

Virusforschung

Onkolytische Viren zur Behandlung von Krebserkrankungen

KATIA DITTUS, ADRIAN E. EILERT, MARIE G. SZCZEPONIK, JULIANE K. HASTEDT, GUY UNGERECHTS, MATHIAS F. LEBER

KLINISCHE KOOPERATIONSEINHEIT „VIROTHERAPIE“

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM (DKFZ), HEIDELBERG/

NATIONALES CENTRUM FÜR TUMORERKRANKUNGEN (NCT), HEIDELBERG

Oncolytic virotherapy is a promising immunotherapeutic strategy in the ongoing quest for effective cancer treatments. Anti-tumor effects are achieved by direct destruction of cancer cells, leading to the release of tumor antigens and the induction of an anti-tumor immune response. Preclinical research is focused on combining and genetically modifying oncolytic viruses to further improve their safety and potency. Here, we discuss some of the manifold approaches of viral engineering.

DOI: 10.1007/s12268-023-2030-8

© Die Autorinnen und Autoren 2023

Der breiten Bevölkerung sind Viren, spätestens seit der Corona-Pandemie, vor allem als Erreger von Infektionskrankheiten bekannt. Bereits etwas weniger bekannt ist der Umstand, dass manche Viren auch die maligne Transformation gesunder Zellen herbeiführen können und hierdurch ca. zwölf Prozent aller Tumorerkrankungen verursachen [1]. Doch Viren sind noch vielseitiger: Forschung der letzten Jahrzehnte hat auch

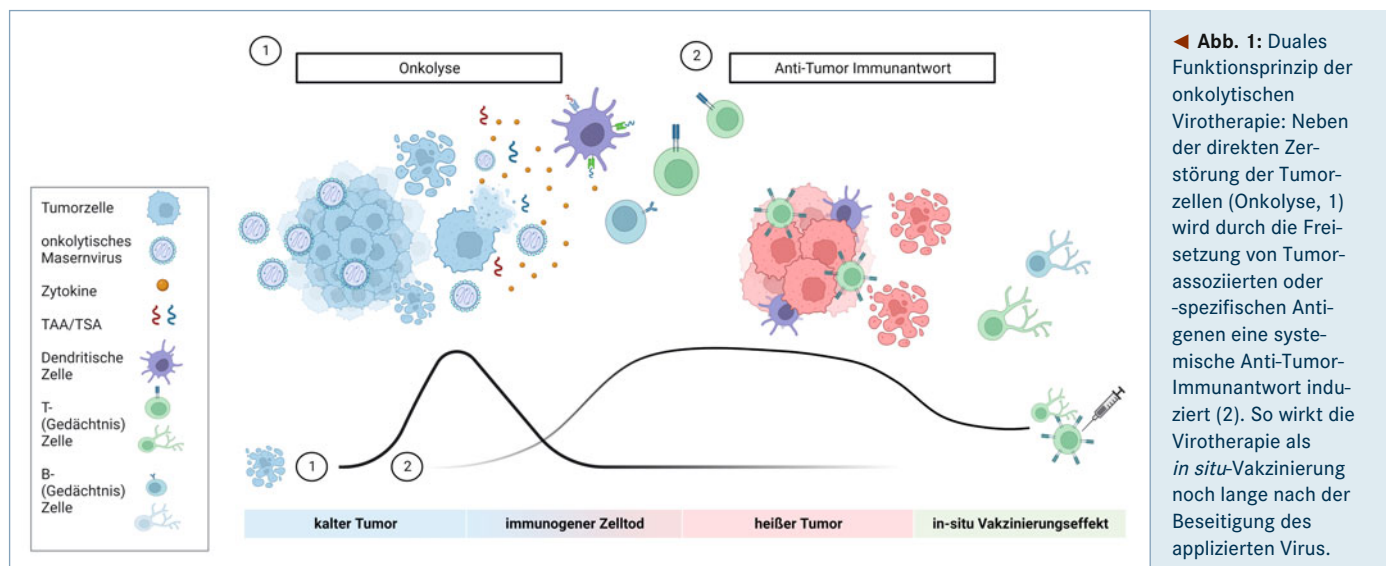
die Nutzung von Viren in der modernen Krebstherapie ermöglicht.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden erstmals Berichte von Patienten bekannt, die nach einer viralen Infektion einen Rückgang ihrer Tumorerkrankung erlebten [2]. Basierend auf diesen Entdeckungen entwickelte sich die Virotherapie, die den therapeutischen Einsatz von onkolytischen Viren (OV) zur Behandlung von Tumorerkrankungen

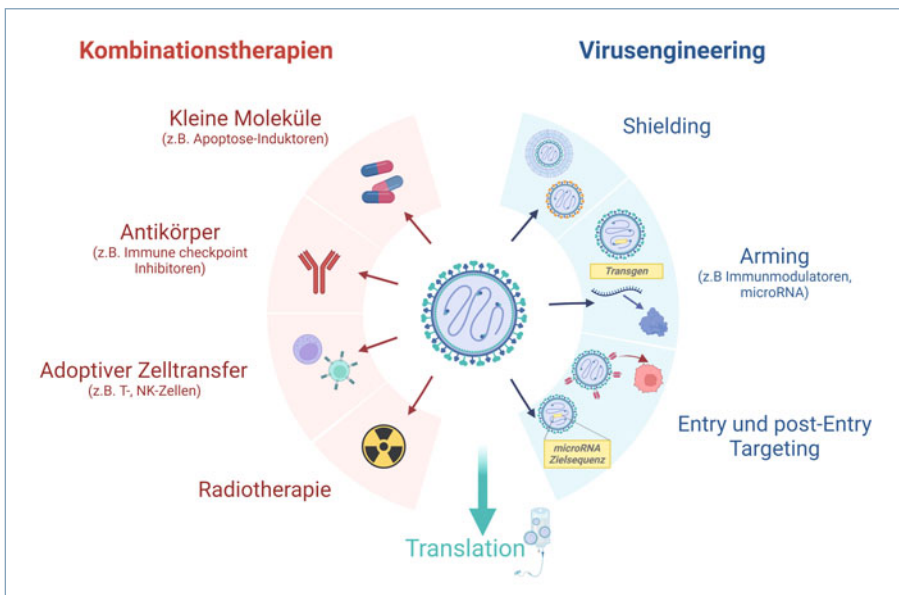
untersucht. Inzwischen wird eine Vielzahl an natürlichen oder modifizierten onkolytischen Virusplattformen (prä-)klinisch getestet.

Masernimpfstamm als onkolytische Virusplattform

Eine vielversprechende Virusplattform ist das onkolytische Masernvirus (oMeV). Das aus der Familie der Paramyxoviridae stammende negativsträngige RNA-Virus ruft in seiner Wildtyp-Form beim Menschen die Masernerkrankung hervor. Für die Virotherapie werden Varianten verwendet, die sich von den Masernimpfstämmen ableiten. Diese Impfviren sind seit über fünfzig Jahren in der klinischen Anwendung bei Kindern und Erwachsenen und bieten ein exzellentes Sicherheitsprofil [3]. Weitere Vorteile der oMeVs sind die Möglichkeit zur vielfältigen Modifikation des einzelsträngigen RNA-Genoms sowie die natürliche Tendenz des Virus, besonders Krebszellen zu infizieren (Onkotropismus). Die Tumorselektivität wird primär durch den Entry-Rezeptor CD46 vermittelt, der auf der Zelloberfläche vieler Tumorzellen verschiedener Entitäten überexprimiert wird. Darüber hinaus sind oMeVs sensitiv gegenüber der antiviralen Typ-I-Interferonantwort, welche gesunde Zellen vor viralen Eindringlingen schützt. Tumor-



◀ **Abb. 1:** Duales Funktionsprinzip der onkolytischen Virotherapie: Neben der direkten Zerstörung der Tumorzellen (Onkolyse, 1) wird durch die Freisetzung von Tumorassoziierten oder -spezifischen Antigenen eine systemische Anti-Tumor-Immunantwort induziert (2). So wirkt die Virotherapie als *in situ*-Vakzinierung noch lange nach der Beseitigung des replizierten Virus.



▲ **Abb. 2:** Grobe Unterteilung der therapeutischen Strategien des onkolytischen Masernvirus in „Kombinationstherapien“ und „Virusengineering“ mit einer Auswahl der jeweiligen Anwendungsgebiete.

zellen hingegen verlieren im Rahmen der malignen Transformation oftmals ihre antiviralen Abwehrmechanismen, da die Deaktivierung jener Mechanismen und Signalwege (aufgrund ihrer vielfältigen Wirkweise) auch den Prozess der malignen Transformation entscheidend begünstigt. Interferon-sensitiven OV's können Tumorzellen mit defekter Interferonantwort infizieren, sich in ihnen vermehren und sie schließlich lysieren. Dieser als Onkolyse bezeichnete Prozess bildet eine wesentliche Säule der Virotherapie.

Mit Masernviren gegen den Krebs impfen

Weiterführend resultiert die Onkolyse in der Freisetzung von Tumor-spezifischen (TSA) und -assoziierten (TAA) Antigenen sowie von immunogenen Pathogen- oder Gefahr-assoziierten molekularen Mustern aus den Tumorzellen (**Abb. 1**). Dieser immunogene Zelltod soll im Zuge der Aktivierung des Immunsystems das zuvor immunologisch „kalte“ Tumormikromillieu in ein inflammatorisches Milieu umwandeln. Infolgedessen werden Immunzellen zum Infektionsherd – dem Tumor – gelockt und können dort eine spezifische anti-tumorale Immunantwort einleiten (adaptives Immunsystem). Man beschreibt dieses Konzept als „*in situ*-Vakzinierung“, da die Erkennung von TSA/TAA durch Lymphozyten zur Ausbildung eines gegen den Tumor gerichteten immunologischen Gedächtnisses führen kann [4]. Ziel ist es, durch die ausge-

bildeten T- und B-Gedächtniszellen, im Sinne eines Krebsimpfstoffs, einen nachhaltigen Schutz vor der Rückkehr des Tumors zu generieren.

In unserer Abteilung testen wir verschiedene Strategien zur Steigerung der therapeutischen Effizienz des oMeV (**Abb. 2**). Ein Fokus liegt hierbei auf der Kombination von OV's mit anderen Therapien: Da keine Kreuzresistenzen der oMeV's beschrieben sind, untersuchen wir u. a. Chemo-, Radio- und Immuntherapien auf synergistische Effekte mit oMeV's. Außerdem beschäftigen wir uns mit verschiedenen Aspekten des „Virusengineering“, also der gezielten Veränderung des oMeV-Genoms via Reverser-Genetik-Technik.

Bewaffnete Masernviren: *arming*

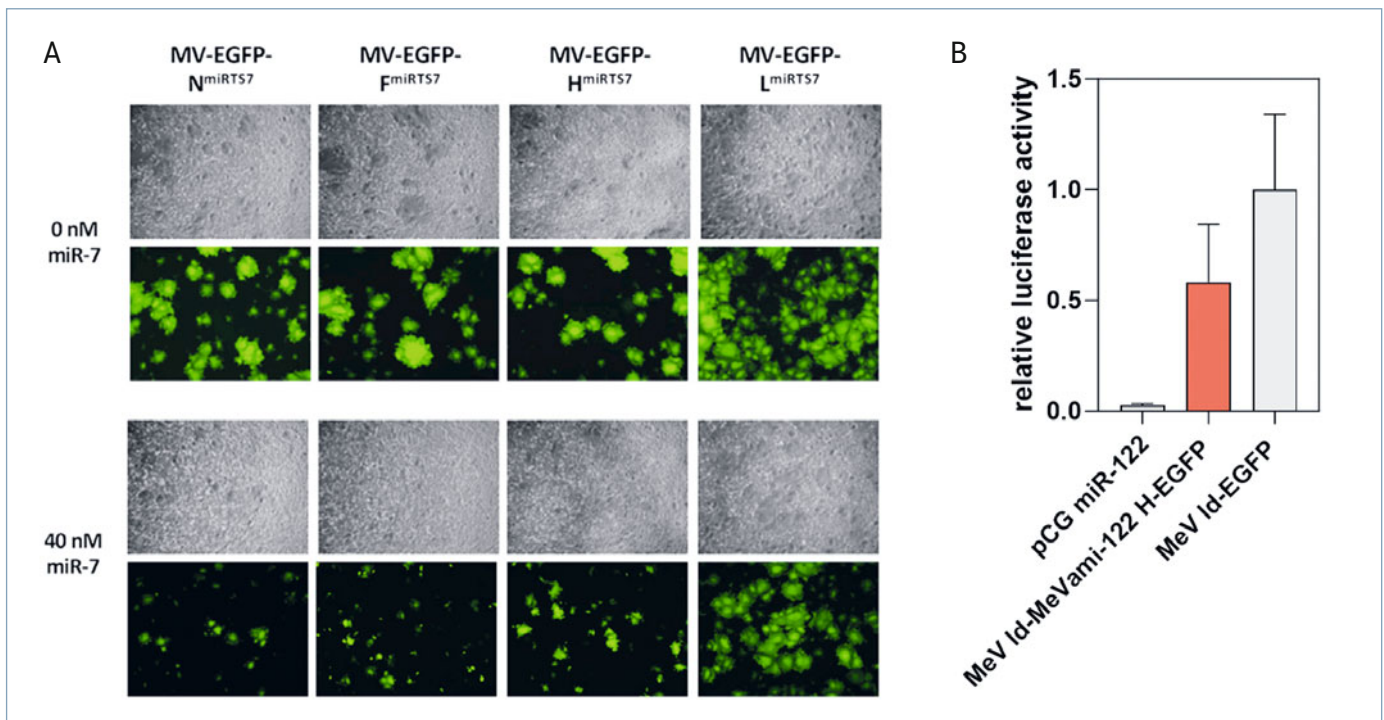
Beim *arming* dient das oMeV als Vektor therapeutischer Transgene, die durch den Onkotropismus gezielt im Tumormikromillieu exprimiert werden. In vergangenen Arbeiten in unserer Abteilung wurden entsprechend oMeV's codierend für Interleukin-12/15 [5] oder CTLA4- und PD-L1-Antikörper [6] generiert, welche verbesserte (immuno-)therapeutische Effekte erzielen konnten. Neben immunmodulatorischen Transgenen können beispielsweise auch Prodrug-Konvertasen durch oMeV exprimiert werden, die zur tumorspezifischen Aktivierung von Chemotherapeutika führen [7]. Unter dem Aspekt des *arming* berichteten wir außerdem erstmals von oMeV's, die funktionale microRNAs

(miRNAs) exprimieren [8]. Wir entwarfen ein oMeV, das eine miRNA-Expressionskassette im Genom trägt, die je nach gewünschter Zielsequenz angepasst und so vielseitig eingesetzt werden kann. Dabei wird die primäre microRNA (miRNA) durch das Virus exprimiert und anschließend von der zellulären RNAi-Maschinerie zu reifer miRNA prozessiert. Um die Strategie grundlegend zu testen, konstruierten wir eine artifizielle, viral codierte miRNA auf Basis der endogenen miR-122 (MeVami-122). Nach Infektion von Tumorzellen mit dem viralen Konstrukt konnte die Expression sowohl primärer als auch reifer miR-122 gezeigt werden.

Für die funktionale Charakterisierung der miRNAs nutzten wir ein Plasmid-System, welches eine Renilla-Luziferase codiert. Hinter der eigentlichen Protein-codierenden Sequenz in den 3' untranslatierten Regionen (3'-UTR) der Renilla-Luziferase wurden drei miRNA *target sites* der MeVami-122 inkorporiert. Hierdurch ist die Reduktion der leicht messbaren Luziferase-Aktivität direkter Indikator für die Funktionalität der miRNAs. Das virale Konstrukt mit MeVami-122 reduziert die Luziferase-Aktivität deutlich, was die grundlegende Funktionalität der oMeV-codierten miRNAs beweist. Allerdings zeigt sich die Knockdown-Effizienz eines miR-122-Kontroll-Plasmids der des Virus noch überlegen (**Abb. 3B**). Ursächlich könnte sein, dass die Menge an reifer miRNA, die durch das Kontroll-Plasmid generiert wird, deutlich größer ist. Die Aussagekraft dieses Assays über die tatsächliche Ausschaltung endogener Gene ist jedoch limitiert, da die Luziferase-Expression in diesem System einem potenten Promotor unterliegt, was zu unphysiologisch hohen Mengen an mRNA führt. Viral codierte, reife miRNAs waren in geringeren physiologischen Konzentrationen nachweisbar. Unser nächstes Ziel besteht in der Auswahl und dem anschließenden miRNA-basierten Knockdown von Tumorzell-Proteinen, welche die virale Replikation oder die Induktion einer antitumoralen Immunantwort supprimieren. Somit soll eine verbesserte therapeutische Effizienz der modifizierten oMeV's erreicht werden.

Herstellung Tumor-spezifischer Masernviren: *post-entry targeting*

Als weitere *engineering*-Strategie dient *targeting* dazu, das Virus zielgerichteter zu machen und so unerwünschte *off-target*-Wirkungen und Toxizität zu reduzieren. Entweder kann der Eintritt (*entry*) in gesunde Zel-



▲ **Abb. 3:** Funktionalität von microRNA-Zielsequenzen bzw. Expressionskassetten im oMeV-Kontext. **A,** Konstruktabhängige Hemmung der oMeV-Replikation durch Zugabe von miRNA: Grün fluoreszierendes Protein wird vom Virus codiert und ist im Beisein der miRNA (untere Bilder) in den ersten drei viralen Konstrukten deutlich reduziert. Die charakteristische Bildung von multinukleären Zellkomplexen (Synzytien) ist ebenfalls weniger ausgeprägt. Aus [11]. **B,** Luziferase-Assay zur funktionalen Charakterisierung Virus- und Plasmid-codierter miRNA: Die Luziferase-Aktivität ist in Präsenz eines miRNA-codierenden Virus (MeV Id-MeVami-122 H-EGFP) oder des entsprechenden Plasmids (pCG miR-122) im Vergleich zum Kontroll-Virus (MeV Id-EGFP) reduziert. Der Graph zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der unabhängigen Replikate. Adaptiert von [8].

len minimiert oder die Replikation auf *post-entry*-Ebene eingeschränkt werden.

Beispiel einer *post-entry targeting*-Strategie ist der Einbau von „miRNA target sites“ (miRTS) in das virale Genom. Grundlage ist, dass sich miRNA-Expressionsprofile zwischen transformierten und gesunden Zellen unterscheiden. Analog zum System der RNA-Interferenz (RNAi) unter physiologischen Bedingungen, werden Zielsequenzen von in Krebszellen herunterregulierten miRNAs in der 3'-UTR hinter einem der im Virusgenom codierten Proteine eingebaut. Die zelluläre RNAi-Maschinerie kann nun aufgrund der unterschiedlichen miRNA-Expression die entstehenden viralen mRNAs in gesunden, aber nicht in Tumorzellen, schneiden oder deren Translation inhibieren, was die virale Replikation schlussendlich inhibiert. Daraus ergibt sich eine weitere Ebene der Tumorselektivität und somit erhöhte Sicherheit des Vektors für die klinische Anwendung.

Die prinzipielle Funktionalität dieser Herangehensweise zeigten wir erstmalig für das oMeV, indem wir die miRTS der in Glioblastomen herunterregulierten miR-7 im viralen Genom inkorporierten [9]. Das

miRTS-tragende Virus repliziert in Glioblastom-Zelllinien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unverändert, ist in primären humanen (nicht transformierten) Hirnexplantaten aber stark in seiner Replikation gehemmt. Nach diesem *proof of principle* entwickelten wir die Strategie weiter: Wir erzeugten oMeVs, die mehrere gewebespezifische miRTS enthielten, um maximalen Schutz vor *off-target*-Infektionen zu erhalten [10]. Dies ist insbesondere für eine systemische Gabe der viralen Vektoren relevant. Wir konnten zeigen, dass das so konstruierte Virus in Präsenz der entsprechenden miRNAs deutlich inhibiert ist, und somit potenziell eine *off-target*-Replikation in mehreren Geweben simultan reduziert werden kann. Wir vermuteten, dass der Ort, an dem die miRTS im viralen Genom inkorporiert ist, einen entscheidenden Effekt auf die Effizienz der Replikationshemmung hat und inserierten die miRTS an verschiedenen Stellen des viralen Genoms. Tatsächlich führen früh (proximal in der Nähe des 3'-Endes) im viralen Genom positionierte miRTS zu einer effizienteren Hemmung der viralen Replikation (**Abb. 3A**, [11]). Dies entspricht auch dem Transkriptionsgradienten des oMeVs, der dafür sorgt, dass Gene stärker transkri-

biert werden, je näher sie am 3'-Ende des Genoms liegen.

Schließlich zeigten wir auch, dass die Kombination aus miRTS-*(de)targeting* mit einer *arming*-Strategie möglich ist: Ein von uns konstruiertes oMeV, das für eine Chemotherapie-aktivierenden Prodrug-Konvertase codiert und eine miRTS im Genom trägt, zeigt virale Replikationshemmung in Präsenz der miRNA *in vitro* sowie synergistische Effekte mit Prodrug-Gabe *in vivo* [7].

Ausblick

Neben diesen Beispielen unserer präklinischen Arbeit, liegt ein großer Fokus unserer Abteilung auf der Translation neuartiger Virotherapie-Konzepte. Nachdem 2015 mit Imlygic® (Talimogen laherparepvec), einem GM-CSF exprimierenden Herpes-simplex-Virus, das erste OV die klinische Zulassung zur Behandlung des malignen Melanoms erlangte, arbeiten wir stetig an der Erweiterung klinisch verfügbarer Virotherapien. Bis Ende 2023 haben wir an unserem Zentrum bereits 12 klinische Studien mit insgesamt 8 verschiedenen OVs durchgeführt bzw. initiiert. Der für 2024 anvisierte Start einer klinischen Studie mit einem in-house entwi-

ckelten oMeV, ist dabei ein Meilenstein. Wir hoffen so unserem Ziel wieder ein Stück näher zu kommen: Die Virotherapie als eine neue Form der modernen immun-onkologischen Therapie klinisch zu etablieren, von der eine Vielzahl an Patienten profitieren kann. ■

Literatur

- [1] Ameya G, Birri DJ (2023) The molecular mechanisms of virus-induced human cancers. *Microb Pathog* 183: 106292
- [2] Kelly E, Russell SJ (2007) History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther* 15: 651–659
- [3] Robert Koch-Institut (1994) *Epidemiologisches Bulletin: aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health*. Bd.1 Heft 1
- [4] Russell SJ, Barber GN (2018) Oncolytic Viruses as Antigen-Agnostic Cancer Vaccines. *Cancer Cell* 33: 599–605
- [5] Backhaus PS, Veinalde R, Hartmann L et al. (2019) Immunological Effects and Viral Gene Expression Determine the Efficacy of Oncolytic Measles Vaccines Encoding IL-12 or IL-15 Agonists. *Viruses* 11: 914
- [6] Engeland CE, Grossardt C, Veinalde R et al. (2014) CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol Ther* 22: 1949–1959
- [7] Singh HM, Leber M F, Bossow S et al. (2021) MicroRNA-sensitive oncolytic measles virus for chemovirotherapy of pancreatic cancer. *Mol Ther Oncolytics* 21: 340–355
- [8] Anker SC, Szczeponik MG, Dessila J et al. (2023) Oncolytic Measles Virus Encoding MicroRNA for Targeted RNA Interference. *Viruses* 15: 308
- [9] Leber MF, Bossow S, Leonard VHJ et al. (2011) MicroRNA-sensitive oncolytic measles viruses for cancer-specific vector tropism. *Mol Ther* 19: 1097–1106
- [10] Baertsch MA, Leber MF, Bossow S et al., (2014) MicroRNA-mediated multi-tissue detargeting of oncolytic measles virus. *Cancer Gene Ther* 21: 373–380
- [11] Leber MF, Baertsch MA, Anker SC et al. (2018) Enhanced Control of Oncolytic Measles Virus Using MicroRNA Target Sites. *Mol Ther Oncolytics* 9: 30–40

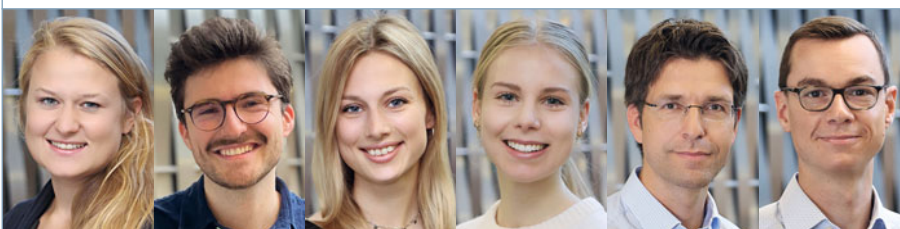
Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Dr. Mathias F. Leber
NCT Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 460
D-69120 Heidelberg
Mathias.Leber@nct-heidelberg.de
www.dkfz.de/de/virotherapie

ARBEITSGRUPPE



Katia Dittus, Adrian E. Eilert, Marie G. Szczeponik, Juliane K. Hastedt, Guy Ungerechts und Mathias F. Leber (v. l. n. r.)

Die klinische Kooperationseinheit Virotherapie (www.dkfz.de/de/virotherapie) des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Guy Ungerechts entwickelt und erforscht neue Therapiestrategien aus dem vielseitigen Feld der onkolytischen Virotherapie. Die Arbeitsgruppe um PD Dr. Dirk M. Nettelbeck beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer Virotherapeutika auf Basis des Adenovirus. Die Arbeitsgruppe um Dr. Dr. Mathias F. Leber mit Sitz am Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen (NCT) in Heidelberg konstruiert, kombiniert und translatiert Virotherapeutika mit besonderem Fokus auf onkolytischen Masernviren.