

## Chương XIII

# GEN TRỊ LIỆU KHÁNG DI CĂN

### MỞ ĐẦU

Di căn là nguyên nhân chính gây tử vong cho các bệnh nhân ung thư. Sự hiện diện của khối u di căn thường là dấu hiệu giai đoạn muộn của tiến triển bệnh trong đó các tế bào khối u đã trải qua nhiều biến đổi di truyền để góp phần vào việc kháng lại xạ trị hay hóa trị. Để xử lý các khối u khó nắm bắt này, rất cần một hệ thống chuyển giao có hiệu lực toàn hệ thống mang các thiết bị trị liệu tới nhiều đích khối u trong một bệnh nhân. Các tác nhân đòi hỏi phải đủ mạnh để ức chế được tăng trưởng khối u hoặc loại bỏ u. Trong chương này chúng tôi tập trung vào những kinh nghiệm sử dụng adenovirus *E1A* (*Ad.E1A*) với tư cách là một gen liệu pháp trong GTL ung thư điều trị các khối u di căn. Cuối cùng chúng tôi sẽ trình bày những phát hiện mới về phạm vi hoạt động kháng u và kháng di căn của một gen liệu pháp mới đó là p202 cũng như tiềm năng của nó trong việc kháng lại các khối u di căn.

### **E1A - GEN KHÁNG DI CĂN**

#### **E1A - gen kiểm chế di căn**

Ad.E1A là một protein đa chức năng đối với biến nạp, tổng hợp DNA, apoptosis, biệt hóa và kiểm chế khối u. E1A đầu tiên được mô tả như một oncogene chủ yếu bởi vì nó có khả năng thúc đẩy tăng trưởng và làm bất tử các tế bào yên lặng loài gặm nhấm và hợp tác với *ras* oncogene để biến nạp những tế bào này. Tuy nhiên, E1A không có liên quan gì với các bệnh ác tính của người mặc dầu vậy đã có nhiều nghiên cứu sâu rộng nhằm tìm kiếm mối liên quan ấy. Hơn nữa, E1A cũng được chỉ rõ là có gây kiểm chế di căn thực nghiệm đối với các tế bào gặm nhấm được biến nạp bởi *ras* oncogene và *neu* oncogene. E1A cũng kiểm chế di căn một số dòng tế bào khối u xác định của người.

Di căn là một quá trình phức tạp bao gồm nhiều bước trong đó các TB khối u tương tác với các chất ngoại bào và các tế bào mô đệm để khởi đầu và kết thúc quá trình di căn. Vì thế chẳng có gì ngạc nhiên khi thấy mối liên hệ giữa sự kiểm chế di căn qua trung gian E1A với sự điều hòa lên gen kiểm chế di căn như các E-cadherin, nucleosid diphosphat kinase (NM23) và các chất ức chế mô của metalloproteinase (TMP) đồng thời điều hòa xuống gen tăng cường di căn như matrix metalloproteinase (MMP) như MMP-1, MMP-3, MMP-9, các chất hoạt hóa plasminogen dạng urokinase, các phân tử kết dính (CD44) và HER-2.

Mặc dầu E1A đầu tiên được thông bào là không có hoạt tính kháng u, nhưng khi các dữ liệu thực nghiệm tăng lên đã chứng minh E1A có khả năng ức chế sinh u của các TB loài gặm nhấm biến nạp và các dòng TB ung thư của người. Vì thế, dựa trên khả năng của nó có thể kiểm chế được cả sinh u và di căn nên E1A được coi như là một gen kiểm chế khối u.

Những thực nghiệm nói trên chủ yếu sử dụng các thể thâm chuyển ổn định E1A (E1A stable transfectants) để xác định hoạt tính kiểm chế khối u của E1A. Những thí nghiệm này đã cung cấp những nguyên lý hoạt động kiểm chế khối u liên quan tới E1A, nhưng đây chưa phải là nguyên lý “trị liệu”. Để biến E1A thành một gen liệu

pháp hiệu ứng, người ta phải phát triển một số chiến lược GTL với việc sử dụng liposom và các vec tơ virus với tư cách là các hệ thống chuyển gen. Đồng thời cũng phải chứng minh được rằng GTL dựa trên cơ sở E1A thực sự đã thu được các hiệu ứng trị liệu trên các mô hình ghép ngoại lai của người trên chuột mô phỏng các mô hình ung thư vú, ung thư buồng trứng và ung thư phổi.

Mặc dầu với những nghiên cứu tiền lâm sàng khích lệ như thế này nhưng vấn đề an toàn vẫn phải đặc biệt quan tâm khi muốn E1A được thực hiện trên các TNLS vì theo quan niệm hiện hành thì E1A vẫn là một oncogene. Năm 1995 các nhà khoa học đã đề nghị FDA phê chuẩn TNLS pha I điều trị các bệnh nhân có biểu hiện quá mức HER-2 với E1A, lý do là E1A điều hòa xuống HER-2 dẫn đến kiềm chế sinh u và di căn.

## **E1A kiềm chế sinh u và di căn qua trung gian biểu hiện quá mức HER-2**

### ***Biểu hiện quá mức HER-2 và di căn***

Sự khuếch đại/biểu hiện quá mức của tiền gen ung thư (proto-oncogene) HER-2 được phát hiện trong khoảng 30% ung thư vú và ung thư buồng trứng của người. Đáng kể là những bệnh nhân ung thư vú và ung thư buồng trứng có biểu hiện quá mức HER-2 trong các khối u thì tỷ lệ sống sót của họ là thấp và thời gian tái phát ngắn hơn so với các bệnh nhân không biểu hiện quá mức HER-2. Vì thế, biểu hiện quá mức HER-2 được sử dụng như một marker bệnh lý học cho các tiên lượng sơ bộ. Sự biểu hiện quá mức HER-2 cũng được phát hiện với tần số cao ở ung thư phổi, ung thư đường tiêu hóa, ung thư bàng quang và ung thư miệng. Điều đó đã gợi lên rằng sự biểu hiện quá mức HER-2 giữ vai trò cực kỳ quan trọng trong việc phát triển các bệnh ác tính của người.

Về mặt lâm sàng, sự biểu hiện quá mức HER-2 cũng liên quan tới tiến triển và di căn của bệnh. Biểu hiện quá mức HER-2 tương quan với di căn sớm cũng như tăng tỷ lệ di căn.

Sự hình thành các di căn ngoài phổi đòi hỏi các TB khối u phải tăng trưởng trong vi môi trường kém thuận lợi. Vì thế các tế bào chuyên biểu hiện quá mức HER-2 có thể có khả năng vượt qua được sự chọn lọc tăng trưởng tổ chức. Khi ép buộc biểu hiện quá mức HER-2 cũng làm phục hồi phần nào tiềm năng di căn của các dòng TB ung thư vú ít di căn khác *in vitro* và *in vivo*, điều đó khẳng định rằng biểu hiện quá mức HER-2 là một trong những nguyên nhân gây nên kiểu hình di căn. Vì thế, muốn HER-2 biểu hiện ở mức thấp trong các mô bình thường thì các thuốc ung thư dựa trên cơ sở HER-2 phải có hiệu ứng trị liệu chọn lọc kháng lại các khối u biểu hiện quá mức HER-2. Dựa trên ý tưởng này, nhiều chiến lược trị liệu đã được phát triển nhắm tới các khối u biểu hiện quá mức HER-2. Một trong số đó là gen trị liệu với cơ sở E1A điều trị các khối u biểu hiện quá mức HER-2.

### ***Sự kiềm chế của E1A đối với di căn qua trung gian biểu hiện quá mức HER-2***

E1A kiềm chế biểu hiện mRNA và protein HER-2 ở trạng thái ổn định bằng cách điều hòa xuống hoạt tính của promoter HER-2. Vì biểu hiện quá mức HER-2 sẽ làm tăng cường tiềm năng di căn của các TB ung thư vì vậy E1A có thể điều hòa xuống HER-2 dẫn đến kiềm chế di căn. Thực vậy, biểu hiện E1A trong các TB ung thư biểu hiện quá mức HER-2 sẽ làm cho các TB ít di căn hơn. Tuy nhiên, E1A cũng có thể kiềm chế di căn bất chấp cả khi có biểu hiện quá mức HER-2. Ý kiến này được

ứng hộ bằng việc quan sát thấy rằng mặc dầu HER-2 biểu hiện từ trước trong các TB ung thư biểu hiện E1A có thể hồi phục được tính sinh u của chúng nhưng nó vẫn thất bại trong việc hồi phục tiềm năng di căn hoặc biểu hiện MMP. Kết quả này cũng nhất quán với các báo cáo trước đây khẳng định rằng E1A có liên quan tới hoạt tính kiểm chế di căn và xa hơn nữa là E1A có thể làm trung gian kiểm chế di căn bằng cách đích các phân tử điều hòa xuống con đường tín hiệu di căn cảm ứng bởi HER-2.

## **Gen trị liệu E1A**

### **Các nghiên cứu tiền lâm sàng**

Để test hiệu lực của một gen trị liệu dựa trên cơ sở *E1A* trên chuột mang các khối u biểu hiện quá mức HER-2, có 3 mô hình ghép ngoại lai ung thư (buồng trứng, vú và phổi) đã được thiết lập và 2 hệ thống chuyển giao đã được sử dụng là cationic liposome  $3\beta$  [ N-(N'-dimethylaminoethane)-carbomoyl] cholesterol:dioleoylphatidylethanolamine (DC-Chol):DOPE và Ad.*E1A*.

### **Mô hình ung thư buồng trứng**

Mô hình ung thư buồng trứng được thiết lập bằng cách tiêm TB ung thư buồng trứng biểu hiện quá mức HER-2 (SKOV3) vào trong màng bụng chuột cái *nu/nu*. Cây ghép các khối u buồng trứng thu nhận từ màng treo ruột và trong khoang bụng có bắt màu dương tính HER-2. Chuột mang khối u được tiêm vào màng bụng hoặc phức hợp vec tơ biểu hiện *E1A* với DC-Chol (DCC-*E1A*) hoặc Ad.*E1A*.

Phân tích mô tử thi cho thấy một số chuột được xử lý với E1A/DC-Chol mặc dù bị chết vì các hội chứng liên quan khối u nhưng không phát hiện thấy sự xâm lấn và di căn của khối u như thường thấy ở các nhóm đối chứng (không điều trị với thể đột biến E1A/DC-Chol, E1A đơn lẻ hoặc DC-Chol đơn lẻ). Khi kiểm tra mô khối u cắt lọc từ chuột đã được xử lý với E1A/DC-Chol thì rõ ràng là biểu hiện E1A rất tương quan với điều hòa xuống protein HER-2 trong các khối u thu nhận từ các nhóm đối chứng. Đáng chú ý là 70% chuột xử lý với E1A/DC-Chol sống sót trên 1 năm nhưng ở đối chứng thì tất cả đều chết trong vòng 200 ngày. Những chuột đang sống đều bình thường và khỏe mạnh bởi không phát hiện thấy các khối u bên trong hoặc các tác dụng phụ khi điều trị. Những kết quả này chỉ rõ rằng việc tiêm vào màng bụng phức hợp E1A/DC-Chol là phương thức vận chuyển hữu ích để cảm ứng các TB ung thư buồng trứng *in vivo* và việc xử lý với E1A/DC-Chol có thể làm thấp đi sự biểu hiện HER-2, kiểm chế sự tăng trưởng khối u, giảm di căn, tăng thời gian sống sót và không có hiệu ứng phụ. Quan sát này là một trong số những bằng chứng đầu tiên khẳng định hiệu lực và tính khả thi của việc sử dụng gen trị liệu cơ sở *E1A*/DC-Chol để điều trị ung thư buồng trứng một cách hiệu quả trong mô hình ghép ngoại lai.

Hiệu lực của việc sử dụng Ad.*E1A* trong mô hình ung thư buồng trứng trên đây cũng tương tự như cách xử lý với E1A/DC-Chol. Ngoài SKOV3, công trình nghiên cứu Ad.*E1A* còn đề cập tới dòng TB ung thư buồng trứng người biểu hiện *HER-2*. 2774. Thật hấp dẫn là, mặc dầu Ad.*E1A* có thể làm tăng đáng kể thời gian sống sót trong mô hình u SKOV3, nhưng lại thất bại khi thực hiện trong mô hình khối u 2774. Những kết quả này không phải do sự khác biệt về hiệu ứng thâm nhiễm virus giữa SKOV3 và các dòng tế bào 2774 vì cả hai đều có thể được gây nhiễm như nhau khi xác định bằng gen  $\beta$ -galactosidase mang adenovirus.

Quan sát này gây chú ý tới khả năng của E1A có thể làm trung gian cho hiệu ứng kháng u đặc biệt trên các tế bào ung thư buồng trứng biểu hiện HER-2, nhưng không có hiệu ứng trên các tế bào ung thư buồng trứng biểu hiện HER-2 thấp. Cũng

cần phải có một cách khác xử lý nghiêm ngặt hơn các TB ung thư biểu hiện HER-2 như 2774 để có được hiệu ứng tương tự như đã thấy khi xử lý các TB ung thư biểu hiện quá mức HER-2, các khối u SKOV3 cắt lọc từ chuột thâm nhiễm Ad.E1A đồng thời giảm sự biểu hiện protein HER-2 trên các mẫu khối u tương tự. Vì thế, kết quả này khẳng định rằng có mối liên quan tới nguyên nhân *in vitro* giữa sự biểu hiện E1A và sự điều hòa xuống HER-2. Khi sử dụng Ad.LacZ để theo dõi phổ biểu hiện của E1A trong mô hình khối u SKOV3, thật là khích lệ khi biết rằng có sự biểu hiện cao LacZ ở các bệnh cổ trướng ác tính và các khối u khi so với các mô và các tổ chức khác, điều đó gợi lên rằng Ad.E1A có thể đích một cách ưu tiên vào các vị trí u này.

### **Mô hình ung thư vú**

Khi thâm nhiễm Ad.E1A ức chế đặc hiệu sự tăng trưởng của các TB ung thư vú biểu hiện quá mức HER-2 (MDA-MB-361 và SKBR3) lại thấy có ít hoặc không có hiệu ứng ức chế tăng trưởng qua trung gian E1A trên các TB ung thư biểu hiện thấp HER-2 (MDA-MB-435 và MDA-MB-231). Dựa trên cơ sở quan sát này thì cả Ad.E1A và E1A/DC-Chol đều có thể sử dụng được để định giá hiệu lực của một mô hình ung thư vú biểu hiện quá mức HER-2.

Các tế bào MDA-MB-361 được cấy vào những khối mỡ vú của chuột cái *nu/nu*. Các khối u vú thường trở nên rõ ràng khoảng 45 ngày sau khi cấy ghép. Ad.E1A hoặc E1A/DC-Chol được tiêm vào trong khối u. Sau 6 tháng xử lý với E1A bởi Ad.E1A hoặc E1A/DC-Chol đã kéo dài được thời gian sống sót (thời gian sống sót kéo dài trên 2 năm, trái lại ở các nhóm đối chứng thì chỉ dưới 15 tháng) và ức chế tăng trưởng khối u. Xử lý với Ad.E1A tốt hơn đôi chút so với xử lý bằng E1A/Dc-chol. Đáng chú ý là, không phát hiện thấy di căn trong các tổ chức trong màng bụng như gan, ruột, lách và thận.

Những kết quả này phù hợp với khả năng của E1A trong việc ức chế di căn và gọi lại hiệu ứng kháng u qua trung gian E1A trên mô hình ung thư buồng trứng biểu hiện quá mức HER-2, trong đó không phát hiện thấy di căn ở những chuột được xử lý với E1A. Sự kiểm chế u vú rất tương quan với sự biểu hiện của E1A và sự điều hòa xuống protein HER-2 nhờ xác định bằng western blot và phân tích hóa tổ chức miễn dịch trên các mẫu khối u. Dẫn liệu này đã gợi lên tính khả thi của gen trị liệu cơ sở E1A (bằng Ad.E1A hoặc E1A/DC-Chol) kháng lại ung thư vú biểu hiện quá mức HER-2 *in vivo*.

Một nghiên cứu về độc chất sau đó cũng đã được thực hiện trên chuột có thẩm quyền miễn dịch để đảm bảo chắc chắn về độ an toàn của quy trình và giảm thiểu tối đa các hiệu ứng phụ liên quan tới việc điều trị bằng gen trị liệu E1A.

### **Các thử nghiệm lâm sàng**

#### **Pha I ung thư vú và ung thư buồng trứng**

##### *Phân phối qua các khoang cơ thể*

Để đánh giá tính khả thi của việc sử dụng E1A cho các bệnh nhân ung thư biểu hiện quá mức HER-2, một TNLS pha I đã được thực hiện trên một nhóm bệnh nhân ung thư vú và ung thư buồng trứng giai đoạn muộn. Phức hợp E1A/DC-Chol cationic liposome (DCC-E1A) được tiêm vào khoang ngực hoặc vào màng bụng. Những kết quả thu được từ các nghiên cứu pha I này đã chứng minh độc tính giới hạn (có thể do DCC-E1A hơn là do E1A). Sự chuyển gen hiệu quả (xác định bằng sự biểu hiện mRNA của E1A trong các khối u cũng như trong các tổ chức ở những vị trí xa), sự

điều hòa xuống HER-2, việc xử lý với DCC-E1A cũng liên quan tới sự thu nhỏ các khối u và giảm quần thể TB đang tăng sinh cũng như tăng các tế bào apoptotic. Thật thú vị là việc tăng các TB apoptotic lại rất tương quan với việc tăng nồng độ yếu tố hoại tử khối u  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Vì E1A làm bất hoạt NF-kB, một phân tử kháng apoptotic được cảm ứng bởi TNF- $\alpha$  nên có khả năng là việc tăng các tế bào apoptotic là do E1A gây nhạy cảm với apoptosis được cảm ứng bởi TNF- $\alpha$ . Tổng cộng có 18 bệnh nhân ung thư vú giai đoạn muộn (n = 6) hoặc ung thư buồng trứng (n = 12) được xử lý với DCC - E1A, có ít nhất 1 bệnh nhân ung thư vú không thấy các bằng chứng bệnh lý về u, 2 bệnh nhân có đáp ứng thấp hơn, 8 bệnh nhân bệnh ổn định và 6 bệnh nhân bệnh có tiến triển. Những kết quả này đã chứng minh tính khả thi của thử nghiệm DCC-E1A.

#### *Phân phối trong khối u*

Trong một thử nghiệm pha I với 9 bệnh nhân có khối u vú tái phát và không thể phẫu thuật cắt bỏ đã được điều trị bằng DCC-E1A thông qua việc tiêm vào khối u. Không quan sát thấy độc tính liên quan tới giới hạn liều của thuốc, cũng không có các hiệu ứng phụ liên quan tới thuốc. Sự biểu hiện E1A phát hiện thấy ở các mẫu khối u sau khi được xử lý với DCC-E1A. Có một bệnh nhân ung thư vú sau điều trị rõ ràng không thấy các bằng chứng bệnh lý khối u ở vị trí u.

#### **Pha II ung thư đầu và cổ - phân phối trong khối u**

Đã hoàn tất nghiên cứu pha I điều trị với DCC-E1A cho 9 bệnh nhân ung thư đầu và cổ. Những kết quả của nghiên cứu này chỉ rõ không có độc tính giới hạn liều, các liều được dùng đều thấp hơn liều dung nạp tối đa. Sự biểu hiện E1A và sự điều hòa xuống HER-2 cũng thấy ở sinh thiết khối u đã xử lý với DCC-E1A. Sau thành công của nghiên cứu pha I, một nghiên cứu pha II đa trung tâm cũng đã được hoàn tất. DCC-E1A được sử dụng như một tác nhân đơn và được phân phối bằng cách tiêm vào khối u. Trong số 24 bệnh nhân ung thư đầu và cổ tái phát, không thể phẫu thuật được thì có 1 bệnh nhân ( $1/24 = 4,2\%$ ) có đáp ứng đầy đủ và 37,5% (9 trong 24 bệnh nhân) có đáp ứng khách quan hoặc tiến tới trạng thái bệnh ổn định. Tác dụng phụ thông thường nhất là đau ở vị trí tiêm, nhưng không có phản ứng phụ liên quan tới việc phân phối DCC-E1A.

Những kết quả này cho thấy, tiêm vào trong khối u DCC-E1A là an toàn và dung nạp tốt. Trên cơ sở những kết quả khích lệ từ các thử nghiệm pha II thì trị liệu DCC-E1A kết hợp với xạ trị ion hóa hoặc hóa trị liệu sẽ là khả thi trong tương lai gần.

## **GEN KHÁNG DI CĂN p202**

### **p202**

Protein p202 được mã hóa bởi 1 trong 6 cụm 200 gen có thể cảm ứng interferon của chuột. Họ protein này có những đoạn tương đồng từng phần gồm 200 amino acid. Cho tới nay, p202 là thành viên được xác định đặc tính kỹ nhất trong họ protein gồm p203, p204 và D3 trên chuột và MNDA, IFI16 và AIM2 trên người. Về mối liên quan bệnh lý học của p202 thì người ta đã phát hiện ra rằng p202 là một gen ứng cử viên được dùng trong mô hình lupus ban đỏ hệ thống ở chuột. Tuy nhiên, hoạt tính này trên người vẫn chưa được xác định.

P202 là một phosphoprotein 52- kDa gắn với chất nhiễm sắc của nhân, chủ yếu liên quan tới tương tác protein – protein. Đáng chú ý là một số chất điều hòa phiên mã

quan trọng gồm gen u nguyên bào võng mạc (Rb), E2F-1, E2F-4, p107, và p130, *Fos/Jun* (AP-1), protein gắn p53 (53BP), *c-Myc*, *MyoD* và myogenin đều có liên quan thể chất với p202 *in vitro* và *in vivo*. Những quan sát này đã làm rõ ý nghĩa về mặt chức năng của p202 trong việc điều hòa chu kỳ tế bào, truyền tín hiệu, apoptosis và sự biệt hóa.

Nhìn chung tương tác protein - protein liên quan tới p202 là làm ức chế sự hoạt động của các promoter. Trong đa số các trường hợp, nó ngăn chặn trực tiếp sự liên kết yếu tố phiên mã với các thành phần DNA cùng nguồn bởi vì p202 đáp ứng cho việc kiểm chế phiên mã.

Tương tự như sự ức chế tăng trưởng được cảm ứng bởi interferon, sự biểu hiện dai dẳng của p202 rõ ràng là đã làm ức chế tăng trưởng các tế bào loài gặm nhấm và các tế bào ung thư của người. Sự ức chế tăng trưởng qua trung gian p202 có liên quan tới việc làm yếu đi sự chuyển tiếp chu kỳ G1/S. Mặc dầu cơ chế phân tử của sự ức chế tăng trưởng qua trung gian p202 chưa được rõ lắm, nhưng người ta quan sát thấy p202 gắn với một số phân tử điều hòa chu kỳ tế bào quan trọng *in vitro* và *in vivo* như Rb, p107, p130, E2F-1, E2F-4 và *c-Myc* đã sáng tỏ sự tác động của p202 trong việc điều hòa chu kỳ tế bào. Chẳng hạn như p202 tương tác với E2F-1, làm thủ tiêu sự hoạt hóa phiên mã qua trung gian E2F-1 của các gen pha S như *DHFR*, *b-Myc* và *PCNA*, kết quả là việc tiến vào pha S bị suy giảm.

Ngoài sự ức chế tăng trưởng, gần đây người ta đã chỉ rõ rằng sự biểu hiện p202 còn làm thúc đẩy apoptosis. Sự xuất hiện apoptosis qua trung gian p202 phụ thuộc vào sự hoạt hóa caspase. Dựa trên cơ sở ức chế tăng trưởng và sự hoạt hóa tiền apoptosis của p202 mà người ta đã thiết lập các nghiên cứu tiền lâm sàng để đánh giá tính khả thi của việc sử dụng p202 trong gen trị liệu điều trị các khối u thực nghiệm.

## **Các nghiên cứu gen trị liệu tiền lâm sàng với p202**

### **Mô hình ung thư vú**

Ung thư vú di căn là một bệnh nguy hiểm chết người. Những cách điều trị thông thường như hóa trị, xạ trị có kết hợp hoặc không kết hợp với phẫu thuật thì cũng chỉ đạt được những kết quả hạn chế. Các nhà khoa học đã chỉ rõ rằng khi sử dụng vec tơ biểu hiện p202 và phức hợp polyethylenimin trong mô hình ghép ngoại lai ung thư vú sẽ có hoạt tính kháng u *ex vivo*. Vì ung thư vú là một bệnh di căn nên cần phải phát triển một hệ thống chuyển giao toàn hệ thống qua đường tĩnh mạch gen p202 tới các vị trí u tiên phát hay đã di căn.

Kết cục là, chúng ta phải tiến hành 2 phương pháp và so sánh hiệu lực của việc điều trị bằng gen trị liệu p202 với việc sử dụng hoặc adenovirus tái tổ hợp biểu hiện p202 hoặc phức hợp liposom CMV-p202/SN2 trong mô hình ghép ngoại lai ung thư vú.

CMV-p202 là một vec tơ biểu hiện p202 được hướng dẫn bởi promoter cytomegalovirus (CMV). Công thức SN2 liposom đã được test và cho thấy có hiệu ứng chuyển gen cao trong mô hình gen trị liệu toàn hệ thống trên động vật. Người ta thấy rằng sự tăng trưởng khối u giảm đáng kể cả trong nhóm điều trị bằng Ad-p202 cũng như nhóm điều trị bằng CMV-p202/SN2.

Những số liệu này có ý nghĩa rất lớn bởi vì CMV-p202/SN2 và Ad-p202 đã vượt qua được nhiều hàng rào miễn dịch, sinh lý học và cấu trúc bên trong cũng như bên ngoài của mạch máu để tới được các tế bào ung thư và giải phóng hiệu ứng trị liệu khi so sánh với các mô hình trị liệu khác như tiêm vào trong khối u. Những kết

quả này đã chắc chắn khẳng định tính khả thi của việc điều trị ung thư vú bằng gen trị liệu p202 toàn hệ thống.

Khi kiểm tra các khối u đã được xử lý với Ad-p202 hoặc CMV-p202/SN2 bằng các thử nghiệm hóa miễn dịch tổ chức người ta thấy rằng mức protein p202 rất tương quan với phạm vi apoptosis trong các khối u ở các mô hình được xác định bằng các thử nghiệm khía và đánh dấu (nick and labeling) dUTP qua trung gian deoxynucleotid transferase tận đầu (terminal) làm biến màu đuôi của các mẫu DNA. Quan sát này cũng phù hợp với những dẫn liệu *in vitro* là sự thâm nhiễm Ad-p202 sẽ làm cảm ứng apoptosis. Vì thế, apoptosis cảm ứng bởi p202 cũng góp phần vào hoạt động kháng u *in vivo* nói chung.

Ngoài ra người ta cũng thấy sự giảm sút rất mạnh nhiều yếu tố sinh mạch, yếu tố tăng trưởng nội mạch (VEGF) trong các khối u vú được xử lý với CMV-p202/SN2 hoặc Ad-p202 khi so sánh với các cách điều trị đối chứng. Kết quả này cũng phù hợp với quan sát trước đây cho thấy sự biểu hiện p202 đã làm kiềm chế sự di căn và tạo mạch trong các khối u tuyến tụy. Vì thế, những kết quả trên lại càng khẳng định p202 là một gen trị liệu tiềm năng thích hợp cho gen trị liệu ung thư vú.

### **Mô hình ung thư tụy**

Ung thư tụy là loại ung thư “hiều chiến” cao và là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư tại các nước Phương Tây. Nguy cơ của bệnh này được dự đoán năm 1999 là có 28.000 trường hợp mắc mới được chẩn đoán và hầu hết các trường hợp đều có thể bị chết. Nguyên nhân chính là do sự tiên đoán quá nghèo nàn và khi bệnh nhân tới khám thì bệnh đã ở giai đoạn muộn. Thời gian sống sót trung bình dao động từ 4 đến 6 tháng và tỷ lệ sống sót 5 năm là dưới 2%. Hiện nay chưa có phương pháp nào điều trị hữu hiệu loại bệnh nguy hiểm này bởi vì các phương pháp điều trị thông thường như hóa trị và xạ trị thì cũng chỉ đạt được những kết quả rất hạn chế. Vì thế các chiến lược mới điều trị loại bệnh này là một nhu cầu khẩn thiết.

Các số liệu trước đây cho thấy p202 có khả năng kiềm chế biến nạp (ức chế tăng trưởng trong môi trường thạch mềm [soft agar] của các tế bào ung thư tuyến tụy - Pancreatic cancer cell - [Panc-1]) *in vitro*. Có khả năng là p202 kiềm chế sự sinh u *in vivo*. Để test hiệu ứng trị liệu của p202 trong các mô hình ghép ngoại lai ung thư tụy, các nhà khoa học đã thực hiện các thí nghiệm sinh u tại chính cơ quan thử nghiệm hoặc tạo dưới da trong các mô hình trên chuột thì thấy trong cả 2 mô hình, sự sinh u của các tế bào Panc-1 biểu hiện p202 đều giảm mạnh so với các tế bào ung thư tụy cha mẹ (parental). Đặc biệt trong mô hình gây ung thư tại cơ quan thực nghiệm - orthotopic) thì các tế bào Panc-1 biểu hiện p202 không những có tần suất tạo u thấp hơn mà những chuột có khối u lại có tỷ lệ sống sót cao hơn đáng kể so với những chuột mang u Panc-1. Những kết quả này đã chứng minh rõ ràng rằng p202 có hoạt tính kháng u một cách tiềm năng *in vivo*.

### **Kiểm chế di căn của p202**

Khi kiểm tra sự tăng trưởng khối u tụy người ta thấy 40% chuột mang khối u Panc-1 và 20% chuột mang khối u vec tơ đối chứng có di căn gan. Trái lại không có di căn gan nào được phát hiện ở chuột có các khối u biểu hiện p202. Kết quả này cho thấy p202 có thể có hoạt tính kháng di căn *in vivo*.

Để test giả thuyết này *in vitro*, người ta áp dụng một thí nghiệm buồng đôi (double chamber assay) trong đó các tế bào test phát hiện thấy ở buồng phía trên, còn buồng phía đáy thì được làm đầy với môi trường có chứa chất lôi cuốn hóa học

(chemoattractant) laminin. Một màng được lót bởi matrigel dùng để tách biệt giữa 2 buồng. Để dịch chuyển từ buồng trên xuống buồng dưới, các tế bào phải vượt qua các hàng rào (tức là phải kiến tạo lại khung màng cơ bản) bằng cách sản xuất ra các protease tiết như MMP trước khi xuyên qua các lỗ trên màng. Vì thế thí nghiệm này dường như là mô phỏng lại quá trình di căn và nhiều tế bào đã phát hiện thấy ở buồng dưới, vậy rõ ràng là các tế bào test có tiềm năng di căn.

Dựa trên quy luật này người ta thấy rằng các tế bào biểu hiện p202 ít có khả năng thâm nhập vào màng so với các tế bào Panc-1 cha mẹ. Quan sát *in vitro* này cũng phù hợp với những dẫn liệu *in vivo* và ủng hộ cho giả thuyết p202 kiềm chế di căn. Cũng giống như hoạt tính kháng di căn của p202, các nhà khoa học cũng phát hiện hoạt tính của MMP-2, một promoter di căn cũng giảm đi trong các tế bào Panc-1 biểu hiện p202.

### **Kiểm chế sự tạo mạch của p202**

Các tài liệu đã nêu rõ sự tăng trưởng và di căn của khối u đòi hỏi phải có sự tăng trưởng liên tục các mạch máu mới. Để kiểm tra xa hơn nữa hoạt tính kháng u qua trung gian p202 trong các khối u tuyến tụy người ta phải phân tích sự hình thành các mạch máu mới ở các khối u Panc-1 và các khối u biểu hiện p202. Các nhà khoa học phát hiện rằng nhiều mạch máu giảm đi đáng kể trong khối u biểu hiện p202 khi so sánh với khối u Panc-1. Phù hợp với giảm sự tạo mạch, các nhà khoa học khi phân tích hóa miễn dịch tổ chức cũng phát hiện rằng sự biểu hiện của các yếu tố tạo mạch như interleukin 8 (IL-8) và VEGF cũng giảm đi trong các khối u có biểu hiện p202. Vì p202 nhìn chung được hiểu là một chất điều hòa âm sự phiên mã nên phải test xem có sự kiềm chế của protein IL-8 hay VEGF trong khối u p202 hay không (vì p202 kiềm chế sự phiên mã). Các nhà khoa học cũng làm thí nghiệm với việc đồng thâm chuyển các vec tơ biểu hiện p202 cùng với luciferase được hướng dẫn bởi promoter IL-8 hay VEGF vào các tế bào Panc - 1. Thật thú vị khi phát hiện ra rằng sự thâm chuyển p202 đã gây ức chế hoạt tính của cả promoter IL-8 và VEGF. Vì thế quan sát này đã chứng tỏ được rằng p202 có gây kiềm chế biểu hiện IL-8 và VEGF ở mức độ phiên mã.

Tập hợp các dẫn liệu thu được có thể khẳng định được sự biểu hiện p202 có liên quan tới giảm tạo mạch và vì thế góp phần vào làm giảm tiềm năng tăng trưởng và di căn của các khối u biểu hiện p202.

### **Phân phối p202/liposom để kiểm chế tăng trưởng khối u trong mô hình ghép ngoại lai ung thư tụy**

Để test hiệu ứng trị liệu của việc xử lý với p202 trong mô hình gen trị liệu tiền lâm sàng, các nhà khoa học đã xử lý các khối u Panc - 1 dưới da bằng cách tiêm thẳng vào khối u CMV - p202 với một hệ thống chuyển gen phi virus SN2. Các nhà khoa học chứng minh rằng việc xử lý với CMV - p202/SN2 đã làm ức chế đáng kể sự tăng trưởng khối u khi so sánh với các xử lý đối chứng. Kiểm tra sinh thiết khối u bằng phương pháp hóa miễn dịch tổ chức người ta thấy mức biểu hiện protein p202 rất tương quan với phạm vi apoptosis trong các khối u được xử lý với CMV - p202/liposom. Như vậy lại một lần nữa cho thấy có sự phù hợp với ý kiến cho rằng apoptosis qua trung gian p202 cũng góp phần vào hoạt tính kháng u nói chung. Kết quả này đã cung cấp cơ sở khoa học cho các khảo sát xa hơn với việc áp dụng gen trị liệu cơ sở p202 trong điều trị ung thư tụy.

### **ĐỊNH HƯỚNG TƯƠNG LAI**



Trong chương này chúng ta đã tóm lược những phát hiện liên quan tới sự kiểm chế di căn bởi 2 gen liệu pháp là *E1A* và *p202*. Cả 2 gen này đều có tiềm năng kiểm chế sinh u, di căn và tạo mạch. Đối với *E1A*, các dẫn liệu sơ bộ thu được trong các TNLS pha II là rất khích lệ. Cả *E1A* và *p202* đều làm cho các TB ung thư nhạy cảm với apoptosis được cảm ứng bởi TNF- $\alpha$  hoặc chiếu xạ tia  $\gamma$  và dẫn đến tăng cường apoptosis. Những dẫn liệu này đã nêu được những lý do cần phải phát triển các trị liệu phối hợp *E1A* (hoặc *p202*) với TNF- $\alpha$  (hoặc chiếu xạ tia  $\gamma$ ) để có được hiệu ứng trị liệu tốt hơn so với việc sử dụng một tác nhân đơn lẻ. Có khả năng là *E1A* hoặc *p202* kết hợp với các tác nhân hóa trị sẽ làm hoạt hóa NF - kB để có thể làm tăng hiệu lực tiêu diệt khối u.

Hơn nữa, vì xử lý toàn hệ thống là điều bắt buộc khi điều trị các khối u di căn nên việc đích đặc hiệu sẽ làm tối thiểu hóa các hiệu ứng phụ tiềm tàng. Một cách để vượt qua trở ngại này là biểu hiện gen *E1A* hoặc *p202* phải được đặt dưới sự kiểm soát của một promoter đặc hiệu u hoặc được chuyển giao bằng một hệ thống chuyển gen đặc hiệu u. Vì sự biểu hiện đặc hiệu của *E1A* hay *p202* ở các vị trí u lại được kết hợp cùng với các tác nhân hóa trị liệu thích hợp nên đã làm các tế bào ung thư nhạy cảm với apoptosis và có lẽ sẽ làm tăng hiệu ứng tiêu diệt các khối u đã di căn.