

STRESZCZENIE

Oncolytic Vaccinia Virus in Treatment of Cancer

Targeting Metastatic and Chemoresistant Ovarian Cancer by a CXCR4 antagonist-armed
Viral Oncotherapy

Zastosowanie onkolitycznego wirusa krowianki w terapii przeciwnowotworowej

Terapia z użyciem rekombinowanego wirusa krowianki w leczeniu agresywnych
i lekoopornych nowotworów jajnika

Marcin Komorowski

**Praca na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii
medycznej**

wykonana w Zakładzie Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego –
Państwowego Zakładu Higieny

oraz

w Department of Immunology - Roswell Park Cancer Institute, USA.

Promotor: Dr hab. n.med. Bogumiła Litwińska, prof. NIZP-PZH

Kopromotor: Danuta Kozbor, PhD, Associate Professor

Rak jajnika jest jednym z najbardziej zabójczych nowotworów atakujących kobiety. W 2012 r. na całym świecie zdiagnozowano łącznie ok. 239 tys. nowych zachorowań i odnotowano prawie 152 tys. zgonów z jego powodu. Nowotwór ten jest najczęściej diagnozowany w późnym stadium zaawansowania (III-IV stadium wg FIGO), co znacznie zmniejsza szansę na jego wyleczenie. Pięcioletni wskaźnik przeżycia dla chorych w I stadium choroby wynosi 80-90%, spada natomiast do 15-30% w przypadku chorych w IV stadium zaawansowania. Przyczyną późnego rozpoznawania raka jajnika jest bezobjawowy przebieg choroby w jej początkowych stadiach, a także nieswoistość pojawiających się później objawów, które często są mylone z innymi schorzeniami.

Rak jajnika jest chorobą heterogenną. Wyróżnia się jego różne typy histologiczne: surowiczy, endometrioidalny, jasnokomórkowy, śluzowy, guzy Brennera, może też występować typ mieszany i rak niezróżnicowany (undifferentiated). Na podstawie tzw. dualistycznego modelu kancerogenezy jajnika, łączącego się w spójną całość z wiedzą o pochodzeniu histologicznym raków jajnika, podzielono je na dwa typy. Do nowotworów typu I zaliczamy dobrze zróżnicowane (low grade) raki: surowicze, endometrioidalne, jasnokomórkowe i śluzowe. W przypadku tych nowotworów (poza rakiem jasnokomórkowym) rokowanie jest dobre. W nowotworach typu I występują mutacje somatyczne w genach *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* i *PIK3CA*, natomiast bardzo rzadko mutacje w genie *TP53*. Do nowotworów typu II zaliczamy niskozróżnicowane raki surowicze, niskozróżnicowane raki endometrioidalne (high grade endometrioid carcinoma), mięsakoraki i raki niezróżnicowane. Nowotwory typu II charakteryzują się bardzo szybkim wzrostem i dużą agresywnością, a diagnoza w 75% przypadków jest stawiana w zaawansowanym stadium (III-IV). Cechuje je duża niestabilność chromosomalna i występowanie mutacji w genie *TP53*, w około 95% przypadków. Rzadko występują mutacje, takie jak w nowotworach typu I. Ponadto, w 40-50% przypadków występuje inaktywacja genów *BRCA*. Nowotwory typu II mają bardzo złe rokowania.

W leczeniu zaawansowanych nowotworów jajnika postępowaniem z wyboru jest, na ile to możliwe, maksymalne usunięcie masy guza pierwotnego i ognisk przerzutowych oraz późniejsza chemioterapia uzupełniająca (adiuwantowa). Standardem w chemioterapii pierwszego rzutu są obecnie pochodne platyny (karboplatyna) i taksoidów (paklitaksel). Niestety, u większości chorych na raka jajnika, po pewnym czasie od zakończenia leczenia dochodzi do wznowy procesu nowotworowego. Czynnikiem rokowniczym jest czas jaki upłynął od zakończenia chemioterapii. W leczeniu nawrotowego raka jajnika główną rolę odgrywa chemioterapia, chociaż w pewnych przypadkach stosuje się chirurgiczne usunięcie

wtórnych ognisk nowotworowych. W chemioterapii drugiego rzutu, poza karboplatiną i paklitakselem stosuje się liposomalną pegylowaną doksorubicynę (PLD), topotekan, gemcytabinę i etopozyd. Dostępne terapie jednak bardzo rzadko pozwalają na całkowite wyzdrowienie chorych na zaawansowanego raka jajnika, co może wynikać z posiadania przez nowotwór cech, wpływających na jego agresywność i wykształcenie lekooporności.

Obecnie, konwencjonalne strategie leczenia chorych na nowotwory niszczą szybko rosnące, zróżnicowane komórki rakowe, redukując masę nowotworową, ale najprawdopodobniej znacznie mniej efektywnie usuwają komórki macierzyste nowotworu (cancer stem cells/cancer initiating cells, CSCs/CICs). Istnieje dużo dowodów, wskazujących potencjalne mechanizmy oporności CICs na leczenie. CICs zawdzięczają swoją oporność np. większej aktywności białek transporterowych (transmembranowych transporterów ABC), wyższemu poziomowi ekspresji białek antyapoptotycznych, czy szybszej naprawie DNA. CICs są bardzo często wykrywane na podstawie ekspresji określonych markerów powierzchniowych. W przypadku CICs, związanych z rozwojem agresywnych form raka jajnika, do markerów tych możemy zaliczyć: CD133, CD44, CD117 (c-kit) oraz zwiększoną aktywność dehydrogenazy aldehydowej ALDH1. Wszystkie te właściwości sprawiają, że CICs mogą przyczyniać się do nawrotu choroby nowotworowej, tworzenia się przerzutów oraz powstawania agresywnych, opornych na konwencjonalne leczenie form raka jajnika.

Na skuteczność leczenia może mieć również wpływ immunosupresyjny charakter mikrośrodowiska nowotworu (the tumor microenvironment, the TME). Wykazano, że może ono hamować eliminację komórek nowotworowych przez komórki odpornościowe aktywowane działaniem chemioterapeutyków. Komórki nowotworowe, ginące w procesie apoptozy, uwalniają szereg antygenów. Antygeny te są pochłaniane przez komórki dendrytyczne (dendritic cells, DCs) i mogą być prezentowane w kontekście cząsteczek MHC I limfocytom CD8⁺ cytotoksycznym, tym samym pobudzać układ odpornościowy gospodarza do eliminacji komórek nowotworowych. Komórki nowotworowe, potrafią jednak „uciec” z pod nadzoru immunologicznego. W swojej ucieczce wykorzystują dwie strategie. Pierwsza z nich polega na „unikaniu” rozpoznania i eliminacji przez komórki T. Druga strategia polega na uszkodzeniu lub zahamowaniu aktywności niektórych elementów odpowiedzi immunologicznej przez komórki nowotworowe lub inne komórki obecne w TME. Dochodzi między innymi do zahamowania na komórkach nowotworowych ekspresji cząsteczek MHC klasy I oraz do nagromadzenia komórek oraz czynników o charakterze immunosupresyjnym. Należą do nich: regulatorowe limfocyty T (Treg), komórki supresyjne pochodzące z linii mieloidalnej (MDSCs), swoiste dla nowotworów makrofagi (TAM typu II), niedojrzałe

komórki dendrytyczne (iDCs), oraz takie czynniki jak: TGF- β , IL-10, PGE2 i VEGF. Na szczególną uwagę zasługuje również chemokina CXCL12 (SDF-1) i jej receptor CXCR4. CXCL12 wpływa na biologię nowotworów poprzez dwa główne mechanizmy: a) autokryne pobudzanie komórek nowotworowych, wykazujących ekspresję receptora CXCR4, do proliferacji i angiogenezy oraz b) parakryne przemieszczanie się komórek nowotworowych do miejsca przerzutu lub komórek immunologicznych, stromalnych i waskulogennych do TME. Chemokina ta może mieć również wpływ na rozwój i przerzuty CICs, które na swojej powierzchni także posiadają receptor CXCR4. W wielu badaniach wykazano udział szlaku CXCL12/CXCR4 w patogenezie raka jajnika. Bierze on udział w procesie jego waskulogenezy (rekrutacja prekursorów komórek śródbłonkowych EPC), angiogenezy (popudzanie wydzielania czynnika angiogenego VEGF przez komórki nowotworowe lub uwalnianie z macierzy pozakomórkowej, ECM) oraz immunosupresji (rekrutacja MDSCs, iDCs, Tregs), przyczyniając się do progresji choroby i powstania agresywnych form.

Dlatego też, zaawansowane stadia raka jajnika oraz oporność na konwencjonalne leczenie, stanowią wyzwanie dla współczesnej medycyny w walce z tym nowotworem. Ważne stało się więc poszukiwanie nowoczesnych, bardziej skutecznych metod leczenia. Coraz więcej uwagi poświęca się molekularnym terapiom celowanym, czyli nakierowanym na hamowanie określonych szlaków sygnałowych w komórkach nowotworowych. Korzyści w leczeniu raka jajnika może również przynieść immunoterapia. Zaobserwowano, iż infiltracja guza przez limfocyty T (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) wiąże się z dłuższym przeżyciem. Wiroterapia z użyciem wirusów onkolitycznych, łącząca cechy wyżej wymienionych terapii, może także stać się przyszłościową metodą leczenia raka jajnika, na co wskazują licznie przeprowadzane obecnie badania kliniczne.

Warunkiem wiroterapii jest użycie wirusa onkolitycznego, który selektywnie zakaża i powoduje lizę komórek rakowych, przy czym nie narusza komórek prawidłowych (terapia onkolityczna). Stosuje się więc wirusy o wysokiej swoistości względem tych komórek. Oprócz zabijania komórek nowotworowych wirus onkolityczny wywołuje efekt anty-angiogeny oraz może przełamywać immunosupresyjny charakter TME i tym samym aktywować immunologiczną odpowiedź przeciwnowotworową. Adenowirusy, herpeswirusy i retrowirusy stanowią grupę wirusów, najbardziej wykorzystywanych w terapii onkolitycznej. Na etapie wstępnym znajdują się natomiast badania wirusa krowianki (vaccinia virus, VV), co czyni go interesującym obiektem zainteresowań w aspekcie możliwości zastosowania w wiroterapii. VV posiada wiele naturalnych cech, które sprawiają że może stanowić dobre narzędzie w walce z nowotworem. Selektywność wirusa w stosunku do

komórek rakowych można dodatkowo zwiększyć poprzez modyfikację jego genomu. W tym celu prowadzi się działania, które obejmują: 1) uzależnienie syntezy wirusowego DNA od komórkowej kinazy tymidyny, której silna ekspresja widoczna jest w komórkach nowotworowych; 2) utratę zdolności wirusa do zakażenia zdrowych komórek (usunięcie genu kodującego VGF, vaccinia growth factor); 3) modyfikację genu kodującego inhibitor interferonu typu I –B18R, w wyniku czego wirus może replikować się tylko w komórkach nowotworowych. Jego dodatkowym atutem jest także duża pojemność genomu, umożliwiającą wprowadzanie genów terapeutycznych, wzmacniających działanie przeciwnowotworowe. Dlatego też, opracowanie skutecznej terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem onkolitycznego wirusa krowianki (oncolytic vaccinia virus, OVV) może przynieść wiele korzyści i obiecujących wyników. Taka terapia może stać się bardzo przydatna w leczeniu i zwiększeniu szans przeżycia pacjentów z nowotworami jajnika o wysokim stadium zaawansowania i bardzo złym rokowaniu.

Celem tej pracy było stworzenie nowej, celowanej terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem rekombinowanego wirusa krowianki. Terapia dotyczy zwalczania agresywnych i lekoopornych nowotworów jajnika, a badania prowadzone na modelach *in vitro* i *in vivo*, miały wykazać jej skuteczność w bezpośrednim niszczeniu komórek rakowych, modulacji TME i aktywacji immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

W pierwszym etapie badań, zaprojektowano celowaną terapię przeciwnowotworową w oparciu o OVV. Do genomu wirusa wprowadzono gen terapeutyczny, dla którego wzorzec stanowił dimer CTCE-9908, oddziałujący z N-końcowym regionem chemokiny CXCL12 (KGVSLSYR-K-RYSLSVGK). W celu zachowania jego dimerycznej struktury, użyto mysiego lub ludzkiego fragmentu Fc IgG2a. Tak powstały konstrukt został wprowadzony do dzikiego wirusa VSC20 w oparciu o rekombinację homologiczną z plazmidem pCB023-CXCR4-A-Fc. W rezultacie otrzymano rekombinowanego wirusa krowianki wykazującego ekspresję antagonisty receptora CXCR4 – OVV-CXCR4-A-Fc. W podobny sposób skonstruowano również wirusy z wbudowanym tylko fragmentem Fc (OVV-Fc) albo z białkiem EGFP (OVV-EGFP), stanowiące swoiste kontrole. Białko EGFP posłużyło także jako marker w monitorowaniu zakażenia. Utworzone w ten sposób rekombinowane wirusy, namnażano w linii komórkowej HeLa, a następnie oczyszczano w gradiencie sacharozy, mianowano i używano w badaniach prowadzonych w systemach *in vitro* i *in vivo*.

Otrzymany konstrukt OVV-CXCR4-A-Fc przebadano pod kątem jego skuteczności w leczeniu agresywnych form raka jajnika. W tym celu użyto agresywny wariant mysiej linii komórkowej raka jajnika ID8-T. Komórki tej linii posiadały cechy charakterystyczne dla

CICs. Wykazywały wysoką ekspresję markerów powierzchniowych CD44 oraz CD117, tworzyły sferoidalne formy w hodowli *in vitro*, a w badaniach *in vivo* szybciej formowały u myszy guz nowotworowy w porównaniu do komórek nie posiadających tych markerów. W badaniach *in vitro*, komórki linii ID8-T wykazywały również zwiększoną podatność na zakażenie OVV-EGFP w porównaniu do komórek linii macierzystej, nie agresywnej (ID8), co mogło wynikać z tropizmu wirusa do CICs. Efekt ten potwierdzono następnie w badaniach na modelu syngenicznych myszy, u których OVV-EGFP eliminował głównie populacje komórek wykazujących na swojej powierzchni obecność markerów CD117 jak i CD44. Użycie w celu terapeutycznym, w badaniach *in vivo*, wirusa OVV-EGFP przyczyniło się do ograniczenia wzrostu guza nowotworowego, a zastosowanie konstruktu OVV-CXCR4-A-Fc zwiększyło ten efekt.

Pomimo, iż mono wiroterapia z udziałem OVV-CXCR4-A-Fc przyniosła obiecujące efekty w redukcji masy guza, nie udało się jednak uzyskać całkowitego wyleczenia myszy. Dlatego też, zastosowano dodatkowe iniekcje wirusa w celu zwiększenia skuteczności terapii. Wykazano, że dodatkowe dwie dawki OVV-CXCR4-A-Fc przedłużyły znacznie przeżywalność myszy w porównaniu do myszy kontrolnych oraz myszy leczonych wirusem kontrolnym (OVV-Fc). Efekt ten zawdzięczano, nie tylko bezpośredniej eliminacji komórek nowotworowych przez wirusa, ale także zmianom w TME spowodowanych działaniem antagonisty. Zablockowanie oddziaływania CXCR4/CXCL12 ograniczyło proces powstawania przerzutów i angiogenezę. Doszło do zmniejszenia ekspresji CXCL12 i VEGF oraz zahamowania indukcji czynników wykazujących działanie immunosupresyjne, tj. EPCs, MDSCs i pDCs w przestrzeni otrzewnowej. Efektem leczenia była również aktywacja przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Zaobserwowano zwiększoną akumulację CD4⁺ oraz CD8⁺ TILs, swoistych przeciwciał oraz limfocytów T CD8⁺, rozpoznających antygen WT1 (Wilms' Tumor 1 antigen), obecny na komórkach raka jajnika.

Uzyskanie wyżej opisanych wyników, doprowadziło następnie do zaprojektowania terapii łączonej z użyciem OVV oraz doksorubicyny (DOX) i przetestowaniu jej w leczeniu opornego na konwencjonalną chemioterapię raka jajnika. W tym celu, zarówno w badaniach *in vitro* i *in vivo*, zastosowano linie ID8-R oraz CAO2-R, reprezentujące odpowiednio mysie i ludzkie warianty oporne na paklitaxel i karboplatynę. Linie te, charakteryzowały się wysoką ekspresją receptorów CD44 i CXCR4 oraz szybciej formowały guzy nowotworowe u myszy w porównaniu do linii macierzystych (ID8-P, CAO2-P). Wykazywały również silniejszą aktywację szlaków komórkowych Akt i MEK/ERK, niezbędnych do replikacji wirusa. W badaniach *in vitro* wykazano większą wrażliwość linii ID8-R i CAO2-R na

zakażenie OVV-EGFP w porównaniu do linii ID8-P i CAO2-P. W testach cytotoxyczości, uzyskano także synergistyczny efekt działania pomiędzy OVV i DOX w stosunku do tych linii. Efekt ten potwierdzono następnie w badaniach *in vivo* na modelach mysich, gdzie podając liposomalną formę doksorubicyny (PLD) w 8 dniu po zastosowaniu OVV, zaobserwowano znaczne wydłużenie czasu przeżywalności myszy.

Kolejnym etapem badań było zbadanie komórkowego mechanizmu oddziaływania OVV i DOX w testach *in vitro*. Wykazano, iż terapia łączona, polegająca na podaniu DOX 12 godzin po zakażeniu OVV, zwiększała umieralność komórek ID8-R na drodze apoptozy. Efekt ten był wynikiem produkcji interferonu beta (IFN- β) przez zakażone wirusem komórki, który z kolei spowodował wzrost efektywności działania DOX. Na powierzchni martwych komórek zaobserwowano również ekspresję kalretikuliny (calreticulin, CRT), czynnika aktywującego komórki dendrytyczne. Pobudzone w ten sposób DCs w większym stopniu fagocytowały komórki ID8-R oraz CAO2-R poddane terapii łączonej i w konsekwencji mogły aktywować przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. Obserwacje te potwierdzono w badaniach na myszach syngenicznym, u których po podaniu komórek ID8-R leczonych OVV i DOX, a następnie wszczepieniu nowotworu, zaobserwowano ograniczenie wzrostu guza.

W celu osiągnięcia większej skuteczności zaprojektowanej terapii łączonej w leczeniu lekoopornego raka jajnika, zastosowano OVV, który wykazywał ekspresję antagonisty receptora CXCR4. W badaniach *in vivo*, na modelu komórek ID8-R podanym myszom syngenicznym, zastosowanie OVV-CXCR4-A-Fc, a następnie po 7 dniach podanie PLD, doprowadziło do całkowitego wyleczenia 20% myszy. Podobne rezultaty osiągnięto także na modelu ludzkich komórek CAO2-R, które podano myszom SCID. Zastosowanie OVV-CXCR4-A-Fc oraz PLD u myszy syngenicznym, przyczyniło się również do znacznych zmian w TME. W przestrzeni otrzewnowej wykazano zahamowanie akumulacji elementów immunosupresyjnych, tj. Tregs, MDSCs oraz zwiększenie liczby DCs, a także prozapalnych makrofagów typu I (TAMs). Doszło także do aktywacji immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej, co wynikało z obecności limfocytów T CD8⁺, których swoistość w stosunku do antygeny WT1 potwierdzono w badaniach przy użyciu cytometrii przepływową z wykorzystaniem tetramerów MHC.

Wytworzenie swoistej odpowiedzi immunologicznej, skierowanej przeciwko komórkom ID8-R, potwierdzono następnie w terapii adoptywnej (adoptive cell therapy, ACT). Polegała ona na pobraniu splenocytów od myszy po zakończonym leczeniu OVV-CXCR4-A-Fc i PLD, pobudzeniu *in vitro*, a następnie podaniu ich myszom z nowotworem.

Wykazano znacznie ograniczony wzrost guza nowotworowego po zastosowaniu takiego schematu leczenia.

Uzyskane wyniki świadczą, że terapia przeciwnowotworowa oparta na zastosowaniu onkolitycznego wirusa krowianki z wbudowanym genem terapeutycznym kodującym antagonistę receptora CXCR4 (OVV-CXCR4-A-Fc), reprezentuje nową, o szerokim spektrum działania, strategię w leczeniu agresywnych wariantów raka jajnika, charakteryzujących się obecnością CICs. Dodatkowo, połączenie konstruktów OVV-CXCR4-A-Fc z doksorubicyną stanowi nową terapię łączoną, która może przynieść znaczne korzyści w leczeniu lekoopornych nowotworów, poprzez: 1) skuteczne niszczenie komórek rakowych, 2) zahamowanie immunosupresyjnego charakteru TME oraz 3) wytworzenie swoistej, przeciwnowotworowej pamięci immunologicznej powstrzymującej tworzenie się przerzutów i nawroty choroby.