

KOMBINACIJA OBSEVANJA IN ŽILNO CILJANE GENSKE TERAPIJE ZA CD105 TER CD146

Monika Savarin^{1,2}, Maja Čemažar^{1,2}, Gregor Serša^{1,3}

¹ *Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija*

³ *Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: msavarin@onko-i.si

Izvleček

Kombinacija radioterapije z drugimi terapijami je dobro uveljavljen pristop k zdravljenju raka, saj se na ta način izboljša izid terapije. V zadnjem času je veliko pozornosti namenjene tudi tumorskemu žilju, saj je to ključno za rast, razvoj in napredovanje tumorjev. Z vplivanjem na tumorsko žilje in prekrvavitev tumorjev lahko vplivamo na občutljivost tumorjev na ionizirajoče sevanje in izboljšamo njegov protitumorski učinek. Pomemben aspekt je kombinacija utišanja večih signalnih poti tumorskega endotelija sočasno, med pomembnima tarčnima molekulama pa sta CD105 ter MCAM. S pomočjo genskega elektro-prenosa takih terapevtskih plazmidov, ki nosijo zapis za antiangiogene molekule in nimajo zapisa za antibiotično rezistenco, razvijamo nov pristop kombiniranega zdravljenja, ki ima velik translacijski potencial za klinične študije.

Obsevanje

Med klasične pristope zdravljenja raka sodi radioterapija, kjer lokalno ciljamo tumorsko maso. Ionizirajoče sevanje uspešno pobija celice preko neposrednih in posrednih poškodb DNA (1) in spodbudi delovanje imunskega sistema. Imunomodulatorni učinek povzročijo številni citokini, v tumorskem mikrookolju pa zaradi sporočanja tumorskih antigenov iz apoptotskih in nekrotičnih celic, pride do aktivacije imunskih celic, ki spodbudijo delovanje citotoksičnih T limfocitov, T-celic: te nato lažje prepoznavajo tudi viabilne tumorske celice (2). Možno je, da obsevalne poškodbe niso letalne in da tumorska celica uspe ohraniti svojo viabilnost (3). To predstavlja težavo pri zdravljenju predvsem večjih in slabo dostopnih tumorjev, ki so večinoma hipoksični in zato bolj radiorezistentni. Potreben je drugačen način zdravljenja, med obetavne pa sodi modulacija tumorskega žilja in s tem prekrvavljenosti tumorske mase.

Žilno ciljane terapije

Tumor potrebuje lastno žilje za nemoteno samooskrbo z metaboliti, hranili in kisikom, ter za nadaljnji razvoj in metastaziranje. Za omejitev rasti tumorja in doseganje boljših terapevtskih učinkov lahko uporabljamo žilno ciljane terapije, ki jih delimo v dve podskupini; antiangiogene ter žilno razdiralne terapije. V prvi, avaskularni fazi tumorske rasti je difuzija snovi iz okolice v tumor še ustrezna (4). Na tej stopnji se lahko uporabi različne zaviralce angiogenih faktorjev, ki preprečijo nastanek tumorskega žilja. Take terapije so antiangiogene in med prevladujočimi tarčami je predvsem vaskularni endotelni rastni faktor (VEGF) in njegove signalne poti. Z antiangiogenimi terapijami

lahko normaliziramo tumorsko žilje, kar vodi v boljšo oksigenacijo tumorjev (5).

Drug način, žilno razdiralne terapije, uporabljamo pri večjih tumorjih v vaskularni fazi rasti. Uničenje žilja spodbudi nastanek centralne hemoragične nekroze ter ishemije, ki spodbudita kaskado umiranja tumorskih celic, ter sočasno nastanek viabilnega oksigeniranega roba (5).

Učinki kombinacije obsevanja in žilno ciljanih terapij

Kljub dobrim rezultatom uporaba samo žilno ciljane terapije le redko privedejo do popolnih ozdravitev in uničenja tumorjev. Zaradi tega jih največkrat kombiniramo z drugimi terapijami, kot je obsevanje. Za učinkovito obsevanje je ključnega pomena primerna oksigenacija tumorjev, zato je kombinacija žilno ciljane terapije ter radioterapije obetaven pristop, s katerim lahko dosežemo radiosenzibilizacijo tumorjev.

Učinki kombinirane antiangiogene terapije in radioterapije so se pokazali kot sinergistični in aditivni, z dobrim protitumorskim učinkom. V kliničnih študijah se najpogosteje uporablja bevacizumab, monoklonsko protitelo, ki vpliva na izražanje VEGF signalne poti, v kombinaciji z obsevanjem ter z nekaterimi kemoterapevtki za zdravljenje različnih vrst raka, pri čemer pa se kljub dobrim protitumorskim učinkom in visokim deležem popolnih ozdravitev lahko pojavijo hudi, tudi potencialno letalni stranski učinki. Poleg tega imajo protitelesa tudi krajši čas delovanja, tumorji pa razvijejo nanje rezistenco in preko povratnih zank aktivirajo druge signalne poti, neodvisne od utišanih (6).

Za kombiniranje žilno razdiralne terapije in obsevanja so bili dalj časa prisotni zadržki, saj uničenje tumorskega žilja privede do centralne nekroze tumorjev, ki bi lahko pripomogla k višji radiorezistenci tumorjev. Vendar pa so ugotovili, da v tumorju po žilno razdiralni terapiji nastane dobro oksigeniran in viabilen rob, ki je potencialna tarča obsevanja. Z uničenjem obstoječega žilja se tako odstrani slabo oksigenirano radiorezistentno subpopulacijo tumorskih celic (5). V primerjavi z antiangiogenimi terapijami je na tem področju izvedenih manj kliničnih študij, kljub temu pa so uspeli dokazati, da so take terapije podaljšale preživetje nekaterih onkoloških pacientov (7).

Zato so potrebne raziskave, usmerjene v nove, bolj ciljane terapije, ki imajo bolj specifično in dolgotrajno delovanje, s katerimi bo dosežen boljši protitumorski učinek in več popolnih ozdravitev z minimalnimi stranskimi učinki.

CD105

Ena izmed alternativnih tarč žilno ciljane terapije je CD105 (ENG, endoglin) (8). CD105 je ko-receptor receptorskega kompleksa transformirajočega faktorja beta (TGF- β), ki skupaj z ligandi tvori kompleksen signalni sistem, sodelujoč v različnih celičnih procesih, ki uravnavajo migracijo, proliferacijo, diferenciacijo ter adhezijo celic. V različnih *in vitro* raziskavah so dokazali, da ima utišanje izražanja CD105 antiangiogeni učinek, kar je posledica delovanja na endotelijske celice. Na tumorskih modelih se je njegovo utišanje odražalo v značilnem zaostanku v rasti tumorjev in protimetastatskem učinku, ki sta bili posledici obeh žilno razdiralnih učinkov. CD105 so ciljali predvsem z uporabo protiteles (8,9), boljša učinkovitost pa se je dosegla pri uporabi bolj tarčnih molekul z daljšim delovanjem. Med te sodijo mala interferenčna RNA (siRNA) (10) ter mala lasnična RNA (shRNA) (11,12), z delovanjem po mehanizmu interference RNA.

Učinke delovanja *in vivo* smo dokazali tudi s pomočjo histoloških analiz tumorjev in na modelu dorzalnega okna, kjer se je pokazala korelacija med pretokom krvi in površino žil v tumorju (13).

CD146

Tudi molekula CD146 (MCAM, melanoma cell adhesion molecule) je prav tako pomembna v tumorskem endoteliju. Ta sodeluje pri številnih znotrajceličnih signalnih poteh, ki omogočajo nastanek metastaz in angiogenezo, vodijo v migracijo normalnih in invazijo tumorskih celic, inhibirajo apoptozo ter povečujejo sposobnost preživetja tumorskih celic. Zaradi raznovrstnosti je ta molekula zanimiva tarča: nas zanima predvsem kot alternativa TGF- β signalne poti v procesu angiogeneze. Znano je, da je CD146 koreceptor VEGF-R2 in v endotelijskih celicah aktivira NF- κ B (jedrni faktor kapa B) ter s tem spodbuja transkripcijo proangiogenih faktorjev (IL-8, IL-6, VEGF, ICAM-1, celične adhezijske molekule žil VCAM-1, metaloproteinaze matriksa itd.) (14). Dokazano je, da ima utišanje izražanja molekule CD146 z molekulami shRNA antiangiogeni učinek v endotelijskih celicah, kot tudi protitumorski učinek na celice melanoma, ki ga izražajo (15,16).

Genski elektroprenos plazmida

Molekule shRNA se v tarčne celice vnaša kot del plazmida, ki se v njenem jedru prepíše v pre-shRNA. Nato v citoplazmi poteka odstranitev lasnične zanke, nastane siRNA, ki nadalje z vezavo v različnih encimskih kompleksih privede do vezave na tarčno mRNA. S tem povzroči njeno razgradnjo in torej onemogoči nadaljnjo biosintezo proteina. Gre za delovanje po mehanizmu interference RNA, ki na post-transkripcijski ravni uravnava izražanje genov (17). Znano je, da po vnosu siRNA ta interferenčni učinek traja manj kot teden dni, kar je posledica razgradnje siRNA z nukleazami ter izgub molekul po celičnih delitvah. Prednost uporabe shRNA je v tem, da lahko dosežemo dolgotrajno utišanje tarčnega gena, saj je plazmid bolj odporen na razgradnjo in omogoča dolgotrajno in večkratno prepisovanje shRNA iz plazmidnega vektorja.

Plazmidi so velike molekule, ki v celice same ne morejo vstopiti. Da bi torej tako tarčno molekulo vnesli v celice, lahko uporabimo različne metode vnosa, ki jih v grobem delimo na virusne in nevirusne. Genski elektroprenos sodi med varne in učinkovite nevirusne fizikalne metode, kjer za vnos nukleinskih kislin v različna tkiva uporabimo elektroporacijo. Tu celice izpostavimo zunanemu električnemu polju, ki privede do strukturnih sprememb v celični membrani in s tem do povečanja njene prepustnosti tudi za velike molekule, kot je plazmid (18). Učinkovitost takega načina genske terapije je bila dokazna v različnih študijah, kjer so uspešno vnašali plazmide z zapisom za imunomodulatorne (IL-12) (19) in antiangiogene (anti-CD105, anti-MCAM) molekule (12,15,16).

Kombiniranje žilno ciljanega genskega elektroprenosa in radioterapije je pri različnih tumorskih modelih privedlo do izboljšane protitumorske učinkovitosti (11,12,16). Pri tumorjih kot je mišji melanom, se s tako terapijo lahko spodbudi delovanje imunskega sistema (preko sproščenih molekul DNA v tumorsko mikrookolje). Tovpliva tudi na imunski spomin, saj je po ponovni nasaditvi tumorjev več kot polovica že ozdravljenih miši nedovzetnih na njihovo izrast (12,16). Pomen takega genskega elektroprenosa

je pokazal dober radiosenzibilizirajoči učinek na tumorje, ki se je kazal v značilnih zaostankih v rasti tumorjev, pa tudi v histoloških analizah tako tretiranih tumorjev: zmanjšano je bilo število tumorskih žil in proliferirajočih tumorskih celic, povečan je bil delež hipoksije, nekroze in apoptoze (12,16). Pri raziskavah pa se je ob tem izpostavil še drug pomemben aspekt: fenotip ter imunsko mikrookolje tumorjev. Ista kombinirana terapija namreč lahko deluje drugače pri različnih tumorskih modelih. Na melanomskem modelu B16F10, ki je v primerjavi z mamarnim adenokarcinomom TS/A bolj imunogen, smo dokazali, da lahko značilen protitumorski učinek dosežemo že pri kombinaciji obsevanja z genskim elektroprenosom plazmida, ki ne nosi zapisa za tarčni gen, saj je tu dejavnih veliko več citosolnih senzorjev DNA (12).

Izzivi za prihodnost

Do sedaj še ni bilo narejenih raziskav, kjer bi sočasno ciljali dve različni signalni poti tumorskega žilja z dvema molekulama shRNA na enem plazmidu, ter ugotavljali terapevtske učinke ter mehanizme delovanja na *in vitro* ter *in vivo* ravni. V naši raziskovalni skupini smo naslovili tudi to področje in uspešno konstruirali tak plazmid, ki sočasno cilja (utiša) izražanje CD105 in CD146, ter je brez zapisa za odpornost proti antibiotikom (kot selekcijski označevalec). Na ta način dodatno zagotavljamo varnost bolnikov ter okolja (preprečitev horizontalnega genskega prenosa na komenzalne bakterije). Na *in vitro* ravni smo že preverili njegovo učinkovitost (20), ter dokazali antiangiogeni potencial. V teku so tudi študije *in vivo*, kjer bomo preverjali vpliv plazmida na radiosenzibilizacijo tumorjev ter mehanizme delovanja s pomočjo analize senzorjev DNA ter histoloških preiskav.

Literatura

1. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W, Baskar R, Phil M. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* 2012;9(3):193-9.
2. Deng L, Liang H, Fu S, R. weichselbaum R, Fu YX. From DNA Damage to nucleic acid sensing: a strategy to enhance radiation therapy. *Clin Cancer Res.* 2016;22(1):20-5.
3. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.
4. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(4):273-86.
5. Ciric E, Sersa G, Serša G. Radiotherapy in combination with vascular-targeted therapies. *Radiol Oncol.* 2010;44(2): 67-78.
6. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2014;8(20):709-31.
7. Tsang W, Gan L, Zhang Z, Li T, Luo Y, Zhong L, et al. Clinical application of tumor vascular disrupting therapy: a systematic review and meta-analysis. 2021; *Onco Targets Ther.* 2021;14:5085-5093
8. Muñoz TG, Amaral AT, Puerto-Camacho P, Peinado H, de Álava E. Endoglin in the

spotlight to treat cancer. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(6), 3186.

9. Liu Y, Paauwe M, Nixon AB, Hawinkels LJAC. Endoglin targeting: lessons learned and questions that remain. *Int J Mol Sci.* 2021;22(1):147.
10. Dolinsek T, Markelc B, Sersa G, Coer A, Stimac M, Lavrencak J, et al. Multiple delivery of siRNA against endoglin into murine mammary adenocarcinoma prevents angiogenesis and delays tumor growth. *PLoS One.* 2013;5;8(3):e587.
11. Stimac M, Kamensek U, Cemazar M, Kranjc S, Coer A, Sersa G. Tumor radiosensitization by gene therapy against endoglin. *Cancer Gene Ther.* 2016;23(7):214-20.
12. Savarin M, Kamensek U, Cemazar M, Heller R, Sersa G. Electrotransfer of plasmid DNA radiosensitizes B16F10 tumors through activation of immune response. *Radiol Oncol.* 2017; 30-9.
13. Savarin M, Prevc A, Rzek M, Bosnjak M, Vojvodic I, Cemazar M, et al. Intravital Monitoring of vasculature after targeted gene therapy alone or combined with tumor irradiation. *Technol Cancer Res Treat.* 2018;17:1533033818784208.
14. Jiang T, Zhuang J, Duan H, Luo Y, Zeng Q, Fan K, et al. CD146 Is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood.* 2012;120(11):2330-9.
15. Prosen L, Hudoklin S, Cemazar M, Stimac M, Lamprecht Tratar U, Ota M, et al. Magnetic field contributes to the cellular uptake for effective therapy with magnetofection using plasmid DNA encoding against MCAM in B16F10 melanoma *in vivo*. *Nanomedicine (Lond).* 2016;11(6):627-41.
16. Brezar SK, Mrak V, Bosnjak M, Savarin M, Sersa G, Cemazar M. Intratumoral gene electrotransfer of plasmid dna encoding shRNA against melanoma cell adhesion molecule radiosensitizes tumors by antivascular effects and activation of an immune response. *Vaccines.* 2020;8(1):135.
17. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* 2013;42(1):217–39.
18. Neumann E, Rosenheck K. Permeability Changes Induced By Electric Impulses In Vesicular Membranes. *J Membr Biol.* 1972;10(1):279-90.
19. Daud AI, Deconti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26(36):5896-903.
20. Savarin M, Kamensek U, Znidar K, Todorovic V, Sersa G, Cemazar M. Evaluation of a novel plasmid for simultaneous gene electrotransfer-mediated silencing of CD105 and CD146 in combination with irradiation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):3069.

