

溶瘤 I 型单纯疱疹病毒的研究进展

由鹏飞 韩金乐 叶祥忠*

(北京万泰生物药业股份有限公司 北京 102206)

摘要: 溶瘤病毒(Oncolytic virus, OV)是可以靶向感染并杀伤肿瘤细胞的一类病毒,其中溶瘤 I 型单纯疱疹病毒(Oncolytic herpes simplex virus type 1, OHSV-1)是目前研究最多的溶瘤病毒之一,可通过多种策略进行构建,已有多种 OHSV-1 进入临床试验,大量结果显示其具有较好的安全性和有效性。本文主要介绍 OHSV-1 的分子生物学特性与优势、主要的开发及靶向性策略、各类 OHSV-1 的研究进展以及目前存在的问题等。

关键词: I 型单纯疱疹病毒, 溶瘤病毒, 肿瘤治疗

The research progress on oncolytic herpes simplex virus type 1

YOU Peng-Fei HAN Jin-Le YE Xiang-Zhong*

(Beijing WANTAI Biological Pharmacy Enterprise Co. Ltd., Beijing 102206, China)

Abstract: Oncolytic virus (OV) is a class of antitumor agents that selectively infect and kill tumor cells while sparing normal cells. Among various oncolytic viruses, oncolytic herpes simplex virus type 1 (OHSV-1) is one of the most widely explored agents. OHSV-1 can be constructed through various strategies. It has been investigated in clinical trials for patients with many types of cancers. These clinical studies have shown the safety and efficacy of OHSV-1. This review briefly summarizes the molecular biologic characteristics and advantages of OHSV-1, the development and targeting strategies of OHSV-1, the progresses in research on various OHSV-1 and discusses the currently problems with OHSV-1 in cancer therapy.

Keywords: Herpes simplex virus type 1, Oncolytic virus, Tumor therapy

溶瘤病毒(Oncolytic virus, OV)是指能特异性感染肿瘤细胞,并在肿瘤细胞中增殖,最终裂解肿瘤细胞的一类病毒,是目前肿瘤治疗领域中研究较多的新型基因治疗药物,有多种病毒已被用于改造成为 OV,其中 I 型单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus type 1, HSV-1)由于其自身具有的很多优势被广泛用作 OV 载体^[1-3]。

HSV-1 通常是通过基因工程手段被改造成为

溶瘤 I 型单纯疱疹病毒(Oncolytic herpes simplex virus type 1, OHSV-1), OHSV-1 主要分为基因缺失的、肿瘤靶向性的和携带肿瘤治疗基因的三类。目前已有多种 OHSV-1 进行了临床前及临床试验研究,大量结果显示其具有良好的安全性和有效性。本文就 HSV-1 的分子生物学特性与优势、OHSV-1 主要的开发及靶向性策略、各类 OHSV-1 的研究进展以及目前存在的问题进行综述。

*通讯作者: Tel: 86-10-59528966-5089; ✉: yxzh_hb@163.com

收稿日期: 2014-11-19; 接受日期: 2015-02-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-06

1 HSV-1 及其分子生物学特性

HSV-1 是一种嗜神经、有包膜的双链 DNA 病毒,属于疱疹病毒科 α 病毒亚科,其基因组长为 152 kb,由 2 个相互连接的长节段 UL 和短节段 US 组成,各节段末端为倒转重复序列 TRL 和 TRS,两片段连接处为内部反向重复序列 IR,IR 包括 IRL 和 IRS,分别是 TRL 和 TRS 的反向重复序列(图 1)。HSV-1 基因组编码约 90 种蛋白,其表达有很高的时序性,按病毒基因表达的顺序可将其分为极早期基因(Immediate early, IE)、早期基因(Early, E)和晚期基因(Late, L),其中极早期基因最先转录,其表达产物继而激活早期基因和晚期基因,极早期基因包括 ICP0、ICP4、ICP22、ICP27 和 ICP47 等 5 个感染细胞蛋白(Infected cell protein, ICP)基因^[4]。

HSV-1 是第 1 种通过基因突变的手段改造成为 OV 的病毒^[6],其作为 OV 载体具有以下优势:(1) HSV-1 的基因组较大,其中约一半为病毒复制非必需基因,因此,HSV-1 可改造空间较大;(2) HSV-1 复制时间短(少于 20 h),感染效率高;(3) 病毒基因组不会整合到宿主细胞基因组中,摒除了插入突变的风险;(4) HSV-1 在免疫功能正常的成年人中很少引起严重疾病,其复制过程可通过抗疱疹病毒类药物加以阻断,使治疗可控;(5) HSV-1 可以感染多种动物细胞,容易在动物模型上做临床前药效评价,降低产品的开发风险。但是,由于 HSV-1 的基因组很大,且有多个基因为双拷贝,因此,对 HSV-1 进行遗传改造就相对困难,限制了 OHSV-1 的发展。经过近几十年的研究,HSV-1 的遗传改造方法已取

得了很大进展^[7],目前构建 OHSV-1 主要的遗传改造方法有:(1) 同源重组:这是一种早期的 HSV-1 遗传操作技术,主要过程是将 HSV-1 基因组和含有病毒基因组同源序列的目的基因载体共转染至细胞内,使其发生同源重组,将目的基因重组至 HSV-1 基因组上,这种方法适用范围广,但病毒重组效率很低。(2) 细菌人工染色体(Bacterial artificial chromosomes, BAC)技术:该技术是目前 HSV-1 载体构建的主流技术,首先是构建一个携带目的基因及同源臂的 BAC 质粒,与病毒基因组一起共转染细胞,经细胞内同源重组把 BAC 质粒插入病毒基因组中,然后提取可复制的重组病毒基因组环状中间体并转化大肠杆菌,从而获得大量的 HSV-BAC,在对 HSV-BAC 进行遗传操作后转染细胞,收获重组病毒^[8]。BAC 技术具有容量大、无需辅助病毒及操作简单的优点。(3) Cre/LoxP 位点特异性重组系统:该方法是在 BAC 技术的基础上发展起来的,Cre 重组酶是由大肠杆菌 P1 噬菌体编码的一种蛋白质,能特异性地识别 LoxP 位点并催化该位点间的重组,可在 BAC 两侧插入方向相同的 LoxP 位点,当 HSV-BAC 与带有 Cre 重组酶基因的细胞杂交时,Cre 重组酶就能将两个 LoxP 位点中间的 BAC 切除,该系统具有快速、有效的优点。HSV-1 遗传改造方法的快速发展大大推动了 OHSV-1 的开发,表 1 列出了主要的 OHSV-1 的改造方式及研究进展。

2 基因缺失的 OHSV-1

基因缺失的 OHSV-1 构建的一般策略为突变或缺失病毒的单个或多个基因以实现其对肿瘤的特

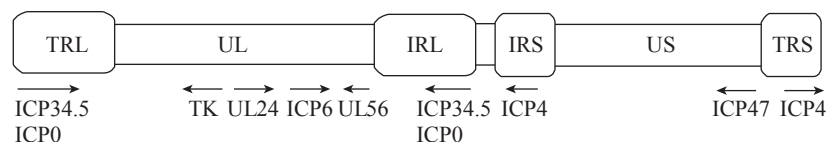


图 1 HSV-1 基因组结构简图^[5]

Figure 1 Schematic of the HSV-1 genome^[5]

表 1 OHSV-1 的遗传改造和临床试验
Table 1 Genetic modification and clinical trials of OHSV-1

病毒名称 Virus name	基因改造 Genetic modification	治疗基因 Therapeutic transgenes	研究进展 Clinical trials
dlspTk	tk 基因	无	临床前
R1716	双拷贝 γ 34.5 基因	无	临床 I 期
hrR3	UL39 基因	无	临床前
KTR27	ICP0 基因删除, ICP27 四环素调控	无	临床前
NV1020	UL24、UL55、UL56 和单拷贝 γ 34.5 基因删除, tk 前插入 ICP4 启动子	无	临床 II 期
G207	UL39、双拷贝 γ 34.5 基因	无	临床 Ib/II 期
G47 Δ	UL39、双拷贝 γ 34.5、ICP47 基因	无	临床前
Myb34.5	单拷贝 γ 34.5、ICP6 基因	无	临床前
G92A	tk 基因删除, ICP4 基因前加入白蛋白增强子	无	临床前
R5141	gB 和 gC 部分被替换成 IL-13, gD 插入一些氨基酸序列	无	临床前
OncoVex ^{GM-CSF}	ICP47 和双拷贝 γ 34.5 基因	GM-CSF 基因	临床III期
HSV1 γ CD	UL39 基因	酵母胞嘧啶脱氨酶基因	临床前
rRp450	UL39 基因	细胞色素 P450 基因	临床前

异性杀伤作用, 这些基因是病毒在肿瘤细胞中增殖非必需而在正常细胞中增殖所不可或缺的。基因缺失的 OHSV-1 包括单基因缺失的第 1 代和多基因缺失的第 2 代 OHSV-1。

2.1 第 1 代(单基因缺失) OHSV-1

第 1 代 OHSV-1 构建的一般策略是删除一个在正常细胞复制中必不可少, 但在肿瘤细胞复制中非必需的病毒基因, 例如胸苷激酶(Thymidine kinase, TK)、核糖核苷酸还原酶(Ribonucleotide reductase, RR)、神经毒性因子 ICP34.5 (γ 34.5)以及某些 ICP 基因等。

TK、RR 是脱氧核糖核苷三磷酸(Deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)合成所必需的, 在正常细胞中 dNTP 仅在细胞处于 G1 和 S 复制周期中表达才会上调, 在其他时期的表达量都很低, 因此, 只有快速增殖的肿瘤细胞才能为这类基因缺失的 OHSV-1 提供所缺失的酶, 从而促进其复制并抑杀肿瘤。tk 基因缺失的 OHSV-1 dlspTk 可抑制裸鼠脑内的神经胶质瘤生长, 但试验证实其在重症联

合免疫缺陷小鼠的正常组织中有增殖, 随深入研究发现, dlspTk 仍然保留了神经毒力, 另外, 抗疱疹病毒药物甘昔洛韦(Gancyclovir, GCV)或阿昔洛韦(Acyclovir, ACV)可被病毒的 TK 选择性磷酸化, 从而抑制病毒 DNA 的复制, 常被用来控制 OHSV-1 的治疗进程, 但由于 dlspTk 缺失了 tk 基因, 因此, 无法使用这两种药控制 dlspTk 的治疗过程。基于以上原因, tk 基因缺失的 HSV-1 已被放弃^[9]。

ICP34.5 (γ 34.5)为双拷贝的神经毒基因, 其编码产物为 HSV-1 在神经细胞中增殖所必需的, 当双拷贝 ICP34.5 基因被删除时, 病毒在神经细胞及其他生长缓慢的细胞中的复制被抑制, 但在快速分裂的细胞中能高效复制增殖。HSV1716 是删除了双拷贝 ICP34.5 的 OHSV-1, 在治疗高级神经胶质瘤的 III 期临床中, 被证实能在瘤细胞内增殖, 并能有效杀伤瘤细胞, 未发现严重不良反应^[10]。另外, HSV1716 治疗非中枢神经系统实体瘤的 I 期及治疗恶性胸膜间皮瘤 I/II 期临床试验正在开展。

ICP6 是 HSV-1 核糖核苷酸还原酶最大的亚单

位,由 UL39 基因编码,为病毒 DNA 复制所必需,hrR3 是删除 ICP6 基因的 OHSV-1,该病毒在正常细胞中复制能力显著减弱而在肿瘤细胞中能有效增殖,对模型动物的脑、胰腺、结肠癌均有治疗效果^[11]。

另外,ICP0 是 HSV-1 在正常细胞中以低感染复数进行表达和复制所必需的蛋白,具有泛素连接酶 E3 的功能,在激活病毒后期基因转录及调控病毒基因表达中起重要作用。Yao 等^[12]构建了一种四环素调控的 ICP0 缺失的重组 OHSV-1 KTR27。该 OHSV-1 敲除了 ICP0 基因,导致该病毒在低感染复数的情况下只能感染肿瘤细胞而无法感染正常细胞;同时,该病毒的 ICP27 受四环素调控,ICP27 是病毒复制的重要蛋白,在极低的水平即可保证病毒的复制,改造后的病毒只有在四环素及其衍生物存在的条件下才能启动该蛋白的表达,从而控制病毒的增殖,提高了病毒的安全性,研究表明该病毒在人非小细胞肺癌的裸鼠模型上有显著的治疗作用。

2.2 第 2 代(多基因缺失) OHSV-1

为提高溶瘤病毒的安全性及有效性,研究人员开发了多基因突变的第 2 代 OHSV-1,主要是在删除 ICP34.5 基因的同时缺失部分其他基因。其中包括 NV1020、G207 和 G47Δ 等,均已进入临床试验。

NV1020 缺失了单拷贝 ICP34.5、大部分 IR 区以及内源性的 tk 基因,但在 L/S 节段的接头处插入了一段 HSV-2 的多个囊膜糖蛋白编码基因和一个由 HSV-1 ICP4 基因启动子控制下的外源性的 tk 基因。NV1020 治疗结肠癌肝转移的 I/II 期临床试验已经完成^[13],4 种剂量(3×10^6 、 1×10^7 、 3×10^7 、 1×10^8 PFU)的 NV1020 通过肝动脉输注后发现,病人的不良反应轻微,安全性良好,50%的病人病情稳定,1 年后的生存率为 47.2%,较传统疗法有显著提高。

G207 在删除双拷贝 γ 34.5 基因的同时失活了 ICP6 基因。治疗恶性胶质瘤的 Ib 临床试验结果显示,瘤内注射高达 3×10^9 PFU 的 G207 后仍未出现严重的不良反应,具有较好的安全性^[14]。G207 与

放射性疗法相结合治疗神经胶质瘤,I 期临床试验结果显示其具有良好的安全性^[15]。另有研究表明,G207 在黑色素瘤、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、头颈部癌、卵巢癌、胰腺癌和前列腺癌等肿瘤的动物模型上也均有治疗作用。

G47Δ 是在 G207 的基础上删除了能抑制 MHC-I 递呈抗原的 ICP47 基因。研究表明 G47Δ 能有效激活宿主抗肿瘤免疫反应,与抗肿瘤药物联合使用能显著延长胶质母细胞瘤的裸鼠的存活时间^[16],目前已进入临床试验。

3 肿瘤靶向性 OHSV-1

实现 OHSV-1 的肿瘤靶向性有多种方法,首先可以通过上述基因缺失的方法实现,但为了提高其有效性和安全性,人们开发出特异性更强的肿瘤靶向性 OHSV-1,其改造策略主要是通过对病毒关键基因进行靶向表达调控(主要是转录靶向性 OHSV-1)或者对病毒的细胞靶向性相关蛋白(细胞表面蛋白靶向性 OHSV-1)进行修饰来实现^[5],该类 OHSV-1 具有更好的特异性和安全性。

3.1 转录靶向性 OHSV-1

该类 OHSV-1 的构建方法是控制病毒复制所需基因的转录靶向性,即在哪些基因前插入组织和(或)肿瘤特异性启动子来控制病毒在肿瘤细胞内复制,从而增强 OHSV-1 的肿瘤特异性,例如 Myb34.5、G92A 等。

Myb34.5 是 HSV-1 缺失了内源的双拷贝 ICP34.5,又在 ICP6 基因位点处插入了一个由 B-myb 启动子控制的 ICP34.5 基因,导致 ICP6 基因失活。B-myb 在很多肿瘤细胞中呈高表达状态,但在正常细胞中不表达或低表达,因此提高了病毒的肿瘤靶向性^[17]。白蛋白启动子具有肝脏组织特异性,G92A 是在 HSV-1 tk 基因失活的基础上在立早期蛋白 ICP4 基因前加入白蛋白增强子构建而成的,能在肝癌细胞中特异性复制^[18]。

3.2 细胞表面蛋白靶向性 OHSV-1

HSV-1 可通过病毒表面糖蛋白 gB 和 gC 与细胞

表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (Heparan sulfate proteoglycan, HSPG) 低亲和力结合, 从而改变糖蛋白 gD 的构象, 促其与细胞表面受体 (例如 Nectin-1, HveA) 高亲和力结合而侵入细胞。将与侵入细胞相关的病毒蛋白进行改造, 使其只能特异性结合肿瘤细胞表面的受体, 是实现病毒肿瘤靶向性的一个可行手段。例如在 OHSV-1R5141 中, gB 和 gC 与 HSPG 的结合部分被替换成白介素-13 (Interleukin-13, IL-13) 的氨基酸序列, 且 gD 与 HveA 和 Nectin-1 结合位点的周围被插入多个氨基酸序列, 阻断其与 HveA 和 Nectin-1 的结合能力, 因此, R5141 仅能依靠通常在恶性胶质瘤和高级星形细胞瘤表面表达的 IL-13R α 2 受体进入宿主细胞, 从而达到特异性杀伤肿瘤细胞的作用^[19]。另外, 许多细胞表面蛋白, 如表皮生长因子受体、叶酸受体、CD44 等在肿瘤细胞上的表达水平也均有上调, 这为靶向性 OHSV-1 的开发提供了更广阔的思路。

4 携带肿瘤治疗基因的 OHSV-1

虽然上述几种 OHSV-1 都已在临床前或临床阶段取得了较好的结果, 但目前很多研究表明单凭病毒自身很难达到彻底消除肿瘤的效果。因此, 为了增强其溶瘤效果, 可以在基因缺失的基础上引入一些对肿瘤有治疗作用的基因, 例如免疫刺激分子和前药转换酶的基因, 这方面研究也取得了很大进展。

重组表达免疫刺激分子的 OHSV-1 在发挥溶瘤作用的同时能有效诱发机体的抗肿瘤免疫应答, 其中粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 是较常引入的免疫刺激分子。GM-CSF 可诱导骨髓前体细胞活化并募集树突细胞, 增强粒细胞和巨噬细胞的活性, 使机体产生抗肿瘤免疫应答。由 BioVex 公司开发的 OncoVEX^{GM-CSF}, 删除了双拷贝的 ICP34.5 和 ICP47 基因, 并在 ICP34.5 的位置插入双拷贝的 GM-CSF 基因。OncoVEX^{GM-CSF} 的 I 期临床以实体瘤皮肤转移病灶、头颈癌和胃肠道癌以及恶

性黑色素瘤为研究对象的瘤内注射, 结果机体的耐受性良好, 未出现严重并发症, 病毒注射部位表现为炎症和坏死; II 期临床试验结果显示有 26% 的缓解率; 目前, 以治疗皮肤癌和恶性黑色素瘤 (头、颈部) 为目标的 III 期临床试验已开展^[20-21]。在中国已批准进入临床试验的奥瑞克 010 (OrienX010) 是以 HSV-1 为载体, 删除了病毒的致病基因, 并插入人源性的 GM-CSF 基因, 由临床前安全性评价结果显示其对小鼠毒性较低、耐受性良好, 豚鼠无过敏反应, 家兔血红细胞无溶血反应^[22]。另外, 白介素-12 (Interleukin-12, IL-12) 也可被用于 OHSV-1 的构建中, IL-12 能促进抗肿瘤细胞免疫应答, M032 是删除 HSV-1 的双拷贝的 ICP34.5 基因, 并插入人的 IL-12 基因, 在治疗神经胶质瘤的临床前试验中显示出良好的安全性和有效性^[23]。

前药转换酶例如胞嘧啶脱氢酶 (Cytosine deaminase, CD) 和细胞色素 p450 氧化酶, 通过诱导有毒物质表达而增强细胞毒性。酵母 CD 可将 5-氟胞嘧啶转换成 5-氟尿嘧啶, 后者可抑制 DNA 合成, HSV1 γ CD 是在 HSV-1 ICP6 基因失活的基础上插入 CD 序列, 在小鼠肝转移模型中能有效延长小鼠存活时间, 且不影响病毒复制^[24]。细胞色素 P450 氧化酶是将安道生 (Cyclophosphamide, CPA) 转化成磷酸氮芥 (Phosphoramidate mustard, PM) 而发挥细胞毒作用, 将大鼠细胞色素 P450 基因插入重组的 HSV-1 中构建成 rRp450, 对肝癌细胞具有较好的杀伤作用^[25]。

5 问题与展望

虽然 OHSV-1 在临床前及临床试验中显现出较好的安全性和有效性, 但仍存在一些问题:

(1) 目前溶瘤病毒的给药方式一般为瘤内注射, 这种方式虽然可以排除机体的抗 HSV-1 的免疫应答, 但是对很多实体瘤治疗的给药带来了困难, 且只能对已发现的实体瘤进行治疗; 相比较而言, 静脉注射的给药方式可以解决该问题, 且对原发和转移病灶都能进行抑杀, 但其最大障碍就是要克服

机体的抗病毒免疫反应来达到治疗的有效浓度,因此需要寻找新型载体将溶瘤病毒输送到肿瘤组织发挥治疗作用。近年来的研究表明,用某些细胞例如抗原特异性T细胞、巨噬细胞、树突状细胞等^[26-27]包装溶瘤病毒后,可以使其避免被机体免疫系统清除,并能被靶向运输至肿瘤组织,继而可以感染并杀伤肿瘤细胞,该方法是具有较大前景的新技术,有望成为肿瘤生物治疗的一种重要手段。

(2) HSV-1 具有较强的免疫原性,可诱导机体产生特异性抗体,该抗体无法清除病毒,但能引发变态和炎症反应,因此应采取多种方法来提高其肿瘤特异性。其中,发展多重靶向的 OHSV-1 是未来发展的重要方向,也可通过采取四环素调控病毒复制必需基因例如 ICP27^[12],或利用抗单纯疱疹病毒药物阿昔洛韦等调控手段来提高其安全性。

(3) 当重组 HSV-1 感染有野生 HSV-1 潜伏的细胞时,二者可能发生同源重组并产生携带生物活性基因的毒性病毒,虽然在动物试验中没有发现野生病毒重新被激活产生显著的危害,但对人类的危害尚不明确。而且,这不仅对接受治疗的患者存在一定危害,与患者紧密接触者也有被感染的可能。另外,较野生株病毒而言,多基因删除的 HSV-1 滴度有显著降低,这给重组 HSV-1 的生产带来一定困难,虽然用表达 HSV-1 删除基因的重组细胞培养该病毒可以提高病毒产量,但二者也可能发生重组进而带来一定的风险,因此需要大量的临床试验数据来确认其安全性。

综上所述,OHSV-1 可通过多种机制靶向和杀伤肿瘤细胞,大量临床前及临床试验结果显示 OHSV-1 在多种恶性肿瘤治疗中均具有较好的安全性及抗肿瘤疗效。但目前大部分 OHSV-1 药物仍处在临床前或临床试验阶段,其安全性和有效性需要进一步验证。另外,在给药方式上还需做大量的研究工作以消除机体的抗病毒免疫应答以及提高肿瘤靶向性。相信随着各方面研究不断取得新的进展,目前存在的问题会得到解决,OHSV-1 也将会成为肿瘤治疗的主要手段之一。

参考文献

- [1] Manservigi R, Argnani R, Marconi P. HSV recombinant vectors for gene therapy[J]. *The Open Virology Journal*, 2010, 18(4): 123-156
- [2] Liu S, Dai M, You L, et al. Advance in herpes simplex viruses for cancer therapy[J]. *Science China Life Sciences*, 2013, 56(4): 298-305
- [3] Ning J, Wakimoto H. Oncolytic herpes simplex virus-based strategies: toward a breakthrough in glioblastomatherapy[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 20(5): 303
- [4] Shen Y, Nemunaitis J. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2006, 13(11): 975-992
- [5] Ke X. Viral Gene Therapy[M]. Croatia: In Tech, 2011: 381, 391-395
- [6] Workenhe ST, Simmons G, Pol JG, et al. Immunogenic HSV-mediated oncolysis shapes the antitumor immune response and contributes to therapeutic efficacy[J]. *Molecular Therapy*, 2014, 22(1): 123-131
- [7] Tian L, Xue JL, Jia WG. Oncolytic herpes simplex virus and its advances in cancer therapy[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2008, 20(5): 734-741 (in Chinese)
田聆, 薛京伦, 贾韦国. 溶瘤单纯疱疹病毒治疗技术及其进展[J]. *生命科学*, 2008, 20(5): 734-741
- [8] Horsburgh BC, Hubinette MM, Qiang D, et al. Allelreplacement: an application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes[J]. *Gene Therapy*, 1999, 6(5): 922-930
- [9] Zhu H, Guo JX, Ma ZH. The research progress on HSV-1 oncolytic virus[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012, 24(3): 236-241 (in Chinese)
朱慧, 郭景霞, 马正海. HSV-1 溶瘤病毒的研究进展[J]. *生命科学*, 2012, 24(3): 236-241
- [10] Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, et al. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumor following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival[J]. *Gene Therapy*, 2004, 11(22): 1648-1658
- [11] Todo T. Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2008, 1(13): 2060-2064
- [12] Yao F, Murakami N, Bleiziffer O, et al. Development of a regulatable oncolytic herpes simplex virus type 1 recombinant virus for tumor therapy[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(16): 8163-8171
- [13] Geevarghese SK, Geller DA, De Haan HA, et al. Phase I/II clinical study of oncolytic herpes simplex virus NV1020 in patients with extensively pre-treated refractory colorectal cancer metastatic to the liver[J]. *Human Gene Therapy*, 2010, 21(9): 1119-1128
- [14] Markert JM, Liechty PG, Wang W, et al. Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre-and post-tumor resection for recurrent GBM[J]. *Molecular Therapy*, 2009, 17(1): 199-207
- [15] Markert JM, Razdan SN, Kuo HC, et al. Phase I trial of oncolytic HSV-1, G207, given in combination with radiation for recurrent GBM demonstrates safety and radiographic responses[J]. *Molecular Therapy*, 2014, 22(5): 1048-1055
- [16] Cheema TA, Kanai R, Kim GW, et al. Enhanced antitumor efficacy of low-dose etoposide with oncolytic herpes simplex virus in human glioblastoma stem cell xenografts[J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(23): 7383-7393
- [17] Chung RY, Saeki Y, Chiocca EA. B-myb promoter retargeting of herpes simplex virus gamma 34.5 gene-mediated virulence

- toward tumor and cycling cells[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(9): 7556-7564
- [18] Miyatake SI, Tani S, Feigenbaum F, et al. Hepatoma-specific antitumor activity of an albumin enhancer-promoted regulated herpes simplex virus *in vivo*[J]. *Gene Therapy*, 1999, 6(4): 564-572
- [19] Zhou G, Roizman B. Construction and properties of a herpes simplex virus 1 designed to enter cells solely via the IL-13 alpha2 receptor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(14): 5508-5513
- [20] Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpes virus in patients with unresectable metastatic melanoma[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(34): 5763-5771
- [21] Kaufman HL, Kim DW, Deraffele G, et al. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patient with stage IIIc and IV melanoma[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2010, 17(3): 718-730
- [22] Wang SL, Jiang H, Shen LZ, et al. Preclinical safety evaluation of OrienX 010[J]. *Food and Drug*, 2010, 12(7): 244-247 (in Chinese)
王三龙, 姜华, 沈连忠, 等. 奥瑞克010临床前安全性评价[J]. *食品与药品*, 2010, 12(7): 244-247
- [23] Roth JC, Cassady KA, Cody JJ, et al. Evaluation of the safety and biodistribution of M032, an attenuated herpes simplex virus type 1 expressing hIL-12, after intracerebral administration to aotus nonhuman primates[J]. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 2014, 25(1): 16-27
- [24] Nakamura H, Mullen JT, Chandrasekhar S, et al. Multimodality therapy with a replication-conditional herpes simplex virus 1 mutant that expresses yeast cytosine deaminase for intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil[J]. *Cancer Research*, 2001, 61(14): 5447-5552
- [25] Pawlik TM, Nakamura H, Mullen JT, et al. Prodrug bioactivation and oncolysis of diffuse liver metastases by a herpes simplex virus 1 mutant that expresses the CYP2B1 transgene[J]. *Cancer*, 2002, 95(5): 1171-1181
- [26] Su XS, Zhang L. Advances in cell carriers for oncolytic viruses in cancer therapy[J]. *Tumor*, 2011, 31(1): 85-88 (in Chinese)
苏晓三, 张蕾. 细胞荷载溶瘤病毒治疗肿瘤的研究进展[J]. *肿瘤*, 2011, 31(1): 85-88
- [27] Chen Y, Qian QJ. Cell carriers for oncolytic viruses: recent progress[J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2011, 18(3): 331-336 (in Chinese)
陈艳, 钱其军. 携带溶瘤病毒细胞载体的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(3): 331-336