

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-078

## 流感病毒改造新策略及其应用

郭茜亚, 陈积, 董铭心

(青岛大学药学院药物化学系, 山东 青岛 266000)

**摘要:** 流感病毒有着极强的变异性和传播性, 常在全球范围内引起季节性的流感爆发。流感病毒的基因组序列、蛋白结构与功能、病毒的包装机制等环节研究相对清楚, 也是一种重要的模式病毒, 用于条件控制基因元件的发现和确证, 构建智能响应型病毒等。随着反向遗传学与合成生物学的发展, 通过基因工程改造的流感病毒能更好地控制病毒复制来提高疫苗的安全性, 以及诱发机体产生强烈的免疫反应, 在肿瘤免疫治疗领域引发广泛关注。本文描述了蛋白质水解靶向嵌合病毒、条件复制型流感减毒活病毒和高干扰素敏感病毒等三种新型减毒流感病毒改造策略, 并对编码过早终止密码子的嵌合抗原肽的流感病毒、与 PD-L1 或 CTLA4 免疫检查点重组的流感病毒、截短的 NS1 片段表达 GM-CSF 的流感病毒分别对黑色素瘤、肝癌的溶瘤作用进行评述。未来, 将通过创新性地运用不同策略、不同病毒来构建减毒活疫苗和溶瘤病毒, 以便在临床上获得更加安全有效的治疗手段。

**关键词:** 流感病毒; 基因元件; 减毒策略; 条件响应; 减毒活疫苗; 溶瘤病毒

**中图分类号:** R915 **文献标志码:** A

## New strategies for engineering influenza viruses and their applications

GUO Xiya, CHEN Ji, DONG Mingxin

(Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong, China)

**Abstract:** Influenza viruses are highly variable and transmissible, and their infections can cause infectious respiratory diseases, such as seasonal influenza outbreaks around the world, one of the most serious public health problems at present, which can be prevented by influenza vaccination. The genome sequences, protein structures and functions of influenza viruses, as well as their packaging mechanisms are relatively clear. They are also important models, which can be used for developing conditional control genetic elements and the construction of intelligent responsive viruses. With the development of reverse genetics and synthetic biology technology, influenza viruses that are genetically engineered can better control virus replication to improve the safety of vaccines, and induce strong immune responses in human being, which have attracted wide attention in tumor immunotherapy. Several studies using simple or modified influenza viruses for treating liver cancer, melanoma, or lung cancer have found breakthroughs. In this paper, three novel strategies for attenuating influenza viruses, namely, proteolytic targeted chimeric virus, conditionally replicating

收稿日期: 2023-11-09 修回日期: 2024-02-22

基金项目: 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项 (2018YFA0900804)

引用本文: 郭茜亚, 陈积, 董铭心. 流感病毒改造新策略及其应用[J]. 合成生物学, 2024, 5(2): 267-280

Citation: GUO Xiya, CHEN Ji, DONG Mingxin. New strategies for engineering influenza viruses and their applications[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(2): 267-280



力, 很容易从动物传播到人类, 演变成一种致命的流行病毒株<sup>[3]</sup>。

流感病毒强有力的传播和目前有限的抗病毒治疗方案加剧了公众的担忧。迄今为止, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准了三种可供人类使用的流感病毒疫苗: 重组流感病毒血凝素三聚体蛋白疫苗、灭活流感病毒疫苗 (inactivated influenza vaccine, IIV) 和流感减毒活疫苗 (live attenuated influenza vaccine, LAIV)<sup>[4-5]</sup>。应用最广泛的流感疫苗是灭活流感病毒疫苗。灭活流感病毒疫苗的主要有效成分是HA和NA蛋白, 这两种蛋白诱导机体产生的中和抗体是疫苗产生保护作用的最主要因素。HA蛋白易变异, 产生新的流感病毒亚型, 但是HA抗原刺激机体产生的抗体特异性强, 由此诱导产生的中和抗体无法有效中和变异后的流感病毒, 所以现有灭活疫苗无法应对由流行株变异引起的流感大流行<sup>[4-5]</sup>。

LAIV由于具有诱导较长且较强免疫反应的潜力和易于给药的便利性, 首次出现便引起广泛关注。与IIV相比, LAIV能更好地抵抗异型流感病毒感染<sup>[6-7]</sup>。FDA推荐的LAIV是由阿斯利康旗下子公司Medimmune制备的名为FluMist的疫苗。该疫苗是一种冷适应、温度敏感且减毒的三价的活病毒流感疫苗<sup>[8-9]</sup>。其为鼻内给药, 推荐用于免疫功能正常的2~49岁人群<sup>[10]</sup>。我国批准上市的减毒活疫苗为三价减毒活疫苗 (LAIV3), 由长春百克科技股份有限公司制备。LAIV3仅适合3~17岁人群, 所适配的年龄范围更为窄小。因此可能需要更优策略来设计减毒活疫苗, 扩大适用范围、增加有效性和降低副作用。

目前研究的经典流感疫苗减毒策略之一是通过反向遗传学方法制备缺失非结构蛋白1 (non-structural protein 1, NS1) 的流感病毒。流感病毒NS1是一个关键的毒力元件和强干扰素拮抗剂, 在病毒复制中具有多功能作用<sup>[11-12]</sup>。虽然NS1蛋白不是病毒复制所必需的, 但在流感病毒感染期间, 它对逃避宿主先天性免疫和干扰适应性免疫至关重要<sup>[13-14]</sup>。因此, 删除NS1一直被认为是制备安全性高、免疫原性强的流感疫苗的理想策略<sup>[15]</sup>。在老年小鼠中, NS1截短疫苗可诱导强烈的免疫应

答, 与灭活病毒疫苗相比具有更好的保护效果<sup>[16-17]</sup>。然而, 截短或缺失NS1的流感病毒在犬肾细胞 (madin darby canine kidney, MDCK) 中的生长效率相对较低<sup>[18]</sup>, 缺乏有效的生产系统限制了缺失NS1的流感病毒减毒活疫苗株的进一步发展。因此, 需要新的减毒策略, 克服当前减毒流感疫苗生产等方面的局限性。

随着反向遗传学与合成生物学的发展, 一些新的减毒策略被用于制备LAIV, 可以更好地控制病毒复制, 提高安全性、有效性和克服病毒生产的难题, 如蛋白质水解靶向嵌合病毒<sup>[19]</sup>、条件复制型流感减毒活病毒<sup>[20]</sup>和高干扰素敏感病毒<sup>[21]</sup>。这些新型减毒策略的研发对于将来季节性流感和流感大流行的应对十分重要。基因工程改造后的流感病毒, 在同样需要安全可控和强免疫载体的溶瘤病毒 (oncolytic virus, OV) 疗法中也发挥重要作用。因流感病毒的基因组、蛋白功能及合成机制研究相对清楚, 可以在改造或修饰后制备出毒性低, 溶瘤有效性高的溶瘤病毒。近年来, 将修饰过的流感病毒作为溶瘤病毒, 已成为肿瘤治疗科研的焦点<sup>[22-23]</sup>。如编码过早终止密码子的嵌合抗原肽的流感病毒、与PD-L1或CTLA4免疫检查点重组的流感病毒和截短的NS1片段表达GM-CSF的流感病毒分别对黑色素瘤或肝癌有较好的溶瘤作用。这里将介绍上述三种新的减毒策略和修饰后的流感病毒在黑色素瘤和肝癌中的溶瘤应用。

## 1 新型流感病毒减毒策略

### 1.1 蛋白质水解靶向嵌合病毒

鉴于病毒复制依赖病毒编码的蛋白质<sup>[13]</sup>, 通过宿主细胞的蛋白质降解机制来操纵病毒蛋白质稳定性可能是一种打开和关闭病毒复制周期的潜在方法<sup>[24-29]</sup>。为此, Si等<sup>[19]</sup>将蛋白酶体靶向结构域 (proteasome-targeting domain, PTD) 与流感病毒基质蛋白1 (matrix protein 1, M1) 融合设计成蛋白质水解靶向嵌合 (proteolysis-targeting chimeric, PROTAC) 病毒。PTD为包含蛋白酶体靶向肽 (proteasome-targeting peptide, PTP) ALAPYIP和烟草蚀刻病毒切割位点 (tobacco etch virus cleavage

site, TEVcs) 接头 ENLYFQG。ALAPYIP 被肿瘤抑制蛋白 (von hippel-lindau, VHL) 识别, VHL 是 CRL2<sup>VHL</sup> E3 泛素连接酶的底物识别成分, 导致泛素化, 从而通过蛋白酶体降解标记蛋白<sup>[30-33]</sup>。VHL 在大多数正常组织和细胞类型中的普遍表达, 为 PROTAC 疫苗的有效性提供关键基础<sup>[34-37]</sup>。烟草蚀刻病毒蛋白酶 (tobacco etch virus protease, TEVp) 可以选择性地切割 PTD 的 TEVcs 接头, 以将病毒蛋白从 PTD 中分离出来, 使其免于降解。该团队建立了稳定表达 TEVp 的细胞系, 以在疫苗生产过程中保持 PROTAC 病毒的繁殖潜力<sup>[19]</sup>。该团队还将 PTD 掺入另一种病毒株 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) 流感病毒 (PR8) 的 M1 蛋白中, 通过细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 测定和病毒复制曲线测量, 发现得到的 PROTAC 病毒株 M1-PTDPR8 也被高度减毒。总之, 制备的 PROTAC 病毒可以依靠宿主细胞的泛素化在传统细胞中高度衰减, 也可以在工程表达 TEVp 的细胞株中使病毒脱离泛素化保持高效复制的能力<sup>[38]</sup>。PROTAC 病毒在体内可被充分减弱, 但能引起强大的体液、黏膜和细胞免疫, 对同源和异源病毒的挑战提供了广泛的保护 (图1)。

现有方法制备的疫苗在常规细胞中显示出相当强的复制能力, 甚至在高剂量下可杀死宿主<sup>[39]</sup>,

这会导致严重的安全性问题。与现有的减毒活疫苗制备方法相比, PROTAC 病毒疫苗采用了一种独特的疫苗设计原则, 即有条件地将病毒蛋白靶向到宿主的蛋白质降解系统中, 以创造蛋白质靶向分解病毒疫苗。这种方法可以将病毒的复制高度衰减到低水平。通过使用稳定表达 TEVp 的细胞让病毒增殖, 在正常细胞培养条件下可以在数周内生产成本效益高的疫苗, 这比依赖于鸡胚的方法有优势<sup>[40]</sup>。因此, 与现有方法生产的疫苗相比, PROTAC 病毒疫苗可能具有更高的安全性, 它可能是预防季节性大流行等多重流行的有效方法。实际上, 有许多 PTD 可用于生成 PROTAC 病毒, 因为在人泛素-蛋白酶体系统中已经发现了 600 多个 E3 连接酶<sup>[33]</sup>。PROTAC 疫苗技术的成功也可能是蛋白质降解机制基础研究与疫苗开发之间的一个重要突破, 是这两个领域的一个新前沿。目前, 一些不依赖蛋白酶体的蛋白质降解系统 (包括内体、溶酶体或自噬体系统) 已被用于开发新的靶向降解技术, 如溶酶体靶向嵌合体、自噬靶向嵌合体和自噬小体绑定化合物<sup>[41-43]</sup>, 这些研究也提示我们可以观察体内其他的酶解通路, 有望制成新的、安全性更高、有效性更强且生产成本低的减毒活疫苗, 为未来减毒疫苗发展提供了新的思考。

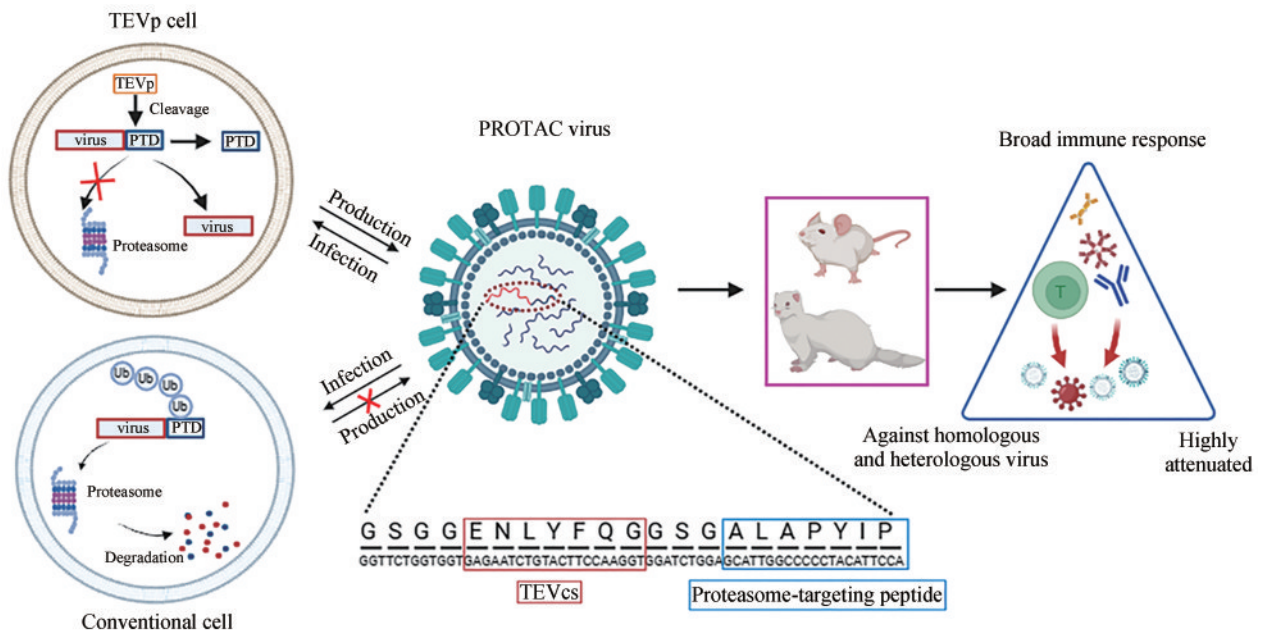


图1 PROTAC病毒生产系统的建立与在鼠/雪貂体内反应示意图  
Fig. 1 Production of the PROTAC virus and its response in mice/ferrets

## 1.2 条件复制型流感病毒

Buskirk等<sup>[44]</sup>开发了一种基于内含肽 (intein) 的分子开关, 将小分子4-羟基他莫昔芬 (4-hydroxy tamoxifen, 4-HT) 的结合转化为靶蛋白的激活, 使得蛋白质的功能依赖于小分子。intein是位于宿主蛋白质中的一段插入序列, 翻译后从蛋白质前体中切除, 从而形成成熟的宿主蛋白。在此过程中, 其被称为外显肽 (extein) 的宿主蛋白质序列两侧通过正常的肽键连接起来。内含肽的自剪接最初是由哈佛大学 David R. Liu发现的, David R. Liu<sup>[45]</sup>将RecA内含肽结构中的非必需归巢核酸内切酶区域替换为人的雌激素受体配体结合区域 (estrogen receptor-ligand binding domain, ER-LBD), 得到N端剪接区-ER-LBD-C端剪接区域内含肽融合蛋白, 将ER-LBD插入到RecA内含肽中可破坏其自剪接活性。当ER-LBD与高亲和力的小分子4-HT结合后, 第12螺旋发生大幅的构象转变, 拉近ER-LBD的N末端和C末端之间的距离, 从而发生内含肽的自剪接。Peck等<sup>[46]</sup>随后更新出37°C下第二代4-HT依赖性内含子37R3-2, 其在哺乳动物细胞中表现出较高的剪接蛋白产量和较快的剪接速度。

Chen等<sup>[20]</sup>利用内含肽自剪接技术, 成功构建出小分子4-HT依赖型流感减毒活疫苗。在这项研究中, 4-HT调节的病毒是将37R3-2内含肽融合到病毒PA序列中第218个位置的丝氨酸位点, 称为S218病毒。融合内含肽到PA序列的S218病毒突变株会阻止活的IAV的正确翻译和组装。该团队是基于插入内含肽后尽可能多地破坏PA蛋白的功能和容易接近4-HT小分子的原理<sup>[47]</sup>, 将intein插入到PA蛋白的无规则卷曲或蛋白的外侧区域。PA蛋白对于调节病毒基因组转录和复制起着至关重要的作用, PA插入内含肽后, 在缺乏4-HT的情况下, 病毒无法正常组装和复制。只有在存在4-HT的情况下4-HT依赖性的内含肽发生自剪接, 从而将病毒PA蛋白恢复正常, 病毒才能得以正常组装和复制。在PA特定位置插入4-HT依赖的内含子后, 通过反向遗传技术进行病毒的合成。实验表明, S218病毒在0.5 μmol/L、1 μmol/L和2 μmol/L 4-HT处理的人胚肾293T细胞 (human embryonic kidney

293T cells, HEK 293T) 和MDCK细胞中未观察到细胞毒性。S218病毒在存在4-HT时表现出高剪接活性, 不存在4-HT的情况下表现出低剪接活性。4-HT存在的情况下观察到突变病毒S218的病毒大量复制和CPE表型。S218病毒粒子是一个典型的球形颗粒, 直径约为100 nm, 病毒粒子的包膜结构清晰可见, 与野生型 (wild type, WT) IAV病毒粒子的大小和形状相似, 并保留病毒所有的蛋白质抗原, 但病毒的复制依赖于4-HT<sup>[20]</sup>。

S218病毒只有在4-HT存在下, 内含肽发生自剪接, PA活性恢复后才能组装活的功能性的IAV病毒, 所以通过内含肽自剪接的方式可以更好地控制病毒的毒力以保证安全性, 同时维持强大的免疫原性以确保有效性。4-HT依赖性病毒在体外和体内都具有高度减毒作用<sup>[20]</sup>。它不仅能在体外刺激人鼻黏膜细胞产生强烈的先天免疫反应, 还能在小鼠体内引发强大而多样的体液、黏膜和细胞免疫, 从而对同源病毒的攻击提供有效的保护 (图2)。

该研究开发的小分子依赖的内含肽自剪接系统制备减毒活疫苗的应用疫苗技术, 具有系统简单、高效和安全的优点, 也可以实现更短的研发和生产周期, 为人工合成减毒活疫苗设计提供重要的理论依据, 可以为热点、难点病毒建立合成生物学病毒疫苗合成平台, 可以作为应对新发、突发病毒流行的战略储备<sup>[12]</sup>。

## 1.3 高干扰素敏感病毒

干扰素 (interferon, IFN) 系统不仅是固有免疫的重要组成部分, 更是桥接固有免疫与适应性免疫的桥梁。IFN可以促进树突状细胞 (dendritic cell, DC) 的分化成熟、抗体的分泌和效应T细胞的成熟与活化<sup>[48-49]</sup>。此外, IFN对病毒有强烈的抑制效应。在病毒基因组中, 通常存在多种抑制IFN激活的途径, 以使其可以在靶器官中复制。因此, 如果我们将对病毒中拮抗IFN的位点进行系统的氨基酸突变, 使其减少对IFN的抑制, 从而减少病毒复制, 拥有高度减毒和IFN敏感的特性, 便可作为安全性高且免疫效果好的疫苗的理想选择。Du等<sup>[50-51]</sup>以甲型流感A/WSN/33流感株为例, 结合高

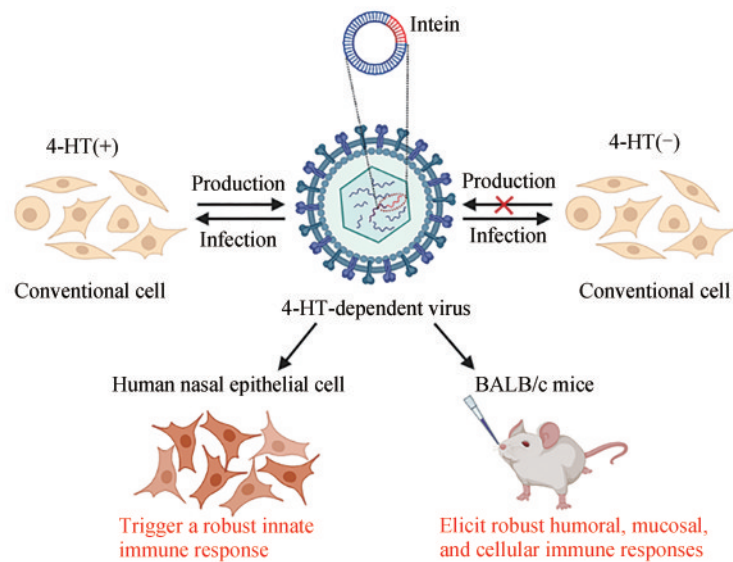


图2 4-HT依赖性的病毒制备与体内体外反应示意图

Fig. 2 Production of the 4-HT-dependent virus and its *in vitro* and *in vivo* responses

通量反向遗传技术和二代测序技术 (next-generation sequencing, NGS), 建立了一种全新且可靠的系统生物学平台。该平台可以大规模同步鉴定流感全基因组的单核苷酸功能。利用此方法, 进行了流感病毒 IFN 敏感位点的全基因组筛查, 并筛选和验证了分布于 IAV 的 PB2、PB1、PA、M1 等多个病毒蛋白的近 30 个抗 IFN 位点。与野生型相比, 有 8 个突变显著增加了 IFN 的敏感性, 其中 6 个基因 (PB2-N9D、PB2-Q75H、PB2-T76A、M1-N36Y、M1-R72Q 和 M1-S225T) 上调 IFN- $\beta$  和 IFN 刺激基因 54 (IFN-stimulated genes54, ISG54) 的表达, 刺激 IFN 调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 的核易位。此外, 这 6 个突变体在 IFN 分泌缺陷的 Vero 细胞中对 IFN 处理不敏感。然而, 另外两个突变 (PB1-L155H 和 PA-E181D) 并没有诱导更高的 IFN 产生, 并且在 Vero 细胞中仍然对 IFN 敏感, 表明这些突变可能影响 IFN 产生的下游过程。因为单核苷酸突变的干扰素诱导功能有限, 且存在基因复原和丢失的问题。所以, 为最大程度地提高突变病毒干扰素敏感及干扰素诱导的特性, 同时不显著影响病毒自身的复制能力的情况下, 希望可以在多种基因上合并多个突变。于是他们合并了 3 个基因片段的 8 个点突变, 包括新筛选到的 6 种干扰素诱导突变 [3 种 PB2 上的突变 (PB2-N9D、PB2-Q75H、PB2-T76A)、3 种 M1 上

的突变 (M1-N36Y、M1-R72Q 和 M1-S225T)] 和他们团队先前验证过的 NS1 双突变 (R38A 和 K41A), 构建了“高干扰素敏感” (hyper-interferon-sensitive, HIS) 病毒<sup>[21]</sup>。

该毒株在多种细胞系和小鼠体内均表现出干扰素敏感与高干扰素诱导的表型。HIS 在正常小鼠肺组织内没有引起任何肺部病理及炎症反应, 没有检测到病毒复制, 表现出强大的安全性。同时, 它可以促进短时的干扰素系统的上调, 并诱导强烈的 T 细胞反应, 引发强大和多样化的体液和细胞免疫, 并在小鼠和雪貂中提供对同源和异源病毒攻击的保护。此外, HIS 突变不影响病毒基因组本身的复制增殖, 在无干扰素的情况下与野生型复制能力无差别<sup>[21]</sup>。

HIS 是由携带流感 A/WSN/33 病毒基因组的 8 质粒反向遗传系统构建突变质粒文库<sup>[52]</sup>, 然后将编码突变亚库的质粒与其他 7 个编码野生型病毒蛋白的质粒共转染, 在人胚胎肾 293T 细胞中重建病毒突变文库, 在腺癌人类肺泡基底上皮细胞 A549 细胞中选择了所有的病毒文库, 系统地鉴定 IFN 调节功能<sup>[21]</sup>。总的来说, HIS 的构建为我们从基因组层面构建高效且安全的病毒疫苗提供了一个重要典范。有望将这种精准且定量的高通量基因组学系统用于改造其他病原体或疾病相关分子, 使其对干扰素敏感, 可以开发出更安全、有效的疫

苗或药物，为其他疾病的治疗和预防提供了新的思路和方法。

## 2 流感病毒在肿瘤领域中的应用

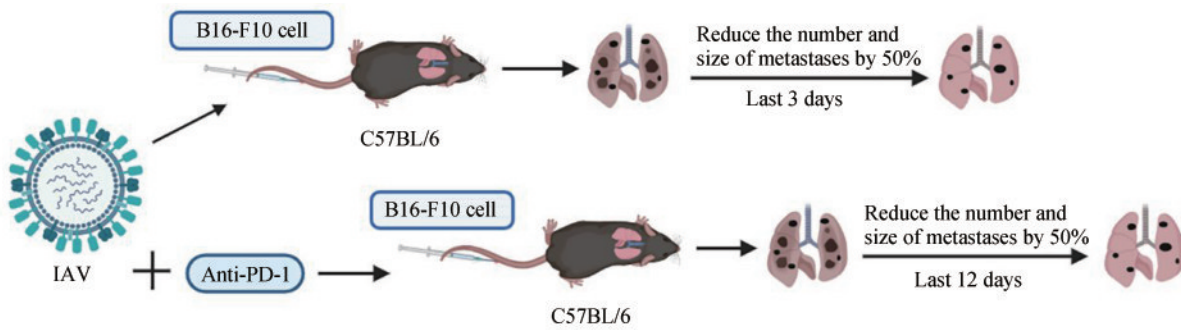
肿瘤免疫治疗是近几年的研究热点，通过重新激活机体的抗肿瘤免疫，识别并杀伤肿瘤细胞，极大地提高了部分病人的长期生存率。溶瘤病毒疗法同免疫治疗一样，可以激活人体免疫反应，是一种革命性的癌症治疗工具。迄今为止，两个基因工程溶瘤病毒已被批准作为药物上市：一个是基于腺病毒的溶瘤病毒 *Oncorine* (H101)，是中国食品药品监督管理局 (China Food and Drug Administration, CFDA) 于2005年批准用于头颈癌和食道癌的重组溶瘤腺病毒，其修饰为E1B缺失和E3部分缺失<sup>[53-54]</sup>；另一个是基于单纯疱疹病毒1型的结合粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 的第二代溶瘤病毒 *T-Vec*，于2015年10月在美国获得FDA批准用于黑色素瘤<sup>[55]</sup>。像制备 *Oncorine* 和 *T-Vec* 一样，设计和操纵病毒基因组以制造非致病性病毒已成为开发溶瘤病毒的标准方法。随着现代基因工程技术的发展和对病毒基因功能和结构的认识不断增加，对于其他结构简单且基因组学、合成和感染机制研究更为清楚的病毒，其改造和控制性生产更易进行，如流感病毒，其结构简单，为含有8个基因片段的RNA病毒，通过合成生物学和反向遗传技术可以获得任何感兴趣突变的重组病毒。有研究团队已经阐明了流感病毒通过将滞留肺泡巨噬细胞训练出持久的抗肿瘤免疫能力，进而增强免疫系统抗肿瘤的能力<sup>[56]</sup>。这提示我们，经过修饰后提高安全性和有效性的流感病毒也可以作为溶瘤病毒的潜在候选者。随着现代生物学的发展，已有大量研究探索修饰的流感病毒对黑色素瘤或肝癌等肿瘤的作用及机制，以期将其作为溶瘤病毒在肿瘤治疗领域取得突破性的进展。

### 2.1 流感病毒在黑色素瘤中的应用

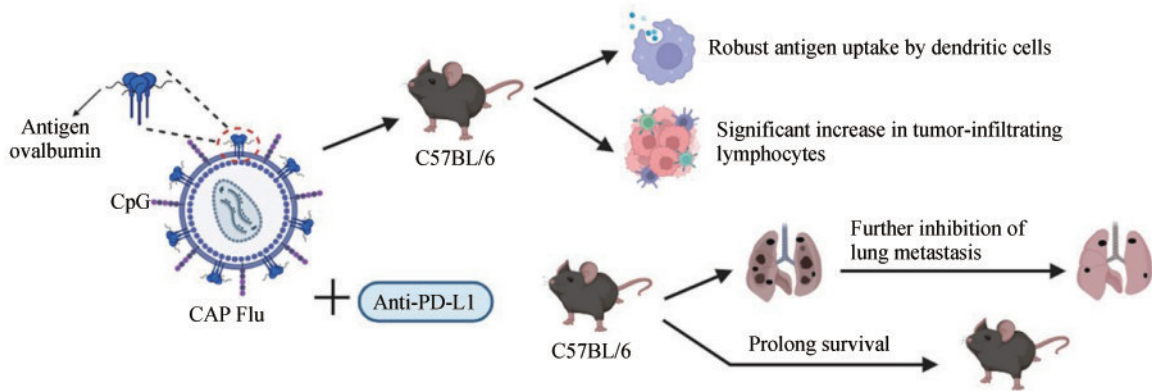
黑色素瘤是最具侵袭性和致命性的皮肤癌症，

主要在肺部扩散，4期黑色素瘤肺转移患者的5年生存率不超过21%<sup>[57]</sup>。有研究评估鼻内应用IAV对黑色素瘤肺转移的溶瘤和免疫调节潜力，并探索联合应用免疫检查点 (immune checkpoint, IC) 抑制剂是否可以增强初始IAV诱导的溶瘤作用。结果发现，与对照小鼠相比，B16-F10黑色素瘤肺转移的小鼠对IAV感染的反应更强，并且消除了肿瘤相关巨噬细胞和淋巴细胞的免疫抑制表型。用亚致死剂量IAV感染黑色素瘤肺转移的小鼠，肺转移灶的数量和大小减少50%以上。当IAV与抗程序性死亡受体1 (programmed death 1, PD-1) 联合应用时，对抑制肺转移有更持续的效果 [图3(a)]<sup>[58]</sup>。到目前为止，黑色素瘤患者的溶瘤病毒治疗仅限于T-VEC病毒。T-VEC因3期临床试验中16%的持久缓解率和适度的生存延长，批准用于不可切除的3期和4期黑色素瘤患者的瘤内治疗<sup>[59-60]</sup>。然而目前没有研究表明T-VEC治疗可以减少内脏器官中已有的黑色素瘤转移，或能延长黑色素瘤转移后患者的生存期<sup>[61-62]</sup>。在这项研究中，首次表明IAV对已经在肺部扩散且无法进行瘤内OV递送的黑色素瘤转移也有效。IAV感染B16-F10黑色素瘤肺转移瘤小鼠不仅导致直接的溶瘤作用，还导致强烈的抗病毒反应，消除肿瘤介导的免疫抑制，其先天免疫细胞和适应性免疫细胞都恢复了功能性免疫表型。

尽管目前发现了多种肿瘤新表位，但用于特异性癌症免疫疗法的抗原递送仍然具有挑战性<sup>[63-65]</sup>。有研究团队利用先前在IAV感染背景下观察到的肿瘤缓解<sup>[66-67]</sup>，制备了一种减毒的嵌合抗原肽流感病毒 (chimeric antigenic peptide influenza virus, CAP Flu) 来应对黑色素瘤肺转移<sup>[68]</sup>。通过引入4个过早终止密码子 (premature termination codons, PTC) 至WT流感病毒A/WSN/33 (H1N1) 中，产生一种活的但非生产性的减毒IAV，与先天免疫刺激剂CpG偶联后，得到IAV-CPG。然后使用点击化学将模型抗原卵清蛋白 (Ovalbumin, OVA) 共价显示在IAV-CPG上，即得CAP Flu。这种CAP Flu在PTC存在的情况下，会提前终止病毒的复制，证实了CAP Flu对宿主细胞的安全性。在黑色素瘤肺转移小鼠模型中将OVA与IAV结合的嵌合抗原肽流感病毒肺部鼻内给药后，观察到肿



(a) 单纯IAV或联合抗PD-1对肺转移性黑色素瘤的作用  
(a) Effectiveness of IAV alone or combined with anti-PD-1 on the pulmonary metastatic melanoma



(b) 单纯CAP Flu或联合抗PD-L1对肺转移性黑色素瘤的作用  
(b) Effectiveness of CAP Flu alone or combined with anti-PD-L1 on the pulmonary metastatic melanoma

图3 流感病毒对肺转移性黑色素瘤的作用

Fig. 3 Effectiveness of engineered influenza viruses on the pulmonary metastatic melanoma

瘤部位免疫细胞的浸润增加。与单独的肽相比，这种构建体进行的疫苗接种不仅提高了对DC的抗原摄取，而且促进了抗原的持续时间和呈递，更重要的是，在体外和体内促进了DC激活和 $CD8^+$ T细胞的交叉启动<sup>[68]</sup>。所有实验数据都反映了将合成肽与编码PTC的病毒结合能够显著诱导先天和适应性免疫反应。工程IAV可以搭配任何感兴趣的肿瘤新抗原来产生癌症疫苗。作为一种病毒载体，CAP Flu在肺肿瘤中工程化制备表达抗程序性死亡受体-配体1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1)后，进一步消除免疫抑制环境，协同提高抗癌效力，增强肺转移的消退，并延长了小鼠生存期 [图3(b)]，该方法为合成肽引导、肿瘤特异性和个性化免疫疗法提供了一种策略。治疗肺转移性黑色素瘤是一个具有挑战性的任务，目前的减毒流感病毒作为溶瘤病毒在癌症免疫治疗方面已崭露头角，但是依然需要更多的尝试，探索更有效的治疗策略，以提高溶瘤病毒的安全性和有效

性，经得住临床癌症治疗的考验。

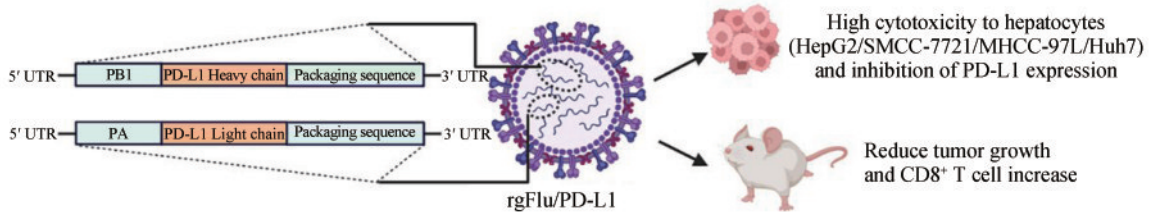
## 2.2 流感病毒在肝癌中的应用

在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中，抗原呈递效率低下，主要是因为抗肿瘤T细胞反应受到免疫检查点分子PD-1或PD-L1的抑制<sup>[69-70]</sup>。目前发现免疫检查点抑制后，出现的抑制反应较弱<sup>[71]</sup>，未有效激活肿瘤T细胞反应。溶瘤病毒治疗可以解决这个问题，这种治疗可以促进肿瘤内T细胞浸润，提高疗效<sup>[72]</sup>。这些效应可能由于在肿瘤组织内持续性刺激导致T细胞耗竭后，溶瘤病毒自身抗原位点由碱性亮氨酸拉链ATF样转录因子3阳性 (BATF3<sup>+</sup>) DC的募集增加，进行加工和呈递，而启动 $CD8^+$ T细胞<sup>[73-74]</sup>，促进了特异性免疫激活和/或免疫抑制肿瘤微环境的改变，激活T细胞反应<sup>[74-75]</sup>，从而增强了免疫检查点抑制的疗效。于是，有研究利用流感病毒反向遗传学

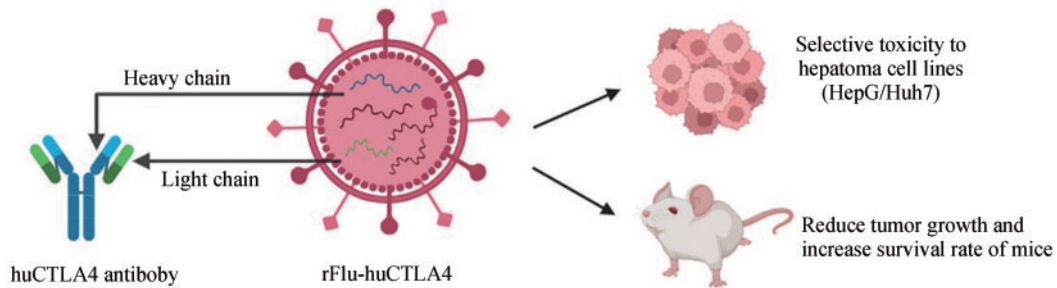
方法，在 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 病毒背景下开发了一种新型有效的分别在 PB1 和 PA 中表达 PD-L1 重链和轻链的流感病毒重组 PD-L1 抗体癌症免疫疗法——rgFlu/PD-L1 [76]，其可高选择性地杀死 HCC 细胞，对正常肝细胞无影响，且可以抑制 HepG2 细胞中 PD-L1 的表达并诱导肝癌细胞凋亡。gFlu/PD-L1 在体内实验中触发肿瘤坏死，心、肝、脾、肺、肾和其他器官组织没有受到显著影响，因此，rgFlu/PD-L1 治疗是安全的。rgFlu/PD-L1 通过激活 cGas STING 途径增强 DC 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活性，以及它们对 HCC 的浸润，靶向肿瘤进行复制并杀伤，减少肿瘤的生长 [图 4(a)]，说明

rgFlu/PD-L1 可用于 HCC 的治疗。这一机制为肝癌提供了一种新的免疫疗法 [76]。

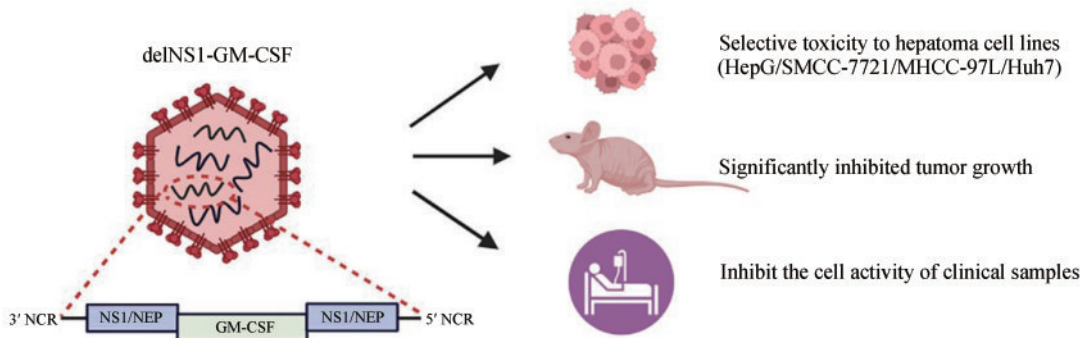
鉴于癌症的异质性，为了获得针对广泛癌症的持久的、一致的治疗反应，可能需要更复杂的免疫调节剂或寻找新的免疫检查点来应对。细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA4) 是 T 细胞上的跨膜受体，是重要的免疫检查点之一 [77]。因此，有研究创新性地开展嵌合 CTLA4 的溶瘤病毒研究，使用反向遗传学产生编码人 CTLA4 抗体的重组流感病毒，即 rFlu-huCTLA4。利用 A/PR/8/34 (PR8) 病毒的 PB1 和 PA 病毒片段分别表达人 CTLA4 抗体



(a) rgFlu/PD-L1 的制备策略及对肝癌的溶瘤作用  
(a) Preparation of rgFlu/PD-L1 and its oncolytic effect on the hepatocellular carcinoma



(b) rFlu-huCTLA4 的制备策略及对肝癌的溶瘤作用  
(b) Preparation of rFlu-huCTLA4 and its oncolytic effect on the hepatocellular carcinoma



(c) delNS1-GM-CSF 的制备策略及对肝癌的溶瘤作用  
(c) Preparation of delNS1-GM-CSF and its oncolytic effect on the hepatocellular carcinoma

图 4 流感病毒的修饰和对肝癌的作用

Fig. 4 Modifications of influenza viruses and their effectiveness on the hepatocellular carcinoma

的重链和轻链<sup>[78]</sup>。随后,在体外和体内观察 rFlu-huCTLA4 对 HCC 的溶瘤效果。在体外实验中发现 rFlu-huCTLA4 病毒以时间和剂量依赖的方式特异性地杀死肝癌细胞,而不会损害正常肝细胞系。在 HepG2 移植小鼠模型中 rFlu-huCTLA4 可以抑制肿瘤生长,且观察到小鼠的存活率有明显的提高[图 4(b)]。在对照组小鼠的肿瘤部位未观察到明显的癌症细胞坏死,肝、肺组织也未见异常<sup>[79]</sup>,印证了 rFlu-huCTLA4 的安全性和溶瘤有效性。最近, Peter Palese 研究团队<sup>[80]</sup>发现,表达拮抗免疫检查点 CTLA4 (IAV-CTLA4) 的单链抗体的重组流感病毒也可以延缓小鼠黑色素瘤模型中的肿瘤。

除了免疫检查点联合溶瘤病毒可以有效地治疗肝癌外,在过去的二十年里, GM-CSF 也是治疗肿瘤患者的关键点<sup>[81]</sup>。GM-CSF 是由巨噬细胞、T 细胞、肥大细胞、自然杀伤细胞、内皮细胞和成纤维细胞分泌的单体糖蛋白,其起到一种细胞因子的作用<sup>[82]</sup>,可以通过结合相应受体调节免疫细胞生长和分化,从而调控免疫应答。有研究者利用反向遗传学方法制备了在 NS1 基因片段中编码 GM-CSF 的重组 PR8 流感病毒,称为 delNS1-GM-CSF,它利用截短的 NS1 病毒片段表达 GM-CSF。重组病毒 delNS1-GM-CSF 在各种细胞系中复制良好,且以时间和剂量依赖的方式选择性地杀死各种 HCC 细胞系 (SMMC7721、HepG2、MHCC97L 和 Huh7.5),而在正常肝细胞 L02 中观察到很少的细胞毒性。在皮下 HepG2 异种移植物裸鼠模型中发现在瘤内注射 delNS1-GM-CSF 五次后,与对照组相比,注射 delNS1-GM-CSF 对 HCC 模型中的肿瘤生长以剂量依赖性方式显著抑制。在 HCC 临床样本中也发现了其可以降低细胞活性 [图 4(c)]。结果表明,溶瘤性 delNS1-GM-CSF 病毒也可能是 HCC 患者的一种新的治疗方法<sup>[83]</sup>。上述研究“rgFlu/PD-L1、rFlu-huCTLA4、delNS1-GM-CSF”因其较好的溶瘤效果和增强的免疫刺激特性,为流感病毒溶瘤打下了坚实的基础。

### 3 总结与展望

随着反向遗传学和合成生物学的发展,已经探索了一些减毒策略来制备 LAIV,如 NS1 截短疫

苗。然而,目前并没有完全消除大众对 LAIV 安全性和快速生产的担忧。此外,季节性流感病毒抗原的持续漂移和转移导致的免疫逃逸,给传统的和减毒的流感疫苗效力带来了巨大挑战。考虑到流感病毒的副作用和快速传播的特性,使用新的策略来生产有效的疫苗仍然是当务之急。上述新兴减毒策略,蛋白质水解靶向嵌合病毒、条件复制型流感减毒活病毒、高干扰素敏感病毒、编码过早终止密码子的嵌合抗原肽流感病毒所构建的减毒病毒可给我们提供新的选择,并引发思考:如何利用新的酶解通路或利用内含肽自剪接技术,设计更新、更安全和更有效的流感病毒减毒活疫苗,达到预防流感或发挥高效的溶瘤作用?虽然流感病毒本身是危害人类身体健康的主要致病源,但经改造后具备作为溶瘤病毒的潜力,其不仅可以激活机体免疫杀伤肿瘤细胞,还可以作为载体安全递送外源基因,提高抗肿瘤靶向性,从而减少对正常组织损害的能力。不可避免的是,在对流感病毒进行基因改造或实验室操作过程中可能存在一些潜在生物安全风险<sup>[84]</sup>,我们需要对改造流感病毒的生物安全风险进行分析,综合考虑病原性和传播性、遗传改造的稳定性等因素。通过全面评估风险,并采取适当的措施来减轻风险,确保改造流感病毒研究和实验室操作的安全性。

当前的肿瘤治疗方法包括手术切除、放疗、化疗、免疫治疗、靶向治疗和个性化治疗等。在 2018 年诺贝尔生理学或医学奖颁发给了代表药物为 PD1/PD-L1 抗体的“肿瘤免疫疗法”后,越来越多的研究者聚焦于免疫治疗,如免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICI) 治疗、CAR-T 细胞疗法、肿瘤疫苗等<sup>[85]</sup>。由于溶瘤病毒治疗在溶瘤过程中,同免疫治疗一致,均诱导特异性抗肿瘤免疫,其在抗肿瘤过程中起着重要作用,因此溶瘤病毒治疗与免疫治疗联合使用有望进一步提高疗效。上述修饰后的流感病毒作为溶瘤病毒表现出较高的安全性和较强的溶瘤作用,将减毒流感病毒作为癌症免疫治疗手段有很大前景和发展空间。结合目前溶瘤病毒的不同病毒载体 (如流感病毒、腺病毒等) 和不同修饰策略 (如上述的新型减毒策略),提示我们可以创新性地组装溶瘤病毒,未来可能会有多种副作用小、

疗效高的溶瘤病毒疗法。

总之，尽管克服流感和治疗肿瘤都是复杂而艰巨的任务，但人类在流感病毒上的减毒或基因修饰等方面的探索，为流感病毒增加有效性和提高安全性方面取得了重要的进展。随着病毒调控和免疫增强基因元件的不断发掘，更加安全有效的病毒疫苗和溶瘤病毒将会被开发，为患者带来更好的生活质量和治疗效果。

### 参 考 文 献

- [1] WOOLHOUSE M E J, BRIERLEY L. Epidemiological characteristics of human-infective RNA viruses[J]. *Scientific Data*, 2018, 5: 180017.
- [2] GOUNDER A P, BOON A C M. Influenza pathogenesis: the effect of host factors on severity of disease[J]. *Journal of Immunology*, 2019, 202(2): 341-350.
- [3] FUKUYAMA S, KAWAOKA Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2011, 23(4): 481-486.
- [4] BELSHE R B, EDWARDS K M, VESIKARI T, et al. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2007, 356(7): 685-696.
- [5] BELSHE R B, NEWMAN F K, WILKINS K, et al. Comparative immunogenicity of trivalent influenza vaccine administered by intradermal or intramuscular route in healthy adults[J]. *Vaccine*, 2007, 25(37-38): 6755-6763.
- [6] GORSE G J, BELSHE R B, MUNN N J. Superiority of live attenuated compared with inactivated influenza A virus vaccines in older, chronically ill adults[J]. *Chest*, 1991, 100(4): 977-984.
- [7] PICA N, PALESE P. Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges[J]. *Annual Review of Medicine*, 2013, 64: 189-202.
- [8] BUONAGURIO D A, BECHERT T M, YANG C F, et al. Genetic stability of live, cold-adapted influenza virus components of the FluMist/CAIV-T vaccine throughout the manufacturing process[J]. *Vaccine*, 2006, 24(12): 2151-2160.
- [9] AMBROSE C S, LUKE C, COELINGH K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza[J]. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2008, 2(6): 193-202.
- [10] DE VILLIERS P J, STEELE A D, HIEMSTRA L A, et al. Efficacy and safety of a live attenuated influenza vaccine in adults 60 years of age and older[J]. *Vaccine*, 2009, 28(1): 228-234.
- [11] KRUG R M. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense[J]. *Current Opinion in Virology*, 2015, 12: 1-6.
- [12] AYLLON J, GARCÍA-SASTRE A. The NS1 protein: a multitasking virulence factor[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2015, 386: 73-107.
- [13] FERNANDEZ-SESMA A, MARUKIAN S, EBERSOLE B J, et al. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(13): 6295-6304.
- [14] GEISS G K, SALVATORE M, TUMPEY T M, et al. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(16): 10736-10741.
- [15] RICHT J A, GARCÍA-SASTRE A. Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2009, 333: 177-195.
- [16] MUELLER S N, LANGLEY W A, CARNERO E, et al. Immunization with live attenuated influenza viruses that express altered NS1 proteins results in potent and protective memory CD8<sup>+</sup> T-cell responses[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(4): 1847-1855.
- [17] PICA N, LANGLOIS R A, KRAMMER F, et al. NS1-truncated live attenuated virus vaccine provides robust protection to aged mice from viral challenge[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(19): 10293-10301.
- [18] EGOROV A, BRANDT S, SEREINIG S, et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(8): 6437-6441.
- [19] SI L L, SHEN Q, LI J, et al. Generation of a live attenuated influenza A vaccine by proteolysis targeting[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(9): 1370-1377.
- [20] CHEN J, WANG J Y, ZHU H Y, et al. Generation of a live attenuated influenza A vaccine using chemical-triggered intein [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(6): 1686-1695.
- [21] DU Y S, XIN L, SHI Y, et al. Genome-wide identification of interferon-sensitive mutations enables influenza vaccine design [J]. *Science*, 2018, 359(6373): 290-296.
- [22] ALSAAB H O, SAU S, ALZHRANI R, et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 561.
- [23] MARIN-ACEVEDO J A, DHOLARIA B, SOYANO A E, et al. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges[J]. *Journal of Hematology &*

- Oncology, 2018, 11(1): 39.
- [24] SCUDELLARI M. Protein-slaying drugs could be the next blockbuster therapies[J]. *Nature*, 2019, 567(7748): 298-300.
- [25] SALAMI J, CREWS C M. Waste disposal—an attractive strategy for cancer therapy[J]. *Science*, 2017, 355(6330): 1163-1167.
- [26] CROMM P M, CREWS C M. Targeted protein degradation: from chemical biology to drug discovery[J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(9): 1181-1190.
- [27] DESHAIES R J. Protein degradation: prime time for PROTACs [J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(9): 634-635.
- [28] YAU R, RAPE M. The increasing complexity of the ubiquitin code[J]. *Nature Cell Biology*, 2016, 18(6): 579-586.
- [29] FINLEY D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78: 477-513.
- [30] HON W C, WILSON M I, HARLOS K, et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL [J]. *Nature*, 2002, 417(6892): 975-978.
- [31] JAAKKOLA P, MOLE D R, TIAN Y M, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub> regulated prolyl hydroxylation[J]. *Science*, 2001, 292(5516): 468-472.
- [32] IVAN M, KONDO K, YANG H, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing[J]. *Science*, 2001, 292(5516): 464-468.
- [33] GU S S, CUI D R, CHEN X Y, et al. PROTACs: an emerging targeting technique for protein degradation in drug discovery [J]. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2018, 40(4): e1700247.
- [34] ZHANG C, PENG Z H, ZHU M L, et al. USP9X destabilizes pVHL and promotes cell proliferation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 60519-60534.
- [35] IWAI K, YAMANAKA K, KAMURA T, et al. Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(22): 12436-12441.
- [36] LATIF F, TORY K, GNARRA J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene[J]. *Science*, 1993, 260(5112): 1317-1320.
- [37] LOS M, JANSEN G H, KAELIN W G, et al. Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues[J]. *Laboratory Investigation*, 1996, 75(2): 231-238.
- [38] PING J H, LOPES T J S, NEUMANN G, et al. Development of high-yield influenza B virus vaccine viruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(51): E8296-E8305.
- [39] MUELLER S, COLEMAN J R, PAPAMICHAIL D, et al. Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(7): 723-726.
- [40] WEI C J, CRANK M C, SHIVER J, et al. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, 19(4): 239-252.
- [41] BANIK S M, PEDRAM K, WISNOVSKY S, et al. Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins[J]. *Nature*, 2020, 584(7820): 291-297.
- [42] TAKAHASHI D, MORIYAMA J, NAKAMURA T, et al. AUTACs: cargo-specific degraders using selective autophagy [J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(5): 797-810.e10.
- [43] LI Z Y, WANG C, WANG Z Y, et al. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT-LC3 linker compounds[J]. *Nature*, 2019, 575(7781): 203-209.
- [44] BUSKIRK A R, ONG Y C, GARTNER Z J, et al. Directed evolution of ligand dependence: small-molecule-activated protein splicing[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(29): 10505-10510.
- [45] YUEN C M, RODDA S J, VOKES S A, et al. Control of transcription factor activity and osteoblast differentiation in mammalian cells using an evolved small-molecule-dependent intein[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(27): 8939-8946.
- [46] PECK S H, CHEN I, LIU D R. Directed evolution of a small-molecule-triggered intein with improved splicing properties in mammalian cells[J]. *Chemistry & Biology*, 2011, 18(5): 619-630.
- [47] LO C Y, TANG Y S, SHAW P C. Structure and function of influenza virus ribonucleoprotein[J]. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2018, 88: 95-128.
- [48] LIU Q, YANG Y J, TAN X F, et al. *Plasmodium* parasite as an effective hepatocellular carcinoma antigen glypican-3 delivery vector[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 24785-24796.
- [49] YU R R, ZHU B, CHEN D G. Type I interferon-mediated tumor immunity and its role in immunotherapy[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, 79(3): 191.
- [50] WU N C, OLSON C A, DU Y S, et al. Functional constraint profiling of a viral protein reveals discordance of evolutionary conservation and functionality[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(7): e1005310.
- [51] DU Y S, ZHANG T H, DAI L, et al. Effects of mutations on replicative fitness and major histocompatibility complex class I binding affinity are among the determinants underlying cytotoxic-T-lymphocyte escape of HIV-1 gag epitopes[J]. *mBio*, 2017, 8(6): e01050-17.
- [52] HOFFMANN E, NEUMANN G, KAWAOKA Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from

- eight plasmids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(11): 6108-6113.
- [53] 夏忠军,常建华,张力. 基因工程腺病毒(H101)瘤内注射联合化疗治疗头颈部及食管鳞癌的Ⅲ期临床研究[J]. *癌症*, 2004, 23(12): 1666-1670.
- XIA Z J, CHANG J H, ZHANG L, et al. Phase Ⅲ randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus [J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2004, 23(12): 1666-1670.
- [54] GARBER K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2006, 98(5): 298-300.
- [55] FERRUCCI P F, PALA L, CONFORTI F, et al. Talimogene laherparepvec (T-VEC): an intralesional cancer immunotherapy for advanced melanoma[J]. *Cancers*, 2021, 13(6): 1383.
- [56] WANG T, ZHANG J J, WANG Y L, et al. Influenza-trained mucosal-resident alveolar macrophages confer long-term antitumor immunity in the lungs[J]. *Nature Immunology*, 2023, 24(3): 423-438.
- [57] PASTORINO U. The development of an international registry[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2010, 5(S2): S196-S197.
- [58] SITNIK S, MASEMANN D, LEITE DANTAS R, et al. PD-1 IC inhibition synergistically improves influenza A virus-mediated oncolysis of metastatic pulmonary melanoma[J]. *Molecular Therapy Oncolytics*, 2020, 17: 190-204.
- [59] ANDTBACKA R H I, KAUFMAN H L, COLLICHIO F, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2015, 33(25): 2780-2788.
- [60] ANDTBACKA R H, ROSS M, PUZANOV I, et al. Patterns of clinical response with talimogene laherparepvec (T-VEC) in patients with melanoma treated in the OPTiM phase Ⅲ clinical trial[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2016, 23(13): 4169-4177.
- [61] BOMMAREDDY P K, PATEL A, HOSSAIN S, et al. Talimogene laherparepvec (T-VEC) and other oncolytic viruses for the treatment of melanoma[J]. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2017, 18(1): 1-15.
- [62] JOHNSON D B, PUZANOV I, KELLEY M C. Talimogene laherparepvec (T-VEC) for the treatment of advanced melanoma[J]. *Immunotherapy*, 2015, 7(6): 611-619.
- [63] ALCAZER V, BONAVENTURA P, TONON L, et al. Neopeptides-based vaccines: challenges and perspectives[J]. *European Journal of Cancer*, 2019, 108: 55-60.
- [64] BLASS E, OTT P A. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2021, 18(4): 215-229.
- [65] YARCHOAN M, JOHNSON B A 3RD, LUTZ E R, et al. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2017, 17(9): 569.
- [66] TWUMASI-BOATENG K, PETTIGREW J L, EUNICE KWOK Y Y E, et al. Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18(7): 419-432.
- [67] GERLACH T, ELBAHESH H, SALETTI G, et al. Recombinant influenza A viruses as vaccine vectors[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2019, 18(4): 379-392.
- [68] JI D Z, ZHANG Y J, SUN J Q, et al. An engineered influenza virus to deliver antigens for lung cancer vaccination[J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2023[2023-12-01]. <https://www.nature.com/articles/s41587-023-01796-7>.
- [69] SHARMA P, ALLISON J P. The future of immune checkpoint therapy[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 56-61.
- [70] WEI S C, DUFFY C R, ALLISON J P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy[J]. *Cancer Discovery*, 2018, 8(9): 1069-1086.
- [71] WANG G, KANG X, CHEN K S, et al. An engineered oncolytic virus expressing PD-L1 inhibitors activates tumor neoantigen-specific T cell responses[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1395.
- [72] RIBAS A, DUMMER R, PUZANOV I, et al. Oncolytic virotherapy promotes intratumoral T cell infiltration and improves anti-PD-1 immunotherapy[J]. *Cell*, 2017, 170 (6): 1109-1119 e10.
- [73] HILDNER K, EDELSON B T, PURTHA W E, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity[J]. *Science*, 2008, 322(5904): 1097-1100.
- [74] BOMMAREDDY P K, SHETTIGAR M, KAUFMAN H L. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2018, 18(8): 498-513.
- [75] RUSSELL S J, BARBER G N. Oncolytic viruses as antigen-agnostic cancer vaccines[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(4): 599-605.
- [76] SUN F, XU Y, DENG Z Y, et al. A recombinant oncolytic influenza virus expressing a PD-L1 antibody induces CD8<sup>+</sup> T-cell activation via the cGas-STING pathway in mice with hepatocellular carcinoma[J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 120: 110323.
- [77] HOSSEINI A, GHARIBI T, MAROFI F, et al. CTLA-4: from mechanism to autoimmune therapy[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 80: 106221.
- [78] YANG H, LEI G L, SUN F, et al. Oncolytic activity of a chimeric influenza A virus carrying a human CTLA4 antibody in hepatocellular carcinoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 875525.
- [79] LEI G L, WANG L P, DONG S H, et al. A recombinant

- influenza virus with a CTLA4-specific scFv inhibits tumor growth in a mouse model[J]. *Cell Biology International*, 2021, 45(6): 1202-1210.
- [80] HAMILTON J R, VIJAYAKUMAR G, PALESE P. A recombinant antibody-expressing influenza virus delays tumor growth in a mouse model[J]. *Cell Reports*, 2018, 22(1): 1-7.
- [81] BURDACH S E, MÜSCHENICH M, JOSEPHS W, et al. Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor for prevention of neutropenia and infections in children and adolescents with solid tumors. Results of a prospective randomized study[J]. *Cancer*, 1995, 76(3): 510-516.
- [82] JAHAN N, TALAT H, CURRY W T. Agonist OX40 immunotherapy improves survival in glioma-bearing mice and is complementary with vaccination with irradiated GM-CSF-expressing tumor cells[J]. *Neuro-Oncology*, 2018, 20(1): 44-54.
- [83] YANG P H, SUN F, WANG R L, et al. Oncolytic activity of a novel influenza A virus carrying granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in hepatocellular carcinoma[J]. *Human Gene Therapy*, 2019, 30(3): 330-338.
- [84] LIPKIN W I. Biocontainment in gain-of-function infectious disease research[J]. *mBio*, 2012, 3(5): e00290-12.
- [85] SEIDEL J A, OTSUKA A, KABASHIMA K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations[J]. *Frontiers in Oncology*, 2018, 8: 86.



通讯作者: 董铭心(1978—),男,教授,博士生导师。研究方向为抗病毒和神经系统小分子药物及疫苗。  
E-mail: Mxdong64@qdu.edu.cn



第一作者: 郭茜亚(1997—),女,博士研究生。研究方向为溶瘤病毒的研发策略及应用。  
E-mail: guoxiya132@163.com