

DOI: 10.13376/j.cblls/2025070

文章编号: 1004-0374(2025)06-0704-13

溶瘤牛痘病毒抗肿瘤及联合治疗策略研究进展

张二帅¹, 段海潇², 李媛琳¹, 胡 翰¹, 刘滨磊^{1,2*}

(1 湖北工业大学生命科学与健康工程学院, 武汉 430068; 2 武汉滨会生物科技股份有限公司, 武汉 436030)

摘 要: 牛痘病毒 (vaccinia virus, VACV) 是具有溶瘤特性的病毒, 近年来在多种癌症治疗中展现出广阔的应用前景。尽管目前尚无 VACV 相关药物正式上市, 但多个临床前和临床研究已显示出其良好的发展潜力。然而, 干扰素 (interferon, IFN) 信号通路激活可能触发抗病毒机制, 导致 VACV 治疗在激活抗肿瘤免疫方面能力受限, 因此需要联合其他治疗方法以增强抗肿瘤效果, 包括化疗、放疗、CAR-T 疗法、免疫检查点阻断疗法和抗肿瘤免疫刺激因子等。本文阐述了 VACV 抗肿瘤作用机制及其联合治疗策略研究进展, 以期促进相关基础研究和未来的转化研究。

关键词: 牛痘病毒; 癌症治疗; 抗肿瘤免疫; 联合治疗

中图分类号: R730.5 **文献标志码:** A

Research advances in oncolytic vaccinia virus for anti-tumor and combination therapy strategies

ZHANG Er-Shuai¹, DUAN Hai-Xiao², LI Yuan-Lin¹, HU Han¹, LIU Bin-Lei^{1,2*}

(1 College of Life Science and Health Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

2 Wuhan Binhui Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 436030, China)

Abstract: Vaccinia virus (VACV) is a virus with oncolytic properties that has shown broad application prospects in the treatment of various cancers in recent years. Although no VACV-related drugs have been officially marketed yet, numerous preclinical and clinical studies have demonstrated its promising potential. However, the activation of the interferon (IFN) signaling pathway may trigger antiviral mechanisms, limiting the ability of VACV monotherapy to activate antitumor immunity. Therefore, it is necessary to explore combination therapies to enhance antitumor immune responses. These methods include chemotherapy, radiotherapy, CAR-T cell therapy, combination with immune checkpoint blockade therapy, and the use of antitumor immune stimulators. This article reviews the research advances in the anti-tumor effects, mechanisms, and combination strategies of vaccinia virus, aiming to facilitate in-depth investigations and future translational studies on VACV-based cancer therapeutics.

Key words: vaccinia virus; cancer treatment; anti-tumor immunity; combination therapy

一百多年来, 病毒被广泛应用于诱导细胞死亡或引发细胞功能障碍, 涉及代谢紊乱和宿主细胞蛋白质合成抑制等方面。20 世纪 90 年代, 研究人员提出了一个突破性假说: 能否利用病毒特异性地杀死肿瘤细胞? 这引发了对溶瘤病毒 (oncolytic virus, OV) 特异性杀伤肿瘤细胞的探索。OVs 能够选择性地感染肿瘤细胞, 通过直接裂解并引起免疫原性导致肿瘤细胞死亡。溶瘤病毒主要分为两大类: 自然存在的病毒和基因改造的病毒。自然存在的溶瘤

病毒, 如麻疹病毒 (Measles virus, MV)、新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 和呼肠孤病毒 (Reoviridae) 等, 已被广泛应用于临床前和临床研究^[1]。基因改造的溶瘤病毒, 如单纯疱疹病毒 (HSV-2) 和腺病毒 (Adenovirus, Adv), 敲除了某些

收稿日期: 2025-01-17; 修回日期: 2025-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(32270969)

*通信作者: E-mail: Liubl@hbut.edu.cn

致病基因以增强其安全性,或在病毒基因组中插入目标基因来增强其抗肿瘤免疫功能,已在多种类型的癌症(如黑色素瘤、胶质瘤等)治疗中显示出良好的效果^[2,3]。2015年,美国食品和药物管理局(FDA)批准了第一个用于治疗转移性黑色素瘤的溶瘤病毒(T-VEC)。T-VEC是一种经基因工程改造的Ⅰ型单纯疱疹病毒(HSV-1),是溶瘤病毒治疗领域的一个重要里程碑^[4]。2021年,日本也批准了世界上第一个针对恶性胶质瘤的溶瘤病毒G47Δ^[5]。而同样属于溶瘤病毒的牛痘病毒(vaccinia virus, VACV),早在1976年就被作为疫苗治疗天花。VACV已有多种产品进入临床研究,例如Pexa-Vec(JX-594)^[6-8]、GL-ONC1^[9]等,临床数据显示VACV在癌症免疫治疗中拥有良好的发展潜力。

本综述对VACV的特点和感染肿瘤细胞的机制进行阐述,总结了重组VACV在临床前和临床中的研究进展,及其联合其他疗法治疗肿瘤的研究进展,旨在使研究人员更全面地了解该领域,通过更深入的研究进一步增强重组VACV抗肿瘤的能力。

1 VACV抗肿瘤机制研究

不同溶瘤病毒载体在基因组容量、靶向性、递送方式及安全性上呈现显著差异。HSV和ADV受限于毒性或免疫原性,更适用于局部基因治疗;呼肠孤病毒通过RAS信号转导途径天然靶向肿瘤细胞,但携带外源基因能力不足;M1病毒的精准靶向性为个体化治疗提供了新方向,但机制不明制约其临床转化。与其他溶瘤病毒相比,VACV凭借其大型DNA基因组、全身递送能力和低氧适应性,成为实体瘤及转移瘤治疗的理想载体。为更清晰地展示其优势,表1总结了各溶瘤病毒载体的主要特性,为研究者提供参考。

VACV独特的生物学特性使其成为癌症免疫治疗的理想病毒平台。首先,VACV拥有一个大型的

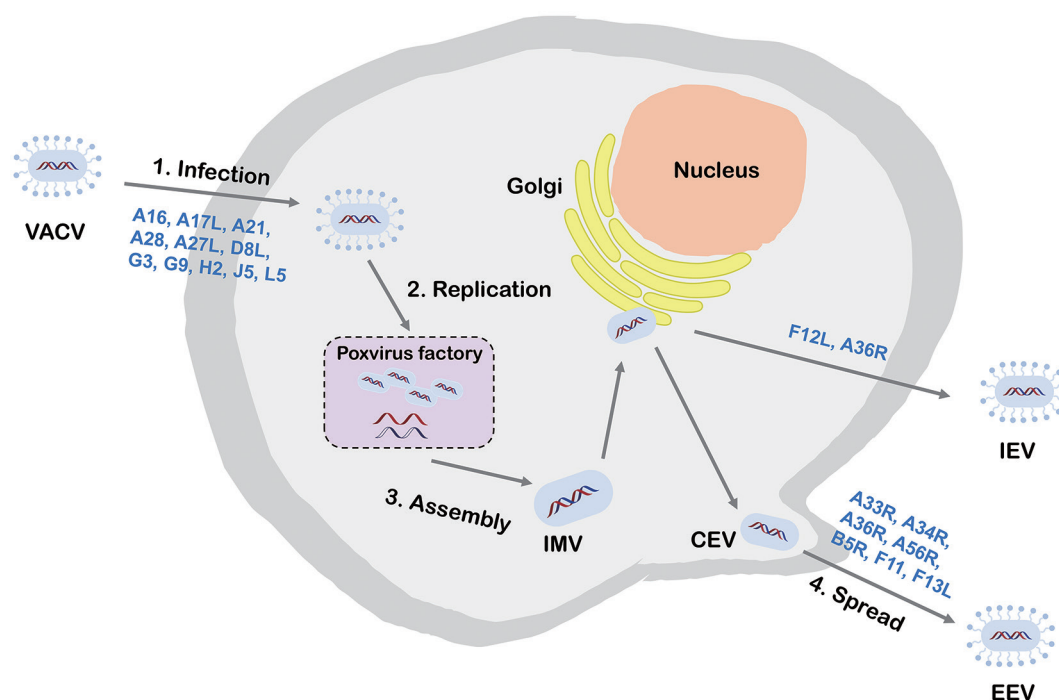
DNA基因组,能够携带较长的基因;第二,VACV在细胞质中复制,避免了其DNA整合到宿主基因组中的风险^[10];第三,VACV可以快速复制,感染后8h就可以从细胞中释放出来;第四,VACV具有特异性靶向肿瘤细胞的能力和低氧条件下无限复制的能力,可以感染大多数肿瘤细胞^[11];第五,VACV能够诱发免疫响应但不会对健康个体造成伤害,具有良好的安全性^[12];第六,VACV通过静脉注射能够安全有效地进行系统性治疗^[7];最后,VACV不仅可以在细胞间传播,还可以通过细胞外包膜病毒释放传播^[13]。VACV的传播机制还在继续探索中,图1展示了VACV的生命周期和相关的病毒蛋白。

1.1 VACV的选择性复制和裂解肿瘤细胞

与其他溶瘤病毒不同,VACV具有内在的肿瘤趋向性,其感染宿主肿瘤细胞的过程如下^[14]。首先,VACV不依赖于受体的吞噬作用进入宿主细胞。Mercer等^[15]研究表明,WR株和国际卫生部门-J(IHD-J)株的成熟病毒颗粒(mature virus, MVs)凭借暴露的磷脂酰丝氨酸,通过吞噬作用进入宿主细胞。然而,由于激活配体的细微差异,同一细胞系中可能存在不同的吞噬机制。研究结果显示,WR株的MVs通过对细胞膜皱褶的瞬时激活进入HeLa细胞。而IHD-J株的MVs则诱导了细胞触须的快速形成和延长,有助于病毒更高效地感染新的细胞。然后,VACV复制所需的DNA和蛋白质在细胞质中合成,子代病毒通过肿瘤细胞裂解释放,进一步感染周围未感染的肿瘤细胞,从而放大溶瘤活性并诱导肿瘤细胞死亡。VACV的选择性复制主要基于肿瘤细胞与正常细胞之间的差异。一方面,肿瘤细胞中各种肿瘤抑制基因(如p53、RAS和PTEN)和抗病毒信号通路(如IFN通路)显著下调,使得VACV更容易在肿瘤细胞中生存和复制^[16]。另一方面,大多数VACV的改造策略是通过敲除特定的病毒基因,如

表1 各溶瘤病毒的优缺点

病毒类型	优势	劣势
单纯疱疹病毒	可携带多个治疗基因;溶瘤效率高,首个FDA批准的溶瘤病毒(T-VEC)	潜在神经毒性风险;易被补体系统中和,需瘤内注射
腺病毒	转染效率高;基因组易于改造	易引发强烈免疫反应;缺乏肿瘤选择性,易攻击正常组织
呼肠孤病毒	通过RAS信号转导途径天然靶向肿瘤;安全性高,副作用少	外源基因携带能力有限;对非RAS依赖型肿瘤效果弱
M1病毒	特异性靶向ZAP缺陷型肿瘤;可静脉注射	作用机制未完全明确;临床数据有限,长期疗效待验证
牛痘病毒	基因组可插入多个基因;静脉注射具有全身靶向性;低氧环境下高效复制;安全性高	补体系统可能中和胞外包膜病毒(EEV);病毒稳定性有待提高



VACV是一种由八种病毒蛋白(A16、A21、A28、G3、G9、H2、J5和L5)组成的融合蛋白复合物。细胞内成熟病毒(intracellular mature virus, IMV)具有A17L、A27L和D8L, 帮助其附着在细胞膜表面。VACV的复制和子代装配发生在感染细胞的细胞质中。IMV通过微管运输到细胞外空间, 同时与细胞膜融合形成细胞相关包膜病毒(cell-associated enveloped virus, CEV)。CEV编码A33R、A34R、A36R、A56R、B5R、F11和F13L, 从而形成用于细胞间传播和远距离转移的细胞外包膜病毒(extracellular enveloped virus, EEV)。IMV还可以被高尔基复合体包裹形成细胞内包膜病毒(intracellular enveloped virus, IEV), 然后在F12L和A36R介导下运输到细胞周边。

图1 VACV的生命周期及关键病毒蛋白示意图

胸苷激酶(thymidine kinase, TK)基因等, 从而增强VACV的肿瘤靶向性^[17]。在正常细胞中, 由于特定基因如TK表达缺失, 敲除TK的VACV无法正常复制。一旦VACV基因组在正常细胞质中暴露, 环磷酸鸟苷-腺苷合酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)/干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)通路被激活, 诱导抗病毒细胞因子如I型干扰素生成, 从而抑制VACV的复制; 随后, VACV的基因组和蛋白质被DNA和蛋白质降解酶降解。而肿瘤细胞高表达TK, 使得敲除TK的VACV可以正常复制, 从而增强了其肿瘤靶向性。

1.2 破坏肿瘤血管网络

除直接溶瘤作用外, VACV还可通过破坏肿瘤血管网络间接抑制肿瘤生长。肿瘤的外围区域含有丰富的血管网络, 主要由内皮细胞组成, 影响肿瘤的生长和转移^[18]。Liu等^[19]发现, JX-594可以诱导由细胞因子和趋化因子介导的中性粒细胞在血管中的积聚, 导致血栓形成。进一步研究发现, JX-594能够特异地靶向和感染肿瘤内皮细胞(TEC),

并通过血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路介导的TK基因高表达从而有效地进行复制, 最终导致肿瘤血管崩溃。在静脉注射JX-594后, 患者肿瘤灌注减少, 同时未观察到对正常血管的临床损伤迹象^[20]。Arulanandam等^[21]研究发现, 重塑血管中的VEGF/VEGFR2信号转导也可以通过PRD1-BF1/Blimp1介导的抗病毒免疫抑制作用, 使肿瘤血管对VACV的感染更敏感。然而, Santry等^[22]认为, 尽管VACV介导的肿瘤血管崩溃有许多潜在的好处, 如白细胞单核细胞的募集, 但是关闭血管也可能限制VACV的传播, 并阻碍后续治疗药物和免疫效应细胞的进入。

1.3 激活抗肿瘤免疫应答和重塑肿瘤微环境

鉴于肿瘤抗原数量匮乏且免疫原性低下, 针对肿瘤引发高效的免疫反应颇具挑战性, 这已然成为癌症免疫治疗取得成功的重大障碍。肿瘤微环境(TME)中有多种机制促进肿瘤细胞死亡。

(1) Caspase-3和Caspase-9被激活促进细胞凋亡^[23]。Wang等^[24]构建了表达白斑凝集素的牛痘病

毒 OVV-WCL, 并在肝癌荷瘤小鼠模型中验证其疗效。流式细胞术和 Western blot 结果显示, OVV-WCL 通过上调 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达显著促进肿瘤细胞凋亡。通过 qRT-PCR 评估发现, 与对照组相比, OVV-WCL 处理的细胞中 IFN- α 和 IFN- β 的转录水平显著提高, 表明 WCL 增强了 VACV 对 IFN 的诱导作用, 从而进一步促进 IFN 的表达, 并抑制体内肿瘤的生长。

(2) 自噬基因和自杀基因的表达促进肿瘤细胞死亡。Lei 等^[25]开发了一种表达自噬基因 Beclin-1 的 VACV (命名为 OVV-BECN1)。OVV-BECN1 感染细胞后表达 Beclin-1 并激活下游信号分子, 导致自噬体形成并诱导自噬性细胞死亡。在白血病和多发性骨髓瘤模型中具有良好的治疗效果。此外, 一种表达 FCU-1 自杀基因的 VACV TG6002 可催化 5-氟胞嘧啶 (5-fluorocytosine, 5-FC) 转化为 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU), 在与外部 5-FC 联合使用时展现出显著的抗肿瘤活性^[26]。

(3) 在免疫抑制性肿瘤微环境中, 抑制性细胞因子表达增加阻碍了抗肿瘤免疫反应, 并削弱了免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 在临床中的疗效^[27]。因此, 表达 ICIs 的 VACV 或许能够增强肿瘤免疫原性以逆转肿瘤微环境中的免疫抑制信号。Zuo 等^[28]成功构建了编码抗 TIGIT 可变片段的 VACV (命名为 VV- α -TIGIT), 显著增强了免疫反应。在小鼠模型中, VV- α -TIGIT 展现出了有效的抗肿瘤免疫反应和长期疗效, 通过招募免疫细胞并激活肿瘤浸润的 CD8⁺ T 细胞来改变肿瘤微环境。这些研究结果表明, VACV 作为一种极具前景的载体, 具备将“冷”肿瘤 (通常缺乏 T 细胞肿瘤浸润) 转化为“热”肿瘤 (具有大量肿瘤浸润 T 细胞) 的潜力^[29]。

2 VACV临床前和临床研究进展及挑战

2.1 VACV的临床前进展

未经改造的 VACV 对肿瘤具有较好的杀伤效果, 但其不良反应, 如肝炎和致命性神经脑炎, 使其在临床上的应用受到了限制^[30]。为了提高临床治疗的效果, 研究者们对病毒基因进行了修饰: 一方面通过基因编辑增强目的基因的表达以及对肿瘤细胞的特异性; 另一方面通过基因敲除使其毒性减弱, 并降低其免疫原性, 从而提升治疗的安全性。目前用于溶瘤性用途的病毒载体主要包括 Wyeth^[6]、Western reserve (WR)^[31]、Lister^[32]、Copenhagen^[26]、

New York City Board of Health (NYCBH)^[33] 和 Tian tan (TTV)^[34] 等。在这些改造中, TK 是最常被敲除的基因之一。经 TK 敲除改造的病毒可特异性感染肿瘤细胞, 作为基因治疗载体递送外源基因, 降低病毒治疗的毒副作用^[35]。VACV 是一种含有宿主来源外膜和 B5R 蛋白的胞外包膜病毒 (EEV), 可以被补体系统识别并导致 EEV 中和^[36]。在 B5R 基因中敲除部分短且一致性重复序列可以促进中和逃逸, 但是不影响 VACV 的溶瘤效力, 使 VACV 能抵抗免疫清除并改善治疗效果。

随着对肿瘤组织中免疫调节机制了解的不不断增加, 新的改造方法随之而来。一些免疫刺激基因被插入到 VACV 的基因组中, 放大了 VACV 的抗肿瘤免疫。这些抗肿瘤免疫刺激因子包括细胞因子、趋化因子、共刺激因子等^[37]。表 2 对近年来 VACV 改造的临床前进展进行了汇总。

表 2 主要是对 VACV 治疗实体瘤的临床前研究进行汇总, 但也有少数治疗血液肿瘤的研究。近年来 VACV 在血液肿瘤治疗领域展现出独特潜力, 其在细胞质内复制的特性及天然免疫逃逸能力, 使其成为靶向恶性血液肿瘤的新工具。例如, 携带 CD19 抗体的 OVV-CD19BiTE 在 B 细胞淋巴瘤模型中诱导肿瘤浸润 T 细胞富集, OVV-CD19BiTE 治疗组的小鼠平均肿瘤体积为 64.3 mm³; 而相比之下, PBS 组和空载 OVV 组的平均肿瘤体积分别为 3 200.3 mm³ 和 967.2 mm³。这些数据显示, 表达 CD19/CD3 双特异性抗体的 OVV-CD19BiTE 对 B 细胞淋巴瘤有良好的治疗效果。

2.2 VACV的临床研究进展

目前, 研究者们主要通过研究减毒的 VACV 和免疫激活来开发 VACV 临床应用。GLV-1h68 从 LIVP 毒株衍生而来, 通过将 RUC-GFP (荧光素酶与绿色荧光蛋白的融合基因)、LacZ (β -半乳糖苷酶) 和 gusA (β -葡萄糖醛酸酶) 插入到 F14.5L (位于 F14L 与 F15L 之间)、胸苷激酶和血凝素基因位点处^[48], 破坏一些常规基因和插入外源基因来降低病毒活性, 同时增强其靶向肿瘤的能力。病毒 GLV-1h68 在临床用药中被命名为 Olvi-Vec。2023 年的一项关于 Olvi-Vec 治疗恶性胸膜间皮瘤的临床研究结果显示, 在恶性胸膜间皮瘤患者中, 治疗后的中位生存期为 22 个月^[49]。基因表达分析显示, 免疫细胞群 (CD8⁺、CD45⁺、Th1⁺、Tregs、NK 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞和细胞毒性细胞) 的数量以及效应蛋白、免疫检查点蛋白和细胞因子

的浓度都有所增加，表明了通过刺激免疫激活来治疗肿瘤的安全性和可行性。但是，其主要目标最大耐受剂量并未显现出来，且在有效性方面还需进一步的研究来验证。表3是 VACV 治疗癌症的临床研究汇总。

本文对比了不同毒株种类的 VACV 在癌症免疫治疗中的临床研究，发现它们在疗效、生存期和不良反应等方面各有特点。Pexa-Vec 治疗肝癌的临床研究显示，Pexa-Vec 高剂量组与低剂量组的中位生存期分别为 14.7 个月和 6.7 个月 ($n = 29$, $P =$

0.020)，有良好的剂量依赖性，在肿瘤部位检测到了粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 的表达和病毒的有效复制^[61]。然而在 II 期临床试验中，该疗法未能达到预设的总体生存期主要终点，BioMedTracker 数据库评估其获批概率仅为 8%，低于平均水平。到目前为止，针对晚期肝癌的 Phase III 临床试验并未满足临床预期，试验终止，这意味着可能单一给药有一定的局限性，治疗并未达到理想预期，还需寻找其他治疗方案。Olvi-Vec 联合铂

表2 VACV临床前研究汇总

毒株种类	病毒名称	改造方式	癌肿	给药
Tian tan	VG9-IL-24	IL-24	肝癌	i.t. ^[38]
IHD-W	KLS-3020	PH-20、IL-12、Spd1-Fc	结肠癌	i.t. ^[39]
Lister	LIVP-IL-15-RFP	IL-15	乳腺癌	i.t. ^[32]
	LIVP-IL15Ra-RFP	IL-15ra		
Copenhagen	VV-iIL-12Mcltx	CLTX、IL-12	结肠癌/卵巢癌	i.t. ^[40]
	LIVP-FlaB-RFP	FlaB-RFP	黑色素瘤	
Lister	LIVP-Fluc-RFP	Fluc-RFP	结肠癌	i.v. ^[41]
	LIVP-RFP	RFP	乳腺癌	
Wyeth	SJ-607	CD55、GM-CSF	结肠癌	i.v. ^[42]
Tian tan	SNV1	载入同种异体的脂肪干细胞	结肠癌	i.t. ^[43]
Tian tan	VG9/(SST-14) ₂ -HAS	(SST-14) ₂ -HAS	骨肉瘤	i.t. ^[44]
Western Reverse	OVV-GPX4	GPX4	胰腺癌	i.t. ^[45]
	OVV-CD19BiTE	CD19BiTEs	B细胞淋巴瘤	i.p. ^[46]
	OVV-BECN1	Beclin-1	血癌	i.p. ^[25]
	BCMA-TEA-VVNEV	BCMA	多发性骨髓瘤	i.p. ^[47]

注：i.t.，鞘内注射；i.v.，静脉注射；i.p.，腹腔注射。

表3 VACV临床研究汇总

毒株种类	病毒名称	缺失基因	插入基因	癌肿	治疗方案	阶段	临床试验登记号
Wyeth	Pexa-Vec/JX-594	TK	GM-CSF	软组织肉瘤	Avelumab、cyclophosphamide	II	NCT02630368 ^[50]
				结直肠癌	anti-PD1、anti-CTLA-4	I/II	NCT03206073 ^[51]
				结直肠癌	单一疗法	II	NCT01469611 ^[52]
				神经母细胞瘤	单一疗法	I	NCT01169584 ^[53]
				肝癌	单一疗法	II	NCT01387555 ^[54]
				晚期实体瘤	anti-CTLA-4	I	NCT02977156 ^[55]
				原发或继发性肝癌	单一疗法	I	NCT00629759 ^[6]
Lister	GL-onc1 (Olvi-Vec)	TK	Luc-GFP	卵巢癌	化疗或贝伐珠单抗	II	NCT02759588 ^[56]
		F145L	β -glucuronidase	头颈癌	单一疗法	I	NCT01584284 ^[57]
		HA	β -galactosidase	腹膜癌	单一疗法	I	NCT01443260 ^[9]
MVM	TG4023		FCU1	原发或继发性肝癌	单一疗法	I	NCT00978107 ^[58]
	TG4010		MUC1、IL-2	非小细胞肺癌	一线化疗	III	NCT01383148 ^[59]
						(终止)	
	RGV004		CD19BiTEs	B细胞淋巴瘤	单一治疗	I	NCT04887025 ^[60]

类化疗对铂类耐药或铂类难治性卵巢癌有较好的疾病控制和生存获益，但免疫反应有待进一步量化；TG4010 联合化疗在晚期非小细胞肺癌特定人群中能显著改善生存期和疗效，安全性可控（表 4）。这些研究都为癌症治疗提供了新的思路 and 方向。

3 VACV联合疗法抗肿瘤进展

OVs 能够选择性地杀死肿瘤细胞，激活抗肿瘤免疫反应，改善肿瘤微环境。然而，基于 VACV 的单药治疗在激活抗肿瘤免疫方面的能力是有限的，这可能是由 IFN 信号通路激活引发的抗病毒机制和恶性细胞的高度异质性造成的。本节对协同疗法增强抗肿瘤免疫反应的策略进行了总结。

3.1 表达抗肿瘤免疫刺激因子

多种 VACV 通过敲除 TK 基因减弱了病毒毒性，并增强了对肿瘤细胞的选择性^[62]。研究人员进一步发现，将外源基因插入到 VACV 中可以增强其抗肿瘤免疫。

GM-CSF 在 VACV 的改造中是使用最广泛的细胞因子。GM-CSF 通过招募单核细胞中的树突状细胞和自然杀伤细胞，促进树突状细胞的成熟，进一步激活抗肿瘤免疫^[63]。IL-15 是一种多效性细胞因子，其在 T 细胞、自然杀伤细胞和自然杀伤 T 细胞的发育活化和存活中起重要作用。Shakiba 等^[32]通过将 IL-15 和其受体亚单位 α 基因分别插入到 VACV 中构建 LIVP-IL15-RFP 和 LIVP-IL15R α -RFP，治疗乳腺癌荷瘤小鼠模型后发现，与两种病毒单独给药组相比，LIVP-IL15-RFP 和 LIVP-IL15R α -RFP 联合组的小鼠肿瘤体积显著减小 ($P < 0.05$)，表明 IL-15 与 IL-15R α 的协同作用对疗效至关重要。肿瘤治疗 7 d 后分析瘤内淋巴细胞浸润发现，联合治

疗组中 CD8⁺ T 细胞比例为 12.5%，对照组为 2.1% ($P < 0.01$)；联合治疗组中 F4/80⁺ 细胞比例为 18.2%，对照组为 4.5% ($P < 0.01$)。检测小鼠血清和肿瘤样本细胞因子水平发现，促炎因子 (IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF) 水平显著上调，肿瘤组织中趋化因子 CXCL9 和 CXCL10 表达增强，表明免疫细胞招募与活化显著提升。LIVP-IL15-RFP 与 LIVP-IL15R α -RFP 联合显著激活抗肿瘤免疫，诱导肿瘤坏死，未来可进一步优化病毒载体，探索人源化模型中的疗效验证，为联合免疫治疗提供了新策略。

IL-12 促进 T 细胞分化为细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTLs)，并增强其抗肿瘤活性。携带 IL-12 的 VACV 可以将“冷”肿瘤转变为“热”肿瘤，从而在不引起全身毒性和细胞因子释放综合征的情况下增强免疫反应^[64]。Nakao 等^[65]构建编码 IL-7 和 IL-12 的重组 VACV hIL-7-VV 和 mIL-12-VV，对多种肿瘤模型 (包括 B16-F10、CT26.WT 及 LLC) 进行治疗，结果显示，hIL-7-VV 和 mIL-12-VV 单独给药显著增强肿瘤内 CD8⁺ T 细胞、NK 细胞浸润；免疫组化分析结果表明，IL-7 通过维持 T 细胞稳态促进扩增，而 IL-12 驱动 IFN- γ 分泌及抗原提呈，二者协同上调 T 细胞功能基因表达。该研究首次通过 VACV 局部递送 IL-7/IL-12 调节肿瘤微环境，为联合免疫治疗提供了新策略。

趋化因子主要介导免疫细胞迁移。CCL2、CCL5、CCL21、CCL22、CXCL10、CXCL11 和 CLL19 等趋化因子已被用于构建重组 VACV，使重组 VACV 通过表达趋化因子招募免疫细胞到肿瘤部位。不同的免疫细胞亚群响应趋化因子的刺激迁移到 TME 中，影响抗肿瘤免疫反应^[66]。Moon 等^[67]建立小鼠肺癌模型，并构建表达 CXCL11 的重组 VACV

表4 不同VACV在癌症免疫治疗中的临床表现

病毒	癌症类型	疗效	患者生存期	免疫相关不良反应
JX-594	晚期肝癌	对于多发性肿瘤患者(19例)，高剂量组的生存优势更明显 (风险比HR=0.19, $P=0.018$)	高剂量组中位OS: 14.1个月；低剂量组中位OS: 6.7个月	短暂发热、流感样症状；无严重不良事件
Olvi-Vec	卵巢癌	ORR: 54%；86%患者肿瘤缩小	中位PFS: 11.0个月；中位OS: 15.7个月；6个月PFS率: 77%	常见: 发热(63%)、腹痛(51.9%)、恶心(48.1%)；3级: 发热(3.7%)、腹痛(7.4%)；无4级事件或治疗相关死亡
TG4010	非小细胞肺癌	ORR: 40%	中位OS: 12.7个月	注射部位反应(33%, 1~2级)；严重中性粒细胞减少(3级26%, 4级12%)；无TG4010直接相关的3~4级事件

注：OS，总生存期；ORR，客观缓解率；PFS，无进展生存期。

VV.CXCL11, 通过肿瘤静脉给药发现, VV.CXCL11 和 VV.Luc 组肿瘤体积显著小于对照组 ($P < 0.05$), 但是彼此之间没有差异性; 随后通过流式细胞术对肿瘤内 T 细胞进行分析, 结果显示 VV.CXCL11 显著增加了瘤内 $CD8^+$ T 细胞的浸润。Francis 等^[68] 建立小鼠结直肠癌模型, 并构建表达 CXCL11 的重组 VACV vvDD-CXCL11, 其治疗结果和流式细胞术结果分析与 Moon 等^[67] 一致。对上述结果进行分析发现, CXCL11 成功招募了 $CD8^+$ T 细胞但不足以控制肿瘤进展, 可能是因为 TME 中存在其他免疫抑制因子。随后, Francis 等^[68] 将 vvDD-CXCL11 联合 IFN- α 、poly I:C 和 COX-2 抑制剂组成的药物混合物, 对小鼠模型进行治疗并对生存期进行分析, 发现联合组中位生存期 >115 d, 显著优于单药组 ($P < 0.001$); 对细胞因子进行分析发现, 该混合物促进 CCL5 和 CXCL10 的生成, 同时减少 CCL22 的生成, 证明可以促进辅助 T 细胞和 CTLs 向 TME 中迁移, 并改善生存率。在其他临床前研究中, 表达趋化因子的溶瘤病毒也显示出了治疗效果^[69]。这些研究表明, 表达趋化因子的 VACV 可以有效、高效地促进 T 细胞对肿瘤的浸润。

总之, 将抗肿瘤免疫刺激因子基因在 VACV 中表达, 可以通过调节 TME 进一步促进抗肿瘤作用。

3.2 联合免疫检查点阻断疗法

免疫检查点可以调节免疫系统。许多肿瘤通过刺激免疫检查点生成免疫抑制性的 TME, 从而逃避宿主免疫系统的攻击。免疫检查点抑制剂 ICIs 可通过抑制肿瘤免疫抑制信号通路, 使癌细胞暴露于宿主免疫系统^[70]。研究表明, 已鉴定出的抑制性检查点分子包括 CTLA-4、PD-1、CD80/60、MHC II、Galectin-3、FGL1、CD112、CD155、HVEM、CD47-SIRP α 和 Ceacam-1, 被统称为干扰素信号刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs)^[71-74]。尽管 ICIs 在癌症治疗中具有潜力, 但单一疗法往往效果有限。联合使用 VACV 和 ICIs 已成为提高治疗效果的常见策略, 该组合疗法既能改善肿瘤免疫抑制环境, 又能通过 VACV 感染触发抗肿瘤免疫反应^[75-77]。目前, 已开发出针对不同检查点分子的多种 ICIs, 例如 CTLA-4 抑制剂 (如 ipilimumab)、PD-1 抑制剂 (如 nivolumab 和 pembrolizumab) 以及 LAG-3 抑制剂 (如 MEDI3039), 这些药物通过阻断 T 细胞表面的相应蛋白活性来发挥作用^[78]。

联合免疫检查点阻断疗法有以下两种。一是直接和抑制剂联合用药。Park 等^[79] 建立了小鼠自发

转移性肾细胞癌 (mRCC) 模型。在早期 mRCC 模型中, JX-594 和 PD-1 联合组的原发肿瘤平均质量为 0.71 g, 显著低于 PD-1 和 CTLA-4 联合组 (0.98 g) ($P < 0.05$); 流式细胞术分析显示, JX-594 和 PD-1 联合组瘤内 $CD8^+$ T 细胞分布约为 PD-1 和 CTLA-4 联合组的 1.9 倍; JX-594 和 PD-1 联合调节了肿瘤微环境, 有效减轻了原发性肿瘤和转移性肿瘤负担, 实现了协同抗肿瘤效应。

二是设计表达抗免疫检查点基因的 VACV。Zuo 等^[28] 在 VACV 中表达抗 TIGIT 可变片段, 发现其能有效诱导抗肿瘤免疫, 并在与 PD-1 或 LAG-3 抑制剂联合治疗时, 将肿瘤微环境从“冷”状态重塑为“热”状态, 实现协同作用。CD47 通过与信号调节蛋白 α (signal-regulatory protein α , SIRP α) 结合发挥促进免疫逃避的作用, 从而诱导抑制性信号通路, 使肿瘤细胞能够逃避巨噬细胞的吞噬作用。Li 等^[80] 构建了编码抗 CD47 抗体的 VACV OVV- α CD47nb, 用于治疗 4T1 和 CT26 荷瘤小鼠模型, 结果发现: OVV- α CD47nb 组的治疗效果优于 OVV 组, 两组之间差异显著 ($P < 0.01$); 流式细胞术检测显示, OVV- α CD47nb 组肿瘤内 $CD3^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞浸润显著增加, 同时显著促进了 CD45 蛋白的表达。Azar 等^[81] 构建了编码 hIL-12 和 CTLA-4 抗体的 VACVmTG6050, 治疗 CT26 和 EMT6 小鼠肿瘤模型后发现, 瘤内注射 mTG6050 ($1E+07$ PFU) 组有 60% 的小鼠肿瘤完全消退; 流式细胞术检测显示, mTG6050 促进了 $CD8^+$ T 细胞浸润, 同时调节性 T 细胞比例显著下降; 3' RNA 测序分析显示, mTG6050 显著上调 $CD8^+$ T 细胞、NK 细胞及 IFN- γ 通路相关基因的转录。mTG6050 实现了 IL-12 与抗 CTLA-4 的瘤内协同表达, 重塑了免疫微环境并激活了系统性抗肿瘤免疫, 为联合免疫检查点阻断疗法奠定了坚实基础。

Shi 等^[82] 构建了编码抗人 PD-1 抗体和抗人 4-1BB 抗体的 VACV Δ TK-Armed-VACV, 治疗乳腺癌荷瘤小鼠模型后发现, 虽然 Δ TK-Armed-VACV 组小鼠平均肿瘤体积较 PBS 对照组有显著性差异, 但 Δ TK-Armed-VACV 组和 WT 空载组无差异性, 推测可能抗人 PD-1 抗体无法靶向小鼠 PD-1 和 4-1BB。随后采集荷瘤小鼠外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 分离 T 淋巴细胞, 通过细胞毒性实验评估 CTLs 的抗乳腺癌活性, 结果显示: 在效应-靶细胞比 (ETR) 为 100:1 时, Δ TK-Armed-VACV 组的细胞毒性达 45.92%, 显著高于 WT 组

(0.77%)。ΔTK-Armed-VACV 通过溶瘤作用与双抗体表达, 展现了显著的肿瘤靶向杀伤和免疫激活潜力。尽管受限于种属特异性, 其安全性设计和局部免疫调节机制仍为后续临床开发奠定了基础, 尤其是在联合治疗和精准递送策略方面具有广阔前景。在 VACV 中共表达抗免疫检查点基因和免疫刺激因子表现出了协同抗肿瘤效果。如表达 PD-L1 抑制剂和 GM-CSF 的 VACV 通过病毒复制、GM-CSF 刺激以及 PD-L1 抑制剂对肿瘤细胞和免疫细胞的协同作用, 激活了针对肿瘤新抗原的特异性 T 细胞免疫反应^[83]。

无论是联合用药还是通过重组构建表达抗检查点的 VACV, 均在重塑 TME, 协同促进抗肿瘤免疫反应。

3.3 联合双特异性抗体

双特异性抗体 (bispecific antibody, BsAb) 可同时靶向两种不同抗原。在肿瘤治疗领域, BsAb 通过“桥接作用”将效应 T 细胞与肿瘤细胞连接, 突破传统单抗单一靶向的局限性^[84]。双特异性 T 细胞衔接器 (bispecific T cell engager, BiTE) 是一种新型免疫治疗蛋白, 由两个不同的单链可变片段 (scFv) 组成, 其通过桥接细胞毒性 T 细胞与肿瘤细胞, 诱导 T 细胞活化并特异性裂解肿瘤细胞; 其介导的细胞因子瞬时释放还可募集其他免疫细胞, 进而放大抗肿瘤免疫应答。Wei 等^[85] 构建表达 EpCAM BiTE 的重组 VACV VV-EpCAM BiTE, 并治疗乳腺癌荷瘤小鼠。结果显示, VV-EpCAM BiTE 组小鼠的肿瘤生长缓慢, 与 VV-Ctrl 组具有显著性差异。通过流式细胞术对小鼠肿瘤细胞进行检测发现, 与 VV-Ctrl 组相比, VV-EpCAM BiTE 组 CD45⁺、CD3⁺ 和 CD8⁺ T 细胞浸润显著增加; 同时, VV-EpCAM BiTE 组 CD8⁺ T 细胞的耗竭减少。通过编码表达 BiTE 的 VACV 可以诱导 T 细胞活化, 增强对肿瘤的治疗效果, 为实体瘤治疗提供了新的策略。

3.4 联合 CAR-T 细胞疗法

CAR-T 细胞疗法通过将抗原受体和 T 细胞结合在一起, 构建一种特异的抗肿瘤机制, 借此实现对肿瘤的精准打击, 获得良好的治疗效果。目前, 靶向 CD19-CAR 的产品 (Tisagenlecleucel) 被批准用于治疗难治性和复发性急性淋巴细胞白血病^[86]。然而, 由于实体瘤表面特异性肿瘤抗原具有多样性且表达不均一, CAR-T 细胞在实体瘤的治疗中受到限制。

为了增强 CAR-T 细胞的靶向性, Park 等^[87] 构

建了一种 VACV OV19t, 使其表达一种截短的 CD19 (CD19t) 蛋白, 增强 CAR-T 细胞靶向肿瘤的能力。OV19t 与 CD19-CAR T 细胞联合治疗人乳腺癌小鼠模型发现, 联合疗法显著抑制肿瘤生长 ($P < 0.01$), 肿瘤体积较 PBS 对照组减小 80%。在结直肠癌荷瘤小鼠模型中, 联合治疗组小鼠肿瘤完全缓解率 (CR) 达到 60%, 显著高于 OV19t 单治疗组 (22%)。流式细胞术检测发现, 联合组显著增强肿瘤内 CD25⁺ T 细胞浸润, 比例达 45%, 而 OV19t 组仅为 15%; 对荷瘤小鼠血清中的细胞因子进行分析发现, 联合组 IFN- γ 、TNF- α 和 GM-CSF 均显著升高。以上结果证实了 VACV 和 CAR-T 细胞联合疗法的治疗潜力。

3.5 VACV 和化疗

化疗药物作为细胞毒性剂, 主要通过抑制 DNA 复制或破坏微管结构来发挥作用^[88]。研究显示, 顺铂或吉西他滨与 VACV GLV-1h68 联合使用, 可以通过影响细胞凋亡、核苷酸池和 DNA 修复途径显著增强抗肿瘤疗效^[89]。在一项 II 期铂类耐药或铂类难治性卵巢癌临床试验中, VACV (Olvi-Vec) 与铂类化疗联合使用, 在患者中表现出良好的客观缓解率 (ORR) 和无进展生存期 (PFS), 且安全性是可控的, 目前正在进行 III 期临床试验的招募工作 (NCT05281471)^[56, 90]。此外, 环磷酰胺 (cyclophosphamide, CPA) 通过暂时抑制抗病毒免疫反应增强了 VACV 的复制。在另一项研究中发现, CPA 与 GLV-1h68 联合使用增强抗肿瘤效力的主要原因是对血管系统的影响, 而非其免疫抑制作用^[91, 92]。Huang 等^[93] 首次揭示了 VACV 可以通过诱导多种细胞因子的释放 (包括 I 型 IFN 和 HMGB1) 使肿瘤细胞对化疗药物 (例如抗微管药物紫杉醇) 更加敏感。其他一些化疗药物 (如阿霉素) 可能通过协同激活 ICD 介导的抗肿瘤免疫来促进 VACV 的抗肿瘤效果^[94]。

另一种增强 VACV 与化疗协同抗肿瘤效果的方法是将前药激活基因导入 VACV 中, 减少系统性毒性。Seubert 等^[95] 发现, 编码 β -半乳糖苷酶的 VACV GLV-1h68 与 β -半乳糖苷酶可激活的前药联合使用时, 溶瘤效果显著增强。GLV-1h94 编码的超级胞嘧啶脱氨酶 (super cytidine deaminase, SCD) 通过仅在感染 VACV 的肿瘤细胞中将前药 5-FC 转化为化疗药物 5-FU, 提高了肿瘤细胞对化疗药物 5-FU 的特异敏感性^[96]。添加 5-FC 使 85% 的细胞系对联合治疗高度敏感, 且没有细胞系表现出“高度耐药”模式。然而, 转化后的 5-FU 会减少 GLV-

1h94 在肿瘤细胞中的复制。因此,研究时应考虑细胞系对 GLV-1h94 诱导的溶瘤作用和对 5-FU 敏感性的特异性平衡。以上研究结果凸显了化疗药物与 VACV 联合使用在肿瘤治疗中的潜力。

3.6 VACV和放疗

放射疗法是指通过高能辐射(如 X 射线、 γ 射线、质子或重离子)来诱导肿瘤细胞衰老,限制其生长,或杀死肿瘤细胞。但是,VACV 与放射疗法联用治疗肿瘤的结果大不相同。有研究发现,对肿瘤组织进行局部照射可促进 VACV 的全身递送^[97],而编码碘/钠共转运蛋白(sodium/iodide symporter, NIS)的 VACV 可以将放射性碘转移到被病毒感染的肿瘤细胞中,在胰腺癌和乳腺癌中增强放射治疗的抗肿瘤效果^[98]。但是,放射治疗会诱导肿瘤细胞衰老,而衰老细胞和 VACV 之间的作用具有复杂性。在胶质母细胞瘤中的研究发现,与未辐射组相比,VACV 对辐射组的衰老肿瘤细胞表现出减弱的溶瘤活性^[99]。目前尚不清楚 VACV 是如何与辐射后的衰老细胞相互作用的,因此基于 VACV 与放射疗法的联合治疗还有待进一步研究。

4 VACV的递送途径

目前为止,大多数 VACV 的治疗都是瘤内给药。瘤内给药只适用于固定位置的肿瘤,对于转移性的肿瘤和需要全身给药的癌症适用度不高。在临床研究中,VACV 静脉注射治疗显示出了良好的安全性,但是其抗肿瘤效果似乎并不明显。

Zhou 等^[100]在一项研究中发现,中性粒细胞和外周血中存在的各种免疫细胞亚群(如单核细胞、T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞等)会吞噬和降解 VACV,其中中性粒细胞的降解能力更强。CAL-101 是一种已经过临床批准的用于治疗慢性 B 细胞性肿瘤的药物,是 PI3K δ (PI3 激酶 δ 亚型)的抑制剂,已被证实可以抑制巨噬细胞对 VACV 的黏附,增强抗肿瘤效果^[101]。此外,CAL-101 还显示出了抑制中性粒细胞吞噬作用的能力。因此,Zhou 等^[100]采用了先口服 CAL-101,然后静脉注射 VACV 的治疗方式。结果表明,联合组的治疗效果优于 VV 组,两组之间差异显著($P < 0.05$);研究还发现,CAL-101 有效抑制了中性粒细胞 PI3K δ 的下游靶点 AKT 的磷酸化,从而加强了 VACV 的抗肿瘤效果。Lee 等^[42]建立了人结直肠癌小鼠肿瘤模型,并构建表达人 CD55 蛋白的 VACV SJ-607,治疗后发现 SJ-607 组的平均肿瘤体积较 JX-594 组显著减小($P < 0.01$)。

结合其在体外验证 SJ-607 稳定性的实验,在 50% 人血清条件下,SJ-607 病毒存活率达 70.4%,而 JX-594 仅 25.1% ($P < 0.05$),说明表达 CD55 的 SJ-607 有效防止了补体介导的攻击,提高了静脉注射的效力。以上研究结果表明,改善 VACV 的递送环境可以提高静脉注射的抗肿瘤效果。

5 总结与展望

本文对 VACV 的特性、抗肿瘤免疫机制、临床前研究和临床试验中的最新进展,以及其与其他疗法联合使用的研究成果展开了论述。随着对 VACV 基因功能和抗肿瘤机制的不断深入研究,研究人员已经构建了多种具有不同功能的 VACV。这些改造后的 VACV 在临床前和临床研究中均显示出良好的安全性和有效性。然而,VACV 在临床应用中仍然存在挑战。JX-594 针对晚期肝癌的临床 III 期试验失败终止,以及临床前 VACV 和放疗联合治疗的不确定性,都提醒我们要选择合适的联合治疗方案。VACV 可以通过静脉注射来进行全身治疗,这是其一大特性。在进行静脉注射时对中性粒细胞和其他免疫细胞亚群进行抑制,保证 VACV 不会被降解和吞噬,同时又不损伤免疫细胞,使两者达到一种平衡,将对静脉注射治疗有很大的帮助。VACV 作为一种高效的肿瘤治疗工具,展现出了显著的治疗潜力和广泛的应用前景。尽管相关研究仍处于不断进展之中,但已有的实验结果表明,VACV 不仅能够特异性地靶向肿瘤细胞,还能通过刺激宿主免疫系统增强抗肿瘤免疫反应。未来的研究可以从以下方向进行突破。(1) 创新 VACV 联合治疗策略(如 mRNA 疫苗)。(2) 改进递送系统:开发纳米载体或细胞包裹技术,保护 VACV 免受补体中和,同时实现靶向递送。(3) AI 辅助治疗:通过 AI 学习预测患者对 VACV 的响应,优化治疗方案。(4) 深度解析机制:明确 VACV 与放疗的相互作用机制,解决联合治疗中病毒复制受抑制的难题。相信随着技术的不断进步和对其机制理解的加深,VACV 将在肿瘤治疗中发挥越来越重要的作用,成为理想的治疗选择之一。

[参 考 文 献]

- [1] Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 642-62
- [2] Jin J, Wang R, Yang J, et al. Bispecific antibody expressed by an oncolytic herpes simplex virus type 2 can transform

- heterologous T cells into uniform tumor killer cells. *Hum Gene Ther*, 2022, 33: 649-63
- [3] Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 658-70
- [4] Poh A. First oncolytic viral therapy for melanoma. *Cancer Discov*, 2016, 6: 6
- [5] Todo T, Ito H, Ino Y, et al. Intratumoral oncolytic herpes virus G47Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial. *Nat Med*, 2022, 28: 1630-9
- [6] 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. *Lancet Oncol*, 2008, 9: 533-42
- [7] Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, et al. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature*, 2011, 477: 99-102
- [8] Mastrangelo MJ, Maguire HC Jr, Eisenlohr LC, et al. Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther*, 1999, 6: 409-22
- [9] Lauer UM, Schell M, Beil J, et al. Phase I study of oncolytic vaccinia virus GL-ONC1 in patients with peritoneal carcinomatosis. *Clin Cancer Res*, 2018, 24: 4388-98
- [10] Greseth MD, Czarnecki MW, Bluma MS, et al. Isolation and characterization of vΔI3 confirm that vaccinia virus SSB plays an essential role in viral replication. *J Virol*, 2018, 92: e01719-17
- [11] Hiley CT, Yuan M, Lemoine NR, et al. Lister strain vaccinia virus, a potential therapeutic vector targeting hypoxic tumours. *Gene Ther*, 2010, 17: 281-7
- [12] Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, et al. Human effector and memory CD8⁺ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity*, 2008, 28: 710-22
- [13] Doceul V, Hollinshead M, van der Linden L, et al. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science*, 2010, 327: 873-6
- [14] Greseth MD, Traktman P. The life cycle of the vaccinia virus genome. *Annu Rev Virol*, 2022, 9: 239-59
- [15] Mercer J, Knébel S, Schmidt FI, et al. Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 9346-51
- [16] de Queiroz NMGP, Xia T, Konno H, et al. Ovarian cancer cells commonly exhibit defective STING signaling which affects sensitivity to viral oncolysis. *Mol Cancer Res*, 2019, 17: 974-86
- [17] Puhlmann M, Brown CK, Gnant M, et al. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7: 66-73
- [18] Nasri D, Manwar R, Kaushik A, et al. Photoacoustic imaging for investigating tumor hypoxia: a strategic assessment. *Theranostics*, 2023, 13: 3346-67
- [19] 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. *Mol Ther*, 2008, 16: 1637-42
- [20] Breitbach CJ, Arulanandam R, De Silva N, et al. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res*, 2013, 73: 1265-75
- [21] Arulanandam R, Batenchuk C, Angarita FA, et al. VEGF-mediated induction of PRD1-BF1/Blimp1 expression sensitizes tumor vasculature to oncolytic virus infection. *Cancer Cell*, 2015, 28: 210-24
- [22] Santry LA, van Vloten JP, Knapp JP, et al. Tumour vasculature: friend or foe of oncolytic viruses? *Cytokine Growth Factor Rev*, 2020, 56: 69-82
- [23] Ning X, Wang Y, Jing M, et al. Apoptotic caspases suppress type I interferon production via the cleavage of cGAS, MAVS, and IRF3. *Mol Cell*, 2019, 74: 19-31
- [24] Wang X, Zhou N, Liu T, et al. Oncolytic vaccinia virus expressing white-spotted charr lectin regulates antiviral response in tumor cells and inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Mar Drugs*, 2021, 19: 292
- [25] Lei W, Wang S, Xu N, et al. Enhancing therapeutic efficacy of oncolytic vaccinia virus armed with Beclin-1, an autophagic gene in leukemia and myeloma. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 110030
- [26] Foloppe J, Kempf J, Futin N, et al. The enhanced tumor specificity of TG6002, an armed oncolytic vaccinia virus deleted in two genes involved in nucleotide metabolism. *Mol Ther Oncolytics*, 2019, 14: 1-14
- [27] Li J, O'Malley M, Urban J, et al. Chemokine expression from oncolytic vaccinia virus enhances vaccine therapies of cancer. *Mol Ther*, 2011, 19: 650-7
- [28] Zuo S, Wei M, Xu T, et al. An engineered oncolytic vaccinia virus encoding a single-chain variable fragment against TIGIT induces effective antitumor immunity and synergizes with PD-1 or LAG-3 blockade. *J Immunother Cancer*, 2021, 9: e002843
- [29] Liang J, Zhao X. Nanomaterial-based delivery vehicles for therapeutic cancer vaccine development. *Cancer Biol Med*, 2021, 18: 352-71
- [30] Kirn DH, Thorne SH. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 64-71
- [31] McCart JA, Ward JM, Lee J, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res*, 2001, 61: 8751-7
- [32] Shakiba Y, Vorobyev PO, Yusubalieva GM, et al. Oncolytic therapy with recombinant vaccinia viruses targeting the interleukin-15 pathway elicits a synergistic response. *Mol Ther Oncolytics*, 2023, 29: 158-68
- [33] Zhang Z, Dong L, Zhao C, et al. Vaccinia virus-based vector against infectious diseases and tumors. *Hum Vaccin Immunother*, 2021, 17: 1578-85
- [34] Deng L, Fan J, Guo M, et al. Oncolytic and immunologic cancer therapy with GM-CSF-armed vaccinia virus of Tian Tan strain Guang9. *Cancer Lett*, 2016, 372: 251-7
- [35] Yakubitskiy SN, Kolosova IV, Maksyutov RA, et al. Attenuation of vaccinia virus. *Acta Naturae*, 2015, 7: 113-21
- [36] Li M, Zhang M, Ye Q, et al. Preclinical and clinical trials

- of oncolytic vaccinia virus in cancer immunotherapy: a comprehensive review. *Cancer Biol Med*, 2023, 20: 646-61
- [37] Xu L, Sun H, Lemoine NR, et al. Oncolytic vaccinia virus and cancer immunotherapy. *Front Immunol*, 2024, 14: 1324744
- [38] Deng L, Yang X, Ding Y, et al. Oncolytic therapy with vaccinia virus carrying IL-24 for hepatocellular carcinoma. *Virol J*, 2022, 19: 44
- [39] Hong SO, Kim J, Lee S, et al. Transgenic viral expression of PH-20, IL-12, and sPD1-Fc enhances immune cell infiltration and anti-tumor efficacy of an oncolytic virus. *Mol Ther Oncolytics*, 2023, 30: 301-15
- [40] Martin NT, Crupi MJF, Taha Z, et al. Engineering rapalog-inducible genetic switches based on Split-T7 polymerase to regulate oncolytic virus-driven production of tumour-localized IL-12 for anti-cancer immunotherapy. *Pharmaceutics*, 2023, 16: 709
- [41] Shakiba Y, Vorobyev PO, Naumenko VA, et al. Oncolytic efficacy of a recombinant vaccinia virus strain expressing bacterial flagellin in solid tumor models. *Viruses*, 2023, 15: 828
- [42] Lee N, Jeon YH, Yoo J, et al. Generation of novel oncolytic vaccinia virus with improved intravenous efficacy through protection against complement-mediated lysis and evasion of neutralization by vaccinia virus-specific antibodies. *J Immunother Cancer*, 2023, 11: e006024
- [43] Nguyen DH, Herrmann T, Härtl B, et al. Development of allogeneic stem cell-based platform for delivery and potentiation of oncolytic virotherapy. *Cancers*, 2022, 14: 6136
- [44] Fan J, Deng L, Peng Y, et al. Combined anti-tumor efficacy of somatostatin fusion protein and vaccinia virus on tumor cells with high expression of somatostatin receptors. *Sci Rep*, 2022, 12: 16885
- [45] Wei W, Tian L, Zheng X, et al. Expression of GPX4 by oncolytic vaccinia virus can significantly enhance CD8⁺ T cell function and its impact against pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology*, 2024, 13: 2322173
- [46] Lei W, Ye Q, Hao Y, et al. CD19-targeted BiTE expression by an oncolytic vaccinia virus significantly augments therapeutic efficacy against B-cell lymphoma. *Blood Cancer J*, 2022, 12: 35
- [47] Zhou L, Song X, Zhai Z. Engineering neutralization-resistant oncolytic vaccinia virus for effective treatment of multiple myeloma. *Blood*, 2024, 144: 4643
- [48] Kloker LD, Berchtold S, Smirnow I, et al. Oncolytic vaccinia virus GLV-1h68 exhibits profound antitumoral activities in cell lines originating from neuroendocrine neoplasms. *BMC Cancer*, 2020, 20: 628
- [49] Chintala NK, Choe JK, McGee E, et al. Correlative analysis from a phase I clinical trial of intrapleural administration of oncolytic vaccinia virus (Olvi-vec) in patients with malignant pleural mesothelioma. *Front Immunol*, 2023, 14: 1112960
- [50] Toulmonde M, Guegan JP, Spalato-Ceruso M, et al. Reshaping the tumor microenvironment of cold soft-tissue sarcomas with oncolytic viral therapy: a phase 2 trial of intratumoral JX-594 combined with avelumab and low-dose cyclophosphamide. *Mol Cancer*, 2024, 23: 38
- [51] Monge C, Xie C, Myojin Y, et al. Phase I/II study of PexaVec in combination with immune checkpoint inhibition in refractory metastatic colorectal cancer. *J Immunother Cancer*, 2023, 11: e005640
- [52] Park SH, Breitbach CJ, Lee J, et al. Phase 1b trial of biweekly intravenous Pexa-Vec (JX-594), an oncolytic and immunotherapeutic vaccinia virus in colorectal cancer. *Mol Ther*, 2015, 23: 1532-40
- [53] Cripe TP, Ngo MC, Geller JI, et al. Phase 1 study of intratumoral Pexa-Vec (JX-594), an oncolytic and immunotherapeutic vaccinia virus, in pediatric cancer patients. *Mol Ther*, 2015, 23: 602-8
- [54] Moehler M, Heo J, Lee HC, et al. Vaccinia-based oncolytic immunotherapy Pexastimogene Devacirepvec in patients with advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib failure: a randomized multicenter Phase IIb trial (TRAVERSE). *Oncoimmunology*, 2019, 8: 1615817
- [55] Marabelle A, Eberst L, Terret C, et al. A phase I dose escalation trial evaluating the impact of an *in situ* immunization strategy with intra-tumoral injections of Pexa-Vec in combination with ipilimumab in advanced solid tumors with injectable lesions. *Annals of Oncology*, 2018, 29: 105-9
- [56] Holloway RW, Mendivil AA, Kendrick JE, et al. Clinical activity of olvimulogene nanivacirepvec-primed immunochemotherapy in heavily pretreated patients with platinum-resistant or platinum-refractory ovarian cancer: the nonrandomized phase 2 VIRO-15 clinical trial. *JAMA Oncol*, 2023, 9: 903-8
- [57] Mell LK, Brumund KT, Daniels GA, et al. Phase I trial of intravenous oncolytic vaccinia virus (GL-ONC1) with cisplatin and radiotherapy in patients with locoregionally advanced head and neck carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 5696-702
- [58] Hussein F, Delord JP, Fournel-Federico C, et al. Vectorized gene therapy of liver tumors: proof-of-concept of TG4023 (MVA-FCU1) in combination with flucytosine. *Ann Oncol*, 2017, 28: 169-74
- [59] Quoix E, Lena H, Losonczy G, et al. TG4010 immunotherapy and first-line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer (TIME): results from the phase 2b part of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Oncol*, 2016, 17: 212-23
- [60] Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University. Exploratory study of a novel oncolytic vaccinia virus expressing bispecific antibody in the treatment of refractory/relapsed B-cell lymphoma[EB/OL]. (2023-02-06). <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04887025>
- [61] Heo J, Reid T, Ruo L, et al. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med*, 2013, 19: 329-36
- [62] Ling Q, Zheng B, Chen X, et al. The employment of

- vaccinia virus for colorectal cancer treatment: a review of preclinical and clinical studies. *Hum Vaccin Immunother*, 2022, 18: 2143698
- [63] Kumar A, Taghi Khani A, Sanchez Ortiz A, et al. GM-CSF: a double-edged sword in cancer immunotherapy. *Front Immunol*, 2022, 13: 901277
- [64] 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: e000710
- [65] Nakao S, Arai Y, Tasaki M, et al. Intratumoral expression of IL-7 and IL-12 using an oncolytic virus increases systemic sensitivity to immune checkpoint blockade. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaax7992
- [66] Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17: 559-72
- [67] Moon EK, Wang LS, Bekdache K, et al. Intra-tumoral delivery of CXCL11 via a vaccinia virus, but not by modified T cells, enhances the efficacy of adoptive T cell therapy and vaccines. *Oncoimmunology*, 2018, 7: e1395997
- [68] Francis L, Guo ZS, Liu Z, et al. Modulation of chemokines in the tumor microenvironment enhances oncolytic virotherapy for colorectal cancer. *Oncotarget*, 2016, 7: 22174-85
- [69] Li F, Sheng Y, Hou W, et al. CCL5-armed oncolytic virus augments CCR5-engineered NK cell infiltration and antitumor efficiency. *J Immunother Cancer*, 2020, 8: e000131
- [70] Hwang JK, Hong J, Yun CO. Oncolytic viruses and immune checkpoint inhibitors: preclinical developments to clinical trials. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 8627
- [71] Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol*, 2016, 39: 98-106
- [72] Carenza C, Calcaterra F, Oriolo F, et al. Costimulatory molecules and immune checkpoints are differentially expressed on different subsets of dendritic cells. *Front Immunol*, 2019, 10: 1325
- [73] He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res*, 2020, 30: 660-9
- [74] Qin S, Xu L, Yi M, et al. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer*, 2019, 18: 155
- [75] Oh CM, Chon HJ, Kim C. Combination immunotherapy using oncolytic virus for the treatment of advanced solid tumors. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 7743
- [76] Chiu M, Armstrong EJL, Jennings V, et al. Combination therapy with oncolytic viruses and immune checkpoint inhibitors. *Expert Opin Biol Ther*, 2020, 20: 635-52
- [77] Ren Y, Miao JM, Wang YY, et al. Oncolytic viruses combined with immune checkpoint therapy for colorectal cancer is a promising treatment option. *Front Immunol*, 2022, 13: 961796
- [78] Wojtukiewicz MZ, Rek MM, Karpowicz K, et al. Inhibitors of immune checkpoints-PD-1, PD-L1, CTLA-4-new opportunities for cancer patients and a new challenge for internists and general practitioners. *Cancer Metastasis Rev*, 2021, 40: 949-82
- [79] Park JS, Lee ME, Kim J, et al. PD-1 inhibitor plus oncolytic vaccinia virus is a safe and effective treatment option for metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Cell Int*, 2024, 24: 50
- [80] Li Z, Li M, Yang L, et al. Oncolytic vaccinia virus armed with anti-CD47 nanobody elicit potent antitumor effects on multiple tumor models via enhancing innate and adoptive immunity. *J Immunother Cancer*, 2024, 12: e009473
- [81] Azar F, Deforges J, Demeusot C, et al. TG6050, an oncolytic vaccinia virus encoding interleukin-12 and anti-CTLA-4 antibody, favors tumor regression via profound immune remodeling of the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*, 2024, 12: e009302
- [82] Shi Z, Liu B, Huang C, et al. An oncolytic vaccinia virus armed with anti-human-PD-1 antibody and anti-human-4-1BB antibody double genes for cancer-targeted therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 559: 176-82
- [83] Wang G, Kang X, Chen KS, et al. An engineered oncolytic virus expressing PD-L1 inhibitors activates tumor neoantigen-specific T cell responses. *Nat Commun*, 2020, 11: 1395
- [84] Klein C, Brinkmann U, Reichert JM, et al. The present and future of bispecific antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23: 301-19
- [85] Wei M, Zuo S, Chen Z, et al. Oncolytic vaccinia virus expressing a bispecific T-cell engager enhances immune responses in EpCAM positive solid tumors. *Front Immunol*, 2022, 13: 1017574
- [86] Styczyński J. A brief history of CAR-T cells: from laboratory to the bedside. *Acta Haematol Pol*, 2020, 51: 2-5
- [87] Park AK, Fong Y, Kim SI, et al. Effective combination immunotherapy using oncolytic viruses to deliver CAR targets to solid tumors. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaaz1863
- [88] Wennier ST, Liu J, McFadden G. Bugs and drugs: oncolytic virotherapy in combination with chemotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13: 1817-33
- [89] Yu YA, Galanis C, Woo Y, et al. Regression of human pancreatic tumor xenografts in mice after a single systemic injection of recombinant vaccinia virus GLV-1h68. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8: 141-51
- [90] Holloway RW, Thaker P, Mendivil AA, et al. A phase III, multicenter, randomized study of olvimulogene nanivacirepvec followed by platinum-doublet chemotherapy and bevacizumab compared with platinum-doublet chemotherapy and bevacizumab in women with platinum-resistant/refractory ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2023, 33: 1458-63
- [91] Lun XQ, Jang JH, Tang N, et al. Efficacy of systemically administered oncolytic vaccinia virotherapy for malignant gliomas is enhanced by combination therapy with rapamycin or cyclophosphamide. *Clin Cancer Res*, 2009,

- 15: 2777-88
- [92] Hofmann E, Weibel S, Szalay AA. Combination treatment with oncolytic Vaccinia virus and cyclophosphamide results in synergistic antitumor effects in human lung adenocarcinoma bearing mice. *J Transl Med*, 2014, 12: 197
- [93] Huang B, Sikorski R, Kirn DH, et al. Synergistic anti-tumor effects between oncolytic vaccinia virus and paclitaxel are mediated by the IFN response and HMGB1. *Gene Ther*, 2011, 18: 164-72
- [94] Zhao X, Yang K, Zhao R, et al. Inducing enhanced immunogenic cell death with nanocarrier-based drug delivery systems for pancreatic cancer therapy. *Biomaterials*, 2016, 102: 187-97
- [95] Seubert CM, Stritzker J, Hess M, et al. Enhanced tumor therapy using vaccinia virus strain GLV-1h68 in combination with a β -galactosidase-activatable prodrug seco-analog of duocarmycin SA. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18: 42-52
- [96] Berchtold S, Beil J, Raff C, et al. Assessing and overcoming resistance phenomena against a genetically modified vaccinia virus in selected cancer cell lines. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 7618
- [97] Advani SJ, Buckel L, Chen NG, et al. Preferential replication of systemically delivered oncolytic vaccinia virus in focally irradiated glioma xenografts. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 2579-90
- [98] Mansfield DC, Kyula JN, Rosenfelder N, et al. Oncolytic vaccinia virus as a vector for therapeutic sodium iodide symporter gene therapy in prostate cancer. *Gene Ther*, 2016, 23: 357-68
- [99] Storozyński QT, Han X, Komant S, et al. Radiation-induced cellular senescence reduces susceptibility of glioblastoma cells to oncolytic vaccinia virus. *Cancers*, 2023, 15: 3341
- [100] Zhou D, Xu W, Ding X, et al. Transient inhibition of neutrophil functions enhances the antitumor effect of intravenously delivered oncolytic vaccinia virus. *Cancer Sci*, 2024, 115: 1129-40
- [101] Yang Q, Modi P, Newcomb T, et al. Idelalisib: first-in-class PI3K delta inhibitor for the treatment of chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic leukemia, and follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 1537-42