

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.001

· 述 评 ·

溶瘤腺病毒肿瘤靶向治疗:从实验室到临床

谭晓华(北京军区总医院 中心实验室,北京 100700)



谭晓华 北京军区总医院中心实验科主任、主任医师、教授、博士生导师,北京军区生物技术专业委员会副主任委员,北京市医学会再生医学专业组委员。主要研究方向为肿瘤免疫基因治疗的基础和临床研究,主要包括:(1)溶瘤腺病毒的研究;(2)以树突状细胞为基础的肿瘤免疫治疗的研究;(3)嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的T细胞(CAR-T)肿瘤过继细胞免疫治疗的研究。以课题负责人身份获多项国家、军队和地方科研基金资助,包括5项国家自然科学基金、1项北京市自然科学基金、1项首都医学科研发基金重点项目、1项归国留学人员科研启动基金和1项军队杰出人才基金。在国内外期刊上发表学术论文50余篇,获军队科技进步二等奖、三等奖各一项。E-mail: xiaohua_t@hotmail.com

[摘要] 过去几十年从实验室到临床对溶瘤腺病毒进行了广泛的研究。有多种策略增强溶瘤腺病毒的肿瘤靶向性,包括将腺病毒基因组中参与细胞周期节点调控的功能基因(如 *E1A* 或 *E1B*)进行突变或(和)利用肿瘤特异性启动子调控 *E1A* 基因的靶向转录调控,利用不同血清型腺病毒或 RGD 基序改变溶瘤腺病毒进入肿瘤细胞方式的靶向转导调控,以及利用细胞载体将溶瘤腺病毒传送至远处的肿瘤部位。溶瘤腺病毒作为一种载体,输送免疫调节基因或治疗性基因,通过增强抗肿瘤免疫,或引起肿瘤细胞凋亡、自杀等产生协同抗肿瘤效应。溶瘤腺病毒临床试验涉及到多种实体瘤,显示其临床应用是安全的,毒性作用轻至中度,患者能很好耐受,但有明确客观抗肿瘤反应的临床病例较少见,联合诸如化、放疗等治疗方法有助于提高临床效果。未来的方向应强化溶瘤腺病毒免疫学相关机制的研究、突破妨碍溶瘤腺病毒研究的一些技术性瓶颈、优化细胞载体、提高溶瘤腺病毒远处传递的靶向性,以及寻找更具潜能的肿瘤干细胞作为靶点。此外,需要扩大临床试验的研究范围和加强与其他治疗方式特别是免疫治疗联合应用的研究。

[关键词] 肿瘤;溶瘤病毒;溶瘤腺病毒;靶向治疗

[中图分类号] R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0569-08

Oncolytic adenoviruses for targeted cancer therapy: From the laboratory to the clinic

TAN Xiao-hua (Department of Center Laboratory, Beijing Military Command General Hospital of PLA, Beijing 100700, China)

[Abstract] Extensive investigations of oncolytic adenoviruse (OA) from the laboratory to the clinic have been made in the past decades. There are a few strategies for improving the potential targeted therapy of OA in cancer, including transcriptional targeting by mutating functional genes (such as *E1A* or *E1B*) of Ad genome which is involved in the control of cell cycle checkpoints in cells and/or utilizing tumor-specific promoter control of *E1A* expression, transductional targeting by changing tropism of OA with different types or incorporated by RGD motif into tumor cells, and cell carriers for delivery of OA to the distant tumor sites. Enhanced anti-tumor immune response, apoptosis or suicide of tumor cells elicited by OA, as vector, enabling express immunoregulatory or therapeutic genes contribute to generate synergetic antitumor effects with OA. Clinical trials of OA for various solid tumors have been carried out, in which the application for patients is safe, presenting well tolerated, mild to moderate adverse events, though few objective tumor responses to patients have been observed. Combination of OA with other therapies, such as chemotherapy or radiotherapy can improve clinical efficacy. Future directions of OA development should be focus on strengthening the research on OA-associated immunological mechanisms, breaking through some technical bottlenecks hampering deep studies of OA, optimizing cell carries for targeting of

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30972804, No. 81172162)。Project supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30972804, No. 81172162)

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20121210.1718.008.html>

OA to distant tumor sites, and looking for more potential targets such cancer stem cells. In addition, enlarging the range of clinical OA trials and reinforcing the investigations to combine OA with other therapeutic approaches, particularly with immunotherapy, are needed.

[**Key words**] tumor; oncolytic virus; oncolytic adenovirus; targeted therapy

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(6): 569-576]

早在 100 多年前,人们就开始寻找利用病毒治疗肿瘤的方法,发现了许多病毒具有天然的溶瘤特性,如流感病毒、单纯疱疹病毒、西尼罗河脑炎病毒、新城疫病毒和痘苗病毒等^[1-2]。随着对这些病毒生物学特性的逐步认识以及分子生物学技术的不断完善,目前已可利用基因工程手段将许多病毒如腺病毒、逆转录病毒、单纯疱疹病毒、痘苗病毒、麻疹病毒、黏液瘤病毒、呼肠病毒和水疱性口炎病毒等改造成溶瘤病毒(oncolytic viruses),使其溶瘤效应更具特异性和选择性^[3]。由腺病毒改造而成的各类溶瘤腺病毒(oncolytic adenoviruses)或称条件复制型(conditionally replicative)或复制选择性(replication-selective)腺病毒具备许多优势^[4],一直是溶瘤病毒领域研究的热点。特别是 2005 年我国食品和药品监督管理局(state food and drug administration, SFDA)批准了世界上第一个溶瘤腺病毒用于肿瘤患者的治疗,更是掀起了溶瘤腺病毒的研究从实验室向临床转化的浪潮^[5]。

1 溶瘤腺病毒的基础研究

1.1 溶瘤腺病毒的改造策略

溶瘤腺病毒最常用的改造策略有两大类:一是利用腺病毒本身某些早期基因产物参与宿主细胞周期节点调控的特性,对这些基因的结构进行删除或突变,以获得在特定条件下选择性复制的能力。如腺病毒 *E1B 55K* 基因产物能与肿瘤抑制基因 *P53* 结合并灭活其功能,阻止细胞发生凋亡而有利于病毒的复制。利用这一特性,通过删除 5 型腺病毒基因组中的 *E1B 55K* 基因构建了一株溶瘤腺病毒 Onyx-015(d11250)^[6],其能选择性地在此类肿瘤细胞中复制。相似地,*E1A* 基因能与肿瘤抑制基因 *Rb*(retinoblastoma)蛋白结合使其功能失活,通过删除 *E1A* 基因与 *Rb* 蛋白结合的 24 个核苷酸序列,导致腺病毒不能与 *Rb* 蛋白结合,由此构建了一种溶瘤腺病毒 Delta 24^[7],其只在 *Rb* 途径异常的肿瘤细胞中选择性复制。二是通过某种(些)肿瘤特异性启动子调控腺病毒复制所必须的 *E1A* 基因表达即可成为在某类特定肿瘤细胞中复制的溶瘤腺病毒,如甲胎蛋白(*AFP*)启动子^[8],癌胚抗

原(carcinoma embryonic antigen, *CEA*)启动子^[9],前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, *PSA*)启动子^[10]、*E2F1* 启动子^[11], *Survivin* 启动子^[12]和端粒酶(telomerase, *TERT*)启动子^[13]等。其中研究最多的是端粒酶启动子,由于 80%~90% 的恶性肿瘤端粒酶为阳性,从而为以端粒酶启动子作为溶瘤腺病毒的特异性调控元件提供了理论基础,并使这类溶瘤腺病毒作为一类广谱的抗肿瘤制品成为可能。

1.2 溶瘤腺病毒的肿瘤靶向策略

溶瘤腺病毒肿瘤靶向治疗除要保证溶瘤腺病毒在肿瘤内复制的特异性和选择性外,还必须具有靶向性。然而,腺病毒本身是缺乏肿瘤靶向性的,而且腺病毒具有较强的免疫原性,机体预先存在的抗病毒机制以及腺病毒应用后诱发机体产生的各种获得性免疫可对腺病毒产生显著的排斥反应。因此,近年来围绕腺病毒改造成溶瘤腺病毒后如何增强肿瘤靶向性和降低腺病毒的免疫原性方面开展了大量的基础研究。

1.2.1 增强转录靶向或(和)转导靶向 转录靶向是指溶瘤腺病毒进入肿瘤细胞后受各种转录调控元件调控实现条件性或选择性复制的目的。如前所述,通过对腺病毒中参与细胞周期节点调控的基因进行删除或突变,或通过肿瘤特异性启动子调控腺病毒 *E1A* 的表达,均能实现对溶瘤腺病毒的转录靶向。有利用双启动子^[14]、增强子^[15]和乏氧调控元件^[16]等策略进一步增强转录的靶向性。所谓转导靶向是指溶瘤腺病毒感染并进入肿瘤细胞的效率。腺病毒进入细胞是一种受体依赖的主动过程,不同血清型腺病毒通过不同的受体进入细胞。5 型腺病毒(C 组)是通过细胞表面柯萨奇腺病毒受体(Coxsackie and adenovirus receptor, *CAR*)进入细胞,但在许多肿瘤细胞,如胃肠癌、胰腺癌、卵巢癌和前列腺癌等 *CAR* 的表达水平低下甚至缺失^[17-18],这将明显降低腺病毒的感染效率。为克服这方面的限制,可采取几种方式提高转导靶向:一是改造 5 型腺病毒纤维蛋白以改变腺病毒进入细胞的机制,最常用的方法是将 *RGD*(Arg-Gly-Asp)基序掺入至 5 型腺病毒纤维蛋白的 *HI* 环中,使腺病毒能通过识别细胞表面整合素 $\alpha_3\beta_1$ 和 $\alpha_5\beta_1$ 进入细胞,从而减少对 *CAR*

的依赖,增强腺病毒的感染效率^[19];另一种策略是改用腺病毒的血清型,如 B 组腺病毒(如 3、11p 和 35 型)进入细胞的机制是利用广泛表达在各种细胞的 CD46,直接采用 B 组腺病毒^[20]或不同腺病毒的纤维蛋白融合形成的嵌合溶瘤腺病毒,如 Ad5/35^[21]和 Ad5/3^[22]等,改变病毒的取向是增强转导靶向、提高病毒进入肿瘤细胞效率的一种手段。此外,将转录靶向和转导靶向的有机结合,可进一步增强肿瘤靶向性^[23]。

1.2.2 提高组织或器官靶向 尽管通过转录和(或)转导靶向有助于提高溶瘤腺病毒的肿瘤靶向性,但这两种靶向是在细胞和分子水平实现,要求病毒与肿瘤细胞的直接接触,如通过瘤内注射或影像学(B超、CT)手段引导穿刺介入方式给药。但绝大多数肿瘤、特别是转移性肿瘤难以通过直接注射或介入手段实现治疗目的,只能通过血管途径给药经由血液循环达到肿瘤部位。在这种状况下,多种因素限制了腺病毒直接血管给药后很难达到肿瘤部位。首先,腺病毒静脉注射后会通过血液循环迅速分布至全身,血液循环丰富的组织或器官分布最多,如肺、脾和肝脏等,特别是肝脏^[24]。其次,腺病毒载体本身具有很强的免疫原性,自然状况下大多数人机体中含有腺病毒中和抗体^[25],即便没有,反复注射后也将迅速产生,静脉注射腺病毒后,将很快被自然存在或后续产生的抗体消除。此外,遍及全身的网状内皮系统(如肝脏的库普弗细胞)对外来的病原体有很强的吞噬作用。因此,如何既能利用静脉给药这种最为便利的给药途径,又要规避静脉给药的种种不利因素一直是研究的热点问题。目前研究最多的是利用各种细胞作为载体,将溶瘤病毒装载至载体细胞上,然后将携带病毒的载体细胞以血管给药的方式注射至机体内,载体细胞通过血液循环将溶瘤病毒靶向至肿瘤部位。这类策略有几个独特的优势:(1)可提高溶瘤病毒的肿瘤靶向性;(2)载体细胞作为一道天然屏障可有效降低溶瘤病毒的免疫原性,有利于规避机体的各种抗病毒机制,减少非靶器官对溶瘤病毒的吸收,使溶瘤病毒不会被过早地被清除;(3)载体细胞容许溶瘤病毒在其中复制,成为溶瘤病毒体内扩增的“微型工厂”;(4)增强溶瘤病毒应用的安全性。目前,有许多研究尝试用不同的细胞作为载体,包括各种免疫细胞如 CIK 细胞^[26]、细胞毒性 T 淋巴细胞^[27]、树突状细胞(dendritic cells, DC)^[28]和巨噬细胞^[29]等;各种干细胞如间充质干细胞^[30]、神经干细胞^[31]、内皮祖细胞^[32]以及各种肿瘤干细胞^[33]等。研究^[34]显示,静脉直接

注射溶瘤病毒后,真正能达到肿瘤部位的病毒量小于注射病毒总量的 0.001%;而将溶瘤病毒装载至细胞载体中,通过细胞载体到达肿瘤部位的病毒量最高可达到注射量的 10%^[35],可见通过细胞载体运载溶瘤病毒靶向肿瘤的效率远比直接静脉注射要高得多。

1.3 溶瘤腺病毒表达治疗性基因

除直接的溶瘤效应外,溶瘤病毒还可通过表达不同的基因产生协同的抗肿瘤活性,主要包括:(1)免疫调节基因:利用溶瘤病毒表达某些具有免疫调节功能的细胞因子有利于提高机体的抗肿瘤免疫反应。目前研究最多的是表达粒-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF),溶瘤病毒表达 GM-CSF 有利于浸润肿瘤内的 DC 前体细胞如单核细胞等分化成 DC,而溶瘤病毒溶解肿瘤细胞后释放大量的肿瘤相关抗原为 DC 提供了丰富的肿瘤抗原,刺激机体产生肿瘤抗原特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞反应。目前国内外已研发了几种表达 GM-CSF 的溶瘤病毒产品,其中 BioVex 公司研发的 OncoVEXGM-CSF(溶瘤单纯疱疹病毒表达 GM-CSF)已完成了 I ~ II 期临床试验研究^[36],并正在进行 III 期临床试验研究^[37]。Jenxerex Biotherapeutics 公司研发的 JX-594(溶瘤痘苗病毒表达 GM-CSF)也开展了多种肿瘤的 I ~ II 期临床试验研究^[38],并即将开始 III 期临床试验研究。目前至少有三种表达 GM-CSF^[39-41]的溶瘤腺病毒开展了 I ~ II 期的临床试验研究。除 GM-CSF,利用溶瘤腺病毒单独或联合表达如 IL-12^[42]、IL-18^[43]、CD40L^[44]、4-1BBL^[45]和 B7^[46]等免疫调节基因,在一定程度上也能增强机体抗肿瘤免疫反应的能力。(2)凋亡相关基因:包括 TRAIL^[47]、P53^[48]等,通过诱导肿瘤细胞的凋亡,增强抗肿瘤效果;(3)自杀基因:包括 TK^[49]和双自杀基因 TK/CD^[50]等,自杀基因能将无毒的前药如更昔洛韦磷酸化,转化为对肿瘤细胞具有细胞毒性作用的药物,从而增强对肿瘤细胞的杀伤效应。

2 溶瘤腺病毒的临床研究

2005 年,我国 SFDA 批准了世界上第一个溶瘤腺病毒 H101(一种 E1B 删除的溶瘤腺病毒)用于肿瘤患者的治疗,极大地推动了国内外溶瘤病毒临床转化应用的研究,文献^[51]报道了至少有 25 种以上溶瘤病毒(其中不少于 10 种溶瘤腺病毒)开展了临床试验研究。然而,有关溶瘤腺病毒临床试验研究最详尽和完整的数据来源于美国 Onyx Pharma-

ceuticals 公司研发的 Onyx-015(dl1520)。Onyx-015 溶瘤腺病毒删除了 Ad5 基因组中早期基因 *E1B 55K*, 能在 *P53* 缺陷的肿瘤细胞中复制。Onyx-015 从 1996 年研发成功^[6] 至今, 不同的国家或地区、单中心或多中心开展了针对 Onyx-015 的一系列 I/III 临床试验研究至少 20 个以上, 涉及到多种肿瘤, 包括头颈部肿瘤^[52]、胰腺癌^[53-55]、原发性和转移性肝癌^[55-56]、结肠癌^[55,57]、卵巢癌^[58]、口腔癌^[59]、胶质瘤^[60]、肉瘤^[61], 给药途径有直接^[52]、CT^[53] 或超声^[54] 引导下瘤内注射、腹腔注射^[58]、经导管选择性动脉给药^[62] 以及静脉给药^[57], 给药的次数从单次给药和多次给药, 剂量从恒定到逐步递增, 有单独或联合化疗^[54,61] 等, 从中获得了许多溶瘤腺病毒有价值的临床资料和数据。应用 Onyx-015 最常见的不良反应为流感样症状, 包括发热、寒战、疲劳、倦怠、恶心、呕吐、腹泻等, 血管给药其发生率要高于肿瘤局部给药, 无论是何种途径给药, 未发现与治疗相关的重要脏器功能损害。血管给药剂量在 $(2 \sim 2.5) \times 10^{13}$ 病毒颗粒时患者仍能较好地耐受, 未能确定最大耐受剂量^[76]。静脉注射后血液中腺病毒中和抗体显著升高, 产生的时间多在病毒注射后 2 周, 病毒滴度的升高范围在 28 ~ 5 758 倍之间, 但疾病的进展时间以及流感样症状的出现与病毒滴度的基线水平无相关性。就临床疗效而言, 在肿瘤局部注射所观察到的临床获益病例比例不到 15%^[52,62]; 然而, 联合化疗时可观察到两种治疗手段显著的协同作用^[63-64]。一组 30 名复发性头颈部鳞状细胞癌患者 Onyx-015 联合标准化疗的临床试验研究^[63] 中, 有 19 名患者肿瘤缩小 50% 以上, 占有所有患者的 63%; 其中 8 名 (27%) 患者产生完全性反应, 11 例 (36%) 为部分反应。有反应的患者随访 6 个月肿瘤无进展。因此, 溶瘤腺病毒联合化疗或其他治疗手段应是提高肿瘤临床疗效的有效途径。

3 溶瘤腺病毒肿瘤靶向治疗: 未来的方向

溶瘤腺病毒未来可能的研究方向应是一方面进一步强化基础研究, 重点加强其免疫学的机制的研究、解决研究中遇到的技术瓶颈及寻找新的特异性靶点等; 另一方面需要扩大临床试验研究的范围, 深入探讨溶瘤腺病毒与常规化疗、免疫治疗等联合应用的可行性和疗效。

3.1 加强溶瘤腺病毒免疫学机制的研究

溶瘤腺病毒作为一种异源性物质本身就是一种免疫佐剂, 病毒表达的基因产物以及感染肿瘤组织后引起的炎症反应会形成“炎症风暴 (inflammatory

storm)”, 其作为一种“危险信号”刺激机体的天然和获得性免疫, 产生抗病毒和抗肿瘤免疫反应^[47]。此外, 溶瘤腺病毒可作为免疫调节剂或激动剂, 通过表达各种免疫相关基因, 活化体内的各类免疫调节细胞和免疫效应细胞, 发挥正性免疫调节作用, 调节肿瘤微环境^[65], 使机体免疫系统朝着有利于抗肿瘤免疫反应的方向发展。此外, 溶瘤腺病毒还可以表达某种肿瘤相关抗原, 作为一种肿瘤疫苗, 刺激机体产生针对该肿瘤抗原的特异性免疫反应。无论是作为免疫佐剂、免疫调节剂还是肿瘤疫苗, 只有深入探讨其中的生物学和免疫学机制, 才有可能充分发挥溶瘤腺病毒的免疫佐剂、免疫调节剂或肿瘤疫苗的功能, 调动机体的抗肿瘤免疫机制, 发挥最大的抗肿瘤效应。

3.2 突破技术瓶颈

在溶瘤腺病毒的研究中, 会遇到某些技术性难题妨碍研究的深入, 如溶瘤腺病毒免疫学机制研究中的动物模型问题、分子成像技术等, 只有突破了这些技术瓶颈, 才有可能更为准确和精细地理解所观察到的现象, 揭示事物的本质。因此, 解决这些技术瓶颈应是未来研究的一个重要方向。

3.2.1 动物模型 至今尚没有十分理想的小鼠模型适用于溶瘤腺病毒免疫学相关的研究, 因为人型溶瘤腺病毒不能在小鼠来源的正常和肿瘤细胞中复制。因此, 寻找和建立合适的免疫正常小鼠模型对研究溶瘤腺病毒的免疫学机制研究十分重要。目前在该方面仅取得有限的进展: 一是发现某些小鼠肿瘤细胞如小鼠非小细胞肺癌 CMT-64 细胞株和小鼠直肠癌 CMT-93 细胞株容许溶瘤腺病毒的复制^[51], 为建立正常免疫小鼠模型提供了条件; 二是近来发现叙利亚仓鼠 (Syrian hamster) 能容许人型溶瘤腺病毒在其细胞中复制^[66], 利用这一模型开展了溶瘤腺病毒溶瘤特性和免疫学机制的研究^[67-68]。上述模型在一定程度上有助于解决小鼠模型匮乏的问题, 但仍有许多问题需要解决, 如以叙利亚仓鼠作为模型, 是否有足够遗传背景相同的肿瘤细胞株, 以满足针对不同肿瘤研究的需求? 利用诸如 CMT-64 和 CMT-93 小鼠肿瘤细胞接种至遗传背景相同的小鼠体内, 尽管溶瘤腺病毒能在这些肿瘤细胞中复制, 但仍然无法评估溶瘤腺病毒在正常组织和细胞中复制可能对宿主造成的潜在风险, 这对研究溶瘤腺病毒的毒性作用以及相关的免疫反应还是会有影响的。因此, 建立和完善一种具有正常免疫功能的小鼠模型, 特别是能表达人类某些基因的转基因小鼠模型, 适用于溶瘤腺病毒的溶瘤特性和免疫学相关的研

究,将有助于阐明溶瘤腺病毒作为一种免疫佐剂、免疫调节剂或肿瘤疫苗的精确机制。

3.2.2 体内影像示踪技术 目前小动物活体成像技术发展迅速,可通过生物发光检测技术^[69]、正电子发射计算机断层成像技术^[70]以及核磁共振成像技术^[71]在活体小动物体内对溶瘤腺病毒的抗肿瘤活性、生物学分布或代谢动力学等实施无创、实时和动态监测。目前应用最广泛的是生物发光检测技术,该技术是利用溶瘤腺病毒编码荧光素酶(*firefly luciferase, Luc*)基因,或是让肿瘤细胞表达 *Luc*,当表达 *Luc* 的溶瘤腺病毒注射至小动物体内后表达荧光素酶,然后体内注射荧光素酶作用底物,底物进入荧光素酶表达的细胞后在荧光素酶催化下产生荧光,利用生物发光检测仪(如小动物活体成像系统等)能较容易地检测到溶瘤腺病毒的抗肿瘤活性、体内的生物学分布或代谢动力学等情况,这种技术目前在溶瘤病毒研究中已被广泛地应用^[72-73]。然而,如何能在人体内像小动物一样较方便地监测到溶瘤腺病毒的上述参数仍然是一个严峻的挑战,如果这类技术能在人体内获得成功,将为临床试验研究中揭示溶瘤腺病毒在人体内的生物学特性提供十分便利的手段。

3.3 选择和优化载体细胞

细胞载体介导的溶瘤病毒靶向治疗研究的一个重要方面是如何选择和优化载体细胞,一种潜在的优质载体细胞既需具备“联邦快递(*Fed Ex*)”样的传递功能^[35],又能像“木马(*Trojan horse*)”病毒样潜入肿瘤部位^[74]。理论上,细胞载体介导的溶瘤病毒靶向治疗需要经历三个不同的阶段:(1)溶瘤病毒体外装载至载体细胞;(2)载体细胞通过血液循环将溶瘤病毒运送至肿瘤部位;(3)达到肿瘤部位后,载体细胞释放溶瘤病毒。上述三个紧密相连的过程所需的时间与所选用的载体细胞类型以及溶瘤病毒在该细胞的复制周期密切相关。因此,对一个特定的载体细胞/溶瘤腺病毒体系而言,可能需要着重研究和改建载体细胞的肿瘤靶向性,了解载体细胞体内分布动力学和溶瘤腺病毒复制周期,提高溶瘤腺病毒对载体细胞的感染效率以及载体细胞释放溶瘤腺病毒的机制等基础性问题,最终做到载体细胞能在正确的时间和地点(即肿瘤部位)“恰到好处”地将溶瘤病毒释放出来。

3.4 靶向肿瘤干细胞

目前在许多类型的肿瘤中发现了具有干细胞特征的细胞,即肿瘤干细胞(*cancer stem cell, CSC*)。虽然 *CSC* 仅占据肿瘤的很小一部分,但其自我更新

及多向分化潜能的特性使其在维持肿瘤存活、增殖、转移和复发中发挥重要的作用。*CSC* 通常对化疗放疗不敏感,需要寻找新的治疗手段。溶瘤病毒与常规治疗手段的抗肿瘤机制不同,是通过感染细胞并在细胞中复制导致癌细胞溶解,从而发挥抗肿瘤活性。因此,对常规治疗具有抗性的肿瘤干细胞可能成为溶瘤腺病毒一个新的靶点^[75]。研究表明,溶瘤腺病毒能有效地感染某些肿瘤干细胞并在其中复制,导致这些肿瘤干细胞的溶解,包括脑肿瘤干细胞^[76]、乳腺癌干细胞^[77]、食管癌干细胞^[78]。要揭示肿瘤干细胞能否真正成为溶瘤腺病毒新靶点,仍然有许多基础性研究要做,如各种肿瘤干细胞的识别、分离方法和动物模型等,还有溶瘤腺病毒能否有效地感染肿瘤干细胞、溶瘤腺病毒在肿瘤干细胞中的复制周期是否有别于普通的肿瘤细胞等。如果肿瘤干细胞学说带有普遍性,并在溶瘤病毒靶向肿瘤干细胞的研究中获得突破,将为临床上解决肿瘤的复发和转移等难题带来新的希望。

3.5 联合其他治疗手段,扩大临床试验研究范围

肿瘤是一种非常复杂的慢性疾病,单一的治疗手段疗效有限。尽管溶瘤病毒治疗是一类十分有前景的抗肿瘤治疗手段,但单独依靠溶瘤病毒实现在肿瘤治疗上的突破是不现实的,必须强调与其他治疗手段的联合,取长补短。为此,有必要开展和扩大溶瘤腺病毒与其他治疗方法联合应用的临床试验研究,包括与化疗、放疗,特别是与免疫治疗的联合应用。目前常规的肿瘤治疗手段对远处多灶转移的晚期肿瘤患者常是无能为力,而免疫治疗为这类患者提供了新的希望。肿瘤免疫治疗领域已取得了某些突出的进展,如2010年4月美国FDA批准了世界上第一个肿瘤疫苗 *Sipuleucel-T*^[79],被誉为癌症免疫治疗时代的到来^[80],为今后癌症疫苗的批准打开了闸门^[81];2011年3月FDA又批准了另一个肿瘤疫苗 *ipilimumab*(抗 *CTLA-4* 单抗)用于晚期转移性黑素瘤的治疗^[82]。溶瘤病毒本身在刺激机体抗肿瘤免疫上有较大的优势,如肿瘤细胞溶解后会释放大量的自身肿瘤抗原;为刺激机体产生肿瘤抗原特异性免疫反应提供了丰富的肿瘤抗原来源,溶瘤病毒表达某种免疫调节基因或肿瘤相关抗原,作为一种肿瘤疫苗可刺激机体产生针对该抗原的免疫反应。因此,如何将溶瘤病毒与肿瘤免疫治疗有机地结合起来,以充分调动机体的抗肿瘤免疫反应,是溶瘤病毒领域的一个重要研究方向,有必要加强溶瘤腺病毒联合免疫治疗的临床试验研究,获得相关的循证医学证据。

4 结 语

作为溶瘤病毒家族中的一大类,溶瘤腺病毒的研发无论是在实验室还是在临床上均处于本领域的领先地位,是研发品种最多、临床试验研究涉及肿瘤类型最广的溶瘤病毒,也是世界上唯一获得政府部门批准用于临床肿瘤治疗的溶瘤病毒产品。然而,以溶瘤腺病毒为基础的病毒治疗要广泛地从实验室推广到临床应用还有许多路要走,还有许多障碍要克服。相信随着多学科的飞速发展,特别是细胞和分子生物学、肿瘤学、病毒学和免疫学等学科在理论和技术等方面取得突破,将会有更多、更好的溶瘤腺病毒制剂进入临床应用。

[参 考 文 献]

- [1] Dock G. The influence of complicating diseases upon leukemia [J]. *Am J Med Sci*, 1904, 127: 563-592.
- [2] Sinkovics JG, Horvath JC. Natural and genetically engineered viral agents for oncolysis and gene therapy of human cancers [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2008, 56(Suppl 1): 3-59.
- [3] Chiocca EA. Oncolytic viruses [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(12): 938-950.
- [4] Yamamoto M, Curiel DT. Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 243-250.
- [5] Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(5): 298-300.
- [6] Bischoff JR, Kim DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in P53-deficient human tumor cells [J]. *Science*, 1996, 274(5286): 373-376.
- [7] Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo [J]. *Oncogene*, 2000, 19(1): 2-12.
- [8] Ren XW, Liang M, Meng X, et al. A tumor-specific conditionally replicative adenovirus vector expressing TRAIL for gene therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(2): 159-168.
- [9] Li Y, Chen Y, Dille J, et al. Carcinoembryonic antigen-producing cell-specific oncolytic adenovirus, OV798, for colorectal cancer therapy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(10): 1003-1009.
- [10] Li HW, Li J, Helm GA, et al. Highly specific expression of luciferase gene in lungs of naïve nude mice directed by prostate-specific antigen promoter [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(4): 1287-1291.
- [11] Jakubczak JL, Ryan P, Gorziglia M, et al. An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway-defective tumors: Dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(7): 1490-1499.
- [12] Li B, Liu X, Fan J, et al. A survivin-mediated oncolytic adenovirus induces non-apoptotic cell death in lung cancer cells and shows antitumoral potential in vivo [J]. *J Gene Med*, 2006, 8(10): 1232-1242.
- [13] Fujiwara T, Urata Y, Tanaka N. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007, 7(2): 191-201.
- [14] Li Y, Idamakanti N, Arroyo T, et al. Dual promoter-controlled oncolytic adenovirus CG5757 has strong tumor selectivity and significant antitumor efficacy in preclinical models [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(24 Pt 1): 8845-8855.
- [15] Chen HH, Cawood R, El-Sherbini Y, et al. Active adenoviral vascular penetration by targeted formation of heterocellular endothelial-epithelial syncytia [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(1): 67-75.
- [16] Kwon OJ, Kim PH, Huyn S, et al. A hypoxia- and (alpha)-feto-protein-dependent oncolytic adenovirus exhibits specific killing of hepatocellular carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(24): 6071-6082.
- [17] Yamamoto M. Conditionally replicative adenovirus for gastrointestinal cancers [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4(4): 1241-1250.
- [18] Kim M, Zinn KR, Barnett BG, et al. The therapeutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumour cells [J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(14): 1917-1926.
- [19] Wang M, Hemminki A, Siegal GP, et al. Adenoviruses with an RGD-4C modification of the fiber knob elicit a neutralizing antibody response but continue to allow enhanced gene delivery [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 96(2): 341-348.
- [20] Sandberg L, Papareddy P, Silver J, et al. Replication-competent Ad11p vector (RCAd11p) efficiently transduces and replicates in hormone-refractory metastatic prostate cancer cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(4): 361-373.
- [21] Hoffmann D, Meyer B, Wildner O. Improved glioblastoma treatment with Ad5/35 fiber chimeric conditionally replicating adenoviruses [J]. *J Gene Med*, 2007, 9(9): 764-778.
- [22] Diaconu I, Cerullo V, Hirvonen ML, et al. Immune response is an important aspect of the antitumor effect produced by a CD40L-encoding oncolytic adenovirus [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(9): 2327-2338.
- [23] Ulasov IV, Zhu ZB, Tyler MA, et al. Survivin-driven and fiber-modified oncolytic adenovirus exhibits potent antitumor activity in established intracranial glioma [J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(7): 589-602.
- [24] Johnson M, Huyn S, Burton J, et al. Differential biodistribution of adenoviral vector *in vivo* as monitored by bioluminescence imaging and quantitative polymerase chain reaction [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(12): 1262-1269.
- [25] Pilankatta R, Chawla T, Khanna N, et al. The prevalence of antibodies to adenovirus serotype 5 in an adult Indian population and implications for adenovirus vector vaccines [J]. *J Med Virol*, 2010, 82(3): 407-414.
- [26] Thorne SH, Negrin RS, Contag CH. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy [J]. *Science*, 2006, 311

- (5768): 1780-1784.
- [27] Yotnda P, Savoldo B, Charlet-Berguerand N, et al. Targeted delivery of adenoviral vectors by cytotoxic T cells [J]. *Blood*, 2004, 104(8): 2272-2280.
- [28] Ilett EJ, Prestwich RJ, Kottke T, et al. Dendritic cells and T cells deliver oncolytic reovirus for tumour killing despite pre-existing anti-viral immunity [J]. *Gene Ther*, 2009, 16(5): 689-699.
- [29] Muthana M, Giannoudis A, Scott SD, et al. Use of macrophages to target therapeutic adenovirus to human prostate tumors [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1805-1815.
- [30] Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(23): 8932-8940.
- [31] Tyler MA, Ulasov IV, Sonabend AM, et al. Neural stem cells target intracranial glioma to deliver an oncolytic adenovirus *in vivo* [J]. *Gene Ther*, 2009, 16(2): 262-278.
- [32] Iankov I, Blechacz B, Liu C, et al. Infected cell carriers: A new strategy for systemic delivery of oncolytic measles viruses in cancer virotherapy [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(1): 114-122.
- [33] Raykov Z, Rommelaere J. Potential of tumour cells for delivering oncolytic viruses [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(10): 704-710.
- [34] Breitbach CJ, Paterson JM, Lemay CG, et al. Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(9): 1686-1693.
- [35] Willmon C, Harrington K, Kottke T, et al. Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(10): 1667-1676.
- [36] Harrington KJ, Hingorani M, Tanay MA, et al. Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(15): 4005-4015.
- [37] Kaufman HL, Bines SD. OPTIM trial: A Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma [J]. *Future Oncol*, 2010, 6(6): 941-949.
- [38] 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.
- [39] Koski A, Kangasniemi L, Escutenaire S, et al. Treatment of cancer patients with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus expressing GM-CSF [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(10): 1874-1884.
- [40] Pesonen S, Diaconu I, Cerullo V, et al. Integrin targeted oncolytic adenoviruses Ad5-D24-RGD and Ad5-RGD-D24-GM-CSF for treatment of patients with advanced chemotherapy refractory solid tumors [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(8): 1937-1947.
- [41] 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.
- [42] Zhang SN, Choi IK, Huang JH, et al. Optimizing DC vaccination by combination with oncolytic adenovirus coexpressing IL-12 and GM-CSF [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(8): 1558-1568.
- [43] 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.
- [44] Diaconu I, Cerullo V, Hirvonen ML, et al. Immune response is an important aspect of the antitumor effect produced by a CD40L-encoding oncolytic adenovirus [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(9): 2327-2338.
- [45] Huang JH, Zhang SN, Choi KJ, et al. Therapeutic and tumor-specific immunity induced by combination of dendritic cells and oncolytic adenovirus expressing IL-12 and 4-1BBL [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 264-274.
- [46] Lee YS, Kim JH, Choi KJ, et al. Enhanced antitumor effect of oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 and B7-1 in an immunocompetent murine model [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(19): 5859-5868.
- [47] Cao X, Yang M, Wei RC, et al. Cancer targeting gene-viro-therapy of liver carcinoma by dual-regulated oncolytic adenovirus armed with TRAIL gene [J]. *Gene Ther*, 2011, 18(8): 765-777.
- [48] Liu C, Sun B, An N, et al. Inhibitory effect of Survivin promoter-regulated oncolytic adenovirus carrying P53 gene against gallbladder cancer [J]. *Mol Oncol*, 2011, 5(6): 545-554.
- [49] Freytag SO, Barton KN, Brown SL, et al. Replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy with radiation in a pre-clinical model of pancreatic cancer [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(9): 1600-1606.
- [50] Freytag SO, Stricker H, Pegg J, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7497-7506.
- [51] Halldén G, Hill R, Wang Y, et al. Novel immunocompetent murine tumor models for the assessment of replication-competent oncolytic adenovirus efficacy [J]. *Mol Ther*, 2003, 8(3): 412-424.
- [52] Ganly I, Kim D, Eckhardt G, et al. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(3): 798-806.
- [53] Mulvihill S, Warren R, Venook A, et al. Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: A phase I trial [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(4): 308-315.
- [54] Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL, et al. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2): 555-561.
- [55] Habib NA, Sarraf CE, Mity RR, et al. E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for patients with primary and secondary liver tumors [J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(3): 219-226.
- [56] Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, et al. Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with

- colorectal carcinoma metastatic to the liver: A phase I trial [J]. Gene Ther, 2001, 8(21): 1618-1626.
- [57] Hamid O, Varterasian ML, Wadler S, et al. Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(8): 1498-1504.
- [58] Vasey PA, Shulman LN, Campos S, et al. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer [J]. J Clin Oncol, 2002, 20(6): 1562-1569.
- [59] Morley S, MacDonald G, Kim D, et al. The dl1520 virus is found preferentially in tumor tissue after direct intratumoral injection in oral carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(13): 4357-4362.
- [60] Chioccia EA, Abbed KM, Tatter S, et al. A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting [J]. Mol Ther, 2004, 10(5): 958-966.
- [61] Galanis E, Okuno SH, Nascimento AG, et al. Phase I - II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas [J]. Gene Ther, 2005, 12(5): 437-445.
- [62] Kim D. Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus dl1520 (Onyx-015): Results of phase I and II trials [J]. Expert Opin Biol Ther, 2001, 1(3): 525-538.
- [63] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer [J]. Nat Med, 2000, 6(8): 879-885.
- [64] Lamont JP, Nemunaitis J, Kuhn JA, et al. A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Ann Surg Oncol, 2000, 7(8): 588-592.
- [65] Wojton J, Kaur B. Impact of tumor microenvironment on oncolytic viral therapy [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2010, 21(2/3): 127-134.
- [66] Thomas MA, Spencer JF, La Regina MC, et al. Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors [J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1270-1276.
- [67] Dhar D, Spencer JF, Toth K, et al. Effect of preexisting immunity on oncolytic adenovirus vector INGN 007 antitumor efficacy in immunocompetent and immunosuppressed Syrian hamsters [J]. J Virol, 2009, 83(5): 2130-2139.
- [68] Bortolanza S, Bunuales M, Otano I, et al. Treatment of pancreatic cancer with an oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 in Syrian hamsters [J]. Mol Ther, 2009, 17(4): 614-622.
- [69] Guse K, Dias JD, Bauerschmitz GJ, et al. Luciferase imaging for evaluation of oncolytic adenovirus replication *in vivo* [J]. Gene Ther, 2007, 14(11): 902-911.
- [70] Idema S, Geldof AA, Dirven CM, et al. Evaluation of adenoviral oncolytic effect on glioma spheroids by 18F-DG positron-emission-tomography [J]. Oncol Res, 2007, 16(10): 471-477.
- [71] Lavilla-Alonso S, Bauerschmitz G, Abo-Ramadan U, et al. Adenoviruses with an $\alpha V\beta$ integrin targeting moiety in the fiber shaft or the HI-loop increase tumor specificity without compromising antitumor efficacy in magnetic resonance imaging of colorectal cancer metastases [J]. J Transl Med, 2010, 8: 80.
- [72] Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas [J]. Cancer Res, 2009, 69(23): 8932-8940.
- [73] Lamfers ML, Fulci G, Gianni D, et al. Cyclophosphamide increases transgene expression mediated by an oncolytic adenovirus in glioma-bearing mice monitored by bioluminescence imaging [J]. Mol Ther, 2006, 14(6): 779-788.
- [74] Power AT, Bell JC. Taming the Trojan horse: Optimizing dynamic carrier cell/oncolytic virus systems for cancer biotherapy [J]. Gene Ther, 2008, 15(10): 772-779.
- [75] Ribacka C, Hemminki A. Virotherapy as an approach against cancer stem cells [J]. Curr Gene Ther, 2008, 8(2): 88-96.
- [76] Jiang H, Gomez-Manzano C, Aoki H, et al. Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: Role of autophagic cell death [J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99(18): 1410-1414.
- [77] Eriksson M, Guse K, Bauerschmitz G, et al. Oncolytic adenoviruses kill breast cancer initiating CD44⁺ CD24^{-/low} cells [J]. Mol Ther, 2007, 15(12): 2088-2093.
- [78] Zhang X, Komaki R, Wang L, et al. Treatment of radioresistant stem-like esophageal cancer cells by an apoptotic gene-armed, telomerase-specific oncolytic adenovirus [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(9): 2813-2823.
- [79] DeFrancesco L. Landmark approval for Dendreon's cancer vaccine [J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(6): 531-532.
- [80] Buonerba C, Ferro M, Di Lorenzo G. Sipuleucel-T for prostate cancer: The immunotherapy era has commenced [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2011, 11(1): 25-28.
- [81] [No authors listed]. Cancer vaccine approval could open floodgates [J]. Nat Med, 2010, 16(6): 615.
- [82] Ledford H. Melanoma drug wins US approval [J]. Nature, 2011, 471(7340): 561.

[收稿日期] 2012 - 10 - 08 [修回日期] 2012 - 11 - 25

[本文编辑] 王莹

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅