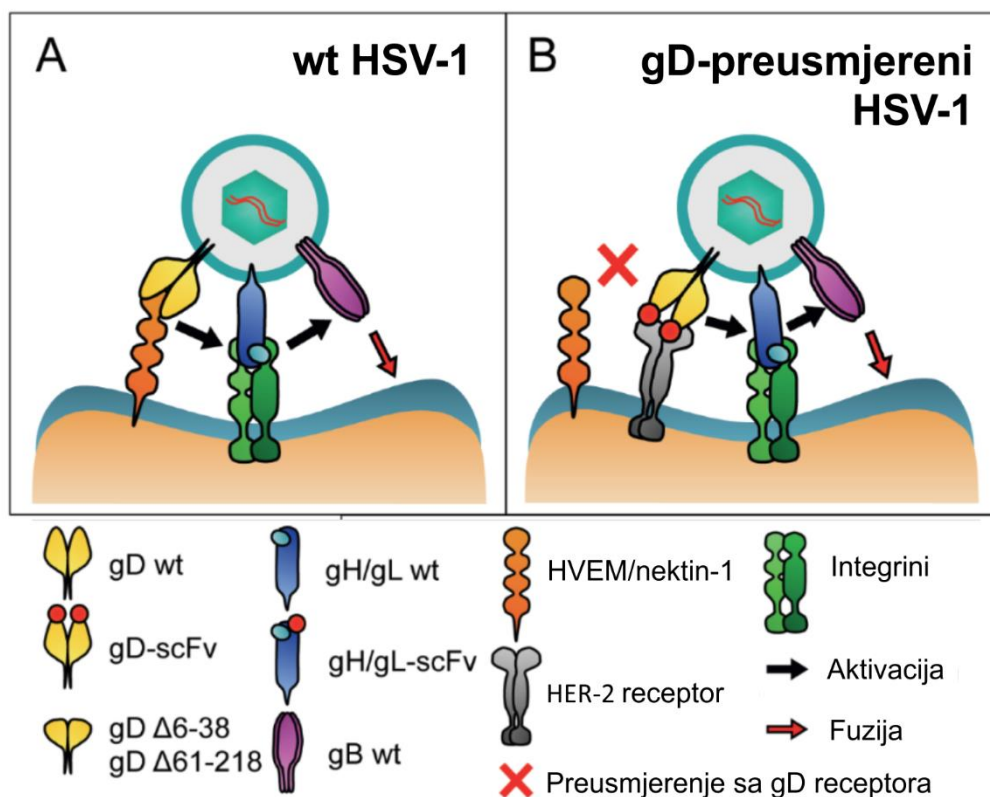
Virusi ciljaju specifične stanične receptore za ulazak u stanicu domaćina, i virusni proteini za prepoznavanje ciljnog receptora mogu se modificirati za prepoznavanje karakterističnih tumorskih biljega, kao što su receptor epidermalnog čimbenika rasta, receptor za folat, ili CD20 - inače limfocitni antigen na B stanicama (Russell i sur., 2012). U slučaju adenovirusnog serotipa

Ad5, tumorske stanice ne ekspimiraju njihov ciljni coxsackie i adenovirusni receptor (CAR) (Shaw i Suzuki, 2016). Virusna Ad5 proteinska vlakna (engl. *protein fibers*) presudna su za prepoznavanje staničnog receptora, naročito kada su modificirana da sadrže tripeptid arginin-glicin-aspartat, poznat kao motiv RGD, koji stvara jače međureakcije s integrinima (Shaw i Suzuki, 2016). Integrini su proteini koji pridonose usidravanju stanica u izvanstanični matriks i dokazano je da pojedine vrste raka, na primjer rak prostate i rak jajnika, imaju više razine ekspresije integrina (Danen, 2013; Shaw i Suzuki, 2016). Također, proteinska vlakna serotipa Ad5 su zamijenjena s vlaknima iz drugih serotipova adenovirusa. Na primjer, za ulazak u stanicu, vlakna serotipa 35 prepoznaju CD46, receptor prekomjerno ekspimiran u stanicama raka dojke i raka debelog crijeva, a vlakna serotipa 3 koriste desmoglein 2, komponente epitelnog adhezijskog sustava u mnogim epitelnim malignim bolestima (Shaw i Suzuki, 2016).

Imunoglobulini su također koristan alat u genetskoj modifikaciji virusnih receptora zbog svoje visoke specifičnosti za određene antigene. Na primjer, virus ospice prepoznaje ciljne stanice domaćina pomoću međureakcije između H proteina i receptora za prepoznavanje staničnih biljega (Aref i sur., 2016). Za ciljanje tumorskih stanica, rekombinantni H protein na C-kraju sadržava varijabilne domene antitijela protiv tumorskih biljega kao što su CEA (engl. *carcinoembryonic antigen*, isto poznat kao CD66), CD20, i CD38. Atenuirani virus ospica sadrži jednolančane T-stanične receptore koji mogu biti dodatno modificirani za prepoznavanje specifičnih molekula glavnog kompleksa tkivne snošljivosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*). Virus ospica također može biti preusmjeren na tumorske stanice mijenjanjem virusnog membranskog fuzijskog proteina (Aref i sur., 2016). Virusi s lipidnom ovojnicom koriste membranske fuzijske proteine za ulazak u stanice domaćina, i ovi proteini služe za stapanje virusne membrane sa staničnom membranom (Kielian, 2014). Fuzijski protein virusa ospica se sintetizira kao inaktivni prekursor F<sub>0</sub>, i cijepa se u dvije aktivne podjedinice F<sub>1</sub> i F<sub>2</sub> pomoću stanične proteaze furin. Furin prepoznaje slijed od pet bazičnih aminokiselina za cijepanje F<sub>0</sub>, a ovaj slijed se može modificirati za prepoznavanje od strane metaloproteaza. Karakteristično je da tumorske stanice luče matriksne metaloproteaze (engl. *matrix metalloproteinases*) za razaranje izvanstaničnog matriksa i invaziju tkiva, stoga promjenom ciljnog slijeda je osigurano da samo tumorske stanice imaju sposobnost cijepanja F<sub>0</sub> i virus ospica može samo njih uspješno inficirati (Aref i sur., 2016).

Virus herpesa simplex I se također preusmjerava na tumorske stanice pomoću rekombinantnih virusnih membranskih glikoproteina (Sokolowski i sur., 2015). HSV-1 sadržava

oko 12 glikoproteina u svojoj ovojnici, a glikoproteini gB, gC, gD, i gH su potrebni za fuziju virusne i stanične membrane (Pereira i sur., 1989). U prvoj mutanti HSV-1, regija gB i gC koja prepoznaje proteoglikan heparan sulfat je zamijenjena s IL-13. Također je N-kraju gD, koji se inače veže na ulazni posrednik herpesvirusa (engl. *herpesvirus entry mediator*), zamijenjen s IL-13 (Slika 6). IL-13 se koristi za ciljanje onkolitičkog HSV na IL-13Ra2 receptor karakterističan za maligne gliome i astrocitome. U drugoj mutanti, funkcionalno neobavezna regija gD je zamijenjena s jednolančanim antitijelom trastuzumab koje cilja receptor epidermalnog čimbenika rasta 2. Epidermalni čimbenik rasta 2 je eksprimiran na oko četvrtini vrsta stanica raka dojke i na stanicama raka jajnika (Sokolowski i sur., 2015). Iako mnogo onkolitičkih virusa s preusmjerenim receptorima ne cilja svoje uobičajne stanice mete, modificirani virusi ipak pokazuju sniženi reproduktivni potencijal u odnosu na divlji tip (Sokolowski i sur., 2015).



Slika 6. Slikovni prikaz preusmjerenja HSV-1 receptora gD na epidermalni čimbenik rasta 2

Izvor: <https://www.mdpi.com/1999-4915/8/3/63>

### 3. Preusmjeravanje imunskog sustava pomoću onkolitičkih virusa

Tradicionalno se smatralo da glavni mehanizam učinkovitosti onkolitičkih virusa je razaranje tumorskih stanica pomoću direktne citotoksične lize posredovane virusima (Bartlett i sur., 2013). Novija istraživanja pokazuju kako onkolitički virusi također mogu indirektno pridonositi ubijanju tumorskih stanica tako što razaraju endotelne stanice i induciraju oštećenja krvožilja unutar tumora, što izaziva apoptozu i nekrozu neinficiranih malignih stanica. U zadnje vrijeme se smatra kako je aktivacija antitumorskog imunskog odgovora pomoću onkolitičkih virusa glavna komponenta njihove učinkovitosti u razaranju raka. Sve više dokaza ukazuje na to da onkolitički virusi izazivaju imunogenu staničnu smrt (engl. *immunogenic cell death*), izraz koji se koristi za mehanizam stanične smrti koji inducira imunski odgovor najčešće kroz oslobađanje molekularnih obrazaca povezanim s oštećenjem (DAMPs, engl. *damage-associated molecular patterns*) (Marchini i sur., 2016). Imunogenična apoptoza, nekroza, autofagna stanična smrt, i piroptoza (engl. *pyroptosis*) sve su mehanizmi ubijanja tumorskih stanica uzrokovani onkolitičkim virusima koji spadaju pod imunogenu staničnu smrt (Bartlett i sur., 2013) (Tablica 1).

Tablica 1. Objašnjenja četiri tipa imunogene stanične smrti

Vrste stanične smrti	Imunogeničnost
<b>Apoptoza</b> (stanična smrt tipa 1). Apoptoza je popraćena zaokruživanjem stanice, retrakcijom pseudopodija, smanjenjem staničnog volumena, kondenzacijom kromatina, fragmentacijom jezgre, ispušćenjem stanične membrane, međutim cjelovitost stanice je sačuvana do finalnih faza procesa.	<b>Neke vrste apoptoze nisu imunogenične, dok druge jesu imunogenične.</b> Preapoptotičko izlaganje CRT-a i HSP70/HSP90 na staničnoj površini možda ima veliki utjecaj na imunski sustav. Također, ispuštanje HMGB1 tijekom kasne faze apoptoze potiče procesiranje antigena u dendritičkim stanicama i tako uzrokuje aktivaciju citotoksičnih stanica T.
<b>Autofagna stanična smrt</b> (ACD; stanična smrt tipa 2). Odvija se bez kondenzacije kromatina ali je popraćena masivnom autofagnom vakuolizacijom citoplazme. Termin ACD označava autofagnu staničnu smrt.	<b>Visoka.</b> Može poticati ispuštanje DAMP-ova (HMGB1, ATP, i ostali) i izazvati značajnu upalu.
<b>Nekroza</b> (stanična smrt tipa 3). Karakterizirana povećanjem staničnog volumena, nateknućem organela i kidanje stanične membrane, što uzrokuje gubitak unutarstaničnog sadržaja, uključujući HMGB1, ATP, itd.	<b>Visoka.</b> Uzrokuje ispuštanje DAMP-ova i potiče lokalnu upalu i utječe na lokalno okruženje.

**Piroptoza** (ili kaspaza-1-ovisna stanična smrt). Upalni oblik stanične smrti posredovana inflamasonom i aktivacije kaspaze-1, uzrok su razni patološki poticaji, na primjer mikrobnna infekcija, moždani udar, srčani udar, ili rak.

**Visoka.** Upalni oblik stanične smrti zbog ispuštanja citokina i gubljenja citoplazmatskog sadržaja. Međutim, neki patogeni kodiraju za imunosupresivne proteine.

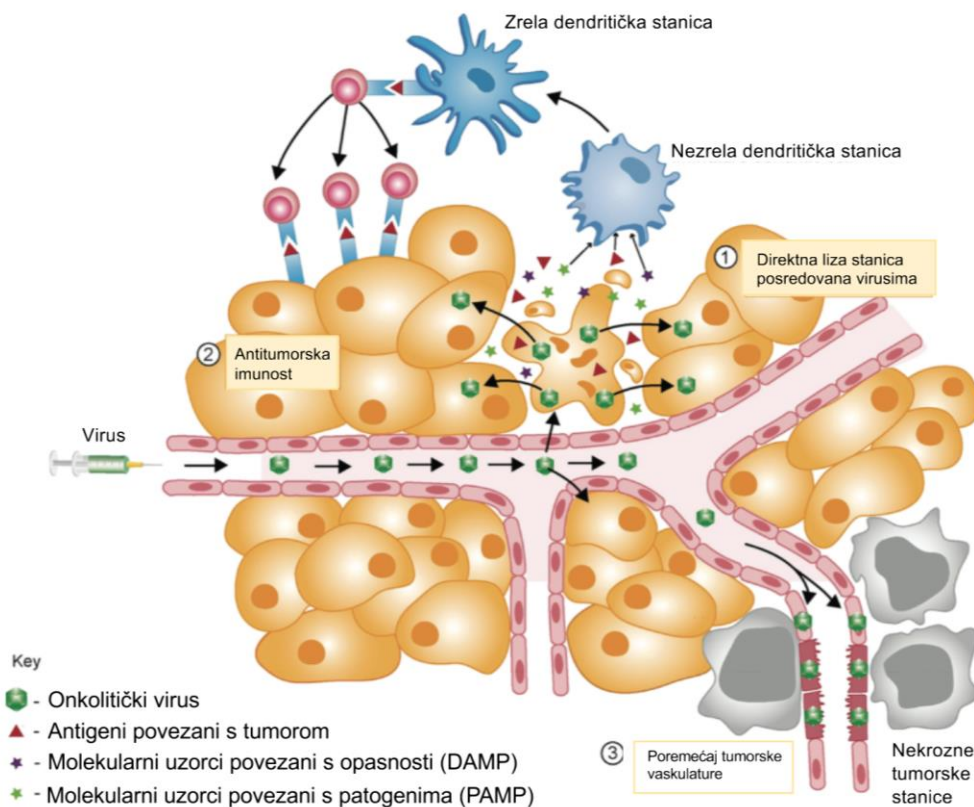
*Kratice: CRT - kalretikulin, HSP70/HSP90 - heat shock protein, HMGB1 - high mobility group box 1 protein, DC - dendritičke stanice*

Izvor: Bartlett i sur., 2013

Ovi mehanizmi uzrokuju predočavanje DAMP-ova i molekularnih obrazaca povezanih s patogenima (PAMPs, engl. *pathogen-associated molecular patterns*) kao i predočavanje antigena povezanih s tumorima (engl. *tumor associated antigens*) dendritičkim stanicama za aktivaciju antitumorskog i antivirusnog imunskog odgovora (Bartlett i sur., 2013). Primjeri DAMP-ova oslobođenih iz tumorskih stanica ubijenih onkolitičkim virusima uključuje izloženost kalretikulina na površini stanice, izvanstanično oslobađanje amfoterina (HMGB1, engl. *high mobility group box 1 protein*), lučenje ATP-a i oslobađanje proteina toplinskog šoka (engl. *heat shock protein*) te raznih citokina (Marchini i sur., 2016). Primjeri PAMP-ova povezanih s lizom posredovanom onkolitičkim virusima su virusne nukleinske kiseline (DNA, ssRNA, dsRNA) i virusni proteini, kao i elementi virusne kapside. DAMP-ove i PAMP-ove prepoznaju stanice urođene imunosti pomoću receptora za prepoznavanje uzorka (engl. *pattern recognition receptors*), što potakne sazrijevanje antigen-specifičnih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T stanica (Slika 7). Predočavanje tumorskih antigena u lokalnom upalnom okruženju kojeg stvara infekcija s onkolitičkim virusima također značajno pridonosi razvoju antitumorske imunosti posredovanom CD8<sup>+</sup> T stanicama, koja djeluje ne samo na stanice inficirane virusom ali i na metastaze koje se nalaze po cijelom organizmu (Marchini i sur., 2016).

Iako onkolitički virusi mogu potaknuti antitumorski imunski odgovor, imunosupresivno okruženje unutar tumora uzrokovano većim populacijama regulatornih imunskih stanica i nenormalnim sastavom citokina i kemokina smanjuje učinkovitost terapije onkolitičkim virusima. Stoga se istražuju mogućnosti kombiniranja onkolitičkih virusa s drugim antitumorskim terapijama kako bi se poboljšala učinkovitost odstranjivanja tumora (Marchini i sur., 2016).





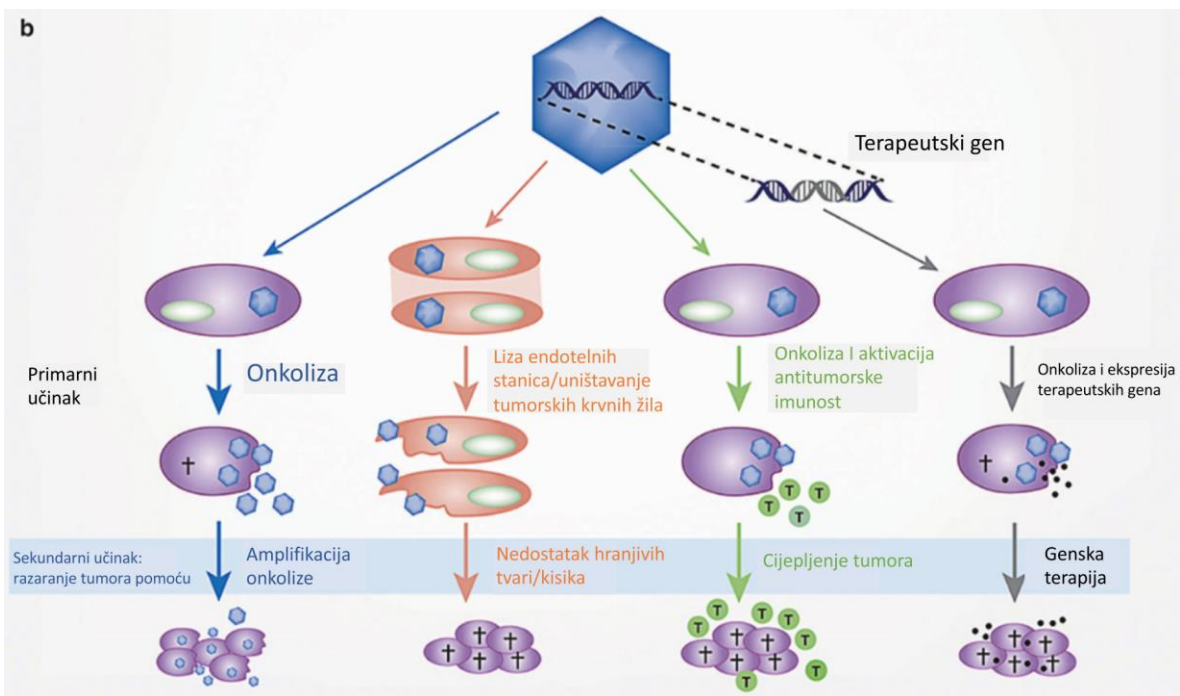
Slika 7. Različiti putevi razaranja tumora pomoću onkolitičkih virusa

Izvor: Marchini i sur., 2016

#### 4. Kombinirana terapija s onkolitičkim virusima i dodatnim antitumorskim terapijama

Iako onkolitički virusi mogu nezavisno ciljati i lizirati stanice raka (Slika 8), u novije vrijeme se istražuje mogućnost dorade onkolitičkih virusa u svrhu kombiniranja viroterapije s drugim antitumorskim terapijama (Sokolowski i sur., 2015). Onkolitički virusi s imunostimulacijskim transgenima mogu aktivirati i pojačati nativni antitumorski imunski odgovor domaćina protiv stanica raka (Aref i sur., 2016). Također su izrađeni onkolitički virusi koji ekspimiraju čimbenike protiv angiogeneze, i tako inhibiraju nastanak tumorskog mikrookoliša koji često sprječava učinkovitu terapiju tumora (Sokolowski i sur., 2015). Kemoterapija i radioterapija se isto kombiniraju s viroterapijom, gdje onkolitički virusi služe kao vektori za toksične metabolite i radioizotope (Aref i sur., 2016). Sinergija onkolitičkih virusa i drugih

antitumorskih terapija, kao što su imunoterapija, kemoterapija, i radioterapija, često rezultira s većom razinom uspješnosti razaranja tumora i tako definira bitan razvoj u primjeni onkolitičkih virusa (Russell i sur., 2012).



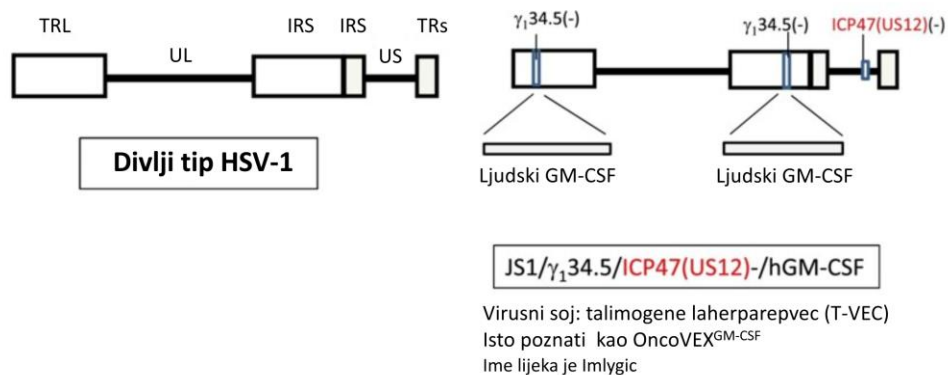
Slika 8. Metode razaranja tumorskih stanica pomoću genetskog inženjerstva onkolitičkih virusa

Izvor: Ungerechts i sur., 2016

#### 4.1. Imunoviroterapija

Tumorske stanice stvaraju imunosupresivnu okolinu tako što produciraju inhibirajuće čimbenike, kao što su IL-4, IL-10, i TGF- $\beta$ , koji potiču razvoj regulatornih T stanica, M2 makrofaga, i mijeloidnih supresorskih stanica (engl. *myeloid-derived suppressor cells*) koje sve doprinose imunosupresivnoj tumorskoj mikrookolini (Shaw i Suzuki, 2016). U svrhu uspostavljanja ili pojačanja antitumorske imunosti, konstruirani su onkolitički virusi koji sadržavaju gene za razne citokine (npr. IL-2, IL-12, IL-18), kemokine (npr. CCL5), ili kostimulatorne molekule (npr. B7.1 i CD40L) (Bartlett i sur., 2013). U slučaju onkolitičkog virusa herpesa simpexa Talimogene laherparepvec, poznatog i kao T-VEC, mutiran je virusni gen ICP47 koji inače blokira procesiranje antigena u inficiranim stanicama (Bartlett i sur., 2013). ICP47 inhibira predočavanje antigena glavnog kompleksa tkivne snošljivosti tipa I tako što se veže za

transportere uključene u prijenos antigena u endoplazmatskom retikulumu (Sokolowski i sur., 2015). Mutacijom ovog gena je stoga omogućeno bolje predočavanje antigena klase I i jači antitumorski imunski odgovor. Za dodatno pojačavanje antitumorskog imunskog odgovora, virusni konstrukt T-VEC (Slika 9) također sadrži gen za GM-CSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), hematopoetski čimbenik rasta granulocita kojeg izlučuju makrofagi, T stanice, i NK stanice (Bartlett i sur., 2013; Shaw i Suzuki, 2016). U prijašnjim istraživanjima je pokazano da tumorske stanice koje ekspimiraju GM-CSF induciraju izuzetno potentan, specifičan i dugoročni antitumorski odgovor koji je ovisan o CD4+ i CD8+ T stanicama, u odnosu na 10 ostalih ispitivanih citokina (Dranoff i sur., 1993). GM-CSF stimulira antitumorski odgovor tako što aktivira stanice NK i inducira citotoksične stanice T specifične za tumorske antigene preko antigen-predočnih stanica (APC, engl. *antigen presenting cells*). Gen za GM-CSF je također umetnut u adenovirusni vektor i vektor virusa vakcinije (engl. *Vaccinia virus*), i oni kao i T-VEC s ugrađenim genom za GM-CSF pokazuju kliničku učinkovitost (Bartlett i sur., 2013).



Slika 9. Shema virusnog konstrukta talimogene laherparepvec u usporedbi s divljim tipom virusa *herpes simplex*

Kratice: TRL - long terminal repeat, UL - long unique segment, IRL - internal long repeat, IRS - internal short repeat, US - short unique segment

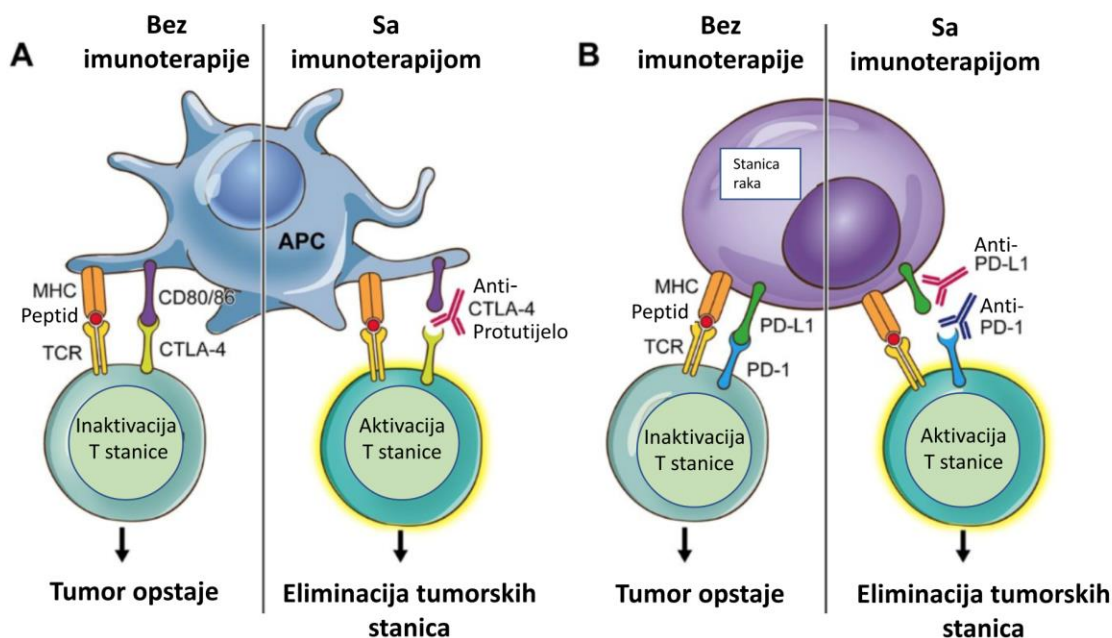
Izvor: Yura, 2016

Osim GM-CSF-a, i drugi citokini se također istražuju kao pogodni stimulatori antitumorskog imunskog odgovora u onkolitičkoj viroterapiji. Jedan primjer je čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha* ili TNF $\alpha$ ) koji inducira nekrozu i apoptozu tumorskih stanica, aktivira druge imunsko stanice, i potiče izlučivanje dodatnih citokina. U kliničkim istraživanjima, adenovirus koji ekspimirira TNF $\alpha$  pokazuje u singeničnom mišjem

modelu veću infiltraciju CD8<sup>+</sup> stanica u tumor i smanjeni rast tumora (Shaw i Suzuki, 2016). Gen za interleukin-12 (IL-12) se također ugrađuje u virusne konstrukte, i on stimulira proliferaciju imunskih stanica, polarizira T stanice u Th1 stanice, i potiče lučenje TNF $\alpha$  i interferona gamma (IFN $\gamma$ ) koji se protive imunosupresivnom učinku IL-4. Onkolitički adenovirus s genom za IL-12 pokazuje kliničku učinkovitost i smanjenu toksičnost u usporedbi sa sustavnim unosom IL-12 koja je vrlo toksična. IL-24 je tumor supresorski interleukin koji uzrokuje apoptozu tumorskih stanica cijepanjem kaspaza 3 i 9 i indukcijom kaskade kaspaza. Onkolitički adenovirus s ugrađenim genom za IL-24 u singeničnom mišjem modelu također pokazuje smanjenje tumora, veću aktivnost T stanica, i povišenu produkciju INF $\gamma$  i IL-6. Kostimulacijske molekule, kao što je CD40L, se isto ugrađuju u onkolitičke viruse kako bi stimulirale dendritičke stanice i inicirale T-stanični odgovor (Shaw i Suzuki, 2016).

Osim što se ugrađuju geni za imunostimulacijske molekule u onkolitičke viruse, terapija onkolitičkim virusima se kombinira s drugim imunoterapijama i tako se postiže veći antitumorski učinak nego kod bilo koje terapije same (Bartlett i sur., 2013). Onkolitička viroterapija se kombinira s tumorskim cjepivom posredovanim dendritičkim stanicama (engl. *DC-mediated cancer vaccine*), gdje su dendritičke stanice izložene tumorskim antigenima *ex vivo* i onda upotrebene kao cjepivo koje inducira antitumorski imunski odgovor (Timmerman i Levy, 1999). Terapija stanica T u kombinaciji s viroterapijom daje mješovite rezultate; iscrpljenje T regulatornih stanica ima negativni terapijski učinak jer omogućuje neometani prvotni antiviralni imunski odgovor, što rezultira iskorjenjivanjem virusa (Bartlett i sur., 2013). Ali zato terapija prijenosa stanica T (engl. *adoptive T cell transfer therapy*) u kombinaciji s viroterapijom značajno poboljšava antitumorski odgovor. Također se kombiniraju različiti onkolitički virusi za postizanje boljeg terapijskog ishoda, ali se koriste različite vrste kako ne bi došlo do rekombinacije i stvaranja nepoznatog i potencijalno opasnog virusnog soja (Bartlett i sur., 2013). U zadnje vrijeme obećavajuća terapija je kombiniranje onkolitičkih virusa s inhibitorima imunskih kontrolnih točki (engl. *immune checkpoint inhibitors*) (Marchini i sur., 2016). Imunološke kontrolne točke su skup inhibitornih signalnih puteva koji snižavaju jačinu i trajanje imunskih odgovora (Slika 10). Pogotovo značajni su citotoksični limfocit T pridruženi protein 4 (CTLA-4, engl. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein*) i protein programirane stanične smrti (PD-1, engl. *programmed cell death protein*), koji su inhibitorni receptori na limfocitima T. CTLA-4 inhibira aktivaciju stanica T tako što je u kompeticiji s kostimulacijskom molekulom B7 na antigen-predodnim

stanicama za vezanje na CD28, a PD-1 inhibira efektorsku funkciju T limfocita tako što se veže za ligand programirane stanične smrti (PD-L1, engl. *programmed cell death ligand*) prisutan na tumorskih stanicama i nekim imunskim stanicama. Transgeni za antitijela protiv CTLA-4 i PD-1/PD-L1 se mogu umetnuti u genome onkolitičkih virusa, i pokazano je da terapija s ovim virusima rezultira višim razinama aktiviranih CD8<sup>+</sup> stanica i manje regulatornih stanica T koje infiltriraju tumorski mikrookoliš (Marchini i sur., 2016).



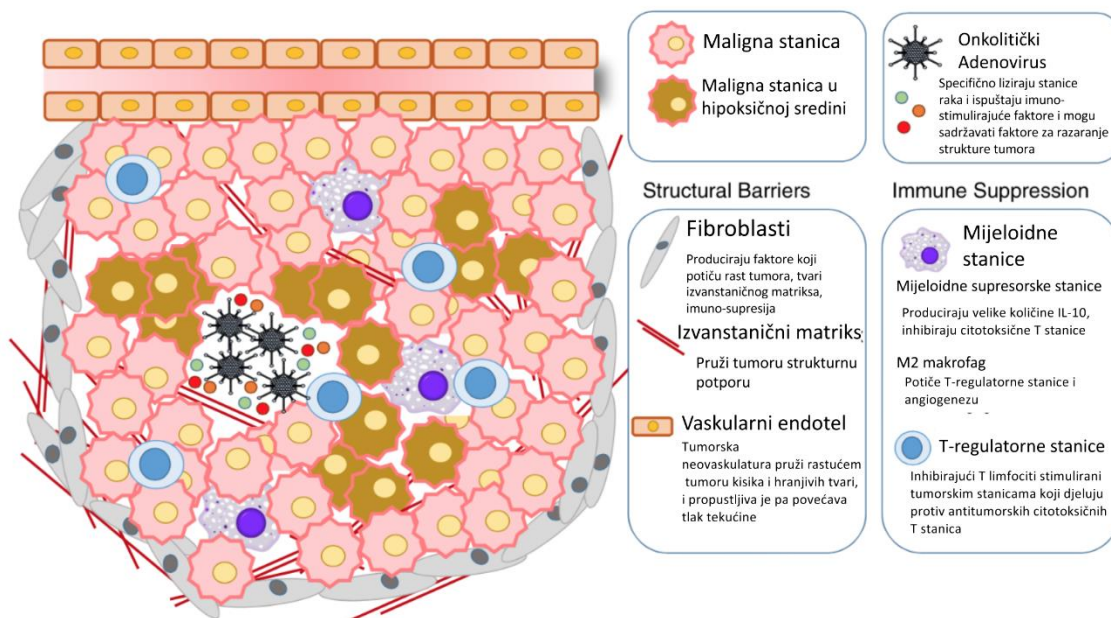
Slika 10. Mehanizmi djelovanja inhibitora imunskih kontrolnih točaka

Izvor: Soularue i sur., 2018

## 4.2. Modulacija tumorskog mikrookoliša

Tumori su heterogene strukture koje uz maligne stanice sadrže fibroblaste, regulatorne imunostne stanice, endotelne stanice, i velike količine gustog stromalnog tkiva i izvanstaničnog matriksa (Shaw i Suzuki 2016). Tumori također imaju slabije razvijeni limfatički sustav, što uz velike količine izvanstaničnog matriksa uzrokuje povišeni intersticijski tlak i onemogućuje širenje onkolitičkih virusa unutar tumora (Sokolowksi i sur., 2015; Shaw i Suzuki, 2016). U svrhu poboljšavanja učinkovitosti širenja onkolitičkih virusa, napravljeni su virusni konstrukti koji ciljaju angiogenezu i izvanstanični matriks (Shaw i Suzuki 2016). Onkolitički adenovirus koji

ekspirira relaksin pokazuje veću sposobnost infiltracije tumora pošto relaksin potiče aktivnost matriksnih metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinases*) koje razgrađuju izvanstanični matriks. Onkolitički adenovirus s transgenom za hijaluronidazu također pokazuje učinkovitost, jer hijaluronidaza snižava količine hijaluronana, sulfatnog glikozaminoglikana koji je ključna komponenta tumorskog izvanstaničnog matriksa (Russell i sur., 2012). Angiogeneza također ometa širenje onkolitičkih virusa unutar tumora, pošto gusto krvožilje fizički blokira diseminaciju virusa, ali i zato što propusne tumorske krvne žile omogućuju prolaz antivirusnih imunskih stanica (Sokolowksi i sur., 2015; Shaw i Suzuki 2016). Krvožilni endotelni čimbenik rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) je najbolje proučeni proangiogenični regulator, i također česta meta terapije onkolitičkim virusima (Shaw i Suzuki, 2016). Dvije metode koje uspješno inhibiraju stimulaciju endotelnih stanica pomoću VEGF-a su blokirajuće antitijelo za VEGF i topljivi receptor za VEGF, oboje čimbenici koji vežu VEGF i onemogućuju njegovo vezanje za VEGF receptore (Shaw i Suzuki, 2016). Geni za oba čimbenika su uspješno umetnuti u adenovirusne konstrukte, i također su napravljeni onkolitički virusi herpesa simplex s genima za antiangiogenične čimbenike kao što su trombospondin-1, endostatin, angiostatin i vaskulostatin (Sokolowksi i sur., 2015). Ti geni također pokazuju raznoliku aktivnost u regulaciji migracije, proliferacije i apoptoze endotelnih stanica. Antiangiogenični virusi u klinici pokazuju mješovite rezultate, i najučinkovitiji su u tumorima središnjeg živčanog sustava (Sokolowksi i sur., 2015).



Slika 12. Slikovni prikaz heterogene strukture tumora i onkolitičkog adenovirusa

Izvor: Shaw and Suzuki, 2016

Tumorski mikrookoliš se može modulirati ne samo u svrhu učinkovitijeg širenja i replikacije onkolitičkih virusa, nego i za modulaciju aktivnosti antitumorskih i urođenih imunskih stanica (Bartlett i sur., 2013). Pokazano je da stanice urođene imunosti, na primjer prirodene stanice ubojice (NK stanice, engl. *natural killer cells*), su štetne za aktivnost onkolitičkih virusa. Glavni okidač stanica urođene imunosti je interferon, koji se luči tijekom infekcije virusima (Bartlett i sur., 2013). Moćan inhibitor odgovora interferona su inhibitori histonskih deacetilaza (HDACi). Histonske deacetilaze utječu na epigenetske modifikacije histona i kromatina, ali i na mnoštvo drugih proteina koji djeluju kao stanični regulatori transkripcije, replikacije i popravka DNA (Bartlett i sur., 2013; Marchini i sur., 2016). Inhibitori histonskih deacetilaza, kao što je valproična kiselina, inhibiraju proizvodnju interferona gamma (IFN- $\gamma$ ) i tako je reducirana sposobnost aktivacije NK stanica i makrofaga (Bartlett i sur., 2013). Valproična kiselina također reducira citotoksičnost NK stanica jer smanjuje ekspresiju citotoksičnih proteina kao što su granzimi i perforini. Zanimljivo je što jedna specifična histonska deacetilaza, poznata kao MS-275, u kombinaciji s onkolitičkim virusom vakcinije suprimira primarni urođeni imunski odgovor ali povećava adaptivni imunski odgovor na tumorske antigene (Bartlett i sur., 2013).

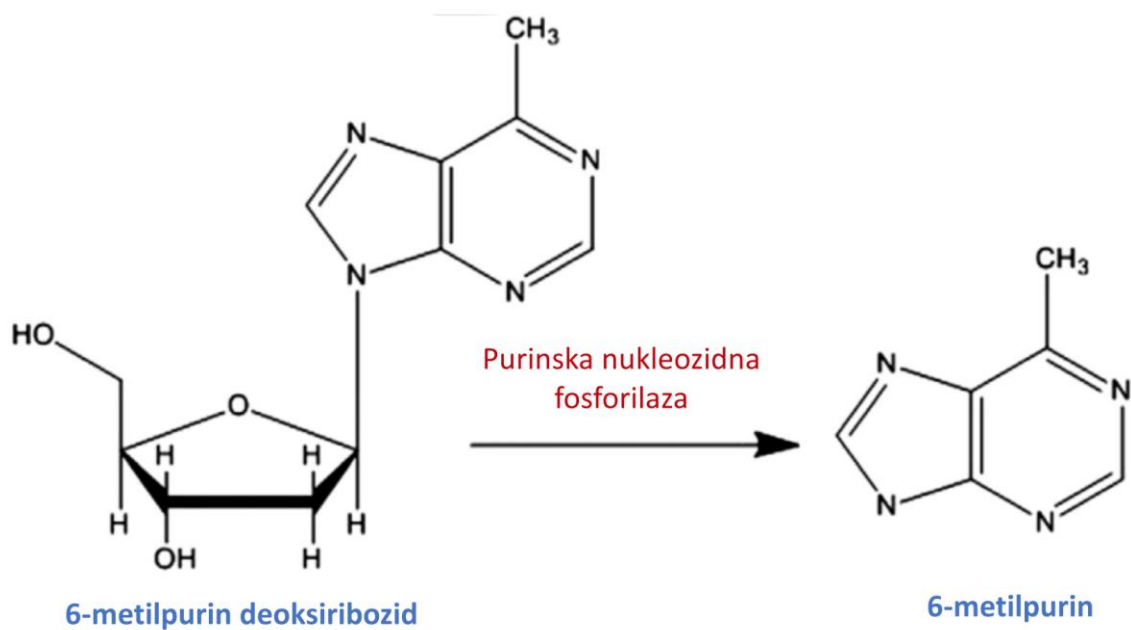
Tumorski mikrookoliš je također opisan kao kronična upala koja sprječava efektorsku funkciju limfocita koji infiltriraju tumor, i tako čini efektorske stanice nastale tijekom infekcije onkolitičkim virusima neučinkovitim (Bartlett i sur., 2013). Međutim, novija istraživanja pokazuju kako kostimulacija s ligandima *toll-like* receptora (TLR) značajno poboljšava efikasnost onkolitičke imunoterapije. Na primjer, terapija onkolitičkim virusom vakcinije pokazuje veću lokalnu onkolitičku aktivnost u kombinaciji s intratumorskom infekcijom lipopolisaharida, koji je agonist TLR-4. Također, intratumorska infekcija TLR liganda 3/9 spašava funkciju CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrirajućih limfocita i snižava razinu T-regulatornih limfocita, i tako značajno povisuje antitumorsku učinkovitost onkolitičkog virusa. Smatra se da međureakcija TLR i TLR liganda izaziva produkciju IFN tipa 1, što aktivira intratumorske dendritičke stanice koje onda reaktiviraju tumor-infiltrirajuće limfocite. Sam onkolitički virus također može aktivirati dendritičke stanice preko TLR koji prepoznaju PAMP-ove (Bartlett i sur., 2013).

### 4.3. Radioviroterapija i kemoviroterapija

Osim što se ciljano manipulira imunim sustavom tijekom onkolitičke viroterapije, klasične antitumorske terapije kao što su primjena radio valova ili kemoterapeutika se također kombiniraju s onkolitičkom viroterapijom (Aref i sur., 2016). Radioviroterapija temelji se na onkolitičkom virusu koji eksprimira gen za simporter natrijevog jodida iz štitnjače. Ovaj membranski kanal inače služi za unos i koncentriranje joda unutar štitnjače, ali u onkolitičkoj viroterapiji služi za unos radioizotopa koji emitiraju beta-valove u inficirane stanice. Radioizotopi, kao što je jod-131, zračenjem induciraju oštećenje tumorskog mikrookoliša, i dokazano je u *in vivo* modelu multiplog mijeloma da radioviroterapija iskorijeni tumorske stanice inficirane onkolitičkim virusom ospica, koje su u slučaju same viroterapije otporne na citotoksičnu lizu (Aref i sur., 2016). Radioviroterapija također može služiti za praćenje širenja onkolitičkog virusa kroz tumor, pošto se radioizotopi kao jod-124 i jod-125 mogu vizualizirati pomoću pozitronske emisijske tomografije (PET) (Russell i sur., 2012).

Kemoviroterapija koristi onkolitičke viruse kao vektore za konvertaze “prolijeka” (engl. *prodrug*) koji kataliziraju konverziju kemoterapeutskog prolijeka u vrlo toksične metabolite (Aref i sur., 2016). Ovi metaboliti se zatim ugrađuju u DNA inficiranih stanica i induciraju apoptozu. Primjer konvertaza su purinske nukleozidne fosforilaze iz *Escherichia coli*, koje kataliziraju konverziju prolijekova fludarabina i 6-metilpurin-2'-deoksiribozid u baze 2-fluoroadenin i 6-metilpurin koje inhibiraju sintezu DNA. Super-citozin deaminaza je konvertaza prolijeka i također fuzijski protein koji se sastoji od citozin deaminaze i uracil fosforiboziltransferaze, oboje porijeklom iz kvasca. Super-citozin deaminaza pretvara 5-fluorocitozin u 5-fluorouracil, pa zatim u 5-fluorouridinmonofosfat. Oba kemoterapeutika purinske nukleozidne fosforilaze (Slika 12) i super-citozin deaminaze pokazuju poboljšanu antitumorsku učinkovitosti u kliničkim istraživanjima (Aref i sur., 2016).



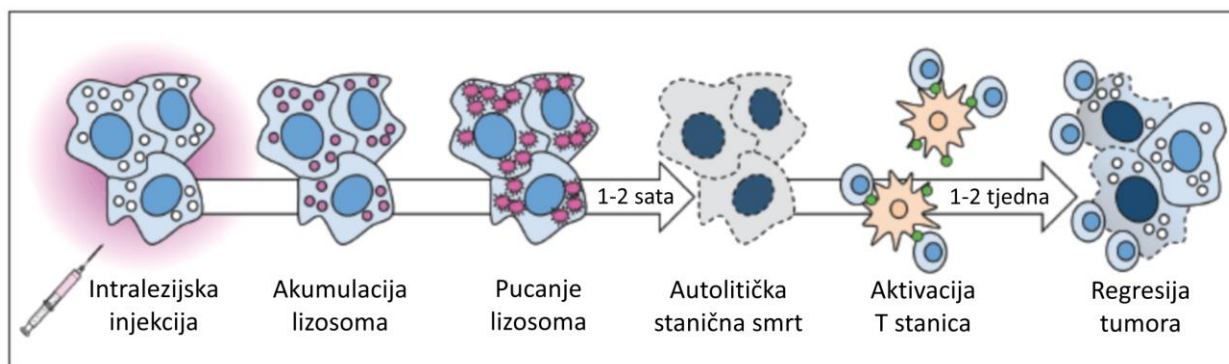


*Slika 12. Primjer djelovanja purinske nukleozidne fosforilaze*

Izvor: Katjoo i sur., 2016

## 5. Onkolitički virusi u kliničkim istraživanjima

Iako se zadnjih 30-ak godina radi na razvoju onkolitičkih virusa primjenjivih u klinici, tek u proteklom desetljeću prvi puta su službeno odobreni za terapiju raka (Pol i sur., 2015). Prvi odobreni onkolitički virus je rekombinantni adenovirus pod nazivom H101, koji je Kineska uprava za hranu i lijekove u kombinaciji s kemoterapijom licencirala za terapiju refraktornog raka glave i vrata već 2005. godine. Američka uprava za hranu i lijekove tek 2015. godine je odobrila prvu terapiju onkolitičkim virusom pomoću varijante virusa herpesa simplex-a s umetnutim transgenom za GM-CSF, poznati i kao T-VEC ili Imlygic za liječenje melanoma (Slika 13). T-VEC u kliničkim istraživanjima pokazuje trajnu stopu odgovora (DPP, engl. *durable response rate*) od 16,3%, ukupnu stopu odgovora (ORR, engl. *overall response rate*) od 26,4%, i medijan ukupnog preživljavanja iznosi otprilike 23,3 mjeseca. Odobrenje prve onkolitičke viroterapije u Americi obilježava bitan razvoj u primjeni onkolitičkih virusa za terapiju raka, jer do tog trenutka klinički potencijal onkolitičkih virusa bio je zasjenjen drugim imunoterapijama, pogotovo inhibitorima imunskih kontrolnih točki. Očekuje se da će T-VEC uskoro biti odobren i od strane Evropske agencije za lijekove, i zbog uspjeha T-VEC-a u klinici očekuje se i povećanje broja kliničkih istraživanja namijenjenih onkolitičkim virusima. Također su neka klinička istraživanja usmjerena prema proučavanju kombinacije T-VEC-a i imuno- ili kemoterapija, kao i primjeni T-VEC-a protiv drugih vrsta raka osim melanoma.



Slika 13. Mehanizam djelovanja Talimogene laherparepvec-a (T-VEC)

Izvor: <https://www.cancernetwork.com/articles/role-intralesional-therapies-melanoma/page/0/1>

Usprkos nedavnim uspjesima onkolitičkih virusa u klinici, postoje naravno i zapreke u njihovoj uspješnoj terapijskoj primjeni. Više nezavisnih prekliničkih i translacijskih istraživanja pokazala su da imunosni odgovori IFN tipa 1 inhibiraju terapijsku učinkovitost onkolitičkih virusa, ali isto tako signalizacija IFN tipa 1 u malignim stanicama je presudna za njihovu smrt i kao i za razvoj adaptivnog imunosnog odgovora (Pol i sur., 2015). Stoga, onkolitička viroterapija bi imala veliku korist od razvoja strategije za inhibiciju prvotnog odgovora IFN tipa 1, a stimulaciju kasnog odgovora IFN tipa 1 za poticanje adaptivnog imunosnog odgovora. Drugi izazov u kliničkoj primjeni onkolitičke viroterapije je testiranje virusa na prikladnim eksperimentalnim modelima (Russell i sur., 2012). Mišji ksenograftni model, koji sadrži tumorsko tkivo pacijenta u imunosuprimiranom mišu nije prikladan za istraživanje odgovora imunosnog sustava na viroterapiju, a imunokompetentni miševi nisu odgovarajući model jer se onkolitički virusi ponašaju drugačije u miševima nego u ljudima. Jedna dodatna prepreka u razvoju terapija pomoću onkolitičkih virusa je osiguravanje kliničkog testiranja novih virusnih sojeva (Russell i sur., 2012). Naime, znanstvenici mogu napraviti puno virusnih varijanti koje su genetski modificirane u svrhu poboljšanja terapijskog potencijala, ali ih je nemoguće sve testirati u klinici zbog ogromne količine posla i trošova. Za razliku od drugih konvencionalnih lijekova, koji su gotovo usavršeni prije kliničkih istraživanja, onkolitički virusi su kompleksne čestice s mnoštvo komponenti koje se mogu svaka posebno usavršiti i poboljšati. Zato bi onkolitička viroterapija trebala imati drugačiju paradigmu za klinička istraživanja; naime, trebali bi se izvesti pokusi za testiranje višestrukih modifikacija onkolitičkih virusa dok su još u prvoj fazi kliničkih istraživanja (Russell i sur., 2012).

## 6. Prednosti i mane primjene onkolitičkih virusa u terapiji tumora

Onkolitički virusi, iako su se počeli istraživati još prije sto godina, su doživjeli u zadnjih 30 godina veliki porast u popularnosti kao prigodni alat u borbi protiv raka. Onkolitički virusi pružaju mnoštvo potencijalnih prednosti u terapiji tumora; imaju visoku razinu specifičnosti za tumorske stanice, i sposobni su potaknuti razvoj trajnog antitumorskog imunogenog odgovora (Bartlett i sur., 2013). Također postoji mnogo varijanti onkolitičkih virusa koji se istražuju kao prigodni kandidati za antitumorsku terapiju, i tehnikama genetskog inženjerstva je lako modificirati virus za poboljšavanje njegove učinkovitosti. U zadnjih 20 godina istraživanja onkolitičkih virusa u klinici, postojale su sumnje o njihovoj sigurnoj primjeni, pogotovo pošto virusi imaju visoku stopu mutacija i nepredvidive mutacije u onkolitičkim virusima bi mogle imati vrlo opasne učinke u pacijentima. Međutim, mnoštvo kliničkih istraživanja je potvrdilo njihov izvrstan sigurnosni profil i nisku toksičnost (Aghi i Martuza, 2005). U jednom dovršenom kliničkom ispitivanju druge faze, od 300 pacijenata samo je jedan smrtni slučaj zbog obrade onkolitičkim virusima zabilježen. Trenutačno se u klinici ulaže mnogo truda u poboljšavanje učinkovitosti onkolitičkih virusa, što se pokazalo kao najveća barijera njihovoj uspješnoj primjeni (Aghi i Martuza, 2005).

Učinkovitost onkolitičkih virusa je okončana zbog mnogo čimbenika. Prvo, relativna neučinkovitost intravenske dopleme onkolitičkih virusa smanjuje broj aktivnih virusnih čestica koje dopiju do tumora (Bartlett i sur., 2013). Sadašnja su istraživanja stoga usmjerena prema smanjenju sekvencije virusnih čestica unutar jetre i slezena, izbjegavanju neutralizacije virusa pomoću serumskih čimbenika, usmjeravanju virusa prema endotelnim stanicama tumorskih krvnih žila, i povećavanju propusnost tumorskih krvnih žila (Russell i sur., 2012). Drugi čimbenik koji snižava učinkovitost je izuzetno imunosupresivan tumorski mikrookoliš koji sprječava širenje onkolitičkih virusa unutar tumora i također sprječava dolazak tumor-infiltrirajućih limfocita (Bartlett i sur., 2013). Ovaj problem se rješava kombiniranjem konvencionalnih terapija s onkolitičkom viroterapijom, na primjer kombiniranje s imunoterapijom posredovanom inhibitorima imunogenih kontrolnih točaka. Učinkovita produkcija onkolitičkih virusa je također izazov za njihovu uspješnu primjenu (Ungerechts i sur., 2016). Razvijeno je mnogo optimiziranih protokola za uzgajanje i pročišćavanje više vrsta virusa iz kulture animalnih stanica, ali današnje viroterapije zahtijevaju veće doze virusa nego uobičajne doze za cjepivo kako bi bile učinkovite.

Produkcija veće koncentracije virusnih čestica je popraćena nakupljanjem nečistoća kao što su nukleinske kiseline stanice domaćina, i također je skuplja cjelokupna proizvodnja. Napredci u tehnologiji kulture animalnih stanica, kao što su bioreaktori i mikrogranule (engl. *microbeads*) mogu pomoći unapređenju procesa proizvodnje onkolitičkih virusa. Zadnja i možda najbitnija mana primjene onkolitičkih virusa je nemogućnost njihovog korištenja u imunokompromitiranim i starijim osobama zbog mogućnosti razvitka kronične infekcije i negativnih nuspojava (Marelli i sur., 2018). Ova činjenica upućuje na važnost provjere prikladnosti pacijenata za onkolitičku viroterapiju.

Iako postoje izazovi koji se moraju premostiti kako bi onkolitički virusi postali učinkovita terapija protiv raka, njihov širok spektar primjene i mogućnost kombiniranja sa već uhodanim antitumorskim terapijama ukazuje na veliki potencijal primjene onkolitičkih virusa u liječenju tumora.

## 7. Literatura

1. Aref, S., Bailey, K., & Fielding, A. Measles to the Rescue: A Review of Oncolytic Measles Virus. *Viruses* 2016, 8(10), 294.
2. Tsun, A., Miao, X. N., Wang, C. M., & Yu, D. C. Oncolytic Immunotherapy for Treatment of Cancer. *Progress in Cancer Immunotherapy* 2016, 241–283.
3. Dock, G. The influence of complicating diseases upon leukaemia. *The American Journal of the Medical Sciences* 1904, 127, 563–592.
4. Pasquinucci, G. Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet* 1971, 1, 136.
5. Zygiert, Z. Hodgkin's disease: Remissions after measles. *Lancet* 1971, 1, 593.
6. Ziegler, J.L. Spontaneous remission in burkitt's lymphoma. *National Cancer Institute Monographs* 1976, 44, 61–65.
7. Sanford, K., Earle, W., & Likely, G. The Growth in Vitro of Single Isolated Tissue Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 1948.
8. Pol, J., Buqué A., Aranda, F., Bloy, N., Cremer, I., Eggermont, A., Erbs, P., Fucikova, J., Galon, J., Limacher, J., Preville, X., Sautès-Fridman, C., Spisek, R., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Galluzzi, L. Trial Watch—Oncolytic viruses and cancer therapy. *OncImmunology* 2016, 5(2), e1117740.
9. Russell, S.J., Peng, K.W., & Bell, J.C. Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology* 2012, 30, 658–670.
10. Sokolowski, N., Diefenbach, R., & Rizos, H. Oncolytic virotherapy using herpes simplex virus: how far have we come? *Oncolytic Virotherapy* 2015, 207.
11. Rosewell Shaw, A. & Suzuki, M. Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer. *Current Opinion in Virology* 2016, 21, 9–15.
12. Kuhn, I., Harden, P., Bauzon, M., Chartier, C., Nye, J., Thorne, S., Reid, T., Ni S., Lieber, A., Fisher, K., Seymour, L., Rubanyi, G., Harkins, R., & Hermiston, T. Directed Evolution Generates a Novel Oncolytic Virus for the Treatment of Colon Cancer. *PLoS ONE* 2008, 3(6), e2409.
13. Miyatake, S., Iyer, A., Martuza, R.L., & Rabkin, S. D. Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication. *Journal of Virology* 1997, 71(7), 5124–5132.

14. Chung, S.M., Advani, S.J., & Yan, S.Y. Replication-competent, non-neuroinvasive genetically engineered herpes virus is highly effective in the treatment of therapy-resistant experimental human tumors. *Cancer Research* 1999, *59(9)*, 2055–2058.
15. Kambara, H., Okano, H., Chiocca, E.A., & Saeki, Y. An oncolytic HSV-1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals even when symptomatic from a brain tumor. *Cancer Research*. 2005, *65(7)*, 2832–2839.
16. Kelly, K. J., Woo, Y., Stanford, M. M., Galanis, C., Shin Chun, Y., Fong, Y., & McFadden, G. Myxoma Virus Is Oncolytic for Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Annals of Surgical Oncology* 2008 , *15(8)*, 2329–2335.
17. Sugio, K., Sakurai, F., Katayama, K., Tashiro, K., Matsui, H., Kawabata, K., Kawase, A., Iwaki, M., Hayakawa, T., Fujiwara, T., & Mizuguchi, H. Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clinical Cancer Research* 2008, *17*, 2807–2818.
18. Danen, E. Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects. *Landes Bioscience* 2013.
19. Kielian, M. Mechanisms of Virus Membrane Fusion Proteins. *Annual Review of Virology* 2014, *1(1)*, 171–189.
20. Pereira, L., Ali, M., Kousoulas, K., Huo, B., & Banks, T. Domain structure of herpes simplex virus 1 glycoprotein B: Neutralizing epitopes map in regions of continuous and discontinuous residues. *Virology* 1989, *172(1)*, 11–24.
21. Bartlett, D. L., Liu, Z., Sathaiah, M., Ravindranathan, R., Guo, Z., He, Y., & Guo, Z. S. Oncolytic viruses as therapeutic cancer vaccines. *Molecular Cancer* 2013, *12(1)*, 103.
22. Marchini, A., Scott, E., & Rommelaere, J. Overcoming Barriers in Oncolytic Virotherapy with HDAC Inhibitors and Immune Checkpoint Blockade. *Viruses* 2016, *8(1)*, 9.
23. Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., & Mulligan, R. C. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993, *90(8)*, 3539–3543.
24. Timmerman, J. M. & Levy, R. (1999). Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annual Review of Medicine* 1999, *50(1)*, 507–529.

25. Aghi, M. & Martuza, R. L. Oncolytic viral therapies – the clinical experience. *Oncogene* 2005, 24(52), 7802–7816.

Izvori slika:

Slika 2. - Ungerechts, G., Bossow, S., Leuchs, B., Holm, P. S., Rommelaere, J., Coffey, M., & Nettelbeck, D. M. Moving oncolytic viruses into the clinic: clinical-grade production, purification, and characterization of diverse oncolytic viruses. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 2016, 3, 16018.

Slika 10. - Yura, Y. Presage of oncolytic virotherapy for oral cancer with herpes simplex virus. *Japanese Dental Science Review* 2017, 53(2), 53–60.

Slika 11. - Soularue, E., Lepage, P., Colombel, J. F., Coutzac, C., Faleck, D., Marthey, L., & Carbonnel, F. Enterocolitis due to immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Gut* 2018, 67, 2056-2067.

Slika 13. - Karjoo, Z., Chen, X., & Hatefi, A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2016, 99, 113–128.



## 8. Sažetak

Onkolitički virusi su definirani kao virusni soj koji ciljano inficira i ubija stanice raka, ali ne inficira benigne stanice. Ovo svojstvo ih čini primjenjivim u tumorskoj terapiji, i pomoću tehnika genetskog inženjerstva je konstruirano mnoštvo sojeva onkolitičkih virusa koji specifično ciljaju različite vrste tumora. Divlji tipovi virusi se mogu modificirati za specifično inficiranje stanica raka delecijom određenih virusnih gena, kontrolom transkripcije virusnog genoma pomoću tkivno-specifičnih promotora ili microRNA, i mijenjanjem virusnih receptora i fuzijskih proteina. Osim što izazivaju citotoksičnu lizu i tako ubijaju maligne stanice, onkolitički virusi također pridonose razvoju dugotrajnog adaptivnog imunskog odgovora oslobođenjem PAMP-ova, DAMP-ova, i tumor specifičnih antigena iz stanica raka. Također se mogu umetnuti razni transgeni u genome onkolitičkih virusa, što omogućuje primjenu različitih strategija u tumorskoj viroterapiji i pojačava učinak same viroterapije. Na primjer, imunoterapija se može provesti pomoću onkolitičkih virusa tako da se umetne gen za citokin u onkolitički virusni vektor, a kemoterapija se kombinira s viroterapijom tako da se umetne gen za konvertazu prolijeka u virusni vektor. Prva obrada onkolitičkim virusima je odobren u Sjedinjenim američkim državama 2016. godine, i očekuje se da će nakon ovog uspjeha sve brže dolaziti novi onkolitički virusi na tržište. I uz sve prednosti upotrebe onkolitičkih virusa u tumorskoj terapiji, i dalje se intenzivno radi na tome da im se poboljša klinička učinkovitost.

## 9. Summary

Oncolytic viruses are defined as viral strains that selectively infect and kill cancer cells, and do not infect non-malignant cells. This characteristic makes them applicable to cancer therapy, and with the help of genetic engineering numerous strains of oncolytic viruses have been constructed to target a wide variety of different tumors. Wild type viruses can be modified to specifically target cancer cells by deleting certain essential viral genes, by controlling transcription of the viral genome with the help of tissue-specific promoters or microRNAs, and by changing viral receptors and membrane fusion proteins. In addition to killing tumor cells through direct cytotoxic lysis, oncolytic viruses also contribute to the development of a long-term adaptive immune response through the release of PAMPs, DAMPs, and tumor-associated antigens from cancer cells. Various transgenes can also be inserted into the genome of oncolytic viruses, which allows different cancer therapies to be used in conjunction with virotherapy. For example, immunotherapy can be carried out with the help of oncolytic viruses by inserting a cytokine-coding gene into an oncolytic virus vector, and chemotherapy can be combined with virotherapy by inserting a gene encoding for a prodrug convertase into a viral vector. The first treatment utilizing oncolytic viruses was approved in the United States in 2016, and after this success it is expected that more oncolytic viruses will rapidly arrive on the market. Even with all the benefits of using oncolytic viruses in cancer therapy, there is still much work to be done to improve their clinical efficacy.