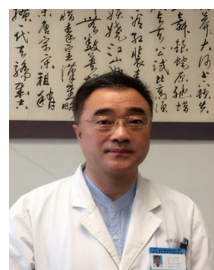


DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.001

· 专家论坛 ·

原位疫苗：肿瘤免疫治疗的新思路

朱军梦, 刘宝瑞(南京大学医学院附属鼓楼医院 肿瘤中心暨南京大学临床肿瘤研究所, 江苏 南京 210008)



刘宝瑞主任医师、教授、博士生导师,美国MD.Anderson Cancer Center博士后,南京大学医学院附属鼓楼医院副院长、肿瘤中心主任,南京大学临床肿瘤研究所所长。兼任中国抗癌协会肿瘤整合分会副主委、中国生物医学工程学会肿瘤靶向治疗技术分会名誉主委、江苏省医学会肿瘤化疗与生物治疗分会主委等。主要从事消化系统肿瘤的个体化药物治疗及靶向免疫治疗,主持国家自然科学基金项目8项(含国际合作研究重大项目和重点项目各1项)。获国家发明专利10项,获中华医学科技二、三等奖和教育部科技进步二等奖等多个奖项。主编《临床肿瘤学》等学术专著5部,以第一或通信作者身份发表SCI论文145篇。

[摘要] 肿瘤免疫治疗的新策略发展迅速,已经成为肿瘤治疗最受瞩目的领域。关于如何实现最理想抗肿瘤免疫效果,可采用“被动”免疫疗法如过继性细胞疗法、基因工程T细胞等直接攻击肿瘤细胞,也可采用“主动”免疫疗法如细胞因子、肿瘤疫苗、免疫检查点抑制剂等调节并激活免疫系统。原位疫苗以局部瘤内注射的方式,将“主动”和“被动”免疫科学地结合起来,在直接抑制肿瘤细胞的同时深度调节和触发机体免疫系统,形成免疫启动-免疫效应-肿瘤细胞死亡-抗原释放导致免疫再启动-免疫再效应的反复循环,最大限度地发挥抗肿瘤免疫效果。本文就原位疫苗的具体策略、临床前研究和临床试验的进展,以及原位疫苗的优势、存在问题和应对策略等展开讨论。

[关键词] 原位疫苗;肿瘤;免疫治疗;免疫佐剂

[中图分类号] R730.51; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)03-0213-08

In situ vaccine: new ideas for tumor immunotherapy

ZHU Junmeng, LIU Baorui (The Comprehensive Cancer Centre of Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Clinical Cancer Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu, China)

[Abstract] New strategies for cancer immunotherapy have developed rapidly in recent years. Regarding how to achieve the optimal anti-tumor immune effect, “passive” immunotherapy such as adoptive cell transfer therapy, genetically engineered T cells, etc. can be used to directly attack tumor cells while “active” immunotherapy such as cytokines, cancer vaccines, immune checkpoint inhibitors, etc. can be used to regulate and activate immune system. *In situ* vaccine, using intratumoral administration of immunomodulators, combines “active” and “passive” immunotherapies scientifically at the same time, forming a cycle composed of immune priming-immune activation-tumor cell death-antigen release resulting in immune priming-immune activation, ultimately maximizing the anti-tumor immune effect. This review describes the specific strategies, promising preclinical results and some clinical trials as well as advantages, challenges and perspectives of *in situ* vaccine.

[Key words] *in situ* vaccine; tumor; immunotherapy; immune adjuvant

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(3): 213-220. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.001]

近年来,原位疫苗作为老方法新概念被重新提出来,让肿瘤自身成为疫苗再激发全身抗肿瘤免疫效应。直接将各种生物和化学试剂注射到肿瘤中作为癌症治疗的方法,已有悠久的历史^[1]。19世纪末,外科医生COLEY^[2]首次开展瘤内注射活菌和细菌毒素疗法,并在部分肿瘤患者中观察到一定的疗效,这些经验性的想法催生了原位免疫疗法新思路,且在浅表性尿路上皮癌中得到应用。

相比于机体免疫系统攻击被病原体感染的细

胞,原位免疫治疗后的局部肿瘤可由“冷”变“热”。“冷”肿瘤免疫原性极低,几乎无法被识别而引起免

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81672367)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81672367)

[作者简介] 朱军梦(1996-),女,硕士生,主要从事肿瘤免疫治疗研究,E-mail: 151232063@smail.nju.edu.cn

[通信作者] 刘宝瑞(LIU Baorui, corresponding author), E-mail: baorui07@163.com

疫系统强烈反应;而“热”肿瘤免疫原性相对较高,其癌细胞表面暴露大量“新抗原”,使得肿瘤更易于被免疫系统识别和杀伤。故当今原位免疫疗法目标之一一是寻找相应方法使肿瘤暴露相关抗原,达到免疫启动;目标之二是寻找适当佐剂激活抗原提呈细胞(APC)、活化T细胞、改变免疫负性调节等,从而激发抗肿瘤免疫效应。由此,该疗法便可在肿瘤局部形成免疫启动-免疫效应-肿瘤细胞死亡-抗原释放导致免疫再启动-免疫再效应的反复循环,最大限度地发挥抗肿瘤免疫效果。

目前,有关原位疫苗的临床前研究和临床试验在不断展开中,为肿瘤治疗提供了许多新思路。本文将结合临床前研究和临床试验的进展讨论原位疫苗的具体策略,分析其优势与挑战。

1 原位疫苗的具体策略

原位疫苗本身就是一种免疫治疗策略,目的是获得免疫启动和免疫效应,形成良好的抗肿瘤免疫良性循环。其关键因素包括引发抗原释放、激活抗原提呈、活化免疫效应细胞、改变免疫负性调节、抑制肿瘤微环境中的免疫耐受等等。故在选择瘤内使用的佐剂时,需要充分考虑上述关键因素,制定合适的原位疫苗策略。

1.1 细菌和细菌毒素

细菌和细菌毒素瘤内注射^[2]已经有一百多年的历史,常用菌株包括双歧杆菌^[3]、沙门菌^[4]、梭状芽胞菌^[5]等。2014年,ROBERTS等^[6]在大鼠原位脑肿瘤模型、自发性狗肿瘤模型瘤内注射减毒株*Clostridium novyi*-NT后,大鼠模型可观察到确实的肿瘤局部反应,16只犬中6只可观察到肿瘤的完全或部分缓解;在这些令人鼓舞结果的基础上,又对一位晚期平滑肌肉瘤患者瘤内注射*Clostridium novyi*-NT孢子(NCT01924689),患者的“骨转移灶”和周围的肿瘤出现缩小。除了自身毒性可引发局部肿瘤的炎性变化进而激活适应性免疫应答外,细菌也可按照简单的基因规则或复杂的合成生物学原理被改造为安全有效的药物载体。2019年,PATEL等^[7]利用耻垢分枝杆菌的细菌膜包被纳米颗粒后瘤内注射,并联合放射治疗(radiotherapy, RT),发现B78黑色素瘤小鼠模型获得100%的免疫应答,NXS2成神经细胞瘤小鼠模型出现100%的肿瘤消退。

1.2 溶瘤病毒

溶瘤病毒本身作为病原体可感染和杀伤肿瘤细胞。STEINMETS等^[8]采用瘤内注射豇豆花叶病毒(cowpea mosaic virus, CPMV)联合低剂量环磷酰胺(cyclophosphamide, CPA)治疗4T1小鼠,结果抑制了原发肿瘤的生长和远处肺转移,提高了生存率。机

制分析表明,CPMV与CPA联合应用可增加多种细胞因子的分泌和肿瘤浸润性T细胞的数量,激活APC,系统性地逆转免疫抑制。但是,仅仅依靠自然产生的病毒难以获得有效持久的抗肿瘤免疫反应。基于基因技术的发展,病毒可以被改造来表达各种目的基因,包括表达热激蛋白等以增强肿瘤抗原的交叉提呈;表达To11样受体(TLR)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子GM-CSF、白介素12和共刺激分子等以促进APC特别是树突状细胞(DC)的成熟;表达抗CTLA-4或抗PD-(L)1等以减少肿瘤微环境中的免疫抑制。但有报道提示,大量病毒多肽会与肿瘤相关抗原竞争,分散免疫系统对肿瘤相关抗原的靶向性。针对此问题可采用“Prime-boost”方案,即使用表达相同肿瘤抗原的两种不同病毒株进行接种。例如用表达黑色素瘤相关抗原的水泡性口炎病毒启动免疫,然后用表达相同抗原的腺病毒加强免疫(反之亦然),可显著增强B16小鼠黑色素瘤的肿瘤特异性T细胞应答^[9]。

1.3 TLR激动剂

模式识别受体具有识别病原体相关分子模式(如上述的细菌细胞壁或病毒DNA)的能力。TLR是模式识别受体的一个亚家族,可表达于肿瘤微环境中的髓系和淋巴系免疫细胞以及肿瘤细胞本身,故TLR激动剂能够活化免疫细胞或直接导致肿瘤细胞死亡。目前,使用较多的TLR激动剂包括TLR3、TLR4、TLR7/8、TLR9等。HAMMERICH等^[10]对惰性非霍奇金淋巴瘤患者局部瘤内注射FMS样酪氨酸激酶3配体(Flt3L)和Poly-ICLC(TLR3激动剂)并联合RT,结果11名患者中有8名患者获得完全或部分缓解(NCT01976585)。G100(TLR4激动剂)在临床前模型中可触发固有和适应性抗肿瘤免疫反应,BHATIA等^[11]证实了瘤内注射此激动剂对Merkel细胞癌患者是有效且安全的。咪喹莫特(TLR7/8激动剂)可局部涂抹于病灶,现已被批准用于治疗浅表性基底细胞癌、光化性角化病和生殖器疣。局部瘤内注射MEDI9197(TLR7/8激动剂)可促进肿瘤免疫细胞的募集和活化,与检查点抑制剂和共刺激分子激动剂联合使用可增强抗肿瘤免疫效果^[12]。MATTHEW等^[13]向表达B16-OVA(卵清蛋白)的小鼠黑色素瘤模型瘤内注射TLR9激动剂ODN1826,并联合静脉注射抗CTLA-4,结果45%的荷瘤小鼠出现局部和远位肿瘤的免疫应答;而在非免疫原性的B16-F10小鼠黑色素瘤模型中,发现只有瘤内而非静脉注射ODN1826时,才能增强抗CTLA-4的治疗效果,这提示瘤内注射TLR9激动剂可以提高免疫原性差的肿瘤对免疫检查点抑制剂的敏感性。

1.4 RT联合免疫治疗

从机制上看,RT引起局部肿瘤组织损伤和炎症发生,导致肿瘤抗原释放和促进机体固有及适应性

免疫应答。然而RT并不能解决先前存在的肿瘤微环境免疫耐受问题,如调节性T细胞上调等^[14],故适当联合RT和免疫治疗^[15-16]至关重要。RT可与抗CTLA-4或抗PD-(L)1等联合使用。THEELEN等^[17]于转移性非小细胞肺癌患者的II期临床试验中,试验组($n=36$)对单个肿瘤部位进行立体定向放射治疗(stereotactic body radiotherapy, SBRT),结束后7 d内静脉给予PD-1单抗pembrolizumab;对照组($n=40$)仅给予pembrolizumab。治疗3个月后显示,试验组和对照组的客观缓解率分别是36%和18%,安全性两组无显著差异。在联合RT与免疫治疗时,需充分考虑RT的剂量、次数、部位、递送方式等,还要高度重视制定合理的联合治疗方案。除RT外,免疫治疗还可联合其他物理疗法如光动力疗法^[18]、电化学疗法^[19]等。

1.5 单克隆抗体

免疫检查点抑制剂抗体和共刺激分子激动剂抗体在免疫治疗领域的研究与应用是肿瘤治疗的一场前所未有的革命,它们能够抑制肿瘤微环境中的免疫逃逸,具备广谱的抗肿瘤免疫效果。实验大多采用静脉给药方式,但有报道^[20]提示静脉给药易产生剂量限制性毒副作用。单克隆抗体药物多靶向肿瘤微环境中的肿瘤细胞和免疫细胞,故瘤内注射可使得药物直接进入肿瘤微环境,规避了组织穿透性差的问题,药物可进一步流向下流的淋巴组织发挥“远位效应”,最终达到低剂量高效率的效果。目前瘤内注射的单克隆抗体包括免疫检查点抑制剂如抗PD-(L)1^[21]、抗KIR^[22]等,共刺激分子激动剂如抗OX40^[23]、抗CD137^[23-24]、抗CD47^[25]、抗CD40^[26]等,免疫抑制细胞阻断剂如抗CTLA4^[23]等,它们都可活化T细胞和改变免疫抑制因素。HEBB等^[23]将抗CTLA4、抗CD137、抗OX40低剂量组合后瘤内注射淋巴瘤小鼠模型和实体瘤小鼠模型,使局部和远位肿瘤均显著缩小。

1.6 细胞因子

肿瘤生物治疗相关的细胞因子包括白细胞介素类、干扰素类、集落刺激因子类等等,可介导和调节免疫应答。已报道可用于局部瘤内注射的主要有GM-CSF、白细胞介素2(IL-2)和白细胞介素12(IL-12)等。GM-CSF局部注射可增加肿瘤部位DC数量。KEMP等^[27]将表达GM-CSF基因的重组病毒瘤内注射入胰腺癌小鼠模型中,发现DC和T细胞的活化显著增强。IL-2可促进T细胞的扩增以及向效应淋巴细胞的活化,在癌症治疗的应用中得到广泛研究,但其静脉给药后易出现严重的毒副作用,单独使用易活化Treg细胞进而发挥负性调节作用,故可考虑联合其他药物瘤内注射。一项I期试验报道^[28],瘤内注射IL-2与抗CTLA-4使67%的患者出现局部肿瘤缩小、89%的

患者出现“远位效应”。IL-12可增强CTL的活性和IFN- γ 的产生,一直被认为具有强大的抗肿瘤活性,但其静脉给药易出现肝脏和血液毒性,故可选择瘤内注射。已有的报道包括瘤内注射瞬时转染IL-12的T细胞^[67]、负载重组IL-12的可生物降解且具有缓释作用的聚乳酸微球^[29]等。

1.7 纳米材料载体

纳米材料具有比表面积大、表面活性中心多、反应活性高等特点,应用于肿瘤免疫治疗的研究逐渐增多。目前常见的纳米材料有聚合物、脂质、树枝状大分子、病毒样颗粒和无机物等。较常见的作用是作为载体递送特异性抗原和免疫佐剂以增加APCs对抗原的摄取及交叉提呈。SUN等^[30]研制了一种索拉菲尼和二氢卟吩e6共载活性氧响应纳米给药系统(NP-sfb/ce6),将其静脉注射给荷瘤小鼠后,再用660纳米激光照射局部肿瘤,导致肿瘤处的二氢卟吩e6产生活性氧以破坏纳米颗粒,释放索拉菲尼,诱导T细胞依赖性局部和全身的抗肿瘤免疫反应,从而抑制肿瘤生长。有的纳米粒子自身大小、形状、表面性质能够模拟病原体的一些关键特征,其本身也具备免疫佐剂效果^[31]。MORRIS等^[7]研发的纳米粒子BNP由细菌膜、TLR9激动剂、PH-应答性聚合物PC7A以及顺丁烯二酰亚胺组成,在患有同源黑色素瘤或成神经细胞瘤的小鼠肿瘤处注射该纳米粒子后,可准确识别肿瘤相关抗原,促进DC对抗原的交叉提呈,刺激特异性抗肿瘤T细胞反应。纳米佐剂是疫苗佐剂研究的一个重要方向,目前虽取得一些成果,但仍面临着一些挑战,如纳米材料的选择、纳米颗粒性质优化等。相信随着研究的深入,纳米佐剂终将以其独特的优势和较佳的免疫效果而逐渐用于临床。

1.8 其他的佐剂

其他的可瘤内递送的免疫佐剂还包括Flt3L^[10]、细胞毒性药物^[32]、生物材料制剂^[33-34]等等。

2 原位疫苗的临床试验

原位疫苗的临床试验正在不断开展中(表1)。2018年首次评估了溶瘤病毒与免疫检查点抑制剂联合治疗的临床效果,符合入组要求的IIIB至IV期黑色素瘤患者随机以1:1分配接受瘤内注射溶瘤病毒(talimogene laherparepvec)联合静脉注射ipilimumab或仅静脉注射ipilimumab治疗,结果试验组($n=98$)和对照组($n=100$)的客观应答率分别为39%和18%,且未出现与治疗相关的致命不良事件^[35]。因为TLR激动剂可促进固有和适应性免疫反应,所以逐渐用于原位免疫疗法。一项多中心I/II期临床试验对惰性淋巴瘤患者瘤内注射TLR 9激动剂SD-101联

合低剂量RT,结果几乎所有患者($n=29$)出现局部肿瘤缩小、24例患者出现“远位效应”,其中5例部分缓解、1例完全缓解,未发生与治疗相关的4级或严重不良事件;机制研究表明肿瘤微环境中CD8⁺、CD4⁺T细胞增多而Treg细胞减少^[16]。此外,一项I/II期临床试验目前正在研究瘤内注射自体DC治疗实体肿瘤

(NCT01882946),类似的研究还有对乳腺癌患者瘤内递送自体DC结合化疗(NCT02018458)和对前列腺癌患者瘤内递送自体DC结合冷冻治疗(NCT02423928)。这些临床试验为原位疫苗的有效性和安全性提供了重要的证据,但部分临床试验样本量较小,后续还需更多研究来提供更为可靠的临床证据。

表1 原位疫苗相关的临床试验

类别	注射物	联合疗法	肿瘤类型	样本量	临床试验	开始时间	完成时间	NCT编号	状态
细菌	Clostridium novyi-NT孢子	-	难治性实体肿瘤	24	I	2013-10	2017-10	NCT01924689	完成
病毒	Coxsackievirus A21	-	恶性黑色素瘤	57	II	2011-12	2016-04	NCT01227551	完成
病毒	T-VEC	Pembrolizumab (MK-3475)	黑色素瘤	713	Ib	2014-12	2023-04	NCT02263508	尚未招募
病毒	DNX-2401	IFN- γ	成胶质细胞瘤或胶质肉瘤	37	I	2014-09	2018-03	NCT02197169	完成
病毒	AdMA3	-	实体瘤	56	I/II	2014-10	2019-12	NCT02285816	未招募
TLR9激动剂	CpG 7909	RT	复发性低度恶性淋巴瘤	30	I/II	2004-07	2010-03	NCT00185965	完成
TLR9激动剂	SD-101	RT	淋巴瘤	9	I/II	2014-09	2017-01	NCT02254772	完成
TLR7/8激动剂	Ipilimumab Resiquimod	-	皮肤T细胞淋巴瘤	13	I/II	2012-02	2015-09	NCT01676831	完成
TLR3激动剂	FIt3L/CDX-301 poly-ICLC	RT	低级别B细胞淋巴瘤	30	I/II	2013-12	2020-11	NCT01976585	招募中
TLR3激动剂	Poly-ICLC	-	黑色素瘤,头颈部鳞状细胞癌,皮肤鳞状细胞癌,皮肤肉瘤,皮肤基底细胞癌,乳腺癌	8	II	2013-11	2014-08	NCT01984892	结束
TLR4激动剂	GLA-SE	-	默克尔细胞癌	10	I	2014-01	2018-03	NCT02035657	完成
细胞因子	IL-2	-	黑色素瘤	12	I	2012-09	2014-08	NCT01672450	完成
细胞因子	Ipilimumab	-	恶性黑色素瘤	21	II	2012-12	2015-05	NCT02076633	完成
细胞因子	L19IL-2+L19TNF	-	恶性黑色素瘤	15	II	2012-02	2015-06	NCT01480323	完成
细胞因子	IL-2	Ipilimumab	黑色素瘤	51	II	2012-02	2016-03	NCT01502293	完成
细胞因子	IL-12	-	黑色素瘤	51	II	2012-02	2016-03	NCT01502293	完成
单克隆抗体	抗CD40 (ADC-1013)	-	实体肿瘤	24	I	2015-04	2017-03	NCT02379741	完成
单克隆抗体	抗CTLA4 (Ipilimumab)	RT	黑色素瘤、淋巴瘤、结直肠癌	3	I/II	2013-02	2015-06	NCT01769222	结束
细胞	DCVax-Direct	-	局部晚期肿瘤,转移性实体组织瘤,肝癌,结直肠癌,胰腺癌,黑色素瘤	60	I/II	2013-06	2016-12	NCT01882946	未知
细胞	DC疫苗	术前化疗	乳腺癌	10	I/II	2014-05	2019-07	NCT02018458	未招募
细胞	DC疫苗	冷冻疗法	前列腺癌	18	I	2015-05	2019-08	NCT02423928	完成
细胞	CD4 CARs (T1E28z)	-	头颈部肿瘤	30	I/II	2015-06	2020-04	NCT01818323	招募中
细胞	AlloStim®	冷冻消融术	转移性结直肠癌	450	II/III	2017.12	2020.10	NCT01741038	未招募

3 原位疫苗的优势

靶向治疗和免疫治疗的不断发展提高了人们对治愈肿瘤的希望,然而,实际应用时仍存在诸多挑战,较为常见的如制备过程繁琐、对正常组织可能存在高毒性、肿瘤细胞亚型的耐药性以及人群受益率低等。原位疫苗的应用为解决这些挑战提供了一种独特的选择,其优势主要体现在以下三个方面。

3.1 制备简便

需体外制备的疫苗如新抗原疫苗和DC疫苗,与原位疫苗相比有很大的局限性。新抗原疫苗作为近年来的新起之秀,又包括肽疫苗、核酸疫苗等,其制备过程包含多个步骤,仅寻找有效的新抗原就需肿瘤组织活检、高通量测序、生物学信息分析、HLA限制性亲和力预测、所得抗原的免疫原性验证等,之后再以GMP标准合成表达有效表位的疫苗,全程耗时持久,价格昂贵,且所得抗原高度个体化、缺乏普适性,表位数目也极为有限。DC疫苗的制备过程还包括将DC与所获得的肿瘤相关抗原体外共孵育,再将致敏的DC回输体内^[36],全程花费昂贵而操作繁琐。这些非原位疫苗使用前需对宿主进行HLA分型,意味着仅有部分患者获益。此外,过继性T细胞免疫治疗,如T细胞受体工程化T细胞(TCR-T)和嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)等,其流程大致包括从患者的外周血中分离出T淋巴细胞,将T淋巴细胞在体外激活/富集后做一定的基因修饰,将处理后的T淋巴细胞回输患者体内,实现肿瘤抑制/清除的效果。宾夕法尼亚大学的专家团队等^[37]在构建基因工程化T细胞时,采用的基因编辑方法涉及慢病毒、电转、CRISPR系统等,其技术难度大且成本高。

相比而言,原位疫苗简单便捷,只需直接将各种生物和化学试剂局部注射到肿瘤中,将其变为“抗原工厂”即可,无需筛选抗原和受众,这种便捷性又促使了多种治疗方法的联合应用^[31-32]。

3.2 安全性高

原位疫苗的给药方式决定了其极具优势的量效关系,即低剂量高效率,这是其他肿瘤治疗方法难以比拟的。多数药物的疗效和毒副作用可出现较大矛盾。TCR-T疗法易产生靶标毒性和脱靶毒性。JOHNSON等^[38]曾分别以MART-1和gp100为靶点治疗黑色素瘤患者,由于皮肤、眼、耳的正常黑色素细胞也有此类靶点,部分患者出现了严重的皮肤、视力、听力损害。CAR-T疗法易出现细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、神经毒性和心血管毒性^[39]。NEELAPU等^[40]在一项多中心II期临床试验中,用靶向CD19的CAR-T技术治疗111例弥漫性

大B细胞淋巴瘤患者,结果导致13%和28%的患者出现了3级或3级以上CRS或神经毒性事件,其中3名患者在治疗期间死亡。免疫检查点抑制剂易产生广泛的免疫相关不良反应,如暴发性心肌炎或致命性心力衰竭^[41]。一项III期试验^[20]报道,对晚期黑色素瘤患者静脉注射10 mg/kg ipilimumab比3 mg/kg ipilimumab的整体生存期明显延长,可是治疗相关的不良事件也明显增多;但当局部瘤内注射ipilimumab时,其剂量只要达到静脉给药剂量的1%就可以触发治疗性的抗肿瘤免疫反应^[42]。类似地,IL-12重组蛋白在抗癌方面显示出良好的临床活性,但全身给药后的安全性较差;CD137作为共刺激分子可增强免疫T细胞应答,但易引发剂量限制性的自体免疫性肝细胞溶解;如采用电穿孔瞬时转染技术,使肿瘤特异性CD8⁺T细胞瞬时表达IL-12和CD137后再局部瘤内注射此种基因工程化的T细胞,小鼠可出现局部和远位肿瘤的完全缓解^[24]。

3.3 免疫疗效独特

整体来看,原位疫苗包括免疫启动-免疫效应-肿瘤细胞死亡导致抗原释放-免疫再启动-免疫再效应,因而具备循环性、普适性和动态性等免疫疗效的优势。

3.3.1 循环进行的免疫效应 原位免疫治疗后可出现远位未治疗处肿瘤的缩小(远位效应)^[8,24,42],这要归功于体内被激活的抗肿瘤免疫细胞的循环。一项II期临床试验对晚期黑色素瘤患者局部瘤内注射IL-12质粒(tavkinogenetelse质粒,tavo),结果17.9%的患者达到完全缓解,25%的患者出现所有未治疗处肿瘤缩小,表明该疗法引起了全身的免疫反应^[43]。长期来看,这种循环进行的免疫效应可以累积,从而形成“免疫记忆性”。LIU等^[44]设计了一种针对肺抗原提呈细胞的可吸入纳米粒子系统NP-cGAMP,联合RT协同作用于小鼠的一处肺肿瘤,发现肿瘤模型小鼠在经受反复免疫效应后可获得长期生存。

3.3.2 普适通用的治疗策略 原位疫苗能使肿瘤细胞死亡并释放大量抗原,形成“抗原工厂”。多种表位抗原的释放很好地解决了肿瘤的异质性和患者的HLA限制性,同时激活I型和II型免疫反应,在高度特异性杀伤肿瘤的同时保持对人群及不同瘤种的普适性,提供了建立通用原位免疫治疗策略的机会。SBRT可诱导肿瘤细胞死亡和释放抗原,激发固有和适应性免疫反应;免疫检查点抑制剂可增强抗肿瘤T细胞的活性。多个临床试验提示联合SBRT和免疫检查点抑制剂可能是一种治疗肿瘤的新模式^[45]。非原位疫苗由于过度依赖个别靶点和单一类型的抗肿瘤免疫,易缺乏足够的免疫原性,尤其对于突变负荷低

的“冷肿瘤”,更难以发挥较大作用。MELERO等^[46]在小鼠移植性肿瘤模型的实验表明,轮状病毒、流感和黄热病疫苗在瘤内注射后特别具有诱导出强大的抗肿瘤免疫,将“冷肿瘤”转化为“热肿瘤”的潜力,而且病毒诱导的I型干扰素通路可提高肿瘤对免疫检查点抑制剂的敏感性。

3.3.3 动态突破的免疫耐受 英国肿瘤学家SWANTON领导的研究团队^[47]认为,肿瘤在很大程度上符合克隆突变、适应和生长的进化规则。肿瘤细胞不但数量庞大,而且具有遗传异质性,现有的许多治疗手段往往给这些复杂的肿瘤细胞种群造成强烈的环境选择压力,反而促进难治性肿瘤的发生发展,这在现阶段临床治疗上非常棘手。JOHNSON等^[48]对23例低级别胶质瘤患者的初发和复发肿瘤的外显子进行了测序,43%的病例复发肿瘤中存在新的基因突变,包括TP53、ATRX、SMARCA4和BRAF中的驱动突变等。值得注意的是,在10例接受化疗药物替莫唑胺(temozolamide, TMZ)治疗的患者中,有6例出现了恶性胶质瘤的替代进化途径,具有TMZ诱导突变的特征。肿瘤精准治疗就是指通过基因测序和生物信息学分析等技术,观察个体在分子或生理等层面上的独特特征,进而提供高度靶向性的干预措施^[49]。但是肿瘤细胞基因组的动态突变则阻碍了持久性精准治疗的施行。原位疫苗可循环杀伤肿瘤细胞,产生肿瘤抗原的不断更新和表位扩散,更好地解决肿瘤细胞突变导致的免疫耐受问题。并且,原位免疫疗法允许在每次注射肿瘤时进行连续和多焦活检,了解肿瘤免疫动态的同时及时调整治疗策略。临床前研究^[50]数据显示,荷瘤小鼠静脉注射肿瘤特异性靶向抗体后,最终可能会复发不再表达原靶向表位的肿瘤细胞;此时,向小鼠瘤内注射TLR激动剂了联合静脉注射单克隆抗体,可产生基于CD8⁺T细胞作用的长期存在的免疫反应。

4 存在问题和应对策略

虽然原位疫苗有这些巨大优势,但仍然面临着许多挑战:(1)仅局部瘤内注射是否能产生全身抗肿瘤免疫反应。尽管通过临床前研究已得到部分肯定回答,但仍有一些肿瘤未出现“远位效应”。这就需要寻找产生“远位效应”肿瘤的共同特征或针对无“远位效应”的肿瘤制定更合理的联合治疗策略等。(2)如何选择合适的给药剂量。大多数传统疗法仍以口服、静脉注射、皮下注射等方式为主,其剂量的选择往往取决于药物毒性和人体耐受的平衡关系。局部瘤内注射时需重新寻找及确定远低于最大耐受剂量的最佳生物剂量,确保尽量大的疗效和安全性。

(3)如何选择原位免疫治疗的肿瘤部位及数量。针对转移性肿瘤患者需考虑局部治疗病灶的部位,如浅层或深层、原发灶或转移灶;需考虑如何避开邻近血管或神经以及是否影响其他邻近器官等;还需考虑病灶的具体数量。(4)如何确定原位免疫治疗的最佳时机。术前或术后?早期或晚期?最近有报道^[51-52]指出,原位免疫治疗可辅助干预早期实体肿瘤或预防术后复发。(5)临床转化时还需考虑的其他因素。为了获得更好的疗效,需探究瘤内注射药物的操作细节,如局部瘤内注射的起始和终止时间如何判断?是否随着时间推移注射越来越多的病灶?是否应该同时进行淋巴结清扫?淋巴结清扫是否会损害瘤内注射的长期效果?是否可以在同一病灶中联合注射一种以上的药物以达到协同疗效?如何制定合理的临床疗效评估标准……这些问题尚待后续大量研究来解决。此外,还需充分考虑原位免疫疗法与其他治疗策略的协同效应,以达到最佳的联合治疗效果。

肿瘤免疫治疗的主要目标是诱导持久有效的抗肿瘤免疫反应,同时使正常宿主细胞不受伤害。先前的靶向治疗和免疫治疗已显示出令人鼓舞的疗效,为许多肿瘤类型的治愈带来希望。然而,部分肿瘤仍可一开始就对治疗不敏感或后来产生免疫耐受,原位疫苗的应用为解决这些挑战提供了新的思路。以局部肿瘤为直接靶点原位疫苗可导致大量肿瘤相关抗原的释放而无需鉴定肿瘤的特定表位,多种免疫佐剂的瘤内注射又可改变肿瘤微环境从而使其由免疫抑制状态转变为免疫激活状态,导致产生“远位效应”和长期的免疫记忆性。同时,其低量高效的关系又降低了全身暴露和相关毒性的风险。但是,寻找可注射大小合适的肿瘤部位和操作手段可能是一个亟待解决的问题,尤其是在需要多次重复给药的情况下,可以考虑新的递送方式如纳米载体或配体-受体特异性结合引导等。总之,对于目前肿瘤治疗的局限性,原位疫苗提供了一个可供选择的独特机会。

[参考文献]

- [1] AZNAR M A, TINARI N, RULLAN A J, et al. Intratumoral delivery of immunotherapy-act locally, think globally[J]. *J Immunol*, 2017, 198(1): 31-39. DOI:10.4049/jimmunol.1601145.
- [2] COLEY W B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. 1893[J]. *Am J Med Sci*, 1970, 105(5): 487-510. DOI: 10.1097/0000441-189305000-00001.
- [3] SASAKI T, FUJIMORI M, HAMAJI Y, et al. Genetically engineered bifidobacterium longum for tumor-targeting enzyme-prodrug therapy of autochthonous mammary tumors in rats[J]. *Cancer Sci*, 2006,

- 97(7): 649-657. DOI:10.1111/j.1349-7006.2006.00221.x.
- [4] CHEN J, QIAO Y, TANG B, et al. Modulation of salmonella tumor-colonization and intratumoral anti-angiogenesis by triptolide and its mechanism[J]. *Theranostics*, 2017, 7(8): 2250-2260. DOI: 10.7150/thno.18816.
- [5] DECLUE A E, AXIAK-BECHTEL S M, ZHANG Y, et al. Immune response to c. novyi-NT immunotherapy[J]. *Vet Res*, 2018, 49(1): 38-48. DOI:10.1186/s13567-018-0531-0.
- [6] ROBERTS N J, ZHANG L, JANKU F, et al. Intratumoral injection of clostridium novyi-NT spores induces antitumor responses[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(249): 249ra111-249ra137. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008982.
- [7] PATEL R B, YE M, CARLSON P M, et al. Development of an in situ cancer vaccine via combinational radiation and bacterial-membrane-coated nanoparticles[J/OL]. *Adv Mater*, 2019, 31(43): e1902626 [2020-03-10]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.201902626>. DOI:10.1002/adma.201902626.
- [8] CAI H, WANG C, SHUKLA S, et al. Cowpea mosaic virus immunotherapy combined with cyclophosphamide reduces breast cancer tumor burden and inhibits lung metastasis[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6(16): 1802281-1802292. DOI:10.1002/advs.201802281.
- [9] BRIDLE B W, BOUDREAU J E, LICHTY B D, et al. Vesicular stomatitis virus as a novel cancer vaccine vector to prime antitumor immunity amenable to rapid boosting with adenovirus[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(10): 1814-1821. DOI:10.1038/mt.2009.154.
- [10] HAMMERICH L, MARRON T U, UPADHYAY R, et al. Systemic clinical tumor regressions and potentiation of PD-1 blockade with in situ vaccination[J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 814-824. DOI:10.1038/s41591-019-0410.
- [11] BHATIA S, MILLER N J, LU H, et al. Intratumoral g100, a TLR4 agonist, induces antitumor immune responses and tumor regression in patients with merkel cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(4): 1185-1195. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-18-0469.
- [12] MULLINS S R, VASILAKOS J P, DESCHLER K, et al. Intratumoral immunotherapy with TLR7/8 agonist MEDI9197 modulates the tumor microenvironment leading to enhanced activity when combined with other immunotherapies[J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 244-261. DOI:10.1186/s40425-019-0724-8.
- [13] REILLEY M J, MORROW B, AGER C R, et al. TLR9 activation cooperates with T cell checkpoint blockade to regress poorly immunogenic melanoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 323-331. DOI:10.1186/s40425-019-0811-x.
- [14] RODRIGUEZ-RUIZ M E, VITALE I, HARRINGTON K J, et al. Immunological impact of cell death signaling driven by radiation on the tumor microenvironment [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(2): 120-134. DOI: 10.1038/s41590-019-0561-4.
- [15] RODRIGUEZ-RUIZ M E, PEREZ-GRACIA J L, RODRIGUEZ I, et al. Combined immunotherapy encompassing intratumoral poly-ICLC, dendritic-cell vaccination and radiotherapy in advanced cancer patients[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(5): 1312-1319. DOI: 10.1093/annonc/mdy089.
- [16] FRANK M J, REAGAN P M, BARTLETT N L, et al. In situ vaccination with a TLR9 agonist and local low-dose radiation induces systemic responses in untreated indolent lymphoma[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(10): 1258-1269. DOI:10.1158/2159-8290.cd-18-0743.
- [17] THEELEN W, PEULEN H M U, LALEZARI F, et al. Effect of pembrolizumab after stereotactic body radiotherapy vs pembrolizumab alone on tumor response in patients with advanced non-small cell lung cancer: results of the PEMBRO-RT phase 2 randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2019; 5(9): 1276-1282. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.1478.
- [18] CHO A, JANTSCHITSCH C, KNOBLER R. Extracorporeal photopheresis-an overview[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2018, 5(2296-858X): 236-250. DOI:10.3389/fmed.2018.00236.
- [19] TREMBLE L F, O'BRIEN M A, SODEN D M, et al. Electrochemotherapy with cisplatin increases survival and induces immunogenic responses in murine models of lung cancer and colorectal cancer[J]. *Cancer Lett*, 2019, 442(0304-3835): 475-482. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.11.015.
- [20] ASCIERTO P A, DEL VECCHIO M, ROBERT C, et al. Ipilimumab 10 mg/kg versus ipilimumab 3 mg/kg in patients with unresectable or metastatic melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(5): 611-622. DOI:10.1016/s1470-2045(17)30231-0.
- [21] LIN CHAOLONG, REN WENFENG, LUO YONG, et al. Intratumoral delivery of a PD-1-blocking scFv encoded in oncolytic HSV-1 promotes antitumor immunity and synergizes with TIGIT blockade[J/OL]. *Cancer Immunol Res*. 2020. Epub ahead of print[2020-03-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32127389>. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0628.
- [22] MUNTASELL A, OCHOA M C, CORDEIRO L, et al. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2017, 45: 73-81. DOI:10.1016/j.coi.2017.01.003.
- [23] HEBB J P O, MOSLEY A R, VENCES-CATALAN F, et al. Administration of low-dose combination anti-CTLA4, anti-CD137, and anti-OX40 into murine tumor or proximal to the tumor draining lymph node induces systemic tumor regression[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(1): 47-60. DOI:10.1007/s00262-017-2059-y.
- [24] ETXEBERRIA I, BOLANOS E, QUETGLAS J I, et al. Intratumoral adoptive transfer of IL-12 mRNA transiently engineered antitumor CD8⁺ T cells[J]. *Cancer Cell*, 2019, 36(6): 613-629. DOI:10.1016/j.ccell.2019.10.006.
- [25] WANG C, STEINMETZ N F. CD47 blockade and cowpea mosaic virus nanoparticle in situ vaccination triggers phagocytosis and tumor killing[J/OL]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(8): e1801288[2020-03-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30838815>. DOI: 10.1002/adhm.201801288.
- [26] YASMIN-KARIM S, BRUCK P T, MOREAU M, et al. Radiation and local anti-CD40 generate an effective in situ vaccine in preclinical models of pancreatic cancer[J]. *Front Immunol*, 2018, 9(1664-3224): 2030-2052. DOI:10.3389/fimmu.2018.02030.
- [27] KEMP V, VAN DEN WOLLENBERG D J M, CAMPS M G M, et al. Arming oncolytic reovirus with GM-CSF gene to enhance immunity[J]. *Cancer Gene Ther*, 2019, 26(9/10): 268-281. DOI: 10.1038/s41417-018-0063-9.
- [28] RAY A, WILLIAMS M A, MEEK S M, et al. A phase I study of intratumoral ipilimumab and interleukin-2 in patients with advanced melanoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(39): 64390-64399. DOI:10.18632/oncotarget.10453.
- [29] EGILMEZ N K, JONG Y S, SABEL M S, et al. In situ tumor vacci-

- nation with interleukin-12-encapsulated biodegradable microspheres: induction of tumor regression and potent antitumor immunity[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(14): 3832-3837. DOI:10.1016/S0165-4608(00)00214-4.
- [30] SUN X, CAO Z, MAO K, et al. Photodynamic therapy produces enhanced efficacy of antitumor immunotherapy by simultaneously inducing intratumoral release of sorafenib[J]. *Biomaterials*, 2020, 240 (0142-9612): 119845-119895. DOI:10.1016/j.biomaterials.2020.119845.
- [31] HUANG P, WANG X, LIANG X, et al. Nano-, micro-, and macroscale drug delivery systems for cancer immunotherapy[J]. *Acta Biomater*, 2019, 85(1742-7061): 1-26. DOI:10.1016/j.actbio.2018.12.028.
- [32] BLOOM A C, BENDER L H, TIWARY S, et al. Intratumorally delivered formulation, INT230-6, containing potent anticancer agents induces protective T cell immunity and memory[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(10): e1625687[2020-03-10]. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2019.1625687>. DOI: 10.1080/2162402X.2019.1625687.
- [33] CHUA C Y X, JAIN P, SUSNJAR A, et al. Nanofluidic drug-eluting seed for sustained intratumoral immunotherapy in triple negative breast cancer[J]. *J Control Release*, 2018, 285: 23-34. DOI:10.1016/j.jconrel.2018.06.035.
- [34] LEACH D G, YOUNG S, HARTGERINK J D. Advances in immunotherapy delivery from implantable and injectable biomaterials[J]. *Acta Biomater*, 2019, 88: 15-31. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.02.016.
- [35] CHESNEY J, PUZANOV I, COLLICHO F, et al. Randomized, open-label phase II study evaluating the efficacy and safety of talimogene laherparepvec in combination with ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced, unresectable melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(17): 1658-1667. DOI:10.1200/jco.2017.73.7379.
- [36] PEREZ C R, DE PALMA M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5408-5417. DOI:10.1038/s41467-019-13368-y.
- [37] STADTMAUER E A, FRAIETTA J A, DAVIS M M, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer[J]. *Science*, 2020, 367(6481): 7365-7384. DOI:10.1126/science.aba7365.
- [38] JOHNSON L A, MORGAN R A, DUDLEY M E, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen[J]. *Blood*, 2009, 114(3): 535-546. DOI:10.1182/blood-2009-03-211714.
- [39] LANCELLOTTI P, MOONEN M, GALDERISI M. Chimeric antigen receptor T-cells and cardiovascular toxicity: cause for concern? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(25): 3109-3111. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.10.028.
- [40] NEELAPU S S, LOCKE F L, BARTLETT N L, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR-T cell therapy in refractory large B-cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2531-2544. DOI: 10.1056/NEJMoa1707447.
- [41] LYON A R, YOUSAF N, BATTISTI N M L, et al. Immune checkpoint inhibitors and cardiovascular toxicity[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(9): e447-e458[2020-03-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30191849>. DOI:10.1016/s1470-2045(18)30457-1.
- [42] SAGIV-BARFI I, CZERWINSKI D K, LEVY S, et al. Eradication of spontaneous malignancy by local immunotherapy[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(426), 4488-4550. DOI: 10.1126/scitranslmed.aan4488.
- [43] ALGAZI A, BHATIA S, AGARWALA S, et al. Intratumoral delivery of tavokinogene telseplasmid yields systemic immune responses in metastatic melanoma patients[J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(4): 532-540. DOI:10.1016/j.annonc.2019.12.008.
- [44] LIU Y, CROWE W N, WANG L L, et al. An inhalable nanoparticulate STING agonist synergizes with radiotherapy to confer long-term control of lung metastases[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):5108-5122. DOI: 10.1038/s41467-019-13094-5.
- [45] LUKE J J, LEMONS J M, KARRISON T G, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab and multisite stereotactic body radiotherapy in patients with advanced solid tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(16):1611-1618. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.2229.
- [46] MELERO I P, GATO M, SHEKARIAN T, et al. Repurposing infectious disease vaccines for intratumoral immunotherapy[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000443[2020-03-10]. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000443>. DOI:10.1136/jitc-2019-000443.
- [47] TURAJLIC S, SOTTORIVA A, GRAHAM T, et al. Resolving genetic heterogeneity in cancer[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(7): 404-416. DOI:10.1038/s41576-019-0114-6.
- [48] JOHNSON B E, MAZOR T, HONG C, et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma[J]. *Science*, 2014, 343(6167): 189-193. DOI:10.1126/science.1239947.
- [49] GOETZ L H, SCHORK N J. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress[J]. *Fertil Steril*, 2018, 109(6): 952-963. DOI:10.1016/j.fertnstert.2018.05.006.
- [50] VARGHESE B, WIDMAN A, DO J, et al. Generation of CD8⁺ T cell-mediated immunity against idiotype-negative lymphoma escapees[J]. *Blood*, 2009, 114(20): 4477-4485. DOI:10.1182/blood-2009-05-223263.
- [51] HONG W X, HAEBE S, LEE A, et al. Intratumoral immunotherapy for early stage solid tumors[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(7), Epub ahead of print[2020-03-10]: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2020/03/13/1078-0432.CCR-19-3642.abstract>. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-19-3642.
- [52] KEPP O, MARABELLE A, ZITVOGEL L, et al. Oncolysis without viruses - inducing systemic anticancer immune responses with local therapies[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 17(1):49-64. DOI:10.1038/s41571-019-0272-7.

[收稿日期] 2020-02-15

[修回日期] 2020-03-13

[本文编辑] 韩丹