

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.023

免疫增强性溶瘤病毒肿瘤疫苗的研究进展

Progress in immunogene-armed oncolytic viruses-based personalized cancer vaccines

郭元彪¹, 俞德超² (1. 重庆医科大学 附属成都第二临床学院 实验医学研究部, 四川 成都 610031; 2. 四川大学 华西医院 生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 溶瘤病毒可在肿瘤细胞中增殖复制,并溶解瘤细胞,释放肿瘤抗原,激发机体自身的抗肿瘤免疫反应,它具有基因操控性、规模化、肿瘤选择性等生物学特征,从而成为个性化肿瘤疫苗的优良载体。但是,肿瘤存在很强的免疫抑制网络,单纯性溶瘤病毒难以激发理想的免疫应答。因此,根据需要加载不同的免疫调控分子,以增强机体的抗肿瘤免疫能力,已成为溶瘤病毒肿瘤疫苗研究的新思路。基于这一原理设计的 OncoVex^{GM-CSF}、JX-594、CG0070、KH901 等免疫增强型肿瘤疫苗在临床试验中取得了较为显著的疗效,为肿瘤个性化疫苗的临床应用带来了曙光。尽管如此,溶瘤病毒肿瘤疫苗在疗效评价标准、作用机制、给药方式与治疗方案等方面还需要更为深入的探索。

[关键词] 溶瘤病毒、个性化治疗、肿瘤疫苗、临床试验、肿瘤免疫

[中图分类号] R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)04-0456-07

肿瘤疫苗是通过激发机体自身免疫系统产生肿瘤特异性杀伤效应,避免了化疗药物对机体正常组织的毒性作用,以及手术治疗的局部效应和暂时性,同时具有非侵入性治疗、不良反应小、低毒性、长效性等特征。因此,人们对于应用肿瘤疫苗控制肿瘤的转移和复发寄予了很高的期望,并取得了突破性进展。尤其是最近,人类第一个治疗性肿瘤疫苗——Provenge 已经获得美国 FDA 认证。通过 III 期临床试验研究证实,Provenge 可显著延长前列腺癌患者生存期,这将开启肿瘤个性化治疗的先河。类似的疫苗也取得了重大的突破与快速推进,尤其是基于溶瘤病毒设计的肿瘤疫苗。鉴于在初期临床试验中的显著性疗效,4 个溶瘤病毒肿瘤疫苗获美国 FDA 批准,进入特殊临床试验方案评价程序 (special protocol assessment, SPA),它们是 OncoVex^{GM-CSF}、Biovex、Reolysin、JX-594,明显显示了溶瘤病毒在肿瘤治疗中的强大力量^[1]。基于溶瘤病毒肿瘤治疗的突出设计原理与临床应用前景,人用药物注册技术要求国际协调会议 (International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human Use, US FDA, ICH) 和 WHO 等多家国际性组织先后发布了其工业指南 (guideline of industry),给出了治疗性溶瘤病毒的研发与生产路径。

1 肿瘤疫苗及其临床试验研究的现状

免疫学与分子生物学的进步带来了肿瘤疫苗研究的飞速发展。用生物医学领域最大的文献数据库

PUBMED 检索 2000 年到 2010 年关于“cancer vaccines”的文献,可以清晰地看到肿瘤疫苗研究的递增速率,但是在 2006 年以后有所减缓。值得关注的是,其中肿瘤疫苗的临床试验研究却在逐年递增 (图 1)。

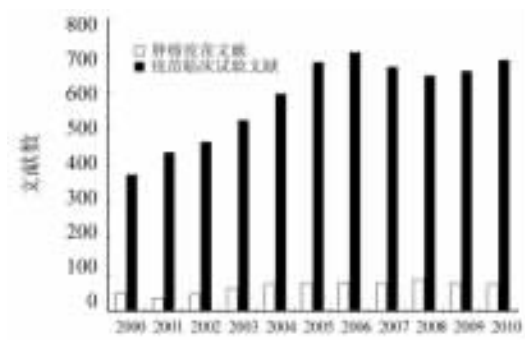


图 1 2000 年到 2010 年关于肿瘤疫苗研究的文献

目前,已经有多种肿瘤疫苗方案,根据抗原是否来自宿主大致可分为异源性 (allogeneic) 和自源性 (autologous) 肿瘤疫苗。异源性肿瘤疫苗包括特定

[基金项目] 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (No. 2007AA021001, No. 2007AA021202)。Project supported by the National High Technology Research and Development Program (863 Program) of China (No. 2007AA021001, No. 2007AA021202)

[作者简介] 郭元彪 (1970 -), 男, 重庆市合川县人, 博士, 主要从事消化疾病标志物研究。E-mail: guo.yubiao@gmail.com

[通信作者] 俞德超 (YU De-chao, corresponding author), E-mail: mich204@yahoo.com

的肿瘤细胞及其蛋白、肽段、裸 DNA,肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)或肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)的重组病毒, TAA 或 TSA 的抗独特型抗体,肿瘤脱落抗原等等。自源性肿瘤疫苗包括自身肿瘤细胞及其蛋白、病毒感染的自身肿瘤细胞、溶瘤病毒、树突状细胞(dendritic cells, DC)等。

虽然众多的疫苗在实验室研究及临床前研究中均取得了激动人心的成功,但是其临床试验研究却遇到了前所未有的困难。大多数肿瘤疫苗的临床疗效差强人意,获得完全缓解 CR(complete response)和部分缓解 PR(partial response)的病例非常少,只有少数患者的肿瘤发展得到了控制(stable disease, SD)。肿瘤免疫治疗的先驱 Steven Rosenberg 在其最近的一篇文章中综合了 1 306 个应用疫苗方案治疗转移性肿瘤的临床试验结果,发现总体的客观有效率(objective response, OR)仅为 3.3%^[2]。在众多的随机性临床试验中,肿瘤疫苗均未能达到预期的总体生存期(overall survival, OS)或者无进展生存期(progression-free survival, PFS)^[3]。但是比较异源性和自源性两种肿瘤疫苗,后者的表现显著好于前者。其中最重要的原因是两者在设计原理上有着本质的不同,异源性肿瘤疫苗着眼于某一个肿瘤特异性抗原或者肿瘤相关抗原,比如治疗黑素瘤的 Gp100、MALT-1、酪氨酸酶;治疗前列腺癌的 PSA 等等^[4];亦或是某一种异源性肿瘤细胞,比如运用某一细胞株治疗前列腺癌的 GVAX^[5]。而自源性肿瘤疫苗的抗原或者 DC 来自与患者自身,如新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)感染自身肿瘤细胞的 ATV-NDV(NDV infected autologous tumor cell vaccine)^[6],彰显了疫苗的个性化特征。

这些临床试验显示个性化疫苗更具有抗肿瘤能力和可行性。事实上,传统的肿瘤疫苗方法(异源性肿瘤疫苗)存在诸多缺陷。一方面,肿瘤抗原多是机体自身抗原,其免疫原性低,诱发的免疫应答低;另一方面,肿瘤细胞一直处于不断进展的状态中,其基因组非常不稳定,这导致肿瘤的抗原性发生变化,从而使以固定抗原制备的肿瘤疫苗失去免疫活力;更重要的是,不同患者的肿瘤特征不同,个体差异显著,因此,选取同一种抗原进行免疫(one for all),可能产生的临床疗效也会大相径庭,这些因素是导致异源性肿瘤疫苗失败的重要原因。大量的临床试验结果也显示,运用一刀切策略制备的异源性肿瘤疫苗几乎没有通过 III 期临床试验证实其临床有效性的案例^[3],而自源性肿瘤疫苗中应用 GM-CSF

作为免疫佐剂的、基于患者自身 DC 的肿瘤疫苗 Provenge 在 III 期临床试验中可显著提高患者生存期,成为 FDA 批准的首个治疗性肿瘤疫苗类药物^[7]。ATV-NDV 在正在进行的 III 期临床试验中也显示了其治疗结肠癌的潜在有效性^[6]。自源性肿瘤疫苗正是基于肿瘤的显著个体差异这一特征而设计,也为个性化肿瘤疫苗提供了理论和实践依据。

2 个性化肿瘤疫苗的希望——溶瘤病毒疫苗

虽然个性化肿瘤疫苗具有其优势,但是目前大多数自源性肿瘤疫苗是来源于患者自身的肿瘤组织或细胞、或者 DC,从而在临床实践上存在局限性。比如,Provenge 需要从患者体内分离 DC,然后通过体外培养加载含有前列腺癌标志蛋白前列腺酸性磷酸酶(prostatic acid phosphatase, PAP)与 GM-CSF 的融合蛋白(PA2024),这增加了临床操作的难度、产品成本与产业化难度,产品的质量尤其困难^[7]。溶瘤病毒的出现,使得类似的问题迎刃而解。肿瘤特异性溶瘤病毒不但可以大规模生产培养,严格质控,同时接受这类溶瘤病毒治疗的患者可产生具有自身肿瘤特异性的抗肿瘤免疫应答,克服了肿瘤抗原及免疫系统的个体差异,从而实现肿瘤的个性化治疗^[8]。尽管应用溶瘤病毒抗肿瘤已经有上百年的历史了,而其真正进入临床试验却是在 20 世纪 90 年代以后,得益于分子生物学和免疫学的飞速发展^[9]。

溶瘤病毒的一般设计是使病毒特异性地在肿瘤细胞中增殖复制,并溶解细胞,从而实现对肿瘤细胞的特异性直接杀伤。理论上,溶瘤病毒具备所有个性化疫苗应当具备的条件^[8]:①通过病毒的溶瘤作用,可获得丰富的各种来自于个体自身的肿瘤抗原,并且不受抗原亚细胞定位的局限性,而传统的疫苗则需要细胞膜蛋白作为疫苗;②瘤内注射病毒可产生局部感染反应,募集 T 细胞;③在溶瘤病毒中加载免疫增强因子,可获得高浓度局部免疫因子,增强抗肿瘤免疫反应;④通过对溶瘤病毒进行改造,病毒可选择性在肿瘤中复制,从而特异性溶解肿瘤细胞,直接发挥细胞毒性作用,并不伤害正常组织;⑤溶瘤病毒可以大规模生产,并且质量可控性和稳定性好。

至今,已经有 100 多种病毒采用了不同的抗瘤机制进行实验研究。在研的溶瘤病毒有腺病毒、单纯疱疹病毒、牛痘病毒、麻疹病毒、逆转录病毒、多瘤病毒、细小病毒、呼肠病毒、副黏病毒属、棒状病毒、冠状病毒、小核糖核苷酸病毒等。使用得最早和最多的是腺病毒,应用于临床试验的有 KH901、ONYX-

015、CG0070、CV706 和 CG7870 等。2005 年, 中国食品与药品监督管理局批准了世界上首个抗肿瘤溶瘤腺病毒药物 H101(安柯瑞)。在 20 种应用于临床试验的溶瘤病毒中, 根据基因改造的不同, 溶瘤病毒可分为如下三种: 一是野生型溶瘤病毒, 比如 ATV-NDV; 二是肿瘤靶向型溶瘤病毒, 通过缺失病毒的某些基因实现病毒复制的肿瘤选择性, 比如 ONYX-015、H101 等; 三是基因加载型溶瘤病毒, 在实现溶瘤病毒肿瘤特异性复制的同时还加载了其他基因, 比如加载免疫共刺激因子 GM-CSF 的 KH901、JX-594、OncoVex^{GM-CSF}, 加载了血清学监测指标 CEA 的麻疹病毒 MV-CEA, 以及加载了促化疗药物活性的融合蛋白 CD/TK 的腺病毒 Ad5-CD/TK 等^[10]。

3 免疫性溶瘤病毒的设计原理

由于肿瘤存在很强的免疫抑制网络, 单纯性溶瘤病毒所激发的免疫应答通常不理想, 其临床试验也是如此, 同时至今尚未见免疫应答与临床疗效的关联性。如前所述, 加载了免疫调控因子的溶瘤病毒更具有个性化肿瘤疫苗的特征。免疫共刺激因子等免疫调控分子在增强肿瘤疫苗的免疫能力方面具有极为重要的作用, 通过溶瘤病毒肿瘤选择性表达这些因子, 可以产生局部高浓度, 打破肿瘤免疫耐受, 并激发特异性抗肿瘤免疫反应。目前将具有肿瘤选择性并加载了免疫调控因子的溶瘤病毒称为免疫性溶瘤病毒。

3.1 肿瘤选择性是溶瘤病毒疫苗的首要条件

溶瘤病毒的选择性复制最主要的两条原则是: ①敲除调控病毒复制的关键基因, 并替换为肿瘤细胞特异表达基因的启动子; ②基于病毒复制与肿瘤细胞转化存在许多相同的转录调控机制, 尤其是细胞增殖信号途径, 敲除病毒在正常细胞中复制的基因, 而保留其在肿瘤细胞中的复制能力^[11]。第一种以肿瘤细胞特有的转录调控因子为靶向, 比如, 人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 是肿瘤细胞中活跃的转录因子, 90% 的肿瘤高表达 hTERT^[12], 本课题组构建的 TOA02 (KH901) 在头颈部肿瘤和肝癌中均有良好的肿瘤选择性^[13]。或者以肿瘤细胞特异性蛋白的转录因子为靶向, 比如, 肝癌的 AFP、黑素瘤的酪氨酸酶等等。1999 年, 俞德超研究小组^[14]率先开展了通过静脉给药治疗前列腺肿瘤的动物实验研究, 并在 2001 年进行了靶向性溶瘤病毒 (CV706/CG7060) 治疗前列腺癌的临床试验^[15]。CV706 可在前列腺癌特异性标志物 PSA 的转录启动子引导

下, 启动溶瘤腺病毒复制。后来他们采用了双重前列腺癌特异性转录调控元件的 CG7870, 进一步提高了对前列腺癌的选择性, 是 CG7060 的 100 倍^[15]。

第二种多以特有的促进肿瘤增殖的信号途径为靶向。针对信号通路的方法则很多, 包括 RB/E2F/p16、P53、IFN、PKR、EGFR、Ras、Wnt、抗凋亡和抗低氧通路等等。其基因操作也因信号通路分子的不同而各不相同^[16]。比如, 同样由俞德超研究小组构建的 CG0070, 在 Rb 信号通路缺失的肿瘤细胞中选择性表达腺病毒的 E1a 和 GM-CSF, 而在正常细胞中的复制能力仅为野生型腺病毒的 1/100 ~ 1/10 000, 同时其对膀胱癌细胞的杀伤率是正常细胞的 1 000 倍^[17]。

3.2 加载免疫调控因子

如前所述, 肿瘤抗原的免疫原性通常较低, 并且肿瘤免疫微环境存在很强的免疫抑制效应, 可诱导产生调节性 T 细胞, 分泌 IL-10、TGF- β 等免疫抑制因子, 因此, 很难引起有效的抗肿瘤免疫应答^[18]。大量的临床试验也证实, 仅仅具有溶瘤效应的设计很难实现治疗的长效性, 因此, 在溶瘤病毒中加载增强抗肿瘤效应的分子显得尤为重要^[11]。在溶瘤病毒中加载的主要有三类分子: 免疫共刺激分子、热休克蛋白 (hot shock protein, HSP)^[19]、融合性膜糖蛋白 (fusogenic membrane glycoprotein, FMG)^[20]。

目前最受关注的方案是加载免疫共刺激分子 GM-CSF 的溶瘤病毒。GM-CSF 可以在肿瘤局部募集 DC 并使其成熟, 改善免疫细胞对肿瘤抗原的识别与提呈, 提高免疫系统对肿瘤细胞的特异性杀伤效应。小鼠的体内研究^[21]表明, 与其他细胞因子 (包括 IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IFN- γ 、ICAM-1、CD2、TNF- α) 以及 IL-1 受体拮抗剂相比, 以转染 GM-CSF 的肿瘤细胞作为肿瘤疫苗具有长效的系统性抗肿瘤效应。GM-CSF 也是目前最为广泛使用的免疫共刺激分子类肿瘤疫苗佐剂。应用 GM-CSF 进行肿瘤治疗也取得了很好的疗效, 比如, 顺铂耐药的转移性前列腺癌患者进行 GM-CSF 治疗后, 几乎所有患者均出现前列腺癌特异性抗原 (PSA) 的显著降低, 同时部分患者的骨转移得到了改善。近来的研究显示, GM-CSF 通过促进 DC 的功能, 建立 CTL 细胞的肿瘤特异性杀伤, 实现抗肿瘤效应。其中最为引人注目的莫过于最近 III 期临床试验取得了成功的 provenge。Provenge 通过融合了 GM-CSF 的 PSA 刺激患者的 DC 细胞, 可使患者血清前列腺癌标志物 PAP 显著降低, 同时提高患者的生存期, 尤其是 3 年生存率提高了 3 倍, 达到了 34%^[7, 22]。在免疫性溶瘤病

毒中,也只有加载 GM-CSF 的溶瘤病毒进入了临床试验,包括 KH901、CG0070、OncoVex^{GM-CSF} 和 JX-594 等。IL-12 是 B 细胞和 DC 等分泌的免疫调控因子,能刺激 T 细胞及 NK 细胞增殖,促进 T 细胞成熟,促进 CTL 和 NK 细胞的杀伤功能,并诱导多种细胞因子的分泌,尤其是 IFN- γ ,在抗肿瘤免疫中发挥着重要作用。

如前所述,溶瘤病毒疫苗的设计理念之一是溶解肿瘤细胞,释放肿瘤抗原,激发机体的抗肿瘤免疫反应。肿瘤抗原激活 DC 无疑是其中至关重要的环节。研究^[23]表明, β -defensin-2(BD2)可通过向局部募集 DC,刺激 DC 成熟,促进 T 细胞抗肿瘤效应。在腺病毒中加载激活 DC 的辅助分子 BD2 即构成溶瘤病毒疫苗 Ad-BD2-E1A,瘤内注射 Ad-BD2-E1A 疫苗可抑制原位和转移乳腺癌的生长。免疫小鼠的脾脏和瘤内 DC 可促进原始 T 细胞分化为肿瘤特异性 CTL,而且成熟的 CD45RA⁺ CD8 α ⁺ CD40⁺ 浆细胞样 DC(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)也出现于免疫后的肿瘤组织中。Ad-BD2-E1A 在 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)缺失的小鼠中却不能发挥免疫作用,这表明,TLR4 介导了 Ad-BD2-E1A 诱发的免疫效应。干扰素 β (interferon- β , IFN- β)可以诱导抗肿瘤抗体的产生,活化 NK、CTL 和巨噬细胞,在临床中广泛应用。IFN- β 腺病毒与条件性复制腺病毒 Δ 24RGD 同时转染 Luis 肺癌细胞,可增强 CTL 抗肿瘤免疫,显著抑制肿瘤的生长并延长荷瘤小鼠的生存期^[24]。

IL-18 可促进 NK 和 T 细胞的发育,并刺激其分泌 IFN- γ ,促进 Fas 介导的 NK 细胞杀伤作用,上调 Th1 细胞分泌细胞因子,参与抗肿瘤免疫。表达 IL-18 的 ZD55-IL-18 腺病毒可促进肿瘤细胞凋亡,降低黑素瘤 VEGF 和 CD34 的表达^[25]。

另一种通过拮抗免疫抑制因子增强肿瘤免疫的方案是加载 TGF- β RII。在 hTERT 启动子下调控下加载 TGF- β RII 与 Fc IgG1(TGF- β RII-Fc)基因,表达分泌型 sTGF- β RII-Fc 融合蛋白(sT β RFc),通过靶向 TGF β 通路抑制乳腺癌的转移。在体外研究中,将 hTERT-Ad. sT β RFc 腺病毒转染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞,48 h 后病毒滴度可增加 6 000 倍,高表达 sT β RFc(达 1 mg/ml),而此腺病毒在正常细胞中不能复制。另一种有趣的情况是,复制缺陷型 Ad(E1₋). sT β RFc 在乳腺癌细胞虽不能复制,却也可高表达 sT β RFc。sT β RFc 可结合 TGF- β ,抑制下游 SMAD-3 的磷酸化。将 hTERT-Ad. sT β RFc 腺病毒静脉注射入荷乳腺癌裸鼠,可抑制肿

瘤细胞的生长,并在血清中检测到 sT β RFc,但同样注射 Ad(E1₋). sT β RFc 却没有抗肿瘤作用,提示病毒的复制局限于肿瘤细胞^[26]。

此外,Shin 等将 IL-12 加载于疱疹性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV),可增强 VSV 对小鼠头颈部鳞癌的疗效^[27]。还有将 IL-4 或者 B-7 加载于 HSV-1(herpes simplex virus-1),也可同时加载两种或者三种分子,如 GM-CSF 与 B7-1 的联合,IL-12、IL-18 和 B7 的联合^[28, 29]。

4 免疫性溶瘤病毒的临床试验研究

已经进入临床试验的免疫性溶瘤病毒有 5 种,其中 4 种携带 GM-CSF 作为免疫佐剂,包括 JX-594、OncoVex^{GM-CSF}、CG0070 和 KH901,另一种是加载 IFN- β (临床 I 期试验)^[30]。目前,这类药物主要通过瘤内注射途径给药。

4.1 OncoVex^{GM-CSF}

OncoVex^{GM-CSF} 是单方治疗肿瘤最具有前景的溶瘤病毒^[31],是英国 BioVex 公司开发的 ICP34.5、ICP47 失活的 HSV-1 突变株,并表达 GM-CSF。ICP34.5 的缺失或失活使其可在多种人肿瘤细胞中特异性复制。目前,OncoVex^{GM-CSF} 治疗的肿瘤包括头颈部肿瘤、黑素瘤、大肠癌、胰腺癌,主要不良反应为局部的红肿、炎性反应。对于黑素瘤采用单方瘤内给药,在治疗 50 例黑素瘤的临床 II 期试验中,26% 患者出现客观有效率,其中 8 例 CR,5 例 PR,其余为 SD。OncoVex^{GM-CSF} 的免疫评价(目前尚无确切的数据公布)采用了肿瘤标志物(gp100、MART-1、tyrosinase)表达水平和肿瘤应答时间来评估。体液免疫检测了 HSV 抗体滴度;细胞免疫检测结果显示肿瘤局部 GM-CSF mRNA 表达呈剂量依赖性,但是血清和尿中却始终未能检出 GM-CSF mRNA 表达,此外,还检测了肿瘤局部浸润淋巴细胞的变化。虽然,病毒的复制、GM-CSF 的表达以及与 HSV 抗原相关的肿瘤细胞坏死均得到了证实,但是,并未观察到细胞因子(IFN- γ 、IL-6、TNF- α)的改变,并且除了 LDH 的变化与 OncoVex^{GM-CSF} 的剂量呈相关性之外,其余指标未见与临床疗效存在关联性。OncoVex^{GM-CSF} 联合放化疗治疗头颈癌的 I/II 期临床试验结果显示,OncoVex^{GM-CSF} 剂量和疾病缓解之间有明显的量效关系,且对注射局部和远端的肿瘤都有效。鉴于 OncoVex^{GM-CSF} 在 I/II 期临床试验中的良好疗效,2008 年 4 月其研发公司 BioVex 已与 FDA 达成 SPA(special protocol assessment)协议,获准进入 III 期临床试验研究。

4.2 JX-594

JX-594 是以人 GM-CSF 基因替代了 TK 基因的牛痘病毒,可在肿瘤细胞中选择性复制^[32]。目前其适应症为肝癌、肠癌、黑素瘤和肺癌。在 I 期临床试验中,应用 JX-594 对 14 例原位和转移性肝癌患者进行治疗后,3 例 PR、6 例 SD、1 例 PD。外周血中性粒细胞随着 GM-CSF 表达而增高,并以单核细胞和嗜酸性粒细胞较显著。血小板减少呈剂量依赖性,但与治疗周期无关,病毒的清除与初始剂量以及病毒抗体滴度无关。体液免疫研究发现,病毒抗体滴度与 GM-CSF、病毒复制、JX-594 药代动力学以及临床有效性无关。细胞免疫研究发现,病毒注射后,细胞因子 IL-6、IL-10、TNF- α 在用药的第 2~8 周期较第 1 周期更高,IL-6 通常出现在血清 GM-CSF 可检测的病例。在非注射肿瘤能检测到病毒颗粒以及 GM-CSF,而且较血清中浓度高。在对肝癌的治疗中,检测了血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10 和 TNF- α 的水平,其中 IL-10 增高非常显著,但是作为诱导 CTL 产生的标志性细胞因子 IFN- γ 的增高幅度却弱于 IL-10,甚至很低^[33]。最近的 II 期临床试验进一步研究了其对晚期黑素瘤的疗效,JX-594 治疗 50 例 IIIc 和 IV 黑素瘤患者(其中 74% 治疗前接受过非手术性治疗),26% 患者为 OR,其中 CR 8 例、PR 5 例,并且对远端转移瘤有效。58% 和 52% 患者 OS 分别达到 1 年和 2 年。这些结果显示,JX594 瘤内注射的安全性好,可以有效表达 GM-CSF,对转移性肿瘤具有一定疗效。同时,该药已获 FDA 批准进入 III 期临床试验^[9]。

4.3 CG0070

CG0070 的设计原理如前述。CG0070 在膀胱癌的 I 期临床试验中证实了其安全性,并且初步显示出较好的疗效。用药 1~2 周后在尿中可检测到 CG0070,高剂量组在用药 5 d 后即可在尿中检测到 GM-CSF。9 例受试者中 3 例 CR,并且 3 个月以上的随访显示这 3 例患者 CG0070 的表达持续 9、6 及 3 个月以上^[14]。

4.4 KH901

KH901 在 5 型腺病毒的 E1 区前加载上融合了 E2F1 的两个结合位点的 hTERT 启动子,以增强其复制的肿瘤选择性,且在 Ad5 的 E3 区插入了 GM-CSF 基因^[13]。KH901 联合 5-氟尿嘧啶和顺铂化疗方案治疗头颈部肿瘤^[34]。从已进行的 II 期临床试验显示,18 例接受 KH901 治疗的患者中,PR 占 50%,而 17 例对照组中 PR 为 35%,而且接受 KH901 治疗的患者无进展生存期(PFS)出现了延长

的趋势。在 I 期临床试验中,KH901 治疗后所有患者均产生病毒中和抗体,血清 GM-CSF 在 24 h 达峰,最高可以增加 7 倍,且与病毒复制相关。仅单次给药的高剂量组可检测到血清 IL-1,血清 IL-6 与药物呈剂量效应,并在单次给药后的 24 h 达峰。而 38.5% 患者在单次给药后 24 h 能检出血清 IL-10,但是在多次给药后所有患者血清均出现 IL-10,并与病毒的拷贝数相关。血清 TNF 与 IL-10 在高剂量组与低剂量组均能检出,且高剂量组的水平高于低剂量组^[34]。对 II 期临床试验的免疫学分析,则通过 KH901 受试者血清抗体谱变化反映体液免疫功能,并以 ELISPOT 检测 T 淋巴细胞增殖及其分泌的细胞因子 IFN- γ 、IL-6、IL-10、TNF- α ,反映细胞免疫功能。对接受 KH901 多周期治疗的多个患者免疫指标检测结果显示,随着治疗周期的延长,细胞免疫逐渐增强,尤其是 IFN- γ 的表达,这对于机体建立肿瘤特异性的杀伤具有重要的意义。值得关注的是,16 例患者经 KH901 治疗 2 周期后,75% (12/16) 患者的免疫系统(体液免疫和细胞免疫)得到了活化,这些患者的瘤体缩小了大约 19%。反之,由于个体差异,其他免疫系统未得到活化的患者(4 例),其瘤体则增大了约 35%。即 KH901 的治疗可活化免疫系统,使患者瘤体显著缩小。

5 展 望

已有的研究结果显示,免疫增强性溶瘤病毒不但具有良好的局部抗肿瘤作用,同时也初步显示了其肿瘤疫苗的潜质,即对转移性肿瘤也具有积极的治疗效应,这与溶瘤病毒的临床前研究是一致的^[35]。但是,目前的研究也提出了许多值得关注的问题。第一,由于肿瘤疫苗与细胞毒性小分子药物存在药物动力学、药效的时效性、量效关系等等的巨大差别,如何评价肿瘤疫苗的疗效还是一个重大课题。用传统的肿瘤缩小为依据的短期反应指标来评价肿瘤疫苗疗效存在明显的不足。疫苗的作用机制涉及到免疫激活过程,需要一定时间才能建立免疫应答,从而转化成长期的临床效应。因此,以疾病稳定或者生存改善指标进行评价更恰当。治疗周期过短是目前肿瘤疫苗临床治疗的重大障碍,有的仅仅数周,这限制了肿瘤疫苗诱导机体产生免疫应答的时间,很难建立足以对抗肿瘤免疫抑制效应的免疫应答。已有的研究^[36]显示,通过肿瘤疫苗启动到能实现无瘤生存疗效的免疫应答大约需 1 年的时间,并且需要反复多次免疫才能建立免疫记忆效应,从而实现长期的主动抗肿瘤免疫应答^[37]。因此,在未

来的临床试验研究中尚有待进行多周期的免疫治疗,方能真正展现肿瘤疫苗的治疗作用。第二,溶瘤病毒疫苗的有效给药方式。由于机体对溶瘤病毒的侵入会产生免疫抵抗,比如抗病毒抗体和细胞免疫反应等,从而清除病毒,降低病毒的感染效率以及在瘤内的扩散。因此,在充分了解宿主与病毒间相互作用机制的基础,建立更为有效的传递系统对于提高疗效显得尤为重要。值得欣喜的是,近来这方面的研究已受到关注并取得了可喜的进展^[38]。第三,由于肿瘤免疫逃逸机制的复杂性,合理运用治疗方案,对突出肿瘤疫苗的疗效也很重要。对于是否联合运用化疗药物,一直存在争议,因为大多数化疗药物具有较强的免疫抑制效应。而现今的研究表明,化疗药物一方面可以增强溶瘤病毒在肿瘤细胞中的复制,另一方面溶瘤病毒也可在化疗药物耐受和抗凋亡的肿瘤细胞中复制,更重要的是,一些化疗药物比如环磷酰胺,可以通过抑制调节性 T 细胞等增强疫苗的抗肿瘤免疫作用^[39]。因此,选择合适的化疗药物与溶瘤病毒的联合方案可能获得更好的治疗效果。

[参 考 文 献]

- (34): 5763-5771.
- [10] Liu TC, Galanis E, Kim D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: A century of promise, a decade of progress [J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2007, 4(2): 101-117.
- [11] Ko D, Hawkins L, Yu DC. Development of transcriptionally regulated oncolytic adenoviruses [J]. *Oncogene*, 2005, 24(52): 7763-7774.
- [12] Yu DC, Working P, Ando D. Selectively replicating oncolytic adenoviruses as cancer therapeutics [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2002, 4(5): 435-443.
- [13] Lei N, Shen FB, Chang JH, et al. An oncolytic adenovirus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor shows improved specificity and efficacy for treating human solid tumors [J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(1): 33-43.
- [14] Senzer M, Nemunaitis J, Goldstein M, et al. A phase I dose-escalation trial of intravesical CG0070 for superficial transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder after BCG Failure [J]. *Molecular Therapy*, 2006, 13: S22
- [15] DeWeese TL, van der Poel H, Li S, et al. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(20): 7464-7472.
- [16] Guo ZS, Thorne SH, Bartlett DL. Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1785(2): 217-231.
- [17] Ramesh N, Ge Y, Ennist DL, et al. CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor--armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(1): 305-313.
- [18] Prestwich RJ, Harrington KJ, Pandha HS, et al. Oncolytic viruses: A novel form of immunotherapy [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008, 8(10): 1581-1588.
- [19] Di Paolo NC, Tuve S, Ni S, et al. Effect of adenovirus-mediated heat shock protein expression and oncolysis in combination with low-dose cyclophosphamide treatment on antitumor immune responses [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 960-969.
- [20] Li H, Dutuor A, Fu X, et al. Induction of strong antitumor immunity by an HSV-2-based oncolytic virus in a murine mammary tumor model [J]. *J Gene Med*, 2007, 9(3): 161-169.
- [21] Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(8): 3539-3543.
- [22] Nehring R. Trial watch: pivotal oncology trials: Outlook for Q2 2009 [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(4): 266.
- [23] Lapteva N, Aldrich M, Rollins L, et al. Attraction and activation of dendritic cells at the site of tumor elicits potent antitumor immunity [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(9): 1626-1636.
- [24] Park MY, Kim DR, Jung HW, et al. Genetic immunotherapy of lung cancer using conditionally replicating adenovirus and adenovirus-interferon-beta [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(5): 356-
- [1] Bell J. Oncolytic viruses: An approved product on the horizon [J]? *Mol Ther*, 2010, 18(2): 233-234.
- [2] Lowy DR, Schiller JT. Preventive cancer vaccines [M]. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. p. 351-368, 548-555.
- [3] Fournier P, Schirmacher V. Randomized clinical studies of anti-tumor vaccination: State of the art in 2008 [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(1): 51-66.
- [4] Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, et al. Vaccines for tumour prevention [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(3): 204-216.
- [5] Nemunaitis J. Vaccines in cancer: GVAX, a GM-CSF gene vaccine [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2005, 4(3): 259-274.
- [6] Schulze T, Kemmer W, Weitz J, et al. Efficiency of adjuvant active specific immunization with Newcastle disease virus modified tumor cells in colorectal cancer patients following resection of liver metastases: results of a prospective randomized trial [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(1): 61-69.
- [7] Bok RA. Treatment of prostate cancer: Therapeutic potential of targeted immunotherapy with APC8015 [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2008, 4(1): 79-85.
- [8] Li QX, Liu G, Wong-Staal F. Oncolytic virotherapy as a personalized cancer vaccine [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(3): 493-499.
- [9] Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27

- 364.
- [25] Zheng JN, Pei DS, Mao LJ, et al. Oncolytic adenovirus expressing interleukin-18 induces significant antitumor effects against melanoma in mice through inhibition of angiogenesis [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(1): 28-36.
- [26] Hu Z, Robbins JS, Pister A, et al. A modified hTERT promoter-directed oncolytic adenovirus replication with concurrent inhibition of TGFbeta signaling for breast cancer therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(4): 235-243.
- [27] Shin EJ, Wanna GB, Choi B, et al. Interleukin-12 expression enhances vesicular stomatitis virus oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma [J]. *Laryngoscope*, 2007, 117(2): 210-214.
- [28] Choi KJ, Kim JH, Lee YS, et al. Concurrent delivery of GM-CSF and B7-1 using an oncolytic adenovirus elicits potent antitumor effect [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(13): 1010-1020.
- [29] Ino Y, Saeki Y, Fukuhara H, et al. 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]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(2): 643-652.
- [30] Sterman DH, Recio A, Haas AR, et al. A phase I trial of repeated intrapleural adenoviral-mediated interferon-beta gene transfer for mesothelioma and metastatic pleural effusions [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 852-860.
- [31] Hu JC, Coffin RS, Davis CJ, et al. A phase I study of OncoVex^{GM-CSF}, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(22): 6737-6747.
- [32] Liu TC, Hwang T, Park BH, et al. The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates antitumoral, antivascular, and anti-HBV activities in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(9): 1637-1642.
- [33] Park BH, Hwang T, Liu TC, et al. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: A phase I trial [J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(6): 533-542.
- [34] Chang J, Zhao X, Wu X, et al. A Phase I study of KH901, a conditionally replicating granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Armed oncolytic adenovirus for the treatment of head and neck cancers [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(8): 676-682.
- [35] Qiao J, Kottke T, Willmon C, et al. Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy [J]. *Nat Med*, 2008, 14(1): 37-44.
- [36] Croci S, Nicoletti G, Landuzzi L, et al. Immunological prevention of a multigene cancer syndrome [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(22): 8428-8434.
- [37] Antia R, Ganusov VV, Ahmed R. The role of models in understanding CD8⁺ T-cell memory [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(2): 101-111.
- [38] Yamamoto M, Curiel DT. Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 243-250.
- [39] Kumar S, Gao L, Yeagy B, et al. Virus combinations and chemotherapy for the treatment of human cancers [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2008, 10(4): 371-379.
- [收稿日期] 2011-02-26 [修回日期] 2011-05-18
- [本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来少数科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至全国带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明。
2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”,通过大量国内外学术文献的全文比对,对稿件进行学术不端行为的检查。
3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》删除学术不端文献系统”,该系统协助本刊对已发表论文的学术不端行为进行全面复核。
4. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重给作者以下处理:书面警告、通知作者所在单位、在本领域相关期刊间通报、2年内本刊不刊登有其署名的稿件、相关学术责任人(通讯作者)署名的其他稿件延缓审稿等。

(本刊编辑部)