

Zastosowanie wirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej

Application of oncolytic viruses in anti-cancer therapy

JUSTYNA AUGUSTYNIAK^{1/}, KRZYSZTOF SAWICKI^{1/}, MACIEJ SKRZYPCZAK^{2/}, LUCYNA KAPKA-SKRZYPCZAK^{1,3/}

^{1/} Samodzielna Pracownia Biologii Molekularnej Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie

^{2/} II Katedra i Klinika Ginekologii II Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Anglojęzycznym Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

^{3/} Katedra Zdrowia Publicznego Wyższej Szkoły Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie

O wykorzystaniu wirusów jako czynników przeciwnowotworowych zdecydował m.in. naturalny tropizm wirusów do komórek określonych tkanek i narządów oraz możliwość wprowadzania do ich genomów pożądanych modyfikacji genetycznych. Wirusy onkolityczne posiadają zdolność do replikacji w komórkach nowotworowych, prowadząc do ich lizy. Selektywność działania powoduje, że leczenie wirusami onkolitycznymi jest korzystniejsze niż inne metody stosowane w kuracji onkologicznej, a zwłaszcza mało selektywna konwencjonalna terapia przeciwnowotworowa. Początkowo wykorzystywano wirusy atenuowane, nie poddane modyfikacjom genetycznym. Drugą generację wirusów onkolitycznych stanowiły wirusy zawierające wprowadzony transgen, natomiast ich najnowsza generacja posiada dodatkowo zmodyfikowany kapsyd. Dobre efekty terapeutyczne u pacjentów onkologicznych dają też terapie wykorzystujące wirusy powodujące choroby zwierząt. Obecnie część prac doświadczalnych nad zastosowaniem wirusów onkolitycznych w leczeniu nowotworów znajduje się na etapie badań klinicznych.

Artykuł ten zawiera przegląd literatury dotyczącej wirusów onkolitycznych, uwzględniający najnowsze odkrycia w dziedzinie wirusoterapii oraz nawiązujący do wcześniejszych odkryć związanych z terapią nowotworów.

Słowa kluczowe: nowotwory, wektory wirusowe, wirusy modyfikowane genetycznie

Natural viral tropism to the cells of specified tissues and organs, as well as the possibility to insert desirable genetic modifications into their genomes, predispose them as anti-cancer factors. Oncolytic viruses are capable to replicate in cancer cells which leads to death of such cells. This specificity has an undeniable advantage over other tools in oncolytic therapy – especially in comparison with less selective conventional cancer therapy. The first type of oncolytic viruses used in therapy were attenuated viruses, but not modified genetically. The second generation contained a transgene in their genome, whereas the latest contained also a modified capsid.

The presented report contains a review of literature concerning oncolytic viruses, considering the latest discoveries in the field of virus therapy, and refers to earlier research related to cancer therapy of various origins, with the use of oncolytic viruses.

Key words: anticancer therapy, cancer, genetically modified viruses, oncolytic viruses, viral vectors

© Probl Hig Epidemiol 2012, 93(4): 654-662

www.phie.pl

Nadesłano: 07.09.2012

Zakwalifikowano do druku: 06.10.2012

Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr n. med. Lucyna Kapka-Skrzypczak

Samodzielna Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie

ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin; e-mail: lucynakapka@gmail.com

Wprowadzenie

Nowotwory są obecnie jedną z najczęstszych przyczyn zgonów ludzi w Polsce i na świecie. W ciągu ostatnich 20 lat obserwuje się stały wzrost zachorowalności na raka, związany w głównej mierze ze starzeniem się populacji ludzkiej [1]. Pomimo licznych badań dotyczących powodów powstawania, mechanizmów rozwoju oraz metod walki z chorobami nowotworowymi, nadal brak jest skutecznego postępowania gwarantującego całkowite wyleczenie. Wadą konwencjonalnych strategii leczenia nowotworów jest ich niska skuteczność, a także selektywność oraz częste remisje choroby po zakończeniu terapii. Niewielka efektywność konwencjonalnego podejścia w leczeniu

chorób nowotworowych stała się jedną z przyczyn poszukiwania alternatywnych sposobów terapii. Intensywne badania w dziedzinie genetyki, biologii nowotworów i biotechnologii umożliwiły m.in. lepsze zrozumienie mechanizmów kontrolujących cykl komórkowy i zidentyfikowanie czynników zaangażowanych w proces kancerogenezy. Z kolei poznanie natury wirusów i mechanizmów infekcji wirusowej stworzyło podstawę do rozwoju nowych metod terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem wirusów. Według definicji *National Cancer Institute* wirus onkolityczny to taki typ wirusa, który selektywnie infekuje i lizuje tylko komórki nowotworowe nie naruszając tym samym komórek prawidłowych [2]. Warunkiem

bezpiecznej terapii wirusowej jest zatem zastosowanie wirusów o wysokiej specyficzności względem strukturalnie i funkcjonalnie zmienionych komórek nowotworowych oraz wzmocnienie ich tropizmu na drodze modyfikacji genetycznych. Pożądana jest także taka modyfikacja wirusa, która umożliwi wywołanie lizy zainfekowanych komórek. Wektory wirusowe mogą stanowić nośnik dla czynników wywołujących śmierć komórki, indukować specyficzną odporność przeciwnowotworową bądź zwiększać wrażliwość komórek rakowych na chemioterapię [3]. Wektory takie tworzy się głównie w oparciu o adenowirusy, herpeswirusy, adenowirusy i retrowirusy [4].

Geneza zastosowania wirusów w onkologii

Koncepcja wykorzystania wirusów w terapii nowotworów narodziła się na początku XX wieku. W 1912 roku w zaledwie kilkanaście lat po odkryciu pierwszego wirusa włoski ginekolog Nicola De Pace przedstawił ciekawy przypadek pacjentki, u której nastąpiła spontaniczna remisja raka szyjki macicy [5]. Lekarz powiązał regresję guza z wcześniejszym podaniem pacjentce atenuowanej szczepionki na wścieklicznę. Był to pierwszy udokumentowany przypadek remisji nowotworu związany z onkolitycznymi właściwościami wirusa [6]. De Pace zachęcony wcześniejszym odkryciem przeprowadził kolejne badania u następnych ośmiu pacjentów chorych na raka, niestety nie uzyskał zadowalających rezultatów [5]. Następnie w latach dwudziestych zrealizowano kolejne eksperymenty potwierdzające zdolność wirusów do infekowania i lizy nowotworów [7]. W 1922 roku Levaditi i Nicolau opublikowali wyniki badań, w których zaprezentowali zdolność wirusów krowianki i opryszczki do replikacji w guzach i mięśniakach skóry myszy. Naukowcy zauważyli, że nowotwory zarażone wirusem rosły wolniej w porównaniu do kontroli [8]. Podobne wyniki zaobserwowano również w przypadku chłoniaka Burkhitza i choroby Hodgkina zainfekowanego wirusem odry [9]. Na podstawie tych obserwacji zaczęto stosować wiroterapię u pacjentów chorych na raka, jednakże bez większych sukcesów. Na negatywny wynik badań wpłynęło powstawanie stanów zapalnych w zdrowych tkankach organizmu pacjenta [10]. W kolejnych latach ogromny wpływ na postęp badań miał rozwój technik mikroskopowych i metod hodowli komórkowej. Ułatwiło to procedurę izolacji i scharakteryzowania poszczególnych wirusów. Punktem zwrotnym okazały się eksperymenty Moore'a zaprezentowane w 1949 roku. Wyniki badań jednoznacznie przedstawiały całkowitą i selektywną lizę mysich komórek mięśniaka, którego zainfekowano wirusem Dalekowschodniego Zapalenia Mózgu. Moore rozszerzając badania na pięć innych typów mysich guzów potwierdził, że zniszczenia ograniczały się jedynie do nowotworu. Pomimo że, ostatecznie myszy umarły na zapalenie mózgu, to definitywnie

rozpoczęła się era badań nad wirusami onkolitycznymi [10]. Wraz z opracowaniem nowych modeli i metod replikacji wirusa w latach 50. i 60. przetestowano wiele wirusów pod kątem skuteczności u pacjentów chorych na raka [11, 12]. Jednym z najbardziej znaczących badań klinicznych była terapia zaprezentowana w 1956 r. przez *National Cancer Institute*, w której pacjentkom chorym na raka szyjki macicy wstrzykiwano różne serotypy dzikiego typu adenowirusa. U ponad połowy pacjentek, u których podano adenowirusa nastąpiła regresja guza bez widocznych skutków ubocznych. Podczas gdy nie zaobserwowano żadnych zmian w grupie kontrolnej leczonej nieaktywną formą wirusa. Jednakże u wszystkich pacjentek w krótkim czasie po pierwotnej regresji, nastąpiła wtórna progresja nowotworu [7]. Następnie w latach 60. i 70. XX w. z powodu braku obiecujących wyników, niskiej skuteczności i przez wysoki odsetek powikłań wynikających z zastosowania dzikich typów wirusów zrezygnowano z terapii z zastosowaniem wirusów onkolitycznych [8, 11]. Na kolejny przełom w tej dziedzinie należało poczekać, aż do momentu rozwoju ery inżynierii genetycznej [13]. Pod koniec lat dziewięćdziesiątych XX w. nastąpił znaczny przełom w wiroterapii, w dużej mierze za sprawą szczegółowego zapoznania się naukowców z interakcjami pomiędzy wirusem, a gospodarzem, a także zgłębienia biologii molekularnej nowotworów. Te osiągnięcia doprowadziły do wznowienia prac nad terapeutycznym wirusem onkolitycznym i w relatywnie krótkim czasie do rozpoczęcia badań klinicznych na ludziach [12]. Pierwszym genetycznie zmodyfikowanym wirusem onkolitycznym był wirus brodawczaka HSV-1 z delecją genu kinazy tymidynowej [14], atenuowaną neurowirusulencją i tropizmem do mysiego glejaka [15]. Kilka lat później adenowirus Onyx 015 stał się pierwszym zmodyfikowanym wirusem onkolitycznym, który przetestowano w badaniach klinicznych na pacjentach chorych na raka. W międzyczasie odkryto, że pewne RNA wirusy, bądź ich naturalnie występujące atenuowane mutanty posiadają wrodzony tropizm do nowotworu [16]. W 2005 adenowirus H101 z delecją genu E1B 55K zatwierdzono jako pierwszy na świecie wirus onkolityczny stosowany w terapii nowotworów głowy i szyi w skojarzeniu z chemioterapią [17].

Wirusy onkolityczne

Terapia onkolityczna oparta jest na naturalnej zdolności wirusów do infekowania, replikacji, a ostatecznie do lizy komórek gospodarza [18]. Ogólnie wirusy onkolityczne można podzielić na dwie grupy: naturalnie występujące m.in. dwuniciowe RNA wirusy (np. Reowirus), jednoniciowe RNA wirusy (np. NDV; VSV), a także genetycznie zmodyfikowane DNA wirusy (Adenowirus, Vaccinia, HSV) [19, 20]. Naturalnie występujące czy genetycznie zmodyfikowane wirusy onkolityczne w teorii posiadają terapeutyczną prze-

wagę w porównaniu do standardowych metod leczenia nowotworu [14]. Wraz z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej, a także wraz ze wzrostem zrozumienia funkcjonowania replikacji wirusów, zdolność do projektowania nowych wirusów onkolitycznych wydaje się być nie ograniczona, a sama metoda bardzo obiecująca [9]. Jedynie kilka wirusów posiada naturalne preferencje do replikowania się w komórkach nowotworowych. Niektóre zaś nabierają takiego tropizmu dopiero po serii pasażów przeprowadzonych na nowotworowych liniach komórkowych np. wirus odry, świnki, NDV, VSV, reowirus. Jednakże wiele wirusów jest pozbawione narzędzi do selektywnego wiązania się z epitopami komórek nowotworowych. Aby zaadaptować takie wirusy do terapii onkolitycznych, należy zmienić ich naturalny tropizm poprzez modyfikacje genetyczne bądź modyfikacje białek powierzchniowych wirionu [19, 21]. Dodatkowo do genomu wirusowego wprowadza się także geny samobójcze czy geny kodujące stymulatory immunologiczne [9]. Takie wirusy działają bezpośrednio, specyficznie niszcząc komórki nowotworowe bądź stymulując i wzmacniając odpowiedź immunologiczną [22, 23]. W ciągu ostatniej dekady wiele wirusów onkolitycznych było analizowanych pod kątem wykorzystania jako potencjalnej metody leczenia raka, a niektóre z nich są nadal w trakcie badań klinicznych. Na atrakcyjność tej metody wpływa fakt że terapię wirusową można jednocześnie połączyć ze standardowymi lekami przeciwnowotworowymi stosowanymi w chemioterapii. Adenowirusy, herpeswirusy i reowirusy są intensywnie badane od lat, natomiast badania wirusa krowianki i parvovirusów są na etapie wstępnym [24].

Strategie zastosowania wirusów onkolitycznych

W terapii przeciwnowotworowej wykorzystującej wirusy onkolityczne stosuje się różne strategie. Pierwsza metoda nazywana ukierunkowaniem transdukcyjnym opiera się na wybiórczym rozpoznawaniu przez cząsteczki adaptorowe znajdujące się na powierzchni wirusa konkretnych epitopów komórek guza, zapewniając tym samym bezpieczeństwo dla komórek prawidłowych [25]. Jest to bardzo ciekawa metoda specyficzna zarówno dla wirusa jak i dla komórki rakowej. Cząsteczka adaptorowa zawiera dwie domeny: jedną połączoną z wirionem i drugą łączącą się z konkretnym epitopem na powierzchni komórki. Skład takiego białka może być bardzo urozmaicony, w zależności od charakteru domen. Domena wiążąca wirus w swojej budowie zawiera rozpuszczalne części receptora tzw. pseudoreceptor, polimery np. PEG, fragmenty przeciwciał w tym scFvs czy Fab. Część z zastosowanych cząsteczek adaptorowych są to naturalne peptydy, ligandy witaminowe, a także fragmenty przeciwciał scFvs czy Fabs. Specyfika dwóch różnych antygenów jest osiągnięta albo poprzez połączenie

chemicznie ramion, bądź poprzez połączenie dwóch części w jedno białko, często z elastycznym elementem łączącym. Domeny łączące się z epitopami przeważnie są zakończone C końcami [21]. Przykładem takich modyfikacji jest wirus HSV-1, który posiada tak zmodyfikowane białko powierzchniowe, aby rozpoznawać receptory powierzchniowe na interleukine-13 (IL-13) znajdujące się na komórkach nowotworowych guza mózgu. Metoda ta dzięki zamianie tropizmu wirusa oferuje również wykorzystanie bardziej wirulentnych wirusów [26]. W przypadku wirusa Odry zmodyfikowano białko receptorowe H (Hemaglutynine), tak aby pełniło funkcje liganda receptorów czynników wzrostu [24].

W drugiej strategii określanej mianem ukierunkowania transkrypcyjnego, wirusy są poddawane modyfikacjom genetycznym, które sprawiają, że aktywacja czyli transkrypcja ich genów staje się możliwa wyłącznie w komórkach nowotworowych. Selektowność ta jest uzyskiwana na drodze modyfikacji genetycznych wirusa, gdzie w genom wirusowy wprowadza się promotor charakterystyczny dla danego nowotworu kontrolujący ekspresję genów istotnych dla replikacji wirusa [26]. Metoda ta jest najbardziej dostosowana dla wirusów, u których w terapii stosuje się maksymalne dawki tolerancyjne [16]. Przykładem takim jest zmodyfikowany adenowirus posiadający ograniczoną ekspresję genów E1A i E1B, wykorzystujący promotory specyficzne dla prostaty takie jak antygen PSA, promotor probazyny i kombinacje obu tych promotorów [25]. Selektowną ekspresję białka E1A próbowano także w raku wątrobykomórkowym (promotor Alfa fetoprotein), i raku piersi (promotor mucyn-1 i promotor receptora estrogeny). Ponadto w modyfikacjach genetycznych adenowirusa wykorzystywano promotor telomerazy i promotor elementów odpowiedzi na czynniki indukowane hipoksją (HRE). Z kolei w przypadku wirusa HSV umieszczono ekspresję istotnych wczesnych genów ICP4 pod kontrolą promotora albuminy, ograniczając replikację tylko do komórek raka wątrobykomórkowego. W podobnym badaniu promotor kalponiny wykorzystano w modyfikacji wirusa HSV, który selektywnie replikował się tylko w ludzkich nowotworowych tkankach miękkich i guzach kości [26].

Inny mechanizm dzięki któremu wirusy onkolityczne przyczyniają się do śmierci komórek nowotworowych to inicjowanie specyficznej i niespecyficznej przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Komórki nowotworowe są z natury mało immunogenne, gdyż posiadają niski poziom antygenów kompleksu zgodności tkankowej aktywujących lokalną odpowiedź immunologiczną. Słabo również indukują sygnały pobudzające cytokiny. W czasie replikacji adenowirusów wytwarzane jest białko E1A, które zwiększa wrażliwość komórek na czynnik martwicy nowotworu (TNF) [27]. Indukcja specyficznej odpowiedzi immu-

nologicznej może przyczynić się do długotrwałej obrony przed nawrotem nowotworu. Peptydy wirusowe są prezentowane na powierzchni komórek z kompleksem białek MHC klasy I głównego kompleksu zgodności tkankowej. Kompleks ten rozpoznawany jest przez limfocyty cytotoksyczne (CTL), które niszczą transdukowane wirusem komórki nowotworowe [28].

Większe zainteresowanie wirusami onkolitycznymi wiąże się z docenieniem ich potencjału terapeutycznego. Jest to szczególnie widoczne w przypadku wirusa krowianki, gdzie zdolność do szybkiego i destrukcyjnego rozprzestrzeniania się w tkance docelowej oraz zdolność do wytwarzania silnej odpowiedzi immunologicznej sprawia, że wirus ten staje się potężnym narzędziem immunoterapii nowotworów [29]. Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że odpowiedź immunologiczna gospodarza może mieć kluczowe znaczenie dla skuteczności terapii. Chociaż odpowiedź organizmu może szybko ograniczyć replikację wirusa, obniżając tym samym skuteczność leczenia. Należy również pamiętać, że może wywołać silne efekty immunologiczne niszczące te komórki raka, które nie uległy lizie w wyniku infekcji wirusowej [30].

Molekularne podstawy replikacji wirusa wewnątrz komórki nowotworowej

W konstrukcji wirusa onkolitycznego postanowiono uwzględnić aktywność komórkową telomerazy. Aktywacja telomerazy uważana jest za istotny krok w procesie kancerogenezy poprzez wydłużanie końców telomerowych, a jej aktywność jest ściśle związana z ekspresją ludzkiej odwrotnej transkryptazy telomerazy (hTERT) [31]. Gen hTERT koduje katalityczną podjednostkę białkową telomerazy (polimerazę), która wydłuża i stabilizuje końce telomerów. Białko to podlega silnej ekspresji tylko w komórkach nowotworowych [32]. Zidentyfikowano wiele czynników, które pośrednio bądź bezpośrednio regulują promotor hTERT. Są to m. in. komórkowe aktywatory transkrypcji (c-Myc, Sp1, HIF-1, AP2, ER, Ets), a także represory transkrypcji, których większość z nich stanowi produkty genów supresorowych nowotworu, takich jak m.in. białko p53 czy WT1 [33]. Wirus OBP-301 (Telomelizyna) zmodyfikowany adenowirus typu 5 posiada w swoim genomie promotor hTERT, który kontroluje ekspresję genów wirusowych E1A i E1B, geny te dodatkowo są połączone w genomie z sekwencją IRES [34]. Ponadto Telomelizyna jest pierwszym replikacyjno-kompetentnym adenowirusem, który utrzymuje w pełni funkcjonalny wirusowy region E3 [32]. W sytuacji, gdy komórki nowotworowe posiadają naturalnie zwiększoną aktywność telomerazy, aktywują promotor (hTERT), zmuszając aparat komórkowy do syntezy przede wszystkim białek wirusowych. Przez co prowadzą do selektywnej replikacji i onkolitycznej śmierci komórek nowotworowych [31]. Badania *in vitro* potwierdziły wybiórczą infekcję i bezpośrednią cytolizę

tylko w komórkach nowotworowych. W doświadczeniach przeprowadzonych na zwierzętach bezpośrednia iniekcja wirusa do guza wirusa Telomelizyny przejawiała aktywność przeciwnowotworową bez znaczącej toksyczności dla zdrowych organów. Zaobserwowano także obecność białek wirusowych, a zatem replikację wirusa w tkankach nowotworowych znajdujących się poza miejscem wstrzyknięcia [32]. Pierwsza faza badań klinicznych wirusa OBP-301 u pacjentów z zaawansowanym zwartym guzem zostały niedawno zakończone, raporty wskazują że wirus ten jest dobrze tolerowany przez pacjentów chorych na raka [34].

Kolejny mechanizm za pomocą, którego wirusy onkolityczne mogą niszczyć komórki nowotworowe to synteza białek podczas replikacji wirusa, które są bezpośrednio cytotoksyczne dla komórek nowotworowych. Przykładowo adenowirusy typu 5 kodują gen dla białka E3 i gen dla białka E4orf4, których ekspresja przyczynia się do śmierci komórek nowotworowych [35, 36]. Białko E3 11,6 kDa kodowane przez adenowirusy bierze udział w ubikwitynacji, będącej procesem powstawania łańcuchów poliubikwitynowych, które są sygnałem do degradacji białek [37]. Również białko E4orf4 14 kDa kodowane przez 4 otwarte ramki odczytu w regionie E4 genomu adenowirusów, współpracuje z wirusowym białkiem E1A i promuje śmierć komórki przez apoptozę w przypadku niewystarczającej ekspresji białka p53 [38]. Indukcja apoptozy przez białko E4orf4 adenowirusa jest specyficzne dla komórek zarażonych wirusem, wymaga interakcji z białkiem fosfatazy PP2A [39] i przebiega w szlaku niezależnym od białka p53 [35]. Białko to aktywuje kaspazę-8 oraz aktywuje szlak FADD wywołujący śmierć komórek nowotworowych. Molekularny mechanizm śmierci komórek raka za pośrednictwem białka E4orf4 kodowanego przez adenowirusa może stać się, więc nową strategią terapii nowotworów [40].

Przykłady zastosowania terapii wirusowej w leczeniu różnych typów nowotworów

Rak prostaty jest drugim w kolejności najczęstszym nowotworem powodującym śmierć u mężczyzn [41]. Nawrót choroby następuje przy zastosowaniu konwencjonalnej terapii w ciągu 5 lat u 14-34% pacjentów. Dlatego też konieczne jest poszukiwanie nowych metod leczenia. Zwłaszcza, że brak jest skutecznej terapii dla miejscowo zaawansowanego lub przerzutowego raka prostaty. Nowotwór ten jest obiecującym celem terapii wirusowej, gdyż guz jest łatwo dostępny dla metod terapeutycznych. Zastrzyki zawierające wirusa można wprowadzić miejscowo do guza, a dzięki nieinwazyjnym technikom takim jak USG czy rezonans magnetyczny można łatwo monitorować postęp leczenia. W terapii wirusowej tego nowotworu stosuje się wirus odry, którego zaletą jest możliwość łatwej modyfikacji genetycznej z jednoczesnym zachowaniem znacznej aktywności onkolitycznej. Określenie

ekspresji genów wirusa odry w komórkach guza stało się możliwe poprzez jego modyfikację genetyczną. Do wirusa wprowadzono gen kodujący antygen płodoworakowy (CEA), który jest rozpuszczalnym markerem nie posiadającym aktywności biologicznej, a jego normalne stężenie w surowicy krwi wynosi 3 ng/ml. Replikacja zmodyfikowanego wirusa odry w komórkach nowotworowych skutkowałą produkcją tego antygeny do surowicy krwi, którą następnie można było bardzo łatwo oznaczyć, a pośrednio określić ekspresję genów wirusa [42]. Przeciwnowotworowe działanie wirusa odry było analizowane także w przypadku szpiczaka mnogiego oraz czerniaka i obecnie znajduje się w trakcie badań klinicznych [9].

W terapii czerniaka wirus odry powodował uwolnienie cytokin zapalnych, wzmacniał wrodzone działanie przeciwnowotworowe organizmu człowieka oraz przyczyniał się do apoptozy komórek nowotworowych [43].

Wirus opryszczki (*Herpes Simplex Virus*) jak dotąd wykorzystywany jako wektor wirusowy w eksperymentalnych terapiach genowych m.in. raka jajnika i raka szyjki macicy znalazł zastosowanie jako wirus onkolityczny. HSV jest bezpieczny oraz efektywny i może być łatwo manipulowany tak, aby preferował replikację tylko w komórkach nowotworowych. Może być również stosowany w przypadku nowotworów trudno dostępnych o wysokiej agresywności [44]. W niektórych modelach zwierzęcych nowotworów systemowych, wykazano uzyskanie specyficznej odpowiedzi immunologicznej przy udziale zmodyfikowanego genetycznie wirusa HSV-1 [45]. Jest to neurotropowy wirus DNA, posiadający korzystne właściwości użyteczne zarówno w terapiach genowych, jak i onkolitycznych. Wirus HSV-1 jest wirusem bardzo szybko rozprzestrzeniającym się po całym organizmie. Uzyskana poprzez manipulacje genetyczne selektywność naturalnie cytotoksycznego wirusa HSV-1, sprawia, że staje się on dobrym kandydatem na efektywny wirus onkolityczny. Zaletami tego wirusa są ponadto: duży rozmiar genomu (152 kb, zawierający ponad 80 genów) [16], wysoka zdolność infekowania komórek, mechanizm kontroli replikacji oraz brak genu kinazy tymidynowej. Delecja genu kinazy tymidynowej powoduje, że wirus może wydajnie replikować się tylko w komórkach pod kontrolą szlaku sygnałowego EGFR/Ras, który jest powszechny w komórkach nowotworowych [13]. Takie cechy wirusa HSV-1 dają, więc bardzo duże możliwości skutecznej walki z nowotworami mózgu [46].

Z kolei wirus (NDV) powodujący rzekomy pomór drobiu (Choroba Newcastle) posiada interesujące właściwości przeciwnowotworowe i stymulujące dla układu immunologicznego [47]. Naukowcy zainteresowali się tym wirusem ze względu na jego zdolności do zdecydowanie szybszej replikacji w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowych.

Wirus NDV potrafi replikować się 10000 razy szybciej w komórkach zmienionych nowotworowo niż w większości komórek prawidłowych. Pierwsze doniesienia o efektywności wirusa w leczeniu nowotworów pojawiły się w literaturze w latach 50, wstrzyknięto wtedy wirus NDV i adenowirus bezpośrednio do guza macicy, w rezultacie nastąpiła częściowa nekroza i złuszczenie komórek. Jednakże po pewnym czasie nowotwór wrócił do pierwotnych rozmiarów. Mogło to być spowodowane produkcją przeciwciał neutralizujących, które hamowały aktywność onkolityczną wirusa NDV. Następnie w ciągu kolejnych lat pojawiło się wiele kolejnych doniesień w literaturze świadczących o możliwości wykorzystania wirusa NDV w leczeniu nowotworów [48]. Obiecujące rezultaty przyniosły badania kliniczne w którym stosowano szczepionkę zawierającą atenuowany szczep MTH-68/N wirusa NDV u pacjentów z zaawansowanymi nowotworami. Pośród 55% pacjentów którym podawano wirusa zaobserwowano korzystne efekty (regresje guza i brak przerzutów). Ponadto zaobserwowano u nich większą przeżywalność w ciągu kolejnych dwóch lat. Co więcej u znacznej liczby pacjentów w porównaniu do kontroli, której podawano placebo poprawiło się samopoczucie (u 45% pacjentów) i zmniejszyła się odczuwalność bólu (u 33% pacjentów). Prawdopodobny przeciwnowotworowy mechanizm działania atenuowanego wirusa NDV może polegać na stymulacji immunologicznej i uwalnianiu cytokin prozapalnych (IFN; TNF; IL-1) [49].

Dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej uzyskano formę wirusa zdolnego do infekowania i zabijania komórek glejaków złośliwych. Wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (VSV) w naturalnej postaci zabija komórki różnych typy nowotworów, ale jest niebezpieczny dla całego organizmu. Dlatego też dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej stworzono mutantą wirusa VSV Δ M51 z delecją pojedynczego aminokwasu metioniny w białku wirusowym M. Jedną z funkcji tego białka jest blokowanie transportu mRNA IFN β z jądra do cytoplazmy, zapobiegając tym samym odpowiedzi komórki na interferon. Delecja 51 metioniny w białku M wirusa VSV Δ M51 znosi blokowanie i przywraca odpowiedź komórki na INF. Dzięki modyfikacji genetycznej wirus VSV zakazał i zabijał jedynie komórki nowotworowe ze względu na upośledzony szlak interferonowy.

W badaniach nad możliwością wykorzystania mutantów wirusa VSV w leczeniu glejaków złośliwych, oceniono podatność 14 linii komórkowych glejaków złośliwych na działanie zmodyfikowanego wirusa i otrzymano pozytywne wyniki. Ponadto mutantą wirusa VSV badano na mysim modelu raka jajnika oraz raka jelita grubego. Zmodyfikowany wirus, podawany ustrojowo dożylnie doprowadził do pełnego i trwałego wyleczenia większości zwierząt łącznie z przypadkami nowotworu, które były wielogniskowe i przerzutujące

[50]. Wyzwaniem związanym z tym rodzajem terapii jest konieczność rozwoju trwałej odpowiedzi immunologicznej w stosunku do guza nowotworowego. Wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej jest prototypem wirusa onkolitycznego, który reprezentuje różne mechanizmy lityczne w tym: bezpośrednią lizę komórek, niedotlenienie guza nowotworowego wynikającego z faktu zniszczenia naczyń guza oraz uwolnienie cytokin zapalnych. Pomimo tych właściwości, wytwarzanie trwałej odporności przeciwnowotworowej możliwe jest tylko w sytuacji, gdy zmodyfikowany wirus na powierzchni wirionu prezentuje antygen nowotworowy. Leveille i wsp. starali się w warunkach *in vitro* zwiększyć liczbę związanych z nowotworem komórek dendrytycznych oraz poprawić prezentację antygenów nowotworowych poprzez połączenie terapii wirusem onkolitycznym z rekombinowanym ligandem (rFlt3L Fms-like tyrosine kinase 3 ligand). Czynnikiem ten jest odpowiedzialnym za wzrost i rozprzestrzenianie się komórek dendrytycznych. Wyniki uzyskane przez Leveille i wsp. pokazują, że wirus VSV zaburza funkcje komórek dendrytycznych i blokuje prezentację antygenów nowotworowych, przez co nie jest zdolny do wytworzenia trwałej odporności przeciwnowotworowej [51].

Skuteczność terapeutyczną zmodyfikowanego genetycznie wirusa Vaccinia GLV-1h68 przeanalizowano na dwóch liniach raka wątrobowo-komórkowego: HuH7 i PLC/PRF/5 (PLC) jak również na ksenogennym modelu nowotworu. W przeprowadzonych badaniach pod kątem proliferacji i cytotoksyczności wykazano zdolność wirusa GLV-1h68 do kolonizacji, replikacji i lizy komórek nowotworowych. Podanie wirusa GLV-1h68 myszy doprowadziło już po pierwszej iniekcji do znacznego zmniejszenia wielkości guza pierwotnego w stosunku do kontroli. Ponadto replikacja wirusa GLV-1h68 wyzwoliła silną odpowiedź immunologiczną i powstanie odczynu zapalnego. W miejscu zapalenia wykryto różne rodzaje cytokin prozapalnych i znaczną kumulację komórek immunologicznie kompetentnych. Co więcej, wykazano że infekcja komórek nowotworowych PLC wirusem GLV-1h68 przyczyniła się do znacznego zmniejszenia gęstości naczyń krwionośnych. Optymistyczne efekty badań wskazują na to, że wirus vaccinia GLV-1h68 posiada ogromny potencjał w terapii raka wątroby u ludzi [52].

Zespół Curiela z *Gene Therapy Center w University of Alabama* opracował adenowirusy wiążące się z komórkowymi białkami transbłonowymi, zwanymi integrzynami. Cząsteczki te ułatwiają komórkom przywieranie do siateczki tkanki łącznej, zwanej macierzą zewnątrzkomórkową, organizującej komórki w spójną tkankę. Chociaż integryny są wytwarzane również przez zdrowe komórki, to wykazano nasilenie syntezy tego białka w komórkach guza tworzącego przerzuty. Grupa badaczy z University of Alabama uzyskała obiecujące wyniki, podając zmodyfikowane wirusy my-

szom z indukowanym ludzkim rakiem jajnika. Wirusy selektywnie replikowały się i zabijały tylko komórki zmienione nowotworowo, dzięki czemu następowała remisja choroby [53].

Z kolei w przypadku terapii wirusowej czerniaka naukowcom udało się wprowadzić zmiany w genomie adenowirusa, w których promotor enzymu z melanocytu został połączony z genami niezbędnymi wirusowi do replikacji. Odpowiedni komplet czynników transkrypcyjnych aktywował promotor, a przez to uruchamiał syntezę istotnych białek dla wirusa. Dzięki czemu wirus mógł replikować się wyłącznie wewnątrz melanocytów. Obecnie trwają prace nad włączeniem w genom adenowirusów rozmaitych promotorów, ograniczających ich działanie do określonych narządów lub tkanek [53]. Wiele badań wykazało bardzo dobre cechy adenowirusów w leczeniu guzów nowotworowych opornych na dotychczasowe metody leczenia. Rein i wsp. przeprowadzili eksperyment dotyczący wpływu wirusa onkolitycznego u pacjentów z opornym na chemioterapię rakiem jajnika. Okazało się, że adenowirus Ad5/3MDR1E1 jest skutecznym i bezpiecznym sposobem terapii komórek nowotworowych charakteryzujących się wielolekową opornością [27]. Jednakże z drugiej strony niepokojące wydają się doniesienia w literaturze opisujące przypadki nabycia oporności nowotworów na adenowirusy onkolityczne [54].

Skuteczność terapii z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych

Chociaż skuteczność wirusów onkolitycznych została wykazana na modelach zwierzęcych, to w przypadku ludzi efekt ten jest już dużo mniejszy, zwłaszcza biorąc pod uwagę zastosowanie monoterapii. Aby zwiększyć skuteczność działania wirusów onkolitycznych postuluje się wykorzystanie ich w kuracji skojarzonej z innymi metodami. Pierwsza strategia zakłada wykorzystanie wirusów onkolitycznych w połączeniu ze standardową chemioterapią i radioterapią. Druga strategia obejmuje identyfikację i ukierunkowanie na czynniki ograniczające aktywność wirusów onkolitycznych. Z kolei trzecie podejście zakłada wykorzystanie wirusów onkolitycznych do wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej organizmu, oraz uzyskaniu synergii z innymi formami immunoterapii nowotworów. Pomimo, że najłatwiejszą drogą wydaje się skojarzenie terapii wirusowej z chemioterapią czy radioterapią to w przypadku niektórych chemioterapeutyków czy promieniowania może to negatywnie wpływać na replikację wirusa, a przez co na całą metodę leczenia [22].

Biorąc pod uwagę liczne doświadczenia w onkologii, zastosowanie monoterapii rzadko okazuje się skuteczne, szczególnie w przypadku zaawansowanych stadiów choroby. Połączenie wielu rodzajów leczenia sprawiło znaczną poprawę w zakresie standardowych zabiegów pielęgnacyjnych dla wielu typów raka. Pierwsze kuracje łączone stanowiły połączenie kil-

ku chemioterapeutyków. Wraz z rozwojem bardziej selektywnych substancji, lepsze rezultaty dawało wykorzystanie nowych leków, mniej toksycznych w połączeniu z bardziej klasycznymi cytostatykami. Włączenie wirusów onkolitycznych do chemioterapii może również prowadzić do synergistycznego oddziaływania pomimo odmiennego mechanizmu aktywności. Sukces kombinacji wirusa onkolitycznego i chemioterapeutyka zależy w dużej mierze od wyboru konkretnego wirusa i substancji czynnej w zależności od typu i stadia zaawansowania nowotworu. Poznanie mechanizmów synergii będzie bardzo istotne w celu maksymalizacji efektywności terapeutycznej wirus-lek. Część prowadzonych badań klinicznych jest obecnie skierowana na wzrost synergii pomiędzy wirusami onkolitycznymi, a konkretną chemioterapią [55]. Dequchi i wsp. badań skojarzenie onkolitycznego wirusa HSV z inhibitorem angiogenezy Bevacizumabem i otrzymał bardzo dobre wyniki w leczeniu raka żołądka. Bewacizumab nie wpływał bezpośrednio na replikację wirusa, a poprzez hamowanie angiogenezy guza zapobiegał ogólnoustrojowemu rozprzestrzenianiu się wirusa HSV na zdrowe tkanki [56]. Z kolei w celu zwiększenia skuteczności adenowirusów onkolitycznych zaproponowano zastosowanie blokerów kanału wapniowego w tym Werapamilu. Badania przeprowadzone na zwierzętach i ludziach wykazały, że jest on bezpieczny i bardzo dobrze tolerowany. Prowadzi do zwiększenia miana wirusa we krwi, co powoduje zwiększenie ogólnej replikacji adenowirusów w nowotworach [57]. Połączenie wirusoterapii ze standardowymi terapiami, takimi jak radioterapia, wydają się także bardzo interesującym połączeniem. Dane przedkliniczne są obiecujące, wirusy onkolityczne w skojarzeniu z radioterapią wykazują działanie addycyjne bądź synergistyczne – zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Wirusy mogą funkcjonować jako czynniki radiouczulające, zaś promieniowanie może poprawiać aktywność wirusa onkolitycznego poprzez zwiększenie absorpcji, replikacji czy ekspresji genów. Jak do tej pory zakończono I i II fazę badań klinicznych analizującą kombinacje zastosowania wirusów i radioterapii, a obecnie trwają badania fazy III na szerszej grupie pacjentów onkologicznych [58].

Wyzwania dla terapii z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych

Wirusy onkolityczne przed zainfekowaniem komórek nowotworowych muszą pokonać pewne naturalne mechanizmy zapobiegające gwałtownemu rozprzestrzenianiu się wirusa w organizmie. Jest to m.in. wrodzona odpowiedź immunologiczna (przeciwciała, układ dopełniacza, makrofagi), przeciwwirusowa odpowiedź komórkowa (interferony), bariery fizyko-chemiczne (np. przepływ krwi, niedotlenienie, odczyn pH). Czynność układu immunologicznego stanowi istotną przeszkodę w zakażeniu wirusem guzów

nowotworowych, co w konsekwencji obniża skuteczność prowadzonej terapii [22]. Kluczowym aspektem tej metody jest dotarcie wirusa terapeutycznego do komórek docelowych przed zniszczeniem przez układ immunologiczny. Koniecznością stało się, więc wykorzystanie komórek nośnikowych w transporcie wirusów do komórek nowotworowych. Transport ten jest oparty na naturalnych mechanizmach wykorzystywanych przez patogeny atakujące organizm gospodarza, w którym patogeny po wnikięciu do organizmu wykorzystują normalne komórki gospodarza, do natychmiastowego lub opóźnionego uniknięcia neutralizacji przez składniki surowicy. Do przenoszenia wirusów do komórek nowotworowych guza można wykorzystać m.in. limfocyty T oraz makrofagi [59].

Kolejnym wyzwaniem klinicznego zastosowania wirusów onkolitycznych jest również brak metod pomiaru kinetyki ekspresji genów wirusowych. Znajomość tych parametrów pozwala na szczegółowe zaplanowanie leczenia, optymalizację dawkowania oraz wyznaczenie odstępu czasu pomiędzy kolejnymi cyklami kuracji, umożliwia także dostosować metody terapii do poszczególnych pacjentów. Popularną techniką pomiaru replikacji wirusów onkolitycznych *in vitro* i *in vivo* jest modyfikacja genomu wirusa poprzez wprowadzenie genu reporterowego lucyferazy. Umożliwia on nieinwazyjny pomiar bioluminescencji procesu replikacji wirusa w komórce [42].

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykorzystujące wirusy w terapii przeciwnowotworowej przynoszą bardzo obiecujące wyniki. Wirusy onkolityczne posiadają wiele cech, których zalety przewyższają konwencjonalne leczenie. Warto podkreślić konieczność szukania nowych sposobów terapii ze względu na fakt wzrostu liczebności zachorowań na nowotwory i na niezadowalające rezultaty obecnych metod leczenia, a zwłaszcza częstych nawrotów choroby. Należy także zwrócić uwagę na to, że terapia wykorzystująca wirusy zwiększa szanse przeżycia w przypadku przerzutów, guzów nieoperacyjnych oraz nowotworów o wysokim stadium zaawansowania i bardzo złym rokowaniu. Istotnym wyzwaniem dla tej metody jest opracowanie bezpiecznych wektorów wirusowych uśmiercających zakażone komórki. Terapia ta musi być niezwykle precyzyjna, gdyż zniszczenie niewłaściwych komórek może nieść ze sobą poważne skutki dla zdrowia i życia pacjenta. Głównym celem jest więc minimalizacja działań niepożądanych [53]. Gdy za cel bierze się wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej od dawna proponuje się zastosowanie synergii wirusów onkolitycznych w połączeniu z innymi wirusami. W warunkach, gdy jeden wirus rozwija odpowiedź immunologiczną, drugi w tym czasie modyfikuje komórkę nowotworową bądź doprowadza do jej bezpośredniej lizy. Dużo lepsze efekty osiągane są również w sytuacji, gdy pierwszy

wirus powstrzymuje wrodzoną odpowiedź przeciwwirusową, pozwalając drugiemu wirusowi zainfekować i zabić komórki nowotworowe [22].

Badania prowadzone nad wirusami powinny dotyczyć identyfikacji skutecznych wirusów onkolitycznych, a następnie wyboru najbardziej odpowiedniego, bazując na podstawie ich zdolności do niszczenia komórek nowotworowych oraz rozprzestrzeniania się do komórek sąsiednich. Wirus powinien być tkankowo specyficzny i ściśle dostosowany do danego nowotworu. Ponadto nie powinien podczas szybkiego namnażania infekować zdrowych komórek organizmu. Największą skuteczność terapii osiąga się prowadząc ją miejscowo, gdyż wirus wprowadzony bezpośrednio do krwiobiegu może zostać osłabiony przez różnego rodzaju mechanizmy oporności. Dodatkowo do geno-

mu wirusa onkolitycznego należy wprowadzić geny reporterowe, aby efektywnie monitorować replikację wewnątrz komórki nowotworowej.

Pomimo obiecujących wyników badań należy jednak brać pod uwagę wiele istotnych problemów związanych z konstrukcją idealnie zmodyfikowanego wirusa onkolitycznego. Warto podkreślić również fakt, że modele zwierzęce nie zawsze odzwierciedlają w pełni złożoności organizmu ludzkiego. Dlatego w celu udoskonalenia mechanizmów terapii wirusami onkolitycznymi (systemu transportu wirusów, a także identyfikacji nowych wirusów i przenośników) konieczna jest współpraca specjalistów z wielu dziedzin takich, jak m.in.: wirusologia, inżynieria biomedyczna, biologia komórki, immunologia i hematologia.

Piśmiennictwo / References

- Zwalczanie raka jelita grubego i raka piersi w Polsce na tle wybranych krajów europejskich. Analiza zasobów systemu opieki onkologicznej i czynników warunkujących sukces. Raport powstał pod patronatem Polskiego Towarzystwa Onkologicznego. Ośrodek Analiz Uniwersyteckich, Warszawa-Kraków 2011. <http://www.medicamo.pl> (2012.08.02).
- National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/dictionary/?print=1&cdrid=615577> (2012.08.02).
- Ottolino-Perry K, Diallo JS, Lichty BD, Bell JC, McCart JA. Intelligent design: combination therapy with oncolytic viruses. *Mol Ther* 2010, 18(2): 251-63.
- Błażejewska P, Goździcka-Józefiak A. Wirusowa terapia przeciwnowotworowa. *Współcz Onkol* 2005, 9, 279-283.
- Power AT, Bell JC. Cell-based delivery of oncolytic viruses: a new strategic alliance for a biological strike against cancer. *Mol Ther* 2007, 15(4): 660-5.
- Tedcastle A, Cawood R, Di Y, Fisher KD, Seymour LW. Virotherapy – cancer targeted pharmacology. *Drug Discov Today* 2012, 17(5-6): 215-20.
- Mullen JT, Tanabe KK. Viral oncolysis. *Oncologist* 2002, 7(2): 106-19.
- Hammill AM, Conner J, Cripe TP. Oncolytic virotherapy reaches adolescence. *Pediatr Blood Cancer* 2010, 55(7): 1253-63.
- Thirukkumaran CM, Morris DG. Oncolytic virotherapy for multiple myeloma: past, present, and future. *Bone Marrow Res* 2011: 632948.
- Bourke MG, Salwa S, Harrington KJ, Kucharczyk MJ, Forde PF, de Kruijff M, et al. The emerging role of viruses in the treatment of solid tumours. *Cancer Treat Rev* 2011, 37(8): 618-32.
- Meerani S, Yao Y. Oncolytic Viruses in Cancer Therapy. *Eur J Sci Res* 2010, 40(1): 156-171.
- Stanford MM, Bell JC, Vähä-Koskela MJ. Novel oncolytic viruses: riding high on the next wave? *Cytokine Growth Factor Rev* 2010, 21(2-3): 177-83.
- Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. Systemic delivery of oncolytic viruses: hopes and hurdles. *Adv Virol* 2012, 2012: 805629.
- Wodarz D, Hofacre A, Lau JW, Sun Z, Fan H, Komarova NL. Complex spatial dynamics of oncolytic viruses in vitro: mathematical and experimental approaches. *PLoS Comput Biol* 2012, 8(6): e1002547.
- Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 2012, 30(7): 658-70.
- Aghi M, Martuza RL. Oncolytic viral therapies – the clinical experience. *Oncogene* 2005, 24(52): 7802-16.
- Wong HH, Lemoine NR, Wang Y. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles. *Viruses* 2010, 2(1): 78-106.
- He S, Li P, Chen CH, Bakst RL, Chernichenko N, Yu YA, et al. Effective oncolytic vaccinia therapy for human sarcomas. *J Surg Res* 2012, 175(2): e53-60.
- Prestwich RJ, Harrington KJ, Pandha HS, Vile RG, Melcher AA, Errington F. Oncolytic viruses: a novel form of immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008, 8(10): 1581-8.
- Rojas JJ, Thorne SH. Theranostic potential of oncolytic vaccinia virus. *Theranostics* 2012, 2(4): 363-73.
- Verheije MH, Rottier PJ. Retargeting of viruses to generate oncolytic agents. *Adv Virol* 2012, 2012: 798526.
- Robert A, Miron MJ, Champagne C, Gingras MC, Branton PE, Lavoie JN. Distinct cell death pathways triggered by the adenovirus early region 4 ORF 4 protein. *J Cell Biol* 2002, 158(3): 519-28.
- Tong AW, Senzer N, Cerullo V, Templeton NS, Hemminki A, Nemunaitis J. Oncolytic Viruses for Induction, of Anti-Tumor Immunity. *Curr Pharm Biotechnol* 2011. (Epub ahead of print).
- Wennier S, Li S, McFadden G. Oncolytic virotherapy for pancreatic cancer. *Expert Rev Mol Med* 2011, 13: e18.
- Prestwich RJ, Errington F, Harrington KJ, Pandha HS, Selby P, Melcher A. Oncolytic viruses: do they have a role in anti-cancer therapy? *Clin Med Oncol* 2008, 2: 83-96.
- Zeyaulah M, Patro M, Ahmad I, Ibraheem K, Sultan P, Nehal M, et al. Oncolytic viruses in the treatment of cancer: a review of current strategies. *Pathol Oncol Res* 2012, 18(4): 771-81.

27. Gooding LR. Regulation of TNF-mediated cell death and inflammation by human adenoviruses. *Infect Agents Dis* 1994, 3(2-3): 106-15.
28. Tollefson AE, Ryerse JS, Scaria A, Hermiston TW, Wold WS. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 1996, 220(1): 152-62.
29. Thorne SH. Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus. *Immunol Res* 2011, 50(2-3): 286-93.
30. Altomonte J, Ebert O. Replicating viral vectors for cancer therapy: strategies to synergize with host immune responses. *Microb Biotechnol* 2012, 5(2): 251-9.
31. Fujiwara T, Kagawa S, Tazawa H. Synergistic Interaction of Telomerase-Specific Oncolytic Virotherapy and Chemotherapeutic Agents for Human Cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2011. (Epub ahead of print).
32. Nemunaitis J, Tong AW, Nemunaitis M, Senzer N, Phadke AP, Bedell C, et al. A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. *Mol Ther* 2010, 18(2): 429-34.
33. Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci* 2008, 99(8): 1528-38.
34. Yamasaki Y, Tazawa H, Hashimoto Y, Kojima T, Kuroda S, et al. A novel apoptotic mechanism of genetically engineered adenovirus-mediated tumour-specific p53 overexpression through E1A-dependent p21 and MDM2 suppression. *Eur J Cancer* 2012, 48(14): 2282-91.
35. Shtrichman R, Sharf R, Barr H, Dobner T, Kleinberger T. Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96(18): 10080-5.
36. Tsuruta Y, Pereboeva L, Breidenbach M, Rein DT, Wang M, Alvarez RD, et al. A fiber-modified mesothelin promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2008, 14(11): 3582-8.
37. Bubko I, Gruber BM, Anuszewska EL. The role of the proteasome for therapy of incurable diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2010, 64: 314-25.
38. Marcellus RC, Teodoro JG, Wu T, Brough DE, Ketner G, Shore GC, et al. Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *J Virol* 1996, 70(9): 6207-15.
39. Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Oritz-Araya X, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001, 409(6817): 207-11.
40. Doronin K, Shayakhmetov DM. Construction of targeted and armed oncolytic adenoviruses. *Methods Mol Biol* 2012, 797: 35-52.
41. Dubrovskaya A, Elliott J, Salamone RJ, Teleguev GD, Stakhovskiy AE, Schepotin IB, et al. CXCR4 expression in prostate cancer progenitor cells. *PLoS One* 2012, 7(2): e31226.
42. Msaouel P, Iankov ID, Allen C, Morris JC, von Messling V, Cattaneo R, et al. Engineered measles virus as a novel oncolytic therapy against prostate cancer. *Prostate* 2009, 69(1): 82-91.
43. Donnelly OG, Errington-Mais E, Steele L, Hadac E, Jennings V, Scott K, et al. Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther* 2011. (Epub ahead of print).
44. Wong J, Lee C, Zhang K, Rennie PS, Jia W. Targeted Oncolytic Herpes Simplex Viruses for Aggressive Cancers. *Curr Pharm Biotechnol* 2011. (Epub ahead of print).
45. Toda M, Rabkin SD, Kojima H, Martuza RL. Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. *Hum Gene Ther* 1999, 10(3): 385-93.
46. Shen Y, Nemunaitis J. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther* 2006, 13(11): 975-92.
47. Csatory LK, Eckhardt S, Bukosza I, Czeglédi F, Fenyvesi C, Gergely P, et al. Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. *Cancer Detect Prev* 1993, 17(6): 619-27.
48. Lam HY, Yeap SK, Rasoli M, Omar AR, Yusoff K, Suraini AA, et al. Safety and clinical usage of newcastle disease virus in cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 2011, 2011: 718710.
49. Schirmacher V, Griesbach A, Ahlert T. Antitumor effects of Newcastle Disease Virus in vivo: local versus systemic effects. *Int J Oncol* 2001, 18(5): 945-52.
50. Lun X, Senger DL, Alain T, Oprea A, Parato K, Stojdl D, et al. Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV(deltaM51)) on multifocal and invasive gliomas. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98(21): 1546-57.
51. Leveille S, Goulet ML, Lichty BD, Hiscott J. Vesicular stomatitis virus oncolytic treatment interferes with tumor-associated dendritic cell functions and abrogates tumor antigen presentation. *J Virol* 2011, 85(23): 12160-9.
52. Gentschev I, Müller M, Adelfinger M, Weibel S, Grummt F, Zimmermann M, et al. Efficient colonization and therapy of human hepatocellular carcinoma (HCC) using the oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h68. *PLoS One* 2011, 6(7): e22069.
53. Nettelbeck DM, Alvarez RD, Curie DI. Wirusy pogromcy nowotworów. *Świat Nauki* 2009, 10: 72-76.
54. Liikanen I, Monsurro V, Ahtiainen L, Raki M, Hakkarainen T, Diaconu I, et al. Induction of interferon pathways mediates in vivo resistance to oncolytic adenovirus. *Mol Ther* 2011, 19(10): 1858-66.
55. Wennier ST, Liu J, McFadden G. Bugs and Drugs: Oncolytic Virotherapy in Combination with Chemotherapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2011. (Epub ahead of print).
56. Deguchi T, Shikano T, Kasuya H, Nawa A, Fujiwara S, Takeda S, et al. Combination of the Tumor Angiogenesis Inhibitor Bevacizumab and Intratumoral Oncolytic Herpes Virus Injections as a Treatment Strategy for Human Gastric Cancers. *Hepatogastroenterol* 2011, 59: 118-119. (Epub ahead of print).
57. Koski A, Raki M, Nokisalmi P, Liikanen I, Kangasniemi L, Joensuu T, et al. Verapamil results in increased blood levels of oncolytic adenovirus in treatment of patients with advanced cancer. *Mol Ther* 2012, 20(1): 221-9.
58. Toucheffeu Y, Vassaux G, Harrington KJ. Oncolytic viruses in radiation oncology. *Radiation Oncol* 2011, 99(3): 262-70.
59. Wu YM, Zhang KJ, Yue XT, Wang YQ, Yang Y, Li GC, et al. Enhancement of tumor cell death by combining cisplatin with an oncolytic adenovirus carrying MDA-7/IL-24. *Acta Pharmacol Sin* 2009, 30(4): 467-77.