



溶瘤新城疫病毒: 肿瘤免疫治疗时代的新机遇

杜莎^{1†}, 姜珂^{2†}, 丁铲^{3*}, 许青^{4*}, 李文斌^{5*}, 孟松树^{1*}

1. 大连医科大学肿瘤干细胞研究院, 大连 116044;
2. 上海交通大学医学院单细胞组学与疾病研究中心, 上海 200025;
3. 中国农业科学院上海兽医研究所禽类感染性疾病部, 上海 200241;
4. 同济大学附属上海市第十人民医院医学肿瘤部, 上海 200072;
5. 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科中心神经肿瘤部, 北京 100070

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: shovelden@shvri.ac.cn; xuqingmd@aliyun.com; liwenbin@ccmu.edu.cn; ssmeng@dmu.edu.cn

收稿日期: 2021-10-25; 接受日期: 2021-11-16; 网络版发表日期: 2021-12-15

摘要 新型溶瘤病毒疗法治疗肿瘤, 是目前肿瘤免疫治疗研究的热点之一。溶瘤新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)作为一种新型抗癌制剂, 在肿瘤治疗中利用肿瘤细胞中有缺陷的抗病毒防御, 选择性地感染复制和裂解肿瘤细胞, 增强肿瘤抗原暴露, 促进免疫细胞的招募, 激活抗肿瘤免疫应答, 从而发挥抗肿瘤作用。基于溶瘤NDV独特的抗肿瘤特性及其与患者免疫系统的相互作用, 溶瘤NDV与其他免疫疗法联用可以增强抗肿瘤功效, 具有广阔的应用前景。本文从溶瘤NDV的结构、溶瘤机制、溶瘤NDV在肿瘤治疗领域的临床前研究和临床应用、联合免疫治疗的应用及未来展望等方面进行综述。

关键词 溶瘤病毒, 新城疫病毒, 肿瘤免疫治疗, 联合免疫治疗

癌症严重威胁人类健康, 目前手术、放疗仍是癌症的主要治疗方法, 但这些传统治疗方法副作用大, 缺乏靶向性, 治疗效果欠佳。溶瘤病毒(oncolytic virus, OV)是天然的或经人工改造的、能选择性地在肿瘤组织中复制、直接或间接抑制肿瘤细胞生长的一类病毒。溶瘤病毒的溶解潜力与病毒种类、剂量、自然或诱导的病毒趋向性、肿瘤细胞不同形式细胞死亡敏感性等相关。与其他治疗手段相比, 溶瘤病毒具备多个优点, 包括杀伤作用强、不易产生耐药性、副作用低、低成本等。此外, 多项临床实验显示, 除单独使用外, 溶瘤病毒与传统的癌症治疗相结合, 显示出更好的疗

效。目前, 包括新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)、腺病毒、腮腺炎病毒、单纯疱疹病毒、痘苗病毒、呼肠弧病毒、甲型流感病毒、细小病毒等在内的多种溶瘤病毒已进入临床试验阶段。2000~2020年, 总计有97项相互独立的临床试验汇报溶瘤病毒治疗癌症的临床试验结果, 治疗的癌症类型包括黑色素瘤、胃肠道肿瘤、胰腺癌等。由国家管理机构批准的第一个溶瘤病毒是ECHO-7肠道病毒RIGVIR, 2004年在拉脱维亚批准用于治疗皮肤黑色素瘤, 并在格鲁吉亚(2015年)和亚美尼亚(2016年)获批。2005年, 中国食品药品监督管理局(China Food and Drug Administration,

引用格式: 杜莎, 姜珂, 丁铲, 等. 溶瘤新城疫病毒: 肿瘤免疫治疗时代的新机遇. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 1623–1636
Du S, Jiang K, Ding C, et al. Oncolytic Newcastle disease virus: a new opportunity in the era of tumor immunotherapy (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 1623–1636, doi: 10.1360/SSV-2021-0434

CFDA)批准了上海三维生物公司开发的重组人5型腺病毒注射液Oncorine(H101), 用于治疗头颈部肿瘤。2015年, 美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)和欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)先后批准了安进(Amgen)公司开发的基于1型单纯疱疹病毒的IMLYGIC(talimogene laherparepvec, T-VEC), 用于治疗晚期黑色素瘤。2021年, 第一三共(Daiichi Sankyo)公司宣布, 溶瘤病毒Delytact(teserpaturev/G47Δ)获得日本厚生劳动省的条件性限时批准, 用于治疗恶性胶质瘤, 这是世界上首款获批治疗原发性脑瘤的溶瘤病毒制剂。2020年8月7日, 中国国家药品监督管理局药品评审中心发布了“关于公开征求《溶瘤病毒类药物临床试验设计指导原则(征求意见稿)》意见的通知”。2021年, 上海第十人民医院许青教授组织撰写了溶瘤病毒专家共识第一版, 这是国内首次对溶瘤病毒研发提出的纲领性指导。此外, 国外涌现出不少溶瘤病毒创新公司, 如2001年纳斯达克上市的Oncolytics Biotech, 2018年纳斯达克上市的Replimune, 在奥斯陆证券交易所OSE上市的溶瘤病毒公司Targovax, 在日本上市的溶瘤病毒公司Oncolys Biopharma, 预计这些公司的溶瘤病毒产品将在未来几年内获得批准。国内目前也有不少创新企业以及一些大型药企布局溶瘤病毒研发。近期报道了乐普生物购买了GC Oncology公司开发的一款溶瘤病毒CG0070(一种重组腺病毒Ad5)在中国区的开发、制造及商业化的授权, 并已获准开展针对浸润性膀胱癌的临床试验。此外, 针对CG0070, 乐普生物将进一步开发结直肠癌、肝癌及乳腺癌等其他适应症领域。据不完全统计, 国内外大约有180多款溶瘤病毒项目处于III期临床阶段, 覆盖80%以上的实体瘤。恶性胶质瘤缺乏有效治疗手段, 患者平均生存期仅为14~21个月。由于血脑屏障的存在, 很难开发出可以突破血脑屏障的药物。近期北京天坛医院李文斌教授启动一项针对复发的中枢神经系统肿瘤的一款溶瘤病毒治疗临床试验。这项临床试验及日本批准的治疗胶质瘤的溶瘤病毒试验表明, 溶瘤病毒对一些死亡率高, 缺乏有效治疗手段的恶性肿瘤, 如恶性脑胶质瘤, 展示出独特的临床效果。

近年来, 免疫疗法成功正在颠覆着整个肿瘤治疗领域, 该疗法包括免疫细胞疗法^[1]、肿瘤疫苗^[2]、免疫检查点抑制^[3]等, 其中最具代表性的是包括

CTLA-4抗体、PD-1抗体以及PD-L1抗体等在内的免疫检查点抑制剂。但值得注意的是, 这类药物针对实体瘤时有效率却只有20%~40%, 疗效亟待改进。已发现溶瘤病毒除直接溶瘤外, 还可以通过激发抗肿瘤免疫反应发挥抗癌作用, 因此从广义上讲, 溶瘤病毒也被归类为一种新型的肿瘤免疫治疗药物, 而溶瘤病毒联合免疫疗法也成为目前肿瘤治疗领域的最热点之一, 国内外已有多个相关临床试验正在开展。2020年10月21日, 第三届“创世技”颠覆性创新榜及创新潜力榜发布, 其中一项被誉为颠覆性的医疗创新科技, 即来自癌症治疗领域的“CAR-T细胞负载溶瘤病毒治疗实体肿瘤项目”。此外, 近期一项临床试验的结果显示, T-VEC与PD-1抑制剂等免疫治疗联合使用优于单纯PD-1抑制剂。鉴于溶瘤病毒联合免疫疗法的广阔前景, 许多大公司开始相关布局与研发。近期PD-1抗体K药的生产商默沙东公司, 宣布以3.94亿美元收购一家名为Viralalytics的公司, 后者的核心产品是一款已经进入临床试验的溶瘤病毒——CVA21。

溶瘤新城疫病毒是一种来源于禽类的天然病毒, 相对于绝大多数溶瘤病毒而言, 其生物安全性极高, 并且在人群中不存在抗体。此外, 溶瘤新城疫病毒对肺有较强的嗜性, 可以通过雾化途径入肺, 靶向肺癌, 这也是溶瘤新城疫病毒的独特之处, 并已在临床试验中得到验证。而溶瘤新城疫病毒作为生物制剂用于治疗肿瘤已有60多年的历史, 目前已有多个溶瘤NDV毒株, 如HUJ和MTH/68等完成I或II期临床试验。2003年, 中国辽宁省肿瘤医院开展了利用溶瘤NDV针对消化道肿瘤的III期临床试验, 效果显著。2015年, 德国批准了NDV激活的树突状细胞疫苗(viral oncolysate-pulsed dendritic cells (VOL-DCs), Cologne, Germany)应用于肿瘤治疗。已完成的临床前和临床实验充分显示, 溶瘤NDV不仅能引起癌细胞溶解, 而且能诱导长期的抗肿瘤免疫。利用溶瘤NDV结合免疫疗法可以有效打破传统疗法的免疫抵抗问题, 其应用于肿瘤免疫治疗高效且高度安全, 具有十分广阔的前景。本课题组长期致力于溶瘤NDV研究, 从150多病毒株中筛选鉴定出FMW毒株(NDV/FMW), 临床前研究显示NDV/FMW抗癌谱广, 抗癌效果强。此外, 本课题组系统研究了NDV/FMW毒株的体内外杀瘤作用及机制, 发表研究论文十多篇, 并获批一项专利(专利号: 201810633071.3)。该专利的主要发明是DC-CIK细胞

携带溶瘤新城疫病毒治疗肿瘤。前期临床前研究显示, 装载溶瘤NDV的DC-CIK, 其杀伤肿瘤细胞的能力得到显著提升, 这既解决了溶瘤病毒的靶向问题, 又提高了DC-CIK的杀瘤效力, 为研发下一代DC-CIK细胞提供了方向, 并可解决相关免疫细胞治疗公司的产品升级换代问题。此外, 目前本课题组还在探讨利用自然杀伤(natural killer, NK)细胞或CAR-T细胞装载溶瘤NDV, 并与肿瘤医院共同推进溶瘤NDV临床试验的前期工作, 后期争取进入临床试验, 推进恶性肿瘤的治疗。

1 溶瘤NDV简介

1.1 溶瘤NDV的结构和分子生物学特征

NDV作为一种溶瘤病毒, 是一种由双层脂质膜包裹的RNA病毒, 属于副粘病毒科*Avulavirus*属的禽副粘病毒 I 型病毒(avian paramyxovirus serotype 1, APMV-1)^[4]。NDV基因组为由15186个核苷酸组成的单股负链RNA, 包含6个开放阅读框, 编码6种不同的结构蛋白: 核蛋白(nuclear protein, NP)、磷蛋白(phosphoprotein, P)、基质蛋白(matrix protein, M)、融合蛋白(fusion protein, F)、血凝素神经氨酸酶(hemagglutinin neur-

minidase, HN)和RNA依赖性的大聚合酶蛋白(RNA-dependent large polymerase protein, L)(图1)。NP, P和L蛋白质与病毒RNA结合, 形成核糖核苷酸-蛋白质复合物, 负责病毒的复制^[5-9]。脂质膜包围着核糖核苷酸-蛋白质复合物, M位于病毒脂质膜下一层, 参与病毒的组装和出芽。HN和F是以寡聚体形式存在的糖基化蛋白, 位于病毒膜外表面, 它们与宿主细胞的脂质双层膜一起构成病毒的外壳, 参与病毒感染宿主细胞的过程^[10,11]。

NDV主要感染禽类, 不感染人在内的哺乳动物。NDV感染宿主细胞的主要过程如下: (i) 由病毒表面HN和F糖蛋白与含唾液酸的宿主细胞表面蛋白结合^[12,13], 触发F蛋白的构象变化, 释放融合肽, 促进病毒包膜和细胞质膜的融合, 病毒颗粒通过内吞作用使具有附着颗粒的相邻细胞形成合胞体^[8,13,14]。病毒基因组进入宿主细胞的细胞质, M蛋白从细胞质中的核糖核蛋白复合物中分离, P和L蛋白形成聚合酶复合物, 启动病毒RNA的转录^[12,15]。(ii) 病毒基因组在宿主细胞质中复制^[16]。首先, 基因组ssRNA(-)在细胞质中转录为mRNA, 翻译成不同的结构蛋白。合成的一个全长RNA分子ssRNA(+), 被用作病毒基因组扩增的模板, 复制出完整负链病毒RNA分子, 随后产生的病毒后代

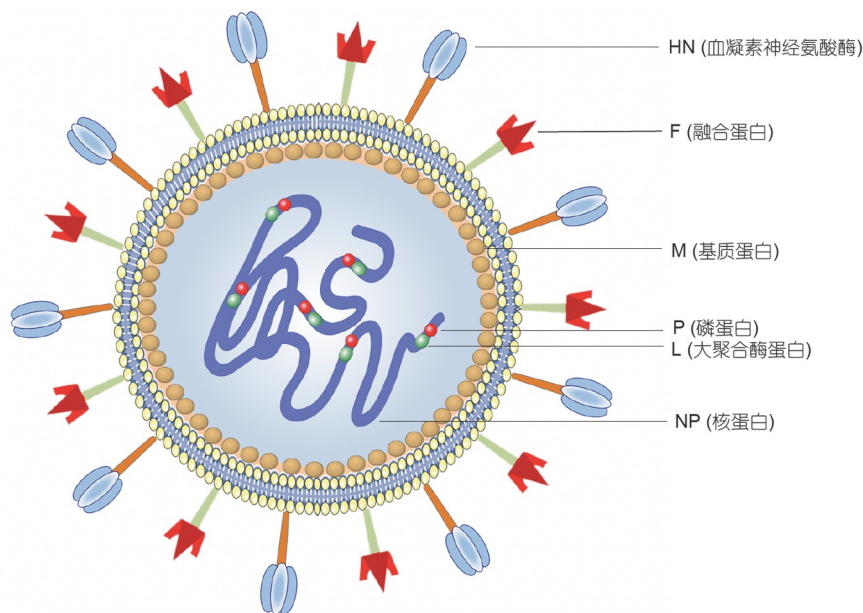


图 1 NDV的分子结构. NDV结构蛋白由NP, P, L, M, HN和F蛋白构成, 其中NP, P和L与病毒RNA结合形成核糖核蛋白复合物
Figure 1 Molecular structure of NDV. The structural proteins of NDV consist of the NP, P, L, M, HN, and F proteins; among these, the NP, P, and L proteins associate with viral RNA to form the ribonucleoprotein complex

通过出芽被释放到细胞外, 引发宿主细胞的新一轮感染^[17]. 溶瘤NDV在肿瘤细胞中的增殖过程与NDV感染禽类细胞类似.

1.2 溶瘤NDV的研究简史

使用NDV来改善癌症治疗已有50多年. 20世纪50年代, 人们发现NDV具有溶瘤特性. 第一例使用NDV治疗人类癌症(急性白血病)的报道发表于1964年^[18], 该患者在使用NDV后经历了短暂的抗白血病作用和临床症状的短暂缓解. 1965年, 来自亚特兰大的Cassel和Garret^[19]首次使用NDV(溶瘤毒株73T)作为抗肿瘤制剂. 人们在20世纪60和70年代进行了溶瘤NDV的一系列开创性研究, 然后出现了一个缺口, 当时癌症研究科学家对细胞抑制药物的开发和对肿瘤基因及肿瘤抑制基因的研究更感兴趣. 20世纪90年代和21世纪初, 人们对溶瘤病毒和NDV的研究兴趣有所回升^[20]. 50多年的NDV临床应用证明了溶瘤NDV作为生物制剂的高度安全性. 2003年, 中国辽宁省肿瘤医院分别使用NDV修饰的自体瘤苗和NDV毒株治疗消化道肿瘤患者, 其生存期显著延长(7年vs. 4.46年). 2015年, 溶瘤NDV的临床应用实现了一个重要里程碑, 即德国IOZK首次获得了生产NDV致敏树突状细胞疫苗的GMP证书. 根据良好生产规范(Good Manufacturing Practice, GMP)成功生产NDV, NDV不仅可以从鸡胚囊中产生, 而且可以从细胞培养中产生. 表1概述了50年来对NDV的研究, 包括基础研究和临床应用.

1.3 NDV的溶瘤机制

人类各种肿瘤细胞, 如肝癌^[67]、胶质母细胞瘤^[68]和淋巴瘤^[69]均对NDV敏感. 此外, 由于NDV的RNA转录和翻译与细胞增殖无关, NDV可以靶向感染肿瘤干

细胞、休眠肿瘤细胞和X射线照射的肿瘤细胞^[70].

NDV选择性感染肿瘤细胞并诱导肿瘤细胞死亡(溶瘤). NDV溶瘤的初始阶段是病毒介导肿瘤细胞的直接溶瘤, 随后第二阶段是溶瘤后引起免疫反应, 激活机体免疫系统, 将“冷肿瘤”转变为“热肿瘤”. NDV的溶瘤机制主要包括以下5个方面: (i) NDV选择性感染肿瘤细胞, 在肿瘤细胞中复制而裂解肿瘤细胞. (ii) 释放肿瘤抗原, 激活机体免疫应答, 先天性免疫和适应性免疫反应, 直接激活免疫细胞, 如巨噬细胞、针对抗原的NK细胞和细胞毒性T淋巴细胞^[71,72]. (iii) 包膜蛋白参与溶瘤作用. (iv) 凋亡通路促进溶瘤作用. (v) NDV诱导肿瘤免疫原性细胞死亡、细胞焦亡、坏死和自噬(图2).

(1) NDV选择性感染肿瘤细胞和复制. NDV感染细胞主要包括两个步骤: (i) 细胞结合、膜融合、病毒基因组的转导和病毒基因的转录^[73]; (ii) 利用新产生的核衣壳进行病毒复制^[17,74]. 所有RNA病毒的复制都涉及双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)的形成, 这种外来结构激活了基于I型干扰素(如IFN- α 和- β)的重要细胞防御系统. 肿瘤细胞的突变往往会削弱干扰素系统, 从而使细胞增殖不受抑制, 并具有凋亡抗性. 在非禽类宿主(如小鼠或人)中, 这种突变允许NDV选择性感染肿瘤细胞, 在肿瘤细胞中复制, 而NDV感染非禽类宿主的正常细胞通常不会进入第二步^[17,75]. NDV在人类肿瘤细胞中的复制速度比在大多数正常细胞中的复制速度快10000倍.

NDV毒株可分为裂解型病毒和非裂解型病毒. 这两种病毒都能杀死癌细胞, 但裂解型病毒有可能更快地杀死癌细胞, 因为它们破坏了被感染细胞的质膜. 此外, 裂解型病毒表现出多环复制, 而非裂解型病毒仅表现出单环复制. NDV诱导的凋亡依赖于TNF相关

表 1 50年来对NDV溶瘤的研究

Table 1 Fifty years of research on NDV

时间	基础研究	临床研究	参考文献
1960s	病毒溶瘤, 溶瘤后免疫	单病例的观察	[18,21,22]
1970s	研究溶瘤机制, 病毒溶瘤液	术后病毒疫苗接种	[19,23~27]
1980s	ATV-NDV活细胞疫苗	使用病毒溶瘤液疫苗接种	[27~37]
1990s	基因组测序, 免疫细胞激活机制研究	ATV-NDV吸入疫苗接种的 I~II 期试验	[38~46]
2000s	重组改良NDV毒株	全身剂量 II/III 期试验	[31,32,47~54]
2010s	高质量(GMP)病毒生产	病毒溶瘤液和DC细胞(VOL-DC)联合使用	[44,45,55~66]

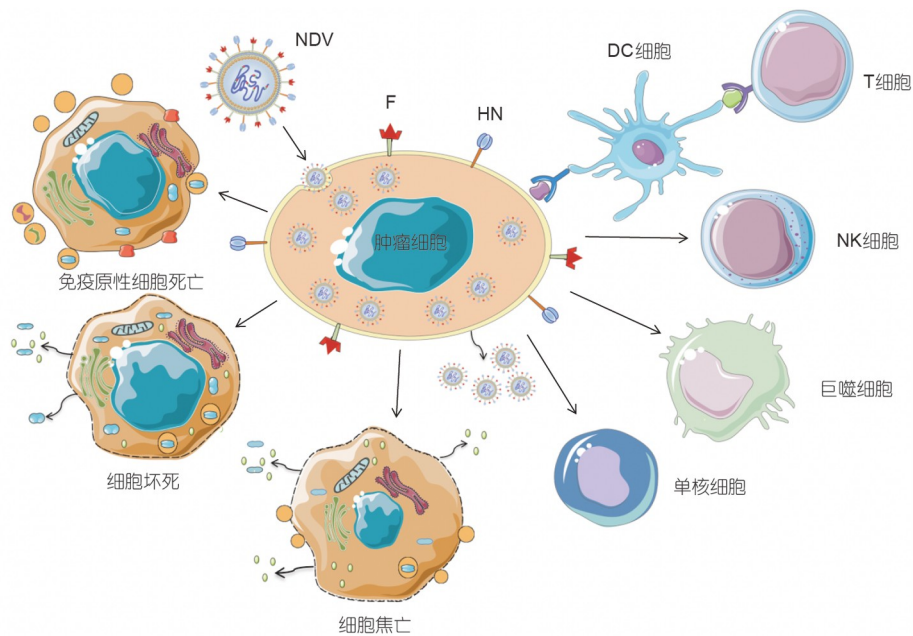


图 2 NDV感染肿瘤细胞的抗肿瘤机制. NDV通过内吞作用进入肿瘤细胞的细胞质, 刺激宿主的先天性免疫反应, 激活NK细胞、单核细胞和巨噬细胞, 促进适应性免疫反应. NDV可通过诱导肿瘤细胞免疫原性死亡、细胞坏死和细胞焦亡等杀伤肿瘤细胞

Figure 2 The antitumor mechanism of NDV infecting tumor cells. NDV enters the cytoplasm of tumor cells via endocytosis, then stimulates the innate immune response, activating natural killer cells, monocytes, and macrophages, thereby promoting the adaptive immune response. Moreover, NDV kills tumor cells by triggering immunogenic cell death, necrosis, and pyroptosis

凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)的上调和caspase的激活. 该病毒通过内源性和外源性caspase依赖的细胞死亡途径介导其溶瘤作用.

已确定的在非禽类宿主中, NDV选择性在肿瘤中复制和溶瘤的机制包括: (i) 肿瘤细胞中抗病毒信号通路激活的缺陷^[76]; (ii) 肿瘤细胞中I型IFN信号通路的缺陷^[77]; (iii) 肿瘤细胞中凋亡通路的缺陷^[68]; (iv) Ras信号激活和Rac1蛋白的表达^[78].

(2) NDV直接激活免疫细胞. (i) 激活NK细胞: NDV的病毒表面蛋白HN, 可诱导NK细胞活化. 激活NK细胞有两种受体NKp46和NKp44, 分别与信号链CD3 ζ (NKp46)和DAP12(NKp44)相关, 其包含促进信号转导的免疫受体酪氨酸基激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)结构域^[79].

(ii) 激活单核细胞和巨噬细胞: 与NDV接触后, 单核细胞被激活, 通过TRAIL产生杀瘤作用^[80]. NDV激活的巨噬细胞不仅在体外具有抗肿瘤活性, 而且在体内也具有抗肿瘤活性^[80,81]. NDV感染的巨噬细胞通过激活NF κ B产生一氧化氮(NO)^[82], 诱导肿瘤细胞凋亡. 在人类肿瘤淋巴细胞中, NO介导的、CD95依赖的

和独立的凋亡需要半胱天冬酶激活^[83].

(iii) 激活树突状细胞: 当暴露于NDV等微生物刺激物时, DC激活NF- κ B, 诱导表达促炎细胞因子, 促进CD4⁺Th1反应和CD8⁺效应T细胞的产生. NDV通过刺激DC分泌大量IFN- α , 介导先天性免疫和适应性免疫之间的联系, DC还可通过促进T细胞分泌IFN- γ 和IL-2, 触发有效的抗肿瘤免疫^[84].

(3) NDV包膜蛋白参与溶瘤作用^[85]. 研究发现, NDV的多种蛋白可以影响感染细胞, 蛋白序列分析显示M, L和F具有一个与促凋亡因子Bcl-2同源的BH-3结构域. 其中HN是重要的免疫原性蛋白和毒力因子, HN诱导人外周血单个核细胞释放I型IFN并上调TRAIL的表达^[86]. 表达NDV HN蛋白的新型溶瘤腺病毒(Ad-hTERTp-E1a-HN), 可以选择性抑制食管癌EC-109细胞并抑制小鼠肿瘤生长. 此外, 有研究表明, NDV AF2240株M蛋白通过其BH-3结构域与Bax结合, 促进Bax从细胞质向线粒体膜转移, 从而激活其固有的凋亡通路^[87].

(4) 凋亡通路参与NDV的溶瘤作用^[85]. 多项研究表明, NDV的溶瘤作用与细胞的多种凋亡途径有关,

NDV诱导细胞凋亡需要病毒复制和凋亡蛋白的表达。

外源性凋亡途径主要由死亡受体Fas及其配体FasL和TRAIL介导。例如, 由于Fas的过表达, 重组减毒株rNDV-B1/Fas在体外和体内均表现出溶瘤能力的增强。与野生型病毒相比, 重组病毒LaSota-TRAIL组的TRAIL表达增加3倍。在小鼠实验中, LaSota-TRAIL组表现为出生率显著提高和肿瘤复发减少。其他研究表明, 凋亡抑制蛋白survivin的上调可延长NDV AF2240株感染的人乳腺癌细胞的生存能力, 并增加病毒蛋白的合成和病毒复制^[88]。

(5) NDV诱导肿瘤免疫原性细胞死亡。免疫原性细胞死亡(immunogenic cell death, ICD)是溶瘤NDV介导免疫治疗的一个重要新方式。经典的生理凋亡是非免疫原性的。NDV诱导肿瘤细胞ICD的特征包括内质网应激反应、免疫原性凋亡、坏死和自噬。这种特征使蛋白质合成终止, 随后暴露于钙蛋白、热休克蛋白和病毒蛋白HN和F。本课题组与合作者先后报道了溶瘤NDV在恶性黑色素瘤及前列腺癌中引起免疫原性细胞死亡^[89,90]。

(6) 溶瘤NDV诱导坏死、自噬和铁死亡。NDV感染肿瘤细胞后, HN和F蛋白在宿主细胞表面积累, 促进细胞合胞体的形成, 导致细胞间融合, 最终引发细胞坏死、合胞体解体、内容物释放和炎症反应。caspase 8也可通过细胞TLR和TNF家族激活细胞坏死。

NDV的HN和F蛋白在肺腺癌细胞(A549)中迅速诱导合胞体形成并启动稳定的自噬, 协同诱导自噬体与溶酶体融合, 实现细胞降解。自噬有利于NDV感染早期肿瘤细胞的病毒复制, 通过调节凋亡延长细胞生命周期。有报道称, 线粒体自噬通过打破肺腺癌细胞固有的凋亡调节途径来促进NDV的复制^[91]。本课题组^[92]前期报道了NDV感染对肿瘤细胞凋亡和自噬的影响, 发现NDV引起肺癌细胞凋亡依赖于p38/MAPK通路。此外, 本课题组^[93]首次报道溶瘤NDV引起肿瘤细胞自噬, 并影响病毒在肿瘤细胞中的复制。本课题组^[94]进一步的研究发现, NDV能诱导耐顺铂肺癌细胞凋亡, 调控自噬促进NDV杀伤耐药肺癌细胞能力, 自噬调节剂氯喹和雷帕霉素可显著增强细胞自噬和NDV对小鼠A549细胞的溶瘤作用, 这一发现为探索自噬调控因子和NDV联合使用的抗肿瘤策略提供了新的思路。

此外, 本课题组^[95]参与的一项由丁铎教授主持的研究首次证实NDV引起肿瘤细胞铁死亡, 这一发现表

明, 溶瘤NDV的杀瘤作用机制及其复杂, 而溶瘤机制的多样性有助于赋予NDV更广的溶瘤谱及对放化疗抵抗肿瘤的杀伤力。综上所述, 溶瘤NDV通过多条途径及方式抑制肿瘤生长, 发挥其杀瘤作用, 为充分挖掘溶瘤NDV的临床应用价值提供了理论基础。

1.4 使用NDV作为溶瘤制剂的优势

与其他病毒家族(如逆转录病毒或DNA病毒)相比, 使用NDV作为溶瘤制剂具有以下优势。(i) NDV属于禽类病毒, 感染家禽和鸟类, 对人无致病性, 使用更安全; 溶瘤NDV静脉注射食蟹猴, 未发生血液或生化指标异常。(ii) NDV是单股负链RNA病毒, 它的复制过程发生在细胞质中, 从RNA到RNA, 不存在DNA阶段, 这种细胞质复制使病毒独立于宿主细胞DNA复制机制, 不能和宿主基因组整合, 也不与人类自身病毒发生重组。(iii) NDV体内给药方式多样, 可通过瘤内注射、静脉注射、鼻腔吸入、喷雾等多种方式, 使用方便, 癌症患者甚至可以耐受相对高剂量的NDV。临床试验报道, NDV感染产生的副作用较少, 通常表现为轻度流感样症状, 如疲劳、头痛、发烧、虚弱。即便偶尔有些患者出现短暂的血小板减少或中性粒细胞减少, 这些副作用也只是暂时的, 在接种NDV疫苗后的一到两天内就会消失。(iv) NDV减毒疫苗具有高滴度的鸡胚生长特性, 生产成本低廉。(v) NDV可以选择性在肿瘤中高效复制, 不会在正常细胞中复制。此外, NDV具有在非增殖性肿瘤细胞中复制的能力, 由于病毒在细胞质中的复制与细胞增殖无关, NDV在肿瘤细胞或休眠的肿瘤细胞中复制, 可能不会受化疗或放疗的影响, 并且可以在耐凋亡的肿瘤细胞、耐缺氧的肿瘤细胞和耐干扰素肿瘤细胞中复制。(vi) 除了NDV直接的溶瘤作用, 它还可以促进免疫系统的激活, 发挥抗肿瘤活性。一方面, NDV可直接刺激免疫细胞, 将肿瘤微环境的免疫抑制状态转变为免疫激活状态, 如显著增加肿瘤微环境中的CD4⁺和CD8⁺ T细胞浸润, 上调免疫检查点分子CTLA-4和PD-1等, 这为使用NDV和免疫检查点抑制剂结合打破免疫抵抗, 提高免疫检查点抑制剂疗效提供可能。另一方面, NDV感染肿瘤细胞可以诱导IFN- α , IFN- β , TNF- α 和IL-1等细胞因子的产生。因此, 肿瘤外有大量的免疫细胞被诱导浸润到肿瘤中, 激活的非特异性免疫细胞可以杀死和吞噬感染的尚未溶解的肿瘤细胞或对病毒溶瘤有抵抗的肿瘤细胞。

1.5 NDV治疗癌症的临床应用

NDV应用于临床治疗癌症已有50多年,作为一种溶瘤制剂,其研发经历了以下几个阶段^[96].

(1) 20世纪60~70年代: 使用NDV制剂进行术后治疗. 1965年, Cassel等人首次将NDV 73T株直接注射到宫颈癌患者的肿瘤区域. 结果显示, 肿瘤广泛脱落, 锁骨上淋巴结转移减少, 初步证实了NDV的抗肿瘤潜力和安全性. 此后, 他们提出了使用自体或异体病毒溶瘤液作为疫苗的策略, 并在Ⅱ期恶性黑色素瘤术后治疗中, 采用NDV溶瘤液作为辅助免疫治疗. 对83名接受治疗的患者进行的10年随访显示, 60%以上的患者仍然存活, 并且没有复发. 在德国, Kirchner等人对208名局部晚期肾细胞癌患者进行了一项类似的二期研究, 研究对象为自体NDV修饰的肿瘤裂解物疫苗, 与仅接受手术治疗的类似患者相比, 接受术后NDV修饰的自体肿瘤裂解物疫苗治疗的患者, 无病生存率有所提高.

(2) 20世纪90年代~21世纪初: 使用自体肿瘤细胞NDV活疫苗(*autologous tumor-cell NDV*, ATV-NDV)进行术后治疗. 为了提高NDV修饰肿瘤疫苗的免疫原性, 德国海德堡癌症研究中心(*Deutsches Krebsforschungszentrum*, DKFZ)提出了一种新概念, 即开发一种病毒感染经辐照的自体肿瘤细胞活细胞疫苗(ATV-NDV), 并在各种转移性动物肿瘤模型系统中成功地验证了该概念. 在七种不同类型的癌症(乳腺癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、头颈癌、胰腺癌和多形性胶质母细胞瘤)中使用了这种疫苗, 结果表明, 使用高质量的ATV-NDV疫苗可明显改善患者的预后生存期, 且未观察到严重副作用. 该临床试验结果表明, 对肿瘤患者接种ATV-NDV是可行和安全的.

(3) 21世纪初, 溶瘤NDV的系统应用研究. 在德国, Csatory等人通过静脉注射减毒溶瘤NDV株(MTH-68/H), 对四种高级别胶质瘤进行了一项选定的病例系列研究. 此外, 在美国, Wellstat Biologics将溶瘤NDV株PV701应用于标准治疗无效的晚期癌症患者. 79名晚期癌症患者接受了递增剂量的病毒注射, 注射 $12 \times 10^9 \sim 12 \times 10^{10}$ 感染颗粒(斑块形成单位/ m^2)的剂量具有良好的耐受性.

(4) 结合溶瘤病毒修饰疫苗(ATV-NDV)和双特异性抗体共刺激. 使用ATV-NDV疫苗进行的大多数临床试验显示, 约30%的受试者总生存期得到改善, 其余约

70%必须被视为免疫无应答者. T细胞无反应性是癌症患者的一个问题, 并且这通常是由于共刺激不足所致. 而向ATV-NDV疫苗中添加具有双特异性的NDV特异性单链抗体(双特异性单链抗体, bsAb), 可以增强疫苗ATV-NDV中的T细胞共刺激信号. 研究表明, ATV-NDV肿瘤疫苗, 带有附加的抗-HN-抗-CD3($\alpha\text{HN-}\alpha\text{CD3}$)和抗-HN-抗-CD28($\alpha\text{HN-}\alpha\text{CD28}$)bsAb, 在体外刺激人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 对人肿瘤细胞具有强而持久的抗肿瘤作用. Schirmmacher等人ATV-NDV的表面添加了一种bsHN-CD28, 构建的bsHN-CD28通过一只臂与NDV的HN分子结合, 另一只臂针对CD28, CD28是T细胞上传递共刺激信号的重要分子. 对14例晚期大肠癌患者使用ATV-NDV疫苗加bsHN-CD28治疗后, 未发生严重不良事件. 这项研究表明, 三组分疫苗是安全的, 而ATV-NDV的表面添加T细胞共刺激信号, 可以重新激活在晚期癌症中可能被激活的T细胞. 表2总结了溶瘤NDV治疗癌症的临床应用研究.

2 NDV与肿瘤免疫治疗

2.1 NDV激活抗肿瘤免疫应答

NDV选择性感染肿瘤细胞, 肿瘤细胞裂解后释放病原体相关分子(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)、危险相关分子(damage-associated molecular patterns, DAMPs)、肿瘤相关抗原(tumour-associated antigens, TAAs)、细胞因子(cytokines, CKs)等物质, TAAs募集抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC), 活化的APC将TAA呈递给杀伤性T细胞, 引起免疫应答, 如图3所示. NDV感染引起肿瘤微环境改变, 并激活先天性和适应性抗肿瘤免疫反应^[97].

(1) NDV激活天然抗肿瘤免疫应答. I型IFN信号通过招募固有细胞(包括NK细胞和APC)、上调细胞黏附、主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)和共刺激分子以及启动抗原特异性T细胞来激活固有免疫和适应性免疫. I型IFN信号的激活是癌症免疫治疗的关键途径之一, 肿瘤细胞通常具有受损的I型IFN信号, 这也是导致肿瘤细胞对NDV感染敏感性增加的主要机制之一. 注射NDV的小鼠肿瘤的转录谱显示I型IFN反应相关基因和一系列细胞因子、趋化因子上调, 它们介导先天性和适应性

表 2 溶瘤NDV的临床应用

Table 2 Clinical applications of oncolytic Newcastle disease virus

NDV毒株类型	临床试验
溶瘤毒株73 T	WA Cassel和Murray博士(1977年)对Ⅱ期黑色素瘤患者(83例)应用NDV溶瘤疫苗进行术后治疗
溶瘤毒株MTH/68	晚期化疗难治性癌症的系统治疗: Cstatary和Eckhardt(1993)进行的Ⅱ期试验
减毒毒株HUJ	14例胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)的系统治疗: Freeman和Zakay-Rones(2006年)在患者体内进行了3个周期的550亿单位的病毒感染试验
溶瘤毒株PV71	Pecora和Lorence(2002年、2003年)对耐标准治疗的晚期实体癌患者(113例)静脉注射病毒的Ⅰ期试验
减毒毒株Ulster	使用NDV感染经辐照的自体肿瘤细胞活细胞疫苗(ATV-NDV)进行术后治疗: (1) Ahlert和Schirmacher(1997)研究的早期乳腺癌(63例)、转移性乳腺癌(27例)和转移性卵巢癌(31例); (2) Ockert和Schirmacher(1996)对晚期大肠癌患者(57例)进行的Ⅱ期试验; (3) Steiner和Herold-Mende(2004年)在GBM患者中(23例接种疫苗的患者和在同一时间内来自同一诊所的87例未接种疫苗的患者)进行的Ⅱ期试验; (4) Karcher和Dyckhoff(2004年)对Ⅲ期和Ⅳ期头颈鳞状细胞癌患者(20例)进行的Ⅰ/Ⅱ期试验
减毒毒株Ulster	Schulze和Schlag(2009)进行的前瞻性随机Ⅱ/Ⅲ期试验,旨在研究ATV-NDV疫苗在大肠癌肝转移肝切除术(51例)后作为三级预防方法的有效性
NDV修饰的自体瘤苗和NDV毒株	辽宁省肿瘤医院 2003年Ⅲ期试验,治疗消化道肿瘤

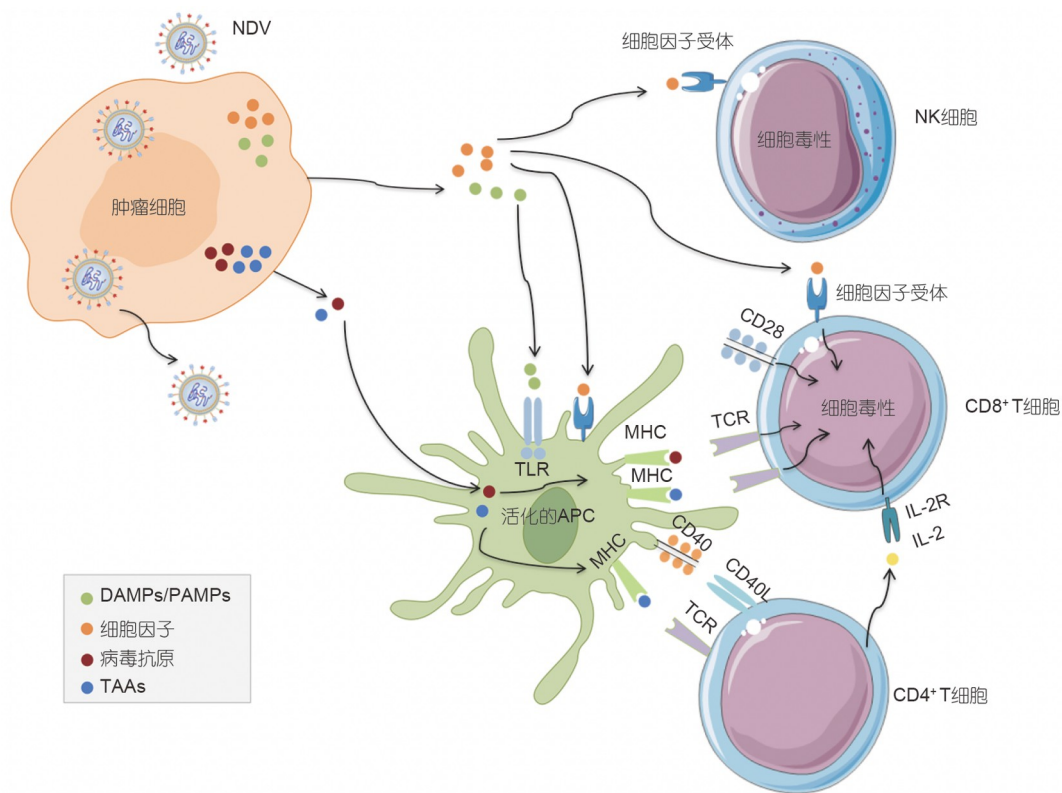


图 3 溶瘤NDV引起抗肿瘤免疫反应

Figure 3 Oncolytic NDV induces the antitumor response

免疫细胞的募集和增殖。

除了激活肿瘤细胞的Ⅰ型IFN信号外,NDV产生的炎症环境导致天然效应细胞和适应性免疫细胞的募

集,这些细胞有助于抗肿瘤免疫。特别是瘤内注射NDV可导致NK细胞明显浸润肿瘤。NDV感染还导致髓样细胞的募集,髓样细胞在吞噬和抗原呈递中起着

重要作用。

(2) NDV激活适应性抗肿瘤免疫应答。NDV感染后激活由 I 型IFN信号介导的先天性抗肿瘤免疫反应, 为刺激适应性抗肿瘤免疫提供了最佳条件。炎症介质的分泌导致髓样细胞和淋巴样细胞向肿瘤微环境募集。一个关键效应细胞群是DC和抗原特异性CD8⁺ T细胞的启动。NDV感染可通过凋亡、坏死或自噬、免疫原性细胞死亡, 导致肿瘤微环境中病毒和肿瘤相关抗原和碎片的释放, 抗原呈递DC在摄取这些抗原以及PAMP和DAMPs时被激活和成熟。抗原呈递DC产生的白细胞介素(IL-12)与肿瘤微环境中的 I 型IFN信号协同作用, 导致MHC I类和 II 类分子、细胞黏附分子和共刺激分子的上调, 所有这些都促进了APCs对T细胞的启动。

NDV诱导的肿瘤抗原特异性CD8⁺ T细胞反应的证据来自于双侧侧翼同基因肿瘤模型的研究, 将NDV LaSota毒株注射到单个侧翼肿瘤, 由于病毒在注射肿瘤部位复制的限制, 这种模型允许评估局部和远处的免疫效应。有趣的是, 注射和未注射NDV的肿瘤内CD4⁺和CD8⁺ T细胞浸润显著增加, 在注射病毒的肿瘤和远处肿瘤的肿瘤浸润性T细胞上观察到许多免疫检查点分子的上调, 包括CTLA-4和PD-1。这些发现表明, 联合NDV和免疫检查点抑制剂有可能打破免疫抵抗。事实上, 与单独治疗相比, NDV与全身抗CTLA-4、抗PD-1或抗PD-L1的联合治疗具有更好的抗肿瘤疗效, 延长动物存活时间, 这一效果在多种肿瘤模型中均有体现。这些研究表明, NDV瘤内治疗可以提高免疫检查点抑制剂的系统疗效。

2.2 NDV与免疫治疗联合治疗肿瘤的研究和临床应用

基于NDV独特的抗肿瘤特性及其与患者免疫系

统的积极相互作用, 从治疗原则来看, 将NDV与多模式免疫治疗相结合, 能充分调动机体的抗肿瘤反应。表3总结了NDV通过多模式免疫治疗的研究和临床应用情况。

3 NDV临床治疗的限制和挑战

在过去的60年中, 多项临床前研究和溶瘤NDV反复证明了其作为溶瘤制剂和免疫治疗制剂的优势和巨大潜力。然而, 有不少问题有待解决, 其中一个关键问题是靶向给药。目前还没有针对患者使用病毒的方式和剂量的优化标准方案和免疫检查点抑制剂联合治疗的最佳组合。

此外, 在治疗效果方面, 实体肿瘤的细胞外基质和其他屏障可能干扰和减缓病毒感染和传播, 从而减少溶瘤效果。另外, 外源基因插入NDV基因组有利弊: 一方面, 外源基因可能增强NDV的抗肿瘤作用; 另一方面, 外源基因的插入可能会影响病毒的复制。

4 未来展望

如何利用溶瘤病毒, 提升抗肿瘤的有效性, 是研究人员需要考虑的重要科学问题。溶瘤NDV作为肿瘤治疗的一种新型疗法, 具有许多先决条件: 高安全性、较低化疗或放疗低的副作用、选择性强溶瘤作用、强的 I 型IFN反应和广泛的免疫刺激作用。在未来, 如何利用溶瘤NDV与其他治疗方式结合以介导更强的抗肿瘤作用, 是值得思考和研究的主题。本文认为多模式联合治疗是治疗肿瘤的理想选择, 通过将溶瘤NDV与热疗、已批准的化疗药物和小分子、免疫调节剂、树突状细胞、活化的T细胞、双特异性抗体或NDV疫苗(如ATV-NDV)结合, 多模式联合治疗具有广阔的应用

表 3 NDV结合免疫治疗疗法的研究和临床应用

Table 3 Research and clinical applications of Newcastle disease virus combined with immunotherapy

联合疗法方式	临床试验
NDV结合免疫检查点抑制剂	Gayathri等人首次构建了表达免疫检测点抑制剂抗体的重组NDV(rNDV-anti-PD1和rNDV-anti-PDL1), 建立使用病毒联合CTLA4阻滞剂治疗小鼠黑色素瘤的模型。与单药治疗相比, 联合治疗增强了抗肿瘤作用, 延长了生存时间
NDV结合免疫调节剂	表达干扰素和促炎细胞因子的NDV, 如rNDV-INF, rNDV-IL24, rNDV-IL2和rNDV-IL12。在动物体内和体外实验中, 相比野生型NDV, 重组NDV均表现出更强的抗肿瘤作用
ATV-NDV装载DC细胞	1例伴有骨转移的前列腺癌患者经治疗后病情缓解

前景, 有利于克服传统疗法的临床障碍。尽管溶瘤新城疫病毒的生物安全性高, 在开展溶瘤新城疫病毒的临床试验之前, 还需考虑如何制备临床级溶瘤新城疫病毒制剂的问题。由于需要从鸡胚尿囊液制备新城疫病毒原液, 该原液含有异种蛋白, 需要深度纯化, 才能获得临床级病毒制剂, 这也增加了大规模制备溶瘤新城疫病毒的难度。

毫无疑问, 溶瘤NDV的前方充满机遇。一方面, 可以通过对免疫机制的进一步了解, 开发出更好的溶瘤NDV, 进一步拓展它的潜力; 另一方面, 应将这一充满潜力的工具与现有疗法进行结合, 利用其对免疫反应的影响能力, 实现更有效的抗肿瘤作用。随着免疫系统抗肿瘤机制的不断阐明, 溶瘤NDV有望为免疫疗法提供更广阔的应用平台。

参考文献

- 1 Huang Y, Mao Q, He J, et al. Fusions of tumor-derived endothelial cells with dendritic cells induces antitumor immunity. *Sci Rep*, 2017, 7: 46544
- 2 Inoda S, Morita R, Hirohashi Y, et al. The feasibility of Cep55/c10orf3 derived peptide vaccine therapy for colorectal carcinoma. *Exp Mol Pathol*, 2011, 90: 55–60
- 3 Xu-Monette Z Y, Zhang M, Li J, et al. PD-1/PD-L1 blockade: have we found the key to unleash the antitumor immune response? *Front Immunol*, 2017, 8
- 4 Amarasinghe G K, Ayllón M A, Bào Y, et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Arch Virol*, 2019, 164: 1967–1980
- 5 Liu T, Song Y, Yang Y, et al. Hemagglutinin-neuraminidase and fusion genes are determinants of NDV thermostability. *Vet Microbiol*, 2019, 228: 53–60
- 6 Marcos F, Ferreira L, Cros J, et al. Mapping of the RNA promoter of Newcastle disease virus. *Virology*, 2005, 331: 396–406
- 7 Lamb R, Parks G. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D M, Howley P M, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 1449–1496
- 8 Sinkovics J G, Horvath J C. Newcastle disease virus (NDV): Brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol*, 2000, 16: 1–15
- 9 Leighton F A, Heckert R A. Newcastle disease and related avian paramyxoviruses. *Infect Dis Wild Birds*, 2008, 1: 1–16
- 10 Fournier P, Zeng J, Von Der Lieth C W, et al. Importance of serine 200 for functional activities of the hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle Disease Virus. *Int J Oncol*, 2004, 24: 623–634
- 11 Connolly S A, Leser G P, Jardetzky T S, et al. Bimolecular complementation of paramyxovirus fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins enhances fusion: implications for the mechanism of fusion triggering. *J Virol*, 2009, 83: 10857–10868
- 12 Dortmans J C F M, Koch G, Rottier P J M, et al. Virulence of newcastle disease virus: What is known so far? *Vet Res*, 2011, 42: 122
- 13 Connaris H, Takimoto T, Russell R, et al. Probing the sialic acid binding site of the hemagglutinin-neuraminidase of newcastle disease virus: identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis, and fusion. *J Virol*, 2002, 76: 1816–1824
- 14 Ito Y, Komada H, Kusagawa S, et al. Fusion regulation proteins on the cell surface: Isolation and characterization of monoclonal antibodies which enhance giant polykaryocyte formation in Newcastle disease virus-infected cell lines of human origin. *J Virol*, 1992, 66: 5999–6007
- 15 Lamb R A, Jardetzky T S. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17: 427–436
- 16 Fournier P, Schirmacher V. Oncolytic newcastle disease virus as cutting edge between tumor and host. *Biology*, 2013, 2: 936–975
- 17 Molouki A, Peeters B. Rescue of recombinant Newcastle disease virus: current cloning strategies and RNA polymerase provision systems. *Arch Virol*, 2017, 162: 1–12
- 18 Wheelock E F, Dingle J H. Observations on the repeated administration of viruses to a patient with acute leukemia. *N Engl J Med*, 1964, 271: 645–651
- 19 Cassel W A, Garrett R E. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer*, 1965, 18: 863–868
- 20 Nelson N J. Scientific interest in Newcastle disease virus is reviving. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91: 1708–1710
- 21 Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *J Interferon Res*, 1987, 7: 429–438
- 22 Lindemann J. Viruses as immunological adjuvants in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1974, 355: 49–75
- 23 Cassel W A, Garrett R E. Tumor immunity after viral oncolysis. *J Bacteriol*, 1966, 92: 792
- 24 Murray D R, Cassel W A, Torbin A H, et al. Viral oncolysate in the management of malignant melanoma. II. Clinical studies. *Cancer*, 1977, 40: 680–686

- 25 Cassel W A, Murray D R. A ten-year follow-up on stage II malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus oncolysate. *Med Oncol Tumor Pharmacother*, 1992, 9: 169–171
- 26 Batliwalla F M, Bateman B A, Serrano D, et al. A 15-year follow-up of AJCC stage III malignant melanoma patients treated postsurgically with newcastle disease virus (NDV) oncolysate and determination of alterations in the CD8 T cell repertoire. *Mol Med*, 1998, 4: 783–794
- 27 Kobayashi H. Viral xenogenisation of intact tumor cells. *Adv Cancer Res*, 1979, 30: 279–299
- 28 Lorence R M, Rood P A, Kelley K W. Newcastle Disease Virus as an antineoplastic agent: induction of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of its cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst*, 1988, 80: 1305–1312
- 29 Reichard K W, Lorence R M, Cascino C J, et al. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *J Surg Res*, 1992, 52: 448–453
- 30 Phuangsab A, Lorence R M, Reichard K W, et al. Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts: antitumor effects of local or systemic administration. *Cancer Lett*, 2001, 172: 27–36
- 31 Pecora A L, Rizvi N, Cohen G I, et al. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J Clin Oncol*, 2002, 20: 2251–2266
- 32 Lorence R M, Pecora A L, Major P P, et al. Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Curr Opin Mol Ther*, 2003, 5: 618–624
- 33 Heicappell R, Schirmacher V, von Hoegen P, et al. Prevention of metastatic spread by postoperative immunotherapy with virally modified autologous tumor cells. I. Parameters for optimal therapeutic effects. *Int J Cancer*, 1986, 37: 569–577
- 34 Schirmacher V, Heicappell R. Prevention of metastatic spread by postoperative immunotherapy with virally modified autologous tumor cells. II. Establishment of specific systemic anti-tumor immunity. *Clin Exp Metast*, 1987, 5: 147–156
- 35 Von Hoegen P, Weber E, Schirmacher V. Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle Disease Virus. *Eur J Immunol*, 1988, 18: 1159–1166
- 36 Schild H, von Hoegen P, Schirmacher V. Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle disease virus. *Cancer Immunol Immunother*, 1989, 28: 22–28
- 37 von Hoegen P, Zawatzky R, Schirmacher V. Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle disease virus. *Cell Immunol*, 1990, 126: 80–90
- 38 Schirmacher V, Haas C, Bonifer R, et al. Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus. *Gene Ther*, 1999, 6: 63–73
- 39 Bohle W, Schlag P, Liebrich W, et al. Postoperative active specific immunization in colorectal cancer patients with virus-modified autologous tumor-cell vaccine. First clinical results with tumor-cell vaccines modified with live but avirulent newcastle disease virus. *Cancer*, 1990, 66: 1517–1523
- 40 Ahlert T, Sauerbrei W, Bastert G, et al. Tumor-cell number and viability as quality and efficacy parameters of autologous virus-modified cancer vaccines in patients with breast or ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 1997, 15: 2763
- 41 Ockert D, Schirmacher V, Beck N, et al. Newcastle disease virus-infected intact autologous tumor cell vaccine for adjuvant active specific immunotherapy of resected colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 1996, 2: 21–28
- 42 Pomer S, Schirmacher V, Thiele R, et al. Tumor response and 4 year survival-data of patients with advanced renal-cell carcinoma treated with autologous tumor vaccine and subcutaneous r-IL-2 and IFN-alpha(2b). *Int J Oncol*, 1995, 6: 947–954
- 43 Csatory L K, Eckhardt S, Bukosza I, et al. Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. *Cancer Detect Prev*, 1993, 17: 619–627
- 44 Feng H, Wei D, Nan G, et al. Construction of a minigenome rescue system for Newcastle disease virus strain Italien. *Arch Virol*, 2011, 156: 611–616
- 45 Wei D, Sun N, Nan G, et al. Construction of recombinant Newcastle disease virus Italien strain for oncolytic virotherapy of tumors. *Hum Gene Ther*, 2012, 23: 700–710
- 46 Ahlert T, Schirmacher V. Isolation of a human melanoma adapted Newcastle disease virus mutant with highly selective replication patterns. *Cancer Res*, 1990, 50: 5962–5968
- 47 Karcher J, Dyckhoff G, Beckhove P, et al. Antitumor vaccination in patients with head and neck squamous cell carcinomas with autologous virus-modified tumor cells. *Cancer Res*, 2004, 64: 8057–8061
- 48 Steiner H H, Bonsanto M M, Beckhove P, et al. Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefit. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 4272–4281

- 49 Schulze T, Kemmner W, Weitz J, et al. Efficiency of adjuvant active specific immunization with Newcastle disease virus modified tumor cells in colorectal cancer patients following resection of liver metastases: results of a prospective randomized trial. [Cancer Immunol Immunother](#), 2009, 58: 61–69
- 50 Liang W, Wang H, Sun T M, et al. Application of autologous tumor cell vaccine and NDV vaccine in treatment of tumors of digestive tract. [World J Gastroenterol](#), 2003, 9: 495–498
- 51 Bian H, Wilden H, Fournier P, et al. *In vivo* efficacy of systemic tumor targeting of a viral RNA vector with oncolytic properties using a bispecific adapter protein. [Int J Oncol](#), 2006, 29: 1359–1369
- 52 Li Y L, Wu J, Wei D, et al. Newcastle disease virus represses the activation of human hepatic stellate cells and reverses the development of hepatic fibrosis in mice. [Liver Int](#), 2009, 29: 593–602
- 53 Bai L, Koopmann J, Fiola C, et al. Dendritic cells pulsed with viral oncolysates potently stimulate autologous T cells from cancer patients. [Int J Oncol](#), 2002, 21: 685–694
- 54 Elankumaran S, Rockemann D, Samal S K. Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. [J Virol](#), 2006, 80: 7522–7534
- 55 Schirmacher V, Fournier P, Schlag P. Autologous tumor cell vaccines for post-operative active-specific immunotherapy of colorectal carcinoma: long-term patient survival and mechanism of function. [Expert Rev Vaccines](#), 2014, 13: 117–130
- 56 Fournier P, Schirmacher V. Bispecific antibodies and trispecific immunocytokines for targeting the immune system against cancer. [BioDrugs](#), 2013, 27: 35–53
- 57 Schirmacher V, Bihari A S, Stücker W, et al. Long-term remission of prostate cancer with extensive bone metastases upon immuno- and virotherapy: a case report. [Oncol Lett](#), 2014, 8: 2403–2406
- 58 Ni J, Schirmacher V, Fournier P. The hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle Disease Virus: a powerful molecular adjuvant for DNA anti-tumor vaccination. [Vaccine](#), 2010, 28: 6891–6900
- 59 Koks C A, Garg A D, Ehrhardt M, et al. Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. [Int J Cancer](#), 2015, 136: E313–E325
- 60 Fournier P, Wilden H, Schirmacher V. Importance of retinoic acid-inducible gene I and of receptor for type I interferon for cellular resistance to infection by Newcastle disease virus. [Int J Oncol](#), 2011, doi: 10.3892/ijo.2011.1222
- 61 Zaslavsky E, Hershberg U, Seto J, et al. Antiviral response dictated by choreographed cascade of transcription factors. [J Immunol](#), 2010, 184: 2908–2917
- 62 Schirmacher V, Schlude C, Weitz J, et al. Strong T-cell costimulation can reactivate tumor antigen-specific T cells in late-stage metastasized colorectal carcinoma patients: Results from a phase I clinical study. [Int J Oncol](#), 2015, 46: 71–77
- 63 Schirmacher V, Stücker W, Lulei M, et al. Long-term survival of a breast cancer patient with extensive liver metastases upon immune and virotherapy: a case report. [Immunotherapy](#), 2015, 7: 855–860
- 64 Wei D, Li Q, Wang X L, et al. Oncolytic Newcastle disease virus expressing chimeric antibody enhanced anti-tumor efficacy in orthotopic hepatoma-bearing mice. [J Exp Clin Cancer Res](#), 2015, 34: 153
- 65 Mansour M, Palese P, Zamarin D. Oncolytic specificity of Newcastle Disease Virus is mediated by selectivity for apoptosis-resistant cells. [J Virol](#), 2011, 85: 6015–6023
- 66 Zamarin D, Holmgaard R B, Subudhi S K, et al. Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. [Sci Transl Med](#), 2014, 6: 226–332
- 67 An Y, Liu T, He J, et al. Recombinant Newcastle disease virus expressing P53 demonstrates promising antitumor efficiency in hepatoma model. [J Biomed Sci](#), 2016, 23: 55
- 68 Abdullah J M, Mustafa Z, Ideris A. Newcastle disease virus interaction in targeted therapy against proliferation and invasion pathways of glioblastoma multiforme. [Biomed Res Int](#), 2014, 2014: 1–11
- 69 Al-Shammari A M, Rameez H, Al-Taei M F. Newcastle disease virus, rituximab, and doxorubicin combination as anti-hematological malignancy therapy. [Oncolytic Virother](#), 2016, 5: 27–34
- 70 Schirmacher V. Fifty years of clinical application of newcastle disease virus: time to celebrate! [Biomedicines](#), 2016, 4: 16
- 71 Ricca J M, Oseledchik A, Walther T, et al. Pre-existing immunity to oncolytic virus potentiates its immunotherapeutic efficacy. [Mol Ther](#), 2018, 26: 1008–1019
- 72 Chaurasiya S, Chen N G, Fong Y. Oncolytic viruses and immunity. [Curr Opin Immunol](#), 2018, 51: 83–90

- 73 McGinnes L W, Morrison T G. Inhibition of receptor binding stabilizes Newcastle disease virus HN and F protein-containing complexes. *J Virol*, 2006, 80: 2894–2903
- 74 Schirmacher V, Fournier P. Newcastle disease virus: a promising vector for viral therapy, immune therapy, and gene therapy of cancer. *Methods Mol Biol* 2009, 542: 565–605
- 75 Fiola C, Peeters B, Fournier P, et al. Tumor selective replication of Newcastle disease virus: association with defects of tumor cells in antiviral defence. *Int J Cancer*, 2006, 119: 328–338
- 76 Wilden H, Fournier P, Zawatzky R, et al. Expression of RIG-I, IRF3, IFN- β and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle disease virus. *Int J Oncol*, 2009, 34: 971–982
- 77 Elankumaran S, Chavan V, Qiao D, et al. Type I interferon-sensitive recombinant Newcastle disease virus for oncolytic virotherapy. *J Virol*, 2010, 84: 3835–3844
- 78 Puhlmann J, Puehler F, Mumberg D, et al. Rac1 is required for oncolytic NDV replication in human cancer cells and establishes a link between tumorigenesis and sensitivity to oncolytic virus. *Oncogene*, 2010, 29: 2205–2216
- 79 Jarahian M, Watzl C, Fournier P, et al. Activation of natural killer cells by Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. *J Virol*, 2009, 83: 8108–8121
- 80 Washburn B, Weigand M A, Grosse-Wilde A, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates tumoricidal activity of human monocytes stimulated by newcastle disease virus. *J Immunol*, 2003, 170: 1814–1821
- 81 Schirmacher V, Bai L, Umansky V, et al. Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity. *Int J Oncol*, 2000, 16: 363–373
- 82 Umansky V, Shatrov V A, Lehmann V, et al. Induction of NO synthesis in macrophages by Newcastle disease virus is associated with activation of nuclear factor- κ B. *Int Immunol*, 1996, 8: 491–498
- 83 Chlichlia K, Peter M E, Rocha M, et al. Caspase activation is required for nitric oxide-mediated, CD95(APO-1/Fas)-dependent and independent apoptosis in human neoplastic lymphoid cells. *Blood*, 1998, 91: 4311–4320
- 84 Zhao L, Niu C, Shi X, et al. Dendritic cells loaded with the lysate of tumor cells infected with Newcastle Disease Virus trigger potent anti-tumor immunity by promoting the secretion of IFN- γ and IL-2 from T cells. *Oncol Lett*, 2018, 16: 1180–1188
- 85 Song H, Zhong L P, He J, et al. Application of Newcastle disease virus in the treatment of colorectal cancer. *World J Clin Cases*, 2019, 7: 2143–2154
- 86 Liao Y, Wang H X, Mao X, et al. RIP1 is a central signaling protein in regulation of TNF- α /TRAIL mediated apoptosis and necroptosis during Newcastle disease virus infection. *Oncotarget*, 2017, 8: 43201–43217
- 87 Molouki A, Hsu Y T, Jahanshahi F, et al. The matrix (M) protein of Newcastle disease virus binds to human bax through its BH3 domain. *Virol J*, 2011, 8: 385
- 88 Altieri D C. Survivin—the inconvenient IAP. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 39: 91–96
- 89 Shao X, Wang X, Guo X, et al. STAT3 contributes to oncolytic newcastle disease virus-induced immunogenic cell death in melanoma cells. *Front Oncol*, 2019, 9: 436
- 90 Wang X, Shao X, Gu L, et al. Targeting STAT3 enhances NDV-induced immunogenic cell death in prostate cancer cells. *J Cell Mol Med*, 2020, 24: 4286–4297
- 91 Li Y, Wang L X, Yang G, et al. Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res*, 2008, 68: 6889–6895
- 92 Bian J, Wang K, Kong X, et al. Caspase- and p38-MAPK-dependent induction of apoptosis in A549 lung cancer cells by Newcastle disease virus. *Arch Virol*, 2011, 156: 1335–1344
- 93 Ye T, Jiang K, Wei L, et al. Oncolytic Newcastle disease virus induces autophagy-dependent immunogenic cell death in lung cancer cells. *Am J Cancer Res*, 2018, 8: 1514–1527
- 94 Jiang K, Li Y, Zhu Q, et al. Pharmacological modulation of autophagy enhances Newcastle disease virus-mediated oncolysis in drug-resistant lung cancer cells. *BMC Cancer*, 2014, 14: 551
- 95 Kan X, Yin Y, Song C, et al. Newcastle-disease-virus-induced ferroptosis through nutrient deprivation and ferritinophagy in tumor cells. *iScience*, 2021, 24: 102837
- 96 Schirmacher V, van Gool S, Stuecker W. Breaking therapy resistance: an update on oncolytic newcastle disease virus for improvements of cancer therapy. *Biomedicines*, 2019, 7: 66
- 97 Burman B, Pesci G, Zamarin D. Newcastle disease virus at the forefront of cancer immunotherapy. *Cancers*, 2020, 12: 3552

Oncolytic Newcastle disease virus: a new opportunity in the era of tumor immunotherapy

DU Sha¹, JIANG Ke², DING Chan³, XU Qing⁴, LI WenBin⁵ & MENG SongShu¹

1 Institute of Cancer Stem Cell, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;

2 Center for Single-Cell Omics and Disease Research, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China;

3 Department of Avian Infectious Diseases, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China;

4 Department of Medical Oncology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China;

5 Department of Neuro-oncology, Neurosurgery center, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China

Oncolytic virus therapy is one of the hot topics in tumor immunotherapy. As a novel anticancer agent, oncolytic Newcastle disease virus (NDV) uses antiviral defense defects in the tumor cells for tumor treatment. NDV selectively infects, replicates and cracks tumor cells, enhances tumor antigen exposure, promotes the recruitment of immune cells, and activates antitumor immune response, thus playing a role in antitumor immunity. Based on the unique antitumor properties of oncolytic NDV and its interaction with patients' immune systems, the combination of oncolytic NDV and other immunotherapies can enhance the antitumor efficacy and have broad applications. This paper reviews the structure and mechanism of oncolytic NDV, preclinical research and clinical application of oncolytic NDV in tumor therapy, and prospects of combined immunotherapy.

oncolytic virus, Newcastle disease virus, tumor immunotherapy, combined immunotherapy

doi: [10.1360/SSV-2021-0434](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0434)