



溶瘤病毒靶向治疗肿瘤的策略*

方中岳 梁 亮 吕维民 张岚清 杨 帆 张继虹 欧 霞**

(昆明理工大学医学院, 昆明 650500)

摘要 近年来,随着国内外几款溶瘤病毒制剂的相继上市,溶瘤病毒疗法成为肿瘤免疫治疗的焦点。溶瘤病毒可选择性感染并裂解肿瘤细胞,同时释放肿瘤相关抗原激活机体的抗肿瘤免疫反应,达到杀伤肿瘤细胞和抑制肿瘤生长的目的。溶瘤病毒对肿瘤的靶向杀伤作用决定了其安全性和溶瘤效果。为了开发出安全高效的溶瘤病毒,目前主要采用以下策略:利用某些病毒载体对肿瘤细胞的天然靶向性,使溶瘤病毒选择性地在肿瘤细胞内复制并杀伤肿瘤细胞;或者对病毒基因组进行缺失和插入等修饰,通过靶向肿瘤细胞特异性表面受体、胞内信号通路或者肿瘤微环境等提高溶瘤病毒的肿瘤靶向性。其中,肿瘤微环境中的低氧状态、新血管生成以及免疫抑制状态等都可成为溶瘤病毒的靶点。而溶瘤病毒通过表达细胞因子和免疫检查点抑制剂,或者与CAR-T细胞联合作用,靶向调节肿瘤微环境中免疫抑制状态,成为提高溶瘤病毒肿瘤靶向性的常用方法。本文将对以上溶瘤病毒靶向治疗肿瘤策略的研究进展进行综述。

关键词 溶瘤病毒,靶向性,表面受体,信号通路,肿瘤微环境

中图分类号 R392, R730

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0061

恶性肿瘤严重威胁着人类生命的健康。其传统治疗方法包括手术、放疗、化疗等,但这些治疗方法依然存在不能根治和严重的毒副作用等问题。近十年来,肿瘤免疫疗法得到了极大的发展,通过重新启动并维持肿瘤-免疫循环,激活机体正常的抗肿瘤免疫,从而达到控制与清除肿瘤的目的^[1]。其中,溶瘤病毒疗法(oncolytic virotherapy)是肿瘤免疫疗法的一个重要分支,已被充分证实在肿瘤治疗领域具有广阔的应用前景。2015年,美国食品和药品管理局(FDA)批准溶瘤疱疹病毒(talimogene laherparepvec, T-VEC)用于转移性黑色素瘤的治疗,使溶瘤病毒疗法受到越来越多的关注。2021年,溶瘤病毒(oncolytic virus, OV) Teserpaturev (G47Δ, Delytact)在日本获批用于治疗恶性胶质瘤,使溶瘤病毒疗法再次成为肿瘤免疫治疗的焦点。溶瘤病毒可选择性感染肿瘤细胞,最终通过裂解肿瘤细胞释放肿瘤相关抗原,或者通过表达外源基因来激发机体抗肿瘤免疫反应。溶瘤病毒靶向感染和杀伤肿瘤细胞的能力受多种因素限制,如肿瘤细胞表面受体、肿瘤细胞内促肿瘤生长信号通路以及复杂的肿瘤微环境(tumor

microenvironment, TME)等,随着病毒学和分子生物学技术的发展,通过基因工程手段对病毒基因组进行改造和修饰可提高溶瘤病毒载体与肿瘤细胞表面受体特异性结合的能力,提高溶瘤病毒对肿瘤细胞胞内促肿瘤细胞生长信号通路的抑制作用以及提高溶瘤病毒对TME中低氧、新血管生成以及免疫抑制状态等的改善和抑制能力,从而提高溶瘤病毒靶向感染和杀伤肿瘤细胞的能力。本文将从肿瘤细胞表面受体^[2]、肿瘤细胞内促肿瘤生长信号通路^[3]、肿瘤微环境^[4]三个方面,对提高溶瘤病毒肿瘤靶向性的策略进行综述。

1 靶向识别肿瘤细胞表面受体

肿瘤细胞表面受体是肿瘤细胞表面能与特定的信号分子结合并可以引起肿瘤细胞应激反应的一种

* 国家自然科学基金(81960555),云南省教育厅科学研究基金(2023Y0434),昆明理工大学-昆明理工大学附属医院(云南省第一人民医院)医学联合专项(KUST-KH2022008Y)和昆明市专家工作站(YSZJG22-2020046)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 13888671615, E-mail: 24553258@qq.com

收稿日期: 2022-02-21, 接受日期: 2022-05-12

膜表面蛋白, 在肿瘤生长、迁移中发挥重要作用。溶瘤病毒靶向肿瘤细胞表面受体的方式主要有两种: 一是利用野生型病毒载体的天然嗜性; 二是通过基因工程等手段, 对病毒载体进行修饰, 提高其对肿瘤细胞的靶向性 (图 1a)。

少数野生型病毒载体对肿瘤细胞的天然嗜性在一定程度上保证了溶瘤病毒对肿瘤细胞的天然靶向性。如 CD54、CD55 在黑色素瘤、乳腺癌等多种肿瘤细胞表面高表达, 而这些分子也是柯萨奇病毒 (coxsackie virus, CV) 的天然受体^[5], CV 通过 CD55 募集到细胞附近, 随后通过 CD54 的内化作用进入宿主细胞^[6]。利用柯萨奇病毒 A21 (coxsackie virus A21, CVA21) 对 CD54、CD55 的天然靶向性, 可有效靶向感染并杀伤黑色素瘤、乳腺癌等肿瘤细胞。其中靶向黑色素瘤的研究显示出良好的安全性, 并于 2009 年通过 I 期安全性试验, 目前进入晚期黑色素瘤的 II 期试验。同时, CVA21 还在多发性骨髓瘤、肺癌等多种癌症的治疗中也表现出良好的靶向性和安全性^[7]。

有些溶瘤病毒载体的天然受体在肿瘤细胞和正常细胞表面均表达, 因此, 在溶瘤病毒基因组中缺失或插入特异性片段可以进一步提高其对肿瘤细胞的靶向性。如单纯疱疹病毒 I 型 (herpes simplex virus-I, HSV-I) 表面糖蛋白 gD 可与靶细胞表面受体疱疹病毒进入介质 (herpesvirus entry mediator, HVEM)、连接蛋白 1 (Nectin-1) 等特异性结合, 介导病毒进入细胞, 但 HVEM 和 Nectin-1 在肿瘤细胞和正常细胞表面均有表达, 从而导致 HSV-1 对肿瘤细胞的靶向性较差。人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor, HER-2) 是表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 家族的一员, 在乳腺癌、卵巢癌、胶质母细胞瘤等肿瘤细胞表面均过表达。因此, 用 HER-2 特异性抗体替代 gD 部分片段可以有效提高重组 HSV-1 对肿瘤细胞的靶向性。Menotti 等^[8]将 HER-2 特异性的抗体的轻链 (107 aa) 和重链 (120 aa) 用连接器 (Linker) 连接, 替代 gD 上的 6~38 氨基酸片段, 构建了重组 HSV-1 病毒 R-LM113, 与野生型病毒相比, 该重组病毒对 HER-2 高表达的卵巢癌细胞 SKOV-3 有更强的感染能力, 其几乎不感染正常细胞。此外, 白介素 (interleukins, IL) -13 的特异性受体 IL-13 α 2 在恶性胶质瘤细胞表面高表达, 而在正常组织细胞中低表达^[9]。Zhou 等^[10]用 IL-13 替代 gD 的 1~32 氨基酸

片段, 构建了重组 HSV 病毒 R5141, 用 R5141 感染 Vero 细胞和表达 IL-13 α 2 的 Vero-13R 细胞后, 通过对细胞内病毒滴度和病毒相关蛋白质表达的检测证实, R5141 只能通过细胞表面的 IL-13 与其受体的特异性结合进入 Vero-13R 细胞并复制。因此, 利用 HER-2 特异性抗体或 IL-13 替代 HSV-1 表面糖蛋白 gD 的部分片段可提高 HSV-1 靶向肿瘤细胞的能力。

由于多数病毒受体在正常细胞表面均能表达, 故利用溶瘤病毒载体对其受体的天然趋向性提高其靶向肿瘤细胞的能力存在一定的限制^[11]。而利用肿瘤表面特异性受体的抗体替代溶瘤病毒载体与其天然受体结合的部分结构域, 可以提高溶瘤病毒对肿瘤细胞的靶向性, 并且这种靶向性可以根据肿瘤细胞表面特征和病毒载体的类型进行改变, 极大促进了溶瘤病毒靶向性的提高^[12]。

2 靶向抑制肿瘤细胞内促肿瘤生长信号通路

肿瘤的发生和发展与细胞内的信号通路改变有很大的关系, 在肿瘤细胞中存在视网膜母细胞瘤抑制蛋白 (retinoblastoma tumor suppressor protein, RB) -E2F、干扰素 (interferon, IFN)、Wnt、p53 等信号通路失调。腺病毒 (adenovirus, Ad)、单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV)、甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV)、痘苗病毒 (vaccinia virus, VV) 等通过基因工程修饰后均能作用于这些失调的信号通路, 从而实现对肿瘤的靶向治疗 (图 1b)。

Wnt 信号通路在多种肿瘤中异常激活, 其原因主要是大肠腺瘤性息肉病 (adenomatous polyposis coli, APC) 基因发生截短突变后形成稳定的 β 连环蛋白 (β -catenin), 随后 β -catenin 进入细胞核, 与 Tcf/Lef 家族转录因子结合, 激活细胞周期蛋白 D、C-myc 等 Wnt 靶基因的转录, 诱导肿瘤发生^[13]。在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 中异常激活的 Wnt 信号通路被认为是肝脏 CSCs 的自我更新、抗药性和致癌性的关键。Zhang 等^[14]构建表达肺癌抑制因子 1 (tumor suppressor in lung cancer-1, TSLC1) 的重组腺病毒 Ad.wnt-E1A (Δ 24bp) -TSLC1, 随后分别处理具有 CSCs 特征的 MHCC-97H 细胞、HepG2 等恶性肿瘤细胞和 L02 等正常细胞后, 检测细胞活性发现, Ad.wnt-E1A (Δ 24bp) -

TSLC1可以靶向杀伤Wnt信号通路异常激活的细胞而对正常细胞无明显杀伤效果。随后, Wang等^[15]构建了携带TSLC1的重组溶瘤腺病毒S24-TSLC1, 在体外实验证实: TSLC1能够下调Tcf4/ β -catenin的转录活性并抑制CyclinD1和C-myc的表达, 进而杀伤Wnt异常激活的肝癌细胞, 该结论在人肝细胞癌SMMC-7721的小鼠异种移植瘤模型中进一步得到证实。因此, 靶向异常激活的Wnt信号通路可以提高溶瘤病毒的靶向性, 并为肿瘤的治疗带来更多的方法和希望。

RB-E2F信号通路通过控制细胞周期从G1期到S期的转变调节细胞进程, 在正常细胞中, RB通过募集组蛋白去乙酰化抑制E2F活性, 当RB失调时, E2F释放并招募转录激活剂, 促进肿瘤的发生和发展^[16]。Ad基因组中E1A的922~947 bp是RB家族的结合区, Heise等^[17]通过缺失E1A的922~947 bp, 构建重组腺病毒dl922-947, 通过感染H1299、MB231等RB缺陷的肿瘤细胞, 发现其可以在肿瘤细胞内大量复制并裂解肿瘤细胞, 同时在乳腺癌异种移植模型中能够有效抑制肿瘤转移的发生, 故dl922-947可以通过靶向肿瘤细胞内失调的RB信号通路, 用于癌症的局部和全身治疗。

IFN信号通路是细胞中重要的抗病毒通路, IFN与细胞表面的干扰素受体(IFN receptor, IFN-R)结合, 诱导IFN下游效应分子蛋白激酶R(protein kinase R, PKR)的表达, 当病毒产生的dsRNA与PKR结合后, 活化的PKR可使eIF-2 α 磷酸化, 抑制蛋白质的合成, 从而抑制病毒在细胞内的复制^[18]。甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)的非结构蛋白NS1是一种毒力因子, 可以对抗宿主细胞IFN信号通路中PKR介导的抗病毒反应, NS1缺失的IAV不能在正常细胞中复制, 但由于激活的Ras可使PKR去磷酸化, 故NS1缺失的IAV可在Ras激活的肿瘤细胞中复制, 并进一步裂解肿瘤细胞^[19]。Bergmann等^[20]敲除IAV的NS1片段构建deINS1, 随后分别感染正常细胞和通过转染表达N-ras基因的正常细胞, 结果显示deINS1选择性在表达N-ras基因的正常细胞中复制, 验证了IAV可以靶向IFN从而作为一种有效的溶瘤病毒载体。此外, HSV-1、HSV-2、新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)^[21]等病毒载体经基因工程修饰后也可通过在IFN信号通路缺陷的肿瘤细胞中选择性复制靶向裂解肿瘤细胞。

3 靶向适应或改善肿瘤微环境(TME)

TME在肿瘤的发生、发展以及转移过程中起着重要作用, 其中低氧、新血管生成、免疫抑制状态^[22]是肿瘤治疗过程中的重要障碍, 溶瘤病毒可以通过改善TME中低氧环境、抑制新血管生成、调节肿瘤免疫抑制状态等手段提高其对肿瘤的靶向性, 进而抑制肿瘤细胞的增殖和扩散(图1c)。

3.1 构建低氧条件复制型溶瘤病毒

实体瘤生长时, 由于肿瘤细胞耗氧量大、肿瘤相关性贫血和治疗性贫血等因素影响, 肿瘤细胞往往处于低氧状态。这种低氧状态与肿瘤对药物的耐受、细胞侵袭能力和患者生存率都有密切关系^[23]。如果溶瘤病毒能够特异性在实体瘤内低氧状态下感染和杀伤肿瘤细胞, 即可抑制肿瘤的发生、发展和转移。针对肿瘤微环境中的低氧环境, 常通过构建低氧条件复制型溶瘤病毒靶向治疗实体瘤。目前主要有两种策略: a. 利用低氧条件复制型病毒作为溶瘤病毒载体; b. 在病毒基因组中插入缺氧诱导因子(hypoxia inducible factors, HIFs)诱导目的基因表达^[24]。

低氧条件复制型病毒载体作为溶瘤病毒是应对肿瘤低氧环境的有利方法。例如水泡口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)是一种属于弹状病毒科的RNA病毒, Connor等^[4]发现, VSV在感染缺氧应激细胞时比正常氧条件下产生更多的mRNA, 在感染后期, VSV可以克服低氧条件下eIF-2 α 磷酸化亚基的增加和感染初期病毒蛋白合成的抑制, 从而产生更多的子代病毒裂解肿瘤细胞, 同时VSV的感染还可通过翻译起始因子eIF-4E的去磷酸化来抑制宿主细胞蛋白质的翻译, 以抑制肿瘤细胞的生长和增殖, 随后在对HeLa细胞裸鼠移植瘤模型实验中, 瘤内给药和静脉给药方式均证明了VSV只能在低氧的肿瘤细胞部位复制。因此, 根据VSV在低氧条件下能够高效复制的特性, 其可以作为良好的溶瘤病毒载体进行靶向实体瘤的治疗。

使用HIFs作为特异性启动子可以在低氧情况下有效诱导目的基因的表达, 提高溶瘤病毒的肿瘤靶向性。HIFs是一个由 α 亚单位和 β 亚单位组成的异二聚体转录因子, 作为肿瘤缺氧环境的主要分子在缺氧情况下被激活^[25]。缺氧诱导因子1(HIF-1)通过直接结合缺氧反应元件(hypoxia-responsive

element, HRE) 启动缺氧条件下的转录反应, 因此可以利用 HIF-1 和 HRE 两种基因的调控作用, 开发出能够靶向低氧环境中肿瘤细胞的溶瘤病毒。HYPR-Ad#1 是一种利用基因工程手段改造的溶瘤腺病毒载体, 其将编码病毒复制因子的 E1A 基因置于 HIF-1 启动子之下, 使其只能在缺氧或显示 HIF-1 激活的肿瘤细胞中进行复制并表达目的基因, 使用 HYPR-Ad#1 感染 LN229、U251MG、D247MG、Daoy 四种 HIFs 激活的脑肿瘤细胞后, 结果在低氧情况下 E1A 高表达, 并且有超过 90% 的细胞出现明显的细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE), 而在常氧情况下没有检测到明显的 E1A 表达和 CPE 的出现, 说明 HYPR-Ad#1 可以在低氧条件和 HIFs 激活的肿瘤细胞中复制^[26]。

因此, 利用某些溶瘤病毒载体在低氧条件下高效复制的特性或将 HIFs 插入多种病毒载体复制必需基因的上游, 都可以获得在低氧条件选择性复制的溶瘤病毒, 提高溶瘤病毒对肿瘤细胞的靶向性。

3.2 抑制肿瘤新血管生成

肿瘤血管新生是指在肿瘤细胞的诱导作用下, 从现有的血管上生长出新的血管, 以供给肿瘤细胞快速增殖所需要的氧气和营养物质, 在侵袭性肿瘤的生长和转移过程中起到十分重要的作用^[27]。抑制肿瘤血管新生是抑制肿瘤生长的重要策略, 目前除了利用某些病毒载体对血管内皮细胞的天然靶向杀伤作用外, 还可利用溶瘤病毒载体表达血管生长因子抑制剂、IL、趋化因子等来抑制肿瘤新血管生成^[28]。

利用 VSV 对血管内皮细胞的天然靶向性, 感染 VSV 可以有效地抑制肿瘤细胞生长。Breitbach 等^[29]在结直肠癌异种移植模型小鼠中通过静脉注射 VSV, 检测到肿瘤组织中内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 的感染, 随后, 肿瘤组织中出现血液凝固以及嗜中性粒细胞的浸润, 导致了肿瘤细胞的死亡, 而在正常组织中则没有发生细胞死亡的现象, 实验结果证明了野生型 VSV 可以特异性感染肿瘤组织中的 ECs, 并发挥有效的抑瘤效果。

利用溶瘤病毒载体表达 sFlt-1、IL-24、PF4 等血管生长因子抑制剂可提高其抑制肿瘤新血管生成的能力, 从而抑制肿瘤生长和转移。ZD55-sflt-1 是第一个被报道表达血管生长因子抑制剂的溶瘤腺病毒, 其在 E1B 上 55 ku 缺失的同时表达可溶性的血管内皮生长因子受体抑制剂 sFlt-1, 在人结直肠癌

的动物模型中显示出对肿瘤血管生成的抑制效果^[30]。IL-24 属于 IL-10 蛋白家族成员, 是一种有效的抗血管生成细胞因子, 可以抑制血管生成和诱导肿瘤细胞的特异性凋亡^[31]。Chai 等^[32]在条件复制型腺病毒的 E4 片段前插入 IL-24 基因, 构建了表达 IL-24 的重组腺病毒 HE1B55D-RGD.IL-24, 并在此基础上在 E1 区域插入抗血管生成的 Arresten 片段构建 HE1B55D-RGD。将这两种溶瘤腺病毒进行裸鼠黑色素瘤移植瘤模型给药后, 蛋白质检测、免疫染色和病理分析发现, IL-24 蛋白通过抑制 VEGF 和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的活性来发挥其抗血管生成活性。此外, IL-18、IL-12 和趋化因子如血小板因子 4 (platelet factor 4, PF4) 在肿瘤的动物模型中均显示具备有效的抗血管生成作用。

通过上述两种方式靶向抑制肿瘤组织新血管生成, 不仅可以有效提高溶瘤病毒的靶向性和溶瘤效果, 还可以抑制给药部位远端的肿瘤生长, 进一步提升溶瘤病毒的抑瘤效果。

3.3 改善肿瘤免疫抑制状态

肿瘤微环境中的免疫抑制状态限制了肿瘤免疫治疗的疗效。肿瘤细胞诱导并维持免疫抑制状态主要有两种方式: a. 在肿瘤周围聚集调节性 T 细胞 (Treg cells)^[33]、髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)^[34] 等免疫抑制细胞, 随后这些免疫抑制细胞分泌免疫抑制因子, 使细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 失活, 形成肿瘤的免疫抑制状态^[35]; b. 诱导免疫检查点分子如程序性死亡配体 1/程序性死亡 1 (programmed death-ligand 1/programmed death-1, PD-L1/PD-1)、半乳糖凝集素 9 (galectin-9) /TIM-3、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4) 等的表达, 通过抑制效应 T 细胞的活化, 导致肿瘤的免疫逃逸, 形成肿瘤免疫抑制状态^[36]。而溶瘤病毒可以通过表达多种细胞因子和免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs), 以及与嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cells, CAR-T) 联合作用来靶向调节肿瘤微环境中免疫抑制状态并增强宿主抗肿瘤免疫能力^[37-38]。

3.3.1 表达多种细胞因子

IL 是由淋巴细胞、单核细胞和其他非单核细胞产生的细胞因子, 在免疫调节中发挥重要调节作

用。IL-12是一种由DCs分泌的多效应细胞因子,可以激活先天免疫和适应性免疫,并且在Th1型抗肿瘤免疫中起重要作用^[39]。通过基因工程手段构建了表达IL-12的溶瘤痘苗病毒vvDD-IL-12-FG,该病毒能有效募集CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞并诱导其活化,并在增加IFN- γ 表达的同时降低TGF- β 和VEGF的表达,因此,vvDD-IL-12-FG可以有效改善肿瘤免疫抑制环境,提高结肠癌小鼠的生存周期和生存率^[40]。

粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)是属于集落刺激因子的一种免疫调节细胞因子,其可以促进树突状细胞的迁移和成熟,随后增强T细胞介导的免疫反应,提高机体免疫系统对肿瘤的杀伤作用。在HSV-1的ICP34.5和ICP47缺失的同时表达GM-CSF,构建重组病毒T-VEC,其不仅可以在肿瘤细胞内选择性复制,还可以通过激活宿主全身的T细胞免疫反应,靶向调节肿瘤免疫抑制微环境,进一步提高靶向性和溶瘤效果^[41],并在2015年被FDA批准用于黑色素瘤的治疗。不仅如此,基于痘苗病毒表达GM-CSF的Pexa-Vec在肝细胞癌的治疗方面已进入III期临床^[42]。

趋化因子是一种可以诱导免疫细胞转移和淋巴组织发育的小型分泌蛋白,在肿瘤组织中,不同的趋化因子可以诱导不同的免疫细胞迁移到肿瘤微环境中,从而调节抗肿瘤免疫反应^[43]。CCL19可以与表达其受体CCR7的细胞因子诱导的杀伤(cytokine induced killer, CIK)细胞直接作用发挥抗肿瘤作用,利用tk和vgf共同缺失的重组痘苗病毒vvDD为载体,构建表达CCL19的重组病毒vvCCL19,在小鼠结肠癌的体内外模型发现,vvCCL19通过将树突状细胞和CD4⁺T细胞募集到肿瘤细胞附近,改变肿瘤细胞的免疫抑制状态,增强宿主的抗肿瘤免疫^[44]。

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)具有杀伤肿瘤细胞、调节免疫、参与炎症反应等功能。CD40L是一种免疫激活剂,属于TNF超家族中II型跨膜蛋白,在活化的CD4⁺T细胞、B细胞、NK细胞和记忆性的CD8⁺T细胞表达^[45]。CD40L与其受体CD40相互作用可以通过活化巨噬细胞、激活NK细胞并使NK细胞增殖,从而改善TME,促进机体的抗肿瘤免疫^[46]。Pesonen等^[47]构建了表达CD40L的重组腺病毒CGTG-401,在治疗多名晚期肺癌等实体瘤患者过程中观察到显著的肿瘤特

异性T细胞反应并有效改善患者的预后。此外,TNF超家族成员OX40及其配体OX40L也可以作为肿瘤免疫治疗的靶分子。Ylösmäki等^[48]构建同时表达CD40L和OX40L两种免疫刺激分子的重组腺病毒VALO-D102,其中,CD40L可通过APCs激活CD8⁺T细胞影响先天免疫,而OX40L可促使CD8⁺T细胞增殖,形成记忆性T细胞库,因此VALO-D102可以通过激活先天免疫和适应性免疫逆转肿瘤微环境中免疫抑制状态。

3.3.2 表达ICIs

免疫检查点分子CTLA-4、TIM-3、PD-1等在许多免疫细胞表面表达,当其与肿瘤细胞表面配体特异性结合后通过肿瘤免疫逃避对抗肿瘤免疫发挥负调控作用,ICIs通过竞争性结合阻断免疫检查点分子的负调控通路,恢复抗机体的抗肿瘤细胞免疫^[49]。使用tk和vgf基因缺失的减毒痘苗病毒为载体,以PD-1的胞外结构域作为PD-L1的抑制剂iPD-L1,构建同时表达GM-CSF和iPD-L1的重组痘苗病毒VV-iPDL1/GM,当其感染肿瘤细胞后,其表达的iPD-L1可以通过自分泌和旁分泌的方式与肿瘤细胞表面的PD-L1结合,从而恢复抗肿瘤细胞免疫,随后使用VV-iPDL1/GM对B16-F10小鼠黑色素瘤模型进行瘤内给药,流式数据显示其可以促进肿瘤浸润性DCs的成熟和肿瘤新抗原特异性T细胞的活化,为肿瘤的靶向治疗,特别是对PD1/PDL1阻断治疗有耐药性的患者,提供一个更有效的靶向治疗方案^[50]。此外,以HSV-1为载体,表达PD-1特异性单链抗体的溶瘤病毒NG34scFvPD-1在胶质母细胞瘤的临床前研究中显示,其可以通过恢复肿瘤特异性T细胞活性改变肿瘤的免疫抑制状态,且在杀伤肿瘤细胞的同时形成记忆性抗肿瘤免疫,为靶向治疗PD-1高表达的肿瘤提供了数据支持^[51]。因此,使用溶瘤病毒表达ICIs的部分片段,可以避免ICIs在治疗过程中引起过激的免疫反应,在发挥靶向抗肿瘤功能的同时降低ICIs的副作用。

3.3.3 与CAR-T联合作用

CAR-T是肿瘤免疫疗法的一种新兴手段,利用抗原抗体特异性结合将T细胞募集到肿瘤细胞附近,以杀伤肿瘤细胞。近年来,CAR-T疗法广泛应用于血液系统恶性肿瘤的研究,并被FDA批准用于淋巴瘤和急性淋巴细胞白血病的治疗,但由于TME中的免疫抑制和CAR-T递送系统能力有限等不足限制了其在实体瘤的应用^[52]。溶瘤病毒可以通过对病毒载体进行修饰,使目的基因定向表达,

特异性增强抗肿瘤免疫, 在治疗实体瘤的研究中发挥重要作用^[53]。因此, 对溶瘤病毒和CAR-T疗法进行联用可以靶向调节肿瘤微环境同时提高抗肿瘤能力。使用选择性肿瘤细胞内复制的溶瘤病毒表达CAR-T特异性抗原, 在提高靶向性的同时募集CAR-T细胞到肿瘤微环境中, 促进抗肿瘤免疫, 随后CAR-T裂解肿瘤细胞促进了子代病毒的释放, 进一步增强其抗肿瘤效果^[54]。CD19是B淋巴细胞的表面蛋白, 参与B细胞的信号

传导功能, 其作为CAR-T的靶点在B细胞恶性肿瘤的研究中进入临床和临床前研究^[55]。Aalipour等^[56]以tk功能受损的痘苗病毒为载体, 将CD19选择性递送至肿瘤细胞表面, 并构建了CD19 CAR-T细胞, 在B16和HeLa等实体瘤体内外模型中验证了溶瘤病毒和CAR-T联合治疗可以提高溶瘤病毒靶向性, 并通过CAR-T调节肿瘤免疫抑制微环境, 进一步提高抗肿瘤效果和小鼠的预后, 也为CAR-T在实体瘤中的治疗开辟了新的方向。

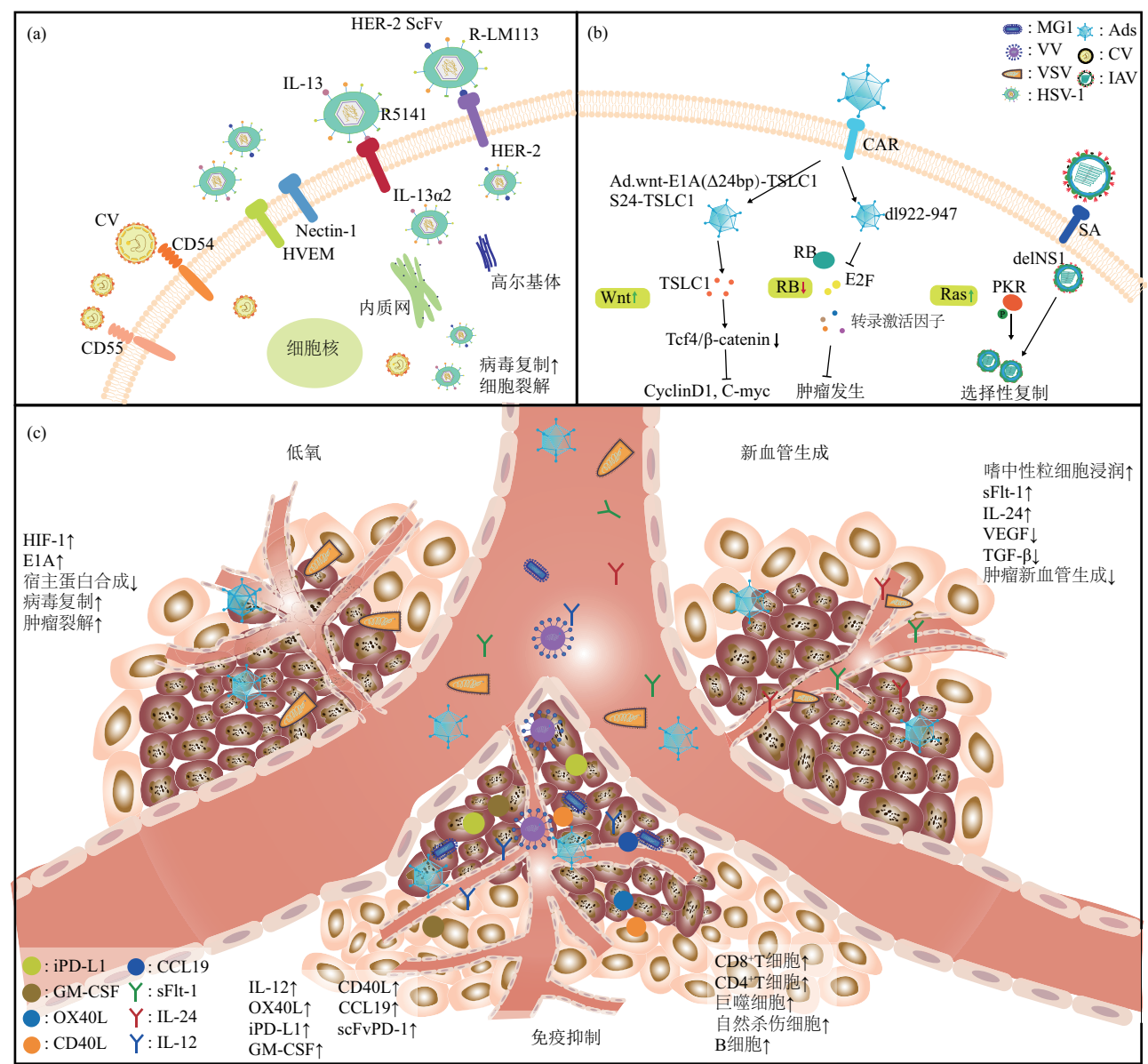


Fig. 1 Tumor targeting mechanism of oncolytic virus
图1 溶瘤病毒靶向肿瘤的机制
(a) 溶瘤病毒靶向识别肿瘤细胞表面受体; (b) 溶瘤病毒靶向抑制肿瘤细胞内促肿瘤生长信号通路; (c) 溶瘤病毒靶向适应和改善肿瘤微环境。

4 挑战与展望

早期的溶瘤病毒疗法大多使用天然病毒, 虽然在实体瘤和少量转移瘤的治疗过程中取得一定效果, 但存在靶向性差、副作用大、无法引起有效的肿瘤免疫、仅能通过瘤内给药等缺陷。随着基因工程技术的不断发展, 溶瘤病毒的研究取得了巨大的进步。肿瘤靶向性得到巨大提升, 毒副作用明显降低, 通过插入细胞因子等提升宿主的抗肿瘤免疫, 这些为难治性实体瘤和转移瘤的治疗带来希望^[57]。

虽然溶瘤病毒疗法取得了巨大的进步, 但在治疗过程中也存在许多障碍。溶瘤病毒属于活病毒, 可以在宿主体内进行复制, 同时宿主的免疫系统会对溶瘤病毒进行清除, 所以在治疗过程中如何动态保持有效的溶瘤剂量是现今需要解决的问题。不仅如此, 病毒载体和外源基因能否稳定地在宿主细胞内进行复制, 为溶瘤病毒的安全性带来了新的挑战^[38]。除此之外, 溶瘤病毒的给药途径和临床患者的选择都将成为溶瘤病毒发展过程中需要解决的困难。

随着科技不断发展以及人们对溶瘤病毒载体和肿瘤发病机制等研究的深入, 使用天然溶瘤病毒或基因工程修饰的溶瘤病毒、与其他疗法和药物联合治疗等都为靶向治疗肿瘤提供了新的方向。因此, 溶瘤病毒在今后必将会成为对抗肿瘤的“主力军”, 在人类抗肿瘤事业和人类健康中发挥积极作用。

参 考 文 献

- [1] Chen D S, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 2017, **541**(7637): 321-330
- [2] Elvington M, Liszewski M K, Atkinson J P. CD46 and oncologic interactions: friendly fire against cancer. *Antibodies (Basel)*, 2020, **9**(4): 59
- [3] Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, *et al.* Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization. *J Immunol*, 2017, **198**(3): 1006-1014
- [4] Connor J H, Naczki C, Koumenis C, *et al.* Replication and cytopathic effect of oncolytic vesicular stomatitis virus in hypoxic tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *J Virol*, 2004, **78**(17): 8960-8970
- [5] Shafren D R, Dorahy D J, Ingham R A, *et al.* Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J Virol*, 1997, **71**(6): 4736-4743
- [6] Haghi A R, Vahedi A, Shekarchi A A, *et al.* Correlation of serum intercellular adhesion molecule 1 and vascular endothelial growth factor with tumor grading and staging in breast cancer patients. *J Cancer Res Ther*, 2017, **13**(2): 257-261
- [7] Bradley S, Jakes A D, Harrington K, *et al.* Applications of coxsackievirus A21 in oncology. *Oncolytic Virother*, 2014, **3**: 47-55
- [8] Menotti L, Cerretani A, Hengel H, *et al.* Construction of a fully retargeted herpes simplex virus 1 recombinant capable of entering cells solely *via* human epidermal growth factor receptor 2. *J Virol*, 2008, **82**(20): 10153-10161
- [9] Mintz A, Gibo D M, Slagle-Webb B, *et al.* IL-13Ralpha2 is a glioma-restricted receptor for interleukin-13. *Neoplasia*, 2002, **4**(5): 388-399
- [10] Zhou G, Roizman B. Construction and properties of a herpes simplex virus 1 designed to enter cells solely *via* the IL-13alpha2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(14): 5508-5513
- [11] Rahman M M, Mcfadden G. Oncolytic viruses: newest frontier for cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 2021, **13**(21): 5452
- [12] Verheije M H, Rottier P J. Retargeting of viruses to generate oncolytic agents. *Adv Virol*, 2012, **2012**: 798526
- [13] Zhong Z, Yu J, Virshup D M, *et al.* Wnts and the hallmarks of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, **39**(3): 625-645
- [14] Zhang J, Lai W, Li Q, *et al.* A novel oncolytic adenovirus targeting Wnt signaling effectively inhibits cancer-stem like cell growth *via* metastasis, apoptosis and autophagy in HCC models. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, **491**(2): 469-477
- [15] Wang Y, Huang P, Hu Y, *et al.* An oncolytic adenovirus delivering TSLC1 inhibits Wnt signaling pathway and tumor growth in SMMC-7721 xenograft mice model. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, **53**(6): 766-774
- [16] Johnson J, Thijssen B, Mcdermott U, *et al.* Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. *Oncogene*, 2016, **35**(37): 4829-4835
- [17] Heise C, Hermiston T, Johnson L, *et al.* An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med*, 2000, **6**(10): 1134-1139
- [18] Kesterson S P, Ringiesn J, Vakharia V N, *et al.* Effect of the viral hemorrhagic septicemia virus nonvirion protein on translation *via* PERK-eIF2 α pathway. *Viruses*, 2020, **12**(5): 499
- [19] Hale B G, Randall R E, Ortin J, *et al.* The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol*, 2008, **89**(Pt10): 2359-2376
- [20] Bergmann M, Romirer I, Sachet M, *et al.* A genetically engineered influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties. *Cancer Res*, 2001, **61**(22): 8188-8193
- [21] Qiu X, Fu Q, Meng C, *et al.* Newcastle disease virus V protein targets phosphorylated STAT1 to block IFN-I signaling. *PLoS One*, 2016, **11**(2): e0148560
- [22] Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett*, 2017, **387**: 61-68
- [23] Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol*, 2001, **18**(4): 243-259
- [24] Chun Y S, Adusumilli P S, Fong Y. Employing tumor hypoxia for oncolytic therapy in breast cancer. *J Mammary Gland Biol*

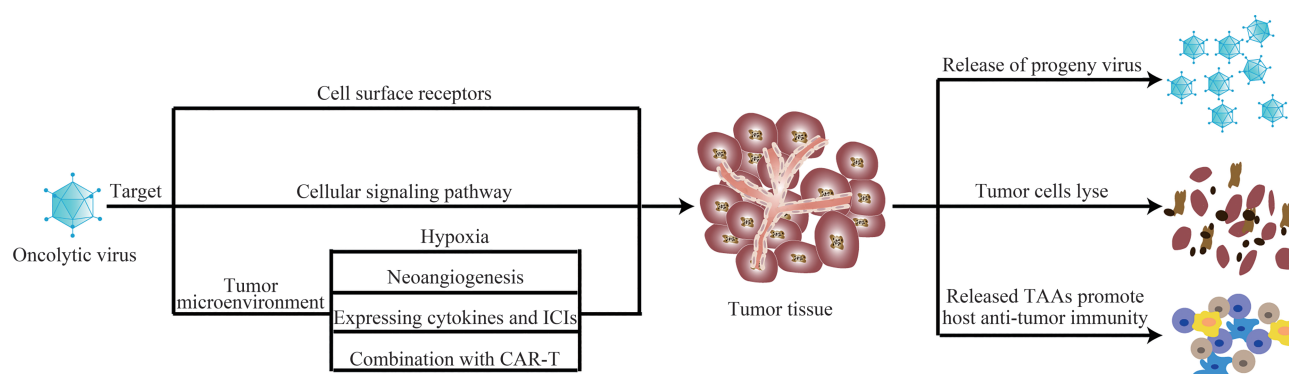
- Neoplasia, 2005, **10**(4): 311-318
- [25] Joseph J P, Harishankar M K, Pillai A A, *et al.* Hypoxia induced EMT: a review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. *Oral Oncol*, 2018, **80**: 23-32
- [26] Post D E, Van Meir E G. A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy. *Oncogene*, 2003, **22**(14): 2065-2072
- [27] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 2002, **29**(6 Suppl 16): 15-18
- [28] Macedo N, Miller D M, Haq R, *et al.* Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. *J Immunother Cancer*, 2020, **8**(2): e001486
- [29] Breitbach C J, De Silva N S, Falls T J, *et al.* Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus. *Mol Ther*, 2011, **19**(5): 886-894
- [30] Zhang Z, Zou W, Wang J, *et al.* Suppression of tumor growth by oncolytic adenovirus-mediated delivery of an antiangiogenic gene, soluble Flt-1. *Mol Ther*, 2005, **11**(4): 553-562
- [31] Persaud L, Mighty J, Zhong X L, *et al.* IL-24 promotes apoptosis through cAMP-dependent PKA pathways in human breast cancer cells. *Int J Mol Sci*, 2018, **19**(11): 3561
- [32] Chai L, Liu S, Mao Q, *et al.* A novel conditionally replicating adenoviral vector with dual expression of IL-24 and arretsen inserted in E1 and the region between E4 and fiber for improved melanoma therapy. *Cancer Gene Ther*, 2012, **19**(4): 247-254
- [33] Wang Y A, Li X L, Mo Y Z, *et al.* Effects of tumor metabolic microenvironment on regulatory T cells. *Mol Cancer*, 2018, **17**(1): 168
- [34] Yu J, Du W, Yan F, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol*, 2013, **190**(7): 3783-3797
- [35] Jiang X, Shapiro D J. The immune system and inflammation in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, **382**(1): 673-682
- [36] Postow M A, Sidlow R, Hellmann M D. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade. *N Engl J Med*, 2018, **378**(2): 158-168
- [37] Ludgate C M. Optimizing cancer treatments to induce an acute immune response: radiation abscopal effects, PAMPs, and DAMPs. *Clin Cancer Res*, 2012, **18**(17): 4522-4525
- [38] Zheng M, Huang J, Tong A, *et al.* Oncolytic viruses for cancer therapy: barriers and recent advances. *Mol Ther Oncolytics*, 2019, **15**: 234-247
- [39] Lu X. Impact of IL-12 in Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 2017, **17**(8): 682-697
- [40] Ge Y, Wang H, Ren J, *et al.* Oncolytic vaccinia virus delivering tethered IL-12 enhances antitumor effects with improved safety. *J Immunother Cancer*, 2020, **8**(1): e000710
- [41] Bommarreddy P K, Patel A, Hossain S, *et al.* Talimogene laherparepvec (T-VEC) and other oncolytic viruses for the treatment of melanoma. *Am J Clin Dermatol*, 2017, **18**(1): 1-15
- [42] Guo Z S, Lu B, Guo Z, *et al.* Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. *J Immunother Cancer*, 2019, **7**(1): 6
- [43] Nagarsheth N, Wicha M S, Zou W P. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2017, **17**(9): 559-572
- [44] Li J, O'malley M, Sampath P, *et al.* Expression of CCL19 from oncolytic vaccinia enhances immunotherapeutic potential while maintaining oncolytic activity. *Neoplasia*, 2012, **14**(12): 1115-1121
- [45] Loskog A, Totterman T H. CD40L - a multipotent molecule for tumor therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2007, **7**(1): 23-28
- [46] Karnell J L, Rieder S A, Ettinger R, *et al.* Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: humoral immunity and beyond. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, **141**: 92-103
- [47] Pesonen S, Diaconu I, Kangasniemi L, *et al.* Oncolytic immunotherapy of advanced solid tumors with a CD40L-expressing replicating adenovirus: assessment of safety and immunologic responses in patients. *Cancer Res*, 2012, **72**(7): 1621-1631
- [48] Ylösmäki E, Ylösmäki L, Fuscicello M, *et al.* Characterization of a novel OX40 ligand and CD40 ligand-expressing oncolytic adenovirus used in the PeptiCRAAd cancer vaccine platform. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, **20**: 459-469
- [49] Miko E, Meggyes M, Doba K, *et al.* Immune checkpoint molecules in reproductive immunology. *Front Immunol*, 2019, **10**: 846
- [50] Wang G, Kang X, Chen K S, *et al.* An engineered oncolytic virus expressing PD-L1 inhibitors activates tumor neoantigen-specific T cell responses. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 1395
- [51] Passaro C, Alayo Q, De Laura I, *et al.* Arming an oncolytic herpes simplex virus type 1 with a single-chain fragment variable antibody against PD-1 for experimental glioblastoma therapy. *Clin Cancer Res*, 2019, **25**(1): 290-299
- [52] Yu W L, Hua Z C. Chimeric antigen receptor T-cell (CAR T) therapy for hematologic and solid malignancies: efficacy and safety-a systematic review with meta-analysis. *Cancers (Basel)*, 2019, **11**(1): 47
- [53] Bommarreddy P K, Shettigar M, Kaufman H L. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2018, **18**(8): 498-513
- [54] Tang X Y, Ding Y S, Zhou T, *et al.* Tumor-tagging by oncolytic viruses: a novel strategy for CAR-T therapy against solid tumors. *Cancer Lett*, 2021, **503**: 69-74
- [55] An L, Lin Y, Deng B, *et al.* Humanized CD19 CAR-T cells in relapsed/refractory B-ALL patients who relapsed after or failed murine CD19 CAR-T therapy. *BMC Cancer*, 2022, **22**(1): 393
- [56] 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
- [57] Ylosmaki E, Cerullo V. Design and application of oncolytic viruses for cancer immunotherapy. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, **65**: 25-36

Strategies for Tumor Targeting Therapy by Oncolytic Viruses*

FANG Zhong-Yue, LIANG Liang, LÜ Wei-Min, ZHANG Lan-Qing, YANG Fan,
ZHANG Ji-Hong, OU Xia**

(Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Graphical abstract



Abstract In recent years, several oncolytic virus preparations has been approved for marketing, leading to the oncolytic virus therapy to become the focus of tumor immunotherapy. Oncolytic viruses can selectively infect and lyse tumor cells, and release tumor-associated antigens (TAAs) to activate anti-tumor immune response to inhibit tumor growth. The safety and efficacy of oncolytic virus are determined by its targeted killing effect on tumor. In order to develop safe and efficient oncolytic viruses, the following strategies are mainly adopted: taking advantage of the natural target of some virus on tumor cells to make oncolytic viruses selectively replicate in tumor cells and kill tumor cells; alternatively, the viral genome can be modified by deletion of some virus gene or insertion of some exogenous gene to promote virus targeting tumor cell-specific surface receptors, intracellular signaling pathways, or the tumor microenvironment to improve the targeting ability of oncolytic viruses. In tumor microenvironment, hypoxia, neovascularization and immunosuppression usually can be targets of oncolytic viruses. In order to regulate immunosuppressive state, oncolytic viruses are commonly used to express cytokines and immune checkpoint inhibitors, or combine with CAR-T cells. In this paper, we will review the research progress of therapy strategies of the oncolytic virus-targeted tumor.

Key words oncolytic virus, targeting, surface receptor, signaling pathway, tumor microenvironment

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0061

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81960555), The Scientific Research Foundation of the Yunnan Provincial Department of Education (2023Y0434), The Kunming University of Technology - Kunming University of Technology Affiliated Hospital (The First People's Hospital of Yunnan Province) Medical Joint Special Program (KUST-KH2022008Y), and Kunming Expert Workstation (YSZJG22-2020046).

** Corresponding author.

Tel: 86-13888671615, E-mail: 24553258@qq.com

Received: February 21, 2022 Accepted: May 12, 2022