

Onkolityczne wirusy zwierzęce i ich zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych

MARCIN CHODKOWSKI, JOANNA CYMERYYS, ANNA SŁOŃSKA*, MARCIN W. BAŃBURA

Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa
*Zakład Fizjologii, Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Otrzymano 31.05.2016

Zaakceptowano 11.07.2016

Chodkowski M., Cymeryys J., Słowska A., Bańbura M. W.

Oncolytic animal viruses and their applications in anti-cancer therapies

Summary

Cancer is one of the most frequent causes of death in Poland and in the world. The low efficacy of conventional treatment, as well as the high toxicity of the usual therapies, have stimulated the search for alternative methods. One of them is the deployment of oncolytic viruses. Oncolytic viruses have a natural ability to lyse tumor cells or can obtain this ability through certain modifications. The aim of virotherapy is to discover a virus that will lyse only tumor cells, and will not be dangerous to healthy cells, and moreover will not cause an undesirable response from the host's immune system. Animal viruses with oncolytic abilities are very promising, because they are not pathogenic for humans and often show a high specificity for human cancerous cells.

Keywords: oncolytic animal viruses, viral oncotherapy, cancer, apoptosis

Nowotwory stanowią główną przyczynę zgonów w Polsce i na świecie zaraz po chorobach układu krążenia. Według najnowszych prognoz, liczba nowych zachorowań będzie stale wzrastać, a w 2020 r. na świecie ma osiągnąć liczbę 20 milionów (38). Dotychczasowa wiedza na temat chorób nowotworowych jest dość obszerna, jednak nie na tyle, aby skutecznie z nimi walczyć. W terapii chorób nowotworowych najczęściej stosowana jest chemioterapia, która działa systemowo na organizm, często powodując poważne skutki niepożądane. Ponadto, komórki nowotworowe nabywają oporność na stosowane chemioterapeutyki (18). Innym ważnym problemem w terapiach onkologicznych jest tylko częściowe usunięcie guza, z powodu jego niekorzystnej lokalizacji, na przykład w sąsiedztwie ważniejszych tętnic, przez co istnieje możliwość tworzenia nowych ognisk. Niska skuteczność działania metod konwencjonalnych w przypadku niektórych nowotworów, a także niekorzystny, uboczny wpływ na organizm są przyczynami poszukiwań alternatywnych metod ich leczenia. Obecnie głównym trendem w tworzeniu nowych terapii jest jej ukierunkowanie wyłącznie na komórki nowotworowe, tzw. terapia celowana. Główną jej zaletą jest mała toksyczność dla komórek zdrowych, dzięki czemu komfort życia pacjenta na skutek choroby nie ulega pogorszeniu (15). Świat naukowy zwrócił uwagę na właściwości pewnej grupy

wirusów, zwanych onkolitycznymi. Wydają się one atrakcyjną alternatywą dla konwencjonalnego leczenia, ponieważ wykazują tropizm wyłącznie do określonych komórek – komórek nowotworowych, nie naruszając przy tym komórek zdrowych. Dodatkowo, mogą być nośnikiem chemioterapeutyków wyłącznie do komórek zmienionych nowotworowo. Wirusy onkolityczne wykazują działanie wielokierunkowe, oprócz „ataku” na komórki nowotworowe indukują układ odpornościowy do walki z rakiem. Obecnie trwają liczne badania nad użyciem wirusów w terapiach onkologicznych, niektóre są już w ostatniej fazie klinicznej. Naukowcy, dzięki coraz większej wiedzy o budowie wirusów, próbują modyfikować je zarówno na poziomie genetycznym, jak i zmieniając ich tropizm. Co ciekawe, do użycia zostały już zatwierdzone dwa preparaty, oparte na zmodyfikowanych wirusach (6).

Onkolityczne działanie wirusów

O możliwości replikacji wirusów w komórkach nowotworowych wiadomo już od dawna. Pierwsze doniesienia dotyczące potencjału przeciwnowotworowego wirusów pochodzą z 1912 r. Jako pierwszy przypadek remisji guza pod wpływem działania wirusa udokumentował włoski ginekolog Nicola De Pace. U swojej pacjentki zaobserwował regresję raka szyjki macicy po podaniu jej atenuowanej szczepionki

przeciw wścieklicznie (25). Kolejne lata jedynie potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia naukowców o potencjale onkolitycznym wirusów. W literaturze znane są przypadki remisji różnych nowotworów pod wpływem zakażenia wirusowego, dlatego też postanowiono wykorzystać ich potencjał (2).

Wirusy onkolityczne możemy podzielić na dwie grupy. Pierwsza obejmuje wirusy, które naturalnie zakażają ludzkie komórki nowotworowe i nie są patogenne dla ludzi, często z powodu podwyższonej wrażliwości na wrodzoną odpowiedź przeciwwirusową lub związane są ze ścieżkami sygnalizacyjnymi onkogenów. Do naturalnych wirusów onkolitycznych możemy zaliczyć: wirusa myksomatozy (MYXV, Myxoma Virus), wirusa choroby Newcastle (NDV, Newcastle Disease Virus) i reowirusy. Drugą grupę stanowią wirusy modyfikowane genetycznie w celu możliwości użycia ich jako wektorów szczepionkowych, np. poliovirus, lub są pozbawiane genów, które umożliwiają im replikację w komórkach zdrowych, np. adenowirusy czy wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1, Herpes Simplex Virus).

Dzięki rozwojowi technik biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej możliwa jest modyfikacja wirusów w taki sposób, aby selektywnie replikowały się wyłącznie w komórkach zmienionych nowotworowo. Zmiana tropizmu wirusa opiera się na modyfikacjach genetycznych lub na zmianie białek strukturalnych cząsteczki wirionu (26, 39). Ponadto, do materiału genetycznego wirusa wprowadza się geny, które mogą kodować stymulatory immunologiczne lub geny samobójcze. Geny samobójcze kodują enzymy, które nie występują naturalnie w komórkach ssaków. Najczęściej włączany jest gen kodujący kinazę tymidynową czy deaminazę cytozyny. Oprócz wirusa pacjentowi podawane są nieaktywne formy związków, tzw. proleki, np. gancyklowir czy acyklowir, które pod wpływem enzymu kinazy tymidynowej zostają przekształcone do trójfosforanów działających toksycznie na komórki, w których obecne były geny samobójcze, np. komórki nowotworowe (12, 37). Jak wynika z danych literaturowych, możliwości tworzenia nowych wirusów onkolitycznych są wręcz nieograniczone, co daje duże perspektywy w tworzeniu nowych terapii (34).

W procesie modyfikacji wirusów najważniejsze jest uzyskanie odpowiedniego tropizmu, tak aby efektywnie i selektywnie replikowały się w komórkach nowotworowych. W tym celu modyfikuje się białka strukturalne wirusów w taki sposób, aby rozpoznawały epitopy komórek nowotworowych. Do cząstek wirusowych niejednokrotnie dodawane są cząsteczki adaptorowe umożliwiające adsorpcję wirusa do komórek (26). Przykładem takich modyfikacji może być wirus odry i HSV-1 (45).

W celu otrzymania zdolności onkolitycznej do genu wirusa wprowadza się również promotory charakterystyczne dla odpowiednich rodzajów nowotworów.

W ten sposób wirusy wydajnie replikują się wyłącznie w komórkach nowotworowych. Przykładem zastosowania tej strategii jest zmodyfikowany adenowirus, charakteryzujący się obniżoną ekspresją genów E1B i E1A. Do genu wirusa wprowadzono promotora charakterystycznego dla nowotworu prostaty, dzięki czemu uzyskano selektywną replikacją wyłącznie w komórkach guza (26). Oprócz nowotworów prostaty próbowano także zastosować zmodyfikowany adenowirus w przypadkach raka piersi czy raka wątroby, z uwzględnieniem charakterystycznych promotorów dla danego typu raka. Innym przykładem ukierunkowania transkrypcyjnego jest wprowadzenie do HSV-1 promotora kalponiny, dzięki któremu wirus mógł się namnażać wyłącznie w nowotworach kości i guzach tkanek miękkich (45).

Coraz częściej wirusy traktowane są jako wektory dla leków, proleków, immunomodulatorów oraz substancji mających wpływ na proces apoptozy komórek nowotworowych. Przykładem takiej cząsteczki jest TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; ligand czynnika martwicy nowotworu indukującego apoptozę), który w sposób selektywny pobudza mechanizmy zewnętrzne apoptozy. TRAIL na skutek przyłączenia się do receptorów śmierci (DR, death receptor) uruchamia kaskadę zdarzeń, naprowadzających komórki w kierunku apoptozy. Najnowsze doniesienia wskazują, że wektory adenowirusowe, kodujące TRAIL są najbardziej efektywne w terapii przeciwnowotworowych. Dotychczas mechanizm ten badany jest głównie w przypadku nowotworów gruczołu krokowego i, co najważniejsze, z pozytywnym skutkiem (42).

Kolejny mechanizm, który został wykorzystany w terapii z zastosowaniem wirusów onkolitycznych, to indukcja specyficznej i niespecyficznej odpowiedzi immunologicznej. Mała immunogenność, a także niewielka liczba antygenów kompleksu zgodności tkankowej sprawia, że nowotwory stają się niezauważalne dla układu immunologicznego. Wirusoterapia daje szansę na zwiększenie wrażliwości komórek nowotworowych na działanie ze strony układu immunologicznego, na przykład podczas replikacji adenowirusów powstaje białko E1A, które uwrażliwia komórki na czynnik martwicy nowotworów (TNF, tumor necrosis factor) (10). Dodatkowo, występowanie na powierzchni komórek nowotworowych białek wirusowych przyczynia się do ich lizy przez limfocyty cytotoksyczne (CTL, cytotoxic lymphocytes) (35).

W trakcie leczenia nowotworów skuteczne wydaje się zastosowanie terapii skojarzonej i, jak wielokrotnie wykazano, jednoczesne połączenie wielu form terapii daje lepsze wyniki. Istnieje więc możliwość połączenia wirusoterapii z metodami konwencjonalnymi stosowanym w trakcie leczenia nowotworów, czyli z chemio- czy radioterapią. Należy jednak odpowiednio dobrać chemioterapeutyk, tak, aby nie wpływał negatywnie na replikację wirusa (2).

Warto wspomnieć, iż obecnie dostępne są już dwa preparaty wykorzystujące właściwości wirusów onkolitycznych. Pierwszym z nich jest Oncorine[®] oparty na zrekombinowanym adenowirusie H101, stosowany w leczeniu nowotworów głowy i szyi. Wirus ten pozbawiony jest genu E1B 55K, dzięki czemu efektywnie replikują się w komórkach z nieprawidłowym białkiem p53, co jest charakterystyczne dla komórek nowotworowych. Preparat Oncorine[®] jest stosowany w terapii skojarzonej ze standardowo stosowanym chemioterapeutykiem. Drugim preparatem jest IMLYGIC[®] oparty na wektorze HSV-1. Wektor ten zawiera gen kodujący GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte macrophage colony-stimulating factor). Preparat ten powoduje śmierć komórek nowotworowych oraz indukcję układu immunologicznego na skutek ekspresji wirusowego GM-CSF. Dokładny mechanizm nie został jeszcze poznany. Jak dotąd wykorzystywany jest w terapii czerniaka. Wskazaniem do jego użycia jest postać nieoperacyjna obejmująca skórę, warstwę podskórną oraz okoliczne węzły chłonne, jak również w przypadku postaci nawrotowych (24).

Wirusy zwierzęce – nowa nadzieja dla onkologii

Wirusy zwierzęce powodują duże straty ekonomiczne w hodowlach, a ponadto mogą stanowić zagrożenie dla życia i zdrowia człowieka. Choroby o etiologii wirusowej przenoszone przez zwierzęta odgrywają coraz większe znaczenie w zdrowiu publicznym. W ostatnich latach, po napływie informacji o coraz to nowszych chorobach odzwierzęcych (zoonozach), powodujące je wirusy zaczęły być traktowane jako realne zagrożenie. Wirus SARS, Nipah, Zachodniego Nilu, ptasiej grypy (H5N1) to tylko nieliczne, które przekroczyły „barierę” międzygatunkową i zaatakowały człowieka (9). Należy jednak pamiętać, że znaczna większość wirusów zwierzęcych nie jest patogenna dla człowieka, stąd też pomysł na wykorzystanie ich w wirusoterapii przeciwnowotworowej. W najnowszych doniesieniach dotyczących badań nad zastosowaniem wirusów zwierzęcych wymienia się takie wirusy, jak: wirus rzekomego pomoru drobiu (NDV), wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (VSV), wirus myksomatozy (MYXV) czy koński herpeswirus typu 1 (EHV-1). Główną zaletą przemawiającą za użyciem ich w terapiach przeciwnowotworowych u ludzi jest fakt, iż w większości przypadków nie są one chorobotwórcze dla człowieka, umożliwiają równoczesne zastosowanie wirusoterapii z innymi, konwencjonalnymi metodami, a ponadto charakteryzuje je niska toksyczność komórkowa.

Wirus rzekomego pomoru drobiu (NDV)

Jednym z pierwszych poznanych RNA wirusów onkolitycznych jest wirus rzekomego pomoru drobiu (Newcastle Disease Virus; NDV). Występuje endemicznie w wielu krajach, zakażając różne gatunki

ptaków, przyczyniając się tym samym do dużych strat ekonomicznych w ich hodowli (44). O możliwości wykorzystania NDV jako czynnika przeciwnowotworowego zdecydowały doświadczenia przeprowadzone w ubiegłym stuleciu na zarodkach kurzych, podczas których dowiedziono wysokiej cytotoksyczności NDV. Zainteresowanie badaczy dotyczące wykorzystania właściwości przeciwnowotworowych NDV doprowadziło do szeregu badań, które udowodniły, że NDV ulega replikacji w komórkach nowotworowych i indukuje w nich apoptozę, jednocześnie oszczędzając komórki zdrowe (5, 27). W zależności od typu onkolizy w komórkach ssaków wyróżniono szczepy lityczne i nielityczne. Szczepy lityczne powodują lizę komórek docelowych poprzez tworzenie zmian w błonach komórkowych, w tym tworzenie syncytiów. Do tej grupy należą m.in.: 73 – T31, MTH-68/H32, PV 70133. Drugą grupę stanowią szczepy nielityczne, które doprowadzają do powolnej regresji guza poprzez zakłócenie metabolizmu komórki. Zaliczany do tej grupy jest szczep Ulster 35. Zarówno szczepy lityczne, jak i nielityczne wydajnie replikują się w komórkach nowotworowych (29).

NDV posiada kilka ważnych cech, które czynią go doskonałym czynnikiem przeciwnowotworowym. Przede wszystkim, wykazuje silny tropizm do komórek dzielących się, do których wnika na drodze endocytozy. NDV ulega szybkiej replikacji w komórkach nowotworowych i zakaża sąsiednie komórki poprzez uwolnienie wirionów potomnych. Co więcej, NDV jest wyłącznie patogenem ptasim, przez co nie ma problemu z występującą wcześniej odpornością i zjadliwością u ludzi. Na podstawie przeprowadzonych badań szacuje się, że 96% populacji ludzkiej jest seronegatywna dla NDV. Kolejną zaletą jest występowanie jedynie łagodnych objawów na skutek zakażenia, obejmujących zapalenie spojówek, krtani oraz objawy grypopodobne (44). Podczas iniekcji wirusa do tkanki nowotworowej obecność wirionów potomnych stwierdza się już po 3 godzinach od momentu zakażenia. Inną ważną cechą NDV jest stymulacja odpowiedzi immunologicznej. Wirus przyczynia się do produkcji cytokin, w tym interferonów (IFN) oraz stymuluje wytwarzanie komórek NK (natural killer), a także makrofagów. W badaniach nad onkolizą powodowaną przez NDV, udowodniono indukcję apoptozy przez tego wirusa, m.in.: w linii komórkowej Vero (African ree monkey kidney, nerce małpy zielonej *Cercopithecus aethiops* sp.) oraz w komórkach raka piersi. Ponadto ułatwia on adhezję APC (antygen presenting cell; komórek prezentujących antygen) i limfocytów poprzez ekspresję wirusowych glikoprotein na powierzchni komórek zakażonych (40).

W badaniach klinicznych z użyciem NDV stosuje się różne strategie podawania wirusa. Jedną z nich jest bezpośrednia iniekcja zawiesiny wirusa do komórek guza (22). Niestety, metoda ta w wielu przypadkach okazała się nieskuteczna z powodu unieszkodliwienia

wirionów przez przeciwciała neutralizujące w tkance nowotworowej, co powodowało ponowny wzrost guza (14). Inną strategią są wirusowe onkolizaty, czyli preparaty zawierające fragmenty błon komórek nowotworowych, uprzednio zakażanych NDV. Tę formę podania wirusa testuje się w przypadku raka nerki i czerniaka (28). Trzecia strategia wiąże się z wykorzystaniem całych komórek nowotworowych, zakażonych szczepem nielitycznym NDV, które podawane są w formie szczepionki. Uzasadnieniem dla użycia tej metody jest fakt, że wprowadzenie całych komórek będzie lepiej stymulowało układ immunologiczny w porównaniu z onkolizatami, zawierającymi jedynie ich fragmenty (29). W wirusoterapii z zastosowaniem NDV zaproponowano także wlewy dożylnne, które okazały się dobrym zastosowaniem klinicznym. W wyniku podawania dożylnego potwierdzone zostały onkolityczne właściwości NDV, ponieważ efektywniej namnażał się on w komórkach nowotworowych. Ten rodzaj strategii sprawdzano m.in. w przypadku raka sutka, płuc, czerniaka, raka jelita grubego oraz w nerwiaku niedojrzałym (17).

Wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV)

Kolejny wirus charakteryzujący się możliwością replikacji w komórkach nowotworowych to wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV, Vesicular Stomatitis Virus), zaliczany do rodziny *Rhabdoviridae*. Jest chorobotwórczy głównie dla ssaków kopytnych, rzadko zakaża człowieka, powodując słabe objawy grypopodobne (36). VSV posiada „wrodzoną” wrażliwość na interferon, od której zależna jest jego replikacja. VSV charakteryzuje się tropizmem do wielu rodzajów komórek, a zawdzięcza to glikoproteinowej osłonce, na powierzchni której znajdują się odpowiednie receptory. VSV nie ulega replikacji w komórkach zdrowych z funkcjonalnym IFN, natomiast wydajnie replikuje się w komórkach nowotworowych, które charakteryzują się niewłaściwą aktywnością antywirusową IFN. Namnażanie się wirusa w komórkach nowotworowych w konsekwencji doprowadza do ich lizy. W badaniach prowadzonych *in vitro* i *in vivo* potwierdzono jego aktywność przeciwnowotworową w wielu typach nowotworów, m.in. w mięsach czy glejakach. Ponadto wykazano, że VSV namnaża się w komórkach z nadekspresją białka p53, przez co selektywnie wybiera komórki nowotworowe (3, 23), co zwiększa jego potencjalne możliwości terapeutyczne. Oprócz własności onkolitycznej, VSV daje duże możliwości modyfikacji mających na celu zwiększenie jego potencjału onkolitycznego, na przykład poprzez wprowadzanie immunomodulatorów czy genów samobójczych (4).

Koński herpeswirus typu 1 (EHV-1)

Koński herpeswirus typu 1 (EHV-1, Equine herpesvirus type 1) zaliczany jest do podrodziny *Alpha-*

herpesvirinae, podobnie jak ludzki wirus opryszczki pospolitej typu I i II (HSV-1, HSV-2). Jest patogenem koni, wywołując u nich stany zapalne dróg oddechowych, ronienia oraz zaburzenia neurologiczne (8). O jego potencjale onkolitycznym wiadomo stosunkowo od niedawna. W 2012 r. zespół Courchesne (7) zaproponował jego użycie w terapii glejaków ludzkich. Badania przeprowadzono na pięciu liniach komórkowych ludzkiego glejaka (A-172, Hs683, LN-18, SNB19 i U251), które zakażano wektorem wirusowym EHV-1 zawierającym kasetę lacZ, zaprojektowanym do badań modelowych na myszach (L11ΔgIΔgE). Uzyskane wyniki okazały się obiecujące – osiągnięto efekt cytotoksyczny w przypadku wszystkich linii komórkowych użytych podczas badania. Dodatkowo wykazano, że EHV-1 wnika do komórek za pomocą receptora MHC-I, którego ekspresja wzrosła w komórkach badanych hodowli (7).

W innych badaniach na liniach komórkowych ludzkiego glejaka postanowiono użyć EHV-1 w terapii skojarzonej z kwasem walproinowym. Związek ten jest inhibitorem deacetylazy histonowej, mogącym mieć wpływ bezpośrednio na modulowanie ekspresji wielu genów poprzez zmiany w budowie chromatyny czy regulacji szlaków sygnałowych i cyklu komórkowego, powodując apoptozę komórek nowotworowych (11). W terapii skojarzonej z jednoczesnym użyciem kwasu walproinowego i EHV-1 odnotowano lepsze rezultaty niż przy użyciu EHV-1 w monoterapii (43). Warto dodać, iż EHV-1 posiada wiele zalet przemawiających za użyciem go w terapii przeciwnowotworowej. Wykazuje krótki cykl replikacyjny, który zakończony jest lizą zakażonych komórek. Ponadto, jego genom jest dobrze poznany, co daje możliwość wprowadzenia różnych modyfikacji (7).

Wirus zakaźnej anemii kurcząt (CAV)

Wirus zakaźnej anemii kurcząt (CAV, Chicken Anaemia Virus), należący do rodzaju *Gyrovirus* rodziny *Circoviridae*, jest jednym z najmniejszych znanych ptasich wirusów (23-25 nm) zawierającym ssDNA (20). Wykazano, że wśród białek CAV (VP1 – białko kapsydu, VP2 i VP3), dwa – VP2 i VP3 wykazują działanie proapoptotyczne w zakażonych komórkach. Białko VP2 indukuje apoptozę zarówno w komórkach normalnych, jak i nowotworowych, zaś VP3 indukuje apoptozę niezależną od białka p53 w komórkach nowotworowych. VP3, zwane również apoptotyńą, to 121 aminokwasowe białko bogate w serynę i treoninę, a jego aktywność proapoptotyczna jest znacznie silniejsza niż VP2 i zyskała duże zainteresowanie badaczy zajmujących się wirusoterapią przeciwnowotworową. Apoptotyńa działa w postaci multimetrycznego kompleksu, który formuje superstruktury po połączeniu się z DNA (Adair, 2000). Wykazano, że w komórkach nowotworowych apoptotyńa występuje w jądrze w formie ufosforylowanej, natomiast w komórkach normalnych znajduje się w cytoplazmie w formie nieufosforylo-

wanej i łatwo można ją neutralizować. Co ciekawe, fosforylacja i jądrowa lokalizacja apoptotyny może być w komórkach normalnych przejściowo indukowana, na przykład poprzez transfekcję dużym onkogenem T SV40. Oznacza to, że apoptotyna wykrywa transformację onkogeną już na wczesnym etapie jej pojawienia się (21, 30). Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań, można wymienić kilka właściwości CAV, ze szczególnym uwzględnieniem działania białka VP3, które wpisują CAV na listę zwierzęcych wirusów onkolitycznych o potencjale przeciwnowotworowym. Są to m.in.: (i) selektywna aktywność apoptotyczna wobec komórek transformowanych i nowotworowych, a nie wobec normalnych komórek diploidalnych, wskazuje na minimalne ryzyko wystąpienia skutków ubocznych podczas terapii z wykorzystaniem apoptotyny; (ii) apoptotyna wykrywa wczesne etapy transformacji nowotworowej w komórkach; (iii) apoptoza indukowana przez apoptotynę jest niezależna od receptorów śmierci (Fas/FasL) oraz nie zależy od aktywności białka p53; (iv) indukcyjne działanie apoptotyny na proces apoptozy komórek jest stymulowane przez antyapoptotyczne białko Bcl-2. Nadekspresja białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-x1, obserwowana u ponad połowy wszystkich nowotworów, niejednokrotnie prowadzi do rozwoju oporności na stosowane podczas leczenia chemioterapeutyki. Działanie apoptotyny można więc wykorzystać w przypadku nowotworów, w leczeniu których zawodzi monoterapia (np.: chemioterapia) i wykorzystać je do terapii skojarzonej (30).

Wirus myksomatozy (MYXV)

Wirus myksomatozy (MYXV, Myxoma Virus) należy do rodziny *Poxviridae*, rodzaju *Leporipoxvirus*. Naturalnym jego rezerwuarem są króliki z gatunku *Sylvilagus brasiliensis* w Ameryce Południowej i *Sylvilagus bachmani* w Kalifornii, u których przebieg choroby jest łagodny ze zmianami skórnymi w postaci włókniaków. Natomiast u królików gatunku *Oryctolagus cuniculus* zakażenie tymi szczepami wywołuje wysoce śmiertelną chorobę – myksomatozę. Najnowsze badania wskazują, że wirus ten wykazuje tropizm do ludzkich komórek nowotworowych, szczególnie tych z nadmierną aktywacją kinazy Akt serynowo-treoninowej, odpowiedzialnej za nadmierną proliferację komórek i zaburzenia metabolizmu komórkowego, z czym wiąże się nadzieje na użycie go w terapii nowotworowej. Zespół Stanforda badał replikację MYXV w mysich liniach komórkowych czerniaka i raka piersi (31). Otrzymał obiecujące wyniki, w których zaobserwowano, że wirus wydajniej namnażał się w linii komórkowej mysiego czerniaka, wykazującej nadmierną aktywację kinazy Akt. Badania wskazują, że wirus ten może być wykorzystywany w przypadku nowotworów z hiperaktywacją Akt, jak np.: glejaki, nowotwory głowy i szyi, nowotwory trzustki. Dodatkowo, w badaniach *in vivo* wykazano

zmniejszoną zdolność tworzenia przerzutów do płuc, a w przypadku ich występowania, regresję zmian (16, 31). MYXV testowany był również w przypadku nowotworów trzustki. Badania *in vitro* wskazały na onkolityczne działanie MYXV, jednak wykazano, że skuteczność terapii była większa przy jednoczesnym stosowaniu chemioterapeutyku standardowo stosowanym w tym typie nowotworu (41).

Reowirusy

Reowirusy należące do rodziny *Reoviridae* są patogenami zarówno zwierząt, jak i ludzi, stąd też możliwość występowania w surowicy przeciwciał skierowanych na ten rodzaj wirusów. Warto jednak o nich wspomnieć, gdyż wykazują bardzo duży potencjał przeciwnowotworowy. W przeprowadzonych do tej pory badaniach udowodniono namnażanie się reowirusów w komórkach, w których występowała nadmierna aktywność onkogenów Ras, SOS, v-EBBR i c-myc (13, 32, 33). Replikacja wirusów w komórkach nienowotworowych jest natomiast hamowana przez kinazę białkową aktywowaną przez dsRNA. Namnażanie się reowirusów w komórkach nowotworowych prawdopodobnie spowodowane jest obecnością wadliwego systemu odpowiedzi przeciwwirusowej zależnego od PKR (protein kinase R; kinaza białkowa R), który jest aktywowany przez dsRNA, w tym przypadku dsRNA reowirusa (32). Mutacje protonkogenów obecne są w około 30% nowotworów ludzkich, m.in.: w 40% raków płuc, 30% przypadków białaczki szpikowej czy nawet w 90% raków trzustki, dlatego tak ogromne nadzieje pokłada się w możliwości zastosowania reowirusów jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych, w przypadku guzów z nadmiernie wysoką aktywnością Ras czy innych onkogenów (19). Reowirusy mogą stanowić dobry kierunek terapeutyczny w leczeniu nowotworów płuc czy układu pokarmowego, ponieważ wykazują naturalny tropizm do tych tkanek. Niestety, oprócz pozytywnych aspektów terapii z wykorzystaniem reowirusów pojawiły się również pewne problemy. W przypadku stosowania reowirusów u zwierząt z obniżoną odpornością pojawiają się działania niepożądane, między innymi: zapalenie mięśnia sercowego, martwicze zapalenie mózgu, krwawienie, zwłóknienia wątroby, zatem stosowanie reowirusów u pacjentów, którzy często pozostają w stanie immunosupresji z powodu leczenia chemioterapeutycznego, nie jest dobrym rozwiązaniem (13).

Wirusoterapia ma istotną przewagę nad tradycyjnymi metodami leczenia – pozwala bardziej precyzyjnie niszczyć komórki nowotworu. Dzięki temu wywołuje mniej skutków ubocznych, a nawet jeśli z czasem okaże się, że niektórym chorym przedłuży życie tylko o kilka czy kilkanaście miesięcy, to pozwoli im doczekać do momentu, kiedy pojawi się kolejna nowa terapia lub nowy lek. Wielu naukowców zmagają się z problemem stosowania wirusów w terapii przeciw-

nowotworowej – czyli znalezieniem takiego wirusa, który „przyczepi” się tylko do komórek nowotworowych, a nie zaatakuję zdrowych, co więcej – nie wywoła niepożądanego odpowiedzi ze strony układu immunologicznego. I tu ogromne nadzieje daje zastosowanie onkolitycznych wirusów zwierzęcych, gdyż najczęściej nie są one chorobotwórcze dla człowieka, zaś niejednokrotnie wykazują wysoką specyficzność do komórek zmienionych nowotworowo, „omijając” równocześnie komórki zdrowe.

Piśmiennictwo

1. Adair B. M.: Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Developmental and Comparative Immunol.* 2000, 24, 247-255.
2. Augustyniak J., Sawicki K., Skrzypczak M., Kapka-Skrzypczak L.: Zastosowanie wirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej. *Probl. Hig. Epidemiol.* 2012, 93, 654-662.
3. Balachandran S., Barber G. N.: Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB life* 2000, 50, 135-138.
4. Błażejewska P., Goździcka-Józefiak A.: Wirusowa terapia przeciwnowotworowa. *Współ. Onkol.* 2005, 9, 279-283.
5. Cassel W. A., Garret R. E.: Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer* 1965, 18, 863-868.
6. Chiocca E. A., Rabkin S. D.: Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* 2014, 2, 295-300.
7. Courchesne M. J., White M. C., Stanfield B. A., Frampton A. R.: Equine herpesvirus type 1-mediated oncolysis of human glioblastoma multiforme cells. *J. Virol.* 2012, 86, 2882-2886.
8. Drebert Z., Golke A., Cymerys J., Stońska A., Chmielewska A., Tucholska A., Bańbura M. W.: Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) disrupts actin cytoskeleton during productive infection in equine leukocytes. *Pol. J. Vet. Sci.* 2015, 18, 107-112.
9. Gliński Z., Kostro K.: Nowo pojawiające się zoonozy zagrażające zdrowiu publicznemu. *Życie Wet.* 2005, 80, 481-484.
10. Gooding L. R.: Regulation of TNF-mediated cell death and inflammation by human adenoviruses. *Infect Agents Dis.* 1994, 3, 106-115.
11. Grabarska A., Dmoszyńska-Graniczka M., Nowosadzka E., Stepulak A.: Inhibitory deacetylaz histonów – mechanizmy działania na poziomie molekularnym i zastosowania kliniczne. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2013, 67, 722-735.
12. Gromadzka A., Kubiczak M.: Terapia genowa i jej zastosowanie w leczeniu nowotworów ginekologicznych. *Ginekol. Pol.* 2010, 81, 50-54.
13. Kim M., Chung Y., Johnston R. N.: Reovirus and tumor oncolysis. *J. Microbiol.* Seoul 2007, 45, 187.
14. Kirn D. H., McCormick F.: Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol. Med. Today* 1996, 2, 519-527.
15. Krawczyk P., Czekajka-Chehab E., Jankowska O., Koczkodaj D., Rolski A., Mulawka D., Korobowicz E., Milanowski J.: Molekularne terapie celowane w niedrobnokomórkowym raku płuca. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2009, 3, 16-26.
16. Krześlak A.: Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2010, 64, 490-503.
17. Lorence R. M., Pecora A. L., Major P. P., Hotte S. J., Laurie S. A., Roberts M. S., Groene W. S., Bamat M. K.: Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2003, 5, 618-624.
18. Mitrus I., Szala S.: Chemioterapia – główne przyczyny niepowodzeń. *Nowotwory J. Oncol.* 2009, 59, 368-376.
19. Norman K. L., Lee P. W.: Not all viruses are bad guys: the case for reovirus in cancer therapy. *Drug Discov. Today* 2005, 10, 847-855.
20. Noteborn M. H. M., Verschuere C. A. J., Koch G., Van der Eb A. J.: Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 3073-3077.
21. Olijslagers S., Dege A. Y., Dinsart C., Voorhoeve M., Rommelaere J., Noteborn M. H. M., Cornelis J. J.: Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther.* 2001, 8, 958-965.
22. Omar A. R., Ideris A., Ali Am. M., Othman F., Yusoff K., Abdullah J. M., Shila H., Mohamad W., Zawawi M., Meyyappan N.: An overview On the development of Newcastle Diseasevirus as an anti-cancer therapy. *Malaysian J. Med. Sci.* 2002, 9, 4-12.
23. Paglino J. C., van den Pol A. N.: Vesicular stomatitis virus has extensive oncolytic activity against human sarcomas: rare resistance is overcome by blocking interferon pathways. *J. Virol.* 2011, 85, 9346-9358.
24. Pol J., Kroemer G., Galluzzi L.: First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncolimmunol.* 2015, 5, e1115641.
25. Power A. T., Bell J. C.: Cell-based delivery of oncolytic viruses: a new strategic alliance for a biological strike against cancer. *Mol. Ther.* 2007, 15, 660-665.
26. Prestwich R. J., Errington F., Harrington K. J., Pandha H. S., Selby P., Melcher A.: Oncolytic viruses: do they have a role in anti-cancer therapy? *Clin. Med. Oncol.* 2008, 2, 83-96.
27. Reichard K. W., Lorence R. M., Cuscino C. J., Peoples M. E., Walter R. J., Fernando M. B., Reyes H. M., Greager J. A.: Newcastle disease virus selectively kills human tumour cells. *J. Surg. Res.* 1992, 52, 448-453.
28. Schirmacher V., Ahlert T., Pröbstle T., Steiner H. H., Herold-Mende C., Gerhards R., Hagmüller E., Steiner H. H.: Immunization with virus-modified tumour cells. *Semin. Oncol.* 1998, 25, 677-696.
29. Schirmacher V., Haas C., Bonifer R., Ahlert T., Gerhards R., Ertel C.: Human tumour cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus. *Gene Ther.* 1999, 6, 63-73.
30. Singh P. K., Doley J., Kumar G. R., Sahoo A. P., Tiwari A. T.: Oncolytic viruses & their specific targeting to tumour cells. *Indian J. Med. Res.* 2012, 136, 571-584.
31. Stanford M. M., Shaban M., Barrett J. W., Werden S. J., Gilbert P. A., Bondy-Denomy J., MacKenzie L., Graham K. C., Chambers A. F., McFadden G.: Myxoma virus oncolysis of primary and metastatic B16F10 mouse tumors in vivo. *Mol. Therapy* 2008, 16, 52-59.
32. Strong J. E., Coffey M. C., Tang D., Sabinin P., Lee P. W.: The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the RASS1 signaling pathway by reovirus. *EMBO J.* 1998, 17, 3351-3362.
33. Strong J. E., Lee P. W.: The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *J. Virol.* 1996, 70, 612-616.
34. Thirukkumar C. M., Morris D. G.: Oncolytic virotherapy for multiple myeloma: past, present, and future. *Bone Marrow Res.* 2011, e632948.
35. Tollefson A. E., Ryerse J. S., Scaria A., Hermiston T. W., Wold W. S.: The E3-11.6-Da adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 1996, 220, 152-162.
36. Tomczyk T., Orzechowska B.: Zastosowanie wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) jako wektora szczepionek przeciw wirusowych. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2013, 67, 1345-1358.
37. Tong A. W., Senzer N., Cerullo V., Templeton N. S., Hemminki A., Nemunaitis J.: Oncolytic Viruses for Induction, of Anti-Tumor Immunity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2011, 13, 1750-1760.
38. Tuchowska P., Worach-Kardas H., Marcinkowski J. T.: Najczęstsze nowotwory złośliwe w Polsce – główne czynniki ryzyka i możliwości optymalizacji działań profilaktycznych. *Probl. Hig. Epidemiol.* 2013, 94, 166-171.
39. Verheije M. H., Rottier P. J.: Retargeting of viruses to generate oncolytic agents. *Adv. Virol.* 2012, 14, e798526.
40. Washburn B., Schirmacher V.: Human tumor cell infection by Newcastle Disease Virus leads to upregulation of HLA and cell adhesion molecules and to induction of interferons, chemokines and finally apoptosis. *Intern. J. Oncology* 2002, 21, 85-93.
41. Wennier S. T., Liu J., Li S., Rahman M. M., Mona M., McFadden G.: Myxoma virus sensitizes cancer cells to gemcitabine and is an effective oncolytic virotherapeutic in models of disseminated pancreatic cancer. *Mol. Therapy* 2012, 20, 759-768.
42. Wędrowska E., Wandtke T., Dyczek A., Woźniak J.: Wirusowy transfer liganda czynnika martwicy nowotworu indukującego apoptozę (TRAIL) w terapii genowej. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2014, 69, 1411-1422.
43. White M. C., Frampton A. R.: The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances equine herpesvirus type 1 (EHV-1)-mediated oncolysis of human glioma cells. *Cancer gene therapy* 2013, 20, 88-93.
44. Zamarin D., Palese P.: Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future Microbiol.* 2012, 7, 347-367.
45. Zeyaulah M., Patro M., Ahmad I., Ibraheem K., Sultan P., Nehal M., Ali A.: Oncolytic viruses in the treatment of cancer: a review of current strategies. *Pathol. Oncol. Res.* 2012, 18, 771-781.

Adres autora: mgr Marcin Chodkowski, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: marcin_chodkowski@sggw.pl