

综述

基因改造的溶瘤痘病毒在肿瘤治疗中的研究进展

李丹洋^{1,2} 唐 慧^{2*}

(¹昆明理工大学医学院, 昆明 650504; ²云南省第一人民医院, 昆明理工大学附属医院临床基础医学研究所, 昆明 650032)

摘要 目前, 肿瘤的标准治疗包括手术、放射疗法、化学疗法、温热疗法和生物/免疫疗法。溶瘤病毒治疗, 即利用病毒的复制能力, 选择性感感染和破坏肿瘤细胞, 同时保留正常细胞和组织, 是肿瘤生物/免疫治疗的一个新疗法。基因治疗一直是肿瘤生物治疗的重要策略, 利用基因工程策略在溶瘤病毒载体上插入抗癌基因, 将病毒治疗与基因治疗有机结合, 成为具有很强杀伤作用的基因-病毒治疗手段。近年来, 以溶瘤痘病毒为载体的肿瘤基因治疗受到较多关注, 通过基因工程策略对痘病毒进行改造是提高其抗肿瘤作用的重要策略。目前, 用于基因工程改造的溶瘤痘病毒主要有 Wyeth株、WR(Western Reverse)株、Lister株、Copenhagen株和天坛株。该文就目前对痘病毒进行基因工程改造的常见形式以及经基因工程改造的痘病毒用于治疗肿瘤的研究进展作一综述。

关键词 溶瘤痘病毒; 基因改造; 基因-病毒治疗; 肿瘤治疗

The Progress of Oncolytic Vaccinia Viruses Modified Genetically for the Tumor Treatment

Li Danyang^{1,2}, Tang Hui^{2*}

(¹College of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650504, China;

²Institute of Basic Medical Sciences, Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

Abstract Current tumor treatments include surgery, radiotherapy, chemotherapy, thermotherapy, and biological/immunological therapy. The use of oncolytic viruses for the tumor treatment is an emerging field of tumor therapy. Oncolytic virotherapy, which exploits replication-competent viruses to selectively infect and destroy tumorous cells while sparing normal cells and tissues, is an emerging therapy for the biological/immunological therapy of tumor. Gene therapy has always been an important strategy for the biological treatment of tumor. Making use of genetic engineering strategy to insert anti-tumor genes in oncolytic viral vector, and combining gene therapy with virotherapy become a gene-viro-therapy involved strong killing effect. Vaccinia virus has emerged as an attractive oncolytic virus vector especially when used as genetic therapy of tumor. It is a important strategy to modify vaccinia viruses through genetic engineering strategy which enhance their anti-tumor efficacy. At present,

收稿日期: 2016-07-11 接受日期: 2016-09-29

国家自然科学基金(批准号: 81460463)和云南省中青年学术技术带头人后备人才培养基金(批准号: 2013HB083)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-63390070, E-mail: htang1122@aliyun.com

Received: July 11, 2016 Accepted: September 29, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81460463) and Young and Middle-aged Academic Technology Leaders Reserve Personnel Training Fund of Yunnan Province (Grant No.2013HB083)

*Corresponding author. Tel: +86-871-63390070, E-mail: htang1122@aliyun.com

网络出版时间: 2016-12-20 16:06:36 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161220.1606.002.html>

oncolytic vaccinia virus genetically modifies mainly based on the backbone of Wyeth strain, Western Reverse (WR) strain, Lister strain, Copenhagen strain and Tian Tan strain. This review addresses some of the common forms of genetically modified vaccinia viruses and describes the progress of genetically modified vaccinia virus vector based tumor therapy.

Keywords oncolytic vaccinia virus; genetic modification; gene-viro-therapy; tumor therapy

2013年,国际学术期刊《科学》将肿瘤免疫治疗评选为六大最值得关注的科学领域之一^[1]。其中,溶瘤病毒在肿瘤免疫治疗中的应用又倍受瞩目。特别是近年来,以溶瘤病毒作为外源基因表达载体的技术不断发展完善,包括腺病毒(adenovirus, Ad)、痘病毒(vaccinia virus, VV)、杆状病毒(baculovirus)及逆转录病毒(retrovirus, RV)的病毒载体得到广泛研究。相较于其他的病毒载体,痘病毒具有宿主范围广、插入外源基因容量大、遗传稳定性好等优点,使其成为继腺病毒之后又一病毒载体的研究热点。本文以痘病毒的生物学特性为基础,综述了不同痘病毒株的基因改造研究进展以及基因改造痘病毒株在肿瘤治疗中的临床应用。

1 溶瘤病毒及其医学应用概况

溶瘤病毒(oncolytic viruses, OV)是指将某些病毒通过基因工程改造后,成为能有效感染肿瘤细胞并在其中大量复制、最终导致肿瘤细胞溶解的基因工程病毒^[2]。

溶瘤病毒通过直接的溶瘤作用和诱导机体的免疫活性发挥抗肿瘤作用,由于缺乏在正常细胞中复制的必要条件,溶瘤病毒能靶向性地在肿瘤细胞内复制增殖,最终导致肿瘤细胞裂解和死亡,而对健康细胞无影响。因此,溶瘤病毒具有良好的安全性,同时,具有可长效表达抗肿瘤的外源基因的优点。目前常见的溶瘤病毒包括Ad、单纯疱疹病毒1型(herpes simplex virus type-1, HSV-1)、水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)、新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)、麻疹病毒(measles virus)、脊髓灰质炎病毒(poliiovirus)、细小病毒(parvoviridae)、呼肠孤病毒(reoviruses)和VV等。

在二十世纪早期,临床医生就提出了病毒可用于治疗肿瘤这一基本概念,但因担忧其副作用,这方面的研究基本处于停滞状态^[3]。而且,由于当时还不能做到人为控制野生型和弱毒株的病原性,故无法将其推广应用于肿瘤的临床治疗。近30年来,随

着分子生物学、病毒学及肿瘤学的飞速发展和多个病毒基因组测序工作的完成,对病毒基因结构和功能有了更详细的了解,并能有效地对病毒基因组进行改造,使得基于病毒载体的治疗得以较快发展。1991年, Martuza等^[4]首次对HSV-1进行基因改造,构建了能抑制肿瘤细胞并在肿瘤细胞中有复制活性的溶瘤病毒株,用于恶性脑肿瘤的治疗,这是第一株经基因改造的溶瘤病毒。之后,人们对多种溶瘤病毒进行了深入研究,如来源于腺病毒的ONYX015、Ad5-CD/Tkrep、CV706和CV787,来源于HSV-1的R1716和G207和来源于新城疫病毒的PV701等。特别自2000年Kim^[5]正式提出肿瘤病毒治疗(tumor virotherapy)的概念以来,针对肿瘤细胞受体、肿瘤发生进程中的关键基因和调控分子作为靶点的新型溶瘤病毒正逐步从实验室走进临床,应用溶瘤病毒治疗肿瘤亦逐步成为癌症研究和治疗的新兴领域。其中的范例就是全球首个获得FDA批准的重组人5型腺病毒H101(ONYX015)联合化疗用于治疗晚期顽固性鼻咽癌^[6]。

我国学者刘新垣院士于2001年开创性地提出了“癌症的靶向基因-病毒治疗(cancer targeting gene-virotherapy, CTGVT)”策略,即在溶瘤病毒载体上插入抗癌基因,将病毒治疗与基因治疗有机结合,成为具有很强杀伤作用的基因-病毒治疗手段。他们应用ONXY015作为骨架构建了“ZD55-gene”基因-病毒系统,该系统可在病毒载体上同时插入多个肿瘤治疗基因,协同治疗肿瘤,体内外实验均证实了其强大的肿瘤杀伤作用^[7]。在此基础上,又进一步提出了“肿瘤的靶向基因-病毒个性化治疗(individual targeting gene-virotherapy)”和“肿瘤的化学药物-靶向基因-病毒治疗(chemo-targeting gene-virotherapy)”策略,发现装载多个肿瘤治疗基因的溶瘤病毒与化疗药物联合应用对肿瘤治疗具有更好的疗效^[8]。2015年,进一步将CTGVT提升为双基因策略(cancer targeting gene-viro-double gene strategy, CTGVT-DG),并提出CTGVT-DG与纳米技术或溶瘤痘病毒(*Oncolytic poxviruses*)相结合,有望构建出更多不同

载体不同基因的抗癌产品^[9]。

众所周知, 痘病毒作为疫苗在全球消灭天花的行动中广泛应用, 是医学史上最成功的事件之一。痘病毒作为目前正在广泛研究的溶瘤病毒之一, 其用于疾病治疗已有200多年历史^[10-12](表1), 其安全性和有效性已经在实践中得到了充分的验证。重组痘病毒和其他相关痘病毒曾作为基因表达载体和疫苗用于传染病和癌症的治疗^[13], 尽管它被用作基因表达载体和疫苗已有较长的历史, 但仅在过去的二十年间痘病毒才作为一个溶瘤病毒在基因工程中加以研究^[14-15], 其所具有的特性使其成为理想的基因表达载体及治疗肿瘤的溶瘤病毒。而我国在重组溶瘤痘病毒领域的研究起步较晚, 因此, 研究并开发以痘病毒为载体的溶瘤病毒疫苗具有重要的理论意义和广阔的临床应用前景。

2 痘病毒的生物学特性

痘病毒是痘病毒科(Poxviridae)家族成员, 呈椭圆形或砖形, 病毒颗粒直径为200~400 nm, 有一个大约300 nm×240 nm×120 nm的外壳, 其核心为约190 Kb、编码200多个基因的线性双链DNA, 是迄今为止结构最为复杂的一类DNA病毒, 也是目前动物病毒中最大的病毒。痘病毒具有核心、侧体和包膜三个主要结构部分, 核心为哑铃状的芯髓, 即与蛋白质结合的DNA, 核心两面凹陷处各有一个侧小体, 包膜含有

宿主细胞的类脂成分及某些病毒特殊蛋白质(图1)。

痘病毒结构复杂, 有一套完整的DNA转录系统, 可以编码包括mRNA合成、加帽、甲基化及多聚核苷酸化过程中所需的酶^[16]。通过这些酶, 痘病毒能在不依赖宿主细胞基因调控系统的基础上合成自身mRNA。痘病毒基因组能编码200多种多肽, 其中一些区域是病毒复制时非必需的, 将这些区域删除或在这些区域中插入外源基因不会影响病毒的复制, 但这些改变可能会引起病毒致病性的改变。因此, 痘病毒的基因组大小具有较高的可塑性, 可以删除长达9 Kb的自身基因或插入25 Kb的外源基因而仍能够保持高效的复制并维持遗传的稳定性^[17-18]。

2.1 痘病毒的复制周期

痘病毒独特的复制周期主要靠自身编码的蛋白质完成, 整个复制过程在宿主细胞质中进行, 不整合入宿主基因组, 复制周期快, 且不受宿主免疫功能的影响(图2)^[19]。其复制过程可分为三个阶段。(1)痘病毒颗粒脱壳阶段: 痘病毒颗粒与细胞表面接触后, 被细胞吞饮入吞饮泡内, 在吞饮泡内被水解酶系酶解, 进行脱壳, 病毒核心等释放入细胞质;(2)痘病毒相关蛋白质合成阶段: 病毒进入细胞后可诱导产生显著的致细胞病变反应, 早期产生的编码病毒的酶可完全抑制宿主细胞的功能, 从而使病毒基因进行有效的复制和表达, 早期合成的蛋白质中含有DNA聚合酶、胸苷激酶等一些与DNA复制相关的酶;

表1 痘病毒用于疾病治疗的历史

Table 1 The history of VV for disease therapy

时间 Time	痘病毒用于人类疾病治疗的历史阶段 The historical stages of VV for human disease treatment
1796~1978年	天花疫苗全球性接种用于预防天花的时代: 非工程痘病毒疫苗
1796年	Edward Jenner首次将天花疫苗用于人类
1850年	预防天花的全球性接种
1979年	WHO宣布世界范围内天花绝迹
1950~1995年	治疗性痘病毒作为肿瘤疫苗的时代: 非工程痘病毒疫苗
1950年	第一次将痘病毒作为一个肿瘤疫苗使用
1994年	痘病毒作为溶瘤病毒用于黑色素瘤的治疗
1995年至今	基因重组的痘病毒作为肿瘤疫苗的时代: 工程痘病毒疫苗
1995年	痘病毒作为溶瘤剂用于膀胱癌的治疗
1996年	痘病毒基因组测序完成
1997年	重组溶瘤痘病毒(JX-594)首次应用于临床试验
1998年	实现溶瘤痘病毒的全身性给药
1999年	JX-594临床试验结果的公布 ^[10]
2001年	实现双基因缺失的溶瘤痘病毒全身给药和其有效性的报导 ^[11]
2011年	首次成功使用溶瘤病毒JX-594对已发生转移的肿瘤患者进行静脉内给药进行全身抗肿瘤治疗, 并且做到了定靶和摧毁肿瘤 ^[12]

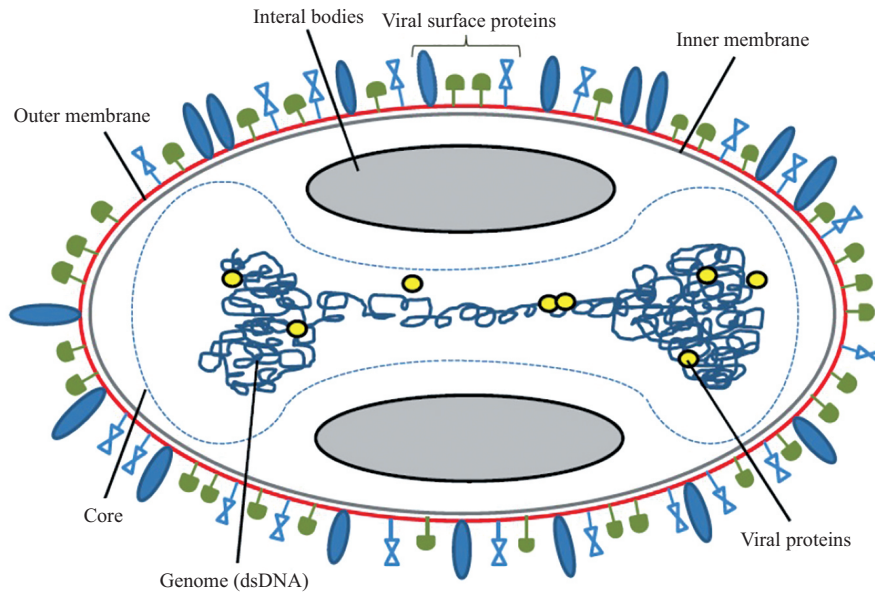


图1 痘病毒的形态结构

Fig.1 The morphological structure of VV

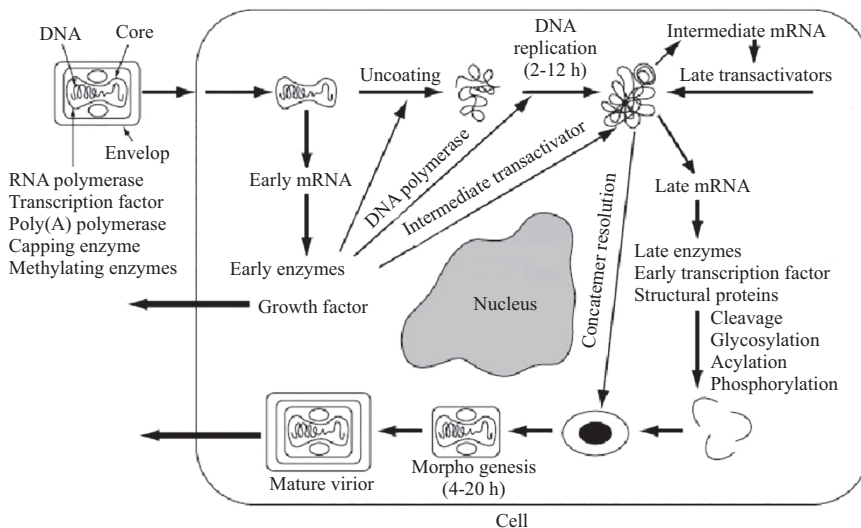


图2 痘病毒的复制周期(根据参考文献[19]修改)

Fig.2 Replication cycle of VV (modified from reference [19])

(3)痘病毒颗粒成熟阶段: 感染4~20 h即可装配成成熟的病毒颗粒并释放。病毒的整个复制过程包括吸附、侵入、脱壳、早期基因表达、病毒DNA的合成、晚期基因表达、病毒颗粒的装配和释放, 由其自身的特异启动子和转录因子分别介导早、中和晚期转录的进行。早期转录起始所需的酶包含在病毒颗粒中并在病毒进入细胞后释放, 病毒复制所需的蛋白质则在感染早期合成; 病毒依赖DNA的RNA聚合酶在细胞质中催化早期mRNA的合成, 并翻译产生早期蛋白质, 参与病毒脱壳、DNA复制及中期mRNA的转录; 中期mRNA翻译产生晚期反式激活因子, 介

导晚期mRNA的合成; 晚期mRNA翻译产生结构蛋白质和早期转录因子。

2.2 痘病毒的形态发生

在痘病毒的整个生命周期中, 根据其感染细胞的不同阶段, 可以产生出四种不同的感染形式(图3)^[20]: 细胞内成熟病毒颗粒(intracellular mature virus, IMV)、细胞内包膜病毒颗粒(intracellular enveloped virus, IEV)、细胞结合包膜病毒颗粒(cellular enveloped virus, CEV)和细胞外包膜病毒颗粒(extracellular enveloped virus, EEV)。这四种感染形式中, IMV和EEV是痘病毒在装配中最常见的形

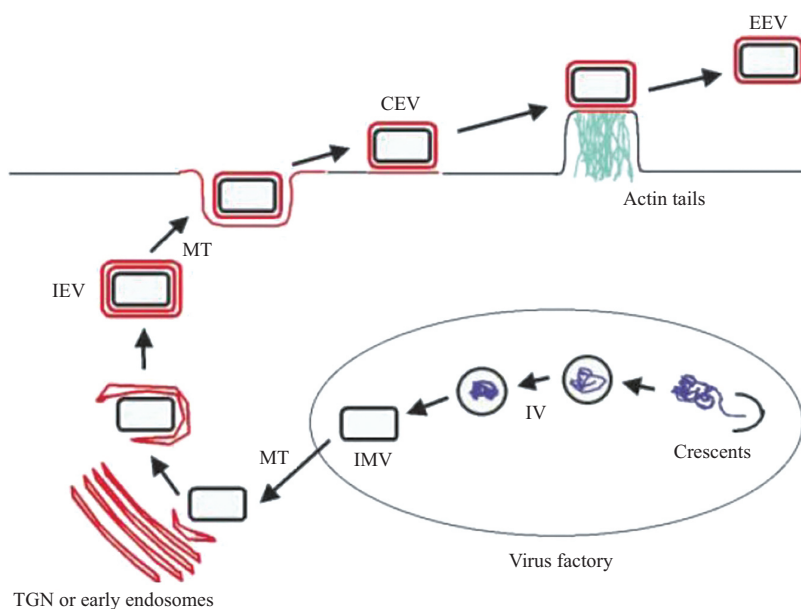


图3 痘病毒的形态发生概况(根据参考文献[20]修改)

Fig.3 Overview of VV morphogenesis (modified from reference [20])

式。痘病毒的整个组装发生在细胞的细胞质中,其中涉及到被称为“新月体(crescent)”的非感染性前体^[20],IMV由新月体和不具感染性的病毒前体——未成熟病毒(immature virus, IV)形成,一些IMV离开“病毒工厂(virus factory)”后,被源自反式高尔基体网状结构(trans Golgi network, TGN)或早期内体(early endosomes)脂质双层膜包裹,形成IEV。然后IEV经过微管(microtubules, MT)的作用到达细胞表面,其外膜与细胞质膜发生融合形成CEV,CEV释放后形成EEV。CEV和EEV在物理结构上无明显差异,所含包膜比IEV和IMV要少。CEV可诱导肌动蛋白尾部(action tails)形成,促使病毒颗粒从细胞膜释放出来,在病毒-细胞传递中发挥着重要作用;EEV包膜上携带的宿主补体调控蛋白质使病毒颗粒能够逃避宿主免疫系统的攻击。目前,痘病毒如何进入肿瘤细胞的机制尚不完全清楚,可能的机制是肿瘤细胞特有的某些信号因子和部分信号通路的异常激活有助于痘病毒进入肿瘤细胞,痘病毒依据感染形式的不同,其进入肿瘤细胞的方式也不尽相同,包括胞吞途径和直接与细胞膜融合。

2.3 痘病毒的基因表达

痘病毒的基因表达过程受到严格的调控。Baroudy等^[21]在分析了不同痘病毒株的基因组后发现,其基因组中央为保守区,主要用于编码晚期蛋白质,并编码少数的早期蛋白质,两侧的可变区则主要用于编码非必需的早期蛋白质。痘病毒依靠其自身

编码的蛋白质和宿主细胞的蛋白质在宿主细胞的细胞质“痘病毒工厂”中进行快速而有效的转录、复制和翻译,完成其生命周期^[22-23]。研究显示,溶瘤痘病毒在感染后72 h内即进行自我复制并裂解肿瘤细胞,表现出较好的肿瘤靶向性并可以通过血液移动到远端的肿瘤病灶^[24]。此外,由于痘病毒的整个复制周期是在宿主细胞的细胞质中完成的,从而不存在病毒DNA整合到宿主基因组中的潜在风险。也正是因为痘病毒的这些特征使其作为一个理想的外源基因载体被广泛应用于肿瘤治疗。

3 痘病毒载体的特点和基因改造研究现状

3.1 痘病毒载体的特点

痘病毒作为基因表达载体,具有以下优点:病毒宿主范围广;插入外源基因容量大;病毒在细胞质内复制增殖,并不整合到宿主细胞基因组内;是一种溶细胞病毒,细胞受感染后在3 d内死亡,死亡的肿瘤细胞又可成为肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)的主要来源;外源基因在病毒启动子的控制下可以获得高效表达;痘病毒本身对宿主无致癌性;易制备获得高滴度病毒;临床应用至今尚未发现严重毒副作用;易于推广应用。因此,研究并开发以痘病毒为载体的重组溶瘤病毒具有重要的理论意义和广阔的临床应用前景。此外,经过基因改造的溶瘤痘病毒,具有更好的肿瘤细胞靶向性,对健康细胞则无损伤^[25]。因此,痘病毒被广泛应用于肿瘤治疗,

其中研究较广的痘病毒株为Wyeth株、WR(Western Reverse)株、Copenhagen株、Lister株和天坛株(表2)^[24]。

3.2 痘病毒基因改造研究现状

痘病毒是一种溶细胞病毒,其抗肿瘤作用主要是通过以下三种不同的机制得以实现。(1)直接感染肿瘤细胞:痘病毒感染后72 h内即完成复制周期并直接导致细胞裂解;(2)免疫介导细胞死亡:痘病毒感染细胞后,病毒本身可释放病毒死亡信号^[26],而受感染细胞可释放细胞死亡信号^[27]及TAA,这些信号可激发强烈的炎症反应,调动机体强烈的抗肿瘤免疫反应;(3)诱导肿瘤内血管萎缩:由细胞因子和炎症因子介导的大量中性粒细胞向肿瘤细胞靠近,并在肿瘤血管局部聚集,最终促使血栓形成和血管萎缩,从而加重肿瘤组织的损伤^[28]。

痘病毒具有天然的肿瘤靶向性,为了进一步提高其肿瘤靶向性和安全性,研究者采用不同的改造策略来增强痘病毒在肿瘤细胞中的选择性复制(表3)^[29-30]。目前,最主要的改造策略是删除痘病毒的胸苷激酶(thymidine kinase, *TK*)基因和痘苗生长因子(vaccinia growth factor, *VGF*)基因。*TK*基因参与细胞增殖过程中的DNA合成^[31],痘病毒复制时,在*TK*的作用下可形成一个高浓度的核苷酸池,以确保子代DNA复制的顺利进行。正常细胞中,核苷酸的浓度较低,因此*TK*是正常细胞增殖所必需的;肿瘤细胞中则具有较高浓度的核苷酸,因此*TK*对于肿瘤细胞增殖是非必需的。由上可知,删除*TK*基因的

痘病毒能够优先在为其提供足够核苷酸的肿瘤细胞中复制,而不能在正常细胞中复制。而*VGF*是病毒感染早期产生的一种分泌蛋白质,与表皮生长因子(epidermal growth factor, *EGF*)同源,可与细胞表面的*EGF*受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)相结合,结合后可介导细胞内*Ras*信号通路的激活,进一步启动细胞周期并促进细胞分化,而细胞分化又会促进细胞*TK*的合成,最终提高病毒的感染效率^[32]。这对于病毒在正常细胞中的扩增十分重要,而在本身可以大量增殖的肿瘤细胞中是非必需的。研究表明,相较于*TK*或*VGF*单个基因敲除的病毒,*TK*和*VGF*双基因敲除的病毒,即vvDD(double deleted vaccinia virus)可显著增强其在肿瘤细胞中复制的特性^[11,33]。

对痘病毒进行基因改造的实验流程是:首先需构建一个用于转染的穿梭质粒,这个质粒通常包括以下几个主要组成部分:(1)痘病毒特异的启动子及其后用于插入目的基因序列的多克隆位点;(2)用于筛选重组痘病毒的标志基因及启动其表达的启动子;(3)两段与痘病毒基因组插入位点两侧基因同源的侧翼序列;(4)用于质粒筛选的抗性基因;(5)质粒本身复制所需的元件。构建好的穿梭质粒经转染进入痘病毒感染的易感细胞中,携带了目的基因序列的穿梭质粒与痘病毒基因在细胞中发生同源重组,将穿梭质粒上所携带的目的基因导入到痘病毒的基因组中。当同源重组发生后,连同目的基因一同导入到痘病毒当中的标记基因即在启动子的作用下表

表2 作为治疗载体的主要野生型痘病毒株(根据参考文献[24]修改)

Table 2 Wild-type VV strains used as backbones for therapeutic agents (modified from reference [24])

毒株 Strain	来源 Background	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
Wyeth or NYCBOH	North American vaccine strain	Most commonly used clinical strains	Minimal inherent tumor selectivity <i>in vitro</i>
Lister	European (UK) vaccine strain	Extensive use during smallpox eradication	No inherent tumor selectivity <i>in vitro</i>
Copenhagen	Northern European vaccine strain	<i>In vitro</i> tumor selectivity; history as a vaccine	Withdrawn during smallpox eradication Programme owing to toxicity
Western Reserve	Primarily laboratory strain derived from Wyeth after passage in mice	Increased lytic ability and inherent selectivity <i>in vitro</i>	Minimal clinical use in humans
Tian Tan	Chinese vaccine strain	Extensive use during smallpox eradication	Unknown potential as oncolytic agent (some use as cancer vaccine)
MVA	Vaccine strain derived from Ankara strain after passage in avian cells	Increased safety but retains vaccine potential	Will not replicate in mammalian cells, so has no oncolytic potential
NYVAC	Vaccine strain derived from Copenhagen with 18 gene deletions	Increased safety but retains vaccine potential	Will not replicate in mammalian cells, so has no oncolytic potential

MVA: 改良型痘病毒安卡拉株; NYCBOH: 纽约市卫生局; NYVAC: 纽约痘病毒株。

MVA: modified vaccinia Ankara; NYCBOH: New York City Board of Health; NYVAC: New York vaccinia.

表3 用于临床前研究的溶瘤痘病毒(根据参考文献[29-30]修改)

Table 3 Examples of oncolytic VV used in preclinical cancer studies (modified from references [29-30])

病毒名称 Virus name	痘病毒株 VV strain	基因缺失部位 Genetic deletion	插入外源基因 Transgene expressed
vvCD	WR	<i>TK</i>	<i>CD</i>
vvDD	WR	<i>TK, VGF</i>	<i>CD</i>
vvDD-CDSR (JX-929)	WR	<i>TK, VGF</i>	<i>CD, SR</i>
vvDD-A34R	WR	<i>TK, VGF</i>	<i>A34R, K151E</i> mutation
vvDD-SR-RFP	WR	<i>TK, VGF</i>	<i>RFP</i>
vCB025	WR	<i>TK</i>	Luciferase
JX-963	WR	<i>TK, VGF</i>	<i>GM-CSF</i>
vvdd-GFP	WR	<i>TK, VGF</i>	<i>GFP</i>
vvdd-VEGFR-1-Ig	WR	<i>TK, VGF</i>	Soluble VEGFR receptor 1 construct
GLV-1h68 (GL-ONC1)	Lister	<i>TK, F14.5L, A56R</i> (hemagglutinin)	Renilla luciferase-GFP fusion protein, β -galactosidase, β -glucuronidase
GLV-1h99	Lister	<i>TK, F14.5L, A56R</i> (hemagglutinin)	Human norepinephrine transporter, β -galactosidase, β -glucuronidase
GLV-1h107 GLV-1h108 GLV-1h109	Lister	<i>TK, F14.5L, A56R</i> (hemagglutinin)	VEGF single chain antibody <i>GLAF-1</i> , Renilla luciferase-GFP fusion protein, β -glucuronidase
GLV-1h153	Lister	<i>TK, F14.5L, A56R</i> (hemagglutinin)	Renilla luciferase-GFP fusion protein, <i>hNIS</i> , β -galactosidase, β -glucuronidase
GLV-1h210	Lister	<i>TK, F14.5L, A56R</i> (hemagglutinin)	Renilla luciferase-GFP fusion protein, <i>hEPO</i> , β -galactosidase, β -glucuronidase
GLV-1h237	Lister	<i>TK, F14.5L, A56R</i> (hemagglutinin)	Renilla luciferase-GFP fusion protein, Walker A motif mutant of <i>Cdc6</i> , β -galactosidase, β -glucuronidase
GLV-1h255	Lister	<i>TK, F14.5L, A56R</i> (hemagglutinin)	Renilla luciferase-GFP fusion protein, <i>MMP-9</i> , β -galactosidase, β -glucuronidase
GLV-1h324	Lister	<i>TK, F14.5L, A56R</i> (hemagglutinin)	Renilla luciferase-GFP fusion protein, melanin, β -galactosidase, β -glucuronidase
GLV-1h285	Lister	<i>TK, F14.5L, A56R</i> (hemagglutinin)	Renilla luciferase-GFP fusion protein, <i>BMP-4</i> , <i>turboRFP</i>
VV-FCU1	Copenhagen	<i>TK</i>	<i>CD/uracil phosphoribosyl transferase</i> fusion gene (<i>FCU1</i>)
JX-594 (Pexa-Vec)	Wyeth	<i>TK</i>	<i>GM-CSF</i>

CD: 胞嘧啶脱氨酶; *GFP*: 绿色荧光蛋白; *TK*: 胸苷激酶; *VGF*: 痘苗生长因子; *vvdd*: 双敲除痘病毒; *GM-CSF*: 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; *VEGF*: 血管内皮生长因子; *SR*: 生长抑素受体; *hNIS*: 人碘化钠同向转运体; *hEPO*: 人促红细胞生成素; *Cdc6*: 细胞周期调控因子细胞分裂周期6; *MMP-9*: 基质金属蛋白酶-9; *BMP-4*: 骨形态发生蛋白-4; *turboRFP*: 驱动红色荧光蛋白。

CD: cytosine deaminase; *GFP*: green fluorescent protein; *TK*: thymidine kinase; *VGF*: vaccinia growth factor; *vvdd*: double deleted VV; *GM-CSF*: granulocyte-macrophage colony stimulating factor; *VEGF*: Vascular endothelial growth factor; *SR*: somatostatin receptor; *hNIS*: human sodium iodide symporter; *hEPO*: human erythropoietin; *Cdc6*: cell cycle regulator cell division cycle 6; *MMP-9*: Matrix metalloproteinase-9; *BMP-4*: bone morphogenetic protein-4; *turboRFP*: turbo red fluorescent protein.

达, 这时, 再应用标记基因即可筛选出携带了目的基因的痘病毒阳性重组子。

4 经基因改造的不同溶瘤痘病毒株应用于肿瘤治疗研究

4.1 经基因改造的不同溶瘤痘病毒株在肿瘤治疗中的研究

应用痘病毒进行肿瘤治疗时, 能特异性靶向肿

瘤细胞而非健康细胞是至关重要的, 虽然一些野生型痘病毒被报道对肿瘤细胞具有固有亲和力, 但是通过基因改造来进一步提高痘病毒在肿瘤细胞中的选择性复制能力是目前对痘病毒进行基因改造的主要策略之一。目前报道较多的经基因改造的痘病毒毒株有Wyeth株、WR株、Copenhagen株、Lister株和天坛株等。

4.1.1 Wyeth株 Kim等^[34]利用痘病毒Wyeth株构

建了重组痘病毒JX-594, 在TK基因缺失的同时又插入了人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(*granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF*)基因。在研究病毒对人类肿瘤敏感性的实验中, Parato等^[25]发现, 在29例包括子宫内膜癌、卵巢癌、结肠直肠癌和胶质母细胞瘤的肿瘤组织和健康对照组织中, 56%表现为JX-594敏感性。相比于具有最低JX-594敏感性的正常组织(13%), 卵巢癌组织具有最大的JX-594敏感性(83%), 说明JX-594优先感染肿瘤细胞。此外, Parato等^[25]还报道了JX-594在荷瘤裸鼠中的复制效率是正常组织的5倍或更高, 分析其潜在的机制是痘病毒通过在其感染的细胞中分泌病毒蛋白质介导了EGF/RAS/MAPK信号通路的异常激活, 并通过结合EGFR激活了信号通路的下游分子。

4.1.2 WR株 Thome等^[33]在WR株的基础上构建了TK、VGF双敲除并插入外源基因GM-CSF的重组痘病毒JX-963, 该病毒在荷瘤小鼠、兔及原位手术标本等体内外实验中均表现出明显的肿瘤靶向性。此外, 痘病毒经静脉注射后, 在具有免疫力的小鼠和兔中针对原发瘤和广泛性转移瘤均可产生有效的全身性免疫应答。在兔模型中, 出现中性粒细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞增多, 并且能够诱导产生强烈的淋巴毒性T细胞免疫应答^[35]。

McCart等^[36]基于WR株构建了表达大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(*cytosine deaminase, CD*)基因的重组痘病毒vvCD, 证实了vvCD与前体药物5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC)联用可提高病毒的抗肿瘤效应并降低其病原性。McCart等^[20]进一步构建了TK、VGF基因双缺失并表达绿色荧光蛋白(*green fluorescent protein, GFP*)的重组痘病毒vvDD-GFP, 体内外实验均显示其复制能力在不分裂细胞中显著降低, 而在肿瘤细胞中选择性复制, 因此, vvDD-GFP表现出较强的抗肿瘤效应。

4.1.3 Copenhagen株 Foloppe等^[37]在Copenhagen株的基础上构建了TK基因缺失同时表达酵母CD和尿嘧啶磷酸核糖基转移酶(*uracil phosphoribosyltransferase*)融合基因(*fusion gene*)FCUI的重组痘病毒VV-FCUI。与TK缺失的VV或5-FC单独用药相比, 前体药物5-FC全身给药的同时瘤内注射VV-FCUI可显著抑制裸鼠皮下接种结肠癌的生长。进一步的研究表明, 全身性皮下注射VV-FCUI可以靶向肿瘤生长, 更重要的是, 在裸鼠结肠癌肝转移模型中, 联合5-FC并全身

性皮下注射VV-FCUI后, 肿瘤的生长受到抑制。该研究证实了融合基因FCUI的插入可增强TK缺失的VV的溶瘤效率, 并提示重组痘病毒VV-FCUI可作为治疗来自结肠癌及其他癌症发生远端转移的患者的潜在手段。

4.1.4 Lister株 痘病毒的溶瘤能力是用于癌症治疗的各种重组体发展的基础。为了了解未经基因改造的痘病毒L-IVP株(Lister株, 莫斯科病毒制剂研究所)是如何产生抗肿瘤作用的, Zonov等^[38]构建了人肺癌细胞A431异种移植裸鼠和荷鼠艾氏腹水瘤的C57BL小鼠模型, 并给予瘤内注射该痘病毒。两周后, 研究者在荷A431瘤小鼠的内脏器官中观察到L-IVP株的存在, 但其又迅速从血液中消失。在该研究中, L-IVP株在两种动物模型中均能抑制肿瘤的生长, 但作用机制却不尽相同: 在A431移植瘤模型中, 病毒在肿瘤细胞中复制并直接破坏肿瘤细胞, 最终导致肿瘤消退; 而在艾氏腹水瘤模型中, 痘病毒虽然复制不良, 但其通过将肿瘤细胞的细胞周期阻滞在S期从而有效抑制了肿瘤细胞的分裂复制。该研究表明, 未经基因改造的野生型痘病毒具有天然的抗肿瘤作用, 其可能机制是直接破坏肿瘤细胞和/或抑制肿瘤细胞的有丝分裂。

Chard等^[39]为了研究携带白细胞介素-10(*interleukin-10, IL-10*)的痘病毒能否增强抗肿瘤作用, 对Lister株进行了基因改造, 删除其TK基因, 同时使其携带鼠源IL-10基因, 得到重组痘病毒VVLΔTK-IL-10。研究者在胰腺癌小鼠模型中对VVLΔTK-IL-10和对照组痘病毒VVΔTK的抗肿瘤功效进行了评估。并通过检测瘤内病毒的持久性、免疫耗竭实验以及脾细胞免疫表型分型实验等分析与痘病毒抗肿瘤效应相关的功能性机制。结果显示, 在体外实验中, 与VVLΔTK相比, VVLΔTK-IL-10在鼠胰腺癌细胞中的细胞毒性和复制能力类似, 但在体内皮下胰腺癌模型和K-ras-p53突变的胰腺癌中则呈现出良好的抗肿瘤效应, 并且全身给药后, 可以诱导长期的抗肿瘤免疫效应。

此外, 还有基于Lister株的TK、F14.5L和A56R基因缺失, 表达萤光素酶、VEGFR、VEGF的抗体、人去甲肾上腺素转运蛋白质、β-半乳糖苷转移酶、β-葡萄糖醛酸酶的GLV-1h系列重组痘病毒。

4.1.5 天坛株 Li等^[40]通过双标记筛选与外源选择性标记基因敲除技术相结合, 敲除相关毒性基因,

得到减毒株TTVAC7, 一个多基因缺失的痘病毒天坛株(VTT)。此项研究中, 构建的七个穿梭载体质粒PTC-EGFP、pTA35-EGFP、pTA66-EGFP、PTE-EGFP、PTB-EGFP、pTIEGFP和PTJ-EGFP用同源重组和荧光菌斑筛选方法敲除天坛株的七个基因片段(TC: TC7L~TK2L; TA35: TA35L; TA66: TA66R; TE: TE3L~TE4L; TB: TB13R; TI: TI4L; TJ: TJ2R)。然后, 将酶Cre/loxP系统施加到脱模外源选择标记, 最终得到基因缺失的减毒株TTVAC7。一系列的体内外实验证明, 不仅TTVAC7的宿主范围可变窄, 其毒性显著减弱, 同时保持了高免疫原性。研究结果表明, TTVAC7可以被开发成为一种安全的病毒载体或疫苗。

Deng等^[41]沿用了痘病毒JX-594株的改造思路, 将痘病毒天坛株Guang9(VG9)加以改造, 构建出表达鼠源GM-CSF的痘病毒株VG9-GMCSF, 并评估了其对于黑色素瘤小鼠的抗肿瘤效应。结果显示, 在体外实验中, VG9-GMCSF的复制能力和细胞毒性与VG9无显著差异; 但在体内实验中, VG9-GMCSF可显著抑制皮下移植黑色素瘤的生长, 延长荷瘤小鼠的生存时间, 并激发荷瘤小鼠产生抗肿瘤细胞毒性反应。VG9-GMCSF可以诱导强烈的肿瘤杀伤效应, 为临床治疗黑色素瘤提供了潜在的策略。

4.1.6 其他痘病毒株 改良型痘苗病毒(modified vaccinia virus Ankara, MVA)株来源于一个土耳其的痘病毒CVA(*Chorioallantois vaccinia virus Ankara*, CVA)株, CVA在鸡成纤维细胞CEF中传代570代后得到MVA^[42]。MVA作为一种重要的疫苗病毒递送载体, 为高度减毒的非复制型痘苗病毒毒株。NYVAC是由Copenhagen株删除十八个基因后得到的痘病毒株, 与MVA一样, 可以作为疫苗病毒载体。MVA和NYVAC不能在哺乳动物细胞中进行复制, 因而不具有溶瘤特性。

4.2 溶瘤痘病毒的临床应用

目前, 应用痘病毒治疗肿瘤的各项临床试验正在开展(<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>)(表4)。基于Wyeth株的Pexa-Vec(JX-594)在I/II期临床试验中, 已确定对各种实体瘤具有肿瘤选择性杀伤作用。截至目前, 在美国国立卫生研究院(NIH)的临床试验注册中心可检索到的用JX-594治疗肿瘤的临床试验共有十五项(<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>)。在JX-594的I/II期临床试验研究中, 分别对23例晚期顽固

性实体瘤患者给予JX-594单剂量静脉注射, 剂量范围为 1×10^5 pfu/kg~ 3×10^7 pfu/kg^[43]。结果表明, 增加剂量可以产生良好的耐受性且无明显毒性。应用 1.5×10^7 pfu/kg或更高的剂量进行治疗的患者, 其肿瘤组织的活检显示, 有87%的细胞为JX-594阳性, 而且高剂量组的肿瘤患者中新的肿瘤病灶形成受到了抑制。这些结果证实, JX-594可能成为一种治疗癌症的新方法。目前, JX-594联合索拉非尼(sorafenib)治疗晚期肝细胞癌的III期临床试验正在开展, 该研究旨在确定在没有接受全身性治疗的晚期肝细胞癌病人中, JX-594联合sorafenib治疗与单独使用抗癌药物sorafenib相比是否能增加病人的生存率。另外, 在NIH临床试验注册中心可检索到用GLV-1h68治疗肿瘤的临床试验共六项。在痘病毒GL-ONC1(GLV-1h68)用于治疗腹膜癌扩散患者的I/II期临床试验研究中, 患者接受GL-ONC1腹膜内剂量注射高达每28天4次^[44]。研究人员初步确定, 患者对单剂量的GL-ONC1具有很好的耐受性, 并能显著降低腹水的恶性细胞数量。此外, 还检索到一项vvDD-CDSR(JX-929)的临床试验, 该研究主要测定的是痘病毒经瘤内注射后的最大耐受剂量^[45], 但目前该临床试验结果还未公布。

5 结语与展望

肿瘤的基因-病毒治疗是近年来肿瘤治疗的研究热点, 痘病毒因其自身具有的诸多特性成为一种理想的治疗载体, 与其他溶瘤病毒不同, 痘病毒可在许多哺乳动物细胞中进行复制, 因而可在具有免疫力的同系肿瘤模型中进行研究, 这使得研究者们可以根据痘病毒对免疫系统及活化的免疫系统的抗肿瘤效应等方面进行研究。目前, 通过删除或插入相关基因已改造产生多种不同的重组痘病毒, 使其可以选择性地靶向杀伤肿瘤细胞, 且获得了一些具有实际意义的临床前和早期临床试验结果, 这些结果都显示出由痘病毒诱导的免疫反应在抗肿瘤作用中的重要性及有效性, 这也将是今后一段时间内痘病毒研究的热点。随着基因编辑技术的突破性发展, 经基因改造的痘病毒也必定在今后靶向性肿瘤基因治疗领域大放异彩。

参考文献 (References)

- 1 Breakthrough of the year. Areas to watch. Science 2012;

表4 应用痘病毒的溶瘤病毒治疗临床试验概况

Table 4 Summary of VV oncolytic virotherapy clinical trials

痘病毒 VV	项目编号/状态 NCT ID/Status	试验期数 Phase	肿瘤类型 Tumor type (s)	给药途径/治疗方案 Administration route/Arms	主要效果指标 Primary outcome measures
Pexa-Vec (JX-594)	NCT02630368/ Recruiting	1	Solid tumor, soft-tissue sarcoma, breast cancer	IV/JX-594 dose escalation+	Assess MTD of combination therapy and antitumor activity
		2		Cyclophosphamide, IV/JX-594+Cyclophosphamide, Cyclophosphamide	
	NCT01380600/ Completed	1b	CRC	IV/1e6 pfu/kg, 1e7 pfu/kg, 3e7 pfu/kg bw, dose escalation	Determine MTD and/or MFD and safety by IV infusion
		2	HCC	IV/IT/1e9 pfu/4 times, sorafenib is initiated after 3 days, twice daily	Determine safety/tolerability of IV infusion followed by IT injections with JX-594 prior to standard sorafenib therapy
	NCT00625456/ Completed ^[43,46]	1	Solid tumor	IV/1e5-3e7 pfu/kg bw, dose escalation	Determine MTD and/or MFD and safety/toxicity by IV infusion
		1b	CRC	IV/1e6 pfu/kg, 1e7 pfu/kg, 3e7 pfu/kg bw	Determine MTD and/or MFD by IV infusion
	NCT01469611/ Unknown	1b	CRC	IV/1e6 pfu/kg, 1e7 pfu/kg, 3e7 pfu/kg bw	Determine MTD and/or MFD by IV infusion
	NCT01636284/ Completed	2a	HCC	IV/once/week, 5 weeks	Assess tumor response
	NCT01394939/ Completed	1/2a	CRC	IV/once/week, 5 weeks (+Irinotecan)	Determine MTD and/or MFD, safety of combination therapy and radiographic response rate of patients
	NCT01169584/ Completed	1	Pediatric solid tumor	IT/1e6-3e7 pfu/kg/once	Determine MTD and/or MFD and safety/toxicity by IT injection
	NCT00629759/ Completed ^[48]	1	HCC	IT/1e8 pfu, 3e8 pfu, 1e9 pfu, 3e9 pfu/12 weeks, 4 times	Determine MTD and/or MFD by IT injection and evaluate safety
	NCT01387555/ Completed	2b	HCC	IV/1e9 pfu/18 weeks, 6 times +supportive care	Determine overall survival for patients receiving best supportive care
	NCT00429312/ Completed ^[49]	1/2	Melanoma	IT/1e4-2e7 pfu/Lesions	Evaluate response rate for injected tumor
	NCT00554372/ Completed ^[46-47]	2a	HCC	IT/1e8 pfu, 1e9 pfu, low/high dose	Determine proportion of subjects achieving disease control
	NCT02562755/ Recruiting	3	HCC	IT/1e9 pfu/6 weeks, 3 times, 6 weeks+sorafenib, twice daily	Evaluate overall survival for patients
GL-ONC1 (GLV-1h68)	NCT02714374/ Recruiting	1	Solid organ cancers	IV/6 groups: GL-ONC1+eculizumab /1,2,4,6 groups, GL-ONC1/3,5 groups	Evaluate number of participants with treatment-related AE
		1	Ovarian cancer, peritoneal carcinomatosis	IP/multiple doses	Determine safety and tolerability of administering multiple doses rely on Incidence of treatment-emergent AE
	NCT01766739/ Recruiting	1	Lung cancer	Intra-pleural/single dose originally, escalating to three consecutive daily doses in patients with malignant pleural effusions	Determine MTD
	NCT01443260/ Completed ^[44]	1/2	Peritoneal carcinomatosis	IP/4 times/4 weeks (28 d)	Determine safety by the evaluation of the number of patients experiencing AE (type, frequency, severity)
	NCT01584284/ Completed	1	Cancer of head and neck	IV/5 groups	Measure safety and tolerability by the number of patients with AE
vvDD-CDSR	NCT00794131/ Completed	1	Solid tumor	IV	Determine the safety and tolerability by IV infusion
		1	Solid tumor	IT/IV/3 treatment programs	Determine MTD and/or MFD and safety of IT injection and IV infusion

CRC: 结直肠癌; HCC: 肝细胞癌; NCT: 国际临床试验; IV: 静脉内注射; IT: 肿瘤内注射; IP: 腹腔注射; MTD: 最大耐受剂量; MFD: 最大可行剂量; AE: 不良反应; pfu: 空斑形成单位; bw: 体重。

CRC: colorectal carcinoma; HCC: hepatocellular carcinoma; NCT: national clinical trial; IV: intravenous; IT: intratumoural; IP: intraperitoneal; MTD: maximum tolerated dose; MFD: maximum-feasible dose; AE: adverse events; pfu: plaque-forming unit; bw: body weight.

- 338(6114): 1528-9.
- 2 Chernichenko N, Linkov G, Li P, Bakst RL, Chen CH, He S, *et al.* Oncolytic vaccinia virus therapy of salivary gland carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 139(2): 173-82.
 - 3 Vaha-Koskela MJ, Heikkilä JE, Hinkkanen AE. Oncolytic viruses incancer therapy. *Cancer Lett* 2007; 254(2): 178-216.
 - 4 Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 1991; 252(5007): 854-6.
 - 5 Kim DH. Replication-selective microbiological agents: Fighting cancer with targeted germ warfare. *J Clin Invest* 2000; 105(7): 837-9.
 - 6 Crompton AM, Kim DH. From ONYX-015 to armed vaccinia viruses: the education and evolution of oncolytic virus development. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7(2): 133-9.
 - 7 Zhang ZL, Zou WG, Luo CX, Li BH, Wang JH, Sun LY, *et al.* An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy. *Cell Res* 2003; 13(6): 481-9.
 - 8 Liu XY, Gu JF. Targeting gene-virotherapy of cancer. *Cell Res* 2006; 16(1): 25-30.
 - 9 刘新垣. 一种抗癌新策略——肿瘤的基因病毒治疗. *中国肿瘤生物治疗杂志*(Liu Xinyuan. *Cancer targeting gene-viro-therapy: An evolving anti-cancer strategy.* *Chin J Cancer Biother*) 2015; 22(2): 159-65.
 - 10 Mastrangelo MJ, Maguire HC Jr, Eisenlohr LC, Laughlin CE, Monken CE, McCue PA, *et al.* Intratumoral recombinant GM-CSF- encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther* 1999; 6(5): 409-422.
 - 11 McCart JA, Ward JM, Lee J, Hu Y, Alexander HR, Libutti SK, *et al.* Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res* 2001; 61(24): 8751-7.
 - 12 Kim JH, Oh JY, Park BH, Lee DE, Kim JS, Park HE, *et al.* Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol Ther* 2006; 14(3): 361-70.
 - 13 Guo ZS, Bartlett DL. Vaccinia as a vector for gene delivery. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4(6): 901-17.
 - 14 Thorne SH, Bartlett DL, Kim DH. The use of oncolytic vaccinia viruses in the treatment of cancer: A new role for an old ally? *Curr Gene Ther* 2005; 5(4): 429-43.
 - 15 Shen Y, Nemunaitis J. Fighting cancer with vaccinia virus: Teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther* 2005; 11(2): 180-95.
 - 16 Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(21): 11341-8.
 - 17 Merchlinsky M, Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by *in vitro* ligation: Recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology* 1992; 190(1): 522-6.
 - 18 Smith GL, Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 1983; 25(1): 21-8.
 - 19 Arhelger RB, Darlington RW, Gafford LG, Randall CC. An electron microscopic study of fowlpox infection in chick scalps. *Lab Invest* 1962; 11(10): 814-25.
 - 20 Smith GL, Vanderplasschen A, Law M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* 2002; 83(Pt12): 2915-31.
 - 21 Baroudy BM, Venkatesan S, Moss B. Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* 1982; 28(2): 315-24.
 - 22 Schramm B, Locker JK. Cytoplasmic organization of poxvirus DNA replication. *Traffic* 2005; 6(10): 839-46.
 - 23 Katsafanas GC, Moss B. Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell Host Microbe* 2007; 2(4): 221-8.
 - 24 Kim DH, Thorne SH. Targeted and armed *Oncolytic poxviruses*: A novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(1): 64-71.
 - 25 Parato KA, Breitbach CJ, Boeuf FL, Wang J, Storbeck C, Ilkow C, *et al.* The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol Ther* 2012; 20(4): 749-58.
 - 26 Zhu J, Martinez J, Huang X, Yang Y. Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN-beta. *Blood* 2007; 109(2): 619-25.
 - 27 Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: Damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol* 2007; 28(10): 429-36.
 - 28 Breitbach CJ, Paterson JM, Lemay CG, Falls TJ, Mcguire A, Parato KA, *et al.* Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther* 2007; 15(9): 1686-93.
 - 29 Guse K, Cerullo V, Hemminki A. Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11(5): 595-608.
 - 30 Chan WM, McFadden G. *Oncolytic poxviruses.* *Annu Rev Virol* 2014; 1(1): 119-41.
 - 31 Merchlinsky M, Eckert D, Smith E, Zauderer M. Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors. *Virology* 1997; 238(2): 444-51.
 - 32 De-Magalhaes J, Andrade A P, Sousa L, Ropert C, Ferreira P, Kroon E, *et al.* A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: Implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J Biol Chem* 2001; 276(42): 38353-60.
 - 33 Thorne SH, Hwang T-HH, O'Gorman WE, Bartlett DL, Sei S, Kanji F, *et al.* Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J Clin Invest* 2007; 117(11): 3350-8.
 - 34 Kim JH, OH JY, Park BH, Lee DE, Kim JS, Park HE, *et al.* Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol Ther* 2006; 14(3): 361-70.
 - 35 Lee JH, Roh MS, Lee YK, Kim MK, Han JY, Park BH, *et al.* Oncolytic and immunostimulatory efficacy of a targeted oncolytic poxvirus expressing human GM-CSF following intravenous administration in a rabbit tumor model. *Cancer Gene Ther* 2010; 17(2): 73-9.
 - 36 McCart JA, Puhlmann M, Lee J, Hu Y, Libutti SK, Alexander HR, *et al.* Complex interactions between the replicating oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor

- regression. *Gene Ther* 2000; 7(14): 1217-23.
- 37 Foloppe J, Kintz JN, Findeli A, Cordier P, Schlesinger Y, Hoffmann C, *et al.* Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene Ther* 2008; 15(20): 1361-71.
- 38 Zonov E, Kochneva G, Yunusova A, Grazhdantseva A, Richter V, Ryabchikova E. Features of the antitumor effect of vaccinia virus lister strain. *Viruses* 2016; doi: 10.3390/v8010020.
- 39 Chard LS, Maniati E, Wang P, Zhang Z, Gao D, Wang J, *et al.* A vaccinia virus armed with interleukin-10 is a promising therapeutic agent for treatment of murine pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 21(2): 405-16.
- 40 Li Y, Yuan S, Chu Y, Ji H, Shuang J, Tian L, *et al.* Seven major genomic deletions of vaccinia virus Tiantan strain are sufficient to decrease pathogenicity. *Antiviral Res* 2016; 129: 1-12.
- 41 Deng LL, Fan J, Guo MM, Huang B. Oncolytic and immunologic cancer therapy with GM-CSF-armed vaccinia virus of Tian Tan strain Guang 9. *Cancer Lett* 2016; 372(2): 251-7.
- 42 Mayr A, Munz E. Changes in the vaccinia virus through continuing passages in chick embryo fibroblast cultures. *Zentralbl Bakteriolog Orig* 1964; 195(1): 24-35.
- 43 Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, Stephenson J, Haas AR, Chow LQ, *et al.* Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 2011; 477(7362): 99-102.
- 44 Lauer U, Zimmermann M, Sturm J, Koppenhoefer U, Bitzer M, Malek NP, *et al.* Phase I/II clinical trial of a genetically modified and oncolytic vaccinia virus GL-ONC1 in patients with unresectable, chemotherapy-resistant peritoneal carcinomatosis (Meeting Abstracts). *J Clin Oncol* 2013; 31(15): 3098.
- 45 Zarin DA, Tse T, Williams RJ, Califf RM, Ide NC. The ClinicalTrials.gov results database—update and key issues. *New Eng J Med* 2011; 364(9): 852-60.
- 46 Breitbach CJ, Arulanandam R, De Silva N, Thorne SH, Patt R, Daneshmand M, *et al.* Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res* 2013; 73(4): 1265-75.
- 47 Heo J, Reid T, Ruo L, Breitbach CJ, Rose S, Bloomston M, *et al.* Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med* 2013; 19(3): 329-36.
- 48 Park BH, Hwang T, Liu TC, Sze DY, Kim JS, Kwon HC, *et al.* Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: A phase I trial. *Lancet Oncol* 2008; 9(6): 533-42.
- 49 Mastrangelo MJ, Maguire HC Jr, Eisenlohr LC, Laughlin CE, Monken CE, McCue PA, *et al.* Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther* 1999; 6(5): 409-22.