

ONKOLYTICKÉ VIRY V LÉČBĚ JATERNÍCH MALIGNIT

THE ROLE OF ONCOLYTIC VIRUSES IN THE TREATMENT OF LIVER TUMOURS

HAVLÍK R.¹, VOJÁČEK P.¹, NEORALČ.¹, KRÁL V.¹, LOVEČKOVÁ Y.², HABIB N.³

¹I. CHIRURGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLOMOUC

²ODDĚLENÍ MIKROBIOLOGIE LF UP A FN OLOMOUC

³LIVER SURGERY SECTION, HAMMERSMITH HOSPITAL, LONDÝN

Souhrn: Velké procento chirurgicky neresekabilních jaterních malignit a jejich špatné ovlivnění jinými terapeutickými modalitami vytváří nutnost hledání nových léčebných prostředků. V současnosti jsou rozvíjeny metody genové léčby. Pro nepřesvědčivé výsledky s replikace neschopnými viry, které jsou používány jako nosiče terapeutických genů, jsou dnes zkoušeny také replikačně kompetentní viry. Tyto jsou upravovány k selektivnímu napadení a ničení nádorů. Z onkolytických virů vstupují v léčbě jaterních malignit do fáze prvních klinických zkoušek geneticky upravené adenoviry a herpesviry. První preklinické i klinické studie potvrzují předpoklady jejich budoucího klinického využití. Cílem tohoto článku je podat přehled současných poznatků v možnostech ovlivnění jaterních malignit onkolytickými viry.

Klíčová slova: onkolytické viry, jaterní nádory, genová léčba.

Summary: High percentage of liver tumours are not suitable for surgical resection and there are no other effective treatment modalities for these tumours. Therefore there is need to develop some new therapeutic strategies. Currently methods of gene therapy are extensively explored. One of those represents replication competent oncolytic viruses that are engineered for selective tumour destruction. Genetically modified adenoviruses and herpesviruses are entering the first clinical trials as therapeutics tools for liver tumours. The preclinical and first preliminary clinical results hold promise for the treatment of cancer. The aim of this review is to describe current possibilities of oncolytic viruses in the treatment of liver tumours.

Key words: oncolytic viruses, liver tumours, gene therapy.

Úvod

Jaterní nádory zaujímají celosvětově v příčině úmrtí na malignitu přední místo. Obecně jde o dva hlavní typy nádorů jater. V Evropě a v USA převládají metastázy kolorektálního karcinomu, kdy u pacientů s generalizovanou nemocí má 40 % pacientů tuto generalizaci lokalizovanou pouze v játrech. V rozvojových zemích je daleko častější hepatocelulární karcinom, nejčastěji vzniklý na podkladě hepatitidy C a B. Jedinou potenciálně kurativní metodou léčby u primárních a sekundárních nádorů jater je chirurgická resekce. Bohužel u většiny pacientů jsou jaterní tumory neresekabilní pro multifokální jaterní postižení nebo pro špatnou funkci jater. Pacienti, kteří jsou nevhodní pro chirurgickou léčbu, mají velmi špatnou prognózu. Nejčastěji umírají na selhání jaterních funkcí. Jejich přežití je přímo úměrné stupni jaterního postižení (1). Pro pacienty s nádory jater, které pro svou pokročilost již nejsou indikovány k chirurgické léčbě, neexistuje v současnosti žádná efektivní terapie. Výzkum a vývoj nových léčebných metod je proto v této oblasti prioritní.

V posledních letech jsme svědky velkého pokroku v oblasti molekulární biologie, genetiky a genového inženýrství. Metody genové léčby přinášejí naději i do oblasti léčby zhoubných nádorů. Bylo zjištěno, že maligní nádor je specifický typ genetické nemoci charakterizovaný neschopností udržet v postižených buňkách neporušenost vlastní DNA. K jeho vzniku vede akumulace několika genových mutací zvláště ve skupinách genů regulujících opravu poškozené DNA a kontrolu buněčného dělení a růstu (2). Vznikly a jsou rozvíjeny metody jako je použití nádory potlačujících genů, inaktivace onkogenů, metody imunogenové terapie, antiangiogeneze a mno-

hé další. I když dnes máme k dispozici množství genů, které jsou velmi efektivní v ničení nádorových buněk, není možno dosáhnout ve všech cílových buňkách jejich vysoké exprese, což by bylo nutné k vyvolání klinického efektu (3). Základní podmínkou genové léčby je totiž transport rekombinované DNA do cílových buněk či tkání a v nich následná exprese aplikovaných genů. Bezpečný a efektivní transfer je dnes ale jedním z hlavních limitujících faktorů genové léčby. Obecně lze transportní systémy rozdělit na virové a nevirové. Nevirové nosiče (vektory) jsou bezpečné, jednoduché a stabilní, ale jejich efektivita je ve srovnání s virovými vektory poměrně malá. Virové vektory jsou pro přenos terapeutických genů používány již delší dobu a mají některé vlastnosti, hlavně dobrý průnik do buněk, lepší než nosiče nevirové. Strategie genové léčby jaterních malignit, které používají virové replikace neschopné vektory, jsou následující: substituce nádory potlačujících genů, metody suicidální genové léčby a imunogenové terapie. Pokroky na poli rekombinovaných virů jako nosičů léčebných genů byly podkladem pro vytvoření nových přístupů v léčbě malignit a využity až v používání virů schopných replikace. Novou metodou je používání replikace schopných geneticky upravených (rekombinovaných) virů, které svou replikací způsobují zničení hostitelské buňky. Viry jsou totiž přirozeně cytotoxické a navíc některé, jako například adenoviry, mají afinitu k epitelovým buňkám ze kterých vzniká většina nádorů. Díky množení a následnému infikování sousedních, dosud nenapadených buněk, dochází k významnému znásobení podané dávky (4). Pro tyto replikačně kompetentní viry, vyvíjené k přímému ničení nádorových buněk, se dnes používá označení onkolytické viry. Cílem tohoto článku

je podat přehled o současných poznatcích v možnostech ovlivnění jaterních malignit onkolytickými viry.

Historie používání virů v léčbě malignit

Úvahy o možnosti využití virů k léčbě nádorů vznikly již na počátku dvacátého století, a to na základě pozorování občasných regrese tumorů u pacientů, kteří prodělali virózu. V padesátých letech pak bylo provedeno několik klinických studií, při nichž byly k ničení nádorů využity adenoviry. V jedné z nich bylo použito 10 různých sérotypů adenoviru u pacientek s nádory děložního čípku (5). Tyto byly podány lokálně přímo do tumoru, intraarteriálně nebo intravenózně. Ke snížení aktivity neutralizujících protilátek byly současně podávány kortikosteroidy. Žádné větší toxické ani alergické účinky nebyly pozorovány. Některé pacientky však prodělaly mírnou virózu, která bez další léčby po dvou až sedmi dnech ustoupila. Adenovirus se následně podařilo identifikovat ve dvou třetinách tumorů, a to i ve vzorcích odebraných po 14 dnech od podání viru. U několika pacientek došlo k regresi tumoru. Poprvé tak bylo demonstrováno, že podání adenoviru je bezpečné, a že adenovirus může působit nekrózu nádoru. Nicméně nepřesvědčivé klinické výsledky vedly přechodně k upuštění od využití virů při léčbě nádorů.

Životní cyklus virů

Virovou částici můžeme zjednodušeně popsat jako "organellu", která je vhodně přizpůsobená k přenosu nukleové kyseliny mezi buňkami (6).

Životní cyklus adenoviru lze rozdělit do následujících etap (obr. č.1) (7):

1. Uchycení na buňce a následný průnik do hostitelské buňky (endocytóza), při kterém se virus zbaví obalu chránícího jeho genom.
2. Zablokování syntézy buněčných proteinů hostitelské buňky a zamezení v její apoptóze.
3. Replikace virové DNA.
4. Syntéza nových virových proteinů. Nově tvořené virové proteiny jsou buď budoucí částí nových virionů (strukturální proteiny), nebo plní funkce enzymů či regulátorů v metabolismu hostitelské buňky a při replikaci viru (nestrukturální proteiny).
5. Nahromadění virionů (dceřinných virových částic) v hostitelské buňce.
6. Případná smrt hostitelské buňky a postupné uvolnění nových virů.

Jeden replikační cyklus u adenoviru trvá přibližně 8 hodin. Podle doby exprese adenovirových genů, které kódují mRNA a proteiny, se tyto geny dělí na časné a pozdní. Hranicí mezi nimi je začátek replikace virové DNA. Časné geny (E - early) jsou exprimované ještě před započetím transkripce virové DNA, zatímco pozdní (L - late) až po začátku její transkripce (obr. č.2). Regulace transkripce jednotlivých genových skupin je kaskádová. Proteinové produkty jedné genové skupiny aktivují transkripci další oblasti. Transkripce časných genů E1-E4 je navíc regulována promotory. To znamená, že teprve aktivace promotoru umožňuje přepis určité oblasti genomu. Proteiny vznikající transkripcí virového genomu lze rozdělit na strukturální a nestrukturální. Strukturální jsou použity k vytvoření nových virionů. Nestrukturální mají důležitou roli ve vzájemné interakci mezi virem a hostitelskou buňkou, v níž inaktivují proteiny, které by bránily ve virové replikaci. Mezi tyto buněčné proteiny, které virus během svého množení inaktivuje, patří například p53 a pRb.

Na usmrcení nádorové buňky napadené onkolytickým virem se podílí několik mechanismů. Jedním z nich je produkce cytotoxických proteinů, které virus produkuje na konci svého replikačního cyklu. Jde o E3-11,6 smrtící protein a E4ORF4 protein (7,8). Odstranění genů, které kódují výše uvedené cytotoxické proteiny, oddálí smrt infikovaných buněk. Dalším mechanismem je navození vysoké senzitivity hostitelské buňky na tumor nekrotizující faktor, který pak může působit její

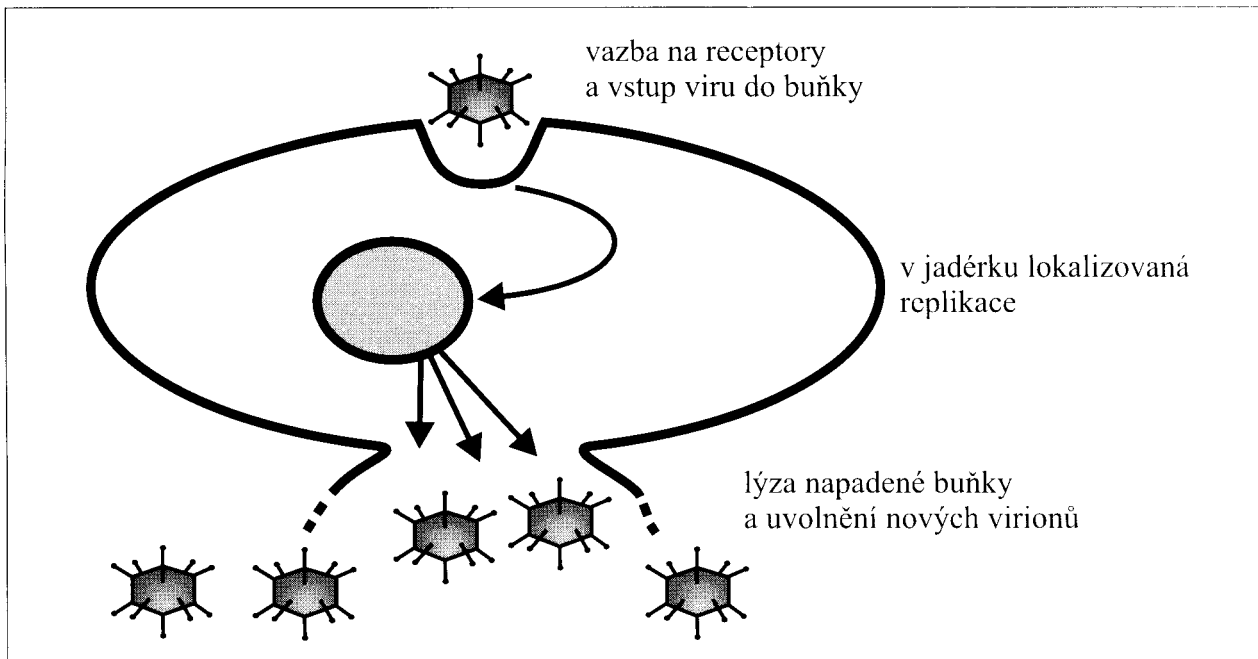
zničení. Citlivost na ničení tumor nekrotizujícím faktorem je zprostředkována proteiny, které jsou kódovány v E1A oblasti adenovirového genomu (9). Virová infekce a lýza nádorových buněk navíc vyvolává buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám (10,11).

Optimalizace nádorově selektivní replikace

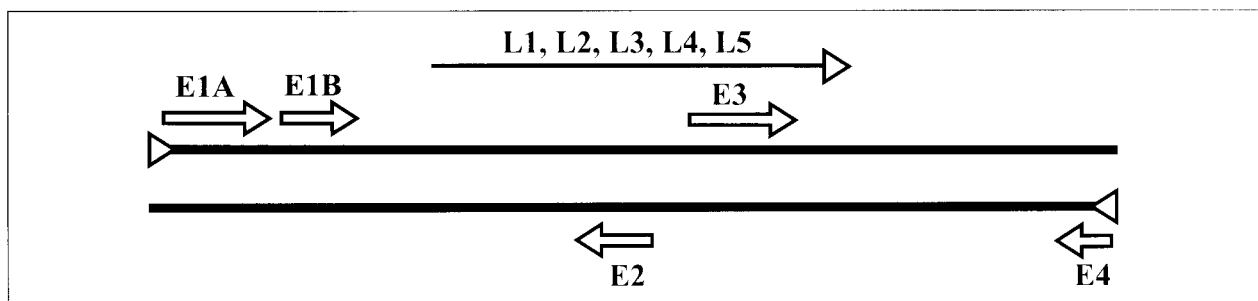
S rozvojem nových molekulárně biologických poznatků v oblasti interakce viru a hostitelské buňky jsou dnes zkoušeny a vyvíjeny jako selektivně se replikující protinádorové prostředky hlavně geneticky upravené adenoviry a herpesviry. Ty dovedou velmi dobře pronikat do buněk. Do genomu hostitelské buňky se neintegrují a jejich exprese je proto dočasná. U onkolytických virů není trvalá exprese nutná, neboť i jejich dočasné působení stačí ke zničení (cytolýze) hostitelské buňky. Výhodami aplikace replikačně kompetentních virů je znásození podané dávky a možnost šíření do sousedních, dosud neinfikovaných nádorových buněk (12). V současnosti se tyto viry upravují tak, aby byly toxicitější k nádorovým buňkám a než k normálním tkáním.

K navození nádorově selektivní virové replikace jsou zkoumány dvě metody. První metodou je omezení exprese jen na nádorové buňky. Časné nestrukturální proteiny kódované v E1 oblasti genomu adenoviru aktivují jak virové tak i buněčné geny, které jsou nutné pro efektivní virovou infekci. Také blokují různé buněčné proteiny, bránící množení viru. Tak vlastně až teprve správná transkripce této oblasti adenovirového genomu umožní jeho množení (13). Vložení promotoru před E1 oblast omezí její transkripci jen na buňky, které jsou schopny tento promotor aktivovat. Organově nebo nádorově specifické promotory tak umožní replikaci viru jen na určité cílové tkáni. Například vložený CEA (carcinom embryonální antigen) či AFP (alfa fetoprotein) jako promotor před E1A oblast umožňuje transkripci této části virového genomu, a tím replikaci viru jen v buňkách, které mají CEA či AFP (14,15). Vložím více promotorů pak lze tuto specifitu dále zvyšovat. Jako příklad lze uvést použití albuminu a AFP jako promotorů, které omezí replikaci jen na nádory vzniklé z hepatocytů a již nezasáhnou další AFP pozitivní buňky (14).

Druhou strategií, vedoucí k selektivní replikaci, je odstranění či zablokování genů důležitých pro replikaci viru v normálních buňkách, které ale neovlivňují jeho množení v nádorových buňkách. K úspěšné replikaci musí virus v hostitelské buňce inaktivovat určité proteiny, jako p53 či pRb (protein retinoblastom). Oba tyto proteiny patří mezi důležité regulátory buněčného cyklu, ale také brání ve virové replikaci. V mnohých nádorových buňkách však tyto proteiny nejsou přítomné, neboť jsou při karcinogenezi inaktivovány (16,17). Například delece či mutace p53 byla identifikována zhruba u 50 % všech tumorů, včetně tumorů jater (18,19). Protein p53 je odpovědný za kontrolu integrity genomu (20). Porucha ve struktuře DNA vede k produkci proteinu p53. Jeho zvýšená koncentrace pak vede buď k pozastavení buněčného cyklu během něhož je porucha DNA opravena, nebo k apoptóze (buněčná smrt), pokud je porucha DNA větší a buňka ji nedovede opravit. Jednoduše řečeno protein p53 má roli určité záchranné brzdy ve vztahu ke vzniku genetických mutací, a tím ke vzniku nádorů. U viry infikovaných buněk pak p53 dokáže bránit virové replikaci. Adenovirus produkuje polypeptid, který p53 váže a inaktivuje. Tím je umožněna replikace adenoviru v hostitelské buňce. Tento polypeptid má molekulovou váhu 55000 a je zakódován v E1B oblasti adenovirového genomu. Adenovirus s chybějícími geny v E1B oblasti, později nazvaný dl1520, byl vyvinut k léčbě nádorů s poruchou p53 (16). Teoreticky pak tento virus není schopen vyvázat p53, a proto se nemůže množit v buňkách s funkčním p53. Naopak v buňkách s porušeným p53 se tento virus může normálně replikovat a napadené buňky ničit. Jak již bylo uvedeno, porucha p53 je přítomna zhruba u 50 % všech nádorů, včetně nádorů jater. Obdobně lze využít i jiný



Obr. č. 1: Schéma životního cyklu adenoviru.



Obr. č. 2: Schéma struktury adenovirového genomu. E1A, E1B, E2, E3, E4 – oblasti časných genů, kódujících časné proteiny; L1-L5 – oblasti pozdních genů, které kódují pozdní proteiny.

nádorový supresor pRb, který také brání efektivní virové infekci a je inaktivován proteinem produkovaným v E1A oblasti adenoviru. Nicméně vztah mezi replikujícím se virem a hostitelskou nádorovou buňkou je složitější a hraje v něm roli i dosud nepoznané mechanismy, neboť mutanty adenoviru s chybějící E1A oblastí mají jak v nádorových kulturách tak i in vivo signifikantně větší protinádorový potenciál než přirozené typy adenovirů (21).

Ovlivnění jaterních nádorů onkolytickými viry; preklinické a klinické studie

Herpes viry

Herpes simplex virus (HSV) je obalený DNA virus s dvojitým řetězcem DNA. Po napadení buňky zůstává extrachromozomálně a jeho exprese proto není trvalá. HSV byl nejdříve používán jako replikace neschopný vektor, který mohl do buněk dopravit jakýkoliv terapeutický gen. Onkolytické replikace schopné mutanty viru herpes simplex byly prvotně vyvíjeny pro léčbu neurologických malignit, jelikož wild-typ (normální typ) HSV je přirozeně neurotropní (22). Později bylo zjištěno, že mají schopnost působit i na mnoho jiných typů nádorů (23,24). Například hrR3 je HSV s mutovanou ribonukleoid reduktázou a mutantu G207 ribonukleoid reduktáza zcela chybí (25,26). Hladina ribonukleoid reduktázy je v nedělicích se buňkách poměrně nízká, zatímco nádorové buňky, včetně jaterních tumorů a metastáz kolorektálního karcinomu, mají vyso-

ké hodnoty tohoto enzymu. Protože HSV pro svou replikaci ribonukleoid reduktázu potřebuje, a mutanty hrR3, G207 a Rp450 ji nedovedou tvořit, metabolicky aktivní nádorové buňky s vysokou hladinou endogenní ribonukleotid reduktázy tak vytvářejí pro tyto mutované viry prostředí umožňující jejich replikaci. Všechny tyto viry in vitro vykazují výraznou onkolytickou aktivitu proti mnohým kolorektálním i hepatocelulárním buněčným liniím (23,24). Příznivé výsledky byly dosaženy také in vivo na zvířecích modelech s jaterními tumorů. Jediná nitronádorová injekce hrR3 výrazně omezila růst kolorektálních nádorů u laboratorních zvířat (23). Stejně povzbudivé výsledky byly dosaženy i s G207 na zvířecích modelech se subkutánně implantovanými či jaterními nádory (27). Virus G207 signifikantně snižoval růst těchto tumorů v porovnání s kontrolní skupinou zvířat. Na synergickém modelu jaterních nádorů pak portální infuze vedla k výrazné redukcí počtu vzniklých jaterních nádorů (27). Také bylo zjištěno, že po portální aplikaci mají tyto mutované herpesviry selektivní afinitu k jaterním tumorům s výrazným protinádorovým účinkem, zatímco žádná virová replikace v normálním jaterním parenchymu nebyla prokázána (24). Poslední studie prokázaly i na imuno-kompetentních myších s difúzními jaterními metastázami významnou redukcí nádorů po jedné nitrožilní aplikaci hrR3 (28). Zjištění, že onkolytické herpes viry působí stejně u imuno-deficientních i imuno-kompetentních zvířat naznačuje, že právě virem zprostředkovaná onkolyza je

hlavním mechanismem ničení nádorů, a nikoliv imunitní reakce organismu (28). Další studie zjistila, že tvorba virionů mutantu rP450 je v buňkách hepatocelulárního karcinomu 103-104 větší než v infikovaných normálních hepatocytech. Tato efektivnější replikace je pak spojena s velkou redukcí hepatocelulárních tumorů laboratorních zvířat už i po jedné intravaskulární aplikaci (29).

Adenoviry

Adenoviry jsou lidské patogeny s afinitou k epitelialním buňkám, ze kterých vzniká většina nádorů. Jsou to DNA viry s dvojítm řetězcem DNA, které se stejně jako herpes viry neintegrují do genomu hostitelské buňky, a proto exprese jejich genových produktů není trvalá. Vyjmutí některých časných genů v genomu adenoviru zabrání jejich replikaci v určitých, například nenádorových buňkách, jak již bylo uvedeno.

V roce 1996 Bischoff a kol. představili E1B-deficientní adenovirus (16,30). Protinádorový efekt tohoto E1B deficientního adenoviru byl in vivo zkoumán na subkutánně vytvořených nádorech u SCID myši. Bylo dosaženo signifikantního zpomalení růstu Hep3B xenograftů (Hep3B je buněčná linie hepatocelulárního karcinomu s chybějícím p53). Xenografty vytvořené z HepG2 (buněčná linie hepatocelulárního karcinomu s wild-type p53) potřebovaly ke své regresi větších dávek tohoto onkolytického adenoviru (31). To zapadá do teorie působení E1B mutovaného adenoviru, které je zprostředkováno nemožností vyvázat p53 v hostitelských buňkách.

Klinické studie s E1B-deficientním adenovirem

Studie s E1B-deficientním rekombinovaným adenovirem (dl1520) byla provedena na 16 pacientech s cílem stanovení toxicity a efektivity (32,33). V klinické studii 1. fáze byl adenovirus podán přímo intratumorálně u pacientů s hepatocelulárními nádory a pomocí arteriálního portu či intravenózně u pacientů s kolorektálními jaterními metastázami. Podaná dávka byla dobře tolerována až do dávky 3×10^{11} pfu. Elektronmikroskopické vyšetření nádorových tkání prokázalo pří-

tomnost adenoviru v buněčné cytoplazmě v okolí jádérka a také prokázalo buněčnou smrt způsobenou virovou infekcí. Klinická studie 2. fáze zjistila dobrou toleranci kombinace dl1520 s chemoterapeutikem 5-fluorouracilem. Oba preparáty byly podávány cestou hepatické arterie sedmi pacientům s kolorektálními jaterními metastázami. Po třech měsících měl jeden z těchto pacientů progresi jaterního onemocnění, u ostatních šesti pacientů byl CT a klinický náález neměnný. Zlepšení však nebylo prokázáno u žádného z těchto nemocných (32,33).

Závěr

Geneticky upravené replikace neschopné viry jsou jako nosiče terapeutických genů v genové léčbě nádorů používány již delší dobu. Nově jsou dnes testovány replikace schopné viry, neboť jejich replikace uvnitř nádorových buněk může způsobovat zničení těchto napadených buněk. Tyto onkolytické viry jsou upravovány k selektivnímu napadení a efektivnějšímu ničení nádorových buněk. Po přímé aplikaci do nádorů byl preklinicky i klinicky zjištěn příznivý vliv na destrukci celé řady solidních nádorů, včetně jaterních. Jelikož je možné a již i ověřené i systémové podání onkolytických virů, například nitrožilně, může být jejich předností působení nejen na solidní nádory, ale i ničení nádorové diseminace. Pro dosažení větší efektivity a snížení celkové toxicity onkolytických virů jsou intenzivně zkoumány zejména oblasti jejich přežívání v krevním oběhu, cílené napadení jen nádorových buněk, selektivní množení v těchto buňkách, laterální šíření z jedné nádorové buňky na druhou a interakce s imunitním systémem, který pak může potencovat jejich účinnost. Klinicky bylo potvrzeno, že nízké dávky těchto virů jsou bezpečné a účinné. V současnosti probíhá několik klinických studií navržených k léčbě jaterních nádorů. V blízké budoucnosti budou pravděpodobně onkolytické viry nejdříve používány v kombinaci s chemoterapeutiky nebo k potencování jiných metod genové léčby.

Tento článek byl částečně podporován výzkumným záměrem MSM 151100002.

Literatura

1. Woods C.M., Gillis C.R., Blumgart L.H.: A retrospective study of the natural history of patients with liver metastases from colorectal cancer. *Clin. Oncol.* 2, 1976, 285-288.
2. Solomon E., Borrow J., Goddard A.D.: Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254, 1991, 1153-1160.
3. Vile R.G., Russell S.J., Lemoine N.R.: Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Therapy* 7, 2000, 2-8.
4. Russell S.J.: Replicating vectors for cancer therapy: a question of strategy. *Sem Cancer Biol* 5, 1994, 437-443.
5. Smith R.R., Huebner R.J., Rowe W.P. et al.: Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* 9, 1956, 1211-1218.
6. Zemla J., Ciampor R., Leško J.: Všeobecná virológiá. Slovak Academic Press 1995, s. 27.
7. Tollefson A.E., Ryerse J.S., Scaria A. et al.: The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 220, 1996, 152-162.
8. Branton P.: Early gene expression. In *Adenoviruses: basic biology to gene therapy*. P. Seth, editor. R.G. Landes, Austin, USA, 1999, 39-58.
9. Heise C., Williams A., Olesch J. et al.: Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects. *Cancer Gene Ther.* 6, 1999, 499-504.
10. Gooding L.R.: regulation of TNF-mediated cell death and inflammation by human adenoviruses. *Infect. Agents Dis.* 3, 1994, 106-115.
11. Shisler J., Duerksen H.P., Hermiston T.M. et al.: Induction of susceptibility to tumor necrosis factor by E1A is dependent on binding to either p300 or p105-Rb and induction of DNA synthesis. *J. Virol.* 70, 1996, 68-77.
12. Kim D.H., McCormick R.: Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol. Med. Today* 2, 1996, 519-527.
13. Whyte P., Ruley H., Harlow E.: Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J. Virol.* 62, 1998, 257-265.
14. Huber BE, Richard CA, Krenitsky TA: Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 8039-8043.
15. Osaki T, Tanio Y, Tachibana I et al.: Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Res* 1994, 54, 5258-5261.
16. Barker D.D., Berk A.J.: Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* 156, 1996, 107-121.
17. Sherr C.J.: Cancer cell cycles. *Science* 274, 1996, 1672-1677.
18. Honda K, Sbisá E, Tullo A et al.: P53 mutation is a poor prognostic indicator for survival in patients with hepatocellular carcinoma undergoing surgical tumour ablation. *Br J Cancer* 1998, 77, 776-782.
19. Havlík R., Sbisá E., Tullo A. et al.: Results of resection for hilar cholangiocarcinoma with analysis of prognostic factors. *Hepatogastroenterology* 2000, 47, 927-31.
20. Lane DP: P53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 358, 15-16.
21. Heise C., Hermiston T., Johnson L. et al.: An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 6, 2000, 1134-9.
22. Mineta T., Rabkin S.D., Yazaki T. et al.: Attenuated multimitated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1, 1995, 938-943.
23. Yoon S.S., Carroll N.M., Chiocca E.A. et al.: Cancer gene therapy using a replication-competent herpes simplex virus type 1 vector. *Ann. Surg.* 228, 1998, 366-374.
24. Carroll N.M., Chiocca E.A., Takahashi K. et al.: Enhancement of gene therapy specificity for diffuse colon carcinoma liver metastases with recombinant herpes simplex virus. *Ann. Surg.* 224, 1996, 323-329.
25. Goldstein D.J., Weller S.K.: Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. *J. Virol.* 62, 1988, 196-205.
26. Yazaki T., Manz H.J., Rabkin S.D. et al.: Treatment of human malignant meningiomas by G207, a replication-competent multimitated herpes simplex virus 1. *Cancer Research* 55, 1995, 4752-4756.

27. Kooby D.A., Carew J.F., Halterman M.W. et al.: Oncolytic viral therapy for human colorectal cancer and liver metastases using a multi-mutated herpes simplex virus type-1 (G207). *FASEB J* 13, 1999, 1325-1334.
28. Yoon S.S., Nakamura H., Carroll N.M. et al.: An oncolytic herpes simplex virus type 1 selectively destroys diffuse liver metastases from colon carcinoma. *FASEB J* 14, 2000, 301-311.
29. Pawlik T.M., Nakamura H., Yoon S.S. et al.: Oncolysis of diffuse hepatocellular carcinoma by intravascular administration of a replication-competent, genetically engineered herpesvirus. *Cancer Res* 60, 2000, 2790-2795.
30. Bischoff J.R., Kim D.H., Williams A.: An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274, 1996, 373-376.
31. Vollmer C.M., Ribas A., Butterfield L.H. et al.: p53 selective and nonselective replication of an E1B-deleted adenovirus in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 59, 1999, 4369-4374.
32. Habib N.A., Sarraf C.E., Mitry R.R., Havlik R. et al.: E1B deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for patients with primary and secondary liver tumours. *Hum Gen Ther.* 2001, 12, 219-226.
33. Havlik R., Sarraf C.E., Mitry R.R. et al.: Gene therapy of primary and secondary liver tumors using E1B-deleted adenovirus: phase I/II clinical trial. *Proceedings of American Association for Cancer Research* 41, 2000, 505.

27. Kooby D.A., Carew J.F., Halterman M.W. et al.: Oncolytic viral therapy for human colorectal cancer and liver metastases using a multi-mutated herpes simplex virus type-1 (G207). *FASEB J* 13, 1999, 1325-1334.
28. Yoon S.S., Nakamura H., Carroll N.M. et al.: An oncolytic herpes simplex virus type 1 selectively destroys diffuse liver metastases from colon carcinoma. *FASEB J* 14, 2000, 301-311.
29. Pawlik T.M., Nakamura H., Yoon S.S. et al.: Oncolysis of diffuse hepatocellular carcinoma by intravascular administration of a replication-competent, genetically engineered herpesvirus. *Cancer Res* 60, 2000, 2790-2795.
30. Bischoff J.R., Kim D.H., Williams A.: An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274, 1996, 373-376.
31. Vollmer C.M., Ribas A., Butterfield L.H. et al.: p53 selective and nonselective replication of an E1B-deleted adenovirus in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 59, 1999, 4369-4374.
32. Habib N.A., Sarraf C.E., Mitry R.R., Havlík R. et al.: E1B deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for patients with primary and secondary liver tumours. *Hum Gen Ther.* 2001, 12, 219-226.
33. Havlík R., Sarraf C.E., Mitry R.R. et al.: Gene therapy of primary and secondary liver tumors using E1B-deleted adenovirus: phase I/II clinical trial. *Proceedings of American Association for Cancer Research* 41, 2000, 505.