

# Onkolytické viry a léčení nádorového bujení

## Oncolytic viruses and cancer treatment

Španielová H.<sup>1,2</sup>, Brdička R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha

<sup>2</sup> Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, UK, Praha

<sup>3</sup> Biogen Praha, s.r.o.

### Souhrn

**Východiska:** Ve srovnání s normálními tkáněmi je jednou ze základních odlišností nádorového bujení vznik mikroprostředí se sníženou nebo zcela vymizelou imunogenicitou. Jedním z hlavních úkolů onkolytických virů je vytvoření situace, která v tomto prostředí povede k obnově imunitních procesů a ke ztrátě životnosti nádorových buněk. Onkolytické viry jsou v tomto smyslu neustále vylepšovány, a lze je tedy jednoznačně považovat za možnou adjuvantní imunomodulační protinádorovou terapii. Nezbytným předpokladem pro úspěch této protinádorové léčby je specifita onkolytických virů, které se replikují jen v buňkách nádoru, ale nepůsobí na normální buňky. Práce nejen představuje strategie, jakými se onkolytické viry optimalizují pro získání nádorové specifity a zvýšení účinnosti, ale také rekapituluje nejzajímavější poznatky vyplývající z proběhlých preklinických a klinických testů. **Cíl:** Předkládaný přehled podává informace o současném stavu vývoje a použití onkolytických virů jako součásti biologického léčení nádorů.

### Klíčová slova

onkolytická viroterapie – imunoterapie – nádorové mikroprostředí – cílená molekulární terapie – nádory

### Summary

**Background:** The fundamental difference between tumor and normal tissue growth is the emergence of the microenvironment with diminished or extinguished immunogenicity. One of the main functions of oncolytic viruses is the formation of such a microenvironment, which leads to a revival of immunological processes and loss of viability of cancer cells. Oncolytic viruses are being continuously improved and should be considered as a possible adjuvant immunomodulatory cancer treatment. A key requirement for the success of this cancer therapy is the specificity of the oncolytic viruses, which replicate only in tumor cells but do not affect normal cells. In this review, optimization strategies to achieve cancer specificity with increased efficacy are discussed and the most interesting results from preclinical and clinical trials are presented.

**Purpose:** This review provides information on the current status of the development and use of oncolytic viruses as part of the biological treatment of cancer.

### Key words

oncolytic virotherapy – immunotherapy – tumor microenvironment – molecular targeted therapy – neoplasms

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

ÚOCHAB AV ČR

Flemingovo náměstí 542/2

160 00 Praha 6

e-mail:

hana.spanielova@uochb.cas.cz

Obdrženo/Submitted: 27. 3. 2022

Přijato/Accepted: 14. 8. 2022

doi: 10.48095/ccko202312

## Úvod

Léčba rakoviny zaznamenává nezabývatelný pokrok, který se promítá do života pacientů i důležitých statistických ukazatelů. Desetiletá míra přežití činí např. ve Velké Británii nyní 50 % a za posledních 40 let se zdvojnásobila [1]. Příznivé trendy lze pozorovat i v ČR [2]. Za tímto úspěchem stojí mnoho faktorů, jako je lepší pochopení mechanismů karcinogeneze a diversity nádorů, včasná diagnostika a zkušenostmi precizovaná léčba, která se nově orientuje i na selektivní cílení na nádorové buňky. S tím znovu ožívá zájem o cílenou terapii nádorů založenou na použití tzv. onkolytických virů (OV) – viroterapii.

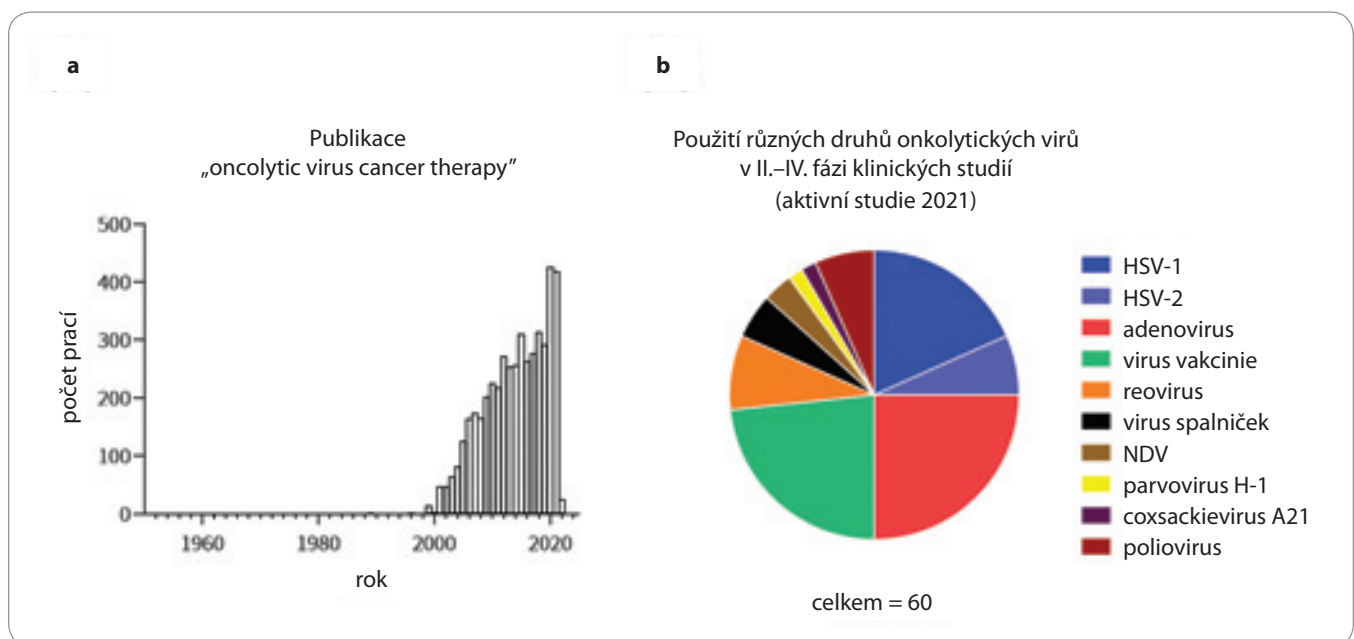
Aniž bychom chtěli extenzivně opakovat to, co již bylo v naší literatuře o použití OV napsáno [3], rozhodli jsme se tuto oblast se stále narůstajícím potenciálem znovu zrekapitulovat. Během již více než 10 let se nahromadilo mnoho úspěšných pozorování [4]. Byť počet publikovaných prací na téma užití OV v posledních letech velice rychle stoupá (graf 1a) [4], zdá se, že v našem domácím výzkumu tato oblast nevyvolala žádný zvláštní zájem. Výjimkou je plánovaná, ale pro nedostatek vhodných pacientů nedokončená klinická studie společnosti

SOTIO a.s. (NCT03514836), která využívala OV ONCOS-102 [5] vyráběný firmou Targovax ASA (Luděk Sojka, SOTIO a.s., osobní sdělení, 21. 9. 2021).

Viroterapii nádorů má za sebou dlouhou historii, která vedla od náhodných pozorování, že virová infekce nebo vakcinace oslabenými viry může zlepšovat stav onkologických pacientů, přes léčbu pomocí různorodých virů nebo buněčných lyzátů infikovaných buněk po dnešní velmi sofistikované přístupy [3]. Navzdory tomu není dodnes zcela jasné, jaké všechny konkrétní mechanismy se při úspěšném využití tohoto přístupu mohou uplatňovat. Označení „onkolytický virus“ jednoznačně evokuje (správnou) představu, že tento virus selektivně napadá nádorovou buňku, ve které se množí, a v důsledku toho dochází k její lýze. To však není vše. V souvislosti s některými OV je zmiňována i možnost, že dokáží destruovat nádorovou vaskulaturu a působí také jako antiangiogenní agens [6]. Hlavně je však stále zřejmější, že za úspěchem OV stojí jejich schopnost navozovat tzv. imunologickou smrt nádorových buněk a v mnoha případech i efektivní protinádorovou imunitu mnoha různými způsoby, které lze ještě posilovat pomocí cílených modifi-

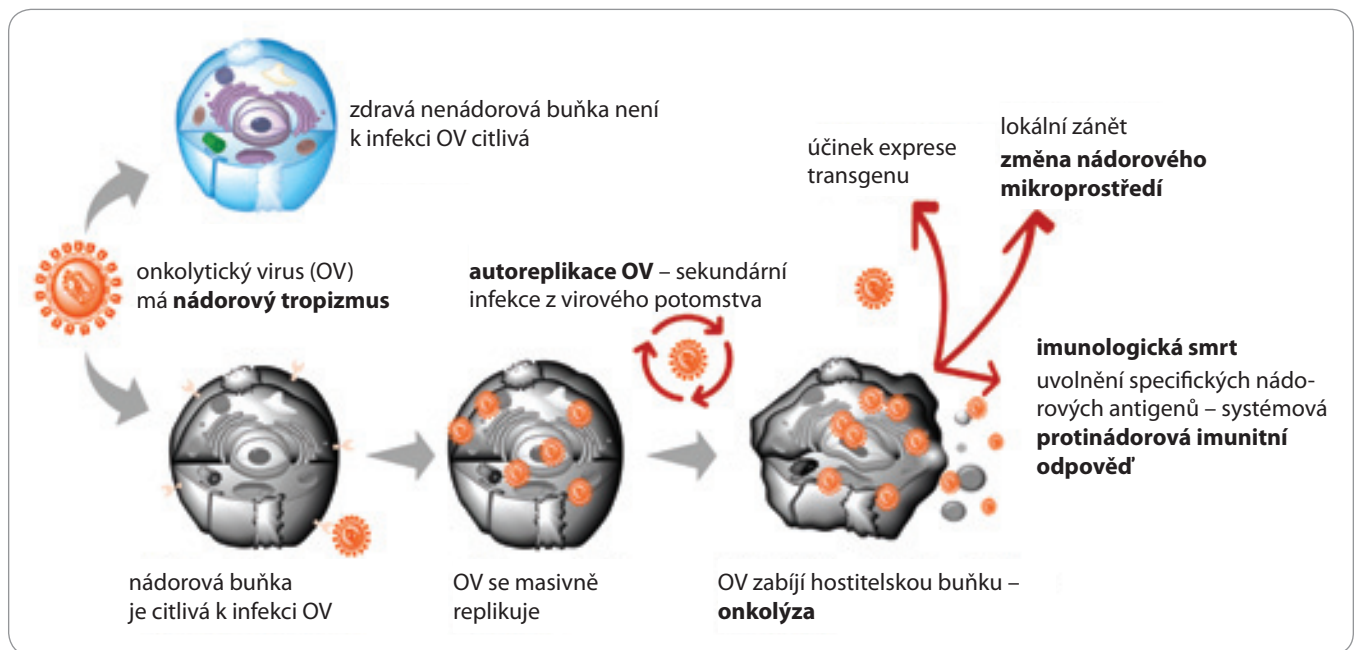
kací. Použití OV v léčbě nádorů je tedy v dnešní době přednostně vnímáno jako forma protinádorové imunoterapie [7] s tou výhodou, že použité agens se dokáže v nádorech amplifikovat a samovolně šířit. Na rozdíl od protinádorových vakcín nemusí nést definovaný antigen, protože nádorově specifické antigeny (tumor specific antigens – TSA) jsou uvolňovány při rozpadu buněk indukovaném virem. Pro léčbu OV se tedy často používá termín viroimunoterapie. To je případ i prvního OV schváleného od roku 2015 pro klinické použití v euroatlantickém prostoru. Jedná se o přípravek talimogene laherparepvec (T-VEC) prodáváný pod obchodním názvem Imlygic™. Imlygic™ je geneticky upravený virus herpes simplex 1 (HSV-1), který produkuje imunostimulant, růstový faktor pro granulocyty-makrofágy (granulocyte-macrophage colony stimulating factor – GM-CSF), a aplikuje se přímo do nádorů při léčbě rekurentního melanomu.

Není bez zajímavosti, že recentní experimentální studie zaznamenaly přínos OV i v případě, kdy byly OV použity jako pouhé adjuvans protinádorové (např. peptidové) vakcíny a jejich efekt nebyl závislý na množení viru v nádoro-



**Graf 1. Publikace věnované onkolytickým virům při terapii nádorů dle databáze PubMed (a) a zastoupení jednotlivých onkolytických virů aktuálně registrovaných klinických studiích II-IV. fáze dle serveru ClinicalTrials.gov (b). Nejsou započítány studie, které pro-  
věřují účinnost protinádorových vakcín odvozených od viru vakcinie (PANVAC-V/F a PROSTVAC-V/F).**

HSV1,2 – herpes simplex virus 1,2, NDV – Newcastle disease virus



Obr. 1. Princip účinku onkolytických virů.

vých buňkách [8,9]. Právě schopnost OV vnášet do nádoru další signály nebezpečí (danger signals) a měnit imunologicky restriktivní „chladné“ nádorové mikroprostředí na imunologicky „horké“ prozánětlivé místo – senzitivní k aditivní kombinované (imuno)terapii – se stává nejčastějším předmětem probíhajících klinických studií s velmi povzbudivými výsledky. Ani vývoj nových OV s precizně navrženými úpravami pro zvýšení jejich účinnosti se nezastavil a přináší velmi zajímavé výsledky.

Tato přehledová práce shrnuje obě oblasti: otázkami vývoje a výběru OV se zabývá první část práce, zatímco druhá část je věnována převážně klinickému použití OV u konkrétních nádorů.

### Vývoj OV a výběr OV pro klinické využití

Výzkum OV probíhá již téměř 100 let. Od metody pokus-omyl s viry, které přirozeně napadají a zabíjejí nádorové buňky, se vývoj OV změnil v sofistikovaný proces racionálního designu a inženýringu vybraných virů na několika úrovních.

### Strategie vývoje OV

Vývoj OV je určován současnou definicí ideálního OV. Ideální OV by neměl u pacienta způsobovat **žádné onemocnění**, při infekci by měl **upřednostňovat** ná-

dorové buňky před buňkami normálními, účinná infekce nádoru by neměla být omezována **antivirovou** odpovědí (např. preexistujícími protilátkami) a zároveň by měl virus indukovat **imunogenní formu smrti** u všech rakovinných buněk, což by mělo vést k navození silné, **systémové a trvalé protinádorové imunity** (obr. 1).

Z definice je patrné, že se vývoj OV zaměřuje na dvě hlavní oblasti: bezpečnost a účinnost.

### Bezpečnost použití OV

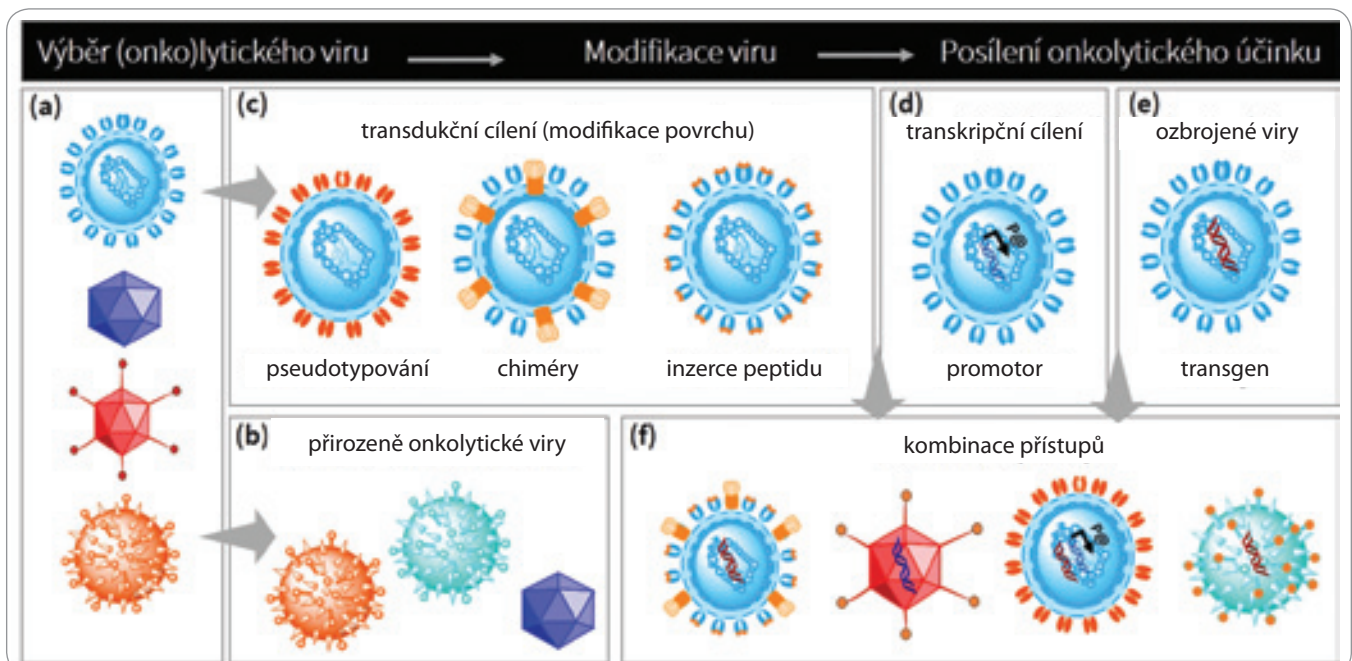
Onkolytické viry se od standardních léčiv významně liší tím, že se jedná o živé viry, které se při klinickém podání množí, což může vést k proměnlivým účinným dávkám, a proto je velmi obtížné jednoznačně stanovit dávky tak, aby byly bezpečné a zároveň účinné [10]. Historicky samozřejmě výběrem neprošly onkolytické viry, které se v protinádorové léčbě zdály být účinné, ale sekundárně vyvolávaly infekce nebo s infekcí OV spojené komplikace [3]. Pro další vývoj jsou vybírány lidské viry, které mají zanedbatelný patogenní potenciál pro člověka (např. orthoreoviry), nebo jde o veterinární patogeny (virus newcastleské choroby kuřat – NDV, virus vezikulární stomatitidy – VSV). Patogenita původního viru ale nemusí být nepřekonatelnou překážkou.

Pokud jsou známy mechanismy, jakými virus nemoc vyvolává, lze metodami genového inženýrství nežádoucí charakteristiky viru odstranit. To je případ mnoha OV používaných dnes v klinických studiích. Obecně však bohužel platí, že čím více se manipulacemi zvyšuje bezpečnost virových vektorů, tím více se snižuje jejich účinnost. Významná rizika ale může přinášet i proměnlivost viru při replikaci v těle pacienta a kvůli těmto komplikacím není divu, že i přes velké množství rozmanitých OV vstupujících do preklinického hodnocení a I. fáze klinického hodnocení je v současné době v II–IV. fázi klinických studií registrován jen relativně úzký okruh virů (graf 1b).

### Zlepšování účinnosti OV

Při vývoji OV je snaha využít replikačně kompetentních virů a u nich podpořit: 1) selektivní vstup viru do nádorových buněk (**transdukční cílení OV**); 2) selektivní aktivaci replikace viru pouze v nádorových buňkách (**transkripční cílení OV**); 3) onkolytický a imunoterapeutický potenciál doplněním transgenů (**vyzbrojení OV**); 4) akumulaci OV v nádorech i při systémovém podání.

Schopnost OV množit se přednostně v nádorových buňkách může být dána kombinací rozdílných mechanismů, které se uplatňují i při běžné virové in-



**Obr. 2. Strategie vývoje onkolytických virů.** Z portfolia dostupných virů (a) lze vybrat přirozeně onkolytické viry (b), které mohou být použity bez dalších modifikací nebo být upraveny tak, aby rozeznávaly receptory na nádorových buňkách (c). Povrch viru pro tzv. transdukční cílení na nádorové buňky může být modifikován pseudotypováním, míšením za vzniku chimérických virů nebo vkládáním (inzerací) vazebných ligandů (peptidů) nebo protilátek do povrchových proteinů viru (c). Genomy onkolytických virů lze modifikovat vložením nádorově-specifického promotoru (označení P@), který dovoluje replikaci viru pouze v nádorových buňkách (d). Onkolytický potenciál je možno zvyšovat vkládáním transgenů, což bývají typicky imunomodulační molekuly nebo tzv. sebevražedné geny a takto vznikají ozbrojené viry (e). Všechny uvedené přístupy lze libovolně kombinovat, vč. míšení nepříbuzných virů (f).

fekci a jsou známy pod pojmem **virový tropismus**. Schopnost napadat hostitelskou buňku, množit se a produkovat virové potomstvo bývá u virů často omezena na určitý druh buněk, tkání nebo organismů (hovoříme pak o buněčném, tkáňovém nebo hostitelském tropismu viru). Virový tropismus je určován: 1) rozeznáváním určitých buněčných receptorů, které zprostředkovávají vstup viru do buňky; 2) přítomností kompatibilních hostitelských faktorů nutných pro realizaci replikace/transkripce virové nukleové kyseliny (např. transkripční faktory); 3) nastavením antivirové signalizace v buňce (může být odlišné v různých buňkách a tkáních).

Některé viry zcela přirozeně využívají pro infekci receptory, které jsou nadměrně exprimovány na nádorových buňkách. U takových virů předpokládáme, že je jejich selektivní množení v nádorech dáno hlavně specifitou receptorovou. Příkladem může být virus spalniček, který využívá pro vstup do buněk receptor CD46. Tato molekula je nadměrně exprimována nádorovými

buňkami, u mnohočetného myelomu až 14× více než u normálních buněk, a klinická i experimentální data potvrzují jednoznačnou souvislost mezi zvýšenou expresí CD46 a maligní transformací s metastatickým potenciálem [11]. Nádorové buňky s nadměrnou expresí tohoto receptoru jsou tak náchylné k infekci a onkolýze vakcinačním kmenem spalniček (stejně jako některých typů adenovirů využívajících CD46 receptor).

Selektivita jiných virů pro nádorové buňky zase souvisí s faktem, že spouštění antivirové odpovědi je v nádorových buňkách často deregulováno. Kupříkladu aktivace onkogenu *RAS* vede k tomu, že v buňkách selhává hlavní interferonová protivirová obrana založená na proteinkináze aktivované dvouvláknovou RNA (PKR). To je pravděpodobně příčinou toho, proč se typicky reoviry, jejichž genomem je dvouvláknová RNA, velmi úspěšně množí a šíří v nádorech s aktivovaným *RAS* onkogelem, ale v normálních zdravých buňkách je infekce díky aktivní PKR potlačena v zárodku [12]. U jiných přirozeně

onkolytických virů však není podstata jejich nádorového tropismu dodnes zcela objasněna [13].

Virový tropismus se může pod vlivem selekce změnit – virus může začít upřednostňovat pro vstup viru do buňky jiný receptor nebo se adaptovat na jiné vnitřní nastavení buňky, tkáně nebo nového hostitele. Z uvedeného vyplývá, že tropismus viru je fenomén, se kterým lze při vývoji OV pracovat, a to tím lépe, čím důkladněji jsou prostudovány mechanismy virové infekce konkrétního viru a charakteristiky nádorových buněk/tkání, na které chceme OV zacílit.

#### Transdukční cílení na nádorové buňky

Při vývoji OV tedy není nutno spoléhat pouze na přirozenou receptorovou specifitu. Existují způsoby, jak tropismus viru cíleně ovlivnit (obr. 2). Jedním z takových způsobů je pseudotypování virů. Vychází z pozorování, že při koinfekci některých virů může docházet k míšení virových komponent tak, že genom jednoho viru může být uzavřen v kapsidě nebo obalu druhého viru. Takto vzniklý pseudotyp



pak interaguje s receptorem prostřednictvím nově získaných povrchových virových proteinů a může transdukovat dříve nedostupné buňky. Pseudotypování se ve virologii stalo standardním nástrojem, pomocí kterého lze měnit, rozšiřovat nebo zužovat virový tropizmus pro experimentální účely a při vývoji OV ho využít ke směřování na nádorové receptory. Někdy může být výhodné vytvářet tzv. chimérické viry, u kterých je vyhovující stávající povrchová charakteristika zachována, ale je obohacena o nové vlastnosti (proteiny) z viru jiného. Toho se často využívá kupříkladu při míšení různých sérotypů virů, kdy vznikající kandidátní OV přichází o nežádoucí původní charakteristiky a kombinuje výhody obou mateřských kmenů. OV lze přesměřovat na nádorové receptory i pomocí sofistikovaných úprav kapsidových proteinů nebo obalových glykoproteinů. Hledáním v peptidových nebo protilátkových knihovnách byla objevena řada vysokoafinitních peptidových ligandů pro nádorové receptory nebo protilátky, které mohou být využity pro směřování léčiv a virů na nádorové receptory. Pomocí metod genového inženýrství lze tyto peptidy nebo jednořetězcové variabilní části (scFv) protilátek inkorporovat do povrchových struktur viru, a tím opět zvýšit transdukcii OV do vytipovaných nádorů [14]. Ligandy a scFv lze na virové částice pochopitelně připojit i chemicky, ale takový způsob je výrobně náročný a zatím se nedočkal u žádného OV klinického použití.

#### Transkripční cílení OV

Pro nádorové buňky je charakteristická nejen aberantní exprese povrchových molekul (které mohou OV využívat jako receptory), ale také celková deregulace signálních drah. To je spojeno s aktivací onkogenů a deaktivací nádorově supresorových genů, což vede k imortalizaci, extenzivní proliferaci, metabolickým změnám a k unikání buněk z imunitního dozoru. Všechny tyto fenomény lze při hledání kandidátních OV a jejich optimalizaci využít.

Příkladem může být konstrukce OV odvozených od adenovirů (Ad). Ad se dokáže pomnožit pouze v buňkách s nefunkčními klíčovými regulátory buněč-

ného cyklu, proteiny RB a p53, a proto Ad v normálních nenádorových buňkách využívají produkty svých genů *E1A* a *E1B* k jejich inaktivaci. Pokud jsou však v genomu Ad oblasti genů *E1A* nebo *E1B* uměle odstraněny, vznikne onkolytický Ad (oAd), který se může replikovat výhradně jen v nádorových buňkách, v nichž jsou výše zmíněné regulátory buněčného cyklu nefunkční. Takový přístup (odstranění části *E1B* genu) byl zvolen při konstrukci oAd ONYX-015, který úspěšně prošel klinickými zkouškami u nádorů s defektem v *p53* a po drobných úpravách se stal prvním schváleným OV v Číně. Na stejném principu jsou navrhovány oAd, které díky odstranění části genu *E1A* cílí na nádory s defektem RB [15]. Příkladem takového oAd je VCN-01 vyvíjený firmou VCN Biosciences, který je testován pro léčbu dětských retinoblastomů [16], ale i jiných nádorů, vč. rakoviny pankreatu a nádorů hlavy a krku. Variací tohoto přístupu je vložení nádorově specifického promotoru před oblast *E1A* a *E1B* genů. To způsobí, že takto upravený oAd začne produkovat klíčové regulační proteiny pouze v takových buňkách, kde je nádorově specifický promotor aktivován. Příkladem takového oAd je Telomelysin (OBP-301) – Ad, který má *E1A* a *E1B* oblasti pod kontrolou promotoru telomerázy. Zatímco po diferenciaci buněk exprese telomerázy v normálních buňkách utichá, většina nádorových buněk telomerázu exprimuje [17]. Telomelysin prochází I. a II. fází klinického testování v kombinovaných terapiích (NCT03921021, NCT04685499, NCT04391049).

#### Vyzbrojení OV

Kromě selektivní lytické replikace v nádorových buňkách je princip účinku OV založen na faktu, že OV mohou do jisté míry zvrátit imunosupresivní mikroprostředí nádoru. Dnes již víme, že jejich potenciál můžeme významně zvýšit, pokud je vyzbrojíme různými geny kódujícími imunomodulační molekuly, jako jsou cytokiny, chemokiny, BITE (bi-specific T cell engagers) – bispecifické protilátky aktivující T-lymfocyty, inhibitory imunitních kontrolních bodů, tumor specifické antigeny (TSA), inhibitory růstových faktorů nebo cílové molekuly T-lymfocytů

s chimérickým antigenním receptorem (CAR-T) [18,19].

**Cytokiny** jsou signalizační molekuly zprostředkující komunikaci mezi buňkami imunitního systému a jsou důležité pro regulaci přirozené a adaptivní imunity. V preklinických testech se ukázalo, že řada cytokinů má protinádorové účinky. Pro dosažení žádaného efektu v nádoru je však třeba použití vysokých dávek, a to bývá spojeno s významnou toxicitou. Řešením se stala lokalizovaná exprese cytokinů přímo v místě nádoru zajišťovaná OV vyzbrojenými geny pro cytokiny. Velmi často se pro konstrukci ozbrojených OV používají geny kódující lidský GM-CSF, geny pro interleukiny (IL)-2, IL-12, IL-1 nebo geny pro interferon (IFN)- $\alpha$ , IFN- $\beta$  nebo IFN- $\gamma$ . Řada těchto virů je v klinickém testování [19].

**Chemokiny** jsou malé solubilní proteiny sloužící jako chemické atraktanty pro leukocyty, a lze tedy předpokládat, že jejich intratumorální exprese zprostředkovaná kandidátním OV může významně přispět k přeměně imunologicky chladného nádoru v místo přitahující pozornost efektorových T-lymfocytů. Tento předpoklad byl experimentálně několikrát ověřen pro různé OV [18,19] a právě probíhá I. fáze klinických zkoušek ozbrojeného oAd NG-641, který exprimuje CXCL9, CXCL10 a IFN- $\alpha$ , ale také BITE navádějící T-lymfocyty na fibroblasty asociované s nádory (FAP-Tac BITE) (NCT04053283).

Právě díky expresi **BITE** je oAd NG-641 velmi zajímavý. BITE jsou konstruovány tak, že dvě tandemově uspořádané scFv oblasti strukturně oddělené flexibilním spojníkem propojují CD3 molekulu na povrchu T-lymfocytů a nádorový antigen na povrchu rakovinné buňky. BITE tedy dokážou navázat a aktivovat T-lymfocyty, které nenesou specifický T-buněčný receptor (T-cell receptor – TCR), a pro aktivaci není nutná exprese antigenů hlavního histokompatibilního komplexu (major histocompatibility complex – MHC) na cílových buňkách. Systémové podávání BITE je však stejně jako u cytokinů a chemokinů limitováno jejich krátkým poločasem rozpadu, a tedy nutností vysokých dávek spojených s nežádoucí toxicitou. Navíc je účinek pochopitelně omezen faktem,

že v solidních nádorech se obvykle aktivovatelné T-lymfocyty vyskytují jen v omezené míře, nebo vůbec. Lokální exprese BITE vyvolaná OV, které způsobují infiltraci nádorů T-lymfocyty, se tedy opět jeví jako velmi atraktivní strategie léčby. Dosud bylo publikováno několik studií s povzbudivými výsledky, které zkoušely pomocí BITE ozbrojit různé OV – virus vakcinie, Ad, virus spalniček a HSV-1 [20,21]. Virus NG-641 zmiňovaný výše je však dosud jediným příkladem použití tohoto konceptu v klinickém testování. Je zajímavé, že u tohoto OV se využívají BITE, které nejsou směřovány přímo na nádorové buňky, ale na buňky nádorového stromatu. NG-641 tak představuje multimodální agens, které způsobuje virolýzu nádorových buněk a iniciuje aktivaci endogenních T-lymfocytů, které atakují a likvidují stromální fibroblasty. Na vzorcích klinických biopsií bylo ověřeno, že tento OV způsobuje infiltraci nádoru PD1+ T-lymfocyty, které odstraňují fibroblasty, a celkově se ukázalo, že došlo k významné změně nádorového mikroprostředí [22]. Klinikou studii s NG-641 sponzoruje firma PsiOxus Therapeutics Ltd (UK), která se specializuje na OV ovlivňující nádorové mikroprostředí. Obecně lze konstatovat, že vývoj OV exprimujících terapeutické nebo imunostimulační protilátky se ukazuje jako velmi atraktivní strategie, která si již vysloužila samostatné pojmenování – viro-protilátková nádorová terapie [21].

Průlomem v imunoterapii nádorů se staly tzv. **inhibitory imunitních kontrolních bodů (immune checkpoint inhibitors – ICIs)**, což jsou monoklonální protilátky, které blokují inhibiční mechanismy aktivace T-lymfocytů. Nedávno se však ukázalo, že z léčby profituje pouze 20–40 % pacientů, kteří mají imunologicky „horké“ nádory [23]. Právě proto, že OV mají prokazatelně schopnost imunologicky senzitivovat nádory, nabízí se logická kombinace obou přístupů. V rámci klinických studií se zkouší podávat ICIs a OV separátně v různých schématech, ale zároveň vznikají i ozbrojené OV, které obsahují geny pro ICIs. Výsledky zatím naznačují, že tento přístup může být za určitých okolností účinnější než kombinovaná terapie [18].

Řada růstových faktorů (např. transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta – TGF-β), vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor – VEGF) nebo prostaglandin E2 – PGE2) vylučovaných nádory posiluje jejich imunosupresivní prostředí, a proto se kandidáty pro konstrukci ozbrojených OV staly také geny, jejichž produkty působí jako **inhibitory růstových faktorů**. Byl např. navržen Ad, který exprimuje receptor pro TGF-β, který vycytává dostupný TGF-β z prostředí. Také byl zkonstruován oAd, který exprimuje protilátku namířenou proti VEGF. Onkolytické účinky obou virů byly lepší než účinky rodičovských, neozbrojených variant [18].

Jedním z důvodů, proč rostoucí nádor uniká z dozoru imunitního systému, může být u některých nádorů nedostatečná **exprese nádorově specifických neoantigenů**, které by buňky imunitního systému aktivovaly. Teoreticky by tak šlo využít OV i pro vnášení TSA. S využitím onkolytického rhabdoviru Maraba exprimujícího modelový antigen se v experimentálním myším modelu ovariálního nádoru ukázalo, že je třeba hierarchicky kombinovat mnoho terapeutických zásahů (vakcinace, booster OV a následná blokáce PD-1 receptoru), aby byl tento přístup aspoň částečně úspěšný [24].

OV mohou být vyzbrojeny i **cílovými molekulami pro CAR-T buňky**. CAR-T jsou autologní T-lymfocyty, které se používají pro léčbu některých typů nádorů (lymfomů). Jsou připravovány metodami genového inženýrství tak, aby exprimovaly chimérický antigenní receptor (CAR) rozeznávající předem vybraný nádorový antigen [25]. Léčba několika preparátů, které využívají směřování CAR-T na CD19 marker B-lymfocytů, byla podmíněně schválena americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration – FDA) i Evropskou lékovou agenturou (European Medicines Agency – EMA). Použití přináší uspokojivé výsledky při léčbě B-lymfomů, ale ne při léčbě solidních nádorů. Důvodem může být fakt, že solidní nádory na rozdíl od B-lymfocytů neexprimují dostatečně nebo homogenně nádorové antigeny. Opět se tedy nabízí možnost využití OV právě pro zajištění exprese těchto antigenů v nádorech.

Léčba by tedy probíhala dvoustupňově – pacient by byl nejprve léčen pomocí ozbrojeného OV, který by podnítil expresi nádorových antigenů v nádoru, a posléze by byla aplikována léčba pomocí T-CAR buněk namířených proti tomuto antigenu. Zatím nejsou k dispozici klinická pozorování, která by potvrdila, že tento koncept funguje. Výsledky na myším modelu nádorů melanomu jsou však povzbudivé. Při využití OV vakcinie, který po infekci zajistil expresi CD19 molekuly v nádorových buňkách, se podařilo u myši pomocí T-CAR buněk namířených proti CD19 zvýšit medián celkového přežití (overall survival – OS) o 50 % oproti kontrolám [26].

#### **Použití OV pro systémové aplikace**

Původní myšlenka výhodnosti použití OV vyplývala z představy, že tyto viry bude možné aplikovat systémově (např. intravenózně) a díky přednostnímu tropismu pro nádorové buňky dojde následně k jejich akumulaci v nádorech i metastázách. V praxi se však tento teoreticky ideální způsob podávání OV (je minimálně invazivní a opakovatelný) neosvědčil. Ukazuje se, že biologická dostupnost viru v nádorech a jeho účinnost je při systémovém podání malá. Při intravenózním podání jsou OV vycytávány krevními buňkami, neutralizovány pre-existujícími protilátkami a komplementem, a navíc se obtížně dostávají z krevního řečiště do tkání, kde mohou být vycytávány nespecificky, např. v játrech, plicích a slezině [27]. V praxi se proto ve většině případů podávají OV lokálně, přímo do nádoru [28]. Existují však možnosti, jak některé z uvedených limitů překonat. Neutralizace viru díky preexistujícím cirkulujícím protilátkám je velkým problémem pro OV, které jsou odvozeny od virů, které se běžně vyskytují v lidské populaci (herpesviry, adenoviry) nebo se používají k vakcinacím (virus vakcinie, virus spalniček, poliovirus). Přesto se podařilo prokázat, že oAd jsou schopny i v přítomnosti těchto protilátek do určité míry infikovat primární nádor i metastázy [29]. Účinnost oAd, které se historicky připravovaly na platformě lidského Ad typu 5 nebo 3, které běžně cirkulují v populaci, lze zvýšit díky modifikacím, které využívají míšení kap-

sidových proteinů Ad z méně obvyklých sérotypů (existuje jich asi sto) nebo Ad zvířecích. Obecně je pseudotypování virů možností, jak tento problém zmenšit nebo obejít. Jinou možností je chemické pokrytí virových částic inertním štítem vytvořeným z polymeru (např. polyetylen glykolu) nebo lipidů, ale tento způsob komplikuje přípravu OV, není přenositelný na další generaci viru vznikajícího při samotné léčbě v nádoru, a hlavně jde proti smyslu transdukčního cílení viru na nádorové buňky. Řešením může být chytrá chemická strategie, např. použití štěpitelné spojky mezi polymerem a povrchem viru (virus se odhalí až v blízkosti nádoru) [30], nebo se použije bioaktivní polymer, který má schopnost vázat se na určité typy nádoru. Druhý způsob byl s velmi dobrými výsledky využit u oAd na hepatocelulárních nádorech [31]. Není bez zajímavosti, že obecně je o způsobech systémového šíření virové infekce velmi málo známo a má se za to, že na šíření viru na dlouhé vzdálenosti uvnitř organismu se podílí buněčné elementy (lymfocyty, dendritické buňky atd.) [32]. Atraktivní možností, jak zlepšit farmakokinetiku a biodistribuci OV je tedy použití nosičových buněk, jako jsou např. mezenchymální kmenové buňky [33].

### Výběr OV pro klinické využití

Mezi často používané **přirozeně onkolytické** viry (s možností dalších úprav) patří lidské orthoreoviry, lidské pikornaviry (coxsackievirus A21, virus dětské obrny – poliovirus – a v tkáňových kulturách objevený Seneca Valley virus – izolát SVV-001), paramyxoviry lidské (vakcinační kmen spalniček) i ptačí (NDV) nebo potkaní parvovirus H1. Experimentálně byly úspěšně použity také některé rhabdoviry (vezikulovirus Maraba nebo VSV) či živá atenuovaná vakcína proti viru Zika (ZIKV-LAV) (shrnutí v [7]).

V klinickém testování jsou však významně zastoupeny také **geneticky upravené viry**, hlavně oAd a OV odvozené od viru vakcinie a lidských herpesvirů [34].

Vývoj Ad vektorů pro různé aplikace probíhá dlouhodobě. Ukázalo se, že při správném použití mají vynikající bezpečnostní profil, jsou stabilní a lze je připra-

vovat ve vysokých titrech. Dnes jsou Ad genomy jednoduše manipulovatelnou genetickou platformou, na které lze navrhovat úpravy pro optimalizaci jejich použití pro genovou terapii, vývoj vakcín nebo rozvoj jejich onkolytického potenciálu [35]. V úvodu zmiňovaný preparát ONCOS-102 (dříve CGTG-102 nebo Ad5/3-D24-GMCSF), patří také mezi oAd. Může sloužit jako příklad praktické aplikace různých principů zvyšování účinnosti OV. ONCOS-102 byl vytvořen na kostře lidského Ad sérotypu 5 (Ad5), ale jeho kapsida je chimérou, protože nese vazebnou doménu sérotypu 3, čímž je eliminováno nebezpečí inaktivace viru preexistujícími protilátkami. V genomu ONCOS-102 byla do genu *E1A* zavedena delece 24 nukleotidů, která omezuje replikaci viru pouze na nádorové buňky (s defektem v pRB-p16 signalizaci). ONCOS-102 je ozbrojený virus – obsahuje gen pro GM-GSF, díky kterému dochází po aplikaci ke zvýšení protinádorové imunitní odpovědi [5].

Další velkou skupinu OV používaných v klinických studiích tvoří OV odvozené od viru vakcinie. Jedná se o poxvirus, který byl dlouhodobě používán jako očkovací látka v rámci programů eradikace pravých neštovic, a máme tedy k dispozici dostatečné údaje o jeho bezpečnosti. Stejně jako Ad byl i virus vakcinie historicky využíván jako virový vektor pro genové terapie, jeho manipulace jsou dobře zvládnutou technologií a zřejmě proto se stal oblíbenou platformou pro vývoj OV. Výhodou je velká kapacita pro vložení i několika transgenů [36].

Unikátní postavení mezi OV mají retrovirové replikativní vektory, které po infekci buňky nelyzují, ale integrují se do genomu hostitelského genomu a ustávají perzistentní infekci. Každá nádorová buňka s integrovaným genomem retroviru pak kontinuálně produkuje virové částice, které postupně infikují celý nádor. Replikativní retrovirové vektory pro klinické použití jsou odvozené od myšího leukemického viru (MLV). Tyto viry infikují pouze dělicí se buňky, proto jsou velmi selektivní pro nádorové buňky, neboť většina normálních buněk se nedělí. Onkolytické retrovirové vektory získávají onkolytický potenciál díky vyzbrojení unikátním transgenem, který

je někdy označován jako sebevražedný gen. Tento transgen má totiž enzymatickou aktivitu využívanou na přeměnu původně netoxických látek na toxická chemoterapeutika. Jde např. o gen pro cytosindeaminázu (CD), která přeměňuje netoxický 5-fluorocytosin (5-FC) („pro-drug“) na chemoterapeutikum 5-fluorouracil (5-FU). Nenádorové, a tedy OV neinfikované buňky tak nejsou v přítomnosti 5-FC ovlivněny, zatímco infikované buňky produkují CD a následkem přeměny 5-FC na 5-FU podstoupí „sebevraždu“.

### Schválené komerční přípravky pro onkolytickou viroterapii

Náročným schvalovacím procesem dosud celosvětově úspěšně prošly pouze čtyři preparáty OV. Jako první byl v roce 2004 schválen v Litvě preparát Rigvir pro léčbu a prevenci relapsu melanomů. Rigvir je obchodní název pro lidský echovirus 7 patřící do rodu *Enterovirus*, čeledě *Picornaviridae*. Rigvir je přirozeně onkolytický virus, nebyl geneticky upraven, ale byl adaptován na růst v melanomech. Je registrován pro použití v Litvě, Gruzii, Arménii a Uzbekistánu [37]. Rigvir se uchází i o schválení EMA [38]. V roce 2019 byla registrace Rigviru v Litvě pozastavena kvůli nesrovnalostem při kontrole kvality distribuované šarže [39]. Není známo, zda byla registrace obnovena, ale společnost Rigvir na svých webových stránkách uvádí, že podepsala licenční smlouvu o vývoji, registraci a prodeji léku Rigvir v zemích Společenství nezávislých států.

Druhým OV, schváleným v Číně v roce 2005, byl geneticky upravený adenovirus uvedený na trh pod názvem Oncorine (H-101). Oncorine byl vyvinut na platformě Ad5 firmou Shanghai Sunway Biotech Co. Ltd. Genetické úpravy spočívaly v zavedení delecí do dvou virových genů (*E1B* a *E3*) a tím bylo dosaženo žádoucí selektivity replikace viru pouze pro nádorové buňky s defektem v genu *p53* (viz výše). Na stejném principu byl dříve v USA vyvíjen oAd ONYX-015, na který koupila firma Shanghai Sunway Biotech Co. Ltd. všechna licenční práva. Oncorine je schválen pro léčbu nádorů hlavy a krku v kombinaci s chemoterapií a v současné době probíhají klinické testy přípravku Oncorine i v řadě dalších indikací [40].



Třetím oficiálně schváleným OV byl talimogene laherparepvec (T-VEC; Imlygic™) vyráběný firmou Amgen Inc. Byl schválen pro léčbu recidivujícího maligního melanomu v roce 2015, a to jak FDA, tak EMA. Jde o geneticky upravený klinický izolát (kmen JS1) viru HSV-1, z jehož genomu byly odstraněny geny pro faktory neurovirulence (*ICP34.5* a *ICP47*). Odstranění genu *ICP34.5*, který je nutný pro překonání antivirové obrany v normálních buňkách, zároveň zajistilo selektivitu množení T-VEC v buňkách nádorových, kde jsou mechanismy antivirové signalizace defektní. Do genomu viru byla dále vložena kazeta s genem kódujícím GM-CSF s cílem navodit systémový protinádorový efekt. Klinickými zkouškami prošel T-VEC ještě pod označením OncoVEXGM-CSF (BioVex Ltd, Abingdon, UK) [41,42]. Schválení T-VEC pro léčbu melanomu vedlo k jeho extenzivnímu klinickému testování i pro další druhy nádorů (nádory gastrointestinálního traktu, nádory prsu, mozkové nádory), a to jak v monoterapii, tak v kombinované terapii s další protinádorovou léčbou [19].

Posledním OV, který byl v roce 2021 schválen pro použití v experimentální léčbě nádorů mozku v Japonsku, je geneticky upravený HSV-1 dostupný pod názvem DELYTACT (teserpatu-*rev/G47Δ*). Byl vytvořen na kostře vektoru G207, který má odstraněné obě kopie genu *ICP34.5* a inaktivovaný gen *UL39* kódující ICP6, velkou podjednotku virové ribonukleotidyl reduktázy, bez které se virus dokáže replikovat pouze v nádorových buňkách. DELYTACT má však ještě další mutaci v genu *a47*. Tento gen kóduje inhibitor transportéru zajišťujícího prezentaci antigenů na MHC-I receptorech. Tento inhibitor dovoluje za normálních okolností snížit imunitní odpověď proti infikovaným buňkám, ale odstranění genu pro *a47* v OV je přínosné v tom smyslu, že významně stimuluje lymfocyty infiltrované v nádoru. Navíc tato delece způsobuje, že se celkově zvyšuje replikace takto modifikovaného viru. V preklinických testech se ukázal tento vektor jako bezpečný a vykazoval robustní protinádorovou účinnost. Klinické studie poskytly velmi uspokojivé výsledky při léčbě glioblastomů.

V současné době se zkouší i pro léčbu nádorů prostaty, okulárních neuroblastomů a maligního pleurálního mezoteliomu. Experimentálně se virus zkouší i v kombinaci s ICIs [43,44].

### Klinické použití OV u konkrétních nádorů

Výskyt nádorových onemocnění není zdaleka rovnoměrný a liší se v mnoha směrech, nejen podle populací nebo věku pacientů a jejich pohlaví, ale mění se i v průběhu let. Pro náš účel, tj. seřazení informací, si vystačíme s údaji z platformy GLOBOCAN 2012 [45], kde u mužů jsou nejčastějšími nádory prostaty a u žen nádory prsu. U mužů pak následují plíce, kolorektum a močový měchýř, u žen kolorektum, plíce a děloha. Proto i v našem souboru budou na prvních místech a ostatní typy budou následovat již bez ohledu na jejich světovou prevalenci. V předkládaném přehledu jsou ovšem hodnoceny nejen další typy nádorů podle pohlaví a věku pacientů, ale i doplňující faktory. A přestože již do roku 2017, jak uvádí Lawler [46], bylo publikováno 40 klinických studií zabývajících se viroterapií nádorových afekcí, rozšířil se zájem o tento léčebný přístup až v posledních letech.

### Nádory prsu

Na prvním místě se věnujeme nádorům prsu, u kterých je již relativně dlouho známo rizikové genetické pozadí a je vypracován preventivní program vyšetření. Na základě molekulární analýzy se podařilo vytvořit pět nádorových skupin, které se liší mírou exprese estrogenového receptoru (ER), progesteronového receptoru (PR) a receptoru pro epidermální růstový faktor 2 (human epidermal receptor 2 – HER2). To dává možnost zaměřovat léčbu OV jak pomocí transdukčního (přes HER2), tak transkripčního (exprese ER, PR) cílení, i když arzenál používaných OV k léčbě nádorů prsu obsahuje i přirozeně onkolytické viry (např. reoviry). Jak zmiňují ve své práci Chaurasiya s Fongem [47], lze nádory klasifikovat na tzv. normální (breast-like), lumenální A (HER2–), lumenální B (mohou být HER2+ i HER2–), HER2+ / ER– a bazální (basal-like). Nádory bazálních buněk,

které postrádají expresi všech tří receptorů, spadají do kategorie tzv. triple-negativních nádorů (triple negative breast cancer – TNBC). Přesto mohou být TNBC vhodným terémem pro onkolytickou terapii, protože imunogenita TNBC je vyšší než u non-TNBC typů. V klinickém testování pro tento typ nádorů je reovirus, ale i preklinické studie na myším modelu nádoru s oAd přinášejí v kombinaci s ICIs velmi dobré výsledky [48]. Autoři srovnávali účinek oAd, který je transkripčně cílen na nádory pomocí telomerázového promotoru a zároveň byl v jedné variantě ozbrojen GM-CSF. Podle očekávání se ukázalo, že terapeutický efekt ozbrojeného viru je mnohem silnější, ale zároveň byla potvrzena předchozí pozorování, že OV může zvýšit expresi inhibičních receptorů na povrchu infiltrujících T-lymfocytů. Proto by kombinace OV a ICIs mohla vést k významnému zlepšení prognózy nejen u triple-negativního typu nádoru prsu [49].

Obecně jsou nádory prsu jedním z nejčastěji studovaných systémů pro testování účinku OV v preklinickém výzkumu i v klinických studiích [47]. K dispozici jsou výsledky 18 publikovaných klinických studií se 14 různými variantami OV odvozenými od pěti virů (viru vakcinie, reoviru, Ad, NDV a HSV-1). Většinou jde o studie v I. fázi testování, a tak dosud není možno učinit jasné závěry ohledně účinnosti této léčby [50]. Do II. fáze testování pro metastazující nádory prsu se dostal zatím pouze výše zmíněný onkolytický reovirus (pelareorep/Reolysin). První publikovaná data porovnávala intravenózní podávání reoviru v kombinaci s paklitaxelem oproti monoterapii paklitaxelem na metastazujícím nádoru prsu u 74 pacientek (NCT01656538). Ukázalo se, že OS se zvýšilo o 7 měsíců u kombinované terapie oproti monoterapii, ale bohužel nedošlo ke zlepšení v primárně sledovaném ukazateli – přežití bez progresu (progression free survival – PFS) [51]. V současné době probíhají s reovirem v kombinované terapii další tři studie II. fáze (u metastazujících nádorů (ER, PR+ / HER2–, NCT04102618 a NCT04215146) a u TNBC (NCT04445844)) a bude zajímavé sledovat, jaké přinesou výsledky. Některé stu-



die II. fáze nejsou primárně cíleny na léčbu nádoru prsu, ale pacienty s těmito typy nádorů v malém počtu zahrnují. Testují účinky preparátů talimogene laherparepvec (T-VEC; Imygit<sup>TM</sup>) odvozeného od HSV-1 a dvou OV odvozených od virů vakcinie: preparátů pexastimogene devacirepvec (Pexa-Vec, JX-594) a TBio-6517. Jedná se o ozbrojené OV, první dva exprimují GM-CSF a TBio-6571 protilátku proti CTLA4 a IL-12.

Pro některé typy luminálních nádorů (až u 60 % pacientů s nádory prsu) je překvapivě charakteristická exprese receptoru  $\alpha$ GR1 pro neurotropní faktor odvozený z glie (glial cell-derived neurotrophic factor – GDNF). Exprese  $\alpha$ GR1 není detekovatelná v běžných nenádorových buňkách, a proto se podařilo navrhnout a vyvinout OV odvozený od HSV-1, který byl kompletně přeměrován na  $\alpha$ GR1 pomocí peptidu odvozeného z GDNF1. Tento OV se replikoval výhradně v nádorových buňkách a způsoboval regresi nádorů u myšičího modelu. Do budoucna může nabízet zajímavou léčebnou možnost [52].

### Nádory prostaty

Nádory prostaty jako nejčastější nádorové onemocnění u mužů patří mezi tzv. chladné nádory (cold tumors) s relativně nízkým výskytem mutací [53]. Označení souvisí s tím, že jejich přítomnost nevyvolává zánětlivou reakci a pochopitelně ani významnou reakci imunitní [54]. Nádory nejsou infiltrovány T-lymfocyty, chybí signatura interferonu I, ale naopak jsou přítomny imunosupresivní buňky. Prvotními příčinami jsou patrně ztráta mašinerie prezentace (neo)antigenů v systému MHC I. třídy [55] a defekty dendritických buněk, jinými slovy je na mnoha místech poškozen proces imunitní odpovědi. Od těchto defektů se proto odvíjí snahy o převedení tumorů prostaty z „chladných“ mezi „horké“, tzn. vyvolávající zánětlivý proces. Tomuto problému se např. velice zevrubně věnují práce [56] zabývající se vstupem T-lymfocytů do nádorové tkáně a s tím souvisejícího spuštění protinádorové imunitní odpovědi. Na rozdíl od chronického zánětu, který spíše podporuje nádorový růst [57], úspěšnost tohoto směru léčby vyžaduje vyvolání akutního

zánětu k aktivaci mnoha signálních drah, prozánětlivých cytokinů a chemokinů a celé řady dalších faktorů. Ve srovnání s ostatními solidními nádory a navzdory komplikovanému imunologickému terénu poskytlo použití protinádorových vakcín u nádoru prostaty poměrně slibné výsledky, což kontrastuje s nepříliš úspěšnou odezvou na léčbu pomocí ICI s [58]. Důvodem je fakt, že nádory prostaty exprimují hned několik unikátních TSA potenciálně rozeznávaných cytotoxickými T-lymfocyty, např. charakteristický prostatický specifický antigen (PSA). Na druhou stranu je pro některé skupiny nádorů prostaty charakteristická nízká hladina PD-L1 [58]. Vysoká heterogenita charakteristik nádorů prostaty bude v budoucnu pravděpodobně vyžadovat personalizovaný přístup i v imunoterapii [59]. V tomto ohledu je velmi zajímavá analýza transkriptomu nádorů prostaty, která identifikovala pět pro výsledek léčby rozhodujících genů (*S100A2*, *NOX1*, *IGHV7-81*, *AMH* a *AGTR1*) účastných v imunitní odpovědi [60].

Díky široké škále možností imunitní stimulace a potenciálu indukovat vznik „horkých“ nádorů se OV staly logickou volbou pro preklinické i klinické testování v různých kombinacích [54,59]. K dispozici je zatím jen velmi málo dat o účinnosti OV [58,59]. Výjimkou je II. fáze klinické studie s reovirem (pelareorep/Reolysin). Ten byl testován v kombinaci s docetaxelem a prednisone u pacientů s metastatickým karcinomem prostaty (metastatic castration resistant prostate cancer – mCRPC), kde se bohužel ukázalo, že reovirus nepřinášel pacientům žádný klinický prospěch [61]. Důvodem může být suboptimální nastavení kombinované léčby. V preklinických testech byl reovirus schopen indukovat infiltraci nádoru imunitními buňkami a zároveň zvyšovat expresi receptorů imunitního regulátoru B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA), které jsou nezbytné pro optimální rozvoj protinádorové imunitní paměti. Nicméně pouze kombinace reoviru a ICI s (anti-PD-1 nebo anti-CD73 protilátkou) dokázala významně zvýšit přežívání myši s indukovaným prostatickým nádorem [53]. Klinické testování reoviru v kombinaci

s ICI však v současné chvíli u nádorů prostaty neprobíhá (u nádoru pankreatu bylo zastaveno pro nedostatek pacientů (NCT03723915)). Probíhá však u preparátu PROSTVAC. PROSTVAC je častěji označován za dvoudávkovou (V + F) protinádorovou vakcínu, ale jedná se o kombinaci dvou geneticky upravených „živých“ virů: PROSTVAC-V (rilimogene galvacirepvec) je replikačně kompetentní virus vakcinie a PROSTVAC-F (rilimogene glafolivec) je virus drůbežích neštovic (fowlpox), který se v lidských buňkách nereplikuje. Oba viry exprimují v cílových buňkách PSA spolu s triádou kostimulačních molekul: ICAM-1 (CD54), B7.1 (CD80) a LFA-3 (CD58) (tzv. TRICOM). Prvotní studie ukázaly velmi povzbudivé výsledky, léčba mCRPC byla dobře tolerována a spojena se 44% snížením úmrtí [62]. Následná placebem kontrolovaná studie III. fáze (PROSTVAC vs. PROSTVAC + GM-CSF vs. placebo) bohužel tento výsledek nepotvrdila a léčba neprodloužila OS ani neovlivnila progresi nádorů ve sledované době 6 měsíců [63]. Imunoterapie nádorů prostaty pravděpodobně vyžaduje při léčbě kombinovaný přístup a monoterapie nebývá úspěšná [54], proto bude velmi zajímavé sledovat, jak dopadnou probíhající studie II. fáze PROSTVACu s nivolumabem (anti-PD-1) (NCT02933255), s kombinací nivolumab/ipilimumab (anti-CTLA-4) (NCT03532217) nebo s anti-PD-L1/TGF- $\beta$ RII BITE (NCT03315871).

### Nádory zažívacího traktu

Nádory gastrointestinálního traktu jsou spojeny s 35 % všech úmrtí na rakovinu. Zhu a Liu [64] uvádějí, že celosvětově bylo v roce 2018 hlášeno 4,8 mil. nových pacientů s touto diagnózou, což opět celosvětově představovalo cca 25 % všech nádorů. Přehledový článek [64] je vybaven více než 300 citacemi a uvádí různé typy nádorů, které se v této oblasti odborného zájmu vyskytují, vč. použitých diagnostických přístupů a léčby založené na imunoterapii a OV. Významu pochopitelně nabývají metody založené na molekulární diagnostice. To je výhodné, neboť detailní identifikace genotypu nádorových buněk může být pro úspěšnost viroterapie klíčová díky možnosti přesného a individuálního zacílení OV.

Navíc mezi zjištěním molekulární výbavy nádoru a nastavením léčby by neměla být příliš dlouhá prodleva, protože v některých případech může být mutabilita nádorového genotypu vysoká, což způsobuje změny citlivosti k léčbě a rezistence [65,66]. Většina prací se zaměřuje na podporu protinádorové imunity, kterou s sebou přináší právě OV. Možnost využití OV lze ilustrovat na příkladu metastazujícího kolorektálního karcinomu s mikrosatelitovou stabilitou, která je charakteristická pro přibližně 95 % těchto nádorů [67]. Autoři upozorňují, že u metastazujících tumorů je tato stabilita obvykle spojována s malou reakcí na monoterapii ICIs kvůli nízké mutabilitě v nádorové tkáni a přítomnosti imunosupresivního mikroprostředí. V práci jsou porovnávány různé strategie k překonávání těchto problémů omezujících účinnost monoterapie. První klinické testy I. a II. fáze se objevily již po roce 2005 a sledovaly účinek intraarteriálního podání onkolytického HSV-1 NV1020 s následnou chemoterapií 5-FU na kolorektálním karcinomu s jaterními metastázami. U 50 % pacientů došlo ke stabilizaci jaterních metastáz a jednoleté přežití činilo 47,2 %. Autoři předpokládají, že díky OV došlo také ke zvýšení citlivosti k následné chemoterapii a plánují další stadia klinického testování [68]. Zlepšení výsledků by pravděpodobně mohla přinést i strategie, která umožní lepší replikaci viru v průběhu léčby. Takovou možnost ve své práci u upraveného NV1020 na modelu nádorů žaludku naznačují Hu et al [69]. Ukázali, že propranolol, který je nespecifickým  $\beta$ -blokátorem, zvyšuje produkci viru díky tomu, že reguluje protivirový stav zprostředkovaný STAT3-PKR dráhou. Tato kombinovaná léčba byla mnohem efektivnější než podání viru samotného.

Podrobný přehled o imunoterapii, vč. imunoviroterapie, u hepatobiliárních karcinomů viz [70]. Výsledky II. fáze klinických studií zatím nejsou k dispozici. Studie s preparátem Pexa-Vec (pexas-timogene devacirepvec) v kombinaci s protilátkou nivolumab dosud nebyly publikovány a sponzor uvádí, že studie byla zastavena na základě nepříznivých výsledků pilotních testů této léčby.

U pokročilých solidních nádorů v současné době probíhá několik studií I. a II. fáze s preparátem OH2, což je OV odvozený od HSV-2 (kmene HG52), který byl upraven podobně jako T-VEC (odstranění genů *ICP34.5* a *ICP47*, plus vložení genu pro GM-GSF (přehledně o HSV vektorech [34]). V preklinickém testování na nádorech tlustého střeva vykazoval OH2 skvělé výsledky: indukoval silnou protinádorovou imunitní odpověď, zamezoval znovuobjevení nádorů a inhiboval vznik metastáz. Průběžné klinické hodnocení dat u pacientů s metastazujícím nádorem jícnu a rekta naznačuje, že podávání OH2 dlouhodobě indukuje příznivou změnu nádorového mikroprostředí (obohacení CD3+ a CD8+ T-lymfocytů), ale také expresi PD-L1. Proto byl OH2 podáván intratumorálně samostatně nebo v kombinaci s anti-PD-1 protilátkou. U pacienta s metastazujícím nádorem rekta se ukázalo, že injekce OH2 do jediné z mnohočetných jaterních metastáz vedla k redukci velikosti i u ostatních metastáz. U pacienta s nádorem jícnu byla pozorována regrese metastatické uzliny po ukončení léčby. Celkově příznivé výsledky podpořily další klinické testování OH2 (samostatně i v kombinaci s protilátkou anti-PD-1) jako monoterapie i jako kombinované terapie [71].

Pacienti s rakovinou jícnu byli zařazeni i do multicentrické studie III. fáze, která předcházela schválení oAd Onco-rine (H101) v Číně [72] (viz nádory hlavy a krku). V současné době probíhá II. fáze studie s oAd, Telomelysinem (OBP-301) v kombinaci s anti-PD-1 protilátkou (Keytruda/pembrolizumab) u pacientů s adenokarcinomy jícnu a žaludku (NCT03921021).

### Nádory plic

Nádory plic v podobě malobuněčné (small cell lung cancer – SCLC) a nemalobuněčné (non-small cell lung cancer – NSCLC) patří mezi nejčastější smrtící typy nádorů, ale také mezi nádory s nejbohatším výzkumem uplatnění OV. Přehled o výzkumu využívajícího buněčné linie, pokusná zvířata (humanizované myši), ale i klinické studie najdeme v rozsáhlé práci Ekekeho et al [73].

Výsledky klinických studií hodnotících účinnost (většinou kombinované) léčby

jsou u těchto typů nádorů poměrně povzbudivé. U pacientů s metastazujícím nebo rekurentním NSCLC se ukázalo, že histologická odpověď na kombinovanou léčbu paklitaxelem, karboplatinou a onkolytickým reovirem (Reolysin) byla mnohem vyšší (31 %) než u léčby paklitaxelem a karboplatinou (20 %).

Placebem kontrolovaná studie zaměřená na hodnocení přínosu léčby pomocí preparátu NTX-010 jako monoterapie u pokročilých stadií SCLC (bez progresu po léčbě platinou) bohužel dopadla hůře. NTX-010 je přirozeně onkolytický pikornavirus Seneca Valley virus. U pacientů nedošlo po léčbě ke zlepšení (sledovaný parametr PFS) a studie byla předčasně ukončena [74].

V současnosti probíhají nebo jsou plánovány II. fáze testování OV v kombinaci s další terapií pro několik OV. Využití konceptu dopravy „sebevražedného“ genu pomocí oAd bylo již testováno u různých typů nádorů [75] a u pacientů s SCLS a TNBC se nyní testuje oAd ADV/HSV-tk, který nese transgen pro tymidinkinázu HSV-1, a to v kombinaci s valacyklovirem a anti-PD-1 protilátkou (NCT03004183). Čeká se na výsledky studie u pacientů s pokročilými solidními nádory vč. SCLS, kde se testuje preparát BT-001, což je OV vakcinie, který kóduje anti-hCTLA4 protilátku a GM-CSF (NCT04725331). U stejných typů nádorů navazuje na povzbudivou I. fázi [76] II. fáze testování OV VSV-IFN $\beta$ -NIS (NCT03647163). Jedná se o upravený VSV, který kóduje lidský IFN- $\beta$  a thyroideální sodíko-jodidový symportér (sodium iodine symporter – NIS) [77]. Vnášený IFN- $\beta$  je podkladem nádorové selektivity tohoto OV, protože stimuluje antivirovou odpověď v normálních buňkách a dovoluje množení viru pouze v buňkách nádoru s porušenou interferonovou signalizací. NIS dovoluje sledovat šíření viru v organismu po podání radioaktivně (např. <sup>99m</sup>Tc) značených látek pomocí tomografické scintigrafie.

Zajímavý přístup vnášení TSA do nádoru testuje studie, která využívá dvousložkovou „vakcínu“ Ad/MAGEA3, MG1-MAGEA3 u pacientů s SCLS (NCT02879760). Léčba spočívá v intratumorálním podávání nereplikujícího se Ad5, který exprimuje TSA MAGE-A3. Následně

je intravenózně podáván OV Maraba, který taktéž exprimuje MAGE-3. MAGE-A3 (melanoma associated antigen A3) se aberantně exprimuje pouze na nádorových buňkách, hlavně u melanomů a nádorů plic [78]. U neoperovatelných nádorů pleurálních mezoteliomů se testuje oAd ONCOS-102 v kombinované terapii (NCT02879669).

Práce Ekekeho et al [73] zmiňuje závěrem perspektivy klinické aplikace OV. Autoři upozorňují na konstrukty schválené pro klinické užití a za nejvýhodnější považují kombinaci OV s ICIs. Pozitivní význam jejich vybavením schopností podporovat imunitní protinádorovou reakci prokazuje celá rovněž řada dalších prací, recentně např. Shi et al [79], s tím, že tuto problematiku je nutno chápat v celé komplexnosti nádorového mikroprostředí [80,81]. V této souvislosti stojí za pozornost kazuistika Zhanga et al [82], který použil oAd5 (Oncorine) společně s nivolumabem a anlotinibem a dosáhl celkového zlepšení a stabilizace pacientova stavu.

V oblasti působení OV u plicních novotvarů stojí za zmínku práce, která se věnovala analýze mikroRNA (miRNA). Vliv této zatím nepříliš studované součásti lidského genomu se stal zajímavým pro Lianga et al (2021) [83], kteří zjistili, že miRNA-204 může být ve svém nádorově supresivním účinku vhodně kombinována s onkolytickým NDV virem. Zevrubnější přehled o účinku molekul miRNA na různé typy plicních novotvarů najdeme v práci Alvanegha et al (2021) [84]. V této práci, která analyzovala účinky různých OV (a nanočástic), identifikovali autoři několik typů miRNA (kromě uvedené miRNA-204 také miRNA-let-7, miRNA-34a, miRNA-130a a miRNA-145), jejichž změny v expresních profilech mohou být ukazatelem úspěšnosti protinádorové léčby.

### Nádory nervové soustavy

Gliom jako typický nádor centrální i periferní nervové sítě má na rozdíl od ostatních tkání zvláštní postavení v tom, že je chráněn od přímého kontaktu s krevními buňkami hematoencefalickou bariérou. Tím v zásadě mění podmínky pro uplatnění imunitních procesů, které by mohly zasahovat do nádorových pro-

cesů, mimo jiné také reagovat na vznikající neoantigeny. I přes tuto nepříznivou skutečnost jsou OV slibnou možností pro léčbu maligních gliomů.

Mezi gliomy je nejčastější a nejmaligntnější glioblastom. Glioblastomy mají velmi špatnou prognózu, zvláště reziduální nebo rekurentní formy, pro které zatím není dostupná žádná účinná standardní léčba. Agregovaná data z klinických studií s použitím standardních postupů zahrnujících resekci nádoru a kombinace chemoterapeutických přístupů uvádějí pro rekurentní glioblastomy medián OS 5 měsíců a medián PFS 1,8 měsíce [85]. Hledání účinných nových přístupů léčby je tedy urgentní a zahrnuje použití OV. Zatím nejúspěšnějším příkladem je výše zmíněný preparát DELYTACT (teserpaturev/G47Δ), který byl v Japonsku schválen ve zrychleném režimu po získání velmi povzbudivých výsledků z klinické studie II. fáze (UMIN000015995) [86]. Ta zahrnovala 19 pacientů s reziduální nebo rekurentní nemocí po předchozí radiční léčbě v kombinaci s temozolomidem. Pacientům byl G47Δ podáván opakovaně v šesti dávkách přímo do nádoru (pomocí stereotakticky naváděných injekcí pod kontrolou magnetické rezonance). Procento přežití po 1 roce od zahájení podávání OV bylo 84,2 %, což přesáhlo cílový parametr a studie byla předčasně ukončena. Medián OS byl 20,2 měsíce od zahájení onkolytické léčby a 28,8 (interval 20,1–37,5) měsíce od prvotního chirurgického odstranění nádoru. Pro léčbu bylo typické, že po každém podání OV došlo ke zvětšení nádorové léze (hodnoceno pomocí magnetické rezonance), což neodráželo pseudoprogresi, ale imunoprogresi, tj. infiltraci buněk imunitního systému do nádoru, jak bylo následně potvrzeno v biopsiích. U sedmi pacientů došlo později (po 9–12 měsících od poslední dávky viru) ke zmenšení nádoru. Celková odpověď na léčbu po 2 letech zahrnovala částečnou odpověď u jednoho pacienta a stabilní nemoc u 18 pacientů. Jednoznačně povzbudivé výsledky vedly ke schválení preparátu jako „gene therapy product“. Data z klinické praxe v Japonsku zatím nejsou dostupná, ale plánuje se, že všichni pacienti, kteří budou lé-

čeni komerčně dostupným preparátem DELYTACT, budou registrováni a data budou v následujících 7 letech vyhodnocována ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů podstupující standardní léčbu.

Při léčbě rekurentních maligních gliomů byla vyzkoušena strategie vnašení sebevražedného genu. Retrovirus (odvozený od MLV) s názvem Toca 511/AC3-yCD2 (vocimagene amiretrorepvec) nesoucí gen pro CD v kombinaci s „pro-drug“ složkou 5-FC (Toca-FC) získal v roce 2015 od americké FDA speciální status „orphan drug“ usnadňující klinické testování [87]. Při léčbě byl nádor nejprve infikován OV Toca-511 a poté zaléčen Toca-FC. Díky lokální produkci CD vznikal v nádorech 5-FU, který zabíjel nádorové buňky a vedl k aktivaci antigen prezentujících buněk a T-lymfocytů. Zároveň zde fungoval i „bystander efekt“, kdy 5-FU uvolňovaný z nádoru eliminoval těsně přilehlé imunosupresivní myeloidní buňky a makrofágy asociované s nádorem, čímž potlačoval imunosupresivní mikroprostředí nádoru. Po velmi úspěšných prvotních fázích vstoupil Toca 511/AC3-yCD2 do III. fáze klinického testování s > 400 pacienty. Virový vektor s genem pro CD (Toca 511) byl injikován při operačním odstranění nádoru do dutiny po jeho resekcii a 5-fluorocytosin (Toca FC) začal být pacientům podáván perorálně po dobu 7 dní, a to 6 týdnů po operaci [88]. I přes původně velmi povzbudivé preklinické výsledky skončila tato studie neúspěchem a testy byly zastaveny [89].

V současné době se pro léčbu gliomů ve II. fázi klinicky testují OV (většinou v kombinované terapii) odvozené od HSV1 (G207; M032/NSC 733972), Ad (DNX-2401; Delta24-RGD; ICOVIR-5), od polioviru (PVSRIP0) a viru vakcinie (TG6002). Do palety testovaných virů přibyl např. potkaní H1 parvovirus (H1-PV), který je také testován pro léčbu glioblastomu, karcinomu pankreatu a dalších nádorů [90]. Pro léčbu rekurentních gliomů se zkoušela také vnitronádorová infuze reoviru, která byla pacienty dobře snášena, a u některých z nich byl zjištěn i protinádorový účinek [91]. Přehled o klinických studiích s použitím celé pa-



lety virů najdeme v přehledové práci Carpentera et al [92].

### Nádory vaječníků

Klinické studie zaměřené na léčbu pomocí reovirů (preparát Reolysin/pelareorep) u nádorů vaječníků započaly před 12 lety, ale jejich první výsledky nebyly příliš povzbudivé [93]. Výzkum na tkáních a pokusných zvířatech přinášel nadějnější výsledky spíše u vakcín [94] než při použití virové onkolýzy [95]. De Queiroz et al [95] si všimli, že nádorové buňky vaječnicku jsou často defektní v systému interferonové stimulace vrozené imunitní reakce, což je činí specificky citlivými k infekci OV s DNA genomem (např. onkolytické HSV-1). Podobně vyzněla i studie provedená s králičím poxvirem, myxoma virem, k jehož vnesení do nádorové tkáně byly použity kmenové nervové buňky [96]. Při léčení nádorů vaječnicků se uplatňují již tolikrát zmiňované adenoviry a experimentálně je stále co vylepšovat [97]. V citované práci byl nasměrován jejich účinek proti zvýšené expresi genu *MUC16*, jehož konečným produktem je protein CA-125, který je ve zvýšené míře nalézán cca u 80 % pacientek s nádory ovarii. Do genomu adenoviru byl po odstranění E1A promotoru adenoviru vložen fragment z promotorové oblasti genu *MUC16*. Takto upraveným oAd byly léčeny myši, kterým byly peritoneálně inokulovány nádorové buňky pacientek. Ukázalo se, že transkripční cílení oAd na *MUC16* gen bylo funkční a oAd se replikovaly výhradně v nádorových buňkách, nikoliv v buňkách normálních, což vedlo autory k přesvědčení, že jde o přístup vhodný k ověření pokračujícím výzkumem.

Další autoři použili chimérický pseudotypovaný VSV obsahující glykoproteiny odvozené od nepříbuzného viru horečky Lassa [98]. U vzniklého konstruktu LASV-VSV byl zásadně snížen virový neurotropismus typický pro VSV a zároveň se posílila schopnost viru rozeznávat  $\alpha$ -dystroglykan, který je nadměrně produkován v ovariálních nádorech a slouží jako virový receptor pro virus horečky Lassa. Pokusem na myších (s vymizelou imunitní reakcí) autoři prokázali, že ve srovnání s léčením chemoterapií, kdy dochází jen k částečnému

omezení růstu nádorových buněk, po intraperitoneálním podání jedné injekce virových částic LASV-VSV byly selektivně zahubeny buňky ovariálního nádoru. K podobnému výsledku došli i při mozkové aplikaci cílené na likvidaci metastazujícího ovariálního nádoru v mozku. Tato práce prokázala úspěšnost strategie transdukčního cílení při vývoji OV a LASV-VSV se stal zajímavým kandidátem pro testování jeho aplikace i na lidskou problematiku. Zajímavou možností může být i použití dosud „nevyzkoušených“ virů, jako jsou spumaretroviry, které navozují nikoliv lýzu, ale fúzi infikovaných buněk. Ukázalo se, že šimpanzí spumaretrovirus dokáže infikovat řadu nádorových buněčných linií, snižovat jejich životaschopnost, zastavovat růst intraperitoneálních ovariálních nádorů *in vivo* a prodlužovat dožití experimentálních zvířat [99].

Přestože výsledky klinického testování zatím byly publikovány jen v omezené míře [93,100,101], určitě se k pacientkám s nádory vaječnicků onkolytická virová léčba dostane v nejbližší budoucnosti. V současnosti je ve II. fázi testování u nádorů vaječnicků několik OV odvozených od viru vakcinie (GL-ONC; JX-594), viru spalniček (MV-NIS) a oAd (LOAd703).

### Nádory varlat

Poměrně recentní přehled léčebných postupů u nádorů varlat poskytuje práce Chieffio et al [102]. Autoři zmiňují, že mezi řadu dosud používaných prostředků při léčení nádorů vycházejících z kmenových buněk varlat, např. seminomů, by mohla vstoupit terapie pomocí OV, jmenovitě pomocí reoviru (pelareorep). Zatím však žádná klinická studie s použitím OV u nádorů varlat nebyla publikována a z dostupných materiálů se zdá, že firma Oncolytics Biotech Inc. si patentovala použití reoviru spíše pro *ex vivo* odstraňování nádorových buněk při autologních transplantacích [103,104].

### Nádory kůže

Uplatnění OV virů u kožních afekcí bylo jednou z prvních testovaných možností a pochopitelně se týkalo melanomu. Právě pro léčbu tohoto nádoru bylo v roce 2015 schváleno (v USA i EU) použití upraveného viru HSV-1, který

byl ozbrojen genem kódujícím GM-CSF. Dnes je virus prodáván pod názvem Imlygic<sup>TM</sup> (talimogene laherparepvec/T-VEC) [105]. Klinická bezpečnost a účinnost byla testována v rámci mezinárodní studien označované jako OPTiM nebo 005/500 (NCT00769704), ve které byli pacienti rozděleni v poměru 2 : 1 do dvou větví pro léčbu přípravkem Imlygic (n = 295) nebo samotným GM-CSF (n = 141). Primárním cílovým parametrem byl výskyt trvajících odpovědí (zjišťovalo se procento pacientů s kompletní nebo částečnou odpovědí přetrvávající nepřetržitě minimálně 6 měsíců). Pacienti léčení přípravkem Imlygic<sup>TM</sup> měli z léčby jednoznačně větší prospěch než pacienti léčení pouze GM-CSF (poměr šancí 8,9; 95% CI 2,7–29,2; p < 0,0001). Výrazně delší byl i medián doby do selhání léčby (8,2 vs. 2,9 měsíce) [106,107]. Detailní informace o výsledcích studie (i u klinických podskupin) lze nalézt v češtině v souhrnu údajů o přípravku na stránkách Státního ústavu pro kontrolu léčiv [108]. Zde jsou uvedeny i všechny potřebné informace, vč. postupu, jakým se použití viru řídí a jak je účinku dosahováno. Imlygic<sup>TM</sup> se podává intralezionálními injekcemi do kožních, podkožních a/nebo uzlinových lézí a je indikován k léčbě dospělých s neresekovatelným melanomem s regionálními nebo vzdálenými metastázami (stadium IIIB, IIIC a IVM1a) bez postižení kostí, mozku a plic. Zkušenosti z reálného klinického používání přípravku Imlygic<sup>TM</sup> u pacientů s melanomy jsou povzbudivé [109] a celková míra objektivní odpovědi (overall response rate – ORR) při léčbě a bezpečnostní profil jsou srovnatelné s výsledky studie OPTiM [110]. Také ukazují, že z léčby mohou nejvíce profitovat pacienti, kteří využijí T-VEC jako léčbu první volby, nebo starší pacienti [109]. Přípravek Imlygic<sup>TM</sup> zatím bohužel není v ČR distribuován.

Pečlivá analýza studií, kde byl T-VEC používán v kombinované terapii, odhalila, že může být velmi přínosný i pro pacienty s mutacemi NRAS (jsou nalézány přibližně ve čtvrtině nádorů melanomu), jejichž výhled na úspěšnou léčbu byl obvykle zřetelně horší než u pacientů s nezměněnými RAS proteiny. Použití T-VEC

nebo vakcinace mRNA stimulující imunitní odpověď proti personalizovaným antigenům, příp. kombinace tří přístupů (inhibitory mitogenem aktivované proteinkinázy, inhibitory CDK4/6 inhibitory a ICI) poskytlo u těchto pacientů povzbudivé výsledky [111].

Použití T-VEC bohužel není indikováno pro melanomy s metastázami do mozku. Poměrně vyčerpávající přehled o dosud aplikované onkolytické léčbě u těchto melanomů poskytují Soldozy et al [112]. V několika případových studiích se ukázalo jako nadějně podávání Rigviru (echovirus-7) u melanomu metastazujícího do mozku (sledovaná pacientka byla v době publikace stabilní bez progresy po dobu 3,8 roku) [113] nebo do plic [114]. Podrobný přehled výsledků klinických studií, které probíhaly s použitím Rigviru v letech 1968–1991 v Litvě, podávají Alberts et al [37]. Autoři uvádějí, že v porovnání s doporučeným postupem (observace) po chirurgickém odstranění nádoru melanomu ve stadiu II snižovalo podávání Rigviru riziko progresy onemocnění 6,67× a pacienti se stadiem IB nebo II měli při podávání Rigviru 4,39–6,57× nižší mortalitu. První laboratorní testy také naznačují, že Rigvir by mohl být aktivní i proti uveálnímu (nitroočnímu) melanomu [115], kde by mohlo být použití OV odvozených od HSV-1 (např. T-VEC) nevhodné, protože HSV-1 paradoxně povzbuzuje růst těchto nádorových buněk [116]. Podle dostupných informací se tedy Rigvir jeví jako velmi slibný OV pro léčbu melanomu, i když podmínky jeho výroby a distribuce zatím nejsou zcela jasné (viz výše). Výsledky studií konaných za železnou oponou by bylo třeba potvrdit a doplnit moderními klinickými studiemi.

### Nádory krve tvorby

V interview dr. Russella, nestora onkolytické terapie, uveřejněném v roce 2021 v časopise *Human Gene Therapy* na téma OV [117] byla mezi nejúspěšnější příklady onkolytické viroterapie zmíněna kazuistika, v níž šlo o pacientku s mnohočetným myelomem. Pacientka byla původně neúspěšně léčena transplantačně, po druhé transplantaci došlo k prudkému relapsu s infiltrací myelomu do kostní dřeně a kromě nových

ložisek ke vzniku velkého tumoru na čele. Po podání onkolytického spalničkového viru ve velké dávce ( $1 \times 10^{11}$  virů v jedné infuzní dávce) tumor na čele prakticky do týdne vymizel. Postupně došlo i k vymizení ostatních metastáz a po dalších 7 let (až do současnosti) nebyl žádný relaps onemocnění pozorován. Již v roce 2012 uvedli Bais et al přehled [118] do té doby použitých virů s onkolytickou aktivitou, především v rámci léčení pacientů s mnohočetným myelomem. U autologních transplantací kmenovými buňkami mělo použití vybraných virů směřovat k očištění transplantovaného materiálu od případné příměsi nádorových buněk. Nicméně v době publikace zmiňovaného článku nebyl navržený způsob čištění ještě klinicky vyzkoušen. Během následujícího desetiletí se použití OV v hematologii rozšířilo i na další hematologické malignity, i když mnohočetný myelom zřejmě zůstal nejčastějším terčem. Přibyla však akutní, ale i chronická myeloidní leukemie. Podrobný přehled současného stavu s upozorněním na zkušenost, která je v našem přehledu často opakována, a sice že namísto virové monoterapie je úspěšnějším postupem vybavení viru dalšími zbraněmi nebo odolností proti neutralizaci antivirových protilátek, najdeme v práci autorů Innao et al [119]. Vedle širokého přehledu použitých virů je v uvedeném přehledu nabízena i rozsáhlejší paleta malignit, při nichž došlo k použití viroterapie, a kromě mnohočetného myelomu to byly akutní i chronické leukemie, Burkittův nebo non-hodgkinský lymfom. Výběrem vhodného virového nosiče onkolytického účinku se okrajově zabývá přehledová práce Heidebüchela a Engelanda [20]. Autoři upozorňují na výhodnost spojení konstruktů označovaných jako BITE (viz výše) a OV. Léčba pomocí BITE v podobě tzv. blinatumomabu (CD3/CD19) se ukázala jako velice úspěšná, zvláště u některých hematologických malignit odvozených od B-lymfocytů. Nevýhodou byl krátký poločas v séru, což vyžadovalo dlouhodobé infuze. Situaci může řešit vybavení OV schopností produkovat tyto bispecifické molekuly, a tak vedle vlastního účinku zainteresovat do protinádorového pů-

sobení i další imunokompetentní buňky. V současné době je plánována první průzkumná klinická studie testující tento přístup pro léčbu B-buněčných lymfomů pomocí OV vakcinie RGV004 exprimujícího CD3/CD19 BITE (NCT04887025).

### Nádory dělohy

Jestliže se tento přehled soustředí na využití virů jako léčebných prostředků proti nádorům, zasluží si uvést tento odstavec částí názvu citovaného článku „virus proti viru“ [120]. Je již poměrně dlouho známo, že zdrojem některých nádorových bujení je virová infekce. V případě karcinomu děložního krčku jde o infekci lidským papilomavirem (human papillomavirus – HPV), u něhož bylo identifikováno několik typů odpovědných za vznik nádoru. Jejich celková prevalence přesahovala 99 % testovaných vzorků [121]. V nádorových buňkách HPV potlačuje funkci proteinů p53 a RB, a proto jsou tyto nádory zvláště vhodným cílem pro oAd [120]. V současné době probíhá v Číně několik klinických studií s použitím oAd Oncorine (H101) u rekurentních nádorů děložního čípku a v počátečních fázích je i testování viru spalniček (MV-NIS) nebo OV odvozený od HSV-1 (HF10). NDV, který se historicky zkoušel na léčbu řady nádorů vč. nádorů dělohy [122], se zatím osvědčil pouze v laboratorních testech u HPV indukovaných nádorů, kde byl přenášen na místo účinku mezenchymálními kmenovými buňkami [123].

### Nádory ledvin

Použití OV pro léčbu urologických nádorů přehledně shrnuje práce Taguchiho et al [124]. U nádorů ledvin se přednostně zkoušelo použití preparátů odvozených od viru vakcinie (Pexa-Vec/pexastimogene devacirepvec/JX-594) a NDV, kde však stále okolo výsledků panují kontroverze. V současnosti je ve II. fázi klinického testování Pexa-Vec (v kombinaci s anti-PD-1 protilátkou) a v počátečních fázích testování další varianty geneticky upraveného viru vakcinie PF-07263689 vyráběná firmou Pfizer, několik variant oAd a OV odvozené od HSV-1 (HSV1716). Z experimentálních studií v oblasti nádorů ledvin, je za-

jímavá práce Wang et al, kteří k ověření možnosti lytických schopností na buněčných liniích nádorů ledvin nově použili zvířecí reovirus, virus katarální horečky ovcí (bluetongue virus, BTV) [125]. O tomto viru bylo již známo, že je schopen lyzovat buňky lidského karcinomu jater nebo prostaty. Analytické ověření provedené na tkáňových kulturách a též na myším modelu vedlo k závěru, že BTV je účinným i na nádorové buňky lidských ledvin. Pozoruhodná je i recentní studie na myším modelu metastazujících orthotopických nádorů ledvin, kde se podařilo ukázat, že systémové podávání preparátu Pexa-Vec (transperitoneálně) vede k remodelaci nádorového mikroprostředí, akumulaci CD4+/CD8+ lymfocytů a dendritických buněk a k lepším terapeutickým výsledkům než systémové podání sunitinibu, který patří ke standardům léčby pomocí tzv. multityrozinkinázových inhibitorů [126].

### Nádory močového měchýře

Výskyt nádorů močového měchýře patří globálně mezi častější, a to hlavně ve státech s obyvatelstvem, které má vysoký věkový průměr. V jihovýchodní Asii a Africe je výskyt zřetelně nižší než v Evropě nebo Severní Americe, zatímco v Austrálii a na Novém Zélandu je naopak nejvyšší [127]. Incidence je o něco vyšší u mužů a zvyšuje se s věkem tak, že začíná stoupat od 40 let věku a maxima dosahuje v 80 letech. Za významný rizikový faktor je považováno kouření.

U těchto nádorů lze vzestup virově onkolytického léčebného přístupu s použitím různých virů sledovat již od roku 2006 [128]. Postupně se zvyšoval počet pokusů o optimalizaci léčby této velice heterogenní skupiny nádorů [129–132]. Pro stratifikaci pacientů vhodných k léčbě OV by mohl v budoucnu napomoci i nedávno navržený systém založený na určení globálního metylačního statusu nádorů pomocí tzv. 5mC skóre. Toto skóre je založeno na komplexní analýze exprese regulátorů 5-methylcytosinu a podle autorů dokáže spolehlivě určit molekulární subtypy a imunofenotypy u nádorů močového měchýře a také predikovat klinický výsledek zvo-

lené léčby [133]. Snad nejkompaktněji přehled léčebných postupů u nádorů močového měchýře najdeme u Nelsonové [134]. Použití OV na úrovni I. klinické fáze zmiňuje poměrně podrobně jak v podobě monoterapie, tak ve spojení s dalšími protinádorovými prostředky (např. onkolytický coxsackie virus CAVATAC s mitomycinem C). Mezi dalšími OV jsou zmiňovány dva oAd. Jedním je chimérický Ad11/3 enadenotucirev (dříve ColoAd1), který v místě účinku (nádorové tkáni) provokuje zánětlivou reakci [135] a druhým CG0070 vyzbrojený GM-GSF molekulou, jehož pozitivní účinek v podobě remise se dostavil téměř u 50 % léčených pacientů [136]. Léčba OV byla sice často provázena vedlejšími projevy, ale jejich míra dosahovala maximálně III. stupně ve zvladatelné podobě. Do klinického testování pro léčbu nádorů močového měchýře vstupuje i obdoba preparátu PROSTVAC (viz nádory prostaty) a používá se dvousložková poxviróvá vakcína PANVAC, která kromě TRICOM imunostimulačních molekul nese geny buněčné adheze CEA a mucinu MUC1 [137]. Publikování výsledků z II. fáze klinického testování (NCT02015104) lze očekávat v brzké době.

### Nádory hlavy a krku

Souhrn přístupů používaných v imunoterapii nádorů hlavy a krku poskytuje přehledová práce Chenga et al [138]. Do našeho přehledu se nádory ústní dutiny, nosohltanu a hrtanu dostávají proto, že i mezi tradičními přístupy chirurgické, ozařovací a chemoterapeutické se v poslední době připojila alternativa v podobě imunoviroterapie. Kromě léčby v Číně schváleným oAd Oncorine (H101) se dnes v I. fázích klinického testování používají různé varianty dalších oAd (VCN-01; OBP-301; CAD-VEC), spalničkový virus (MV-NIS), coxsackie virus 21 (CAVATAC), virus vakcinie (GL-ONC1; JX-594) a vektory odvozené od HSV-1 (HF10; ONCR-177), VSV (VSV-IFNβ-NIS). Do II a III. fáze se dostal Reolysin (pelareorep). Viroterapie je zmiňována i jako alternativní sekundární léčba refrakterních nádorů štítné žlázy, kde jsou klasické OV testovány zatím pouze preklinicky (NV1023, G47Δ), ale nerepli-

kující se virové vektory odvozené od Ad pro genovou terapii (VB-111 nebo rAd-p53) procházejí II. nebo IV. fází klinických studií [139].

### Závěry

Viroterapie je prudce se rozvíjející oblast protinádorové léčby, ale dosud není k dispozici dostatek údajů pro komparativní analýzy různých OV. Výjimkou je recentně publikovaná metaanalýza zahrnující 13 klinických studií II–III. fáze, která dovolila srovnání účinnosti čtyř OV: SVV-010 (NTX-010), Pexa-Vec (pexas-timogene devacirepvec/JX-594), T-VEC (talimogene laherparepvec/Imlygic™) a reoviru (pelareorep/Reolysin) [49]. Ukázalo se, že z hlediska ORR a závažnosti vedlejších příznaků (adverse effects grade) je nejvýhodnější použití T-VEC samostatně nebo ve spojení s další systémovou léčbou, přičemž spojení pouze s chemoterapií nevedlo ke zvýšení úspěšnosti. Naproti tomu kombinace s ICIs byla výhodnější díky nepřítomnosti vedlejších příznaků [49]. Mezi nejdéle klinicky používanými OV patří Oncorine (H101), oAd schválený v Číně pro léčbu nádorů hlavy a krku; přesto je k dispozici jen velmi málo publikovaných dat o jeho klinické účinnosti v praxi. V současnosti se Oncorine (H101) zkouší pro léčbu řady dalších nádorů [40]. Z metaanalýz vyplývá, že pacienti léčení pouze H101 nebo H101 v kombinaci s chemoterapií mají signifikantně vyšší ORR než pacienti léčení pouze chemoterapií (OS bylo 1,23× vyšší než v kontrolní skupině) a pozorovaný terapeutický efekt byl nejnižší u nádorů jater [140]. Data o klinické účinnosti preparátu Imlygic™ (talimogenum laherparepvecum/T-VEC), který je na trhu v USA a EU teprve od roku 2015, jsou shromažďována postupně [109] a naznačují, že na léčbu nejlépe odpovídají pacienti, u kterých je T-VEC použit jako léčba první volby pro lokálně a regionálně pokročilé melanomy. Terapie s využitím T-VEC by tedy měla být u rekurentního melanomu zvažována časně, v okamžiku, kdy je zřejmé, že chirurgický zákrok nepovede k vyléčení v důsledku výskytu transitorních melanomových metastáz. Podle dostupných údajů poskytuje u metastazujících melanomů velmi dobré výsledky léčba Rigvi-



rem [37], kde však chybí nezávislá data z klinického použití mimo zemi původu. Pro léčbu rekurentních glioblastomů jsou velkou nadějí onkolytické herpesviry a adenoviry. V Japonsku nedávno schválený preparát DELYTACT (teserpaturev/G47Δ) prošel klinickými testy v režimu přelomové terapie, neboť se od zavedení léčby temozolomidem a metodou „tumor treating fields“ (Optune™) stal prvním lékem, který prodloužil přežití pacientů s tímto agresivním nádorem, a u části z nich má potenciál nádor zcela vyléčit [86]. Pro pacienty s touto diagnózou byl v USA i EU schválen v režimu „orphan drug“ také zástupce oAd, DNX-2401 (tasadenoturev/Delta-24-RGD vyvíjený firmou DNATrix), který způsobuje virem indukované nekrózy nádorové tkáně [141]. Není vyloučeno, že kombinace výše zmíněných účinných léčebných přístupů může v budoucnu změnit standardní management léčby maligních gliomů.

V režimu „orphan drug“ bylo FDA i EMA schváleno použití preparátu Pelareorep (Reolysin) pro léčbu rakoviny pankreatu a vaječnicků. Pelareorep je vyvíjen a vyráběn společností Oncolytics Biotech, Inc. [142].

Je možné, a dokonce i pravděpodobné, že v souvislosti s pokrokem genového inženýrství se příprava onkologických virů bude dít na zakázku a podobně jako výroba vakcín i „průmyslově“. Příkladem mohou být např. firmy HALIX [143] nebo Oncolys BioPharma [144]. Posledně jmenovaná čínská firma získala v roce 2019 domácí licenci pro Telomelysin (OBP-301), jehož účinnost vyplývá z vnesení telomerázového promotoru do cílových (nádorových) buněk. Na základě dosažených výsledků při testování účinku Telomelysinu se předpokládají [145] optimální výsledky při jeho aplikaci v kombinaci s ICI. Za zmínku stojí v roce 2008 založené centrum International Virotherapy Centrum (Dubai, UEA) [146] orientované na zprostředkování léčby Rigvirem. Postupně vznikly i další formy klinik, které se na léčbu nádorů onkolytickými viry soustředily, jako např. Digital Virotherapy Clinic.

Léčba nádorových onemocnění pomocí OV a její úspěšnost je bezesporu závislá na tom, jak dobře je proti nádoro-

vému procesu namířena, jinými slovy, jak podrobně dokážeme identifikovat odlišnosti mezi nádorovými a normálními buňkami. Je tedy závislá na kvalitě molekulární diagnostiky. Na základě této diagnostiky můžeme vybrat vhodný virus, jeho výstavbu, příp. paralelní – doprovodnou – terapii jinými prostředky. Např. v nabídce společnosti CeGaT zabývající se zakázkovou nádorovou diagnostikou najdeme 766 genů asociovaných s nádory [147]. Vzhledem ke značné variabilitě nádorových onemocnění jsme postaveni před úkoly jednou poměrně jednoduché, kdy odlišnosti tkví v genotypu nádorových buněk, jako je tomu v případě chronické myeloidní leukemie, nebo naopak velmi složité, kdy klinicky téměř stejný typ nádoru může být charakterizován značnou variabilitou a nestabilitou především ve své genové výstavbě a její aktivitě.

Výběr vhodného OV pro konkrétní využití je však limitován nejen nedostatečnou molekulární diagnostikou nádorů, ale také absencí obecných kritérií pro použití OV. Preklinické ani klinické testy bohužel zatím nejsou realizovány tak, aby bylo možné nějaká kritéria odvodit. Většinou prověřují účinnost jen jediného OV, i v preklinickém výzkumu jsou komparativní studie, které by porovnávaly účinky několika virů na stejném terénu spíše výjimkou [148]. V klinických studiích nedochází ani ke stratifikaci pacientů, ze které by mohl vzejít nějaký predikční profil pro návrh personalizovaného použití konkrétního OV pro konkrétního pacienta. To vše ukazuje na potřebnost vzniku konzorcií, která umožní harmonizovaný a standardizovaný sběr dat pro různé pacienty, typy nádorů a různé OV [149]. To by bezpochyby pomohlo k vybudování silnější pozice imunoviroterapie na poli protinádorové léčby a OV by se pak mohly stát účinnou inovativní a pravděpodobně personalizovanou protinádorovou léčbou hlavně pro pacienty, kteří trpí agresivními typy rakoviny.

#### Podporující agentury a sponzoři

Tato práce vznikla za podpory projektu „ChemBioDrug“ reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000729 financovaného z OP VVV. Naše poděkování patří také sponzorům GHC GENETICS, s.r.o., a Biogen Praha, s.r.o., za jejich podporu při přípravě díla.

#### Literatura

1. Quaresma M, Coleman MP, Rachet B. 40-year trends in an index of survival for all cancers combined and survival adjusted for age and sex for each cancer in England and Wales, 1971–2011: a population-based study. *Lancet* 2015; 385(9974): 1206–1218. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61396-9.
2. De Angelis R, Sant M, Coleman MP et al. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO-CARE-5 – a population-based study. *Lancet Oncol* 2014; 15(1): 23–34. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70546-1.
3. Španielová H. Viry, které uzdravují. *Vesmír* 2010; 89(3): 181–183.
4. Mozaffari Nejad AS, Noor T, Munim ZH et al. A bibliometric review of oncolytic virus research as a novel approach for cancer therapy. *Virology* 2021; 18(1): 98. doi: 10.1186/s12985-021-01571-7.
5. Kuryk L, Vassilev L, Ranki T et al. Toxicological and biodistribution profile of a GM-CSF-expressing, double-targeted, chimeric oncolytic adenovirus ONCOS-102 – support for clinical studies on advanced cancer treatment. *PLoS One* 2017; 12(8): e0182715. doi: 10.1371/journal.pone.0182715.
6. Santry LA, van Vloten JP, Knapp JP et al. Tumour vasculature: friend or foe of oncolytic viruses? *Cytokine Growth Factor Rev* 2020; 56: 69–82. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.07.007.
7. Rahman MM, McFadden G. Oncolytic viruses: newest frontier for cancer immunotherapy. *Cancers* 2021; 13(21): 5452. doi: 10.3390/cancers13215452.
8. Humeau J, Le Naour J, Galluzzi L et al. Trial watch: intratumoral immunotherapy. *Oncoimmunology* 2021; 10(1): 1984677. doi: 10.1080/2162402X.2021.1984677.
9. Roy DG, Geoffroy K, Marguerie M et al. Adjuvant oncolytic virotherapy for personalized anti-cancer vaccination. *Nat Commun* 2021; 12(1): 2626. doi: 10.1038/s41467-021-22929-z.
10. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2015; 14(9): 642–662. doi: 10.1038/nrd4663.
11. Elvington M, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46 and oncologic interactions: friendly fire against cancer. *Antibodies* 2020; 9(4): 59. doi: 10.3390/antib9040059.
12. Fernandes J. Oncogenes: the passport for viral oncology through PKR inhibition. *Biomark Cancer* 2016; 8: 101–110. doi: 10.4137/BIC.S33378.
13. Jhawar SJ, Thandoni A, Bommarreddy PK et al. Oncolytic viruses – natural and genetically engineered cancer immunotherapies. *Front Oncol* 2017; 7: 202. doi: 10.3389/fonc.2017.00202.
14. Verheije MH, Rottier PJM. Retargeting of viruses to generate oncolytic agents. *Adv Virol* 2012; 2012: 798526. doi: 10.1155/2012/798526.
15. O'Shea C, Miyake-Stoner SJ, Powers CJ et al. Highly selective and potent p16-CDK-RB-E2F targeted oncolytic virus therapies. *J Clin Oncol* 2021; 39 (Suppl 15): e14543–e14543. doi: 10.1200/JCO.2021.39.15\_suppl.e14543.
16. Pascual-Pasto G, Bazan-Peregrino M, Olaciregui NG et al. Therapeutic targeting of the RB1 pathway in retinoblastoma with the oncolytic adenovirus VCN-01. *Sci Transl Med* 2019; 11(476): eaat9321. doi: 10.1126/scitranslmed.aat9321.
17. Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N et al. Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(1): 285–292. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-1075-3.
18. Chaurasiya S, Fong Y, Warner SG. Optimizing oncolytic viral design to enhance antitumor efficacy: progress and challenges. *Cancers* 2020; 12(6): 1699. doi: 10.3390/cancers12061699.
19. Pol JG, Workenhe ST, Konda P et al. Cytokines in oncolytic virotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2020; 56: 4–27. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.10.007.

20. Heidbuechel JPW, Engeland CE. Oncolytic viruses encoding bispecific T cell engagers: a blueprint for emerging immunovirotherapies. *J Hematol Oncol* 2021; 14(1): 63. doi: 10.1186/s13045-021-01075-5.
21. Kontermann RE, Ungerechts G, Nettelbeck DM. Viro-antibody therapy: engineering oncolytic viruses for genetic delivery of diverse antibody-based biotherapeutics. *MABs* 2021; 13(1): 1982447. doi: 10.1080/19420862.2021.1982447.
22. Freedman JD, Duffy MR, Lei-Rossmann J et al. An oncolytic virus expressing a T-cell engager simultaneously targets cancer and immunosuppressive stromal cells. *Cancer Res* 2018; 78(24): 6852–6865. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1750.
23. Bořilová S, Grell P, Bílek O et al. Biomarkers for predicting response to immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Onkologie* 2020; 14(5): 205–212. doi: 10.36290/xon.2020.075.
24. McGray AJR, Huang R-Y, Battaglia S et al. Oncolytic Maraba virus armed with tumor antigen boosts vaccine priming and reveals diverse therapeutic response patterns when combined with checkpoint blockade in ovarian cancer. *J Immunother Cancer* 2019; 7(1): 189. doi: 10.1186/s40425-019-0641-x.
25. Mihályová J, Jelínek T, Kaščík M et al. Practical aspects of CAR-T cell therapy. *Klin Onkol* 2022; 35(1): 44–54. doi: 10.48095/ccko202244.
26. Aalipour A, Le Boeuf F, Tang M et al. Viral delivery of CAR targets to solid tumors enables effective cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2020; 17: 232–240. doi: 10.1016/j.omto.2020.03.018.
27. Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. Systemic delivery of oncolytic viruses: hopes and hurdles. *Adv Virol* 2012; 2012: e805629. doi: 10.1155/2012/805629.
28. Xu W, Atkinson VG, Menzies AM. Intratumoral immunotherapies in oncology. *Eur J Cancer* 2020; 127: 1–11. doi: 10.1016/j.ejca.2019.12.007.
29. Koski A, Bramante S, Kipar A et al. Biodistribution analysis of oncolytic adenoviruses in patient autopsy samples reveals vascular transduction of noninjected tumors and tissues. *Mol Ther* 2015; 23(10): 1641–1652. doi: 10.1038/mt.2015.125.
30. Dal Corso A, Pignataro L, Belvisi L et al. Innovative linker strategies for tumor-targeted drug conjugates. *Chemistry* 2019; 25(65): 14740–14757. doi: 10.1002/chem.201903127.
31. Garofalo M, Bellato F, Magliocca S et al. Polymer coated oncolytic adenovirus to selectively target hepatocellular carcinoma cells. *Pharmaceutics* 2021; 13(7): 949. doi: 10.3390/pharmaceutics13070949.
32. Sewald X, Motamedi N, Mothes W. Viruses exploit the tissue physiology of the host to spread in vivo. *Curr Opin Cell Biol* 2016; 41: 81–90. doi: 10.1016/j.cceb.2016.04.008.
33. Reale A, Calistri A, Altomonte J. Giving oncolytic viruses a free ride: carrier cells for oncolytic virotherapy. *Pharmaceutics* 2021; 13(12): 2192. doi: 10.3390/pharmaceutics13122192.
34. Aldrak N, Alsaab S, Alghamdi A et al. Oncolytic herpes simplex virus-based therapies for cancer. *Cells* 2021; 10(6): 1541. doi: 10.3390/cells10061541.
35. Cunliffe TG, Bates EA, Parker AL. Hitting the target but missing the point: recent progress towards adenovirus-based precision virotherapies. *Cancers* 2020; 12(11): 3327. doi: 10.3390/cancers12113327.
36. Chan WM, McFadden G. Oncolytic poxviruses. *Annu Rev Virol* 2014; 1(1): 119–141. doi: 10.1146/annurev-virol-031413-085442.
37. Alberts P, Tilgase A, Rasa A et al. The advent of oncolytic virotherapy in oncology: the Rigvir® story. *Eur J Pharmacol* 2018; 837: 117–126. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.08.042.
38. Alberts P. Comment on McCarthy, C.; et al. Developing picornaviruses for cancer therapy. *Cancers* 2019; 11, 685. *Cancers* 2020; 12(7): 1775. doi: 10.3390/cancers12071775.
39. State Agency of Medicines Republic of Latvia. Rigvir marketing authorisation suspended; information for current patients. [online]. Available from: <https://www.zva.gov.lv/en/news-and-publications/news/rigvir-marketing-authorisation-suspended-information-current-patients>.
40. Liang M. Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China. *Curr Cancer Drug Targets* 2018; 18(2): 171–176. doi: 10.2174/1568009618666171129221503.
41. Ferrucci PF, Pala L, Conforti F et al. Talimogene laherparepvec (T-VEC): an intralesional cancer immunotherapy for advanced melanoma. *Cancers* 2021; 13(6): 1383. doi: 10.3390/cancers13061383.
42. Shen Y, Nemunaitis J. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther* 2006; 13(11): 975–992. doi: 10.1038/sj.cgt.7700946.
43. Sugawara K, Iwai M, Ito H et al. Oncolytic herpes virus G47Δ works synergistically with CTLA-4 inhibition via dynamic intratumoral immune modulation. *Mol Ther Oncolytics* 2021; 22: 129–142. doi: 10.1016/j.omto.2021.05.004.
44. Taguchi S, Fukuhara H, Todo T. Oncolytic virus therapy in Japan: progress in clinical trials and future perspectives. *Jpn J Clin Oncol* 2019; 49(3): 201–209. doi: 10.1093/jcco/hyy170.
45. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.
46. Lawler SE, Speranza M-C, Cho C-F et al. Oncolytic viruses in cancer treatment: a review. *JAMA Oncol* 2017; 3(6): 841–849. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.2064.
47. Chaurasiya S, Fong Y. Viroimmunotherapy for breast cancer: promises, problems and future directions. *Cancer Gene Ther* 2021; 28(7–8): 757–768. doi: 10.1038/s41417-020-00265-6.
48. Zhang H, Xie W, Zhang Y et al. Oncolytic adenoviruses synergistically enhance anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 immunotherapy by modulating the tumour microenvironment in a 4T1 orthotopic mouse model. *Cancer Gene Ther* 2021; 29(5): 1–10. doi: 10.1038/s41417-021-00389-3.
49. Xie R, Bi X, Shang B et al. Efficacy and safety of oncolytic viruses in advanced or metastatic cancer: a network meta-analysis. *Virol J* 2021; 18(1): 158. doi: 10.1186/s12985-021-01630-z.
50. Carter ME, Koch A, Lauer UM et al. Clinical trials of oncolytic viruses in breast cancer. *Front Oncol* 2021; 11: 803050. doi: 10.3389/fonc.2021.803050.
51. Bernstein V, Ellard SL, Dent SF et al. A randomized phase II study of weekly paclitaxel with or without pelareorep in patients with metastatic breast cancer: final analysis of Canadian Cancer Trials Group IND.213. *Breast Cancer Res Treat* 2018; 167(2): 485–493. doi: 10.1007/s10549-017-4538-4.
52. Hall BL, Leroni D, Miyagawa Y et al. Generation of an oncolytic herpes simplex viral vector completely retargeted to the GDNF receptor GFRα1 for specific infection of breast cancer cells. *Int J Mol Sci* 2020; 21(22): 8815. doi: 10.3390/ijms21228815.
53. Annels NE, Simpson GR, Denyer M et al. Oncolytic reovirus-mediated recruitment of early innate immune responses reverses immunotherapy resistance in prostate tumors. *Mol Ther Oncolytics* 2021; 20: 434–446. doi: 10.1016/j.omto.2020.09.010.
54. Boettcher AN, Usman A, Morgans A et al. Past, current, and future of immunotherapies for prostate cancer. *Front Oncol* 2019; 9: 884. doi: 10.3389/fonc.2019.00884.
55. Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer immune evasion through loss of MHC class I antigen presentation. *Front Immunol* 2021; 12: 636568. doi: 10.3389/fimmu.2021.636568.
56. Liu Y-T, Sun Z-J. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration. *Theranostics* 2021; 11(11): 5365–5386. doi: 10.7150/thno.58390.
57. Zhao H, Wu L, Yan G et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6(1): 1–46. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5.
58. Patel D, McKay R, Parsons JK. Immunotherapy for localized prostate cancer: the next frontier? *Urol Clin North Am* 2020; 47(4): 443–456. doi: 10.1016/j.ucl.2020.07.008.
59. Adamaki M, Zoumpourlis V. Immunotherapy as a precision medicine tool for the treatment of prostate cancer. *Cancers* 2021; 13(2): 173. doi: 10.3390/cancers13020173.
60. Cheng H, Wang Y, Liu C et al. Development and verification of a prostate cancer prognostic signature based on an immunogenomic landscape analysis. *Front Oncol* 2021; 11: 711258. doi: 10.3389/fonc.2021.711258.
61. Eigl BJ, Chi K, Tu D et al. A randomized phase II study of pelareorep and docetaxel or docetaxel alone in men with metastatic castration resistant prostate cancer: CCTG study IND 209. *Oncotarget* 2018; 9(8): 8155–8164. doi: 10.18632/oncotarget.24263.
62. Singh P, Pal SK, Alex A et al. Development of PROS-TVAC immunotherapy in prostate cancer. *Future Oncol* 2015; 11(15): 2137–2148. doi: 10.2217/fon.15.120.
63. Gully JL, Borre M, Vogelzang NJ et al. Phase III trial of PROSTVAC in asymptomatic or minimally symptomatic metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 2019; 37(13): 1051–1061. doi: 10.1200/JCO.18.02031.
64. Zhu H, Liu X. Advances of tumorigenesis, diagnosis at early stage, and cellular immunotherapy in gastrointestinal malignancies. *Front Oncol* 2021; 11: 666340. doi: 10.3389/fonc.2021.666340.
65. Russo M, Sogari A, Bardelli A. Adaptive evolution: how bacteria and cancer cells survive stressful conditions and drug treatment. *Cancer Discov* 2021; 11(8): 1886–1895. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1588.
66. Russo M, Crisafulli G, Sogari A et al. Adaptive mutability of colorectal cancers in response to targeted therapies. *Science* 2019; 366(6472): 1473–1480. doi: 10.1126/science.aav4474.
67. Kim CW, Chon HJ, Kim C. Combination immunotherapies to overcome intrinsic resistance to checkpoint blockade in microsatellite stable colorectal cancer. *Cancers* 2021; 13(19): 4906. doi: 10.3390/cancers13194906.
68. Geevarghese SK, Geller DA, de Haan HA et al. Phase II study of oncolytic herpes simplex virus NV1020 in patients with extensively pretreated refractory colorectal cancer metastatic to the liver. *Hum Gene Ther* 2010; 21(9): 1119–1128. doi: 10.1089/hum.2010.020.
69. Hu J, Lu R, Zhang Y et al. β-adrenergic receptor inhibition enhances oncolytic herpes virus propagation through STAT3 activation in gastric cancer. *Cell Biosci* 2021; 11(1): 174. doi: 10.1186/s13578-021-00687-1.
70. Ilyas FZ, Beane JD, Pawlik TM. The state of immunotherapy in hepatobiliary cancers. *Cells* 2021; 10(8): 2096. doi: 10.3390/cells10082096.

Kompletní seznam literatury naleznete v online verzi článku na [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz).

## Literatura

1. Quaresma M, Coleman MP, Rachet B. 40-year trends in an index of survival for all cancers combined and survival adjusted for age and sex for each cancer in England and Wales, 1971–2011: a population-based study. *Lancet* 2015; 385(9974): 1206–1218. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61396-9.
2. De Angelis R, Sant M, Coleman MP et al. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO CARE-5 – a population-based study. *Lancet Oncol* 2014; 15(1): 23–34. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70546-1.
3. Španielová H. Viry, které uzdravují. *Vesmír* 2010; 89(3): 181–183.
4. Mozaffari Nejad AS, Noor T, Munim ZH et al. A bibliometric review of oncolytic virus research as a novel approach for cancer therapy. *Virol J* 2021; 18(1): 98. doi: 10.1186/s12985-021-01571-7.
5. Kuryk L, Vassilev L, Ranki T et al. 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* 2017; 12(8): e0182715. doi: 10.1371/journal.pone.0182715.
6. Santry LA, van Vloten JP, Knapp JP et al. Tumour vasculature: friend or foe of oncolytic viruses? *Cytokine Growth Factor Rev* 2020; 56: 69–82. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.07.007.
7. Rahman MM, McFadden G. Oncolytic viruses: newest frontier for cancer immunotherapy. *Cancers* 2021; 13(21): 5452. doi: 10.3390/cancers13215452.
8. Humeau J, Le Naour J, Galluzzi L et al. Trial watch: intratumoral immunotherapy. *Oncoimmunology* 2021; 10(1): 1984677. doi: 10.1080/2162402X.2021.1984677.
9. Roy DG, Geoffroy K, Marguerie M et al. Adjuvant oncolytic virotherapy for personalized anti-cancer vaccination. *Nat Commun* 2021; 12(1): 2626. doi: 10.1038/s41467-021-22929-z.
10. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2015; 14(9): 642–662. doi: 10.1038/nrd4663.
11. Elvington M, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46 and oncologic interactions: friendly fire against cancer. *Antibodies* 2020; 9(4): 59. doi: 10.3390/antib9040059.
12. Fernandes J. Oncogenes: the passport for viral oncolysis through PKR inhibition. *Biomark Cancer* 2016; 8: 101–110. doi: 10.4137/BIC.S33378.
13. Jhawar SR, Thandoni A, Bommareddy PK et al. Oncolytic viruses – natural and genetically engineered cancer immunotherapies. *Front Oncol* 2017; 7: 202. doi: 10.3389/fonc.2017.00202.
14. Verheije MH, Rottier PJM. Retargeting of viruses to generate oncolytic agents. *Adv Virol* 2012; 2012: 798526. doi: 10.1155/2012/798526.
15. O’Shea C, Miyake-Stoner SJ, Powers CJ et al. Highly selective and potent p16-CDK-RB-E2F targeted oncolytic virus therapies. *J Clin Oncol* 2021; 39(Suppl 15): e14543–e14543. doi: 10.1200/JCO.2021.39.15\_suppl.e14543.
16. Pascual-Pasto G, Bazan-Peregrino M, Olaciregui NG et al. Therapeutic targeting of the RB1 pathway in retinoblastoma with the oncolytic adenovirus VCN-01. *Sci Transl Med* 2019; 11(476): eaat9321. doi: 10.1126/scitranslmed.aat9321.
17. Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N et al. Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(1): 285–292. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-1075-3.
18. Chaurasiya S, Fong Y, Warner SG. Optimizing oncolytic viral design to enhance antitumor efficacy: progress and challenges. *Cancers* 2020; 12(6): 1699. doi: 10.3390/cancers12061699.
19. Pol JG, Workenhe ST, Konda P et al. Cytokines in oncolytic virotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2020; 56: 4–27. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.10.007.



20. Heidbuechel JPW, Engeland CE. Oncolytic viruses encoding bispecific T cell engagers: a blueprint for emerging immunovirotherapies. *J Hematol Oncol* 2021; 14(1): 63. doi: 10.1186/s13045-021-01075-5.
21. Kontermann RE, Ungerechts G, Nettelbeck DM. Viro-antibody therapy: engineering oncolytic viruses for genetic delivery of diverse antibody-based biotherapeutics. *MAbs* 2021; 13(1): 1982447. doi: 10.1080/19420862.2021.1982447.
22. Freedman JD, Duffy MR, Lei-Rossmann J et al. An oncolytic virus expressing a T-cell engager simultaneously targets cancer and immunosuppressive stromal cells. *Cancer Res* 2018; 78(24): 6852–6865. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1750.
23. Bořilová S, Grell P, Bílek O et al. Biomarkers for predicting response to immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Onkologie* 2020; 14(5): 205–212. doi: 10.36290/xon.2020.075.
24. McGray AJR, Huang R-Y, Battaglia S et al. Oncolytic Maraba virus armed with tumor antigen boosts vaccine priming and reveals diverse therapeutic response patterns when combined with checkpoint blockade in ovarian cancer. *J Immunother Cancer* 2019; 7(1): 189. doi: 10.1186/s40425-019-0641-x.
25. Mihályová J, Jelínek T, Kaščák M et al. Practical aspects of CAR-T cell therapy. *Klin Onkol* 2022; 35(1): 44–54. doi: 10.48095/ccko202244.
26. Aalipour A, Le Boeuf F, Tang M et al. Viral delivery of CAR targets to solid tumors enables effective cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2020; 17: 232–240. doi: 10.1016/j.omto.2020.03.018.
27. Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. Systemic delivery of oncolytic viruses: hopes and hurdles. *Adv Virol* 2012; 2012: e805629. doi: 10.1155/2012/805629.
28. Xu W, Atkinson VG, Menzies AM. Intratumoural immunotherapies in oncology. *Eur J Cancer* 2020; 127: 1–11. doi: 10.1016/j.ejca.2019.12.007.
29. Koski A, Bramante S, Kipar A et al. Biodistribution analysis of oncolytic adenoviruses in patient autopsy samples reveals vascular transduction of noninjected tumors and tissues. *Mol Ther* 2015; 23(10): 1641–1652. doi: 10.1038/mt.2015.125.
30. Dal Corso A, Pignataro L, Belvisi L et al. Innovative linker strategies for tumor-targeted drug conjugates. *Chemistry* 2019; 25(65): 14740–14757. doi: 10.1002/chem.201903127.
31. Garofalo M, Bellato F, Magliocca S et al. Polymer coated oncolytic adenovirus to selectively target hepatocellular carcinoma cells. *Pharmaceutics* 2021; 13(7): 949. doi: 10.3390/pharmaceutics13070949.
32. Sewald X, Motamedi N, Mothes W. Viruses exploit the tissue physiology of the host to spread in vivo. *Curr Opin Cell Biol* 2016; 41: 81–90. doi: 10.1016/j.ceb.2016.04.008.
33. Reale A, Calistri A, Altomonte J. Giving oncolytic viruses a free ride: carrier cells for oncolytic virotherapy. *Pharmaceutics* 2021; 13(12): 2192. doi: 10.3390/pharmaceutics13122192.
34. Aldrak N, Alsaab S, Algethami A et al. Oncolytic herpes simplex virus-based therapies for cancer. *Cells* 2021; 10(6): 1541. doi: 10.3390/cells10061541.
35. Cunliffe TG, Bates EA, Parker AL. Hitting the target but missing the point: recent progress towards adenovirus-based precision virotherapies. *Cancers* 2020; 12(11): 3327. doi: 10.3390/cancers12113327.
36. Chan WM, McFadden G. Oncolytic poxviruses. *Annu Rev Virol* 2014; 1(1): 119–141. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085442.
37. Alberts P, Tilgase A, Rasa A et al. The advent of oncolytic virotherapy in oncology: the Rigvir® story. *Eur J Pharmacol* 2018; 837: 117–126. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.08.042.
38. Alberts P. Comment on McCarthy, C.; et al. Developing picornaviruses for cancer therapy. *Cancers* 2019, 11, 685. *Cancers* 2020; 12(7): 1775. doi: 10.3390/cancers12071775.

39. State Agency of Medicines Republic of Latvia. Rigvir marketing authorisation suspended; information for current patients. [online]. Dostupné z: <https://www.zva.gov.lv/en/news-and-publications/news/rigvir-marketing-authorisation-suspended-information-current-patients>.
40. Liang M. Oncorine, the world first oncolytic virus medicine and its update in China. *Curr Cancer Drug Targets* 2018; 18(2): 171–176. doi: 10.2174/1568009618666171129221503.
41. Ferrucci PF, Pala L, Conforti F et al. Talimogene laherparepvec (T-VEC): an intralesional cancer immunotherapy for advanced melanoma. *Cancers* 2021; 13(6): 1383. doi: 10.3390/cancers13061383.
42. Shen Y, Nemunaitis J. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther* 2006; 13(11): 975–992. doi: 10.1038/sj.cgt.7700946.
43. Sugawara K, Iwai M, Ito H et al. Oncolytic herpes virus G47 $\Delta$  works synergistically with CTLA-4 inhibition via dynamic intratumoral immune modulation. *Mol Ther Oncolytics* 2021; 22: 129–142. doi: 10.1016/j.omto.2021.05.004.
44. Taguchi S, Fukuhara H, Todo T. Oncolytic virus therapy in Japan: progress in clinical trials and future perspectives. *Jpn J Clin Oncol* 2019; 49(3): 201–209. doi: 10.1093/jjco/hyy170.
45. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.
46. Lawler SE, Speranza M-C, Cho C-F et al. Oncolytic viruses in cancer treatment: a review. *JAMA Oncol* 2017; 3(6): 841–849. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.2064.
47. Chaurasiya S, Fong Y. Viroimmunotherapy for breast cancer: promises, problems and future directions. *Cancer Gene Ther* 2021; 28(7–8): 757–768. doi: 10.1038/s41417-020-00265-6.
48. Zhang H, Xie W, Zhang Y et al. Oncolytic adenoviruses synergistically enhance anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 immunotherapy by modulating the tumour microenvironment in a 4T1 orthotopic mouse model. *Cancer Gene Ther* 2021; 29(5): 1–10. doi: 10.1038/s41417-021-00389-3.
49. Xie R, Bi X, Shang B et al. Efficacy and safety of oncolytic viruses in advanced or metastatic cancer: a network meta-analysis. *Virology* 2021; 18(1): 158. doi: 10.1186/s12985-021-01630-z.
50. Carter ME, Koch A, Lauer UM et al. Clinical trials of oncolytic viruses in breast cancer. *Front Oncol* 2021; 11: 803050. doi: 10.3389/fonc.2021.803050.
51. Bernstein V, Ellard SL, Dent SF et al. A randomized phase II study of weekly paclitaxel with or without pelareorep in patients with metastatic breast cancer: final analysis of Canadian Cancer Trials Group IND.213. *Breast Cancer Res Treat* 2018; 167(2): 485–493. doi: 10.1007/s10549-017-4538-4.
52. Hall BL, Leroni D, Miyagawa Y et al. Generation of an oncolytic herpes simplex viral vector completely retargeted to the GDNF receptor GFR $\alpha$ 1 for specific infection of breast cancer cells. *Int J Mol Sci* 2020; 21(22): 8815. doi: 10.3390/ijms21228815.
53. Annels NE, Simpson GR, Denyer M et al. Oncolytic reovirus-mediated recruitment of early innate immune responses reverses immunotherapy resistance in prostate tumors. *Mol Ther Oncolytics* 2021; 20: 434–446. doi: 10.1016/j.omto.2020.09.010.
54. Boettcher AN, Usman A, Morgans A et al. Past, current, and future of immunotherapies for prostate cancer. *Front Oncol* 2019; 9: 884. doi: 10.3389/fonc.2019.00884.
55. Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer immune evasion through loss of MHC class I antigen presentation. *Front Immunol* 2021; 12: 636568. doi: 10.3389/fimmu.2021.636568.
56. Liu Y-T, Sun Z-J. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration. *Theranostics* 2021; 11(11): 5365–5386. doi: 10.7150/thno.58390.

57. Zhao H, Wu L, Yan G et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6(1): 1–46. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5.
58. Patel D, McKay R, Parsons JK. Immunotherapy for localized prostate cancer: the next frontier? *Urol Clin North Am* 2020; 47(4): 443–456. doi: 10.1016/j.ucl.2020.07.008.
59. Adamaki M, Zoumpourlis V. Immunotherapy as a precision medicine tool for the treatment of prostate cancer. *Cancers* 2021; 13(2): 173. doi: 10.3390/cancers13020173.
60. Cheng H, Wang Y, Liu C et al. Development and verification of a prostate cancer prognostic signature based on an immunogenomic landscape analysis. *Front Oncol* 2021; 11: 711258. doi: 10.3389/fonc.2021.711258.
61. Eigel BJ, Chi K, Tu D et al. A randomized phase II study of pelareorep and docetaxel or docetaxel alone in men with metastatic castration resistant prostate cancer: CCTG study IND 209. *Oncotarget* 2018; 9(8): 8155–8164. doi: 10.18632/oncotarget.24263.
62. Singh P, Pal SK, Alex A et al. Development of PROSTVAC immunotherapy in prostate cancer. *Future Oncol* 2015; 11(15): 2137–2148. doi: 10.2217/fon.15.120.
63. Gulley JL, Borre M, Vogelzang NJ et al. Phase III trial of PROSTVAC in asymptomatic or minimally symptomatic metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 2019; 37(13): 1051–1061. doi: 10.1200/JCO.18.02031.
64. Zhu H, Liu X. Advances of tumorigenesis, diagnosis at early stage, and cellular immunotherapy in gastrointestinal malignancies. *Front Oncol* 2021; 11: 666340. doi: 10.3389/fonc.2021.666340.
65. Russo M, Sogari A, Bardelli A. Adaptive evolution: how bacteria and cancer cells survive stressful conditions and drug treatment. *Cancer Discov* 2021; 11(8): 1886–1895. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1588.
66. Russo M, Crisafulli G, Sogari A et al. Adaptive mutability of colorectal cancers in response to targeted therapies. *Science* 2019; 366(6472): 1473–1480. doi: 10.1126/science.aav4474.
67. Kim CW, Chon HJ, Kim C. Combination immunotherapies to overcome intrinsic resistance to checkpoint blockade in microsatellite stable colorectal cancer. *Cancers* 2021; 13(19): 4906. doi: 10.3390/cancers13194906.
68. Geevarghese SK, Geller DA, de Haan HA et al. Phase I/II study of oncolytic herpes simplex virus NV1020 in patients with extensively pretreated refractory colorectal cancer metastatic to the liver. *Hum Gene Ther* 2010; 21(9): 1119–1128. doi: 10.1089/hum.2010.020.
69. Hu J, Lu R, Zhang Y et al.  $\beta$ -adrenergic receptor inhibition enhances oncolytic herpes virus propagation through STAT3 activation in gastric cancer. *Cell Biosci* 2021; 11(1): 174. doi: 10.1186/s13578-021-00687-1.
70. Ilyas FZ, Beane JD, Pawlik TM. The state of immunotherapy in hepatobiliary cancers. *Cells* 2021; 10(8): 2096. doi: 10.3390/cells10082096.
71. Zhang B, Huang J, Tang J et al. Intratumoral OH2, an oncolytic herpes simplex virus 2, in patients with advanced solid tumors: a multicenter, phase I/II clinical trial. *J Immunother Cancer* 2021; 9(4): e002224. doi: 10.1136/jitc-2020-002224.
72. Xia Z-J, Chang J-H, Zhang L et al. Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus. *Ai Zheng* 2004; 23(12): 1666–1670.
73. Ekeke CN, Russell KL, Joubert K et al. Fighting fire with fire: oncolytic virotherapy for thoracic malignancies. *Ann Surg Oncol* 2021; 28(5): 2715–2727. doi: 10.1245/s10434-020-09477-4.
74. Schenk EL, Mandrekar SJ, Dy GK et al. A randomized double-blind phase II study of the seneca valley virus (NTX-010) versus placebo for patients with extensive-stage SCLC (ES

- SCLC) who were stable or responding after at least four cycles of platinum-based chemotherapy: North Central Cancer Treatment Group (Alliance) N0923 Study. *J Thorac Oncol* 2020; 15(1): 110–119. doi: 10.1016/j.jtho.2019.09.083.
75. Zhang H, Qin L, Li C et al. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy combined with ganciclovir induces hepatoma cell apoptosis. *Exp Ther Med* 2019; 17(3): 1649–1655. doi: 10.3892/etm.2019.7147.
76. Powell SF, Patel MR, Merchan J et al. VSV-IFN $\beta$ -NIS intratumoral (IT) injection: a first-in-human (FIH), phase I study of an innovative oncolytic virotherapy, alone and with an anti-PD-L1 antibody, in patients with refractory solid tumors. *Ann Oncol* 2018; 29(Suppl 8): viii439. doi: 10.1093/annonc/mdy288.108.
77. Felt SA, Grdzeliashvili VZ. Recent advances in vesicular stomatitis virus-based oncolytic virotherapy: a 5-year update. *J Gen Virol* 2017; 98(12): 2895–2911. doi: 10.1099/jgv.0.000980.
78. Pol JG, Acuna SA, Yadollahi B et al. Preclinical evaluation of a MAGE-A3 vaccination utilizing the oncolytic Maraba virus currently in first-in-human trials. *Oncoimmunology* 2018; 8(1): e1512329. doi: 10.1080/2162402X.2018.1512329.
79. Shi Z, Liu B, Huang C et al. An oncolytic vaccinia virus armed with anti-human-PD-1 antibody and anti-human-4-1BB antibody double genes for cancer-targeted therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2021; 559: 176–182. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.078.
80. Wadowski B, Bueno R, De Rienzo A. Immune microenvironment and genetics in malignant pleural mesothelioma. *Front Oncol* 2021; 11: 684025. doi: 10.3389/fonc.2021.684025.
81. Zaheer U, Hassain NA, Banu S et al. Oncolytic viruses as nanomedicines against the tumor microenvironment. *Biointerface Res Appl Chem* 2021; 11(6): 14825–14852. doi: 10.33263/BRIAC116.1482514852.
82. Zhang Q, Li Y, Zhao Q et al. Recombinant human adenovirus type 5 (Oncorine) reverses resistance to immune checkpoint inhibitor in a patient with recurrent non-small cell lung cancer: a case report. *Thorac Cancer* 2021; 12(10): 1617–1619. doi: 10.1111/1759-7714.13947.
83. Liang Y, Tian W-Y, Huang J-J et al. MicroRNA-204 plays a role as a tumor suppressor in Newcastle disease virus-induced oncolysis in lung cancer A549 cells. *Oncol Lett* 2021; 21(6): 482. doi: 10.3892/ol.2021.12743.
84. Alvanegh AG, Ganji SM, Kamel A et al. Comparison of oncolytic virotherapy and nanotherapy as two new miRNA delivery approaches in lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2021; 140: 111755. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111755.
85. Ballman KV, Buckner JC, Brown PD et al. The relationship between six-month progression-free survival and 12-month overall survival end points for phase II trials in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 2007; 9(1): 29–38. doi: 10.1215/15228517-2006-025.
86. Todo T, Ito H, Ino Y et al. Intratumoral oncolytic herpes virus G47 $\Delta$  for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial. *Nat Med* 2022; 28(8): 1630–1639. doi: 10.1038/s41591-022-01897-x.
87. FDA. FDA's orphan drug designation to toca 511 & toca FC for glioblastoma. *Oncol Times* 2015; 37(18): 57. doi: 10.1097/01.COT.0000471997.28149.68.
88. Tocagen Inc. A Phase 2/3 Randomized, Open-Label Study of Toca 511, a Retroviral Replicating Vector, Combined With Toca FC Versus Standard of Care in Subjects Undergoing Planned Resection for Recurrent Glioblastoma or Anaplastic Astrocytoma. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2020.



89. Collins SA, Shah AH, Ostertag D et al. Clinical development of retroviral replicating vector Toca 511 for gene therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2021; 21(9): 1199–1214. doi: 10.1080/14712598.2021.1902982.
90. Angelova A, Ferreira T, Bretscher C et al. Parvovirus-based combinatorial immunotherapy: a reinforced therapeutic strategy against poor-prognosis solid cancers. *Cancers* 2021; 13(2): 342. doi: 10.3390/cancers13020342.
91. Kicielinski KP, Chiocca EA, Yu JS et al. Phase 1 clinical trial of intratumoral reovirus infusion for the treatment of recurrent malignant gliomas in adults. *Mol Ther* 2014; 22(5): 1056–1062. doi: 10.1038/mt.2014.21.
92. Carpenter AB, Carpenter AM, Aiken R et al. Oncolytic virus in gliomas: a review of human clinical investigations. *Ann Oncol* 2021; 32(8): 968–982. doi: 10.1016/j.annonc.2021.03.197.
93. Cohn DE, Sill MW, Walker JL et al. Randomized phase IIB evaluation of weekly paclitaxel versus weekly paclitaxel with oncolytic reovirus (Reolysin®) in recurrent ovarian, tubal, or peritoneal cancer: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 2017; 146(3): 477–483. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.07.135.
94. Doo DW, Norian LA, Arend RC. Checkpoint inhibitors in ovarian cancer: a review of preclinical data. *Gynecol Oncol Rep* 2019; 29: 48–54. doi: 10.1016/j.gore.2019.06.003.
95. de Queiroz NMGP, Xia T, Konno H et al. Ovarian cancer cells commonly exhibit defective STING signaling which affects sensitivity to viral oncolysis. *Mol Cancer Res* 2019; 17(4): 974–986. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0504.
96. Cornejo Y, Li M, Dellinger TH et al. NSCs are permissive to oncolytic Myxoma virus and provide a delivery method for targeted ovarian cancer therapy. *Oncotarget* 2020; 11(51): 4693–4698. doi: 10.18632/oncotarget.27845.
97. Yue E, Yang G, Yao Y et al. Targeting CA-125 transcription by development of a conditionally replicative adenovirus for ovarian cancer treatment. *Cancers* 2021; 13(17): 4265. doi: 10.3390/cancers13174265.
98. van den Pol AN, Zhang X, Lima E et al. Lassa-VSV chimeric virus targets and destroys human and mouse ovarian cancer by direct oncolytic action and by initiating an anti-tumor response. *Virology* 2021; 555: 44–55. doi: 10.1016/j.virol.2020.10.009.
99. Budzik KM, Nace RA, Ikeda Y et al. Oncolytic foamy virus: generation and properties of a nonpathogenic replicating retroviral vector system that targets chronically proliferating cancer cells. *J Virol* 2021; 95(10): e00015–e00021. doi: 10.1128/JVI.00015-21.
100. Manyam M, Stephens AJ, Kennard JA et al. A phase 1b study of intraperitoneal oncolytic viral immunotherapy in platinum-resistant or refractory ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2021; 163(3): 481–489. doi: 10.1016/j.ygyno.2021.10.069.
101. Moreno V, Barretina-Ginesta M-P, García-Donas J et al. Safety and efficacy of the tumor-selective adenovirus enadenotucirev with or without paclitaxel in platinum-resistant ovarian cancer: a phase 1 clinical trial. *J Immunother Cancer* 2021; 9(12): e003645. doi: 10.1136/jitc-2021-003645.
102. Chieffi P, De Martino M, Esposito F. New anti-cancer strategies in testicular germ cell tumors. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2019; 14(1): 53–59. doi: 10.2174/1574892814666190111120023.
103. BioSpace. Oncolytics biotech Inc. announces issuance of 14th U.S. patent. [online]. Dostupné z: <https://www.biospace.com/article/oncolytics-biotech-inc-announces-issuance-of-14th-u-s-patent/>.
104. Morris D, Thompson BG, Coffey MC. Reovirus clearance of ras-mediated neoplastic cells from mixed cellular compositions. *Calgary CA* 2012.

105. Pol J, Kroemer G, Galluzzi L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology* 2015; 5(1): e1115641. doi: 10.1080/2162402X.2015.1115641.
106. Andtbacka RHI, Kaufman HL, Collichio F et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2015; 33(25): 2780–2788. doi: 10.1200/JCO.2014.58.3377.
107. Harrington KJ, Andtbacka RH, Collichio F et al. Efficacy and safety of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with stage IIIB/C and IVM1a melanoma: subanalysis of the Phase III OPTiM trial. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 7081–7093. doi: 10.2147/OTT.S115245.
108. Státní ústav pro kontrolu léčiv. IMLYGIC. [online]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0209135&tab=texts>.
109. Kaufman HL, Shalhout SZ, Iodice G. Talimogene laherparepvec: moving from first-in-class to best-in-class. *Front Mol Biosci* 2022; 9: 834841. doi: 10.3389/fmolb.2022.834841.
110. van Akkooi ACJ, Haferkamp S, Papa S et al. A retrospective chart review study of real-world use of talimogene laherparepvec in unresectable stage IIIB–IVM1a melanoma in four European countries. *Adv Ther* 2021; 38(2): 1245–1262. doi: 10.1007/s12325-020-01590-w.
111. Randic T, Kozar I, Margue C et al. NRAS mutant melanoma: towards better therapies. *Cancer Treat Rev* 2021; 99: 102238. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102238.
112. Soldozy S, Mulligan KM, Zheng DX et al. Oncolytic virotherapy for melanoma brain metastases, a potential new treatment paradigm? *Brain Sci* 2021; 11(10): 1260. doi: 10.3390/brainsci11101260.
113. Proboka G, Tilgase A, Isajevs S et al. Melanoma unknown primary brain metastasis treatment with ECHO-7 oncolytic virus Rigvir: a case report. *Front Oncol* 2018; 8: 43. doi: 10.3389/fonc.2018.00043.
114. Alberts P, Olmane E, Brokāne L et al. Long-term treatment with the oncolytic ECHO-7 virus Rigvir of a melanoma stage IV M1c patient, a small cell lung cancer stage IIIA patient, and a histiocytic sarcoma stage IV patient-three case reports. *APMIS* 2016; 124(10): 896–904. doi: 10.1111/apm.12576.
115. Tilgase A, Olmane E, Nazarovs J et al. Multimodality treatment of a colorectal cancer stage IV patient with FOLFOX-4, Bevacizumab, Rigvir oncolytic virus, and surgery. *Case Rep Gastroenterol* 2018; 12(2): 457–465. doi: 10.1159/000492210.
116. Valyi-Nagy T, Fredericks B, Ravindra A et al. Herpes simplex virus 1 infection promotes the growth of a subpopulation of tumor cells in three-dimensional uveal melanoma cultures. *J Virol* 2018; 92(19): e00700–e00718. doi: 10.1128/JVI.00700-18.
117. Davies K. The life oncolytic: an interview with Stephen J. Russell. *Hum Gene Ther* 2021; 32(3–4): 129–132. doi: 10.1089/hum.2021.29148.int.
118. Bais S, Bartee E, Rahman MM et al. Oncolytic virotherapy for hematological malignancies. *Adv Virol* 2012; 2012: 186512. doi: 10.1155/2012/186512.
119. Innao V, Rizzo V, Allegra AG et al. Oncolytic viruses and hematological malignancies: a new class of immunotherapy drugs. *Curr Oncol* 2020; 28(1): 159–183. doi: 10.3390/currenol28010019.
120. Ghanaat M, Goradel NH, Arashkia A et al. Virus against virus: strategies for using adenovirus vectors in the treatment of HPV-induced cervical cancer. *Acta Pharmacol Sin* 2021; 42(12): 1981–1990. doi: 10.1038/s41401-021-00616-5.
121. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1): 12–19. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F.
122. Burman B, Pesci G, Zamarin D. Newcastle disease virus at the forefront of cancer immunotherapy. *Cancers* 2020; 12(12): 3552. doi: 10.3390/cancers12123552.

123. Keshavarz M, Ebrahimzadeh MS, Miri SM et al. Oncolytic Newcastle disease virus delivered by Mesenchymal stem cells-engineered system enhances the therapeutic effects altering tumor microenvironment. *Virol J* 2020; 17(1): 64. doi: 10.1186/s12985-020-01326-w.
124. Taguchi S, Fukuhara H, Homma Y et al. Current status of clinical trials assessing oncolytic virus therapy for urological cancers. *Int J Urol* 2017; 24(5): 342–351. doi: 10.1111/iju.13325.
125. Wang H, Song L, Zhang X et al. Bluetongue viruses act as novel oncolytic viruses to effectively inhibit human renal cancer cell growth in vitro and in vivo. *Med Sci Monit* 2021; 27: e930634. doi: 10.12659/MSM.930634.
126. Park JS, Lee ME, Jang WS et al. Systemic injection of oncolytic vaccinia virus suppresses primary tumor growth and lung metastasis in metastatic renal cell carcinoma by remodeling tumor microenvironment. *Biomedicines* 2022; 10(1): 173. doi: 10.3390/biomedicines10010173.
127. Richters A, Aben KKH, Kiemeny LALM. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol* 2020; 38(8): 1895–1904. doi: 10.1007/s00345-019-02984-4.
128. Potts KG, Hitt MM, Moore RB. Oncolytic viruses in the treatment of bladder cancer. *Adv Urol* 2012; 2012: e404581. doi: 10.1155/2012/404581.
129. Hindupur SV, Schmid SC, Koch JA et al. STAT3/5 inhibitors suppress proliferation in bladder cancer and enhance oncolytic adenovirus therapy. *Int J Mol Sci* 2020; 21(3): 1106. doi: 10.3390/ijms21031106.
130. Hugar LA, Gilbert SM, Sexton WJ et al. Immunotherapy in Bacillus Calmette-Guerin (BCG) unresponsive nonmuscle invasive bladder cancer. *Curr Opin Urol* 2021; 31(2): 160–169. doi: 10.1097/MOU.0000000000000846.
131. Relph K, Annels N, Smith C et al. Oncolytic immunotherapy for bladder cancer using coxsackie A21 virus: using a bladder tumor precision-cut slice model system to assess viral efficacy. *Methods Mol Biol* 2020; 2058: 249–259. doi: 10.1007/978-1-4939-9794-7\_16.
132. Shang C, Zhu Y-L, Li Y-Q et al. Autophagy promotes oncolysis of an adenovirus expressing apoptin in human bladder cancer models. *Invest New Drugs* 2021; 39(4): 949–960. doi: 10.1007/s10637-021-01073-x.
133. Hu J, Othmane B, Yu A et al. 5mC regulator-mediated molecular subtypes depict the hallmarks of the tumor microenvironment and guide precision medicine in bladder cancer. *BMC Med* 2021; 19(1): 289. doi: 10.1186/s12916-021-02163-6.
134. Nelson BE, Hong A, Jana B. Elucidation of novel molecular targets for therapeutic strategies in urothelial carcinoma: a literature review. *Front Oncol* 2021; 11: 705294. doi: 10.3389/fonc.2021.705294.
135. Chiu M, Armstrong EJJ, Jennings V et al. Combination therapy with oncolytic viruses and immune checkpoint inhibitors. *Expert Opin Biol Ther* 2020; 20(6): 635–652. doi: 10.1080/14712598.2020.1729351.
136. Burke JM, Lamm DL, Meng MV et al. A first in human phase 1 study of CG0070, a GM-CSF expressing oncolytic adenovirus, for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2012; 188(6): 2391–2397. doi: 10.1016/j.juro.2012.07.097.
137. Gulley JL, Arlen PM, Tsang K-Y et al. Pilot study of vaccination with recombinant CEA-MUC-1-TRICOM poxviral-based vaccines in patients with metastatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14(10): 3060–3069. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0126.
138. Cheng G, Dong H, Yang C et al. A review on the advances and challenges of immunotherapy for head and neck cancer. *Cancer Cell Int* 2021; 21(1): 406. doi: 10.1186/s12935-021-02024-5.
139. Jones H, Green V, England J et al. Current understanding of nonsurgical interventions for refractory differentiated thyroid cancer: a systematic review. *Future Sci OA* 2021; 7(7): FSO738. doi: 10.2144/fsoa-2021-0041.

140. Gao P, Ding G, Wang L. The efficacy and safety of oncolytic viruses in the treatment of intermediate to advanced solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Transl Cancer Res* 2021; 10(10): 4290–4302. doi: 10.21037/tcr-21-905.
141. Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C et al. Phase I study of DNX-2401 (delta-24-RGD) oncolytic adenovirus: replication and immunotherapeutic effects in recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 2018; 36(14): 1419–1427. doi: 10.1200/JCO.2017.75.8219.
142. Oncolytics Biotech, Inc. [online]. Dostupné z: <https://www.oncolyticsbiotech.com>.
143. Halix. Get to know more about HALIX. [online]. Dostupné z: <https://www.halix.nl/about-halix/>.
144. Oncolys BioPharma. [online]. Dostupné z: <https://www.oncolys.com/en/>.
145. Kanaya N, Kuroda S, Kakiuchi Y et al. Immune modulation by telomerase-specific oncolytic adenovirus synergistically enhances antitumor efficacy with anti-PD1 antibody. *Mol Ther* 2020; 28(3): 794–804. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.01.003.
146. International Virotherapy Center. [online]. Dostupné z: <https://www.virotherapy.com/about-ivc.php>.
147. CeGaT. About CeGaT. [online]. Dostupné z: <https://www.cegat.com/about-cegat/>.
148. Cervera-Carrascon V, Quixabeira DCA, Havunen R et al. Comparison of clinically relevant oncolytic virus platforms for enhancing T cell therapy of solid tumors. *Mol Ther Oncolytics* 2020; 17: 47–60. doi: 10.1016/j.omto.2020.03.003.
149. Kemp V, Lamfers MLM, van der Pluijm G et al. Developing oncolytic viruses for clinical use: a consortium approach. *Cytokine Growth Factor Rev* 2020; 56: 133–140. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.06.010.