



Samenvatting van het proefschrift

Michael A. van Geer

"Adenovirus targeting for gene therapy of pancreatic cancer"

Promotiedatum: 8 februari 2011

Universiteit: Universiteit van Amsterdam

Promotor:

Prof. dr. R.P.J. Oude Elferink

Co-promotor:

Dr. P.J. Bosma

Patiënten met het pancreascarcinoom hebben een sombere prognose. Om het merendeel van de patiënten met pancreascarcinoom beter te kunnen behandelen worden nieuwe therapieën ontwikkeld zoals genterapie. Virotherapie is een agressieve vorm van genterapie waarin gebruik wordt gemaakt van virussen die selectief kankercellen kunnen doden. Een veel gebruikt virus is een Conditioneel Replicerend Adenovirus (CRAd) wat in preklinische modellen specifiek kan repliceren in kankercellen met een gemuteerd p53- of retinoblastoma tumor-suppressor-eiwit. Echter uit klinische studies blijkt dat tumorcellen, als gevolg van verlaagde expressie van de Adenovirus receptor CAR, relatief refractair zijn voor adenovirus infectie hetgeen efficiënte replicatie en verspreiding van vector door de tumor bemoeilijkt. Door de CRAd te retargeten naar andere receptoren, die hoog tot expressie komen op tumorcellen, kan transductie van de tumorcel verhoogd worden. Het doel van ons onderzoek is het ontwikkelen van een adenovirale vector die pancreastumor cellen kan infecteren via een voor deze tumor specifiek antigeen. Ten tweede wordt nagestreefd een nieuw model te ontwikkelen dat beter dan de tot nu toe gebruikte modellen de klinische effectiviteit van nieuwe recombinante adenovirale vectoren kan voorspellen. Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van een ex vivo systeem om de effectiviteit van recombinant adenovirale vectoren te testen op primaire humane pancreastumoren. Met behulp van een "tissue slicer" werd pancreastumor en normaal pancreasweefsel verwerkt tot dunne weefsel schijfjes. In dit model blijft de oorspronkelijke weefsel structuur van de tumoren behouden, inclusief aanwezige bloedvaten en extracellulaire matrix. Er werd aangetoond dat pancreasweefsel ex vivo gedurende 3 dagen in leven kon worden gehouden met behoud van viabiliteit en weefselstructuur. Het tissue slice systeem bleek een goede methode te zijn om met minimale

hoeveelheden vers pancreas(tumor)weefsel ex vivo transductie experimenten te kunnen uitvoeren.

Hoofdstuk 3 beschrijft de selectie van verschillende pancreastumor specifieke receptoren (EphA2, Thomsen Friedenreich antigeen, neurotensine receptor, VEGFR-II) met als doel adenovirale vectoren te ontwikkelen die via deze receptoren specifiek deze tumoren infecteren. Hiervoor werden door middel van genetische modificatie in de Adenofiber knob peptiden ingebouwd die specifiek binden aan de verschillende receptoren. Uiteindelijk werden zo verschillende vectoren gemaakt, respectievelijk Ad-YSA/SWL, Ad-p30, Ad-NT, Ad-K237, waarvan werd onderzocht of ze inderdaad pancreastumorcellen via de getargete receptor infecteerden. Ad-YSA bleek het meest veelbelovend. De ephrineA2 receptor kon met hoge affiniteit worden getarget met Ad-YSA. Experimenten met 12 pancreastumoren, gebruik makende van het ex-vivo tissue slice systeem, leerde dat inbouw van het YSA peptide de transductie van pancreastumoren verhoogde. Op basis van deze transductiestudies komen wij tot de conclusie dat de nieuwe recombinant virale vector Ad-YSA pancreascarcinoom kan infecteren via de EphA2 receptor.

In hoofdstuk 3 wordt het in vivo biodistributieprofiel van Ad-YSA en de potentie om in vivo pancreascarcinoom te targeten beschreven. Omdat Ad-YSA nog de natieve bindingsplaatsen heeft en dus ook in staat is te binden aan de natieve Adenovirus receptoren CAR en integrines, werd gekozen om deze natieve bindingsplaatsen te ablateren. In vitro infectie van pancreascarcinoom cellijnen door deze geablateerde en geretargete virale vector, Ad-/ΔF(FG)ΔP-YSA, verhoogde de transductie significant, vergeleken met de geablateerde controle vector. Vervolgens werd dit virus toegediend aan muizen met subcutaan groeiende humane pancreastumoren. Inbouw van het YSA peptide resulteerde niet in een verhoogde transductie van gezonde weefsels. Er trad geen verhoogde targeting op naar de subcutane pancreastumoren door Ad-/ΔF(FG)ΔP-YSA. Ook bleek dat het geablateerde virus in staat pancreastumoren in vivo te transduceren. Dit suggereert dat adenovirus pancreascarcinoom ook kan infecteren via een CAR en integrine onafhankelijke route, bijvoorbeeld via heparaansulfaat proteoglycanen of bloedfactoren. Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat Ad-YSA geen gezonde weefsels target maar dat voor een efficiënte tumor targeting additionele mutaties dienen te worden aangebracht in het adenovirus manteleiwit.

Hoofdstuk 4 beschrijft een alternatieve methode om pancreascarcinoom te targeten. Hiertoe werden fiber chimereën geproduceerd waarbij de fiber van het Adenovirus type 5 op de partikels vervangen werden door de fiber van andere Ad serotypen. Screening van de fibers van al deze serotypen in vitro leerde dat de fibers van serotype 16 en 50 de transductie van pancreastumorcellen verhogen. Ad-5/16 werd vervolgens getest in het ex vivo tissue slice systeem. Consistent met de in vitro experimenten werd verhoogde transductie waargenomen van pancreascarcinoom, terwijl de infectie van normaal pancreasweefsel en leverweefsel door Ad-5/16 minder efficiënt was. Analoog aan de ex vivo studies met Ad-YSA bleek de verhoging van

transductie efficiëntie door de fibers in de slices lager dan in pancreastumor cellijnen in vitro. Concluderend kan worden gesteld dat de Ad-5/16 chimeer een veelbelovende vector lijkt om pancreascarcinoom te specifiek te transduceren en normaal weefsel te ontzien. ◀