

UNIwersytet WarsZawski

Wydział Biologii



Justyna Legierska

Nr albumu: 337189

**WIRUSY ONKOLITYCZNE:  
ADENOWIRUSY W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ**

Praca licencjacka  
na kierunku Biologia  
w zakresie Wirusologii

Praca wykonana pod kierunkiem  
dr hab. Moniki Adamczyk-Popławskiej  
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa, wrzesień 2018

### **Oświadczenie kierującej pracą**

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie tytułu zawodowego.

Data

Podpis kierującej pracą

### **Oświadczenie autorki pracy**

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autorki pracy

## **Streszczenie**

Konwencjonalne metody leczenia nowotworów złośliwych są niewystarczające. Jedną z badanych form terapii jest tzw. wiroterapia onkolityczna. Wirusy onkolityczne to wirusy cechujące się onkotropizmem, tzn. preferencyjnie infekujące i namnażające się w komórkach nowotworowych. Wirusy te wchodzi w cykl lityczny, tj. kończący się lizą komórki gospodarza, i równolegle pobudzają mechanizmy odporności przeciwnowotworowej, można więc zaliczyć je do immunoterapii przeciwnowotworowej. Praca dotyczy historii i perspektyw rozwoju wiroterapii onkolitycznej. Opisano jedno z najlepiej poznanych wirusów onkolitycznych — adenowirusy (rodzina *Adenoviridae*). Podjęto próbę nakreślenia stanu prawnego i możliwych trudności związanych z terapią wirusami onkolitycznymi.

## **Słowa kluczowe**

adenowirus, *adenoviridae*, onkolityczność, onkoliza, onkowiroterapia, terapia onkolityczna, wiroterapia, wirusy onkolityczne

## **Dziedzina pracy (kody wg programu Socrates-Erasmus)**

13.100 — Biologia

## **Tytuł pracy w języku angielskim**

Oncolytic viruses: adenoviruses in anticancer therapy

Dziękuję

prof. dr hab. Nadziei Dreli  
∞ za konsultację w kwestii układu odpornościowego

dr hab. Monice Adamczyk-Popławskiej  
∞ za opiekę promotorską,  
wsparcie merytoryczne oraz okazaną życzliwość,  
dzięki którym mogła powstać ta praca

## SPIS TREŚCI

PRZEDMOWA.....	2
1. Epidemiologia i etiologia nowotworów.....	2
CEL PRACY.....	4
Charakterystyka komórki nowotworowej jako gospodarza.....	5
1. Zarys biologii komórek nowotworowych.....	5
Wirusy onkolityczne.....	8
1. Definicje.....	8
2. Mechanizm onkolityczności wirusowej.....	10
Rola układu odpornościowego.....	13
Historia zastosowania wirusów onkolitycznych.....	18
Obecny stan badań.....	23
Wybrane wirusy onkolityczne.....	25
1. Grupa I.....	25
2. Grupa II.....	27
3. Grupa III.....	27
4. Grupa IV.....	28
5. Grupa V.....	29
6. Grupa VI.....	31
7. Grupa VII.....	32
Charakterystyka adenowirusów.....	33
1. Onyx-015.....	37
2. H101Oncorine i seria H100 wirusów onkolitycznych.....	38
3. Enadenotucirev (wcześniej ColoAd1).....	38
4. CELYVIR (ICOVIR-5 w mezenchymalnych komórkach macierzystych).....	39
5. LOAd703.....	40
6. Ad-ΔE1-KOX/PEG $\beta$ PHF.....	41
7. ONCOS-102 (CGTG-102)/Oncos-401.....	41
8. VCN-01.....	43
9. CG0070.....	43
10. DNX-2401.....	44
11. Telomelysin/OBP-301 i OBP-405.....	44
12. Pozostałe adenowirusy onkolityczne.....	45
DYSKUSJA.....	47
1. Zalety i wady.....	47
2. Problemy technologiczne.....	48
3. Próba określenia sytuacji prawnej.....	49
PODSUMOWANIE.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	52

# PRZEDMOWA

## 1. EPIDEMIOLOGIA I ETIOLOGIA NOWOTWORÓW

Wedle danych Głównego Urzędu Statystycznego (GUS), w roku 2010 na nowotwory złośliwe w Polsce zachorowało ponad 140 tys. kobiet i mężczyzn (WOJCIECHOWSKA *ET AL.*, 2012: s. 7) , a w 2013 — prawie 156 500 (DIDKOWSKA, WOJCIECHOWSKA, 2015: s. 3). W 2014 liczba nowych zachorowań wyniosła 159,2 tys., powiększając liczbę żyjących z nowotworem złośliwym (ponad 574 tysiące), zaś prawie 96 tysięcy chorych zmarło (WOJCIECHOWSKA *ET AL.*, 2016). Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) szacuje, że średnio jedna na sześć osób umiera z powodu choroby nowotworowej (*CANCER FACT SHEET*, 2017), a w krajach rozwiniętych to jedna z najczęstszych przyczyn śmierci osób powyżej 65 roku życia. W Polsce również pośrednio potwierdza się ta statystyka: 70% przypadków choroby u mężczyzn, o dziesięć punktów procentowych mniej u kobiet — ma miejsce po 60 roku życia (WOJCIECHOWSKA *ET AL.*, 2014). Prognozowane zmiany demograficzne (starzenie się społeczeństw zachodnich, rosnąca liczba ludności w krajach rozwijających się / nowo uprzemysłowionych), i powiązane z nimi wzrastające koszty, nie tylko ekonomiczne, schorzeń nowotworowych (YABROFF *ET AL.*, 2011; *CANCER FACT SHEET*, 2017), motywują badania nad zapobieganiem (prewencją pierwotną i wtórną) oraz skutecznym leczeniem.

Profilaktyka obniża prawdopodobieństwo zachorowania na określone rodzaje nowotworów, wywoływanych przez specyficzny, zewnętrzny czynnik etiologiczny (kancerogen), związany np. ze stylem życia (nowotwory płuc spowodowane dymem tytoniowym) lub z ryzykiem zawodowym (rak płuc poprzedzony pylicą azbestową u robotników pracujących z eternitem). Od lat 60. ubiegłego wieku wiadomo również o onkogenności infekcji wirusowych — na przykład zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (ang. *Human Papilloma Virus*, HPV) może powodować raka szyjki macicy (*HPV AND CANCER*, 2017). Szacuje się, że pewnej części nowotworów można zapobiec: Cancer Research UK określa wpływ środowiska na około 40% (*STATISTICS ON PREVENTABLE CANCERS*, 2017), podobnie jak inne badania statystyczne (TOMASETTI, VOGELSTEIN, 2015; TOMASETTI *ET AL.*, 2017).

Rozwój nowotworów często przebiega w sposób bezobjawowy (mówimy wtedy o okresie latencji, utajenia) lub niespecyficzny. Przyjmuje się, że guzy poniżej centymetra średnicy, widoczne na rentgenogramie, składają się z około  $1 \cdot 10^9$  komórek, a te wyczuwalne w badaniu palpacyjnym — z  $\sim 1 \cdot 10^{10}$  komórek. Powoduje to niską wykrywalność w początkowych fazach, przekładającą się na obniżenie szansy wyleczenia. Z tego powodu w przypadku stwierdzenia genetycznie podwyższonego ryzyka wystąpienia nowotworu złośliwego mogą zostać zaproponowane radykalne metody. Przykładowo, wykrycie raka jajnika na wczesnym etapie (I i II) udaje się osiągnąć u co najwyżej 30% chorych, ponieważ brakuje badań przesiewowych; większość nowotworów w fazie III (metastazy) jest nieuleczalnych. Z powyższych powodów u nosicielek mutacji w genach *BRCA1* oraz *BRCA2* rozważa się profilaktyczne usunięcie jajników oraz jajowodów (*REKOMENDACJE POLSKIEGO TOWARZYSTWA GINEKOLOGII ONKOLOGICZNEJ*, 2015; LEVY-LAHAD, FRIEDMAN, 2007).

Oprócz tego warto nadmienić, że skuteczność terapii konwencjonalnych (leczenie operacyjne, chemio- i radioterapia) nie wzrosła znacząco w ostatnich latach. Jaskrawym przykładem jest czas przeżycia ze zdiagnozowanym glejakiem IV stopnia, szacowany na krótszy niż dwa lata<sup>1</sup> (FIJUTH *ET AL.*, 2013: s. 47).

---

1 Ewenementem byłby przypadek Bena Williamsona (czas przeżycia od diagnozy i operacji w 1995 roku) oraz świadectwa kilku innych osób, zgromadzone na jego stronie ([\[//VIRTUALTRIALS.COM/SURVIVEBEN.CFM](http://VIRTUALTRIALS.COM/SURVIVEBEN.CFM), dostęp 13 grudnia 2017]). W piśmiennictwie naukowym poświadczono przypadek ponad 15-letniego czasu przeżycia (stan na rok 2007: KREX *ET AL.*, 2007).

## CEL PRACY

Powyższe statystyki wykazują potrzebę opracowania i wdrożenia nowego podejścia w leczeniu nowotworów u ludzi<sup>2</sup>, zapewniającego optymalną efektywność oraz komfort pacjenta. Jedną z metod eksperymentalnych na polu badań antynowotworowych jest użycie tzw. wirusów onkolitycznych (ang. *oncolytic viruses*).

Za cel postawiono przybliżenie tematyki wirusów onkolitycznych, w tym między innymi zdefiniowanie pojęcia oraz przedstawienie zarysu historii badań, szans i zagrożeń wiążących się ze stosowaniem preparatów wirusowych.

Jako model wirusów onkolitycznych przyjęto adenowirusy (Ad) ze względu na stopień zaawansowania prowadzonych nad nimi badań oraz fakt, że terapie oparte na tychże właśnie wirusach zostały dopuszczone na niektóre rynki. W związku z powyższym, można zaproponować szczegółowe rozpatrzenie przyczyn tego stanu rzeczy — zalet adenowirusów do użycia w terapii onkolitycznej.

W toku wywodu będą używane zamiennie określenia „wiroterapia onkolityczna” oraz „terapia wirusami onkolitycznymi”. Ukuto również neologizm „wiroterapeutyk”, analogiczny do „chemioterapeutyku”.

---

2 Warto wspomnieć o badaniach nad weterynaryjnym użyciem wirusów onkolitycznych, szczególnie u psów, które molekularnie mogą być bliższe człowiekowi niż myszy (RIVERA, EULER, 2011 za: PATIL *ET AL.*, 2012). W pracy nie poruszono tego tematu z powodu ograniczeń w objętości oraz zaistnienia konieczności porównania różnych aspektów biologii człowieka i innych zwierząt. Przykładowe publikacje dot. weterynarii onkolitycznej: Patil *ET AL.*, 2012; MACNEILL, 2015).



# CHARAKTERYSTYKA KOMÓRKI NOWOTWOROWEJ JAKO GOSPODARZA

## 1. ZARYS BIOLOGII KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

„Rak<sup>3</sup> — choroba organizmów wielokomórkowych charakteryzująca się modyfikacją genetyczną specyficznych komórek, w wyniku czego dochodzi do powstania stanu nowotworowego, w którym komórki tracą zdolność do prawidłowej odpowiedzi na działanie sygnałów kontrolujących ich wzrost, podziały i rozprzestrzenianie się w organizmie”.

(PIEKAROWICZ, 2004: s. 576)

Komórki nowotworowe to heterogenna grupa komórek o zbliżonym fenotypie, różniących się genetycznie i epigenetycznie od komórek zdrowych, jak i między sobą (tzw. poliklonalność komórek nowotworowych). Utraciły one stabilność genetyczną, głównie z powodu akumulacji mutacji somatycznych<sup>4</sup> (teoria SMT ang. *the somatic mutation theory*<sup>5</sup>) i/lub zmian epigenetycznych, przede wszystkim w genach związanych z regulacją: wzrostu, różnicowania i śmierci komórki. Część nowotworów jest powodowana przez dziedziczne predyspozycje. Niekontrolowane podziały mitotyczne dają początek populacjom komórek, podlegającym doborowi (CAHILL *ET AL.*, 1999; MCGRANAHAN, SWANTON, 2017): najbardziej efektywne w walce o zasoby stają się lokalnie dominującą grupą i tworzą własne mikrośrodowisko, organizując się ze zdrowymi komórkami w specyficzną tkankę nowotworową.

Douglas Hanahan i Robert Weinberg (2000) początkowo wyodrębnili sześć wspólnych cech fenotypowych<sup>6</sup> wszystkich komórek nowotworów złośliwych; w nowszej pracy z roku 2011 jest ich osiem (tab. 1., s. 6.).

---

3 Obecnie „rak” to termin nazywający nowotwory złośliwe tkanki nabłonkowej, kiedyś pojęcie to obejmowało wszystkie nowotwory złośliwe, bez względu na ich lokalizację. Podana definicja dotyczy właśnie historycznego, szerszego rozumienia.

4 Częstość pomyłek polimerazy podczas replikacji DNA, po uwzględnieniu mechanizmów sprawdzających i naprawiających błędne podstawienia nukleotydów (ang. *proofreading, mismatch repair*), wynosi 1 na 10<sup>9</sup>.

5 Z racji tematyki pracy skupiono się bardziej na podejściu molekularnym, ale z racji poruszania zagadnienia biologii nowotworów warto zauważyć, że istnieje konkurencyjna do SMT teoria TOFT (ang. *Tissue Organization Field Theory*), interpretująca zmiany nowotworowe jako przede wszystkim zaburzenie na poziomie tkankowym (SOTO, SONNENSCHNEIN, 2011; SONNENSCHNEIN, SOTO, 2013).

6 Mimo tych samych objawów, ich podłoże genetyczne i epigenetyczne może się różnić.

**Tabela 1.** Cechy komórek nowotworowych

Cecha (wg HANAHAN, WEINBERG, 2011):	Dodatkowe informacje:
I. Wzrost niezależny od sygnału	Może być spowodowany aktywacją ścieżki onkogenu Ras, występującą w około 30% ludzkich komórek nowotworowych; w wielu innych przypadkach zmiany innych genów białek ze ścieżki sygnalizacyjnej białka Ras)
II. Brak odpowiedzi na sygnał spowalniający wzrost (alternacje w obszarze genów regulacji wzrostu)	-
III. Niedziałające mechanizmy apoptozy (programowanej śmierci) ←	Okolo 50% wszystkich nowotworów ma mutację inaktywującą w genie <i>p53</i> .
IV. Niekontrolowane podziały, bez ograniczeń. ← Wirusy namnażają się w komórkach w fazie S	Cykl większości eukariotycznych komórek przebiega w czterech następujących kolejno fazach: M (mitoza i cytokineza), G <sub>1</sub> (wzrost, ang. <i>growth</i> ), S (synteza, czyli replikacja DNA), G <sub>2</sub> (drugi etap wzrostu), przy czym trzy ostatnie zbiorczo określa się jako interfazę. Niedzielące się komórki somatyczne zatrzymują się w fazie G <sub>1</sub> , a dla podkreślenia specyfiki tej sytuacji, mówi się o fazie G <sub>0</sub> ich cyklu komórkowego.
V. Angiogeneza	Atypowe i chaotyczne tworzenie naczyń krwionośnych, odżywiających tkankę nowotworową oraz przyczyniające się do rozsiewu komórek nowotworowych w innych lokalizacjach).
VI. Utrata wrażliwości na kontakty z otoczeniem	Przemieszczanie i zagnieżdżanie komórek w innych obszarach ciała (tzw. metastazy, przerzuty); niezmiennione nowotworowo komórki giną w przypadku utraty odpowiedniej stymulacji z otoczenia.
VII. Zmiana (przyspieszenie) metabolizmu ←	Przykładowo hipoksja w tkance nowotworowej powoduje zachodzenie glikolizy beztlenowej (tzw. efekt Warburga): wzrost zapotrzebowania na heksozy używany jest w wykrywaniu ognisk nowotworu poza układem nerwowym oraz przy ocenianiu skuteczności działania preparatów wirusowych <i>in vivo</i> (obrazowanie CT). Mikrośrodowisko o niższym niż normalnie stężeniu tlenu (0-5%) wiąże się z aktywnością czynnika transkrypcyjnego HIF (ang. <i>hipoxia-inducible factor</i> ), regulującego ekspresję genów — wykorzystać można to przy ukierunkowaniu Glikoliza beztlenowa powoduje również obniżenie pH.
VIII. Unikanie odpowiedzi immunologicznej	Niewystarczająca ekspresja cząsteczek MHC klasy I na powierzchni komórek nowotworu, uniemożliwiająca rozpoznanie przez limfocyty T-cytotoksyczne. Ekspresja na powierzchni komórki nowotworowej FasL i oddziaływanie z cząsteczką Fas limfocytu T-cytotoksycznego, powodujące apoptozę danego limfocytu T. Wydzielanie cytokin immunosupresyjnych (TGF-β, IL-10). Selekcja komórek nowotworowych: pozostają tylko te o niskiej immunogenności.

Źródło: wskazane w tabeli, opracowanie własne

Równolegle można zaproponować podział mutacji ze względu na wystąpienie w sekwencjach kodujących produkty o charakterze:

- ♦ supresorowym — zazwyczaj wymagana mutacja w obu kopiach genu — cecha recesywna; brak produktu lub produkt zmieniony (utrata działania, ang. *loss of function*) jest czynnikiem powodującym zmianę komórki w niestabilną genetycznie:
  - ♦ gen *RBI*, kodujący pRB;
  - ♦ *TP53/gen p53*, którego produktem jest białko p53.
- ♦ Onkogennym — wystarczy mutacja w jednym allelu protoonkogenu — cecha dominująca. Produkt genu wpływa na mechanizmy wewnątrzkomórkowe z powodu zwiększenia swojej aktywności (ang. *gain of function*) lub ilości:
  - ♦ mutacje w genach białek-GTPaz ze ścieżki Ras,
  - ♦ zmiana w czynniku transkrypcyjnym c-Myc, powodująca jego konstytutywną ekspresję,
  - ♦ mutacje w genach kodujących MAP-kinazy.

Klasyfikacje te pokazują stopień złożoności biologii nowotworów, przekładający się na trudności w terapii. Dodatkowo guzy lite składają się nie tylko z komórek neoplastycznych, ale także ze zdrowych komórek, które umożliwiają dalszy rozwój nowotworu i wyciszają odpowiedź układu odpornościowego (CASSADY *ET AL.*, 2016). Oprócz tego odnaleźć można podgrupę tzw. komórek macierzystych nowotworu (ang. *Cancer Stem Cells*, CSCs), często opornych na terapię. Warunkiem wyleczenia jest eliminacja wszystkich zmienionych nowotworowo komórek.

Przez długi czas diagnozowano nowotwory wyłącznie histologicznie przez lekarzy patomorfologów. Obecnie diagnostyka molekularna staje się coraz bardziej popularna i wspiera proces rozpoznania i leczenia choroby nowotworowej. W ramach *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) — projektu trwającego od 2005 roku — zbadano i opisano genomy 33 nowotworów, co wiązało się z przetworzeniem ogromnej ilości danych, ale dało podstawy do lepszego zrozumienia odmiennych rezultatów w leczeniu, nie związanych z różnicami histologicznymi (TOMCZAK *ET AL.*, 2015).

# WIRUSY ONKOLITYCZNE

## 1. DEFINICJE

„Wirusy mogą być zdefiniowane jako wyłącznie wewnątrzkomórkowe i potencjalnie patogenne byty z fazą infekcyjną, a także (1) posiadające wyłącznie jeden rodzaj kwasu nukleinowego, (2) powielające się w formie materiału genetycznego, (3) niezdolne do wzrostu i przechodzenia podziałów komórkowych, (4) pozbawione własnego metabolizmu”<sup>7</sup>.

(Odczyt noblowski André M. Lwoffa, 1957; tłum. własne)

Zaczynając *ab ovo*: wirusy (łac. *vīrus* — jad, trucizna) to struktury zbudowane z kwasu nukleinowego, zamkniętego w białkowej osłonie, zwanej kapsydem, składającej się z kapsomerów (od łacińskiego *capsa* — futerał oraz greckiego *meros* — część). Z powodu niekomórkowej budowy wirusy zależne są od komórkowego gospodarza (prokariotycznego lub eukariotycznego), na zasadzie pasożytnictwa molekularnego, całkowicie polegając na jego aparacie translacyjnym, w dużym stopniu zaś — na transkrypcyjnym i replikacyjnym. Poza komórką przechodzą w „fazę wirionową”, podczas której nie spełniają definicji organizmu<sup>8</sup> i mogą być badane jak cząsteczki, np. poprzez krystalizację. Wirion to „kompletna cząstka wirusowa zdolna do zapoczątkowania infekcji i powstania potomnych cząsteczek wirusowych” (PIEKAROWICZ, 2004: s. 581), czasami porównywany bywa do fazy przetrwalnikowej bakterii.

Klasyfikacją wirusów (ich taksonomią i filogenetyką) zajmuje się Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ang. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV). Do zadań tej instytucji naukowej należy również zatwierdzanie nazw wirusów.

---

7 W oryginale: „*Viruses could accordingly be defined as: strictly intracellular and potentially pathogenic entities with an infectious phase, and (1) possessing only one type of nucleic acid, (2) multiplying in the form of their genetic material, (3) unable to grow and to undergo binary fission, (4) devoid of a Lipmann system*”. Obecnie nie stosuje się określenia „system Lipmanna”, dotyczącego aparatu energetycznego komórki i procesów koenzymu A. Cytat za stroną internetową Nagrody Nobla: [//NOBELPRIZE.ORG/NOBEL\_PRIZES/MEDICINE/LAUREATES/1965/LWOFF-LECTURE.HTML, dostęp 5 lipca 2018, (na stronie pomyłka w dacie wykładu)].

8 W zależności od przyjęcia definicji funkcjonalnej lub strukturalnej życia, można argumentować dwojako w kwestii uznania wirusy za żywe. Podlegają one tym samym mechanizmom ewolucyjnym, co organizmy: mutacji oraz presji selekcyjnej.

Szczep wirusowy (*strain*) to taki wariant wirusa, który jest stabilny i charakterystyczny, można go wyróżnić na podstawie sekwencji w genomie objawiających się fenotypowo (VAN REGENMORTEL, 2008). Serotypy (*serotypes*) to szczepy wirusowe, różniące się antygenowo — odmienne serotypy są neutralizowane przez różne przeciwciała (IBIDEM). Pojęcie gatunku biologicznego (np. z encyklopedii PWN lub funkcjonujące w dziedzinie botaniki lub zoologii) nie ma zastosowania w przypadku wirusów. O ile początki ICTV sięgają roku 1966, to definicję gatunku wirusowego przyjęto dopiero po 25 latach, w 1991. Gatunek wirusowy określony został jako „politetyczna klasa wirusów, która stanowi linię replikacyjną i zajmuje określoną niszę ekologiczną” (ang. “*a virus species is a polythetic class of viruses that constitute a replicating lineage and occupy a particular ecological niche*”; ICTV CODE..., 2018) „najniższy poziom taksonomiczny zatwierdzony przez ICTV, [...] monofiletyczna grupa wirusów, której właściwości mogą być odróżnione od tych z innych gatunków poprzez wielorakie kryteria” (ang. “*A species is the lowest taxonomic level in the hierarchy approved by the ICTV. A species is a monophyletic group of viruses whose properties can be distinguished from those of other species by multiple criteria.*”, IBIDEM). Równolegle funkcjonuje również pojęcie *quasi*-gatunku, podkreślające specyfikę stosowania konstruktów gatunku w klasyfikacji wirusów.

Nazwa „onkolityczny” powstała z połączenia greckich słów *ónkos* (ὄγκος — masa, ciężar), odnoszącego się do nowotworu, oraz *lytikós* — „rozpuszczalny”, dotyczącego przebiegu infekcji cytolitycznej, tzn. kończącej się rozpadem komórki gospodarza (etymologia za Internetowym *Słownikiem wyrazów obcych i zwrotów obcojęzycznych Władysława Kopalińskiego*)<sup>9</sup>. Internetowy słownik *Oxford Dictionaries* datuje najwcześniejsze zanotowane, oficjalne użycie terminu „onkoliza” (ang. „*oncolysis*”) na lata 20. XX wieku i przypisuje je Thomasowi L. Stedmanowi, będącemu autorem słowników medycznych. Wiele wczesnych publikacji dotyczących wirusów onkolitycznych nie zawiera frazy „onkolityczny” (ang. „*oncolytic virus/virotherapy*”, HAMMILL ET AL., 2010). Najwcześniejszy artykuł uwzględniony w bazie PubMed z tym wyrażeniem pochodzi z 1946 roku: użyte zostało ono na opisanie mechanicznego otwarcia komórki nowotworowej za pomocą wysokiego stężenia alkoholu

9 Słownik dostępny pod adresem: //slovník-online.pl/index.php

([//NCBI.NLM.NIH.GOV/PUBMED/18731129, wyszukano 13 maja 2016]). Można zauważyć, że do lat 50. w leczeniu mięsaków stosowano kontrowersyjny ekstrakt ze *Stroptococcus pyogenes*<sup>10</sup> i *Serratia marcescens* (tzw. toksyny Coleya) (McCARTHY, 2006; *WHAT IS COLEY'S TOXINS TREATMENT...*, 2012). Pokazuje to, że zdolność do onkolizy nie jest cechą jedynie wirusów (więcej na ten temat: JAZOWIECKA, SZALA, 2002) Powstają również propozycje połączenia onkolityczności wirusowej oraz bakteryjnej (KRZYKAWSKI, 2015).

Według definicji *National Cancer Insitute*: wirus onkolityczny preferencyjnie infekuje i niszczy wyłącznie komórki nowotworowe drogą lizy, uwalniając jednocześnie nowe cząsteczki wirusa; widać tutaj różnicę między wirusami onkolitycznymi i wektorami wirusowymi, używanymi w terapii genowej, które pozbawiane są zdolności do replikowania się. Wirus może być naturalnie onkolityczny, dlatego też lakoniczna definicja — „zmodyfikowana genetycznie jednostka wirusowa, której zadaniem jest infekowanie i niszczenie komórek nowotworowych”, jaką podaje polskojęzyczna wersja Wikipedii, jest zbyt wąska (*WIRUS ONKOLITYCZNY*, 2014). Wirusy niosące dodatkową informację genetyczną, zwiększającą ich skuteczność, określane są jako wirusy onkolityczne uzbrojone (ang. *armed*). Arsenał obejmuje m.in. geny kodujące interleukiny (POST ET AL., 2007), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), białka indukujące fuzję komórek (ang. *cell fusion inducing proteins*) (DEL PAPA, PARKS, 2017).

Równolegle prowadzone są prace nad ukierunkowywaniem wirusów onkolitycznych na nienowotworowe komórki obecne w tkance nowotworowej. Zaobserwowano, że onkolityczny pokswirus Pexa-Vec infekuje komórki śródbłónka związane z angiogenezą nowotworową (ang. *tumor-associated endothelial cells*, TECs) (BREITBACH ET AL., 2013).

## 2. MECHANIZM ONKOLITYCZNOŚCI WIRUSOWEJ

Cykl replikacyjny każdego wirusa zachodzi w komórkach wrażliwych na infekcję (kryterium jest obecność receptorów koniecznych do adsorpcji wirusa) i permissywnych, tzn. zapewniających odpowiednie środowisko wewnętrzne. Można wyróżnić kilka etapów tego procesu, wspólnych dla wszystkich wirusów zwierzęcych (por. il. 1., s. 12.):

---

10 Jedna z wczesnych prac nt. onkolityczności paciorkowców: TAKETO Y., TAKETO A., 1967.

- I. Adsorpcja — przyłączenie do specyficznych receptorów oraz koreceptorów obecnych w błonie komórkowej gospodarza. Wiązanie do receptora jest zależne od pH, siły jonowej, obecności jonów  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ ; temperatura fizjologiczna pozwala na internalizację wirusa. Zmiany wprowadzane za pomocą metod inżynierii genetycznej w obrębie genów receptorów wirusowych pozwalają na otrzymanie wirusów selektywnie rozpoznających wybrane komórki. Taka modyfikacja tropizmu<sup>11</sup> to inaczej ukierunkowanie transdukcyjne (łac. *trāns* — poprzez, *dūcere* — prowadzić; SINGH *ET AL.*, 2012).
- II. Internalizacja lub penetracja — wejście do komórki i utrata osłonki białkowej. Może odbywać się poprzez pinocytozę, endocytozę, lub fuzję, dotyczyć całego wirionu lub bardzo rzadko — tylko odpłaszczonego materiału genetycznego.
- III. Transkrypcja i pasożytnictwo na aparacie translacyjnym.

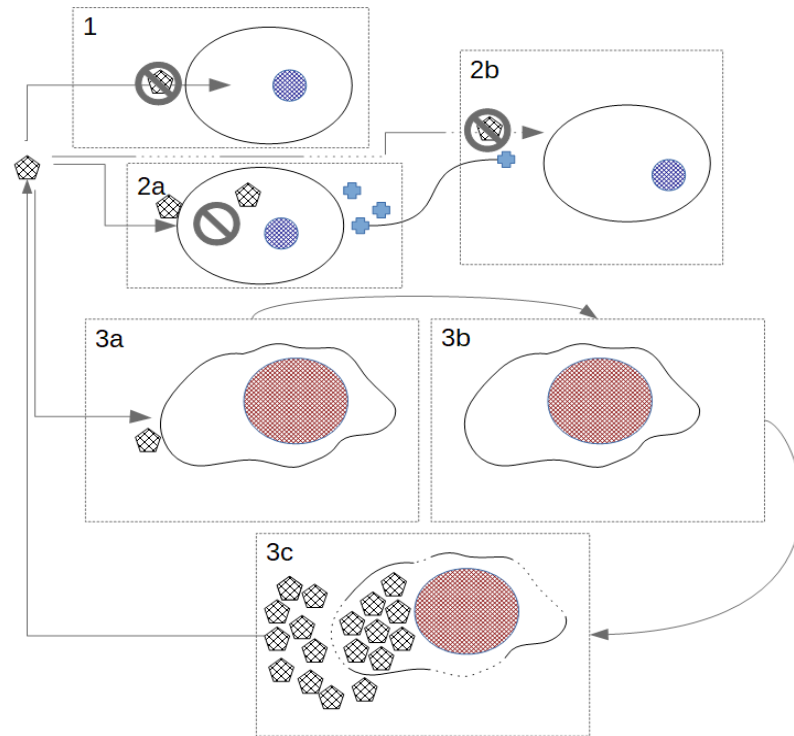
Cykl wirusa onkolitycznego w komórkach niezmiennych nowotworowo powinien zatrzymać się najpóźniej przed fazą trzecią, z dostatecznie dużym prawdopodobieństwem, aby minimalizować uszkodzenia zdrowej tkanki i działania niepożądane leczenia.

Zawężenie zbioru komórek permissywnych dla wirusów onkolitycznych osiąga się poprzez manipulacje w wirusowych genach wczesnych (od ich ekspresji zależy sukces infekcji) — jest to tzw. ukierunkowanie transkrypcyjne (SINGH *ET AL.*, 2012; Picó, 2005). Dodatkowo można użyć miRNA do regulacji posttranskrypcyjnej, aby obniżyć ekspresję genów w komórkach nienowotworowych (YLÖSMÄKI *ET AL.*, 2008), w szczególności dla adenowirusów w komórkach wątroby.
- IV. Replikacja genomu: wirus „korzysta” z enzymów komórkowych, albo koduje własne.
- V. Składanie cząstek wirusowych i pakowanie genomu, ekspresja tzw. genów późnych (ang. *late genes*).

---

11 Tropizmem w wirusologii określa się zjawisko infekowania tylko określonych komórek przez wirusy. Selektywność występuje na poziomie wyboru gospodarza / grupy gospodarzy oraz na poziomie tkanek. Tropizm wynika w pierwszej kolejności z rozpoznania receptorów komórkowych przez receptory wirusowe (tzw. wrażliwość na infekcję). Drugim czynnikiem warunkującym tropizm jest wystąpienie określonych cech fenotypowych w funkcjonowaniu komórki gospodarza.

VI. Opuszczenie komórki gospodarza. W przypadku wirusów osłonkowych: pączkowanie (ang. *budding*), bezpośrednio z błony cytoplazmatycznej lub z etapem egzocytozy. Wirusy bezosłonkowe najczęściej kończą swój cykl lizą komórki.



**Ilustracja 1.** Działanie wirusa onkolitycznego

Internalizacja wirusa do komórki nienowotworowej nie zachodzi (niewrażliwość z powodu braku receptorów) (1) lub infekcja jest zatrzymywana na początkowym etapie (niepermissywność) (2a), przy czym komórka może wydzielić interferon (IFN-I), uniemożliwiający dalsze infekowanie komórek wrażliwych na ten sygnał. W przypadku komórki nowotworowej wirus onkolityczny wchodzi do wnętrza (3a), rozpoczyna swój cykl infekcyjny (transkrypcja, translacja, replikacja, składanie cząsteczek wirusowych), kończący się lizą komórki i uwolnieniem wirionów potomnych (3c).

Na schemacie nie zachowano proporcji pomiędzy wielkością elementów: wirion — 90 nm, jądro komórkowe 6  $\mu$ m.

Źródło: rysunek własny

Oprócz bezpośredniego działania lizującego komórki, wirusy powodują efekt antynowotworowy również poprzez stymulację mechanizmów odporności komórkowej oraz układu odpornościowego, w szczególności: apoptozy indukowanej cytokinami, cytotoksycznością, działaniem komórek T (CASSADY *ET AL.*, 2016). Prowadzi to do konieczności dokładniejszego rozważenia działania i roli układu odpornościowego w kwestii wiroterapii onkolitycznej.



## ROLA UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Głównym zadaniem układu odpornościowego jest utrzymanie homeostazy organizmu, w szczególności poprzez utrzymanie tolerancji na własne antygeny, niszczenie komórek wykazujących ekspresję nieprawidłowych lub zmienionych antygenów własnych (komórki nieprawidłowe, stare, nowotworowe), a także obronę przed patogenami. Spontanicznie pojawiające się w następstwie mutacji somatycznych komórki nowotworowe są niszczone przy udziale sprawnie działającego układu odpornościowego.

Istotną rolę w rozpoznaniu komórek pełni ekspresja cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy I (ang. *Major Histocompatibility Complex I*, MHC-I, albo ang. *Human Leukocyte Antigens*, HLA, w przypadku ludzi) na błonie komórkowej. Wyeksponowanie przez MHC-I peptydu rozpoznawanego przez receptor TCR limfocyta T-cytotoksycznego CD8<sup>+</sup> kończy się apoptozą komórki eksponującej. Również brak MHC-I na powierzchni komórki powoduje jej śmierć, poprzez aktywację komórek NK (ang. *natural killers*) i apoptozę<sup>12</sup>. Komórki nowotworowe często mają niewielką ekspresję MHC-I, ale wydzielają cytokiny immunosupresyjne, które m.in. blokują receptory komórek NK albo przeciwdziałają stanowi zapalnemu. Rola wybranych cytokin została przedstawiona w tab. 2., s. 14.

W odpowiedzi na infekcję wirusową komórki zainfekowane wydzielają interferon (IFN), który blokuje możliwość dalszego infekowania komórek, wrażliwych na ten sygnał. Istotną kwestią jest fakt, że część komórek nowotworowych traci zdolność reagowania na IFN (wadliwa ścieżka Ras/PKR/eIF-2 $\alpha$ ), pozwalając na namnażanie się wirusów onkolitycznych.

Wirusy onkolityczne, jako cząstki obce dla organizmu, mogą wywoływać odpowiedź odpornościową ograniczającą skuteczność wiroterapii. Przeprowadzono retrospektywną analizę kliniczno-epidemiologiczną, mającą na celu identyfikację czynników wpływających na skuteczność wiroterapii adenowirusami (TAIPALE ET AL., 2016). W grupie 170 pacjentów zbadano występowanie i stężenie przeciwciał przeciwko adenowirusom użytym w terapii: wykryto je u 119 badanych (dowolne stężenie niezerowe), zaś u pozostałych 51 — wynik był negatywny. Zauważono, że pacjenci,

---

<sup>12</sup> Dotyczy to komórek innych niż te, których zadaniem jest prezentowanie antygenów (ang. *antigen-presenting cell*, APC)

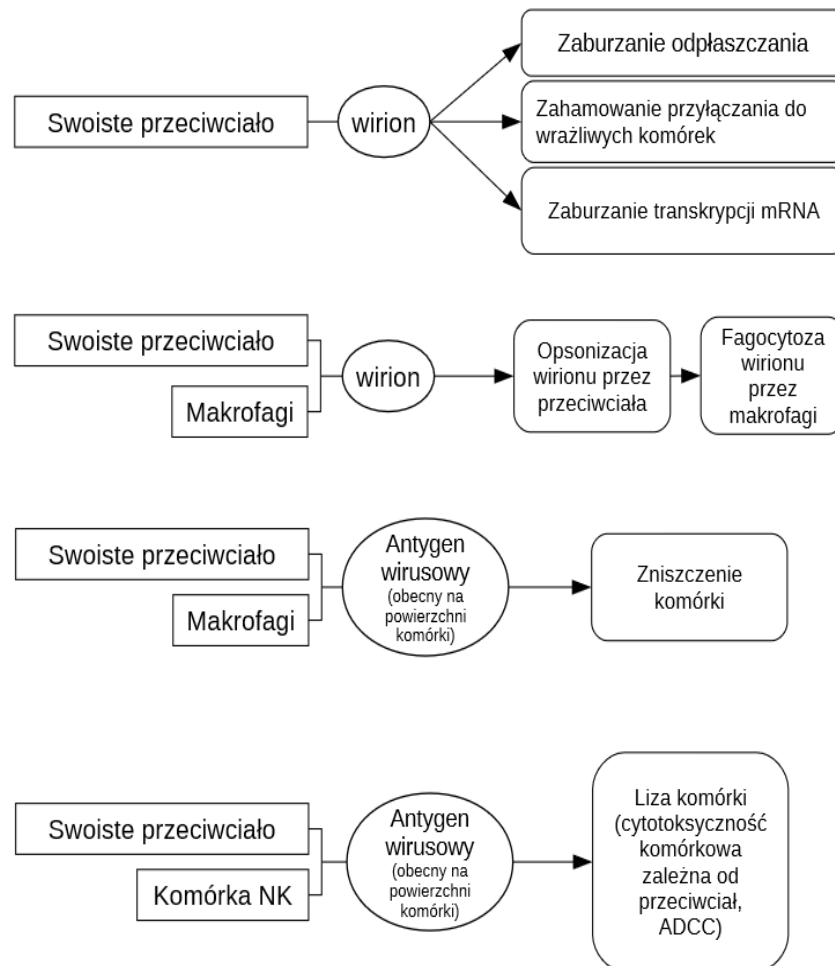
u których nie wykryto przeciwciał neutralizujących wirotepauy, mieli dłuŝszy czas przeŝycia (mediana parametru *overall survival* wyniosła 239 dni), w porównaniu do pacjentów ze stwierdzoną obecnością przeciwciał antyadenowirusowych (mediana: 122 dni) (TAIPALE *ET AL.*, 2016). Wskazuje to na wiêksze prawdopodobieństwo rozpoznania i zneutralizowania adenowirusów przez swoiste przeciwciała, w porównaniu np. z wirusem krowianki (IBIDEM).

**Tabela 2.** Rola wybranych cytokin w odporności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej

Nazwa grupy cytokin	Produkowane przez	Przedstawiciele danej grupy cytokin [UniProt]	Wybrana funkcja cytokiny
Interleukiny (IL) (bez interferonów)	Makrofagi, leukocyty	IL-24 [Q13007]	Działanie przeciwnowotworowe
jw.	jw.	IL-8 [P10145]	Działanie przeciwwirusowe, w szczególności przeciw infekcji adenowirusowej
Interferony (IFN) (podgrupa IL)	Makrofagi, fibroblasty	IFN-I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ [P01574])	Oddziaływania z komórkami NK; hamowanie replikacji wirusa
jw.	Komórki NK, limfocyty CD4 <sup>+</sup> T-helperowe 1 i CD8 <sup>+</sup> T-cytotoksyczne,	IFN-II (IFN- $\gamma$ [P01579])	Działanie przeciwnowotworowe
jw.	m.in. komórki dendrytyczne plazmacytoidalne i wywodzące się z linii monocytno- makrofagowej	IFN-III (IFN- $\lambda$ 1 [Q8IU54], IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3, IFN- $\lambda$ 4)	Działanie przeciwwirusowe (PALMA-OCAMPO <i>ET AL.</i> , 2015)
Czynniki martwicy nowotworu (TNF)	Makrofagi, limfocyty T	TNF- $\alpha$ [P01375] TNF- $\beta$ [P01374 ]	Działanie przeciwnowotworowe
Transformujące czynniki wzrostu beta (TGF- $\beta$ )	Niektóre limfocyty T, komórki nowotworowe	TGF- $\beta$ 1 [P01137]	Działanie immunosupresyjne, pronowotworowe (CONNOLLY <i>ET AL.</i> , 2012)

Źródło: wskazane w tabeli, opracowanie własne

Odporność zależna od przeciwciał (por. il. 2.) skierowana może być przeciwko samym wirionom lub też komórkom przechodzącym infekcję wirusową.



**Ilustracja 2.** Wybrane reakcje antywirusowe układu odpornościowego, mechanizmy inicjowane przez przeciwciała

Źródło: rysunek własny

Aby zmniejszyć skutki niepożądane ze strony układu odpornościowego przy podaniu dożylnym wirusów onkolitycznych, można zastosować:

- I. wirusy o słabej immunogenności, takie jak np. wirusy związane z adenowirusami (ang. *adeno-associated viruses*, AAV) z rodziny *Parvoviridae* (ALAM ET AL., 2011; 2014)<sup>13</sup>, *Alphaviridae* (ZAJAKINA ET AL., 2015 za: LUNDSTROM, 2017), forma EEV wirusa krowianki (ICHIHASHI, 1996; KIRN ET AL., 2008).

13 AAV są rozpatrywane częściej jako wektory w terapiach genowych lub w immunoterapii nowotworów.

- II. wirusy nierozpoznawane przez układ odpornościowy (indywidualne testy pozwalają określić występowanie i miano przeciwciał IgG przeciwko wirusowi);
- III. różnego rodzaju transportery komórkowe (por. CELYVIR), porównywane do konia trojańskiego (LI *ET AL.*, 2016; PAN *ET AL.*, 2013);
- IV. wiriony w otoczce z nanocząsteczek chroniącej przed rozpoznaniem (Ad/PEGbPHF);
- V. podać równolegle z wirusem onkolitycznym taki sam wirus, pozbawiony zdolności replikacji, mający za zadanie ochronić właściwy wiroteapeutyk przed neutralizacją przez przeciwciała (XU *ET AL.*, 2018). Jest to metoda wymagająca dokładniejszego zbadania.

Oprócz obniżenia rezultatów leczenia, aktywacja układu odpornościowego zakończyć może się poważniejszymi konsekwencjami. W 1999 roku osiemnastoletni Jesse Gelsinger, biorący udział w testach klinicznych terapii genowej, zmarł po wystąpieniu odpowiedzi odpornościowej. Była ona spowodowana podanym dożylnie Ad 5, rozpoznawanym przez przeciwciała. Zbyt duża dawka preparatu wirusowego spowodowała niewydolność wielonarządową, związaną z nadmierną aktywacją układu odpornościowego (STOLBERG, 1999; SIBBALD, 2001).

Z drugiej zaś strony infekcje wirusowe mogą stymulować odpowiedź przeciwnowotworową (JACQUELINE *ET AL.*, 2017), przykładowo: wirus grypy przeciwko rakowi płuc (IHEAGWARA *ET AL.*, 2014). Powodem jest podobieństwo antygenowe białek wirusowych (istotne są wzorce molekularne związane z patogenami, ang. *Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs) do antygenów nowotworowych (ang. *tumor-associated antigens*, TAAs; *tumour-specific antigens*, TSAs; także *Tumor-associated peptides*, TUMAPs oraz *Tumor-specific peptides*, stosowane w spersonalizowanych szczepionkach w projekcie APVACS/GAPVAC<sup>14</sup> [[//gapvac.eu/science/apvacs/](http://gapvac.eu/science/apvacs/)]). Limfocyty T-helperowe, rozpoznające dany antygen, aktywują odpowiedź komórek T-cytotoksycznych (IHEAGWARA *ET AL.*, 2014). Liza komórek prowadzi do reakcji zapalnej

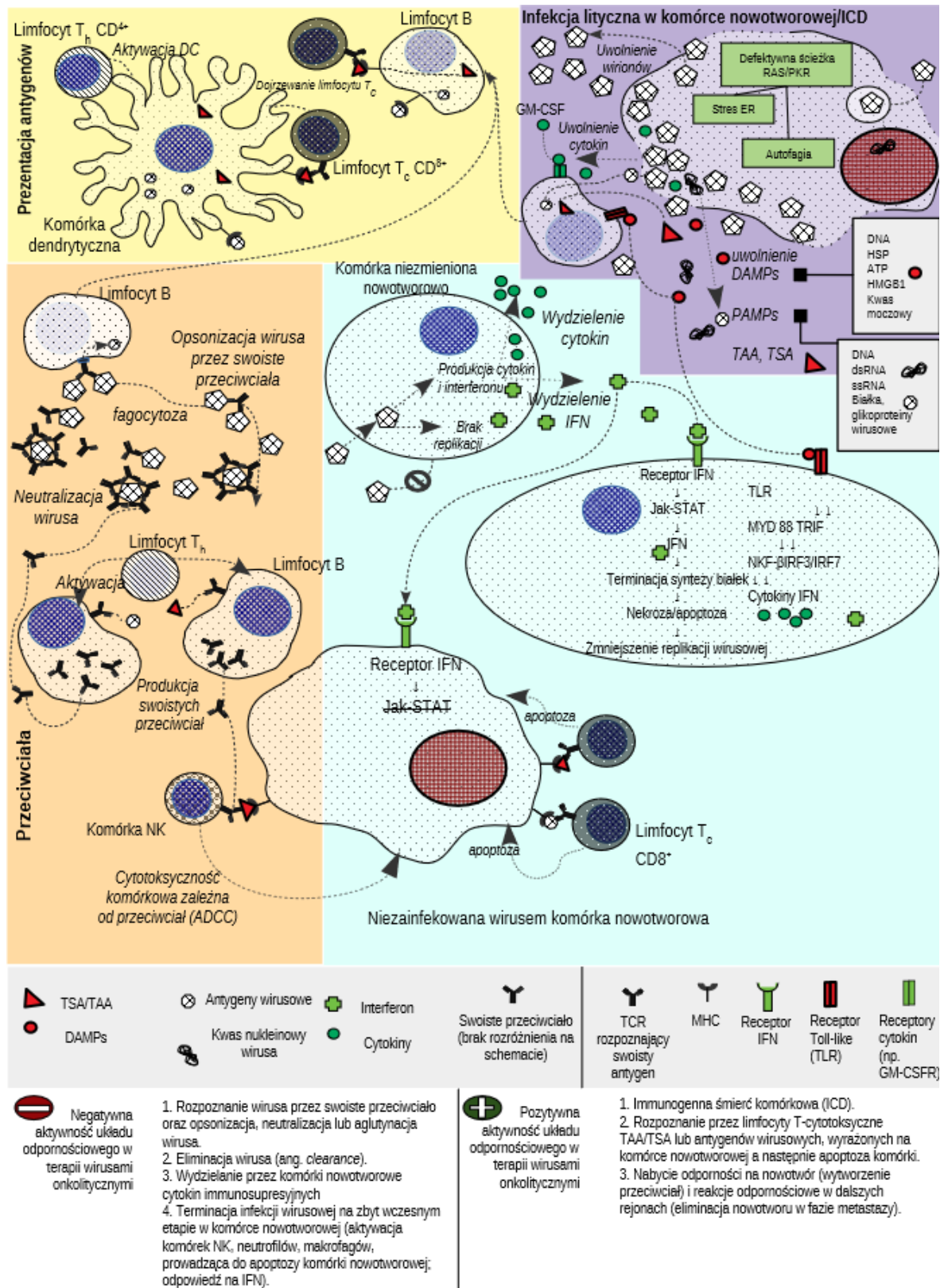
---

14 GAPVAC (skrót od ang. *The Glioma Actively Personalized Vaccine Consortium*) w swoich celach zakłada ustalenie działania antygenów na odpowiedź antynowotworową ([//gapvac.eu/science/objectives/](http://gapvac.eu/science/objectives/)). Założyć można, że badania te mogłyby wpłynąć na projektowanie wirusów onkolitycznych albo mogłyby być połączone w złożoną terapię.

z powodu wykrycia wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem komórek/tkanek (ang. *Damage Associated Molecular Patterns*, DAMPs).

Nie do końca poznany zjawiskiem jest wykorzystanie układu odpornościowego do zmniejszenia efektów negatywnych terapii onkolitycznej (wieliminowania infekcji komórek niezmiennych nowotworowo) (BALATHASAN *ET AL.*, 2017).

Podsumowaniem tego rozdziału jest schemat, będący próbą przedstawienia odpowiedzi ze strony układu odpornościowego przeciw komórkom zainfekowanym wirusami oraz przeciw wirusom (il. 3., s. 18).



**Ilustracja 3.** Wybrane mechanizmy odpowiedzi układu odpornościowego w terapii przeciwnowotworowej wirusami onkolitycznymi

Źródło: rysunek własny

## HISTORIA ZASTOSOWANIA WIRUSÓW ONKOLITYCZNYCH

Można zastanawiać się, czy anegdotyczne uzdrowienie Peregryna Laziosi (święty Kościoła katolickiego, patron chorych na raka, mający żyć w średniowiecznych Włoszech w latach 1260-1345) mogłoby być spowodowane zakażeniem wirusowym: wedle legendy zmiany nowotworowe na nodze ustąpiły przez noc, a św. Peregryn nie musiał poddawać się ryzykownej amputacji kończyny i dożył późnej starości (IMMUNOONCOLOGY, 14 lipca 2015).

Zanim Dimitrij Iwanowski (1892), Martinus Beijerinck (1898), Fryderyk Loeffler wraz z Paulem Froschem (1898) zaobserwowali istnienie niefiltrowalnych czynników chorobotwórczych<sup>15</sup>, mniejszych niż bakterie, w połowie XIX wieku spisywano pierwsze lekarskie wzmianki o możliwym leczniczym wpływie niektórych chorób na nowotwory. Obecnie wiadomo, że schorzenia te wywoływane są przez wirusy. Przekazy dotyczyły pacjentów cierpiących na nowotwory pochodzenia hematologicznego, które ulegały krótkotrwałej regresji pod wpływem infekcji wirusowych (omówiono w: KELLY, RUSSELL, 2007).

W 1904 roku włoski ginekolog Nicola De Pace zaobserwował regresję guza szyjki macicy, zbiegającą się w czasie z podaniem pacjentce atenuowanego wirusa wścieklizny (szczepienie po ugryzieniu przez psa). Podobny rezultat zaobserwowano u innych ośmiu pacjentek, którym podano osłabionego wirusa wścieklizny. W 1912<sup>16</sup> została opublikowana praca opisująca ten eksperyment (tytuł włoski: „*Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica*”). Można uznać to za pierwszą udokumentowaną próbę celowego użycia wirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej (POWER, BELL, 2007), chociaż paradoksalnie ma ona swój początek w przypadkowej obserwacji.

Levaditi razem z Nicolau w 1922 roku przeprowadzili na myszach i szczurach obserwację wzrostu guzów skórnych i mięsaków (ang. *sarcoma*), zainfekowanych

---

15 Więcej na temat początków wirusologii: SUMMERS, 2014.

16 Niektóre źródła (Mahoney i wsp. w artykule z października 2014 roku, który ukazał się w Scientific American, strona preparatu Rigvir), podają, że artykuł (o nieznanym tytule) lub inny rodzaj doniesienia naukowego autorstwa De Pace'a został opublikowany w 1910. Nie udało się potwierdzić tego wydania, wydaje się, że jest to związane z pomyłką w dacie albo trudną dostępnością.

W 1912 roku umiera wspomniana pacjentka z 1904 roku.

herpeswirusem albo wirusem krowianki (ang. *Vaccinia Virus*, VV). Porównanie tkanki zakażonej z próbą kontrolną (wolną od wirusów) pokazało zmniejszony przyrost masy nowotworu w przypadku występowania infekcji wirusowej (za: HAMMILL *ET AL.*, 2010; prace oryginalne Levaditiego i Nicolau nie zostały zdigitalizowane i dostępne są wyłącznie w języku francuskim: *Sur la culture de virus vaccinal dans les neoplasmes epitheliaux* [O hodowli wirusa krowianki w nowotworach nabłonkowych, tłum. własne], 1922; *Affinite du virus herpetique pour les neoplasmes epitheliaux* [Powinowactwo wirusa opryszczki względem nowotworów nabłonkowych, tłum. własne], 1922).

Alice Moore w latach 1949-1951 prowadziła badania nad wirusem rosyjskiego dalekowschodniego zapalenia mózgu przenoszonego przez kleszcze (ang. *Russian Far East[ern] Encephalitis Virus*), który zatrzymał lub spowodował całkowite usunięcie nowotworów w modelu zwierzęcym, m.in. nerwiaka zarodkowego (ang. *neuroblastoma*, agresywny nowotwór, występujący u dzieci). Jednakże infekcja oprócz efektu leczniczego, kończyła się śmiercią zwierząt zainfekowanych, a próby atenuacji wirusa nie pozwalały na zachowanie jego wysokiej onkolityczności (za: HAMMILL *ET AL.*, 2010). Innym wirusem badanym przez Moore był szczep Egipt 101 wirusa Zachodniego Nilu (ang. *West Nile virus*, WNV), należący do rodziny *Flaviviridae*. W celu uzyskania ochrony przed nadmiernym neurotropizmem WNV, próbowano wykorzystać wirusa choroby Newcastle (ang. *Newcastle Disease virus*, NDV) do preinfekowania niezmiennych nowotworowo komórek mózgu (omówiono w pracy: KELLY, RUSSELL, 2007; MOORE, 1952 oraz SOUTHAM, MOORE, 1954, omówione w: VÄHÄ-KOSKELA *ET AL.*, 2007).

Do 1952 roku przeprowadzono badania nad 42 różnymi typami wirusów, wstrzykiwanymi dożylnie lub dootrzewnowo zwierzętom z guzami; 11 z nich spowodowało regresję guza w co najmniej jednym modelu badawczym (za HAMMILL *ET AL.*, 2010).

W 1956 roku miała miejsce pierwsza próba kliniczna z użyciem wirusów onkolitycznych (HUEBNER *ET AL.*, 1956\*, za: VENKATARAMAN *ET AL.*, 2008). Zastosowano 10 serotypów dzikich adenowirusów (w tamtych latach adenowirusy znane były jako wirusy A-P-C, ang. *A-P-C viruses*) w leczeniu raka szyjki macicy u 30 pacjentów. Wybór ten był spowodowany ich wysoką cytopatycznością *in vitro* względem komórek HeLa.



*In vivo* nie zaobserwowano znaczącego wpływu na przebieg choroby (SMITH *ET AL.*, 1956\*). Jeśli było to możliwe, wybierano serotypy, na które leczony nie posiadał przeciwciał. U dwóch trzecich pacjentów zanotowano lokalną odpowiedź w tkance nowotworowej, w postaci nekrozy i owrzodzenia (ang. *ulceration of tumour*), jednak bez dokładnych informacji, które pozwoliłyby porównać lub ocenić obiektywnie skuteczność leczenia. Ostatecznie wszyscy pacjenci zmarli z powodu progresji choroby nowotworowej (SMITH *ET AL.*, 1956).

Część artykułów naukowych publikowana jest jedynie w językach narodowych. Duże znaczenie ma to w przypadku badań oryginalnych, ograniczając przepływ informacji — niedawnym przykładem będą chińskie publikacje dot. Oncorine. Na Łotwie, znajdującej się za żelazną kurtyną w latach 50., zespół do którego należy doktor Aina Muceniece opublikował w języku łotewskim oraz rosyjskim swoje badania nad potencjałem onkolitycznym wirusów ECHO (ang. *enteric cytopathogenic human orphan viruses*, ludzkie jelitowe cytopatogenne wirusy sieroce, enterowirusy). W krótkim artykule przeglądowym przybliżającym część tych rosyjskojęzycznych prac podano, że w fazie wczesnych badań (lata 1960-1965) 72% z 60 znanych enterowirusów wykazywało onkotropizm oraz onkolityczność (BRÜVERE *ET AL.*, 2002). W roku 1968 rozpoczęły się pierwsze badania kliniczne nad wirusem ECHO-7, współcześnie znanym pod nazwą RIGVIR ([dostęp 27 lipca 2018, dostępny w Internecie: [//rigvir.com/clinical-studies/](http://rigvir.com/clinical-studies/)]). Do 2002 roku w badaniach tych poddano leczeniu 1063 pacjentów z różnymi nowotworami, w tym 824 z czerniakiem złośliwym (BRÜVERE *ET AL.*, 2002). Zaobserwowano brak poważnych reakcji ubocznych preparatu oraz zwiększenie liczby pacjentów z pięcioletnim czasem przeżycia w porównaniu z grupami leczonymi innymi metodami (omówiono w: BRÜVERE *ET AL.*, 2002).

W 1974 roku przeprowadzono testy kliniczne z użyciem nieatenuowanego, dzikiego wirusa nagminnego zapalenia przyusznic (tzw. wirus świnki, ang. *mumps virus*, MuV) na grupie 90 pacjentów w terminalnym stadium choroby nowotworowej (rak układu pokarmowego, układu oddechowego, rak macicy zajmujący powyżej 50% narządu) (ASADA, 1974). U 88% leczonych (79 osób) odnotowano poprawę: u 41% (37 osób) wystąpiła całkowita regresja lub zmniejszenie guza powyżej 50%, u 47% (42 osoby) —

---

\* Jest to ten sam artykuł.

zatrzymanie wzrostu lub zmniejszenie guza poniżej 50%; reakcjami ubocznymi na leczenie było krwawienie lub gorączka, wystąpiły one u siedmiu osób, czyli około 8% leczonych. Autor pracy przypuszczał, że efekt cytostatyczny wynikał z powodu podania zbyt niskiej dawki wirusa. Oprócz powyższych wyników, na uwagę zasługuje dyskusja, zawierająca polemikę z ówczesną opinią części badaczy, iż efekt onkolityczny miałby być zależny od antywirusowego działania interferonu lub innych mechanizmów związanych z odpornością. Gdyby ta hipoteza była słuszna, stan chorych polepszałaby dowolna infekcja wirusowa; dodatkowo bezpośrednio podanie wirusa do tkanki nowotworowej nie skutkowałoby efektem onkolitycznym z powodu niskiej produkcji interferonu. Kolejnym kontrargumentem była odpowiedź antynowotworowa u pacjenta, nie posiadającego przeciwciał anti-MV, różniąca się od reakcji na podanie szczepionki atenuowanej (IBIDEM).

Na zmniejszenie zainteresowania badaniami nad wirusami onkolitycznymi wpływ miały poniższe okoliczności:

- 1) Przede wszystkim brak narzędzi inżynierii genetycznej, równoważny z niemożnością uzyskania efektywnego szczepu, który byłby też w pełni bezpieczny (atenuowany); dopiero w latach 70. opracowano technikę rekombinacji DNA (JACKSON *ET AL.*, 1972), udoskonalaną od tamtej pory.
- 2) Powiązane z powyższym trudności w obrazowaniu i pomiarze replikacji wirusów *in vivo* (obecnie stosuje się nieinwazyjne metody, polegające na umieszczeniu specyficznych transgenów, dla przykładu *GFP*, *lacZ*).
- 3) Ograniczenia techniczne w otrzymywaniu większych ilości czystych preparatów wirusowych, zdalnych do użycia w testach klinicznych.
- 4) Niepełne zrozumienie mechanizmu onkolityczności oraz działania przeciwnowotworowego.
- 5) Nadzieje wiązane z chemioterapią — początkowy entuzjazm na początku XX wieku, znaczący jej rozwój pod koniec lat 40. spowodowany przez wprowadzenie antagonisty kwasu foliowego (aminopteryny) w leczeniu białaczki przez Farbera i współpracowników w 1948 roku, a później opracowanie skuteczniejszej formy leczenia w latach 60. XX wieku (DEVITA, CHU, 2008).

- 6) Postępy anestezjologii (znieczulenie, sterylność), pozwalające na niemożliwe wcześniej interwencje chirurgiczne.

Opracowanie nowych metod biotechnologicznych spowodowały ponowny wzrost zainteresowania wirusami onkolitycznymi. Hiroshi Fukuhara, Yasushi Ino i Tomoki Todo podają jako jeden z momentów przełomowych rok 1991, kiedy wychodzi praca dot. eksperymentalnego leczenia glejaków przy użyciu zmodyfikowanego genetycznie wirusa herpes simplex-1 (HSV-1) (MARTUZ *ET AL.*, 1991 za: FUKUHARA *ET AL.*, 2016).

Ponadto zmienia się postrzeganie procedury operacyjnej — chociaż pozostaje podstawą leczenia wielu nowotworów (sztyndarowym przykładem jest wcześniej wykryty czerniak), niektóre analizy skłaniają do stawiania hipotezy, że zabieg ten nie wpływa na przebieg choroby, chyba że zlokalizowana w newralgicznych miejscach zmiana nowotworowa zagraża życiu pacjenta (praca przeglądowa: BENJAMIN, 2014).

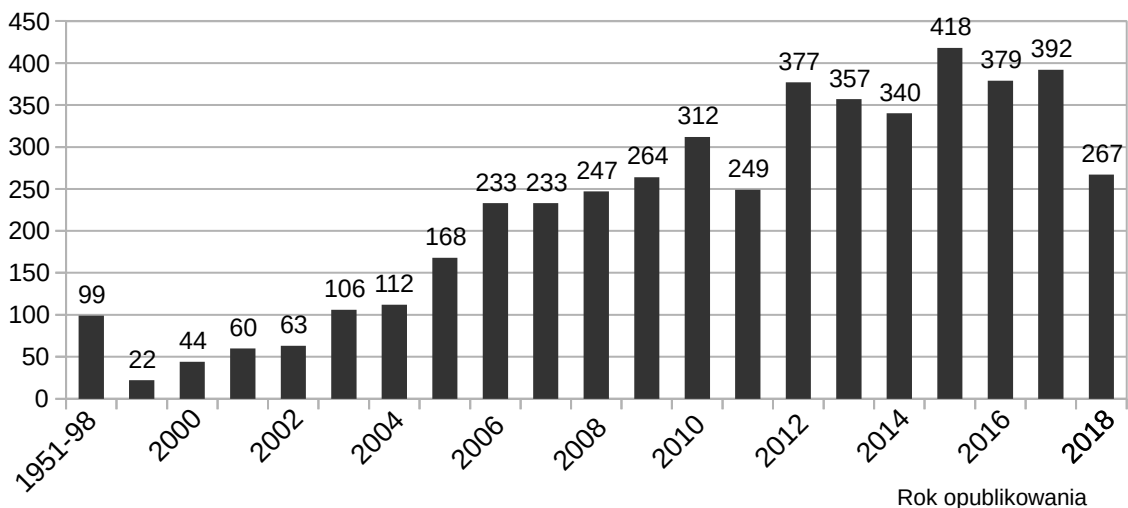
## OBECNY STAN BADAŃ

Magazyn Forbes uznał za czterech „najważniejszych graczy” w terapii onkolitycznej na rok 2017 reowirusy, herpeswirusy, wirusy coxsackie oraz adenowirusy (WEINTRAUB, 2016).

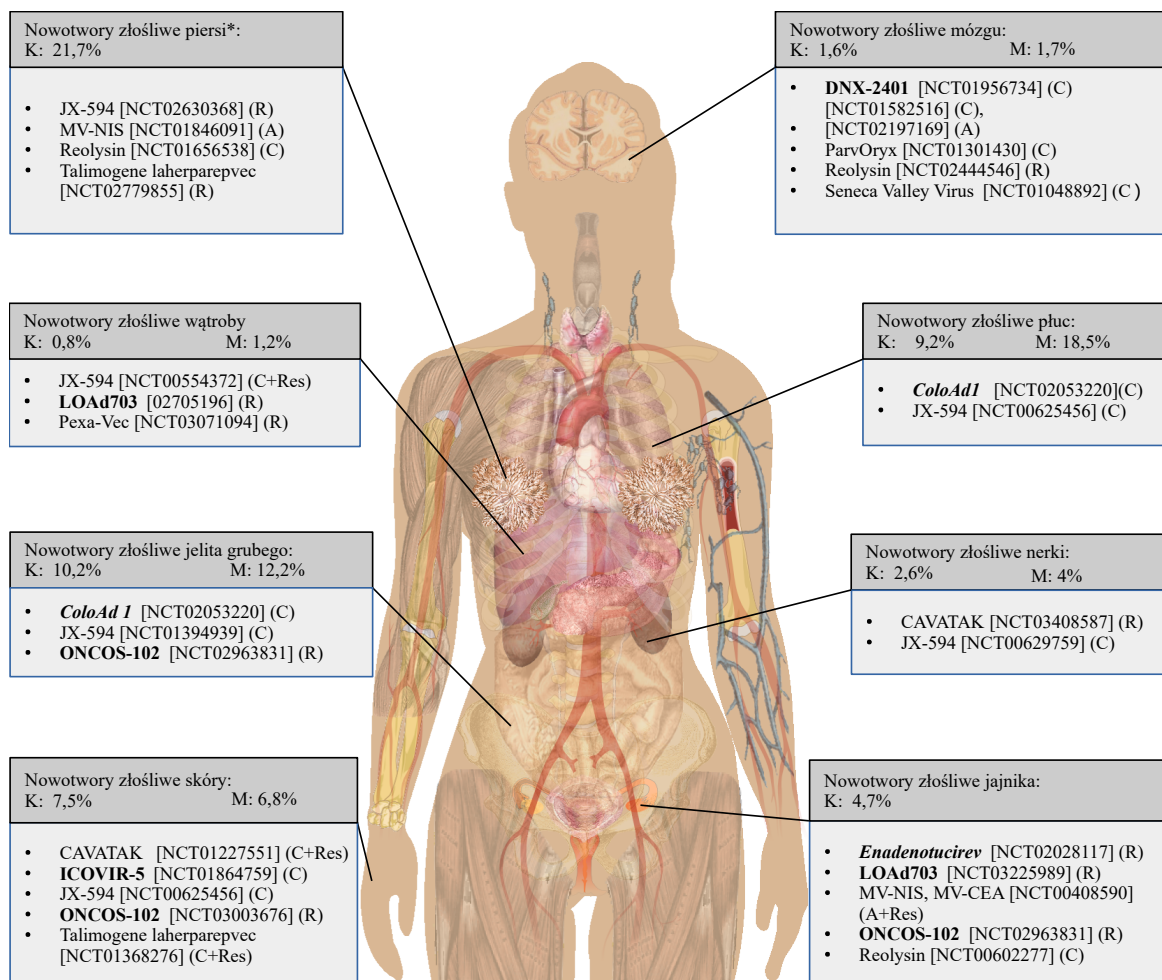
Według [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) obecnie prowadzonych (aktywnych, bez rekrutacji) jest 11 prób klinicznych dot. onkolizy wirusowej (stan na 4 lipca 2018). Dwie z nich dotyczą adenowirusów (CG0070 oraz DNX-2401). W bazie tej można znaleźć w sumie 75 badań dotyczących wirusów onkolitycznych (stan na 6 lipca 2018, wybrane próby kliniczne przedstawione na il. 4., s. 24). Do 10 czerwca br. ukazały się 235 publikacje nt. onkolizy, przez miesiąc (od 10 czerwca do 10 lipca) opublikowano kolejne 32 (średnio jedną dziennie), co wpisuje się w obecny trend zainteresowania wirusami onkolitycznymi (por. wykres 1.).

Od 2012 roku ukazuje się tematyczne czasopismo elektroniczne *Oncolytic Virotherapy*, jednak artykuły dot. wiroterapii onkolitycznej nadal ukazują się pod egidą innych publikacji, ogólnie o tematyce onkologicznej, a także m.in. w *The Lancet*, *PLOS*, *Cancer Research*.

**Wykres 1:** Liczba publikacji, dotyczących wirusów onkolitycznych, w bazie PubMed, w zależności od roku wydania



Źródło: opracowanie na własne na podstawie kwerendy „oncolytic AND (virus OR virotherapy)” w bazie PubMed [[//ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)], dane z 10 czerwca 2018



**Ilustracja 4:** Wybrane nowotwory i próby kliniczne wirusów onkolitycznych

K – częstotliwość zachorowań wśród kobiet, M – częstotliwość zachorowań wśród mężczyzn, pogrubieniem wyróżniono preparaty adenowirusowe, C – próba zakończona, Res – dostępne są wyniki, R – trwa rekrutacja

\*„Rak piersi” jest powszechnie używaną nazwą, chociaż zalecane jest stosowanie formy „rak sutka”, odpowiadającej znaczeniowo łacińskiemu *carcinoma mammae* (Lekarski Poradnik Językowy, [dostęp 27 lipca 2018, dostępny w Internecie: //lpj.pl/index.php?op=35&id=5]).

Źródło: kompilacja zrobiona na podstawie danych dot. nowotworów: Wojciechowska, Didkowska, *Zachorowania...*, kwerendy na portalu clinicaltrials.gov (5 lipca 2018), grafika: Mikael Häggström, Wikimedia Commons

Dostępne są opracowania metod laboratoryjnych związanych z wirusami onkolitycznymi, przykładowo *Methods and Protocols* pod redakcją D. H. Kirna, T. Liu, S. H. Thorne’a, wydane przez Humana Press w 2012 roku.

## WYBRANE WIRUSY ONKOLITYCZNE

Wobec ruchomej i nie ustalonej taksonomii wirusów (85 ze 122 rodzin wirusów nie sklasyfikowano do żadnego z ośmiu rzędów; *VIRUS TAXONOMY: 2016 RELEASE*, 2017), rozważano przyjęcie za pracą Augustyniak i wsp. (2012), podziału wirusów na wirusy RNA (jedno- i dwuniciowe) oraz na wirusy DNA. Zaletą tych pierwszych jest niewielki rozmiar genomu, ułatwiający atenuację, wprowadzanie i usuwanie genów, ponieważ łatwo jest zidentyfikować ich produkt (AUGUSTYNIAK *ET AL.*, 2012). Innym kryterium mogłoby być podzielenie wirusów na naturalnie lub sztucznie onkolityczne. Postanowiono omówić wirusy onkolityczne grupami wg podziału Davida Baltimore'a. Klasyfikacja ta oparta jest na cechach genomu, determinujących zajście procedury translacji w jeden z siedmiu sposobów (BALTIMORE, 1971).

Poniższy wykaz nie stanowi kompletnej listy wirusów onkolitycznych.

### 1. GRUPA I

Do grupy tej należą wirusy o dwuniciowym genomie DNA (dsDNA). Ich replikacja zachodzi w jądrze komórkowym, z wyjątkiem rodziny *Poxviridae* (Pokswirusy), które replikują się na terenie cytoplazmy, w specyficznych inkluzjach zwanych *viral factories*.

Przedstawiciele rodzin *Adenoviridae* (omówionych w następnym rozdziale), dawnych *Papovaviridae* (obecnie rozdzielonych na *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*) oraz *Herpesviridae* mogą wywoływać w procesie swojego namnażania podziały komórkowe gospodarza, prowadzące do nowotworzenia. *Spiritus movens* dla badań nad takimi wirusami była hipoteza, że usunięcie predyspozycji do onkogenności prowadziłoby do uzyskania onkolityczności. I tak, jeżeli zdezaktywuje się specyficzne wirusowe geny, odpowiedzialne za przełączanie cyklu komórkowego do fazy S, można zapobiec transformacji nowotworowej oraz uzyskać onkotropizm. Jest to jeden z kroków w dążeniu do uzyskania wyłącznego efektu onkolitycznego.

Pod względem zastosowania onkolitycznego badane są adenowirusy, pokswirusy, wirusy herpes (rodzina *Herpesviridae*, nie omówiona w pracy).

Pokswirusy (naturalnie onkolityczne) posiadają duży (do 375 kbp, kilo par zasad, kodujących od 150 do 300 lub więcej genów) liniowy, kowalencyjnie zamknięty, dwuniciowy DNA. Występuje u nich otoczka. Rozróżnia się dwie formy infekcyjne: IMV

(ang. *Intracellular Mature Virion*, brak polskiego odpowiednika) oraz EEV (ang. *Extracellular Enveloped Virion*). Komórki szybko przechodzące swój cykl komórkowy — takie jak komórki nowotworowe — są bardziej permissywne niż komórki dzielące się (za gruntowną pracę przeglądową nt. pokswirusów onkolitycznych: CHAN, McFADDEN, 2014)

Jednym z badanych pokswirusów jest wirus krowianki (ang. *Vaccinia virus*, skrót VV), i jego szczepy Wyeth, Lister oraz Western Reserve. Oprócz możliwości wejścia poprzez endocytozę zależną od receptorów komórkowych, VV może wejść do komórki poprzez pinocytozę. W atenuowanym VV selektywność wirusa względem komórek nowotworowych wynika z braku kinazy tymidynowej (ang. *thymidine kinase*).

Preparat JX-594 (Pexa-Vec, pexastimogene devacirepvec) oparty jest na szczepie Wyeth. Replikacja zależy od ścieżki sygnalizacyjnej EGFR/Raf/Ras i poziomu kinazy tymidynowej. W obszarze kodującym tę kinazę wklonowano pod syntetycznym promotorem wczesnym-późnym (ang. *early-late promotor*) gen kodujący GM-CSF, którego produkt odpowiada za stymulację odpowiedzi ze strony układu odpornościowego, oraz gen *lac-Z*, pozwalający na selekcję łysinek rekombinowanych wirusów oraz monitorowanie replikacji wirusowej w nowotworach (CHAN, McFADDEN, 2014; informacje za stroną producenta [[//sillajen.com/eng/sub/eng\\_sub.aspx?s\\_code=0201000000](http://sillajen.com/eng/sub/eng_sub.aspx?s_code=0201000000), dostęp 21 czerwca 2018]).

Próba kliniczna NCT00554372 pokazała wpływ dawki, podawanej bezpośrednio do tkanki nowotworowej, na czas przeżycia pacjentów z zaawansowanym rakiem wątroby (ang. *advanced hepatocellular carcinoma*). Przy podaniu niskiej dawki ( $10^8$  PFU, liczebność grupy badawczej  $n = 14$ ) mediana czasu przeżycia wynosiła 6,7 miesiąca, a przy wysokiej ( $10^9$  PFU,  $n = 16$ ) — wzrastała do 14,1 miesiąca (HEO *ET AL.*, 2013). Z kolei w badaniu oznaczonym numerem NCT00625456, zaobserwowano infekcję komórek związanych z angiogenezą nowotworową, prawdopodobnie z powodu wysokiej ekspresji genów kodujących FGF-2 oraz VEGF w tych komórkach (BREITBACH *ET AL.*, 2013).

Innymi preparatami opartymi na wirusie krowianki są: Talimogene laherparepvec, GL-ONC1.

## 2. GRUPA II

Do wirusów o jednoniciowym DNA (ssDNA) zaliczamy m.in. rodzinę *Parvoviridae*, której przynajmniej jednego przedstawiciela bierze się pod uwagę w badaniach nad onkolizją wirusową.

Preparat ParvOryx/ParvOryx01 oparty jest na niepatogennym parwowirusie szczurzym, zdolnym do infekowania i replikacji także w ludzkich komórkach. Jest on w stanie pokonać barierę krew-mózg (GELETNEKY *ET AL.*, 2012 ).

Przeprowadzono badanie kliniczne I i II fazy nad użyciem wiroterapeutyku ParvOryx w leczeniu glejaka (GELETNEKY *ET AL.*, 2012, NCT01301430). Osiemnastu badanych podzielono na dwie grupy. W obu z nich pacjentom podawano preparat przed operacją: pierwsza grupa otrzymywała preparat w obręb lub poblizko guza nowotworowego, druga zaś — dożylnie. Po operacji wszyscy pacjenci otrzymali ParvOryx do tkanki wokół miejsca resekcji (GELETNEKY *ET AL.*, 2012). Mediana całkowitego czasu przeżycia wśród pacjentów wyniosła 464 dni, z medianą czasu przeżycia bez progresji choroby (bez pogorszenia się stanu chorego) wynoszącą 111 dni (GELETNEKY *ET AL.*, 2017).

Podczas badania jeden z leczonych najwyższą dawką doświadczył poważnej reakcji ubocznej, prawdopodobnie związanej z preparatem ParvOryx. Dwa dni po podaniu wiroterapeutyku w obręb mózgowia zaobserwowano zanikanie świadomości u pacjenta oraz wodogłowie wymagające interwencji operacyjnej. Pacjent zapadł w śpiączkę i nigdy się nie wybudził. Badania laboratoryjne wykluczyły stan zapalny, ale nie określono też żadnej bezpośredniej przyczyny powyższej reakcji organizmu pacjenta. U innych leczonych w tej grupie nie odnotowano żadnych efektów ubocznych, związanych z ParvOryx (GELETNEKY *ET AL.*, 2017).

## 3. GRUPA III

Do grupy trzeciej zaliczane są wirusy dsRNA. Naturalnie występujące wirusy z rodziny *Reoviridae* posiadają właściwości onkolityczne. Reowirusy (ang. *Respiratory Enteric Orphan viruses*<sup>17</sup>, REO viruses) są izolowane z dróg oddechowych i jelit ludzi. Ponad połowa ludzkiej populacji posiada przeciwciała przeciwko białkom produkowanym przez

<sup>17</sup> Wirusy sieroce (ang. *Orphan Viruses*) nie są powiązane z chorobami gospodarza, nazwa zwyczajowo zostaje, nawet jeżeli stwierdzi się patogenność.



reowirusy, a infekcja przebiega bezobjawowo w niezmiennych nowotworowo komórkach, powodując jednak efekty cytopatyczne w komórkach nowotworowych. Efekt onkolityczny występuje w komórkach z aktywną ścieżką onkogenu RAS, która zapobiega antywirusowemu mechanizmowi obronemu PKR (CAREW *ET AL.*, 2013).

Reolysin jest preparatem firmy Oncolyticsbiotech. W badaniach nad tym wiroterapeutycznym zaobserwowano *in vivo* oraz *in vitro*, że śmierć komórki nowotworowej jest powodowana stresem retikulum endoplazmatycznego, prowadzącym do apoptozy (CAREW *ET AL.*, 2013).

#### 4. GRUPA IV

Genom wirusów (+)ssRNA może zostać rozpoznany jako mRNA i podlegać bezpośrednio translacji przez rybosomy w komórce gospodarza.

Należące do rodziny *Picornaviridae* wirusy polio<sup>18</sup> oraz Seneca Valley Virus (SVV) badane są pod kątem ich zastosowania w onkologii. SVV jest naturalnie niepatogenny i onkolityczny, preferencyjnie namnażając się w komórkach nowotworów neuroendokrynych (VENKATARAMAN *ET AL.*, 2008). Przeprowadzono dwie próby kliniczne fazy 1 dla SVV-001, określanego również nazwą NTX-010. Pierwsza (NCT01048892) skierowana była do młodych pacjentów (w wieku od trzech do 21 lat) z nerwiakiem zarodkowym, mięśniakomięsakiem prążkowanokomórkowym (ang. *rhabdomyosarcoma*), lub nowotworami z cechami różnicowania neuroendokrynymi (BURKE *ET AL.*, 2015). Druga próba sprawdzała skuteczność SVV w leczeniu nowotworów z cechami neuroendokrynymi u dorosłych (NCT00314925, status nieznan).

RIGVIR jest preparatem wirusowym opracowanym na Łotwie, zawierającym niemodyfikowanego genetycznie wirusa ECHO-7. Od roku 2004 jest on dopuszczony do leczenia czerniaka (melanoma) na Łotwie. Obecnie trwają badania, które będą spełniać unijne standardy. Wcześniejsze publikacje miały charakter retrospektywny, a w środowisku medycznym i naukowym pojawiły się głosy sceptyczne względem skuteczności preparatu oraz marketingu prowadzonego przez klinikę *International Virotherapy Center* (GORSKI, 2017; RITUMS, 2016; COLLIER, 2017).

---

18 Nie omówiony w tej pracy preparat PVSRIPO, oparty o chimerycznego wirusa polio-rhinowirus, obecnie jest w pierwszej fazie testów klinicznych (NCT01491893).

Najbardziej znanym przedstawicielem rodziny *Flaviviridae* (flawiwirusów) jest wirus Zika, wykazujący tropizm względem komórek nerwowych, przechodzących intensywne podziały, takich jak komórki macierzyste; z tego powodu zakażenie płodowe powoduje oligocefalię — namnażanie odbywa się w macierzystych komórkach nerwowych embrionu; zakażenie u dorosłych przebiega w sposób mniej drastyczny. Obserwacje te oraz badania nad tropizmem wirusa Zika pozwoliły na przypuszczenie, że będzie on preferencyjnie infekował i niszczył komórki macierzyste glejaka (ang. *glioblastoma stem cells*, GSCs). Badania *in vitro* oraz *in vivo* na myszach potwierdziły tę hipotezę (ZHU, 2017). Wirus Zika infekuje również komórki nerwiaka zarodkowego, rozpoznając antygen komórkowy CD24 (MAZAR *ET AL.*, 2018).

## 5. GRUPA V

Są to wirusy, których materiał genetyczny to jednoniciowy RNA o polarności ujemnej, (-)ssRNA. Do grupy V zaliczamy jedne z bardziej wirulentnych wirusów, m.in. wirusy odry i świnki (ang. *Measles*, *Mumps virus*, rodzina *Paramyxoviridae*), wirusa grypy (ang. *influenza virus*, rodzina *Orthomyxoviridae*), wirusa wścieklizny (ang. *Rabies virus*, rodzina *Rhabdoviridae*), wirusa Ebola i Marburg (rodzina *Filoviridae*). Większość z nich badana jest lub była w kontekście onkologiczności. Dodatkowo prowadzone są prace nad arenawirusami (rodzina *Arenaviridae*, wirus Lassa) oraz nad wirusem VSV (ang. *Vesicular Stomatitis Virus*, należący do rodziny *Rhabdoviridae*).

Wirus odry (ang. *Measles virus*, MV) należy do rodzaju *Morbilivirus*. Jest patogenny dla człowieka, powodujący wysoce zakaźną i ciężką chorobę, mogącą wywoływać niebezpieczne powikłania. Z tego powodu do prac laboratoryjnych wybierane są wirusy atenuowane, o długiej historii i o potwierdzonym bezpieczeństwie — np. oparte na szczepie Edmonston, stosowanym powszechnie w szczepieniach (najpierw w pojedynczej szczepionce przeciwko odrze, obecnie również jako jeden ze składników szczepionki skojarzonej MMR — od ang. *mumps-measles-rubella*, świnka-odra-różyczka).

Genom MV koduje 8 białek. Kapsyd o symetrii helikalnej jest zdolny do zwiększania pojemności. Właściwości onkologiczne wirus odry zawdzięcza powinowactwu białek kapsydu do receptorów CD46, wyrażanych w dużej liczbie

na błonach komórek nowotworowych. W przyłączeniu pośredniczy białko H, które odpowiada za specyficzność wiązania, w fuzji — białko F. Pozwala to na ukierunkowanie wirusa (zmiany w sekwencji białka H) bez zaburzania procesu fuzji (brak ingerencji w białko F) (DÖRIG *ET AL.*, za: GALANIS 2015; GALANIS *ET AL.*, 2015).

Aby uzyskać informacje nt. replikacji MV wklonowano gen kodujący rozpuszczalny peptyd CEA (ang. *carcinoembryonic antigen*, antygen rakowo- płodowy), który miał służyć za marker replikacji. Pozwalał on na pośrednią ocenę replikacji wirusa, jednak bez możliwości zlokalizowania jej. Sposobem na uzyskanie dodatkowych informacji było wklonowanie genu kodującego białko NIS. Symporter sodowo-jodowy (ang. *sodium iodide symporter*, NIS) został odkryty w 1996 roku w gruczole tarczycy. Pozwala on na efektywny wychwyty jonów jodkowych I<sup>-</sup>. Ekspresja genu kodującego białko NIS w komórce przy podaniu pacjentowi radioaktywnego jodu może mieć zastosowanie chemioterapeutyczne lub lokalizacyjne (obrazowanie metodą SPECT/CT). Akumulacja jodu zależy od odstępu czasowego między ekspresją transgenu a lizą komórki (HEMMINKI, 2014; GALANIS *ET AL.*, 2015).

Wklonowanie pojedynczego genu nie wpływa na efektywność namnażania się wirusa, jednak połączenie obu modyfikacji w obrębie jednego wektora MV powoduje „niekorzystną kinetykę replikacji” (HASEGAWA *ET AL.*, 2006). Kolejne badania polegały na sprawdzeniu skuteczności antynowotworowej w przypadku podania obu wirusów MV-NIS oraz MV-CEA: okazała się ona lepsza niż w przypadku zastosowania pojedynczego wirusa (IBIDEM). MV-CEA w połączeniu z radioterapią daje efekt synergistyczny w leczeniu glejaka wielopostaciowego (LIU *ET AL.*, 2007), MV-NIS — również (OPYRCHAL *ET AL.*, 2012).

Chimeryczny wirus Lassa-VSV, zawierający geny obu wirusów, wykazuje efektywność onkolityczną prawdopodobnie przez brak odpowiedzi interferonowej w komórkach nowotworowych (omówienie zjawiska w ÖZDUMAN *ET AL.*, 2008). Glikoproteina G obecna w osłonce tego wirusa została poddana modyfikacjom aby obniżyć neurotropizm, wynoszący 90% infekcji neuronów i 10% infekcji komórek glejowych, i zwiększyć bezpieczeństwo wirusa przy leczeniu nowotworów mózgu (WOLLMANN *ET AL.*, 2015). Alternatywną ochroną przeciw neuropatycznemu działaniu

VSV okazało się pobudzenie obwodowego układu odpornościowego niską dawką wirusa (badania na myszach, BALATHASAN *ET AL.*, 2017).

## 6. GRUPA VI

Do grupy VI należą wirusy (+)ssRNA, replikujące się przez pośrednik DNA przy użyciu odwrotnej transkryptazy oraz mające zdolność integracji z genomem gospodarza. Określa się je zbiorczo nazwą retrowirusów (rodzina *Retroviridae*). Do grupy tej należy m.in. HIV (ang. *Human Immunodeficiency Virus*, ludzki wirus niedoboru odporności).

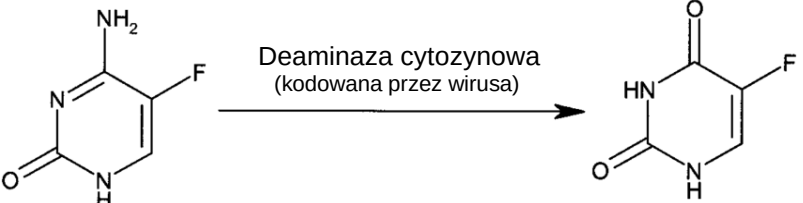
Wirusy z tej grupy, używane w terapii przeciwnowotworowej to tzw. RCR (ang. *replication-competent retroviruses*, zdolne do replikacji retrowirusy). Stanowią one platformę wektorową do opracowywania wiroterapeutyków. Jednym z RCR jest wirus mysiej białaczki (ang. *murine leukemia virus* — MML), mający poniższe cechy:

- ♦ zdolność do infekowania różnych typów komórek (amfotropizm), bez możliwości do namnażania się w komórkach w stanie spoczynku ( $G_0$ ),
- ♦ genom wirusowy integrujący się stabilnie z genomem gospodarza,
- ♦ brak naturalnej onkolityczności i cytotatyczności,

Powyższe cechy stanowią punkt wyjścia do zaprojektowania RCR, opartych o MML, niosących określony gen (szczegóły w tab. 3., s. 33), który ulegałby ekspresji w komórkach nowotworowych po integracji genomu wirusa (HIRAOKA *ET AL.*, 2007; KAWASAKI *ET AL.*, 2011).

Jak widać, działanie onkolityczne w tej grupie byłoby więc odmienne od omówionego w poprzednich podrozdziałach, podobne bardziej do terapii genowej. W wielu przypadkach określenie danej terapii jako immunoterapii, terapii onkolitycznej lub terapii genowej w leczeniu nowotworów jest kwestią umowną.

**Tabela 3.** Wybrane RCR kodujące gen deaminazy cytozynowej

Gen i jego produkt [UniProt]	Mechanizm działania
<p><i>FCYI</i> Deaminaza cytozynowa [Q12178]</p>	<div style="text-align: center;">  </div> <p>5-Fluorocytosyna Prolek, brak aktywności</p> <p>5-Fluorouracyl <b>Lek o działaniu cytotoksycznym</b></p> <p>Źródło: ilustracja za Rooseboom et al., 2004, zmodyfikowano</p>
<p>Wybrane retrowirusy z wklonowanym genem <i>FCYI</i>:</p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ MML: <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ KAWASAKI <i>ET AL.</i>, 2011 → leczenie międzybłoniaka (ang. <i>mesothelioma</i>),</li> <li>♦ HIRAOKA <i>ET AL.</i>, 2007 → leczenie wielogniskowego raka jelita grubego (ang. <i>multifocal colorectal cancer</i>).</li> </ul> </li> <li>♦ GALV (ang. <i>gibbon ape leukemia virus</i>): <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ LU <i>ET AL.</i>, 2012 → leczenie raka wątrobowokomórkowego (ang. <i>hepatocellular carcinoma</i>).</li> </ul> </li> </ul>	

## 7. GRUPA VII

Wirusy dsDNA, replikujące się przez ssRNA, z użyciem odwrotnej transkryptazy. Obecnie klasyfikuje się tutaj dwie rodziny: *Hepadnaviridae* (wyróżnić można onkogenego wirusa Hepatitis B, HBV) oraz *Caulimoviridae* (infekujące tylko rośliny, a więc nie posiadające zdolności onkolitycznych względem komórek ssaczy).

Nie udało się potwierdzić w literaturze zastosowania wirusów z grupy VII w terapii onkolitycznej ani ich rozpatrzenia pod tym kątem. Wiadomo jednak, że praca z wektorami opartymi o HBV jest specyficzna ze względu na wysoką ekonomiczność genomu<sup>19</sup> i skomplikowany cykl infekcyjny tego wirusa (trudności te opisuje praca BAI *ET AL.*, 2016).

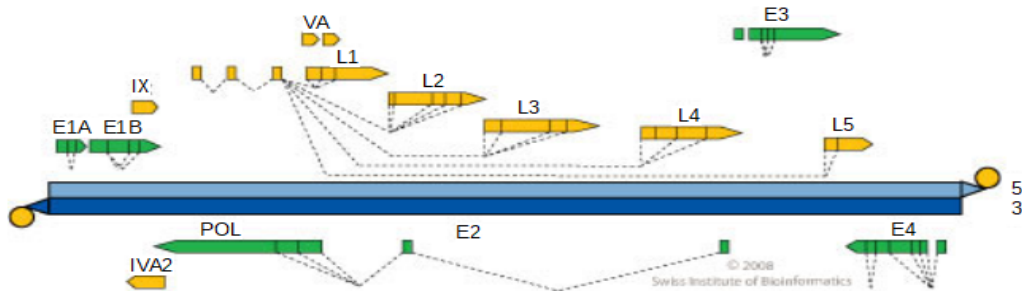
<sup>19</sup> Przez ekonomiczność rozumie się tutaj dużą ilość informacji, nachodzącej na siebie, zapisanej w niewielkim genomie.

## CHARAKTERYSTYKA ADENOWIRUSÓW

Adenowirusowe zapalenie kanalików ocznych u niemieckich robotników opisano już w XIX wieku, jednakże czynnik etiologiczny został przypadkowo odkryty dopiero w 1953 przez zespół badawczy W. Rowe'a, kiedy zaobserwowano proces cytopatyczny w hodowli komórek pozyskanych z resekcji ludzkich migdałków, w których planowano namnażać wirusa polio (PIEKAROWICZ, 2004: s. 468). Patogen odpowiedzialny za te zmiany nazwano czynnikiem degeneracyjnym migdałków (ang. *adenoids* — migdałki, skrót Ad, nazwę utworzono postępując wedle propozycji ICTV, poprzez dodanie sufiksu *-virus*). Rzadziej wspomina się o zespole Hilleman i Werner, który niemalże równolegle (1954), niezależnie opisał adenowirusy w artykule *Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness*.

Rodzina *Adenoviridae* jeszcze dziesięć lat temu dzieliła się na dwa rodzaje: *Aviadenovirus* i *Mastadenovirus*; obecnie (lipiec, 2018) wyróżniono pięć rodzajów: *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Siadenovirus* oraz *Mastadenovirus*. Do ostatniego z nich zaliczono ludzkie adenowirusy (ang. *Human Adenoviruses*, HAd-V lub HAdV-[numer]), dodatkowo wyróżniając siedem gatunków oznaczanych literami alfabetu łacińskiego od A do G, do których łącznie należy ponad 55 (sero)typów adenowirusów, odpowiadających za różne choroby (tab. 4., s. 35). Otwarta inicjatywa *Human Adenovirus Working Group* (współpraca między *National Center for Biotechnology Information* oraz społecznością badaczy adenowirusów) wyodrębniła HAdV od numeru 53 wzwyż do 84 ([//HADVWG.GMU.EDU, dostęp 7 grudnia 2017, stan na listopad 2017], serotypów powyżej HAdV-57 nie uwzględniono w tabeli 4.).

Za przydział do danego typu odpowiada m.in. organizacja genomu (il. 5.), np. różnice w regionie *E3*, liczba genów *VA RNA*, wspólny udział procentowy guaniny i cytozyny, odległość filogenetyczna, zdolność do rekombinacji.



**Ilustracja 5:** Genom ludzkiego adenowirusa 5 (Had-5)

Źródło: [dostępny w Internecie, ViralZone: //expasy.org/viralzone/4?outline=all\_by\_species, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, dostęp 26 lipca 2018], zmodyfikowano

**Tabela 4.** Klasyfikacja i porównanie cech znanych adenowirusów

Gatunki	Serotypy	Wywoływane choroby (PIEKAROWICZ, 2004: s. 469)	Potencjał onkogenny	Receptory komórkowe	G + C [%]
A	12, 18, 31	biegunki dziecięce	wysoki	CAR CD46	48-49
B← (B1+B2)	3←, 7, 11←, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55	choroby dróg oddechowych	niski	(i CD80, CD86 u Ad 3; NANDI, LESNIAK, 2009)	50-52
C←	1, 2, 5←, 6, 57	stany zapalne u dzieci	niski	CAR	57-59
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22- 30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56	zapalenie spojówek	brak	CAR	58
E	4	zapalenie oczu (Japonia), choroby dróg oddechowych rekrutów	brak	CAR	57-61
F	40, 41	niezależne od pory roku biegunki dziecięce	brak	CAR	57-59
G	52	[bd.]	[bd.]	[bd.]	[bd.]

[bd.] - brak danych; ← gatunki i serotypy używane jako onkolityczne.

Źródło: wskazane w tabeli, opracowanie własne

W testach klinicznych wiroterapii onkolitycznej używane są rekombinowane adenowirusy (ang. *recombinant adenoviruses* — rAV), określane w publikacjach jako warunkowo replikujące się (ang. *conditionally replicating adenoviruses* — CRAds) lub jako ograniczenie zdolne do replikacji (ang. *restricted replication-competent adenoviruses*, RRCAs), w przeciwieństwie do wektorów wirusowych, które nie wytwarzają wirionów potomnych (określane są jako ang. *replication-deficient/defective*, w tej pracy przyjęto skrót RD).

Zaletami adenowirusów w pracy laboratoryjnej oraz do wykorzystania w terapiach są:

- ◆ linearny, dwuniciowy DNA o wielkości około 38 kpz, łatwy w modyfikacji,
- ◆ brak integracji z genomem gospodarza,
- ◆ stabilność genomu wirusowego (w przeciwieństwie do wirusów RNA),
- ◆ pojemność genomu adenowirusowego, pozwalająca na wklonowanie długich fragmentów,

- ♦ poznana budowa, w szczególności receptorów wirusowych, co pozwala na zwiększenie infekcyjności względem komórek nowotworowych, które nie wyrażają receptorów CAR w dostatecznej liczbie (omówienie receptorów adenowirusowych w pracy przeglądowej: LAW, DAVIDSON, 2005),
- ♦ zdolność do 1000-krotnego zwielokrotnienia liczby cząsteczek wirusowych (ang. *viral particles*, vp) podczas pojedynczego cyklu replikacyjnego (CHU *ET AL.*, 2004),
- ♦ aktywacja komórek T CD8<sup>+</sup> (poprzez TLR 9, ang. *toll-like receptor*, receptor toll-like, i mechanizmy niezależne od TLR), mająca zastosowanie w immunoterapii nowotworów (DRAPER, HEENEY, 2010: informacja za stronę [//TARGOVAX.COM/TECHNOLOGY/VIRUS-BASED-CANCER-IMMUNOTHERAPY/ADENOVIRUS-IS-AN-OPTIMAL-VECTOR-FOR-CANCER-IMMUNOTHERAPY/DEFAULT.ASPX], dostęp 25 czerwca 2018).

Jako wady wymienia się ich silną immunogenność, przez którą dalsze używanie adenowirusów jako wiroterapeutyku w terapii genowej stało pod znakiem zapytania, po tragicznej śmierci podczas jednej z prób klinicznych (STOLBERG, 1999; BRENNER, 2000; SIBBALD, 2001). Pacjentowi podano dawkę około  $4 \cdot 10^4$  cząsteczek adenowirusowego wektora RD z genem kodującym transkarbamyłazę ornitynową (OTC). Przypuszcza się, że niska wydolność wątroby, spowodowana brakiem OTC, w połączeniu z wydzieleniem dużej ilości cytokin prozapalnych, mogły doprowadzić do niewydolności wielonarządowej (AU *ET AL.*, 2007).

Cząsteczki adenowirusowe są rozpoznawane i usuwane przez układ odpornościowy<sup>20</sup>, oprócz tego Ad wykazują hepatotropizm i hepatotoksyczność (ENGLER *ET AL.*, 2004). Wymusza to podawanie Ad onkolitycznych lokalnie (w pobliżu lub obszar tkanki nowotworowej), nie pozwalając na podanie dożylnie. Problemy te stanowią bodziec dla opracowywania metod ukrycia i ukierunkowania adenowirusów (transportery komórkowe, tworzenie kompleksów wirus-nanocząsteczki).

Można wskazać kilka etapów cyklu infekcyjnego adenowirusów ważnych dla przebiegu onkolizy. Pierwszy z nich to internalizacja, zależna od komórkowych

20 W 2014 zbadano występowanie przeciwciał IgG i IgA przeciwko patogenym adenowirusom u dzieci w wieku 11-26 miesięcy, leczonych w Dziecięcym Szpitalu Klinicznym w Warszawie: u 83 % wykryto przeciwciała IgG przeciwko adenowirusom (TROJNAR *ET AL.*, 2014). Potwierdza to powszechność infekcji adenowirusowych wśród ludzi.



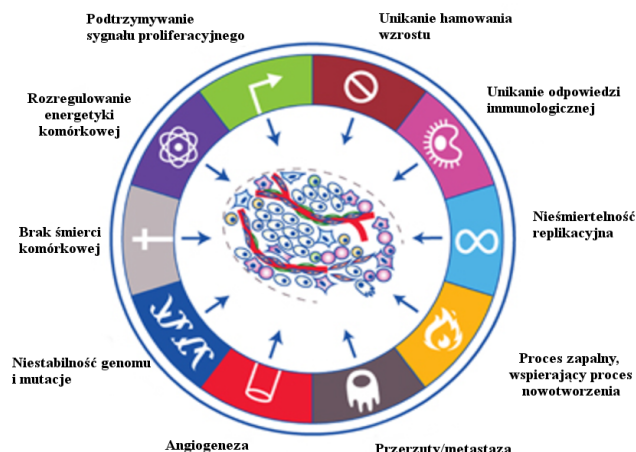
receptorów coxsackie-adenowirusowych (ang. *Coxsackie and adenovirus receptor*, CAR) oraz integrzyn  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  (NEMEROW, STEWART, 1999; WICKHAM *ET AL.*, 1993). Pojawia się tutaj konieczność zmiany receptora adenowirusowego, aby rozpoznawał inne, występujące częściej niż CAR receptory komórkowe. Interesującą koincydencją jest fakt, że hAd 3 rozpoznają zestaw charakterystycznych epitopów glioblastomy: CD46, CD80, CD86 (NANDI *ET AL.*, 2009).

Natychmiast po wejściu niemodyfikowanego adenowirusowego DNA do jądra komórkowego, następuje kluczowa dla przebiegu infekcji transkrypcja przez komórkową polimerazę RNA II genu *E1A*, którego produkt powoduje przestawienie cyklu komórkowego do fazy S. Umożliwia to replikację wirusowego DNA w komórkach nieprzechodzących podziałów, oraz aktywuje promotory genów wczesnych, takich jak *E1B*, *E2E*, *E3* i *E4*. Białko E1A oddziałuje również na białko p53 (supresor nowotworowy) oraz na ekspresję czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Białka wczesne przeciwdziałają mechanizmom obrony przeciwwirusowej oraz przestawiają maszynę komórkową na transkrypcję oraz przede wszystkim na replikację genomu wirusa; zachodzi akumulacja białka E2A wiążącego DNA, E2B *precursor terminal protein* i polimerazy DNA. Rosnąca liczba kopi genomu wirusa aktywuje promotory genów *Iva2* oraz *IX*. Faza późna to etap składania wirionów (PIEKAROWICZ, 2004: s. 319-327; [//VIRALZONE.EXPASY.ORG/4, dostęp 3 lipca 2018]). Delecja w obszarze genów E1 pozbawia adenowirusy możliwości replikacji w komórkach poza fazą S, zawężając grupę komórek permisyjnych.

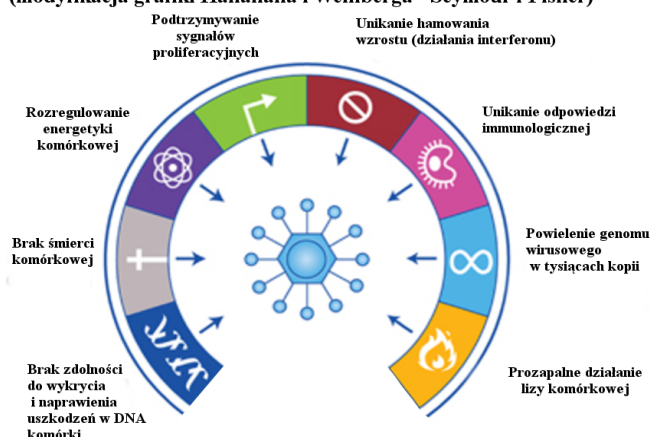
Po złożeniu wirionów w jądrze komórkowym następuje śmierć komórki wywołane lizą (HEISE, KIRN, 2000). Obserwacje późnej fazy infekcji Ad 5 wskazują na autofagiczne podłoże procesu lizy związane z immunogenną śmiercią komórki (ang. *immunogenic cell death*, ICD) (JIANG *ET AL.*, 2011 oraz HOU *ET AL.*, 2013, omówione w: TAZAWA *ET AL.*, 2017). W procesie lizy biorą udział białka wirusowe wiroporyny (ang. *viroporins*) ([//VIRALZONE.EXPASY.ORG/1077, dostęp 5 lipca 2018]).

Analogicznie do cech szczególnych komórek nowotworowych wyróżniono oznaki infekcji adenowirusowej (il. 6., s. 38).

**Cechy charakterystyczne dla procesu nowotworzenia**  
(ang. Hallmarks of cancer, grafika: Hanahan i Weinberg)



**Cechy charakterystyczne dla infekcji adenowirusowej**  
(modyfikacja grafiki Hanahana i Weinberga - Seymour i Fisher)



**Ilustracja 6.** Porównanie infekcji adenowirusowej i nowotworzenia

Analogie między tymi procesami pozwalają zrozumieć interakcje wirusów onkolitycznych z komórkami nowotworowymi.

Źródło: SEYMOUR, FISHER, 2016, zmienione, tłum. własne

## 1. ONYX-015

W 2001 roku opublikowano pracę przeglądową, podsumowującą ówczesne badania kliniczne (fazy I-III) nad preparatem Onyx-015 (KIRN, 2001). W 2003 przeprowadzono próby dożylnego podawania preparatu przy chemioterapii (NEMUNAITIS *ET AL.*, 2003). Potwierdzono bezpieczeństwo takiej formy terapii (wstrzykiwane dawki poniżej  $2 \cdot 10^{13}$  vp), jednakże zaobserwowana aktywność nie była znacząca (IBIDEM). W 2007 (AU *ET AL.*) zbadano bezpieczeństwo przy podaniu preparatu Onyx-015 do tętnicy wątrobowej

u pacjentów z przerzutami raka jelita grubego. Osiem jednorazowych dawek  $2 \cdot 10^{12}$  vp nie wiązało się z niebezpieczną hepatotoksycznością (AU ET AL., 2007).

W genomie Ad5 wprowadzono zmianę polegającą na delecji 827 par zasad w regionie *E1B*, kodującym białko E1B-55 kDa (usunięcie odcinka nukleotydów 2496-3323), oraz podstawienie tyminy na cytozynę (T→C) w pozycji 2022 (GEOERGER ET AL., 2003; [//CANCER.GOV/PUBLICATIONS/DICTIONARIES/CANCER-DRUG?CDRID=43035, dostęp 28 listopada 2017]). Modyfikacje te powinny umożliwić zajście apoptozy w komórkach z niezmienną aktywnością p53. Badania nad ludzkimi nowotworami złośliwymi gleju (porównanie linii glejaka IGRG121, IGRG93, *p53-wild-type*, oraz IGRG82, IGRG88, będących mutantami *p53*) przeszczepionym myszom pokazały, że samo wystąpienie aktywności onkolitycznej preparatu Onyx-015 jest niezależne od mutacji *p53*, jednakże odpowiedź na leczenie była silniejsza w przypadku guzów z wersją dziką tego genu (GEOERGER ET AL., 2002).

Część nienowotworowych komórek może posiadać mutacje w innych genach ze ścieżki białka p53, które pozwolą na uniknięcie apoptozy i namnażanie wirusa w cyklu litycznym.

## 2. H101ONCORINE I SERIA H100 WIRUSÓW ONKOLITYCZNYCH

H101Oncorine jest siostrzaną wersją leku wirusowego Onyx-015, niezależnie opracowaną i rozwijaną przez chińską firmę Shanghai Sunway Biotech, dostępną na rynku chińskim od września 2006 roku ([//Sunwaybio.com.cn/en/product.html, dostęp 21.09.2017]). Jest to pierwszy z serii komercyjnych preparatów wirusowych H100. Zalecany jest leczeniu nowotworów głowy i szyi.

Artykuły naukowe opisujące Oncorine wydawane były w nietłumaczonych krajowych periodykach, przez co nie były dostępne pozostałym (tj. nieznanym chińskiego) badaczom.

## 3. ENADENOTUCIREV (WCZEŚNIEJ COLOAD1)

ColoAd1 to chimeryczny wirus, oparty o adenowirusy z grupy B: Ad11p oraz Ad3, rozwijany przez firmę PsiOxus. Zmiany genetyczne obejmują delecję całości genu *E1B* oraz części *E3* ([//CANCER.GOV/PUBLICATIONS/DICTIONARIES/CANCER-DRUG?CDRID=757141,

dostęp 30 listopada 2017]). Wirus powstał drogą bioselekcji, tzw. kierunkowej ewolucji, przebiegającej w następujący sposób (za stroną Internetową producenta: [//PSIOXUS.COM/TECHNOLOGY-PRODUCTS/ENADENOTUCIREV/, dostęp 30 listopada, 2017]; KUHN *ET AL.*, 2008):

- I. Stworzono bibliotekę chimerycznych adenowirusów za pomocą rekombinacji homologicznej.
- II. Zidentyfikowano wirusy zależne od komórek nowotworowych i jednocześnie je niszczące (metoda pasażu na liniach komórkowych nowotworów, m.in. HT-29<sup>21</sup>)
- III. Odsiano wirusy namnażające się w komórkach niezmienionych nowotworowo.
- IV. Ustalono oddziaływanie wyselekcjonowanych wirusów ze składnikami świeżej krwi, w celu sprawdzenia, czy zostanie zachowana ich onkolityczność przy podawaniu dożylnym.

Pierwsze wyniki badań pokazały, że skuteczność w linii komórkowej HT-29 była ponad dwukrotnie wyższa w skali logarytmicznej (ponad 2 log) dla ColoAd1 w porównaniu z Onyx-015/Oncorine (KUHN *ET AL.*, 2008).

#### **4. CELYVIR (ICOVIR-5 W MEZENCHYMALNYCH KOMÓRKACH MACIERZYSTYCH)**

Jest to lek opracowany w Hiszpanii przez lekarzy i naukowców związanych z Uniwersyteckim Szpitalem Dzieciątka Jezus w Madrycie (zespół pracujący nad adenowirusami) oraz Instytutem Zdrowia Carlosa III (badacze zajmujący się komórkami macierzystymi). Nazwa CELYVIR pochodzi od frazy „komórki i wirus” (hiszp. *células y virus*), związanej ze sposobem dostarczania wirusa ICOVIR-5 w autologicznych mezenchymalnych komórkach macierzystych (ang. *mesenchymal stem cells*, MSCs), tj. pozyskiwanych i przygotowanych dla każdego pacjenta indywidualnie z jednojądrzastych komórek pochodzących ze szpiku kostnego ([//ASOCIACION-NEN.ORG/NEN\_DOCS/INTERNATIONAL\_INNOVATION\_CELYVIR\_NEUROBLASTOMA.PDF, dostęp 7 grudnia 2017], GARCÍA-CASTRO *ET AL.*, 2010).

---

21 Linia HT-29 to komórki pierwotnego gruczolakoraka jelita grubego (ang. *colon adenocarcinoma*)

Pierwszymi beneficjentami była czwórka dzieci z oporną na leczenie (ang. *refractory*), metastatycznym nerwiakiem zarodkowym. U jednego z pacjentów odnotowano całkowitą remisję przez trzy lata od terapii, a cztery od diagnozy (GARCÍA-CASTRO *ET AL.*, 2010).

Oprócz ICOVIR-5, prowadzone były badania nad siostrzanymi wirusami o numeracji odzwierciedlającej następstwo chronologiczne badań (tab. 5.). Punktem wyjścia był wektor Ad $\Delta$ 24RGD, w którym gen *E1A* umieszczono pod kontrolą promotora zależnego od czynnika transkrypcyjnego E2F, występującego w stanie wolnym w większej ilości w komórkach nowotworowych z powodu braku lub hiperfosforylacji pRB.

**Tabela 5.** Porównanie wersji preparatu ICOVIR

Wirus:	ICOVIR-1	ICOVIR-2	ICOVIR-5	ICOVIR-7	ICOVIR-15
Źródło:	MAJEM <i>ET AL.</i> , 2006		CASCALLO <i>ET AL.</i> , 2007	ROJAS <i>ET AL.</i> , 2009	ROJAS <i>ET AL.</i> , 2010
Ad-E2F - $\Delta$ 24RGD	Tak				
Element przed promotorem E2F-zależnym	Poly-A	Poly-A-DM1			
Element przed genem <i>E1A-<math>\Delta</math>24</i>	Brak	Sekwencja Kozak			
Dodatkowe modyfikacje w promotorze E2F	Brak			4 dodatkowe palindromy rozpoznawane przez E2F	
				Element wiążący Sp-1	

Źródło: podane w tabeli, opracowanie własne

## 5. LOAd703

Wiroterapeutyk LOAd703 firmy Lokon Pharma to chimeryczny adenowirus Ad 5/35. Jest on uzbrojony w stymulatory odpowiedzi przeciwnowotworowej, TMZ-CD40L oraz 4-1BBL, pobudzające makrofagi i komórki dendrytyczne. Pobudzone komórki wydzielają IL-12, IL-21 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (ERIKSSON *ET AL.*, 2017, za stroną [//LOKONPHARMA.COM, dostęp 4 lipca 2018]).

W chwili obecnej (lipiec 2018) trwa rekrutacja do badań klinicznych fazy I/II (NCT02705196). Nabór jest skierowany do pacjentów cierpiących na raka trzustki. Celem jest weryfikacja działania onkolitycznego preparatu LOAd703 podanego do guza, a także sprawdzenie bezpieczeństwa tego wirowterapeutyku.

Oprócz LOAd703 firma Lokon Pharama pracuje nad LOAd700 oraz LOAd713, które są w mniej zaawansowanej fazie rozwoju niż LOAd703 ([//LOKONPHARMA.COM/PIPELINE-AND-TRIALS, dostęp 4 lipca 2018]). LOAd700 to poprzednik LOAd703, oparty na preparacie ICOVIR, z wklonowanym genem kodującym ligand CD40 (CD40L) (SVENSSON *ET AL.*, 2015).

## 6. Ad-ΔE1-KOX/PEG<sub>b</sub>PHF

Ad-ΔE1-KOX/PEG<sub>b</sub>PHF to adenowirus połączony z wrażliwym na pH polimerem PEG<sub>b</sub>PHF (ang. *methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(L-histidine-co-L-phenylalanine)*). Dodatkowo naładowany polimer przyłącza się do kapsydu o ładunku ujemnym na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych. Poza mikrośrodowiskiem nowotworowym cząsteczka pozostaje nieaktywna i niewykryta przez układ odpornościowy (brak wykrycia wzrostu stężenia IL-6, używanej jako markera dla infekcji adenowirusowych), a także wykazuje mniejszą cytotoksyczność względem komórek wątroby niż inne adenowirusy onkolityczne, oparte na serotypie Ad 5 (CHOI *ET AL.*, 2015, badania na myszach). W środowisku kwasowym (pH 6,4), wynikającym z hipoksji i glikolizy beztlenowej, polimer ułatwia wniknięcie do komórek nowotworowych (KANG *ET AL.*, 2008; CHOI *ET AL.*, 2015).

W celu wsparcia działania antynowotworowego opracowano sztuczny czynnik transkrypcyjny F435-KOX, białko z motywem Cys2-His2 palców cynkowych (ang. *Zinc Fingers Protein, ZFP*), który działa jako represor genu *VEGFA*. Dzięki temu ograniczona zostaje angiogeneza w obrębie nowotworu (KANG *ET AL.*, 2008; CHOI *ET AL.*, 2015).

## 7. ONCOS-102 (CGTG-102)/ONCOS-401

ONCOS-102 to Ad5, w którym wprowadzono trzy istotne zmiany. Pierwszą z nich jest podmienienie gałki (ang. *knob*) receptora Ad5 na białko adenowirusa 3 — ma to na celu ułatwienie wejścia do komórek nowotworowych poprzez ukierunkowanie wirusa na inny receptor niż CAR, ponieważ receptor ten jest słabo wyrażany przez komórki nowotworowe. Po drugie usunięto w genomie fragment genu *E1A* (delecja 24 pz). Trzecią modyfikacją jest insercja genu kodującego GM-CSF w obręb *E3* (informacje producenta: [//TARGOVAX.COM/PIPELINE/ONCOS-ADENOVIRUS-BASED-CANCER-IMMUNOTHERAPY/, dostęp 30 listopada 2017]).

Badania przedkliniczne, przeprowadzone na chomikach, pokazały niską toksyczość preparatu (KURYK *ET AL.*, 2017). Pierwsza próba kliniczna fazy I została wycofana przed zarejestrowaniem pierwszych uczestników (NCT01437280). W drugiej próbie klinicznej fazy pierwszej sprawdzono bezpieczeństwo i efektywność preparatu przy podaniu bezpośrednio w obręb guzów litych oraz dożylnie (NCT01598129; RANKI *ET AL.*, 2016). Zaobserwowano pojawienie się komórek T CD8<sup>+</sup> rozpoznających komórki nowotworowe oraz wzrost stężenia IFN $\gamma$  w tkance nowotworowej, co wskazuje na immunoterapeutyczne działanie wirusa (RANKI *ET AL.*, 2016). Prowadzona jest rekrutacja do dalszych testów klinicznych (tab. 6.).

**Tabela 6.** Badania kliniczne (etap rekrutacji uczestników) preparatu ONCOS-102

Tytuł oryginalny, numer NCT	Faza	Rodzaj nowotworu	Leki
A Phase I/II, Safety Clinical Trial of DCVAC/PCa and ONCOS-102 in Men With Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer (NCT03514836)	I/II	▪ rak gruczołu krokowego, oporny na kastrację	▪ DCVac/PCa, ▪ cyklofosfamid
A Pilot Study of Sequential ONCOS-102, an Engineered Oncolytic Adenovirus Expressing GM-CSF, and Pembrolizumab in Patients With Advanced or Unresectable Melanoma Progressing After Programmed Cell Death Protein 1 (PD1) Blockade (NCT03003676)	I	▪ zaawansowany lub nieoperacyjny czerniak, rozwijający się po blokadzie PD-1	▪ cyklofosfamid ▪ pembrolizumab
A Randomised Phase II Open-label Study With a Phase Ib Safety lead-in Cohort of ONCOS-102, an Immune-priming GM-CSF Coding Oncolytic Adenovirus, and Pemetrexed/Cisplatin in Patients With Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma (NCT02879669)	I/II	▪ nieoperacyjny złośliwy międzybłoniak opłucnej	▪ pemetreksed/ cisplatyna ▪ cyklofosfamid
A Phase 1/2 Study to Investigate the Safety, Biologic and Anti-tumor Activity of ONCOS-102 in Combination With Durvalumab in Subjects With Advanced Peritoneal Malignancies (NCT02963831)	I/II	▪ rak jajnika oporny na platynę, ▪ rak jelita grubego	▪ durvalumab

Źródło: wyszukano na stronie internetowej: [//clinicaltrials.gov], stan na 2 lipca 2018

Warto wspomnieć o enigmatycznym adenowirusie onkolitycznym Oncos-401, który opisany został w jednym tylko artykule (KURYK *ET AL.*, 2014). Tak jak ONCOS-102 posiadał gałkę receptora Ad3, jednak zamiast genu kodującego GM-CSF wklonowano gen kodujący ligand CD40 (CD40L) pod kontrolą promotora hTERT. CD40L miał aktywować apoptozę komórek nowotworowych oraz aktywować limfocyty T-cytotoksyczne. Wiadomo również, że preparat wirusowy został podany pacjentom oraz przygotowywano się do dalszych testów przedklinicznych i klinicznych. Od 2014 roku nie opublikowano

niczego nowego w temacie rozwoju tego wirusa, nie jest też wymieniany na stronie firmy Targovax.

Równolegle do prac nad wirusem ONCOS-102 prowadzone są badania nad innymi wersjami tego preparatu, oznaczane jako ONCOS-x02 (wcześniej podawane z rozróżnieniem na: ONCOS-402, ONCOS-802, ONCOS-902). Nie udało się odnaleźć oficjalnych informacji na ich temat.

## 8. VCN-01

VCN-01 to adenowirus, który koduje hialuronidazę PH-20, która trawi macierz zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM), ułatwiając wniknięcie w głąb tkanki nowotworowej (informacja za stroną producenta: [[//WWW.VCNBIOSCIENCES.COM/CANDIDATE.HTML](http://WWW.VCNBIOSCIENCES.COM/CANDIDATE.HTML)], oraz bazą UniProt: [P38567]). Standardowo posiada również delecję 24 pz w rejonie E1A, a dodatkowo wstawiono w ten obszar osiem elementów E2F response element, dla których pRB jest represorem. Zmodyfikowano także receptor, motyw aminokwasowy KKTK (lizyna-lizyna-treonina-lizyna) zastąpiono motywem RGDK (arginina-glicyna-kwas asparaginowy-lizyna) w domenie wiążącej się z siarczanem heparanu (ang. *heparan sulfate glycosaminoglycans-binding domain*).

Zespół badaczy, częściowo związany z firmą VCN Biosciences, badał możliwość użycia tego wirusa w leczeniu osteosarkomy. Inaktywacja *p53* oraz *pRB* w tym rodzaju nowotworu została uwzględniona podczas ukierunkowywania wirusa VCN-01. Przeprowadzono próby *in vitro* (na liniach komórkowych pochodzących od pacjentów oraz na jednej linii komercyjnej) oraz *in vivo* w modelu mysim. Miały one na celu ocenę replikacji, poziomu ekspresji białek i cytotoksyczności wirusa VCN-01 oraz działania onkolitycznego. Otrzymane wyniki oprócz działania wirusa, potwierdziły dodatkowo jego bezpieczeństwo (MARTÍNEZ-VÉLEZ *ET AL.*, 2016).

## 9. CG0070

CG0070 to preparat firmy Cold Genesys o działaniu onkolitycznym i immunostymulującym, wzmocnionym obecnością transgenu kodującego GM-CSF (informacje za stroną producenta, [[//COLDGENESYS.COM/CG0070.HTML](http://COLDGENESYS.COM/CG0070.HTML)], dostęp 24 maja



2018). Oparty jest na serotypie 5 adenowirusa. Jego replikacja jest zależna od wklonowanego ludzkiego promotora E2F-1.

Potencjalnym zastosowaniem dla tego leku jest leczenie inwazyjnego raka pęcherza moczowego, w szczególności po nieudanej terapii żywą szczepionką przeciwgruźliczą *Bacillus Calmette-Guérin*, BCG<sup>22</sup>. Preparat podawano dopęcherzowo w dawkach jednorazowych do  $3 \cdot 10^{13}$  vp (BURKE *ET AL.*, 2012).

## 10. DNX-2401

W roku 2000 opublikowano badania działania *in vivo* i *in vitro* adenowirusa serotypu 5 z delecją 24 pz w genie *E1A*, dokładniej w regionie kodującym białko wiążące Rb (FUEYO *ET AL.*, 2000). Oprócz powyższej modyfikacji, DNX-2401 zawiera motyw RGD-4C wiążący integryny, co pozwala na infekowanie komórek nowotworowych, niezależnie od ekspresji CAR na ich powierzchni (często niewystarczającej do efektywnej internalizacji adenowirusów) ([//CANCER.GOV/PUBLICATIONS/DICTIONARIES/CANCER-DRUG?CDRID=590711, dostęp 1 grudnia 2017]).

DNX-2401 badany był m.in. w leczeniu glejaków u dzieci. Początkowa dawka jednorazowa wynosiła  $1 \cdot 10^{10}$  i mogła być zwiększona do  $5 \cdot 10^{10}$ , jeżeli nie było objawów toksyczności (w ramach badań nie stwierdzono objawów powyżej poziomu 2 według Po-wszechnych kryteriów terminologicznych dla zdarzeń niepożądanych (ang. *Common Terminology Criteria for Adverse Events*, CTCAE), wersji 4.0.). Zaobserwowano wydłużenie czasu przeżycia u pacjentów leczonych DNX-2401 (TEJADA *ET AL.*, 2018).

## 11. TELOMELYSIN/OBP-301 I OBP-405

W roku 2004 zaprojektowano i skonstruowano wirus onkolityczny, oparty o Ad 5 (KAWASHIMA *ET AL.*, 2004). W celu uzyskania specyficzności replikacji uzależniono ekspresję genów *E1* (*E1A* i *E1B*) od wklonowanego promotora *hTERT* (IBIDEM). Wirusy z taką modyfikacją określane są jako TRADs (ang. *telomerase-specific replication-competent Ads*) Jest to rozwiązanie alternatywne do np. mechanizmu działania ONYX-15 (IBIDEM).

Zmodyfikowana wersja OBP-301, OBP-405 (Telomelysin-RGD), zawiera sekwencję RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy) w pętli HI (ang. *HI loop*) gałki

---

22 Więcej nt. terapii BCG: Maranda, 2015.

receptora adenowirusowego (TAKI *ET AL.*, 2005). Ten motyw aminokwasowy, dzięki oddziaływaniu z integrynami  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$ , pozwala na infekowanie CAR-negatywnych<sup>23</sup> komórek nowotworowych. Infekcyjność wirusa OBP-405 była wyższa, niż w przypadku wirusa OBP-301: dziesięciokrotnie w przypadku komórek z receptorem CAR oraz tysiąckrotnie — bez receptora (IBIDEM). Poziom replikacji obu wersji wirusa był porównywalny między sobą w przypadkach linii komórek CAR-pozytywnych a także w przypadku linii kontrolnej, będącej linią komórek fibroblastów (IBIDEM). Porównanie infekcyjności i replikacji wirusów OBP-301 i OBP-405 w tab. 7.

**Tabela 7:** Porównanie OBP-301 i OBP-405 w trzech różnych liniach komórkowych

Linia komórkowa	Wariant wirusa	Relatywna liczba kopii <i>EIA</i>	
		Infekcyjność	Replikacja (48 godzin po infekcji)
H1299	OBP-301	$>10^2$	$>10^5$
	OBP-405	$\sim 10^4$	$>10^5$
LN444	OBP-301	$10^1$	$\sim 10^{4,5}$
	OBP-405	$10^{3,5}$	$\sim 10^{5,5}$
NHLF	OBP-301	$10^2$	$\sim 10^3$
	OBP-405	$10^2$	$\sim 10^3$

Źródło: dane za TAKI *ET AL.*, 2005

Obecnie prowadzona jest rekrutacja do próby klinicznej fazy I dotyczącej użycia OBP-301 razem z chemioterapeutyką pembrolizumab w leczeniu pacjentów z guzami litymi (NCT03172819, KOJIMA *ET AL.*, 2018).

## 12. POZOSTAŁE ADENOWIRUSY ONKOLITYCZNE

Powyższe przykłady nie wyczerpują puli przykładów adenowirusów onkolitycznych. Poniższe Ad mają cechy wspólne z wyżej omówionymi już preparatami lub dostępne informacje są zbyt skąpe, aby budować w oparciu o nie podrozdział.

Orca-010 to Ad 5 z delecją w genie *E1A*, posiadający motyw RGD w swoim receptorze. Dodatkowo niesie on mutację T1 w genie *E3*, ulepszającą uwalnianie i rozprzestrzenianie się wirusa (DONG *ET AL.*, 2014).

<sup>23</sup> Jako przykłady komórek nowotworowych niewyrażających CAR wykorzystano w badaniu komórki glejaka (z linii LN444 oraz LN308) i komórki raka płuc (linia H1299).

TRAD-DN $\kappa$ B $\alpha$  (ang. *Dominant-Negative I $\kappa$ B $\alpha$* ) to adenowirus o działaniu podobnym do preparatu Telomelysin. Również opiera się na zależnej od promotora hTERT ekspresji genu *E1A*. Oprócz tego posiada dominujący I $\kappa$ B $\alpha$ , który powoduje negatywną regulację czynnika NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$  jest inhibitorem NF- $\kappa$ B), odpowiadającego za hepatotoksyczność w wyniku reakcji odpornościowej). I $\kappa$ B $\alpha$  ulega ekspresji w komórkach wątroby (zdrowych lub zmienionych nowotworowo). Zachowane zostaje działanie onkolityczne w komórkach nowotworowych (MACHITANI *ET AL.*, 2017).

Ad 657 to chimeryczny adenowirus powstały w rezultacie rekombinacji homologicznej: w genomie Ad 6 podmieniono rejon kodujący HVR heksonu na pochodzący z Ad 57. Następnie przeprowadzono badania w mysim modelu raka prostaty. Opisana modyfikacja zmniejszyła uszkodzenia wątroby w porównaniu z Ad 5 i Ad 6. Różnice w efektywności pomiędzy Ad 6 a Ad 657 były niewielkie i przemawiały na korzyść pierwszego (NGUYEN *ET AL.*, 2018).

# DYSKUSJA

## 1. ZALETY I WADY

Jak wspomniano na początku pracy, od wielu lat skuteczność leczenia nowotworów nie wzrosła znacząco. Długa jest lista działań niepożądanych związanych z chemio- i radioterapią, obniżających znacząco komfort życia pacjentów. Warto podkreślić problem bólu — szczególnie tzw. bólu przebijającego — nadal poszukiwane są skuteczniejsze środki przeciwbólowe. W przypadku terapii wirusami, opisane/zaobserwowane reakcje uboczne są łagodniejsze niż w przypadku leczenia konwencjonalnego — objawy przypominają grypę (gorączka, drżenie, uczucie rozbicia) lub występują w postaci miejscowego bólu, jednak o stopniu tolerowanym przez pacjenta lub są do załagodzenia poprzez podanie standardowych środków przeciwbólowych.

Jako zalety terapii onkolitycznej wymieniane najczęściej są:

- ♦ specyficzność względem komórki nowotworowej *versus* komórki zdrowe,
- ♦ mechanizm *perpetuum mobile* namnażania się (liczba nowych wirusów nie wzrasta liniowo, jak u bakterii, lecz wykładniczo; z każdą zainfekowaną komórką nowotworową powstają tysiące nowych cząstek wirusowych),
- ♦ możliwość modyfikacji genetycznych genomu wirusowego,
- ♦ łatwość hodowli wirusów (TEDx TALKS, 2012);
- ♦ bezpieczeństwo (wybierane są wirusy o znanej, długiej historii stosowania w szczepieniach).

Na efekt końcowy leczenia nowotworów u ludzi składa się wiele czynników, I-III dotyczą każdego rodzaju terapii antynowotworowej, IV-V są specyficzne dla onkowirotepii:

- I. historia choroby, leczenia — stopień zaawansowania i złośliwości nowotworu, jego metabolizm, markery genetyczne; wtórność lub pierwotność; pierwszy epizod choroby albo wznowa;
- II. zastosowanie innych metod leczenia, celem osiągnięcia efektu synergistycznego — terapia kombinowana, skojarzona, leczenie chirurgiczne;
- III. kondycja organizmu pacjenta, szczególnie wiek;
- IV. sposób podania wirusa: lepsze rezultaty osiągnęto przy iniekcjach bezpośrednio w guz nowotworowy;

V. funkcjonowanie układu odpornościowego, zdolność do reakcji na nowotwór (obecność przeciwciał skierowanych na komórki zmienione), odporność pacjenta na stosowanego wirusa (przeciwciała antywirusowe, istotne zwłaszcza przy podawaniu dożylnym wirusów).

Bilans powyższych czynników przekłada się na wystąpienie odpowiedzi na leczenie oraz jej siłę. Przez wiele lat badań zaobserwowano spektakularne przypadki wyleczenia<sup>24</sup>, jak i całkowity brak wpływu leczenia oraz spektrum efektów pośrednich. Powyższe różnice w podatności na wirusowe preparaty onkolityczne trzeba uznać za ich poważną wadę. Dodatkowo odnotowano przypadki uniewrażliwiania się nowotworów na leczenie onkolityczne (HEMMINKI, 2014).

Oporność na leczenie onkolityczne polega na istnieniu populacji komórek nowotworowych, u których zachodzi wysoka ekspresja genów antywirusowych, m.in. zależnych od interferonów (jak np. *STAT1*) (LEE *ET AL.*, 2017). Porównano 1436 genów o zmienionej ekspresji w komórkach limfoidalnych nowotworów (776 o obniżonej ekspresji i 660 o podwyższonej) z poziomem replikacji onkolitycznego wirusa Pexa-Vec. Zaobserwowano korelację między zwiększonym wyrażaniem pewnych genów, a opornością na wirus. Kwestia ta wymaga dalszych badań.

## 2. PROBLEMY TECHNOLOGICZNE

W przypadku wirusów onkolitycznych, jak i ogólnie pojętej wiroterapii, problemy technologiczne mogą dotyczyć następujących kwestii:

### I. **Możliwość kontaminacji preparatu czynnikami zakaźnymi:**

- (i) wirusami pochodzącymi z odzwierzęcej linii komórkowej — zachorowanie na zoonozę lub rozwinięcia się nowotworu (zakażenie hodowli adenowirusowej SV40 — CZAU-SIUNG, MELNICK, 1963; skażenie szczepionek przeciwko polio w latach 50. i 60., STRICKLER *ET AL.*, 1998);
- (ii) wirusami „brudnych strzykawek” (pogłoski o obecności HIV lub HCV w preparacie adenowirusowym do terapii genowej; przywołuje je artykuł: BRENNER, 2000).

---

<sup>24</sup> Czasami w praktyce medycznej spotyka się przypadki samoistnej, spontanicznej remisji, o nieznanym przyczynie.

## **II. Prawdopodobieństwo rozwoju choroby wirusowej, spowodowanej preparatem lub wystąpienia objawów niepożądanych.**

→ Atenuacja wirusów i używanie szczepów o optymalnej skuteczności, cechujących się obniżoną częstotliwością efektów niepożądanych. Warto też podkreślić, że do tej pory nie odnotowano zarażenia wirusem onkolitycznym osób z otoczenia pacjenta (CATTANEO, RUSSELL, 2017).

## **III. Obecność dodatkowych, szkodliwych substancji.**

→ Obniżanie ich stężenia w ramach rygorystycznej kontroli produkcji preparatu; zastępowanie szkodliwych substancji neutralnymi zamiennikami.

## **IV. Potencjalne zagrożenie bioterrorystyczne, szczególnie przy badaniach nad wirusami wysokiego ryzyka (przykładowo: wirus Zika używany jako onkolityczny).**

### **3. PRÓBA OKREŚLENIA SYTUACJI PRAWNEJ**

W świetle prawa europejskiego wirusy zaliczane są do *Genetically Modified Microorganisms*<sup>25</sup>, GMM. Aby legalnie prowadzić badania nad wirusami, należy spełniać wymagania dotyczące bezpieczeństwa pracy z tymi czynnikami zakaźnymi oraz z liniami komórkowymi, używanymi do namnażania. Wynikają one z oceny ryzyka indywidualnego (narażenie personelu badawczego) oraz ogólnego (narażenie społeczeństwa), przy uwzględnieniu infekcyjności, zjadliwości danego wirusa oraz możliwości leczenia choroby przezeń powodowanej. Szczegóły zawiera Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie „Szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki” (Dz. U. z dnia 11 maja 2005 r.).

W roku 2004 zaakceptowano i dopuszczono pierwszy na świecie wiroterapeutyk onkolityczny<sup>26</sup>, Rigvir, w leczeniu czerniaka na Łotwie (DONIŃA ET AL., 2015); w najbliższym czasie spodziewana jest ponowna weryfikacja tego preparatu (STIRĀNE, DJAKONOVA, 2017).

---

25 Choć wirusy nie są zaliczane do mikroorganizmów w biologii.

26 W różnych publikacjach pierwszeństwo przyznaje się też Oncorine w leczeniu nowotworów głowy i szyi (Chiny — listopad 2015) albo T-Vec w leczeniu czerniaka (Stany Zjednoczone — 27 października 2015).

Co najmniej kilka preparatów wirusowych wpisano do rejestru leków sierocych, tzn. takich, których opracowanie byłoby nieopłacalne z powodu małej częstości występowania danej choroby (kryterium co najwyżej 5 osób na 10 000 w krajach Wspólnoty). Procedura rozpoznania prowadzona jest przez *Committee for Orphan Medicinal Products* (COMP) działający w obrębie *European Medicines Agency* (EMA). Status leku sierociego związany jest z dziesięcioletnimi benefitami ekonomicznymi oraz zapewnieniem wyłączności rynku europejskiego dla producenta preparatu z taką klasyfikacją. Na początku 2015 roku Enadenotucirev, jako preparat w leczeniu platynopornego raka jajnika, otrzymał powyższe wsparcie (*EMA GRANTS POSITIVE OPINION...*, 2015).

Dnia 27 października 2015 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (*U.S. Food and Drug Administration*, w skrócie FDA) zaakceptowała pierwszą w Stanach Zjednoczonych terapię onkolityczną z zastosowaniem talimogene laherparepvec (dostępnego na rynku pod nazwą T-Vec albo pod zastrzeżonym znakiem towarowym Imlygic). Leczenie ma obejmować niektórych pacjentów z nieoperowalnymi przypadkami metastatycznej melanomy (*FDA APPROVES TALIMOGENE LAHERPAREPVEC...*, 2015). Koszt rundy leczenia szacowany jest na kwotę 65 tys. dolarów amerykańskich, co początkowo może wydawać się wysoką kwotą, jednak w porównaniu okazuje się niższą, niż dla innych nowych terapii ([[//BUSINESSINSIDER.COM/FDA-APPROVES-AMGENS-IMLYGIC-ONCOLYTIC-VIRAL-THERAPY-2015-10?IR=T](http://BUSINESSINSIDER.COM/FDA-APPROVES-AMGENS-IMLYGIC-ONCOLYTIC-VIRAL-THERAPY-2015-10?IR=T), dostęp 3 grudnia 2017]). Rok wcześniej FDA przyznała preparatowi DNX-2401 status leku sierociego (kryterium: mniej niż 200 000 chorych w Stanach Zjednoczonych) (*FDA GRANTS ORPHAN DRUG DESIGNATION...*, 2014).

Na początku bieżącego roku (9 lutego 2018) nowozelandzki EPA (ang. *Environmental Protection Authority*, Urząd Ochrony Środowiska) udzielił pozwolenia na import preparatu Telomelysin/OBP-301 do przeprowadzenia próby klinicznej fazy II w leczeniu zaawansowanego czerniaka (EPA, 2018).

Istotną kwestią w regulacji prawnej wirusów onkolitycznych jest prawo patentowe oraz koszty monitorowania pacjentów podczas trwania oraz po kuracji (HEMMINKI, 2014). Obostrzenia natury legislacyjnej powodują zawężenie kręgu potencjalnych beneficjentów wiroterapii onkolitycznej.

## PODSUMOWANIE

Nowotwory złośliwe towarzyszą człowiekowi od zarania dziejów — długi staż tego związku potwierdzają m.in. zmiany chorobowe w kościach neandertalczyka, obecnie datowanych na starsze niż 120 tysięcy lat, oraz u niezidentyfikowanego hominida (*genus et species indeterminans*) sprzed 1,7 miliona lat (MONGE ET AL., 2013; ODES ET AL., 2016).

Badania nad wirusami onkolitycznymi przeżywają obecnie swój renesans dzięki rozwojowi metod molekularnych pozwalających na edycję genów wirusowych. Dużą rolę mogą też odegrać projekty sekwencjonowania genomów nowotworowych (TCGA), dostarczające informacji o komórce gospodarza, a w konsekwencji pozwalające lepiej zaprojektować wiroterapeutyk i zrozumieć jego mechanizm działania.

Na korzyść terapii onkolitycznej przemawia fakt, że opisane reakcje uboczne są oceniane jako mniej uciążliwe i mniej groźne, niż te pojawiające się podczas chemio- i radioterapii. Warto zauważyć, że nie odnotowano przekroczenia dawki bezpiecznej podczas leczenia wirusami onkolitycznymi, ani też transmisji wirusa do osób z otoczenia pacjenta. Z drugiej strony zaś nadal otwarte pozostają poniższe kwestie:

- ♦ Zwiększenie efektywności wirusów onkolitycznych w podaniu dożylnym. Zmniejszenie negatywnych interakcji z układem odpornościowym (obniżenie immunogenności wirusa) stanowi fundament dla możliwości leczenia nowotworów w fazie metastazy.
- ♦ Skierowanie odpowiedzi układu odpornościowego na komórki nowotworowe.
- ♦ Optymalizacja tropizmu: wyeliminowanie replikacji w komórkach niezmiennych nowotworowo (hepatotropizm Ad), jednocześnie przy ukierunkowaniu na elementy chorej tkanki (tj. na komórki nowotworowe, CSCs, TECs).

Jak zademonstrowano w pracy, podjęto próby przełamania ograniczeń, zarówno w modelu adenowirusowym, jak i w przypadku innych wirusów. Na chwilę obecną trudno prognozować rezultat oraz dalsze kierunki rozwoju badań, z pewnością jednak dotychczasowe rozwiązania będą rozwijane. Można spodziewać się powstawania równoległe nowych propozycji, a także prób łączenia ich w obrębie pojedynczego konstruktów wirusowego tak, aby terapia wirusami onkolitycznymi stała się optymalną i standardową procedurą terapii przeciwnowotworowej.



# BIBLIOGRAFIA

## ARTYKUŁY

- ALAM S., BOWSER B. S., CONWAY M. J., ISRAR M., TANDON A., MEYERS C. (2011), *Adeno-associated virus type 2 infection activates caspase dependent and independent apoptosis in multiple breast cancer lines but not in normal mammary epithelial cells*, Mol Cancer, PMID: 21827643.
- ALAM S., BOWSER B. S., ISRAR M., CONWAY M. J., MEYERS C. (2014), *Adeno-associated virus type 2 infection of nude mouse human breast cancer xenograft induces necrotic death and inhibits tumor growth*, Cancer Biol Ther, 15 (8):1013-28.
- ASADA T. (1974), *Treatment of human cancer with mumps virus*, Cancer, 34 (6): s. 1907-1928.
- AU T., THORNE S., KORN W. M., SZE D., KIRN D., REID T. R. (2007), *Minimal hepatic toxicity of Onyx-015: spatial restriction of coxsackie-adenoviral receptor in normal liver*, Cancer Gene Ther., 14 (2): s. 139-150.
- AUGUSTYNIAK J., SAWICKI K., SKRZYPCZAK M., KAPKA-SKRZYPCZAK L. (2012), *Zastosowanie wirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej*, Probl Hig Epidemiol, 93 (4): s. 654-662.
- BAI W., CUI X., XIE Y., LIU J. (2016), *Engineering Hepadnaviruses as Reporter-Expressing Vectors: Recent Progress and Future Perspective*, Viruses, 8 (5): 125.
- BALATHASAN L., TANG V. A., YADOLLAHI B., BRUN J., LABELLE M., LEFEBVRE C., SWIFT S. L., STOJDL D. F. (2017), *Activating Peripheral Innate Immunity Enables Safe and Effective Oncolytic Virotherapy in the Brain*, Mol Ther Oncolytics, 7: s. 45-56.
- BENJAMIN D. J. (2014), *The efficacy of surgical treatment of cancer — 20 years later*, Medical Hypotheses, 82 (4): s. 412-420.
- BREITBACH C. J., ARULANANDAM R., DE SILVA N., THORNE S. H., PATT R., DANESHMAND M., MOON A., ILKOW C., BURKE J., HWANG T., HEO J., CHO M., CHEN H., ANGARITA F. A., ADDISON C., ANDREA MCCART J. A., BELL J. C., KIRN D. H. (2013), *Oncolytic Vaccinia Virus Disrupts Tumor-Associated Vasculature in Humans*, Cancer Res, 73 (4): s. 1265-1275.
- BRENNER M. (2000), *Reports of Adenovector „Death” Are Greatly Exaggerated*, Mol. Ther., (1): s. 205.
- BRŪVERE R., HEISELE O., FERDATS A., RUPAIS A., AND MUCENIECE A. (2002), *Echovirus-mediated biotherapy for malignant tumours: 40 years of investigation*. Acta medica Lituanica, Supplement 9: s. 97-100.
- BURKE J. M., LAMM D. L., MENG M. V., NEMUNAITIS J. J., STEPHENSON J. J., ARSENEAU J. C., AIMI J., LERNER S., YEUNG A. W., KAZARIAN T., MASLYAR D. J., MCKIERNAN J. M. (2012), *A First in Human Phase I Study of CG0070, a GM-CSF Expressing Oncolytic Adenovirus, for the Treatment of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer*, The Journal of Urology, 188 (6): s. 2391-2397
- BURKE J. M., AHERN C., WEIGEL B. J., POIRIER J. T., RUDIN C. M., CHEN Y., CRIFE T. P., BERNHARDT M. B., BLANEY S. M. (2015), *Phase I trial of Seneca Valley Virus (NTX-010) in children with relapsed/refractory solid tumors: a report of the Children's Oncology Group*, Pediatr Blood Cancer., 62 (5): s. 743-50.
- CAHILL D. P., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., LENGAUER C. (1999), *Genetic instability and darwinian selection in tumours*, Trends Cell Biol, (12): M57-60.
- CAREW J. S., ESPITIA C. M., ZHAO W., KELLY K. R., COFFEY M., FREEMAN J. W., NAWROCKI S. T. (2013), *Reolysin is a novel reovirus-based agent that induces endoplasmic reticular stress-mediated apoptosis in pancreatic cancer*, Cell Death Dis., 4 (7): e728.
- CASCALLO M., ALONSO M. M., ROJAS J. J., PEREZ-GIMENEZ A., FUEYO J., ALEMANY R. (2007), *Systemic Toxicity–Efficacy Profile of ICOVIR-5, a Potent and Selective Oncolytic Adenovirus Based on the pRB Pathway*, Molecular Therapy, 15 (9): s. 1607-1615.

- CASSADY K. A., HAWORTH K. B., JACKSON J., MARKERT J. M., CRIFE T. P. (2016), *To Infection and Beyond: The Multi-Pronged Anti-Cancer Mechanisms of Oncolytic Viruses*, *Viruses*, 8 (2): s. 43.
- CATTANEO R., RUSSEL S. J. (2017), *How to develop viruses into anticancer weapons*, *PLOS Pathog*, 13 (3): e1006190.
- CHAN W. M., MCFADDEN G. (2014), *Oncolytic Poxviruses*, *Annu. Rev. Virol.*, (1): s. 191-214.
- CHOI J. W., JUNG S. J., KASALA D., HWANG J. K., HU J., BAE Y. H., YUN C. O. (2015), *pH-sensitive oncolytic adenovirus hybrid targeting acidic tumor microenvironment and angiogenesis*, *J Control Release*, 205: s. 134-143.
- CHU R. L., POST D. E., KHURI F. R., VAN MEIR E. G. (2004), *Use of Replicating Oncolytic Adenoviruses in Combination Therapy for Cancer*, *Clinical Cancer Research*, (10): s. 5299-5312.
- CONNOLLY E. C., FREIMUTH J., AKHURST R. J. (2012), *Complexities of TGF- $\beta$  Targeted Cancer Therapy*, *Int J Biol Sci*, 8 (7): s. 964-978.
- CZAU-SIUNG Y., MELNICK J. L. (1963), *Contamination of Adenovirus Stocks with SV40 (Papovavirus Group)*, *Experimental Biology and Medicine*, 113 (2): s. 339-343.
- DEL PAPA J., PARKS R. J. (2017), *Adenoviral Vectors Armed with Cell Fusion-Inducing Proteins as Anti-Cancer Agents*, *Viruses*, 9 (1): [DOI: 10.3390/v9010013].
- DEVITA V. T. JR., CHU E. (2008), *A history of cancer chemotherapy*, *Cancer Res.*, 68 (21): s. 8643-8653.
- DIDKOWSKA J., WOJCIECHOWSKA U. (2015), *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2013 roku*, Warszawa 2015: s. 3.
- DONG W., VAN GINKEL J.-W. H., AU K. Y., ALEMANY R., MEULENBERG J. J. M., VAN BEUSECHEM V. W. (2014), *ORCA-010, a Novel Potency-Enhanced Oncolytic Adenovirus, Exerts Strong Antitumor Activity in Preclinical Models*, *Human Gene Therapy*, 25 (10): s. 897-904.
- DONIÑA S., STRÉLE I., PROBOKA G., AUZIŃŠ J., ALBERTS P., JONSSON B., VENSKUS D., MUCENIECE A. [autorka post mortem] (2015), *Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study*, *Melanoma Res*, 25 (5): s. 421-426.
- ENGLER H., MACHEMER T., PHILOPENA J., WEN S. F., QUIJANO E., RAMACHANDRA M., TSAI V., RALSTON R. (2004), *Acute hepatotoxicity of oncolytic adenoviruses in mouse models is associated with expression of wild-type E1a and induction of TNF-alpha*, *Virology*, (1): s. 52-61.
- FUEYO J., GOMEZ-MANZANO C., ALEMANY R., LEE P. S., McDONNELL T. J., MITLIANGA P., SHI Y. X., LEVIN V. A., YUNG W. K., KYRITSIS A. P. (2000), *A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo*, *Oncogene*, 19 (1): s. 2-12.
- FUKUHARA H., INO Y., TODO T. (2016), *Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn*, *Cancer Sci.*, 107 (10): s. 1373-1379.
- GALANIS E., ATHERTON P. J., MAURER M. J., KNUTSON K. L., DOWDY S. C., CLIBY W. A., HALUSKA P. JR., LONG H. J., OBERG A., ADERCA I., BLOCK M. S., BAKKUM-GAMEZ J., FEDERSPIEL M. J., RUSSELL S. J., KALLI K. R., KEENEY G., PENG K. W., HARTMANN L. C. (2015), *Oncolytic Measles Virus Expressing the Sodium Iodide Symporter to Treat Drug-Resistant Ovarian Cancer*, *Cancer Res* 75 (1): s. 22-30.
- GARCÍA-CASTRO J., ALEMANY R., CASCALLO M., MARTÍNEZ-QUINTANILLA J., DEL MAR ARRIERO M., LASSALETTA Á., MADERO L., RAMÍREZ M. (2010), *Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study*, *Cancer Gene Therapy*, (17): s. 476-483.
- GELETNEKY K., HAJDA J., ANGELOVA A. L., LEUCHS B., CAPPER D., BARTSCH A. J., NEUMANN J. O., SCHÖNING T., HÜSING J., BEELTE B., KIPRIANOVA I., ROSCHER M., BHAT R., VON DEIMLING A., BRÜCK W., JUST A., FREHTMAN V., LÖBHARD S., TERLETSKAIA-LADWIG E., FRY J., JOCHIMS K., DANIEL V., KREBS O., DAHM M., HUBER B., UNTERBERG A., ROMMELAERE J. (2017), *Oncolytic H-1 Parvovirus*

- Shows Safety and Signs of Immunogenic Activity in a First Phase I/IIa Glioblastoma Trial*, *Molecular Therapy*, 25 (12): s. 2620-2634.
- GELETNEKY K., HÜSING J., ROMMELAERE J., SCHLEHOFER J. R., LEUCHS B., DAHM M., KREBS O., VON KNEBEL DOEBERITZ M., HUBER B., HAJDA J. (2012), *Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol*, *BMC Cancer*, 12: s. 99.
- GEOERGER B., GRILL J., OPOLON P., MORIZET J., AUBERT G., TERRIER-LACOMBE M.-J., BRESSAC DE-PAILLERETS B., BARROIS M., FEUNTEUN J., KIRN D. H., VASSAL G. (2002), *Oncolytic Activity of the E1B-55 kDa-deleted Adenovirus ONYX-015 Is Independent of Cellular p53 Status in Human Malignant Glioma Xenografts*, *Cancer Research*, 62 (3): s. 764-772.
- GEOERGER B., GRILL J., OPOLON P., MORIZET J., AUBERT G., LECLUSE Y., VAN BEUSECHEM V. W., GERRITSEN W. R., KIRN D. H., VASSAL G. (2003), *Potentiation of radiation therapy by the oncolytic adenovirus dl1520 (ONYX-015) in human malignant glioma xenografts*, *British Journal of Cancer*, (89): s. 577-584.
- HAMMILL A. M., CONNER J., CRIPE T. P. (2010), *Oncolytic virotherapy reaches adolescence*, *Pediatr. Blood Cancer*, (55): s. 1253-1263.
- HANAHAHAN D., WEINBERG R. A. (2000), *The Hallmarks of Cancer*, *Cell*, 100 (1): s. 57-70.
- HANAHAHAN D., WEINBERG R. A. (2011), *Hallmarks of cancer: the next generation*, *Cell*, 144 (5): s. 646-74.
- HASEGAWA K., PHAM L., O'CONNOR M. K., FEDERSPIEL M. J., RUSSELL S. J., PENG K. (2006), *Dual Therapy of Ovarian Cancer Using Measles Viruses Expressing Carcinoembryonic Antigen and Sodium Iodide Symporter*, *Clinical Cancer Research*, 12 (6): s. 1868-1875.
- HEMINKI A. (2014), *Oncolytic Immunotherapy: Where Are We Clinically?*, *Scientifica (Cairo)*, 2014 (2014): 862925.
- HEISE K., KIRN D. H. (2000), *Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents*, *J Clin Invest*, 105 (7): s. 847-851.
- HIRAOKA K., KIMURA T., LOGG C. R., TAI CH., HAGA K., LAWSON G. W., KASAHARA N. (2007), *Therapeutic Efficacy of Replication-Competent Retrovirus Vector-Mediated Suicide Gene Therapy in a Multifocal Colorectal Cancer Metastasis Model*, *Cancer Res*, 67 (11): s. 5345-5353.
- ICHIHASHI Y. (1996), *Extracellular Enveloped Vaccinia Virus Escapes Neutralization*, *Virology* 217: s. 472-485.
- IHEAGWARA U. K., BEATTY P. L., VAN P. T., ROSS T. M., MINDEN J. S., FINN O. J. (2014), *Influenza virus infection elicits protective antibodies and T cells specific for host cell antigens also expressed as tumor associated antigens: a new view of cancer immunosurveillance*, *Cancer Immunol Res*, 2 (3): s. 263-273.
- JACKSON D. A., SYMONS R. H., BERG P. (1972), *Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69 (10): s. 2904-2909.
- JACQUELINE C., TASIEMSKI A., SORCI G., UJVARI B., MAACHI F., MISSÉ D., RENAUD F., EWALD P., THOMAS F., ROCHE B. (2017), *Infections and cancer: the „fifty shades of immunity” hypothesis*, *BMC Cancer*, (17): s. 257.
- JAZOWIECKA J., SZALA S. (2002), *Bakterie onkologiczne w terapii nowotworów*, *Współcz Onkol*, 6 (5): s. 264-271
- KANG Y. A., SHIN H. C., YOO J. Y., KIM J. H., KIM J. S., YUN C. O. (2008), *Novel cancer antiangiotherapy using the VEGF promoter-targeted artificial zinc-finger protein and oncolytic adenovirus*, *Mol Ther* 16: s. 1033-1040.

- KAWASAKI Y., TAMAMOTO A., MAEYAMA Y., YAMAOKA N., TERADA N., OKAMURA H., KASAHARA N., KUBO S. (2011), *Replication-competent retrovirus vector-mediated prodrug activator gene therapy in experimental models of human malignant mesothelioma*, *Cancer Gene Ther*, 18 (8): s. 571-578.
- KAWASHIMA T., KAGAWA S., KOBAYASHI N., SHIRAKIYA Y., UMEOKA T., TERAISHI F., TAKI M., KYO S., TANAKA N., FUJIWARA T. (2004), *Telomerase-Specific Replication-Selective Virotherapy for Human Cancer*, *Clinical Cancer Research*, 10 (2): s. 285-292.
- KELLY E., RUSSELL J. S. (2007), *History of Oncolytic Viruses: genesis to genetic engineering*, *Mol Ther.*, 15 (4): s. 651-659.
- KIRN D. H. (2001), *Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus dl1520 (Onyx-015): results of phase I and II trials*, *Expert Opin Biol Ther*, 1 (3): s. 525-38.
- KIRN D. H., WANG Y., LIANG W., CONTAG C. H., THORNE S. H. (2008), *Enhancing Poxvirus Oncolytic Effects through Increased Spread and Immune Evasion*, *Cancer Research*, 68 (7): s. 2071-2075.
- KOJIMA T., FUJIWARA T., SHIRAKAWA Y., ONO H., NAKAMOTO M., HASEGAWA H., HIRANO N., WAKABAYASHI M., NOMURA S., TOGASHI Y., NISHIKAWA H., SATO A., OHTSU A., DOI T. (2018), *An open label phase I study to evaluate the safety and efficacy of OBP-301 with pembrolizumab in patients with advanced solid tumors*, *Journal of Clinical Oncology*, [DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15\_SUPPL.TPS3117].
- KREX D., KLINK B., HARTMANN C., VON DEIMLING A., PIETSCH T., SIMON M., SABEL M., STEINBACH J. P., HEESE O., REIFENBERG G., WELLER M., SCHACKERT G. (2007), *Long-term survival with glioblastoma multiforme*, *Brain*, 130 (20): s. 2596-2606.
- KRZYKAWSKI M. P. (2015), *Combined bacterial and viral treatment: a novel anticancer strategy*, *Cent Eur J Immunol*, 40 (3): s. 366–372.
- KUHN I., HARDEN P., BAUZON M., CHARTIER C., NYE J., THORNE S., REID R. NI S., LIEBER A., FISHER K., SEYMOUR L., RUBANYI G. M., HARKINS R. N., HERMISTON T. W. (2008), *Directed Evolution Generates a Novel Oncolytic Virus for the Treatment of Colon Cancer*, *PLOS ONE*, [DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0002409 ].
- KURYK L., VASSILEV L., RANKI T., HEMMINKI A., KARIOJA-KALLIO A., LEVÄLAMPI O., VUOLANTO A., CERULLO V., PESONEN S. (2017), *Toxicological and bio-distribution profile of a GM-CSF-expressing, double-targeted, chimeric oncolytic adenovirus Oncos-102 — Support for clinical studies on advanced cancer treatment*, *PLOS ONE*, 12 (8): e0182715.
- KURYK L., VUOLANTO A., PESONEN S., HIRVINEN M., GAROFALO M., CAPASSO C., ROMANYUK D., CERULLO V. (2014), *Enhanced Generation and Characterisation of a CD40L-Expressing Oncolytic Adenovirus for Cancer Treatment of Human Patients*, *Molecular Therapy*, (22) [Supplement 1]: s. 86.
- LAW K., DAVIDSON B. L. (2005), *What Does It Take to Bind CAR?*, *Molecular Therapy*, 12 (4): s. 599-609.
- LEE N. H., KIM M., OH S. Y., KIM S. G., KWON H. C., HWANG T. H. (2017), *Gene expression profiling of hematologic malignant cell lines resistant to oncolytic virus treatment*, *Oncotarget*, 8 (1): s. 1213-1225.
- LEVY-LAHAD E., FRIEDMAN E. (2007), *Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*, *Br J Cancer*, 96 (1): s. 11-15.
- LI Z., LIANG X., LI H., WANG Z., CHONG T. (2016), *Dendritic cells serve as a „Trojan horse” for oncolytic adenovirus delivery in the treatment of mouse prostate cancer*, *Acta Pharmacol Sin.*, 37 (8): s. 1121-1128.
- LIU C., SARKARIA J. N., PETELL C. A., PARASKEVAKOU, ZOLLMAN P. J., SCHROEDER M., CARLSON B., DECKER P. A., WU W., JAMES C. D., RUSSELL S. J., GALANIS E. (2007), *Combination of Measles Virus Virotherapy and Radiotherapy Has Synergistic Activity in the Treatment of Glioblastoma Multiforme*, *Clinical Cancer Research*, 13 (23): s. 7155-7165.
- LU Y., CHEN Y., YU Y., LAI Y., CHENG J., LI Y., SHEN C., TAI C. (2012), *Replicating retroviral vectors for oncolytic virotherapy of experimental hepatocellular carcinoma*, *Oncology Reports* 28 (1): s. 21-26.

- LUNDSTROM K. (2017), *Oncolytic Alphaviruses in Cancer Immunotherapy*, Vaccines (Basel), 5 (2): s. 9.
- MACHITANI M., SAKURAI F., WAKABAYASHI K., NAKATANI K., TACHIBANA M., KATO N., FUJIWARA T., MIZUGUCHI H. (2017), *Suppression of Oncolytic Adenovirus-Mediated Hepatotoxicity by Liver-Specific Inhibition of NF- $\kappa$ B*, Molecular Therapy Oncolytics, 7: s. 76-85.
- MACNEILL A. L. (2015), *On the potential of oncolytic virotherapy for the treatment of canine cancers*, Oncolytic Virother., 4: s. 95-107.
- MAJEM M., CASCALLO M., BAYO-PUXAN N., MESIA R., GERMA J. R., ALEMANY R. (2006), *Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad- $\Delta$ 24RGD*, Cancer Gene Therapy, 13: 696-705.
- MARANDA R. (2015), *Terapia BCG jako leczenie uzupełniające w leczeniu chorych na raka pęcherza moczowego*, Przegląd Urologiczny, (63): s. 25-30.
- MARTÍNEZ-VÉLEZ N., XIPELL E., VERA B., DE LA ROCHA A. A., ZALACAIN M., MARRODÁN L., GONZALEZ-HUARRIZ M., TOLEDO G., CASCALLO M., ALEMANY R., PATIÑO A., ALONSO M. M. (2016), *The Oncolytic Adenovirus VCN-01 as Therapeutic Approach Against Pediatric Osteosarcoma*, Cancer Therapy: Preclinical, 22 (9): s. 2217-2225.
- MAZAR J., LI Y., ROSADO A., PHELAN P., KEDARINATH K., PARKS G. D., ALEXANDER K. A., WESTMORELAND T. J. (2018), *Zika virus as an oncolytic treatment of human neuroblastoma cells requires CD24*, PLOS ONE 13 (7): e0200358, [DOI: 10.1371/journal.pone.0200358].
- MCCARTHY E. F. (2006), *The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas*, Iowa Orthop J, 26: s. 154–158.
- MCGRANAHAN N., SWANTON C. (2017), *Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future*, Cell, 168 (4): s. 613-628.
- MONGE J., KRICUN M., RADOVČIĆ J., RADOVČIĆ D., MANN A., FRAYER D. W. (2013), *Fibrous Dysplasia in a 120,000+ Year Old Neandertal from Krapina, Croatia*, PLOS ONE, [DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0064539].
- NANDI S., LESNIAK M. S. (2009), *Adenoviral virotherapy for malignant brain tumors*, Expert Opin Biol Ther., 9 (6): s. 737-747.
- NANDI S., ULASOV I. V., ROLLE C. E., HAN Y., LESNIAK M. S. (2009), *A chimeric adenovirus with an Ad3 fiber knob modification augments glioma virotherapy*, J Gene Med, (11): s. 1005-1011.
- NEMEROW G. L., STEWART P. L. (1999), *Role of  $\alpha$  Integrins in Adenovirus Cell Entry and Gene Delivery*, Microbiol Mol Biol Rev, 63 (2): s. 725-734.
- NEMUNAITIS J., CUNNINGHAM C., TONG A. W., POST L., NETTO G., PAULSON A. S., RICH D., BLACKBURN A., SANDS B., GIBSON B., RANDLEV B., FREEMAN S. (2003), *Pilot trial of intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in combination with chemotherapy or IL-2 treatment in refractory cancer patients*, Cancer Gene Therapy (10): s. 341–352.
- NGUYEN T. V., CROSBY C. M., HELLER G. J., MENDEL Z. I., BARRY M. E., BARRY M. A. (2018), *Oncolytic adenovirus Ad657 for systemic virotherapy against prostate cancer*, Oncolytic Virotherapy, 7: s. 43-51.
- ODES E. J., RANDOLPH-QUINNEY P. S., STEYN M., THROCKMORTON Z., SMILG J. S., ZIPFEL B., AUGUSTINE T. N., DE BEER F., HOFFMAN J. W., FRANKLIN R. D., BERGER L. R. (2016), *Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa*, S Afr J Sci., 112 (7/8): art. #2015-0471, [DOI: 10.17159/sajs.2016/20150471].
- OPYRCHAL M., ALLEN C., IANKOV I., ADERCA I., SCHROEDER M., SARKARIA J., GALANIS E. (2012), *Effective radiovirotherapy for malignant gliomas by using oncolytic measles virus strains encoding the sodium iodide symporter (MV-NIS)*, Hum Gene Ther., 23 (4): s. 419-427.

- ÖZDUMAN K., WOLLMANN G., PIEPMEIER J. M., VAN DEN POL A. N. (2008), *Systemic Vesicular Stomatitis Virus Selectively Destroys Multifocal Glioma and Metastatic Carcinoma in Brain*, Journal of Neuroscience, 28 (8): s. 1882-1893.
- PALMA-OCAMPO H. K., FLORES-ALONSO J. C., VALLEJO-RUIZ V., REYES-LEYVA J., FLORES-MENDOZA L., HERRERA-CAMACHO I., ROSAS-MURRIETA R. H., SANTOS-LÓPEZ G. (2015), *Interferon lambda inhibits dengue virus replication in epithelial cells*, Virol J., 12: s. 150.
- PAN P., CHEN H., CHEN S. (2013), *Myeloid-derived suppressor cells as a Trojan horse. A cellular vehicle for the delivery of oncolytic viruses*, Oncoimmunology, 2 (8): e25083.
- PATIL S. S., GENTSCHEV I., NOLTE I., OGILVIE G., SZALAY A. A. (2012), *Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: current status and future prospects for canine patients*, J Transl Med., 10: s. 3.
- PICÓ A. H., WANG X., SIPO I., SIEMETZKI U., EBERLE J., POLLER W., FECHNER H. (2005), *Viral and Nonviral Factors Causing Nonspecific Replication of Tumor- and Tissue-Specific Promoter-Dependent Oncolytic Adenoviruses*, Molecular Therapy 11 (4): s. 563-577.
- PIEKAROWICZ A. (2004), *Podstawy wirusologii molekularnej*, PWN, Warszawa 2012, wyd. 1., dodruk: s. 319-327, 468, 469, 576, 581.
- POST D. E., SANDBERG E. M., KYLE M. M., DEVI N. S., BRAT D. J., XU Z., TIGHIOUART M., VAN MEIR E. G. (2007), *Targeted Cancer Gene Therapy Using a Hypoxia Inducible Factor-Dependent Oncolytic Adenovirus Armed with Interleukin-4*, Cancer Research 67 (14): s. 6872-6881.
- POWER A. T., BELL J. C. (2007), *Cell-based Delivery of Oncolytic Viruses: A New Strategic Alliance for a Biological Strike Against Cancer*, Molecular Therapy, 15 (4): s. 660-665.
- RANKI T., PESONEN S., HEMMINKI A., PARTANEN K., KAIREMO K., ALANKO T., LUNDIN J., LINDER N., TURKKI R., RISTIMÄKI A., JÄGER E., KARBACH J., WAHLE C., KANKAINEN M., BACKMAN C., VON EULER M., HAAVISTO E., HAKONEN T., HEISKANEN R., JADERBERG M., JUHILA J., PRIHA P., SUORANTA L., VASSILEV L., VUOLANTO A., JOENSUU T. (2016), *Phase I study with ONCOS-102 for the treatment of solid tumors - an evaluation of clinical response and exploratory analyses of immune markers*, J Immunother Cancer (4): s. 17.
- ROJAS J. J., CASCALLO M., GUEDAN S., GROS A., MARTINEZ-QUINTANILLA J., HEMMINKI A., ALEMANY R. (2009), *A modified E2F-1 promoter improves the efficacy to toxicity ratio of oncolytic adenoviruses*, Gene Ther., 16 (12): s. 1441-1451.
- ROJAS J. J., GUEDAN S., SEARLE P. F., MARTINEZ-QUINTANILLA J., GIL-HOYOS R., ALCAYAGA-MIRANDA F., CASCALLO M., ALEMANY R. (2010), *Minimal RB-responsive E1A Promoter Modification to Attain Potency, Selectivity, and Transgene-arming Capacity in Oncolytic Adenoviruses*. Molecular Therapy, 18 (11): s. 1960-1971.
- ROOSEBOOM M., COMMANDEUR J. N. M., VERMEULEN N. P. E. (2004), *Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs*, Pharmacological reviews, (56): s. 53-102.
- SEYMOUR L. W., FISHER K. D. (2016), *Oncolytic viruses: finally delivering*, Br J Cancer 2016, luty 16; 114 (4): s. 357-361.
- SIBBALD B. (2001), *Death but one unintended consequence of gene-therapy trial*, CMAJ, 164 (11): s. 1612.
- SINGH P. K., JUWAR D., KUMAR R.G., SAHOO A.P., TIWARI A.K. (2012), *Oncolytic viruses and their specific targeting to tumour cells*, Indian J MedRes; 136 (4): s. 571-581.
- SMITH R. R., HUEBNER R. J., ROWE W. P., SCHATTEN W. E., THOMAS L. B. (1956), *Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix*, Cancer, (9): s. 1211-1218.
- SONNENSCHN C., SOTO A. M. (2013), *The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer Reviews: A critique*, J. Biosci, 38 (3): s. 651-663.
- SOTO A. M., SONNENSCHN C. (2011), *The tissue organization field theory of cancer: A testable replacement for the somatic mutation theory*, Bioessays, 33 (5): s. 332-340.

- STRICKLER H. D., ROSENBERG P. S., DEVESA S. S., HERTEL J., FRAUMENI J. F., GOEDERT J. J. (1998), *Contamination of Poliovirus Vaccines With Simian Virus 40 (1955-1963) and Subsequent Cancer Rates*, JAMA, 279 (4): s. 292-295.
- SUMMERS W. C. (2014), *Inventing Viruses*, Annual Review of Virology, (1): s. 25-35.
- SVENSSON E., MORENO R., MILENOVA I., CHRISTIANSSON L., ALEMANY R., LOSKOG A., *Immunotherapy using LOAd700 armed with CD40 ligand controls experimental pancreatic cancer and activates immune responses*. [abstrakt], [w:] Proceedings of the AACR Special Conference: Tumor Immunology and Immunotherapy: A New Chapter, Orlando, FL. Philadelphia (PA) (2015): AACR; Cancer Immunol Res, 3(10) Supplement: Abstract nr A25.
- TAIPALE K., LIKANEN I., KOSKI A., HEISKANEN R., KANERVA A., HEMMINKI O., OKSANEN M., GRÖNBERG-VÄHÄ-KOSKELA S., HEMMINKI K., JOENSUU T., HEMMINKI A. (2016), *Predictive and Prognostic Clinical Variables in Cancer Patients Treated With Adenoviral Oncolytic Immunotherapy*, Molecular Therapy, 24 (7): s. 1323-1332.
- TAKETO Y., TAKETO A. (1967), *Oncolytic Activity in vitro of Streptococci with Special Reference to „Cell-bound” Hemolysin*, The Journal of Biochemistry, 61 (4): s. 450-459.
- TAKI M., KAGAWA S., NISHIZAKI M., MIZUGUCHI H., HAYAKAWA T., KYO S., NAGAI K., URATA Y., TANAKA N., FUJIWARA T. (2005), *Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 (Telomelysin-RGD)*, Oncogene, 24 (19): s. 3130-3140.
- TAZAWA H., KURODA S., HASEI J., KAGAWA S., FUJIWARA T. (2017), *Impact of Autophagy in Oncolytic Adenoviral Therapy for Cancer*, Int J Mol Sci, 18 (7): pii: E1479.
- TEJADA S., DÍEZ-VALLE R., DOMÍNGUEZ P. D., PATIÑO-GARCÍA A., GONZÁLEZ-HUARRIZ M., FUEYO J., GOMEZ-MANZANO C., IDOATE M. A., PETERKIN J., ALONSO M. M. (2018), *DNX-2401, an Oncolytic Virus, for the Treatment of Newly Diagnosed Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas: A Case Report*, Frontiers in Oncology, 8, [DOI: 10.3389/FONC.2018.00061].
- TOMASETTI C., LI L., VOGELSTEIN B. (2017), *Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention*, Science, 355 (6331): s. 1330-1334.
- TOMASETTI C., VOGELSTEIN B. (2015), *Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions*, Science, 347 (6217): s. 7881.
- TOMCZAK K., CZERWIŃSKA P., WIZNEROWICZ M. (2015), *The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge*, Contemp Oncol (Pozn.), 19 (1A): A68-A77.
- TROJNAR Z., CIEPIELA O., DEMKOW U. A. (2014), *The prevalence of IgG and IgA against adenoviruses in serum of children aged 11-26 months, hospitalised in the Clinical Paediatric Hospital in Warsaw, Poland*, Cent Eur J Immunol, 39 (1): s. 91-95.
- VAN REGENMORTEL M. H. V. (2008), *Nature of Viruses*, [w:] Desk Encyclopedia of General Virology, red. Mahy B. W. J., van Regenmortel M. H. V., Oxford/San Diego (2010): s. 19-23.
- VÄHÄ-KOSKELA M. J. V., HEIKKILÄ J. E., HINKKANEN A. E. (2007), *Oncolytic viruses in cancer therapy*, Cancer Letters, (254): s. 178-216.
- VENKATARAMAN S., REDDY S. P., LOO J., IDAMAKANTI N., HALLENBECK P. L., REDDY V. S. (2008), *Structure of Seneca Valley Virus-001, An oncolytic picornavirus representing a new genus*, Structure, 16 (10): s. 1555-1561.
- WICKHAM T. J., MATHIAS P., CHERESH D. A., NEMEROW G. R. (1993), *Integrins  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment*, Cell, 73 (2): s. 309-319 [abstrakt].
- WOJCIECHOWSKA U., DIDKOWSKA J., ZATOŃSKI W. (2012), *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2010*, Warszawa 2012: s. 7.
- WOJCIECHOWSKA U., OLASEK P., CZAUDERNA K., DIDKOWSKA J. (2016) *Rozdział 2. Nowotwory Złośliwe ogółem*, [w:] Nowotwory Złośliwe w Polsce 2014, Ministerstwo Zdrowia, Warszawa 2016.

- WOLLMANN G., DROKHLYANSKY E., DAVIS J. N., CEPKO C., VAN DEN POL A. N. (2015), *Lassa-Vesicular Stomatitis Chimeric Virus Safely Destroys Brain Tumors*, *J Virol*, 89 (13): s. 6711-6724.
- XU C., GOß A. V., DORNEBURG C., DEBATIN K.-M., WEI J., BELTINGER C. (2018), *Proof-of-principle that a decoy virus protects oncolytic measles virus against neutralizing antibodies*, *Oncolytic Virotherapy*, 7: s. 37-41, [DOI: 10.2147/OV.S150637].
- YABROFF K. R., LUND J., KEPKA D., MARIOTTO A. (2011), *Economic Burden of Cancer in the US: Estimates, Projections, and Future Research*, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, (20): s. 2006-2014.
- YLÖSMÄKI E., HAKKARAINEN T., HEMMINKI A., VISAKORPI T., ANDINO R., SAKSELA K. (2008), *Generation of a Conditionally Replicating Adenovirus Based on Targeted Destruction of E1A mRNA by a Cell Type-Specific MicroRNA*. *Journal of Virology*, 82 (22): s. 11009-11015.
- ZHU Z., GORMAN M. J., MCKENZIE L. D., CHAI J. M., HUBERT C. G., PRAGER B. C., FERNANDEZ E., RICHNER J. M., ZHANG R., SHAN C., TYCKSEN E., WANG X., SHI P.-Y., DIAMOND M. S., RICH J. N., CHHEDA M. G. (2017), *Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells*, *Journal of Experimental Medicine*, [DOI: 10.1084/JEM.20171093].

## ŹRÓDŁA INTERNETOWE

- Cancer Fact sheet* (2017, luty), [dostęp 5 grudnia 2017, //who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en].
- COLLIER M. (2017, październik 13), *Resolving Rigvir*, [dostęp 17 października 2017, //ENG.LSM.LV/ARTICLE/FEATURES/COMMENTARY/RESOLVING-RIGVIR.A253515/].
- EMA grants positive opinion for orphan drug status for ovarian cancer oncolytic vaccine (2015, styczeń 13), [dostęp 11 grudnia 2017, //PSIOXUS.COM/JANUARY-2015-EMA-GRANTS-POSITIVE-OPINION-ORPHAN-DRUG-STATUS-OVARIAN-CANCER-ONCOLYTIC-VACCINE/].
- EPA (2018, luty 9), *Decision*, [dostęp 31 lipca, 2018, dostępny w Internecie: //EPA.GOV.TZ/ASSETS/FILEAPI/HSNO-AR/APP202854/APP202854-DECISION-FINAL.PDF].
- FDA Approves Talimogene Laherparepvec to Treat Metastatic Melanoma (2015, listopad 25), [dostęp 22 listopada 2017, //CANCER.GOV/NEWS-EVENTS/CANCER-CURRENTS-BLOG/2015/T-VEC-MELANOMA ].
- FDA Grants Orphan Drug Designation to DNX-2401 for Malignant Glioma (2014, październik 7), [dostęp 11 grudnia 2017, //ASCOPOST.COM/NEWS/18662].
- FIJUTH J., DZIADZIUSZKO R., BIERNAT W., BOBEK-BILLEWICZ B., BONICKI W., JARZĄB M., KRZKOWSKI M., NAWROCKI S., TROJANOWSKI T. (2013), *Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego*, red. Fijuth J., Dziadziuszko R., [dostęp: 7 grudnia 2017, //ONKOLOGIA.ZALECENIA.MED.PL/PDF/PTOK\_2013\_02\_NOWOTWORY%20OUN.PDF]
- GORSKI D. [pseudonim Orac] (2017), *Rigvir: A cancer "cure" imported from Latvia that cancer patients should avoid*, [dostęp 7 grudnia 2017, //RESPECTFULINSOLENCE.COM/2017/09/25/RIGVIR-A-CANCER-CURE-IMPORTED-FROM-LATVIA-THAT-CANCER-PATIENTS-SHOULD-AVOID/].
- HPV and cancer (2016, wrzesień 2), [dostęp 1 lipca 2018, //CANCERRESEARCHUK.ORG/ABOUT-CANCER/CAUSES-OF-CANCER/INFECTIONS-HPV-AND-CANCER/HPV-AND-CANCER?\_GA=2.104531524.516331436.1530487752-2076016669.1530487752].
- ICTV Code (2018, kwiecień), [dostęp 2 lipca 2018, //TALK.ICTVONLINE.ORG/INFORMATION/W/ICTV-INFORMATION/383/ICTV-CODE].
- IMMUNOONCOLOGY (2015, lipiec 14), *Oncolytic Immunotherapy — Robert H Andtbacka*, [dostęp 22 listopada 2017, //YOUTUBE.COM/WATCH?v=ML1xMPGjV7M].
- Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej dotyczące diagnostyki i leczenia raka jajnika (2015, październik 16), [dostęp 9 czerwca 2016, //PTGO.PL/WP-CONTENT/UPLOADS/REKOMENDACJEJAJNIK-16.10.2015.PDF].



- RITUMS E. (2016), *Zinātne kalpones priekšautā* [tłum. ang. *When Science Takes A Back Seat*], *Materia Medica* [język oryginału: łotewski, tłumaczenie angielskie dostępne w Internecie: //skepticisms.lv/enciklopedija/rigvir-when-science-takes-a-back-seat/, dostęp 8 grudnia 2017].
- Statistics on preventable cancers* (2017, wrzesień 27), [dostęp 6 listopada 2017, //CANCERRESEARCHUK.ORG/HEALTH-PROFESSIONAL/CANCER-STATISTICS/RISK/PREVENTABLE-CANCERS#HEADING-EIGHT].
- STIRĀNE D., DJAKONOVA A. (2017, luty 13), *Latvia to review state compensation for Rigvir anti-cancer drug*, [dostęp 11 grudnia 2017, //ENG.LSM.LV/ARTICLE/SOCIETY/SOCIETY/LATVIA-TO-REVIEW-STATE-COMPENSATION-FOR-RIGVIR-ANTI-CANCER-DRUG.A223586/]
- STOLBERG S. G. (1999, listopad 28), *The Biotech Death of Jesse Gelsinger*, *The New York Times Magazine*, [dostęp 3 grudnia 2017, dostępny w Internecie: //NYTIMES.COM/1999/11/28/MAGAZINE/THE-BIOTECH-DEATH-OF-JESSE-GELSINGER.HTML].
- TEDx TALKS (2012, styczeń 12), *Killing Cancer With Viruses: Patrick Lee at TEDxHalifax*, [dostęp 22 listopada 2017, //YOUTUBE.COM/WATCH?v=NSOP4SPi2jY].
- WEINTRAUB A. (2016, GRUDZIEŃ 29), *Four Cancer-Killing Viruses To Watch In 2017*, [dostęp 1 grudnia 2017, //FORBES.COM/SITES/ARLENEWEINTRAUB/2016/12/29/FOUR-CANCER-KILLING-VIRUSES-TO-WATCH-IN-2017/#4ED3A79165CC].
- WHAT IS COLEY'S TOXINS TREATMENT FOR CANCER? (2012, SIERPIEŃ 22), [dostęp 1 sierpnia 2018, //CANCERRESEARCHUK.ORG/ABOUT-CANCER/CANCER-IN-GENERAL/TREATMENT/COMPLEMENTARY-ALTERNATIVE-THERAPIES/INDIVIDUAL-THERAPIES/COLEYS-TOXINS-CANCER-TREATMENT]
- Wirus onkolityczny* (2014, maj 22), Wikipedia, wolna encyklopedia, [dostęp 1 lipca 2018, //PL.WIKIPEDIA.ORG/W/INDEX.PHP?TITLE=WIRUS\_ONKOLITYCZNY&OLDID=39500498].
- WOJCIECHOWSKA U., DIDKOWSKA J. (b.r.), *Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów*, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej — Curie, [dostęp 20 listopada 2017, dostępne w Internecie: //ONKOLOGIA.ORG.PL/RAPORTY/].