



## Terapötik Newcastle Disease Virus (NDV)'un İmmun Sistem ve İnsan Tumor Hücreleri ile Etkileşimi: Onkolitik Viroterapi

**Bahattin Taylan KOÇ**

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Işıklı-AYDIN

Geliş Tarihi / Received  
14.10.2016

Kabul Tarihi / Accepted  
28.12.2016

Yayın Tarihi / Published  
31.12.2016

**Özet:** Kanser gerek mortalite gerekse ortaya çıkma oranı açısından hiç şüphesiz çağımızın en tehlikeli hastalığıdır. Gelişen yeni teknolojiler ile erken tanı, yeni nesil kemoterapötikler ve ileri düzey radyoterapiler geliştirilmiş olsa da kanser hastalığına tam bir çözüm olamamışlardır. Bu durum biyoteknolojinin de gelişmesiyle birlikte kanserin tedavi ve korunma yöntemlerini laboratuvar bazlı geliştirmeye yönlendirmiştir. Laboratuvar bazlı bu tekniklerden en önemlisi virüsler aracılığıyla yapılan kanser tedavisi yani *Onkolitik Viroterapi*'dir. Kanser hücrelerine yüksek affinite gösteren doğadaki bu virüsler, laboratuvar şartlarında geliştirilerek daha etkin olması sağlanmıştır. Ancak insanlardaki immün sistemin oldukça karmaşık ve güçlü bir işleyişi olması virüslerin kanser hücresine tam olarak etki etmesini engellemektedir. Bu durum insan orijinli olmayan virüslere yönelmiştir ki bunlardan ön plana çıkan ise *Newcastle Disease Virus* (NDV) olmuştur. Özellikle insan orijinli olmayan hayvan virüslerinin insanlar üzerinde yan etki göstermemesi ya da çok düşük bir etki göstermesi onları ayrıca avantajlı hale getirmektedir. NDV kanatlıların oldukça patojen bir hastalığı olmasına karşın insanlarda antitümöral etkisi sayesinde birçok başarılı terapi sonucu elde edilmiştir. Bu derlemede NDV'un kanser hücreleri için terapötik etkisi ve immün sistemle ilişkisi incelenecek, ayrıca konu hakkında yapılan laboratuvar ve klinik çalışmalara değinilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Newcastle Disease Virus, Onkolitik Viroterapi, İmmun Sistem, Kanser

### Interaction of Therapeutic Newcastle Disease Virus (NDV) With Immune System and Human Cancer Cell: Oncolytic Virotherapy

**Abstract:** Cancer is undoubtedly the most dangerous diseases of present age in terms of both rates of its mortality and emergence. Although early diagnosis, a new generation chemotherapeutic and advanced radiotherapy have emerged through developing new technologies, a certain solution could not be discovered for the cancer. In this case has directed to develop laboratory-based methods of treatment and prevention within advances in biotechnology. The most important one of these laboratory-based techniques is cancer treatment via oncolytic viruses, in other words *Oncolytic Virotherapy*. These viruses in the environment showing a high affinity to cancer cells have been provided to be more effective by developed in the laboratory. However, in humans, possessing quite complex and powerful operation of the immune system has inhibited to completely affect to the virus. This circumstance has directed to viruses not originate from human, of which has been Newcastle Disease Virus (NDV). Especially non-human animal viruses have not led to adverse effects or let a much lower impact on humans have made them advantageous. Although NDV is highly pathogenic disease of avian species, several successful therapy results have been obtained by its antitumor effects in humans. This review will examine the relationship with the immune system and therapeutic effects of NDV on cancer cells, also laboratory and clinical studies about these issues will be discussed.

**Keywords:** Newcastle Disease Virus, Oncolytic Virotherapy, Immune System, Cancer

Sorumlu yazar: B. Taylan KOÇ

Adres: Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji ABD Aydın.

E-mail: [btcoc@adu.edu.tr](mailto:btcoc@adu.edu.tr)

## 1. GİRİŞ

*Newcastle Disease Virus* (NDV), *Paramyxoviridae* familyası içinde *Avulavirus* genusunda yer almaktadır. Dokuz serogruba sahip olan paramyxoviruslarda, serogrup bir (PMV-1) kanatlı hastalıkları bakımından en önemli viral ajanları içermektedir. NDV, bu serogrupta yer almaktadır. Virusun ismi, İngiltere'de Newcastle şehrine yakın olan Tyne kasabasında hastalığın ilk olarak kanatlı hayvanlar arasında görülmesi ve kısa zamanda tüm şehirde salgınlar halinde görülmesinden dolayı NDV olarak nitelendirilmiştir (1). Virus negatif polariteli, tek iplikçikli ve segmentsiz RNA genomu içermekte olup, zarflı bir virustur. Helikal simetrik nükleokapside sahip olan etkenin filtreleri geçebilme özelliği bulunmaktadır. Virus; hücre partikülü (virion), füzyon (F) olarak adlandırılan zarf glikoproteininden ve glikolize olmamış membran veya matris (M) proteinlerinden oluşmaktadır. Füzyon proteini moleküler ağırlığı (M.A) 66.000 olan bir prekürsör olarak sentez edilmiştir. Bununla beraber disülfid bağlarla bir arada tutulan F1 (M.A. 56.000) ve F2 (M.A. 10.000) komponentleri de bulunmaktadır. Füzyon proteini virusun hücreye penetrasyonu aşamasında hücre duvarını lize eder. Hemaglütinin (HA) ve Nöroaminidaz (NA) proteinlerine sahiptir ve bu proteinler multifonksiyoneldir. Virus 56 °C 'de ve UV ışınları altında hızlı bir şekilde inaktive olur (2). Virus için önemli olan altı tane polipeptid kodlanması, 6 farklı gen bölgesi tarafından yapılmaktadır.

1. Geniş (Large) protein (L,200 kDa)
2. Hemaglütinin - Nöroaminidaz protein (H-N, 74 kDa)
3. Füzyon protein (F, 67 kDa)
4. Matrix protein (M, 40 kDa)
5. Fosfoprotein (P, 53 kDa)
6. Nükleoprotein (NP, 55 kDa)

NDV ile hücre enfeksiyonu iki basamak halinde ele alınabilir. İlk basamak virusun H ve N molekülleri ile

hücreye bağlanmasını ve translasyonunu içerir. Bu olay F protein aktivasyonu ile devam eder. HN ve F moleküllerinin hücre yüzeyindeki bu uyumlu hareketi konakçı hücre membranının kolay geçilmesini sağlar. Bu membran-füzyon olayı viral genomun hücre sitoplazmasına girmesine izin verir. Sitoplazmada negatif polariteli RNA genomu mRNA içinde transkribe edilir ve viral protein translasyonu gerçekleşir. Buraya kadar birinci basamak olarak nitelendirilmektedir. Buradan sonraki kısımlar ise ikinci basamak olarak değerlendirilir. NP, P, L proteinleri nükleokapsid oluşumu için birleşmeleri gerekmektedir. M proteini ve HN-F molekülü translasyonel modifikasyondan sonra membrana taşınırlar ki böylece virus partiküllerinin toplanması buna müteakip tomurcuklanması söz konusu olur (3).

Günümüzde NDV halen kanatlı hayvanlar arasında görülen ve özellikle sektörde ciddi verim kayıplarına neden olabilen bir virustur. Ancak bu olumsuz özelliği yanı sıra bilim dünyasında diğer bir özelliği ile olumlu gelişmelere ön ayak olmuştur. *Onkolitik viroterapi* denilen virusla insanlarda kanser tedavisinde en çok araştırılan ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından alternatif terapiler içinde değerlendirilen bir virustur (4).

*Onkolitik viroterapi*, kanser hücrelerinde bölünme yoğunluğuna bağlı olarak virusların bu hücrelerdeki replikasyon artışı ve sonunda tümörün lize ya da regrese edilmesi işlemidir. *Onkolitik viroterapi* günümüzde birçok virus türü ile denenmekte ve dikkat çekici birçok sonuç alınmaktadır (4, 5, 6). Bunun en önemlisi Ekim 2015 FDA tarafından onay verilen Amgen firması tarafından üretilen *Talimogene laherparepvec* (T-VEC)'dir. T-VEC, Herpes Simpleks Virus'tan köken alan ancak birçok biyoteknolojik metot ile hücre üzerindeki olumsuz özelliği engellenmiş ve sadece tümör hücrelerini hedefleyen bir kanser aşısı haline getirilmiştir (7). FDA onayına karşın Herpes Simpleks Virusun en çok

insanlar üzerinde hastalık yapması bakımından yan etki ve mutasyon sonucu olumsuz sonuçlara neden olabilme ihtimali söz konusudur. Bu yüzden farklı virus türleri halen araştırılmaktadır. Kanatlılara özgü NDV'da bu araştırılan türlerin başını çekmektedir. Özellikle konakçı türünün farklı olması ve zoonoz olduğu daha önceki çalışmalarda belirtilmiş olsa da insanlarda basit soğuk algınlığı tarzı semptomlara neden olması, bunun yanında tümöral hücrelere yüksek affinite göstermesi onu daha çok ön plana çıkarmıştır. NDV antineoplastik özelliklerinden dolayı, farklı tedavi konseptlerinde yer almıştır.

Bunlar (3,8);

- I. Tümör Selektif Mekanizması ve Onkolitik Özellikleri
- II. Non-spesifik immün stimülasyon için kullanılması (Sitokinler ve İnterferon İndükleme)
- III. Sitotoksik T Lenfosit (CTL)'e bağlı immün sistemin indüklenmesi

#### **I. NDV'nun Tümör Selektif Mekanizması ve Onkolitik Özellikleri**

NDV'nun normal hücrelerde yaptığı enfeksiyonlar genellikle İnterlökin -12 (IL - 12) ile engellenmeye çalışılır (9, 10). Fakat tümör hücreleri üzerinde yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda ise, enfeksiyon oluşumundan 50 saat sonra bile viral partikül üretimi devam ettiği saptanmıştır (9-14).

NDV tümör selektivitesini arttıran hücre immün sistemi ve immün sistem komponentleridir. Özellikle non-tümörijenik olan insan periferik mononükleer kan hücrelerinde Protein Kinaz (PKR), MxA Dynamin-Like GTPase (antiviral etkili) gibi molekülleri stimüle edebilir (10). Fakat tümörijenik hücrelerde immün sistem bozulmasına bağlı olarak bu antiviral yanıtlar büyük oranda gelişmemektedir. Böylece viral proteinlerin tümör hücrelerinde yüksek replikasyon siklusu devam etmektedir (10). Antineoplastik tedavi için NDV'nun

litik ve non-litik olmak üzere iki suşu da kullanılabilir. Hem litik hem de non-litik suş, insan neoplastik hücrelerinde, normal hücrelere göre daha yoğun şekilde replike olurlar. Bu iki suş da potansiyel anti-kanser ajanı olarak incelenmiştir. Fakat bu iki suşun onkolitik özelliklerinde temel bir fark göze çarpmıştır; enfektif litik suşlar insan neoplastik hücrelerinde projeni virus partikülleri oluşturabilirken, non-litik suşlar oluşturamamaktadır (11). Bunun nedeni non-litik virusların sahip olduğu F proteininin inaktif projeni virus partikülleri meydana getirmesidir. Litik NDV suşları ise enfektif projeni virus partikülü meydana getirir ve viral enfeksiyonun ilk etabından sonra multisiklik replikasyon aracılığıyla tümör dokularında virus enfeksiyonunu yayılmasını indükler (12). Onkolitik NDV suşları, insan endodermal, ektodermal, mezodermal hücre kültürlerine sitotoksiktir ve bu hücre kültürlerindeki ölüm hem intrinsik hem de ekstrinsik faktörlerin NDV ile uyarılması sonucu meydana gelir (13). NDV enfeksiyonu ile mitokondrial membran potansiyeli düşmesi sonucu mitokondrial protein olan sitokrom C serbest kalır. Bu duruma ek olarak kaspaz-3 ve kaspaz-9 sisteminde erken aktivasyon sağlanır ve apoptoza bağlı olmadan tümör hücrelerinde sitotoksik etki görülür (14).

Daha baskın olan apoptoz yolunda ise TRAIL (tümör nekrozis faktöre bağlı ligand yolu ile apoptoz) sisteminde indüklenen tümör hücresi kaspaz-8 ve pro-kaspaz-3 ü uyararak apoptoza götürmektedir. Bu durum ise NDV'nun hücrelerde meydana getirdiği apoptoza göre geç bir olaydır (14). Yapılan bir çalışmada da, p53 'ün kontrol edilebilir ekspresyonu (rekombinasyon ile sağlanan) insan glioma hücre kültüründe sağlanmış ve p53 ekspresesi esnasında ya da p53 ekspresyonu biten hücreler arasında NDV sensitivitesinde herhangi bir farklılık meydana gelmediği tespit edilmiştir (13).

Bu durum göstermektedir ki NDV p53'e bağlı olmadan apoptoz mekanizmasını indükleyebilmektedir (15-17). Onkolitik NDV suşu olan *MTH-68/H* (Newcastle disease virusun canlı attenüe aşı suşularında birisidir) test edilen tüm NDV suşları içinde en güçlü IFN -  $\alpha$  yanıtını sağlayan suştur. Kolon karsinomalı farelere uygulanan locoregional *MTH-68/H* tümör regresyonu sağlamış ve yaşam süresini uzatmıştır (18).

## **II.Non-spesifik immün stimülasyon için kullanılması (Sitokinler ve İnterferon İndükleme)**

NDV ile enfeksiyon meydana gelen normal hücrelerde, konakçı immün sistemi doğal bağışıklığı hızlı bir şekilde Tip I interferon üreterek devreye sokar (IFN -  $\alpha/\beta$ ). Bu interferon sistemi ile virus replikasyonu inhibe edilir. Antiviral yanıt mekanizmasını uyaran ise, Toll-like reseptörleri (TLRs) ve RIG-I-like reseptörleri (RLRs) tarafından tanınan ve viral bir ürün olan çift iplikçik RNA (dsRNA)'dır. TLRs ailesi, hücre yüzey membranında ve endozomlarda ekspresyon meydana getiren 10'dan fazla üyeye sahiptir. RLRs ise sitoplazmik RNA helikazların ailesidir ve RIG-I (Retinoic acid-inducible gene 1) ve MDA-5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5)'i kapsamaktadır (19,20).

Sitoplazmada NDV replikasyonu sırasında duyarlı hale gelen dsRNA molekülleri hücrede TLR-3 ve RIG-I/MDA-5 reseptörleri tarafından tanınmaktadır. RIG-I ve MDA yetersiz ifade olduğu farelerdeki çalışmalarda (20-23), RNA virusu ile meydana gelen enfeksiyondan sonra bu farelerden izole edilen konvansiyonel dendritik hücreler (cDCs), makrofajlar ve fibroblastlar, mekanizması bozulan Tip I IFN indükler fakat normal IFN üretimi plazmosit dendritik hücrelerde (pDCs) halen gözlenmektedir. DCs bu sayede daha yüksek miktarlarda IFN- $\alpha$  üretebilmektedir. Bu yüzden TLR sistem, antiviral yanıtta cDCs, makrofajların ve

fibroblastların indüklenmesinden çok pDCs'nin indüklemesine ihtiyaç duymaktadır, RLRs ise NDV'ü algılamada kritik bir reseptördür (24). Virus enfeksiyonu sonucu ölmüş hücrelerin apoptotik cisimciklerindeki dsRNA'lar, TLR-3 tarafından yüksek ekspresyon kapasitesine sahip olan CD8 $\alpha$  dendritik hücreleri tarafından tanınmaktadır (25). Bu olay, virus enfekte hücreler için T hücrelerinin çapraz etkileşimini indükler. DCs (hem cDCs hem de pDCs tarafından)'in ve monositlerin aktivasyonu, periferel kandaki mononükleer hücreler tarafından IFN- $\alpha$ 'nın yüksek yoğunlukta salınmasına neden olmaktadır (12).

NDV'una karşı IFN- $\alpha$  salgılanmasını antiviral bazlı bir indüklemektedir. Bu özellikten yola çıkarak NDV enfeksiyonlarına karşı aşılama da en önemli adjuvant olarak IFN- $\alpha$  önerilmektedir (26). Eğer dışarıdan adjuvant konulmazsa, Tip I IFN tek başına adjuvant olarak kullanıldığında çoğu canlı virusa karşı güçlü bir immün yanıt oluşturduğu saptanmıştır. IFN- $\alpha$  doğal öldürücü hücrelerde (NK), TRAIL faktörünü de indüklediği gözlemlenmiştir. İlginç olarak, burada IFN sinyal yolağı (pathway) ve TRAIL arasında bir bağlantı olduğu düşünölmektedir. Bu durum şöyle açıklanmıştır; NDV TRAIL faktörünü monositlerde ekspresyonunu regüle eder ve böylece tümörisidal aktiviteleri ile bir bağlantı oluşturmaktadır (22).

NDV DCs için tehlike sinyallerini indüler ve stimüle eder. Buna bağlı olarak, DCs antijen sunan immün stimulatör fonksiyonunu geliştirilmiş olur. Bu durum tek bir mekanizma olarak açıklanmıştır. NDV enfeksiyonu sonucu nekroze olan hücrelerin, hücre komponentleri salınır ve bu da diğer hücrelerde tehlike olarak algılanmaktadır. Bu model eğer kendi konakçı hücrelerinde regüle olmuş tehlike sinyalleri mevcutsa non-litik viruslarla beraber tehlike modeli ile ilgili olabilir (27). Bu nedenle, NDV enfeksiyon yerinde immunolojik tehlike sinyallerini indüklediğinden dolayı aşı vektörü kullanılma

potansiyelini arttırmıştır. Aksi ise, memeli immun sistemine adapte olan diğer viruslar viral olarak immunite inhibitörlerini (TAP inhibitörleri, sitokin tuzağı, miRNAlar ve viral proteinler gibi) kodlayabilmektedir; böylece Tip I IFN indüksiyon sistemi antagonize edilebilmektedir (28).

IFN- $\alpha/\beta$ , CTL (sitotoksik T lenfosit) lerin jenerasyonunda da oldukça önemli bir rolü bulunmaktadır. CTL aktivitesinin jenerasyonu Esb-NDV (Embrionic stem B cells-Newcastle Disease)'nin stimülatör hücre olarak bulunduğu karışık lenfosit tümörü hücre kültürü (MLTC) kullanılarak, Tip I IFN antisera ile spesifik olarak bloke olabilmektedir. Benzer etki CTL'nin in vivo denemesinde de görülmüştür. IFN- $\alpha/\beta$  sadece CTL aktivitesini arttırmaz fakat CTL aktivasyonu içinde esansiyellik teşkil etmektedir (29). Bütün bu maddelere bakıldığında NDV çok güçlü bir immunstimülatör olduğunu göstermektedir. Bu sebepten, antitumoral immun yanıtın gelişmesinde güçlü bir role sahiptir (27,29).

### III.Sitotoksik T Lenfosit (CTL)'e bağlı immun sistemin indüklenmesi

NDV aynı zamanda T lenfositler üzerine etkiye de sahiptir. Düşük yoğunlukta NDV ile murine Esb (Embrionic stem B cells) tümör hücrelerinin enfeksiyonu in vivo sensitizasyon ve in vitro restimülyasyondan sonra tumor spesifik CTL'in sitolitik aktivitesinde bir artışa yol açması için yeterlidir. Dalak başına düşen Esb spesifik CTL sayısı 3300'den 9100'e çıkmış olabilmektedir ki bu değer limitli dilusyon analizi tarafından test edilerek tespit edilmiştir. In split tip denemelerde, klonal seviyede, viral modifikasyonun Esb spesifik CTL'in spesifitesini değiştirmediği gösterilmiştir. Bu nedenle, tümör hücrelerinin NDV modifikasyonu TAA spesifik CTL'nin selektif güçlenmesine neden olmuştur. Bir çalışmada, NDV'nin düşük dozu tarafından tümör hücrelerinin modifikasyonu CD4+ ve CD8+ immun T hücrelerinin iş birliği sonucu

tümör spesifik T hücre yanıtın artmasına neden olmuştur. Esb-NDV-immun CD4+ yardımcı T hücreleri, antijen stimülyasyonundan sonra Esb immun hücrelere tekabül edene göre daha fazla IL-2 üretirler (29).

İnsan melanoma hücrelerinin NDV enfeksiyonu, T hücre co-stimülatör fonksiyonuna aracılık ettiği ve enerjii engellediği bildirilmiştir (30). NDV viral onkolizatları malignant melonama tedavisi için yaygın olarak kullanılmıştır. Melanoma hücreleri ve tümör infiltre CD4+ T lenfositleri, yeni rezekte edilmiş tümörlerden hazırlanmıştır. Bir yardımcı T hücresi klonu, otolog tümör hücreleri ile stimülyasyona yanıtızsızdır ve IL-2 tarafından sonradan yapılan stimülyasyona rağmen cevapsız kalmaya devam etmiştir. Melanoma hücrelerinin NDV enfeksiyonu, yardımcı T hücrelerinin proliferatif yanıtını tamamen restore etmemektedir fakat aynı zamanda enerji indüksiyonuna karşı korumaktadır (30).

NDV'nun tümör hücrelerine yerleşmesinin pozitif etkisi ile antitümör immun yanıtı güçlenmesinin diğer bir açıklaması ise, NDV'nun neden olduğu insan tümör hücresi enfeksiyonunun, HLA moleküllerinin regülyasyonuna yol açtığı gerçeği ile desteklenmektedir (31). Canlı fakat inaktive olmayan NDV ile tümör hücresi enfekte edilmesi sonucu, enfekte olan tüm hücrelerde RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) ve interferon- $\gamma$ -indüklenebilir protein-10 (IP-10)'u tetiklemektedir (31). Bu kemokinler kemotaksisi arttırmakta ve aşının uygulandığı yerde monosit ve T-hücrelerini düzenlemektedir. Canlı NDV *Ulyster* suşu ile oluşan tümör hücre enfeksiyonundan 72 saat sonra, çoğu tümör hücresi lize olmuş ya da erken veya geç apoptoz aşamasına girmiştir (31). Apoptoz genellikle non-inflamatuar hücre ölümleri ile karakterizedir. Bu tümör hücresini öldüren virus enfeksiyonunun özelliğine baktığımızda, virusa

bağlı gelişen inflamatuvar yanıt olsa da apoptozis gelişebilmektedir.

### **İnsanlarda NDV ile Yapılan Onkolitik Viroterapi Uygulaması ve Güvenilirliği**

Aslında NDV 'nun insanlarda güvenilirliği oldukça yüksektir. Çünkü bu hastalığın çıktığı çiftliklerde çalışan çiftçiler ve işçiler vahşi tip (wild-type) NDV ile enfekte olmalarına rağmen çok minimal bir hastalık göstermişlerdir (15).

İnsan neoplazilerinin tedavileri için geliştirilmiş olan ve en çok kullanılan NDV suşları şunlardır; *MTH-68/H*, *PV-701*, *73-T* ve *Ulyster* 'dir. Bunların içinde sadece *Ulyster* non-litik diğerleri ise litiktir. NDV'nun ilk antineoplastik etki gösterdiğine dair yapılan ilk yayından bugüne kadar, NDV intratümöral, sistemik ve nasal uygulanarak test edilmiştir. NDV *73-T* suşu servikal kanserli hastalara intratumoral  $2.4 \times 10^{12}$  enfeksiyöz ünite dozda enjekte edilmiştir (32). Sistemik uygulama için ise, farklı virus suşundan farklı bir grup geliştirilmiştir: *PV701* (Wellstat Biologicals, Gaithersburg, MD, USA) (12), *HUJ* (Theravir, Jerusalem, Israel) (33) ve *MTH-68/H* (34).

NDV *PV701* suşu ilerlemiş solid tümörlü hastaların tedavisinde  $3 \times 10^9$  enfeksiyöz partikül dozu intravenöz yolla uygulanmış ve iyi bir şekilde tolere etmiştir. Doz limiti aşımında ise dispnea, diare ve dehidrasyon şekillenmektedir. Hastalar düşük başlangıç dozlarıyla desensitize edilirse, maksimum tolerasyon dozu (MTD) 10 kat arttığı vurgulanmıştır (35). NDV'nun çok yüksek doz sistemik uygulamaları bile çok iyi bir şekilde tolere edilebilmektedir. NDV bazen çok kısa süreli trombositopeniye ve diffüz vaküler sızıntıya neden olabilmektedir. Bütün bu durumlar dışında, NDV ile tedavide sadece bir kişi hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Kanser I. fazda bulunan bu hasta için yapılan *PV701* tedavisinde akciğerlerde olan tümörlerin çok hızlı lize olduğu görülmüş ve bu lizis sonucu ölüm şekillenmiştir. Fakat bu olay bir

komplikasyon olarak gelişmiş ve diğer kanser faz I tedavilerine nazaran çok daha olumludur (35).

*MTH-68/H* suşu, NDV'nun Hertfortshire suşunun (*Herz'33*) tavuk embriyo hücrelerinde birkaç kez pasajlanıp ve attenüe edilmesiyle tasarlanmıştır. Çok uzun süre pasajlarda bile, çalışmalarda dikkat çekici bir şekilde genetik olarak oldukça stabil kaldığı gözlenmiştir (36). *MTH-68/H* sistemik olarak uygulandığında tümör hücrelerinde ya tamamen ya da kısmen regresyon sağlamaktadır. Ayrıca tümörden ileri gelen laboratuvar parametrelerinde de önemli değişimler meydana getirir (örneğin; tümör belirteçlerinde, karaciğer transaminazlarında ve diğer enzimlerde). Ayrıca bu suş ile glioma tedavisi üzerine yapılan çalışmaların yoğunluğu dikkat çekmektedir (36).

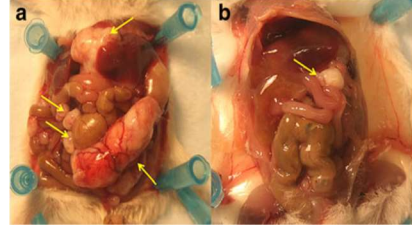
*MTH-68/H* ile yapılan inhalasyon tedavisinde ilginç olarak 33 hastadan 7 si sadece 2 haftalık periyotta tedaviye yanıt vermiştir (37). Yine aynı çalışmada, Macaristan'da 4.000 hasta inhalasyon terapisi ile tedavi edildiği öne sürülmektedir Bu çalışmalar yapılmaya başlamasından bu yana NDV ile insanlara uygulanan kanser tedavisinde NDV'nun genellikle insanlarda hafif bir ateş ve hafif geçici bir konjunktivit meydana getirmesinden başka herhangi bir yan etkisi açıklanmamıştır. Bununla beraber 20 senedir Amerika ve Avrupa'da insanlara yapılan binlerce uygulama sonucunda herhangi bir olumsuz etki görülmemiş, genelde tümör regresyonu şekillenmiştir. Böylece NDV yeniden 1960'lı yıllardaki gibi anti kanser ajanı olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (38).

Bilim insanları son yıllarda yaptıkları başarılı çalışmalar sayesinde NDV'un onkolitik özelliklerini artırırken yan etkilerini azaltmayı başarmışlardır. 2014 yılında yapılan bir çalışmada lentojenik NDV'nun izolasyonu sonrası deneme hayvanlarında GL261 (Glioblastoma hücre kültürü) türü kanser hücrelerine intratümöral verilmesi sonrası kısa dönemde (14 gün) kanserde gerileme görülürken

uzu dönemde (100 gün) tamamen iyileşme görülmüştür. Bu çalışmada bir diğer dikkat çekici sonuç ise NDV'nun indüklemesi ile kanser hücrelerinde otofaji (hücresinin kendi lizozim enzimleri ile parçalanarak programlı ölümü) meydana gelmesidir (23). 2016 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise SU-DHL-4 (Human malignant lenfositoz) kanser hücresinin NDV'na sağlıklı lenfosit hücresine göre daha duyarlı olduğu ortaya konmuştur. Onkolitik viroterapi sonrası kanser hücresi yaşam oranı  $83,1 \pm 10,1$  azalırken, sağlıklı hücrelerde  $59,5 \pm 25,7$  azalmıştır; diğer bir deyişle kanser hücresine göre sağlıklı hücreler NDV'a daha az duyarlı olarak saptanmıştır (39). Yapılan bir diğer prelinik çalışmada CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) blokajı sırasında daha yüksek terapötik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu etki ile daha güçlü immunité ve anti-tümöral sağlanmış, bu sayede %60 oranında yaşam süresi uzatılmıştır (40). 2014 yılında rapor edilmiş bir çalışmada ise prostat kanseri standart tedavilere rağmen kemik dokusuna metastaz yapmış bir hasta kendi rızasıyla bu tedavileri bırakmış ve NDV onkolitik viroterapi uygulanmasını kabul etmiştir. Bu hastaya sadece bir ay uygulanan NDV-DC (Dendritik hücre ile kombine NDV viroterapi) ve lokal ısı uygulaması sonucunda psa (prostat spesifik antigen) değeri 233.8 ng/ml'dan 0.8 ng/ml'ye düşmüştür. Bu terapi sayesinde oluşan T hücreleri uzun dönem koruma sağladığı saptanmış ve hastanın tamamen iyileştiği gözlemlenmiştir (41). Ayrıca İnterlökin-2 (IL-2) ile rekombine edilen NDV tümör hücre regresyonunu %22 arttırdığı da saptanmıştır (42). Günümüzde NDV ve NDV'ye bağlı kombine onkolitik viroterapi daha çok prelinik çalışmalar ile devam ettirilmektedir (43, 44, 45, 46).

Gen teknolojisinin gelişmesi ile NDV nun önemi de artmıştır. Belirtilen özellikleri dışında gen transkripsiyonuna açık olması, rekombinasyonun

saptanamaz oranı olması ve replikasyon siklusunda bir DNA fazı olmamasından dolayı NDV, attenüé aşilar ve gen terapisi için uygun ve güvenilir vektör olmaktadır (31).



**Resim.1.** NDV(F3aa)-GFP ile Gastrik Karsinotmazisin Tedavisi [Song ve ark. (2010)'dan adapte edilmiştir.]. (a) Tedavi öncesi farede gastrik karsinom (b) Tedavi sonrası dikkate değér tümör regresyonu. "NDV (F3aa)-GFP: NDV nin F proteininde 3 amino asit değiştirilmesi ile daha fusojenik hale getirilmesi. Bunun yanında GFP (green fluorescent protein) yüksek ekspresyonu sağlayan genin transfekte edilmesi." (50)

### Rekombinant NDV'nun Gen Terapisinde Vektör olarak kullanılması

DNA teknolojisinin gelişmesi ile non-segmenter negatif tek sarmallı RNA viruslarını rekombinant hale getirmek de mümkün olmuştur. Klonlanan cDNA (complementer DNA) sayesinde laboratuarlarda farklı rekombinant NDV (recNDV) meydana getirilmektedir (47) Örneğin; V protein ekspresyonu azaltılarak oluşturulan recNDV, tavuk embriyo hücrelerinde patojenite oluşturmamıştır (48).

Ayrıca NDV 'nun, bazı virusların farklı gen bölgelerini bünyesine katarak farklı protein ve molekül ekspresyonu sağlayabiliriz. Böylece NDV 'nun onkolitik özellikleri arttırılabilir (49). NDV normalde de respirator ve alimantar kanal mukozasında enfeksiyon meydana getirir, bu şekilde recNDV'nun yabancı proteinleri eksprese etmesi ile bu semptomlarla seyreden hastalıklarda iyi bir koruma sağlar (**Resim.1**) (50).

### 2. SONUÇ

NDV günümüzde gen terapi, immuno terapi ve virus terapi konularında önemli bir yer tutmaktadır.

Gelecekte de NDV'nun diğer gen terapileri ve virus terapileri nazaran güvenilirlik ve çabuk replike olabilme konusundaki avantajları sayesinde kanser başta olmak üzere diğer birçok hastalığın (otoimmun, genetik hastalıkları vb.) tedavisinde de başrol üstlenmesi söz konusu olabilecektir. Ayrıca kombine tedavilerle de (radyoterapi, kemoterapi ile birlikte uygulanması) uygulanmasıyla birlikte daha başarılı çalışmalar yapılmaktadır ve bu başarı biyoteknoloji ve gen mühendisliği geliştikçe her gün daha ileri taşınacaktır.

NDV gibi tür - spesifik kullanılmayıp, genetik modifikasyon sonucu gen terapisinde vektör olarak kullanılan viruslarla araştırmalar giderek artmaktadır. Bu çalışmalar sayesinde hayvan ve bitki orijinli birçok virusları yakın gelecekte genetik değişimi sağlanarak kanser tedavi denemelerinin en önemli araçlarından biri olması kuvvetle muhtemeldir. Ayrıca gelecekte kanser çalışmalarında immun sistemi kuvvetlendiren ve/veya supresif etki meydana getirmeyen diğer tedaviler (örn. *immunoviroterapi*) ile viroterapinin genetik modifikasyonlarının kombinasyonu yeni kanser terapisi çalışma alanları olarak daha çok gündemde olacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. **Doyle TM. (1927):** B. aertrycke infection of chicks. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*; 40: 71-75.
2. **de Leeuw O, Peeters, B. (1999):** Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *Journal of General Virology*; 80(1), 131-136.
3. **Yusoff K, Tan WS. (2001):** Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology*; 30: 439 - 455.
4. **Cancer Network: Lawrence, L. (2015):** "FDA Approves First Oncolytic Virus With New Melanoma Therapy".

<http://www.cancernetwork.com/melanoma/fda-approves-first-oncolytic-virus-new-melanoma-therapy>, Erişim tarihi; 10.10.2015.

5. **Huang F, Wang BR, Wu YQ, Wang FC, Zhang J, Wang YG. (2016):** Oncolytic viruses against cancer stem cells: A promising approach for gastrointestinal cancer. *World Journal of Gastroenterology*; 22(35): 7999 - 8009.
6. **Seymour LW, Fisher KD. (2016):** Oncolytic viruses: finally delivering. *British Journal of Cancer*; 114: 357-361.
7. **Dharmadhikari N, Mehnert JM, Kaufman HL. (2015):** Oncolytic Virus Immunotherapy for Melanoma. *Current Treatment Options in Oncology*; 16(10): 1-15.
8. **Sinkovics JG, Horvath JC. (2000):** Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *Journal of Clinical Virology*; 16: 1-15.
9. **Schirmacher V, Haas C, Bonifer R, Ahlert T, Gerhards R and Ertel C. (1999):** Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle Disease Virus. *Gene Therapy*; 6: 63 - 73..
10. **Fiola C, Peeters B, Fournier P, Arnold A, Bucur M, Schirmacher V. (2006):** Tumor selective replication of Newcastle Disease Virus: association with defects of tumor cells in antiviral defence. *International Journal of Cancer*; 119(2) : 328 - 338.
11. **Ahlert T, Schirmacher V. (1990):** Isolation of a human melanoma adapted Newcastle disease virus mutant with highly selective replication patterns. *Cancer Research*; 50(18): 5962 - 5968.
12. **Janke M, Peeters B, de Leeuw O, Moorman R, Arnold A, Fournier P, Schirmacher V. (2007):** Recombinant Newcastle Disease Virus (NDV) with inserted gene coding for GM-CSF as a new vector for cancer immunogene therapy. *Gene Therapy*; 14 (23): 1639 - 1649.



- 13. Elankumaran S, Rockemann D and Samal SK. (2006):** Newcastle Disease Virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *Journal of Virology*; 80 (15): 7522 – 7534.
- 14. Fábíán U, Csatory C, Szeberényi J, Csatory LK. (2007):** p53-independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity of a Newcastle Disease Virus strain in tumor cell lines. *Journal of Virology*; 81(6): 2817 – 2830.
- 15. Lorence RM, Pecora AL, Major PP, Hotte SJ, Laurie SA, Roberts MS, Groene WS, Bamat, MK. (2003):** Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Current opinion in molecular therapeutics*; 5(6): 618-624.
- 16. Sinkovics JG, Horvath JC. (2000):** Vaccination against human cancers (review). *Intertional Journal of Oncology*; 16: 81–96.
- 17. Liu TC, Kirn D. (2007):** Systemic efficacy with oncolytic virus therapeutics: clinical proof-of-concept and future directions. *Cancer research*; 67(2): 429-432.
- 18. Apostolidis L, Schirmacher V, Fournier P. (2007):** Host mediated anti-tumor effect of oncolytic Newcastle Disease Virus after locoregional application. *International Journal of Oncology*; 31: 1009 – 1019.
- 19. Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003):** Toll-like receptors. *Annual review of immunology*; 21(1), 335-376.
- 20. Thompson AJ, Locarnini SA. (2007):** Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunology and Cell Biology*; 85 (6): 435 – 445.
- 21. Melchjorsen, J, Jensen SB, Malmgaard L, Rasmussen SB, Weber F, Bowie AG, Matickinen S, Paludan SR. (2005):** Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *Journal of virology*; 79(20): 12944-12951.
- 22. Washburn B, Weigand MA, Grosse-Wilde A, Janke M, Stahl H, Rieser E, Sprick MR, Schirmacher V, Walczak H. (2003):** TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates tumoricidal activity of human monocytes stimulated by Newcastle Disease Virus. *Journal of Immunology*; 170(4): 1814 – 1821.
- 23. Koks CA, Garg AD, Ehrhardt M, Riva M, Vandenberg L, Boon L, De Vleeschouwer S, Agostinis P, Graf N, Gool SW. (2014):** Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. *International Journal of Cancer*; 136: 313–325.
- 24. Magyarics Z, Rajnavölgyi É. (2005):** Professional type I Interferon-producing cells-A Unique Subpopulation of Dendritic Cells. *Acta microbiologica et immunologica hungarica*; 52(3-4): 443-462.
- 25. Kawai T, Akira S. (2005):** Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Current opinion in immunology*; 17(4): 338-344.
- 26. Lindemann J. (1974):** Viruses as immunological adjuvants in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*; 355(1): 49-75.
- 27. Forden C. (2004):** Do T lymphocytes correlate danger signals to antigen?. *Medical hypotheses*; 62(6): 898-906.
- 28. Hengel H, Koszinowski UH, Conzelmann KK. (2005):** Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends in immunology*; 26(7): 396-401.
- 29. von Hoegen P, Zawatzky R, Schirmacher V. (1990):** Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle Disease Virus: III. Potentiation of tumor specific cytolytic T cell activity via induction of interferon alfa, beta. *Cellular Immunology*; 126: 80 – 90.

- 30. Termeer CC, Schirmacher V, Bröcker EB, Becker JC. (2001):** Newcastle-Disease-Virus infection induces a B7-1/ B7-2 independent T-cell-costimulatory activity in human melanoma cells. *Cancer Gene Therapy*; 7(2): 316 – 323.
- 31. Washburn B, Schirmacher V. (2002):** Human tumor cell infection by Newcastle Disease Virus leads to upregulation of HLA and cell adhesion molecules and to induction of interferons, chemokines and finally apoptosis. *International Journal of Oncology*; 21(1) : 85 – 93.
- 32. Cassell WA, Garrett RE. (1965):** Virus de la enfermedad de Newcastle como agente antineoplásico. *Cáncer*; 18: 863-868.
- 33. Lorence RM, Scot Roberts M, O'Neil JD, Groene WS, Miller JA, Mueller SN, Bamat MK. (2007):** Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. *Current cancer drug targets*; 7(2): 157-167.
- 34. Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, Rozenman-Yair S, Panet A, Libson E, Irving CS, Galun, E. (2006):** Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Molecular Therapy*; 13(1): 221-228.
- 35. Hotte SJ, Lorence RM, Hirte HW, Polawski SR, Bamat MK, O'Neil JD, Roberts MS, Groene WS, Major PP. (2007):** An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. *Clinical Cancer Research*; 13(3): 977 – 985.
- 36. Csatory LK, Csatory C, Gosztonyi G, Bodey B. (2006):** Promising MTH-68/H Oncolytic Newcastle Disease Virus therapy in human high grade gliomas Focus on Brain Cancer Research. 69 – 82, Nova Science Publishers, New York.
- 37. Csatory LK, Massey RJ. (1993):** "Method for treating viral diseases with attenuated virus" Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Patent No. 5,215,745.
- 38. Nelson NJ. (1999):** Scientific interest in Newcastle disease virus is reviving. *Journal of the National Cancer Institute*; 91(20): 1708-1710.
- 39. Sánchez D, Pelayo R, Medina L, Vadillo E, Sánchez R, Núñez L, Cesarman-Maus G, Sarmiento-Silva R. (2015):** Newcastle Disease Virus: Potential Therapeutic Application for Human and Canine Lymphoma. *Viruses*; 8(1): 3-14.
- 40. Zamarin D, Holmgaard RB, Subudhi SK, Park JS, Mansour M, Palese P, Merghoub T, Wolchok JD, Allison JP. (2014):** Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Science Translational Medicine*; 6: 226 -232.
- 41. Schirmacher V, Bihari AS, Stücker W, Sprenger T. (2014):** Long-term remission of prostate cancer with extensive bone metastases upon immuno- and virotherapy: A case report. *Oncology Letters*; 8(6): 2403–2406.
- 42. Wu Y, He J, An Y, Wang X, Liu Y, Yan S, Ye X, Qi J, Zhu S, Yu Q, Yin J, Li D, Wang W. (2015):** Recombinant Newcastle disease virus (NDV/Anh-IL-2) expressing human IL-2 as a potential candidate for suppresses growth of hepatoma therapy. *Journal of Pharmacological Science*; 132(1):24–30.
- 43. Chai Z, Zhang P, Fu F, Zhang X, Liu Y, Hu L, Li X. (2014):** Oncolytic therapy of a recombinant Newcastle disease virus D90 strain for lung cancer. *Virology Journal*; 11(1): 84-92.
- 44. Buijs P, van Nieuwkoop S, Vaes V, Fouchier R, van Eijck C, Hoogen B Van Den. (2015):** Recombinant Immunomodulating Lentogenic or Mesogenic Oncolytic Newcastle Disease Virus for Treatment of Pancreatic Adenocarcinoma. *Viruses*; 7(6): 2980–2998.
- 45. Jebar AH, Errington-Mais F, Vile RG, Selby PJ, Melcher AA, Griffin S. (2015):** Progress in clinical oncolytic virus-based therapy for hepatocellular

carcinoma. *Journal of General Virology*; 96(7): 1533–1550.

**46. Schirmacher V. (2016):** Fifty Years of Clinical Application of Newcastle Disease Virus: Time to Celebrate! *Biomedicines*; 4(3): 16-29.

**47. Peeters BP, de Leeuw OS, Koch G, Gielkens AL. (1999):** Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *Journal of Virology*; 73(6): 5001–5009.

**48. Römer-Oberdörfer A, Mundt E, Mebatsion T, Buchholz UJ, Mettenleiter TC. (1999):** Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *Journal of General Virology*; 80(11): 2987-2995.

**49. Mebatsion T, Verstegen S, De Vaan LT, Römer-Oberdörfer A, Schrier CC. (2001):** A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *Journal of virology*; 75(1): 420-428.

**50. Song KY, Wong J, Gonzalez L, Sheng G, Zamarin D, Fong Y. (2010):** Antitumor efficacy of viral therapy using genetically engineered Newcastle disease virus [NDV (F3aa)-GFP] for peritoneally disseminated gastric cancer. *Journal of Molecular Medicine*; 88(6): 589-596.