

◇综述◇

肿瘤治疗的新突破:溶瘤病毒治疗

喻启桂

(美国印第安纳大学医学院微生物与免疫学系,美国 印第安纳波利斯 IN46202)

摘要:溶瘤病毒通过感染癌细胞,引起病毒性细胞病变并诱发宿主抗肿瘤免疫反应,从而选择性感染和杀死癌细胞。美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲药物管理局(EMA)最近批准了世界上第一个用于治疗恶性黑色素瘤的溶瘤病毒制剂,命名为 Imlygic。Imlygic 为表达人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)活病毒颗粒,经直接注射入肿瘤组织引起肿瘤细胞裂解和机体抗肿瘤免疫双重效应。除了 HSV-1 外,尚有许多不同类型的病毒已经进入临床试验,评估其生物安全性和抗肿瘤疗效。这些正在临床试验的溶瘤病毒包括腺病毒、痘病毒、麻疹病毒和呼肠孤病毒等。治疗的肿瘤包括卵巢癌、腹膜癌、肝癌、胶质瘤和黑色素瘤等。目前,溶瘤病毒治疗肿瘤的临床试验约有 67 项,一些临床试验已经取得了有希望的结果,从而进展到第三期临床试验。该文重点讨论目前正在临床试验中用于治疗各类癌症的溶瘤病毒,并讨论这些溶瘤病毒作为一类新的癌症治疗药物的机遇和挑战。

关键词:溶瘤病毒;单纯疱疹病毒 I 型;癌症;临床试验

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.01.001

New breakthrough in cancer treatment: oncolytic virus therapy

YU Qigui

(Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine,
Indianapolis, Indiana 46202, USA)

Abstract: Oncolytic viruses are viruses that preferentially infect and kill cancer cells by viral cytopathic effects (CPEs), host immune responses, or both. The US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) have recently approved Imlygic (a genetically modified live oncolytic herpes simple virus) for the treatment of melanoma lesions in the skin and lymph nodes. Imlygic is the first approved oncolytic virus agent, which is directly injected into the melanoma lesions where the oncolytic virus replicates inside cancer cells and causes the cells to rupture and die. Oncolytic viruses have been developed from many different types of viruses including adenovirus, vaccinia virus, herpes simplex virus 1, measles virus, and reovirus. In addition, advances in molecular engineering have allowed for manipulation of the viral genome to both make them safer by deleting viral genes involved in pathogenesis and by insertion of anti-tumor genes to enhance antitumor activity. Many oncolytic viruses have now been tested in clinical trials with varying degrees of success against a number of different cancer types including ovarian cancer, peritoneal carcinomatosis, primary hepatocellular carcinoma, glioblastoma, gliosarcoma, and melanoma. The field of oncolytic virus therapy has expanded rapidly over the past decade. Currently, there are more than 67 clinical trials of oncolytic viruses and some clinical trials have yielded promising results, thereby progressing to late stage clinical development. This review focuses on oncolytic viruses that are currently in clinical trials for treatment of various types of cancer. The challenges and perspectives for further research in the field of oncolytic virus therapy are also discussed.

Keywords: oncolytic viruses; HSV-1; cancer; clinical trial

溶瘤病毒治疗肿瘤取得了新的重大突破。2015 年 10 月,美国食品药品监督管理局(U. S. Food and Drug Administration, FDA)和欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)几乎同时批准了用基因工程改造的单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)治疗晚期黑色素瘤^[1]。这是迄今为止世界上第一个溶瘤病毒的药物,其名称为 Talimogene Laherparepvec (T-VEC)或 Imlygic。Imlygic 由总部位于美国加利福尼亚州千橡市(Thousand Oaks, California)的美国

Amgen 公司研发(图 1)。Imlygic 为表达人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的 HSV-1 活病毒颗粒,有 10^6 PFU · mL⁻¹ 和 10^8 PFU · mL⁻¹ 两剂型(图 1)。给药途径为直接肿瘤内注射,进入肿瘤组织内的 HSV-1 活病毒高效感染肿瘤细胞,细胞随之裂解死亡。裂解的肿瘤细胞释放出肿瘤相关抗原,在 GM-CSF 作为细胞因子免疫佐剂的作用下,激发机体抗肿瘤的免疫反应,进一步提高抗肿瘤的疗效。



注: Imlygic 有 10^6 PFU $\cdot$ mL $^{-1}$ (左) 和 10^8 PFU $\cdot$ mL $^{-1}$ (右) 两剂型。

图1 美国 FDA 和欧洲药物管理局 (EMA) 批准的第一个溶瘤病毒的药物 Imlygic

病毒感染可分为细胞裂解性感染和持续性感染。细胞裂解性感染由病毒感染引起细胞病变和细胞毒性免疫效应,最终裂解或杀伤感染的细胞,其结果是病毒被感染宿主清除或者感染宿主死亡。痘病毒等仅引起急性感染,病毒快速大量复制,导致感染的细胞迅速裂解,同时诱发机体产生强烈的免疫应答,病毒从感染宿主体内被彻底清除或者感染宿主死亡。持续性感染常发生在原发性感染没有被获得性免疫反应彻底清除,感染持续很长时间,甚至终生。持续性病毒感染有三种重叠类型即潜伏感染、慢性感染和慢发性感染。艾滋病毒 (HIV)、乙型肝炎病毒 (HBV) 和丙型肝炎病毒 (HCV) 等能引起典型的持续性感染。此外,有些病毒如腺病毒等既能引起急性细胞裂解性感染,也能导致长期潜伏感染,尽管其致长期潜伏感染的效率极低。很显然,用于肿瘤治疗的溶瘤病毒应为细胞裂解性感染的病毒,而不是持续性感染的病毒。如用溶瘤病毒治疗作关键词检索美国国立卫生研究院 (U. S. National Institutes of Health, NIH) 的临床试验政府网 (<https://ClinicalTrials.gov>), 到目前为止 (2017 年 3 月 28 日), 该网共列出 134 项溶瘤病毒治疗肿瘤的临床试验信息。ClinicalTrials.gov 是世界最具有权威的药品临床试验的美国官方网,其数据库提供了由世界各地公有和私有团体资助的在人体进行的临床研究注册和结果资讯。目前共列出美国 50 个州和世界上 196 个国家的 239 101 份临床研究。因此,仅溶瘤病毒治疗肿瘤的临床研究一项,就占总的药物临床研究的万分之 5.6,且绝大多数是近 2~3 年开展的,充分说明溶瘤病毒治疗肿瘤具有新的生命力。本文对 NIH 临床试验政府网注册的溶瘤病毒治疗肿瘤的临床试验进行梳理,分析和归纳,并从病毒学和免疫学的角度对用于治疗肿瘤的重要的溶瘤病毒如腺病毒、痘病毒和单纯疱疹病毒进行阐述,探讨溶瘤病毒作为一类新的癌

症治疗药物的机遇和挑战。

1 目前 NIH 临床试验政府网注册的溶瘤病毒治疗肿瘤的临床试验概括

溶瘤病毒代表新一类治疗肿瘤的生物制剂。溶瘤病毒通过选择性感染并杀伤肿瘤细胞及诱导和增强机体抗肿瘤免疫双重功能控制或清除体内肿瘤^[2],尤其是不适用手术和放化疗治疗的晚期肿瘤 (表 1)。用于治疗肿瘤的溶瘤病毒可为原生型和基因工程改造型病毒。此外,病毒的基因组中可插入人细胞因子基因,以表达人的细胞因子如 GM-CSF,作为免疫佐剂增强机体抗肿瘤免疫功能。目前 NIH 临床试验政府网注册的治疗肿瘤的溶瘤病毒主要有八类:腺病毒、柯萨奇病毒、HSV-1、麻疹病毒、新城疫病毒、呼肠孤病毒、水泡型口炎病毒和痘苗病毒 (表 1)。根据病毒基因组的组成不同,这些溶瘤病毒可分为 DNA 和 RNA 病毒。腺病毒、单纯疱疹病毒 (HSV) 和痘苗病毒为 DNA 病毒,其病毒基因组为线性双链 DNA。柯萨奇病毒、麻疹病毒、新城疫病毒、呼肠孤病毒和水泡型口炎病毒为 RNA 病毒,其病毒基因组为单链或双链 RNA。

溶瘤病毒给药方式或途径包括肿瘤内直接注射、静脉注射、腹膜内注射、胸膜内注射和脑内注射。可经溶瘤病毒治疗的肿瘤范围很广,但主要为实体瘤包括原发性和转移性胰腺癌、卵巢癌、输卵管癌、膀胱癌、黑色素瘤、肝癌、肺癌、胶质瘤、前列腺癌、多发性骨髓瘤、乳腺癌、结肠癌、头颈癌、恶性胸膜间皮瘤、恶性外周神经鞘外肿瘤、腹膜癌和其它恶性实体肿瘤 (表 1)。值得关注的是,用溶瘤病毒治疗的肿瘤范围很广,但绝大多数的临床试验尚处在临床 I~II 期,真正进入临床 III 期的只有两项即用腺病毒治疗非肌肉侵袭性膀胱癌 (NCT01438112) 和用痘苗病毒治疗晚期肝癌 (NCT02562755)。实际上,腺病毒治疗非肌肉侵袭性膀胱癌的项目 (NCT01438112) 因研究设计需要调整而提前终止。因此,目前只有痘苗病毒治疗晚期肝癌的项目 (NCT02562755) 尚在临床 III 期。项目始于 2015 年 10 月,计划于 2019 年 10 月结束,试验性治疗 600 例从未接受过全身治疗的晚期肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者。总之,溶瘤病毒治疗肿瘤的机遇和挑战并存。一方面,众多临床 I~II 期的项目正在展开,说明溶瘤病毒作为一类新的癌症治疗药物正在兴起且呈现出勃勃生机,具有新的生命力。另一方面,能进入临床 III 期的项目不多,说明该类癌症治疗药物的适应证、疗效和副作用等均需深入探索。

表1 正在临床试验中用于治疗各种类型癌症的溶瘤病毒

病毒	癌症种类	研究机构	临床试验编号	试验进展分期
腺病毒	胰腺癌	LokonPharma AB	NCT02705196	1/2a 期
	卵巢癌	UAB	NCT00562003	1 期
	复发性胶质母细胞瘤	Erasmus Medical Center	NCT01582516	1/2 期
	局部晚期或转移性黑色素瘤	InstitutCatal�d'Oncologia	NCT01864759	2 期
	新诊断的恶性胶质瘤	Northwestern University	NCT03072134	1 期
	非肌肉侵袭性膀胱癌	Cold Genesys, Inc.	NCT01438112	2/3 期
	晚期癌症	Baylor College of Medicine	NCT01437280	1 期
	恶性实体瘤	TargovaxOy	NCT01598129	1 期
	切除原发性肿瘤	PsiOxus Therapeutics Ltd	NCT02053220	1 期
	复发性胶质母细胞瘤或胶质肉瘤	DNatrix, Inc.	NCT02798406	2 期
	复发性胶质母细胞瘤或胶质肉瘤	DNatrix, Inc.	NCT02197169	1b 期
	首次复发的胶质母细胞瘤	Universidad de Navarra	NCT01956734	1 期
	高级别的非肌肉侵袭性膀胱癌	Cold Genesys, Inc.	NCT02143804	2 期
	晚期或者不可切除的黑色素瘤	TargovaxOy	NCT03003676	1 期
	局部复发性前列腺癌	Henry Ford Health System	NCT02555397	1 期
	转移性非小细胞肺癌	Turnstone Biologics, Inc.	NCT02879760	1/2 期
	非小细胞肺癌	Benjamin Movsas, M. D.	NCT03029871	1 期
	晚期/转移性实体瘤	Canadian Cancer Trials Group	NCT02285816	1/2 期
	晚期实体瘤	VCN Biosciences, S. L.	NCT02045602	1 期
	晚期胰腺癌	VCN Biosciences, S. L.	NCT02045589	1 期
柯萨奇病毒	头颈鳞状细胞癌	Viralytics	NCT00832559	1 期
	4 期黑色素瘤	Viralytics	NCT00438009	1 期
	4 期恶性黑色素瘤	Viralytics	NCT01227551	2 期
单纯疱疹病毒 I 型	顽固性头颈癌或实体瘤	Takara Bio Inc.	NCT01017185	1 期
	顽固性或复发性高级别胶质瘤	Pediatric Brain Tumor Consortium	NCT02031965	1 期
	不能手术的恶性胸膜间皮瘤	Virtu Biologics Limited	NCT01721018	1/2a 期
	顽固性非中枢神经系统实体瘤	Timothy Cripe	NCT00931931	1 期
	复发性恶性胶质瘤	MediGene	NCT00028158	1b/2 期
	不可切除或转移性恶性黑色素瘤	Takara Bio Inc.	NCT02272855	2 期
	3C 或者 4 期恶性黑色素瘤	BioVex Limited	NCT00289016	2 期
麻疹病毒	顽固性多发性骨髓瘤	University of Arkansas	NCT02192775	2 期
	卵巢上皮癌或原发性腹膜间皮瘤	Mayo Clinic	NCT00408590	1 期
	恶性胸膜间皮瘤	Mayo Clinic	NCT00408590	1 期
	转移性非小细胞肺癌	Vyriad, Inc	NCT02919449	1 期
	头颈癌或转移性乳腺癌	Mayo Clinic	NCT01846091	1 期
	复发性多形性胶质母细胞瘤	Mayo Clinic	NCT00390299	1 期
	复发性卵巢癌	Mayo Clinic	NCT02068794	1/2 期
	复发性或顽固多发性骨髓瘤	Mayo Clinic	NCT03015922	1/2 期
	卵巢癌, 输卵管癌或腹膜癌	Mayo Clinic		
	恶性外周神经鞘外肿瘤	Mayo Clinic		
新城疫病毒	转移性肿瘤	Hadassah Medical Organization	NCT00348842	2 期
呼肠孤病毒	转移性黑色素瘤	National Cancer Institute (NCI)	NCT00651157	2 期
	转移性黑色素瘤	Oncolytics Biotech	NCT00984464	2 期
	复发型或顽固多发性骨髓瘤	National Cancer Institute (NCI)	NCT01533194	1 期
	复发型或顽固多发性骨髓瘤	University of Southern California	NCT02514382	1b 期
水泡型口炎病毒	成人复发性肝癌	Mayo Clinic	NCT01628640	1 期
痘病毒	头颈癌	Genelux Corporation	NCT01584284	1 期
	晚期肝癌	JennerexBiotherapeutics	NCT02759588	2b 期
	转移性, 顽固性结肠癌	JennerexBiotherapeutics	NCT01394939	1/2a 期
	不可切除的原发性肝癌	JennerexBiotherapeutics	NCT00554372	2a 期
	不可切除的 3/4 期恶性黑色素瘤	JennerexBiotherapeutics	NCT00429312	1/2 期
	顽固性实体瘤	JennerexBiotherapeutics	NCT00625456	1 期
	肝癌	JennerexBiotherapeutics	NCT00629759	1 期
	不可切除的顽固性实体瘤	JennerexBiotherapeutics	NCT01169584	1 期
	腹膜癌	Genelux GmbH	NCT01443260	1/2 期
	1 期非小细胞肺癌	Benjamin Movsas, M. D.	NCT03029871	1 期
	晚期肝癌	SillaJen, Inc.	NCT02562755	3 期
	复发性卵巢癌	Genelux Corporation	NCT02759588	1b 期
	晚期实体瘤	Genelux Corporation	NCT00794131	1 期
	卵巢腹膜癌	Andrea McCart	NCT02017678	2 期

注: 资料来源于 NIH 的临床试验政府网 (<https://ClinicalTrials.gov>), 截止期为 2017 年 3 月 28 日。

2 用于治疗肿瘤临床试验的溶瘤病毒

2.1 腺病毒 腺病毒已被广泛用作溶瘤病毒和基因治疗的病毒载体治疗肿瘤^[3-6]。实际上,中国国家食品药品监督管理局于2005年批准了基因突变后的溶瘤腺病毒(H101, Sunway Biotech, 上海, 中国)用于局部注射治疗头颈鳞状细胞癌,但是人群试验中观察到的临床疗效未能达到用动物模型研究的疗效^[5-6]。

腺病毒是最为重要的溶瘤病毒候选之一。作为溶瘤病毒,腺病毒具有以下优点:(1)人腺病毒的基因结构和功能已研究得深入透彻,有利于对其基因组进行改造和克隆外源基因;(2)腺病毒血清型4和7(Ad4和Ad7)活疫苗已被美国FDA批准用于预防由腺病毒引起的急性呼吸道疾病(Acute respiratory disease, ARD)约50年,其安全性得到了充分证明;(3)腺病毒感染细胞后,病毒快速复制,产生细胞病变,迅速裂解感染细胞;(4)腺病毒易于体外培养,产量高,可大量生产;(5)腺病毒为无包膜病毒,生物学稳定,抗环境能力强,便于运输和操作;(6)腺病毒的壳蛋白和病毒纤毛与广谱表达的高亲和性的细胞受体、柯萨奇-腺病毒受体(CAR)和整合素 $\alpha\gamma\beta3$ and $\alpha\gamma\beta5$ 结合而感染细胞,感染谱广,能感染多种类型的肿瘤细胞,因此具有治疗多类肿瘤的潜力。目前,腺病毒作为溶瘤病毒在临床试验中治疗的肿瘤包括:胰腺癌、卵巢癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、膀胱癌、前列腺癌和肺癌等(表1)。

目前已发现和鉴定的人腺病毒超过50多个血清型^[7],这就使选用何型腺病毒有效治疗何类肿瘤变得很复杂,需大量深入细致的探讨和研究。此外,绝大多数人曾感染过腺病毒,其机体已产生特异性抗腺病毒的免疫反应,这预先存在的抗腺病毒免疫可能迅速清除用到体内的腺病毒,从而干扰腺病毒作为溶瘤病毒治疗肿瘤的疗效。虽然腺病毒用于人体的安全性得到了充分证明,但因其受体CAR在肝细胞表面高水平表达,腺病毒具有极强的嗜肝实质细胞,从而增加肝脏毒性^[8]。这些用腺病毒作为溶瘤病毒治疗肿瘤的问题,是当前亟待解决的问题,也是研究极为活跃的前沿领域。

2.2 痘病毒 痘病毒家族中的成员是一组超大型的、复杂的、有包膜的病毒。该家族病毒含长度约150~380 kb的线性双链DNA基因组,可编码约250个基因。因其基因组庞大,可容纳大片段外源DNA(至少25 000 bp)的插入而不影响其生物活

性^[9]。因此,痘病毒是最理想的克隆和表达外源基因的活载体之一,常被用来作为疫苗载体高效表达外源基因、分子免疫佐剂或免疫增强细胞因子,以诱生和增强特异性免疫反应^[10-12]。痘病毒感染细胞后,其整个生活周期均在细胞质中完成,无细胞核阶段,这在DNA病毒中是独一无二的。痘病毒的感染不进入细胞核,因而无病毒DNA整合到细胞基因组而导致细胞基因突变之虞。事实上,作为痘病毒家族的原型成员的痘苗病毒,曾被广泛用作活病毒疫苗预防天花病毒感染,最终在全球彻底消灭了天花。这是人类历史上战胜烈性传染病最伟大的成就,也证实了痘苗病毒的有效性、安全性和稳定性,并由此诞生了免疫学和疫苗学。

尽管痘病毒,特别是痘苗病毒,用作溶瘤病毒治疗肿瘤还处在临床试验阶段,该家族病毒独特的生物学特征表明了其巨大的应用价值。大量的研究资料表明痘苗病毒可感染和裂解不同种类的肿瘤细胞。实际上,绝大多数肿瘤细胞系都对痘苗病毒的感染易感。由此推测,痘苗病毒用作溶瘤病毒可适用于多种类肿瘤的治疗。这里必须指出的是,痘苗病毒对体外培养的肿瘤细胞系具有广谱的感染性,但对人原代细胞的感染选择性极强。当前的研究结果包括我们的研究结果表明,痘病毒包括痘苗病毒和金丝雀痘病毒对人原代抗原提呈细胞(APCs),特别是人原代单核细胞,具有极强的感染选择性^[13-17]。痘病毒几乎不结合也不感染未经激活的人原代T细胞和自然杀伤细胞^[13]。迄今为止,尚未发现任何痘病毒的特异性细胞受体。因此,痘病毒对肿瘤细胞的广谱感染和对人原代单核细胞的选择性感染的分子机制尚不清楚,亟待深入研究和阐明。痘病毒嗜肿瘤细胞的特征提示,肿瘤患者体内应用痘病毒,将优先感染和攻击肿瘤细胞,而不产生严重的副作用。当然,单核细胞可能受到高度感染使其数量和功能受损。正常情况下,血液中的单核细胞多为终末端血细胞,寿命极短,仅能生存1.6~7 d^[18]。鉴于此,即使短暂损伤单核细胞的数量和功能,肿瘤患者也能耐受。目前,痘苗病毒作为溶瘤病毒在临床试验中治疗的肿瘤包括:头颈部癌、肝癌、直肠癌、黑色素瘤、实体瘤、腹膜癌、肺癌和卵巢癌等(表1)。值得注意的是,目前虽然有众多正在进行的临床I~II期的溶瘤病毒项目,只有痘苗病毒治疗晚期肝癌的项目(NCT02562755)进入临床III期。由此可见,痘苗病

毒用作溶瘤病毒治疗肿瘤潜力巨大,前景可期。

2.3 HSV HSV 被认定为极具吸引力和潜力的溶瘤病毒。HSV 俗称疱疹,分两型:HSV-1 和单纯疱疹病毒 II 型(HSV-2)。HSV-1 常感染腰部以上的皮肤和黏膜,导致皮肤和黏膜疱疹。最常见为嘴唇周围皮肤和黏膜疱疹或口腔疱疹(有时称为发热水泡或冷疮)。与 HSV-1 相比,HSV-2 常感染腰部以下尤其是生殖器或肛门周围的皮肤和黏膜,导致生殖器或肛门疱疹,为常见性传播疾病之一。尽管 HSV-1 和 HSV-2 感染部位有所区别,但不是绝对的。HSV-1 也感染腰部以下部位,而 HSV-2 也感染腰部以上部位。HSV-1 和 HSV-2 急性感染后,病毒沿着感觉神经元轴逆行而上,最终分别潜伏于三叉神经和骶神经节。潜伏于神经节的 HSV-1 和 HSV-2 可因神经节受到刺激或感染而重新激活,产生与急性感染相似但轻得多的临床症状。

HSV-1 是非常普遍的人类病原体。世界卫生组织(WHO)流行病学资料显示,67%的世界人口年龄在 50 岁以下都感染过 HSV-1^[19]。所幸的是,口腔疱疹感染和生殖器疱疹感染大多只引起轻微的症状或在感染部位引起局限的溃疡。在大多数情况下,皮肤和黏膜疱疹为自限性感染疾病,2~3 周可自愈。但对于一些特殊人群如新生儿和免疫系统缺陷或低下的人,疱疹病毒感染可全身扩散,导致多脏器或神经系统感染。对于这些特殊人群,疱疹病毒感染是危险的,甚至是致死性的。这些感染者需用抗疱疹病毒药物来治疗。目前,用来治疗疱疹病毒的药物主要为核苷和核苷酸类似物,如阿昔洛韦、万乃洛韦和泛昔洛韦。这些药物能有效阻断疱疹病毒的复制,对预防和治疗疱疹病毒全身扩散性或神经系统感染有显著疗效。

单纯疱疹病毒是疱疹病毒家族的 α 亚科的成员,具有线性双链 DNA 基因组^[20]。该基因组比痘病毒基因组小,但仍为大病毒基因组之一,长约 150 kb,编码约 80 基因^[20-22]。因其基因组庞大,含大量不影响疱疹病毒复制和细胞病变作用的序列,便于对基因组进行基因工程改造,提高疱疹病毒溶瘤能力,弱化其抗原性,降低其副作用。此外,疱疹病毒庞大的基因组也便于外源基因如分子免疫佐剂或免疫增强细胞因子的克隆和表达,使重组的疱疹病毒可诱生和增强抗肿瘤的特异性免疫反应。实际上,当今世界上第一个溶瘤病毒的药物就是表达 GM-CSF 的 HSV-1 活病毒颗粒。进入肿瘤组织内的

HSV-1 活病毒高效感染肿瘤细胞,细胞随之裂解死亡。裂解的肿瘤细胞释放出肿瘤相关抗原,在 GM-CSF 作为细胞因子免疫佐剂的作用下,激发机体的抗肿瘤免疫反应,进一步提高抗肿瘤的疗效。HSV-1 除了被批准用于治疗晚期黑色素瘤,该病毒作为溶瘤病毒在临床试验中治疗的肿瘤包括:头颈部癌、实体瘤、胶质瘤、恶性胸膜间皮瘤、神经系统实体瘤和黑色素瘤(表 1)。

3 溶瘤病毒治疗癌症的挑战

溶瘤病毒治疗肿瘤的机遇和挑战并存。一方面,溶瘤病毒复制快,选择性感染和杀伤肿瘤细胞能力强,临床试验已经证明其良好的安全性。因此,溶瘤病毒作为一类新的癌症治疗药物正在兴起且呈现出勃勃生机,具有新的生命力。另一方面,溶瘤病毒具有复杂的生物学特性,不易纯化,不具备化学药物的稳定性。此外,溶瘤病毒治疗癌症的给药途径、适应证、疗效和副作用等均需深入探索。

3.1 溶瘤病毒的给药途径影响临床疗效 溶瘤病毒可经肿瘤内注射和静脉注射。瘤内注射多用于治疗实体瘤或部位局限的肿瘤,而静脉给药有望治疗转移性肿瘤或血液肿瘤。但静脉给药易被循环液包括血液稀释,降低溶瘤病毒到达靶细胞的浓度,从而降低裂解肿瘤细胞的疗效^[23]。此外,静脉给药易被循环血液的成分干扰,如免疫调理、抗体中和及补体激活,导致溶瘤病毒失效或被快速清除。静脉给药还可能引起全身扩散,导致严重的非靶向性感染。因此,肿瘤内注射是目前溶瘤病毒治疗肿瘤的最主要的给药途径,易应用于实体瘤。最新研究进展表明,溶瘤病毒肿瘤内注射的同时,给予肿瘤部位以外的肌肉注射,可有效增强特异性抗肿瘤效果。溶瘤病毒静脉给药有广泛的适应证,但面临诸多挑战,需深入研究。

3.2 溶瘤病毒的临床应用级别的纯化 目前在 NIH 临床试验政府网注册的治疗肿瘤的溶瘤病毒主要有八类:腺病毒、柯萨奇病毒、HSV-1、麻疹病毒、新城疫病毒、呼肠孤病毒、水泡型口炎病毒和痘苗病毒(表 1)。这些病毒分属于不同的家族,具有不同的生物学特性和细胞感染谱,病毒颗粒大小各异,存在或缺乏病毒包膜等。这就要求每一溶瘤病毒都需要个性化的感染、培养、扩增、纯化和长期稳定保存的优化策略和方案。例如,溶瘤性 Ad 病毒的纯化通常需用两次氯化铯密度梯度超速离心来完成^[24]。该方法最大的缺陷是不能完全去除细胞

杂质,因为与病毒密度一致的细胞成分无法用密度梯度超速离心法与病毒颗粒分开。此外,该方法耗时和生产成本高,因此难以用于大规模生产临床应用级别的病毒颗粒。该方法也不适合包膜病毒的纯化,因超速离心力和缺乏缓冲能力的氯化铯密度梯度成分易致病毒颗粒完整性受损。

包膜病毒的纯化一般采取减毒活病毒疫苗的生产所使用的标准程序,包括收集感染细胞上清、大小排阻色谱法、离子交换层析、苯甲酸酶(Benzonase)处理去除污染DNA、无菌过滤和最终产品的分装^[24]。最终产品需经免疫印迹检测关键性病毒蛋白以确认病毒的存在和丰度,PCR或Southern杂交确认病毒基因及基因组结构,病毒攻击试验以确认溶瘤病毒裂解靶细胞的能力^[24]。

值得指出的是,有些包膜病毒如痘苗病毒,主要存在于细胞内或细胞表面,只有少量存在于感染的细胞上清中。因此,痘苗病毒的纯化始于裂解感染的细胞,随之进行蛋白酶消化,以释放出病毒颗粒并消化掉细胞成分,减少宿主细胞成分的污染。细胞裂解和蛋白酶消化无特异性,也可能伤及病毒。制造药物级痘苗病毒的另一个挑战是其特别大的病毒颗粒。痘苗病毒是常见病毒中最大的,其直径约为200 nm,长度为300 nm,不能有效通过通常使用的0.2 μm或更小孔径的“灭菌过滤器”。这意味着整个制备过程必须全程无菌地完成。因此,对环境、工作间、设备和工作人员有超高的要求。

3.3 肿瘤免疫抑制微环境影响溶瘤病毒的临床疗效 肿瘤发生和发展常与全身或局部免疫功能低下有关。肿瘤组织含有大量的浸润性免疫抑制细胞如免疫调节T细胞(Treg)和髓源性抑制细胞(MDSC)。这些浸润性免疫抑制细胞产生和维持免疫抑制环境并促进肿瘤生长^[23]。肿瘤细胞本身分泌和募集免疫抑制细胞因子如白细胞介素(IL)-10,进一步抑制抗肿瘤免疫和促进肿瘤生长和浸润。此外,肿瘤的快速生长,形成肿瘤组织缺氧的微环境,从而诱导缺氧诱导因子1α(HIF-1α)。HIF-1α能促进Treg细胞的分化和浸润^[25],上调抗原提呈细胞如髓性树突状细胞的免疫检查点调节性程序性死亡配体1(PD-L1)^[26],从而进一步强化了肿瘤组织免疫抑制微环境。因此,干扰和改善肿瘤组织免疫抑制状态以提高溶瘤病毒临床疗效就成为当前重要的研究课题。很显然,增强免疫的细胞因子可武装溶瘤病毒,以达到裂解肿瘤细胞且提高抗肿

瘤免疫的双重疗效。世界上第一个溶瘤病毒的药物(Imlygic)就是GM-CSF武装的HSV-1活病毒。必须指出的是,GM-CSF不一定是理想的武装溶瘤病毒的细胞因子^[27]。与GM-CSF相比,IL-12、IL-18或可溶性B7-1更能大大提高溶瘤HSV-1病毒的抗肿瘤效果^[28-30]。除了增强免疫的细胞因子外,其它具有抗肿瘤作用的分子,包括抗血管生成基因产物,也能武装溶瘤病毒以提高抗肿瘤疗效^[31-33]。因此,细胞因子多样化和其功能的复杂性可被有效利用,形成溶瘤病毒-细胞因子-肿瘤类别和临床期型的最佳治疗策略,并与其它抗肿瘤治疗联合使用,以取得抗肿瘤的协同疗效。

4 结语

癌症的治疗已从相对非特异性细胞毒性药物或放射性治疗转向基于癌症发生和发展机理产生的针对性疗法。溶瘤病毒代表一类新的正在开发和临床试验的具有选择性杀伤肿瘤细胞的独特的生物药物。重要的是,溶瘤病毒可经免疫增强细胞因子的武装,从而达到裂解肿瘤细胞且提高抗肿瘤免疫的双重疗效。武装的溶瘤病毒还可与化疗、放疗或手术联合使用,以发挥这些疗法的最大潜力。由于溶瘤病毒生物学的复杂性、细胞因子的多样性和肿瘤治疗的艰巨性,组成溶瘤病毒-细胞因子-肿瘤类别和临床期型的最佳治疗策略将需长期和艰难的探索。因此,溶瘤病毒治疗癌症的新时代还处在黎明期,需要更大的投入和全社会的鼎力支持。

参考文献

- [1] LEDFORD H. Cancer-fighting viruses win approval [J]. Nature, 2015, 526(7575): 622-623.
- [2] KAUFMAN HL, KOHLHAPP FJ, ZLOZA A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(9): 642-662.
- [3] ROSEWELLSHAW A, SUZUKI M. Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer [J]. Curr Opin Virol, 2016, 21: 9-15.
- [4] CHENG PH, WECHMAN SL, MCMASTERS KM, et al. Oncolytic replication of E1b-deleted adenoviruses [J]. Viruses, 2015, 7(11): 5767-5779.
- [5] YU W, FANG H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7(2): 141-148.
- [6] YAMAMOTO M, CURIEL DT. Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses [J]. Mol Ther, 2010, 18(2): 243-250.
- [7] URA T, OKUDA K, SHIMADA M. Developments in viral vector-based vaccines [J]. Vaccines (Basel), 2014, 2(3): 624-641.
- [8] YANG Y, NUNES FA, BERENCI S, et al. Cellular immunity to

- viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,1994,91(10):4407-4411.
- [9] SMITHGL, MOSS B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA[J]. Gene, 1983, 25(1):21-28.
- [10] MOSS B. Vaccinia and other poxvirus expression vectors[J]. Curr Opin Biotechnol, 1992, 3(5):518-522.
- [11] MOSS B, FUERST TR, FLEXNER C, et al. Roles of vaccinia virus in the development of new vaccines[J]. Vaccine, 1988, 6(2):161-163.
- [12] MOSS B, FLEXNER C. Vaccinia virus expression vectors[J]. Annual Review of Immunology, 1987, 5(1):305-324.
- [13] YU QG, JONES B, HU NJ, et al. Comparative analysis of tropism between canarypox (ALVAC) and vaccinia viruses reveals a more restricted and preferential tropism of ALVAC for human cells of the monocytic lineage [J]. Vaccine, 2006, 24(40/41):6376-6391.
- [14] SANCHEZ-PUIG JM, SANCHEZ L, ROY G, et al. Susceptibility of different leukocyte cell types to Vaccinia virus infection[J]. Virology Journa, 2004, 1:10.
- [15] CHAHROUDIA, CHAVAN R, KOZYR N, et al. Vaccinia virus tropism for primary hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor[J]. J Virol, 2005, 79(16):10397-10407.
- [16] BYRD D, AMETT, HU N, et al. Primary human leukocytes subsets differentially express vaccinia virus receptors enriched in lipidrafts [J]. Journal of Virology, 2013, 87(16):9301-9312.
- [17] BYRD D, SHEPHERD N, LAN J, et al. Primary human macrophages serve as vehicles for vaccinia virus replication and dissemination [J]. Journal of Virology, 2014, 88(12):6819-6831.
- [18] PATEL AA, ZHANG Y, FULLERTON JN, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation[J]. J Exp Med, 2017, 214(7):1913-1923.
- [19] GOTTLIEB SL, GIERSENG B, BOILY MC, et al. Modelling efforts needed to advance herpes simplex virus (HSV) vaccine development; Key findings from the World Health Organization Consultation on HSV Vaccine Impact Modelling[J]. Vaccine, 2017.
- [20] MACDONALD SJ, MOSTAFA HH, MORRISON LA, et al. Genome sequence of herpes simplex virus 1 Strain KOS[J]. Journal of Virology, 2012, 86(11):6371-6372.
- [21] MCGEOCH DJ. The genome of herpes simplex virus: structure, replication and evolution[J]. J Cell Sci Suppl, 1987, 7:67-94.
- [22] MCGEOCH DJ, MOSSHAW M, MCNAB D, et al. DNA Sequence and genetic content of the hindiii 1 region in the short unique component of the herpes simplex virus type 2 genome: identification of the gene encoding glycoprotein g, and evolutionary comparisons [J]. Journal of General Virology, 1987, 68(1):19-38.
- [23] AURELIAN L. Oncolytic viruses as immunotherapy: progress and remaining challenges [J]. Onco Targets and Therapy, 2016, 9:2627.
- [24] UNGERECHTS G, BOSSOW S, LEUCHS B, et al. Moving oncolytic viruses into the clinic: clinical-grade production, purification, and characterization of diverse oncolytic viruses [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016, 3:16018.
- [25] BEN-SHOSHAN J, MAYSEL-AUSLENDER S, MOR A, et al. Hypoxia controls CD4 + CD25 + regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(9):2412-2418.
- [26] NOMAN MZ, DESANTIS G, JANJI B, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2014, 211(5):781-790.
- [27] FUKUHARA H, INO Y, TODO T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn[J]. Cancer Sci, 2016, 107(10):1373-1379.
- [28] VARGHESE S, RABKIN SD, LIU R, et al. Enhanced therapeutic efficacy of IL-12, but not GM-CSF, expressing oncolytic herpes simplex virus for transgenic mouse derived prostate cancers [J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13(3):253-265.
- [29] FUKUHARA H, INO Y, KURODA T, et al. Triple gene-deleted oncolytic herpes simplex virus vector double-armed with interleukin 18 and soluble B7-1 constructed by bacterial artificial chromosome-mediated system [J]. Cancer Res, 2005, 65(23):10663-10668.
- [30] INO Y. Triple combination of oncolytic herpes simplex virus-1 vectors armed with interleukin-12, interleukin-18, or soluble b7-1 results in enhanced antitumor efficacy [J]. Clinical Cancer Research, 2006, 12(2):643-652.
- [31] LIU TC, ZHANG T, FUKUHARA H, et al. Oncolytic HSV armed with platelet factor 4, an antiangiogenic agent, shows enhanced efficacy[J]. Mol Ther, 2006, 14(6):789-797.
- [32] TSUJI T, NAKAMORI M, IWAHASHI M, et al. An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer[J]. Int J Cancer, 2013, 132(2):485-494.
- [33] LIU TC, ZHANG T, FUKUHARA H, et al. Dominant-negative fibroblast growth factor receptor expression enhances antitumoral potency of oncolytic herpes simplex virus in neural tumors[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(22):6791-6799.

(收稿日期:2017-08-22)