

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:
"ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΡΙΖΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ
ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ "**

Της Ιατρού
Μαρίας Θεοδώρου Βλαχάκη

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής
Τομέας Ακτινολογίας
Ηράκλειο, Κρήτη

*Αφιερώνω αυτήν την εργασία
στους γονείς μου*

*Θα επιθυμούσα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου
στους συναδέλφους Edward Brian Butler,
Estuardo Aguilar-Cordova και
Κων/νο - Χαράλαμπο Α. Βαρβέρη
για την καθοδήγηση και την υποστήριξή τους*

Τμήματα αυτής της εργασίας έχουν δημοσιευτεί ως ακολούθως:

1. Vlachaki MT, Hernandez-Garcia A, Ittman M, Chhikara M, Aguilar L, Zhu X, The BS, Butler EB, Woo S, Thompson, TC, Aguilar-Cordova A. "Impact of Preimmunization in Adenoviral Vector Expression and Toxicity in a Subcutaneous Mouse Cancer Model". *Molecular Therapy*. Vol 6 (3), pp.342-348, 2002
2. Maria Vlachaki, Madhu Chhikara, Laura Aguilar, Xiaohong Zhu, Kam J. Chiu, Shiao Woo, Bin S. The, Timothy C. Thompson, E. Brian Butler, Estuardo Aguilar-Cordova, "Enhanced Therapeutic Effect of Multiple Injections of Hsv-tk+ GCV Gene Therapy in Combination with Ionizing Radiation In a Mouse Mammary Tumor Model", *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. Vol. 51 (4), pp. 1008-17, 2001
3. Madhu Chhikara, Hanxian Huang, Maria Vlachaki, Xiaohong Zhu, Kam J. Chiu, Shiao Woo, Timothy C. Thompson, E. Brian Butler, Estuardo Aguilar-Cordova, "Enhanced Therapeutic Effect of Hsv-tk Gene Therapy and Ionizing Radiation for Prostate Cancer", *Molecular Therapy*, Vol. 3, No 4, pp. 536-542, 2001

Τα πειράματα αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια του Νοσοκομείου Veterans Affairs Medical Center σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο Baylor College of Medicine εις Χιούστον, Τέξας, Ηνωμένων Πολιτειών

Η εργασία υπεστηρίχθη από

- 1) Specialized Program of Research Excellence (SPORE) grant (CA58204) from the National Cancer Institute
- 2) Merit Review Award by the Department of Veterans Affairs
- 3) Ιατρική Σχολή Baylor College of Medicine, Τομέας Ακτινολογίας, Τμήμα Ακτινοθεραπείας
- 4) Advantagene, Inc, Boston, Massachusetts και
- 5) Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Ακτινολογίας

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του προστάτη είναι η πλέον συχνή αιτία κακοήθειας και η δεύτερη κατά σειρά αιτία θανάτου στον άνδρα. Οι τρέχουσες θεραπείες για τη νόσο αυτή που περιλαμβάνουν τη ριζική προστατεκτομή, την ακτινοθεραπεία και την ορμονοθεραπεία συνοδεύονται από σημαντικές επιπλοκές καθώς και υποτροπές (1,2). Η ακτινοθεραπεία αποτελεί τοπική μορφή θεραπείας η οποία χαρακτηρίζεται από έλλειψη ειδικότητας για την αντιμετώπιση των υπό αναφορά νεοπλασματικών όγκων (3). Αν και μια καμπύλη Δόσης – Ανταπόκρισης / Αποτελέσματος στην ιονίζουσα ακτινοβολία έχει τεκμηριωθεί για τους περισσότερους όγκους, περαιτέρω αύξηση των δόσεων ακτινοβολίας περιορίζεται από τον κίνδυνο εμφάνισης τοξικότητας στους φυσιολογικούς ιστούς. Επιπλέον, η ακτινοθεραπεία δεν έχει καμία θεραπευτική επίδραση αναφορικά με την ολική επιβίωση σε περίπτωση μεταστατικής νόσου. Η γονιδιακή θεραπεία κατά του καρκίνου επιτρέπει τη τοπική χορήγηση συγκεκριμένων γονιδίων εντός των όγκων τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε ακτινοευαισθητοποίηση. Οι αδενοϊοί (AdV) είναι άριστοι φορείς γονιδίων και χρησιμοποιούνται για τη χορήγηση της ανωτέρω θεραπείας επειδή 1) καταλήγουν σε υψηλή παραγωγή πρωτεϊνών αντιστοιχούντων στα θεραπευτικά γονίδια, 2) είναι αποτελεσματικοί σε βραδέως και ταχέως αναπτυσσόμενους όγκους εφόσον μολύνουν πολλαπλασιαζόμενα και μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, 3) δεν ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό του μεμολυσμένου κυττάρου και επομένως δεν υπάρχει κίνδυνος μεταλλάξεων, 4) δύνανται να προκαλέσουν επαύξηση της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού κατά του όγκου, και 5) υπάρχουν εργαστηριακές μέθοδοι παραγωγής τους σε υψηλούς τίτλους συγκέντρωσης. Μια συγκεκριμένη μέθοδος γονιδιακής θεραπείας με AdV περιλαμβάνει τη χορήγηση γονιδίου από το ένζυμο της θυμιδινικής κινάσης του ιού του απλού έρπητος (HSV-tk) που ακολουθείται από τη συστηματική χορήγηση του προφαρμάκου ganciclovir (GCV) (4).

Το GCV είναι ένα προφάρμακο που για να ενεργοποιηθεί, μπορεί αρχικά να φωσφορυλιωθεί μόνο κάτω από την επίδραση του ενζύμου θυμιδινική κινάση του ιού του απλού έρπητος, το οποίο είναι τουλάχιστον 100 φορές

αποτελεσματικότερο συγκρινόμενο με τη δραστικότητα των ενδοκυτταρίων κινασών. Κατόπιν αυτού του σταδίου, οι ενδοκυτταρικές κινάσες περαιτέρω φωσφορυλιώνουν το GCV και το μετατρέπουν στη τριφωσφορική μορφή του. Σε αυτή τη μορφή, το GCV δρα ως ανάλογο της γουανοσίνης που 1) αναστέλλει τη δράση της πολυμεράσης του δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέως (DNA) και 2) ανταγωνίζεται με τα νουκλεοτίδια. Κατ' αυτό τον τρόπο παρεμποδίζεται η επιμήκυνση του DNA και προκαλείται κυτταρικός θάνατος (5,6). Επιπλέον, η γονιδιακή θεραπεία με HSV-tk προκαλεί το φαινόμενο "bystander", σύμφωνα με το οποίο μη-μολυνθέντα γειτονικά κύτταρα γίνονται ευαίσθητα στη δράση του GCV. Από πειράματα με κυτταρικές καλλιέργειες *in vitro*, ο αρχικός μηχανισμός για το ανωτέρω φαινόμενο έχει καθοριστεί ως η μεταφορά των ενεργών (τριφωσφορυλιωμένων) μεταβολιτών GCV μέσω διακυτταρικών χασμάτων επικοινωνίας ("gap junctions") (7,8). *In vivo* πειράματα έχουν αποδείξει ότι η γονιδιακή θεραπεία με HSV-tk προκαλεί μια ισχυρή ανοσολογική απάντηση που καθυστερεί τόσο τη τοπική όσο και τη μεταστατική ανάπτυξη των όγκων (9-13).

Δεδομένου ότι η ακτινοθεραπεία δρα προκαλώντας διάσπαση των αλύσεων του DNA, υποθέτουμε ότι ο συνδυασμός γονιδιακής θεραπείας HSV-tk και ακτινοβολίας επιδεινώνει τις βλάβες στο DNA και περαιτέρω παρεμποδίζει τους μηχανισμούς αποκατάστασης των DNA βλαβών. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η ακτινοβολία μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα στην ενσωμάτωση και έκφραση των θεραπευτικών γονιδίων από τους καρκινικούς ιστούς όταν χρησιμοποιούνται οι αδenoϊοί ως μέσο χορήγησης των γονιδίων αυτών(14). Υποθέτουμε επίσης ότι οι βλάβες των κυτταρικών μεμβρανών που προκαλούνται από την ακτινοβολία διευκολύνουν τη μεταφορά κυτταροτοξικών αναλόγων νουκλεοτιδίων GCV σε γειτονικά, μη μολυνθέντα από τον αδenoϊό, κύτταρα. Αυτή η συνδυασμένη θεραπευτική προσέγγιση έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα καρκίνου (15).

Στην παρούσα μελέτη, ο ρόλος της γονιδιακής θεραπείας HSV-tk σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία μελετήθηκε σε δύο μοντέλα υποδορίων όγκων σε ποντίκια. Το πρώτο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η 60

θεραπευτική απάντηση μιας επιθετικής μορφής προστατικού καρκίνου ενώ το δεύτερο αναφερόμενο σε καρκίνο μαστού αντιπροσωπεύει ομάδα περισσότερο βραδέως αναπτυσσόμενων νεοπλασμάτων. Η επιλογή μοντέλων καρκίνου βασισμένων σε υποδορίους όγκους έγινε με βάση την εύκολη πρόσβαση για την εγκατάσταση των όγκων στους γλουτούς των πειραματόζων, την δυνατότητα επακριβούς παρακολούθησης της ανάπτυξης, μέτρησης και καταγραφής των διαστάσεων των πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας, καθώς και την αποφυγή ανάπτυξης επιπλοκών από την ακτινοβολήση της πυέλου, γεγονός που δύναται να αλλάξει τα πειραματικά αποτελέσματα.

Στόχος αυτής της μελέτης είναι επίσης να αξιολογηθεί ο ρόλος των πολλαπλών συνεδριών της γονιδιακής θεραπείας HSV-tk σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία. Οι επαναλαμβανόμενες συνεδρίες γονιδιακής θεραπείας μπορούν θεωρητικά να βελτιώσουν το θεραπευτικό αποτέλεσμα λόγω 1) της περιορισμένης αποτελεσματικότητας στην ενδοκυτταρική ενσωμάτωση των θεραπευτικών γονιδίων μέσω των 2) της πρόσκαιρης και μικράς διάρκειας έκφρασης του θεραπευτικού γονιδίου, και 3) της καταστροφής του αδενοϊού από τους μηχανισμούς κυτταρικής και χημικής ανοσίας (16,17). Δεδομένου ότι η ακτινοθεραπεία χορηγείται συνήθως κατά τη διάρκεια ενός χρονικού διαστήματος εβδομάδων, υποθέτουμε ότι επαναλαμβανόμενες συνεδρίες γονιδιακής θεραπείας HSV-tk μπορούν να είναι απαραίτητες για να επιτευχθεί ακτινοευαισθητοποίηση. Επιπλέον, δεδομένου ότι ο καρκίνος είναι μια χρόνια πάθηση, οι επαναλαμβανόμενες συνεδρίες γονιδιακής θεραπείας μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμες για τη μακρόχρονη διατήρηση των θεραπευτικών απαντήσεων καθώς και για τη θεραπεία υποτροπών.

Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση γονιδιακής θεραπείας με αδενοϊούς ως φορείς δύναται να οδηγήσει σε συστηματική ανοσοποίηση που επίσης μπορεί να περιορίσει την ενδοκυτταρική ενσωμάτωση και έκφραση των θεραπευτικών γονιδίων, και κατά συνέπεια, να μειώσει το θεραπευτικό τους αποτέλεσμα. Επιπροσθέτως η ανωτέρω ανοσοποίηση είναι δυνατόν να ασκήσει έναν προστατευτικό ρόλο στους φυσιολογικούς ιστούς και να μειώσει

τον κίνδυνο τοξικών επιπλοκών. Αντιθέτως, προϋπάρχουσα ανοσία μπορεί να αυξήσει την τοξικότητα εκ της χορηγήσεως του αδενοϊού (18).

Οι συνέπειες εκ της προϋπάρχουσας ανοσοποίησης είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για τη γονιδιακή θεραπεία που χρησιμοποιεί αδενοϊούς ως φορείς των θεραπευτικών γονιδίων στον άνθρωπο. Επειδή οι αδενοϊοί είναι αιτιολογικοί παράγοντες σε διάφορες συχνές ιογενείς παθήσεις, όπως οι λοιμώξεις του ανωτέρου αναπνευστικού συστήματος, οι περισσότεροι άνθρωποι έχουν αναπτύξει ανοσία εναντίον τους. Επιπλέον, ο πρώτος αναφερθείς θάνατος σε μια κλινική μελέτη με γονιδιακή θεραπεία ήταν συνέπεια χορήγησης της θεραπείας αυτής χρησιμοποιώντας αδενοϊό ως φορέα του θεραπευτικού γονιδίου (19). Ο συγκεκριμένος ασθενής έπασχε από ανεπάρκεια της τρανσκαρβαμυλάσης της ορνιθίνης (OTC) και έλαβε δόση 3×10^{11} σωματίδια/χιλιόγραμμο βάρους δι' ενέσεως του αδενοϊού μέσω της ηπατικής αρτηρίας. Εισ τον ανωτέρω ασθενή παρατηρήθη ένα σύνθετο σύνολο ταχέως εμφανιζομένων κλινικών συμπτωμάτων που συμπεριέλαβε την άνοδο της θερμοκρασίας, την εμφάνιση θρομβοκυτοπενίας και την αύξηση των ηπατικών ενζύμων με αποτέλεσμα τον θάνατο που επήλθε από ανάπτυξη του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας (ARDS) και πολλαπλής ανεπάρκειας ζωτικών οργάνων τρεις ημέρες μετά από την χορήγηση της γονιδιακής θεραπείας. Μια απρόβλεπτη ανολοσογική απάντηση δύναται να συμπεριληφθεί στην αιτιολογία της ανωτέρω κλινικής εικόνας, καθώς ένας προγενέστερος ασθενής που έλαβε μια ισοδύναμη δόση παρουσίασε μόνο παροδική τοξικότητα και ανέρρωσε πλήρως χωρίς περαιτέρω θεραπευτική παρέμβαση. Οι διαφορές που παρατηρούνται στις απαντήσεις με την γονιδιακή θεραπεία μεταξύ ασθενών στην προαναφερθείσα κλινική μελέτη και σε αντίστοιχες παρόμοιες (20) μπορεί να αντικατοπτρίζει, μεταξύ άλλων, διαφορές στο εξατομικευμένο ανοσοποιητικό ιστορικό κάθε ασθενούς, σχετιζόμενες ιδιαίτερα με προηγούμενη έκθεση σε αδενοϊούς.

Εάν η προϋπάρχουσα ανοσοποίηση αποδειχθεί προστατευτική εναντίον τυχόν τοξικότητας εκ του αδενοϊού, η χρησιμοποίηση μεγαλύτερων δόσεων σε επακόλουθες συνεδρίες γονιδιακής θεραπείας χρήζει μελέτης καθώς αυτές μπορεί να βελτιώσουν το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Αντιθέτως, εάν η

τοξικότητα επιτείνεται, η μελέτη θα προσανατολιστεί ώστε να καθοριστούν το εύρος των δόσεων καθώς και των μεσοδιαστημάτων που θα αυξήσουν την θεραπευτική αποτελεσματικότητα των επαναληπτικών συνεδριών ελαχιστοποιώντας συγχρόνως τις επιπλοκές τους.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΟ

Αδενοϊοί Φορείς

Ο AdV-tk είναι ένας φορέας αδενοϊός που αδυνατεί να πολλαπλασιαστεί ενδοκυττάρια και που έχει παρασκευαστεί δια γενετικού ανασυνδυασμού ώστε να φέρει το γονίδιο της θυμιδινικής κινάσης του ιού του απλού έρπητος (HSV-tk). Το γονίδιο HSV-tk ευρίσκεται κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του Rous sarcoma virus-long terminal repeats (RSV-LTR) promoter. Οι AdV/ β -GAL και AdV/Luc είναι παρόμοιοι αδενοϊοί που φέρουν το γονίδια της β -γαλακτοσιδάσης (β -GAL) και της λουσιφεράσης (Luc), αντίστοιχα. Επί πλέον, ένας άδειος / κενός φορέας αδενοϊός (AdV/null) χρησιμοποιήθηκε για να επιτευχθεί ανοσοποίηση των πειραματόζωων. Οι αδενοϊοί αυτοί παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τυποποιημένες μεθόδους, οι οποίες έχουν ήδη δημοσιευτεί (21,22). Η συγκέντρωση των αδενοϊών που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα αυτής της μελέτης ήταν 5×10^{12} σωματίδια αδενοϊού ανά χιλιοστό του λίτρου (ml) και καθορίστηκε με φασματομετρική μέθοδο.

Κυτταροκαλλιέργεια

Τα προστατικά καρκινικά κύτταρα RM-1 προήλθαν από προστατικό ιστό που υπέστη μεταλλάξεις στα γονίδια myc και ras (Dr. Thompson, Baylor College of Medicine). Για το μοντέλο καρκίνου μαστού χρησιμοποιήσαμε τα κύτταρα TM-40D (Dr. Medina, Baylor College of Medicine) τα οποία συντηρήθηκαν σε πρότυπο θρεπτικό υλικό και χρησιμοποιήθηκαν μετά από μικρό αριθμό μεταβάσεων (low passage numbers). Τα κύτταρα ανεπτύχθησαν σε μεγάλο όγκο (αριθμό) και αποθηκεύθησαν σε περιβάλλον υγρού αζώτου. Ένα

φιαλίδιο με παγωμένα TM-40D κύτταρα χρησιμοποιήθηκε at passage 8 ή 9 για κάθε πείραμα.

Πειραματικά Μοντέλα

Το πειραματικό μοντέλο καρκίνου του προστάτη αποτελείται από ποντίκια C57BL/6 (Jackson Laboratory) και συγγενετικά κύτταρα RM-1, ενώ αυτό του μαστού αποτελείται από ποντίκια Balb-c (Harlan Laboratory) με συγγενετικά κύτταρα TM-40D. Οι πειραματικές μελέτες συντελέστηκαν στις εγκαταστάσεις του νοσοκομείου Veterans Affairs Medical Center που ακολουθεί δημοσιευθείσες αρχές και οδηγίες για την χρήση πειραματόζων από τους οργανισμούς American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care και National Institutes of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Πειραματόζωα ηλικίας 6 εβδομάδων (~20 γραμμάρια βάρος) χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των όγκων. Τα καρκινικά κύτταρα χορηγήθηκαν δι' ενέσεως στο γλουτό σε δόση 1×10^4 σε 50 μ l διαλύματος (εκατομμυριοστά του λίτρου). Αυτή η δόση οδήγησε στην ανάπτυξη οζιδίων μεγέθους 50-60 mm^3 (κυβικών χιλιοστών) μετά από 5-7 ημέρες στα C57BL/6 και μετά από 21 ημέρες στα Balb-c πειραματόζωα. Η επιλογή του γλουτού για την ανάπτυξη των όγκων έγινε για να αποφευχθούν ακτινοθεραπευτικές επιπλοκές εξ' αιτίας της ακτινοβόλησης ζωτικών οργάνων της πυέλου. Οι δόσεις AdV κυμάνθηκαν από 1×10^9 σε 6×10^{11} σωματίδια/όγκο σε 20 μ l διαλύματος και χορηγήθηκαν δια τοπικής ενέσεως εντός των όγκων. Η θεραπεία GCV άρχισε 24 ώρες μετά από την έγχυση AdV-tk σε δόση 20 mg/χιλιόγραμμο βάρους (kg) και χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά (IP) δις ημερησίως για έξι ημέρες. Το μέγεθος των όγκων καθορίστηκε από τη μέση τιμή των διαστάσεων τους κατά τον κάθετο και οριζόντιο άξονα που καταγράφοντο κάθε τέσσερις ημέρες.

Η χορήγηση των καρκινικών κυττάρων καθώς και όλοι οι θεραπευτικοί χειρισμοί έγιναν μετά από χορήγηση γενικής αναισθησίας με ενδοπεριτοναϊκή ένεση Πεντοβαρβιτάλης σε δόση 50 χιλιοστά του γραμμαρίου (mg) ανά kg βάρους. Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε θερμό περιβάλλον μέχρι να

ανανήψουν από την γενική αναισθησία. Η παρακολούθηση συμπεριέλαβε προσεκτικό έλεγχο για την έγκαιρη διάγνωση τοπικής μόλυνσης ή άλλων επιπλοκών καθώς και την ικανοποιητική ενυδάτωση και λήψη τροφής. Τα πειραματόζωα υπεβλήθησαν σε ευθανασία δι' ασφυξίας με διοξείδιο του άνθρακος στη περίπτωση που το μέγεθος όγκων υπερέβη τη μέγιστη διάμετρο των 25 χιλιοστών (mm) σε οποιοδήποτε άξονα, ή κατά την εμφάνιση σημείων σημαντικής εξασθένησης της υγείας όπως μεγάλη απώλεια βάρους, αναπνευστική δυσχέρεια και αραίωση τριχώματος.

Ακτινοθεραπεία

Γεννήτρια ακτίνων X orthovoltage χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση των όγκων σε μονήρη κλάσματα των 5, 10 και 15 Gy χρησιμοποιώντας κάλυμμα μολύβδου για να προστατευτούν οι περιβάλλοντες φυσιολογικοί ιστοί από την περιττή έκθεση στην ακτινοβολία. Στα πειράματα συνδυασμού, η ακτινοβολία χορηγήθηκε σαράντα οκτώ ώρες μετά από τη χορήγηση της γονιδιακής θεραπείας.

Μοντέλο Μεταστατικής Νόσου

Για την ανάπτυξη των μοντέλων μεταστατικού καρκίνου, 5.000 καρκινικά κύτταρα σε 100 μl διαλύματος χορηγήθηκαν μέσω φλέβας στην ουρά πειραματόζωων ταυτόχρονα με την ανάπτυξη των υποδορίων όγκων. Θεραπεία εδόθη μόνο στους υποδορίους όγκους. Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν για να αξιολογηθεί η ανάπτυξη μεταστατικών πνευμονικών οζιδίων σε χρονικό διάστημα 12 ημερών μετά την έναρξη της θεραπείας για τα C57BL/6 και 21 ημερών για τα Balb-c ποντίκια. Ο αριθμός των πνευμονικών οζιδίων μετρήθηκε μετά την αφαίρεση των πνευμόνων και τη τοποθέτηση τους σε διάλυμα Bouin.

Μέτρηση Λουσιφεράσης

Η έκφραση της λουσιφεράσης (Luciferase, Luc) αξιολογήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες κατασκευαστών χρησιμοποιώντας το Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI). Οι ιστοί πλύθηκαν μία φορά με φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (PBS) και υποβλήθηκαν σε μηχανική ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο υγρό αποθηκεύτηκε σε -80° Κελσίου. Τα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης εκφράζονται ως relative luminescence units (RLU) ανά γραμμάριο (gm) ιστού.

Καθορισμός Τίτλου Αντισωμάτων Ορού

Ειδικά αντισώματα εναντίον του AdV στον ορό ανοσοποιηθέντων και μη πειραματόζων μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας την ανοσοιστοχημική τεχνική ELISA. Πλάκες 96-φρεατίων καλύφθηκαν ολονυκτίς με Adv/null (9×10^{12} σωματίδια/ml). Κατόπιν προσετέθησαν τα δείγματα των ορών και το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύθηκε με τη χρήση της πρωτεΐνης A/G που φέρει το ένζυμο υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, Pierce, Rockford, IL).

Ιστολογική Εξέταση και Μέτρηση Ηπατικών Ενζύμων

Οι ιστοί υπέστησαν επεξεργασία με φορμαλίνη, τοποθετήθηκαν σε παραφίνη, τεμαχίστηκαν σε τμήματα πάχους 5 χιλιοστών, και ακολούθως υπεβλήθησαν σε χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη για ιστολογική αξιολόγηση. Οι ιστολογικές αλλαγές βαθμολογήθηκαν από 0 έως 4, όπου το 0 αντικατοπτρίζει την φυσιολογική μορφολογία και το 4 σοβαρή φλεγμονή με νέκρωση.

Ο προσδιορισμός των ηπατικών ενζύμων αλανινοτρανσφεράσης (ALT), ασπαρτικής τρανσφεράσης (AST) και αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) εκτελέστηκαν στο εργαστήριο παθολογίας του Baylor College of Medicine. Τα επίπεδά τους εκφράζονται ως διεθνείς μονάδες (IU) ανά λίτρο.

Ο προσδιορισμός των αντισωμάτων έναντι των CD4+, CD8+T λεμφοκυττάρων και μακροφάγων στους όγκους έγινε δια ανοσοιστοχημικής μεθόδου με σκοπό να διευκρινιστεί ποιοτικά και ποσοτικά το είδος της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού στη θεραπεία. Τα δείγματα όγκων, εψύχθησαν σε υγρό άζωτο, τεμαχίστηκαν σε φέτες πάχους 5 μικροχιλιοστών (μm) και τοποθετήθηκαν σε πλακάκια καλυμμένα με πολυλυσίνη. Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν αφού παρέμειναν μέσα σε διάλυμα ακετόνης/μεθανόλης (1:1) σε θερμοκρασία -20° Κελσίου για είκοσι λεπτά. Η ανοσοιστοχημική χρώση επετεύχθη με τη χρήση υπεροξειδάσης αβιδίνης-βιοτίνης (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Αντισώματα αρουραίων εναντίον των CD4+ και CD8+ T-λεμφοκυττάρων ποντικών, αγοράστηκαν από την εταιρεία Pharmingen, (San Diego, CA) ενώ αντίστοιχα αντισώματα εναντίον των μακροφάγων (anti-F/80) προήλθαν από την εταιρεία Serotec, (Oxford, UK). Η αραιώση των αντισωμάτων ήταν 1:100 για τα anti-CD4+ και anti-CD8+ και 1:400 για τα anti-F/80. Η ανοσοαντίδραση απεικονίστηκε με DAB/H₂O₂. Η μέτρηση των κυττάρων που χρώστηκαν θετικά κάτω από το μικροσκόπιο έγινε από ερευνητή που δεν είχε γνώση της συγκεκριμένης θεραπευτικής ομάδας από την οποία προέρχονται τα πλακάκια και τα αποτελέσματα καταγράφηκαν ως αριθμός θετικών κυττάρων ανά mm².

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας το Student's T-test και την Analysis of Variance (ANOVA) Οι καμπύλες επιβίωσης συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το τεστ Wilcoxon. Το τεστ χ^2 χρησιμοποιήθηκε για να συγκρίνει το βαθμό τοξικότητας των φυσιολογικών ιστών μεταξύ ανοσοποιηθέντων και μη ανοσοποιηθέντων πειραματόζων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προσδιορισμός των δόσεων AdV και ακτινοβολίας

Για να επιτραπεί η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του συνδυασμού γονιδιακής θεραπείας HSV-tk και ακτινοβολίας, απαιτήθηκε καθορισμός αποτελεσματικών δόσεων αλλά μη θεραπευτικών τόσο για τον AdV όσο και για την ακτινοβολία. Για να επιτευχθεί το ανωτέρω, χορηγήθηκαν προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις AdV κυμαινόμενες από 1×10^9 μέχρι 1×10^{11} σωματίδια/όγκο ακολουθούμενες εικοσιτέσσερις ώρες αργότερα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση GCV. Στο μοντέλο καρκίνου του προστάτη (Διάγραμμα 1), παρατηρήθη καθυστέρηση ανάπτυξης των όγκων 4, 8, και 12 ημέρες μετά από χορήγηση της γονιδιακής θεραπείας ανεξαρτήτως της δόσεως του AdV ($p > 0.1$). Επιπλέον, δεν παρατηρήθη παντελής εξάλειψη των όγκων ή εμφανής τοξικότητα. Στο μοντέλο καρκίνου μαστού, παρ' όλο που παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική καθυστέρηση ανάπτυξης όγκων με την υψηλότερη δόση AdV 16 και 20 μέρες μετά τη χορήγηση της γονιδιακής θεραπείας ($p < 0.04$), σε καμία από τις θεραπευτικές ομάδες επεξεργασίας δεν παρατηρήθη εξαφάνιση των όγκων ή τοξικότητα. Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα η δόση 3×10^{10} σωματίδια/όγκο επιλέχθηκε για τις μελέτες συνδυασμένης θεραπείας.

Για να καθοριστεί η δόση της ακτινοβολίας, συγκρίθηκαν τα θεραπευτικά αποτελέσματα συνεδριών ακτινοβολίας με μονήρη κλάσματα των 5, 10 και 15 Gy. Στο μοντέλο καρκίνου του προστάτη, στατιστικώς σημαντική διαφορά στην καθυστέρηση ανάπτυξης των όγκων παρατηρήθηκε μεταξύ της δόσεως των 5 Gy και των δυο υψηλότερων δόσεων ($p < 0.002$), 8 και 12 μέρες μετά από χορήγηση της ακτινοβολίας (Διάγραμμα 2). Οι υψηλότερες δόσεις προκάλεσαν σημαντική νέκρωση των όγκων. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην καθυστέρηση ανάπτυξης των όγκων μεταξύ των πειραματόζων που έλαβαν 5 Gy και αυτών που δεν έλαβαν θεραπεία ($p > 0.2$). Στο μοντέλο καρκίνου του μαστού επίσης, στατιστικώς σημαντική διαφορά στην καθυστέρηση ανάπτυξης των όγκων παρατηρήθηκε μεταξύ

των 5 Gy και των δύο υψηλότερων δόσεων ($p < 0.015$) 24 μέρες μετά από χορήγηση της ακτινοβολίας ενώ δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των πειραματόζων που έλαβαν 5 Gy και αυτών που δεν έλαβαν καμία θεραπεία ($p=0.468$). Βασιζόμενοι στα ανωτέρω πειραματικά δεδομένα, η δόση των 5 Gy επιλέχτηκε για τον συνδυασμό γονιδιακής θεραπείας με ακτινοθεραπεία.

Αποτελέσματα Συνδυασμού Γονιδιακής Θεραπείας με Ακτινοθεραπεία στο Τοπικό Έλεγχο των Όγκων

Για να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα του συνδυασμού γονιδιακής θεραπείας HSV-tk με ακτινοβολία στο μοντέλο καρκίνου του προστάτη, τα πειραματόζωα ταξινομήθηκαν στις ακόλουθες έξι ομάδες. Η πρώτη δεν υπέστη θεραπευτικούς χειρισμούς αλλά έλαβε αλατούχο διάλυμα (PBS) δι' ενέσεως εντός των όγκων. Η δεύτερη έλαβε επίσης δι' ενέσεως AdV φέροντα το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (AdV-β-GAL) για να αξιολογηθούν οι επιδράσεις επί των όγκων που προέρχονται από τον ίδιο τον φορέα AdV. Η τρίτη και τέταρτη ομάδα έλαβαν μονοθεραπεία: η τρίτη έλαβε γονιδιακή θεραπεία HSV-tk με GCV (AdV-tk + GCV) ενώ η τέταρτη έλαβε ακτινοθεραπεία σε δόση 5 Gy. Η πέμπτη ομάδα έλαβε γονιδιακή θεραπεία AdV-β-GAL σε συνδυασμό με ακτινοβολία σε δόση 5 Gy για να διαπιστωθούν τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ AdV και ακτινοβολίας. Η έκτη και τελευταία ομάδα έλαβε AdV-tk + GCV σε συνδυασμό με ακτινοβολία σε δόση των 5 Gy. Και οι δύο ομάδες που έλαβαν μονοθεραπεία παρουσίασαν μεγαλύτερη καθυστέρηση ανάπτυξης των όγκων κατά τουλάχιστον 38% σε σύγκριση με τη πρώτη, δεύτερη και πέμπτη ομάδα θεραπείας αντίστοιχα. Η έκτη ομάδα είχε μια στατιστικώς σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη των όγκων έναντι όλων των άλλων ομάδων θεραπείας, $p < 0.02$ (Διάγραμμα 3A).

Στο μοντέλο καρκίνου του μαστού, τα πειραματόζωα ταξινομήθηκαν σε πέντε ομάδες για την μελέτη συνδυασμένης ή μη θεραπείας: 1) PBS, 2) AdV-β-GAL, 3) AdV-tk + GCV, 4) Ακτινοβολία με δόση 5 Gy, και 5) AdV-tk + GCV σε συνδυασμό με ακτινοβολία 5 Gy. Όπως αναμένετο, οι ομάδες μονοθεραπείας οδήγησαν σε καθυστέρηση ανάπτυξης των όγκων κατά 11% έναντι των αποτελεσμάτων των δύο πρώτων ομάδων. Επιπρόσθετη καταστολή και

στατιστικώς σημαντική καθυστέρηση της ανάπτυξης των όγκων ($p < 0.017$) παρατηρήθηκε στην ομάδα AdV-tk + GCV σε συνδυασμό με ακτινοβολία 5 Gy (Διάγραμμα 3B,Γ).

Αποτελέσματα Συνδυασμού Γονιδιακής Θεραπείας με Ακτινοθεραπεία: Μελέτες επιβίωσης

Στο μοντέλο προστατικού καρκίνου, ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ομάδων που έλαβαν PBS και AdV-β-GAL ήταν 13.8 και 14.3 μέρες αντίστοιχα και η διαφορά αυτή δεν ευρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντική. Οι ομάδες μονοθεραπείας παρουσίασαν βελτιωμένη επιβίωση έναντι των ομάδων PBS και AdV-β-GAL ($p < 0.02$) με μέσους χρόνους επιβίωσης 16.4, 16.8, και 18.5 ημερών αντίστοιχα για τις πειραματικές ομάδες AdV-tk + GCV, XRT και AdV-β-GAL. Οι διαφορές στους μέσους χρόνους επιβίωσης μεταξύ των ομάδων μονοθεραπείας δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p > 0.1$). Σημαντική βελτίωση στην επιβίωση έναντι της μονοθεραπείας ($p < 0.01$) επέφερε το θεραπευτικό σχήμα AdV-tk + GCV σε συνδυασμό με ακτινοβολία 5 Gy με μέση επιβίωση 22 ημερών (Διάγραμμα 4A).

Στο μοντέλο καρκίνου του μαστού δεν παρουσιάστηκε σημαντική διαφορά στην επιβίωση μεταξύ των ομάδων PBS και AdV-β-GAL όπου οι μέσοι χρόνοι επιβίωσης ήταν 25.5 και 27 μέρες αντίστοιχα ($p = 0.155$). Οι ομάδες μονοθεραπείας παρουσίασαν βελτιωμένη επιβίωση έναντι των ομάδων PBS και AdV-β-GAL με μέσους χρόνους επιβίωσης 31.9 και 33.3 ημερών αντίστοιχα για τις ομάδες ακτινοθεραπείας και AdV-tk + GCV ($p < 0.0005$). Οι διαφορές στους μέσους χρόνους επιβίωσης ανάμεσα στις δύο ομάδες μονοθεραπείας δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p = 0.848$). Όπως και στο μοντέλο καρκίνου του προστάτη, το θεραπευτικό σχήμα AdV-tk + GCV + ακτινοβολία 5 Gy με μέση επιβίωση 36,07 ημέρες παρουσίασε σημαντική βελτίωση συγκρινόμενο με την μονοθεραπεία και με τις ομάδες ελέγχου (PBS & AdV – β – GAL). ($p < 0.027$), (Διάγραμμα 4B).

Αποτελέσματα Ιστολογικής Εξέτασης των Όγκων

Οι ιστολογικές μεταβολές των όγκων συνεπεία της θεραπείας αξιολογήθηκαν όσον αφορά την μιτωτική δραστηριότητα, τις φλεγμονώδεις διηθήσεις και την απόπτωση χωρίς ο εξεταστής να γνωρίζει εκ των προτέρων την ομάδα θεραπείας από την οποία προέρχεται ο υπό εξέταση ιστός. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη μιτωτική δραστηριότητα ή την απόπτωση ενώ ιστοί νεοπλασμάτων από όλες τις θεραπευτικές ομάδες παρουσίασαν ισχαιμική νέκρωση και διήθηση από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Παρατηρήθηκε πιο περιορισμένη ισχαιμική νέκρωση στους όγκους που έλαβαν συνδυασμό γονιδιακής θεραπείας με ακτινοβολία, πιθανώς επειδή στις υπόλοιπες ομάδες θεραπείας ο ρυθμός ανάπτυξης των όγκων υπερβαίνει τον ρυθμό αγγειογένεσης. Η ομάδα συνδυασμού γονιδιακής θεραπείας με ακτινοβολία παρουσίασε επίσης εντονότερη λεμφοκυτταρική διήθηση (Διάγραμμα 5). Η διήθηση από λεμφοκύτταρα παρατηρήθηκε κυρίως στα σημεία επαφής όγκων και φυσιολογικών ιστών, επεκτεινόμενη καθ' όλο τον όγκο και διαμορφώνοντας τοπικά λεμφοκυτταρικές εστίες. Η ομάδα συνδυασμού γονιδιακής θεραπείας με ακτινοβολία παρουσίασε σημαντικά ηυξημένη συχνότητα διήθησης από CD4+ T-λεμφοκύτταρα σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες θεραπείας.

Μοντέλο Προϋπάρχουσας Μεταστατικής Νόσου

Το μοντέλο προϋπάρχουσας μεταστατικής νόσου χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί κατά πόσο η ηυξημένη τοπική ανοσολογική απάντηση που παρατηρήθηκε με το συνδυασμό γονιδιακής θεραπείας και ακτινοβολίας συνδυάζεται επίσης και από μια γενικευμένη απάντηση εναντίον μεταστατικών εστιών. Από τα ανωτέρω πειράματα παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των πνευμονικών οζιδίων μειώθηκε κατά 37% στην ομάδα θεραπείας AdV-tk+GCV με επιπρόσθετη μείωση 50% όταν προσετέθη και η ακτινοβολία. Η θεραπεία με ακτινοβολία και μόνο δεν είχε καμία επίδραση στο περιορισμό ανάπτυξης πνευμονικών μεταστάσεων (Διάγραμμα 6A). Η δραματική μείωση του αριθμού των μακροσκοπικών πνευμονικών μεταστάσεων μετά από AdV-

tk+GCV με ακτινοβολία απεικονίζεται στο Διάγραμμα 6B, όπου συγκρίνονται ιστολογικά παρασκευάσματα πνευμόνων πειραματόζων που είτε δεν έλαβαν καθόλου θεραπεία ή αντιμετωπίστηκαν με μονοθεραπεία ή με συνδυασμό γονιδιακής θεραπείας και ακτινοβολίας.

Ομοίως, στο μοντέλο καρκίνου του μαστού, η θεραπεία με AdV-tk+GCV οδήγησε στο περιορισμό των μεταστατικών πνευμονικών οζιδίων κατά 59.5% σε σχέση με τα πειραματόζωα που δεν έλαβαν καμία θεραπεία, ενώ η θεραπεία συνδυασμού AdV-tk+GCV με ακτινοβολία παρουσίασε μία επιπρόσθετη μείωση κατά 66.7%. Όπως και στο μοντέλο του προστατικού καρκίνου, η θεραπεία με ακτινοβολία μόνο δεν είχε καμία επίδραση στη μεταστατική νόσο. Παρ' όλο που ο μέσος αριθμός πνευμονικών οζιδίων που προέκυψε από τον συνδυασμό γονιδιακής θεραπείας με ακτινοθεραπεία ήταν πολύ μικρότερος έναντι της ομάδας θεραπείας με AdV-tk+GCV (2.5+/-1.5 SE έναντι 7.5 +/- 3.8 SE, αντίστοιχα), η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0.277$).

Επανειλημμένες Συνεδρίες Συνδυασμού Γονιδιακής Θεραπείας με Ακτινοθεραπεία

Για να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα των επανειλημμένων συνεδριών θεραπείας, δύο και τρεις συνεδρίες μονοθεραπείας ή συνδυασμού γονιδιακής θεραπείας με ακτινοβολία που χορηγήθηκαν με μεσοδιάστημα 7 ημερών συγκρίθηκαν με μονήρεις συνεδρίες θεραπείας, ταξινομώντας τα πειραματόζωα στις ακόλουθες δέκα ομάδες θεραπείας: 1) Η ομάδα ελέγχου 1 έλαβε PBS 2) ομάδες 2, 3 και 4 που έλαβαν μια, δύο και τρεις συνεδρίες ακτινοβολίας, αντίστοιχα, 3) ομάδες 5, 6 και 7 που έλαβαν μια, δύο και τρεις συνεδρίες AdV-tk+GCV (3×10^{10} σωματίδια/όγκο), αντίστοιχα, και 4) ομάδες 8, 9 και 10 που έλαβαν μια, δύο και τρεις συνεδρίες συνδυασμού AdV-tk+GCV με ακτινοβολία, αντίστοιχα. Εικοσιοκτώ ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας, τρεις συνεδρίες συνδυασμού AdV-tk+GCV με ακτινοβολία επέτυχαν τη μεγαλύτερη καταστολή στη τοπική αύξηση όγκων (51,5%) ακολουθούμενες από δύο συνεδρίες συνδυασμένης θεραπείας (37,2%) και τρεις συνεδρίες μόνο-ακτινοβολίας (35,6%) έναντι μιας συνεδρίας AdV-

tk+GCV με ακτινοβολία (Διάγραμμα 7). Συγκεκριμένα, η μέση σχετική διάμετρος όγκων στην ομάδα με τρεις συνεδρίες θεραπείας συνδυασμού ήταν 2.37 ± 0.069 SE, με δύο 3.07 ± 0.25 SE ενώ η ομάδα που έλαβε τρεις συνεδρίες ακτινοβολίας παρουσίασε μέση σχετική διάμετρο όγκων 3.14 ± 0.15 SE. Παρότι οι ανωτέρω θεραπευτικές ομάδες επέτυχαν την μεγαλύτερη καταστολή στην ανάπτυξη των όγκων έναντι όλων των άλλων ομάδων θεραπείας ($p < 0.003$), η διαφορά μεταξύ των δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p = 0.11-0.13$).

Οι μελέτες επιβίωσης κατέδειξαν ότι η ομάδα που έλαβε τρεις συνεδρίες συνδυασμού AdV-tk+GCV με ακτινοβολία παρουσίασε την μεγαλύτερη παράταση επιβίωσης με έναν μέσο χρόνο επιβίωσης 58 ημερών ($p < 0.01$). Ακολούθησε η ομάδα που έλαβε δύο συνεδρίες συνδυασμού με μέσο χρόνο επιβίωσης 45 ημερών. Οι μέσοι χρόνοι επιβίωσης για όλες τις άλλες ομάδες θεραπείας ήταν: AdV-tk+GCV+XRT X 1: 34 ημέρες, AdV-tk+GCV X 3: 26 ημέρες, AdV-tk+GCV X 2: 30 ημέρες, AdV-tk+GCV X 1: 29 ημέρες, XRT X 3: 34 ημέρες, XRT X 2: 35 ημέρες XRT X 1: 28 ημέρες και PBS: 24 ημέρες (Διάγραμμα 8). Είναι αξιοσημείωτο ότι ακόμα κι αν τρεις συνεδρίες ακτινοβολίας οδήγησαν σε καθυστέρηση της τοπικής ανάπτυξης των όγκων, το ανωτέρω όφελος δεν μεταφράστηκε σε σημαντική παράταση της επιβίωσης συγκριτικά με τις άλλες ομάδες θεραπείας.

Ρόλος Προηγούμενης Ανοσοποίησης στα Επίπεδα Έκφρασης Φορέως Αδενοϊού σε Συνάρτηση με τη Χορηγούμενη Δόση

Υψηλότεροι τίτλοι αντισωμάτων παρατηρήθηκαν στα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα κατά τη διάρκεια των δύο εβδομάδων της μελέτης (Διάγραμμα 9). Δύο ημέρες μετά τη χορήγηση του AdV/Luc δι' ενέσεως εντός των όγκων, η ομάδα των ανοσοποιηθέντων πειραματόζωων παρουσίασε τριπλάσια ηυξημένους τίτλους αντισωμάτων έναντι του αδενοϊού σε σύγκριση με αυτά των μη ανοσοποιηθέντων οργανισμών. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στους τίτλους αντισωμάτων μεταξύ των πέντε ομάδων των ανοσοποιηθέντων πειραματόζωων που έλαβαν προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις AdV/Luc ($p > 0.19$).

Η ανάλυση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθούν τα επίπεδα έκφρασης του φορέως αδενοϊού τόσο στους υποδόριους όγκους όσο και στα περιφερικά όργανα μετά από τοπική χορήγησή του δι' ενέσεως εντός των όγκων. Τα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική μείωση της έκφρασης του αδενοϊού σε όλους τους εξετασθέντες ιστούς περιλαμβανομένων και των όγκων σε σύγκριση με τους μη ανοσοποιηθέντες οργανισμούς. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης του αδενοϊού ήταν χαμηλότερη κατά 24 φορές για τους υποδόριους όγκους ($p=0.004$), 808 φορές για το ήπαρ ($p=0.001$), 2392 φορές για τον σπλήνα ($p<0.001$) και 714 φορές για τις ωσθήκες ($p=0.001$), (Διάγραμμα 10). Η ανοσοποίηση οδήγησε επίσης σε μια αύξηση στο πηλίκο των επιπέδων έκφρασης του αδενοϊού στον όγκο δια των αντιστοιχών του ήπατος. Στα μη ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα, αύξηση δόσεων από 2×10^9 σε 6×10^{10} σωματίδια/όγκο οδήγησε σε μια μικρή αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του αδενοϊού στους όγκους ($p=0.112$), σε μια στατιστικώς σημαντική αύξηση στο ήπαρ κατά 4000 φορές ($p<0.001$), προκαλώντας κατά συνέπεια μείωση στο ανωτέρω αναφερόμενο πηλίκο επιπέδου έκφρασης του αδενοϊού στον όγκο και στο ήπαρ (Διάγραμμα 11). Αντίθετα, τα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα παρουσίασαν ανάλογη με τη χορηγηθείσα δόση προοδευτική αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του αδενοϊού εντός των όγκων χωρίς σημαντική αύξηση στο ήπαρ, με συνέπεια να παρατηρηθεί αύξηση του πηλίκου των επιπέδων έκφρασης του αδενοϊού στον όγκο δια των αντίστοιχων στο ήπαρ. Συγκεκριμένα, οι δόσεις AdV-Luc που αξιολογήθηκαν ήταν 2×10^9 , 6×10^9 , 2×10^{10} , 6×10^9 , και 2×10^{11} σωματίδια/όγκο. Οι ομάδες που έλαβαν τις δύο χαμηλές δόσεις παρουσίασαν κατά μέσο όρο 30 φορές χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης αδενοϊού στους όγκους σε σύγκριση με τις τρεις υπόλοιπες ομάδες ($p<0.05$). Επιπροσθέτως, τα επίπεδα έκφρασης του αδενοϊού στις τρεις ομάδες υψηλών δόσεων ήταν συγκρίσιμα με αυτά που παρατηρήθηκαν στα μη ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα ($p>0.9$).

Ρόλος Προηγούμενης Ανοσοποίησης στα Επίπεδα Έκφρασης Φορέως Αδενοϊού σε Συνάρτηση με το Χρόνο

Η δραστηριότητα της λουσιφεράσης αξιολογήθηκε επίσης σε συνάρτηση με τον χρόνο, ήτοι, 2, 7 και 14 ημέρες μετά από τη χορήγηση του φορέως αδενοϊού. Όπως αναμένετο, η προηγούμενη ανοσοποίηση οδήγησε σε μείωση της διάρκειας έκφρασης του αδενοϊού σε σύγκριση με αυτή των μη ανοσοποιηθέντων πειραματόζων (Διάγραμμα 12). Ειδικότερα, η ανοσοποίηση οδήγησε σε μείωση της μέσης τιμής των επιπέδων έκφρασης του αδενοϊού στους όγκους κατά 24 φορές την δεύτερη ημέρα ($p=0.004$), 65 φορές την εβδόμη ημέρα, ($p=0.001$) και 300 φορές την δεκατη τέταρτη ημέρα ($p<0.001$). Τα επίπεδα έκφρασης του αδενοϊού στο ήπαρ μετεβλήθησαν σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό στα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα ($p<0.01$) αλλά ελάχιστα στους μη ανοσοποιηθέντες οργανισμούς. Το ανωτέρω οδήγησε σε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα πηλικά επιπέδων έκφρασης του αδενοϊού στον όγκο δια των αντίστοιχων στο ήπαρ σε ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα συγκριτικά με τους μη ανοσοποιηθέντες οργανισμούς ($p<0.028$) καθ' όλον τον χρόνο εξέτασης, (Διάγραμμα 12). Σημειωτέον ότι η υψηλότερη έκφραση AdV-Luc παρατηρήθηκε την δεύτερη ημέρα τόσο στα ανοσοποιηθέντα όσο και στα μη ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα.

Ένας δεύτερος στόχος της ανωτέρω μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η τοξικότητα από τη χορήγηση υψηλών δόσεων φορέων αδενοϊών σε ανοσοποιηθέντα και μη πειραματόζωα. Μελετήθηκαν δόσεις AdV-Luc 2×10^{11} και 6×10^{11} σωματίδια/όγκο που είναι αντίστοιχες με 1×10^{13} και 3×10^{13} σωματίδια/χιλιόγραμμο βάρους. Οι ως άνω δόσεις επιλέχτηκαν ως πιθανές κατώτατες τοξικές δόσεις για τα μη ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα. Κατόπιν χορήγησης υψηλών δόσεων, 12 από τα 20 ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα απεβίωσαν μέσα σε 18 ώρες έναντι των τριών από τα 20 πειραματόζωα που δεν ανοσοποιήθηκαν. Παθολογοανατομική εξέταση απέδειξε ότι η ηπατίτις ήταν η κυρία αιτία τοξικότητας στα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα, χαρακτηριζόμενη από μικτά φλεγμονώδη διηθήματα μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων γύρω από τις πυλαίες περιοχές και τις κεντρικές φλέβες του

ήπατος (Διάγραμμα 13Γ και Δ). Παρατηρήθηκε επίσης λοβιώδης φλεγμονή αλλά σε πιο περιορισμένο βαθμό. Οι ιστολογικές αλλαγές βαθμολογήθηκαν από 0 (κανονική μορφολογία) σε 4 (εκτενής φλεγμονή με περιοχές νέκρωσης). Η διάμεση πνευμονία χαρακτηρίστηκε από διήθηση μονοκυττάρων και, σε μικρότερο βαθμό, ουδετεροφίλων στα κυψελιδικά τοιχώματα και τους διάμεσους ιστούς του πνεύμονα. Η υπερπλασία του σπληνός χαρακτηρίστηκε από λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο παθολογοανατόμος δεν γνώριζε την προέλευση του εκάστοτε προς εξέταση ιστού.

Η μόνη σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων ήταν η σημαντικά ηυξημένη ηπατική τοξικότητα που παρατηρήθηκε στα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα ($p < 0.001$), (Διάγραμμα 13 E). Συγκεκριμένα, και τα οκτώ ανοσοποιημένα πειραματόζωα ανέπτυξαν ηπατίτιδα, που αξιολογήθηκε ως δευτέρου βαθμού σε δύο πειραματόζωα και τρίτου στα υπόλοιπα έξι. Αντίθετα, μεταξύ των 17 μη ανοσοποιηθέντων πειραματόζωων, μόνο ένα ανέπτυξε ηπατίτιδα δευτέρου βαθμού. Προϋπάρχουσα ανοσοποίηση επίσης κατέληξε σε μεγαλύτερη, αλλά στατιστικώς μη σημαντική ($p > 0.25$), αναλογία ανάπτυξης σπληνικής υπερπλασίας δευτέρου (grade 2) ή και ανωτέρου βαθμού (63%) έναντι των μη ανοσοποιηθέντων πειραματόζωων (35%). Η πνευμονική τοξικότητα δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων καθώς ιστολογικά ευρήματα διάμεσης πνευμονίας δευτέρου (grade 2) ή και ανώτερου βαθμού παρατηρήθηκαν στο 63% των ανοσοποιηθέντων και 65% των μη ανοσοποιηθέντων πειραματόζωων. Ειδικότερα, ένα από τα ανοσοποιημένα πειραματόζωα έδωσε ιστολογικά ευρήματα νεκρωτικής πνευμονίας (τετάρτου βαθμού) και ένα από την ομάδα των μη ανοσοποιηθέντων πειραματόζωων ανέπτυξε πνευμονία τρίτου βαθμού.

Τα ηπατικά ένζυμα συγκρίθηκαν επίσης μεταξύ των ομάδων των ανοσοποιηθέντων και μη ανοσοποιηθέντων πειραματόζωων την τρίτη ημέρα μετά από τη χορήγηση AdV-Luc (πίνακας 1). Παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξήσεις στα επίπεδα της αλανινοτρανσφεράσης (ALT) και ασπαρτικής τρανσφεράσης (AST) στα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα ($p < 0.05$), σε σύγκριση με τα μη ανοσοποιηθέντα αντίστοιχα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο προστατικός καρκίνος είναι ο πιο συχνός κακοήθης όγκος και η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες. Υπολογίζεται ότι κάθε έτος περίπου 180,000 άτομα διαγιγνώσκονται και 32.000 πεθαίνουν από αυτήν την πάθηση (23). Τρέχουσες σύγχρονες θεραπείες περιλαμβάνουν τη χειρουργική εξαίρεση του προστάτη με ριζική προστατεκτομή, την ακτινοθεραπεία καθώς και την ορμονοθεραπεία που παρουσιάζουν σημαντικά ποσοστά υποτροπών. Παραδείγματος χάριν, σε ασθενείς με τοπική νόσο αλλά κακούς προγνωστικούς παράγοντες, έχει αποδειχθεί ότι ο κίνδυνος αποτυχίας της θεραπείας μετά από ακτινοβολία υπερβαίνει το 70% (1.2). Διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσουν την έκβαση των ασθενών με προστατικό καρκίνο. Η αύξηση της συνολικής δόσης ακτινοβολίας στον προστάτη μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα αλλά μπορεί να οδηγήσει σε απaráδεκτα υψηλά ποσοστά επιπλοκών του ορθού και της ουροδόχου κύστεως (24-26). Μια άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει το συνδυασμό ακτινοθεραπείας με άλλες θεραπείες που έχουν αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα εναντίον των όγκων, εντούτοις παρουσιάζουν διαφορετικό από την ακτινοβολία φάσμα παρενεργειών. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η χρήση ορμονοθεραπείας επαγωγής ή συμπληρωματικής αντίστοιχα σε συνδυασμό με την ακτινοθεραπεία (27-29). Σε αυτή τη μελέτη υποθέσαμε ότι ο συνδυασμός γονιδιακής θεραπείας με HSV-tk και ακτινοθεραπείας μπορεί να αποδώσει μεγαλύτερο θεραπευτικό όφελος χωρίς ηυξημένη τοξικότητα.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε αδενοϊός που αδυνατεί να πολλαπλασιαστεί ενδοκυττάρια διότι του έχει αφαιρεθεί το γονιδιακό τμήμα E1 που είναι υπεύθυνο για τη παραγωγή των απαραίτητων ενζύμων για τον αναδιπλασιασμό του DNA. Ο αδενοϊός έφερε το γονίδιο HSV-tk και χορηγήθηκε τοπικά δι' ενέσεως σε υποδόριους όγκους. Οι δόσεις του αδενοϊού καθώς και της ακτινοβολίας επιλέχτηκαν σκόπιμα ώστε από μόνες τους να μην προκαλούν ίαση για να διερευνήσουμε εάν οι δύο θεραπείες παρουσιάζουν αθροιστική δράση ή και συνέργια. Απεδείχθη ότι η συνδυασμένη θεραπεία καθυστέρησε σημαντικά την τοπική ανάπτυξη των

όγκων και παρέτεινε την επιβίωση έναντι της μονοθεραπείας στις ομάδες ελέγχου. Συγκεκριμένα, ο χρόνος επιβίωσης αυξήθηκε κατά 37-57% σε σύγκριση με τα πειραματόζωα που δεν έλαβαν θεραπεία και από 11-28% σε σύγκριση με αυτά που έλαβαν είτε γονιδιακή θεραπεία είτε ακτινοβολία μόνο.

Η ευεργετική επίδραση της συνδυασμένης θεραπείας κατά των όγκων μπορεί να είναι το αποτέλεσμα των συμπληρωματικών μηχανισμών δράσης της γονιδιακής θεραπείας με HSV-tk με την ακτινοβολία καθώς και της χαμηλής τοξικότητάς τους. Στη μελέτη που δημοσιεύτηκε από τον Eastham και συνεργάτες (10) αξιολογήθηκε ο βαθμός ενσωμάτωσης του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης που χορηγήθηκε από αδenoϊό δι' ενέσεως σε υποδόριους όγκους χρησιμοποιώντας τη μέθοδο χρώσης της β-γαλακτοσιδάσης και ευρέθη ότι κατά μέσο όρο η αποτελεσματικότητα ενσωμάτωσης του εν λόγω γονιδίου είναι 20% (6-57%). Πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν ότι η ιονίζουσα ακτινοβολία αυξάνει την ενσωμάτωση και τη σταθερότητα γονιδίων που χορηγούνται στους όγκους με αδenoϊούς (14). Η ακτινοβολία ασκεί τη θεραπευτική της επίδραση προκαλώντας ρήξη των αλύσεων του DNA και έχει επίδραση πρώτιστα στις φάσεις G2/M του κυτταρικού κύκλου. Ακόμα και εάν τα ενεργώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα καρκίνου είναι ο κύριος θεραπευτικός στόχος τόσο της ακτινοβολίας όσο και της γονιδιακής θεραπείας με HSV-tk, η δράση της γονιδιακής θεραπείας πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της φάσης σύνθεσης του DNA S και συσχετίζεται με τη συσσώρευση και την ενσωμάτωση του τοξικού τριφωσφορικού άλατος GCV στο DNA (5,6). Η ενισχυμένη βλάβη του DNA από τον συνδυασμό γονιδιακής θεραπείας με ακτινοβολία που συμβαίνει σε διάφορα κρίσιμα σημεία του κυτταρικού κύκλου οδηγεί στο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου, την ηυξημένη κυτταρική καταστροφή και την καθυστέρηση στην ανάπτυξη των όγκων. Τέλος, ο μη συστηματικός αλλά ενδοεπιπλασματικός τρόπος χορήγησης της γονιδιακής θεραπείας στο ανωτέρω μοντέλο προσφέρει το πλεονέκτημα ότι ελαχιστοποιείται η έκθεση των φυσιολογικών ιστών, και κατά συνέπεια, διευρύνεται το θεραπευτικό παράθυρο του ανωτέρω σχήματος ακτινοθεραπείας (3).

Το γενετικό πρωτόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων καθορίζει κατά πόσον οι όγκοι είναι ευαίσθητοι και, συνεπώς, θεραπεύσιμοι με την ακτινοβολία. Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα όγκων που έχουν απώλεια ή μετάλλαξη του γονιδίου p53 παρουσιάζουν αντίσταση στην απόπτωση μετά από ακτινοθεραπεία. Στη γονιδιακή θεραπεία HSV-tk, ο κύριος τρόπος θανάτου κυττάρων είναι η απόπτωση, αν και νέκρωση έχει επίσης περιγραφεί. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η απόπτωση από γονιδιακή θεραπεία HSV-tk συμβαίνει ανεξαρτήτως ανωμαλιών του γονιδίου p53 (30,31). Συνεπώς, η χορήγηση συνδυασμένης γονιδιακής θεραπείας με ακτινοβολία δύναται να καταστρέψει καρκινικά κύτταρα ανεξάρτητα από μεταλλάξεις του p53 καθώς και μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, αυξάνοντας επομένως τις πιθανότητες για τον αποτελεσματικό έλεγχο των όγκων.

Η γονιδιακή θεραπεία με φορείς αδenoϊούς προκαλεί επίσης το φαινόμενο “bystander” κατά το οποίο η χορήγηση του γονιδίου HSV-tk μπορεί να έχει θεραπευτικό αποτέλεσμα σε μη-μολυνθέντα γειτονικά καρκινικά κύτταρα. Ο μηχανισμός του φαινομένου “bystander” δεν έχει γίνει εξ’ ολοκλήρου κατανοητός και έχει επίσης παρατηρηθεί όταν συνδυάζονται από κοινού η γονιδιακή θεραπεία HSV-tk με την ακτινοθεραπεία. Αυτό το φαινόμενο έχει αποδοθεί σε διάφορους μηχανισμούς και σχετίζεται με τα επίπεδα ενεργοποίησης της θυμιδινικής κινάσης στα μολυνθέντα κύτταρα (20), τη πρόσληψη αποπτωτικών κυστιδίων αποθνησκόντων κυττάρων από μη μολυνθέντα παραπλήσια κύτταρα (9), ως και τη μεταφορά τοξικών αναλόγων νουκλεοτιδίων GCV και άλλων μικρών μορίων μέσω των διακυτταρικών χασμάτων επικοινωνίας “gap junctions” (7,8). Είναι δυνατό οι βλάβες των κυτταρικών μεμβρανών και ο κυτταρικός θάνατος που προκαλούνται από την ακτινοβολία, να ενισχύουν τη μεταφορά των ανάλογων νουκλεοτιδίων στα γειτονικά κύτταρα, ενισχύοντας έτσι την ευαισθησία τους στη γονιδιακή θεραπεία.

Επιπροσθέτως, διάφοροι επιστήμονες έχουν θεωρήσει ότι η παρουσίαση/γένεση μιας ισχυρής ανοσολογικής απάντησης αποτελεί σημαντική πτυχή της γονιδιακής θεραπείας. Έχει αποδειχθεί ότι οι όγκοι που αντιμετωπίζονται με HSV-tk και GCV διηθούνται από μακροφάγα, CD4 +,

CD8+ T λεμφοκύτταρα καθώς και κύτταρα NK (12,32). Λεμφοκίνες όπως οι ιντερλευκίνες IL-1, IL-2, IL-6, και IL-12, η ιντερφερόνη - γ , TNF- α , Gm-CSF μεσολαβούν για την ανάπτυξη ενός τοπικού καθώς και γενικευμένου φαινομένου “bystander” (33-35). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η παρουσία του συγκεκριμένου γονιδίου HSV-tk στους ιστούς προκαλεί τη διαφοροποίηση εξειδικευμένων κυτταροτοξικών κλώνων T-λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα τη δημιουργία επίκτητης προστατευτικής ανοσίας (36-38). Στην παρούσα μελέτη, η συστηματική δράση της γονιδιακής θεραπείας HSV-tk σε συνδυασμό με την ακτινοβολία αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο καρκίνου μαστού και προστάτου αντίστοιχα με προϋπάρχουσες μεταστάσεις. Το ανωτέρω επιτεύχθηκε με ταυτόχρονη χορήγηση καρκινικών κυττάρων τόσο υποδόρια στο γλουτό όσο και μέσω της φλέβας στην ουρά των πειραματόζων. Παρόλο που θεραπεία εδόθη μόνο στους υποδόριους όγκους, περιορισμός ανάπτυξης μεταστατικών οζιδίων παρατηρήθη μόνο στις ομάδες που έλαβαν γονιδιακή θεραπεία με HSV-tk. Συγκριτικά με την ομάδα που έλαβε μόνο HSV-tk, ο συνδυασμός γονιδιακής θεραπείας με ακτινοβολία μείωσε περαιτέρω τον αριθμό των πνευμονικών οζιδίων κατά 50%-66,7%. Η ως άνω σημαντική συστηματική δραστηριότητα του συνδυασμού θεραπείας αποδόθηκε στην ηυξημένη ενδοεπιπλασματική συσσώρευση πρώτιστα των CD4 + και δευτερευόντως των CD8 + T-λεμφοκυττάρων. Φαίνεται πιθανό ότι ο συνδυασμός γονιδιακής θεραπείας με την ιονίζουσα ακτινοβολία μεταβάλλει και ενισχύει την αντιγονικότητα των όγκων, προκαλώντας έτσι μια ισχυρότερη ανοσολογική απάντηση.

Σε αυτή τη μελέτη αξιολογήθηκε επίσης η επίδραση των επανειλημμένων συνεδριών της συνδυασμένης ταυτόχρονης γονιδιακής θεραπείας HSV-tk με ακτινοθεραπεία στον τοπικό έλεγχο των όγκων και την επιβίωση των πειραματόζων. Ανεβρέθει ότι τρεις συνεδρίες ταυτόχρονης θεραπείας είχαν το καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα αυξάνοντας την μέση επιβίωση σε 58 ημέρες, ακολουθούμενες από τις δύο συνεδρίες με μέση επιβίωση 45 ημέρες, ενώ η μέση επιβίωση όλων των άλλων θεραπευτικών ομάδων κυμάνθηκε από 26 έως 35 ημέρες. Παρ' όλο που οι τρεις συνεδρίες συνδυασμού γονιδιακής θεραπείας με ακτινοθεραπεία επέτυχαν την καλύτερη καθυστέρηση στην τοπική ανάπτυξη των όγκων, η διαφορά μεταξύ των τριών καλύτερων

θεραπευτικών ομάδων όσον αφορά το μέγεθος των υποδορίων όγκων δεν ήταν στατιστικά σημαντική και, επομένως, δεν είναι ανάλογη με τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στην επιβίωση. Είναι κατά συνέπεια δυνατόν η παρατεταμένη επιβίωση μετά από τις πολλαπλές συνεδρίες συνδυασμού θεραπείας να οφείλεται σε μια ισχυρή ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα ανωτέρω αποτελέσματα είναι πολύ ενθαρρυντικά δεδομένου ότι υπάρχουν επιφυλάξεις για την αποτελεσματικότητα της γονιδιακής θεραπείας με φορείς αδενοϊούς βασιζόμενες σε δημοσιεύσεις που αναφέρουν χαμηλά ποσοστά ενσωμάτωσης και έκφρασης των θεραπευτικών γονιδίων καθώς και εξουδετέρωση του φορέως αδενοϊού από το ανοσοποιητικό σύστημα. (7). Σε μια πρόσφατη μελέτη (39), επαναλαμβανόμενες συνεδρίες γονιδιακής θεραπείας HSV-tk χορηγηθείσες δια της ενδοπεριτοναϊκής οδού σε πειραματικό μοντέλο καρκίνου των ωθηκών ήσαν αποτελεσματικές στο να αυξήσουν την επιβίωση. Στην ανωτέρω μελέτη εντούτοις, βρέθηκε ότι η ενδοπεριτοναϊκή συγκέντρωση αντισωμάτων εναντίον του αδενοϊού ήταν αρκετά χαμηλότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη του ορού. Συμπεραίνεται, επομένως, ότι η περιτοναϊκή κοιλότητα μπορεί να αποτελεί μία περιοχή του σώματος προστατευμένη από τις επιδράσεις της χημικής ανοσίας, παρ' όλο που ελέγχεται συνεχώς από κύτταρα υπεύθυνα για την κυτταρική ανοσία όπως τα μακρόφαγα και τα λεμφοκύτταρα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε υποδόριους όγκους, οι οποίοι μπορεί επίσης να είναι προστατευμένοι από τη χημική ανοσία. Μέλλουσες ορθοτοπικές μελέτες θα βοηθήσουν περαιτέρω στο χαρακτηρισμό της κυτταρικής και χημικής ανοσίας παρέχοντας το φυσιολογικό περιβάλλον όπου ο συνδυασμός αντιγόνων από αδενοϊούς και καρκινικά κύτταρα θα προκαλέσουν την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι επανειλημμένες συνεδρίες της γονιδιακής θεραπείας HSV-tk έχουν μελετηθεί σε κλινικά πρωτόκολλα για τη θεραπεία υποτροπών καρκίνου του προστάτη μετά από ακτινοθεραπεία (40). Η γονιδιακή θεραπεία, που χορηγήθηκε τοπικά δι ενέσεως εντός του προστατικού αδένος, έγινε καλώς ανεκτή, είχε ελάχιστη τοξικότητα και οδήγησε σε μείωση των επιπέδων PSA. Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα του συνδυασμού γονιδιακής θεραπείας με ακτινοθεραπεία στις προκλινικές μελέτες καθώς και η παρατηρηθείσα χαμηλή

τοξικότητα σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο του προστάτη οδήγησαν σε κλινικές μελέτες για τη διερεύνηση της τοξικότητας και της αποτελεσματικότητας του ταυτόχρονου συνδυασμού σε άτομα που πρωτοδιαγιγνώσκονται με τη πάθηση αυτή. Δεδομένου ότι η ακτινοθεραπεία διαρκεί για μερικές εβδομάδες, επαναλαμβανόμενες συνεδρίες γονιδιακής θεραπείας κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας μπορούν να αποδειχθούν αποτελεσματικές για την ακτινοευαισθητοποίηση και, συνεπώς, την έκβαση της πάθησης. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από μια σε εξέλιξη ευρισκόμενη κλινική μελέτη φάσης I/II αποδείχνουν ότι αυτή η ανωτέρω θεραπευτική προσέγγιση είναι ασφαλής. Μακροχρόνια εντούτοις παρακολούθηση των ασθενών είναι απαραίτητη προς απόδειξη του ισχυρισμού ότι η ταυτόχρονη χορήγηση ακτινοθεραπείας με in-situ γονιδιακή θεραπεία παρέχει πλεονεκτικά θεραπευτικά αποτελέσματα έναντι των πρότυπων θεραπευτικών μεθόδων αντιμετώπισης της νόσου (41).

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν επίσης να αξιολογήσει την επίδραση προϋπάρχουσας ανοσίας στην έκφραση, κατανομή, κινητική και τοξικότητα των φορέων αδενοϊών που χορηγούνται τοπικά εντός των καρκινικών όγκων. Η ανάγκη για αυτή την αξιολόγηση προκύπτει επειδή ο βαθμός ανοσίας μπορεί να ποικίλλει ανάμεσα στους ανθρώπινους πληθυσμούς υπό μελέτη, και επειδή υπάρχουν λίγες εργασίες που αξιολογούν τα αποτελέσματα της γονιδιακής θεραπείας σε συνάρτηση με τη παρουσία προηγούμενης ανοσοποίησης. Ανοσοποίηση έναντι των αδενοϊών είναι συχνή και ο βαθμός της εξαρτάται από την αιτιολογία της λοιμώξεως και το μεσοδιάστημα που έχει περάσει μέχρι την συμμετοχή στη κλινική μελέτη (42,43). Επιπλέον, εφόσον τα πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι οι πολλαπλές συνεδρίες γονιδιακής θεραπείας με αδενοϊούς είναι αποτελεσματικότερες, η ανωτέρω στρατηγική έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται σε κλινικές μελέτες (40-44). Κατά συνέπεια, η κατανόηση των πιθανών συνεπειών από προϋπάρχουσα ανοσία μπορεί να ασκήσει σημαντική επίδραση στο σχεδιασμό του θεραπευτικού σχήματος και, επομένως, στο τελικό αποτέλεσμα.

Τα ερωτήματα σχετιζόμενα με την έκφραση, κατανομή και κινητική των αδενοϊών αξιολογήθηκαν από τη μέτρηση των επιπέδων της λουσιφεράσης

(luciferase) σε όγκους και επιλεγμένους φυσιολογικούς ιστούς σε συνάρτηση με τη δόση του αδενοϊού και με το χρόνο. Ο τίτλος αντισωμάτων δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη δόση του φορέως αδενοϊού που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση. Εντούτοις, αυξανόμενες δόσεις αδενοϊών σε μη ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα οδήγησαν σε δυσανάλογη αύξηση των επιπέδων έκφρασης των σε φυσιολογικούς ιστούς σε σύγκριση με τις μόνο μέτριες αυξήσεις των επιπέδων τους στους όγκους. Αυτό μπορεί να αποτελεί αποτέλεσμα διάχυσης των αδενοϊών από την περιοχή των όγκων, πιθανώς συνεπεία του τοπικού κορεσμού των κυτταρικών υποδοχέων. Αντίθετα, στα ανοσοποιηθέντα ζώα, προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις αδενοϊού κατέληξαν σε προοδευτικά αυξανόμενα επίπεδα έκφρασής τους στους όγκους, εντούτοις δεν προκάλεσαν καμία αύξηση στα επίπεδα έκφρασης τους στο ήπαρ, πιθανώς λόγω προστασίας εκ της μόλυνσης των περιφερικών οργάνων από κυκλοφορούντα αντισώματα. Αφού η μείωση στα επίπεδα έκφρασης του αδενοϊού ήταν αναλογικά πολύ περισσότερη στα περιφερικά όργανα σε σχέση με τους όγκους, υποθέσαμε όπως και άλλοι ερευνητές ότι το ανωτέρω φαινόμενο δύναται να αντιμετωπιστεί με την χορήγηση αυξημένων δόσεων αδενοϊού (45). Τα αποτελέσματά μας απέδειξαν ότι αύξηση της δόσης κατά δέκα με εκατό φορές στα ανοσοποιημένα ζώα αποκαθιστά το επίπεδο έκφρασης του αδενοϊού στους όγκους χωρίς να επηρεάζει σημαντικά τη έκφραση του αδενοϊού στο ήπαρ. Αυτή η προφανής ανοσο-προστασία υποστηρίζει τα συμπεράσματα του Bramson και συνεργατών (45). Στην τελευταία μελέτη, οι ερευνητές ανέφεραν μείωση των επιπέδων έκφρασης του αδενοϊού κατά 2,4 φορές στους όγκους και πάνω από 1000 φορές στο ήπαρ μετά από προηγηθείσα ενδοκρινική ανοσοποίηση. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για να αποφευχθεί η τοξικότητα της γονιδιακής θεραπείας με αδενοϊούς κατά τη διάρκεια μιας κλινικής μελέτης μπορεί να είναι χρήσιμο να προηγηθεί εμβολιασμός των ασθενών ακολουθούμενος από χορήγηση αυξημένων δόσεων φορέων αδενοϊών προς επίτευξη ικανοποιητικής έκφρασής τους στους όγκους και κατά συνέπεια να μην επηρεαστεί αρνητικά το θεραπευτικό τους αποτέλεσμα. Τα ανωτέρω δεδομένα υποστηρίζουν το συμπέρασμα ότι η χορήγηση ηυξημένων δόσεων αδενοϊού μπορεί να οδηγήσει σε ηυξημένη τοπική έκφρασή του· εντούτοις η αναμενόμενη προστασία από την προ-ανοσοποίηση ήταν αληθινή

μόνο στο επίπεδο έκφρασης του αδενοϊού αλλά αντίθετη προς αυτό που παρατηρήθηκε αναφορικά με την συστηματική τοξικότητα, όπως συζητείται στις επόμενες παραγράφους.

Η ηυξημένη ταχέως εμφανισθείσα τοξικότητα που παρατηρήθηκε στους ανοσοποιηθέντες οργανισμούς μετά από τις υψηλές δόσεις αδενοϊού, 1×10^{13} και 3×10^{13} σωματίδια ανά χιλιόγραμμο βάρους, ήταν μη αναμενόμενη. Είχαμε υποθέσει ότι η χημική ανοσία μπορεί να παρουσιάσει ένα προστατευτικό αποτέλεσμα δεδομένου ότι διάφορες προκλινικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης και της παρούσης, έχουν αποδείξει ότι τα αντισώματα εναντίον των αδενοϊών παρεμποδίζουν την ενσωμάτωση τους στο ήπαρ και άλλα περιφερικά όργανα (45,46). Παρ' όλα αυτά, παρατηρήθηκε το αντίθετο αποτέλεσμα. Η ανοσοποιηθείσα ομάδα παρουσίασε 60% θνησιμότητα μέσα σε 18 ώρες από την χορήγηση του αδενοϊού, έναντι 15% στα μη ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα. Ιστολογικά και βιοχημικά στοιχεία μέτριας έως βαριάς μορφής ηπατίτιδας παρατηρήθηκαν μόνο στα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα. Η απουσία ηπατο-τοξικότητας στους μη ανοσοποιηθέντες οργανισμούς δείχνει ότι η τοξικότητα δεν είναι αποτέλεσμα της κυτταρικής ενσωμάτωσης του φορέως αδενοϊού αλλά οφείλεται σε ταχεία ανοσολογική απάντηση.

Αν και δεν έχουν διευκρινιστεί οι παράγοντες που μετατρέπουν τις ανοσολογικές απαντήσεις στους αδενοϊούς από προστατευτικές σε τοξικές, η ταχεία ανάπτυξη των συμπτωμάτων συνηγορεί περισσότερο υπέρ ενός μηχανισμού σχετιζόμενου με την παραγωγή και εναπόθεση ελευθέρων ανοσοσυμπλεγμάτων ή και προσροφημένων σε αιμοπετάλια. Τα ανοσοσυμπλέγματα αυτά δύνανται να προκαλέσουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις αφού ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, και έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν ηπατοτοξικότητα σε ένα πειραματικό μοντέλο αρουραίων (47). Επιπροσθέτως, ενεργοποίηση του συμπληρώματος έχει διαπιστωθεί στο πλάσμα μετά από χορήγηση φορέως αδενοϊού (48,49). Η αρχική ενεργοποίηση του συμπληρώματος με τις επακόλουθες αγγειακές διαταραχές μπορούν να κινητοποιήσουν μια συστηματική φλεγμονώδη απάντηση που μπορεί να καταλήξει σε αναπνευστική ανεπάρκεια, ανεπάρκεια πολλαπλών

οργάνων και, τελικώς, θάνατο (19). Σε περίπτωση ελαφρότερων απαντήσεων, η εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στα αιμοπετάλια μπορεί να προκαλέσει θρομβοκυτοπενία (48-50). Εντούτοις, είναι σαφές ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη τοξικότητα από τη χορήγηση φορέων αδενοϊών. Παραδείγματος χάριν, η τοξικότητα που παρατηρείται από τους αδενοϊούς πρώτης γενεάς είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται σε αδενοϊούς από τους οποίους τα E4 γονίδια έχουν αφαιρεθεί (44,51). Σε αυτή τη μελέτη, το γεγονός ότι η ηπατοτοξικότητα παρατηρήθηκε μόνο στους ανοσοποιηθέντες οργανισμούς συνηγορεί κατά του μηχανισμού άμεσης τοξικότητας προερχομένης εκ του ιδίου του αδενοϊού.

Κατά συνέπεια, η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να είναι απαραίτητη για να περιοριστεί η τοξικότητα εκ της γονιδιακής θεραπείας. Πολλοί ερευνητές δοκιμάζουν αυτήν τη μέθοδο στα ζώα και τους ανθρώπους για να ενισχύσουν τη διάρκεια της έκφρασης των θεραπευτικών γονιδίων (46,52). Εντούτοις, οι περισσότερες από τις μελέτες που έχουν δημοσιεύσει τα θεραπευτικά αποτελέσματα της γονιδιακής θεραπείας έχουν συμπεριλάβει μη ανοσοποιηθέντες οργανισμούς, στοχεύοντας την καταστολή της αρχικής ανοσολογικής απάντησης. Αυτή η τακτική είναι πιθανόν να είναι επιτυχέστερη από την καταστολή της απάντησης μνήμης (53). Στη παρούσα μελέτη δεν προσπαθήσαμε να επηρεάσουμε την ανοσολογική απάντηση των πειραματόζων αλλά αποδείξαμε ότι η διάρκεια της έκφρασης γονιδίων μειώθηκε σημαντικά στα ανοσοποιημένα ζώα ακόμη και στη περίπτωση που χορηγήσαμε ηυξημένες δόσεις αδενοϊών.

Οι αιτίες για την παρατηρηθείσα ηπατοτοξικότητα πρέπει να ερευνηθούν περαιτέρω δεδομένου ότι δύναται να έχουν αυστηρές επιπτώσεις στην αποτελεσματικότητα της γονιδιακής θεραπείας με αδενοϊούς για την αντιμετώπιση του καρκίνου και άλλων ασθενειών. Είναι πιθανό ότι η τοξικότητα είναι σημαντική μόνο στη περίπτωση χορήγησης υψηλών δόσεων αδενοϊού, όπως απεδείχθη στη παρούσα μελέτη, δεδομένου ότι οι κλινικές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει σχετικά χαμηλές δόσεις, μικρότερες από 1×10^{11} σωματίδια ανά χιλιόγραμμο βάρους. Τέτοιες μελέτες έχουν αναφέρει ελάχιστη τοξικότητα ακόμα και μετά από επανειλημμένες συνεδρίες γονιδιακής

θεραπείας (40,41). Επιπλέον, καμία τοξικότητα δεν παρατηρήθηκε στα ζώα με δόσεις κάτω από 1×10^{13} σωματίδια ανά χιλιόγραμμο βάρους. Εντούτοις, δεν είναι σαφές πώς δόσεις χορηγούμενες δι' ενέσεως τοπικά εντός των όγκων αντιστοιχούν σε συστηματικές δόσεις όπως στη μοιραία περίπτωση του ασθενούς που έλαβε 1×10^{13} σωματίδια ανά χιλιόγραμμο βάρους δια των ηπατικών αρτηριών (19). Δεν είναι επίσης σαφές ποια μπορεί να είναι η κρίσιμη δόση για κάθε άτομο ξεχωριστά, και με ποιο τρόπο παράγοντες σχετιζόμενοι με την ύπαρξη προηγούμενης ανοσοποίησης, το ηπατικό μικροπεριβάλλον και τον τρόπο χορηγήσεως του αδενοϊού μπορεί να μετατρέπουν τις ανοσολογικές απαντήσεις από προστατευτικές για τους ιστούς σε καταστρεπτικές.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός γονιδιακής θεραπείας HSV-tk σε συνδυασμό με την ακτινοβολία έχει καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα έναντι της μονοθεραπείας εφόσον καθυστερεί την τοπική ανάπτυξη των όγκων και παρατείνει την επιβίωση. Επιπλέον, η παρατηρηθείσα αντι-μεταστατική της δράση, που αποδίδεται σε ανοσολογικούς μηχανισμούς, παρέχει ενδείξεις ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη ή και σε συνδυασμό με άλλες σύγχρονες θεραπείες για τη καταστολή υποβόσκουσας μεταστατικής νόσου ή ακόμη και την αντιμετώπιση τοπικών υποτροπών. Τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα των πολλαπλών συνεδριών επίσης παρέχουν ενδείξεις ότι η ανωτέρω θεραπεία πιθανώς θα είναι αποτελεσματική ως συμπληρωματική (adjuvant) για να καταστείλει την μικρομεταστατική νόσο και για τη διατήρηση των θεραπευτικών απαντήσεων σε ασθενείς με συστηματικές μεταστάσεις. Λόγω της παρατηρηθείσης ηπατοτοξικότητας σε ανοσοποιηθέντες οργανισμούς, συνιστώνται περαιτέρω μελέτες σε μοντέλα πειραματόζων, ειδικά αναφερόμενες στις περιπτώσεις που αναμένεται η συστηματική χορήγηση υψηλών δόσεων φορέων αδενοϊών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zagars, G.K., Pollack, A., Kavadi, V., and Eschenbach, A. Prostate-Specific Antigen and Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 32: 293-306; 1995.
2. Zietman, A.I., Coen, J.J., Shipley, W.U., Willet, C.G., and Efid, J.T. Radical Radiation Therapy in the Management of Prostatic Adenocarcinoma: The Initial Prostate-Specific Antigen Value as a Predictor of Treatment Outcome. *J Urol.* 141: 640-645; 1994.
3. Wheldon, T.E., Mairs, R.J., Rampling, R.P., Barrett, and A. Modeling the enhancement of fractionated radiotherapy by gene transfer to sensitize tumor cells to radiation, *Radioth and Oncol* 48: 5-13; 1998.
4. Moolten, F.L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* 46: 5276-5281, 1986.
5. Frank, K.B., Chiou, J.F., Cheng, Y.C. Interaction of herpes simplex virus-induced DNA polymerase with 9-(1, 3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 259: 1566-1569; 1984.
6. Matthews, T., Boehme, R. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev.Infec. Dis.* 10 (Suppl. 3) : S490-S494; 1988.
7. Mesnil, M., and Yamasaki, H. Bystander Effect in Herpes Simples Virus thymidine kinase/Ganciclovir Cancer Gene Therapy: Role of Gap-Junctional Communication, *Cancer Res.* 60: 3989-3999; 2000
8. Yang, L., Chiang, Y., Lenz, H.J., Danenberg, K.D., Spears, C.P., Gordon, E.M., Anderson, W.F., Parekh, D. Intercellular Communication Mediates the Bystander Effect During Herpes Simplex Thymidine Kinase/Ganciclovir-Based Gene Therapy of Human Gastrointestinal Tumor Cells. *Hum. Gene Ther.*, 9: 719-728; 1998
9. Freeman, S.M., Abboud, C.N., Wartenby, K.A., Packman, C.H., Koeplin, D.S., Moolten, F.L., Abraham, G.N. The "bystander effect": Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 53: 5274-5283; 1993.
10. Eastham, J.A., Chen, S.H., Sehgal, I., Wang, J., Timme, T.L., Hall, S.H., Woo S.L.C., and Thompson, T.C. Prostate Cancer Gene Therapy: Herpes

- Simplex Virus Thymidine Kinase Gene Transduction Followed by Ganciclovir in Mouse and Human Prostate Cancer Models. *Hum. Gene Ther.* 7: 515-523; 1996.
11. Timme, T.L., Hall, S.J., Barrios, R., Woo, S.L.C., Aguilar-Cordova, E., Thompson, T.C. Local inflammatory response and vector spread after direct intraprostatic injection of a recombinant adenovirus containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir therapy in mice. *Cancer Gene Ther* 5: 74-82; 1998.
 12. Hall, S.J., Sanford, M.A., Atkinson, G., Chen, S.H. Induction of potent antitumor natural killer cell activity by herpes simplex virus-thymidine kinase and ganciclovir therapy in an orthotopic mouse model of prostate cancer. *Cancer Res.* 58:3221-3225; 1998.
 13. Hall, S.J., Mutchnik, S.E., Chen, S.H., Woo, S.L.C., Thompson, T.C. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir therapy leads to systemic activity against spontaneous and induced metastasis in an orthotopic mouse model of prostate cancer. *Int. J. Cancer*, 70: 183-187; 1997
 14. Zeng, M., Cerniglia, G.J., Eck, S.L., Stevens, C.W. High-efficiency stable gene transfer of adenovirus into mammalian cells using ionizing radiation. *Hum. Gene Ther.* 8: 1025-1032; 1997
 15. Kim, S.H., Kim, J.H., Koloszy, A., Brown, S.L., Freytag, S.O. Preferential radiosensitization of 9L glioma cells transduced with HSV-tk gene by acyclovir. *Journal of Neuro-Oncology.* 33: 189-194; 1997.
 16. Trapnell, B.C. Adenoviral vectors for gene transfer. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 12: 185-189; 1993.
 17. Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E., Wilson, J.M. Cellular immunity to viral antigens limits E-1deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 4407-4411; 1994.
 18. Cichon, G., Boeckh-Herwig, S., Schmidt, H.H, Wehnes, E., Muller, T, Pring-Akerblom, P, and Burger, R. (2001). Complement Activation by Recombinant Adenoviruses. *Gene Ther.* 8(23): 1794-800; 2001
 19. Raper, S., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, GP, Nunes, F., Haskal ZJ, Furth, EE., Propert, KJ., Robinson, MB., Magosin, S., Simoes, H., Speicher, L., Hughes, J., Tazelaar, J., Wivel, NA., Wilson, JM., and

- Batshaw, ML.. A Pilot Study of In Vivo Liver-Directed Gene Transfer with an Adenoviral Vector in Partial Ornithine Transcarbamylase Deficiency. *Hum. Gene Ther.* 13(1): 163-75; 2002
20. Herman, J., Adler, HL, Aguilar-Cordova, E., Rojas-Martinez, A., Woo, S., Timmie, TL, Wheeler, TM, Thompson, TC, and Scardino, PT. In Situ Gene Therapy for Adenocarcinoma of the Prostate: A Phase I Clinical Trial. *Hum. Gene Ther.* 10(7): 1239-49; 1999
21. Nyberg-Hoffman, C., Shabram, P., Li, W., Giroux, D., Aguilar-Cordova, E. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nature Medicine.* 3; 808-811; 1997.
22. Chen, S.H., Chen, X.H.L., Wang, Y., Kosai, K.I., Finegold, M.J., Rich, S.S., Woo, S.L.C. Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:2577-2581; 1995.
23. Greenlee, R.T., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P.A. Cancer Statistics, 2000 CA, *Cancer J Clin*, 50(1): 7-33; 2000.
24. Laramore, G.E., et al. Fast Neutron Radiotherapy for Locally Advanced Prostate Cancer. *Am J Clin Oncol.* 16: 164-167; 1993
25. Russel, K., Caplan, R., and Laramore, G. Photon versus Fast Neutron External Beam Radiotherapy in the Treatment of Locally Advanced Prostate Cancer: Results of a Randomized Prospective Trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 28: 47-54; 1994.
26. Shipley, W.U., et al. Advanced Prostate Cancer: The Results of a Randomized Comparative Trial of High Dose Irradiation Boosting with Conformal Protons Compared with Conventional Dose Irradiation Using Photons Alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 32: 3-12; 1995.
27. Bolla, M., et al. Improved Survival in Patients with Locally Advanced Prostate Cancer Treated with Radiotherapy and Goserelin. *N Engl J Med.* 337: 295-300; 1997.
28. Pilepich, M.V., et al. Phase III Trial of Androgen Suppression Using Goserelin in Unfavorable-Prognosis Carcinoma of the Prostate Treated with Definitive Radiotherapy: Report of the Radiation Therapy Oncology Group Protocol 85-31. *J Clin Oncol.* 15: 1013-1021; 1997.
29. Pilepich, M.V., et al. Androgen Deprivation with Radiation Therapy Compared with Radiation Therapy Alone for Locally Advanced Prostatic

- Carcinoma: A randomized Comparative Trial of the Radiation Therapy Oncology Group. *Urology*. 45: 616-623; 1995.
30. Hamel, W., Magnelli, L., Chiarugi, V.P., Israel, M.A. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res.*, 56:2697-2702; 1996.
31. Wallace, H., MacLaren, K., Al-Shawi, R., Bishop, J. Ganciclovir-induced ablation of non-proliferating thyrocytes expressing herpes thymidine kinase occurs by p53-independent apoptosis. *Oncogene*, 13: 55-61, 1996.
32. Vile, R.G., Castelden, S., Marshall, J., Camplejohn, R., Upton, C., Chong, H. Generation of an anti-tumor immune response in a non-immunogenic tumor: HSV-tk killing in vivo stimulates a mononuclear cell infiltrate and a TH1-like profile of intratumoral cytokine expression. *Int. J. Cancer*, 71:267-274; 1997.
33. Kianmanesh, A.R., Perrin, H., Panis, Y., Fabre, M., Nagy, H.J., Houssin, D., Klatzmann, D.A. A "distant" bystander effect of suicide gene therapy: regression of nontransduced tumors together with a distant transduced tumor. *Hum. Gene Ther.*, 8: 1807-1814; 1997.
34. Gagandeep, S., Brew, R., Gree, B., Christmas, S.E., Klatzmann, D., Poston, G.J., Kinsella, A.R. Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the bystander effect. *Cancer Gene Ther.* 3: 83-88, 1996.
35. Vile, R.G., Nelson, J.A., Castleden, S., Chong, H., Hart, I.R. Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSV-tk gene involves an immune component. *Cancer Res.* 54: 6228-6234; 1994.
36. Iwadate, Y., Namba, H., Tagawa, M., Takeneage, K., Sueyoshi, K., Sakiyama, S. Induction of acquired immunity in rats that have eliminated intracranial gliosarcoma cell by the expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Oncology*, 54:329-334; 1997
37. Kuriyama, S., Sakamoto, T., Masui, K., Nakatani, T., Tominga, K., Kikikawa, M., Yoshikawa, M., Ikenaka, K., Fukui, H., Tsujii, T. Tumor-specific expression of HSV-tk gene can induce efficient antitumor effect

- and protective immunity to wildtype hepatocellular tumor. *Int. J. Cancer*, 71: 470-475; 1997
38. Yamamoto, S., Suzuki, S., Hoshino, A., Akimoto, M., Shimada, T. Herpes simplex virus thymidine/ganciclovir-mediated killing of tumor cells induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice. *Cancer Gene Ther*, 4: 91-96; 1997.
39. Al-Hendy, A., Magliocco, A.M., Al-Tweigeri, T., Braileanu, G., Crellin, N., Li, H., Strong, T., Curiel, D., Chedrese, P.J. Ovarian cancer gene therapy: Repeated treatment with thymidine kinase in an adenovirus vector and ganciclovir improves survival in a novel immunocompetent murine model. *Am J Obstet Gynecol*, 182(3): 553-559; 2000
40. Shalev, M., Kadmon, D., Teh, B.S., Butler, E.B., Aguilar-Cordova, E., Thompson, T.C., Herman, J.R., Adler, H.L., Scardino, P.T., Miles, B.J. Suicide gene therapy toxicity after multiple and repeat injections in patients with localized prostate cancer. *The Journal of Urology*, 163: 1747-1750; 2000
41. Teh, B.S., Aguilar-Cordova, E., Kernen, K., Chou, C.C., Shalev, M., Vlachaki, M.T., Miles, B., Kadmon, D., Mai, W.Y., Caillouett, J., Davis, M., Ayala, G., Wheeler, T., Brady, J., Carpenter, L.S., Lu, H.H., Chiu, J.K., Woo, S.Y., Thompson, T., Butler, E.B. Phase I-II trial evaluating combined radiotherapy and in-situ gene therapy with or without hormonal therapy in the treatment of prostate cancer-A preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 51: 605-613; 2001.
42. Molnar-Kimber, K.L., Sterman, D. H., Chang, M., Kang, E. H., Elbash, M., Lanuti, M., Elshami, A., Gelfand, K., Wilson, J. M., Kaiser, L. R., and Albelda, S. M. (1998). Impact of Preexisting and Induced Humoral and Cellular Immune Responses in an Adenovirus-Based Gene Therapy Phase I Clinical Trial for Localized Mesothelioma. *Hum. Gene Ther*. 9: 2121-2133.
43. Thompson, T.C. In situ Gene Therapy for Prostate Cancer. *Oncol. Res*. 11: 1-8; 1999
44. Morral, N., O'Neal, W., Zhou, H., Langston, C., and Beaudet, A. Immune Responses to Reporter Proteins and High Viral Dose Limit Duration of Expression with Adenoviral Vectors: Comparison of E2a Wild Type and E2a Deleted Vectors. *Hum. Gene Ther*. 8(10): 1275-86; 1997

45. Bramson, J.L., Hitt, M., Gauldie, J., and Graham F. L. Pre-existing Immunity to Adenovirus does not Prevent Tumor Regression Following Intratumoral Administration of a Vector Expressing IL-12 but Inhibits Virus Dissemination. *Gene Therapy*. 4: 1069-1076;1997
46. Yang, Y., Greenough, K., and Wilson J. M. Transient Immune Blockade Prevents Formation of Neutralizing Antibody to Recombinant Adenovirus and Allows Repeated Gene Transfer to Mouse Liver. *Gene Therapy*. 3: 412-420; 1996
47. Sun, M., Wang, BE, Annoni, G., Degli Esposti, S., Biempica, L., and Zern, MA. Two Rat Models of Hepatic Fibrosis. A Morphologic and Molecular Comparison. *Lab Invest*. 63(4): 467-75;1990
48. Clabough, D., Gebhard, D., Flaherty, MT., Whetter, LE, Perry, ST., Coggins, L., and Fuller, FJ. Immune-mediated Thrombocytopenia in Horses Infected with Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*. 65(11): 6242-51;1991
49. Lurhuma, A., Riccomi, H., and Masson, PL. The Occurrence of Circulating Immune Complexes and Viral Antigens in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Clin Exp Immunol*. 28(1): 49-55;1977
50. Assessment of Adenoviral Vector Safety and Toxicity: Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. *Hum. Gene Ther*. 13(1): 3-13; 2002
51. Lanuti, M., Gao, GP., Force, SD., Chang, MY., El Kouri, C., Amin, KM., Hughes, JV., Wilson, JM., Kaiser, LR., and Albelda, SM. Evaluation of an E1E4-Deleted Adenovirus Expressing the Herpes Simplex Thymidine Kinase Suicide Gene in Cancer Gene Therapy. *Hum. Gene Ther*. 10(3): 463-75; 1999
52. Fang, B., Eisensmith, R.C., Wang, H., Kay, M. A., Cross, R. E., Landen, C. N., Gordon, G., Bellinger, D. A., Read, M. S., Hu, P. C., Brinkhous, K. M., and Woo, S. L. C. Gene Therapy for Hemophilia B: Host Immunosuppression Prolongs the Therapeutic Effect of Adenovirus-Mediated Factor IX Expression. *Hum. Gene Ther*. 6: 1039-1044; 1995
53. Ludviksson, B., Seegers, D., Resnick, AS., and Strober, W. The Effect of TGF-beta1 on Immune Responses of Naive Versus Memory CD4+ Th1/Th2 T Cells. *Eur. J. Immunol*. 30(7): 2101-11; 2000

ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ / ΕΙΚΟΝΩΝ

Διάγραμμα 1.

Αποτελέσματα από την προοδευτική αύξηση δόσεων φορέων AdV για τη χορήγηση γονιδιακής θεραπείας HSV-tk. Οι δόσεις κυμάνθηκαν από 1×10^9 ως 1×10^{11} σωματίδια/όγκο και χορηγήθηκαν δια τοπικής ενέσεως σε υποδορίους όγκους μεγέθους 50-60 κυβικά χιλιοστά. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την χορήγηση του AdV χορηγήθη GCV για έξι μέρες σε δόση 20 mg/kg, δις ημερησίως.

Διάγραμμα 2.

Αποτελέσματα από την προοδευτική αύξηση δόσεων ακτινοβολίας. Η ακτινοθεραπεία εδόθη σε μονήρη κλάσματα των 5, 10, ή 15 Gy.

Διάγραμμα / Εικόνα 3.

Αποτελέσματα συνδυασμού γονιδιακής θεραπείας με ακτινοθεραπεία όσον αφορά τον τοπικό έλεγχο των όγκων στα πειραματικά μοντέλα καρκίνου προστάτη (A) και μαστού (B,C). Ο AdV εδόθη σε δόση 3×10^{10} σωματίδια/όγκο, ενώ οι ακτινοβοληθέντες όγκοι έλαβαν μια ενιαία δόση 5 Gy, σαράντα οκτώ ώρες μετά τη χορήγηση του AdV.

Διάγραμμα 4.

Αποτελέσματα συνδυασμού γονιδιακής θεραπείας με ακτινοθεραπεία αναφορικά με την επιβίωση στα πειραματικά μοντέλα καρκίνου προστάτη (A) και μαστού (B).

Διάγραμμα 5.

Ποσοτικός προσδιορισμός διήθησης όγκων απο CD4+ και CD8+ T-λεμφοκύτταρα στις ομάδες θεραπείας. Πραγματοποιήθηκε με ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε τομές ιστών εκφραζόμενη σε αριθμό θετικών κυττάρων ανά mm².

Διάγραμμα / Εικόνα 6.

Επίδραση του συνδυασμού τοπικής επί των υποδορίων όγκων γονιδιακής θεραπείας με ακτινοθεραπεία στην ανάπτυξη πνευμονικών μεταστάσεων. Α) Αριθμός μακροσκοπικών πνευμονικών οζιδίων 12 ημέρες μετά τη χορήγηση μονοθεραπείας ή συνδυασμού γονιδιακής θεραπείας με ακτινοβολία. Β) Φωτογραφία αντιπροσωπευτικών παραδειγμάτων πνευμόνων από πειραματόζωα που έλαβαν ή μη θεραπεία.

Διάγραμμα 7.

Αποτελέσματα επανειλημμένων συνεδριών θεραπείας στη καθυστέρηση τοπικής ανάπτυξης των όγκων. Μια, δύο και τρεις συνεδρίες συνδυασμού AdV + XRT συγκρίθηκαν με μια, δύο και τρεις συνεδρίες απο AdV ή XRT, και με πειραματόζωα που δεν έλαβαν θεραπεία. Ο AdV εχορηγήθη σε δόση 3×10^{10} σωματίδια/όγκο, ενώ η ακτινοβολία εδόθη σε μονήρες κλάσμα των 5 Gy. Το μεσοδιάστημα μεταξύ των θεραπευτικών συνεδριών ήταν επτά ημέρες.

Διάγραμμα 8.

Επιβίωση μετά από επανειλημμένες συνεδρίες θεραπείας.

Διάγραμμα 9.

Ολικός τίτλος αντισωμάτων έναντι AdV που αξιολογήθηκε με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο ELISA. Σημαντικά υψηλότεροι τίτλοι κυκλοφορούντων αντισωμάτων παρατηρήθηκαν στα ανοσοποιηθέντα

πειραματόζωα συγκριτικά με τα μη ανοσοποιηθέντα σε όλα τα χρονικά σημεία ($p < 0.011$). Οι τίτλοι αντισωμάτων έφθασαν στη μέγιστη τιμή τους μια εβδομάδα μετά από την χορήγηση του AdV ($p < 0.009$).

Διάγραμμα 10.

Επίπεδα λουσιφεράσης (luciferase) σε όγκους και επιλεγμένα φυσιολογικά όργανα σε ανοσοποιηθέντα και μη ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα. Τα επίπεδα της λουσιφεράσης αντιστοιχούν στα επίπεδα έκφρασης του AdV και εκφράζονται ως relative luminescence units ανά γραμμάριο ιστού (RLU/gm). Η ανοσοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χορήγηση αδενοϊού σε δόση 1×10^{11} σωματίδια/όγκο 14 ημέρες πριν από τη χορήγηση του αδενοϊού φέροντος το γονίδιο της λουσιφεράσης. Η ανοσοποίηση ελάττωσε τα επίπεδα της λουσιφεράσης στα περιφερικά όργανα κατά τουλάχιστον 714 φορές ($p < 0.001$) ενώ στους όγκους τα επίπεδα της λουσιφεράσης ελαττώθηκαν κατά μόνο 24 φορές ($p = 0.004$).

Διάγραμμα 11.

Επίπεδα λουσιφεράσης στον όγκο και το ήπαρ ως συνάρτηση της δόσης του AdV. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε τρεις μέρες μετά τη χορήγηση του AdV. Στα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα, η έκφραση της λουσιφεράσης στο ήπαρ παραμένει ποσοτικά ανεπηρέαστη από την αύξηση της δόσεως του AdV ενώ η έκφραση του γονιδίου στους όγκους αυξάνεται σε επίπεδα ισοδύναμα με αυτά των μη ανοσοποιηθέντων πειραματοζώων.

Διάγραμμα 12.

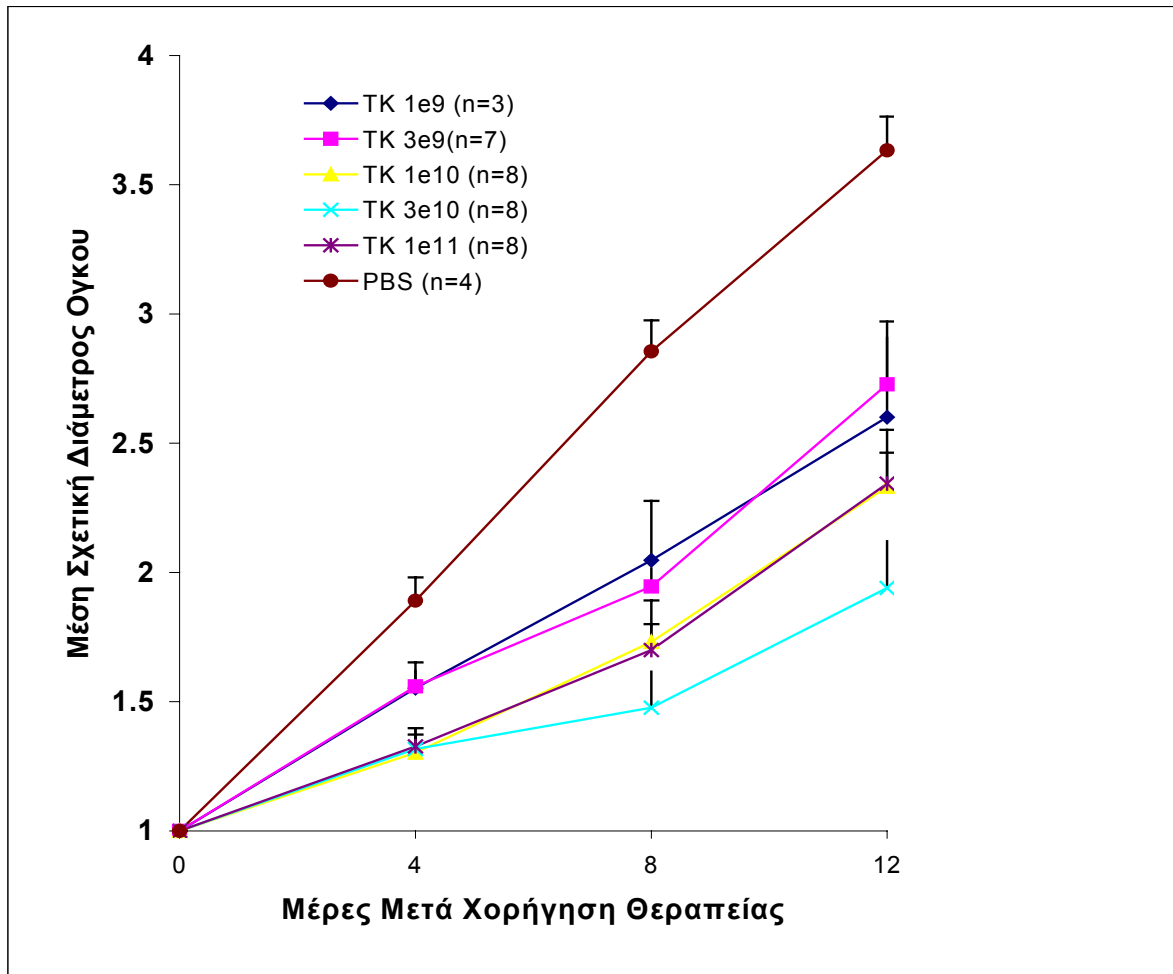
Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της λουσιφεράσης σε όγκο και ήπαρ σε ανοσοποιηθέντα και μη ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα σε συνάρτηση με το χρόνο. Ο αριστερός άξονας δείχνει τα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης (RLU/gm) στα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα και στα αντίστοιχα της ομάδας ελέγχου· ο δεξιός άξονας επιδεικνύει το πηλίκo των επιπέδων έκφρασης λουσιφεράσης στον όγκο δια των αντίστοιχων του ήπατος για τα

ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα (closed square line) και για τα αντίστοιχα της ομάδας ελέγχου (open bars) . Οι ηυξημένες τιμές του πηλίκου στα ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα οφείλονται στην αναλογικά μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων της λουσιφεράσης στο ήπαρ συγκριτικά με τους όγκους, και απεδόθησαν στη κυκλοφορία αντισωμάτων εναντίον του αδενοϊού. Τα ενδονεοπλασματικά επίπεδα της λουσιφεράσης μεγιστοποιήθηκαν την δεύτερη ημέρα μετά την χορήγηση AdV-Luc και μειώθηκαν σημαντικά την έβδομη ημέρα στα προ-ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα και τα αντίστοιχα στην ομάδα ελέγχου. Στα τελευταία, τα ενδονεοπλασματικά επίπεδα της λουσιφεράσης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα σε όλα τα σημεία του χρόνου ($p < 0.004$).

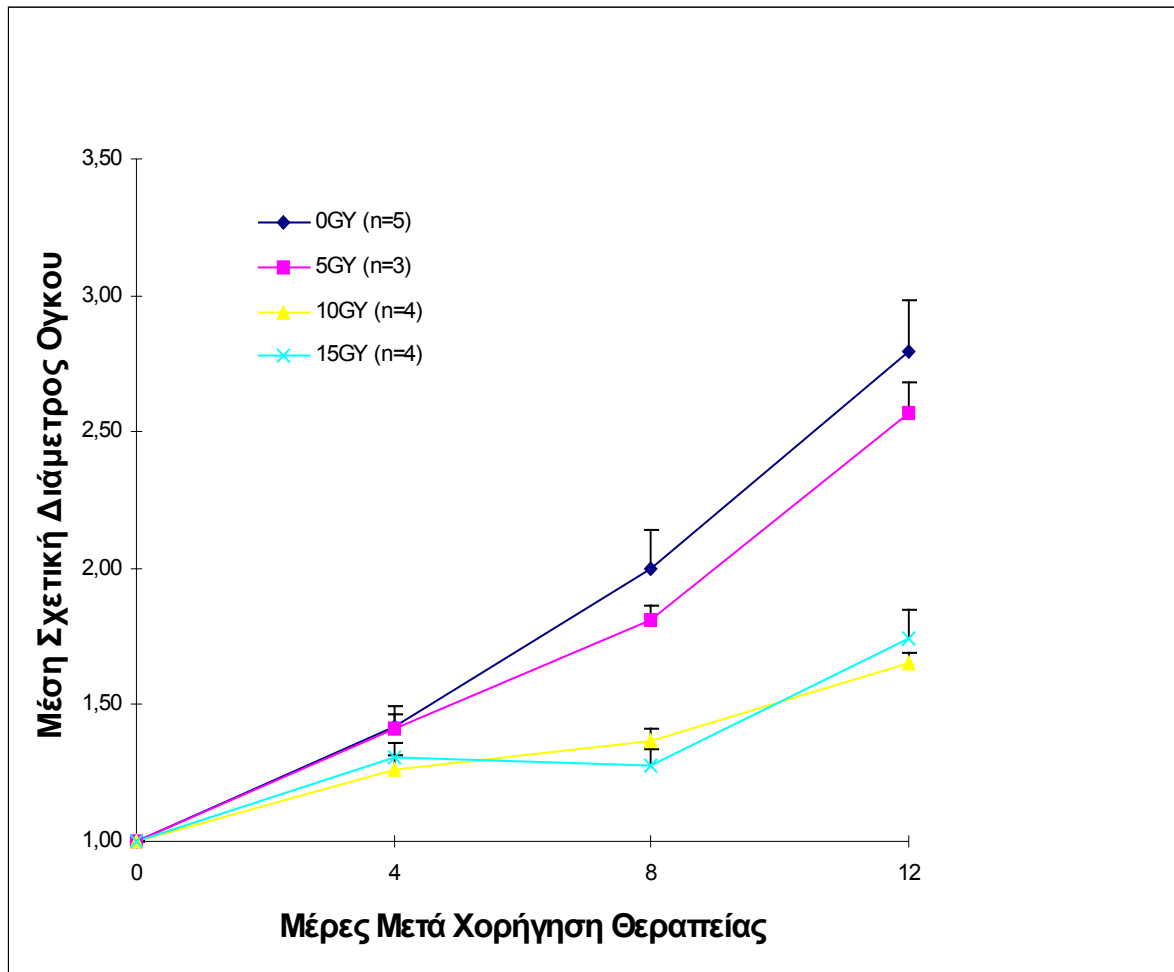
Διάγραμμα / Εικόνα 13.

Ιστολογική εξέταση μετά από χορήγηση υψηλών δόσεων AdV σε ανοσοποιηθέντα και μη πειραματόζωα. Α) πύλη φυσιολογικού ήπατος πειραματόζωου που δεν έχει λάβει γονιδιακή θεραπεία, Β) παρόμοια περιοχή από μη ανοσοποιηθέν πειραματόζωο. Έντονη φλεγμονώδης αντίδραση γύρω από την κεντρική φλέβα στη πύλη του ήπατος παρατηρείται σε ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα που έλαβαν δόση 2×10^{11} σωματίδια/όγκο (Γ) και 2×10^{11} σωματίδια/όγκο (Δ). Το διάγραμμα Ε απεικονίζει το βαθμό της παρατηρηθείσης τοξικότητας στην ιστολογική εξέταση στο ήπαρ, σπλήνα και πνεύμονα σε ανοσοποιηθέντα και μη πειραματόζωα. Το 0 αντικατοπτρίζει τη φυσιολογική ιστολογική εικόνα ενώ το 4 σοβαρή φλεγμονή με περιοχές νέκρωσης. Στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα ηπατικής τοξικότητας σημειώθηκε σε όλα τα προ-ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα ($p < 0.001$), με συνέπεια να παρουσιάσουν ιστολογικά στοιχεία φλεγμονής, λεμφοκυτταρικής διήθησης και νέκρωσης.

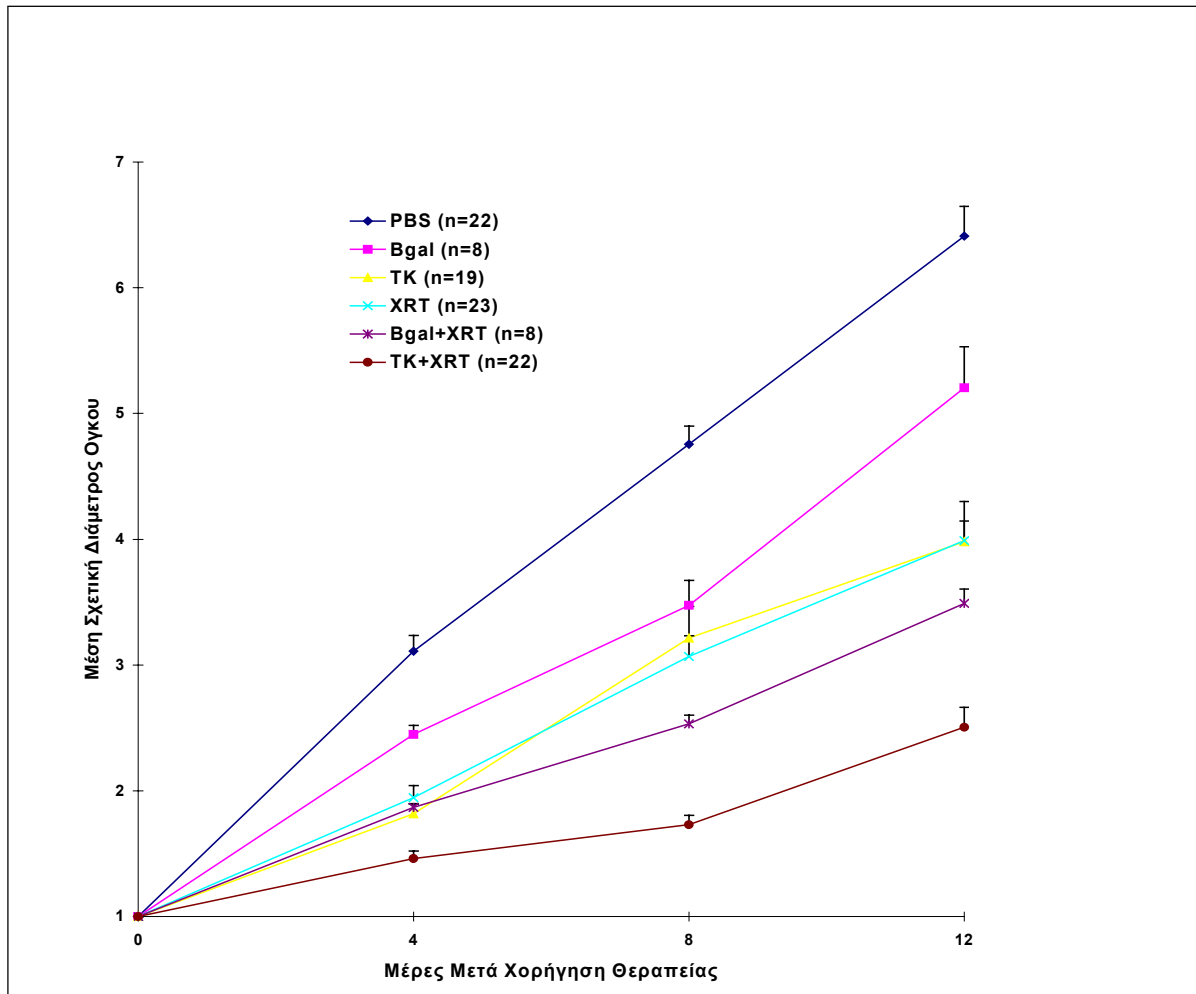
Διάγραμμα 1



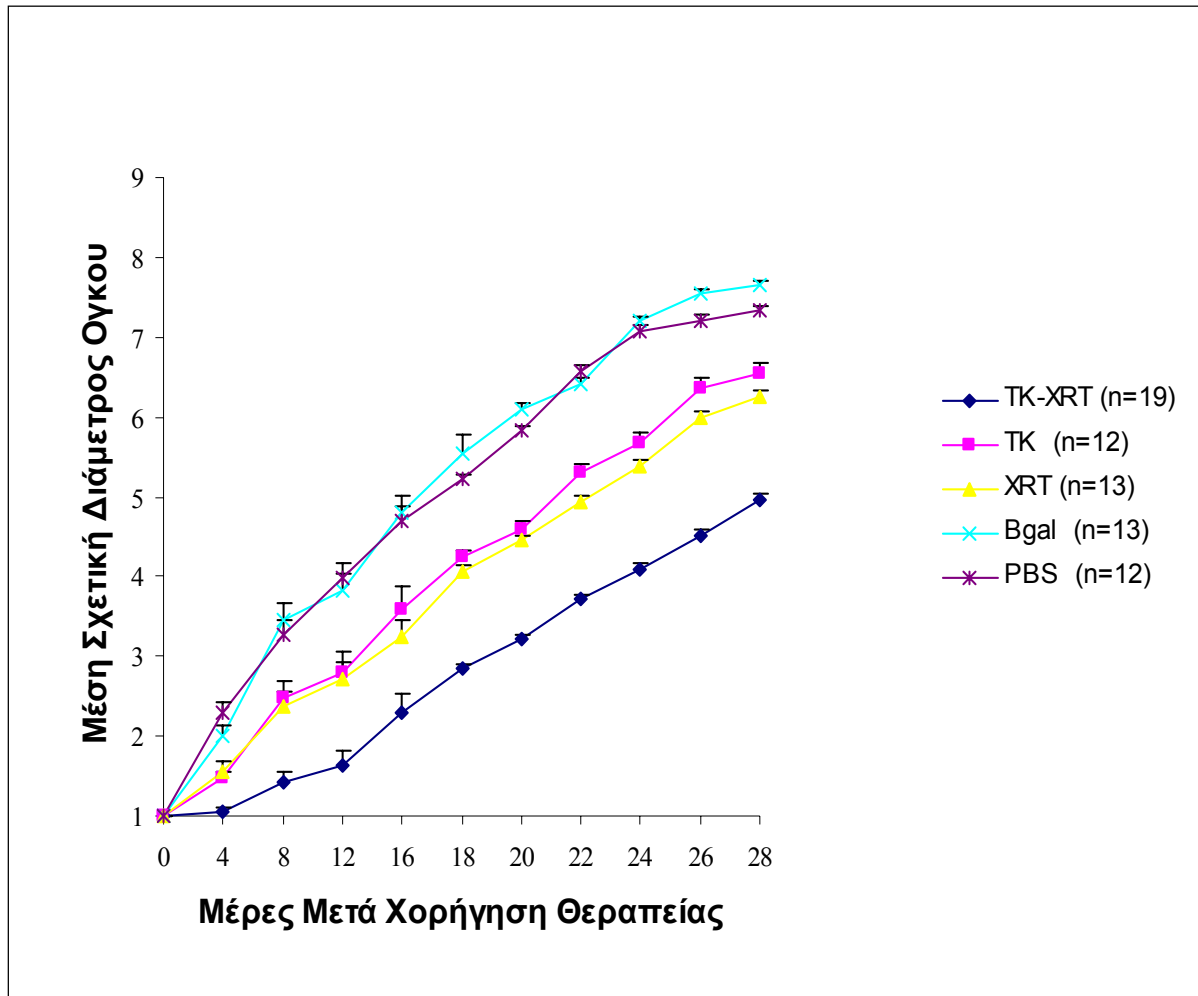
Διάγραμμα 2



Διάγραμμα 3Α

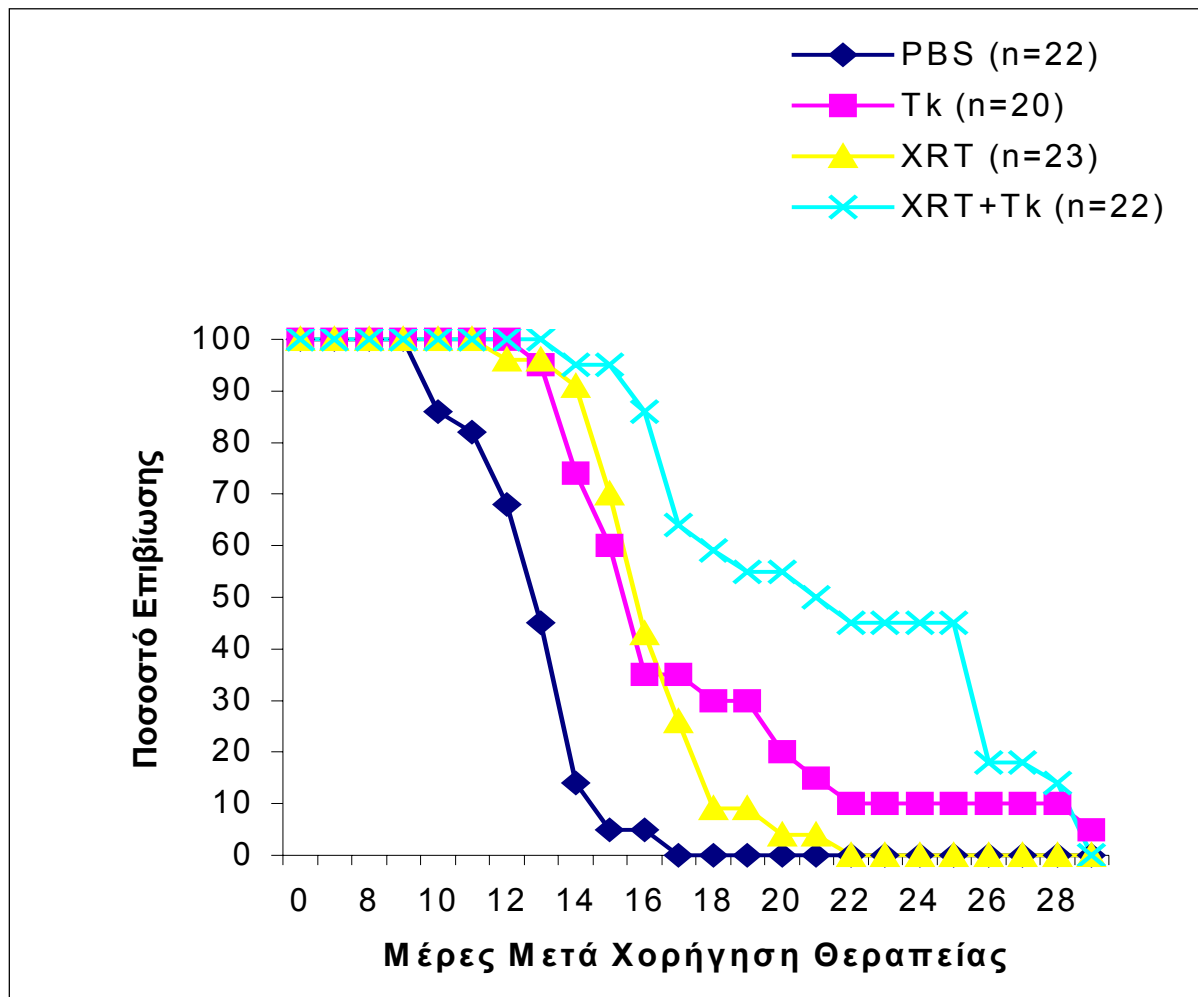


Διάγραμμα 3B

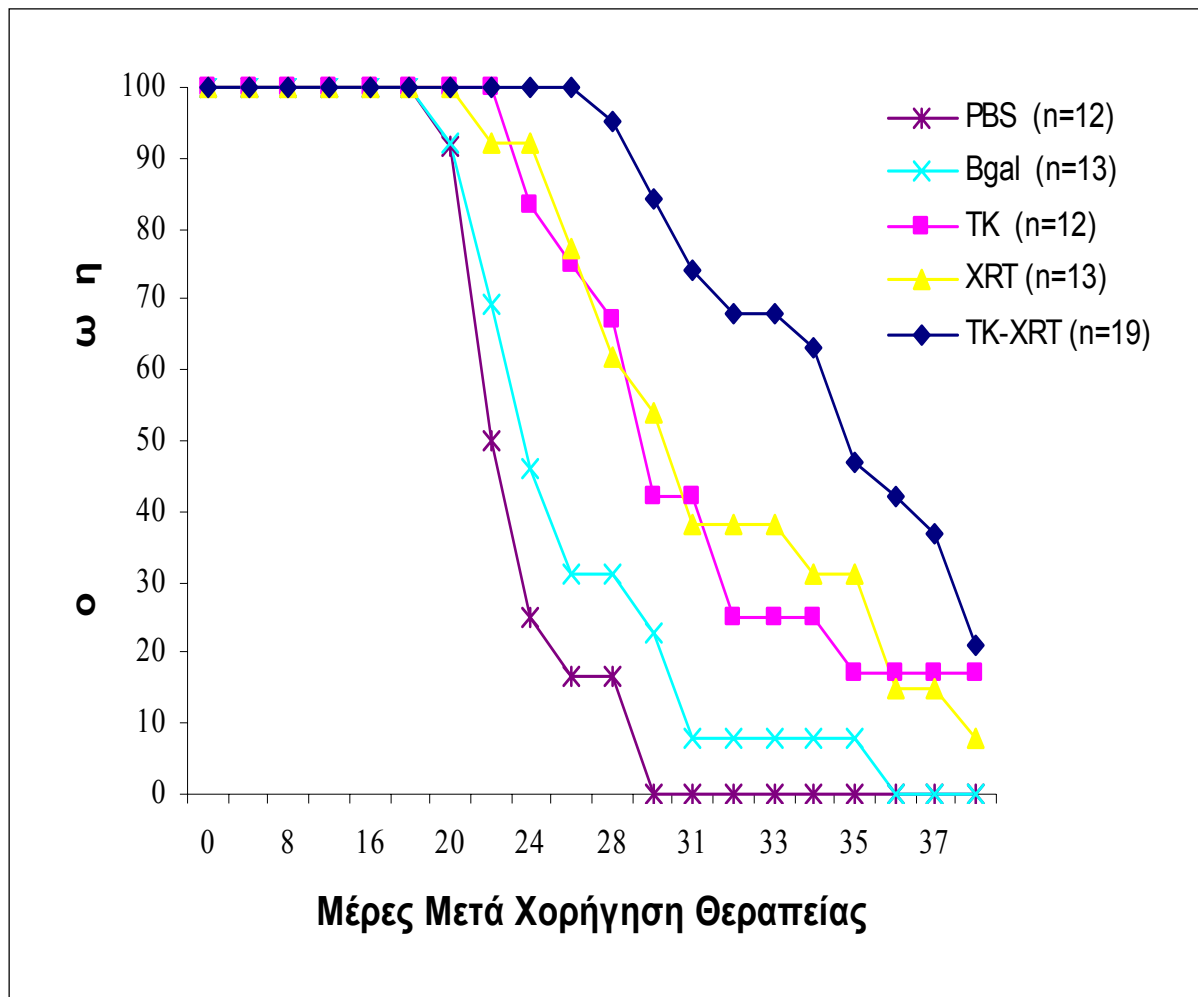


Διάγραμμα 3Γ**PBS****AdV-β-gal****AdV-tk****XRT****AdV-tk+XRT**

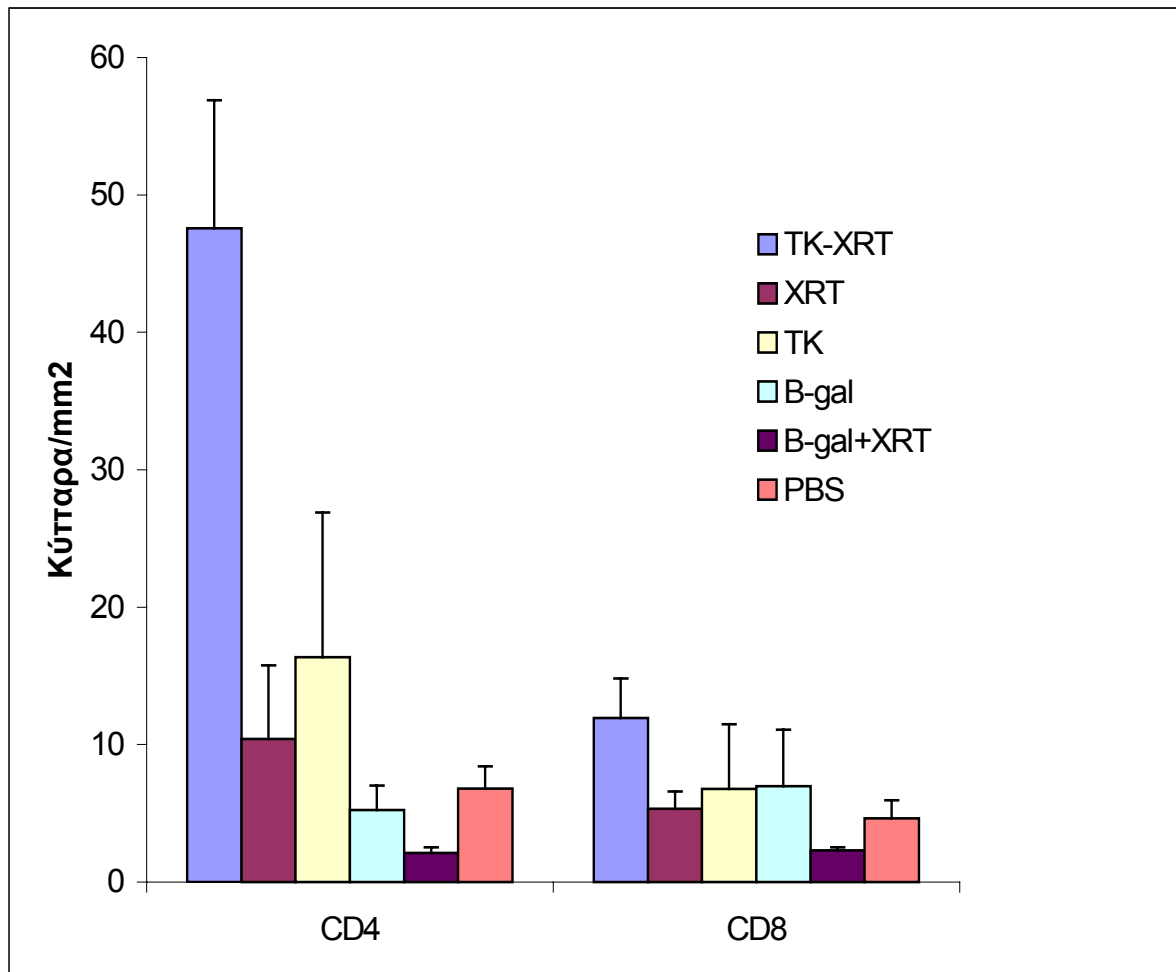
Διάγραμμα 4A



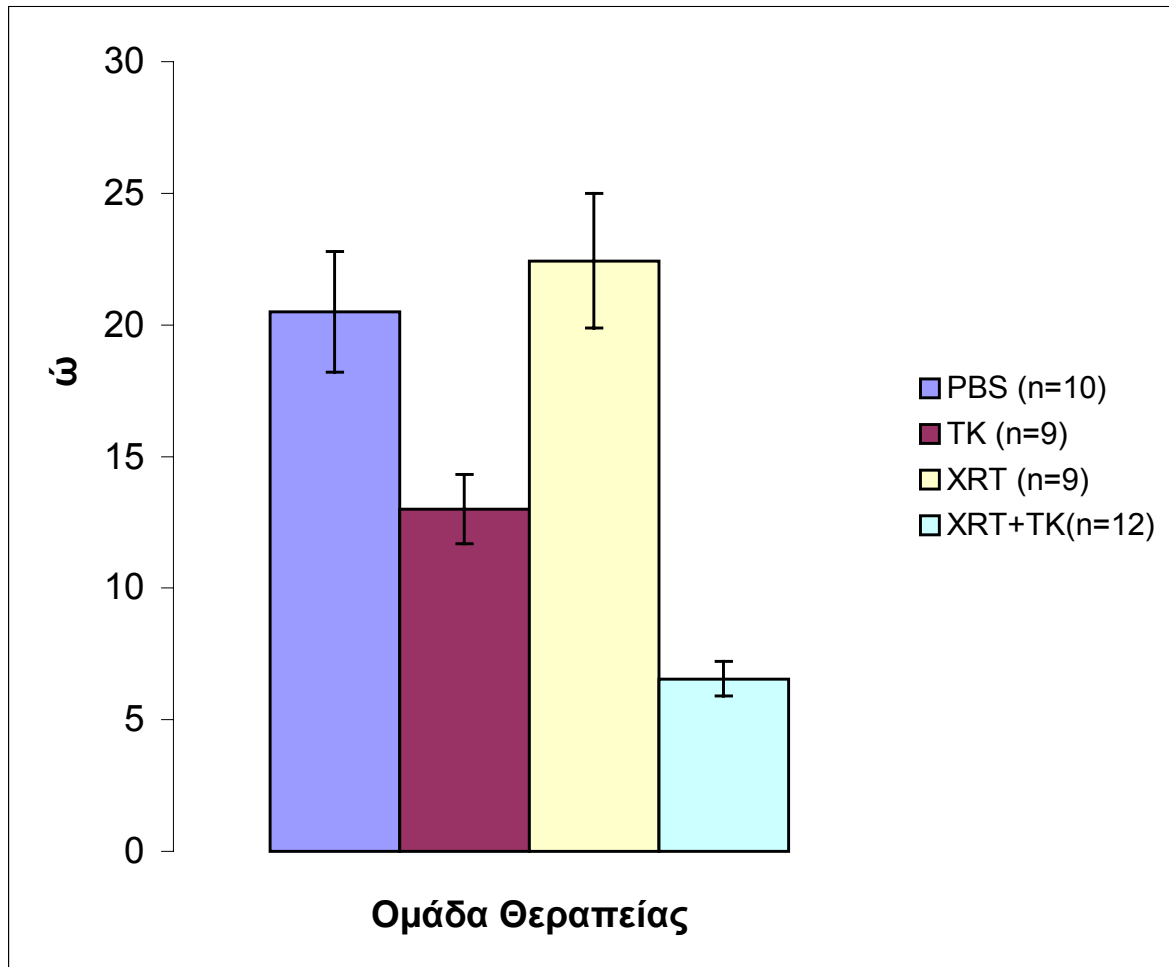
Διάγραμμα 4B



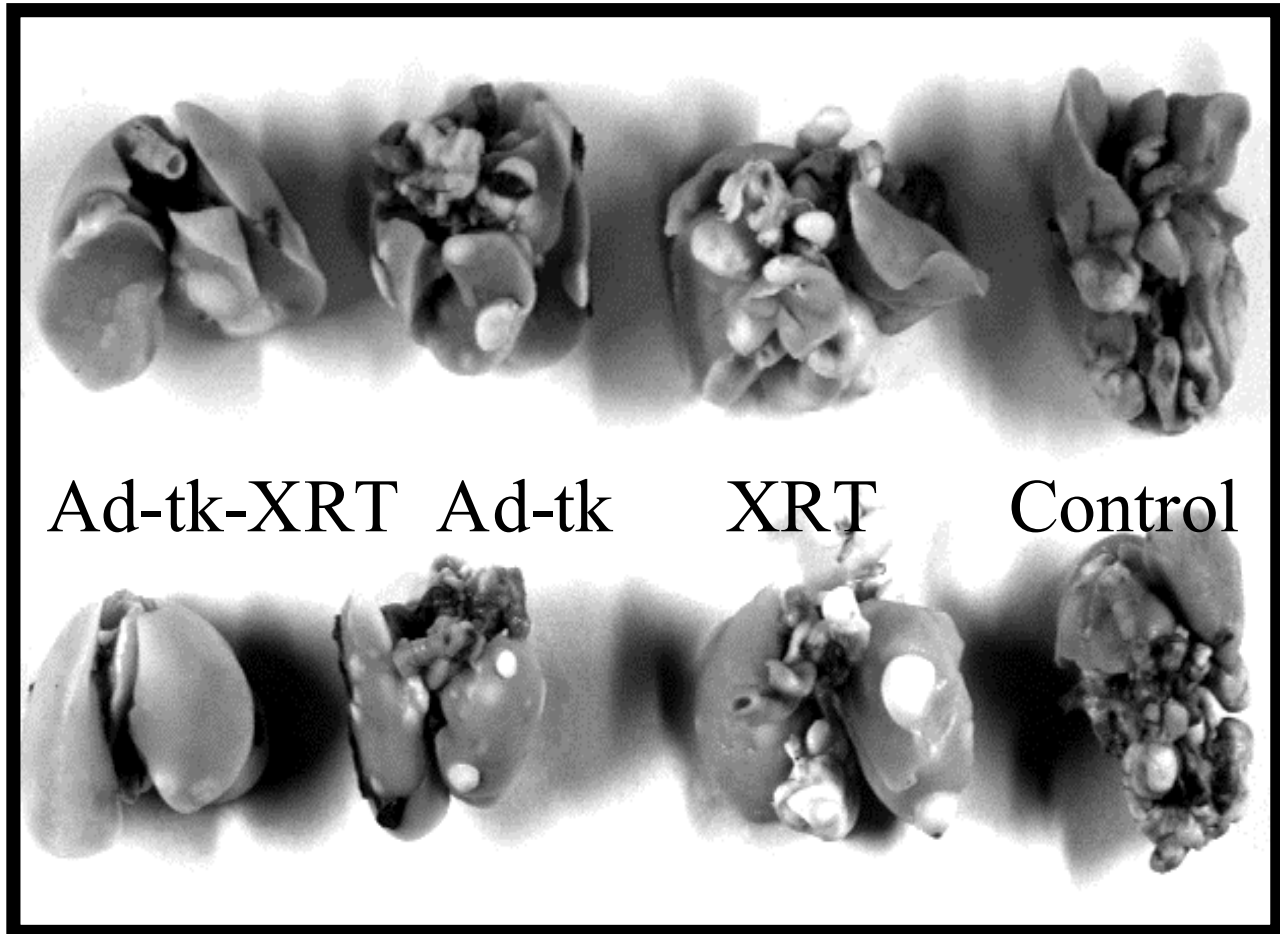
Διάγραμμα 5



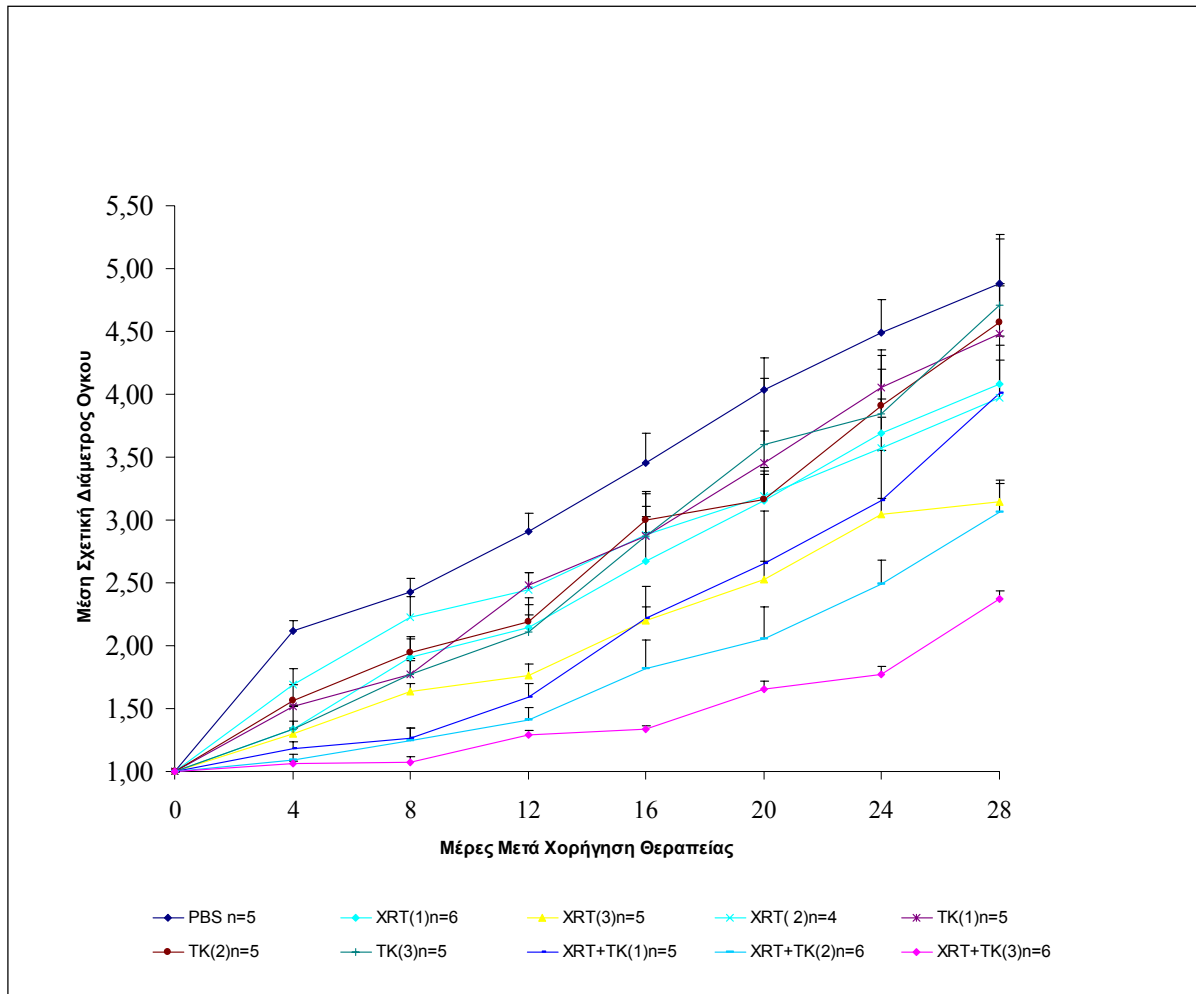
Διάγραμμα 6Α



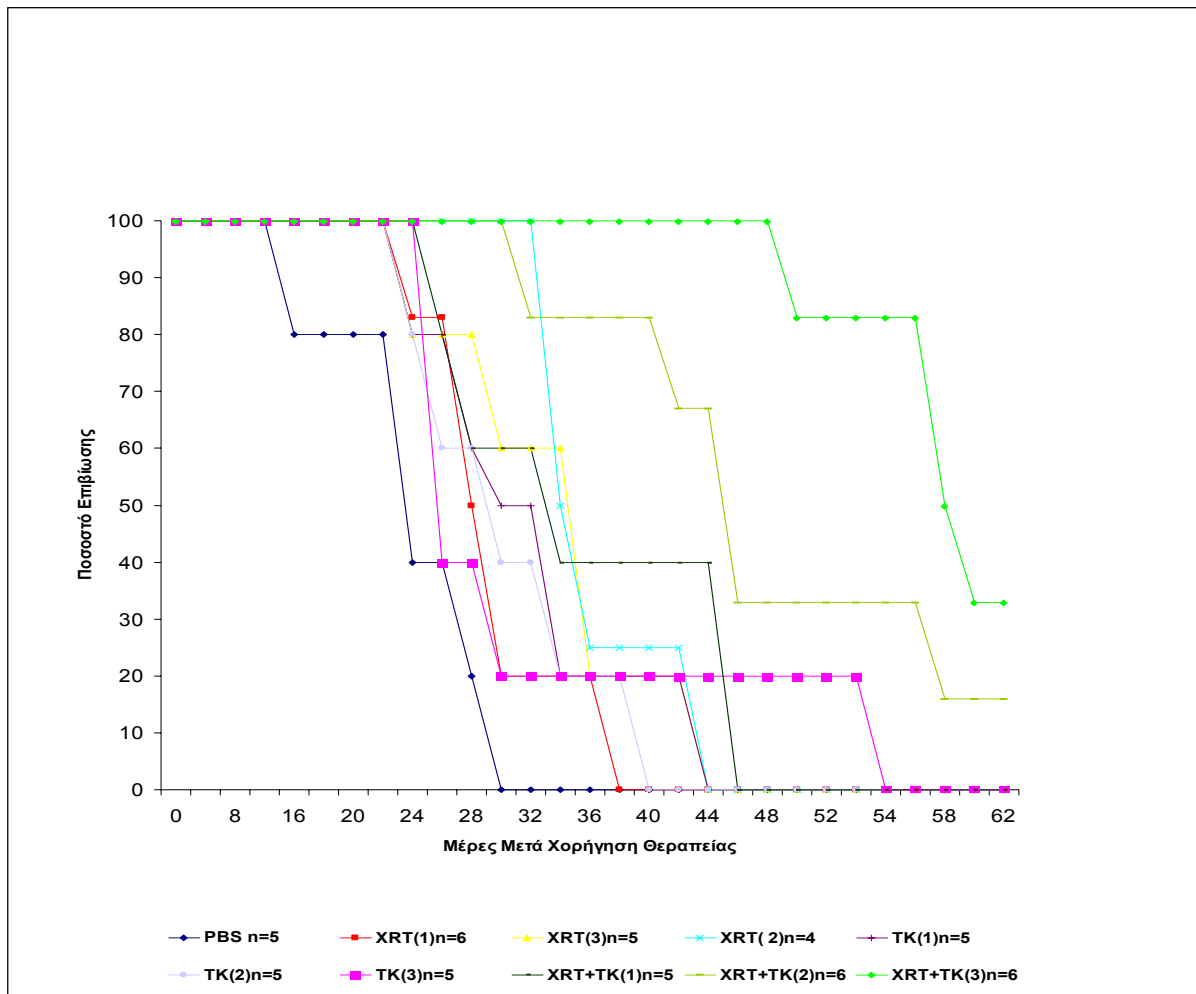
Διάγραμμα 6B



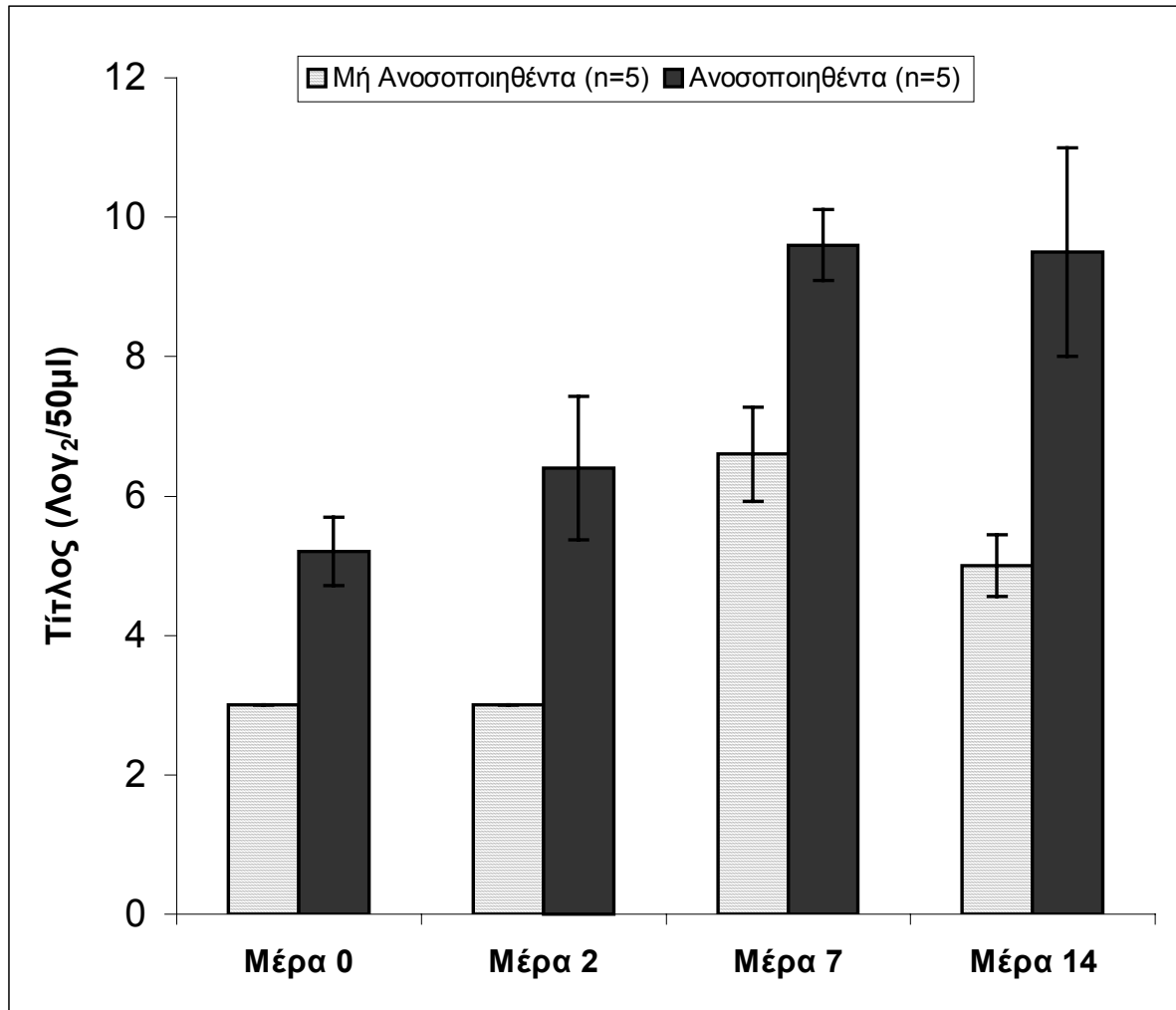
Διάγραμμα 7



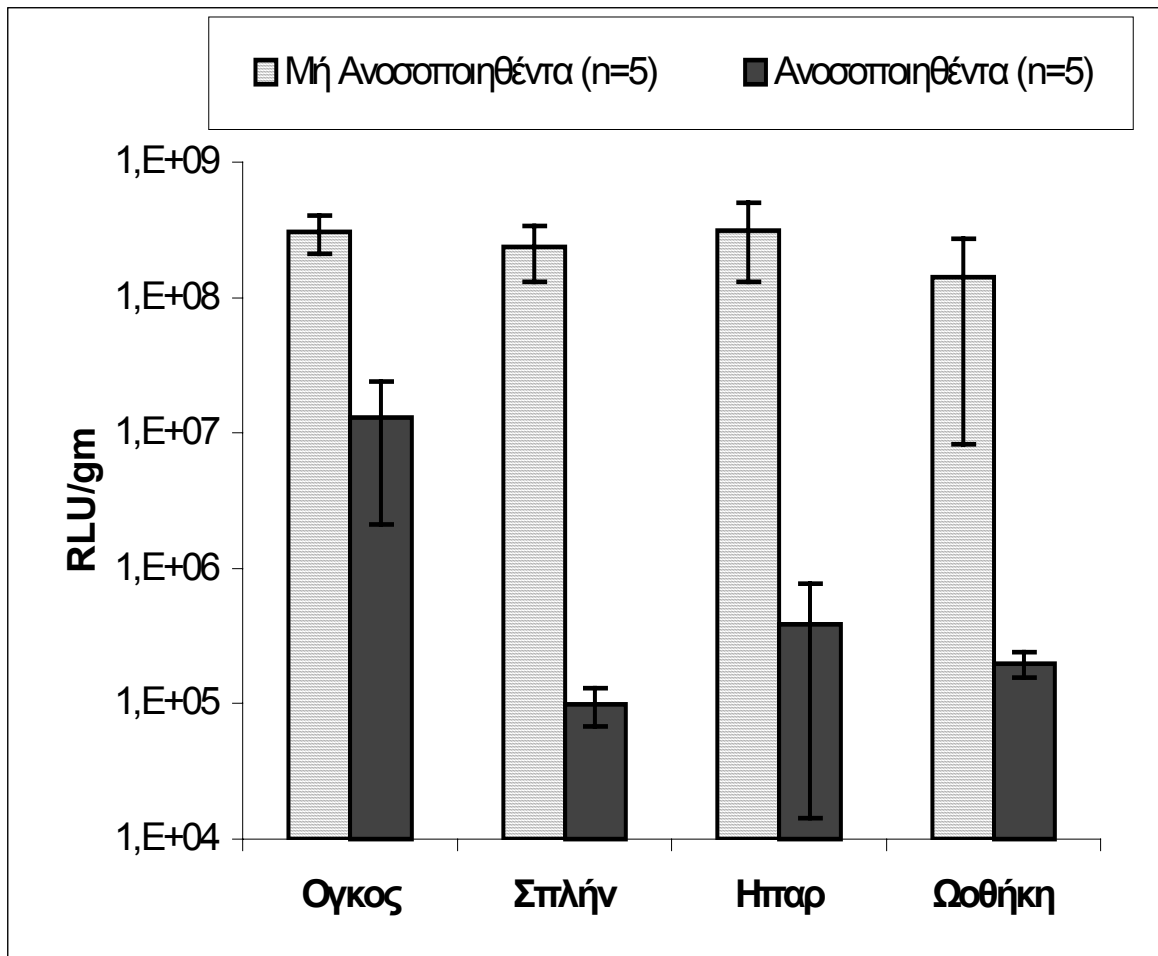
Διάγραμμα 8



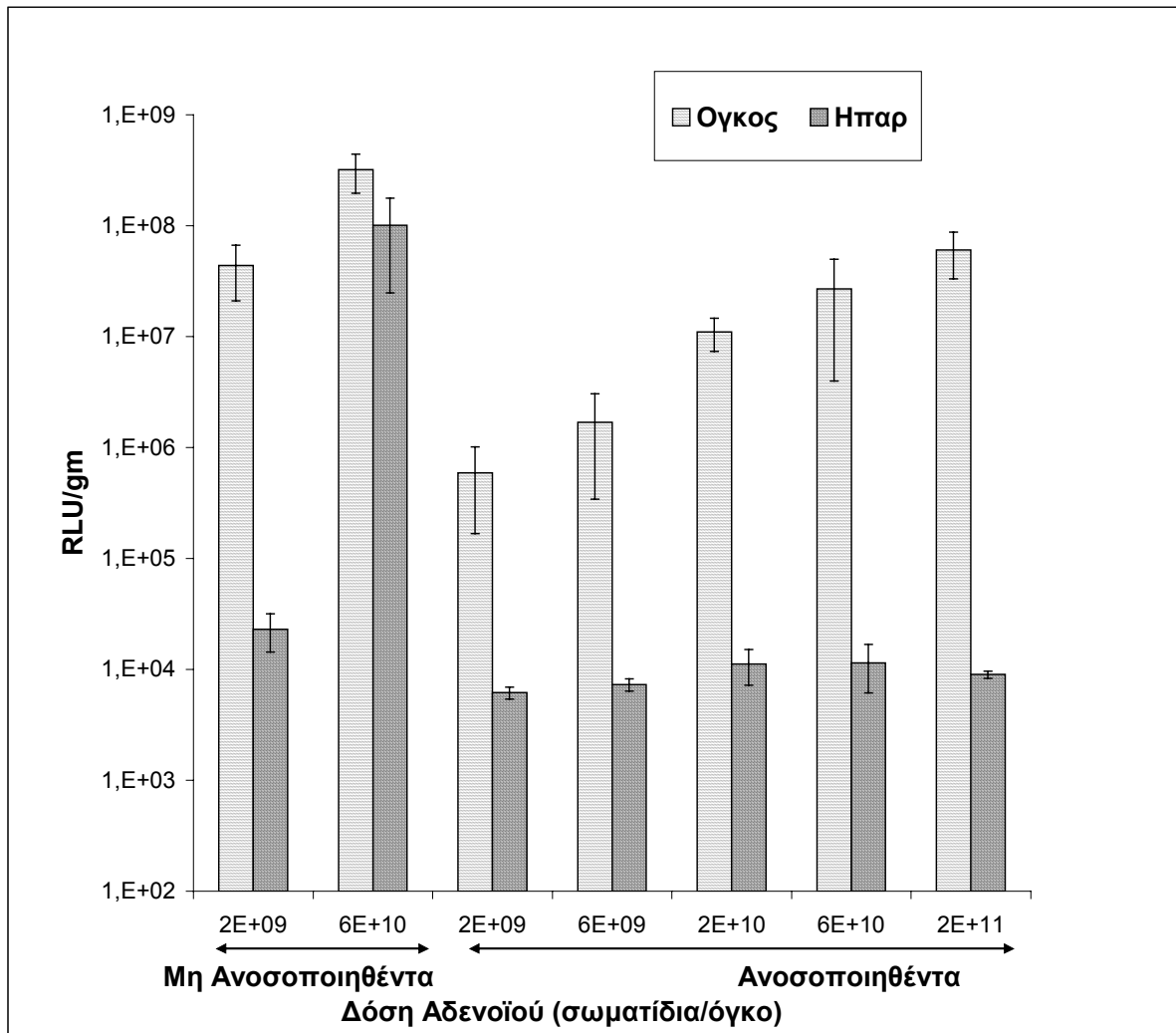
Διάγραμμα 9



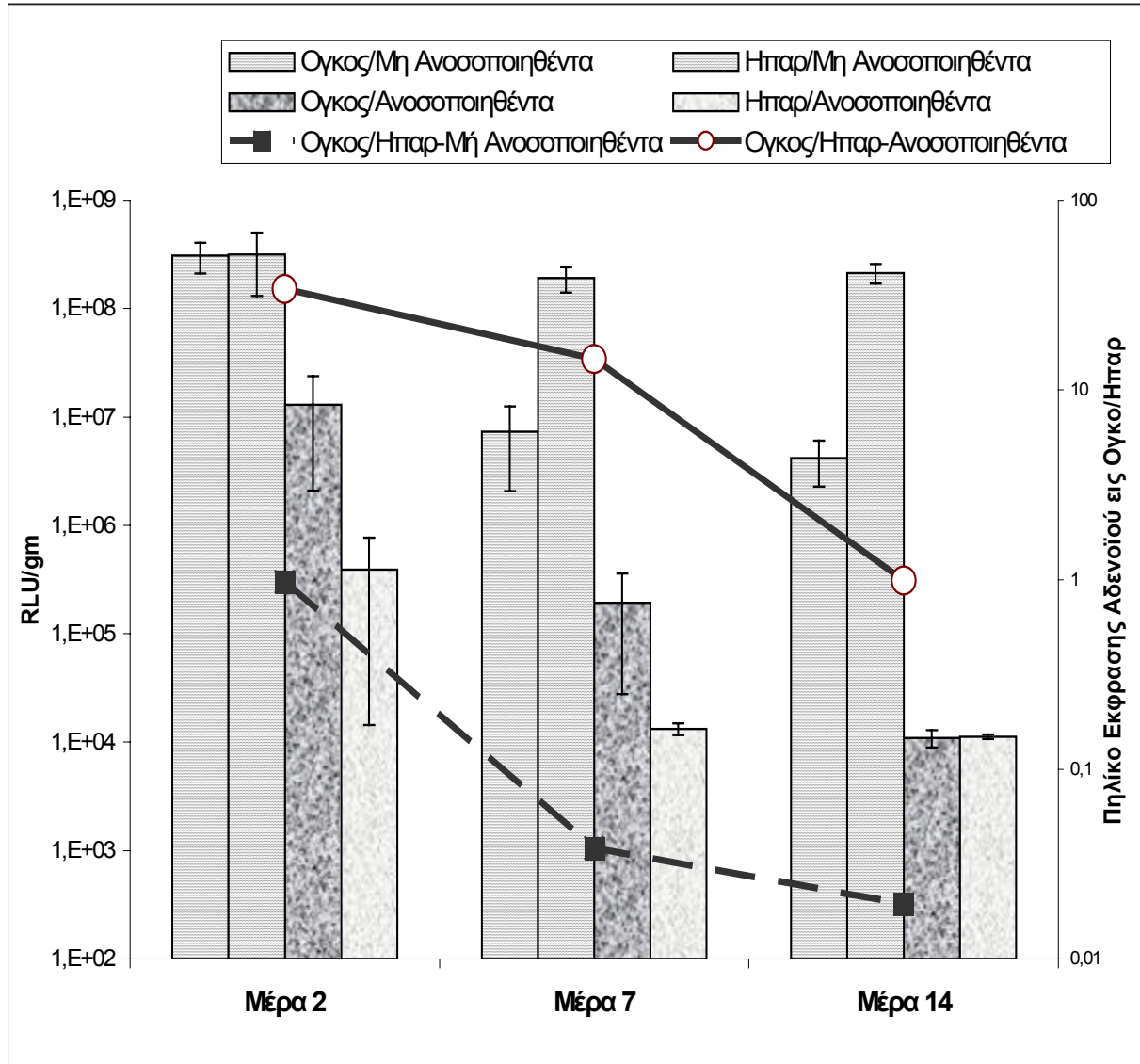
Διάγραμμα 10



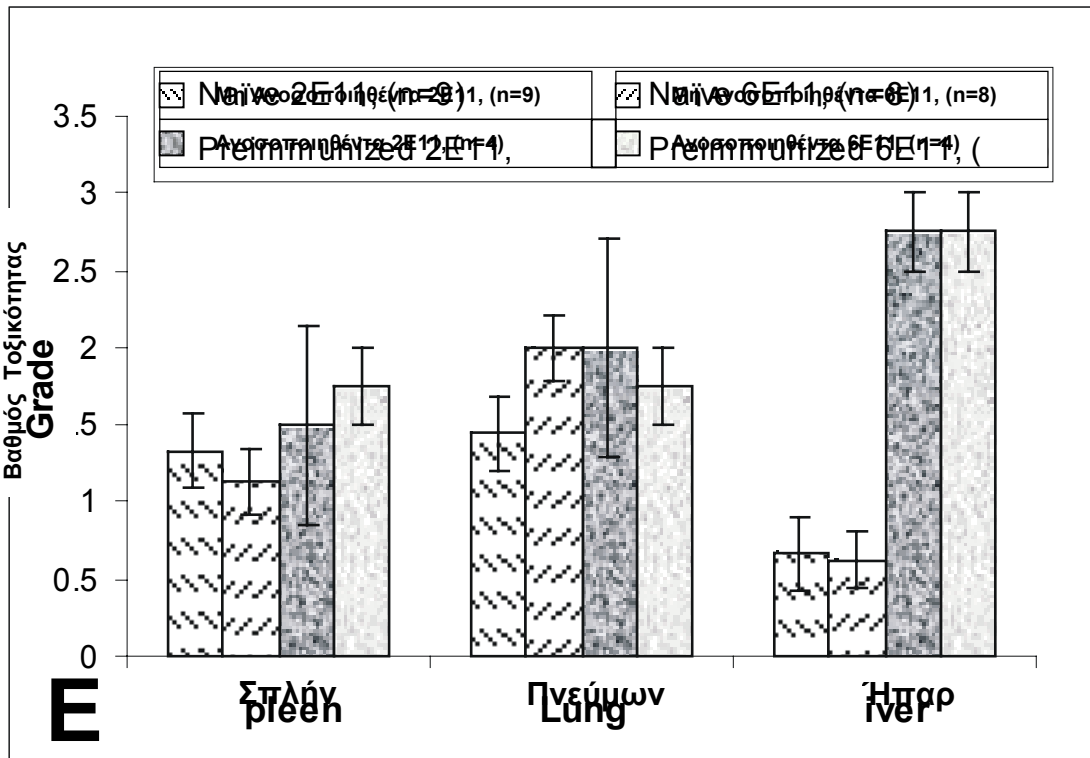
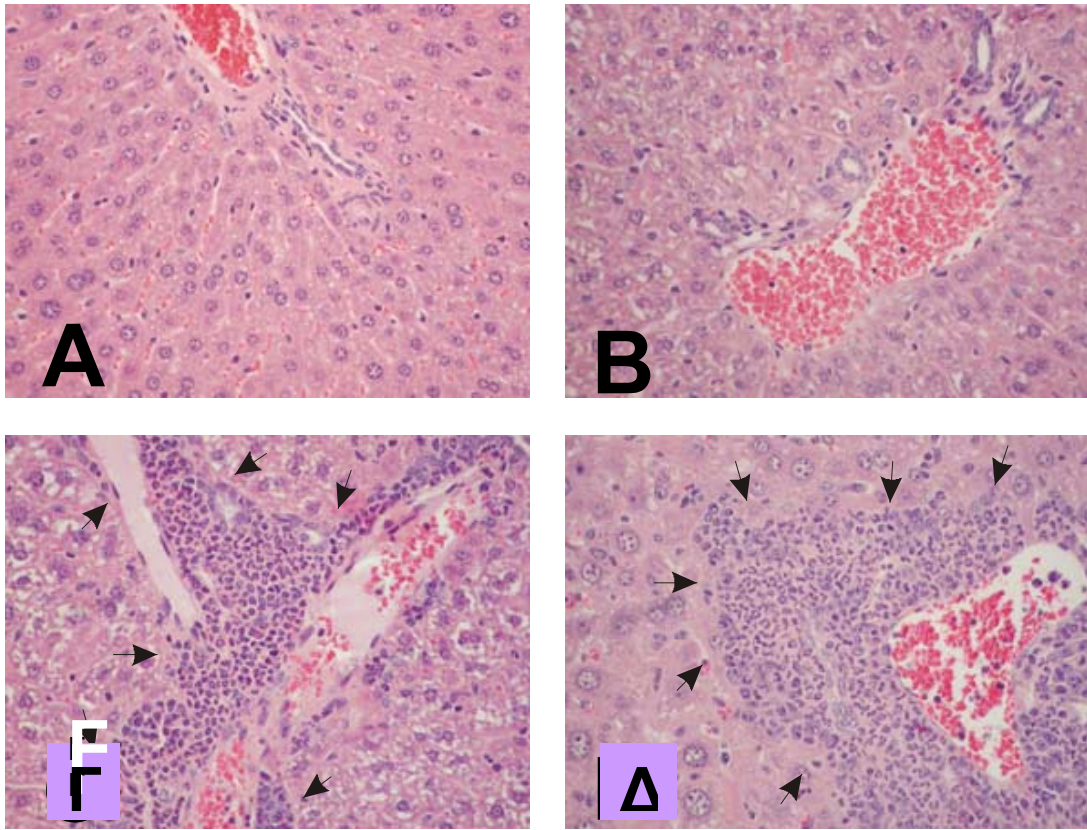
Διάγραμμα 11



Διάγραμμα 12



Διάγραμμα 13 (Α-Ε)



Πίνακας 1. Ηπατικά ένζυμα (διεθνείς μονάδες/λίτρο) μετά από την χορήγηση AdV-Luc τοπικά δι' ενέσεως εντός των όγκων σε ανοσοποιηθέντα και μη ανοσοποιηθέντα πειραματόζωα (μέσες τιμές με τη σταθερή απόκλιση).

Πειραματική Ομάδα	Δόση Αδενοϊού	Αλανινοτρανσφεράση (ALT)	Ασπαρτική Τρανσφεράση (AST)
Μη Ανοσοποιηθέντα *	κανένας	42.03+/-27.53	86.47+/-35.27
Μη Ανοσοποιηθέντα	2X10 ¹¹	50.78+/-58.28	211.00+/-53.57
Μη Ανοσοποιηθέντα	6X10 ¹¹	43.25+/-41.99	170.63+/-117.80
Ανοσοποιηθέντα	2X10 ¹¹	224.00+/-181.40	381.00+/-177.24
Ανοσοποιηθέντα	6X10 ¹¹	193.5+/-161.14	394.25+/-186.34

* Μέση τιμή ηπατικών ενζύμων προερχομένων από τρία διαφορετικά είδη ποντικών.