



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Α.Γ. ΤΖΙΟΥΦΑΣ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΩΝ ΩΣ ΦΟΡΕΩΝ ΣΤΗ ΓΟΝΙΑΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ  
ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΣΟΘΗΛΙΩΜΑΤΟΣ**

**Διδακτορική Διατριβή**

**Βασιλική Σαλούρα**

**ΑΘΗΝΑ, 2017**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....</b>	<b>5</b>
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ (ελληνικά).....</b>	<b>6</b>
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ (αγγλικά).....</b>	<b>11</b>
<b>ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ (αρχαία ελληνικά).....</b>	<b>15</b>
<b>ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ (νεοελληνική απόδοση).....</b>	<b>16</b>
<b>ΑΦΙΕΡΩΣΗ.....</b>	<b>17</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....</b>	<b>18</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>19</b>
1. ΜΕΣΟΘΗΛΙΩΜΑ.....	20
1.1. Επιδημιολογία.....	20
1.2. Παθογένεια.....	20
1.3. Κλινικές εκδηλώσεις.....	21
1.4. Διάγνωση.....	22
1.5. Θεραπεία.....	22
2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	23
2.1. Εισαγωγή και βασικές αρχές της γονιδιακής θεραπείας.....	23
2.2. Κλινικές εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας.....	25
3. ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΣΟΘΗΛΙΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ..	26
3.1. Το κακόηθες μεσοθηλίωμα ως «στόχος» γονιδιακής θεραπείας.....	26
3.2. Στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας για το κακόηθες μεσοθηλίωμα.....	26
3.2.1. Θεραπεία με γονίδια «αυτοκτονίας»: Ad.HSVtk/GCV.....	27
3.2.2. Γονιδιακή θεραπεία με ανοσοτροποποιητικά γονίδια.....	28
3.2.2.1. Vaccinia-virus VV-IL-2.....	28
3.2.2.2. Ad.IFN-β και Ad.IFN-α.....	29
3.3. Μειονεκτήματα της γονιδιακής θεραπείας με μη πολλαπλασιαζόμενους ιούς.....	30

4. ΟΓΚΟΛΥΤΙΚΟΙ ΙΟΙ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	31
4.1. Γενικά στοιχεία.....	31
4.2. Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης.....	31
4.3. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα ενός αποτελεσματικού ογκολυτικού ιού.....	32
4.4. Μηχανισμοί επιλεκτικότητας για τα καρκινικά κύτταρα.....	32
4.5. Παραδείγματα ογκολυτικών ιών που έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία καρκίνου.....	33
5. ΙΟΣ ΘΥΛΑΚΙΩΔΟΥΣ ΣΤΟΜΑΤΙΤΙΔΑΣ (VESICULAR STOMATITIS VIRUS, VSV).....	33
5.1. Κύκλος ζωής του VSV.....	35
5.2. Παθογένεια και φορείς (hosts) του VSV.....	35
5.3. Εγγενής επιλεκτικότητα του VSV για τα καρκινικά κύτταρα.....	36
5.4. Αναφορές στην αποτελεσματική αντικαρκινική δράση του VSV in vivo....	36
5.5. Χαρακτηριστικά του ιού VSV που τον καθιστούν έναν ιδανικό ογκολυτικό ιό.....	37
6. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ.....	37
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>43</b>
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	43
2. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ β ΕΝΙΣΧΥΕΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΟΥ ΟΓΚΟΛΥΤΙΚΟΥ ΙΟΥ ΘΥΛΑΚΙΩΔΟΥΣ ΣΤΟΜΑΤΙΤΙΔΑΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΣΟΘΗΛΙΩΜΑΤΟΣ.....	43
2.1. Εισαγωγή.....	43
2.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	44
2.3. Αποτελέσματα της μελέτης.....	46
2.4. Συμπεράσματα.....	55
2.5. Παραπομπές.....	58
3. ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΜΕΛΕΤΗΣ (2).....	61
4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΙΟΥ ΘΥΛΑΚΙΩΔΟΥΣ ΣΤΟΜΑΤΙΤΙΔΑΣ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΕΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ β ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΣΟΘΗΛΙΩΜΑΤΟΣ: Η ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ	

ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ β ΚΑΘΟΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ.....	70
4.1. Εισαγωγή.....	70
4.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	71
4.3. Αποτελέσματα της μελέτης.....	76
4.4. Συμπεράσματα.....	90
4.5. Παραπομπές.....	93
5. ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΜΕΛΕΤΗΣ (4).....	97
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΗΣ ΕΚΠΟΝΗΘΕΙΣΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ, ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ~ .....	111
7. SUMMARY OF AFOREMENTIONED RESEARCH PROJECTS, PROSPECTS FOR CLINICAL TRIALS AND FUTURE CHALLENGES.....	112

## **ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Abramson Cancer Center του University of Pennsylvania στο εργαστήριο του καθηγητή Steven M. Albelda.

**Ημερομηνία αίτησης εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής:** 25/11/2009

**Ημερομηνία ορισμού της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:** 13/01/2010

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

1. Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Αθανάσιος Α.Γ. Τζιούφας, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
2. Νικόλαος Τσαβαρής, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
3. Ιωάννης Ρούτσιας, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών

**Ημερομηνία κατάθεσης θέματος:** 07/05/2010

### **Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

1. Αθανάσιος Α.Γ. Τζιούφας, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
2. Νικόλαος Τσαβαρής, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
3. Ιωάννης Ρούτσιας, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
4. Βασίλης Γοργούλης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
5. Παναγιώτης Βλαχογιαννόπουλος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
6. Μιχάλης Κουτσιλιέρης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
7. Ευσταθία Καψογεώργου, Επίκουρη Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών

**Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών:** Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

**Θέμα διδακτορικής διατριβής:** Ο ρόλος των ιόν ως φορέων στη γονιδιακή θεραπεία του κακοήθους μεσοθηλιώματος

**Ανάδοχος φορέας:** Κλινική Παθολογικής Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

**Φορέας υλοποίησης της μελέτης:** University of Pennsylvania, Abramson Cancer Center, Pulmonary, Allergy and Critical Care Department, υπό την εποπτεία και καθοδήγηση του καθηγητή Steven M. Albelda.

**Βαθμός διδακτορικής διατριβής:** 'Αριστα

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ (ελληνικά)**

### **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Διεύθυνση οικίας: 11705 Stonewood Lane, Rockville, Maryland, 20852, USA

Κινητό τηλέφωνο: 001-215-609-9664 (ΗΠΑ)  
210-8137008 (Ελλάδα)

Προσωπικό email address: [valsaloura@yahoo.com](mailto:valsaloura@yahoo.com)

Ημερομηνία γέννησης: 4 Μαρτίου 1980

Τόπος γέννησης: Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα

### **ΣΠΟΥΔΕΣ**

- |                 |  |
|-----------------|--|
| 10/1997-06/2004 | Πτυχίο Ιατρικής Σχολής MD, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Βαθμός πτυχίου: «Άριστα»)          |
| 09/2007-06/2008 | Μεταπτυχιακό Research Fellowship, Thoracic Oncology Laboratory, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA            |
| 07/2008-06/2011 | Ειδικότητα Εσωτερικής Παθολογίας, Hahnemann University Hospital/Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA, USA |
| 07/2011-06/2014 | Ειδικότητα Αιματολογίας/Ογκολογίας, University of Chicago, Chicago, IL, USA  |
| 07/2014-06/2017 | Coggeshall Fellowship/Λέκτορας, University of Chicago, Chicago, IL, USA  |

### **ΠΡΟΣΛΗΨΕΙΣ ΣΕ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΕΣ/ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 07/2014-06/2017 | Λέκτορας, University of Chicago, Chicago, IL, USA                             |
| 10/2017-        | Assistant Clinical Investigator, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA |

### **ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ/ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

- |                 |  |
|-----------------|--|
| 01/2005-04/2006 | Θητεία αγροτικού ιατρού στο Γενικό Νοσοκομείο Κορίνθου/Κέντρο Υγείας Γκούρας, Νομός Κορινθίας, Ελλάδα                                      |
| 07/2006-10/2006 | Εθελοντής Ιατρός, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα», Αθήνα, Ελλάδα   |
| 11/2006-01/2007 | Εθελοντής Ιατρός, Montefiore Medical Center, Albert Einstein College of Medicine/Department of Hematology/Oncology, New York City, NY, USA |
| 04/2007-07/2007 | Εθελοντής Ιατρός, Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, 5 <sup>ο</sup> Τμήμα Εσωτερικής Παθολογίας, Αθήνα, Ελλάδα                                       |
| 07/2008-06/2011 | Ειδικευόμενος Ιατρός στην Εσωτερική Παθολογία, Hahnemann University Hospital/Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA, USA  |
| 07/2011-06/2014 | Ειδικευόμενος Ιατρός στην Αιματολογία/Ογκολογία, University of Chicago, Chicago, IL, USA   |

07/2014-06/2017 Λέκτορας, Επιμελητής Αιματολογίας/Ογκολογίας, University of Chicago, Chicago, IL, USA

### ΑΔΕΙΕΣ ΕΞΑΣΚΗΣΗΣ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ/ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΑ

2004 Ελληνική άδεια εξάσκησης ιατρικού επαγγέλματος  
2007 Educational Committee for Foreign Medical Graduates (ECFMG)  
-Step 1 score: 99%  
-Step 2 CK score: 99%  
2008-2011 Pennsylvania State Medical Licensure (MT192195)  
2011 American Board of Internal Medicine  
2011-παρόν Illinois State Medical Licensure (036.127098)  
2015 American Board of Medical Oncology

### ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΟΥΣ/ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

2009-παρόν Μέλος, American Society of Gene Therapy  
2009-παρόν Μέλος, American Society of Cancer Research (AACR)  
2009-παρόν Μέλος, American Society of Clinical Oncology (ASCO)

### ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ/ΒΡΑΒΕΙΑ/ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

2004 1<sup>η</sup> στην κατάταξη αποφοίτησης της 2<sup>ης</sup> Ιουνίου 2004 της Ιατρικής Σχολής Αθηνών με βαθμό πτυχίου «<sup>?</sup>Αριστα»  
2007-2008 Χορήγηση Υποτροφίας του Κοινοφελούς Ιδρύματος «Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης» για μεταπτυχιακές ερευνητικές σπουδές στη Βιολογία του Καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής  
2008 Travel Award, American Society of Gene Therapy  
2013 Merit Award, American Society of Clinical Oncology  
2013 Annual AACR Aspen Workshop: Molecular Biology in Clinical Oncology Fellowship  
2014 Annual AACR/ASCO Vail Workshop: Methods in Clinical Cancer Research  
2014 Young Investigator Award, Conquer Cancer Foundation  
2014-2016 Coggeshall Fellowship, University of Chicago  
2014 American Cancer Society Institutional Research Grant Award  
2014 Cancer Research Foundation Young Investigator Grant Award

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Saloura V**, Grivas PD, Sarwar AB, Gorodin P, Ledley GS. Papillary fibroelastomas: innocent bystanders or ignored culprits? *Postgrad Med.* 2009 May; 121(3):131-8
2. Willmon CL\*, **Saloura V\***, Fridlender ZG, Wongthida P, Diaz RM, Thompson J, Kottke T, Federspiel M, Barber G, Albelda SM, Vile RG. Expression of IFN-beta enhances both

- efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus for therapy of mesothelioma. *Cancer Res.* 2009 Oct 1;69(19):7713-20 \*equally contributed
3. **Saloura V**, Grivas PD, Mapow D, Kazmi K, Ward C, Styler M. Intracerebral progression of Hodgkin lymphoma in a HIV-seropositive patient: a case report. *Postgrad Med.* 2009 Nov; 121(6):170-5.
  4. **Saloura V**, Wang LC, Fridlender ZG, Sun J, Cheng G, Kapoor V, Sterman DH, Harty RN, Okumura A, Barber GN, Vile RG, Federspiel MJ, Russell SJ, Litzky L, Albelda SM. Evaluation of an Attenuated Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Vector expressing Interferon-beta for Use in Malignant Pleural Mesothelioma: Heterogeneity in Interferon-Responsiveness Defines Potential Efficacy. *Hum Gene Ther.* 2010 Jan; 21(1):51-64.
  5. **Saloura V**, Grivas P. Lenalidomide: a synthetic compound with an evolving role in the management of malignancies. *Hematology.* 2010 Oct; 15(5):318-31.
  6. Cheng G, Wang LC, Fridlender ZG, Cheng GS, Chen B, Mangalmurti NS, **Saloura V**, Yu Z, Kapoor V, Mozdzanowska K, Moon E, Sun J, Kreindler JL, Cohen NA, Caton AJ, Erikson J, Albelda SM. Pharmacologic activation of the innate immune system to prevent respiratory viral infections. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2011, Sep;45(3):480-8
  7. Lustgarten DE, Deshpande C, Aggarwal C, Wang LC, **Saloura V**, Vachani A, Wang LP, Litzky L, Feldman M, Creaney J, Nowak AK, Langer C, Inghilleri S, Stella G, Albelda SM. Thymidylate Synthase and Folyl-Polyglutamate Synthase Are Not Clinically Useful Markers of Response to Pemetrexed in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2013 Apr;8(4):469-477.
  8. **Saloura V**, Langerman A, Rudra S, Chin R, Cohen EE. Multidisciplinary care of the patient with head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2013 Apr;22(2):179-215.
  9. Kogure M, Takawa M, **Saloura V**, Cho HS, Hayashi K, Ueda K, Abdelrahim IR, Tsunoda T, Sugiyama M, Atomi Y, Nakamura Y, Hamamoto R. The Oncogenic Polycomb Histone Methyltransferase EZH2 Methylates Lysine 120 on Histone H2B and Competes Ubiquitination. *Neoplasia.* 2013 Nov;15(11):1251-61.
  10. **Saloura V**, Cohen E, Licitra L, Billan S, Dinis J, Lisby S, Gauler TC. An open-label single-arm, phase II trial of zalutumumab, a human monoclonal anti-EGFR antibody, in patients with platinum-refractory squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 2014 Jun;73(6):1227-39.
  11. Jasielc J\*, **Saloura V**\*, Godley LA. The mechanistic role of DNA methylation in leukemogenesis. *Leukemia.* 2014 Sep;28(9):1765-73. \* equally contributed
  12. Lee HJ, Cho HS, Jun SY, Lee JJ, Yoon JY, Lee JH, Song HH, Choi SH, Kim SY, **Saloura V**, Park CG, Kim NS. Tussilago farfara L. augments TRAIL-induced apoptosis through MKK7/JNK activation by inhibition of MKK7-TIPRL in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2014 Sep;32(3):1117-23.
  13. **Saloura V**, Cho HS, Kyiotani K, Alachkar H, Zuo Z, Nakakido M, Tsunoda T, Seiwert T, Lingen M, Licht J, Nakamura Y, Hamamoto R. WHSC1 Promotes Oncogenesis through Regulation of NIMA-related-kinase-7 in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Mol Cancer Res.* 2015 Feb;13(2):293-304.
  14. **Saloura V**, Vokes EE. EGFR-based bioradiotherapy in SCCHN. *Lancet Oncol.* 2015 Feb;16(2):129-30.
  15. Hamamoto R, **Saloura V**, Nakamura Y. Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2015 Feb;15(2):110-24.



16. Yoon JY, Cho HS, Lee JJ, Lee HJ, Jun SY, Lee JH, Song HH, Choi S, **Saloura V**, Park CG, Kim CH, Kim NS. Novel TRAIL sensitizer *Taraxacum officinale* F.H. Wigg enhances TRAIL-induced apoptosis in Huh7 cells. *Mol Carcinog*. 2015 Apr;55(4):387-96.
17. Brand TM, Iida M, Stein AP, Corrigan KL, Braverman C, Coan J, Pearson HE, Bahrar H, Fowler TL, Bednarz BP, Saha S, Yang D, Gill PS, Lingen MW, **Saloura V**, Villaflor VM, Salgia R, Kimple RJ, Wheeler DL. AXL is a logical molecular target in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015 Jun 1;21(11):2601-12.
18. Taylor RJ, **Saloura V**, Jain A, Goloubeva O, Wong S, Kronsberg S, Madhavi N, Silipino L, de Souza JA, Seiwert TY, Vokes E, Villaflor VM, Cohen EE. Ex Vivo Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Inducibility Predicts Efficacy of Cetuximab. *Cancer Immunol Res*. 2015 May;3(5):567-74.
19. Vougiouklakis T, Hamamoto R, Nakamura Y, **Saloura V**. The NSD family of protein methyltransferases in human cancer. *Epigenomics*. 2015 Aug;7(5):863-74.
20. Vougiouklakis T, Sone K, **Saloura V**, Cho HS, Suzuki T, Dohmae N, Alachkar H, Nakamura Y, Hamamoto R. SUV420H1 enhances the phosphorylation and transcription of ERK1 in cancer cells. *Oncotarget*. 2015 Dec 22;6(41):43162-71.
21. **Saloura V**, Vougiouklakis T, Zewde M, Kiyotani K, Park JH, Gao G, Karrison T, Lingen M, Nakamura Y, Hamamoto R. WHSC1L1 drives cell cycle progression through transcriptional regulation of CDC6 and CDK2 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42527-42538.
22. Gooi Z, Richmon J, Agrawal N, Blair E, Portugal L, Vokes E, Seiwert T, de Souza J, **Saloura V**, Haraf D, Goldenberg D, Chan J. AHNS Series - Do you know your guidelines? Principles of treatment for nasopharyngeal cancer: A review of the National Comprehensive Cancer Network guidelines. *Head Neck*. 2017 Feb;39(2):201-205.
23. **Saloura V**, Vougiouklakis T, Zewde M, Deng X, Kiyotani K, Park JH, Matsuo Y, Lingen M, Suzuki T, Dohmae N, Hamamoto R, Nakamura Y. WHSC1L1-mediated EGFR mono-methylation enhances the cytoplasmic and nuclear oncogenic activity of EGFR in head and neck cancer. *Sci Rep*. 2017 Jan 19;7:40664.
24. **Saloura V**, Fatima A, Zewde M, Kiyotani K, Brisson R, Park JH, Ikeda Y, Vougiouklakis T, Seiwert T, Cipriani N, Lingen M, Vokes E, Nakamura Y. Characterization of the T-cell receptor repertoire in patients with locoregionally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin.Cancer Res*. 2017 Aug 15;23(16):4897-4907.

#### ΑΛΛΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- 2013-παρόν Εκτίμηση υποβιβλημένων ερευνητικών εργασιών για το Journal of the National Cancer Institute, Lung Cancer, Nature Genetics, Clinical Cancer Research
- 2014-2017 Μέλος του Clinical Trials Research Committee (CTRC) του University of Chicago

#### ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 2011-2014 University of Chicago: διαλέξεις σε φοιτητές ιατρικής και ειδικευόμενους Εσωτερικής Παθολογίας
- 2014-2017 University of Chicago: διδακτική δραστηριότητα σε ειδικευόμενους Εσωτερικής Παθολογίας και Αιματολογίας/Ογκολογίας

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ (αγγλικά)**

### **PERSONAL INFORMATION**

Vassiliki Saloura, M.D.

Home address: 11705 Stonewood Lane, Rockville, Maryland, 20852, USA

Cell phone: 215-609-9664

Personal email address: valsaloura@yahoo.com

Citizenship: Greek

Date of Birth: 03/04/1980

Place of Birth: Alexandroupolis, Greece

### **ACADEMIC TRAINING**

10/1997-06/2004	M.D., University of Athens Medical School, Athens, Greece
09/2007-06/2008	Postdoctoral Research Fellowship, Thoracic Oncology Laboratory, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA
07/2008-06/2011	Internal Medicine Residency, Hahnemann University Hospital/Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA, USA
07/2011-06/2014	Fellowship in Hematology/Oncology, University of Chicago, Chicago, IL, USA
07/2014-06/2017	Coggeshall Fellowship/Instructorship, University of Chicago, Chicago, IL, USA

### **APPOINTMENTS**

Effective 10/2017	Assistant Clinical Investigator, National Cancer Institute, Bethesda, USA
-------------------	---

### **CLINICAL WORK**

01/2005-04/2006	Primary care service in underserved regions of Greece, General Hospital of Korinthos, Korinthos, Greece
07/2006-10/2006	Volunteer Internship, University Hospital of Alexandra, Athens, Greece
11/2006-01/2007	Volunteer Internship, Visiting Physician, Montefiore Medical Center, New York City, New York, USA
04/2007-07/2007	Volunteer Internship, University Hospital of Evangelismos, Athens, Greece
07/2008-06/2011	Residency, Hahnemann University Hospital/Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA, USA
07/2011-07/2014	Hematology/Oncology Fellowship (first year: rotations in hematology and oncology clinics, second and third years: one half-day head and neck cancer clinic per week), University of Chicago, Chicago, IL, USA
07/2014-06/2017	Instructorship, Head and neck cancer clinic (one half-day clinic per week), University of Chicago, Chicago, IL, USA

## LICENSING AND BOARD CERTIFICATION

2007	Educational Committee for Foreign Medical Graduates ECFMG Certification - STEP1 score: 99% - STEP2CK score: 99%
2008-2011	Pennsylvania State Medical Licensure (MT192195)
2011	American Board of Internal Medicine
2011-present	Illinois State Medical Licensure (036.127098)
2015	American Board of Medical Oncology

## PROFESSIONAL SOCIETIES

2009-present	Member, American Society of Gene Therapy
2011-present	Member, American Association of Cancer Research
2011-present	Member, American Society of Clinical Oncology

## HONORS, PRIZES AND AWARDS

2004	Ranked first in graduating class at University of Athens School of Medicine
2007-2008	Alexandros S. Onassis Public Benefit Foundation Scholarship for postgraduate studies in Cancer Biology Research in the USA
2008	Travel Award, American Society of Gene Therapy
2013	Merit Award, American Society of Clinical Oncology
2013	Annual AACR Aspen Workshop: Molecular Biology in Clinical Oncology Fellowship
2014	Annual AACR/ASCO Vail Workshop: Methods in Clinical Cancer Research
2014	Young Investigator Award, Conquer Cancer Foundation
2014-2016	Coggeshall Fellowship, University of Chicago
2014	American Cancer Society Institutional Research Grant Award
2014	Cancer Research Foundation Young Investigator Grant Award

## SCHOLARSHIP

Peer-reviewed publications in the primary literature, exclusive of abstracts:

25. **Saloura V**, Grivas PD, Sarwar AB, Gorodin P, Ledley GS. Papillary fibroelastomas: innocent bystanders or ignored culprits? *Postgrad Med.* 2009 May; 121(3):131-8
26. Willmon CL\*, **Saloura V\***, Fridlender ZG, Wongthida P, Diaz RM, Thompson J, Kottke T, Federspiel M, Barber G, Albelda SM, Vile RG. Expression of IFN-beta enhances both efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus for therapy of mesothelioma. *Cancer Res.* 2009 Oct 1;69(19):7713-20 \*equally contributed
27. **Saloura V**, Grivas PD, Mapow D, Kazmi K, Ward C, Styler M. Intracerebral progression of Hodgkin lymphoma in a HIV-seropositive patient: a case report. *Postgrad Med.* 2009 Nov; 121(6):170-5.
28. **Saloura V**, Wang LC, Fridlender ZG, Sun J, Cheng G, Kapoor V, Sterman DH, Harty RN, Okumura A, Barber GN, Vile RG, Federspiel MJ, Russell SJ, Litzky L, Albelda SM. Evaluation of an Attenuated Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Vector expressing

- Interferon-beta for Use in Malignant Pleural Mesothelioma: Heterogeneity in Interferon-Responsiveness Defines Potential Efficacy. *Hum Gene Ther.* 2010 Jan; 21(1):51-64.
29. **Saloura V**, Grivas P. Lenalidomide: a synthetic compound with an evolving role in the management of malignancies. *Hematology.* 2010 Oct; 15(5):318-31.
  30. Cheng G, Wang LC, Fridlender ZG, Cheng GS, Chen B, Mangalmurti NS, **Saloura V**, Yu Z, Kapoor V, Mozdanzowska K, Moon E, Sun J, Kreindler JL, Cohen NA, Caton AJ, Erikson J, Albelda SM. Pharmacologic activation of the innate immune system to prevent respiratory viral infections. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2011, Sep;45(3):480-8
  31. Lustgarten DE, Deshpande C, Aggarwal C, Wang LC, **Saloura V**, Vachani A, Wang LP, Litzky L, Feldman M, Creaney J, Nowak AK, Langer C, Inghilleri S, Stella G, Albelda SM. Thymidylate Synthase and Foyl-Polyglutamate Synthase Are Not Clinically Useful Markers of Response to Pemetrexed in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2013 Apr;8(4):469-477.
  32. **Saloura V**, Langerman A, Rudra S, Chin R, Cohen EE. Multidisciplinary care of the patient with head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2013 Apr;22(2):179-215.
  33. Kogure M, Takawa M, **Saloura V**, Cho HS, Hayashi K, Ueda K, Abdelrahim IR, Tsunoda T, Sugiyama M, Atomi Y, Nakamura Y, Hamamoto R. The Oncogenic Polycomb Histone Methyltransferase EZH2 Methylates Lysine 120 on Histone H2B and Competes Ubiquitination. *Neoplasia.* 2013 Nov;15(11):1251-61.
  34. **Saloura V**, Cohen E, Licitra L, Billan S, Dinis J, Lisby S, Gauler TC. An open-label single-arm, phase II trial of zalutumumab, a human monoclonal anti-EGFR antibody, in patients with platinum-refractory squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 2014 Jun;73(6):1227-39.
  35. Jasielc J\*, **Saloura V**\*, Godley LA. The mechanistic role of DNA methylation in leukemogenesis. *Leukemia.* 2014 Sep;28(9):1765-73. \* equally contributed
  36. Lee HJ, Cho HS, Jun SY, Lee JJ, Yoon JY, Lee JH, Song HH, Choi SH, Kim SY, **Saloura V**, Park CG, Kim NS. Tussilago farfara L. augments TRAIL-induced apoptosis through MKK7/JNK activation by inhibition of MKK7-TIPRL in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2014 Sep;32(3):1117-23.
  37. **Saloura V**, Cho HS, Kyiotani K, Alachkar H, Zuo Z, Nakakido M, Tsunoda T, Seiwert T, Lingen M, Licht J, Nakamura Y, Hamamoto R. WHSC1 Promotes Oncogenesis through Regulation of NIMA-related-kinase-7 in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Mol Cancer Res.* 2015 Feb;13(2):293-304.
  38. **Saloura V**, Vokes EE. EGFR-based bioradiotherapy in SCCHN. *Lancet Oncol.* 2015 Feb;16(2):129-30.
  39. Hamamoto R, **Saloura V**, Nakamura Y. Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2015 Feb;15(2):110-24.
  40. Yoon JY, Cho HS, Lee JJ, Lee HJ, Jun SY, Lee JH, Song HH, Choi S, **Saloura V**, Park CG, Kim CH, Kim NS. Novel TRAIL sensitizer Taraxacum officinale F.H. Wigg enhances TRAIL-induced apoptosis in Huh7 cells. *Mol Carcinog.* 2015 Apr;55(4):387-96.
  41. Brand TM, Iida M, Stein AP, Corrigan KL, Braverman C, Coan J, Pearson HE, Bahrar H, Fowler TL, Bednarz BP, Saha S, Yang D, Gill PS, Lingen MW, **Saloura V**, Villafior VM, Salgia R, Kimple RJ, Wheeler DL. AXL is a logical molecular target in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2015 Jun 1;21(11):2601-12.

42. Taylor RJ, **Saloura V**, Jain A, Goloubeva O, Wong S, Kronsberg S, Madhavi N, Silipino L, de Souza JA, Seiwert TY, Vokes E, Villaflor VM, Cohen EE. Ex Vivo Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Inducibility Predicts Efficacy of Cetuximab. *Cancer Immunol Res*. 2015 May;3(5):567-74.
43. Vougiouklakis T, Hamamoto R, Nakamura Y, **Saloura V**. The NSD family of protein methyltransferases in human cancer. *Epigenomics*. 2015 Aug;7(5):863-74.
44. Vougiouklakis T, Sone K, **Saloura V**, Cho HS, Suzuki T, Dohmae N, Alachkar H, Nakamura Y, Hamamoto R. SUV420H1 enhances the phosphorylation and transcription of ERK1 in cancer cells. *Oncotarget*. 2015 Dec 22;6(41):43162-71.
45. **Saloura V**, Vougiouklakis T, Zewde M, Kiyotani K, Park JH, Gao G, Karrison T, Lingen M, Nakamura Y, Hamamoto R. WHSC1L1 drives cell cycle progression through transcriptional regulation of CDC6 and CDK2 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42527-42538.
46. Gooi Z, Richmon J, Agrawal N, Blair E, Portugal L, Vokes E, Seiwert T, de Souza J, **Saloura V**, Haraf D, Goldenberg D, Chan J. AHNS Series - Do you know your guidelines? Principles of treatment for nasopharyngeal cancer: A review of the National Comprehensive Cancer Network guidelines. *Head Neck*. 2017 Feb;39(2):201-205.
47. **Saloura V**, Vougiouklakis T, Zewde M, Deng X, Kiyotani K, Park JH, Matsuo Y, Lingen M, Suzuki T, Dohmae N, Hamamoto R, Nakamura Y. WHSC1L1-mediated EGFR mono-methylation enhances the cytoplasmic and nuclear oncogenic activity of EGFR in head and neck cancer. *Sci Rep*. 2017 Jan 19;7:40664.
48. **Saloura V**, Fatima A, Zewde M, Kiyotani K, Brisson R, Park JH, Ikeda Y, Vougiouklakis T, Seiwert T, Cipriani N, Lingen M, Vokes E, Nakamura Y. Characterization of the T-cell receptor repertoire in patients with locoregionally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin.Cancer Res*. 2017 Aug 15;23(16):4897-4907.

## APPOINTED INTRA/EXTRAMURAL SERVICE

- 2013-currently    Manuscript reviewer for the journal of the National Cancer Institute, Human Gene Therapy, Lung Cancer, Nature Genetics, Clinical Cancer Research
- 2015-2017        Member of the Clinical Trials Research Committee (CTRC) of the University Of Chicago

## TEACHING

### For Graduate medical education (residency and clinical fellowships):

#### Didactic

- 2011-2014        University of Chicago: Lectures to medical students and residents during their hematology/oncology service rotation
- 2014-2017        University of Chicago: Inpatient and outpatient oncology, routine teaching of fellows and housestaff

## ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ (αρχαία ελληνικά)

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωντέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἂ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἕξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

## ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ (νεοελληνική απόδοση)

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδελφία μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη.

Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

## ΑΦΙΕΡΩΣΗ

*Στους γονείς μου Ελένη και Παντελή  
για την αγάπη που μου εμφύσησαν  
για τη γνώση, την ποιότητα, τη  
διερεύνηση των κατεστημένων και  
μη, και την περιπέτεια...*

*To Cesar A. Santa-Maria, for  
constantly encouraging me not to  
give up on the pursuit of ideals...*



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Αθανάσιο Τζιούφα για τη θερμή και συνεχή υποστήριξή του για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, καθώς και για τη φιλοσοφία του να υποστηρίζει και να συνδουλίζει φοιτητές που έχουν το πάθος για την έρευνα και για τη βελτίωση της ζωής ασθενών σε ανάγκη για καλύτερες θεραπείες. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Νικόλαο Τσαβαρή και Ιωάννη Ρούτσια για την ενθουσιώδη υποστήριξη αυτής της εργασίας. Επιπλέον, ο καθηγητής Steven Albela του University of Pennsylvania μου έδωσε την εκπληκτική δυνατότητα να αναπτύξω τη συγκεκριμένη εργασία, να εκπαιδευτώ και να αποκτήσω ερευνητική εμπειρία στο εργαστήριό του, παρ'ότι αρχικά δεν είχα καμία σχετική εμπειρία. Αυτή η γενναιόδωρη ευκαιρία ενίσχυσε την επιθυμία μου να επιδιώξω ερευνητική δραστηριότητα και καριέρα στο χώρο της βιολογίας του καρκίνου και της Ογκολογίας.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# 1. ΜΕΣΟΘΗΛΙΩΜΑ

## 1.1. Επιδημιολογία

Το κακόηθες μεσοθηλίωμα είναι ένας σπάνιος αλλά θανατηφόρος τύπος καρκίνου που προσβάλλει περίπου 3,000 άτομα στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ) και περίπου 5,000 άτομα ετησίως στην Ευρώπη (1). Στις ΗΠΑ καταγράφηκε κορύφωση της συχνότητας αυτής της νόσου το 2000 και αναμένεται κορύφωση των κρουσμάτων μετά το 2020 σχετιζόμενη με την πτώση των «Δίδυμων Πύργων» το 2001, οπότε και απελευθερώθηκαν περίπου 400 τόνοι αμιάντου. Η επίπτωση του κακοήθους μεσοθηλιώματος στις ΗΠΑ υπολογίζεται στις 15 περιπτώσεις/1,000,000 πληθυσμού, στην Ιαπωνία στις 7 περιπτώσεις/1,000,000, ενώ η υψηλότερη επίπτωση έχει καταγραφεί στην Αυστραλία με 40 περιπτώσεις/1,000,000 και στην Ευρώπη με 18 περιπτώσεις/1,000,000 πληθυσμού (ιδιαίτερα στο Βέλγιο και στη Μεγάλη Βρετανία) (2).

Το 1987, καταγράφηκε στην Ελλάδα μία «επιδημία» κακοήθους μεσοθηλιώματος στους κατοίκους του Μετσόβου των Ιωαννίνων με συχνότητα 300 φορές υψηλότερη από το αναμενόμενο. Αυτή η συχνότητα δεν ήταν αναμενόμενη λόγω της απουσίας εργοστασίων και ορυχείων αμιάντου στην περιοχή. Αυτή η παρατήρηση και η διαπίστωση συχνών πλευριτικών αποτιτανώσεων περίπου στο 50% του πληθυσμού οδήγησε στη διεξαγωγή μακροχρόνιων ερευνών (3, 4) που συμπέραναν ότι η χρήση ενός υλικού ασπρίσματος («λούτο») των σπιτιών της περιοχής το οποίο περιείχε ίνες τρεμολιθικού αμιάντου αποτέλεσε την αιτία για αυτή την «επιδημία» μεσοθηλιώματος στην περιοχή του Μετσόβου που ονομάστηκε «πνεύμονας του Μετσόβου». Το «λούτο», που βρισκόταν στο χόμα κάποιων βουνών της Πίνδου, χρησιμοποιούνταν σε όλα τα σπίτια τη δεκαετία του 1940-1950, οπότε η χρήση του άρχισε να περιορίζεται και το 1985 εγκαταλήφθηκε τελείως με αντίστοιχη μείωση της συχνότητας μεσοθηλιώματος στην περιοχή. Υπολογίζεται ότι η συχνότητα του μεσοθηλιώματος στο Μέτσοβο θα μειωθεί στο αναμενόμενο τη δεκαετία το 2020-2030 (5).

## 1.2. Παθογένεια

Η κύρια αιτία του κακοήθους μεσοθηλιώματος είναι η επαγγελματική ή περιβαλλοντική έκθεση και εισπνοή ινών αμιάντου (περίπου 80% των περιπτώσεων), αν και μόνο 5% των ατόμων που εκτίθενται στον αμιάντο αναπτύσσουν αυτή τη νόσο. Η αιτιολογική αυτή συσχέτιση παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1960 σε εργάτες μεταλλίων αμιάντου στη Νότια Αφρική από το Πανεπιστήμιο του Johannesburg (6). Υπάρχουν δύο βασικά είδη ινών αμιάντου, οι σερπεντίνες, όπως ο χρυσοσίλης που καθιστά το 99% της παγκόσμιας παραγωγής, και οι αμιφίβολες, με κυριότερο εκπρόσωπο τον κροκιδόλιθο που αποτελεί τον πιο καρκινογόνο τύπο. Αν και ο κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου είναι δοσο-εξαρτώμενος, δεν έχει καθοριστεί κατώτατη δόση ασφαλείας. Το 1977, ο αμιάντος αναγνωρίστηκε ως καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο, και το 1980 το κακόηθες μεσοθηλίωμα αναγνωρίστηκε ως επαγγελματική νόσος. Σε αυτά τα πλαίσια, το 2005 η Ευρωπαϊκή ένωση απαγόρευσε την εξόρυξη, επεξεργασία και διάθεση στην αγορά του αμιάντου.

Οι εισπνεόμενες ίνες αμιάντου εναποτίθενται στην υπεζωκοτική κοιλότητα και προκαλούν μηχανική βλάβη που οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή με παραγωγή κυτταροκινών (IL-6, TNF- $\alpha$ ), αυξητικών παραγόντων (HFG, PDGF, EGF, TFG- $\beta$ , VEGF), reactive oxygen species (ROS) και

ενεργοποίηση του NF-κB στα μεσοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, προκύπτει φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των MAPK, ERK1/2 και AKT/mTOR κινασών που προωθούν τον πολλαπλασιασμό των μεσοθηλιακών κυττάρων. Ταυτόχρονα, οι ίνες αμιάντου παρεμβάλλονται στη μιτωτική άτρακτο και παρεμποδίζουν τη φυσιολογική κυτταρική διαίρεση, προκαλώντας ανευπλοειδία και χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Λιγότερο συχνές αιτίες κακοήθους μεσοθηλιώματος είναι η έκθεση σε εριονίτη, καθώς και η ακτινοθεραπεία του θώρακος σε ασθενείς με λέμφωμα ή καρκίνο μαστού. Σπανιότερα, το κακόηθες μεσοθηλίωμα προκύπτει στα πλαίσια κληρονομικών γενετικών μεταλλάξεων. Πιθανή γενετική προδιάθεση διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στα χωριά του Karain και Tuzkoy της Καππαδοκίας στην Τουρκία, όπου είχε παρατηρηθεί υψηλή συχνότητα κακοήθους μεσοθηλιώματος περίπου στο 50% των κατοίκων που χρησιμοποιούσαν εριονίτη για την κατασκευή σπιτιών. Οι ερευνητές της συγκεκριμένης μελέτης παρατήρησαν ότι ανεξαρτήτως της έκθεσης στον εριονίτη, οι θάνατοι από κακόηθες μεσοθηλίωμα παρατηρήθηκαν στα μέλη συγκεκριμένων οικογενειών. Τα γενεαλογικά δέντρα 6 γενεών (526 άτομα) σε αυτά τα χωριά έδειξαν πιθανή αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα, με κρούσματα κακοήθους μεσοθηλιώματος σε 41 από τα 87 παιδιά γονιών που είχαν διαγνωστεί με αυτή τη νόσο (7).

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, διαπιστώθηκαν απενεργοποιητικές κληρονομικές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1 associated protein-1 (BAP1) σε δύο οικογένειες με δυσανάλογα υψηλή συχνότητα κακοήθους μεσοθηλιώματος παρότι η έκθεση σε αμιάντο ήταν μέτρια. Στους ίδιους ασθενείς παρατηρήθηκαν ταυτόχρονες σωματικές μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο, υποδηλώνοντας αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα. Τρεις ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα και BAP-1 μεταλλάξεις διαγνώστηκαν και με μελάνωμα του χοριοειδούς χιτώνα, ενώ αρκετά μέλη αυτών των δύο οικογενειών διαγνώστηκαν με καρκίνο των ωοθηκών, του μαστού και του πλακώδους επιθηλίου του δέρματος. Οι ερευνητές συμπεράναν ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου BAP-1 ευθύνονται για το κληρονομικό σύνδρομο BAP-1 related cancer syndrome το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα μεσοθηλιώματος, μελανώματος του χοριοειδούς χιτώνα και άλλων τύπων καρκίνου, και ότι η παρουσία αυτής της μετάλλαξης αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης μεσοθηλιώματος μετά από έκθεση σε αμιάντο (8).

Το κακόηθες μεσοθηλίωμα αναπτύσσεται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα της υπεζωκοτικής κοιλότητας και κατατάσσεται σε τρεις βασικούς ιστολογικούς τύπους: το επιθηλιακό (50-60%), το σαρκωματώδες (10-20%) και το μικτό (25-30%) κακόηθες μεσοθηλίωμα (9). Ασθενείς με σαρκωματώδες ή μικτό μεσοθηλίωμα έχουν σημαντικά χειρότερη πρόγνωση και ανθεκτικότητα στις ενδεδειγμένες θεραπείες σε σχέση με τους ασθενείς με επιθηλιακό μεσοθηλίωμα (10).

### **1.3. Κλινικές εκδηλώσεις**

Τα συμπτώματα εμφανίζονται περίπου μετά από 40 χρόνια από την έναρξη έκθεσης στον αμιάντο (11). Η νόσος παρατηρείται συνήθως σε άντρες ηλικίας 65-70 ετών που το επάγγελμά τους σχετίζεται με την έκθεση σε αμιάντο, όπως εργάτες οικοδομών, υδραυλικοί, μαραγκοί, εργάτες στην κατασκευή πλοίων. Τα πιο συχνά συμπτώματα με τα οποία παρουσιάζεται η νόσος είναι η δύσπνοια στην προσπάθεια και το θωρακικό άλγος (2). Η φυσική πορεία της νόσου χαρακτηρίζεται από την προοδευτική τοπική επέκταση και διήθηση γειτονικών οργάνων, όπως του θωρακικού τοιχώματος και των μεσοπλεύριων νεύρων, της καρδιάς, των βραχιονοκεφαλικών αγγείων και του διαφράγματος. Επιπλοκές αυτής της διηθητικής επέκτασης

περιλαμβάνουν τη μεταποφρακτική πνευμονία, το σύνδρομο της άνω κοίλης φλέβας, καρδιακό επιπωματισμό και καρδιακές αρρυθμίες, δυσφαγία και το σύνδρομο Horner.

#### 1.4. Διάγνωση

Η υποψία της διάγνωσης τίθεται με τις κλινικές εκδηλώσεις, τη φυσική εξέταση, τα απεικονιστικά ευρήματα και το ιστορικό έκθεσης σε αμιάντο. Στην αξονική θώρακος (CT) μπορούν να παρατηρηθούν πάχυνση του υπεζωκότα, υπεζωκοτική συλλογή, υπεζωκοτική μάζα και υπεζωκοτικές πλάκες (20-30%). Αν υπάρχει υποψία περικαρδιακής συλλογής, συστήνεται υπερηχογράφημα καρδιάς. Το PET-CT χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η παρουσία μεταστάσεων στους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου, ενώ η μαγνητική τομογραφία (MRI) παρέχει πιο ακριβή εκτίμηση της πιθανής επέκτασης του μεσοθηλιώματος στα βραχιοκεφαλικά αγγεία, το θωρακικό τοίχωμα, το μεσοθωράκιο και το διάφραγμα. Το PET-CT και η MRI συμβάλλουν καθοριστικά στο να εκτιμηθεί αν η νόσος είναι χειρουργήσιμη.

Η διάγνωση του κακοήθους μεσοθηλιώματος τίθεται με την παθολογοανατομική εξέταση βιοψίας του υπεζωκότα. Πολύ συχνά, η κλειστή βιοψία του υπεζωκότα και κυρίως η κυτταρολογική εξέταση υπεζωκοτικού υγρού είναι ανεπαρκείς διότι δεν παρέχουν αρκετό υλικό για να τεθεί η διάγνωση καθώς και η διαφορική διάγνωση από το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. Σε αυτήν την περίπτωση πρέπει να επιχειρείται βιοψία με θωρακοσκόπηση (video-assisted thoracoscopic biopsy).

#### 1.5. Θεραπεία

Οι περισσότεροι ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα παρουσιάζονται με νόσο προχωρημένου σταδίου και η θεραπεία στοχεύει στη παράταση της επιβίωσης και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής με χημειοθεραπεία. Ο συνδυασμός cisplatin/pemetrexed βελτίωσε στατιστικώς σημαντικά τη διάμεση επιβίωση ασθενών με κακόηθες μεσοθηλίωμα προχωρημένου σταδίου από 9.3 μήνες με το cisplatin σε 12.1 μήνες ( $p=0.02$ ) (12), και αποτελεί το εγκεκριμένο χημειοθεραπευτικό σχήμα πρώτης γραμμής (National Comprehensive Cancer Center and European Society of Medical Oncology guidelines). Το cisplatin μπορεί να αντικατασταθεί με το carboplatin (13) με ανάλογη αποτελεσματικότητα και πιο ανεκτή τοξικότητα, ιδιαίτερα σε ηλικιωμένους ασθενείς. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η προσθήκη bevacizumab στο σχήμα cisplatin/pemetrexed βελτίωσε τη διάμεση επιβίωση από 16.1 μήνες σε 18.8 μήνες, αλλά με σοβαρές παρενέργειες στο 71% των ασθενών. Επίσης, μία μελέτη εξέτασε χημειοθεραπευτικά σχήματα βασισόμενα στο cisplatin ή doxorubicin (cisplatin και vinblastine, doxorubicin και vincristine) με ενθαρρυντικά αποτελέσματα και διάμεση επιβίωση 20.8 μηνών σε ασθενείς που παρουσίασαν συρρίκνωση του όγκου, ωστόσο η μελέτη αυτή περιέλαβε και ασθενείς με περιτοναϊκό μεσοθηλίωμα που έχουν γενικά καλύτερη πρόγνωση από τους ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα (14). Μία παλαιότερη αναδρομική μελέτη από την ίδια ομάδα είχε δείξει ανάλογα ενθαρρυντικά αποτελέσματα με το σχήμα cisplatin και vinblastine με διάμεση επιβίωση ασθενών με κακόηθες μεσοθηλίωμα που παρουσίασαν συρρίκνωση του όγκου στους 19.3 μήνες (15). Για τους περισσότερους ασθενείς, η νόσος επιδεινώνεται περίπου μετά από 6 μήνες θεραπείας με το σχήμα cisplatin/pemetrexed (12). Η χημειοθεραπεία δεύτερης γραμμής είναι το pemetrexed (αν επιτεύχθηκε σταθερότητα της νόσου για πάνω από 6 μήνες με το cisplatin/pemetrexed) ή το

vinorelbine (για ασθενείς με νόσο που επιδεινώθηκε εντός 6 μηνών από τη θεραπεία πρώτης γραμμής) (16).

Οι κυτταρομειωτικές χειρουργικές επεμβάσεις, όπως η πλευρεκτομή/αποφλοιώση (pleurectomy/decortication) και η εξωπνευμονική πνευμονεκτομή (extrapleural pneumonectomy), συστήνονται σε επιλεγμένους ασθενείς με χειρουργήσιμο επιθηλιακό μεσοθηλίωμα αρχικού σταδίου που περιορίζεται στο ημιθώρακο, και συνδυάζονται με χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία (πολυπαραγοντική θεραπεία). Η απόφαση για πολυπαραγοντική θεραπεία θα πρέπει να λαμβάνεται μετά από σύσκεψη ομάδας ογκολόγων, χειρουργών και ακτινοθεραπευτών σε κέντρα αναφοράς με εμπειρία στην αντιμετώπιση του κακοήθους μεσοθηλιώματος και στα πλαίσια κλινικών μελετών, και αφορά ασθενείς χωρίς καρδιακές, αναπνευστικές και νεφρολογικές παθήσεις. Ακόμα και όταν όλα τα παραπάνω κριτήρια πληρούνται, η μέση επιβίωση αυτών των ασθενών κυμαίνεται από 16-20 μήνες (17, 18). Η πλευρεκτομή/αποφλοιώση και η ακτινοθεραπεία μπορούν να εφαρμοστούν και για την ανακούφιση συμπτωμάτων σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου. Επίσης, η υποστηρικτική αγωγή επίσης περιλαμβάνει τη χρήση οπιοειδών και αντιεπιληπτικών φαρμάκων, τη πλευρόδεση και την εμφύτευση μόνιμων ενδοϋπεζωκοτικών καθετήρων.

Η απογοητευτική απολεσματικότητα και η υψηλή τοξικότητα αυτών των θεραπειών καθιστά την ανάγκη για ανέρευση καινοτόμων θεραπειών επιτακτική.

## **2.ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

Οι πολλά υποσχόμενες προοπτικές της γονιδιακής θεραπείας έγιναν αντιληπτές το 1971, όταν άρχισαν να σχεδιάζονται τα πρώτα πειράματα με τη χρήση ανασυνδυσμένου DNA. Η γονιδιακή θεραπεία βασίζεται στην ενσωμάτωση συγκεκριμένων γονιδίων, των οποίων η λειτουργία έχει απενεργοποιηθεί λόγω κληρονομικών ή επίκτητων γενετικών μεταλλάξεων, στο γενετικό υλικό κυττάρων του ασθενούς με σκοπό την επαναφορά της λειτουργίας του συγκεκριμένου γονιδίου και συνεπώς την ίαση της αντίστοιχης πάθησης που προκύπτει από την απουσία λειτουργίας αυτού του γονιδίου. Με την πρόσφατη πρόοδο στο χώρο της τεχνολογίας του ανασυνδυσμένου DNA τα τελευταία 20 χρόνια, η γονιδιακή θεραπεία έχει εισέλθει στο χώρο της πραγματικότητας με συγκεκριμένες κλινικές εφαρμογές για τη θεραπεία γενετικά κληρονομούμενων νοσημάτων.

### **2.1. Εισαγωγή και βασικές αρχές της γονιδιακής θεραπείας**

Η βασική αρχή της γονιδιακής θεραπείας είναι η μεταγωγή γενετικού υλικού σε συγκεκριμένα κύτταρα ενός ασθενούς με σκοπό την αποκατάσταση της λειτουργίας ενός γονιδίου, η απουσία της οποίας αποτελεί την αιτία παθογένειας συγκεκριμένης νόσου. Η μεταγωγή γονιδιακού υλικού μπορεί να στοχεύει σε δύο τύπους κυττάρων: (α) τα σωματικά, μη αναπαραγωγικά κύτταρα, και (β) τα βλαστοκύτταρα (germ-line cells). Γενετική παρέμβαση στα βλαστοκύτταρα οδηγεί σε κληρονομικές αλλαγές που επηρεάζουν μόνιμα όλες τις επόμενες γενεές. Γι'αυτό το λόγο, η έρευνα στο χώρο της γονιδιακής θεραπείας επικεντρώνεται προς το παρόν σε σωματικά κύτταρα λόγω των ηθικών αμφιβολιών που αφορούν την μόνιμη και κληρονομούμενη γενετική τροποποίηση βλαστοκυττάρων (19).

Η μεταγωγή γονιδιακού υλικού σε κύτταρα μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο βασικά είδη φορέων DNA:

- Οι ιικοί φορείς, από τους οποίους οι πιο διαδεδομένοι είναι οι παρακάτω:

α. Ρετροϊοί, που είναι λυσιγενείς (ενσωματώνονται στο DNA), απλής έλικας RNA ιοί και χαρακτηρίζονται από υψηλή μεταγωγική ικανότητα και υψηλή έκφραση του γονιδίου για μεγάλο χρονικό διάστημα, αλλά απενεργοποιούνται εύκολα από το σύστημα συμπληρώματος, και μπορεί να προκαλέσουν ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων με τυχαία ενσωμάτωσή τους στο DNA (insertional mutagenesis).

β. Αδενοϊοί, που είναι λυτικοί, διπλής έλικας DNA ιοί. Έχουν μεγάλη χωρητικότητα, χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση του γονιδίου, αλλά μόνο για μικρή διάρκεια.

γ. Παρβοϊοί, που είναι λυσιγενείς, απλής έλικας DNA ιοί και εξαιρετικά ασφαλείς αφού δεν προκαλούν νόσο στον άνθρωπο. Χαρακτηρίζονται από υψηλή και παρατεταμένη έκφραση του γονιδίου.

δ. Ιοί της ευλογιάς, όπως ο ιός της δαμαλίτιδας (vaccinia virus), που είναι λυτικοί, διπλής έλικας DNA ιοί. Είχαν χρησιμοποιηθεί για τον εμβολιασμό έναντι του ιού δαμαλίτιδας και πλέον η νόσος έχει εξαλειφθεί. Χαρακτηρίζονται από εύκολη γενετική τροποποίηση, μεγάλη χωρητικότητα και παρατεταμένη έκφραση του γονιδίου. Ωστόσο, ο εμβολιασμός πολλών ατόμων σημαίνει ότι πολλοί ασθενείς έχουν ήδη απενεργοποιητικά αντισώματα έναντι του ιού.

ε. Ερπητοϊοί, που είναι λυτικοί, διπλής έλικας DNA ιοί. Χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση, μεγάλη χωρητικότητα, ικανότητα παραγωγής μεγάλων ιικών φορτίων, αλλά η έκφραση γονιδίων είναι παροδική.

- Οι μη ιικοί φορείς είναι μη ανοσογενετικοί, δεν προκαλούν μεταλλάξεις και δεν αποτελούν βιολογικό κίνδυνο. Ωστόσο, η μεταγωγική τους ικανότητα είναι λιγότερο αποτελεσματική και χαρακτηρίζονται από παροδική έκφραση του γονιδίου:

α. Πλασμίδια

β. Λιπιδώματα

γ. Πολυμερή

δ. Πεπτίδια

ε. Νανοσωματίδια

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, κάθε φορέας έχει τα δικά του ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και μπορεί να τροποποιηθεί επιπρόσθετα όσον αφορά την ικανότητα στόχευσης συγκεκριμένων κυττάρων, τη χωρητικότητα DNA, τη μεταγωγική ικανότητα και την προκαλούμενη ανοσολογική αντίδραση. Αυτοί οι φορείς τροποποιούνται γενετικά ώστε να ενσωματώνουν το «θεραπευτικό» γονίδιο στο γενετικό υλικό τους και στη συνέχεια εισέρχονται στα κύτταρα όπου η απουσία της λειτουργίας του γονιδίου προκαλεί την αντίστοιχη νόσο. Η μεταγωγή του γονιδίου στα αντίστοιχα κύτταρα μπορεί να πραγματοποιηθεί *ex vivo*, *in vivo*, ή *in situ* (20). Στη μέθοδο *ex vivo*, τα κύτταρα αφαιρούνται από το σώμα του ασθενούς και υφίστανται τη μεταγωγή του γονιδίου σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειών στο εργαστήριο. Αφού επιβεβαιωθεί η επιτυχής μεταγωγή του γονιδίου, τα κύτταρα επαναχορηγούνται στον ασθενή. Στη μέθοδο *in vivo*, ο γονιδιακός φορέας χορηγείται ενδοφλεβίως απευθείας στον ασθενή με σκοπό την μεταγωγή του σε συγκεκριμένα κύτταρα-«στόχους». Στη μέθοδο *in situ*, ο ιικός φορέας χορηγείται απευθείας στον ιστό στον οποίο η απουσία λειτουργίας του γονιδίου προκαλεί τη συγκεκριμένη νόσο (π.χ. Duchenne muscular dystrophy).

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έγινε αντιληπτό ότι η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να βρει εφαρμογή και στη θεραπεία του καρκίνου, ιδιαίτερα με τη χρήση ογκολυτικών ιών ως γονιδιακών φορέων. Οι μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης και μέθοδοι βελτίωσης της επιλεκτικότητας των ιικών φορέων για τα καρκινικά κύτταρα αναλύονται με περισσότερη λεπτομέρεια παρακάτω (4.2 και 4.4).

Ταυτόχρονα με την πρόοδο της τεχνολογίας σε αυτόν τον τομέα, πολλά ηθικά ερωτήματα δεν έχουν απαντηθεί και έχουν ήδη λάβει κεντρικό ρόλο για την υλοποίηση περαιτέρω εφαρμογών της γονιδιακής θεραπείας. Ένα επιπλέον σημαντικό εμπόδιο στην εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας είναι η αντιμετώπιση των ανοσολογικών αντιδράσεων που εκλύονται έναντι φορέων ή και του ίδιου του εξωγενούς γενετικού υλικού. Μία ακόμα πρόκληση που πρέπει να αντιμετωπιστεί για την αποτελεσματική κλινική εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας είναι η «στόχευση» του εξωγενούς γενετικού υλικού στα κατάλληλα κύτταρα.

## 2.2. Κλινικές εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας

Κλινικές μελέτες για την εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας έχουν πραγματοποιηθεί για τις κληρονομικές νόσους της σοβαρής συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας λόγω έλλειψης της απαμινάσης της αδενοσίνης (severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency, ADA-SCID), της μυικής δυστροφίας τύπου Duchenne (Duchenne muscular dystrophy), της κυστικής ίνωσης (cystic fibrosis) και της αιμοφιλίας Α (hemophilia A).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα επιτυχούς κλινικής εφαρμογής γονιδιακής θεραπείας είναι η νόσος της σοβαρής συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας λόγω έλλειψης της απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA-SCID). Η ADA-SCID είναι μία σχετικά σπάνια κληρονομική νόσος που προσβάλλει 1 στα 75.000 αγόρια και οφείλεται στην απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης απαμινάσης της αδενοσίνης (adenosine deaminase, ADA) που είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική παραγωγή και διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Κλινικά, εκδηλώνεται τους πρώτους μήνες της ζωής με αποτυχία ανάπτυξης, μέση ωτίτιδα, χρόνια διάρροια, σημηγατορροϊκή δερματίτιδα ή ερυθροδερμία, επίμονη βλεννογονοδερματική καντίτιαιση, πνευμονία, σηψαιμία και σοβαρές βακτηριδιακές λοιμώξεις οι οποίες οδηγούν στο θάνατο στον πρώτο χρόνο της ζωής του νεογνού. Η ενδεδειγμένη θεραπεία είναι η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών (hematopoietic stem cell transplantation), ωστόσο πολλοί ασθενείς δεν έχουν κατάλληλους δωρητές και συχνά δεν πληρούν όλα τα κριτήρια για αυτήν τη θεραπεία. Το Μάιο του 2016, η επιτροπή European Medicines Agency ενέκρινε τη χρήση γονιδιακής θεραπείας με τον ικό φορέα Strimvelis για ασθενείς με ADA-SCID που δεν έχουν κατάλληλο δωρητή για μεταμόσχευση μυελού των οστών. Αυτή η έγκριση βασίστηκε σε μία κλινική μελέτη ex vivo μεταγωγής του γονιδίου της ADA σε αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών 18 ασθενών με ADA-SCID που έλαβαν non-myeloablative χημειοθεραπεία με busulfan πριν από τη χορήγηση των αιματοποιητικών βλαστοκυττάρων που υπέστησαν μεταγωγή του ADA γονιδίου. Αυτή η θεραπεία πραγματοποιήθηκε από το 2000 μέχρι το 2011 και η παρακολούθηση των ασθενών έγινε για 7 χρόνια. Η επιβίωση των ασθενών ήταν 100%, 75% των ασθενών δε χρειάστηκαν θεραπεία αποκατάστασης του ενζύμου ADA και όλοι οι ασθενείς παρουσίασαν βελτίωση της λειτουργίας του ανοσολογικού συστήματος, μείωση του αριθμού των λοιμώξεων και ομαλοποίηση του αριθμού των T-λεμφοκυττάρων χωρίς σημαντικές παρενέργειες. Αυτή τη στιγμή, το Strimvelis είναι διαθέσιμο για ασθενείς με ADA-SCID χωρίς δωρητή μυελού των οστών μόνο από το νοσοκομείο San Raffaele Hospital στο Μιλάνο λόγω της εξειδίκευσης του νοσοκομείου στη γονιδιακή θεραπεία αιματοποιητικών βλαστοκυττάρων, καθώς και στα πλαίσια κλινικής μελέτης από το νοσοκομείο του UCLA (21).

Η μυική δυστροφία τύπου Duchenne είναι μία σχετικά συχνή κληρονομική νόσος που προκαλείται από την ελλατωματική έκφραση της πρωτεΐνης δυστροφίνη. Η νόσος προσβάλλει περίπου 1 στα 3.000 αγόρια. Η αποκατάσταση της έκφρασης του γονιδίου της δυστροφίνης στους μυς με τη μεταγωγή του αντίστοιχου γονιδίου αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό και άμεσο



τρόπο αντιμετώπισης της νόσου. Παρόλες τις εξαιρετικές προκλινικές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ζώων, η γονιδιακή θεραπεία δεν έχει ακόμα καταστεί κλινικά αποτελεσματική για τη θεραπεία της μυικής δυστροφίας τύπου Duchenne (22). Μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος μεταγωγής του γονιδίου της δυστροφίνης είναι η χρήση του adeno-associated virus (AAV) ως ιικού φορέα του γονιδίου (23). Ο ιός AAV έχει ήδη δοκιμαστεί σε πολλές κλινικές μελέτες και έχει δειχθεί ότι έχει χαμηλή νοσογονικότητα, ικανότητα παραγωγής σε μεγάλα ιικά φορτία, και μεγάλη μεταγωγική ικανότητα γονιδίων σε μύς όλου του ανθρώπινου σώματος. Ωστόσο, λόγω του πολύ μεγάλου μεγέθους του γονιδίου της δυστροφίνης (2.2Mbs) και της μικρής χωρητικότητας του AAV, χρησιμοποιείται το μικρότερο γονίδιο της μικροδυστροφίνης (mini-dystrophin) που είναι πιο κατάλληλο για τη θεραπεία της μυικής δυστροφίας τύπου Becker. Ένα επιπλέον πρόβλημα είναι η υψηλή ανοσογονικότητα του AAV, εκλύοντας απενεργοποιητική ανοσοαντίδραση έναντι του ιού και του φερόμενου γονιδίου της δυστροφίνης. Επίσης, λόγω της παρουσίας των AAV φορέων ως επισωμάτων στα μυικά κύτταρα που στοχεύουν, αναμένεται ότι το γενετικό υλικό αυτών των φορέων θα εξαλειφθεί λόγω του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου των μυικών κυττάρων (muscle cell turnover), με αποτέλεσμα να αναμένεται η ανάγκη επαναχορήγησης του ιικού φορέα. Με βάση τα παραπάνω, αν και η γονιδιακή θεραπεία θεωρείται η πιο υποσχόμενη μέθοδος θεραπείας της μυικής δυστροφίας τύπου Duchenne, η αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων είναι απαραίτητη για την κλινική αποτελεσματικότητα αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης.

Άλλα παραδείγματα κληρονομούμενων νοσημάτων στα οποία ερευνάται η κλινική εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας είναι η κυστική ίνωση, με μία πρόσφατη βρετανική κλινική μελέτη (Imperial College of London) που χρησιμοποίησε τον λιποσωματικό ιικό φορέα pGM169/GL67A για το γονίδιο της κυστικής ίνωσης και αναμένεται η δημοσίευση των αποτελεσμάτων της (clinicaltrials.gov, NCT01621867), καθώς και η αιμοφιλία Α με την πρόσφατη ολοκλήρωση μίας βρετανικής κλινικής μελέτης που χρησιμοποίησε τον AAV ως γονιδιακό φορέα του γονιδίου του παράγοντα VIII (clinicaltrials.gov, NCT02576795).

### **3. ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΣΟΘΗΛΙΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΙΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ**

#### **3.1. Το κακόηθες μεσοθηλίωμα ως «στόχος» γονιδιακής θεραπείας**

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες έγινε αντιληπτό ότι η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να βρει εφαρμογή στη θεραπεία του καρκίνου, ιδιαίτερα με την αυξανόμενη κατανόηση της βιολογίας του καθώς και με τη ραγδαία ανάπτυξη μιας πληθώρας φορέων DNA. Το κακόηθες μεσοθηλίωμα αποτελεί έναν ιδανικό τύπο καρκίνου καρκινικό για τη μελέτη γονιδιακής θεραπείας με ιικούς φορείς. Ένας λόγος είναι ότι το μεσοθηλίωμα παραμένει συνήθως εντοπισμένο στη θωρακική κοιλότητα και δεν εξελίσσεται με μεταστάσεις ακόμα και σε προχωρημένα στάδια, συνεπώς η τοπική χορήγηση ενός ιικού φορέα θεωρητικά θα μπορούσε να ελέγξει αυτήν την επέκταση. Επίσης, ο όγκος είναι εύκολα προσβάσιμος μέσω του θωρακικού τοιχώματος χωρίς έτσι να είναι απαραίτητη η χορήγηση του ιού μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας, ενώ ταυτόχρονα καθίσταται σχετικά εύκολη η λήψη δειγμάτων πλευριτικού υγρού ή του όγκου για ανάλυση. Επιπλέον, η υπεζωκοτική κοιλότητα παρέχει μια εκτεταμένη, συνεχή επιφάνεια μεσοθηλιακών κυττάρων που αναμένεται να διευκολύνει την αποτελεσματική, ταχεία και διάχυτη μεταβίβαση των ιικών φορέων από το ένα κύτταρο στο άλλο. Τέλος, η απουσία αποτελεσματικών θεραπειών καθιστά την ανάγκη για καινοτόμες θεραπείες επιτακτική.

### 3.2. Στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας για το κακόηθες μεσοθελίωμα

Οι πρώτες κλινικές μελέτες φάσης I γονιδιακής θεραπείας του μεσοθελιώματος ξεκίνησαν στις αρχές του 1990 (24). Οι στρατηγικές που μελετήθηκαν αρχικά είναι η μέθοδος «αυτοκτονίας» με τη μεταγωγή του γονιδίου της θυμιδικής κινάσης και η μεταγωγή ανοσοτροποποιητικών γονιδίων, όπως η IL2 και η IFN-β.

Η πρώτη κλινική μελέτη ξεκίνησε στο Queen Elizabeth Medical Center στο Perth της Αυστραλίας με τη χρήση του γενετικά τροποποιημένου με πολλαπλασιαζόμενου ιού δαμαλίτιδας (vaccinia virus) που εξέφραζε το γονίδιο της IL2 (vaccinia-IL2, VV-IL-2) με στόχο την ανάπτυξη ανοσιακής αντίδρασης εναντίον του όγκου. Οι αμέσως επόμενες μελέτες έγιναν στο University of Pennsylvania από τους Steven Albelda και Daniel Serman. Αρχικά χρησιμοποίησαν ένα γενετικά τροποποιημένο μη πολλαπλασιαζόμενο αδενοϊό που εξέφραζε το γονίδιο της θυμιδικής κινάσης του ερπητοϊού (Ad.HSVtk) σε κλινικές μελέτες που ξεκίνησαν το 1995, ενώ σε ακόλουθες μελέτες, που ξεκίνησαν το 2003, χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένος αδενοϊός με το γονίδιο της IFN-β (Ad.IFN-β).

#### 3.2.1. Θεραπεία με γονίδια «αυτοκτονίας»: Ad.HSVtk/GCV

Η θεραπεία με γονίδια «αυτοκτονίας» (suicide gene therapy) βασίζεται στην αρχή ότι η μεταβίβαση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί ένα ένζυμο και η έκφραση αυτού του ενζύμου από τα καρκινικά κύτταρα επιφέρει ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων σε ένα φάρμακο ή ουσία («prodrug» ή «προφάρμακο») με κατά τα άλλα καλοήγη δράση σε κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν αυτό το ένζυμο. Αυτό το ένζυμο μεταβολίζει το «προφάρμακο» σε τοξική ουσία που προκαλεί κυτταρικό θάνατο ή «αυτοκτονία» στα καρκινικά κύτταρα που το εκφράζουν. Ένα πλεονέκτημα της θεραπείας με γονίδια «αυτοκτονίας» είναι το bystander effect που προκύπτει όταν η ενδοκυτταρικά παραγόμενη τοξική ουσία προσβάλλει και γειτονικά καρκινικά κύτταρα τα οποία δεν έχουν υποστεί μεταβίβαση του γονιδίου. Αυτό το φαινόμενο είναι εφικτό λόγω της παρουσίας χασματικών συνδέσεων (gap junctions) που επιτρέπουν τη διακυτταρική διάχυση μορίων ανάμεσα σε γειτονικά κύτταρα.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της αρχής είναι το γονίδιο αυτοκτονίας της θυμιδικής κινάσης του ερπητοϊού (herpes simplex virus-1 thymidine kinase, HSVtk), που ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στα οποία εκφράζεται στο νουκλεοσιδικό ανάλογο γκανσικλοβίρη (gancyclovir). Στα φυσιολογικά κύτταρα η γκανσικλοβίρη (GCV) δεν μεταβολίζεται και συνεπώς σπάνια έχει τοξικές παρενέργειες. Η HSVtk φωσφορυλιώνει την γκανσικλοβίρη σε μονοφωσφορική γκανσικλοβίρη η οποία μεταβολίζεται περαιτέρω από ενδογενείς κινάσες σε τριφωσφορική γκανσικλοβίρη που αναστέλλει δραστικά την DNA πολυμεράση καθώς και τη φυσιολογική αντιγραφή του DNA.

Σε αυτά τα πλαίσια, μία εργαστηριακή μελέτη έδειξε ότι η τοπική χορήγηση ενός ανασυνδυασμένου αδενοϊού που φέρει το γονίδιο HSVtk (Ad.HSVtk/GCV) σε μοντέλα ανοσοκατασταλμένων ποντικών (severe combined immunodeficiency, SCID) με ενδοπεριτοναϊκούς όγκους μεσοθελιώματος οδήγησε σε σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων μετά τη χορήγηση GCV, ακόμα και σε ποντίκια με προχωρημένους όγκους. Δεν παρατηρήθηκαν ανησυχητικές παρενέργειες, όπως διαπιστώθηκε και από την απουσία του mRNA ιικών γονιδίων με real-time polymerase chain reaction σε διάφορους φυσιολογικούς ιστούς των ποντικών που υπεστήσαν τη θεραπεία (25).

Με βάση αυτά τα προκλινικά δεδομένα, ο Sterman και συνεργάτες ξεκίνησαν μία σειρά από κλινικές μελέτες φάσης I για τη διερεύνηση της τοξικότητας, της αποτελεσματικότητας της μεταβίβασης του γονιδίου HSVtk και την εκτίμηση της παραγωγής αντικής ανοσοαντίδρασης μετά από τη χορήγηση μίας ενδοϋπεζωκοτικής δόσης του Ad.HSVtk και ενδοφλέβιας χορήγησης GCV 2 φορές την ημέρα για 2 εβδομάδες (26, 27). Στη μελέτη συμμετείχαν 34 ασθενείς που έλαβαν μία υψηλή, ενδοϋπεζωκοτική δόση μη πολλαπλασιαζόμενου (non-replicative) αδενοϊού που κωδικοποιεί το γονίδιο της θυμιδινικής κινάσης (Ad.HSVtk) που καθορίστηκε ως ίση ή μεγαλύτερη των  $1.6 \times 10^{13}$  ιικά σωματίδια. Η έκφραση του γονιδίου της θυμιδινικής κινάσης Ad.HSVtk διαπιστώθηκε σε 21 από τους ασθενείς με ανοσοϊστοχημεία των μεσοθηλιακών καρκινικών κυττάρων και η ανάλυση επικεντώθηκε σε αυτούς του ασθενείς. Η ενδοϋπεζωκοτική έγχυση του αδενοϊού αξιολογήθηκε ως ασφαλής χωρίς σοβαρές παρενέργειες και κανένας από τους ασθενείς δε χρειάστηκε να εγκαταλείψει τη μελέτη. Οι περισσότερες παρενέργειες ήταν πρώτου ή δευτέρου βαθμού και περιλάμβαναν λεμφοπενία, αναιμία, παροδική αύξηση ηπατικών ενζύμων, πυρετό, κνησμό και θρομβοκυττάρωση. Η διάμεση επιβίωση ήταν περίπου 10-15 μήνες, αν και 2 από τους ασθενείς παρουσίασαν παρατεταμένη κλινική σταθεροποίηση του όγκου και επιβίωση μέχρι 7-10 χρόνια. Αν και η μεταγωγή του ιού Ad.HSVtk παρατηρήθηκε σε 21 από του 34 ασθενείς, η έκφραση του γονιδίου της θυμιδινικής κινάσης παρατηρήθηκε μόνο επιφανειακά και σποραδικά από τα μεσοθηλιακά καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, η έκφραση των γονιδίων του ιού ήταν χαμηλή και μόνο για περίπου 48 ώρες. Επίσης, διαπιστώθηκε ανοσιακή αντίδραση με την ενεργοποίηση natural killer cells και αντισωμάτων έναντι του ιού καθώς και των μεσοθηλιακών καρκινικών κυττάρων. Λόγω της χαμηλής μεταγωγής του ιού στα καρκινικά κύτταρα, οι ερευνητές συμπεράναν ότι ο κύριος μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης του ιού διαμεσολαβήθηκε μέσω της ανοσιακής αντίδρασης που εκλύθηκε έναντι του ιού και των καρκινικών κυττάρων. Ταυτόχρονα όμως με αυτήν την αντίδραση, παρατηρήθηκαν και ουδετεροποιητικά αντισώματα έναντι του ιού. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι αν και ο Ad.HSVtk ιός ήταν γενικά ασφαλής, αλλά η μεταγωγή του στα καρκινικά κύτταρα πολύ χαμηλή. Παρόλα αυτά, διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη αντικαρκινική δράση της οποίας η αποτελεσματικότητα οφείλεται μάλλον στην έκλυση ανοσιακής αντίδρασης έναντι των καρκινικών κυττάρων και όχι στη μεταγωγή της θυμιδινικής κινάσης. Το συμπέρασμά τους ήταν η χρήση αδενοϊών που εκφράζουν ανοσοτροποποιητικά γονίδια και θα μπορούσαν να ενισχύσουν περαιτέρω την έκλυση αντικαρκινικής ανοσιακής αντίδρασης, π.χ. κυτταροκίνες, IFN- $\beta$ , χρήζουν περαιτέρω έρευνας και κλινικών μελετών.

### **3.2.2. Γονιδιακή θεραπεία με ανοσοτροποποιητικά γονίδια**

Η υπόθεση που υποστηρίζει τη γονιδιακή θεραπεία με ανοσοτροποποιητικά γονίδια στη θεραπεία του καρκίνου είναι ότι η υψηλή έκφραση ανοσοδιεγερτικών κυτταροκινών (π.χ. IL-2, TNF, GM-CSF, IFN- $\alpha$  και IFN- $\beta$ ) εντός των καρκινικών κυττάρων μπορεί να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα και να ενισχύσει την αντικαρκινική ανοσιακή αντίδραση. Τα πλεονεκτήματα της γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνουν την αποφυγή της τοξικότητας που έχει παρατηρηθεί με τη συστηματική χορήγηση κυτταροκινών και την παρατεταμένη έκφραση των κυτταροκινών στους καρκινικούς ιστούς.

#### **3.2.2.1. Vaccinia-virus VV-IL-2**

Η κλινική μελέτη του ανασυνδυασμένου ιού δαμαλίτιδας VV-IL-2 ήταν η πρώτη κλινική μελέτη άμεσης ενδοϋπεζωκοτικής χορήγησης γονιδίου κυτταροκίνης σε ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα. Αυτή η μελέτη ξεκίνησε το 1990 και τα αποτελέσματά της ανακοινώθηκαν το 2000 (28). Αν και ο ιός δαμαλίτιδας δεν είχε χρησιμοποιηθεί ευραίως σε μελέτες γονιδιακής θεραπείας λόγω της υψηλής ανοσογονικότητάς του που θα καθιστούσε την χορήγηση πολλαπλών ενέσεων του ιού δύσκολη με την παραγωγή ουδετεροποιητικών αντισωμάτων, οι ερευνητές τροποποίησαν τον ιό γενετικά τοποθετώντας το γονίδιο της IL-2 εντός του γονιδίου της θυμιδικής κινάσης του ιού, καταργώντας την πολλαπλαστική ικανότητά του (non-replicative virus). Επέλεξαν τη χρήση του ιού δαμαλίτιδας λόγω του μεγάλου γονιδιώματός του, επιδεχόμενου τροποποίησης με μεγάλα γονίδια, και λόγω της διαθεσιμότητας ενός εργαστηριακού τεστ που μπορούσε να μετρήσει την παρουσία ουδετεροποιητικών αντικών αντισωμάτων έναντι του ιού (VV IgG).

6 ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα ανθεκτικό στις τότε ενδεδειγμένες θεραπείες έλαβαν διαδοχικές, ενδοϋπεζωκοτικές ενέσεις του ιού VV-IL-2 ( $1 \times 10^7$  ιικά σωματίδια) για 12 εβδομάδες. Δείγματα βιοψιών του όγκου, σιέλου, ούρων και αίματος εξετάστηκαν για την έκφραση VV-IL-2 mRNA, ενώ η παρουσία διήθησης του όγκου από T-λεμφοκύτταρα αξιολογήθηκε με ανοσοϊστοχημεία. Διήθηση με T-λεμφοκύτταρα διαπιστώθηκε στο 50% των ασθενών. Η έκφραση του VV-IL-2 mRNA ήταν υψηλότερη 1-3 ημέρες μετά από κάθε ένεση του ιού και παρέμεινε μετρήσιμη μέχρι 3 εβδομάδες μετά από κάθε ένεση παρά την παρουσία ουδετεροποιητικών αντισωμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές παρενέργειες και λοιμώξεις σε συγγενείς των ασθενών. Ωστόσο, η κλινική αποτελεσματικότητα αυτής της θεραπείας ήταν απογοητευτική καθώς δεν διαπιστώθηκε μείωση του όγκου και της διάμεσης επιβίωσης των ασθενών. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η χορήγηση του VV-IL-2 ήταν ασφαλής και προκαλεί παρατεταμένη έκφραση της IL-2, υποδηλώνοντας ότι ο ιός δαμαλίτιδας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικός φορέας της IL-2 για τη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου με κυτταροκίνες.

### 3.2.2.2. Ad.IFN-β και Ad.IFN-α

Με βάση τα αποτελέσματα της γονιδιακής θεραπείας με τον ανασυνδυασμένο αδενοϊό Ad.HSVtk (3.2.1), και λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή τοξικότητα αλλά ισχυρή αντικαρκινική δράση της IFN-β, η ομάδα του Steven Albelda στο University of Pennsylvania ξεκίνησε προκλινικές μελέτες ενός μη πολλαπλασιαζόμενου ανασυνδυασμένου αδενοϊού που φέρει το γονίδιο της IFN-β (Ad.IFN-β) (29). Χρησιμοποιώντας ένα ανοσοεπαρκές, ορθοτοπικό μοντέλο ποντικών με ενδοπεριτοναϊκό μεσοθηλίωμα (κυτταρικές σειρές AB12 ή AC29), η χορήγηση μίας μόνο δόσης του Ad.IFN-β ενδοπεριτοναϊκά οδήγησε σε στατιστικά σημαντικώς παρατεταμένη επιβίωση άνω του 90% των ποντικών σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου που έλαβαν μία δόση αδενοϊού που δεν κωδικοποιεί το γονίδιο IFN-β. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρατήρηση ότι αντικαρκινική δράση διαπιστώθηκε και σε ποντίκια με μεγάλους όγκους, καθώς και σε υποδόριους όγκους όπου δε χορηγήθηκε άμεσα ο ιός (abscopal effect). Οι ερευνητές απέδωσαν αυτά τα εντυπωσιακά αποτελέσματα στην έκλυση αντικαρκινικής ανοσιακής αντίδρασης μέσω κυτταροτοξικών CD8+ T-λεμφοκυττάρων, αφού η αντικαρκινική δράση ανερέθηκε σε ποντίκια που έλαβαν ουδετεροποιητικά αντισώματα έναντι των CD8+ T-λεμφοκυττάρων.

Με βάση τα παραπάνω προκλινικά δεδομένα, ξεκίνησε μία κλινική μελέτη φάσης I για να ερευνηθεί η τοξικότητα της γονιδιακής θεραπείας με τον ιό Ad.IFN-β σε ασθενείς με κακόηθες

μεσοθηλίωμα και άλλους τύπους καρκίνου με μεταστάσεις στην υπεζωκοτική κοιλότητα (30). Μία δόση του Ad.IFN-β ( $9 \times 10^{11}$  έως  $10 \times 10^{12}$  ιικά σωματίδια) χορηγήθηκε μέσω ενδοπλευρίου καθετήρα σε 7 ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα και σε 3 ασθενείς με κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές. Αξιολογήθηκαν η τοξικότητα, η γονιδιακή μεταγωγή, η έκλυση ειδικής ανοσίας και το μέγεθος των όγκων. Η χορήγηση του Ad.IFN-β ήταν πολύ καλά ανεκτή και η συχνότερη παρενέργεια ήταν η παροδική λεμφοπενία. Τα επίπεδα IFN-β στο πλευριτικό υγρό μετά τη χορήγηση του Ad.IFN-β ποικίλλαν σημαντικά, ενώ γονιδιακή μεταγωγή της IFN-β διαπιστώθηκε σε 7 από τους 10 ασθενείς με αξιολόγηση της έκφρασης IFN-β mRNA ή πρωτεΐνης. Αντικαρκινική ανοσιακή αντίδραση διαπιστώθηκε σε 7 από τους 10 ασθενείς με τη μορφή CD8+ κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και αντισωμάτων ειδικών για το αντιγόνο μεσοθηλίνης ή το Simian virus 40 large T-antigen που εκφράζονται χαρακτηριστικά και συχνά από τους όγκους μεσοθηλιώματος. Όλοι οι ασθενείς ανέπτυξαν ουδετεροποιητικά αντισώματα έναντι του αδενοϊού. 4 από τους 10 ασθενείς παρουσίασαν είτε σταθεροποίηση της νόσου ή μείωση του μεγέθους των όγκων (PET-CT, CT) 60 μέρες μετά από τη χορήγηση του Ad.IFN-β.

Με βάση αυτά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η ίδια ερευνητική ομάδα ξεκίνησε μία δεύτερη κλινική μελέτη φάσης I σε ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα προχωρημένου σταδίου με τη διαφορά ότι χορηγήθηκαν δύο δόσεις του Ad.IFN-β ( $3 \times 10^{11}$  έως  $3 \times 10^{12}$  ιικά σωματίδια) ενδοπλευρικά με διαφορά μίας εβδομάδας (31). Το σκεπτικό της χορήγησης δύο δόσεων του ιού ήταν η αναμενόμενη ενίσχυση της αντικαρκινικής ανοσολογικής αντίδρασης (32). 10 ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα και 7 ασθενείς με κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές συμμετείχαν στη μελέτη. Η θεραπεία δεν είχε σοβαρές παρενέργειες και παρατηρήθηκε ξανά αντικαρκινική ανοσιακή αντίδραση όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη μελέτη. Αν και διαπιστώθηκαν υψηλά επίπεδα IFN-β μετά από τη χορήγηση της πρώτης δόσης του ιού, η έγχυση της δεύτερης ένεσης προκάλεσε ελάχιστη αύξηση των επιπέδων IFN-β λόγω της παραγωγής ουδετεροποιητικών αντισωμάτων που παρεμπόδιζε την αποτελεσματική μεταγωγή του γονιδίου IFN-β. Ουδετεροποιητικά αντισώματα παρήχθησαν ακόμα και όταν η δεύτερη δόση χορηγήθηκε μόλις μετά από 7 μέρες μετά από την πρώτη δόση. 3 ασθενείς παρουσίασαν μείωση ή σταθεροποίηση της νόσου και 7 ασθενείς είχαν επιβίωση μεγαλύτερη των 18 μηνών. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η χορήγηση του Ad.IFN-β είναι κλινικά αποτελεσματική και χρήζει περαιτέρω έρευνας για ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα, ωστόσο η δεύτερη δόση του ιού μετά από 7 μέρες μάλλον δεν επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα λόγω της έκλυσης αντικής ανοσιακής αντίδρασης και παραγωγής ουδετεροποιητικών αντισωμάτων. Σε μία ακόλουθη κλινική μελέτη φάσης I (33), χρησιμοποιήθηκαν δύο δόσεις ανασυνδυασμένου αδενοϊού Ad.IFN-α έναντι του Ad.IFN-β (για λόγους χρηματοδότησης από τη συγκεκριμένη συνεργάζουσα φαρμακευτική εταιρία) που χορηγήθηκαν με διαφορά 3 ημερών για να αποφευχθεί η απενεργοποίηση του ιικού φορτίου της δεύτερης δόσης από ουδετεροποιητικά αντισώματα. 9 ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα συμμετείχαν στη μελέτη. Πράγματι, διαπιστώθηκε παράταση της αύξησης της IFN-α και έκλυση αντισωμάτων έναντι μεσοθηλιακών αντιγόνων σε 7 από τους 8 ασθενείς. Περίπου 50% των ασθενών είχαν σταθεροποίηση ή μείωση του μεγέθους του όγκου με σχετικά ανεκτές παρενέργειες, υποδηλώνοντας ότι η γονιδιακή θεραπεία με τον αδενοϊό Ad.IFN-α χρήζει περαιτέρω κλινικής διερεύνησης ως θεραπευτική στρατηγική για το κακόηθες μεσοθηλίωμα.

### 3.3. Μειονεκτήματα της γονιδιακής θεραπείας με μη πολλαπλασιαζόμενους ιούς

Οι ερευνητικές προσπάθειες για τη γονιδιακή θεραπεία του κακοήθους μεσοθηλιώματος έχουν επικεντρωθεί στη χρήση μη πολλαπλασιαζόμενων ικών φορέων, κυρίως του αδενοϊού, όπως περιγράφηκε παραπάνω (2.2). Ο κύριος λόγος χρήσης μη πολλαπλασιαζόμενων ιών είναι ότι θεωρούνται πιο ασφαλείς. Αν και τα κλινικά αποτελέσματα είναι σχετικά ενθαρρυντικά, ταυτόχρονα παρατηρήθηκαν τα εξής μειονεκτήματα με τη χρήση μη πολλαπλασιαζόμενων ικών φορέων: (1) η μεταγωγή του γονιδίου ενδιαφέροντος παρατηρήθηκε μεν, αλλά ήταν μόνο επιφανειακή και σποραδική, (2) η πρόσβαση του ιού στα καρκινικά κύτταρα είναι περιορισμένη, και (3) η έκφραση του μεταγόμενου γονιδίου ήταν χαμηλή και μικρού χρονικού διαστήματος (2 ημέρες). Αυτοί είναι οι βασικοί λόγοι που πολύ λίγοι μη πολλαπλασιαζόμενοι ιοί έχουν προχωρήσει σε κλινικές μελέτες φάσης II και III.

## **4. ΟΓΚΟΛΥΤΙΚΟΙ ΙΟΙ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

### **4.1. Γενικά στοιχεία**

Η απάντηση σε αυτά τα προβληματικά σημεία είναι η χρήση ικών φορέων που πολλαπλασιάζονται και ταυτόχρονα λύουν τα προσβαλλόμενα καρκινικά κύτταρα, μία εφαρμογή που είναι γνωστή ως ογκολυτική ιοθεραπεία.

Οι περισσότεροι καρκίνοι προκαλούνται από μία πληθώρα ογκογενετικών μηχανισμών, όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η γονιδιακή αστάθεια, η διηθητική ικανότητα, η ανάπτυξη αναερόβιων μεταβολικών οδών, η αγγειογένεση, και η διαφυγή από την ανοσιακή αναγνώριση. Για κάθε μηχανισμό, μπορούν να αναπτυχθούν αναστολείς, οι οποίοι όμως αν χρησιμοποιηθούν ως μονοθεραπεία, επιδρούν παροδικά στον όγκο ως επιλεκτική δαρβινική πίεση που οδηγεί σε διαφυγή του όγκου. Οι περισσότεροι όγκοι έχουν πολλές μεταλλάξεις που επιτρέπουν τη διαφυγή τους από τέτοιους συγκεκριμένους αναστολείς. Γι'αυτό το λόγο, η ανάπτυξη μεθόδων που καταστέλλουν πολλαπλούς καρκινογενετικούς μηχανισμούς είναι απαραίτητη. Η ογκολυτική ιοθεραπεία αποτελεί μία καινοτόμο θεραπευτική στρατηγική που δεν παρουσιάζει «cross-resistance» με τις κατεστημένες αντικαρκινικές θεραπείες και ταυτόχρονα δρα μέσω «μονοπατιών» που είναι απαραίτητοι για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Συνεπώς, η ανάπτυξη «ανθεκτικότητας» στους ογκολυτικούς ιούς με την επιλεκτική καταστολή αυτών των «μονοπατιών» θα οδηγούσε σε θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

### **4.2. Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης**

Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των ογκολυτικών ιών είναι οι παρακάτω:

A. Προκαλούν ογκόλυση, εκμεταλλευόμενοι τα πολλαπλά ογκογενετικά «μονοπάτια» των καρκινικών κυττάρων, αποτελώντας ένα είδος βιολογικής μηχανής που αυτοαναπαράγεται με τη βοήθεια των ίδιων των καρκινικών κυττάρων.

B. Προκαλούν μη ειδική και ειδική ανοσιακή αντίδραση έναντι του όγκου, κάτι που έχει καταδειχθεί σε πολλά *in vivo* πειραματικά μοντέλα.

Γ. Μπορούν να δράσουν ταυτόχρονα ως φορείς γονιδίων στα πλαίσια γονιδιακής θεραπείας, αλλά με αποτελεσματικότερη μεταγωγή και υψηλότερη έκφραση του γονιδίου σε περισσότερα καρκινικά κύτταρα που επιτυγχάνεται με τον ταχύ πολλαπλασιασμό του ιού και συνεπώς την

ταχύτερη προσβολή καρκινικών κυττάρων. Διακρίνονται 5 βασικές στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας που μπορούν να εφαρμοστούν με τη χρήση ογκολυτικών ιών:

- 1) Μεταγωγή ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το p53 και η πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος, που υφίστανται μεταλλάξεις σε περισσότερο από 50% των καρκινικών όγκων
- 2) Μεταγωγή γονιδίων «αυτοκτονίας», που είναι ένζυμα που μετατρέπουν ένα προφάρμακο σε ουσία που είναι τοξική για τα κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο ένζυμο, π.χ η θυμιδική κινάση του ερπητοϊού, που μετατρέπει τη γκανσικλοβίρη σε τοξική ουσία.
- 3) Αναστολή της έκφρασης ογκογονιδίων με τη μεταγωγή γονιδίων που μεταγράφονται σε siRNA (small interfering RNAs) και συνεπώς καταστέλλουν τη μετάφραση του mRNA ενεργοποιημένων ογκογονιδίων, όπως το HER2 και Ras.
- 4) Μεταγωγή γονιδίων που αυξάνουν την ευαισθησία των όγκων στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία, όπως το γονίδιο p53.
- 5) Μεταγωγή γονιδίων που ενεργοποιούν την ανοσιακή αντίδραση εναντίων του όγκου, π.χ. ιντερλευκίνες και το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC class I) για την ενίσχυση της παρουσίας ογκοαντιγόνων.

#### **4.3. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα ενός αποτελεσματικού ογκολυτικού ιού**

Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού ογκολυτικού φορέα περιλαμβάνουν τα παρακάτω:

- 1) την επιλεκτική προσβολή καρκινικών και όχι φυσιολογικών κυττάρων
- 2) την ασφάλεια για τον ασθενή, με τη χρήση φορέων που δεν προκαλούν σημαντική νοσηρότητα και για τους οποίους υπάρχει διαθέσιμο αντικό φάρμακο και ένας μηχανισμός άμεσης απενεργοποίησης του ιού
- 3) τον ταχύ λυτικό κύκλο ζωής του ιού, έτσι ώστε η προσβολή των καρκινικών κυττάρων και εξάπλωση του ιού εντός του όγκου να πραγματοποιείται το δυνατόν γρηγορότερο πριν από την ανάπτυξη αντικής ανοσιακής αντίδρασης
- 4) την υψηλή μεταγωγική ικανότητα για το φερόμενο γονίδιο
- 5) την ικανότητα υψηλής έκφρασης του γονιδίου για παρατεταμένο διάστημα
- 6) τη χαμηλή ανοσογονικότητα
- 7) την απουσία μεταλλαξιογόνου ικανότητας
- 8) την προσβολή τόσο πολλαπλασιαζόμενων όσο και μη πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, δεδομένης της παρουσίας και των 2 τύπων πληθυσμών σε έναν όγκο.
- 9) την ικανότητα παραγωγής σε υψηλούς τίτλους από τη φαρμακευτική βιομηχανία

#### **4.4. Μηχανισμοί επιλεκτικότητας για τα καρκινικά κύτταρα**

Τα καρκινικά κύτταρα είναι εγγενώς ευεπίφορα στην προσβολή από ιούς διότι τα αποπτωτικά και αντικά «μονοπάτια» τους, που επιτρέπουν στα φυσιολογικά κύτταρα να αντιστέκονται στην ιική προσβολή, έχουν απενεργοποιηθεί με στόχο την πρόωθηση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας. Ωστόσο, οι περισσότεροι ογκολυτικοί ιοί προσβάλλουν όχι μόνο τα καρκινικά αλλά και τα φυσιολογικά κύτταρα όταν χορηγούνται ενδοφλεβίως. Γι' αυτό το λόγο, η γενετική τροποποίησή είναι συνήθως απαραίτητη, ώστε ο ιός να στοχεύει μόνο τα καρκινικά κύτταρα. Οι κύριες μέθοδοι στόχευσης που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι εξής:

1)Μεταγωγική στόχευση, που αναφέρεται στην τροποποίηση των ικών καψιδίων ή της κυτταρικής μεμβράνης που περιβάλλει τον ικό φορέα και μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη σύζευξη της επιφάνειας του ιού με υποστρώματα υποδοχέων που εκφράζονται ειδικά από το καρκινικό κύτταρο, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα.

2)Μεταγραφική στόχευση, που αναφέρεται στην ενσωμάτωση ενός promoter, που εκφράζεται συγκεκριμένα στο καρκινικό κύτταρο (π.χ. prostatic acid phosphatase PSA για τον καρκίνο του προστάτη, alpha fetoprotein antigen AFP για τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο), μπροστά από το μεταβιβαζόμενο ικό γονιδίωμα.

3)Η διαγραφή ικών γονιδίων που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού σε φυσιολογικά κύτταρα αλλά όχι σε καρκινικά κύτταρα.

4)Τέλος, ορισμένοι ιοί, όπως ο VSV, παρουσιάζουν εγγενή επιλεκτικότητα για τα καρκινικά κύτταρα και αυτό παρατηρείται με ιούς που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην αντική δράση των ιντερφερονών, λαμβάνοντας υπόψη ότι μεγάλο ποσοστό των κακοήθων όγκων παρουσιάζουν ελαττωματικά «μονοπάτια» ιντερφερονών τύπου I, κάτι που θα εξηγηθεί με περισσότερη λεπτομέρεια παρακάτω (4.3).

#### 4.5. Παραδείγματα ογκολυτικών ιών που έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία καρκίνου

Περισσότεροι από 10 ογκολυτικοί ιοί βρίσκονται σε κλινικές μελέτες φάσης I/II/III και πάνω από 10 φαρμακευτικές εταιρίες έχουν ενεργά προγράμματα ογκολυτικής ιοθεραπείας. Ο παρακάτω πίνακας περιλαμβάνει παραδείγματα κλινικών μελετών με ογκολυτικούς ιούς και αφορούν διάφορους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος κεφαλής/τραχήλου, ο καρκίνος προστάτη, το γλοιοβλάστωμα, ο καρκίνος ουροδόχου κύστης καθώς και ο καρκίνος του παχέως εντέρου και ωοθηκών.

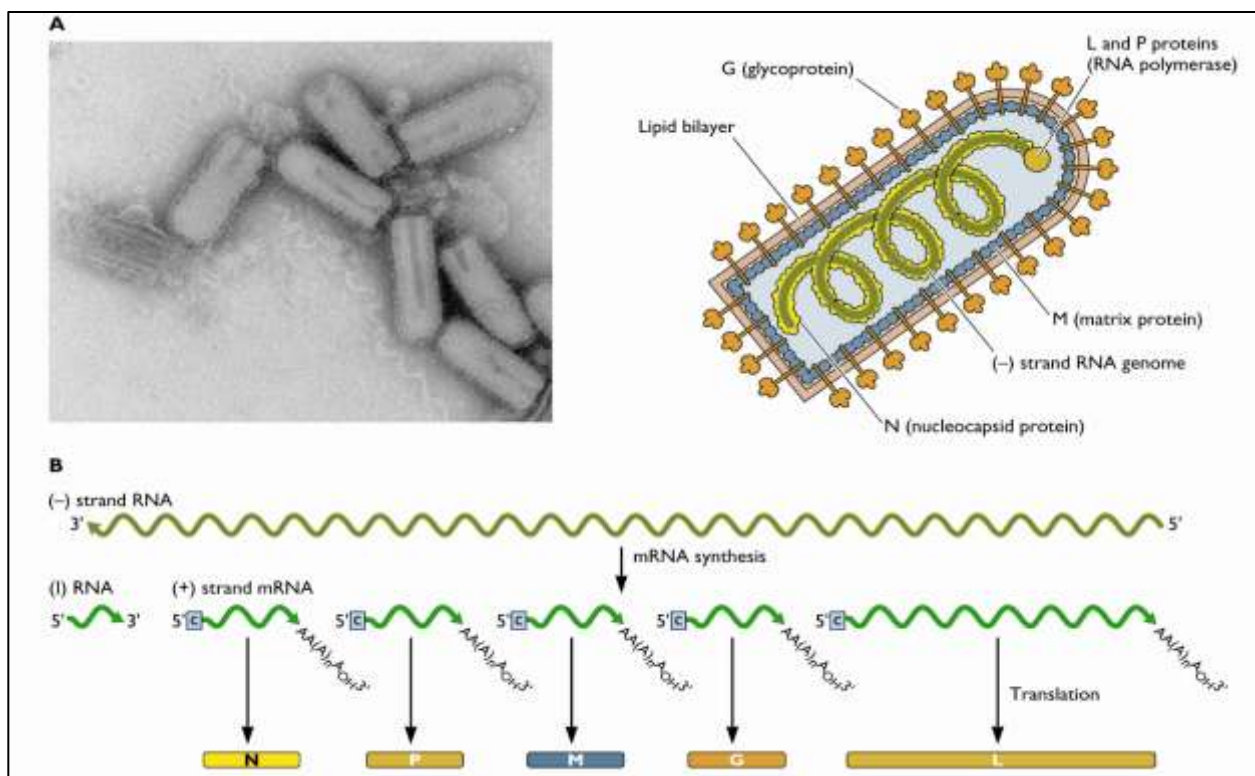
Ογκολυτικός ιός	Φάση κλινικής μελέτης και τύπος καρκίνου	Γενετική τροποποίηση του ιού	Μηχανισμός επιλεκτικής προσβολής των καρκινικών κυττάρων
Onyx 015 (adenovirus)	I-III, καρκίνος κεφαλής/τραχήλου	Διαγραφή γονιδίου E1B	Απουσία έκφρασης του p53
CN706 (adenovirus)	I, καρκίνος προστάτη	Έκφραση του γονιδίου E1A υπό την επίδραση του promoter του γονιδίου prostate-specific ets (PSE)	Μεταγραφή του PSE
G207 (herpesvirus-1)	I, γλοιοβλάστωμα	Διακοπή έκφρασης του γονιδίου ribonucleotide reductase (ICP6)	Πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα
Newcastle virus 73-T	I, καρκίνος ουροδόχου κύστης	Καμία τροποποίηση	Απενεργοποίηση των «μονοπατίων» ιντερφερονών τύπου I
Measles virus encoding thyroidal sodium iodide symporter	I, κακόηθες μεσοθηλίωμα	Έκφραση του γονιδίου thyroidal sodium iodide symporter	Δράση $I^{131}$ μόνο στα καρκινικά κύτταρα που προσβάλλονται από τον ιό



## 5. ΙΟΣ ΘΥΛΑΚΙΩΔΟΥΣ ΣΤΟΜΑΤΙΤΙΔΑΣ (VESICULAR STOMATITIS VIRUS, VSV)

### 5.1. Γενετική οργάνωση και κύκλος ζωής του VSV

Ο ιός θυλακιώδους στοματίτιδας (vesicular stomatitis virus, VSV) είναι ένας φακελωμένος λυτικός ραβδοϊός μήκους 100-430nm και διαμέτρου 80nm με χαρακτηριστικό σχήμα σφαίρας όπλου. Ο πυρήνας του περιβάλλεται από νουκλεοκαψίδιο που εσωκλείει μία μονόκλωνη αρνητική RNA αλυσίδα περίπου 11,200 νουκλεοτιδίων που φέρει 5 γονίδια. Ο ιός αποτελείται από το γενετικό υλικό (RNA αλυσίδα), την ιική νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη N (VSV-N, 47kD), την πρωτεΐνη M (matrix, VSV-M, 26kD) που συνδέεται με τους πυρηνικούς πόρους και παρεμποδίζει τη μεταφορά του κυτταρικού mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα του προσβεβλημένου κυττάρου, τη φωσφοπρωτεΐνη P που αποτελεί μέρος της πολυμεράσης (VSV-P, 30kD) και τις RNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (VSV-L, large, 240kD) που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή και μετάφραση του ιικού γονιδιώματος (**Εικόνα 1**). Ο ιός περιβάλλεται από φάκελο φωσφολιπιδικής μεμβράνης που καλύπτεται από προεξοχές της γλυκοπρωτεΐνης G (VSV-G, 56kD) μέσω της οποίας ο ιός προσδένεται και εισέρχεται στα κύτταρα που προσβάλλει. Ο VSV χαρακτηρίζεται από έναν πολύ γρήγορο λυτικό κύκλο ζωής. Προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια των προσβαλλόμενων κυττάρων μέσω της



γλυκοπρωτεΐνης G που συνδέεται με υποδοχείς που δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί, και ενδοκυτταρώνεται σε ενδοσώματα κλαθρίνης που στη συνέχεια απελευθερώνουν τον ιό στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, οι RNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες αντιγράφουν και μεταφράζουν το ιικό γονιδίωμα, το οποίο εισέρχεται στα νεοσυστηθέντα νουκλεοκαψίδια (VSV-N). Μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού των νέων ιών, τα προσβεβλημένα κύτταρα λύνονται και απελευθερώνουν τους νέους ιούς.

**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση του ιού VSV (εικόνα από το σύγγραμμα Principles of Virology, by Flint et al). **A.** Φωτογραφία του ιού VSV με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που απεικονίζει το χαρακτηριστικό σχήμα σφαίρας όπλου του ιού. Απεικόνιση των συστατικών του ιού VSV. Ο ιός αποτελείται από φάκελο φωσφολιπιδικής μεμβράνης, από την οποία προέχει η γλυκοπρωτεΐνη G, που μεσολαβεί την είσοδο του ιού στο κύτταρο, τον πυρήνα που περιβάλλεται από την νουκλεοκαψιδιακή πρωτεΐνη N, τα ένζυμα L και P που συνιστούν RNA πολυμεράσες και την πρωτεΐνη M (matrix) που επενδύει την μεμβράνη, συνδέεται με τους πυρηνικούς πόρους και παρεμποδίζει τη μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα του προσβεβλημένου κυττάρου. **B.** Απλοποιημένη απεικόνιση του γονιδιώματος του VSV. Το γονιδίωμα του VSV αποτελείται από μία αρνητική μονόκλωνη έλικα RNA που αντιγράφεται με τις RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες σε θετική έλικα, η οποία στη συνέχεια κωδικοποιεί τα 5 γονίδια του ιού.

## 5.2. Παθογένεια και φορείς (hosts) του VSV

Ο ιός VSV ανήκει στην κατηγορία των ραβδοϊών και είναι ενδημικός στην περιοχή της κεντρικής Αμερικής και στις νότιες πολιτείες των ΗΠΑ, ενώ επιδημικές κρίσεις προκαλούνται σε τροπικές περιοχές της Νότιας Αμερικής κάθε 2-3 χρόνια. Φέρεται από μεγάλη ποικιλία αρθρόποδων τα οποία μεταφέρουν τον ιό σε βοοειδή, χοίρους και άλογα, προκαλώντας πυρετό και θυλακιώδεις φλύκταινες στο στοματικό βλεννογόνο. Αν και είναι κύριως νόσος των ζώων, μπορεί να μεταδοθεί και σε ανθρώπους μετά από επαφή με νοσούντα ζώα (αερογενής μετάδοση μέσω σταγονιδίων). Συνήθως είναι ασυμπτωματική αλλά μπορεί να εκδηλωθεί με γριπώδη συνδρομή, επιπεφυκίτιδα και στοματικές φλύκταινες. Η νόσος υποχωρεί αυτόματα σε 7-10 μέρες και συνήθως χωρίς σοβαρές επιπλοκές.

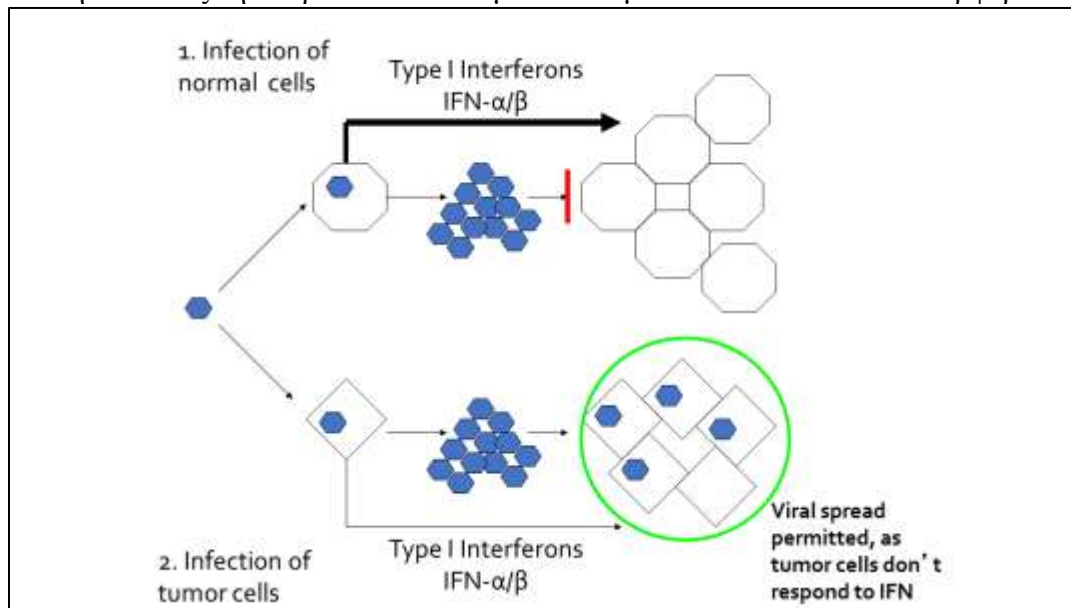
## 5.3. Εγγενής επιλεκτικότητα του VSV για τα καρκινικά κύτταρα

Ο ιός VSV είναι χαρακτηριστικά ευαίσθητος στην αντική δράση τύπου I ιντερφερονών (μη ειδική ανοσία) σε σχέση με άλλους ιούς. Με την σύνδεση της IFN-β στους υποδοχείς τύπου I ιντερφερονών των προσβεβλημένων καθώς και των γειτονικών κυττάρων ενεργοποιείται η μεταγραφή μίας ομάδας γονιδίων που ονομάζονται interferon-stimulated genes (ISGs), τα οποία ενορχηστρώνουν αντικές κυτταρικές δράσεις, όπως η απόπτωση, η άρση του κυτταρικού κύκλου και η έκλυση κυτταρικής ανοσοαντίδρασης.

Οι φυσιολογικοί μηχανισμοί δράσης των τύπου I ιντερφερονών δεν περιλαμβάνουν μόνο την αντική τους επίδραση, αλλά και την ανασταλτική τους επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω προώθησης εντολών απόπτωσης, άρσης της κυτταρικής διαίρεσης και αναστολής της αγγειογένεσης. Σε αυτά τα πλαίσια, έχει παρατηρηθεί και περιγραφθεί απενεργοποίηση των «μονοπατιών» που άγουν τα μηνύματα των τύπου I ιντερφερονών σε διάφορους τύπους καρκίνου, είτε μέσω απενεργοποιητικών μεταλλάξεων είτε μέσω επιγενετικής «σίγασης» (epigenetic silencing) της μεταγραφής των κύριων φορέων αυτών των «μονοπατιών».

Για τους παραπάνω λόγους, τέθηκε η υπόθεση ότι ο ιός VSV προσβάλλει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν απενεργοποιήσει τα «μονοπάτια» τύπου I ιντερφερονών, ενώ τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα με φυσιολογική απαντητικότητα στην επίδραση τύπου I ιντερφερονών καταστέλλουν αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η πρώτη μελέτη

στην οποία παρατηρήθηκε ότι ο ιός VSV προσβάλλει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα ήταν το 2000 από την ομάδα του Stojdl (34), όπου 8 καρκινικές κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν στο ιό VSV με επακόλουθη λύση και μείωση της βιωσιμότητας στατιστικά σημαντικώς μεγαλύτερη σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα. Στην ίδια μελέτη, η προθεραπεία των καρκινικών κυττάρων με IFN-β δεν επηρέασε την ογκολυτική ικανότητα του ιού, ενώ προστάτευσε ακόμα περισσότερο τα φυσιολογικά κύτταρα. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, οι συγγραφείς πρότειναν ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν ελατωματικά «μονοπάτια» τύπου I ιντερφερόνης, γεγονός που εξηγεί την επιλεκτικότητα του VSV για τα καρκινικά κύτταρα. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε σε άλλη μία μελέτη από την ίδια ομάδα (35), στην οποία 60 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές από μία μεγάλη ποικιλία όγκων, όπως λευχαιμία, καρκίνος του πνεύμονα, παχέως εντέρου, μελανώματος κτλ, καθώς και οι αντίστοιχες φυσιολογικές κυτταρικές σειρές, εκτέθηκαν στον ιό VSV για 48h και περισσότερο από 80% αυτών των σειρών έδειξαν ευαισθησία στη λύση από τον ιό, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, ενώ προθεραπεία με IFN-β δεν επηρέασε την ογκολυτική δράση του VSV, υποδηλώνοντας την παρουσία ελατωματικών «μονοπατιών» τύπου I ιντερφερόνων (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Σχηματική απεικόνιση της βασικής αρχής επιλεκτικότητας του VSV. Ελατωματικά «μονοπάτια» τύπου I ιντερφερόνων επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του ιού VSV και την εξάπλωσή του εντός του όγκου, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα.

#### 5.4. Αναφορές στην αποτελεσματική αντικαρκινική δράση του VSV in vivo

Η αντικαρκινική αποτελεσματικότητα του ιού VSV έχει καταδειχθεί σε μία ποικιλία in vivo πειραματικών μοντέλων, τόσο ξеноμοσχευμάτων ανθρώπινων καρκινικών σειρών όσο και ανοσοεπαρκών συγγενικών μοντέλων. Σε μία έρευνα της ομάδας του Stojdl (35), η χορήγηση του ιού VSV εντός υποδόριων όγκων μελανώματος σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια που δέχτηκαν τα αντίστοιχα ξеноμοσχεύματα μείωσε το ρυθμό αύξησης των όγκων σε στατιστικά σημαντικό βαθμό σε σχέση με ποντίκια που δεν έλαβαν τον ιό.

Ανάλογα, η ομάδα του Savio Woo έχει μελετήσει εκτεταμένα τη θεραπευτική χρήση του VSV για τη θεραπεία καρκίνου του παχέως εντέρου και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Σε ένα ανοσοεπαρκές συγγενικό μοντέλο της καρκινικής σειράς MCA26 παχέως εντέρου με ηπατικές

μεταστάσεις σε ποντίκια BALB/C, η χορήγηση μίας δόσης του ιού VSV σε μία από τις ηπατικές μεταστάσεις παρέτεινε την διάμεση επιβίωση των ποντικών σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (36). Σε ένα άλλο ανοσοεπαρκές μοντέλο καρκίνου του παχέως εντέρου με ηπατικές μεταστάσεις σε αρουραίους (chemically-induced rat colorectal carcinoma), η χορήγηση του VSV με έγχυση μέσω της ηπατικής αρτηρίας οδήγησε στην πρόσβαση του ιού σε πολλαπλές ηπατικές μεταστάσεις με στατιστικώς σημαντική παράταση της επιβίωσης, ενώ η μείωση του όγκου των μεταστάσεων ενισχύθηκε με την έγχυση πολλαπλών δόσεων του ιού (37, 38).

Με βάση τα παραπάνω, καθώς και πολλές άλλες μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι ο ιός VSV έχει υψηλή μολυσματικότητα και κυτταρολυτική ικανότητα σε μία ποικιλία καρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης και ισχυρή αντικαρκινική δράση σε πολλαπλά καρκινικά μοντέλα in vivo. Αν και η μολυσματικότητα του VSV στα καρκινικά κύτταρα in vitro είναι υψηλή, η επίτευξη θεραπείας in vivo προϋποθέτει τη χορήγηση πολλαπλών δόσεων του ιού, κάτι που υποδηλώνει την εγγενή παρουσία σημαντικών παρεμποδίων στη χορήγηση ή/και εξάπλωση του ιού εντός των καρκινικών όγκων. Πιθανά εμπόδια περιλαμβάνουν την ανάπτυξη ειδικής ανοσίας και απενεργοποιητικών (neutralizing) αντισωμάτων που παρεμποδίζουν την πρόσβαση των ιών από τη συστηματική κυκλοφορία του αίματος στον όγκο, την παρουσία ενός «πυκνού» καρκινικού μικροπεριβάλλοντος (tumor stroma) που παρεμποδίζει την ώσμωση των ιών εντός του όγκου, και την παρουσία ετερογενών καρκινικών πληθυσμών που διαθέτουν ενεργά «μονοπάτια» τύπου I ιντερφερονών συμβάλλοντας στην καταπολέμηση του ιού.

### **5.5. Χαρακτηριστικά του VSV που τον καθιστούν έναν ιδανικό ογκολυτικό ιό**

Ο ιός VSV παρουσιάζει 6 χαρακτηριστικά που τον καθιστούν ιδανικό φορέα ογκολυτικής θεραπείας. Καταρχήν, ο VSV δεν θεωρείται ανθρώπινο παθογόνο, με αποτέλεσμα τα πολύ χαμηλά ποσοστά προϋπάρχουσας ειδικής ανοσίας στον άνθρωπο. Η παρουσία προϋπάρχουσας ανοσίας θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό εμπόδιο για τη θεραπευτική χρήση του VSV λαμβάνοντας υπόψη ότι ο VSV προκαλεί ταχεία ανάπτυξη ειδικής ανοσίας με την παραγωγή απενεργοποιητικών αντισωμάτων και κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, ο κύκλος ζωής του ιού είναι πολύ σύντομος (περίπου 1-2 ώρες), κάτι που επιτρέπει την ταχεία προσβολή των καρκινικών κυττάρων πριν από την έναρξη ειδικής ανοσιακής αντίδρασης που απενεργοποιεί τον ιό.

Ένας ακόμα πολύ σημαντικός παράγοντας είναι η εγγενής επιλεκτικότητα του VSV για τα καρκινικά κύτταρα χωρίς την ανάγκη γενετικής τροποποίησης (σε αντίθεση με άλλους ιούς) και ο περιορισμός του πολλαπλασιασμού του στα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτή η επιλεκτικότητα βασίζεται στα ελαττωματικά «μονοπάτια» τύπου I ιντερφερονών που παρατηρείται σε μεγάλο ποσοστό των καρκινικών κυττάρων, τα οποία συνεπώς αδυνατούν να ελέγξουν τον πολλαπλασιασμό του ιού. Εκτός αυτού, ο VSV διαθέτει χαμηλή παθογονικότητα στον άνθρωπο, κάτι που αποδίδεται στην εξαιρετική ευασθησία του VSV στην αντική δράση των τύπου I ιντερφερονών που παράγονται από τα φυσιολογικά κύτταρα.

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του VSV είναι η μεγάλη χωρητική του ικανότητα, που σημαίνει ότι μπορεί να τροποποιηθεί γενετικά ώστε να μεταφέρει γονίδια που συμβάλλουν στην ενίσχυση της αντικαρκινικής αποτελεσματικότητας του ιού (π.χ. γονίδια αυτοκτονίας). Επιπρόσθετα, η έκφραση των γονιδίων του VSV μπορεί να φτάσει σε πολύ υψηλά επίπεδα, ενισχύοντας την αποτελεσματική έκφραση επιπρόσθετων γονιδίων. Τέλος, το γενετικό υλικό του VSV δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα των κυττάρων, περιορίζοντας τις πιθανότητες για γενετικές μεταλλάξεις και τροποποιήσεις που θα μπορούσαν να αποβούν καρκινογόνες.

## 6. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- 1.Kim J, Bhagwandin S, Labow DM. Malignant peritoneal mesothelioma: a review. *Ann Transl Med.* 2017 Jun;5(11):236.
- 2.Robinson BW, Lake RA. Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med.* 2005 Oct 13;353(15):1591-603.
- 3.Constantopoulos SH, Goudevenos JA, Saratzis NA, Langer AE, Selikoff IJ, Moutsopoulos HM. Metsovo Lung: pleural calcifications and restrictive lung function in North-Western Greece; environmental exposure to mineral fiber as etiology. *Environmental Research* , 1985; 38(2): 319-331
- 4.Constantopoulos SH, Malamou-Mitsi V, Goudevenos JA, Papathanasiou MP, Pavlidis NA, Papadimitriou CS. High incidence of malignant pleural mesothelioma in neighbouring villages of Northwest Greece. *Respiration*, 1987; 51: 266-271
- 5.Gogali A, Manda-Stachouli C, Ntzani EE, Matthaiou M, Konstantinidis AK, Zampira I, Koubanou C, Dalavanga Y, Stefanou D, Constantopoulos SH, Daskalopoulos G. Malignant mesothelioma in Metsovo, Greece, from domestic use of asbestos: 30 years later. *Eur Respir J.* 2012 Jan;39(1):217-9.
- 6.Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med.* 1960 Oct;17:260-71.
- 7.Roushdy-Hammady I, Siegel J, Emri S, Testa JR, Carbone M. Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the Cappadocian region of Turkey. *Lancet.* 2001 Feb 10;357(9254):444-5.
- 8.Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, Cox NJ, Dogan AU, Pass HI, Trusa S, Hesdorffer M, Nasu M, Powers A, Rivera Z, Comertpay S, Tanji M, Gaudino G, Yang H, Carbone M. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet.* 2011 Aug 28;43(10):1022-5.
- 9.Henderson DW, Reid G, Kao SC, van Zandwijk N, Klebe S. Challenges and controversies in the diagnosis of malignant mesothelioma: Part 2. Malignant mesothelioma subtypes, pleural synovial sarcoma, molecular and prognostic aspects of mesothelioma, BAP1, aquaporin-1 and microRNA.*J Clin Pathol.* 2013 Oct;66(10):854-61.
- 10.Musk AW, Olsen N, Alfonso H, Reid A, Mina R, Franklin P, Sleith J, Hammond N, Threlfall T, Shilkin KB, de Klerk NH. Predicting survival in malignant mesothelioma. *Eur Respir J.* 2011 Dec;38(6):1420-4.
- 11.van Meerbeeck JP, Scherpereel A, Surmont VF, Baas P. Malignant pleural mesothelioma: the standard of care and challenges for future management. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011 May;78(2):92-111.

12. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 2003 Jul 15;21(14):2636-44.
13. Santoro A, O'Brien ME, Stahel RA, Nackaerts K, Baas P, Karthaus M, Eberhardt W, Paz-Ares L, Sundstrom S, Liu Y, Ripoche V, Blatter J, Visseren-Grul CM, Manegold C. Pemetrexed plus cisplatin or pemetrexed plus carboplatin for chemo-naïve patients with malignant pleural mesothelioma: results of the International Expanded Access Program. *J Thorac Oncol.* 2008 Jul;3(7):756-63.
14. Tsavaris N, Primikiriou N, Mylonakis N, Varouchakis G, Dosios T, Pavlidis N, Skarlos D, Tasopoulos T, Dritsas J, Kosmidis P. Combination chemotherapy with cisplatin and/or doxorubicin in malignant mesothelioma. A retrospective study. *Anticancer Res.* 1997 Sep-Oct;17(5B):3799-802.
15. Tsavaris N, Mylonakis N, Karvounis N, Bacoyiannis C, Briasoulis E, Skarlos D, Pavlidis N, Stamatelos G, Kosmidis P. Combination chemotherapy with cisplatin-vinblastine in malignant mesothelioma. *Lung Cancer.* 1994 Sep;11(3-4):299-303.
16. Ceresoli GL, Zucali PA, Gianoncelli L, Lorenzi E, Santoro A. Second-line treatment for malignant pleural mesothelioma. *Cancer Treat Rev.* 2010 Feb;36(1):24-32.
17. Weder W, Stahel RA, Bernhard J, Bodis S, Vogt P, Ballabeni P, Lardinois D, Betticher D, Schmid R, Stupp R, Ris HB, Jermann M, Mingrone W, Roth AD, Spiliopoulos A; Swiss Group for Clinical Cancer Research. Multicenter trial of neo-adjuvant chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy in malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol.* 2007 Jul;18(7):1196-202.
18. Krug LM, Pass HI, Rusch VW, Kindler HL, Sugarbaker DJ, Rosenzweig KE, Flores R, Friedberg JS, Pisters K, Monberg M, Obasaju CK, Vogelzang NJ. Multicenter phase II trial of neoadjuvant pemetrexed plus cisplatin followed by extrapleural pneumonectomy and radiation for malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol.* 2009 Jun 20;27(18):3007-13.
19. Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science.* 1995 Oct 20;270(5235):404-10.
20. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science.* 1993 May 14;260(5110):926-32.
21. Ferrua F, Aiuti A. Twenty-five years of gene therapy for ADA-SCID: from "bubble babies" to an approved drug. *Hum Gene Ther.* 2017 Aug 28.
22. Dalakas MC. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: balancing good science, marginal efficacy, high emotions and excessive cost. *Ther Adv Neurol Disord.* 2017 Aug;10(8):293-296.

23. Ramos J, Chamberlain JS. Gene Therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2015;3(11):1255-1266.
24. Vachani A, Moon E, Wakeam E, Albelda SM. Gene therapy for mesothelioma and lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Apr;42(4):385-93.
25. Hwang HC, Smythe WR, Elshami AA, Kucharczuk JC, Amin KM, Williams JP, Litzky LA, Kaiser LR, Albelda SM. Gene therapy using adenovirus carrying the herpes simplex-thymidine kinase gene to treat in vivo models of human malignant mesothelioma and lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Jul;13(1):7-16.
26. Serman DH, Treat J, Litzky LA, Amin KM, Coonrod L, Molnar-Kimber K, Recio A, Knox L, Wilson JM, Albelda SM, et al. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum Gene Ther* 1998;9:1083-1092.
27. Serman DH, Recio A, Vachani A, Sun J, Cheung L, DeLong P, Amin KM, Litzky LA, Wilson JM, Kaiser LR, et al. Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:7444-7453.
28. Mukherjee S, Haenel T, Himbeck R, Scott B, Ramshaw I, Lake RA, Harnett G, Phillips P, Morey S, Smith D, Davidson JA, Musk AW, Robinson B. Replication-restricted vaccinia as a cytokine gene therapy vector in cancer: persistent transgene expression despite antibody generation. *Cancer Gene Ther*. 2000 May;7(5):663-70.
29. Odaka M, Serman DH, Wiewrodt R, Zhang Y, Kiefer M, Amin KM, Gao GP, Wilson JM, Barsoum J, Kaiser LR, et al. Eradication of intraperitoneal and distant tumor by adenovirus-mediated interferon beta gene therapy is attributable to induction of systemic immunity. *Cancer Res* 2001;61:6201-6212.
30. Serman DH, Recio A, Carroll RG, Gillespie CT, Haas A, Vachani A, Kapoor V, Sun J, Hodinka R, Brown JL, et al. A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses. *Clin Cancer Res* 2007;13:4456-4466.
31. Serman DH, Recio A, Haas AR, Vachani A, Katz SI, Gillespie CT, Cheng G, Sun J, Moon E, Pereira L, Wang X, Heitjan DF, Litzky L, June CH, Vonderheide RH, Carroll RG, Albelda SM. A Phase I Trial of Repeated Intrapleural Adenoviral-mediated Interferon- $\beta$  Gene Transfer for Mesothelioma and Metastatic Pleural Effusions. *Mol Ther*. 2010 Apr;18(4):852-860.
32. Lambright ES, Force SD, Lanuti ME, Wasfi DS, Amin KM, Albelda SM, Kaiser LR. Efficacy of repeated adenoviral suicide gene therapy in a localized murine tumor model. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1865–1870; discussion 1870-1861.

- 33.Sterman DH, Haas A, Moon E, Recio A, Schwed D, Vachani A, Katz SI, Gillespie CT, Cheng G, Sun J, Papasavvas E, Montaner LJ, Heitjan DF, Litzky L, Friedberg J, Culligan M, June CH, Carroll RG, Albelda SM. A trial of intrapleural adenoviral-mediated Interferon- $\alpha$ 2b gene transfer for malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Dec 15;184(12):1395-9.
- 34.Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N, Bell JC. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med*. 2000 Jul;6(7):821-5.
- 35.Stojdl DF, Lichty BD, tenOever BR, Paterson JM, Power AT, Knowles S, Marius R, Reynard J, Poliquin L, Atkins H, Brown EG, Durbin RK, Durbin JE, Hiscott J, Bell JC. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*. 2003 Oct;4(4):263-75.
- 36.Huang TG, Ebert O, Shinozaki K, García-Sastre A, Woo SL. Oncolysis of hepatic metastasis of colorectal cancer by recombinant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Mol Ther*. 2003 Sep;8(3):434-40.
- 37.Shinozaki K, Ebert O, Kournioti C, Tai YS, Woo SL. Oncolysis of multifocal hepatocellular carcinoma in the rat liver by hepatic artery infusion of vesicular stomatitis virus. *Mol Ther*. 2004 Mar;9(3):368-76.
- 38.Shinozaki K, Ebert O, Woo SL. Eradication of advanced hepatocellular carcinoma in rats via repeated hepatic arterial infusions of recombinant VSV. *Hepatology*. 2005 Jan;41(1):196-203.



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **1.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών με τον μη πολλαπλασιαζόμενο αδενοϊό Ad.IFN-β σε ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα ήταν εμπνευστικά και ο μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης του αποδόθηκε στην έκλυση ειδικής ανοσιακής αντίδρασης μέσω CD8+ T-λεμφοκυττάρων και αντισωμάτων έναντι των κακόηθων μεσοθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, η αντικαρκινική δράση παρατηρήθηκε μόνο σε όγκους μικρού μεγέθους και η έκφραση του γονιδίου της IFN-β ήταν χαμηλή και παροδική.

Με την υποσχόμενη προοπτική των ογκολυτικών ιών ως καινοτόμου θεραπευτικής στρατηγικής για τη θεραπεία του καρκίνου, η ομάδα του Steven Albelda ξεκίνησε ερευνητικές μελέτες για την αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης του ανασυνδυασμένου, πολλαπλασιαζόμενου ογκολυτικού ιού θυλακιώδους στοματίτιδας που εκφράζει το γονίδιο IFN-β για το μεσοθηλίωμα, με στόχο να βελτιώσει τα παραπάνω κλινικά αποτελέσματα. Η μελέτη που παρουσιάζεται σε αυτήν τη διατριβή είχε ως στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας του ογκολυτικού ιού VSV.IFN-β για λύση καρκινικών κυττάρων μεσοθηλιώματος και της καταλληλότητάς του για κλινική μετάφραση.

## **2. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ-β ΕΝΙΣΧΥΕΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΟΥ ΟΓΚΟΛΥΤΙΚΟΥ ΙΟΥ ΘΥΛΑΚΙΩΔΟΥΣ ΣΤΟΜΑΤΙΤΙΔΑΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΣΟΘΗΛΙΩΜΑΤΟΣ**

### **2.1. Εισαγωγή**

Το κακόηθες μεσοθηλίωμα είναι ένας επιθετικός καρκίνος της πλευριτικής ή περιτοναϊκής κοιλότητας που σχετίζεται με την έκθεση σε ίνες αμιάντου (1). Λόγω της έλλειψης αποτελεσματικής θεραπείας, λίγοι ασθενείς επιβιώνουν περισσότερο από 2 χρόνια από τη στιγμή της διάγνωσης (1), γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη ανεύρεσης καινούργιων αποτελεσματικών θεραπειών. Με αυτό το σκοπό αναπτύσσονται ογκολυτικοί ιοί που μπορούν να πολλαπλασιάζονται επιλεκτικά εντός των καρκινικών κυττάρων χωρίς να προσβάλλουν τα φυσιολογικά κύτταρα. Θεωρητικά η χρήση ογκολυτικών ιών με την ικανότητα πολλαπλασιασμού (replication-competent) απαιτεί χορήγηση μικρότερου ιικού φορτίου σε έναν όγκο για την εξασφάλιση προσβολής κατά το δυνατόν όλων των καρκινικών κυττάρων εντός του όγκου (2, 3). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο ιός θυλακιώδους στοματίτιδας (VSV) που πολλαπλασιάζεται εντός του κυτταροπλάσματος και είναι εξαιρετικά λυτικός, παρουσιάζει αποτελεσματικότητα σε διάφορα προκλινικά μοντέλα όγκων (4, 5). Ο ιός VSV προτάθηκε αρχικά ως πιθανός ογκολυτικός παράγοντας διότι η λοίμωξη φυσιολογικών κυττάρων από το VSV προκαλεί την παραγωγή τύπου I IFN (IFN $\alpha$ / $\beta$ ) που παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό του ιού και συνεπώς καταπολεμούν την εξάπλωση της ιικής προσβολής στα φυσιολογικά

κύτταρα. Αντιθέτως, πολλά καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν ελλειμματική ικανότητα αντικής «απάντησης» με την παραγωγή IFN τύπου I (6-8), κατί που επιτρέπει τον ανεμπόδιο πολλαπλασιασμό του ιού και την επακόλουθη ογκόλυσή τους (9-11). Ο VSV είναι ένας ισχυρός ογκολυτικός ιός και είναι δραστικός σε μία ποικιλία τόσο όγκων του ανθρώπου όσο και όγκων ποντικών. (5, 9-17). Επιπλέον έχουμε δείξει σε προηγούμενες μελέτες ότι η αντικαρκινική δράση του VSV σε ανοσοεπαρκή ποντίκια δε βασίζεται μόνο σε άμεσο πολλαπλασιασμό του ιού και στην επακόλουθη λύση των καρκινικών κυττάρων, αλλά επιπλέον εξαρτάται και από τη δράση των CD8 και NK (natural killer) T-λεμφοκυττάρων (4).

Η εύκολη πρόσβαση των όγκων μεσοθηλιώματος καθιστά αυτόν τον όγκο ιδανικό στόχο για την εφαρμογή ογκολυτικής ιοθεραπείας, καθώς ο ιός μπορεί να χορηγηθεί τοπικά (18) (συστηματική χορήγηση ογκολυτικών ιών προκαλεί την παραγωγή ουδετεροποιητικών αντισωμάτων που μειώνουν την ογκολυτική τους δράση). Η χρήση ενός ογκολυτικού ιού στη θεραπεία του μεσοθηλιώματος αποτελεί προέκταση προηγούμενων προκλινικών μελετών μας σε ποντίκια, στις οποίες χορήγηση του γονιδίου της IFN-β εντός όγκων μεσοθηλιώματος με τη χρήση ενός μη πολλαπλασιαζόμενου αδενοϊού (non-replicative vector) απέφερε σημαντικά θεραπευτικά αποτελέσματα (19, 20). Η έκφραση του γονιδίου της IFN-β επέφερε αναστολή της ανάπτυξης καθώς και θεραπεία των όγκων, που αποδόθηκε στην πολλαπλή αντικαρκινική δράση της IFN-β, συμπεριλαμβανομένης της ενίσχυσης της έμμεσης ανοσιακής αντίδρασης, της αναστολής πολλαπλασιασμού των κυττάρων (21) και της «ωρίμανσης» των T-κυτταρικών ανοσιακών αντιδράσεων (19, 22, 23). Αντίστοιχες κλινικές μελέτες μας έχουν επιφέρει ανάλογα αισιόδοξα αποτελέσματα (24).

Τα παραπάνω δεδομένα (19, 20, 24, 25) υποστηρίζουν ότι η ενσωμάτωση και έκφραση του γονιδίου της IFN-β από τον ιό VSV (21) θα ενισχύσει περαιτέρω την αντικαρκινική ανοσοθεραπευτική δράση του. Επιπλέον, η ενσωμάτωση του γονιδίου της IFN-β στον ιό VSV αναμένεται να ενισχύσει το προφίλ ασφάλειας αυτού του ιού, σε περίπτωση ιικής προσβολής φυσιολογικών κυττάρων (21). Συνεπώς, δεδομένου ότι τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν πλήρως λειτουργικές απαντήσεις στην IFN-α/β (σε αντίθεση με τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα), που καταστέλλουν πλήρως τον πολλαπλασιασμό του ιού VSV τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, υποθέσαμε ότι η αύξηση της έκφρασης της IFN-β με την ενσωμάτωση του αντίστοιχου γονιδιού στον ιό VSV αναμένεται να περιορίσει την πιθανή τοξικότητα του VSV-IFN-β χωρίς να επηρεάσει σημαντικά την αντικαρκινική του δράση. Αυτό είναι σημαντικό δεδομένου ότι σε ορισμένα προκλινικά μοντέλα ποντικών, η χορήγηση του VSV σε υψηλές δόσεις οδήγησε σε θανατηφόρο νευροτοξικότητα (ιδιαίτερα σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια, 10, 21).

Σε αυτήν τη μελέτη, εξετάσαμε την IFN-β ως θεραπευτικό γονίδιο εκφραζόμενο από τον ιό VSV ως καινούργια θεραπεία για όγκους μεσοθηλιώματος, υποθέτοντας ότι ο ιός φορέας VSV-IFN-β θα ενισχύσει την ανοσοθεραπευτική αποτελεσματικότητα, την αυξήσει εξάπλωση του ιού από κύτταρο σε κύτταρο και θα βελτιώσει το προφίλ ασφαλείας του VSV. Με τα παρακάτω πειράματα αποδείξαμε ότι ο VSV-IFN-β προκαλεί αποτελεσματική λύση της καρκινικής κυτταρικής σειράς AB12 ποντικών καθώς και ότι η έκφραση της IFN-β δεν επηρεάζει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό του ιού. Τοπική χορήγηση του ιού VSV-IFN-β προκάλεσε την πλήρη υποχώρηση των όγκων μεσοθηλιώματος σε προκλινικά μοντέλα ποντικών, παρατήρηση που αποδίδεται τουλάχιστον εν-μέρει σε ενεργοποίηση CD8 T-κυττάρων μέσω του ιού VSV. Επιπλέον επιβεβαιώσαμε ότι η έκφραση IFN-β καθιστά τον ιό VSV πιο ασφαλή και προστάτευσε ανοσοανεπαρκή ποντίκια (SCID) από θανατηφόρο νευροτοξικότητα. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την χρήση του VSV-IFN-β ως νέας θεραπευτικής προσέγγισης σε ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα.

## 2.2. Υλικά και Μέθοδοι

**Κυτταρικές σειρές.** Αγοράστηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά MSTO-21 1H από το American Tissue Type Collection. Ο Dr. Bruce Robinson (University of Western Australia, Perth, Australia) παρείχε την κυτταρική σειρά ποντικών AB12. Τα κύτταρα B16ονα, μία κυτταρική σειρά μελανώματος ποντικών, προέκυψε από τη μεταγωγή της αντίστοιχης κυτταρικής σειράς με cDNA που κωδικοποιεί το γονίδιο chicken ovalbumin.

**Ιικά strains.** Τα ιικά strains VSV.mIFN-β και VSV.hINF-β περιγράφηκαν αρχικά από τον Obuchi et al. (2003). Το strain VSV.GFP παρήχθηκε όπως έχει περιγραφεί από τους Diaz RM et al (2007). Τα ιικά strains παρασκευάστηκαν στο Core Viral Facility της Mayo Clinic (Rochester, MN).

**MTT μέθοδος.** Η μέθοδος MTT εφαρμόστηκε με τα ιικά strains VSV.mIFN-β και VSV.GFP. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν και καλλιεργήθηκαν εις τετραπλούν σ πλακίδια με 96 υποδοχείς (96-well) και μολύνθηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις ικών διαλυμάτων (multiplicities of infection MOIs). Η βιωσιμότητα των προσβεβλημένων κυττάρων αξιολογήθηκε σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή της μεθόδου (Promega).

**Ανάλυση ELISPOT για την έκκριση της IFN-γ.** Ο σπλήνας ή οι λεμφαδένες που παροχέτευαν αντίστοιχους όγκους ελήφθησαν από ποντίκια σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία. Για την εφαρμογή της μεθόδου ELISPOT, 10.000 κύτταρα τοποθετήθηκαν εις τριπλούν σε πλακίδια με 96 υποδοχείς και εκτέθηκαν σε πεπτίδια για 48 ώρες στους 37°C (όλα τα πεπτίδια σε συγκέντρωση 5μg/ml). Κηλύδες θετικές για IFN-γ που προκλήθηκαν από τα πεπτίδια αξιολογήθηκαν κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή της μεθόδου (Mabtech, Inc.) και μετρήθηκαν με τη βοήθεια απεικονιστικού software. Τα ακόλουθα πεπτίδια κατασκευάστηκαν στο Mayo Clinic Core Facility: EGSRNQDWL, gp100 ποντικού, SIINFEKL, chicken OVA, TRP-2 ποντικού, RGYVYQGL, VSV-N.

**Πειράματα με ποντίκια (in vivo studies).** Όλα τα πειράματα εγκρίθηκαν από το Mayo Foundation ή την Επιτροπή Χρήσης Ζώων του University of Pennsylvania με βάση τον Οδηγό για τη Φροντίδα και Χρήση Εργαστηριακών Ζώων. Για την ανάπτυξη υποδόριων όγκων, έγιναν υποδόριες ενέσεις με  $5 \times 10^5$  B16ονα κύτταρα,  $1 \times 10^6$  AB12 κύτταρα ή  $1 \times 10^6$  MSTO-211H κύτταρα σε 100μL PBS στη γλουτιαία χώρα ποντικών C57Bl/6, BALB/c ή σε ποντίκια με Σοβαρή Συνδυασμένη Ανοσοανεπάρκεια (SCID), αντιστοίχως. Όταν οι όγκοι έφτασαν το μέγεθος των 200mm<sup>3</sup>, πραγματοποιήθηκαν ενέσεις εντός των όγκων με μέσο ελέγχου ή με  $5 \times 10^8$  pfu ικού strain C57Bl/6) ή  $6.6 \times 10^8$  pfu σε 100μL κάθε ικού strain (VSV.mIFN-β ή VSV.hINF-β) μία φορά την εβδομάδα για δύο (C57Bl/6, SCID) ή τρεις (BALB/c) συνεχόμενες εβδομάδες. Το μέγεθος των όγκων μετριοταν δύο φορές την εβδομάδα και τα ποντίκια υπόκεινταν σε ευθανασία εάν παρουσιαζόταν τοξικότητα ή το μέγεθος του όγκου ξεπερνούσε τα 1500mm<sup>3</sup>. Για ενδοπεριτοναϊκούς όγκους, έγιναν ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις με  $3.5 \times 10^5$  κύτταρα. Την τέταρτη μέρα, η ανάπτυξη ενδοπεριτοναϊκών όγκων επιβεβαιωνόταν και γίνονταν ενέσεις με μέσο ελέγχου ή με  $6.6 \times 10^8$  pfu ικού strain σε 100μL μέσου (VSV.mIFN-β ή VSV.hINF-β)

**Εξάλειψη CD8+ T-κυττάρων σε ποντίκια.** BALB/c ποντίκια έλαβαν ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις 200μg αντι-CD8 μονοκλωνικού αντισώματος που παράχθηκε από anti-CD8 υβρίδωμα 53.6.7 (American Type Culture Collection). Οι ενέσεις χορηγήθηκαν 3 ημέρες και 1 ημέρα πριν από την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση AB12 κυττάρων. Ακολούθως, δόσεις διατήρησης του αντισώματος χορηγούνταν ενδοπεριτοναϊκά κάθε 7 ημέρες κατά τη διάρκεια όλου του πειράματος για τη διατήρηση της εξάλειψης της λειτουργίας των CD8 T-κυττάρων. Η εξάλειψη CD8+ T-κυττάρων επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής σπληνικών κυτταρικών διαλυμάτων την ημέρα της έγχυσης AB12 κυττάρων καθώς και εβδομαδιαία. Την ημέρα 11 και 18 του πειράματος, τα ποντίκια έλαβαν  $6.6 \times 10^8$  pfu VSV.mIFN- $\beta$  ή μέσο ελέγχου (PBS). Το μέγεθος των όγκων μετριόταν δύο φορές την εβδομάδα και τα ποντίκια υπόκεινταν σε ευθανασία εάν παρουσιαζόταν τοξικότητα ή το μέγεθος του όγκου ξεπερνούσε τα 1500mm<sup>3</sup>.

**Κυτταρομετρία ροής και ενδοκυτταρική μέθοδος staining για IFN- $\gamma$ .** Για την ανάλυση του φαινότυπου των κυττάρων,  $1 \times 10^6$  κύτταρα «πλύθηκαν» με PBS και 0.1% bone serum albumin (wash buffer), επαναδιαλύθηκαν σε κυτταρικό διάλυμα 50μL του wash buffer, και εκτέθηκαν σε συζευγμένα αντισώματα για 30 λεπτά στους 4οC. Το OVA-iTag0H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL-PE συζευγμένο τετραμερές χρησιμοποιήθηκε κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή (Beckman Coulter). Τα κύτταρα «πλύθηκαν» και επαναδιαλύθηκαν σε 500μL PBS με 4% φορμαλδεΐδης, αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το FlowJo software. Για το ενδοκυτταρικό staining, κυτταρικά διαλύματα (single-cell) προετοιμάστηκαν από όγκους που ελήφθησαν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές (3 ποντίκια ανά ομάδα). Η παραγωγή IFN- $\gamma$  μετά από έκθεση σε πεπτίδια (5μg/ml) μετρήθηκε με την παρουσία Golgi Plug για 4 ώρες. Τα κύτταρα υπέστησαν staining, σταθεροποίηση (fixation) και διάτρηση για ενδοκυτταρικό staining χρησιμοποιώντας το Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή.

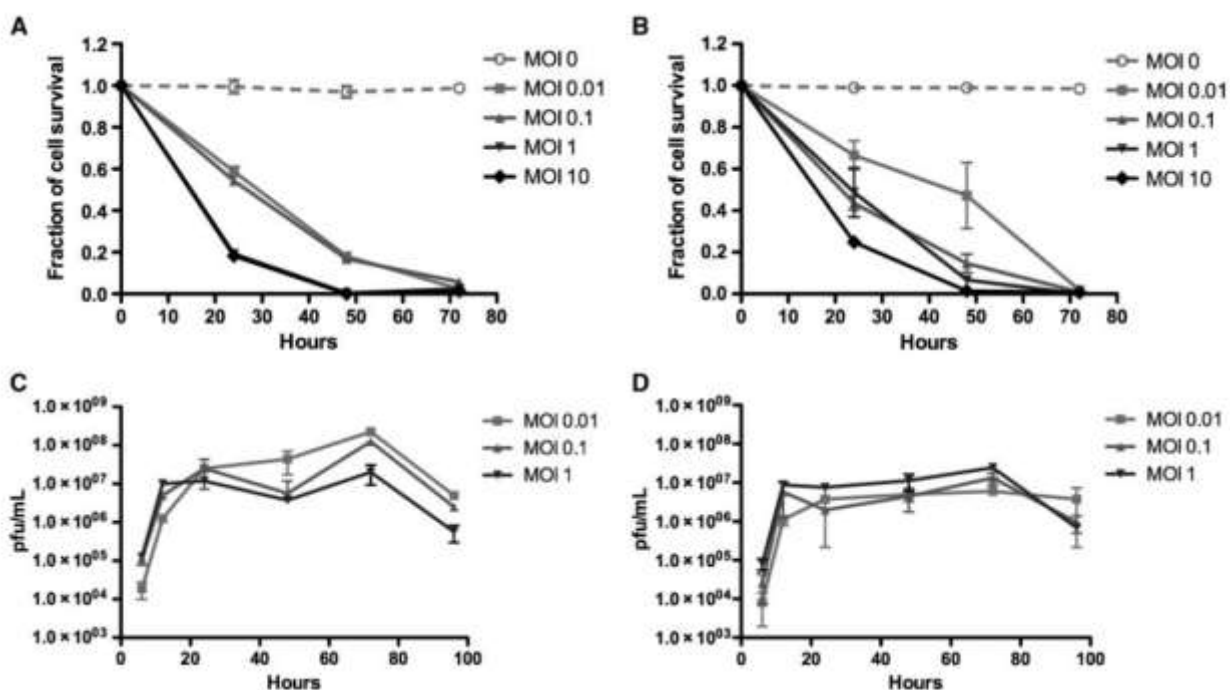
**Στατιστική ανάλυση.** Για τη σύγκριση διαφορών μεταξύ δύο ομάδων χρησιμοποιήσαμε unpaired student t-tests. Για συγκρίσεις περισσότερων από τριών ομάδων, χρησιμοποιήσαμε analysis of variance with post hoc testing. Οι καμπύλες επιβίωσης σχεδιάστηκαν με βάση τη μέθοδο Kaplan-Meier, και οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το log-rank test.

## 2.3. Αποτελέσματα

### *O VSV-mIFN- $\beta$ είναι ισχυρά κυτταροτοξικός έναντι κυττάρων μεσοθηλιώματος in vitro*

Τόσο ο VSV (**Εικ. 1A**) όσο και ο VSV-m-IFN- $\beta$  (**Εικ. 1B**) προκάλεσαν ταχύ και εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο λόγω συνεχούς πολλαπλασιασμού του ιού στα κύτταρα AB12 σε συγκεντρώσεις ικού φορτίου που κυμαίνονταν από MOI 0.01 έως 10 (**Εικ. 1C και D**). Παρατηρήσαμε μία μέτρια αλλά σημαντική μείωση της ταχύτητας πολλαπλασιασμού του VSV-m-IFN- $\beta$  σε σύγκριση με τον VSV στη μικρότερη MOI συγκέντρωση ικού φορτίου (**Εικ. 1C και D**), που αντίστοιχα αντικατοπτρίστηκε σε ένα σχετικά μικρότερο βαθμό κυτταρικού θανάτου (**Εικ 1A και B**), υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα AB12 μπορεί να διατηρούν ένα μικρό βαθμό ενεργότητας του αντικού «μονοπατιού» της IFN- $\beta$  που κατ'επέκταση μπορεί να αναστέλλει σε μικρό βαθμό και τον πολλαπλασιασμό του VSV σε αυτά τα κύτταρα. Ωστόσο, στις

72 ώρες μετά την ιική προσβολή, περισσότερο από 99% των κυττάρων AB12 είχαν υποστεί κυτταρικό θάνατο και από τα δύο ιικά strains (**Εικ 1A και B**).



**Εικόνα 1.** Ο VSV-m-IFN-β είναι ισχυρά κυτταροτοξικός για τα κύτταρα μεσοθηλιώματος in vitro. Κύτταρα AB12 τοποθετήθηκαν και καλλιιεργήθηκαν σε πλακίδια 96 υποδοχείων και εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις MOIs είτε με (A) VSV ή με (B) VSV-mIFN-β. Σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία, εφαρμόστηκε η μέθοδος MTT κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν ως κλάσματα μονάδας σε σχέση με την επιβίωση των κυττάρων ελέγχου με σταθερά απόκλιση. Κύτταρα AB12 εκτέθηκαν στον ιό VSV (C) ή στον VSV-mIFN-β (D) για 1 ώρα στους 37 οC σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ιικού φορτίου MOIs. Μετά από εκκόλαψη, τα κύτταρα «πλύθηκαν», και στα συγκεκριμένα χρονικά σημεία, ελήφθησαν δείγματα για τη μέτρηση του ιικού φορτίου με τη μέθοδο πλακών.

### ***O VSV-mIFN-β έχει αντικαρκινική δράση έναντι όγκων μεσοθηλιώματος***

Σε αντιστοιχία με τα in vitro αποτελέσματα της **Εικ. 1**, άμεση χορήγηση (ένεση) του VSV-m-IFN-β εντός υποδόριων όγκων AB12 σε ανοσοεπαρκή ποντίκια προκάλεσε σημαντική αντικαρκινική δράση έναντι των AB12 όγκων σε σχέση με τους όγκους ελέγχου ( $P < 0.01$  την ημέρα 32 ; **Εικ. 2A**). Αυτή η μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης των όγκων μεταφράστηκε σε σημαντική αύξηση της επιβίωσης των ποντικών που έλαβαν ενέσεις VSV-m-IFN-β, ενώ τέσσερα από τα οχτώ ποντίκια θεραπεύτηκαν τελείως από τους όγκους τους (**Εικ. 2A**), σε σύγκριση με κανένα από τα οχτώ ποντίκια της ομάδας ελέγχου. Επιπλέον, αργότερα, όλα τα ποντίκια που επεβίωσαν για μεγάλο χρονικό διάστημα απέρριψαν μία δοκιμασία υποδόριας εγκατάστασης ζωντανών κυττάρων AB12. Υποθέτουμε ότι η αντικαρκινική ανοσιακή αντίδραση που παρατηρήθηκε στην **Εικ. 2A** είναι συγκεκριμένη έναντι των κυττάρων AB12, αν και δεν είχαμε επαρκή αριθμό ποντικών που επεβίωσαν για μεγάλο χρονικό διάστημα για να τα εκθέσουμε σε μία διαφορετική σειρά καρκινικών κυττάρων.

Ο VSV-m-IFN-β ήταν επίσης αποτελεσματικός στη θεραπεία ενδοπεριτοναϊκών όγκων AB12 με τοπική ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του ιού (**Εικ. 2A**). Σε αντίθεση όμως με το μοντέλο

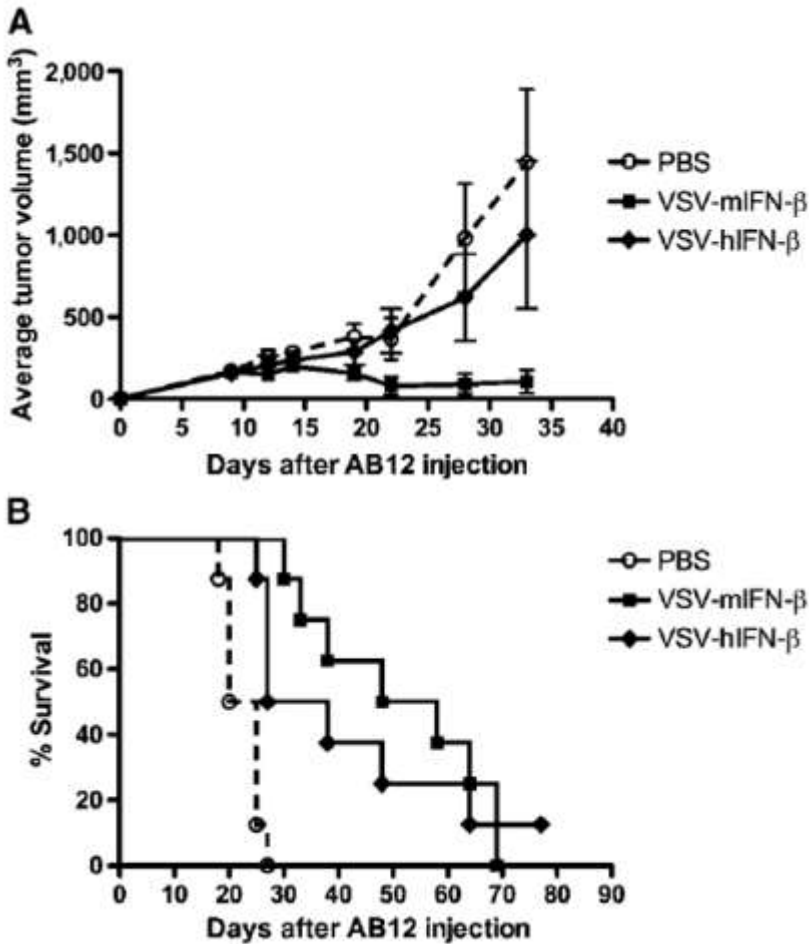
υποδορίων όγκων, δεν επιτεύχθηκε πλήρης θεραπεία και μακρά επιβίωση των ποντικών. Ωστόσο, η επιβίωση των ποντικών που έλαβαν το strain VSV-m-IFN-β (μέση επιβίωση 54 ημέρες) αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου (μέση επιβίωση, 26 ημέρες ;  $P < 0.01$ ).

Συνολικά αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο VSV-m-IFN-β είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας έναντι όγκων μεσοθηλιώματος AB12 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* με υποδόρια και ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση.

### ***Η αποτελεσματικότητα της *in vivo* θεραπείας εξαρτάται από την βιολογική δραστηριότητα της IFN-β***

Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες που έγιναν με τη χρήση ενός μη πολλαπλασιαζόμενου αδενοϊού που εξέφραζε την IFN-β (19, 20, 24, 25), η υπόθεσή μας ήταν ότι η προσθήκη του γονιδίου της IFN-β στον πολλαπλασιαζόμενο ιό VSV θα ενίσχυε ακόμα περισσότερο την ανοσοδιεγερτική επίδραση της κυτταρικής λύσης καρκινικών κυττάρων μέσω του ιού. Για να εξετάσουμε αυτήν την υπόθεση, κατασκευάσαμε ένα ιικό strain VSV που εκφράζει την ανθρώπινη IFN-β, η οποία είναι ανενεργή σε ποντίκια. Συνεπώς, με αυτό το σκεπτικό, η δράση του VSV-m-IFN-β και του VSV-h-IFN-β σε ανοσοεπαρκή ποντίκια παρέχει μία σωστή σύγκριση της αντικαρκινικής δράσης που διαμεσολαβείται μέσω της διέγερσης ανοσιακής αντίδρασης από το ιικό strain και αυτής που διαμεσολαβείται μέσω της λυτικής δράσης του. Επιβεβαιώσαμε ότι τα ιικά strain VSV-m-IFN-β και VSV-h-IFN-β έχουν παρόμοια προφίλ πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας έναντι των κυττάρων AB12 *in vitro* (δεδομένα που δε δείχνονται). Όπως δείξαμε προηγουμένως, η άμεση χορήγηση του VSV-m-IFN-β εντός υποδορίων όγκων AB12 επέφερε σημαντική αντικαρκινική δράση σε σύγκριση με τους όγκους ελέγχου που έλαβαν PBS (**Εικ. 2A**;  $P < 0.01$ ). Αντιθέτως, η χορήγηση του VSV-h-IFN-β εντός των όγκων δεν επέφερε στατιστικά σημαντικό θεραπευτικό αποτέλεσμα σε σύγκριση με τη χορήγηση PBS (**Εικ. 2A**;  $P = 0.27$ ), κάτι που υποδηλώνει ότι ένα σημαντικό μέρος της αντικαρκινικής δράσης του VSV-IFN-β *in vivo* διαμεσολαβείται μέσω της ανοσιακής δράσης της τοπικής έκφρασης της IFN-β και λιγότερο μέσω της ογκολυτικής δράσης του ιού.

Επίσης παρατηρήσαμε μια τάση μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας του VSV-m-IFN-β σε σχέση με τον VSV-h-IFN-β στο ενδοπεριτοναϊκό μοντέλο χορήγησης του ιού, αν και αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $P = 0.54$ ; **Εικ. 2B**). Ωστόσο, τόσο ο VSV-h-IFN-β όσο και ο VSV-m-IFN-β ήταν οπωσδήποτε πιο αποτελεσματικοί στη θεραπεία σε σύγκριση με τη χορήγηση PBS ( $P < 0.01$  και  $P < 0.0001$ , αντιστοίχως).



**Εικόνα 2.** Η in vivo θεραπεία εξαρτάται από τη βιολογική δραστηριότητα της IFN-β. Ομάδες (n=8) ποντικών BALB/C με υποδόριους (A) ή ενδοπεριτοναϊκούς όγκους (B) AB12 έλαβαν ορό, VSV-m-IFN-β ή VSV-h-IFN-β σε δόση  $6.6 \times 10^8$  rfu, μία φορά την εβδομάδα για 3 εβδομάδες. Η χορήγηση VSV-m-IFN-β οδήγησε σε σημαντική υποχώρηση των υποδόριων όγκων ( $P < 0.01$ ) σε σύγκριση με το group ελέγχου, ενώ ο VSV-h-IFN-β δεν επέφερε σημαντική θεραπευτική δράση. Ωστόσο, τόσο ο VSV-m-IFN-β όσο και ο VSV-h-IFN-β αύξησαν σημαντικά την επιβίωση στο ενδοπεριτοναϊκό μοντέλο σε σύγκριση με το group ελέγχου ( $P < 0.0001$  και  $P < 0.01$ , αντιστοίχως).

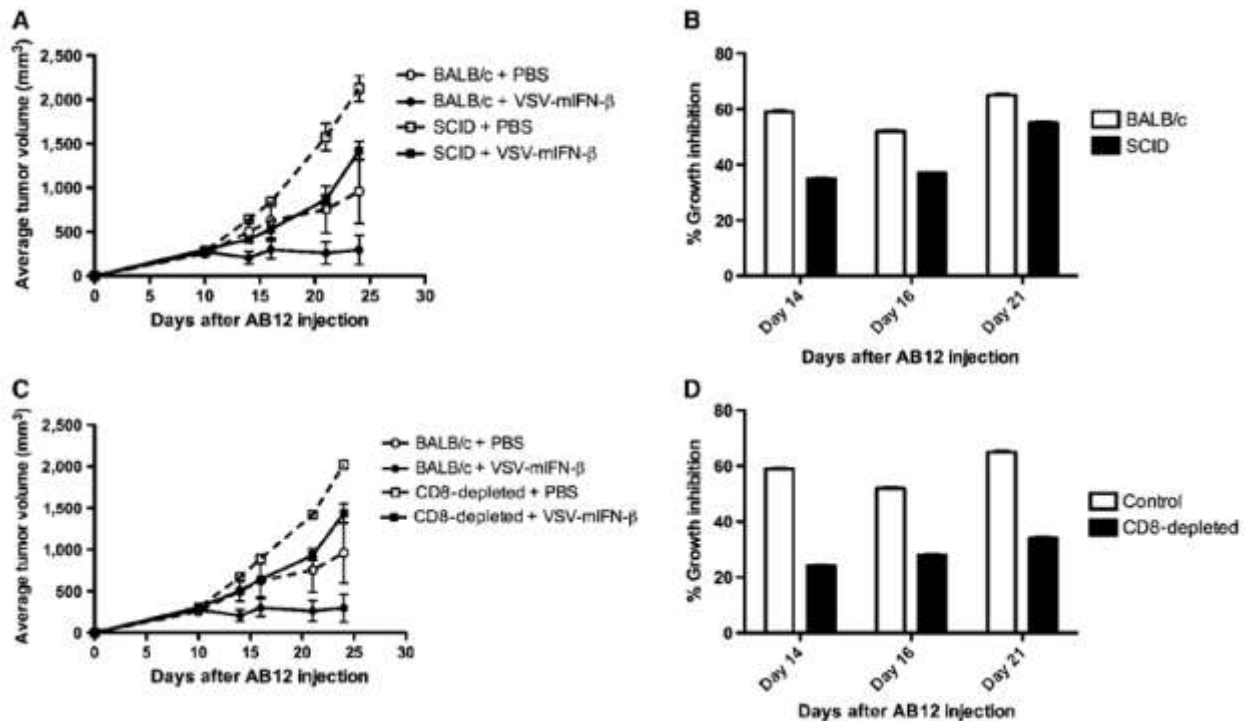
### **Η έκφραση της IFN-β μέσω του VSV ενισχύει την αντικαρκινική δράση του μέσω της διέγερσης CD8 T-κυττάρων**

Για να διευκρινίσουμε περαιτέρω τους ανοσολογικούς μηχανισμούς με τους οποίους η IFN-β ενισχύει τη θεραπεία που επιφέρει η τοπική χορήγηση του VSV εντός των όγκων, τα πειράματα της Εικ. 2 επαναλήφθηκαν σε ποντίκια SCID. Η χορήγηση VSV-IFN-β εντός των όγκων μείωσε σημαντικά το ρυθμό ανάπτυξης των όγκων σε ποντίκια SCID σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου ( $P < 0.001$ , **Εικ. 3A**). Ωστόσο, οι όγκοι AB12 αναπτύσσονται με ταχύτερο ρυθμό σε ποντίκια SCID σε σύγκριση με ανοσοεπαρκή ποντίκια BALB/c. Ετσι, μετρώντας το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης των όγκων μεταξύ των ποντικών ελέγχου και των ποντικών που έλαβαν VSV-IFN-β, παρατηρήσαμε ότι υπάρχει σημαντική διαφορά στην αποτελεσματικότητα του VSV-IFN-β μεταξύ ανοσοεπαρκών και ανοσοκατασταλμένων ποντικών ( $P < 0.0001$  για όλες τις ημέρες ; **Εικ. 3B**). Ετσι, την ημέρα 14 μετά από τη χορήγηση του VSV-m-IFN-β εντός των



όγκων, αν και στα ποντίκια SCID το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης των όγκων ήταν 35%, το αντίστοιχο ποσοστό στα ανοσοεπαρκή ποντίκια ήταν 60%. Συνεπώς, η απουσία T ή/και B-κυττάρων στα ποντίκια SCID ήταν υπεύθυνη για την απώλεια περίπου 50% της αντικαρκινικής αποτελεσματικότητας του VSV-IFN-β στο μοντέλο υποδόριων όγκων AB12 14 ημέρες μετά από την αρχική χορήγηση του ιού.

Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα της **Εικ. 3A και B**, όγκοι που αναπτύχθηκαν σε ποντίκια χωρίς δραστικά CD8 T-κύτταρα και υπέστησαν θεραπεία με χορήγηση του VSV-IFN-β εντός των όγκων, παρουσίασαν αναστολή της ανάπτυξής τους κατά 25% σε σύγκριση με τους όγκους ελέγχου 14 ημέρες μετά την έναρξη χορήγησης του VSV-IFN-β, σε σύγκριση με το ποσοστό αναστολής 60% σε ανοσοεπαρκή BALB/c ποντίκια ( $P < 0.0001$  ; **Εικ. 3C και D**). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι περίπου 50% της αντικαρκινικής αποτελεσματικότητας της χορήγησης του VSV-IFN-β εντός υποδόριων όγκων μεσοθηλιώματος AB12 σε ανοσοεπαρκή ποντίκια εξαρτάται από τη δράση των CD8 T-κυττάρων.



**Εικόνα 3.** Η έκφραση της IFN-β από τον ιό VSV ενισχύει την αντικαρκινική θεραπεία του VSV-IFN-β μέσω της επαγωγής CD8 T-κυττάρων. Ομάδες (n=8) ποντικών BALB/C, SCID (A) ή ποντίκια με απενεργοποιημένο CD8 πληθυσμό κυττάρων (CD8 depleted) (C) με υποδόριους όγκους AB12 κυττάρων μεσοθηλιώματος έλαβαν όρο ή VSV-mIFN-β ( $6.6 \times 10^8$  pfu), μια φορά την εβδομάδα για 2 συνεχόμενες εβδομάδες. **B και D**, επειδή οι όγκοι AB12 αναπτύσσονται γρηγορότερα στα SCID και CD-8 depleted ποντίκια σε σύγκριση με τα ανοσοεπαρκή ποντίκια BALB/C, υπολογίστηκε ένα ποσοστό αναστολής ανάπτυξης μεταξύ των όγκων ελέγχου και των όγκων που έλαβαν VSV-IFN-β ως εξής:  $V \text{ control} - V \text{ VSVmIFN-}\beta / V \text{ control} \times 100$ .

### ***H έκφραση της IFN-β δεν επάγει ανιχνεύσιμες αντιδράσεις T- κυττάρων έναντι χαρακτηριστικών αντιγόνων των καρκινικών κυττάρων AB12 μεσοθηλιώματος***

Δεδομένης αυτής της εξάρτησης της αντικαρκινικής δράσης του VSV-IFN-β από τα CD8 T-κύτταρα, θεωρήσαμε ενδιαφέρον να διερευνήσουμε περαιτέρω αυτήν την ανοσιακή αντίδραση που διαμεσολαβείται από την IFN-β. Επειδή η σειρά AB12 δε φέρει συγκεκριμένα γνωστά καρκινικά αντιγόνα, διεκπεραιώσαμε επιπλέον μηχανιστικές μελέτες χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά B16ονα, η οποία έχει ένα πληρέστερα γνωστό ανοσολογικό προφίλ και επιπλέον εκφράζει το νεο-αντιγόνο chicken ovalbumin που μας επέτρεψε να χρησιμοποιήσουμε CD8 T-κυττάρα έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου (τετραμερή). Εχουμε διεξάγει προηγούμενες μελέτες των ανοσολογικών αντιδράσεων με τη θεραπεία wild-type VSV στο συγκεκριμένο μοντέλο B16ονα (4). Αρχικά δείξαμε ότι το μοντέλο υποδόριων όγκων B16ονα σε ποντίκια C57Bl/6 «απάντησε» στη θεραπεία με VSV-mIFN-β με τον ίδιο τρόπο που «απάντησαν» οι όγκοι AB12 σε ποντίκια BALB/C (Εικ.4A). Ακολουθώντας, απομονώσαμε σπληνοκύτταρα από ποντίκια C57Bl/6 στα οποία χορηγήθηκαν VSV- ή VSV-mIFN-β και εξετάσαμε το μέγεθος και την ειδικότητα των ανοσολογικών T-κυτταρικών αντιδράσεων έναντι ιικών ή καρκινικών αντιγόνων. Για την παρακολούθηση των ανοσολογικών αντιδράσεων έναντι των καρκινικών αντιγόνων, εκμεταλλευτήκαμε το γεγονός ότι ποντίκια C57Bl/6 που φέρουν

όγκους B16ονα αντιδρούν με την παραγωγή ειδικών T-κυτταρικών αντιδράσεων έναντι του επιτόπου SIINFEKL του πρότυπου καρκινικού αντιγόνου OVA.

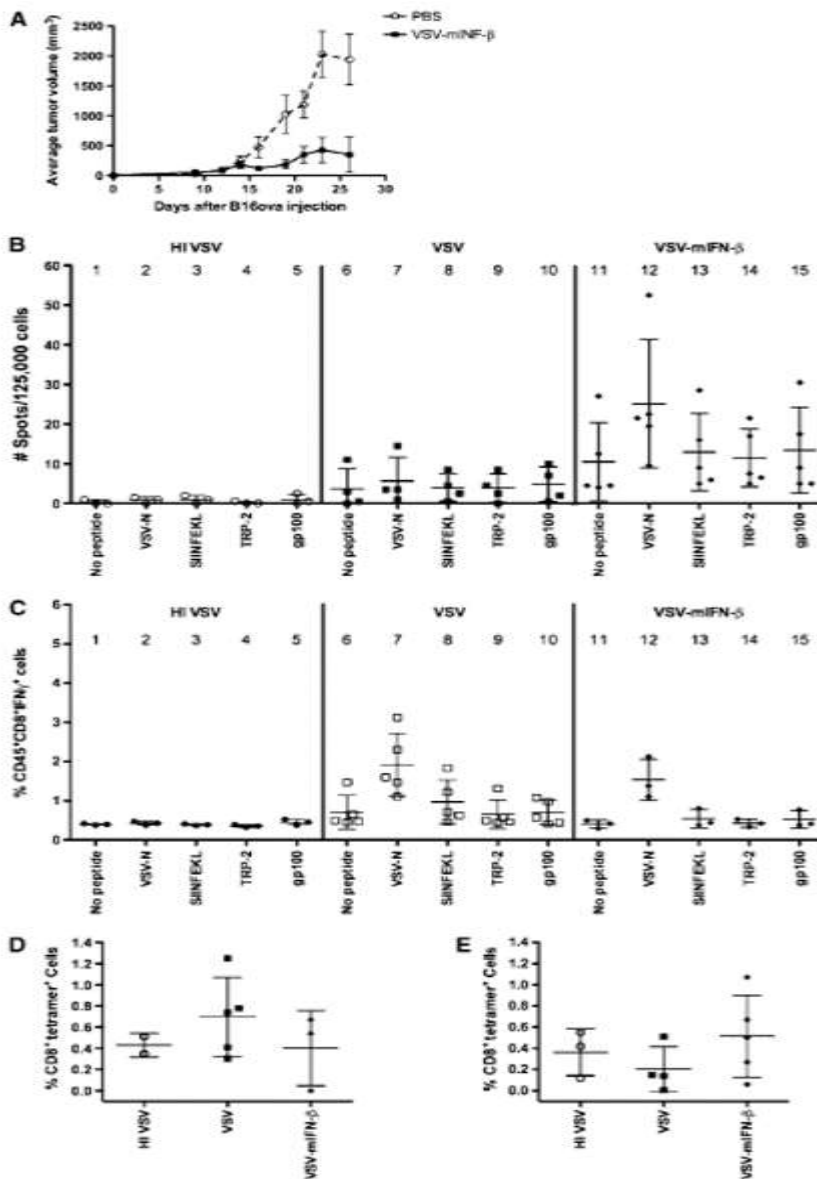
Χορήγηση του VSV εντός των όγκων B16ονα φαίνεται ότι επάγει μεγάλο αριθμό T-κυττάρων που αναγνωρίζουν τον ανοσολογικά επικρατέστερο επίτοπο της ιικής πρωτεΐνης N, σε σύγκριση με τους όγκους ποντικών που έλαβαν ενέσεις με αδρανοποιημένο με θέρμανση VSV (**Εικ. 4B, στήλη 2 και στήλη 7**), αν και δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των T-κυτταρικών απαντήσεων έναντι του ιικού αντιγόνου N σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου που εκτέθηκαν σε δραστικό ιό VSV (**Εικ. 4B, στήλη 6 και στήλη 7**). Εκφραση της IFN-β από τον ιό VSV γενικά ενίσχυσε τη συχνότητα επαγωγής T-κυττάρων έναντι της ιικής N πρωτεΐνης σε σύγκριση με τα ποντίκια που έλαβαν το strain VSV (**Εικ. 4B, στήλη 12**). Ωστόσο, παρατηρήσαμε επίσης ότι τα σπληνοκύτταρα από ποντίκια που έλαβαν είτε το strain VSV είτε το VSV-mIFN-β παρουσίασαν μία γενικευμένη, αντιγονικά μη-ειδική ενεργοποίηση, σε αντιστοιχία με την αυξημένη συχνότητα IFN-γ-producing spots που παράγεται μόνο με την έκθεση στα ιικά strain του VSV και χωρίς περαιτέρω ενεργοποίηση με την έκθεση σε ειδικό αντιγόνο (**Εικ. 4B, στήλη 11**). Σε σύγκριση με τη συχνότητα αντιγονικά μη ειδικών T-κυτταρικών απαντήσεων (χωρίς έκθεση σε συγκεκριμένο πεπτίδιο), δεν παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας των T-κυττάρων έναντι του επιτόπου SIINFEKL-OVA στα σπληνοκύτταρα ή στους λεμφαδένες ποντικών που έλαβαν VSV-IFN-β (**Εικ. 4B, στήλη 13**). Επίσης, η συχνότητα των T-κυττάρων έναντι του OVA στα ποντίκια που έλαβαν το strain VSV-IFN-β δεν ήταν υψηλότερη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό σε σύγκριση με τα ποντίκια που έλαβαν το strain VSV, αν και μεταξύ των πειραμάτων παρατηρήθηκε τάση υψηλότερης συχνότητας στα ποντίκια που έλαβαν VSV-IFN-β (**Εικ. 4B, στήλη 8 και στήλη 13**).

Σε αντιστοιχία με τα παραπάνω αποτελέσματα, αν και η χορήγηση του VSV εντός των όγκων ενίσχυσε σημαντικά το μέγεθος της αντίδρασης T-κυττάρων έναντι ιικών αντιγόνων (**Εικ. 4C, στήλη 6 και στήλη 7**), δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των T-κυττάρων έναντι των ειδικών καρκινικών αντιγόνων OVA, TRP-2 ή του gp100 (**Εικ. 4C, στήλη 6 και στήλες 8-10**). Εκφραση της IFN-β από τον ιό δεν αύξησε την αντική T-κυτταρική απάντηση (σε σχέση με την έκθεση στον VSV) ή την T-κυτταρική απάντηση έναντι του αντιγόνου OVA εντός του όγκου (**Εικ. 4C, στήλη 8 και στήλη 13**). Ανάλογα, αν και παρατηρήσαμε μία τάση προς αυξημένο αριθμό T-κυττάρων έναντι του αντιγόνου OVA εντός των όγκων που εκτέθηκαν στο VSV σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου, αυτή η τάση δεν ήταν στατιστικά σημαντική (**Εικ. 4D**). Αναλόγως, η έκφραση IFN-β από το VSV δεν τη συχνότητα των T-κυτταρικών απαντήσεων έναντι ειδικών καρκινικών αντιγόνων είτε στους όγκους είτε στο σπλήνα των ποντικών, σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου ή τα ποντίκια που έλαβαν VSV (**Εικ. 4D και E**).

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η χορήγηση του VSV εντός των όγκων μεσοθηλιώματος επαγει αντικές T-κυτταρικές απαντήσεις, που ενισχύονται ακόμα περισσότερο με την έκφραση IFN-β από τον ιό. Επιπλέον, η χορήγηση του VSV εντός των όγκων σχετίζεται με την επαγωγή αντιγονικά μη ειδικής T-κυτταρικής ενεργοποίησης. Τελειώνοντας, δεν καταφέραμε να δείξουμε επαγωγή T-κυτταρικών απαντήσεων έναντι των ειδικών καρκινικών αντιγόνων TRP-2, gp100 και του τεχνητού αντιγόνου OVA σε επίπεδα υψηλότερα από αυτά των ποντικών ελέγχου.

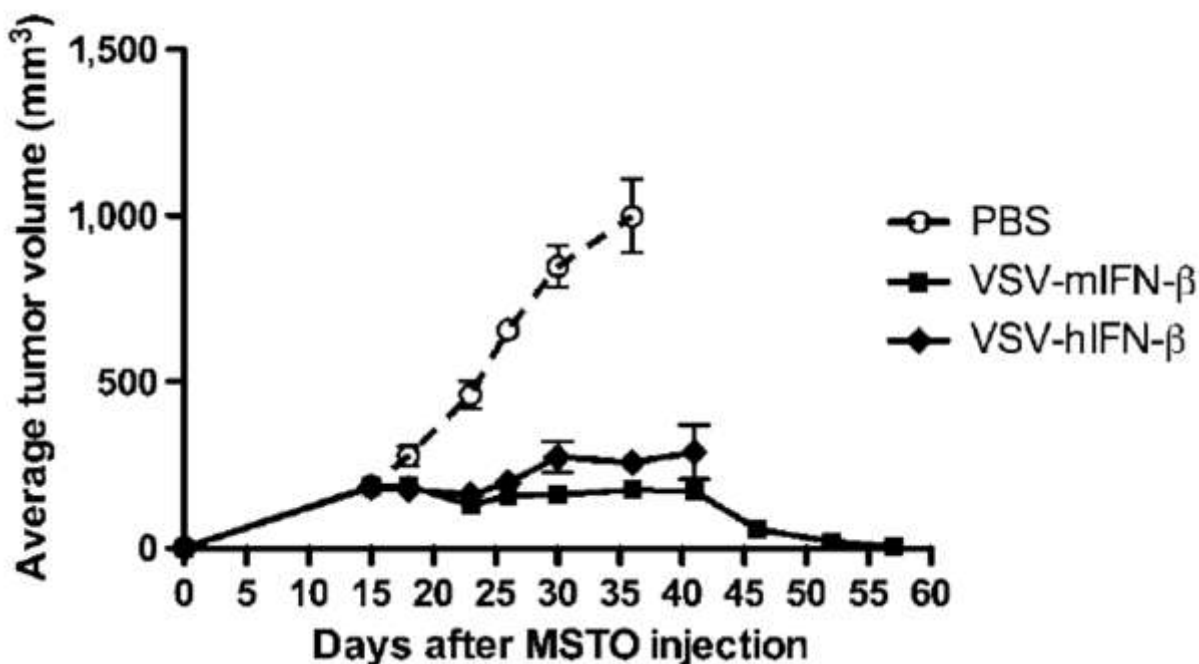
### ***Η IFN-β παρέχει ενισχυμένη προστασία έναντι της νευροτοξικότητας που προκαλείται από τον VSV***

Ενας βασικός λόγος της ενσωμάτωσης του γονιδίου της IFN-β στον ιό VSV ήταν η αύξηση της ασφάλειάς του στην περίπτωση ιικής προσβολής φυσιολογικών κυττάρων-στην περίπτωση αυτή η έκφραση της IFN-β αναμένεται να ενισχύσει την αντική απάντηση των φυσιολογικών κυττάρων, αποτρέποντας τον πολλαπλασιασμό του ιού και συνεπώς τον κυτταρικό θάνατο. Η τοξικότητα του VSV, που περιλαμβάνει και τη νευροτοξικότητα, είναι περισσότερο εμφανής σε ανοσοκατασταλαμένα ποντίκια. Για αυτόν το λόγο, υποδόριοι όγκοι της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς MSTO-211H αναπτύχθηκαν σε SCID ποντίκια, στους οποίους ακολούθως χορηγήθηκαν VSV-h-IFN-β (η ανθρώπινη IFN-β δεν επιφέρει προστασία των ιστών του ποντικιού από ιική προσβολή) ή VSV-m-IFN-β (η IFN-β του ποντικιού προστατεύει τους ιστούς του ποντικιού από την ιική προσβολή). Οι όγκοι των ποντικιών που έλαβαν το strain VSV-h-IFN-β εμφάνισαν σημαντική μείωση του μεγέθους τους σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου (**Εικ. 5**), αλλά ταυτόχρονα εμφάνισαν και σημαντική νευροτοξικότητα την ημέρα 40 μετά από την εγκατάσταση των όγκων, που κατέστησε απαραίτητη τη διακοπή του πειράματος στο συγκεκριμένο group. Αντιθέτως, χορήγηση του VSV-m-IFN-β οδήγησε στον ίδιο βαθμό αναστολής του της ανάπτυξης των όγκων την ημέρα 40 μετά την εμφύτευση των κυττάρων, αλλά χωρίς εμφανή τοξικότητα. Αυτή η έλλειψη τοξικότητας επέτρεψε τη συνέχιση του πειράματος, που οδήγησε στην υποχώρηση όγκων και στην εμφάνιση ποντικιών με μακρά επιβίωση (**Εικ. 5**). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η ενσωμάτωση του γονιδίου της IFN-β στον ιό VSV προσθέτει το σημαντικό πλεονέκτημα της προστασίας από τη νευροτοξικότητα που μπορεί να προκαλέσει ο VSV και επιτρέπει την εκδήλωση της αποτελεσματικότητας του VSV προστατεύοντας τα φυσιολογικά κύτταρα από τις πιθανές τοξικές δράσεις του VSV.



**Εικόνα 4.** Η έκφραση της IFN-β δεν επάγει ανιχνεύσιμες ειδικές T-κυττάρικες απαντήσεις έναντι καρκινικών αντιγόνων. **A**, ομάδες (n=8) C57Bl/6 ποντικών με υποδόριους όγκους B16οβα έλαβαν ορό ή VSV-m-IFN-β ( $5 \times 10^8$  rfu) τις ημέρες 8 και 12 μετά από εμφύτευση των υποδόριων όγκων. Η χορήγηση VSV-mIFN-β οδήγησε σε σημαντική υποχώρηση όγκων ( $P < 0.05$ ) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. **B** - **E**, ομάδες C57Bl/6 ποντικών (n=4) με υποδόριους όγκους B16οβα έλαβαν δύο φορές εντός των όγκων απενεργοποιημένο με θέρμανση ιό VSV, VSV ή VSV-m-IFN-β σε συγκέντρωση  $5 \times 10^8$  rfu. Τα ποντικά θυσίαστηκαν 7 ημέρες μετά από την τελευταία ένεση και τα όργανά τους αποσπάστηκαν προς επεξεργασία. **B**, οι λεμφαδένες εκτέθηκαν σε ορό χωρίς πεπτίδιο ή εκτέθηκαν στα αντιγόνα ονα, VSV-N, TRP-2 ή gp100 και ακολούθως αναλύθηκε η παρουσία κυττάρων που παράγουν IFN-γ με τη μέθοδο ELISpot. Οι τελείες στο διάγραμμα αντιστοιχούν στο μέσο όρο 2 ή 3 αξιών από το ίδιο ποντίκι; στήλες, σταθερά απόκλιση. **C**, καρκινικά κύτταρα εκκολάφθηκαν για 4 ώρες με την παρουσία Golgi plug με ή χωρίς τα αναφερόμενα πεπτίδια και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την παρουσία ενδοκυττάριας IFN-γ.

Επιπλέον, καρκινικά κύτταρα (D) και σπληνοκύτταρα (E) αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την παρουσία H2-Kb-SIINFEKL-tetramer-positive CD8 κύτταρα.



**Εικόνα 5.** Η IFN-β επιφέρει ενισχυμένη ασφάλεια έναντι της νευροτοξικότητας που προκαλείται από το VSV. Ομάδες (n=8) ποντικών SCID με υποδόριους όγκους MSTO-211H έλαβαν ορό, VSV-m-IFN-β ή VSV-h-IFN-β σε μία δόση  $6.6 \times 10^8$  pfu, μια φορά την εβδομάδα για 2 συνεχόμενες εβδομάδες. Η χορήγηση και των δύο ιικών strains οδήγησε σε σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $P < 0.0001$  και για τις δύο ομάδες). Ωστόσο τα ποντίκια που έλαβαν VSV-hIFN-β εκδήλωσαν νευροτοξικότητα και θυσιάστηκαν την ημέρα 40 μετά την εμφύτευση των όγκων.

## 2.4. Συμπεράσματα

Βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι η έκφραση της IFN-β μπορεί να αυξήσει την ανοσοθεραπευτική αποτελεσματικότητα του VSV, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στη μείωση της συστηματικής τοξικότητάς του, εξετάσαμε την αποτελεσματικότητα του πολλαπλασιαζόμενου ογκολυτικού ιικού strain του VSV που εκφράζει το γονίδιο της IFN-β σε ένα μοντέλο μεσοθηλιώματος σε ποντίκια. Σε αυτή τη μελέτη δείξαμε ότι τα κύτταρα AB12 είναι πολύ ευαίσθητα τόσο στον VSV όσο και στο παράγωγο του VSV-IFN-β σε in vitro πειράματα (**Εικ.1**). Η ευαισθησία στο ιικό strain VSV-m-IFN-β επιβεβαιώθηκε και σε in vivo πειράματα με χορήγηση του ιού εντός των όγκων καθώς και ενδοπεριτοναϊκά (**Εικ. 2**). Σε συστοιχία με το αρχική μας υπόθεση, σημαντικό μέρος της αντικαρκινικής δράσης του VSV-IFN-β in vivo εξαρτάται από ανοσολογικούς μηχανισμούς που επάγονται από την IFN-β, όπως καταδείχτηκε σε προκλινικό μοντέλο ποντικών με την in vivo σύγκριση του VSV-m-IFN-β με το ιικό strain VSV-h-IFN-β, στο οποίο η ανθρώπινη IFN-β δεν είναι βιολογικά ενεργή στο ποντίκι (**Εικ. 2**). Η εξάρτηση της αντικαρκινικής δράσης του VSV-IFN-β από την ανοσολογικές του επιδράσεις

ήταν πιο εμφανής στο προκλινικό μοντέλο υποδόριων όγκων σε αντίθεση με το ενδοπεριτοναϊκό μοντέλο (**Εικ. 3Α και Β**). Αυτή η διαφορά πιστεύουμε ότι οφείλεται στο γεγονός ότι οι όγκοι που αναπτύσσονται στον υποδόριο ιστό μπορεί να διαφέρουν όσον αφορά τη διείδυσή τους και την ενεργοποίηση ανοσολογικών διαμεσολαβητικών κυττάρων, όπως τα μακροφάγα, τα κύτταρα NK (4), και όπως φαίνεται και στην Εικ.3, τα κύτταρα CD8, σε αντίθεση με όγκους της ενδοπεριτοναϊκής κοιλότητας. Ωστόσο περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την επαλήθευση αυτής της υπόθεσης.

Σε προηγούμενες μελέτες δείξαμε ότι η ενσωμάτωση του γονιδίου της IFN-β σε έναν μη-πολλαπλασιαζόμενο αδενοϊό απέφερε σημαντικά θεραπευτικά αποτελέσματα με τη χορήγηση του ιού εντός των όγκων μέσω της επαγωγής ανοσολογικής αντικαρκινικής αντίδρασης (19, 20, 24, 25). Συνεπώς, υποθέσαμε ότι η προσθήκη του γονιδίου της IFN-β μπορεί να οδηγήσει σε ανάλογη ενίσχυση της ανοσοθεραπευτικής αποτελεσματικότητας του ογκολυτικού ιού VSV. Για να εντοπίσουμε ειδικές αντιγονικές ανοσολογικές αντιδράσεις έναντι συγκεκριμένων καρκινικών αντιγόνων, χρησιμοποιήσαμε την σειρά μελανώματος B16ονα, για την οποία υπάρχουν ήδη διαθέσιμες ανοσολογικές τεχνικές μέθοδοι προσδιορισμού τόσο του πρότυπου μη-ενδογενούς, τεχνητά ενσωματωμένου αντιγόνου OVA, όσο και μερικών ενδογενών αντιγόνων της συγκεκριμένης σειράς μελανώματος. Για να δικαιολογήσουμε τις ομοιότητες μεταξύ της σειράς μεσοθηλώματος και της σειράς μελανώματος, δείξαμε ότι ο VSV-m-IFN-β παρέχει αποτελεσματική θεραπεία έναντι των όγκων B16ονα, και ότι η προσθήκη του γονιδίου της IFN-β στον ιό VSV έχει παρόμοια αποτελέσματα όπως στο μοντέλο AB12 (**Εικ. 4Α**). Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η προσθήκη του γονιδίου της IFN-β στον ογκολυτικό VSV δεν ενίσχυσε την επαγωγή ειδικής ανοσολογικής αντίδρασης έναντι καρκινικών αντιγόνων (**Εικ. 4**). Αν και η χορήγηση του VSV εντός των όγκων προκάλεσε την επαγωγή ειδικής ανοσολογικής αντίδρασης έναντι συγκεκριμένων αντικών αντιγόνων (**Εικ. 4**), δεν καταφέραμε να ανιχνεύσουμε ειδικές ανοσολογικές αντιδράσεις έναντι των καρκινικών αντιγόνων OVA, του ενδογενούς TRP-2 ή του gp100.

Ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε VSV εντός των υποδόριων όγκων τους ανέπτυξαν αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας των T-κυττάρων τους, αν και αυτή η δραστηριότητα ήταν συγκεκριμένη μόνο προς ικά αντιγόνα (**Εικ.4 Β-Ε** και αλλά δεδομένα που δε δείχνονται). Ωστόσο, μελέτες στις οποίες τα CD8 κύτταρα απενεργοποιήθηκαν έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι σημαντικά για την αντικαρκινική δράση του VSV-IFN-β. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η μη ειδική ανοσολογική ενεργοποίηση που επάγει είτε ο VSV είτε η IFN-β που εκφράζεται από τον ιό συνίσταται από ένα σύνολο σχετικά ασθενών πολυκλωνικών αντιγονικών ανοσολογικών αντιδράσεων έναντι καρκινικών αντιγόνων, οι οποίες δε δύνανται να ανιχνευθούν παρά μόνο μετά από κάποιο είδος ενίσχυσής τους (amplification). Αυτή η παρατήρηση βρίσκεται σε αντιστοιχία με προηγούμενες μελέτες μας που έδειξαν ότι η επαγωγή T-κυττάρων έναντι του αντιγόνου OVA στο μοντέλο B16ονα είναι ιδανικά αποτελεσματική όταν το αντιγόνο εκφράζεται από τον ιό VSV (4). Εναλλακτικά, είναι πιθανό ότι οι ισχυρές αντικές ανοσολογικές αντιδράσεις κυριαρχούν και επισκιάζουν τις T-κυτταρικές αντιδράσεις έναντι των καρκινικών αντιγόνων εντός του όγκου, και η εξάρτηση της αντικαρκινικής δράσης του VSV από τα CD8 κύτταρα μπορεί να σχετίζεται με την παρατηρούμενη γενικευμένη ενεργοποίηση των T-κυττάρων από μία ισχυρά αντιγονική ουσία (potently immunogenic adjuvant), παρά με την παρουσία ειδικών T-κυττάρων που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα καρκινικά αντιγόνα. Το δεδομένο που υποστηρίζει την πρώτη υπόθεση (γενικευμένη ενεργοποίηση T-κυττάρων) είναι η απόρριψη υποδόριων όγκων AB12 όταν κύτταρα AB12 χορηγήθηκαν επανειλημμένα υποδορίως σε ποντίκια τα οποία είχαν ήδη θεραπευτεί από υποδόριους όγκους AB12 με τη χορήγηση

ενέσεων VSV-IFN-β. Συνεπώς, είναι σημαντικό να διερευνηθεί αν αυτή η απόρριψη οφείλεται σε μη ειδική αντικαρκινική ανοσολογική αντίδραση (28)- ιδέα συμβατή με την επαγωγή γενικευμένης ενεργοποίησης των T-κυττάρων από τον VSV- ή σε ενεργοποίηση μικρού αριθμού ειδικών T- κυττάρων έναντι καρκινικών αντιγόνων.

Η έκφραση της IFN-β από τον ιό VSV θα αναμενόταν να μειώσει την αντικαρκινική αποτελεσματικότητα του VSV-IFN-β, σε σύγκριση με τον VSV, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό του ιού εντός των καρκινικών κυττάρων, στην περίπτωση που τα τελευταία διατηρούσαν ευαισθησία στη δράση των τύπου I IFN. Ωστόσο τα δεδομένα μας, καθώς και τα αποτελέσματα άλλων μελετών (5), υποδηλώνουν ότι οι άμεσες ανοσολογικές αντιδράσεις (immune effectors) είναι κυρίως υπεύθυνες για την αντικαρκινική δράση του VSV-IFN-β σε ανοσοεπαρκή ποντίκια. Συνεπώς οι ανοσοδιεγερτικές επιδράσεις της IFN-β που εκφράζεται από το ιικό strain VSV-IFN-β μπορεί να αντισταθμίζει την αρνητική επίδραση του πιθανώς μειωμένου ιικού πολλαπλασιασμού στο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Περαιτέρω μελέτες του μεγέθους του ιικού πολλαπλασιασμού εντός των όγκων σε διαφορετικά χρονικά σημεία είναι απαραίτητες για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση.

Σε συνέπεια με τα παραπάνω, οι μελέτες μας δείχνουν έναν κυρίαρχο ρόλο της ανοσολογικής επίδρασης του VSV-IFN-β στην αντικαρκινική θεραπεία των όγκων AB12 σε ανοσοεπαρκή ποντίκια (Εικ. 2). Ωστόσο, στο προκλινικό μοντέλο MSTO των ποντικίων SCID (Εικ. 5), η θεραπεία των όγκων αποδόθηκε στην ογκολυτική δράση του ιού VSV-IFN-β, διότι τόσο ο VSV-m-IFN-β όσο και ο VSV-h-IFN-β είχαν ανάλογη αντικαρκινική αποτελεσματικότητα. Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν με την υπόθεση ότι η αντικαρκινική δράση της ογκολυτικής ιοθεραπείας αποτελεί μία ισορροπία μεταξύ της επαγωγής ανοσολογικών αντιδράσεων (έναντι ιικών και καρκινικών αντιγόνων) και άμεσης καταστροφής των καρκινικών κυττάρων μέσω πολλαπλασιασμού του ιού και συνεπακόλουθης ογκόλυσης. Σε πλήρως ανοσοεπαρκή ποντίκια, οι ανοσολογικές αντιδράσεις κυριαρχούν και προάγουν τόσο την «εκκαθάριση» του ιού όσο και του όγκου. Αντιθέτως, σε ανοσοκατασταλμένα SCID ποντίκια, ο ρόλος της άμεσης ογκόλυσης είναι πιθανόν να είναι πιο κυρίαρχος και εμφανής.

Επιβεβαιώσαμε επίσης ότι η ενσωμάτωση του γονιδίου της IFN-β εντός του VSV προς επιπρόσθετη ασφάλεια προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα και τους ιστούς από τον πολλαπλασιασμό και την επακόλουθη τοξικότητα από τον VSV (Εικ. 5). Συνεπώς, η ενσωμάτωση του βιολογικά ανενεργού ανθρώπινου γονιδίου της IFN-β στο VSV προκάλεσε σημαντική νευροτοξικότητα μετά από χορήγηση του VSV-h-IFN-β σε ανοσοκατασταλμένα SCID ποντίκια, στα οποία η τοξικότητα του VSV είναι εμφανής γρηγορότερα σε σύγκριση με τα ανοσοεπαρκή ποντίκια. Αντιθέτως, η αντικατάσταση του γονιδίου της ανθρώπινης IFN-β με το γονίδιο της IFN-β ποντικίου αύξησε το θεραπευτικό δείκτη ασφαλείας χωρίς εμφανή τοξικότητα, κάτι που επέτρεψε την επίτευξη πλήρους θεραπείας με τη χορήγηση ενέσεων του ιού εντός των όγκων. Αυτά τα δεδομένα είναι σύμφωνα με τις τοξικολογικές μας μελέτες που στοχεύουν στην έναρξη χρήση του VSV-IFN-β σε κλινικές μελέτες με ασθενείς. Σε αυτά τα πλαίσια έχουμε παρατηρήσει ότι η ενσωμάτωση ενός βιολογικά ενεργού γονιδίου IFN-β στον VSV αυξάνει σημαντικά την μέγιστη ανεκτή δόση του κατά περισσότερο από 2 λογαριθμικές μονάδες όταν χορηγείται σε μοντέλα τρωκτικών.

Συνοπτικά, δείξαμε ότι ο VSV-IFN-β αποτελεί έναν υποσχόμενο παράγοντα για τη θεραπεία όγκων μεσοθηλιώματος, τόσο σε υποδόρια, όσο και σε ενδοπεριτοναϊκά προκλινικά μοντέλα ποντικίων. Η προσθήκη του γονιδίου της IFN-β προσφέρει τόσο ενισχυμένη αντικαρκινική δράση μέσω ανοσολογικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση CD8 T-κυττάρων, καθώς και ενισχυμένη ασφάλεια με την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού του ιού



σε μη-καρκινικούς, φυσιολογικούς ιστούς. Η αρχική μας υπόθεση ήταν ότι η χρήση ενός πολλαπλασιαζόμενου ιικού φορέα που εκφράζει την IFN-β θα ήταν θεραπευτικά πιο αποτελεσματικός από έναν μη-πολλαπλασιαζόμενο αδενοϊό στη θεραπεία όγκων μεσοθηλιώματος. Αυτό βασίστηκε στην υπόθεση ότι ο πολλαπλασιαζόμενος VSV-IFN-β ιός μπορεί να προσβάλλει περισσότερα καρκινικά κύτταρα στο ίδιο χρονικό διάστημα, και συνεπώς, εκφράζει υψηλότερα επίπεδα της IFN-β, προκαλώντας έτσι πιο εκτεταμένο κυτταρικό θάνατο καθώς και ενισχυμένες ανοσολογικές αντιδράσεις έναντι του όγκου μέσω της δράσης της IFN-β. Τα πειράματά μας δείχνουν ότι αυτή η αρχική υπόθεση πιθανώς να μην είναι απαραίτητα σωστή. Έτσι, παρατηρούμε πολύ περιορισμένο πολλαπλασιασμό του VSV in vivo, κάτι που σχεδόν σίγουρα οφείλεται στην εγγενώς ισχυρή αντιγονικότητα του συγκεκριμένου ιού (5). Επιπλέον, αυτή η ισχυρή αντιγονικότητα οδήγησε στην επαγωγή T-κυττάρων έναντι του ιού που φαίνεται ότι επισκιάζει σε μέγεθος την αντίστοιχη επαγωγή T-κυττάρων έναντι συγκεκριμένων καρκινικών αντιγόνων. Σε βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, το εργαστήριό μας έχει αρχίσει να διεξάγει μελέτες σύγκρισης των ιικών φορέων VSV-IFN-β και Ad.IFN-β.

## 2.5. Παραπομπές

1. Robinson BW, Lake RA. Advances in malignant mesothelioma. *New England Journal of Medicine* 2005;353(15):1591-603.
2. Kirn D, Martuza RL, Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nature Medicine* 2001;7(7):781-7.
3. Parato KA, Senger D, Forsyth PA, Bell JC. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nature Reviews Cancer* 2005;5(12):965-76.
4. Diaz RM, Galivo F, Kottke T, et al. Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus. *Cancer Research* 2007;67(6):2840-8.
5. Fernandez M, Porosnicu M, Markovic D, Barber GN. Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *Journal of Virology* 2002;76(2):895-904.
6. Barber GN. Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector. *Viral Immunology* 2004;17(4):516-27.
7. Barber GN. VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene* 2005;24(52):7710-9.
8. Lichty BD, Power AT, Stojdl DF, Bell JC. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends in Molecular Medicine* 2004;10(5):210-6.
9. Balachandran S, Barber GN. Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* 2000;50(2):135-8.

10. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nature Medicine* 2000;6(7):821-5.
11. Stojdl DF, Lichty BD, tenOever BR, et al. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 2003;4(4):263-75.
12. Balachandran S, Porosnicu M, Barber GN. Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *Journal of Virology* 2001;75(7):3474-9.
13. Ebert O, Harbaran S, Shinozaki K, Woo SL. Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer Gene Therapy* 2005;12(4):350-8.
14. Lichty BD, Stojdl DF, Taylor RA, et al. Vesicular stomatitis virus: a potential therapeutic virus for the treatment of hematologic malignancy. *Human Gene Therapy* 2004;15(9):821-31.
15. Lun X, Senger DL, Alain T, et al. Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV(deltaM51)) on multifocal and invasive gliomas. *Journal of the National Cancer Institute* 2006;98(21):1546-57.
16. Shinozaki K, Ebert O, Woo SL. Eradication of advanced hepatocellular carcinoma in rats via repeated hepatic arterial infusions of recombinant VSV. *Hepatology* 2005;41(1):196-203.
17. Stojdl DF, Abraham N, Knowles S, et al. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* 2000;74(20):9580-5.
18. Sterman DH, Albelda SM. Advances in the diagnosis, evaluation, and management of malignant pleural mesothelioma. *Respirology* 2005;10(3):266-83.
19. Odaka M, Sterman DH, Wiewrodt R, et al. Eradication of intraperitoneal and distant tumor by adenovirus-mediated interferon-beta gene therapy is attributable to induction of systemic immunity. *Cancer Research* 2001;61(16):6201-12.
20. Odaka M, Wiewrodt R, DeLong P, et al. Analysis of the immunologic response generated by Ad.IFN-beta during successful intraperitoneal tumor gene therapy. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy* 2002;6(2):210-8.
21. Obuchi M, Fernandez M, Barber GN. Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *Journal of Virology* 2003;77(16):8843-56.
22. Ahmed CM, Wills KN, Sugarman BJ, et al. Selective expression of nonsecreted interferon by an adenoviral vector confers antiproliferative and antiviral properties and causes reduction of tumor growth in nude mice. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2001;21(6):399-408.

23. Brin E, Atencio I, Helmich BK, Maneval D, Laface D. Adenovirus delivery provides extended interferon-alpha exposure and augments treatment of metastatic carcinoma. *Cancer Gene Therapy* 2006;13(7):664-75.
24. Stermann DH, Recio A, Carroll RG, et al. A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses. *Clinical Cancer Research* 2007;13(15 Pt 1):4456-66.
25. Kruklytis RJ, Singhal S, Delong P, et al. Immuno-gene therapy with interferon-beta before surgical debulking delays recurrence and improves survival in a murine model of malignant mesothelioma. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery* 2004;127(1):123-30.
26. Davis MR, Manning LS, Whitaker D, Garlepp MJ, Robinson BW. Establishment of a murine model of malignant mesothelioma. *International Journal of Cancer* 1992;52(6):881-6.
27. Linardakis E, Bateman A, Phan V, et al. Enhancing the efficacy of a weak allogeneic melanoma vaccine by viral fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumor cell-tumor cell fusion. *Cancer Research* 2002;62(19):5495-504.
28. Prehn RT. Two competing influences that may explain concomitant tumor resistance. *Cancer Research* 1993;53(14):3266-9.

### **3.ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΜΕΛΕΤΗΣ (2)**

## Expression of IFN- $\beta$ Enhances Both Efficacy and Safety of Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus for Therapy of Mesothelioma

Candice L. Willmon,<sup>1</sup> Vassiliki Saloura,<sup>3</sup> Zvi G. Fridlender,<sup>3</sup> Phonphimon Wongthida,<sup>1</sup> Rosa Maria Diaz,<sup>1</sup> Jill Thompson,<sup>1</sup> Timothy Kottke,<sup>1</sup> Mark Federspiel,<sup>1</sup> Glen Barber,<sup>4</sup> Steven M. Albelda,<sup>3</sup> and Richard G. Vile<sup>1,2</sup>

Departments of <sup>1</sup>Molecular Medicine and Immunology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota; <sup>2</sup>Thoracic Oncology Research Laboratory, Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania; and <sup>3</sup>Sylvester Comprehensive Cancer Center, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida

### Abstract

Our preclinical and clinical trials using a replication-defective adenoviral vector expressing IFN- $\beta$  have shown promising results for the treatment of malignant mesothelioma. Based on the hypotheses that a replication-competent vesicular stomatitis virus (VSV) oncolytic vector would transduce more tumor cells *in vivo*, that coexpression of the immunostimulatory IFN- $\beta$  gene would enhance the immune-based effector mechanisms associated both with regression of mesotheliomas and with VSV-mediated virotherapy, and that virus-derived IFN- $\beta$  would add further safety to the VSV platform, we tested the use of IFN- $\beta$  as a therapeutic transgene expressed from VSV as a novel treatment for mesothelioma. VSV-IFN- $\beta$  showed significant therapy against AB12 murine mesotheliomas in the context of both local and locoregional viral delivery. Biologically active IFN- $\beta$  expressed from VSV added significantly to therapy compared with VSV alone, dependent in part on host CD8<sup>+</sup> T-cell responses. Immune monitoring suggested that these antitumor T-cell responses may be due to a generalized T-cell activation rather than the priming of tumor antigen-specific T-cell responses. Finally, IFN- $\beta$  also added considerable extra safety to the virus by providing protection from off-target viral replication in nontumor tissues and protected severe combined immunodeficient mice from developing lethal neurotoxicity. The enhanced therapeutic index provided by the addition of IFN- $\beta$  to VSV therefore provides a powerful justification for the development of this virus for future clinical trials. [Cancer Res 2009;69(19):7713–20]

### Introduction

Malignant mesothelioma is an aggressive neoplasm of the pleura or peritoneum associated with asbestos exposure (1). Due to a lack of effective therapy, few patients survive beyond 2 years from onset (1), highlighting the need for new therapeutic approaches. In this respect, oncolytic viruses are being developed to replicate selectively in tumor cells leading to tumor cell lysis while sparing normal cells. In theory, use of a replication-competent oncolytic virus would require only low levels of seeding in a tumor to initiate

spreading infections to cover the tumor comprehensively (2, 3). We have previously shown that vesicular stomatitis virus (VSV), which replicates in the cytoplasm and is highly lytic, is an effective oncolytic virus in various tumor models (4, 5). The potential of VSV as an oncolytic agent was suggested because VSV infection of normal cells induces type-I IFN responses (IFN- $\alpha/\beta$ ), blocking viral replication and extinguishing infection. However, many tumor cells have defects in their IFN response (6–8), allowing free-ranging infection and lysis (9–11). VSV is indeed a potent oncolytic agent against a variety of both human and murine tumors (5, 9–17). In addition, we have shown that the efficacy of VSV-mediated virotherapy in immunocompetent mice is not solely attributable to direct viral replication and tumor cell lysis but is also dependent on host-derived CD8<sup>+</sup> and natural killer (NK) cells (4).

The accessibility of malignant pleural mesothelioma makes it a good candidate for oncolytic viral therapy with the need for only locoregional delivery of the virus (18). Use of an oncolytic virus extends our previous work in which inclusion of the IFN- $\beta$  gene into a replication-defective adenoviral vector led to significant therapy following intratumoral (i.t.) injections (19, 20). Expression of IFN- $\beta$  generated tumor regressions and cures, dependent on its pleiotropic antitumor effects including enhancement of innate immune responses, its antiproliferative activities (21), and the priming of T-cell responses (19, 22, 23), and our resulting clinical trials have generated promising results (24).

Taken together, these data (19, 20, 24, 25) suggest that expression of IFN- $\beta$  (21) will further enhance the antitumor immunotherapeutic effects of the replication-competent oncolytic VSV. Moreover, inclusion of IFN- $\beta$  within the VSV vector should also increase the safety of VSV in the event that it were to infect normal cells (21). Thus, because normal cells have intact responses to IFN- $\alpha/\beta$  (unlike many tumor cells), which shut down VSV replication rapidly both *in vitro* and *in vivo*, by adding further levels of expression of IFN- $\beta$  from the virus, we predicted that the toxicity of VSV-IFN- $\beta$  would be further diminished without major effect on the efficacy against tumor. This is an important issue given the findings that at high doses, VSV infection can lead to lethal neurotoxicity in some mouse models (especially immunodeficient mice; refs. 10, 21).

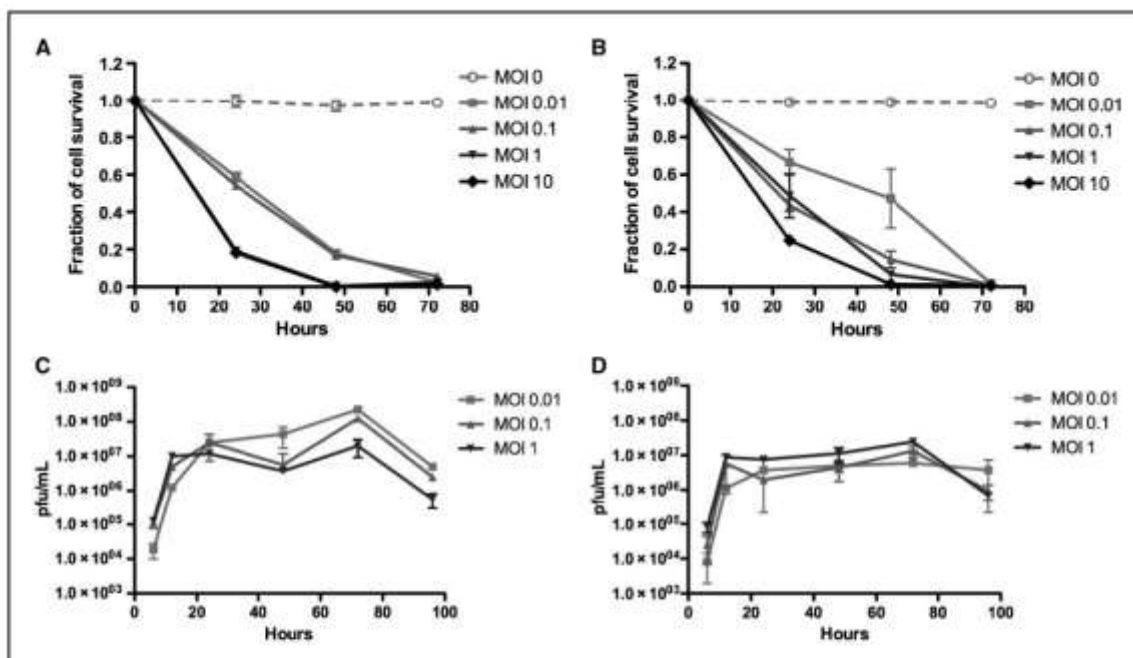
Here, we tested IFN- $\beta$  as a therapeutic transgene expressed from VSV as a novel treatment for mesothelioma based on the potential of VSV-IFN- $\beta$  to increase immunotherapeutic efficacy, enhance tumor cell transduction, and increase the safety of previous approaches using VSV alone. We show that VSV-IFN- $\beta$  efficiently lyses the murine mesothelioma AB12 cell line, and that added expression of IFN- $\beta$  does not significantly interfere with VSV replication. Locoregional delivery of VSV-IFN- $\beta$  generated tumor regressions, dependent, at least in part, on virus-induced activation

Note: C.L. Willmon and V. Saloura contributed equally to this work. S.M. Albelda and R.G. Vile are joint senior authors.

Requests for reprints: Richard G. Vile, Mayo Clinic, Guggenheim 18, 200 First Street Southwest, Rochester, MN 55905. Phone: 507-254-3178; Fax: 507-266-2122. E-mail: vile.richard@mayo.edu.

©2009 American Association for Cancer Research.  
doi:10.1158/0008-5472.CCR-09-1013





**Figure 1.** VSV-IFN- $\beta$  is potently cytotoxic to mesothelioma cells *in vitro*. AB12 cells plated in 96-well plates were infected at various MOIs with either (A) VSV or (B) VSV-mIFN- $\beta$ . At specific time points, an MTT assay was done per manufacturer's instructions. Data are plotted as a fraction of control cell survival with SD. AB12 cells were infected with VSV (C) or VSV-mIFN- $\beta$  (D) for 1 h at 37°C at the indicated MOIs. After incubation, cells were washed and, at the indicated time points, samples were taken for a plaque-forming unit assay.

of CD8<sup>+</sup> T cells. Finally, we confirmed that IFN- $\beta$  expressed from VSV added considerable extra safety to the virus and protected severe combined immunodeficient (SCID) mice from lethal neurotoxicity. These data support the development of the VSV-IFN- $\beta$  vector for use in patients with malignant mesothelioma.

## Materials and Methods

**Cell lines.** The human mesothelioma line MSTO-211H was purchased from the American Tissue Type Collection. The murine mesothelioma cell line AB12 was provided by Dr. Bruce Robinson (University of Western Australia, Perth, Australia; ref. 26). B16ova cells, a murine melanoma cell line, were derived from the parental cell by transduction of cDNA encoding chicken ovalbumin gene (27).

**Viral strains.** The VSV-mIFN- $\beta$  and VSV-hIFN- $\beta$  vectors were originally described by Obuchi and colleagues (21). VSV-green fluorescent protein (GFP) was generated as previously described (4). Viral stocks were manufactured by the Core Viral Facility of Mayo Clinic. VSV-GFP is referred to as VSV.

**MTT assays.** MTT assays were done with VSV-mIFN- $\beta$  and VSV-GFP. Cells were plated in quadruplicate on 96-well plates and infected with different multiplicities of infection (MOI). Cell viability was assessed at the indicated time points per manufacturer's instruction (Promega).

**ELISpot analysis for IFN- $\gamma$  secretion.** Spleens or tumor-draining lymph nodes were harvested from mice at the indicated times. For ELISpot assays,  $1 \times 10^5$  cells were plated in triplicate on a 96-well plate and restimulated for 48 h at 37°C under different conditions (all peptides were at 5  $\mu$ g/mL). Peptide-specific, IFN- $\gamma$ -positive spots were detected per manufacturer's protocol (Mabtech, Inc.) and quantified by a computer-assisted image analyzer.

The following synthetic peptides were synthesized at the Mayo Foundation Core Facility: EGSRNQDWL, mouse gp100; SIINFEKL, chicken OVA; SVYDFFVWL, mouse TRP-2; and RGYVYQGL, VSV-N protein.

***In vivo* studies.** All procedures were approved by the Mayo Foundation or the University of Pennsylvania Animal Care and Use Committee in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. To establish s.c. tumors,  $5 \times 10^5$  B16ova cells,  $1 \times 10^6$  AB12 cells, or  $1 \times 10^6$  MSTO-211H cells in 100  $\mu$ L of PBS were injected into the flank of C57Bl/6, BALB/c, or SCID mice, respectively. Once s.c. tumors reached  $\sim 200$  mm<sup>3</sup> in size, i.t. injections were done with saline,  $5 \times 10^8$  plaque-forming units (pfu; C57Bl/6) or  $6.6 \times 10^8$  pfu in 100  $\mu$ L of each vector (VSV-mIFN- $\beta$  and VSV-hIFN- $\beta$ ), once weekly for 2 (SCID, C57Bl/6) or 3 consecutive weeks (BALB/c). Tumors were measured twice a week, and mice were euthanized if toxicity was evident or tumor burden exceeded 1,500 mm<sup>3</sup>. To establish i.p. tumors,  $3.5 \times 10^5$  cells were injected i.p. On day 4, growth of the i.p. tumors was confirmed, and injections were done with saline or  $6.6 \times 10^8$  pfu in 100  $\mu$ L of each virus (VSV-mIFN- $\beta$  and VSV-hIFN- $\beta$ ).

***In vivo* depletion of CD8<sup>+</sup> T cells.** BALB/c mice received i.p. injections of 200  $\mu$ g of purified monoclonal antibodies purified from the anti-CD8<sup>+</sup> hybridoma 53-6.7 (American Type Culture Collection). Injections were administered 3 d and 1 d before inoculation with AB12 cells. Thereafter, a maintenance dose of antibody was injected i.p. every 7 d throughout the entire experimental period to ensure depletion. CD8<sup>+</sup> T-cell depletion was confirmed by flow cytometry of splenic suspensions at the time of tumor injection and weekly afterward. On days 11 and 18, mice received  $6.6 \times 10^8$  pfu VSV-mIFN- $\beta$  or PBS. Tumors were measured twice a week and mice were euthanized if toxicity was evident or tumor burden exceeded 1,500 mm<sup>3</sup>.

**Flow cytometry and IFN- $\gamma$  intracellular staining assay.** For analysis of phenotype,  $1 \times 10^6$  cells were washed in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (wash buffer), resuspended in 50  $\mu$ L of wash buffer, and exposed to conjugated primary antibodies for 30 min at 4°C. The

OVA-Flag-H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL-PE conjugated tetramer was used per manufacturer's protocol (Beckman Coulter). Cells were washed and resuspended in 500  $\mu$ L PBS containing 4% formaldehyde and analyzed by flow cytometry, and data were analyzed using FlowJo software. For intracellular staining, single-cell suspensions were prepared from tumors harvested (three mice per group) at the indicated times. IFN- $\gamma$  production in response to antigen was measured by incubation with peptides (5  $\mu$ g/mL) in the presence of Golgi Plug for 4 h. Cells were stained, fixed, and permeabilized for intracellular staining using a Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences) per manufacturer's instructions.

**Statistical analyses.** For comparison of two individual data points, two-sided Student's *t* test was applied to determine statistical significance. ANOVA with post hoc testing was used for groups of three or more. Survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier method, and statistical significance in the different treatment groups was compared using the log-rank test.

## Results

**VSV-mIFN- $\beta$  is potentially cytotoxic to mesothelioma cells *in vitro*.** Both VSV (Fig. 1A) and VSV-mIFN- $\beta$  (Fig. 1B) induced rapid and extensive cell killing following infection of AB12 cells at MOIs ranging from 0.01 to 10, associated with ongoing replication of the viruses (Fig. 1C and D). We observed a moderate but significant reduction in the rate of viral replication of VSV-mIFN- $\beta$  compared with VSV at the lowest MOI of infection (Fig. 1C and D), additionally reflected in a slightly slower rate of tumor cell killing (Fig. 1A and B), suggesting that AB12 cells may retain a slight degree of responsiveness to IFN- $\beta$ -mediated inhibition of viral

replication. By 72 hours after infection, however, more than 99% of AB12 cells had been eradicated by both viruses (Fig. 1A and B).

**VSV-IFN- $\beta$  has antitumor activity against established tumors.** Consistent with the *in vitro* results of Fig. 1, direct injection of VSV-mIFN- $\beta$  into established s.c. AB12 tumors in immunocompetent mice also generated significant antitumor activity compared with controls ( $P < 0.01$  at day 32; Fig. 2A). This reduction in the rate of tumor growth translated into significantly increased survival in VSV-mIFN- $\beta$ -treated mice, with four of eight mice cured of their tumors (Fig. 2A), compared with zero of eight in the PBS-treated group. In addition, all of these long-term survivors rejected a later challenge of live AB12 tumor cells. We predict that the antitumor immunity observed in Fig. 2A is specific against AB12 cells, although we did not have sufficient numbers of survivors to rechallenge these tumor-cured animals with a different, nonmesothelioma tumor cell line.

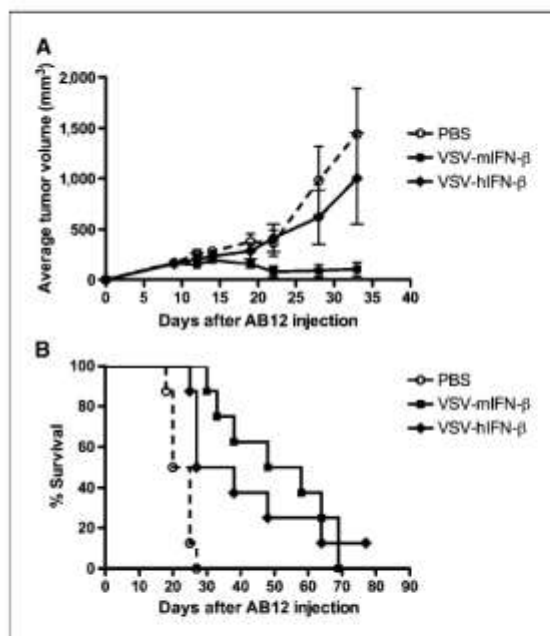
VSV-mIFN- $\beta$  was also therapeutically effective in a model of locoregional virus delivery to treat i.p. seeded AB12 tumors (Fig. 2B). Unlike the s.c. model, there were no long-term cures. However, survival of tumor-bearing mice treated with VSV-IFN- $\beta$  (median survival, 54 days) was extended significantly over control-treated animals (median survival, 26 days;  $P < 0.01$ ).

Taken together, these data show that VSV-mIFN- $\beta$  is an effective agent against AB12 mesothelioma tumors both *in vitro* and *in vivo* in the contexts of both local and locoregional delivery.

***In vivo* therapy is dependent on biological activity of IFN- $\beta$ .** Based on our previous studies using a replication-defective adenovirus expressing IFN- $\beta$  (19, 20, 24, 25), our hypothesis was that addition of the IFN- $\beta$  gene to the replication-competent VSV would further enhance the immunostimulatory activity of virus-mediated tumor cell killing. To test this hypothesis, we constructed a VSV expressing the human IFN- $\beta$  gene, which is not active in the mouse. Therefore, the efficacy of VSV-mIFN- $\beta$  and VSV-hIFN- $\beta$  in immunocompetent mice would provide a closely matched comparison between immune-based components of antitumor therapy and the effects of direct VSV-mediated oncolysis. We confirmed that both the VSV-mIFN- $\beta$  and the VSV-hIFN- $\beta$  viruses have very similar profiles of replication in, and cytotoxicity to, AB12 cells *in vitro* (not shown). As before, direct i.t. injection of VSV-mIFN- $\beta$  into s.c. AB12 tumors significantly improved antitumor therapy compared with PBS alone (Fig. 2A;  $P < 0.01$ ). In contrast, i.t. injection of VSV-hIFN- $\beta$  gave no significant therapy over PBS (Fig. 2A;  $P = 0.27$ ), suggesting that a major component of the therapy *in vivo* associated with VSV-IFN- $\beta$  is contributed by immune reactivity of local IFN- $\beta$  expression, as opposed to direct oncolysis by the virus.

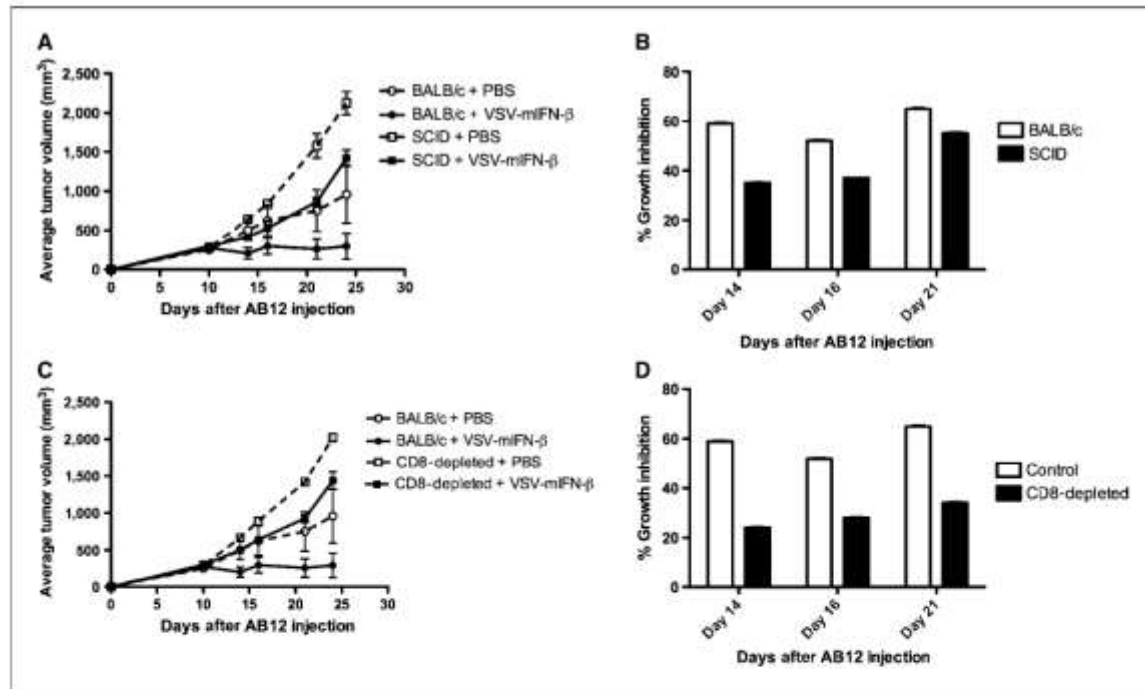
We also observed a trend toward increased efficacy of VSV-mIFN- $\beta$  compared with VSV-hIFN- $\beta$  in the model of locoregional delivery of virus to i.p. tumors, although this difference did not reach statistical significance ( $P = 0.54$ ; Fig. 2B). Both VSV-hIFN- $\beta$  and VSV-mIFN- $\beta$  were, however, significantly more therapeutic than PBS ( $P < 0.01$  and  $P < 0.0001$ , respectively).

**VSV-mediated expression of IFN- $\beta$  enhances therapy through CD8<sup>+</sup> T cells.** To further define the immune-mediated mechanisms by which IFN- $\beta$  enhances the therapy associated with i.t. VSV injection, the experiments of Fig. 2 were repeated in SCID mice. Intratumoral injection of VSV-IFN- $\beta$  significantly reduced the rate of tumor growth in SCID mice compared with control injections ( $P < 0.001$ ; Fig. 3A). However, AB12 tumors develop at a faster rate in SCID mice than in BALB/c mice. Therefore, by measuring the percentage of growth inhibition



**Figure 2.** *In vivo* therapy is dependent on biological activity of IFN- $\beta$ . Groups ( $n = 8$ ) of BALB/c mice bearing either s.c. (A) or i.p. (B) AB12 tumors were treated with saline, VSV-mIFN- $\beta$ , or VSV-hIFN- $\beta$  at a dose of  $6.6 \times 10^6$  pfu, once a week for 3 wk. Administration of VSV-mIFN- $\beta$  led to significant tumor regressions in the s.c. model ( $P < 0.01$ ) in comparison with the saline group, whereas VSV-hIFN- $\beta$  does not show any significant therapy. However, both VSV-mIFN- $\beta$  and VSV-hIFN- $\beta$  significantly prolong survival in the i.p. model over saline ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.01$ , respectively).





**Figure 3.** VSV-mediated expression of IFN- $\beta$  enhances therapy through the activity of CD8<sup>+</sup> T cells. Groups ( $n = 8$ ) of BALB/c, SCID (A) or CD8<sup>+</sup> T-cell-depleted (B) mice bearing s.c. tumors were treated with saline or VSV-mIFN- $\beta$  ( $6.6 \times 10^5$  pfu), once a week for 2 wk. C and D, because AB12 tumors develop at a faster rate in the SCID and CD8-depleted mice than in the BALB/c mice, a percentage of growth inhibition between control- and VSV-IFN- $\beta$ -treated groups was calculated as  $[(V_{control} - V_{VSV-mIFN-\beta})/V_{control}] \times 100\%$ .

between control- and VSV-IFN- $\beta$ -treated groups, we observed that there was a significant difference in the potency of VSV-IFN- $\beta$  between immunocompetent and immunodeficient strains ( $P < 0.0001$  for all days; Fig. 3B). Thus, on day 14 after AB12 injection, whereas SCID mice showed a growth inhibition of ~35% of tumor growth, immunocompetent BALB/c mice had a growth inhibition of 60% of tumor growth. Therefore, the absence of T and/or B cells in SCID mice was responsible for a loss of ~50% of the therapy associated with it, injection of VSV-IFN- $\beta$  in the AB12 model from 14 days onward.

Consistent with the results of Fig. 3A and B, tumors grown in mice depleted of CD8<sup>+</sup> T cells and treated with VSV-IFN- $\beta$  were ~25% smaller than control-treated tumors at day 14, compared with a 60% growth inhibition of tumors treated identically in immunocompetent mice ( $P < 0.0001$ ; Fig. 3C and D). These data suggest that about half of the therapy induced by it, injection of VSV-IFN- $\beta$  is dependent on an intact CD8<sup>+</sup> T-cell compartment.

**Expression of IFN- $\beta$  does not prime detectable tumor antigen-specific T-cell responses.** Given this T-cell dependence, it was of interest to further study this IFN- $\beta$ -induced immune response. Because the AB12 cell line has no known specific tumor antigens, we conducted further mechanistic studies using a more well-immunologically characterized cell line (B16ova) that additionally expressed a neo-antigen (chicken ovalbumin) that allowed the use of tetramers. We have previously analyzed the immune responses of this model to wild-type VSV treatment (4). We first showed that B16ova tumors responded to VSV-mIFN- $\beta$  in a similar fashion as AB12 cells (Fig. 4A). Next, we assayed splenocytes of

VSV- or VSV-IFN- $\beta$ -treated mice for the magnitude and specificity of responses against viral or tumor-associated antigens. To track antigen responses, we took advantage of the fact that C57Bl/6 mice bearing B16ova tumors generate T-cell-specific responses against the well-characterized SIINFEKL epitope of the model OVA tumor-associated antigen, which can readily be monitored.

Intratumoral injection of VSV into B16ova tumors seemed to prime increased numbers of T cells specific for the immunodominant epitope of the viral N protein, compared with mice in which tumors were injected with control heat-inactivated VSV (Fig. 4B, column 2 versus column 7), although there is no statistically significant increase in the N-specific T-cell response compared with the control in mice injected with VSV (Fig. 4B, column 6 versus column 7). Coexpression of IFN- $\beta$  from the injected VSV generally enhanced the frequencies of T cells specific for the viral N protein compared with mice treated with VSV alone (Fig. 4B, column 12). However, we also consistently observed that splenocytes from mice treated with either VSV or VSV-mIFN- $\beta$  exhibited a generalized, non-antigen-specific activation, as evidenced by the elevated frequencies of IFN- $\gamma$ -producing spots generated in response to stimulation with no added peptide (Fig. 4B, column 11). Relative to the frequencies of antigen nonspecific T-cell responses (no stimulating peptide), we did not observe a significant increase in the frequency of OVA-(SIINFEKL)-specific T cells in the spleens or lymph nodes of mice treated with VSV-IFN- $\beta$  (Fig. 4B, column 13). Moreover, frequencies of OVA-specific T cells were not significantly different in mice whose tumors were treated with VSV-IFN- $\beta$  compared with those treated with VSV, although between

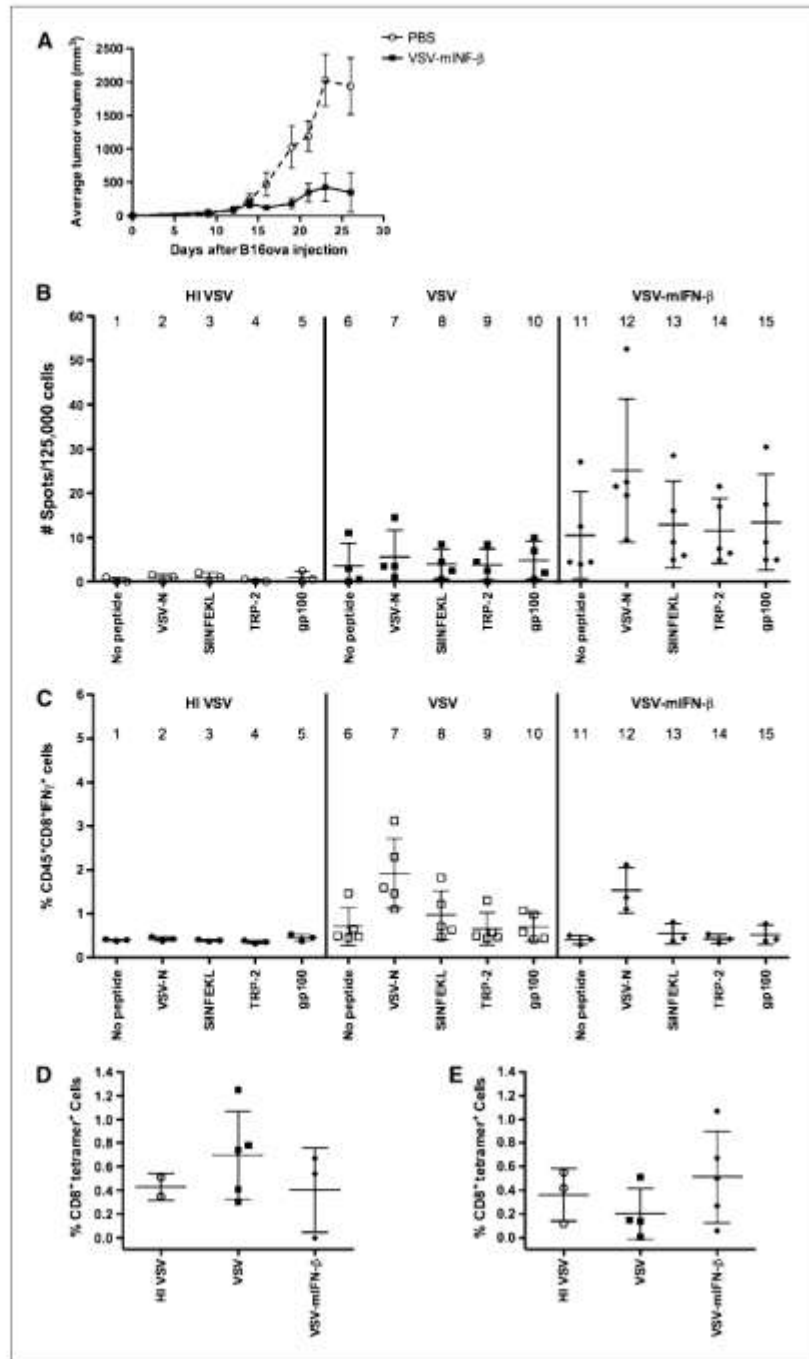


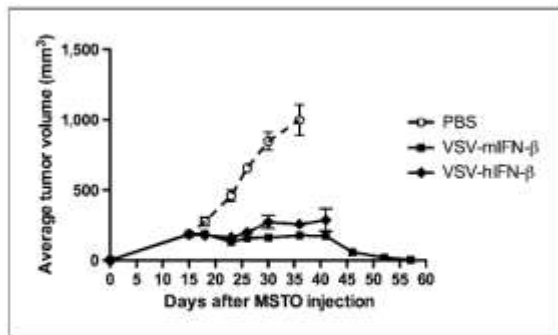
experiments there was a trend toward increased levels of SIINFEKL-specific T cells (Fig. 4B, column 8 versus column 13).

Consistent with these data, although i.t. injection of VSV significantly enhanced the magnitude of the antiviral T-cell

response seen within tumors (Fig. 4C, column 6 versus column 7), there was no significant increase in the T-cell response to either the nonself OVA-specific or the self TRP-2- or gp100-specific tumor-associated antigens (Fig. 4C, column 6 versus columns 8-10).

**Figure 4.** Expression of IFN- $\beta$  does not prime detectable tumor antigen-specific T-cell responses. **A**, groups ( $n = 8$ ) of C57Bl/6 mice bearing s.c. tumors were treated with saline or VSV-mIFN- $\beta$  ( $5 \times 10^6$  pfu) on days 8 and 12 after tumor inoculation. Administration of VSV-mIFN- $\beta$  led to significant tumor regressions in the s.c. model ( $P < 0.05$ ) in comparison with the saline group. **B** to **E**, groups of C57Bl/6 mice ( $n = 4$ ) bearing s.c. B16ova tumors were i.t. treated twice with heat-inactivated VSV, VSV, or VSV-mIFN- $\beta$  at  $5 \times 10^6$  pfu. Mice were sacrificed 7 d after the final injection and organs were harvested. **B**, lymph nodes were pulsed with no peptide or with ova, VSV-N, TRP-2, or gp100 peptides and assayed for IFN- $\gamma$ -producing cells by ELISpot. Points, average of duplicates or triplicates from each individual mouse; bars, SD. **C**, tumor cells were incubated for 4 h in the presence of Golgi Plug with or without the indicated peptides and analyzed by flow cytometry for intracellular IFN- $\gamma$ . Additionally, tumor cells (**D**) and splenocytes (**E**) were analyzed by flow cytometry for H2-K<sup>b</sup>-restricted SIINFEKL tetramer-positive CD8<sup>+</sup> T cells.





**Figure 5.** IFN- $\beta$  provides enhanced safety against VSV-induced neurotoxicity. Groups ( $n = 8$ ) of SCID mice bearing s.c. MSTO-211H tumors were i.t. treated with saline, VSV-mIFN- $\beta$ , or VSV-hIFN- $\beta$  at a dose of  $6.6 \times 10^8$  pfu, once weekly for 2 wk. Administration of both viruses significantly reduced tumor growth in the mice compared with control ( $P < 0.0001$  for both). However, mice treated with VSV-hIFN- $\beta$  displayed neurotoxicity and were sacrificed around day 40.

Coexpression of IFN- $\beta$  from the virus did not enhance either the antiviral T-cell response (relative to treatment with VSV) or the anti-OVA response within the tumor (Fig. 4C, column 8 versus column 13). Similarly, although we observed a trend toward increased number of tetramer-positive OVA-specific T cells infiltrating tumors treated with VSV compared with control-treated animals, this was not significant (Fig. 4D). Addition of IFN- $\beta$  expression from the virus did not increase the frequency of tumor antigen-associated T-cell responses in either the tumor or the spleens of treated mice compared with control- or VSV-treated mice (Fig. 4D and E).

Taken together, these data indicate VSV i.t. injection primes viral-specific T-cell responses, which can be enhanced in their frequency by the coexpression of IFN- $\beta$  from the virus. In addition, VSV i.t. injection is associated with enhanced levels of T-cell activation but through a non-antigen-specific mechanism. Finally, we could not show the priming of T-cell responses specifically either against the endogenous TRP-2 or gp100 tumor antigens or against the artificial nonself OVA tumor antigen at levels higher than controls.

**IFN- $\beta$  provides enhanced safety against VSV-induced neurotoxicity.** A principal rationale for the inclusion of the IFN- $\beta$  gene within the VSV platform was to increase the safety of this virus should it become disseminated within a patient and infect normal cells—in which case, the expression of IFN- $\beta$  would enhance the antiviral response of normal cells and extinguish extraneous viral replication. The potential toxicities of VSV, including neurovirulence, are most potent when the virus is administered to immunodeficient mice. For this reason, human MSTO-211H mesothelioma tumors were grown in SCID mice, which were then treated either with VSV-hIFN- $\beta$  (in which the human IFN- $\beta$  confers no protection against viral replication in a mouse) or with VSV-mIFN- $\beta$  (in which the IFN- $\beta$  will be active in the host mouse at protecting normal tissues from viral replication). Significantly, all tumor-bearing mice treated with VSV-hIFN- $\beta$  showed significant tumor regressions compared with mice with control-treated tumors (Fig. 5), but these mice also exhibited unacceptable neurotoxicity by day 40, necessitating termination of the experiment in that group. In contrast, treatment of tumors with VSV-mIFN- $\beta$  led to similar levels of tumor growth inhibition by day 40 after tumor seeding (Fig. 5) but was not associated with any

overt viral-associated toxicities. This lack of toxicity enabled the experiment to be continued, under which circumstances tumor regressions continued and long-term survivors were generated (Fig. 5). These results confirm that inclusion of a biologically active IFN- $\beta$  in the VSV platform adds a significant safety benefit of protection against VSV-associated neurologic toxicity and allows for increased efficacy to be manifested by protecting the host from adverse side effects.

## Discussion

Based on the hypothesis that expression of IFN- $\beta$  would enhance the immunotherapeutic efficacy of VSV while decreasing its systemic toxicity, we tested a replication-competent oncolytic VSV expressing IFN- $\beta$  in a murine model of mesothelioma. We show here that AB12 cells are highly sensitive to both VSV and its IFN- $\beta$ -expressing derivative *in vitro* (Fig. 1). This sensitivity to VSV-mIFN- $\beta$  is also reproduced *in vivo* after both i.t. and loco-regional delivery (Fig. 2). Consistent with our original rationale, a significant proportion of the *in vivo* therapy is contributed by IFN- $\beta$ -dependent immune-based mechanisms as shown by comparing VSV-mIFN- $\beta$  with a closely matched VSV-hIFN- $\beta$  virus in which the IFN- $\beta$  is not biologically active in the murine host (Fig. 2). This immune component was most marked in the s.c. model as opposed to the i.p. model of tumor growth (Fig. 3A and B). We believe that this is probably because tumors growing in the s.c. and i.p. sites may differ significantly in the access and activation of the immune effectors that we believe are critical to these antitumor mechanisms, such as macrophages, NK (4) cells, and, as shown in Fig. 3, CD8<sup>+</sup> T cells. However, further studies will be required to confirm this hypothesis.

We previously showed that inclusion of the IFN- $\beta$  gene into a replication-defective adenoviral vector led to significant therapy following i.t. injections through priming of immune-mediated antitumor responses (19, 20, 24, 25). Therefore, we hypothesized that addition of IFN- $\beta$  may lead to similar enhancements in the immunotherapeutic effects of oncolytic VSV. To monitor or track potential tumor antigen-specific responses, we used the B16ova model in which immunologic assays are available for both the model nonself OVA antigen and several endogenous self-melanoma-associated antigens. To justify the similarities between the mesothelioma and melanoma models, we have shown that VSV-mIFN- $\beta$  provides effective therapy against B16ova, and that addition of IFN- $\beta$  to VSV has similar effects as seen in the AB12 model (Fig. 4A). Significantly, however, our results indicate that addition of IFN- $\beta$  to oncolytic VSV did not enhance priming of tumor antigen-specific T-cell responses (Fig. 4). Whereas VSV injection into tumors primed specific antiviral T-cell responses (Fig. 4), we were unable to detect antigen-specific responses against either OVA or the endogenous TRP-2 or gp100 tumor antigens. Mice injected i.t. with VSV developed generally elevated levels of T-cell activity, although these were not specific for any stimulating peptide other than virally derived epitopes (Fig. 4B-E and data not shown). Nonetheless, depletion studies showed that these apparently antigen nonspecific CD8<sup>+</sup> T-cell responses are important for therapy. This may be due to the fact that the nonspecific immune activation induced by either virus or IFN- $\beta$  induces a series of relatively infrequent, but polyclonal, antigen responses against tumor-associated antigens but that these responses are not strong enough to be detected without some sort of amplification. This is consistent with our previous reports that effective anti-OVA T-cell



responses can be primed optimally in the B16ova model when the tumor antigen (OVA) is expressed from the VSV itself (4). Alternatively, it may be possible that the strong viral responses predominate and overshadow T-cell responses against antigens expressed within the tumor, and dependence of the therapy on CD8<sup>+</sup> T cells may be associated more with the observed generalized T-cell hyperactivity induced by a potentially immunogenic adjuvant rather than by antigen-specific T-cell effectors recognizing tumor-associated antigens. Favoring the first possibility is that BALB/c mice cured of established AB12 tumors following i.t. VSV-IFN- $\beta$  therapy rejected a subsequent challenge with tumor. Therefore, it will be important to elucidate whether these rejection responses are associated with the concept of nonspecific concomitant tumor immunity (28)—compatible with the VSV-induced generalized T-cell reactivity—or with low-frequency, genuinely tumor antigen-specific T-cell responses.

Viral-directed expression of IFN- $\beta$  would be expected to counteract antitumor efficacy, compared with VSV alone, by inhibiting viral replication if the tumor cells retain any levels of sensitivity to type-I IFN signaling. However, our data, as well as those of other studies,<sup>5</sup> suggest that immune effectors are the predominant mechanism of antitumor therapy in the immunocompetent model. Therefore, the immune-activating benefits of addition of IFN- $\beta$  to VSV may outweigh the negative therapeutic effect of any reduced viral replication. Further studies on the levels of viral replication in tumors with time will be required to confirm this.

Consistent with this, our data clearly show a predominantly immune-based component of antitumor therapy with VSV-IFN- $\beta$  in the immunocompetent AB12 model (Fig. 2). However, in the human MSTO/SCID model (Fig. 5), therapy was principally associated with oncolysis because both VSV-hIFN- $\beta$  and VSV-mIFN- $\beta$  viruses gave equivalent antitumor therapy. These results are consistent with the hypothesis that the antitumor mechanisms of oncolytic virotherapy represent a balance between immune effectors and direct tumor cell destruction by viral replication and oncolysis. In the fully immunocompetent setting, we believe that immune effectors predominate in both viral clearance and antitumor efficacy. In contrast, in the context of SCID mice, the role of direct oncolysis is likely to be both more dominant and more apparent.

We also confirmed that inclusion of IFN- $\beta$  into VSV as an additional safety feature protects normal cells or tissues from VSV-induced replication and cytotoxicity (Fig. 5). Thus, inclusion of the biologically inactive human IFN- $\beta$  gene into VSV unmasked very significant neurotoxicity of i.t. injected VSV in the context of SCID

mice, in which toxicity of VSV is more readily apparent, compared with the immunocompetent counterpart hosts. In contrast, replacing the human IFN- $\beta$  gene with the murine IFN- $\beta$  gene led to a more prolonged therapeutic window of opportunity without any apparent toxicity, during which i.t. injections of virus were able to achieve significant tumor cures. These data are consistent with our ongoing toxicology studies to support implementation of clinical trials of the VSV-IFN- $\beta$  virus in patients. In this respect, we have observed that incorporation of a biologically active IFN- $\beta$  gene into VSV significantly increases the maximum tolerated dose in excess of 2 orders of magnitude when administered in rodent models.

In summary, we have shown that VSV-IFN- $\beta$  has significant therapeutic potential against mesothelioma tumors in the context of both local and locoregional viral delivery. Addition of IFN- $\beta$  provides both added efficacy through immune-mediated mechanisms, which include activation of CD8<sup>+</sup> T-cell responses, and added safety by providing protection from off-target viral replication in nontumor tissues. Our original hypothesis was that the use of a replication-competent viral vector expressing IFN- $\beta$  would be therapeutically more effective than a replication-defective adenoviral vector against established mesothelioma tumors. This was based on the assumption that the replication-competent VSV-IFN- $\beta$  virus would transduce more tumor cells and, correspondingly, express higher levels of IFN- $\beta$ , leading to higher levels of direct tumor cell killing as well as improved IFN- $\beta$ -mediated antitumor immunity. Our studies here suggest that this initial hypothesis may not necessarily prove to be correct. Thus, we observe only very limited replication of the VSV vector *in vivo*, which is almost certainly associated with the potent innate immunogenicity of this virus.<sup>5</sup> Moreover, this immunogenicity also resulted in an effect in which adaptive T-cell responses to the virus seem to dominate over those to tumor-associated antigens. In the light of our current results, therefore, a direct head-to-head comparison between the two vector platforms (VSV-IFN- $\beta$  and Ad-IFN- $\beta$ ) is warranted, and these studies are now under way in our laboratory.

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Acknowledgments

Received 3/25/09; revised 7/8/09; accepted 7/28/09; published OnlineFirst 9/22/09.

Grant support: Richard Schulze Family Foundation, the Mayo Foundation, and NIH grants CA107082-02, CA130878-01, and CA66726-12.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Tami Higgins for expert secretarial assistance.

<sup>5</sup> F. Galivo et al., submitted for publication.

## References

- Robinson BW, Lake RA. Advances in malignant mesothelioma [see comment]. *N Engl J Med* 2005;353:1591-603.
- Kiru D, Martuza RL, Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: biological principles, risk management and future directions. *Nat Med* 2001;7:781-7.
- Parato KA, Senger D, Forsyth PA, Bell JC. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* 2006;6:596-76.
- Diaz RM, Galivo F, Kottke T, et al. Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus. *Cancer Res* 2007;67:2840-8.
- Fernandez M, Porosnicu M, Markovic D, Barber GN. Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *J Virol* 2002;76:895-904.
- Barber GN. Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector. *Viral Immunol* 2004;17:1516-27.
- Barber GN. VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene* 2005;24:7710-9.
- Lichty BD, Power AT, Stojdl DF, Bell JC. Vesicular stomatitis virus re-inventing the bullet. *Trends Mol Med* 2004;10:210-6.
- Balachandran S, Barber GN. Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *UBMB Life* 2000;30:135-8.

10. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* 2006;12:821-5.
11. Stojdl DF, Lichty BD, tenOverer BR, et al. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 2003;4:263-75.
12. Balachandran S, Porosnicu M, Barber GN. Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *J Virol* 2001;75:3474-9.
13. Ebert O, Harbarth S, Shinozaki K, Woo SL. Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer Gene Ther* 2005;12:350-8.
14. Lichty BD, Stojdl DF, Taylor RA, et al. Vesicular stomatitis virus: a potential therapeutic virus for the treatment of hematologic malignancy. *Hum Gene Ther* 2004;15:821-31.
15. Lun X, Senger DL, Alain T, et al. Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV16M51) on multifocal and invasive gliomas. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1546-57.
16. Shinozaki K, Ebert O, Woo SL. Eradication of advanced hepatocellular carcinoma in rats via repeated hepatic arterial infusions of recombinant VSV. *Hepatology* 2005;41:196-203.
17. Stojdl DF, Abraham N, Knowles S, et al. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *J Virol* 2000;74:9580-5.
18. Sterman DH, Altschuld SM. Advances in the diagnosis, evaluation, and management of malignant pleural mesothelioma. *Respirology* 2005;10:266-83.
19. Odaka M, Sterman DH, Wiesrodt R, et al. Eradication of intraperitoneal and distant tumor by adenovirus-mediated interferon- $\beta$  gene therapy is attributable to induction of systemic immunity. *Cancer Res* 2000;61:6201-12.
20. Odaka M, Wiesrodt R, DeLong P, et al. Analysis of the immunologic response generated by Ad:IFN- $\beta$  during successful intraperitoneal tumor gene therapy. *Mol Ther* 2002;6:210-8.
21. Obschtl M, Fernandez M, Barber GN. Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *J Virol* 2001;77:8843-56.
22. Ahmed CM, Wills KN, Sugarman BL, et al. Selective expression of nonacetylated interferon by an adenoviral vector confers antiproliferative and antiviral properties and causes reduction of tumor growth in nude mice. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:399-406.
23. Brin E, Atencio I, Helmich BK, Maneval D, Lafuze D. Adenovirus delivery provides extended interferon- $\alpha$  exposure and augments treatment of metastatic carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2006;13:664-75.
24. Sterman DH, Rocio A, Carroll RG, et al. A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN- $\beta$  gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions; high rate of antitumor immune responses.[erratum appears in *Clin Cancer Res*. 2007 Sep 1;13(5):26. Note: Kanther, Michelle [added]]. *Clin Cancer Res* 2007;13:4456-66.
25. Krulitis RJ, Singhal S, DeLong P, et al. Immuno-gene therapy with interferon- $\beta$  before surgical debulking delays recurrence and improves survival in a murine model of malignant mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;127:123-30.
26. Davis MR, Manning LS, Whitaker D, Garlepp MJ, Robinson BW. Establishment of a murine model of malignant mesothelioma. *Int J Cancer* 1992;52:881-6.
27. Linanakis E, Bateman A, Phan V, et al. Enhancing the efficacy of a weak allogeneic melanoma vaccine by viral fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumor cell-tumor cell fusion. *Cancer Res* 2002;62:5495-504.
28. Prehn RT. Two competing influences that may explain concomitant tumor resistance. *Cancer Res* 1993;53:3266-9.

## **4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΙΟΥ ΘΥΛΑΚΙΩΔΟΥΣ ΣΤΟΜΑΤΙΤΙΔΑΣ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΕΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ-β ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΣΟΘΗΛΙΩΜΑΤΟΣ: Η ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ-β ΚΑΘΟΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ**

### **4.1. Εισαγωγή**

Η ογκολυτική ιοθεραπεία αποτελεί μία αναδυόμενη θεραπεία κατά του καρκίνου (1). Μία κατηγορία μικροσκοπικών, γενετικά μη τροποποιημένων RNA ιών, συμπεριλαμβανομένου του ιού θυλακιώδους στοματίτιδας (VSV), παρουσιάζει μία εγγενή επιλεκτικότητα για την προσβολή καρκινικών κυττάρων, που φαίνεται ότι οφείλεται, εν μέρει, σε ελλειμματικούς εγγενείς αντικούς μηχανισμούς άμυνας των καρκινικών κυττάρων. Αυτοί οι RNA ιοί είναι φυσιολογικά σχετικά μη παθογόνοι λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους στην αντική δράση των ιντερφερονών τύπου I (IFNs). Η ιντερφερόνη β (IFN-β), που παράγεται από φυσιολογικά κύτταρα μετά από ιική προσβολή τους, ενισχύει την έκφραση αντικών γονιδίων εξαρτώμενων από τη δράση της ιντερφερόνης (IFN-stimulated antiviral genes ISGs), όπως η πρωτεΐνη A αντίστασης του μυξοϊού (myxovirus resistance A, MxA), η 2'-5'-ολιγο-αδενυλο-συνθετάση (2',5'-oligo-adenylate-synthetase, 2',5'-OAS), η διπλής-έλικας-RNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνοκινάση (double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR) και κατ'επέκταση της ιντερφερόνης α IFN-α από τα γειτονικά κύτταρα. Αυτές οι πρωτεΐνες αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του ιικού γονιδιώματος και συνεπώς προστατεύουν τα γειτονικά κύτταρα από την ιική προσβολή. Μελέτες έχουν δείξει ότι καρκινικά κύτταρα πολλών διαφορετικών νεοπλασιών παρουσιάζουν σχετική αντίσταση στην προστατευτική αντική δράση των τύπου I ιντερφερονών λόγω επίκτητων μεταλλάξεων στα «μονοπάτια» των ιντερφερονών που επιτρέπουν ταχύτερο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. (1, 2-7).

Ο VSV είναι ένας ταχέως πολλαπλασιαζόμενος RNA ιός με μία αρνητική, μονή RNA αλυσίδα γονιδιώματος που ανήκει στην οικογένεια των Ραβδοϊών και είναι σχετικά μη παθογόνος για τους ανθρώπους (1, 8-10). Ο VSV πολλαπλασιάζεται πιο αποτελεσματικά εντός καρκινικών κυττάρων σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα. Αυτό αποδίδεται σε ελλείματα της εγγενούς ανοσιακής αντίδρασης των καρκινικών κυττάρων μέσω του συστήματος των ιντερφερονών, ελλείματα στη ρύθμιση της μετάφρασης του RNA και σε παθολογικά «μονοπάτια» εντολών (signaling pathways) εντός των καρκινικών κυττάρων που ενισχύουν τον ιικό πολλαπλασιασμό (11-13). Μελέτες έχουν ήδη δείξει ότι ο ιός VSV έχει σημαντική αντικαρκινική δράση σε πολλά προκλινικά μοντέλα κακοήθων όγκων, όπως στο μελάνωμα, στον πλακώδη καρκίνο, καρκίνο των ωοθηκών, παχέως εντέρου, προστάτη, μαστού, ραβδοειδείς όγκους, λευχαιμία, στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο και στο γλοιοβλάστωμα (7, 14-22).

Έχει αποδειχθεί ότι πολλές ανθρώπινες και κυτταρικές σειρές ποντικών παρουσιάζουν σημαντική εγγενή αντίσταση στη λοίμωξη από τον ιό VSV in vitro, αν και υψηλοί τίτλοι του ιού μπορούν να προκαλέσουν θανατηφόρο λοίμωξη in vivo, με κύρια αιτία θανάτου τις νευρολογικές επιπλοκές (9, 13). Συνεπώς, για τη χρήση του ιού στη γονιδιακή θεραπεία, έχουν καταβληθεί προσπάθειες κατασκευής ιικών strains με μεγαλύτερο δείκτη ασφαλείας και

ταυτόχρονα μικρή απώλεια της επιλεκτικότητας και αποτελεσματικότητας δράσης τους (7, 9, 10, 13). Υπό αυτό το σκεπτικό, επιδιώχθηκαν γενετικές στρατηγικές για τη δημιουργία VSV strains που συμβάλλουν στην αύξηση της παραγωγής IFN από τα μολυσμένα με ιό κύτταρα. Μία τέτοια στρατηγική είναι η εισαγωγή του γονιδίου της IFN-β στο γονιδίωμα του ιού που, με τον πολλαπλασιασμό του ιού VSV, συντελεί στην έκφραση πολύ υψηλών επιπέδων IFN-β από τα προσβεβλημένα καρκινικά κύτταρα (9).

Το κακόηθες μεσοθηλίωμα έχει γενικά κακή πρόγνωση και παρουσιάζει αντίσταση τόσο στη χημειοθεραπεία όσο και στην ακτινοθεραπεία; ωστόσο, το γεγονός ότι παραμένει εντοπισμένο στην πλευριτική κοιλότητα ακόμα και σε προχωρημένα στάδια, καθιστά το κακόηθες μεσοθηλίωμα δυνητικά πολύ καλό στόχο γενετικής ή ογκολυτικής ιοθεραπείας, όπως έχει καταφανεί από τις προκλινικές και κλινικές μελέτες μας (23, 24). Η ερευνητική μας ομάδα του εργαστηρίου έρευνας όγκων του θώρακος (Thoracic Oncology Research Laboratory at the University of Pennsylvania) έχει διεξάγει προκλινικές και κλινικές μελέτες σε όγκους μεσοθηλιώματος με έναν μη πολλαπλασιαζόμενο αδενοϊό ποθ εκφράζει το γονίδιο της ανθρώπινης INF-β (25, 26). Έχουμε παρατηρήσει ισχυρή αντικαρκινική δράση που μεσολαβείται κυρίως μέσω φλεγμονής έναντι του ιού σε συνδυασμό με την παραγωγή και έκκριση της IFN-β από τα μολυσμένα με ιό καρκινικά κύτταρα, που οδηγεί τόσο σε εγγενείς όσο και σε επίκτητες ανοσολογικές αντικαρκινική αντιδράσεις. Η διερεύνηση ενός πολλαπλασιαζόμενου ικού φορέα-εκφραστή του γονιδίου της IFN-β (π.χ. VSV.hIFN-β) παρουσίαζε συνεπώς ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ερευνητική ομάδα μας.

Υποθέσαμε ότι ένας πολλαπλασιαζόμενος ικός φορέας-εκφραστής της IFN-β θα επιφέρει επιπρόσθετη αντικαρκινική δράση μέσω ενισχυμένης έκφρασης της IFN-β (amplified transgene expression) και άμεσης ογκόλυσης από τον ιό. Δεδομένης της ανάδυσης του VSV ως δυνητικά υποσχόμενου αντικαρκινικού παράγοντα και της διαθεσιμότητας του ικού strain VSV-human IFN-β, διεξάγαμε αυτήν τη μελέτη για να διερευνήσουμε (1) την ικανότητα του VSV να λύει κύτταρα ανθρώπινου μεσοθηλιώματος και (2) την καταλληλότητα του VSV.hIFN-β για κλινική μετάφραση.

## 4.2. Υλικά και Μέθοδοι

### *Κυτταρικές σειρές*

**Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μεσοθηλιώματος.** Οι ανθρώπινες σειρές OK1, OK2, OK5, OK6 και OK7 χορηγήθηκαν από την Dr. Claire Verschaegen (University of New Mexico). Οι σειρές H2052, I-45 και MSTO αγοράστηκαν από το American Tissue Type Collection (Manassas, VA). Οι σειρές Pt108, REN, LRK και M30 προήλθαν από ασθενείς με μεσοθηλίωμα στο University of Pennsylvania. Οι σειρές OK1, OK2, OK5, OK6, OK7, M30, REN, LRK, H2052 και MSTO καλλιιεργήθηκαν με το μέσο καλλιέργειας Roswell Park Memorial Institute (RPMI) με 10% πλάσματος εμβρύου βοός (fetal bovine serum), 2mM L-γλουταμίνης και 2mM πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης. Τα κύτταρα I-45 καλλιιεργήθηκαν με το ίδιο μέσο καλλιέργειας με την προσθήκη 0.1M μη απαραίτητων (nonessential) αμινοξέων (Invitrogen, Carlsbad, CA). Τα κύτταρα Pt 108 διατηρήθηκαν σε E-medium, που αποτελείται από το μέσο καλλιέργειας RPMI 1640 και 10μg/ml ινσουλίνης, 10mg/ml τρανσφερρίνης, 10μM αιθανολαμίνης, 10ng/ml σελήνιο, 2mM γλουταμίνης, 10mM 4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζίνιο-αιθανο-σουλφονικό οξύ (HEPES) , 0.5mM πυροσταφυλικό νάτριο, 0.1mM μη-βασικά αμινοξέα (nonessential aminoacids),

πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 1ng/ml επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, 18ng/ml υδροκορτιζόνης και 0.1nM T3 ορμόνης.

**Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές φυσιολογικών μεσοθηλιακών κυττάρων.** Οι σειρές LP9, HM1 και HM3 χορηγήθηκαν από τον Dr. James Rheinwald (Dana Farber Cancer Institute); Αυτές οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε ειδικό μέσο καλλιέργειας με υδροκορτιζόνη (1000μg ανά 500ml) και επιδερμικό αυξητικό παράγοντα όπως έχει περιγραφθεί (27, 28). Τα κύτταρα PF1M προέκυψαν από την καλλιέργεια μη κακόηθους πλευριτικού υγρού στο ίδιο μέσο καλλιέργειας.

### ***Ιικά strains***

Τα ιικά strains VSV.mIFN-β και VSV.hINF-β περιγράφηκαν αρχικά από τον Obuchi et al. (2003). Το strain VSV.GFP παρήχθηκε όπως έχει περιγραφθεί από τους Diaz RM et al (2007). Τα ιικά strains παρασκευάστηκαν στο Core Viral Facility της Mayo Clinic (Rochester, MN). Όλα τα strains εκκολάφθηκαν σε Baby Hamster Kidney (BHK) κύτταρα και τιτλοποιήθηκαν με την προτυποποιημένη μέθοδο πλακών των κυττάρων BHK.

### ***MTT μέθοδος***

Για την εφαρμογή της μεθόδου 3-(4,5-διμεθυλοθιαζολο-2-)-2,5-διφαινυλοτετραζολοβρομιδίου (MTT), τα κύτταρα τοποθετήθηκαν και καλλιεργήθηκαν εις τετραπλούν σε πλακίδια με 96 υποδοχείς (96-well) (5000 κύτταρα /υποδοχέα σε RPMI ή Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] μέσο καλλιέργειας με 10% FBS) και μολύνθηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις ικών διαλυμάτων (multiplicities of infection MOIs) (10,1,0.1, 0.01 και 0) των ικών strains VSV.mIFN-β, VSV.hINF-β και VSV.GFP. Η βιωσιμότητα των προσβεβλημένων κυττάρων αξιολογήθηκε σε διαφορετικά χρονικά σημεία (24, 48 και 72h) ανάπτυξη της αντίδρασης της μεθόδου MTT κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή της μεθόδου (Promega, Madison, WI). Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 570nm και διορθώθηκε με βάση μία τιμή ελέγχου του χρησιμοποιούμενου μέσου καλλιέργειας.

### ***Μέθοδος πλακών***

Για να αξιολογήσουμε την ικανότητα του ικού strain VSV.hINF-β να πολλαπλασιάζεται σε κύτταρα μεσοθηλιώματος, κύτταρα LP9, REN και LRK εκτέθηκαν σε μία συγκέντρωση MOI 1 ικού φορτίου. Τα υπερκείμενα διαλύματα συλλέχθηκαν 24 ώρες αργότερα και τιτλοποιήθηκαν με την προτυποποιημένη τεχνική των πλακών σε κύτταρα BHK. Επιπλέον, κύτταρα PF1M, REN και LRK εκτέθηκαν σε ανθρώπινη IFN-β για 24 ώρες σε συγκέντρωση 1 και 10000U/ml, και ακολούθως εκτέθηκαν στο ικό strain VSV.GFP. Τα υπερκείμενα διαλύματα και τα κυτταρικά «lysates» συλλέχθηκαν 6,24 και 48 ώρες μετά από την αρχική έκθεση στον ιό και μετρήθηκε ο ικός τίτλος.

### ***Προετοιμασία mRNA της IFN-β και των γονιδίων που επάγονται από την IFN-β (MxA, 2'5'-OAS και PKR)***

Για να συλλεχθεί mRNA μετά από έκθεση στο strain VSV.GFP ή σε IFN-β για επεξεργασία με τη μέθοδο real-time PCR, T25 πλαστικά φλασκία με κύτταρα REN, LRK και LP9 (1.3 x 10<sup>6</sup> κύτταρα/φλασκίο) χρησιμοποιήθηκαν ως control, εκτέθηκαν στο ιικό strain VSV.GFP σε συγκέντρωση MOI 10 ή σε 2.5ml διαλύματος ανθρώπινης IFN-β 10U/ml σε μέσο καλλιέργειας RPMI/10% FBS ή DMEM/10% FBS. Μετά από 1 ώρα έκθεσης, το υπερκείμενο διάλυμα με τον ιό αναρροφήθηκε, τα κύτταρα «πλύθηκαν» με PBS δύο φορές και χορηγήθηκαν 2.5ml μέσου καλλιέργειας RPMI σε κάθε φλασκίο για 5 ώρες. Μετά από 6 ώρες από την στιγμή έκθεσης στον ιό ή στην IFN-β, το μέσο καλλιέργειας αναρροφήθηκε και τα κύτταρα υπεστησαν λύση με TRIzol Reagent (Invitrogen) χρησιμοποιώντας 300μL σε κάθε φλασκίο. Για κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 3 φλασκία, τα οποία συνδυάστηκαν σε ένα τελικό διάλυμα 1ml. Τα δείγματα ψύχθηκαν στους -80 οC.

Ολικό RNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή και ακολούθησε διαχωρισμός του DNA με επεξεργασία με DNAase I (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Η απομόνωση υψηλής ποιότητας RNA επιβεβαιώθηκε με ανάλυση μικρής ποσότητας κάθε δείγματος σε gel φορμαλδεΐδης/αγαρόζης/EtBr.

### ***Real-time RT-PCR***

Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του mRNA πραγματοποιήθηκε με RT-PCR. Τρία μικρογραμμάρια ολικού RNA υπέστησαν ανάστροφη μεταγραφή σε συμπληρωματικό cDNA, χρησιμοποιώντας Oligo(dT)15 primer(Promega) και SuperScript III ανάστροφη μεταγραφάση(Invitrogen), ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το cDNA κανονικοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα της β-ακτίνης, της γλυκεραλδεΐδης-3-φωσφορδεϋδρογενάσης (GAPDH) ή του 18S rRNA και ακολούθησε ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA των όγκων, όπως έχει περιγραφεί (29). Προσδιορίστηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης καθενός από τα συγκεκριμένα γονίδια (αναλογία έκφρασης μεταξύ κυττάρων εκτεθιμένων στο VSV.GFP ή στην IFN-β και κυττάρων ελέγχου). Η ποσοτικοποίηση έγινε 4 φορές σε κάθε δείγμα και το πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον 1 φορά με το Smart Cycler System (Cepheid, Sunnyvale, CA). Τα primers σχεδιάστηκαν με βάση τις αλληλουχίες cDNA και γενωμικού DNA που είναι διαθέσιμες στη GenBank.

### ***Πειράματα προέκθεσης στην IFN-β***

Κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλακίδια με 96 υποδοχείς (5000κύτταρα/υποδοχέα) και καλλιεργήθηκαν κατά τη διάρκεια μίας νύχτας. Την επόμενη ημέρα, το καλλιεργητικό μέσο αναρροφήθηκε και προστέθηκαν διαλύματα ανθρώπινης IFN-β σε καλλιεργητικό μέσο RPMI ή DMEM και σε διάφορες συγκεντρώσεις (1, 10, 100, 500, 1000 και 10000U/ml). Η δραστηριότητα της IFN-β ήταν 5pg/unit. Μετά 24 ώρες εκκόλαψης με IFN-β, τα διαλύματα IFN-β αναρροφήθηκαν και τα κύτταρα εκτέθηκαν στο ιικό strain VSV.GFP σε συγκέντρωση MOI 0.05. Σε τέσσερις υποδοχείς καλλιεργήθηκαν κύτταρα που εκτέθηκαν στο strain VSV.GFP χωρίς προέκθεση στην IFN-β και τέσσερις ακόμα υποδοχείς καλλιεργήθηκαν κύτταρα με μέσο καλλιέργειας ως control, χωρίς έκθεση στο ιικό strain ή στην IFN-β. Πραγματοποιήθηκε η μέθοδος MTT μετά 24 ώρες έκθεσης στο strain VSV.GFP.

### ***IFN-β ELISA***



Κύτταρα REN, LRK και LP9 ( $1 \times 10^6$ ) τοποθετήθηκαν σε πλακίδια 6 υποδοχέων εις τριπλούν και καλλιεργήθηκαν με μέσο καλλιέργειας RPMI ή DMEM κατά τη διάρκεια μίας νύχτας. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα εκτέθηκαν στα ιικά strain VSV.GFP και VSV.hIFN- $\beta$  σε συγκεντρώσεις MOI 1 με ολικό όγκο ιικού διαλύματος 100 $\mu$ L. Μετά 1 ώρα, το υπερκείμενο ιικό διάλυμα αναρροφήθηκε, τα φλασκία «πλύθηκαν» με PBS δύο φορές και τα κύτταρα καλύφθηκαν με 400 $\mu$ L μέσου καλλιέργειας RPMI ή DMEM. 24 ώρες μετά την έκθεση στα ιικά strain, το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 13000 στροφές/λεπτό για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και αποθηκεύτηκε στους -80 oC. Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ανθρώπινης IFN- $\beta$  με τη μέθοδο ELISA σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή (PBL InterferonSource).

### ***Βιομέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της IFN- $\beta$***

Ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα μεσοθηλιώματος εκτέθηκαν στο ιικό strain VSV.GFP σε συγκέντρωση MOI 10 και τα υπερκείμενα διαλύματα συλλέχθηκαν μετά 24 ώρες έκθεσης. Το ιικό φορτίο των διαλυμάτων αδρανοποιήθηκε με θέρμανση στους 56 oC για 30 λεπτά. Κύτταρα REN τοποθετήθηκαν σε πλακίδια με 96 υποδοχείς (5000 κύτταρα/υποδοχέα) και εκκολάφθηκαν με τα αδρανοποιημένα με θέρμανση υπερκείμενα διαλύματα για 24 ώρες. Τα διαλύματα αναρροφήθηκαν και τα κύτταρα εκτέθηκαν στο ιικό strain VSV.GFP σε συγκέντρωση MOI 10 για 48 ώρες. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε μέθοδος MTT για να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων REN μετά από προέκθεση στα υπερκείμενα διαλύματα και ακολούθως έκθεση στο VSV.GFP. Τα επίπεδα ανθρώπινης h.IFN- $\beta$  στα υπερκείμενα διαλύματα προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου MTT με μία προτυποποιημένη καμπύλη που βασίστηκε σε γνωστές συγκεντρώσεις h.IFN- $\beta$ . Για τη δημιουργία αυτής της καμπύλης, κύτταρα REN καλλιεργήθηκαν σε πλακίδια 96 υποδοχέων (5000 κύτταρα/υποδοχέα), εκκολάφθηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις h.IFN- $\beta$  από 0.01U μέχρι 10U/ml σε μέσο καλλιέργειας RPMI και ακολούθως εκτέθηκαν στο ιικό strain VSV.GFP σε συγκέντρωση MOI 10 για 48 ώρες. Η ευαισθησία αυτής της μεθόδου ήταν 0.01U/ml h.IFN- $\beta$ .

### ***Πειράματα με ποντίκια***

Αγοράστηκαν ποντίκια με Σοβαρή Συνδυασμένη Ανοσοανεπάρκεια (SCID) από το Wistar Institute (Philadelphia, PA). Σε τρεις ομάδες ποντικών SCID (n=6-8 ανά ομάδα) έγιναν υποδόριες ενέσεις με  $1 \times 10^6$  (REN ή MSTO) κύτταρα στη γλουτιαία χώρα. Όταν οι όγκοι έφτασαν το μέγεθος των 200mm<sup>3</sup>, πραγματοποιήθηκαν ενέσεις εντός των όγκων με μέσο ελέγχου ή με  $6.6 \times 10^8$  pfu ιικού strain σε 100 $\mu$ L PBS (VSV.mIFN- $\beta$  ή VSV.hIFN- $\beta$ ) μία φορά την εβδομάδα για τρεις συνεχόμενες εβδομάδες. Το μέγεθος των όγκων μετρήσαν δύο φορές την εβδομάδα με ρυθμισμένους κανόνες και τα ποντίκια παρακολουθούνταν για την ανάπτυξη πιθανής τοξικότητας. Τα ποντίκια υπόκεινταν σε ευθανασία εάν παρουσιαζόταν τοξικότητα ή το μέγεθος του όγκου ξεπερνούσε τα 1500mm<sup>3</sup>. Η Επιτροπή Χρήσης Ζώων του University of Pennsylvania ενέκρινε όλα τα πρωτόκολλα με βάση τον Οδηγό για τη Φροντίδα και Χρήση Εργαστηριακών Ζώων.

### ***Blocks κυττάρων μεσοθηλιώματος από πνευμονικές συλλογές ασθενών***

Για να αναλύσουμε δείγματα από ασθενείς, παραλάβαμε δείγματα πλευριτικών συλλογών από ασθενείς με μεσοθηλίωμα που συμμετείχαν στη Φάση I της κλινικής μελέτης ενδοπλευρικής χορήγησης ενός αδεονοϊού που εκφράζει το γονίδιο της IFN-β (Ad. IFN-β) (26). Συλλέχθηκαν δείγματα πριν και 24 ώρες μετά τη χορήγηση του Ad. IFN-β, όταν τα επίπεδα IFN-β εντός του πλευρικού υγρού ήταν εξαιρετικά υψηλά. Για να αξιολογηθούν τα κύτταρα, το υγρό του δείγματος από κάθε πλευριτική συλλογή φυγοκεντρήθηκε στις 1500 στροφές/λεπτό και το καθίζημα των κυττάρων διαλύθηκε σε αγαρόζη 1% και PBS. Τα διαλύματα σταθεροποιήθηκαν με 1% φορμαλίνης κατά τη διάρκεια μίας νύχτας και αργότερα σταθεροποιήθηκαν σε παραφίνη για ανοσοϊστοχημικό staining.

### ***Ανοσοϊστοχημεία***

Block κυττάρων, σταθεροποιημένων με φορμαλίνη και παραφίνη, και μία σειρά δειγμάτων από όγκους μεσοθηλιώματος (από το Mesothelioma Research Bank [CDC NIOSH 1-U19-OH009077 Mesothelioma Virtual Bank for Translational Research, Pittsburgh, PA]) μικροτμήθηκαν σε πάχος τομών 5 μm και τοποθετήθηκαν σε slides μικροσκοπίου. Η συγκεκριμένη σειρά όγκων μεσοθηλιώματος περιλάμβανε 48 δείγματα τα οποία τμήθηκαν εις τριπλούν.

Τα block κυττάρων και οι τομές ιστών αποπαραφινολογήθηκαν με ξυλένιο και επαενυδατώθηκαν με βύθισμα σε διαλύματα με αυξανόμενη συγκέντρωση αλκοόλης. Τα slides τοποθετήθηκαν σε δοχείο coplin με 10mM κιτρικού νατρίου (pH 6) με σκοπό την αποκάλυψη αντιγονικών θέσεων και τοποθετήθηκαν σε microwave για 5 λεπτά μέχρι να επιτευχθεί θερμοκρασία βρασμού. Τα slides εκτέθηκαν σε κατάλληλο ορό για 30 λεπτά πριν από την έκθεση στο κύριο αντίσωμα. Τα κύρια αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το anti-p48 (sc-496; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-STAT1 (sc-592; Santa Cruz Biotechnology), anti-IFNAR1 (ab45172; Abcam, Cambridge, MA), anti-PKR (sc-100378, Santa Cruz Biotechnology) και το anti-OAS1 (sc-100639; Santa Cruz Biotechnology). Μετά από εκκόλαψη με τα κύρια αντισώματα στους 4 οC κατά τη διάρκεια μίας νύχτας, τα slides «πλύθηκαν» δύο φορές με PBS και ακολούθησε έκθεση σε διάλυμα 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου για 30 λεπτά προς αδρανολογία της ενδογενούς δραστηριότητας υπεροξειδάσης. Οι τομές εκτέθηκαν στα κατάλληλα βιοτινυλιωμένα δευτερογενή αντισώματα (1:200 διάλυση) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα slides «πλύθηκαν» ξανά και ακολούθως εκτέθηκαν σε υπεροξειδάση για 30 λεπτά (Victor Elite, Burlingame, CA). Μετά από ένα τελευταίο «πλύσιμο» σε PBS, τα block κυττάρων και οι τομές ιστών εκτέθηκαν σε υπόστρωμα 3,3' διαμινοβενζιδίου (DAB) (0.02% DAB, 0.005% υπεροξειδίου του υδρογόνου) για 1-5 λεπτά για την ανάπτυξη χρωματομετρικής αντίδρασης, βυθίστηκαν σε αιματοξυλίνη και ακολούθως καλύφθηκαν με γυάλινα λεπτά φύλλα που επικολλήθηκαν με Aqua-poly. Ο ανοσοαντιδραστικός βαθμός/score για κάθε τομή υπολογίστηκε με βάση το τροποποιημένο σύστημα Remmele.

### ***Τροποποιημένο βαθμολογικό σύστημα Remmele***

Χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση x20 για την αξιολόγηση των slides από δύο παρατηρητές. Η αξιολόγηση έγινε «τυφλά» ως προς τα γνωρίσματα των δειγμάτων και την προέκθεση στο ιικό strain Ad. IFN-β. Το ανοσοαντιδραστικό score υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας το βαθμό του ποσοστού με το βαθμό έντασης του staining (30). Ο βαθμός ποσοστού υποδηλώνει το ποσοστό των κυττάρων με θετικό staining ως εξής : 76-100% κυττάρων, βαθμός 4 ; 50-75% κυττάρων, βαθμός 3 ; 26-50%, βαθμός 2 ; 0-25%, βαθμός 1.

Παράδειγμα του βαθμού της έντασης staining φαίνεται στην Εικόνα 4<sup>A</sup>, με μία διαβάθμιση από 0 (μηδενικό staining) έως 3+ (ισχυρά θετικό staining). Ανοσοαντιδραστικό score 0-2 υποδηλώνει απουσία ή πολύ χαμηλή έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

### **Στατιστική ανάλυση**

Για τη σύγκριση διαφορών μεταξύ ομάδων των πειραμάτων με RT-PCR και του μεγέθους όγκων γλουτιαίας χώρας χρησιμοποιήσαμε unpaired student t-tests. Για τα πειράματα με όγκους της γλουτιαίας χώρας όπου συγκρίναμε περισσότερες από δύο ομάδες, χρησιμοποιήσαμε analysis of variance with appropriate post hoc testing. Σημαντικές θεωρήθηκαν διαφορές με  $p < 0.05$ . Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος  $\pm$  σταθερά απόκλισης του μέσου όρου.

## **4.3 Αποτελέσματα της μελέτης**

### ***Ογκολυτική δράση των ιικών strains του VSV in vitro σε κύτταρα μεσοθηλιώματος***

Δοκιμάστηκε in vitro η ευαισθησία στη λύση μη εξαλλαγμένων σειρών ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων και ανθρώπινων σειρών μεσοθηλιώματος από τα ιικά strain του VSV. Ως strain ελέγχου, χρησιμοποιήσαμε ένα ιικό strain που εκφράζει την ανοσοφθορίζουσα πρωτεΐνη green fluorescent protein (VSV.GFP) ή την murine IFN- $\beta$  (VSV.mIFN- $\beta$ ). Το strain VSV.mIFN- $\beta$  αποτελεί ιδανικό strain ελέγχου για το VSV.hIFN- $\beta$ , διότι οι ιντερφερόνες εμφανίζουν ενεργότητα μόνο στα κύτταρα του είδους από το οποίο προέρχονται χωρίς διασταυρούμενη δράση. Το ιικό strain που δοκιμάσαμε εξέφραζε ανθρώπινη IFN- $\beta$  (VSV.hIFN- $\beta$ ).

Μελετήθηκαν τέσσερις μη εξαλλαγμένες σειρές ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων, PF1M, MH3, HM1 και LP9 (Εικ. 1A). Η σειρά PF1M παράχθηκε στο εργαστήριό μας. Σαρανταοχτώ (48) ώρες μετά την ιική προσβολή (σε ιική συγκέντρωση MOI 0.1), τα strains VSV.mIFN- $\beta$  και VSV.GFP (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται) προκάλεσαν κυτταρικό θάνατο περίπου στο 50% των φυσιολογικών πρωτογενών ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων (PF1M), αλλά μόνο περιορισμένο κυτταρικό θάνατο στις υπόλοιπες τρεις μη εξαλλαγμένες κυτταρικές σειρές. Όλες αυτές οι κυτταρικές σειρές εμφάνισαν απόλυτη αντίσταση στη λύση από το strain VSV.hIFN- $\beta$ .

Μελετήθηκαν δώδεκα κυτταρικές σειρές ανθρώπινου μεσοθηλιώματος. Οι σειρές Pt108, M30, REN και LRK είναι πρωτογενείς κυτταρικές σειρές που παρήχθησαν στο εργαστήριό μας και χρησιμοποιήθηκαν μόνο μετά από μικρό αριθμό κυτταρικών κύκλων πολλαπλασιασμού. Παρατηρήθηκαν τρεις τύποι αντιδράσεων στην προσβολή από τα ιικά strains. Τρεις από τις σειρές (Ομάδα 1: Pt 108, OK1 και OK2) εμφάνισαν σημαντική αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο είτε από το strain VSV.mIFN- $\beta$  είτε από το VSV.hIFN- $\beta$  και συνεπώς προσομοιάζουν με την αντίδραση των φυσιολογικών μεσοθηλιακών κυττάρων. Πέντε σειρές μεσοθηλιώματος (Ομάδα 2: OK4, OK6, OK7, M30, REN) παρουσίασαν ενδιάμεση ευαισθησία (50-75%) στον κυτταρικό θάνατο από το VSV.mIFN- $\beta$ , αλλά απόλυτη αντίσταση στο θάνατο από το VSV.hIFN- $\beta$ . Τέσσερις σειρές μεσοθηλιώματος (Ομάδα 3: H2052, LRK, I45 και MSTO) παρουσίασαν υψηλή ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο τόσο από το VSV.mIFN- $\beta$ , όσο και από το VSV.hIFN- $\beta$ . Επιπλέον δεδομένα για διαφορετικές ικές συγκεντρώσεις MOIs και για διαφορετικά χρονικά διαστήματα ικής εκθεσης παρουσιάζονται στην Συμπληρωματική εικόνα Fig. S1 (διαθέσιμη online στο [www.liebertonline/hum](http://www.liebertonline/hum)).

Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν ότι η IFN-β προστατεύει τα φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα από την λύση μέσω του VSV, αλλά επίσης προστατεύει άνω του 50% των κυτταρικών σειρών μεσοθηλιώματος που μελετήθηκαν.

### ***Ικανότητα του VSV να πολλαπλασιάζεται σε ανθρώπινα κύτταρα μεσοθηλιώματος***

Λόγω της διαφορετικής ευαισθησίας των κυτταρικών σειρών μεσοθηλιώματος στα ιικά strains του VSV, μελετήσαμε λεπτομερέστερα την ικανότητα του VSV.hIFN-β να πολλαπλασιάζεται σε μία μη εξαλλαγμένη σειρά μεσοθηλιακών κυττάρων (LP9), μία σειρά μεσοθηλιώματος ανθεκτική στη λύση από τον VSV.hIFN-β (REN) και μία σειρά ευαίσθητη στη λύση από τον VSV.hIFN-β (LRK). Αυτές οι κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν στον ιό VSV.hIFN-β σε συγκέντρωση MOI 1, και τα υπερκείμενα διαλύματα των καλλιέργειών συλλέχθηκαν μετά από 24 ώρες με σκοπό τη μέτρηση του ιικού φορτίου με τη χρήση της μεθόδου πλακών. Το υπερκείμενο διάλυμα της καλλιέργειας των κυττάρων LP9 περιήχε  $1 \times 10^4$  pfu/ml/1 εκατομμύριο κύτταρα, ενώ το διάλυμα των REN περιήχε  $1.35 \times 10^6$  pfu/ml/1 εκατομμύριο κύτταρα, αποτελέσματα συμβατά με περιορισμένο πολλαπλασιασμό του ιού. Αντιθέτως ο πολλαπλασιασμός του VSV.hIFN-β στα κύτταρα LRK ήταν σημαντικά εντονότερος ( $1.55 \times 10^8$  pfu/ml/1 εκατομμύριο κύτταρα) και μεγαλύτερος κατά 2 λογαρίθμους σε σύγκριση με τα REN και 4 λογαρίθμους σε σύγκριση με τα LP9 κύτταρα.

### ***Αξιολόγηση της λειτουργικότητας των αντικών προστατευτικών κυτταρικών «μονοπατιών» της IFN-β***

Τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν με την υπόθεση ότι η παραγωγή της IFN-β από τον VSV.hIFN-β αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και κατ'επέκταση την ογκόλυση ορισμένων καρκινικών κυττάρων, υποσημαίνοντας μία μερική ευαισθησία τους στην προστατευτική αντική δράση της IFN. Συνεπώς αξιολογήσαμε την αντική δράση της IFN-β σε αντιπροσωπευτικές σειρές μεσοθηλιώματος εκθέτοντας τις σειρές αυτές στη δράση της IFN-β για 24h και ακολούθως ελέγχοντας την ικανότητα του ιού VSV.GFP να πολλαπλασιάζεται και να προκαλεί λύση αυτών των κυτταρικών σειρών.

Οι μη εξαλλαγμένες κυτταρικές σειρές ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων (LP9 και HM1) παρουσίασαν ανθεκτικότητα στη ογκόλυση από το VSV.GFP με ή χωρίς προηγούμενη έκθεση στην ανθρώπινη INF-β (**Εικ. 1B**). Αντιθέτως, προηγούμενη έκθεση στην IFN-β σε συγκέντρωση 1U και 500U/ml για 24ώρες συνέβαλε σε σχεδόν πλήρη προστασία των κυτταρικών σειρών μεσοθηλιώματος της Ομάδας 2 OK6 και REN από την ογκόλυση μέσω του VSV (**Εικ. 1B και C**). Η IFN-β φάνηκε ότι προστατεύει επίσης την σειρά M30; ωστόσο η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε με την έκθεση στις υψηλές συγκεντρώσεις των 500U/ml της IFN-β. Αντιθέτως, προ-έκθεση στην IFN-β δεν προστατέψα τις σειρές H2052 και LRK της Ομάδας 3 από την ογκολυτική δράση του ιού VSV.GFP. (**Εικ. 1B και C**). Μάλιστα αυτές οι σειρές υπέστησαν κυτταρικό θάνατο από τον VSV.GFP ακόμα και με προ-έκθεση σε 10.000U/ml της IFN-β (Συμπληρωματική Εικόνα Fig. S2, διαθέσιμη online στο [www.liebertonline.com/hum](http://www.liebertonline.com/hum)). Εξάιρεση αποτέλεσε η προστασία των κυττάρων MSTO, αλλά μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις άνω των 1000U/ml προ-έκθεσης σε ανθρώπινη IFN-β (Συμπληρωματική Εικόνα Fig. S2).

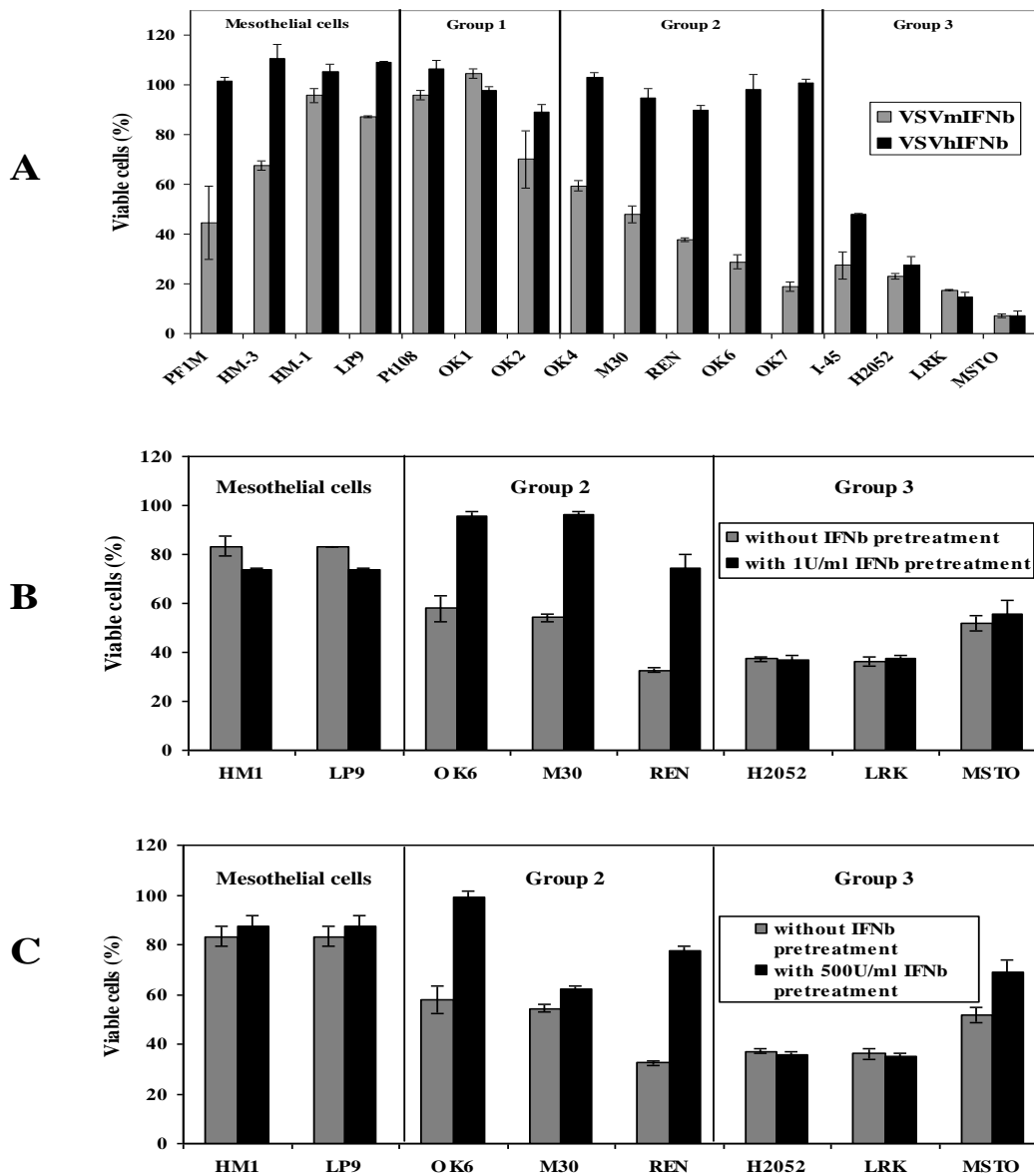
Για να επιβεβαιώσουμε ότι η αντική προστασία μέσω της IFN-β οφείλεται σε μείωση του πολλαπλασιασμού του ιού εντός των κυττάρων, μετρήσαμε το ιικό φορτίο (ιικός τίτλος) στις καλλιέργειες των κυττάρων μεσοθηλιώματος (REN και LRK) και των μεσοθηλιακών κυττάρων

(PF1M) μετά από ιική προσβολή τους με τον VSV.GFP (**Πίνακας 1**). Στη σειρά μεσοθηλιακών κυττάρων PF1M (**Πίνακας 1A**), ο αρχικός ιικός τίτλος 1 ώρα μετά την ιική προσβολή ήταν  $2.8 \times 10^3$  pfu/ml/10<sup>6</sup> κύτταρα. Ο ιικός πολλαπλασιασμός κορυφώθηκε στις 48 ώρες, με τίτλο που έφτασε τα  $2.5 \times 10^5$  pfu/ml/10<sup>6</sup> κύτταρα (αύξηση κατά 2 λογαρίθμους). Ο ιικός πολλαπλασιασμός ανεστάλη σημαντικά με προ-έκθεση σε 1U IFN-β (150 φορές) ή σε 10000U IFN-β (340 φορές). Στη μερικώς ευαίσθητη σειρά REN (**Πίνακας 1B**), ο αρχικός ιικός τίτλος 1 ώρα μετά την ιική προσβολή ήταν  $1.3 \times 10^4$  pfu/ml/10<sup>6</sup> κύτταρα. Ο ιικός πολλαπλασιασμός κορυφώθηκε νωρίτερα στις 24 ώρες, με τίτλο που έφτασε τα  $1.25 \times 10^6$  pfu/ml/10<sup>6</sup> κύτταρα (αύξηση κατά 2 λογαρίθμους). Σε αυτήν την περίπτωση, η προ-έκθεση σε 1U IFN-β είχε μηδενική επίδραση στον πολλαπλασιασμό του ιού; ωστόσο προ-έκθεση σε 10000U IFN-β ανέστειλε σημαντικά τον ικό πολλαπλασιασμό (1000 φορές). Στην υψηλής ανθεκτικότητας στη δράση της IFN-β κυτταρική σειρά LRK (**Πίνακας 1C**), ο αρχικός ιικός τίτλος 1 ώρα μετά την ιική προσβολή ήταν  $9 \times 10^2$  pfu/ml/10<sup>6</sup> κύτταρα. Ωστόσο, ο ιικός πολλαπλασιασμός ήταν εξαιρετικά ταχύς, με κορύφωση στις 6 ώρες, όταν ο ιικός τίτλος έφτασε τα  $8.5 \times 10^4$  pfu/ml/10<sup>6</sup> κύτταρα (αύξηση κατά 2 λογαρίθμους). Σε αυτό το σημείο, προ-έκθεση στην IFN-β δεν είχε καμία επίδραση στον ικό πολλαπλασιασμό; Μάλιστα ο ιικός τίτλος μετρήθηκε υψηλότερος στα  $1 \times 10^5$  pfu/ml/10<sup>6</sup> κύτταρα. Ακόμα και στις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις των 10000U IFN-β, ο ιικός πολλαπλασιασμός ανεσταλή κατά λιγότερο από 3 φορές.

Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι ορισμένες κυτταρικές σειρές μεσοθηλιώματος έχουν μία μερικώς ή πλήρως ενεργή λειτουργικότητα των αντιικών «μονοπατιών» της IFN-β που τα προστατεύει από την ιική ογκόλυση, αναστέλλοντας τον ικό πολλαπλασιασμό εντός του καρκινικού κυττάρου.

### ***Ογκολυτική δράση του VSV in vivo***

Ακολουθώντας εξετάσαμε τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα του VSV in vivo χρησιμοποιώντας τις 2 κυτταρικές σειρές που μπορούσαν να αναπτυχθούν ως ξενομοσχεύματα σε ανοσοκατασταλαμμένα SCID ποντίκια. Ο VSV.mIFN-β προκάλεσε κυτταρικό θάνατο και στις δύο σειρές in vitro, αν και η σειρά MSTO παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία. Ωστόσο, ο VSV.hIFN-β προκάλεσε θάνατο μόνο στη σειρά MSTO in vitro, ενώ η σειρά REN παρουσίασε αντίσταση στο ίδιο strain in vitro. Όταν οι γλουτιαίοι όγκοι έφτασαν τα 200mm<sup>3</sup> σε μέγεθος, πραγματοποιήθηκαν ενέσεις εντός των όγκων με φυσιολογικό ορό ή ιικά strains σε συγκέντρωση  $6.6 \times 10^8$  pfu σε εβδομαδιαία διαστήματα. Οι όγκοι MSTO που υπέστησαν ενέσεις είτε με VSV.mIFN-β ή VSV.hIFN-β παρουσίασαν στατιστικά σημαντική ( $p < 0.05$ ) αναστολή της ανάπτυξής τους (περίπου κατά 75%) σε σύγκριση με τους όγκους ελέγχου. (**Εικ. 2A**). Η αναστολή ανάπτυξης των όγκων ήταν ποσοτικά παρόμοια και για τα δύο strains (VSV.mIFN-β και VSV.hIFN-β). Οι όγκοι REN που υπέστησαν ενέσεις με VSV.mIFN-β παρουσίασαν στατιστικά σημαντική ( $p < 0.01$ ) αναστολή της ανάπτυξής τους (περίπου κατά 80%) σε σύγκριση με τους όγκους ελέγχου (**Εικ. 2B**). Ωστόσο οι REN όγκοι που υπέστησαν ενέσεις με τον VSV.hIFN-β δεν ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότεροι σε μέγεθος ( $p = 0.2$ ) σε σχέση με τους όγκους ελέγχου και ήταν στατιστικά μεγαλύτεροι ( $p < 0.05$ ) σε σχέση με τους όγκους που υπέστησαν ενέσεις με τον VSV.mIFN-β.



**Figure 1**

**Εικόνα 1. (A)** Ευαισθησία των ανθρώπινων κυττάρων μεσοθηλιώματος σε strain του Vesicular Stomatitis Virus (VSV) in vitro. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε πλακίδια με 96 υποδοχείς (5000 κύτταρα /υποδοχέα) και εκκολάφθηκαν με VSV που εξέφραζε την IFN-β ποντικού ή ανθρώπου ( VSV.mIFN-β [γκρι μπάρες] ή VSV.hIFN-β [μαύρες μπάρες]) σε μία συγκέντρωση MOI 0.1. Εφαρμόστηκε η μέθοδος 3-(4,5-διμεθυλοθιαζολο-2-)-2,5-διφαινυλοτετραζολοβρομιδίου (MTT) μετά από 48 ώρες έκθεσης στον ιό και προσδιορίστηκε το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων. Τα δεδομένα του σχήματος εκφράζονται ως ο μέσος όρος±σταθερά απόκλισης του μέσου όρου. **(B και C)** Εκτίμηση της ικανότητας της IFN-β να αναστέλλει την ογκόλυση που προκαλείται από τον VSV. Τα κύτταρα προ-εκτέθηκαν σε ανθρώπινη IFN-β σε συγκεντρώσεις 1 και 500

Units/ml για 24 ώρες και μετά εκτέθηκαν στο strain VSV.GFP σε συγκέντρωση MOI 0.05 για 48 ώρες. Η μέθοδος MTT εφαρμόστηκε για το προσδιορισμό των βιώσιμων κυττάρων. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε εις τετραπλούν. Τα δεδομένα του σχήματος εκφράζονται ως ο μέσος όρος<sup>α</sup>- σταθερά απόκλισης του μέσου όρου.

### Πίνακες 1 A, B, C

**Πίνακας 1A. Ιικός τίτλος σε καλλιέργεια PF1M φυσιολογικών μεσοθηλιακών κυττάρων που προεκτέθηκαν σε IFN-β και ακολούθως στο ιικό strain Vesicular Stomatitis Virus που κωδικοποιεί την ανοσοφθορίζουσα πρωτεΐνη Green Fluorescent Protein.**

Interferon-β (U/ml)	Ιικός τίτλος	
	1 ώρα <sup>α</sup>	48 ώρες <sup>α</sup>
0	2800	250.000
1	ΔΜ	1.700
10.000	ΔΜ	730

**Πίνακας 1B. Ιικός τίτλος σε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος REN που προεκτέθηκε σε IFN-β και ακολούθως στο ιικό strain Vesicular Stomatitis Virus που κωδικοποιεί την ανοσοφθορίζουσα πρωτεΐνη Green Fluorescent Protein.**

Interferon-β (U/ml)	Ιικός τίτλος		
	1 ώρα <sup>α</sup>	24 ώρες <sup>α</sup>	48 ώρες <sup>α</sup>
0	13.000	1.250.000	220.000
1	ΔΜ	1.100.000	2.300
10.000	ΔΜ	950	2.050

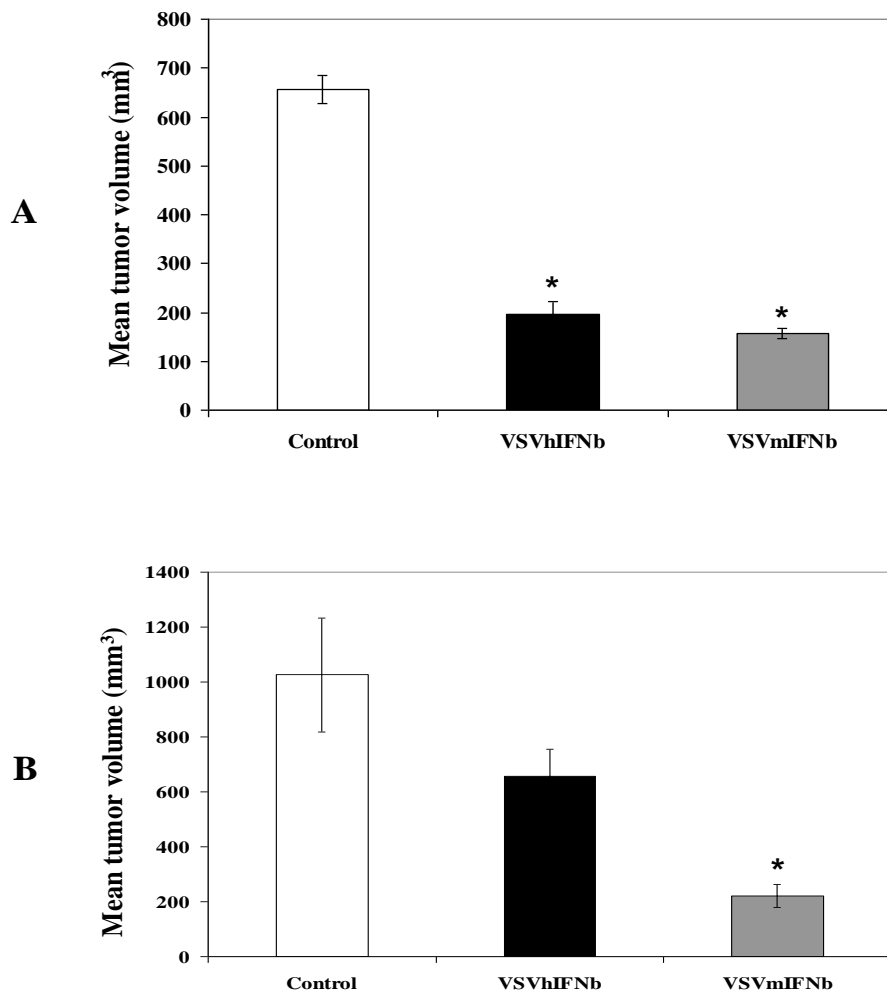
**Πίνακας 1C. Ιικός τίτλος σε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς μεσοθηλιώματος LRK που προεκτέθηκε σε IFN-β και ακολούθως στο ιικό strain Vesicular Stomatitis Virus που κωδικοποιεί την ανοσοφθορίζουσα πρωτεΐνη Green Fluorescent Protein.**

Interferon-β (U/ml)	Ιικός τίτλος			
	1 ώρα <sup>α</sup>	6 ώρες <sup>α</sup>	24 ώρες <sup>α</sup>	48 ώρες <sup>α</sup>
0	900	85.000	80.000	3.200
1	ΔΜ	107.500	59.500	1.900
10.000	ΔΜ	29.000	11.000	2.050

Η μονάδα μέτρησης του ιικού φορτίου είναι pfu/ml/εκατομμύριο κύτταρα

Συντομογραφίες: ΔΜ, δε μετρήθηκε

α. Χρόνος μετά από την έναρξη έκθεσης στον ιό



**Figure 2**

**Εικόνα 2.** Επίδραση των ιικών strain του VSV στην ανάπτυξη ανθρώπινων αλλομοσχευμάτων όγκων μεσοθηλιώματος. Όγκοι της γλουτιαίας χώρας δημιουργήθηκαν με υποδόρια ένεση κυττάρων μεσοθηλιώματος των σειρών MSTO (**A**) ή REN (**B**) σε ποντίκια με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια SCID. Όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε τα 200mm<sup>3</sup>, διεξήχθησαν ενέσεις με ορό (λευκές μπάρες) ή με 6.6x10<sup>8</sup> pfu των VSV.mIFN- $\beta$  (γκρι μπάρες) και VSV.hIFN- $\beta$  (μαύρες μπάρες) σε 100 $\mu$ L PBS εβδομαδιαία για 3 συνεχόμενες εβδομάδες. Απεικονίζεται το μέγεθος των όγκων μία εβδομάδα μετά από την τελευταία ένεση. Ο αστερίσκος υποδηλώνει τις στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο μέγεθος των ογκων μεταξύ των όγκων ελέγχου (ορός) και των όγκων που έλαβαν φορτίο VSV.



## Μηχανιστικές μελέτες

Για να κατανοήσουμε την διαφορετικότητα της ανθεκτικότητας των κυττάρων μεσοθηλιώματος στην ιική προσβολή με τον ιό VSV.IFN-β, επικεντρώσαμε τις περαιτέρω μελέτες σε τρεις ανθρώπινες σειρές που φαίνεται να αντιπροσωπεύουν κάθε κατηγορία αντίδρασης στα ιικά strains VSV.mIFN-β και VSV.hIFN-β: (1) LP9, μη εξαλλαγμένη σειρά μεσοθηλιακών κυττάρων που είναι ανθεκτική και στα δύο strains; (2) REN, μία σειρά μεσοθηλιώματος ευαίσθητη στον VSV.mIFN-β, αλλά ανθεκτική στον VSV.hIFN-β; και (3) LRK, μία σειρά μεσοθηλιώματος ευαίσθητη και στα δύο strains.

### Ικανότητα των ανθρώπινων μεσοθηλιακών κυττάρων να παράγουν IFN-β mRNA και πρωτεΐνη ως απάντηση στην ιική προσβολή με τον VSV

Προσβάλαμε τα παραπάνω κύτταρα με VSV και αξιολογήσαμε την ικανότητα του ιού να προκαλεί την παραγωγή IFN-β mRNA. Αυτή η απάντηση αποτελεί έναν βασικό αντικό προστατευτικό μηχανισμό που διαμεσολαβείται μέσω του IRF3 «μονοπατιού» (10, 31). Πριν από την ιική προσβολή δεν υπήρχε ανιχνεύσιμο IFN-β mRNA σε καμία από τις κυτταρικές σειρές. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2**, ο VSV αύξησε την έκφραση του IFN-β mRNA στις σειρές LP9 και REN σε ανάλογο βαθμό. Αντιθέτως, τα κύτταρα LRK δεν παρουσίασαν καμία επαγωγή της IFN-β.

Μετά την ιική προσβολή από τον VSV, το mRNA της IFN-β μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, μεταφράζεται σε πρωτεΐνη και εκκρίνεται από το κύτταρο για να δράσει επάγοντας την έκφραση των ISGs (10, 31). Ο VSV έχει αναπτύξει μηχανισμούς (όπως η M πρωτεΐνη) για να αναστέλλει αυτήν τη μετάφραση, αν και φαίνεται ότι τα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν τουλάχιστον μερικώς να υπερβούν αυτήν την αναστολή. Δεδομένου ότι τόσο τα κύτταρα LP9 όσο και τα REN παράγουν παρόμοια μεγάλες ποσότητες του IFN-β mRNA μετά από προσβολή του VSV και ότι και οι δύο σειρές παρουσιάζουν ευαισθησία στη δράση της εξωγενούς IFN-β, προσπαθήσαμε να διαπιστώσουμε εάν τα επίπεδα της IFN-β πρωτεΐνης αυξάνονται μετά από προσβολή με τον ιό VSV. Προς αυτό το σκοπό, μετρήσαμε τα επίπεδα της IFN-β πρωτεΐνης στα υπερκείμενα διαλύματα των κυττάρων LP9, REN και LRK μετά από προσβολή τους με VSV.GFP με μία προτυποποιημένη μέθοδο ELISA. Τα επίπεδα IFN-β σε όλες αυτές τις σειρές ήταν υπό το ανιχνεύσιμο όριο της συγκεκριμένης μεθόδου (ουδός ανίχνευσης 25pg/ml ή 2.5U/ml). Έτσι χρησιμοποιήσαμε μία βιο-μέθοδο (bioassay) και συγκρίναμε την ικανότητα των υπερκείμενων διαλυμάτων (μετά από απενεργοποίηση του ιού εντός αυτών) να προστατεύουν κύτταρα REN από προσβολή με τον VSV.GFP σε σύγκριση με πολύ μικρές προτυποποιημένες συγκεντρώσεις IFN-β. Διαπιστώσαμε ότι αυτή η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης, μέχρι και 0.01U/ml της IFN-β. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2**, τα κύτταρα LP9, μετά από ιική προσβολή με τον VSV.GFP σε συγκέντρωση MOI 10 για 24 ώρες, παρήγαγαν 0.22U/ml της IFN-β ανά 1 εκατομμύριο κύτταρα, ενώ τα κύτταρα REN παρήγαγαν μόνο 0.01U/ml ανά 1 εκατομμύριο κύτταρα. Αντιθέτως τα κύτταρα LRK δεν παρήγαγαν καμία ανιχνεύσιμη ποσότητα IFN-β.

Τελικά, συγκρίναμε τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης IFN-β μετά από προσβολή με τον VSV.GFP με τα επίπεδα έκφρασης μετά από προσβολή με τον VSV.hIFN-β. Τα επίπεδα IFN-β μετά από 24 ώρες έκθεσης στον VSV.hIFN-β ανιχνεύτηκαν πολύ εύκολα στα υπερκείμενα διαλύματα των προσβεβλημένων κυττάρων; Ωστόσο τα επίπεδα έκφρασης παρουσίασαν σημαντική εξάρτηση από την ικανότητα του ιού να πολλαπλασιάζεται στα αντίστοιχα κύτταρα. Τα ευαίσθητα στη

λύση κύτταρα LRK παρήγαγαν περισσότερο από 353U/ml/10<sup>6</sup> κύτταρα στις 24 ώρες έκθεσης στον ιό VSV.hIFN-β σε συγκέντρωση MOI 1. Τα κύτταρα LP9 και REN παρήγαγαν ανιχνεύσιμες αλλά πολύ μικρότερες ποσότητες IFN-β, 5 και 7.2U/ml/10<sup>6</sup> κύτταρα αντιστοίχως.

**Πίνακας 2.** Αύξηση του mRNA και της πρωτεΐνης της IFN-β σε ανθρώπινες κυτταρικές μεσοθηλιώματος μετά από έκθεση στο ιικό strain VSV.GFP σε συγκέντρωση MOI 10 για 6 ώρες με τη χρήση real time RT-PCR ή για 24 ώρες με τη χρήση της βιομεθόδου της IFN-β.

Κυτταρικές σειρές	Επίπεδα mRNA (Fold Change)		Επίπεδα πρωτεΐνης IFN-β (U/ml/εκατομμύριο κυττάρων)	
	Ελεγχος	Έκθεση VSV.GFP <sup>α</sup>	Ελεγχος	Έκθεση VSV.GFP
LP9	μ/α	7325 +/- 6% <sup>β</sup>	μ/α	0.225
REN	μ/α	11428 +/- 12.5%	μ/α	0.007 ± 0.003
LRK	μ/α	μ/α <sup>γ</sup>	μ/α	μ/α

Συντομογραφίες : LP9, φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα; μ/α, μη ανιχνεύσιμα ; VSV.GFP, vesicular stomatitis virus expression green fluorescent protein.

α. Τα επίπεδα του mRNA εκφράζονται σε αυθαίρετες μονάδες.

β. Τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται ως μέσες τιμές τριών αξιών με +/- το συντελεστή διακύμανσης (SEM/mean).

γ. p value<0.05 compared to LP9.

### Ικανότητα των ανθρώπινων κυττάρων μεσοθηλιώματος να επάγουν την έκφραση mRNA των ISGs μετά από εξωγενή έκθεση σε ανθρώπινη IFN-β (hIFN-β)

Ακολούθως επιδιώξαμε να καθορίσουμε πώς αντιδρά κάθε μία κυτταρική σειρά στην έκθεση σε IFN-β προσδιορίζοντας την ικανότητα αυτών των κυττάρων να επάγουν και να συνθέτουν τα mRNAs τριών ISGs που έχουν χαρακτηριστεί πολύ καλά, MxA, 2'5'-OAS και PKR, που είναι γνωστό ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του VSV στα φυσιολογικά κύτταρα (10, 11, 24, 32). Εκθέσαμε τις κυτταρικές σειρές σε ανθρώπινη hIFN-β σε συγκέντρωση 10U/ml (περίπου 50pg/ml) για 6 ώρες και μετά συλλέξαμε τα κύτταρα με σκοπό να ποσοτικοποιήσουμε τα mRNA επίπεδα κάθε γονιδιού με τη μέθοδο real-time RT-PCR (Πίνακας 3Α).

Πριν από την έκθεση στην IFN-β, όλες οι κυτταρικές σειρές εξέφραζαν πολύ χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα mRNA των γονιδίων MxA και 2'5'-OAS. Παρατηρήθηκε ποικίλη έκφραση του γονιδιού PKR (Πίνακας 3Α). Ωστόσο μετά από την έκθεση στην IFN-β, τα κύτταρα LP9 και REN παρουσίασαν σημαντική επαγωγή του mRNA όλων των επαγόμενων από την IFN-β πρωτεϊνών. Η επαγωγή ήταν πιο δραματική στη σειρά LP9, με μία στατιστικά μικρότερη απάντηση (p<0.05) στη σειρά REN. Η επαγωγή όλων αυτών των mRNAs ήταν μηδενική στη σειρά LRK.

## Ικανότητα των ανθρώπινων κυττάρων μεσοθηλιώματος να επάγουν την έκφραση mRNA των ISGs μετά από ιική προσβολή με τον ιό VSV.GFP

Ακολούθως εξετάσαμε την ικανότητα του VSV να επάγει την έκφραση των ISGs (Πίνακας 3B) προσβάλλοντας τις σειρές LP9, REN και LRK με τον ιό VSV.GFP με συγκέντρωση ιικού φορτίου MOI 10. Έξι ώρες μετά την ιική προσβολή, ο VSV.GFP προκάλεσε επαγωγή της έκφρασης και των τριών ISG mRNAs στις σειρές LP9 και REN; ωστόσο ο βαθμός επαγωγής ήταν μικρότερος κατά 30-50% στην σειρά REN σε σύγκριση με τη σειρά LP9 ( $p < 0.05$ ). Σε συνέπεια με την έλλειψη αντίδρασης της σειράς LRK στην IFN- $\beta$ , δεν παρατηρήθηκε επαγωγή των ISGs μετά από προσβολή με τον VSV. Πρέπει να παρατηρηθεί ότι σε σύγκριση με τον Πίνακα 3A και σε συνέπεια με τα χαμηλά επίπεδα IFN- $\beta$  μετά από ιική προσβολή με τον VSV, τα επίπεδα επαγωγής των ISG mRNAs μετά από ιική προσβολή είναι πολύ χαμηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδα επαγωγής μετά από έκθεση σε 10U IFN- $\beta$ .

**Πίνακας 3.** Αύξηση των ρυθμιζόμενων από την IFN $\beta$  αντικών γονιδίων MxA, 2'5'OAS και PKR με τη χρήση real time RT-PCR σε ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα και σε κύτταρα μεσοθηλιώματος μετά από εκκόλαψη με 10 U/ml hIFN $\beta$  ή μετά έκθεση στο ιικό strain VSV.GFP σε συγκέντρωση MOI 10.

### 3A. Εκκόλαψη με 10μονάδες/ml hIFN $\beta$ για 6 ώρες

Κυτταρικές σειρές	MxA mRNA <sup>a</sup>		2'5'OAS mRNA		PKR mRNA	
	<u>Baseline</u>	<u>10U/ml</u>	<u>Baseline</u>	<u>10U/ml</u>	<u>Baseline</u>	<u>10U/ml</u>
LP9	μ/α	13,255+/-3.4% <sup>β</sup>	μ/α	14,463 +/-6.6%	615+/-9.1%	13,616 +/-3%
REN	13+/-12.2%	5,780 +/-16% <sup>γ</sup>	μ/α	3,392 +/-11.4% <sup>γ</sup>	45+/-9.7%	2,609 +/-17.7% <sup>γ</sup>
LRK	μ/α	μ/α <sup>γ</sup>	μ/α	μ/α <sup>γ</sup>	μ/α	μ/α <sup>γ</sup>

### 3B. Εκθεση στο ιικό strain VSV.GFP σε συγκέντρωση MOI 10 για 6 ώρες

Κυτταρικές σειρές	MxA mRNA <sup>a</sup>		2'5'OAS mRNA		PKR mRNA	
	<u>Ελεγχος</u>	<u>Εκθεση VSV.GFP</u>	<u>Ελεγχος</u>	<u>Εκθεση VSV.GFP</u>	<u>Ελεγχος</u>	<u>Εκθεση VSV.GFP</u>
LP9	μ/α	82+/-2.2% <sup>β</sup>	μ/α	105+/-1.7%	615+/-9.1%	958+/-1.7%
REN	13+/-12.2%	30+/-5.9% <sup>γ</sup>	μ/α	23+/-6.3% <sup>γ</sup>	45+/-9.7%	μ/α
LRK	μ/α	μ/α	μ/α	μ/α	μ/α	μ/α

Συντομογραφίες: MxA, μυξοϊός αντίστασης A; 2',5'-OAS, 2'-5'-ολιγο-αδενυλο-συνθετάση; PKR, διπλής-έλικας-RNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνκινάση; VSV.GFP, vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein.

- α. Τα επίπεδα του mRNA εκφράζονται σε αυθαίρετες μονάδες.  
β. Τα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται ως μέσες τιμές τριών αξιών με +/- το συντελεστή διακύμανσης (SEM/mean).  
γ. p value<0.05 compared to LP9.

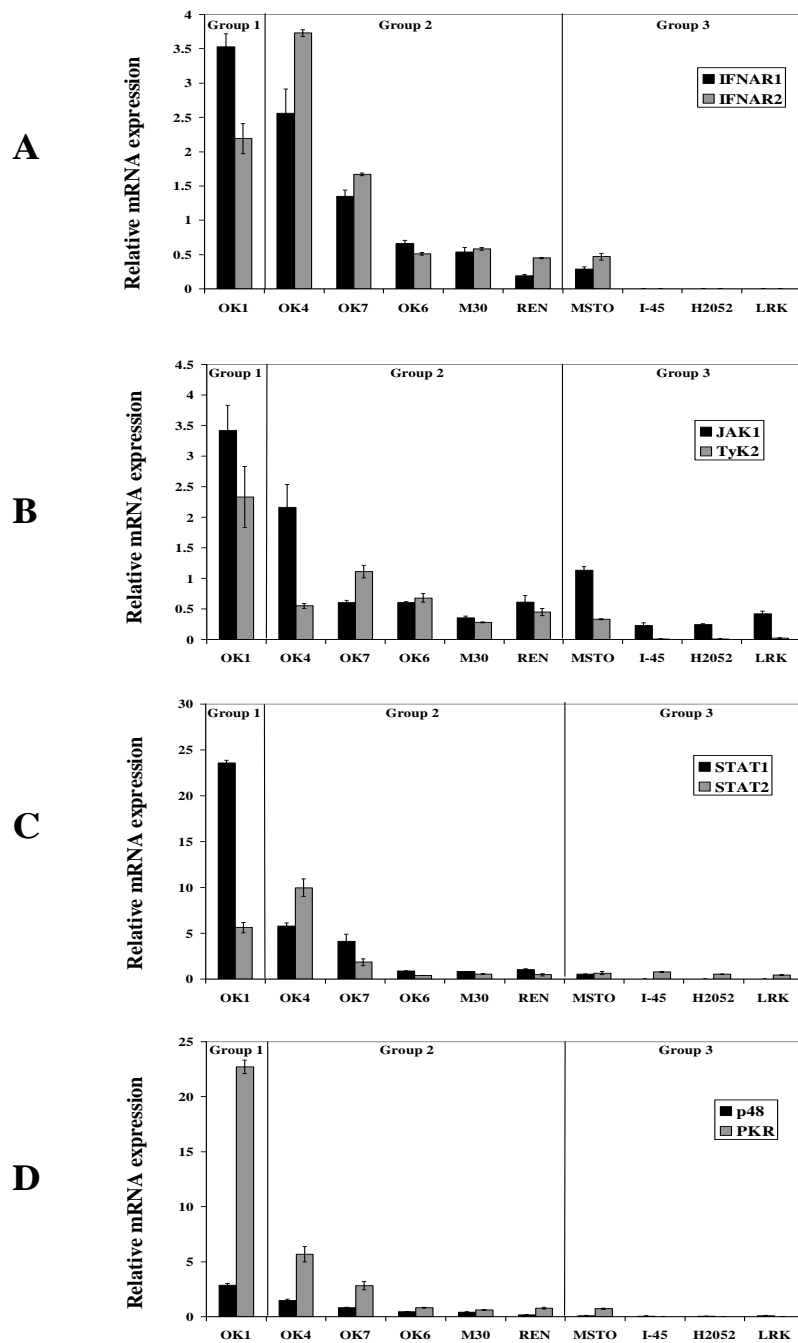
### **Βασικά επίπεδα έκφρασης mRNA διαφόρων συστατικών του «μονοπατιού» της IFN σε διάφορες ανθρώπινες σειρές μεσοθηλιώματος**

Η ετερογένεια της ευαισθησίας των διαφόρων σειρών μεσοθηλιώματος στη δράση της IFN θα μπορούσε να εξηγηθεί με την απώλεια βασικών «αγγελιαφόρων» συστατικών του «μονοπατιού» της IFN στα πλαίσια της διαδικασίας της ογκογένεσης (1-6) ή με την παραδοχή της παρουσίας λειτουργικών ελλειμμάτων στην απαντητικότητά τους στη δράση της IFN μετά από κατάλληλη έκθεση. Με στόχο την ανεύρεση βασικών ελλειμμάτων έκφρασης που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη (π.χ. με προσδιορισμό με PCR ή ανασοϊστοχημεία) ως βιολογικοί δείκτες ευαισθησίας/απαντητικότητας στην ογκολυτική δράση ιών, εξήγαμε ολικό RNA από 10 ανθρώπινες σειρές μεσοθηλιώματος και πραγματοποιήσαμε ποσοτική rt-PCR για να συγκρίνουμε τη βασική έκφραση διαφόρων βασικών «αγγελιαφόρων» συστατικών του «μονοπατιού» της IFN μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων μεσοθηλιώματος (PF1M) και των σειρών μεσοθηλιώματος (**Εικ. 3**). Η έφραση αυτών των mRNAs παρατηρήθηκε ότι ήταν πολύ υψηλή στην Ομάδα 1 των σειρών μεσοθηλιώματος, ενώ στην Ομάδα 2 η έκφραση ήταν παρόμοια με την έκφραση που παρατηρήθηκε στα φυσιολογικά κύτταρα μεσοθηλιώματος. Ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι τα IFNAR1, IFNAR2, Tyk2, STAT1, p48 και PKR mRNA επίπεδα ήταν σημαντικά υποεκφραζόμενα (downregulated) ή μη ανιχνεύσιμα σε τρεις μη ευαίσθητες στην IFN κυτταρικές σειρές μεσοθηλιώματος (H2052, I45 και LRK) σε σύγκριση με τα φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα. Η σειρά MSTO, μία σειρά που ανήκει στην Ομάδα 3 χωρίς ευαίσθησία στη δράση της IFN, παρουσίασε ανιχνεύσιμα επίπεδα των IFNRA1, IFNRA2, JAK1, STAT1, STAT2 και PKR, αλλά μη ανιχνεύσιμα επίπεδα του p48. Συμπερασματικά, αυτά τα αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι ελλείμματα στη βασική έκφραση βασικών συστατικών του «μονοπατιού» της τύπου I IFN σε ορισμένες κυτταρικές σειρές μεσοθηλιώματος μπορούν να εξηγήσουν την έλλειψη ευαισθησίας στη δράση της IFN και κατ'επέκταση την ευαισθησία αυτών των σειρών στην ογκολυτική δράση του VSV.hIFN-β.

### **Κατανομή των συστατικών πρωτεϊνών του «μονοπατιού» της IFN σε όγκους μεσοθηλιώματος**

Για να διαπιστώσουμε την αντιστοιχία των παραπάνω in vitro αποτελεσμάτων σε κλινικά δείγματα όγκων μεσοθηλιώματος, διεξάγαμε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι των IFNRA1, p48 και PKR σε mesothelioma tissue array 48 βιοψιών από όγκους μεσοθηλιώματος. Όπως περιγράφηκε στα «Υλικά και Μέθοδοι», για κάθε βιοψία, βαθμολογήσαμε την ένταση του staining (**Εικ. 4<sup>A</sup>** για το p48 αντίσωμα) και προσδιορίσαμε το ποσοστό των κυττάρων που ήταν θετικά για το staining και συνδυάσαμε αυτούς τους δύο παράγοντες σε έναν τελικό βαθμό ανοσοαντιδραστικότητας. Η κλίμακα ανοσοαντιδραστικότητας κυμαινόταν από 0-12 βαθμούς; οι βαθμοί 0-2 αντιστοιχίστηκαν σε μηδενική ή πολύ χαμηλή έκφραση της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Η εικόνα 5 δείχνει την κατανομή των ανοσοαντιδραστικών βαθμών για κάθε αντίσωμα. Παρατηρήθηκε ότι 26%, 31% και 24% των όγκων μεσοθηλιώματος είχαν μηδενική ή πολύ χαμηλή έκφραση των IFNAR1, p48 και PKR αντιστοίχως (**Εικ. 5 A-C**). Περίπου 50% των

όγκων μεσοθηλιώματος παρουσίασαν μηδενική βασική έκφραση τουλάχιστον ενός από τα βασικά συστατικά του «μονοπατιού» της IFN (Εικ. 5D).



**Figure 3**

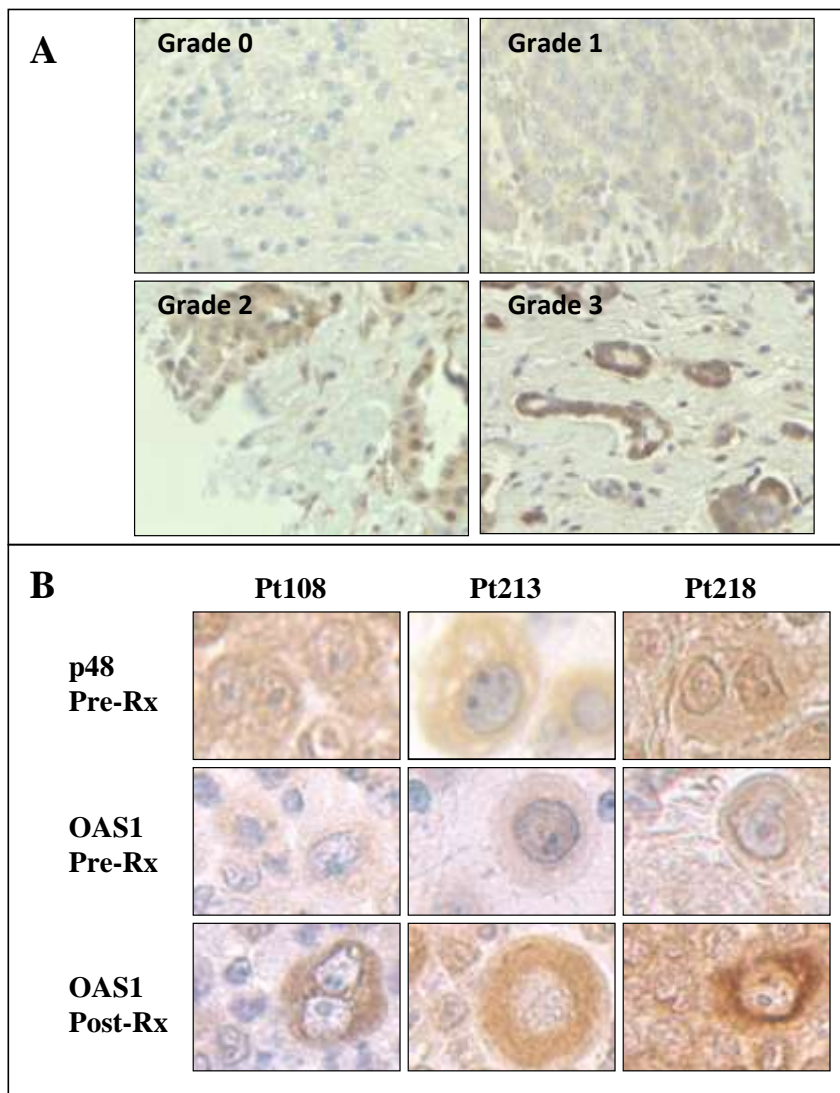
**Εικόνα 3.** Βασική έκφραση του mRNA των γονιδίων επαγόμενων από την IFN μεταξύ διαφόρων κυτταρικών σειρών μεσοθηλιώματος. Ολικό RNA εξήχθηκε από την κυτταρική σειρά φυσιολογικών μεσοθηλιακών κυττάρων, PF1M, καθώς και από 10 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μεσοθηλιώματος και χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση συμπληρωματικού cDNA. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα primer sets για τα γονίδια που επάγονται από την IFN: (A) IFNAR1, IFNAR2, (B) JAK1, Tyk2, (C) STAT1, STAT2, (D) p48 και PKR. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τετραπλούν και η ποσότητά του προσαρμόστηκε με βάση την έκφραση β-ακτίνης ή GAPDH. Η έκφραση του κάθε

γονιδίου κανονικοποιήθηκε με βάση την έκφρασή τους στη σειρά PF1M και το σχήμα δείχνει το “fold change” +/- σταθερά απόκλισης .

### **Απάντηση των κακοήθων κυττάρων μεσοθηλιώματος στη θεραπεία με IFN-β in vivo**

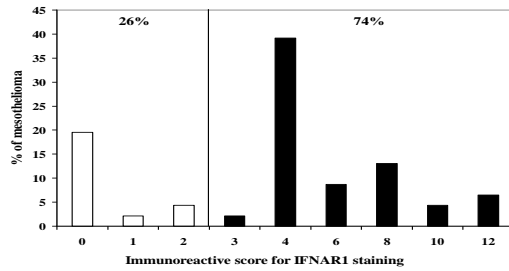
Για να διαπιστώσουμε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της βασικής έκφρασης των πρωτεϊνών του «μονοπατιού» της IFN και της ικανότητας του κακοήθους κυττάρου μεσοθηλιώματος να «απαντά» στην έκθεση σε IFN-β in vivo, χρησιμοποιήσαμε κλινικά δείγματα πλευριτικού υγρού από μία προηγούμενη κλινική μελέτη γενετικής θεραπείας που πραγματοποιήθηκε στο University of Pennsylvania, στην οποία ένας αδενοϊός που εξέφραζε ανθρώπινη IFN-β χορηγούνταν σε ασθενείς με μεσοθηλίωμα ενδοπλευρικά (26). Μπορέσαμε να βρούμε 3 ασθενείς με δείγματα πλευριτικού υγρού που περιείχαν κύτταρα μεσοθηλιώματος πριν και 1 ημέρα μετά τη χορήγηση του αδενοϊού (χρόνος κατά τον οποίο τα επίπεδα IFN-β ήταν πολύ υψηλά).

Κάναμε staining κάθε δείγματος για την πρωτεΐνη p48, που απέδωσε το πιο καθαρό staining και φάνηκε ότι ήταν ο πιο κατάλληλος προβλεπτικός δείκτης ευαισθησίας στη δράση της IFN στις κυτταρικές σειρές, καθώς και για την πρωτεΐνη OAS1 ως δείκτη ενεργότητας του μονοπατιού της IFN. Το staining αποκάλυψε ότι πριν από την έκθεση στον αδενοϊό-φορέα του γονιδίου της IFN-β, τα καρκινικά κύτταρα και των τριών ασθενών εμφάνισαν καθαρά ανιχνεύσιμη έκφραση του p48 (Εικόνα 4B και Συμπληρωματική Εικόνα S3, διαθέσιμη online στο website [www.liebertonline.com/hum](http://www.liebertonline.com/hum)) και πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης του OAS1. 24 ώρες μετά την γονιδιακή μεταφορά της IFN-β, η έκφραση του OAS1 αυξήθηκε (Εικ. 4B και Συμπληρωματική Εικ. S3). Δυστυχώς δεν καταφέραμε να βρούμε ένα δείγμα με μηδενική έκφραση του p48; ωστόσο αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι είναι δυνατό να προβλέψουμε την ευαισθησία των όγκων μεσοθηλιώματος, προσδιορίζοντας τα επίπεδα βασικής έκφρασης του p48.

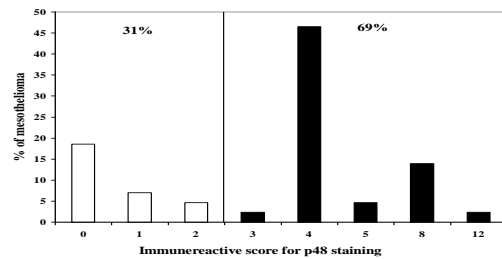


**Εικόνα 4.** Ανοσοϊστοχημεία όγκων μεσοθηλιώματος από ασθενείς. **(Α)** Πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημεία σε δείγματα όγκων μεσοθηλιώματος από 48 ασθενείς με ένα αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης p48. Παρατίθενται παραδείγματα του συστήματος βαθμολόγησης της έντασης του staining σε τομές από 4 ασθενείς (Βαθμός 0, μηδενικό staining, Βαθμός 3, ισχυρό staining) σε μεγέθυνση x20. **(Β)** Κύτταρα από την πλευριτική συλλογή 3 ασθενών που συμμετείχαν στην κλινική μελέτη του Ad.IFN-β φάσης I συλλέχθηκαν πριν και 24 ώρες μετά από την έκθεση στον ιικό φορέα. Πραγματοποιήθηκε staining των κυττάρων για την πρωτεΐνη p48 (ανώτερες φωτογραφίες) και για την πρωτεΐνη ολιγο-αδενυλο-συνθετάση-1 (OAS-1) πριν (μεσαίες φωτογραφίες) και 24 ώρες μετά από την έκθεση στον Ad.IFN-β (κατώτερες φωτογραφίες) για την εκτίμηση της ευαισθησίας στην IFN όπως θα μπορούσε να αξιολογηθεί από την αύξηση της OAS-1. Τα κύτταρα απεικονίζονται σε μεγέθυνση x100. Τα μεγάλα κύτταρα είναι κύτταρα μεσοθηλιώματος και τα μικρότερα είναι μακροφάγα. Και οι 3 ασθενείς είχαν εμφανή βασική έκφραση της πρωτεΐνης p48 και εμφανή αύξηση της έκφρασης της OAS-1 μετά από έκθεση στην IFN-β.

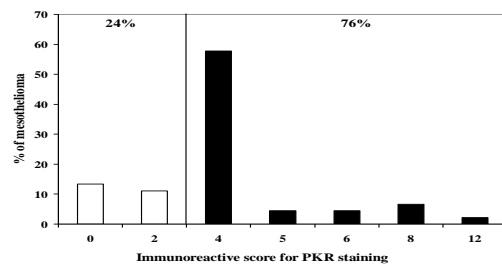
**A**  
**IFNAR1**



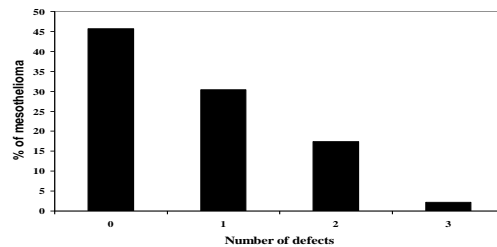
**B**  
**p48**



**C**  
**PKR**



**D**  
**Combined**



**Εικόνα 5.** Πραγματοποιήθηκε staining με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών IFNAR1 (**A**), p48 (**B**) και PKR (**C**) σε μία σειρά μικροτομών από 48 βιοψίες όγκων μεσοθηλιώματος και προσδιορίστηκε ένα ανοσοαντιδραστικός βαθμός (βλέπε τμήμα Μέθοδοι και Υλικά) για κάθε όγκο. (**A-C**) Η κατανομή του ανοσοαντιδραστικού βαθμού για κάθε αντίσωμα. Ανοσοαντιδραστικός βαθμός μικρότερος του 2 δηλώνει μηδενική ή πολύ χαμηλή έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. (**D**) Σχεδιάγραμμα του αριθμού των ελλειμμάτων των παραπάνω πρωτεϊνών ανά όγκο. 45% των όγκων δεν είχαν κανένα έλλειμμα, 30% είχαν ελλειμματικό staining για μία πρωτεΐνη και 25% είχαν ελλειμματικό staining για 2 ή 3 πρωτεΐνες.



#### 4.4. Συμπεράσματα

Η σπάνια αποτελεσματικότητα των σύγχρονων θεραπειών του κακοήθους μεσοθηλιώματος καθιστά απαραίτητη την ανεύρεση νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Οι προκλινικές μελέτες της ομάδας μας έχουν δείξει ότι η χορήγηση ιντερφερονών τύπου I με τη χρήση ενός αδενοϊού ως γονιδιακού φορέα προκαλεί ισχυρή αντικαρκινική ανοσολογική αντίδραση και είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην καταπολέμηση όγκων μεσοθηλιώματος σε μοντέλα ποντικών (25, 32, 33). Αυτή η αντικαρκινική δράση φαίνεται ότι υπάρχει και σε ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα. Ενδοπλευριτική χορήγηση ενός μη-πολλαπλασιαζόμενου αδενοϊού που εκφράζει το γονίδιο IFN-β σε ασθενείς με μεσοθηλίωμα ή κακοήγη πλευριτική συλλογή προκάλεσε την παραγωγή χυμικής και κυτταρικής αντικαρκινικής ανοσολογικής αντίδρασης και σε αξιολογη κλινική αποτελεσματικότητα (31). Δεδομένων των πιθανών προκλήσεων (τοξικότητα) σχετιζόμενων με την ενδοφλέβια χορήγηση ογκολυτικών ιών, όπως ο VSV (19) και της πιθανής πρόκλησης παραγωγής ουδετεροποιητικών αντισωμάτων έναντι του ιικού φορέα (34), η δυνατότητα ασφαλούς και αποτελεσματικής τοπικής χορήγησης ιικών φορέων γονιδιακής θεραπείας σε ασθενείς με όγκους της πλευριτικής κοιλότητας καθιστά το μεσοθηλίωμα έναν άριστο θεραπευτικό στόχο με τη χρήση γονιδιακής θεραπείας (19). Σε μία πρόσφατα ολοκληρωμένη εργασία (35), αποδείξαμε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια ενός ιικού φορέα VSV που εξέφραζε το γονίδιο της IFN ποντικών σε ένα μοντέλο μεσοθηλιώματος ποντικού. Πολύ σημαντικό σημείο είναι ότι η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανθεκτική στην δράση της IFN ποντικού και επομένως ο πολλαπλασιασμός του ιικού φορέα κατέστη δυνατός. Λόγω αυτού του πλεονεκτήματος του συγκεκριμένου ιικού φορέα σε ένα προκλινικό μοντέλο ποντικού, σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει την αντικαρκινική αποτελεσματικότητα του ιικού φορέα VSV.hIFN-β που εκφράζει το γονίδιο της ανθρώπινης IFN-β, σε μία μεγάλη σειρά ανθρώπινων κυτταρικών σειρών κακοήθους μεσοθηλιώματος.

Λαμβάνοντας υπόψη την ανάλογη του είδους δράση της IFN-β στον αντίστοιχο κυτταρικό υποδοχέα, προσδιορίσαμε την ευαισθησία ενός συνόλου ανθρώπινων κυτταρικών σειρών κακοήθους μεσοθηλιώματος στην ογκολυτική δράση του VSV.hIFN-β (που επιδρά μόνο στον ανθρώπινο υποδοχέα τύπου I IFN), καθώς και του VSV.mIFN-β (που επιδρά μόνο στον υποδοχέα τύπου I IFN του ποντικού). Εννιά από τις δώδεκα ανθρώπινες κυτταρικές σειρές υπέστησαν κυτταρική λύση από τον ιικό φορέα ελέγχου VSV.mIFN-β (καθώς και από ένα δεύτερο φορέα ελέγχου, τον VSV.GFP), ενώ οι τέσσερις μη-εξαλλαγμένες κυτταρικές σειρές μεσοθηλιακών κυττάρων παρουσίασαν μικρότερο βαθμό λύσης και τοξικότητας από τους ίδιους φορείς. (Εικ. 1<sup>A</sup>). Αυτά τα αποτελέσματα συμβαδίζουν με ευρήματα προηγούμενων μελετών που έχουν δείξει ότι τα καρκινικά κύτταρα, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα από τα οποία προέρχονται, είναι περισσότερο επιρρεπή σε κυτταρική λύση από τον ιό VSV (11, 13). Αυτό υποδηλώνει ότι η πλειοψηφία των κυτταρικών σειρών μεσοθηλιώματος έχουν κάποια ελλείμματα στο «μονοπάτι» των IFN. Επιπλέον, η κυτταρική λύση από τον VSV αναστάλθηκε τελείως στις μη-εξαλλαγμένες κυτταρικές σειρές μεσοθηλιακών κυττάρων όταν ο ιικός φορέας που χρησιμοποιήθηκε εξέφραζε το γονίδιο της ανθρώπινης IFN-β, εύρημα που υποστηρίζει την ιδέα της ενσωμάτωσης του γονιδίου της IFN με σκοπό της ενίσχυση της αντικαρκινικής προστασίας.

Ωστόσο παρατηρήθηκε ότι περισσότερο από το 50% των κυτταρικών σειρών μεσοθηλιώματος υπέστησαν μερική προστασία από την κυτταρόλυση μέσω του VSV με την παρουσία του γονιδίου της ανθρώπινης IFN-β, εύρημα που υποδηλώνει σημαντική ετερογένεια της απάντησης των καρκινικών κυττάρων μεσοθηλιώματος στη δράση της IFN-β. Διαπιστώσαμε την παρουσία 3 τύπων κυτταρικών σειρών μεσοθηλιώματος με βάση την απάντησή τους στη δράση της IFN-β.

Η ομάδα 1 κυττάρων μεσοθηλιώματος (3 από 12 σειρές) παρουσίασε αντίσταση στη λύση τόσο από τους ικούς φορείς VSV ελέγχου, όσο και στο φορέα VSV.hIFN-β, προσομοιάζοντας στις μη-εξαλλαγμένες σειρές φυσιολογικών μεσοθηλιακών κυττάρων. Η ομάδα 2 κυττάρων μεσοθηλιώματος (5 από 12 σειρές) υπέστησαν λύση από τους ικούς φορείς VSV ελέγχου, αλλά παρουσίασαν αντίσταση στη λύση από τον φορέα VSV.hIFN-β. Αντιθέτως, η ομάδα 3 κυτταρικών σειρών (4 από 12 σειρές) φαίνεται ότι παρουσίασε πλήρη αντίσταση στην αντική προστασία της IFN-β και συνεπώς τα κύτταρα υπέστησαν λύση τόσο από τους φορείς ελέγχου, όσο και από το φορέα VSV.hIFN-β. Αυτά τα *in vitro* ευρήματα συμπίπτουν με τα αποτελέσματα προκλινικών μελετών με όγκους μεσοθηλιώματος της γλουτιαίας χώρας ποντικών με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID). Χρησιμοποιώντας τη σειρά MSTO που χαρακτηρίζεται από αντίσταση στη δράση της IFN-β, η αύξηση των όγκων της γλουτιαίας χώρας ανεστάλη σημαντικά τόσο με τη χρήση του VSV.hIFN-β, όσο και με το φορέα VSV.mIFN-β (**Εικ. 2A**). Αντιθέτως, χρησιμοποιώντας τη σειρά REN, που χαρακτηρίζεται από μερική ευαισθησία στη αντική προστατευτική δράση της IFN-β, στο ίδιο μοντέλο, η αύξηση του μεγέθους των όγκων ανεστάλη σημαντικά με τη χορήγηση του φορέα VSV.mIFN-β, ενώ η χορήγηση του VSV.hIFN-β δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέγεθος των όγκων σε σχέση με τους όγκους ελέγχου (**Εικ. 2B**).

Η ετερογένεια στην ευαισθησία στις δράσεις των IFN τύπου I που παρατηρήθηκε στις παραπάνω κυτταρικές σειρές μεσοθηλιώματος έχει παρατηρηθεί σε μία ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως κυτταρικές σειρές μελανώματος (2, 4), λεμφώματος (5), καρκίνου ουροδόχου κύστης (6), καρκίνου του νεφρού (2) και καρκίνου προστάτη (14). Αυτή η παρατήρηση μελετήθηκε από την ομάδα του Stodjil et al. (2000), ο οποίος ανέλυσε ένα σύνολο 60 καρκινικών κυτταρικών σειρών από το National Cancer Institute (NCI). Βρήκαν ότι 81% των υπό εξέταση κυτταρικών σειρών ήταν «ανθεκτικές» στη δράση της IFN-α ή IFN-β, όπου «ανθεκτικότητα» ορίστηκε ως η αναποτελεσματικότητα της προέκθεσης σε 5 μονάδες της IFN να αυξήσει την αποτελεσματική συγκέντρωση EC50 του ιού VSV (wild-type) που απαιτείται για να επιφέρει κυτταρικό θάνατο μετά από 48ώρες έκθεσης στον ιό. Ωστόσο, οι διαβαθμίσεις ευαισθησίας στη δράση της IFN (μερική ή ολική) δεν αναλύθηκαν με ιδιαίτερη λεπτομέρεια. Σε σύγκριση με αυτή τη μελέτη, τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν την ύπαρξη μεγαλύτερου ποσοστού κυττάρων μεσοθηλιώματος που είναι ευαίσθητα στη δράση των IFN.

Η αιτιολογία αυτής της ετερογένειας διερευνήθηκε περισσότερο συγκρίνοντας τη μη-εξαλλαγμένη κυτταρική σειρά μεσοθηλιακών κυττάρων LP9, τη μερικώς ευαίσθητη στη δράση της IFN-β σειρά REN (Ομάδα 2) και την σειρά LRK (Ομάδα 3) που είναι ανθεκτική στη δράση της IFN-β. Η σειρά LRK παρουσίασε πολλαπλά ελλείμματα. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα LP9, το mRNA της IFN-β, όπως και η πρωτεΐνη της IFN-β δεν αυξήθηκαν μετά από έκθεση στον ιό VSV (**Πίνακας 2**). Ομοίως τα επίπεδα του mRNA των ISG (Interferon-Sensitive-Genes) δεν αυξήθηκαν μετά από έκθεση σε IFN-β (**Πίνακας 3A**) ή στον ιό VSV (**Πίνακας 3B**). Σε αντίθεση με τη σειρά LRK, η μερικώς ευαίσθητη στη δράση της IFN-β σειρά REN παρουσίασε ενδιάμεσες απαντήσεις στην έκθεση IFN-β ή στον ιό VSV. Αν και τα κύτταρα REN παρήγαγαν υψηλά επίπεδα IFN-β mRNA μετά από έκθεση στον ιό VSV (**Πίνακας 2**), η ικανότητά τους να αυξάνουν τα επίπεδα mRNA αντικών πρωτεϊνών που εξαρτώνται από την έκφραση της πρωτεΐνης IFN-β μετά από έκθεση στην IFN-β (**Πίνακας 3A**) και στον ιό VSV (**Πίνακας 3B**) ήταν σημαντικά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα που μετρήθηκαν στη μη-εξαλλαγμένη σειρά LP9. Αυτά τα ευρήματα παρουσιάζουν ομοιότητες με αντίστοιχα ευρήματα μίας εργασίας που διεκπεραιώθηκε σε ένα σύνολο κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος (30). Σε αυτήν την εργασία, φυσιολογικά ανθρώπινα αστροκύτταρα παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε

έκθεση στον ιό VSV, ενώ 4 από τις 5 κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος παρουσίασαν μεγάλη ευαισθησία στην λυτική δράση του ιού VSV, ακόμα και μετά από προ-έκθεση στην IFN- $\alpha$ . Όλες οι σειρές που υπέστησαν κυτταρική λύση από τον VSV παρουσίασαν ελλειμματική ικανότητα αύξησης των αντικών πρωτεϊνών, όπως η MxA, που ρυθμίζονται από την IFN, και το 50% των κυτταρικών σειρών είχαν ελλειμματική ικανότητα παραγωγής του mRNA της IFN- $\beta$  μετά από έκθεση στον ιό VSV.

Η αιτιολογία της ετερογένειας της ευαισθησίας των κυττάρων μεσοθηλιώματος στη δράση της IFN διερευνήθηκε περισσότερο με ποσοτική real-time PCR ανάλυση του mRNA των πρωτεϊνών-αγγελιαφόρων που συμμετέχουν στο «μονοπάτι» των IFN τύπου I με σκοπό τον προσδιορισμό πιθανών ελλειμμάτων του τις διάφορες σειρές μεσοθηλιώματος (Εικόνα 3). Τα κύτταρα μεσοθηλιώματος της Ομάδας 1 (ανθεκτικά σε όλα τα strain του VSV) παρουσίασαν εξαιρετικά υψηλά επίπεδα mRNA γονιδίων που ενεργοποιούν το «μονοπάτι» των τύπου I IFN σε σύγκριση με τα φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 3). Τα κύτταρα της Ομάδας 2 (ευαίσθητα στη λύση με τα strain ελέγχου του VSV, αλλά ανθεκτικά στη λύση από το VSV.hIFN- $\beta$ ) είχαν παρόμοια επίπεδα mRNA γονιδίων που ενεργοποιούν το «μονοπάτι» των τύπου I IFN σε σύγκριση με τα φυσιολογικά μεσοθηλιακά κύτταρα (Εικ. 3). Τα κύτταρα της Ομάδας 3 (ευαίσθητα στη λύση από τα strain ελέγχου VSV και από το VSV.hIFN- $\beta$ ) είχαν πολύ χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα mRNA σχεδόν των περισσότερων γονιδίων που ενεργοποιούν το «μονοπάτι» των τύπου I IFN. Αυτά τα αποτελέσματα (με την εξαίρεση της σειράς MSTO) υποδηλώνουν ότι υφίστανται ελλείμματα πολλαπλών συστατικών πρωτεϊνών του «μονοπατιού» των IFN, που μπορεί να εξηγήσει γιατί τα κύτταρα μεσοθηλιώματος της Ομάδας 3 δεν είναι ευαίσθητα στην αντική δράση της IFN.

Προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε αυτά τα ευρήματα και σε ασθενείς με όγκους μεσοθηλιώματος. Χρησιμοποιήσαμε ανοσοϊστοχημεία σε τομές δειγμάτων από 48 όγκους μεσοθηλιώματος για να προσδιορίσουμε τα βασικά επίπεδα έκφρασης τριών βασικών συστατικών πρωτεϊνών του «μονοπατιού» των τύπου I IFN που παρουσίασαν χαμηλή έκφραση στις κυτταρικές σειρές (IFNAR1, p48 και PKR), και διαπιστώσαμε ότι περίπου 50% των όγκων δεν παρουσίασαν κανένα έλλειμμα στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες (Εικ. 5D), υποδηλώνοντας πιθανή ευαισθησία αυτών των όγκων στις δράσεις των τύπου I IFN. Είναι ενδιαφέρον ότι η πρωτεΐνη p48 (που παρουσίαζε συστηματικά χαμηλή έκφραση σε όλες τις ανθεκτικές στην IFN κυτταρικές σειρές) κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14q. Μία πρόσφατη μελέτη «απώλειας ετεροζυγωτικότητας» από τους Rienzo et al. (36) έδειξε ότι περίπου 43% των όγκων μεσοθηλιώματος παρουσιάζουν απώλειες αλληλίων που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 14q, κάτι που πιθανώς μπορεί να εξηγήσει το παραπάνω εύρημα.

Χρησιμοποιώντας δείγματα από μία πρόσφατη κλινική μελέτη (26) ενδοπλευρικής χορήγησης αδενοϊού που κωδικοποιεί το γονίδιο της IFN- $\beta$  (Ad.IFN- $\beta$ ) σε ασθενείς με μεσοθηλίωμα, προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε αν η έκφραση της πρωτεΐνης p48 μπορεί να προβλέψει την παρουσία ευαισθησίας στις δράσεις της IFN. Σε τρία δείγματα με επαρκή ποσότητα κυττάρων, παρατηρήσαμε την παρουσία βασικής έκφρασης της p48 πρωτεΐνης χωρίς την επίδραση ιικής προσβολής, η οποία συσχετίστηκε με σημαντική αύξηση της εξαρτώμενης από την IFN πρωτεΐνης OAS μετά από έκθεση στον ικό φορέα Ad.IFN- $\beta$  (Εικ. 4 και συμπληρωματική Εικόνα S3). Αν και είναι απαραίτητες περισσότερες μελέτες (π.χ. σε δείγματα με μηδενική βασική έκφραση της πρωτεΐνης p48), αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν τον προσδιορισμό της βασικής έκφρασης πρωτεϊνών όπως η p48 με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας σε δείγματα όγκων ως δείκτη απαντητικότητας και ευαισθησίας στη λυτική δράση ικών φορέων που κωδικοποιούν το γονίδιο της IFN.

Μία κλινική μελέτη που προτείνει τη χρήση του VSV.hIFN-β σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο έχει ήδη υποβληθεί στο “DNA Recombinant Advisory Council” και είναι πιθανό ότι θα ακολουθήσουν και άλλες παρόμοιες προτάσεις . Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποστηρίζουν την οργάνωση κλινικών μελετών που θα εξετάσουν τη χρήση ιικών φορέων VSV σε ασθενείς με μεσοθηλιώμα; ωστόσο είναι πιθανό ότι οι όγκοι μεσοθηλιώματος θα παρουσιάζουν ετερογένεια ευαισθησίας στη λυτική δράση του συγκεκριμένου ιικού φορέα, κάτι που πιθανόν να καθιστά χρήσιμη την ανεύρεση βιοχημικών δεικτών που θα προβλέπουν την ευαισθησία κάθε όγκου μεσοθηλιώματος στη λύση από συγκεκριμένα ιικά strains του VSV («εξατομικευμένη ιατρική»). Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει την εξέταση δειγμάτων όγκων για τον προσδιορισμό της ικανότητάς τους να επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του VSV (37, 38); ωστόσο φαίνεται ότι η χρήση ανοσοϊστοχημείας ή PCR ανάλυσης σε βιοψίες όγκων για την ανεύρεση ελλειμμάτων βασικών συστατικών του «μονοπατιού» των IFN, όπως οι πρωτεΐνες IFNARs, Tyk2 ή p48 (4), φαίνεται να είναι πολύ πιο πρακτική λύση. Τα ευρήματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η εξέταση της ευαισθησίας ασθενών με όγκους μεσοθηλιώματος στην αντικική δράση της IFN πριν από την έναρξη θεραπείας είναι εφικτή. Αυτή η ανάλυση της ευαισθησίας στην IFN είναι πιθανόν να είναι χρήσιμη και στην πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας άλλων ογκολυτικών ιών (π.χ. ιός ιλάρας, ιός Newcastle Disease ή ρεοϊός), των οποίων η αποτελεσματικότητα της λυτικής δράσης εξαρτάται από την παρουσία ελλειμμάτων του «μονοπατιού» των IFN στα καρκινικά κύτταρα. Εκτός από τη χρησιμότητα της στην διάκριση ασθενών με μεσοθηλιώμα με τη πιθανότερη βέλτιστη απάντηση στη λυτική δράση του VSV, η γνώση της πληρότητας ή μη του «μονοπατιού» των IFN ενός όγκου μπορεί να επιφέρει περαιτέρω πρακτικές θεραπευτικές εφαρμογές. Η πρόσφατη μελέτη που έδειξε ότι η χρήση αναστολέων των αποακετυλιωτών των ιστονών αναστέλλει το «μονοπάτι» των IFN (38) υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο τους ως συμπαραγόντων σε ασθενείς με όγκους που έχουν μία υπολειπόμενη ευαισθησία στη δράση των IFN.

#### 4.5. Παραπομπές

- 1.Parato, KA, Senger, D, Forsyth, PA, Bell, JC. (2005). Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat. Rev. Canc.* **5**: 965-976.
2. Linge, C, Gewert, D, Rossmann, C, Bishop, JA, Crowe, JS. (1995) Interferon system defects in human malignant melanoma. *Cancer Res.* **55**: 4099-4104.
- 3.Pfeffer LM, Wang C, Constantinescu SN, Croze E, Blatt LM, Albino AP, Nanus DM. (1996). Human renal cancers resistant to IFN's antiproliferative action exhibit sensitivity to IFN's gene-inducing and antiviral actions. *J Urol.* **156**: 1867-1871.
- 4.Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiriou I, et al. (1997). Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem* **272** :28779-28785.
- 5.Sun WH, Pabon C, Alsayed Y, Huang PP, Jandeska S, Uddin S, Plataniias LC, Rosen ST. (1998) Interfeon-alpha resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT1 expression. *Blood* **91**: 570-576.

6. Matin SF, Rackley RR, Sadhukhan PC, Kim MS, Novick AC, Bandyopadhyay SK. (2001). Impaired alpha-interferon signaling in transitional cell carcinoma: lack of p48 expression in 5637 cells. *Cancer Res* **61**: 2261-2266.
7. Stojdl, DF, Lichty, BD, TenOever, BR, et al. (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*. **4**: 263-275.
8. Russell, SJ. (2002) RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther*. **9**: 961-966.
9. Obuchi M, Fernandez M, Barber GN. (2003). Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *J Virol* **77**: 8843-8856.
10. Lichty BD, Power AT, Stojdl DF, Bell JC. (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med* **10**: 210-216.
11. Balachandran S, Barber GN. (2000). Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* **50**: 135-138.
12. Balachandran S, Porosnicu M, Barber GN. (2001). Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *J Virol* **75**: 3474-3479.
13. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, et al. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* **6**: 821-825.
14. Ahmed M, Cramer SD, Lyles DS. (2004). Sensitivity of prostate tumors to wild type and M protein mutant vesicular stomatitis viruses. *Virology* **330**: 34-49.
15. Ebert O, Harbaran S, Shinozaki K, Woo SL. (2005). Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer Gene Ther* **12**: 350-358.
16. Ebert O, Shinozaki K, Huang TG, Savontaus MJ, Garcia-Sastre A, Woo SL. (2003). Oncolytic vesicular stomatitis virus for treatment of orthotopic hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *Cancer Res* **63**: 3605-3611.
17. Huang TG, Ebert O, Shinozaki K, Garcia-Sastre A, Woo SL. (2003). Oncolysis of hepatic metastasis of colorectal cancer by recombinant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Mol Ther* **8**: 434-440.
18. Shinozaki K, Ebert O, Kournioti C, Tai YS, Woo SL. (2004). Oncolysis of multifocal hepatocellular carcinoma in the rat liver by hepatic artery infusion of vesicular stomatitis virus. *Mol Ther* **9**: 368-376.

19. Lun X, Senger DL, Alain T, et al. (2006). Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV(deltaM51)) on multifocal and invasive gliomas. *J Natl Cancer Inst* **98**: 1546-1557.
20. Bergman I, Griffin JA, Gao Y, Whitaker-Dowling P. (2007). Treatment of implanted mammary tumors with recombinant vesicular stomatitis virus targeted to Her2/neu. *Inter. J. Canc.* **121**: 425-430.
21. Wu Y, Lun X, Zhou H, et al. (2008). Oncolytic efficacy of recombinant vesicular stomatitis virus and myxoma virus in experimental models of rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res* **14**: 1218-1227.
22. Sung CK, Choi B, Wanna G, Genden EM, Woo SL, Shin EJ. (2008). Combined VSV oncolytic virus and chemotherapy for squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* **118**: 237-242.
23. Serman DH, Albelda SM. (2005). Advances in the diagnosis, evaluation, and management of malignant pleural mesothelioma. *Respirology* **10**: 266-283.
24. Serman DH, Gillespie CT, Carroll RG, Coughlin CM, Lord EM, Sun J, Haas A, Recio A, Kaiser LR, Coukos G, June CH, Albelda SM, Vonderheide RH. (2006). Interferon beta adenoviral gene therapy in a patient with ovarian cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **3**: 633-639.
25. Odaka M, Wiewrodt R, DeLong P, Tanaka T, Zhang Y, Kaiser L, Albelda S. (2002). Analysis of the immunologic response generated by Ad.IFN-beta during successful intraperitoneal tumor gene therapy. *Mol Ther.* **6**: 210-218.
26. Serman DH, Recio A, Carroll RG, et al. (2007). A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses. *Clin Cancer Res* **13**: 4456-4466.
27. Connell ND, Rheinwald JG. (1983). Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells: reversible loss of keratin and increase in vimentin during rapid growth in culture. *Cell* **34**: 245-253.
28. Murphy JE, Rheinwald JG. (1997). Intraperitoneal injection of genetically modified, human mesothelial cells for systemic gene therapy. *Hum Gene Ther* **8**: 1867-1879.
29. Jassar, A., Suzuki, E., Kapoor, V., et al. (2005) Activated Tumor-Associated Macrophages and CD8<sup>+</sup> T-cells are the Key Mediators of Anti-tumor Effects of the Vascular Disrupting Agent 5,6 Di-methylxanthenone-4-acetic Acid (DMXAA) in Murine Models of Lung Cancer and Mesothelioma. *Cancer Res.*, **65**: 11752-11761.
30. Remmele, W., and Stegner, H.E. (1987). Recommendations for a uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathology* **8**, 138-140.

31. Decker T, Stockinger S, Karaghiosoff M, Muller M, Kovarik P. (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest* **109**: 1271-1277.
32. Brin E, Atencio I, Helmich BK, Maneval D, Laface D. (2006) Adenovirus delivery provides extended interferon-alpha exposure and augments treatment of metastatic carcinoma. *Cancer Gene Ther*. **13**: 664-75.
33. Ahmed, C.M.I., D.E. Johnson, G.W. Demers, H. Engler, J.A. Howe, K.N., Wills, S.F. Wen, J. Shinoda, J. Beltran, M. Nodelman, T. Machemer, D.C., Maneval, T.L. Nagabhusan, B.J. Sugarman. (2001). Interferon alpha2b gene delivery using adenoviral vector causes inhibition of tumor growth in xenograft models from a variety of cancers. *Cancer Gene Ther* **8**: 788-795.
34. Power AT, Wang J, Falls TJ, et al. (2007). Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Mol Ther* **15**: 123-130.
35. Willmon, C.L., Saloura, V., Fridlender, Z.G., Wongthida, P., Diaz, R.M., Thompson, J., Kottke, T., Federspiel, M., Barber, G., Albelda, S.M., and Live, R.G. (2009). Expressino of IFN- $\beta$  enhances both efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus (VSV) for therapy of mesothelioma. *Cancer Res*. 69, 7713-7720.
36. De Rienzo, A, Jhanwar SC, and Testa JR. (2000) Loss of Heterozygosity Analysis of 13q and 14q in human malignant mesothelioma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **28**:337-341.
37. Wollmann G, Robek MD, van den Pol AN. (2007). Variable deficiencies in the interferon response enhance susceptibility to vesicular stomatitis virus oncolytic actions in glioblastoma cells but not in normal human glial cells. *J Virol* **81**: 1479-1491.
38. Nguyen T, Abdelbary H, Arguello M, et al. (2008). Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis. *Proc. Natl Acad Sci, USA*, **105**: 14981-14986.

## **5. ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΜΕΛΕΤΗΣ (4)**



## Evaluation of an Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Vector Expressing Interferon- $\beta$ for Use in Malignant Pleural Mesothelioma: Heterogeneity in Interferon Responsiveness Defines Potential Efficacy

Vassiliki Saloura,<sup>1,\*</sup> Liang-Chuan S. Wang,<sup>1,\*</sup> Zvi G. Fridlender,<sup>1</sup> Jing Sun,<sup>1</sup> Guanjun Cheng,<sup>1</sup> Veena Kapoor,<sup>1</sup> Daniel H. Serman,<sup>1</sup> Ronald N. Harty,<sup>2</sup> Atsushi Okumura,<sup>2</sup> Glen N. Barber,<sup>3</sup> Richard G. Vile,<sup>4</sup> Mark J. Federspiel,<sup>4</sup> Stephen J. Russell,<sup>4</sup> Leslie Litzky,<sup>5</sup> and Steven M. Albelda<sup>1</sup>

### Abstract

Vesicular stomatitis virus (VSV) has shown promise as an oncolytic agent, although unmodified VSV can be neurotoxic. To avoid toxicity, a vector was created by introducing the interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) gene (VSV.IFN- $\beta$ ). We conducted this study to determine the ability of VSV.IFN- $\beta$  to lyse human cancer (mesothelioma) cells and to evaluate the potential of this recombinant virus for clinical translation. Four normal human mesothelial and 12 mesothelioma cell lines were tested for their susceptibility to VSV vectors *in vitro*. VSV.hIFN- $\beta$  did not cause cytotoxicity in any normal lines. Only 4 of 12 lines were effectively lysed by VSV.hIFN- $\beta$ . In the eight resistant lines, pretreatment with IFN- $\beta$  prevented lysis of cells by VSV.GFP, and VSV infection or addition of IFN- $\beta$  protein resulted in the upregulation of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), myxovirus resistance A (*MxA*), and 2',5'-oligo-adenylate-synthetase (2'5'-OAS) mRNA. In the susceptible lines, there was no protection by pretreatment with IFN- $\beta$  protein and no IFN- or VSV-induced changes in PKR, *MxA*, and 2'5'-OAS mRNA. This complete lack of IFN responsiveness could be explained by marked downregulation of interferon alpha receptors (IFNARs), p48, and PKR in both the mesothelioma cell lines and primary tumor biopsies screened. Presence of p48 in three tumor samples predicted responsiveness to IFN. Our data indicate that many mesothelioma tumors have partially intact IFN pathways that may affect the efficacy of oncolytic virotherapy. However, it may be feasible to prescreen individual susceptibility to VSV.IFN- $\beta$  by immunostaining for the presence of p48 protein.

### Introduction

ONCOLYTIC VIROTHERAPY is an emerging platform in cancer therapeutics (Parato *et al.*, 2005). A group of small unmodified RNA viruses, including vesicular stomatitis virus (VSV), demonstrate inherent specificity for tumor cells which appears to be due, in part, to defective innate antiviral host defense mechanisms in tumor cells (Russell, 2002). These RNA viruses are normally relatively nonpathogenic because of their high sensitivity to the antiviral actions of type I interferons (IFNs). IFN- $\beta$ , produced by normal cells as a result of viral

infection, upregulates the expression of IFN-stimulated antiviral genes (ISGs), such as myxovirus resistance A (*MxA*), 2',5'-oligo-adenylate-synthetase (2'5'-OAS), and double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), and subsequently IFN- $\alpha$  in adjacent cells (Wathelet *et al.*, 1998; Stojdl *et al.*, 2003). These proteins potently inhibit replication of the viral genome and thus protect adjacent normal cells from the viral attack. Tumor cells of many tumor types have been reported to be relatively resistant to the antiviral protective effect of type I IFNs because of acquired mutations in the IFN pathways that presumably allow them to gain proliferative potential (Linge *et al.*, 1995;

<sup>1</sup>Thoracic Oncology Research Laboratory, University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, PA 19104.

<sup>2</sup>University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine, Philadelphia, PA 19104.

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology and Sylvester Comprehensive Cancer Center, University of Miami School of Medicine, Miami, FL 33136.

<sup>4</sup>Molecular Medicine Program, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN 55905.

<sup>5</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, PA 19104.

\*These two authors contributed equally to this work.



Pfeffer *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1998; Matin *et al.*, 2001; Stojdl *et al.*, 2003; Parato *et al.*, 2005).

VSV is a rapidly replicating, negative single-stranded RNA virus that belongs to the Rhabdoviridae family and is relatively nonpathogenic to humans (Russell, 2002; Obuchi *et al.*, 2003; Lichty *et al.*, 2004; Parato *et al.*, 2005). VSV replicates more efficiently in tumor cells compared with normal "nontransformed" cells, which is attributable to flaws in cancer cells' innate immune responses involving the IFN system, tumor-related defects in translational regulation, and abnormal signaling pathways in cancer cells that support viral replication (Balachandran and Barber, 2000; Stojdl *et al.*, 2000; Balachandran *et al.*, 2001). VSV has shown significant promise in a variety of preclinical tumor models, such as melanoma, squamous cell cancer, ovarian cancer, colorectal carcinoma, prostate cancer, breast cancer, rhabdoid tumors, leukemia, hepatocellular carcinoma, and glioblastoma (Ebert *et al.*, 2003, 2005; Huang *et al.*, 2003; Stojdl *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2004; Shinozaki *et al.*, 2004; Lun *et al.*, 2006; Bergman *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

Many primary human and murine cells have been shown to exhibit significant resistance to VSV infection *in vitro*, yet high titers of VSV can still lead to lethal infection *in vivo* with death primarily due to neurologic complications (Stojdl *et al.*, 2000; Obuchi *et al.*, 2003). For use in human gene therapy, therefore, efforts have been made to develop approaches that will allow enhanced safety, with minimal loss of selectivity and efficacy (Stojdl *et al.*, 2000, 2003; Obuchi *et al.*, 2003; Lichty *et al.*, 2004). Genetic approaches aimed at creating strains of VSV that enhance IFN production in infected cells have thus been pursued. One of strategies has been to directly introduce the IFN- $\beta$  gene into the viral genome, generating very high levels of IFN- $\beta$  protein as the virus replicates (Obuchi *et al.*, 2003).

Malignant pleural mesothelioma has a dismal prognosis and is resistant to chemotherapy and radiation therapy; however, its localized nature makes it potentially amenable to gene or oncolytic viral therapy and our preclinical and clinical studies in this regard have been promising (Serman and Albeda, 2005). Our group has been conducting preclinical and clinical trials for mesothelioma tumors with a nonreplicating adenoviral vector expressing human IFN- $\beta$  (Odaka *et al.*, 2002; Serman *et al.*, 2007). We have seen strong antitumor effects that are mediated primarily through virus-induced inflammation in combination with tumor cell secretion of IFN- $\beta$  that leads to both innate and acquired immune-mediated antitumor responses. A replicating vector that also expresses IFN- $\beta$  (i.e., VSV.hIFN- $\beta$ ) was thus of particular interest to us.

We postulated that a replicating vector that delivered IFN- $\beta$  might provide added antitumor effects through both amplified transgene expression and direct virus-mediated tumor cell lysis. Given the promise of VSV as an oncolytic agent and the availability of a VSV-human IFN- $\beta$  vector, we conducted this study to (1) study the ability of VSV to lyse human mesothelioma cells and (2) evaluate the potential of the VSV.hIFN- $\beta$  for clinical translation.

## Materials and Methods

### Cell lines

Human mesothelioma lines. The human OK1, OK2, OK5, OK6, and OK7 cell lines were provided by Dr. Claire

Verschaegen (University of New Mexico). H2052, I-45, and MSTO lines were purchased from the American Tissue Type Collection (Manassas, VA). The human Pt108, REN, LRK, and M30 lines were derived from patient samples at the University of Pennsylvania. OK1, OK2, OK5, OK6, OK7, M30, REN, LRK, H2052, and MSTO were grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 2 mM penicillin/streptomycin. I-45 cells were also grown in the same supplemented RPMI medium with addition of 0.1 M nonessential amino acids (Invitrogen, Carlsbad, CA). Pt108 cells were maintained in E-medium, which consists of RPMI 1640 culture medium plus 10  $\mu$ g/ml insulin, 10  $\mu$ g/ml transferrin, 10  $\mu$ M ethanolamine, 10 ng/ml selenium, 2 mM glutamine, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane sulfonic acid (HEPES), 0.5 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acid, penicillin/streptomycin, 1 ng/ml epidermal growth factor, 18 ng/ml hydrocortisone, and 0.1 nM T3 hormone.

Human mesothelial cell lines. LP9, HM1, and HM3 cell lines were kindly provided by Dr. James Rheinwald (Dana Farber Cancer Institute); these cell lines were grown in the special culture medium supplemented with hydrocortisone (1000  $\mu$ g per 500 ml) and epidermal growth factor as previously described (Connell and Rheinwald, 1983; Murphy and Rheinwald, 1997). PF1M cells were obtained by growing cells from nonmalignant pleural fluid in the same culture medium.

### Viral strains

The VSV.mIFN- $\beta$  and VSV.hIFN- $\beta$  vectors were originally described by Obuchi *et al.* (2003). VSV.GFP was generated as previously described (Diaz *et al.*, 2007). Viral stocks were manufactured by the Core Viral Facility of Mayo Clinic (Rochester, MN). All vectors were amplified in Baby Hamster Kidney (BHK) cells and were titered by standard plaque assay of BHK cells.

### MTT assay

To perform the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, cells were plated in quadruplicate on 96-well plates (5000 cells/well in RPMI or Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] medium with 10% FBS) and were infected with different multiplicities of infection (MOIs) (10, 1, 0.1, 0.01, and 0) of the VSV.mIFN- $\beta$ , VSV.hIFN- $\beta$ , and VSV.GFP viruses. Viability was assessed at successive time points (24, 48, or 72 hr) by developing the reaction assay per manufacturer's instruction (Promega, Madison, WI). Optical density was read at 570 nm and corrected using a background control value.

### Plaque assays

To evaluate the ability of VSV.hIFN- $\beta$  to replicate in mesothelioma cells, LP9, REN, and LRK cells were infected at an MOI of 1. The supernatants were collected 24 hr later and titered by standard plaque assay of BHK cells. In addition, PF1M, REN, and LRK cells were pretreated with human IFN- $\beta$  for 24 hr at 1 and 10,000 U/ml, followed by infecting the cells with VSV.GFP. The supernatants and cell lysates



were collected at 6, 24, and 48 hr postinfection to measure the virus titers.

*Preparation of IFN- $\beta$  and IFN-inducible gene (MxA, 2'5'-OAS, and PKR) mRNA*

To collect mRNA for reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) after VSV.GFP infection or IFN- $\beta$  exposure, T25 flasks of REN, LRK, and LP9 cells ( $1.3 \times 10^6$  cells) were left as controls, infected with VSV.GFP at an MOI of 10, or exposed to 2.5 ml of 10 U/ml hIFN- $\beta$  in RPMI/10% FBS or DMEM/10% FBS. After 1 hr, the viral inoculum was aspirated in the infected flasks, cells were washed with PBS twice, and 2.5 ml of supplemented RPMI medium was applied in each of the flasks for 5 hr. After 6 hr from the time of infection or application of IFN- $\beta$ , the medium was aspirated and cells were placed in TRIzol Reagent (Invitrogen) using 300  $\mu$ l in each flask, which were combined to 1 ml for each condition. Samples were frozen at  $-80^\circ\text{C}$ .

Total RNA were isolated using the protocol provided by the manufacturer, followed by removal of contaminating genomic DNA by DNase I treatment (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). High-quality RNA was confirmed by running an aliquot of each sample on a denaturing formaldehyde/agarose/EtBr gel.

*Real-time RT-PCR*

Quantitative analysis of mRNA expression was performed using real time RT-PCR. Three micrograms of total RNA were reverse transcribed to cDNA, using Oligo(dT)<sub>15</sub> primer (Promega) and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), following the protocol provided by the manufacturer. Synthesized cDNA was normalized to  $\beta$ -actin, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), or 18S rRNA levels and quantification of tumor mRNA levels was performed as previously described (Jassar *et al.*, 2005). Relative levels of expression of each of the selected genes (fold change in VSV.GFP-infected or IFN- $\beta$ -treated vs. control) were determined. Each sample was run in quadruplicate and the experiment was repeated at least once using the Smart Cycler System (Cepheid, Sunnyvale, CA). The primers were designed based on cDNA and genomic DNA sequence available in GenBank (primer sequences available upon request).

*Pretreatment assays with hIFN- $\beta$*

Cells were plated on 96-well plates (5000 cells/well) and were incubated overnight. On the next day the medium was discarded and hIFN- $\beta$  (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ) was added at various dilutions made with RPMI- or DMEM-supplemented medium (1, 10, 100, 500, 1000, and 10,000 U/ml). The activity of hIFN- $\beta$  was 5 pg/unit. After 24 hr of incubation with IFN- $\beta$ , the medium was discarded and cells were infected with VSV.GFP at an MOI of 0.05. Four wells were used for infection with VSV.GFP alone and four wells as controls with medium only. MTT assay was performed 48 hr after infection.

*IFN- $\beta$  ELISA*

REN, LRK, and LP9 cells ( $1 \times 10^6$ ) were plated in six-well plates in triplicate and were incubated in 1 ml of supplemented RPMI or DMEM medium overnight. On the next day,

the cells were infected with VSV.GFP and VSV.hIFN- $\beta$  at an MOI of 1 in a total volume of 100  $\mu$ l. After 1 hr, the inoculum was aspirated, flasks were washed with PBS twice, and 400  $\mu$ l of RPMI or DMEM culture medium was applied. Twenty-four hours after the time of infection, the medium was collected, spun for 10 min at 13,000 rpm to remove dead cells, and retained at  $-80^\circ\text{C}$  to quantify human IFN- $\beta$  by ELISA according to manufacturer's instructions (PBL InterferonSource).

*INF- $\beta$  bioassay*

Human mesothelial cells and human mesothelioma cells were infected with VSV.GFP at an MOI of 10 and supernatants were harvested at 24 hr. The supernatants were inactivated for viral activity by heating at  $56^\circ\text{C}$  for 30 min. REN cells were plated at a density of 5000 cells/well and then incubated with the heat-inactivated supernatants for 24 hr. The supernatants were discarded and VSV.GFP at an MOI of 10 was added for 48 hr. The MTT assay was performed to assess the viability of REN cells after incubation with the supernatants. The hIFN- $\beta$  levels in the supernatants were determined by comparing the survival results from the MTT assay to a standard curve performed with known concentrations of hIFN- $\beta$ . For our standard curve, REN cells were plated at a density of 5000 cells/well and incubated with hIFN- $\beta$  concentrations ranging from 0.01 to 10 U/ml prepared in supplemented RPMI medium. The sensitivity of the assay was 0.01 U/ml of hIFN- $\beta$ .

*Animal studies*

SCID mice were purchased from the Wistar Institute (Philadelphia, PA). Three groups of SCID mice ( $n=6-8$  per group) were injected with  $1 \times 10^6$  cells (REN or MSTO) on the hind flank. Once tumor size reached approximately 200 mm<sup>3</sup>, intratumoral injections were performed with control medium or  $6.6 \times 10^8$  pfu of vector in 100  $\mu$ l of PBS (VSV.mIFN- $\beta$  and VSV.hIFN- $\beta$ ) once weekly for 3 consecutive weeks. Tumors were measured twice per week with calipers and mice were monitored for toxicity. Mice were euthanized if toxicity was evident or tumor burden exceeded 1500 mm<sup>3</sup>. The Animal Use Committee of the University of Pennsylvania approved all protocols in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

*Cytology blocks of primary tumor cells in pleural effusions*

To analyze actual patient samples, we obtained pleural effusion samples from mesothelioma patients who were part of a phase I trial of intrapleural administration of an adenovirus expressing IFN- $\beta$  (Ad.IFN- $\beta$ ) (Sterman *et al.*, 2007). Samples were collected before and 24 hr after receiving the vector, at a time when pleural fluid IFN- $\beta$  levels were markedly increased. To evaluate the cells, pleural effusion fluids were spun down at 1500 rpm and the cell pellet was resuspended with molten 1% agarose in PBS. The samples were fixed with 1% formalin overnight and later embedded with paraffin for immunohistochemical staining.

*Immunohistochemical staining*

Formalin-fixed, paraffin-embedded cytology blocks and a human mesothelioma tissue array (obtained from the



Mesothelioma Research Bank [CDC NIOSH 1-U19-OH009077 Mesothelioma Virtual Bank for Translational Research, Pittsburgh, PA]) were sectioned at 5  $\mu$ m and placed on pre-cleaned glass microscope slides. The array contains samples for 48 mesothelioma tumors that were arrayed in triplicate.

The cytology and tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through graded alcohol solutions. The slides were placed in a coplin jar filled with 10 mM sodium citrate (pH 6), as the antigen retrieval agent, and boiled in a microwave for 5 min. The slides were blocked with appropriate serum for 30 min before addition of the primary antibodies. The primary anti-human antibodies used were anti-p48 (sc-496; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-STAT1 (sc-592; Santa Cruz Biotechnology), anti-IFNAR1 (ab45172; Abcam, Cambridge, MA), anti-PKR (sc-100378; Santa Cruz Biotechnology), and anti-OAS1 (sc-100639; Santa Cruz Biotechnology). After overnight incubation with the primary antibodies at 4°C, the slides were washed with PBS twice, followed by incubating in a 3% hydrogen peroxide solution for 30 min to quench any endogenous peroxidase activity. The appropriate biotinylated secondary antibodies (1:200 dilution) was added to the sections and incubated for 30 min at room temperature. The slides were washed again and incubated with ABC-peroxidase for 30 min (Vector Elite, Burlingame, CA). After a final rinse in PBS, the cytology and tissue sections were incubated with 3,3' diaminobenzidine (DAB) substrate (0.02% DAB, 0.005% hydrogen peroxide) for 1–5 min to develop the colorimetric reaction, counterstained with hematoxylin, and then mounted with glass coverslips with Aqua-poly. The immunoreactive score for each tissue section was calculated using our modified Remmele's scoring system (see below).

#### Modified Remmele's scoring system

The 20 $\times$  objective was used to evaluate the whole section by two observers who were blinded with respect to the sample identities and treatment assignment. The immunoreactive score for each sample was calculated by multiplying the percent score with the intensity score (Remmele and Stegner, 1987). The percent score indicates the percentage of cells positive: 76–100% tumor cells, score 4; 51–75% tumor cells, score 3; 26–50%, score 2; 1–25%, score 1. An example of the intensity score is shown in Fig. 4A, with a scale of 0 (absent) to 3+ (strongly positive). An immunoreactive score of 0–2 indicates absence or extremely low expression of that particular protein.

#### Statistical analyses

For the RT-PCR and flank tumor studies comparing differences between two groups, we used unpaired Student *t*-tests. For flank tumor studies comparing more than two groups, we used analysis of variance with appropriate *post hoc* testing. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean.

## Results

### Oncolytic activities of VSV vectors in vitro in mesothelioma cells

Nontransformed human mesothelial lines and human mesothelioma lines were tested for their *in vitro* susceptibility to the VSV vectors. As control vectors, we used a VSV ex-

pressing either green fluorescent protein (VSV.GFP) or murine IFN- $\beta$  (VSV.mIFN- $\beta$ ). VSV.mIFN- $\beta$  serves as an ideal control for the VSV.hIFN- $\beta$ , because IFN proteins are strictly species specific with no cross reactivity. Our test vector was a VSV expressing human IFN- $\beta$  (VSV.hIFN- $\beta$ ).

Four nontransformed human mesothelial lines, PF1M, HM3, HM1, and LP9, were studied (Fig. 1A). PF1M was a primary cell line derived in our laboratory. Forty-eight hours after infection (at an MOI of 0.1), VSV.mIFN- $\beta$  and VSV.GFP (data not shown) induced about 50% cell death in the normal primary human mesothelial cells (PF1M), but only minimal cell death in the three immortalized human mesothelial cell lines. All four of the nontransformed human mesothelial lines were completely resistant to VSV.hIFN- $\beta$ .

Twelve human mesothelioma lines were tested. Lines Pt 108, M30, REN, and LRK were primary cell lines derived in our laboratory, used in early passage. Three types of responses were seen. Three of the mesothelioma lines (Group 1: Pt108, OK1, and OK2) seemed quite resistant to cell death induced by either VSV.mIFN- $\beta$  or VSV.hIFN- $\beta$  and thus resembled the normal mesothelial lines. Five mesothelioma lines (Group 2: OK6, M30, REN, OK4, and OK7) were moderately sensitive to killing (50–75% cell death) by VSV.mIFN- $\beta$ , but were completely resistant to killing by VSV.hIFN- $\beta$ . Four mesothelioma lines (Group 3: H2052, LRK, I45, and MSTO) were efficiently killed by both VSV.mIFN- $\beta$  and VSV.hIFN- $\beta$ . Additional data for a range of MOIs at different time points are shown in Supplemental Fig. S1 (available online at [www.liebertonline.com/hum](http://www.liebertonline.com/hum)).

These data demonstrate that IFN- $\beta$  transgene protects normal mesothelial cells from VSV-mediated cell lysis, but also protects more than half of mesothelioma lines tested.

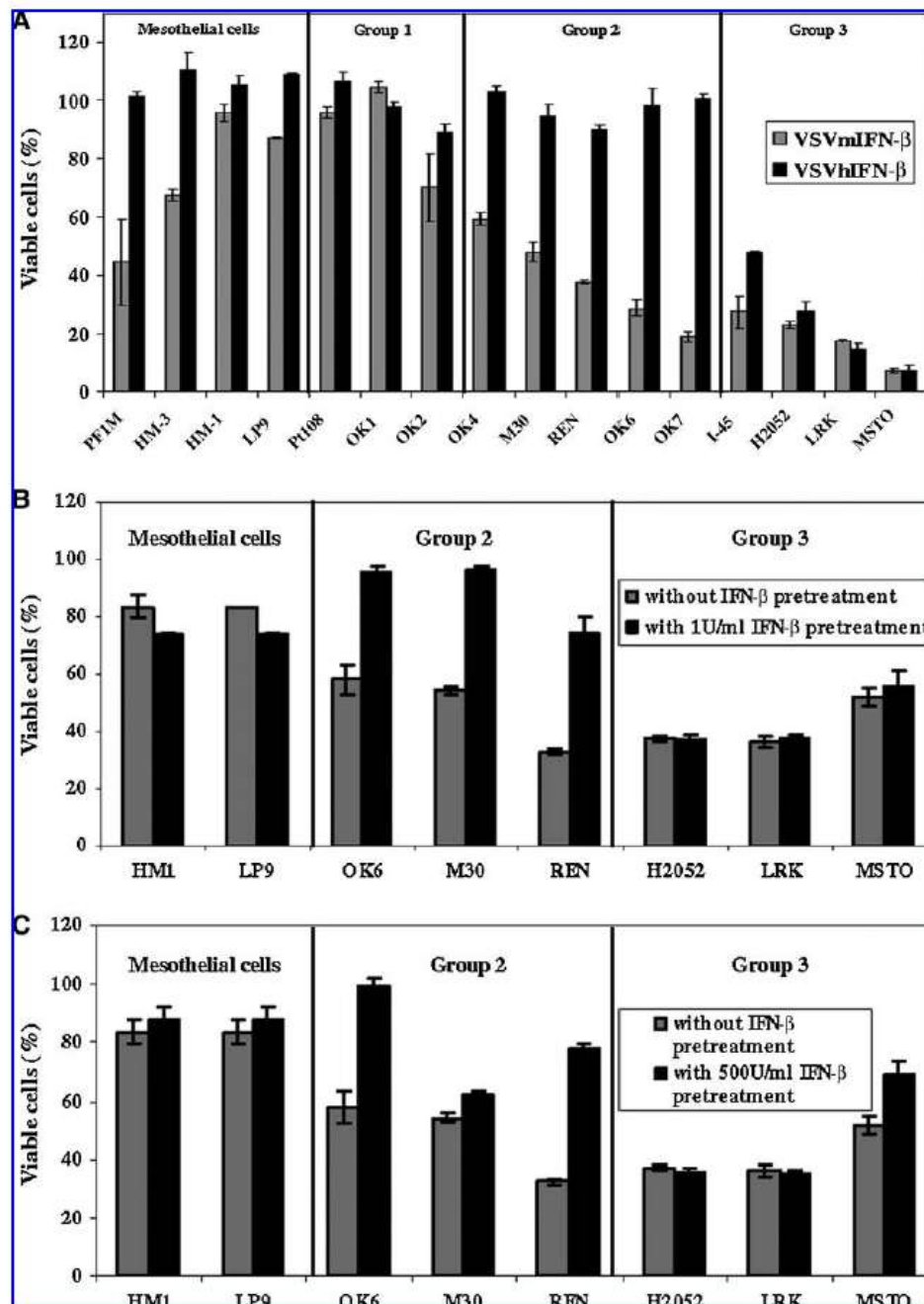
### Ability of VSV to replicate in human mesothelioma cells

Because of different susceptibilities of mesothelioma lines to VSV.IFN- $\beta$  strains, the ability of VSV.hIFN- $\beta$  to replicate in a nontransformed mesothelial cell line (LP9), a mesothelioma line resistant to VSV.hIFN- $\beta$  (REN), and a mesothelioma line sensitive to VSV.hIFN- $\beta$  (LRK) was investigated in more detail. These cell lines were infected with VSV.hIFN- $\beta$  at an MOI of 1, and the culture supernatants were collected at 24 hr later to measure the virus titer using plaque assay. The supernatant of LP9 culture contained  $1 \times 10^4$  pfu/ml/1 million cells, and the supernatant of REN culture contained  $1.35 \times 10^6$  pfu/ml/1 million cells, showing only minimal replication. In contrast, VSV.hIFN- $\beta$  was able to replicate substantially better in LRK cells ( $1.55 \times 10^8$  pfu/ml/1 million cells), an amount that was 2 logs higher than in REN cells and 4 logs higher than in LP9 cells.

### Assessment of functional antiviral IFN- $\beta$ responses

The data above suggest the hypothesis that in some of the tumor cells, IFN (of the appropriate species specificity) produced by the transgene in the VSV vector inhibited replication and subsequent oncolysis, implying some partial sensitivity to the antiviral effects of IFN. We therefore directly evaluated the antiviral activity of IFN- $\beta$  on representative cell lines by pre-treating them with IFN- $\beta$  for 24 hr and then testing the ability of VSV.GFP to replicate and lyse these pretreated cells.

The nontransformed human mesothelial cell lines (HM1 and LP9) were resistant to VSV.GFP-mediated oncolysis with



**FIG. 1.** (A) Susceptibility of human mesothelioma cells to vesicular stomatitis virus (VSV) vectors *in vitro*. Cell lines were plated at a density of 5000 cells/well in 96-well plates and incubated with VSV expressing murine interferon- $\beta$  or human interferon- $\beta$  (VSV.mIFN- $\beta$  [gray bars] or VSV.hIFN- $\beta$  [black bars]) at an MOI of 0.1. An 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay was performed at 48-hr postinfection and the percentage of viable cells were determined. Data shown are the mean  $\pm$  standard error of the mean. (B and C) Assessment of the ability of IFN- $\beta$  to inhibit VSV-induced oncolysis. Cells were pretreated with human IFN- $\beta$  at 1 and 500 U/ml for 24 hr and then exposed to VSV.GFP at an MOI 0.05 for 48 hr. An MTT assay was performed at this time to determine the percentage of viable cells. Each sample was run in quadruplicate. Data shown are the mean  $\pm$  standard error of the mean.



or without human IFN- $\beta$  pretreatment (Fig. 1B). On the other hand, pretreatment with 1 and 500 U/ml of human IFN- $\beta$  for 24 hr almost completely protected the Group 2 OK6 and REN mesothelioma lines from VSV-mediated oncolysis (Fig. 1B and C). The M30 mesothelioma line was also protected by IFN- $\beta$ ; however, the cell viability decreased when M30 cells were pretreated with 500 U/ml of IFN- $\beta$ . In contrast, the Group 3 H2052 and LRK cell lines were not protected from VSV-induced oncolysis after pretreatment (Fig. 1B and C). In fact, these cells were killed by VSV.GFP when pretreated with hIFN- $\beta$  at doses as high as 10,000 U/ml (Supplemental Fig. S2, available online at [www.liebertonline.com/hum](http://www.liebertonline.com/hum)). MSTO cells were only protected at doses greater than 1000 U/ml of hIFN- $\beta$  (Supplemental Fig. S2).

To confirm that the IFN- $\beta$ -mediated viral protection is due to a decrease in virus replication in cells, the viral titers in the cultures of mesothelioma cell lines (REN and LRK) and primary mesothelial cells (PF1M) after infecting with VSV.GFP were investigated (Table 1). In the PF1M primary mesothelial cell line (Table 1A), the initial viral titer at 1 hr postinfection was  $2.8 \times 10^5$  pfu/ml/ $10^6$  cells. Viral replication peaked at 48 hr, when the titer reached  $2.5 \times 10^5$  pfu/ml/ $10^6$  cells (a 2-log increase). Viral replication was markedly inhibited by either 1 unit (150-fold) or 10,000 units (340-fold) of IFN- $\beta$ . In the partially sensitive REN line (Table 1B), the initial viral titer at 1 hr postinfection was  $1.3 \times 10^4$  pfu/ml/ $10^6$  cells. Viral replication peaked earlier at 24 hr, when the titer reached  $1.25 \times 10^6$  pfu/ml/ $10^6$  cells (a 2-log increase). In this case, 1 unit of IFN- $\beta$  had virtually no effect on viral replication; however, 10,000 units of IFN- $\beta$  markedly inhibited viral production (1000-fold). In the highly IFN-resistant LRK line (Table 1C), the initial viral titer at 1 hr postinfection was lower at  $9 \times 10^2$  pfu/ml/ $10^6$  cell. However, viral replication was very rapid, peaking at 6 hr, when the titer reached  $8.5 \times 10^4$  pfu/ml/ $10^6$  cells (again, a 2-log increase). At this time point, pretreatment with IFN- $\beta$  had no effect; titers were actually higher at  $1 \times 10^5$  pfu/ml/ $10^6$  cells. Even at the extremely high dose of 10,000 units of IFN- $\beta$ , replication was only inhibited by less than threefold.

These data demonstrate that some mesothelioma cell lines have a partial or fully intact IFN response that protects them from VSV-mediated cell lysis by inhibiting virus replication.

#### Oncolytic activities of VSV *in vivo*

We next examined the effect of VSV treatment *in vivo* using the two human cell lines that were able to grow as xenografts in SCID mice. Both lines were killed *in vitro* by VSV.mIFN- $\beta$ , although MSTO was more sensitive. However, only one line (MSTO) was killed by VSV.hIFN- $\beta$  *in vitro*, whereas the other line (REN) was resistant to VSV.hIFN- $\beta$  *in vitro*. When flank tumors reached approximately 200 mm<sup>3</sup> in size, they were injected three times with saline or  $6.6 \times 10^8$  pfu of vector intratumorally at weekly intervals. MSTO flank tumors treated with either VSV.hIFN- $\beta$  or VSV.mIFN- $\beta$  showed statistically significant ( $p < 0.05$ ) tumor growth inhibition (approximately 75%) compared with the control tumors (Fig. 2A). The growth inhibition induced by VSV.hIFN- $\beta$  was equivalent to that of VSV.mIFN- $\beta$ . REN flank tumors treated with VSV.mIFN- $\beta$  showed statistically significant ( $p < 0.01$ ) tumor growth inhibition (approximately 80%) compared to control (Fig. 2B). However, tumors treated with VSV.hIFN- $\beta$  were not statistically significantly

TABLE 1A. VIRUS TITERS IN THE CULTURE OF PF1M PRIMARY MESOTHELIAL CELLS RECEIVING INTERFERON- $\beta$  PRETREATMENT PRIOR TO INFECTION WITH VESICULAR STOMATITIS VIRUS EXPRESSING GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Interferon- $\beta$ (U/ml)	Virus titer	
	1 hr <sup>a</sup>	48 hr <sup>a</sup>
0	2800	250,000
1	NM	1700
10,000	NM	730

TABLE 1B. VIRUS TITERS IN THE CULTURE OF REN MESOTHELIAL CELL-LINE RECEIVING INTERFERON- $\beta$  PRETREATMENT PRIOR TO INFECTION WITH VESICULAR STOMATITIS VIRUS EXPRESSING GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Interferon- $\beta$ (U/ml)	Virus titer		
	1 hr <sup>a</sup>	24 hr <sup>a</sup>	48 hr <sup>a</sup>
0	13,000	1,250,000	220,000
1	NM	1,100,000	2300
10,000	NM	950	2050

TABLE 1C. VIRUS TITERS IN THE CULTURE OF LRK MESOTHELIAL CELL-LINE RECEIVING INTERFERON- $\beta$  PRETREATMENT PRIOR TO INFECTION WITH VESICULAR STOMATITIS VIRUS EXPRESSING GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Interferon- $\beta$ (U/ml)	Virus titer			
	1 hr <sup>a</sup>	6 hr <sup>a</sup>	24 hr <sup>a</sup>	48 hr <sup>a</sup>
0	900	85,000	80,000	3200
1	NM	107,500	59,500	1900
10,000	NM	29,000	11,000	2050

The unit for the virus titers is pfu/ml/million cells.

Abbreviation: NM, not measured.

<sup>a</sup>Time after infection (hr).

smaller ( $p = 0.2$ ) than control tumors and were statistically larger ( $p < 0.05$ ) than the tumors treated with VSV.mIFN- $\beta$ .

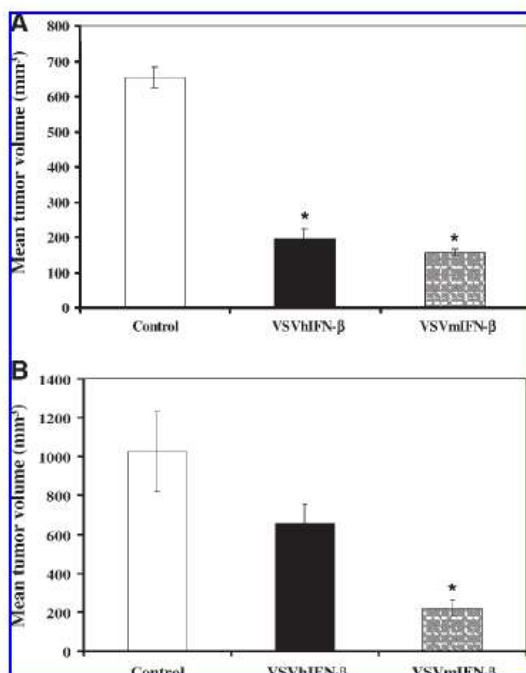
#### Mechanistic studies

To understand the basis for this variable resistance of mesothelioma cells to infection with VSV.IFN- $\beta$ , we focused additional studies on three human cell lines that appeared to be representative of each type of response to VSV.mIFN- $\beta$  and VSV.hIFN- $\beta$ : (1) LP9, a nontransformed mesothelial cell line that was resistant to both vectors; (2) REN, a mesothelioma cell line that was sensitive to VSV.mIFN- $\beta$ , but resistant to VSV.hIFN- $\beta$ ; and (3) LRK, a mesothelioma cell line that was sensitive to both vectors.

#### Ability of human mesothelioma cells to produce IFN- $\beta$ message and protein in response to VSV

We infected the aforementioned cells and evaluated the ability of VSV to stimulate the production of IFN- $\beta$  message.





**FIG. 2.** Effect of VSV vectors on the growth of human mesothelioma xenografts. Flank tumors were generated by the injection of MSTO mesothelioma cells (A) or REN mesothelioma cells (B) into SCID mice. When the tumors reached approximately 200 mm<sup>3</sup> in size, they were injected with saline (white bars) or  $6.6 \times 10^8$  pfu of either VSV.mIFN- $\beta$  (gray bars) and VSV.hIFN- $\beta$  (black bars) suspended in 100  $\mu$ l of PBS once weekly for 3 weeks. The tumor volume measured a week after the last injection is shown. The asterisk denotes a significant change in tumor volume between the untreated tumors and VSV-infected tumors ( $p < 0.05$ ).

This response is a key initial antiviral cellular defense mechanism mediated through the IRF3 pathway (Decker *et al.*, 2002; Lichty *et al.*, 2004). At baseline, there was no detectable mRNA for IFN- $\beta$  in any cell line. As shown in Table 2, VSV infection upregulated the expression levels of

IFN- $\beta$  message in the LP9 and REN cell lines to a similar degree. In contrast, the LRK cells showed no induction of IFN- $\beta$ .

After VSV infection, the mRNA of IFN- $\beta$  must be effectively transported to the cytoplasm, translated into protein, and secreted to exert its effects on ISGs (Decker *et al.*, 2002; Lichty *et al.*, 2004). VSV has evolved mechanisms (such as the M protein) to block this translation, although it appears that normal cells can at least partially overcome this block. Given that both LP9 and REN cells produced similar (and high) levels of IFN- $\beta$  mRNA after VSV infection and that both cell lines were able to respond to exogenous IFN- $\beta$ , we need to find out whether the protein levels of IFN- $\beta$  would be upregulated after VSV infection. We thus evaluated the supernatant fluid from LP9, REN, and LRK cells that had been infected with VSV.GFP and measured IFN- $\beta$  levels by a standard ELISA. The IFN- $\beta$  levels from all three cell lines were below the level of detection (threshold of 25 pg/ml or 2.5 U/ml). We therefore used a bioassay comparing the ability of supernatants (after inactivation of virus) to protect REN cells from VSV.GFP compared with very low amounts of IFN- $\beta$ . We found that this assay was sensitive to levels of IFN- $\beta$  as low as 0.01 U/ml. As shown in Table 2, LP9 cells infected with VSV.GFP at an MOI of 10 for 24 hr produced 0.22 U/ml of IFN- $\beta$  per 1 million cells infected, whereas REN cells produced only 0.01 U/ml per 1 million cells. In contrast, LRK cells produced no detectable amounts of IFN- $\beta$ .

Finally, we compared the low levels of IFN- $\beta$  produced after VSV.GFP infection with the levels of IFN- $\beta$  after infection with VSV.hIFN- $\beta$ . IFN- $\beta$  production after 24 hr of infection was easily detected in the supernatants of cells infected with VSV.hIFN- $\beta$ ; however, levels were markedly affected by the ability of the vector to replicate. The susceptible LRK cells produced more than 353 U/ml/ $10^6$  cells at 24 hr after infection with VSV.hIFN- $\beta$  at an MOI of 1. LP9 and REN cells made clearly detectable but much lower amounts, 5 and 7.2 U/ml/ $10^6$  cells, respectively.

#### Ability of human mesothelioma cells to upregulate the mRNA expressions of ISGs after external hIFN- $\beta$ exposure

We next sought to determine how well each cell line could respond to external IFN- $\beta$  stimulation by measuring the ability of these cells to upregulate and synthesize the mRNAs for three well-described ISGs, *MxA*, *2'5'-OAS*, and *PKR*,

**TABLE 2.** UPREGULATION OF INTERFERON- $\beta$  mRNA AND PROTEIN IN HUMAN MESOTHELIOMA CELLS AFTER INFECTION WITH VESICULAR STOMATITIS VIRUS EXPRESSING GREEN FLUORESCENT PROTEIN AT AN MOI OF 10 FOR 6 HR, MEASURED USING REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION, OR 24 HR, USING INTERFERON- $\beta$  BIOASSAY

Cell lines	mRNA levels (fold change)		Interferon- $\beta$ protein levels (U/ml/million cells)	
	Control	VSV.GFP infected <sup>a</sup>	Control	VSV.GFP infected
LP9	u/d	7325% $\pm$ 6% <sup>b</sup>	u/d	0.225
REN	u/d	11,428% $\pm$ 12.5%	u/d	0.007 $\pm$ 0.003
LRK	u/d	u/d <sup>c</sup>	u/d	u/d

Abbreviations: LP9, normal mesothelial cells; u/d, undetectable; VSV.GFP, vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein.

<sup>a</sup>Levels of mRNA are expressed in arbitrary units.

<sup>b</sup>Expression levels are presented as means of triplicates with  $\pm$  the coefficient of variation (standard error of the mean/mean).

<sup>c</sup> $p$ -Value is  $< 0.05$  compared with LP9.

which are known to inhibit the replication of VSV in normal host cells (Balachandran and Barber, 2000; Lichty *et al.*, 2004; Brin *et al.*, 2006; Sterman *et al.*, 2006). We therefore incubated each cell line with 10 U/ml hIFN- $\beta$  (approximately 50 pg/ml) for 6 hr and then harvested the cells for quantification of the mRNA levels of each gene using real-time RT-PCR (Table 3A).

At baseline, all three cell lines had very low or undetectable levels of message for MxA or 2'5'-OAS. There was variable baseline expression of PKR (Table 3A). However, after exposure to IFN- $\beta$ , the LP9 and REN cells showed marked upregulation of the mRNA levels of all three IFN-inducible proteins. The response was most robust in the LP9 line, with a statistically ( $p < 0.05$ ) lesser degree of induction in the REN cell line. There was no stimulation of any of these mRNAs in the LRK cell line.

*Ability of human mesothelioma cells to upregulate the mRNA expressions of ISGs after VSV.GFP infection*

We next examined the ability of VSV to upregulate the expression of ISGs (Table 3B) by infecting LP9, REN, and LRK cell lines with VSV.GFP at an MOI of 10. Six hours postinfection, VSV.GFP was able to upregulate the expression all three ISG mRNAs in the LP9 and REN cell lines; however, the level of upregulation was reduced by 30–50% in the REN cell line compared with the LP9 cell line ( $p < 0.05$ ). Consistent with the lack of the LRK cell line to respond to IFN- $\beta$ , we saw no upregulation of ISGs after VSV infection. It should be noted that in comparison to Table 3A, consistent with the low levels of IFN- $\beta$  made after VSV infection, the levels of upregulation of the ISGs mRNAs after

viral infection are much lower than those seen after exposure to 10 U of IFN- $\beta$ .

*Baseline mRNA expression levels of various components on IFN signaling pathway within different human mesothelioma lines*

The heterogeneity in IFN responsiveness among mesothelioma lines could potentially be explained by losses of key components on the IFN signaling pathway as a result of oncogenesis (Linge *et al.*, 1995; Pfeffer *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1998; Matin *et al.*, 2001; Parato *et al.*, 2005) or by functional defects in their IFN responses after stimulation. With a goal toward finding baseline deficits that could be used clinically (i.e., by PCR or immunohistochemistry) to predict responses to oncolytic viruses, we extracted total RNA from 10 human mesothelioma lines and performed quantitative real-time PCR to compare the baseline expression levels of various components on the IFN signaling pathway between the primary mesothelial cells (PFIM) and the established and primary mesothelioma cell lines (Fig. 3). Expression of these mRNAs was very high in the Group 1 cell line and similar to the levels seen in the normal mesothelial cell line in the Group 2 cells. Interestingly, IFNAR1, IFNAR2, TyK2, STAT1, p48, and PKR mRNA levels were highly downregulated or undetectable in three IFN-nonresponsive Group 3 lines (H2052, I45, and LRK) compared with the primary mesothelial cells. MSTO, a Group 3 cell line not responsive to IFN, had detectable levels of IFNAR1 and 2, JAK1, STAT1, STAT2, and PKR, but virtually undetectable levels of p48. Together, these results indicate that baseline deficiencies in key molecules of the type I IFN

TABLE 3. UPREGULATION OF INTERFERON- $\beta$ -INDUCIBLE ANTIVIRAL GENES MxA, 2'5'-OAS AND PKR USING REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION IN HUMAN MESOTHELIAL AND MESOTHELIOMA CELLS AFTER INCUBATION WITH 10 U/ml HUMAN INTERFERON- $\beta$  OR INFECTION WITH VESICULAR STOMATITIS VIRUS EXPRESSING GREEN FLUORESCENT PROTEIN AT AN MOI OF 10.

Cell lines	MxA mRNA <sup>a</sup>		2'5'-OAS mRNA		PKR mRNA	
	Baseline	10 U/ml	Baseline	10 U/ml	Baseline	10 U/ml
LP9	u/d	13,255 $\pm$ 3.4% <sup>b</sup>	u/d	14,463 $\pm$ 6.6%	615 $\pm$ 9.1%	13,616 $\pm$ 3%
REN	13 $\pm$ 12.2%	5780 $\pm$ 16% <sup>c</sup>	u/d	3392 $\pm$ 11.4% <sup>c</sup>	45 $\pm$ 9.7%	2609 $\pm$ 17.7% <sup>c</sup>
LRK	u/d	u/d <sup>c</sup>	u/d	u/d <sup>c</sup>	u/d	u/d <sup>c</sup>

TABLE 3B. INCUBATION WITH VESICULAR STOMATITIS VIRUS EXPRESSING GREEN FLUORESCENT PROTEIN AT AN MOI OF 10 FOR 6 hr

Cell lines	MxA mRNA <sup>a</sup>		2'5'-OAS mRNA		PKR mRNA	
	Control	VSV.GFP infected	Control	VSV.GFP infected	Control	VSV.GFP infected
LP9	u/d	82% $\pm$ 2.2% <sup>b</sup>	u/d	105% $\pm$ 1.7%	615% $\pm$ 9.1%	958% $\pm$ 1.7%
REN	13% $\pm$ 12.2%	30% $\pm$ 5.9% <sup>c</sup>	u/d	23% $\pm$ 6.3% <sup>c</sup>	45% $\pm$ 9.7%	u/d
LRK	u/d	u/d	u/d	u/d	u/d	u/d

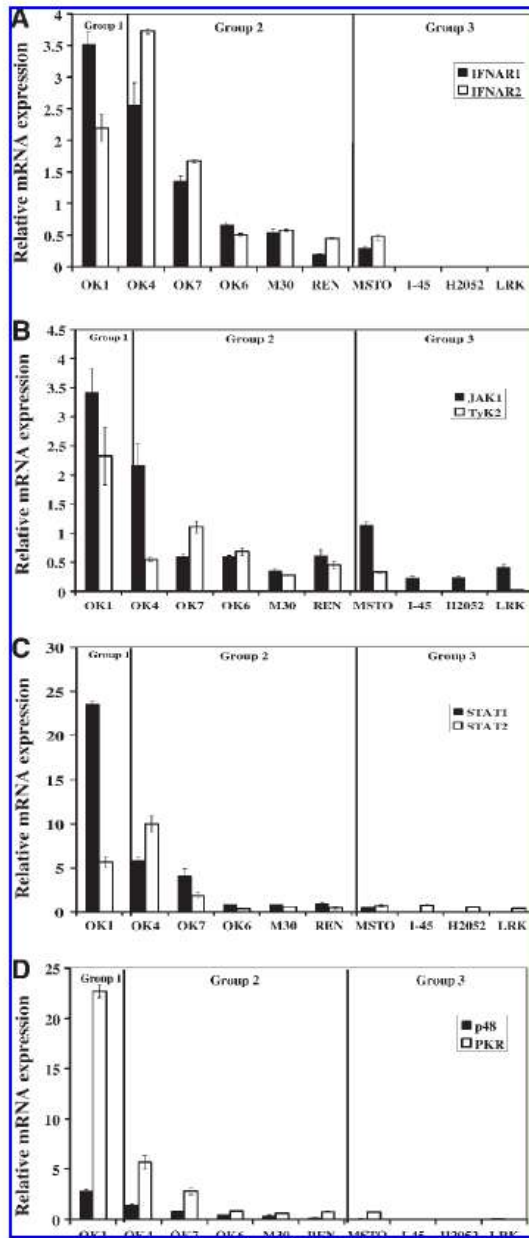
Abbreviations: MxA, myxovirus resistance A; 2'5'-OAS, 2',5'-oligo-adenylate-synthetase; PKR, double-stranded RNA-dependent protein kinase; VSV.GFP, vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein.

<sup>a</sup>Levels of mRNA are expressed in arbitrary units based on a standard curve.

<sup>b</sup>Expression levels are presented as means of triplicates with  $\pm$  the coefficient of variation (standard error of the mean/mean).

<sup>c</sup> $p$ -Value is  $< 0.05$  compared with LP9.





**FIG. 3.** Baseline mRNA expression of IFN pathway-associated genes among human mesothelioma lines. Total RNA was extracted from the primary mesothelial cell line, PF1M, and 10 human mesothelioma lines and used to synthesize cDNA. Specific primer sets were made to amplify eight IFN pathway-associated genes: (A) IFNAR1, IFNAR2, (B) JAK1, Tyk2, (C) STAT1, STAT2, (D) p48, and double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR). Each sample was run in quadruplicate and the sample loading was adjusted in relation to their  $\beta$ -actin or GAPDH expression. The expression of each gene is normalized to the expression in the PF1M line and the fold change  $\pm$  standard deviation is shown.

signaling pathway within a subset of mesothelioma lines likely explains why these cells fail to respond to IFN and are thus killed by VSV.hIFN- $\beta$ .

#### *Distribution of IFN-response pathway proteins at baseline in mesothelioma tumors*

To see if these changes in cell lines were reflected in actual clinical samples, we performed immunostaining with antibodies to IFNAR1, p48, and PKR on a mesothelioma tissue array consisting of 48 tumor biopsies. As detailed in the Materials and Methods, for each biopsy, we graded the intensity of staining (Fig. 4A for examples using the p48 antibody) and the percentage of cells positive and combined these factors into a immunoreactive score. The score ranged from 0 to 12, with an immunoreactive score of 0-2 indicating absence or extremely low expression of a particular protein. Figure 5 shows the distribution of scores for each antibody. There were 26%, 31%, and 24% of mesothelioma tumors that had absence or low expression of IFNAR1, p48, and PKR, respectively (Fig. 5A-C). Approximately 50% of mesothelioma tumors had at least one component of the IFN pathway missing at baseline (Fig. 5D).

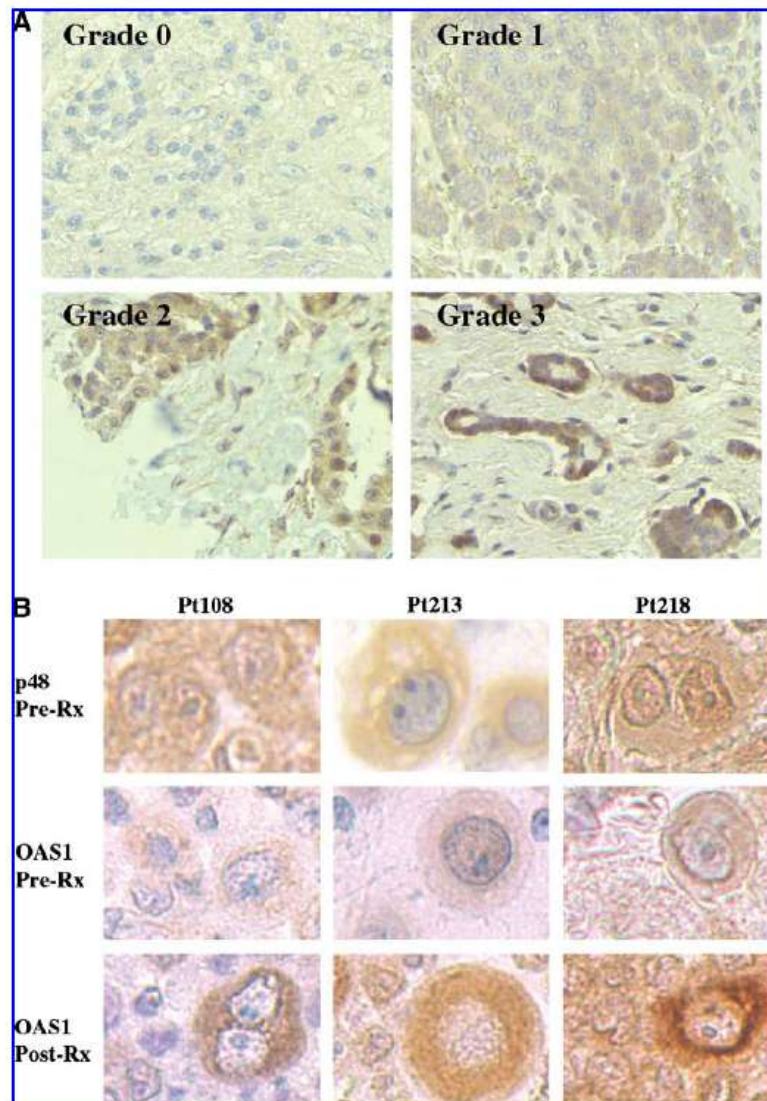
#### *Response of mesothelioma tumor cells to IFN- $\beta$ treatment in vivo*

To determine if the baseline expression of IFN response proteins might correlate with the ability of the tumor cell to respond to IFN- $\beta$  *in vivo*, we were able to take advantage of unique specimens stored from a previous gene therapy clinical trial conducted at our institution in which an adenovirus expressing hIFN- $\beta$  was instilled intrapleurally (Sterman *et al.*, 2007). We were able to find three patients in whom pleural fluid samples containing clearly identifiable mesothelioma cells were available before treatment and 1 day after vector instillation (a time when pleural IFN- $\beta$  levels were very high).

We stained each sample for p48, which gave the most clear staining and seemed to be our best predictor of response in the cell lines, and the IFN-response protein OAS1 as a marker of IFN responsiveness. The staining revealed that before treatment, the tumor cells from all three of these patients had clearly detectable basal p48 expression (Fig. 4B and Supplemental Fig. S3, available online at [www.liebertonline.com/hum](http://www.liebertonline.com/hum)) and very low levels of OAS1 expression. Twenty-four hours after gene transfer, OAS1 expression clearly increased (Fig. 4B and Supplemental Fig. S3). Unfortunately, we did not have a patient with p48 absent among these three examples; however, these results suggest that it would be feasible to prescreen patients for their responsiveness to IFNs by looking at baseline p48 levels.

#### **Discussion**

Rare therapeutic success with current therapies for malignant pleural mesothelioma indicates a need for new therapeutic modalities. Our group and others have shown in preclinical studies that delivery of type I IFNs using an adenoviral vector induces strong antitumor immune responses and has been highly effective in eliminating tumors in mice (Ahmed *et al.*, 2001; Odaka *et al.*, 2002; Brin *et al.*, 2006). This antitumor activity appears to be present in patients also.

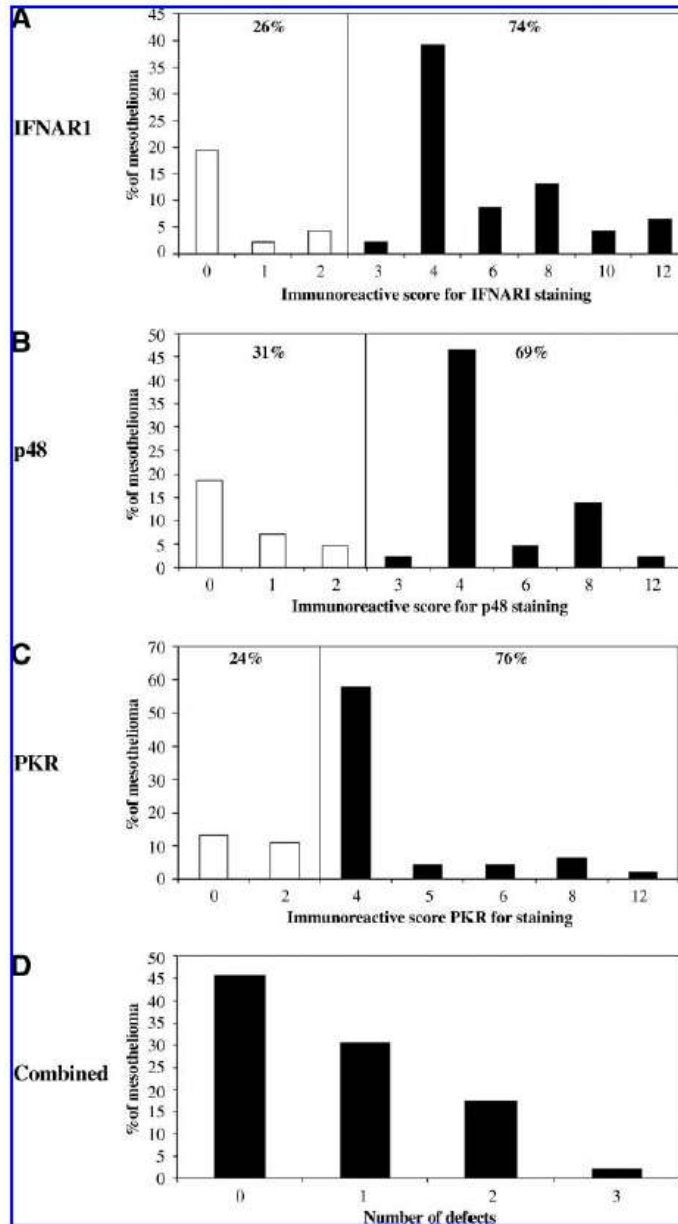


**FIG. 4.** Immunostaining of mesothelioma tumors from patients. (A) Mesothelioma tumor samples from 48 patients were stained with an antibody against p48. Sections from four patients showing examples of our grading system (Grade 0, no staining; Grade 3, strongly positive) are shown at 20 $\times$  magnification. (B) Pleural effusion cells of three patients from our Ad.IFN- $\beta$  Phase I trial were collected prior to and 24 hr after receiving the vector. Cells were immunostained for p48 (upper panels) and the IFN-response protein oligo-adenylate-synthetase 1 (OAS1) before vector (middle panels) and 24 hr after vector (lower panels) to evaluate their IFN responsiveness as assessed by upregulation of OAS1. Cells are shown at a 100 $\times$  magnification (see Supplemental Fig. S3 for a low-power, wide-field view). The large cells are mesothelioma cells, and the smaller cells are macrophages. All three patients showed baseline p48 staining and a clear upregulation of OAS1 after exposure to IFN.

Intracavitary administration of a replication-incompetent adenoviral vector expressing IFN- $\beta$  to patients with mesothelioma and malignant pleural effusions resulted in humoral and cellular antitumor immune responses and some significant clinical responses (Sterman *et al.*, 2006, 2007). Given the potential challenges of giving intravenous injections of oncolytic vectors such as VSV (Lun *et al.*, 2006) and the po-

tential induction of neutralizing antibodies (Power *et al.*, 2007), the ability to safely and effectively deliver local gene therapy vectors to patients with tumors of the pleural space make mesothelioma an excellent disease target (Sterman *et al.*, 2007). In recently completed work (Willmon *et al.*, 2009), we have shown the efficacy of a VSV vector expressing murine IFN in a mouse model of mesothelioma with increased safety





**FIG. 5.** A mesothelioma tissue array, which consists of 48 primary tumor biopsies, was stained with antibodies against IFNAR1 (A), p48 (B), and PKR (C) and an immunoreactive staining score (see Materials and Methods section) was determined for each tumor. (A–C) The distribution of the immunoreactive score for each antibody. An immunoreactive score of 2 or less indicates an absence or low expression of that particular protein. (D) The number of defects per tumor is plotted. Forty-five percent of tumors had no defects, approximately 30% of tumors had lost staining in one protein, and 25% had lost staining in two or three of the proteins.

features. Importantly, this cell line was resistant to effects of murine IFN- $\beta$ , thus supporting replication. Given this potential advantage of a replicating vector expressing mouse IFN- $\beta$  in our preclinical models, the purpose of this study was to evaluate the potential antitumor efficacy of a repli-

cating oncolytic virus expressing human IFN- $\beta$ , VSV.hIFN- $\beta$ , in a large panel of human mesothelioma cell lines.

Taking the advantages of species-specific binding for IFN- $\beta$  and its receptor, a panel of human mesothelioma cells were screened for their susceptibility to VSV vectors expressing

either human IFN- $\beta$  (which is species specific and only interacts with the human IFN type I receptor) or mouse IFN- $\beta$  (which only interacts with the mouse IFN type I receptor). Nine of 12 human mesothelioma lines (including a number of primarily isolated lines) were rapidly lysed by our control vector, VSV.mIFN- $\beta$  (or by another control vector, VSV.GFP), whereas the four nontransformed mesothelial lines showed more limited toxicity with this vector (Fig. 1A). These data are consistent with previous findings showing that tumor cells, compared with their normal counterparts, are more susceptible to the lytic effects of VSV (Balachandran and Barber, 2000; Stojdl *et al.*, 2000), a result that suggests that majority of mesothelioma lines have some defects in the IFN pathway. In addition, the VSV-mediated cell lysis was completely abolished in our nontransformed mesothelial lines when the vector expressed human IFN- $\beta$ , a finding that supports the initiative for inserting this antiviral cytokine gene to improve safety (Obuchi *et al.*, 2003).

However, we observed that more than half of the mesothelioma cell lines were protected from VSV-induced lysis in the presence of the hIFN- $\beta$  transgene, revealing substantial tumor heterogeneity in their IFN responsiveness. We noted three classes of tumor cells with respect to their responses to IFN. Group 1 cells (3 of 12 lines) appeared to be resistant to both control VSV vectors and to VSV.hIFN- $\beta$  and thus resembled the nontransformed mesothelial lines. Group 2 cells (5 of 12 lines) were lysed by control VSV vectors, but were resistant to lysis by the VSV.hIFN- $\beta$  vector. In contrast, Group 3 cells (4 of 12 lines) appeared to be completely resistant to the antiviral effect of IFN- $\beta$  and were thus lysed by both control and VSV.hIFN- $\beta$ . These *in vitro* findings were consistent with animal studies conducted with flank mesothelioma tumors in SCID mice. Using the IFN nonresponsive MSTO line, flank tumor growth was significantly inhibited and showed similar sensitivity to VSV.hIFN- $\beta$  and VSV.mIFN- $\beta$  (Fig. 2A). In the IFN-responsive REN flank model in SCID mice, significant tumor inhibition was seen with the VSV.mIFN- $\beta$ , whereas the VSV.hIFN- $\beta$  vector did not induce a statistically significant difference in tumor size compared with the control group (Fig. 2B).

The heterogeneity in response to type I IFNs seen in our mesothelioma cell lines has been reported in other tumor cell lines in the literature, including cells derived from melanomas (Linge *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1997), lymphomas (Sun *et al.*, 1998), bladder cancers (Matin *et al.*, 2001), renal cancers (Pfeffer *et al.*, 1996), and prostate cancers (Ahmed *et al.*, 2004). This issue was addressed comprehensively by Stojdl *et al.* (2000) using the NCI 60 tumor cell panel. They found that 81% of lines tested were "nonresponsive" to either IFN- $\alpha$  or IFN- $\beta$  pretreatment, defined as 5 units of IFN being unable to significantly affect (<10-fold) the effective concentration required to induce 50% effect (EC50) of cells infected with wild-type VSV for 48 hr. The degree of IFN responsiveness (partial vs. total) was not explored in detail, however. Our data in mesothelioma lines, however, show a higher percentage of IFN-sensitive tumor cells.

The mechanism of this heterogeneity was explored in more detail by comparing the LP9 nontransformed line, the partially sensitive REN tumor line (Group 2), and the completely resistant LRK tumor line (Group 3). The resistant line (LRK) had multiple defects. Unlike the normal LP9 cells, no IFN- $\beta$  mRNA and protein were upregulated in LRK cells

following VSV infection (Table 2), and ISG mRNA levels were also unchanged in this cell line after treatment with IFN- $\beta$  (Table 3A) or after infection with VSV (Table 3B). In contrast, the partially sensitive REN line appeared to be intermediate in these responses. Although the REN cells produced high amounts of IFN- $\beta$  message after VSV infection (Table 2), their ability to upregulate the message levels of IFN-dependent antiviral proteins after treatment with IFN- $\beta$  (Table 3A) and after VSV infection (Table 3B) was significantly less than that seen with the nontransformed LP9 cell line. These findings are similar to those described in a panel of glioblastoma cells (Wollmann *et al.*, 2007). In that study, normal human astrocytes were resistant to VSV infection, whereas four of five lines tested were highly susceptible to VSV infection, even in the presence of IFN- $\alpha$ . All of the susceptible cell lines showed defects in their ability to upregulate IFN-regulated proteins, such as MxA, and half had defects in their ability to produce IFN- $\beta$  message after VSV infection.

To further investigate the mechanisms of heterogeneity in IFN response, quantitative real-time PCR analyses were performed to define possible defects in the type-I IFN signaling pathway among the mesothelioma lines (Fig. 3). Group 1 tumor cells (resistant to all types of VSV) appeared to have highly elevated levels of mRNA for Type I IFN activation pathway genes compared with primary mesothelial cells (Fig. 3). Group 2 tumor cells (sensitive to control VSV but resistant to lysis by VSV.hIFN- $\beta$ ) tended to have similar levels of mRNA for Type I IFN activation pathway genes as the primary mesothelial cells (Fig. 3). Group 3 tumor cells (sensitive to control and VSV.hIFN- $\beta$ ) had markedly reduced or undetectable levels of mRNA of most of the Type I IFN activation pathway genes. The results (with the exception of the MSTO line) indicate that there are losses of multiple components of the IFN pathway which explains why these cells do not respond to IFN.

We also extended these observations to mesothelioma tumors from patients. When we used immunohistochemistry to screen a tissue array of 48 primary tumors for their basal levels of three key components of IFN pathway that were downregulated in cell lines (IFNAR1, p48, and PKR), we found that about half of the primary tumors tested had no defects in any of these components (Fig. 5D), suggesting they would be responsive to IFN. It is interesting to note that p48 (which was uniformly markedly downregulated in our IFN-nonresponsive cell lines) is encoded by a gene on chromosome 14q. A recent "loss of heterozygosity" analysis done by De Rienzo *et al.* (2000) showed that approximately 43% of mesotheliomas displayed allelic losses from chromosome 14q, perhaps explaining these findings.

Using specimens from a recently conducted clinical trial (Sterman *et al.*, 2007) of intrapleural delivery of Ad.IFN- $\beta$  in mesothelioma patients, we were also able to directly determine if p48 status might predict response to IFN. In the three cases with sufficient cells, we observed clear p48 expression at baseline and this was associated with strong upregulation of the IFN-dependent protein OAS after Ad.IFN- $\beta$  gene transfer (Fig. 4 and Supplemental Fig. S3). Although more studies are needed (e.g., in specimens with p48 absent), these data suggest that screening tissue samples using immunohistochemistry for basal expression of proteins such as p48 might be useful for predicting whether viral replication of an IFN-containing vector will be likely.



A clinical trial proposing the use of VSV.hIFN- $\beta$  in patients with liver tumors has already been submitted to the DNA Recombinant Advisory Council and others will likely soon follow. Our data support studies to examine the use of VSV mutant vectors in patients with mesothelioma; however, it is likely that there would be heterogeneity in susceptibility to tumor lysis by this vector and suggests that tests to evaluate the sensitivity of a given tumor to a specific VSV vector might be useful ("personalized medicine"). This could include testing tumor samples for their ability to support VSV replication (Wollmann *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2008); however, it would be much more practical to use immunohistochemistry or PCR analysis on tumor biopsies to search for loss of key components of the IFN pathway, such as IFNARs, Tyk2, or p48 (Wong *et al.*, 1997). Our data have demonstrated that it is feasible to prescreen patients' responsiveness to IFN prior to treatment. This sort of susceptibility analysis may also be important in predicting the efficacy of other oncolytic viruses (i.e., measles, Newcastle Disease Virus, or Reovirus) that depend on defects in tumor IFN responses for efficacy. In addition to predicting patients who might have optimal response, knowing the IFN status of a tumor might also have practical therapeutic applications. The recent report that histone deacetylase inhibitors blunt the IFN pathway in tumor cells (Nguyen *et al.*, 2008) suggests that these agents might be useful adjuncts in patients who have tumors with some residual IFN sensitivity.

#### Acknowledgments

The authors thank Kirsten Langfield (Mayo Clinic) and Tim Kottke (Mayo Clinic) for their assistance in the preparation of vectors. The mesothelioma tissue array was obtained from the Mesothelioma Research Bank (CDC NIOSH 1-U19-OH009077-01 Mesothelioma Virtual Bank for Translational Research). This work was supported by the Schulze Family Foundation (to R.G.V., M.J.F., and S.J.R.), an NCI (National Cancer Institute) grant P01 CA66726 (to S.M.A.), and an NRSA (National Research Service Award) training grant 5-T32 HL07748 (to L.-C.S.W.).

#### Author Disclosure Statement

The authors declare that no conflicts of interest exist.

#### References

- Ahmed, C.M.I., Johnson, D.E., Demers, G.W., Engler, H., Howe, J.A., Wills, K.N., Wen, S.F., Shinoda, J., Beltran, J., Nodelman, M., Machemer, T., Maneval, D.C., Nagabhushan, T.L., and Sugarman, B.J. (2001). Interferon alpha2b gene delivery using adenoviral vector causes inhibition of tumor growth in xenograft models from a variety of cancers. *Cancer Gene Ther.* 8, 788–795.
- Ahmed, M., Cramer, S.D., and Lyles, D.S. (2004). Sensitivity of prostate tumors to wild type and M protein mutant vesicular stomatitis viruses. *Virology* 330, 34–49.
- Balachandran, S., and Barber, G.N. (2000). Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* 50, 135–138.
- Balachandran, S., Porosnicu, M., and Barber, G.N. (2001). Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *J. Virol.* 75, 3474–3479.
- Bergman, I., Griffin, J.A., Gao, Y., and Whitaker-Dowling, P. (2007). Treatment of implanted mammary tumors with recombinant vesicular stomatitis virus targeted to Her2/neu. *Int. J. Cancer* 121, 425–430.
- Brin, E., Atencio, I., Helmich, B.K., Maneval, D., and Laface, D. (2006). Adenovirus delivery provides extended interferon-alpha exposure and augments treatment of metastatic carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 13, 664–75.
- Connell, N.D., and Rheinwald, J.G. (1983). Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells: reversible loss of keratin and increase in vimentin during rapid growth in culture. *Cell* 34, 245–253.
- De Rienzo, A., Jhanwar, S.C., and Testa, J.R. (2000). Loss of heterozygosity analysis of 13q and 14q in human malignant mesothelioma. *Genes Chromosomes Cancer* 28, 337–341.
- Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Muller, M., and Kovarik, P. (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest.* 109, 1271–1277.
- Diaz, R.M., Galivo, F., Kottke, T., Wongthida, P., Qiao, J., Thompson, J., Valdes, M., Barber, G., and Vile, R.G. (2007). Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus. *Cancer Res.* 67, 2840–2848.
- Ebert, O., Harbaran, S., Shinozaki, K., and Woo, S.L. (2005). Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer Gene Ther.* 12, 350–358.
- Ebert, O., Shinozaki, K., Huang, T.G., Savontaus, M.J., Garcia-Sastre, A., and Woo, S.L. (2003). Oncolytic vesicular stomatitis virus for treatment of orthotopic hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *Cancer Res.* 63, 3605–3611.
- Huang, T.G., Ebert, O., Shinozaki, K., Garcia-Sastre, A., and Woo, S.L. (2003). Oncolysis of hepatic metastasis of colorectal cancer by recombinant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Mol. Ther.* 8, 434–440.
- Jassar, A., Suzuki, E., Kapoor, V., Sun, J., Silverberg, M., Cheung, L., Burdick, M., Strieter, R., Ching, L.-M., Kaiser, L.R., and Albelda, S.M. (2005). Activated tumor-associated macrophages and CD8<sup>+</sup> T-cells are the key mediators of anti-tumor effects of the vascular disrupting agent 5,6 di-methylxanthone-4-acetic acid (DMXAA) in murine models of lung cancer and mesothelioma. *Cancer Res.* 65, 11752–11761.
- Lichty, B.D., Power, A.T., Stojdl, D.F., and Bell, J.C. (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol. Med.* 10, 210–216.
- Linge, C., Gewert, D., Rossmann, C., Bishop, J.A., and Crowe, J.S. (1995). Interferon system defects in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 55, 4099–4104.
- Lun, X., Senger, D.L., Alain, T., Oprea, A., Parato, K., Stojdl, D., Lichty, B., Power, A., Johnston, R.N., Hamilton, M., Parney, I., Bell, J.C., and Forsyth, P.A. (2006). Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV(deltaM51)) on multifocal and invasive gliomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1546–1557.
- Matin, S.F., Rackley, R.R., Sadhukhan, P.C., Kim, M.S., Novick, A.C., and Bandyopadhyay, S.K. (2001). Impaired alpha-interferon signaling in transitional cell carcinoma: lack of p48 expression in 5637 cells. *Cancer Res.* 61, 2261–2266.
- Murphy, J.E., and Rheinwald, J.G. (1997). Intraperitoneal injection of genetically modified, human mesothelial cells for systemic gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 8, 1867–1879.
- Nguyen, T., Abdelbary, H., Arguello, M., Breitbach, C., Leveille, S., Diallo, J.-S., Yasmeen, A., Bismar, T.A., Kirm, D., Falls, T., Snoulter, V.E., Vanderhyden, B.C., Werier, J., Atkins, H., Vahakoskela, M.J.V., Stojdl, D.F., Bell, J.C., and Hiscott, J. (2008).



- Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 14981–14986.
- Obuchi, M., Fernandez, M., and Barber, G.N. (2003). Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *J. Virol.* 77, 8843–8856.
- Odaka, M., Wiewrodt, R., DeLong, P., Tanaka, T., Zhang, Y., Kaiser, L., and Albelda, S. (2002). Analysis of the immunologic response generated by Ad.IFN-beta during successful intraperitoneal tumor gene therapy. *Mol. Ther.* 6, 210–218.
- Parato, K.A., Senger, D., Forsyth, P.A., and Bell, J.C. (2005). Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat. Rev. Canc.* 5, 965–976.
- Pfeffer, L.M., Wang, C., Constantinescu, S.N., Croze, E., Blatt, L.M., Albino, A.P., and Nanus, D.M. (1996). Human renal cancers resistant to IFN's antiproliferative action exhibit sensitivity to IFN's gene-inducing and antiviral actions. *J. Urol.* 156, 1867–1871.
- Power, A.T., Wang, J., Falls, T.J., Paterson, J.M., Parato, K.A., Lichty, B.D., Stojdl, D.F., Forsyth, P.A., Atkins, H., and Bell, J.C. (2007). Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Mol. Ther.* 15, 123–130.
- Remmele, W., and Stegner, H.E. (1987). Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathology* 8, 138–140.
- Russell, S.J. (2002). RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther.* 9, 961–966.
- Shinozaki, K., Ebert, O., Kournioti, C., Tai, Y.S., and Woo, S.L. (2004). Oncolysis of multifocal hepatocellular carcinoma in the rat liver by hepatic artery infusion of vesicular stomatitis virus. *Mol. Ther.* 9, 368–376.
- Sterman, D.H., and Albelda, S.M. (2005). Advances in the diagnosis, evaluation, and management of malignant pleural mesothelioma. *Respirology* 10, 266–283.
- Sterman, D.H., Gillespie, C.T., Carroll, R.G., Coughlin, C.M., Lord, E.M., Sun, J., Haas, A., Recio, A., Kaiser, L.R., Coukos, G., June, C.H., Albelda, S.M., and Vonderheide, R.H. (2006). Interferon beta adenoviral gene therapy in a patient with ovarian cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 3, 633–639.
- Sterman, D.H., Recio, A., Carroll, R.G., Gillespie, C.T., Haas, A., Vachani, A., Kapoor, V., Sun, J., Hodinka, R., Brown, J.L., Corbly, M.J., Parr, M., Ho, M., Pastan, I., Machuzak, M., Benedict, W., Zhang, X.Q., Lord, E.M., Litzky, L.A., Heitjan, D.F., June, C.H., Kaiser, L.R., Vonderheide, R.H., Albelda, S.M., and Kanther, M. (2007). A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses. *Clin. Cancer Res.* 13, 4456–4466.
- Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonnenberg, N., and Bell, J.C. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* 6, 821–825.
- Stojdl, D.F., Lichty, B.D., TenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E.G., Durbin, R.K., Durbin, J.E., Hiscott, J., and Bell, J.C. (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4, 263–275.
- Sun, W.H., Pabon, C., Alsayed, Y., Huang, P.P., Jandeska, S., Uddin, S., Platania, L.C., and Rosen, S.T. (1998). Interferon-alpha resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT1 expression. *Blood* 91, 570–576.
- Sung, C.K., Choi, B., Wanna, G., Genden, E.M., Woo, S.L., and Shin, E.J. (2008). Combined VSV oncolytic virus and chemotherapy for squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 118, 237–242.
- Wathelet, M.G., Lin, C.H., Parekh, B.S., Ronco, L.V., Howley, P.M., and Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer *in vivo*. *Mol. Cell* 1, 507–518.
- Willmon, C.L., Saloura, V., Fridlender, Z.G., Wongthida, P., Diaz, R.M., Thompson, J., Kottke, T., Federspiel, M., Barber, G., Albelda, S.M., and Vile, R.G. (2009). Expression of IFN- $\beta$  enhances both efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus (VSV) for therapy of mesothelioma. *Cancer Res.* 69, 7713–7720.
- Wollmann, G., Robek, M.D., and van den Pol, A.N. (2007). Variable deficiencies in the interferon response enhance susceptibility to vesicular stomatitis virus oncolytic actions in glioblastoma cells but not in normal human glial cells. *J. Virol.* 81, 1479–1491.
- Wong, L.H., Krauer, K.G., Hatzinisiriou, I., Estcourt, M.J., HERSHEY, P., Tam, N.D., Edmondson, S., Devenish, R.J., and Ralph, S.J. (1997). Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J. Biol. Chem.* 272, 28779–28785.
- Wu, Y., Lun, X., Zhou, H., Wang, L., Sun, B., Bell, J.C., Barrett, J.W., McFadden, G., Biegel, J.A., Senger, D.L., and Forsyth, P.A. (2008). Oncolytic efficacy of recombinant vesicular stomatitis virus and myxoma virus in experimental models of rhabdoid tumors. *Clin. Cancer Res.* 14, 1218–1227.

Address correspondence to:

Dr. Steven M. Albelda  
Thoracic Oncology Research Laboratory  
University of Pennsylvania Medical Center  
1016B ARC, 3615 Civic Center Blvd.  
Philadelphia, PA 19104

E-mail: albelda@mail.med.upenn.edu

Received for publication May 26, 2009;  
accepted after revision August 28, 2009.

Published online: December 17, 2009.

## 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΗΣ ΕΚΠΟΝΗΘΕΙΣΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ, ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

Τα συμπεράσματα της παραπάνω έρευνας είναι ότι ο ογκολυτικός ιός VSV.IFN-β έδειξε εντυπωσιακή αντικαρκινική δράση έναντι μεσοθηλιακών καρκινικών κυττάρων μέσω κυτταρόλυσής τους σε *in vitro* πειραματικά μοντέλα, καθώς και σε ορθοτοπικά και ετεροτοπικά μοντέλα μεσοθηλιώματος σε ανοσοεπαρκή ποντίκια, όπου η αντικαρκινική δράση αποδόθηκε όχι μόνο στη λύση των καρκινικών κυττάρων, αλλά και στην έκλυση αντικαρκινικής ανοσιακής αντίδρασης μέσω CD8+ T-λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ανοσιακή «μνήμη» έναντι των μεσοθηλιακών κυττάρων, καθότι η επανέκθεση ανοσοεπαρκών ποντικών που είχαν ήδη θεραπευτεί με τη χορήγηση του VSV.mIFN-β σε υποδόρια ένεση με μεσοθηλιακά κύτταρα ποντικίου κατέληξε σε απόρριψη της εμφύτευσης των κυττάρων (δεν αναπτύχθηκαν όγκοι). Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την περαιτέρω μελέτη του ιού VSV.IFN-β στη θεραπεία του κακοήθους μεσοθηλιώματος με ανάλογες κλινικές μελέτες σε ασθενείς.

Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα του ογκολυτικού ιού VSV.IFN-β εξαρτάται από τη λειτουργικότητα των «μονοπατιών» των ιντερφερονών τύπου I, κάτι που ήταν αναμενόμενο αν ληφθεί υπόψη η υψηλή ευαισθησία του ιού VSV στην αντική δράση των ιντερφερονών τύπου I. Αν και τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα έχουν απενεργοποιήσει τα «μονοπάτια» ιντερφερονών τύπου I λόγω της αποπτωτικής τους δράσης που αντίκειται στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, υφίσταται ετερογένεια των κυτταρικών πληθυσμών που προβάλλει έναν εγγενή μηχανισμό μερικής αντίστασης την ογκολυτική αντικαρκινική δράση αυτού του ιού. Σε αυτά τα πλαίσια είναι απαραίτητη η ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών, όπως π.χ. η ανοσοϊστοχημεία για την έκφραση ενζύμων-βιοχημικών δεικτών που υποδηλώνουν λειτουργικότητα των «μονοπατιών» ιντερφερονών τύπου I, ώστε να μπορούν να επιλεγούν οι ασθενείς που έχουν υψηλότερες πιθανότητες ευαισθησίας στην ογκολυτική δράση του VSV.

Ενας βασικός λόγος της ενσωμάτωσης του γονιδίου της IFN-β στον ιό VSV είναι η αύξηση της ασφάλειάς του στην περίπτωση ιικής προσβολής φυσιολογικών κυττάρων; στην περίπτωση αυτή η έκφραση της IFN-β αναμένεται να ενισχύσει την αντική απάντηση των φυσιολογικών κυττάρων, αποτρέποντας τον πολλαπλασιασμό του ιού και συνεπώς τον κυτταρικό θάνατο. Αν και ο ιός VSV.mIFN-β δεν προκάλεσε παρενέργειες και ήταν πολύ καλά ανεκτός στις θεραπευτικές δόσεις που χορηγήθηκαν σε ανοσοεπαρκή ποντίκια, παρατηρήθηκαν νευροτοξικές επιπλοκές στα ανοσοανεπαρκή ποντίκια των παραπάνω μελετών με τη χρήση του VSV.hIFN-β και VSV.GFP. Άλλες μελέτες έχουν επίσης καταδείξει την νευροτοξικότητα του wild-type VSV σε ποντίκια. Αυτά τα δεδομένα έχουν προκαλέσει αμφιβολίες για την ασφαλή χορήγηση του ιού σε ασθενείς με κακοήθες μεσοθηλίωμα που μπορεί να υποστούν ανοσοκαταστολή με τη χορήγηση χημειοθεραπειών. Συνεπώς, για τη θεραπευτική χορήγηση αυτού του ιού πρέπει να χρησιμοποιούνται τροποποιημένα, μη τοξικά ιικά strain του VSV (attenuated strains) ή να ακολουθούνται τοπικές μέθοδοι χορήγησης (π.χ. τοπικά) που περιορίζουν τη συστηματική κυκλοφορία του ιού.

Ένα ακόμα σημαντικό εμπόδιο για τη θεραπευτική εφαρμογή του VSV καθώς και άλλων ογκολυτικών ιών είναι η παραγωγή ουδετεροποιητικών αντισωμάτων που απενεργοποιούν τον ιό, ιδιαίτερα μετά από συστηματική του χορήγηση (ενδοφλεβίως). Στρατηγικές που μπορούν να εφαρμοστούν για τη μείωση της ανοσογονικότητας των ιών περιλαμβάνουν την τροποποίηση των αντιγόνων/επιτόπων του ιού, η κάλυψη των ιών με πολυμερή που «κρύβουν» τα ιικά αντιγόνα, και η ανοσοκαταστολή. Ωστόσο, η εφαρμογή ανοσοκαταστολής για τη χορήγηση του VSV αυξάνει τον κίνδυνο τοξικών παρενεργειών του ιού με προσβολή των φυσιολογικών

κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα αναμένεται να μειώσει την αντικαρκινική αποτελεσματικότητα του ιού δεδομένου ότι ο VSV δε δρα μόνο προκαλώντας ογκόλυση, αλλά και επάγοντας ειδική αντικαρκινική ανοσιακή αντίδραση.

Επιπλέον, η συστηματική, ενδοφλέβια χορήγηση του VSV οδηγεί στην κύρια πρόσληψή του από τα ηπατικά κύτταρα, περιορίζοντας την πρόσβαση του στη συστηματική κυκλοφορία και συνεπώς στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Συνεπώς, μέθοδοι βελτίωσης της πρόσβασης του VSV στο μικροπεριβάλλον του όγκου με την επαγωγή τοπικής φλεγμονής στον όγκο αποτελούν πεδίο έρευνας για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της ογκολυτικής ιοθεραπείας. Τέλος, η ενσωμάτωση της ογκολυτικής ιοθεραπείας με τις υπόλοιπες ενδεδειγμένες αντικαρκινικές θεραπείες για το μεσοθηλίωμα, καθώς και άλλων τύπων καρκίνου, χρήζει περαιτέρω προσοχής και έρευνας, καθώς η ταυτόχρονη ή διαδοχική εφαρμογή αυτών των θεραπειών μπορεί να δράσει συνεργιστικά με καλύτερα αποτελέσματα από ό,τι η εφαρμογή κάθε θεραπευτικής στρατηγικής ξεχωριστά.

Παρά τις παραπάνω δυσκολίες που αφορούν γενικά τα περισσότερα είδη ογκολυτικών ιών, η ογκολυτική ιοθεραπεία είναι μία καινοτόμος θεραπευτική στρατηγική που βρίσκεται υπό έντονη έρευνα. Υπάρχουν τουλάχιστον 15 ήδη ογκολυτικών ιών (γενετικά τροποποιημένοι αδενοϊοί, ερπητοϊοί, ιοί δαμαλίτιδας, ρεοϊοί, ιοί Coxsackie, ιοί ιλαράς) που βρίσκονται υπό κλινική μελέτη για διάφορους τύπους καρκίνου, όπως το γλοιοβλάστωμα, ο καρκίνος παγκρέατος, πνεύμονα, νεφρών, κεφαλής και τραχήλου, παχέως εντέρου. Για το κακόηθες μεσοθηλίωμα, έχει ήδη ξεκινήσει μία κλινική μελέτη φάσης I που χρησιμοποιεί τον ογκολυτικό ιό ιλαράς (measles virus, MV) που εκφράζει το γονίδιο του υποδοχέα ιωδίου (sodium iodide symporter, MV.NIS), ενώ ο ανάλογα τροποποιημένος ιός VSV.hIFN-β.NIS βρίσκεται υπό κλινική μελέτη σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, οξεία λεμφογενή λευχαιμία, T-cell λέμφωμα, και καρκίνο του ενδομητρίου (NCT03017820).

## **7. SUMMARY OF THE AFOREMENTIONED RESEARCH PROJECTS, PROSPECTS FOR CLINICAL TRIALS AND FUTURE CHALLENGES**

The results of the described research projects support that the oncolytic virus VSV.IFN-β manifests remarkable anticancer effects against mesothelioma cancer cells and this is mediated not only through direct lysis of cancer cells, but also through the induction of CD8+ T-cell mediated anticancer immunity. Furthermore, immunocompetent mice that were cured and remained cancer free for more than 6 months after treatment of heterotopic subcutaneous mouse mesothelioma flank tumors with VSV.mIFN-β did not develop new flank tumors after reexposure to subcutaneous injections with the same mouse mesothelioma cells, indicating the development of anticancer “immune memory”. These results support the translation of VSV.IFN-β in clinical trials as a novel therapeutic approach for patients with malignant pleural mesothelioma.

However, the efficacy of VSV.IFN-β depends on the functionality of the type I IFN pathways, an observation which was expected if one considers the exquisite sensitivity of VSV to the antiviral functions of type I IFNs. Although a large percentage of cancer cells have evolutionarily favored the deactivation of type I IFN pathways due to their antiproliferative effects in cancer growth, the presence of some cancer cells with “active” type I IFN pathways pose an inherent mechanism of resistance to the oncolytic effects of VSV. With this in mind, it is necessary to develop personalized therapeutic strategies, i.e. immunohistochemistry for



biomarkers indicative of “active” or “inactive” type I IFN pathways, in order to select patients who have higher chances of responding to the oncolytic effects of VSV.

One of the main reasons for the genetic engineering of VSV to express IFN- $\beta$  is the improved safety of it in case of infection of normal cells by this virus; in this case, the expression of IFN- $\beta$  would be expected to enhance the antiviral response of normal cells to the virus, preventing the replication of the virus and thus cell death. Although VSV.mIFN- $\beta$  did not induce significant side effects and was very well tolerated at the treatment doses administered to immunocompetent mice, neurotoxic complications were observed in the immunodeficient mice treated with VSV.hIFN- $\beta$  and VSV.GFP. Other studies have also demonstrated neurotoxicity of wild-type VSV in mice. These observations have raised doubts about the safety of the administration of this virus in patients with malignant pleural mesothelioma who could become immunosuppressed in the context of their malignancy or their treatment with chemotherapy. Hence, for the therapeutic administration of this virus the use of modified, nontoxic, attenuated viral strains is necessary or one should consider the local rather than systemic administration of this virus.

Another very important obstacle in the clinical application of VSV, as well as of other oncolytic viruses, is the induction of neutralizing antibodies that inactivate the virus, especially after its systemic administration. Strategies that could be applied to reduce the immunogenicity of this virus include the modification of its immunogenic viral epitopes, the coating of the virus with polymers that “hide” these epitopes and prevent their recognition by the immune system, and systemic immunosuppression. However, the latter approach could increase the risk of side effects by rendering normal cells more susceptible to viral attack, while VSV’s anticancer effect could be significantly hampered, as this is not only mediated by oncolysis of cancer cells, but also through induction of adaptive anticancer immune response.

Furthermore, the intravenous administration of VSV is followed by its uptake by hepatocytes, limiting its access to the systemic circulation and thus to the tumor’s microenvironment. Thus, strategies to improve the access of systemically administered VSV to the tumor microenvironment are also important for the improvement of the efficacy of oncolytic virotherapy; one such approach is the induction of local tumor inflammation which is currently under investigation. Finally, the incorporation of oncolytic virotherapy with other clinically approved therapeutic strategies for malignant pleural mesothelioma, as well as other cancer types, is of major importance and merits further investigation, as the concurrent or successive application of such therapeutic approaches may have a synergistic effect with better results compared to the application of each therapeutic approach separately.

Despite these difficulties that generally concern most types of oncolytic viruses, oncolytic virotherapy is a groundbreaking, novel therapeutic strategy which is being actively investigated in clinical trials. There are at least 15 different types of oncolytic viruses (genetically modified adenoviruses, herpesviruses, retroviruses, vaccinia, Coxsackie and measles viruses) under clinical trials for various cancer types, such as glioblastoma multiforme, pancreatic, lung, colon, renal cell and head and neck cancer. For malignant pleural mesothelioma, a phase I clinical trial is currently investigating a viral strain of the oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter (MV.NIS), while VSV.hIFN- $\beta$ .NIS is currently being investigated in patients with multiple myeloma, acute lymphoblastic leukemia, T-cell lymphoma and endometrial cancer (NCT03017820).

