(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日:
2003年4月17日(17.04.2003)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 03/031602 A1

(51) 国际分类号[7]: C12N 1/21

(21) 国际申请号: PCT/CN01/01616

(22) 国际申请日: 2001年12月12日(12.12.2001)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
01141696.3 2001年10月9日(09.10.2001) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 杭州康科生物技术有限公司(HANGZHOU CONQUER BIOTECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市文三路199号, Zhejiang 310012 (CN)。

(72) 发明人;及
(75) 发明人/申请人(仅对美国): 陈思毅(CHEN, Siyi) [US/US]; 美国皮尔兰阿比伍德大街3929号, No. 3929 Abbeywood Drive, Pearland, TX 77584 (US)。胡放(HU, Fang) [CN/CN]; 中国北京市海淀区皂君庙乙7号, Beijing 100081 (CN)。

(74) 代理人: 中原信达知识产权代理有限责任公司 (CHINA SINDA INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市朝阳区建国路99号中服大厦1300室, Beijing 100020 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号，请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的"代码及缩写符号简要说明"。

(54) Title: THE ONCOLYTIC MICROORGANISMS EXPRESSING HSP AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 表达热休克蛋白的溶瘤微生物及其应用

(57) Abstract: The present invention is directed to the oncolytic microorganisms expressing HSP, compositions or pharmaceutical compositions containing them, and to methods of killing local and metastatic tumor using them. The microorganisms refer to viruses and bacteria, which can grow selectively within tumor cells in order to lyse tumor cells. While administrated the microorganisms or compositions according to present invention, the oncolytic microorganisms lyse tumor cells and the heat shock proteins expressed or administrated meanwhile adhere to tumor antigen released by lysing tumor cells, and bind to antigen-presenting cells so as to induce specific immune reaction against tumor cells, then to kill metastatic tumors.

(57) 摘要

本发明提供了表达热休克蛋白的溶瘤微生物、含有该微生物的组合物或药物组合物，以及使用该微生物杀死局部的及转移的肿瘤的方法。所述的溶瘤微生物包括能选择性地在肿瘤细胞中生长从而将肿瘤细胞溶解的病毒和细菌。给肿瘤患者施用本发明的微生物或组合物后，所述溶瘤微生物溶解肿瘤细胞，同时表达的或与溶瘤微生物同时投递的热休克蛋白与肿瘤细胞溶解所释放的肿瘤抗原粘附，并与抗原提呈细胞结合，诱发抗肿瘤细胞特异性的免疫反应，从而杀死转移的肿瘤。

WO 03/031602 A1

表达热休克蛋白的溶瘤微生物及其应用

技术领域

本发明涉及生物医学的肿瘤免疫治疗领域。具体地讲，本发明涉及一种肿瘤免疫治疗新方法，即一种有效利用肿瘤患者自身肿瘤抗原，同步激活患者免疫应答，从而在杀灭原位肿瘤的同时抑制肿瘤转移并治疗转移性肿瘤的方法。本发明还涉及一种溶瘤微生物、含有该溶瘤微生物的组合物以及所述的溶瘤微生物或组合物用于治疗肿瘤或制备用于治疗肿瘤的药物的应用。

技术背景

目前，治疗肿瘤最常用的还是传统的肿瘤手术切除和放化疗疗法，它给患者带来很大的痛苦和负担。而且，对转移性肿瘤患者而言，一方面很难通过手术将肿瘤彻底切除或通过放化疗疗法将其彻底杀灭；另一方面，切除原位肿块，往往有引发肿瘤在身体其它部位生长的风险，结果反而加速了肿瘤的扩散。

通过改变遗传特性，人们创建了一些能够选择性地感染肿瘤细胞的病毒，例如单纯疱疹病毒（*Herpesvirus*）如 HSV-1 和 G207 等，腺病毒（*Adenovirus*）如 ONYX-015（也称为 dl1520）、CN706 和 CN787 等，新城疫病毒(*Newcastle Disease Virus*)如 73-T 等，水泡性口炎病毒（*Vesiculovirus*），呼肠孤病毒(*Reovirus*)如 Reolysin [1-3]。虽然这其中的某些病毒具备很强的抗肿瘤活性，在临床试验中能够使肿瘤体积变小甚至完全消除 [3]，但存在的问题是：对于转移性肿瘤的抑制作用不强。原因在于：虽然这种病毒通过裂解肿瘤细胞来使肿瘤消退，但实体瘤的病人体内缺乏肿瘤特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞介导的免疫反应 [4]。缺乏免疫反应的原因可能是大部分肿瘤抗原是在肿瘤细胞内，而并不是释放出来，发生坏死而释放肿瘤抗原的肿瘤细胞数量也很有限，抗原提呈细胞吸纳肿瘤抗原的几率极小。即使在病毒介导的肿瘤细胞裂解后通过增强肿瘤抗原的释放，呈递“危险信号”，来激发机体肿瘤特异性免疫反应，但由于缺乏有效呈递，只有很少的一部分肿瘤抗原能够被提呈，激发的免疫反应也非常有限，仍然需要特殊的机制来进一步增强抗肿瘤的免疫反应。

用癌症疫苗进行肿瘤免疫治疗的策略主要是将被杀死的肿瘤细胞或其裂解产物同时与佐剂或细胞因子共同使用。通过接种癌症疫苗能激发机体的抗肿瘤免疫反应，这在肿瘤治疗研究中将是一个重大的进展。但是，在很多情况下，肿瘤抗原是弱免疫原，也即不能够引起机体足够的针对肿瘤抗原的免疫应答反应。现阶段利用癌症疫苗治疗肿瘤的方式主要为：用分离的肿瘤特异性抗原进行免疫；或通过体外将肿瘤细胞与树突状细胞融合后对病人进行细胞治疗。但是，因为不同病人存在着肿瘤抗原的个体差异性；而且同一病人在肿瘤发展的不同

阶段，肿瘤细胞所表达的特异性抗原也不相同；即使在同一病人的肿瘤的某一发展时期，其肿瘤细胞内也存在着多种肿瘤抗原。由于这种种限制，导致现阶段用癌症疫苗治疗肿瘤存在着许多缺点：不存在一种针对多种肿瘤的抗原，必须针对每个病人设计相应的肿瘤抗原，技术操作细节各不相同，操作环节多，每个环节的技术要求高，操作中容易造成污染；而且由于病人体内多种抗原的动态发展，使得这种体外操作技术不一定有效。在临床治疗实践中，必须针对每个病人制备独特的癌症疫苗，难度大，费用高，可行性差。

综上所述，传统的手术治疗和放化疗对机体本身造成伤害而且难以消除转移性肿瘤。现阶段用病毒等作为载体对肿瘤进行基因治疗也只能针对局部肿瘤，对转移性肿瘤也无能为力。用白介素，干扰素等细胞因子对肿瘤进行免疫治疗只能激发免疫调节反应和很少的 CTL 细胞介导的对肿瘤细胞的特异性杀伤效应。最近发展的“癌症疫苗”疗法非常昂贵且没有普遍适用性。因此，到目前为止，还缺乏一种高效低毒、给药方便的肿瘤治疗物质，该物质在被施用给肿瘤患者后能在体内诱导出有效的抗肿瘤免疫反应，从而将肿瘤，包括转移性肿瘤有效地杀灭。

发明概述

本发明的目的在于找到一种肿瘤免疫治疗新方法，以便有效地利用肿瘤患者自身的肿瘤抗原，同步激活患者体内的免疫应答，从而在杀灭原位肿瘤的同时抑制肿瘤转移。

为实现上述目的，本发明提供了一种溶瘤微生物，该微生物能选择性地在肿瘤细胞中生长并同时表达能粘附肿瘤抗原并能被抗原提呈细胞所识别的蛋白（在下文中有时也将之简称为“功能蛋白”）。

为实现上述目的，本发明还提供了一种抗原提呈细胞，其是被含有编码功能蛋白或其片段的 DNA 序列的载体转化的。

为实现上述目的，本发明还提供了一种微生物组合物，包括：

a）溶瘤微生物，该微生物能选择性地在肿瘤细胞中生长以裂解肿瘤细胞；和

b）表达能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白及其片段的载体；

其中所述的微生物或载体任选地进一步含有编码免疫增强分子的 DNA 序列。

为实现上述目的，本发明还提供了一种药物组合物，其主要含有：

a. 溶瘤微生物，即能选择性地在肿瘤细胞中生长的微生物；

b. 能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段；和

c. 任选地含有的免疫增强因子、免疫佐剂和可药用载体，其中免疫增强因子可以由溶瘤微生物产生。

为实现上述目的，本发明还提供了一种治疗肿瘤的免疫治疗剂，其包含以上所述的溶瘤微生物，或者所述的抗原提呈细胞、或者所述的微生物组合物或者所述的药物组合物。

为实现上述目的，本发明还提供了一种治疗肿瘤的方法，包括用含有编码能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片断的 DNA 的载体转化患者的抗原提呈细胞。

为实现上述目的，本发明还提供了治疗肿瘤的方法，包括给肿瘤患者施用一种免疫有效量的以上所述的溶瘤微生物、所述的抗原提呈细胞、所述的微生物组合物、所述的药物组合物或所述的免疫治疗剂。

在本发明的一个实施方案中，给肿瘤患者体内施用免疫有效量的携有功能蛋白基因的溶瘤微生物。具体地说，所述的携有功能蛋白基因的溶瘤微生物为能表达能粘附肿瘤抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段的重组溶瘤微生物；或者是溶瘤微生物和含有编码上述功能蛋白或其片段的 DNA 的质粒；或者是溶瘤微生物和包含编码上述功能蛋白或其片断的 DNA 的复制缺陷性载体。所述溶瘤微生物是指能选择性地在肿瘤细胞中生长裂解肿瘤细胞的病毒或细菌。通过溶瘤微生物在肿瘤细胞中大量复制而裂解肿瘤细胞，将肿瘤细胞杀死，释放患者自身的肿瘤抗原，放大危险信号，同步表达的功能蛋白自身或其与所粘附的肿瘤抗原形成的复合体，刺激并激活抗原提呈细胞，促进抗原及时提呈，激发患者自身免疫系统，从而杀死局部的及转移的肿瘤。

在本发明的另一实施方案中，用含有编码功能蛋白或其片段的 DNA 的载体转化患者的抗原提呈细胞。所述蛋白是能粘附肿瘤抗原并能被抗原提呈细胞所识别的蛋白。含有编码功能蛋白或其片段 DNA 的载体转化的抗原提呈细胞，对释放的抗原更加敏感，该提呈细胞释放的功能蛋白捕捉抗原后提交给抗原提呈细胞，进一步增强免疫信号，激活机体免疫反应。达到在杀灭肿瘤细胞的同时诱导肿瘤患者体内特异性抗肿瘤免疫反应，抑制肿瘤转移，并杀灭已转移的远端肿瘤细胞的目的。

在本发明的再一实施方案中，给肿瘤患者施用能选择性地在肿瘤细胞中生长的溶瘤微生物和上述功能蛋白或及其变体的组合物。溶瘤微生物在肿瘤细胞中大量复制而裂解肿瘤细胞，将肿瘤细胞杀死，释放患者自身的肿瘤抗原；另外，由于和溶瘤微生物同时施用给患者的所述功能蛋白本身具有和抗原提呈细胞的

亲和性，其在抗原提呈细胞周围的大量出现也会放大危险信号，更多地激活提呈细胞，激发患者自身的免疫应答，从而杀死局部的及转移的肿瘤。

本发明提供的溶瘤微生物优选为选择性地在肿瘤细胞中生长的病毒或细菌。病毒实例是腺病毒、单纯疱疹病毒、水泡性口炎病毒、新城疫病毒、呼肠孤病毒或其他能选择性地在肿瘤细胞中生长的病毒。细菌的实例是伤寒沙门氏菌(*Salmonella*)、双岐杆菌(*Bifidobacterium*)、志贺氏菌(*Shigella*)、李斯特菌(*Listeria*)、鼠疫杆菌(*Yersinia*)、梭菌(*Clostridium*)[21] 或其它能选择性地在肿瘤细胞中生长的细菌。

所述的能粘附肿瘤抗原并能被抗原提呈细胞所识别的蛋白或功能蛋白优选热休克蛋白。热休克蛋白来源于哺乳动物和病原微生物。所述哺乳动物包括但不限于人、非人灵长类动物和啮齿动物；所述病原微生物包括但不限于结核分支杆菌(*M. tuberculosis*)、麻风分支杆菌(*M. leprae*)、克氏椎虫(*Tryanosoma cruzi*)和恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)。所述含有功能蛋白基因的溶瘤微生物可进一步含有编码免疫增强分子的 DNA 序列，如 IL-2、IL-12、TNF、IFN、G-CSF、GM-CSF、趋化因子等在内的细胞因子，免疫共刺激分子如 B7 等。

本发明的溶瘤微生物、抗原提呈细胞、溶瘤微生物的组合物、药物组合物或免疫治疗剂可以单独使用，也可以和其它形式的免疫治疗剂联合使用，包括细胞因子、免疫佐剂和传统中药。

据推测，本发明中的溶瘤微生物、其组合物或药物组合物是通过如下一种或多种途径达到抑制或消除转移性肿瘤的目的的：a）能选择性在肿瘤细胞中复制的溶瘤微生物溶解肿瘤细胞，释放肿瘤抗原，同步表达的能粘附肿瘤抗原并被抗原提呈细胞识别的蛋白将肿瘤抗原实时提呈，刺激抗原提呈细胞（主要是被施用者自身的树突状细胞），进一步激发 NK 细胞、CTL 细胞、Th 细胞等免疫效应细胞的活性，激活机体免疫反应；b）能粘附肿瘤抗原并被抗原提呈细胞识别的蛋白本身具有和抗原提呈细胞的亲和性，其在抗原提呈细胞周围的大量出现也会放大危险信号，更多地激活提呈细胞；和/或 c）含有编码能粘附肿瘤抗原并被抗原提呈细胞识别的蛋白或其片段 DNA 的载体转化的抗原提呈细胞，对释放的抗原更加敏感，该提呈细胞释放的功能蛋白捕捉抗原后提交给抗原提呈细胞，进一步增强免疫信号，激活机体免疫反应。达到在杀灭肿瘤细胞的同时诱导肿瘤患者体内特异性抗肿瘤免疫反应，抑制肿瘤转移，并杀灭已转移的远端肿瘤细胞的目的。

综上所述，可以看出本发明的进步在于，本发明克服了现有技术中的由于肿瘤抗原的个体差异性，用 “癌症疫苗”进行治疗的主要缺陷：例如，必须得到病

人自体的肿瘤细胞，并在体外进行培养及一系列的实验操作的种种缺陷。本发明能够将患者自身肿瘤细胞裂解后释放的肿瘤特异性抗原实时提呈，并且不论肿瘤细胞所处的发展阶段以及肿瘤抗原的种类是否相同，都能激发机体针对自身特定的肿瘤抗原有效的免疫反应。本发明实现了在不同个体内利用个体自身的抗原提呈细胞在体内实时动态地将其自身特异性的肿瘤抗原进行加工和提呈，从而激发针对各自不同肿瘤抗原的特异性免疫反应，达到了既简单又有效的治疗效果。举例来说，本发明通过溶瘤微生物将肿瘤细胞裂解，同时由溶瘤微生物所表达的对抗原提呈细胞具有亲和性的蛋白对释放的肿瘤抗原进行吸附，并随后由抗原提呈细胞如树突状细胞将肿瘤抗原加工提呈，来激发机体本身的免疫效应细胞，包括：特异性杀伤肿瘤的 CTL（细胞毒性 T 淋巴细胞），能够调节机体免疫反应的 Th 细胞（辅助性 T 淋巴细胞），和 NK 细胞（自然杀伤 T 淋巴细胞），激活机体的免疫反应；不但能够溶解局部肿瘤，还可以进一步抑制并杀灭转移肿瘤，与单独用溶瘤病毒进行肿瘤治疗相比，突破了其只能治疗局部肿瘤的局限性。

附图简述

图 1 是本发明所构建的表达热休克蛋白的重组 HSV-1 病毒质粒的图。质粒 pHSV-HSP 含有 CMV 启动子控制下的 HSP70 基因和 SV40 多聚腺苷酸序列（SV40poly(A)）。该质粒还包括选择标记、E. coli 的复制起点（ColE1 ori）、HSV α (HSV 切割和包装信号)和 HSV ori (HSV 的 DNA 复制起点)。

图 2 是显示重组病毒 HSV-HSP 的体外细胞毒性效果的图。其中将鼠肿瘤细胞 CT26 培养于 24 孔板（每孔 1×10^5）并由 HSV-HSP 或 HSV 以不同的感染复数（0.01-10）感染。感染 4 天后用 Promega 试剂盒测定细胞毒性（%）。图 2 中当感染复数为 1 时，细胞毒性已达 99%以上。

图 3 表示重组的 HSV-HSP 在原位肿瘤内注射后能抑制远端肿瘤的良好能力。在小鼠的肋部双侧对称接种 CT26 细胞。当肿瘤分别长到最大直径为 0.5cm 时，仅在鼠的右侧肿瘤瘤内注射接种 HSV-HSP（$1X10^6$）(以实心方块表示)、HSV 载体（$1X10^6$）(以实心菱形表示)和 HSP70 蛋白(以实心三角表示)作为对照（该日设为第 0 日），过 7 天再进行第二次接种（每组 6 只）。与对照组相比，经瘤内注射接种 HSV-HSP 的肿瘤和其对侧未被接种的肿瘤在注入 HSV-HSP 后都会有显著的肿瘤生长减慢（$p<0.001$,感染后 25 天，非配对的 t 检验）。HSV-HSP 在抑制两侧的肿瘤生长显著优于 HSV 以及 HSP70 蛋白分别单独使用（$p<0.001$, 感染后 25 天，非配对 t 检验）。

图 4 是质粒 pLEP-HSP70-IRES-E1A 的构建图。
利用双质粒法构建重组腺病毒，首先将 HSP 基因和对腺病毒在肿瘤细胞内具备复制能力必须的 E1A 基因通过图示的多克隆位点连接到质粒 pLEP 上，构建得到重组质粒 pLEP-HSP70-IRES-E1A。

图 5 表示重组病毒 Ad-HSP/E1A 的构建过程。
将重组质粒 pLEP-HSP70-IRES-E1A 和质粒 pREP 通过酶切连接，并将连接产物用 γ 噬菌体包装并感染大肠杆菌，得到的重组质粒 pAd-Hsp70/E1A 经 I-CeuI 酶切和转染 293 细胞后得到能够表达 Hsp70 的重组腺病毒。

图 6 是本发明所构建的表达热休克蛋白的重组 pcDNA-HSP 质粒图。
将 PCR 扩增得到的 HSP 基因通过平端连接连到真核表达质粒 pcDNA3.1 上，重组质粒 pcDNA-HSP 含有 CMV 启动子控制下的 HSP70 基因和 BGH 多聚腺苷酸序列（BGHpolyA）,该质粒还包括选择标记以及复制起点 SV40ori.。

图 7 表示表达热休克蛋白的沙门氏菌在原位肿瘤内注射后能抑制远端肿瘤的良好能力。

在小鼠的肋部双侧对称接种 SMMC7721 细胞。当肿瘤分别长到最大直径为 0.5cm 时，仅在鼠的右侧肿瘤瘤内注射接种含有质粒 pcDNA-HSP 的沙门氏菌($aroA^-$)（$1X10^7$）(以实心方块表示)、不含质粒的沙门氏菌($aroA^-$)（$1X10^7$）(以实心菱形表示)和 HSP70 蛋白(以实心三角表示)作为对照（该日设为第 0 日），过 7 天再进行第二次接种（每组 6 只）。与对照组相比，经瘤内注射接种含有质粒 pcDNA-HSP 的沙门氏菌($aroA^-$)的肿瘤和其对侧未被接种的肿瘤都会有显著的肿瘤生长减慢（$p<0.001$,感染后 25 天，非配对的 t 检验）。HSV-HSP 在抑制两侧的肿瘤生长显著优于 HSV 和 HSP70 蛋白分别单独使用（$p<0.001$,感染后 25 天，非配对 t 检验）。

发明详述

在本专利申请的上下文中，采用的术语具有本领域中所熟知的一般含义。为清楚起见，本专利申请中的下列术语具有如下所说明的含义：

“溶瘤微生物”这一术语在此定义为天然存在的或经过遗传改造的一类能够进入肿瘤细胞，并通过选择性地在肿瘤细胞内大量复制而导致肿瘤细胞裂解死亡的微生物。溶瘤微生物的实例包括如下定义的溶瘤病毒和溶瘤细菌。

“溶瘤病毒”这一术语在此定义为一种能够选择性地在肿瘤细胞内复制并杀死肿瘤细胞而不论肿瘤细胞的 p53 或其它蛋白是否突变。溶瘤病毒的实例包括单

纯疱疹病毒（如 HSV-1），腺病毒（如 ONYX-015），新城疫病毒（NDV），水泡性口炎病毒（VSV）等。

“溶瘤细菌” 这一术语在此定义为一种经过遗传改造的细菌，该细菌能够在肿瘤细胞内复制并杀死肿瘤细胞。已知一些细菌的突变株可以作为肿瘤的基因治疗载体 [20]。例如，沙门氏菌中编码嘌呤（pur）或芳香族氨基酸（aroA）的基因突变后，不能自己合成这些对其必不可少的营养物质。这些物质在正常细胞中并不存在，而肿瘤细胞由于遗传特性的改变可以提供这些营养物质。所以这些营养缺陷型细菌能够选择性地在肿瘤细胞内扩增而使其裂解，如 Salmonella typhimurium YS72(pur-)在荷瘤鼠腹膜接种 2 天后，可检测到在肿瘤细胞中与在正常肝细胞中的比例为 9000:1[20]。将表达热休克蛋白的基因引入这些细菌突变株，再利用突变型细菌能够在肿瘤细胞中富集并使其裂解的这种特性，这些细菌完全可以作为本发明的溶瘤微生物使用。

“粘附肿瘤抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白”这一术语在此定义为一类蛋白，该蛋白能够通过吸附、粘附或结合等作用与肿瘤特异抗原多肽连接而形成蛋白-多肽复合物，并通过抗原肽伴侣转移作用将抗原提交给树突状细胞等抗原提呈细胞，抗原被加工提呈，激发机体免疫反应。这类蛋白的实例包括以热休克蛋白为主的分子伴侣蛋白。

“复制缺陷型载体”这一术语在此定义为不具备复制能力的病毒等微生物，但其表达外源蛋白的能力不受影响。

“热休克蛋白” 这一术语在此定义为一族高度保守具有 ATP 酶活性的分子，包括热休克蛋白变体。热休克蛋白在所有的原核生物以及大多数真核细胞中都存在；无论是否存在外界压力，其在蛋白质代谢中都起着重要作用，包括在蛋白质从头合成途径中蛋白质的折叠和跨膜转运以及错误折叠后的蛋白的降解。所述热休克蛋白，包括从肿瘤细胞和细菌感染的细胞中得到的 hsp70、hsp90 和 gp94/gp96，他们都能够激发细胞性的免疫反应。

“表达热休克蛋白的质粒” 这一术语在此定义为能够在体内进行真核表达热休克蛋白或其变体的质粒 DNA，编码热休克蛋白其变体的 DNA 序列以适当的方式位于由相关的启动子、polyA、增强子等调控元件组成的序列之中。

“热休克蛋白的变体” 这一术语在此定义为热休克蛋白的片段或各种修饰，包括但不限于一个或多个氨基酸的添加、缺失或替换以及和外源肽组成融合蛋白，通过对热休克蛋白的这种修饰可以增强热休克蛋白对抗原的粘附能力；或者可以将靶定位序列如信号肽，核定位序列等与热休克蛋白 DNA 连接使热休克蛋白能够改变其在细胞内的分布状态，如热休克蛋白由非分泌型转变为分泌型或

由定位于胞内转变为定位于胞外，从而使其更好的与抗原多肽结合。

“编码能粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段的 DNA 的质粒” 在此定义为能够在体内进行真核表达所述蛋白或其变体的质粒 DNA，编码所述蛋白或其变体的 DNA 序列以恰当的方式位于由相关的启动子、polyA、增强子等调控元件组成的序列之中。

“包含编码能粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段的 DNA 的复制缺陷型载体”在此定义为不具备复制能力的病毒等微生物，但其表达所述蛋白或其变体的能力不受影响。

“佐剂” 是一类和抗原共同使用或其本身就能够充当抗原来能够增强免疫反应的物质。

“抗原” 这一术语在此定义为能激发免疫应答的一种分子。免疫反应包括产生抗体，具备特异的免疫活性细胞的活化，或两者的组合。抗原可以产生于生物体、蛋白或抗原的亚单位、被杀死或被去活化的全细胞或裂解物。

“癌症” 这一术语在此定义为一种恶性的细胞性肿瘤并能够侵袭其它细胞。其实例包括但并不限于乳腺癌，前列腺癌，卵巢癌，子宫癌，皮肤癌，胰腺癌，结肠癌和肺癌。

“癌症疫苗”这一术语在此定义为肿瘤特异性抗原分子或接触过肿瘤细胞的免疫细胞。肿瘤细胞所表达的，使肿瘤细胞具有免疫原性从而能被免疫系统识别的蛋白质为肿瘤特异性抗原，通过体外制备该抗原蛋白质或其具有免疫效应的抗原表位多肽；或通过体外免疫细胞与肿瘤细胞接触使免疫细胞能够识别该种抗原，上述蛋白或多肽或免疫细胞即可作为治疗性的癌症疫苗。

“杀灭肿瘤”这一术语在此定义为能够有效地抑制肿瘤的扩增、浸润和转移以及使肿瘤消退或转化成良性。

“表达” 这一术语在此定义为由其启动子启动的一段特定序列的转录和/或翻译。

“主要组织相容性复合物”或“MHC” 这一术语在此定义为一簇特殊的基因，其中大部分编码在细胞表面进行抗原提呈的蛋白，其中对决定组织相容性最重要的包括 I 类组织相容性复合物，或 MHC I，其功能主要是将抗原提呈给 CD8 T 淋巴细胞；II 类组织相容性复合物，或 MHC II，其功能主要是将抗原提呈给 CD4

T 淋巴细胞。

“启动子”这一术语在此定义为一段核酸序列，能够调控一段特殊的核酸序列的转录。启动子这一术语包括增强子、沉默子和其它顺式调控原件。

“T 淋巴细胞” 在此定义为胸腺来源的能够参与一系列的细胞介导的免疫反应的一类细胞。

“抗原提呈细胞” 在此定义为其功能为加工提呈抗原给 T 细胞和 B 细胞的一类细胞，该类细胞包括树突状细胞，巨噬细胞和 B 细胞。

“免疫增强分子”在此定义为能增强免疫作用的分子，包括 IL-2、IL-12、TNF、IFN、G-CSF、GM-CSF、趋化因子等在内的细胞因子和免疫共刺激分子如免疫共刺激分子 B 7 等。

“免疫有效量”这一术语在此定义为能够有效地激发机体产生抑制或杀死肿瘤细胞的免疫反应的剂量。

在本发明中，我们采用的策略是：在不需要体外制备肿瘤抗原甚至预先不知道患者体内具有个体差异性的特异性肿瘤抗原的情况下，利用患者自身的肿瘤抗原和自体中存在的抗原提呈细胞，在体内实现肿瘤免疫治疗。

为实现本发明的目的，我们提供了能在肿瘤患者体内诱导特异性抗肿瘤免疫反应的携带有功能蛋白基因的溶瘤微生物，将该微生物对肿瘤患者施用后，能够起到在溶解肿瘤细胞的同时刺激抗原提呈细胞，激发机体同步免疫反应，达到抑制肿瘤转移，杀灭远端肿瘤细胞的目的。

具体说，本发明提供的一个实施方案是构建一种能表达能粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的功能蛋白的重组溶瘤微生物。用其感染局部肿瘤，该微生物在肿瘤细胞中生长而在正常细胞中基本上不生长。溶瘤微生物在肿瘤细胞中生长的同时，表达能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白。由于溶瘤微生物在肿瘤细胞中的大量复制，导致肿瘤细胞裂解，释放出各种肿瘤细胞的抗原。这些抗原与溶瘤微生物所表达的能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白结合，形成抗原－蛋白复合物。该复合物进一步被抗原提呈细胞识别，经抗原提呈细胞加工后提呈给能够特异性杀伤肿瘤细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL），并能够激发调节机体免疫反应的 Th 细胞（辅助性 T 淋巴细胞），和 NK 细胞（自然杀伤 T 淋巴细胞）等免疫效应细胞来增强机体的免疫反应。

在本发明的另一实施方案中，将溶瘤微生物和能粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或表达该蛋白的载体联合施用，也能实现本发明的目的。其中所述微生物能选择性的在肿瘤细胞中生长以溶解肿瘤细胞，使肿瘤抗原释放出来。所述蛋白能够吸附抗原多肽而形成蛋白-多肽复合物，并通过抗原肽伴侣转移作用将抗原提交给树突状细胞等抗原提呈细胞，抗原一蛋白复合物经抗原提呈细胞加工，进一步激发 NK 细胞、CTL 细胞、Th 细胞等免疫效应细胞的活性，激活机体特异性免疫反应；同时，由于所述蛋白本身具有和抗原提呈细胞的亲和性，起到放大危险信号并激活提呈细胞的作用，最后激活机体的特异性抗肿瘤的免疫反应。

在本发明的另一实施方案中，用含有编码能粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段 DNA 的载体在体内或体外转化肿瘤患者的抗原提呈细胞。如果在体外转化抗原提呈细胞，则在转化后将所述被转化的抗原提呈细胞施用给患者，同样也能实现本发明的目的。转化的抗原提呈细胞对抗原更加敏感，提呈细胞表达的功能蛋白捕捉抗原后又返回提呈细胞，进一步增强免疫信号，激活机体的特异性抗肿瘤免疫反应。

综上所述，除本发明的表达能粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段的溶瘤微生物外，本发明还包括但不限于以下几种组合形式：

一种组合，其包括：

a) 能选择性地在肿瘤细胞中生长的微生物；和
b) 包含编码能粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段的 DNA 的质粒。

另一种组合，其包括：

a) 能选择性地在肿瘤细胞中生长的微生物；和
b) 复制缺陷性载体，该载体包含编码能粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段的 DNA。

再一种组合，其包括：

a) 能选择性地在肿瘤细胞中生长的微生物；和
b) 能粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白。

以上所述微生物还可进一步含有编码免疫增强分子的 DNA 序列，如编码 IL-2、IL-6、IL-12、TNF、IFN、G-CSF、GM-CSF 或趋化因子等的细胞因子和/或免疫共刺激分子如 B7 等的序列。本发明的微生物、微生物组合物可以单独使用，也可以和其它形式的免疫治疗剂联合使用，例如，和细胞因子、免疫佐剂或传统中药联合使用。所述的微生物组合物可进一步含有可药用载体。

本发明中所述的“功能蛋白”或“能粘附肿瘤抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白”是指能够结合肿瘤抗原并对抗原提呈细胞有亲和性的一类蛋白，这类蛋白的实例包括以热休克蛋白为主的分子伴侣蛋白。热休克蛋白能够结合肿瘤特异抗原多肽而形成蛋白-多肽复合物，并通过抗原肽伴侣转移作用将抗原提交给树突状细胞等抗原提呈细胞，抗原被加工提呈，激发机体 NK 细胞、CTL 细胞、Th 细胞等免疫效应细胞的活性，激活机体特异性免疫反应。热休克蛋白本身具有和抗原提呈细胞的亲和性，也能够激活提呈细胞。

在一个具体实施例中，我们采用表达热休克蛋白的溶瘤微生物感染局部肿瘤。试验中，在原位肿瘤表达的热休克蛋白能够结合肿瘤抗原并通过癌症疫苗免疫的方式起到免疫调节的作用，显著引发、增强对肿瘤抗原的免疫反应，在杀灭原位肿瘤的同时抑制远端肿瘤。

热休克蛋白(Heat Shock Proteins, HSP)是一类高度保守并具有 ATP 酶活性的蛋白家族，在所有的原核生物以及大多数真核细胞中都存在。无论是否存在外界压力，热休克蛋白在蛋白质代谢中都起着重要作用，包括在蛋白质从头合成途径中蛋白质的折叠和跨膜转运以及错误折叠后的降解 [5]。热休克蛋白，包括从肿瘤细胞和细菌感染的细胞中得到的 Hsp70、Hsp90 和 grp94/gp96，都能够激发细胞性的免疫反应 [6-7]。可以替代的热休克蛋白也可以来源于病原微生物，包括结核分支杆菌（*M. tuberculosis*），麻风分支杆菌（*M. leprae*），克氏锥虫（*Trypanoma cruzi*），恶性疟原虫（*Plasmodium falciparum*）；以及其它物种如灵长类、鼠等哺乳动物。

热休克蛋白的免疫原性主要是由结合到其分子上的多肽所产生 [8]。产生的热休克蛋白－抗原多肽通过一种不表达内生性抗原的特异性细胞将抗原呈递给 T 淋巴细胞后，从而激活免疫系统。这些结果表明热休克蛋白作为分子伴侣能够将抗原性的多肽呈递给抗原提呈细胞--主要为树突状细胞，其可能的机制是通过使这些多肽与 MHC I 和 MHC II 分子结合而进入 MHC I 和 MHC II 呈递抗原途径；这些抗原多肽会进一步激活 CTL 细胞、NK 细胞、Th 细胞等免疫效应细胞的活性，激发机体特异性免疫反应。

各种热休克蛋白、其片段或各种修饰（包括但不限于一个或多个氨基酸的添加、缺失和/或替换等）变体均可用于本发明，只要该热休克蛋白、片段或其变体保持与肿瘤细胞抗原多肽结合的能力即可。

在本发明的具体应用中，为增强热休克蛋白对抗原的粘附能力，可通过对热休克蛋白一个或多个氨基酸的添加、缺失或替换或者与外源肽组成融合蛋白等手段进行修饰。也可以根据需要将靶定位序列（如信号肽）、核定位序列等与热休

克蛋白连接使热休克蛋白能够改变其在细胞内的分布状态，如热休克蛋白由非分泌型转变为分泌型或由定位于胞内转变为定位于胞外，从而使其更好地与抗原多肽结合。

本发明的溶瘤微生物是天然的或经遗传改造后能选择性地在肿瘤细胞中复制的病毒或细菌。所述病毒包括单纯疱疹病毒如 HSV-1 和 G207，腺病毒（AdV）如 ONYX-015（也称为 dl1520）、CN706 和 CN787，新城疫病毒(NDV)如 73-T，水泡性口炎病毒（VSV），呼肠孤病毒如 Reolysin [1-3] 或其他能选择性地在肿瘤细胞中生长的病毒。所述细菌包括伤寒沙门氏菌、双岐杆菌、志贺氏菌、李斯特菌、鼠疫杆菌、梭菌 [21] 以及其他天然存在和经诱变筛选后能选择性地在肿瘤细胞中生长的细菌。溶瘤微生物也指上述微生物的各种变体，只要该微生物具有选择性地在肿瘤细胞中复制和生长从而将肿瘤细胞裂解的能力即可。

因此，本领域的普通技术人员可以认识到，无论编码能粘附肿瘤抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白如热休克蛋白的基因是整合到溶瘤微生物的基因组还是游离于所述微生物的基因组之外如存在于其它表达载体中，只要保证所述的基因与调控序列如启动子和终止子有效地连接，所述的溶瘤微生物如 HSV-1 或 dl1520 就可以同所表达的能粘附肿瘤抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白如热休克蛋白共同作用，达到本发明的目的。在不背离本发明的范围和精神情况下，可对本发明申请中各种实例进行不同的改变或修改，这一点对于本领域的技术人员是很显而易见的。

在本发明的一个具体的实施例中，公开了携带热休克蛋白 Hsp70 基因的溶瘤腺病毒 Ad-HSP/E1A。将 Hsp70 基因导入 dl1520（其为一种能够选择性的在 p53 功能缺陷的肿瘤细胞内复制的减毒腺病毒 [9-14]）中构建重组溶瘤腺病毒，具体过程参见实施例 2。采用重组溶瘤腺病毒 Ad-HSP/E1A 进行了动物试验，这种病毒表现非常强的抗肿瘤活性，能够有效地使肿瘤体积减小甚至消除（见下表）。下表还列出了热休克蛋白 Hsp70 或表达热休克蛋白 Hsp70 的载体与溶瘤腺病毒 Ad-ΔE1B 组成联合体，在不同的肿瘤模型动物上进行的试验结果：

	组 1		组 2	组 3		组 4
肿瘤模型	分泌型	非分泌型		分泌型	非分泌型	
CT26/ Balb/c	+	+	+	+	+	+
TRAMP-c2/c57	+	+	+	+	+	+
B16/C57	−	−	+	+	+	+

注：

组 1：能表达热休克蛋白 Hsp70 的重组溶瘤腺病毒 Ad-Hsp/E1A；

组 2：溶瘤腺病毒 Ad-ΔE1B 和表达热休克蛋白 Hsp70 的 DNA 质粒；
组 3：溶瘤腺病毒 Ad-ΔE1B 和表达热休克蛋白 Hsp70 的复制缺陷型病毒；
组 4：溶瘤腺病毒 Ad-ΔE1B 和热休克蛋白 Hsp70；
CT26/Balb/c 表示在 Balb/c 品系的小鼠上建立的结肠癌 CT26 肿瘤模型。
TRAMP-c2/c57 表示在 c57 品系的小鼠上建立的前列腺癌 TRAMP-c2 肿瘤模型。
B16/c57 表示在 c57 品系的小鼠上建立的黑素瘤 B16 肿瘤模型。

在相应的小鼠肋部对称部位（左侧和右侧）分别进行皮下注射接种相应的肿瘤细胞 2×10^5 个。将这些小鼠作为患有转移性肿瘤的动物的模型。当皮下注射的肿瘤迅速生长（在接种后大约 8-10 天）时，将实验小鼠的非对称（右面）的瘤内接种重组 Ad-Hsp/E1A 约 2×10^9 PFU； 或 Ad-ΔE1B 约 2×10^9 PFU 和表达热休克蛋白 Hsp70 的 DNA 质粒 50 微克；或溶瘤腺病毒 Ad-ΔE1B 约 2×10^9 PFU 和表达热休克蛋白 Hsp70 的复制缺陷型病毒约 2×10^9 PFU；或溶瘤腺病毒 Ad-ΔE1B 约 2×10^9 PFU 和热休克蛋白 Hsp70 约 10-25 微克。瘤内注射治疗后每隔 3-4 天测量肿瘤的体积。表中列出了初步的实验结果，其中“＋”表示已有初步的实验结果表明不但被瘤内注射治疗侧的肿瘤的体积明显缩小，对侧的未被注射的肿瘤的体积也明显缩小。“－”表示实验数据尚在进一步的整理之中。

在另一个具体的实施例中，采用的溶瘤病毒是单纯疱疹病毒。一种具备复制能力的单纯疱疹病毒的突变株经过大量的不同种的动物模型试验发现为非病原性的并被用于人的原发性脑部肿瘤治疗的临床试验 [16]。这种单纯疱疹病毒突变株在分裂细胞内的复制能够导致细胞死亡，其在非分裂细胞内的复制能力则非常弱，在接种到荷瘤鼠后能够选择性的在肿瘤内复制，从而抑制原位肿瘤的生长并延长荷瘤鼠的生存期 [15-17]。将编码热休克蛋白 HSP70 的扩增质粒导入这种单纯疱疹病毒突变株，构建重组单纯疱疹病毒，两种具体构建方法如下：

一种方法：从人的 cDNA 文库中通过 PCR 扩增得到 HSP70 的 cDNA，进行了 DNA 序列测定。用 Klenow 酶补平上述 PCR 产物的 DNA 片段两端 ，然后平末端插入连接于质粒 pHSV 中的 SpeI 位点，得到质粒 pHSV－HSP。通过重组质粒和辅助病毒共转染真核细胞，在细胞内辅助病毒对重组质粒进行包装，从而得到能够表达热休克蛋白的重组单纯疱疹病毒。具体构建过程见实施例 1。

另一种方法：先构建含有在启动子控制下 HSP70 的载体，然后按照本领域的常规方法将 HSP DNA 插入到 HSV 的基因组中，以得到 HSP 基因整合到病毒基因组中的重组单纯疱疹 DNA。所得到的这种重组单纯疱疹病毒可以直接给肿瘤患者施用，而不需要体外通过 HSV 辅助病毒和质粒 DNA 的共转染来制备表达热休克蛋白的单纯疱疹病毒。

在另一个具体的实施例中，采用的溶瘤病毒是腺病毒。所采用的腺病毒突变株能够选择性的在肿瘤细胞中复制而使细胞裂解死亡，其在正常细胞内的复制能

力则非常弱 [10]。这种腺病毒突变株在接种到荷瘤鼠后能够选择性的在肿瘤内复制，从而抑制原位肿瘤的生长并延长荷瘤鼠的生存期 [9-11]。通过 pLEP 和 pREP 双质粒系统构建重组腺病毒，将 HSP 基因和腺病毒在肿瘤细胞内具备复制能力所必须的 E1A 基因连接到质粒 pLEP 上，构建得到重组质粒 pLEP-HSP70-IRES-E1A。将所得的重组质粒和质粒 pREP 通过酶切连接，并将连接产物用 γ 噬菌体包装并感染大肠杆菌，得到的重组质粒 pAd-Hsp70/E1A 经 I-CeuI 酶切和转染 293 细胞后得到能够表达 Hsp70 的重组腺病毒。具体过程见实施例 2。

在另一个具体实施例中，采用能够特异性的在肿瘤细胞内复制的沙门氏细菌作为表达热休克蛋白的载体，因为所用的沙门氏菌为 aroA 缺陷型 [19]，其所需要的营养只能由肿瘤细胞提供，在正常细胞中不能够复制生长。所以该突变株能够选择性的在肿瘤细胞内复制并通过其增殖使肿瘤细胞裂解死亡。沙门氏菌表达的热休克蛋白能够结合肿瘤细胞裂解所释放的抗原并将其传送给抗原提呈细胞，从而激发了 CTL 介导的能够特异性杀死肿瘤细胞的免疫反应，从而抑制了肿瘤的生长，延长了荷瘤鼠的生存期。具体过程见实施例 3。

在本发明中，编码热休克蛋白 Hsp70 的序列受启动子的转录调控。“启动子”是指能被细胞自体的或引入的转录复合物所识别的 DNA 序列，其对于一个基因地转录起始是必须的。对于启动子是如何组织的，人们通过分析多种不同病毒如 CMV（巨细胞病毒），HSV 胸苷激酶（tk）和 SV40 的启动子来进行研究。近来的研究表明，启动子由不连续的功能调控元件组成，每个约 7－20bp DNA，并且包括一个或更多的由转录活化或抑制蛋白的识别位点。其它类型的启动子例如增强子能够调控转录起始的频率。典型的启动子序列都是位于起始位点上游 30－110bp 处，尽管现在表明有包含在起始位点下游的调控元件的启动子。启动子各元件之间的距离通常是可改变的，所以当某些元件被插入或移去时仍能保持启动子的正常功能。在 tk 启动子中，在保持活性的前提下，启动子各元件之间的距离最多可以增加到 50bp。根据各启动子类型不同，各元件可互相协同或独立地活化转录反应。

一个启动子可以是一个基因或一段序列自身的，即从编码区和/或外显子的上游 5'端非编码序列得到。这样的启动子为“内源性”启动子。我们同样可以得到这个基因或这段序列上游或下游的增强子。可替代的，将并非基因或序列自身的启动子也即重组或异源启动子置于编码序列的上游进行转录调控会有特殊优势。重组或异源的启动子包括并非在自然环境中与基因或序列相关的增强子。这种启动子和增强子可包括其它基因的启动子和增强子，以及从原核生物，病毒或真核细胞中分离的启动子和增强子，或者并非 “天然存在”的启动子和增强子，例如不同转录调控区的不同调控元件的组合，和/或引入能够影响功能的突变。而且在合成启动子或增强子序列时，还可以使用重组克隆和/或包括 PCR

在内的核酸扩增技术。而且，也可以使用其它细胞器如线粒体，叶绿体的能够调控转录和/或表达的序列。

在实施例中所采用的为巨细胞病毒（CMV）的前早期启动子序列。这个启动子属于组成型的强启动子能够启动其下游序列的高水平表达。同时，也可使用其它组成型的启动子如猴病毒 SV40 前早期启动子，小鼠乳腺瘤病毒（MMTV）启动子，人免疫缺陷病毒（HIV）长末端重复序列（LTR）启动子，鼠病毒启动子，鸟白血病病毒启动子，EB 病毒前早期启动子，劳氏肉瘤病毒启动子，以及人类基因启动子，例如（但不限于）：肌动蛋白启动子，肌球蛋白启动子，血红蛋白启动子，肌酸启动子。而且本发明并不仅限于用组成型启动子，也可以选用诱导型启动子。本发明中诱导型启动子的使用提供了在需要时能打开其相连的下游核酸序列表达的分子开关，并在不需要其表达时将其关闭。诱导型启动子包括但并不局限于：金属硫蛋白启动子，糖皮质激素启动子，孕酮启动子，四环素启动子。而且，本发明还包括使用组织特异性启动子，其转录活化只能在特定组织内进行。组织特异性启动子包括但不限于现在已知的如：HER－2 启动子，PSA 相关启动子序列。

对于热休克蛋白的表达，需要一个典型的多聚腺苷酸信号来完成转录的正确多聚腺苷酸加尾反应。多聚腺苷酸的性质对于成功的实施本发明并不是至关重要的，任何类型的中止序列都可以使用。优选的实施例包括 SV40 多聚腺苷酸信号，LTR 多聚腺苷酸信号和/或牛生长激素多聚腺苷酸信号，对于不同的靶向细胞应以方便原则和/或已知能在其中正确行施功能的原则选择多聚腺苷酸信号。也可以选用转录中止位点来中止转录。这些元件应能够增强转录的翻译中止水平和/或避免通读到其它序列。

重要的一点是，本发明中表达热休克蛋白的载体正确进行蛋白表达并不需要载体整合到受体细胞的基因组中。载体可以以游离体状态存在于靶细胞中。例如，在某些类型的细胞中载体表达目标蛋白并不需要载体本身的复制。这些细胞如肌肉细胞通常是不能正常复制的，被导入非分裂细胞的表达载体在载体本身不复制的情况下能够表达目的蛋白。

本发明是还可以将溶瘤微生物与能粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或表达该蛋白的载体进行联合施用，或用含有编码所述蛋白或其片段的 DNA 的载体转染患者自身的抗原提呈细胞。从而引发机体针对肿瘤抗原的特异性免疫反应，杀死局部肿瘤和转移的肿瘤。本发明的微生物或含有所述溶瘤微生物的组合物可以单独使用，也可以和其它形式的免疫治疗剂联合使用，例如和细胞因子或传统中药一起使用。在许多实际应用中，免疫调节剂如佐剂或称为免疫刺激剂被用来增强免疫反应。大量研究表明，同时给予细胞因子或表达

细胞因子的质粒能够增强抗肿瘤的免疫活性。一个本领域的技术人员很容易认识到可以将细胞因子的核酸序列和本发明实施方案中的 HSP 的核酸序列放入同一载体来共同应用，这样就避免使用两个表达载体。另外，一个本领域的技术人员很容易认识到，为了提高热休克蛋白在肿瘤细胞中的表达量可以将多个拷贝的 HSP 基因引入同一载体中。

在适当的情况下，可以将本发明的溶瘤微生物、微生物组合物或药物组合物制成免疫治疗剂。本发明的携有功能蛋白基因的溶瘤微生物、溶瘤微生物的组合物或药物组合物可根据其被施用的途径不同被加工成固体，半固体，液体或气雾剂形式。可以利用已知的方法来阻止组合物在到达靶器官前被释放和吸收。本发明中可采用任何一个可以接受的药剂形式保证本发明组分的有效性。在制剂时，本发明中的微生物可以单独使用，也可和其它的药学上活性组分以适当的比例结合/配合使用。应保证在给药时有足够多量的携有能粘附肿瘤抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段的 DNA 的溶瘤微生物如溶瘤病毒或溶瘤细菌，从而其基因产物能提供药学上有效的剂量。溶瘤微生物可以单独使用也可以和不同的佐剂配合使用。

通常，可将上述本发明的溶瘤微生物、微生物组合物、药物组合物或免疫治疗剂以免疫有效量通过本领域已知的各种常规的和可接受的方式单独或与其它治疗剂一起联合给药。免疫有效量将根据疾病的严重程度、个体的年龄和相对健康状况、所用微生物的效力以及其它因素有很大变化。通常，本领域普通技术人员可以根据个人知识以及本申请所公开的内容确定出用于治疗给定肿瘤时的本发明的微生物的免疫有效量。

可以和本发明的微生物共同使用的佐剂包括（但不限于）弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、氢氧化铝、卡介苗（BCG）、脂多糖(LPS)、脂质 A 类似物、胞壁酰二肽（MDP）及其类似物、内毒素（LT）和霍乱毒素（CT）。

本发明的药物可通过下列途径之一给药：瘤内注射、口服、全身性给药(例如，经皮、鼻内或通过栓剂给药)或胃肠外给药(例如，肌肉内、静脉内或皮下)。药物组合物或免疫治疗剂可以是片剂、丸剂、胶囊、半固体、散剂、缓释制剂、溶液剂、混悬剂、气雾剂的形式或是任何其它适宜的组合物，并且通常由本发明溶瘤微生物以及至少一种可药用赋形剂组成。可药用赋形剂是无毒的、对所述微生物的活性没有实质性损害的、有助于给药的并且不会对其他活性成分的免疫或治疗效果产生不利影响的物质。所述赋形剂可以是任何固体、液体、半固体，或者在气雾剂组合物的情况下，可以是气体赋形剂。这些赋形剂是本领域技术人员易于得到的。

固体药物赋形剂包括淀粉、纤维素、滑石、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、氯化钠、脱脂奶粉等。液体和半固体赋形剂可以选自水、乙醇、甘油、丙二醇和各种油，包括来源于石油、动物、植物或合成的油(例如，花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等)。优选的液体载体，特别是用于可注射溶液的液体载体包括水、盐水、葡萄糖水溶液和二甘醇。

药物组合物中本发明微生物的量可以根据制剂的种类、单位剂量的大小、赋形剂的种类以及药学领域技术人员已知的其它因素有很大变化。而且，实际的剂量和治疗方案会根据其它因素如该发明的组分是否和其它治疗组分结合，个体的药物动力学，药物分布和代谢等各不相同而有所变化。而且，加入细胞的病毒量也随着插入载体的治疗基因的长度、稳定性，和序列的性质而不同，是一个由经验决定的变量，很可能被非本发明中方法之外的其它因素所改变。一个本领域的技术人员可以根据具体情况的出现很容易的进行调整。

下面以实施例的方式具体描述本发明。以下的实施例是举例性的，因此不能将这些实施例看成是对本发明的限制。

实验实施例

实施例 1

人热休克蛋白（HSP70）基因的扩增及克隆：

利用 PCR 方法从人肿瘤细胞系 SKOV3 细胞（ATCC HTB-77）的 cDNA 中扩增 HSP70 基因。上游引物序列为：GGT ATG GAA GAT CCC TCG AGA TC，下游引物序列为：TA CTA ATC TAC CTC CTC AAT GGT GGG。使用 PE 公司的 PCR 仪，反应条件是：每个反应的引物终浓度是 30pM, dNTP 为 100mM，模板 DNA 为 100ng, Taq DNA 聚合酶为 2.5 个单位。其他反应条件依照 GeneAmp DNA 扩增试剂盒中的使用说明进行，每个反应总体积为 100 微升。每份反应混合物上覆盖以 75 微升矿物油。扩增共进行 30 个循环，每一循环包括变性步骤 92℃ 1 分钟，退火步骤 50℃ 1 分钟，延长步骤 72℃ 2 分钟。反应结束后，使用 Qiagen 公司的 PCR 产物纯化试剂盒纯化所得产物。

溶瘤病毒－单纯疱疹病毒的构建

我们采用的是具备复制能力的、突变型 I 型单纯疱疹病毒（HSV-1）[15-18]。其中 γ 34.5 基因被缺失。HSV-1 突变株在分裂型细胞中的复制会导致细胞死亡；其在非分裂型细胞中的生长能力显著减弱 [16]。这种单纯疱疹病毒突变株在接种到

荷瘤鼠后能够选择性的在肿瘤内复制，从而抑制原位肿瘤的生长并延长荷瘤鼠的生存期[16]。HSV 被用来在肿瘤内投递热休克蛋白。人 HSP70 的 cDNA 是从人的 cDNA 文库中通过 PCR 扩增得到并进行了 DNA 序列测定。用 Klenow 酶补平上述 PCR 产物的 DNA 片段两端 ，然后平末端插入连接于质粒 pHSV（Geller, A. I. and Breakefield, X. O.(1988), Science 241:1667-1669）中的 SpeI 位点，得到质粒 pHSV-HSP(如图 1 所示)。γ34.5 基因被缺失的 HSV－1 突变株，作为辅助病毒来生产重组病毒 HSV－HSP。使用质粒 pHSV-HSP DNA 和单纯疱疹病毒辅助病毒 DNA 共转染疱疹病毒宿主细胞。在 HSV 辅助病毒存在的条件下，pHSV-HSP 被包装于单纯疱疹病毒的外壳中，这样就产生了带有 HSP70 基因的重组单纯疱疹病毒。重组病毒是由单纯疱疹病毒辅助病毒对编码 HSP 的扩增质粒进行包装得到的[17]。每个病毒颗粒能够包装 15 个 HSP70 基因的拷贝，并且能够高效的转染分裂和非分裂的细胞。病毒 DNA 并不整合到被感染的细胞的基因组中，由 CMV 启动子调控 HSP70 蛋白的表达，属于瞬时高表达。对 HSV－HSP 进行了序列测定，其序列列于序列表中。

单纯疱疹病毒的滴度测定

用脂质体 lipofectAMINE(Life Technologies 产品)将纯化的扩增质粒 DNA（pHSP70）和 HSV 病毒共转染 Vero 细胞，然后在 34.5℃温育培养，直到细胞表现出完全的细胞病变效应。从 Vero 细胞中收获重组病毒并按 1:5 比例稀释培养，一般传代 5-6 代，直到观察到辅助病毒的复制被抑制。含有 pHSP70 质粒的 HSV 被命名为 HSV－HSP。经过冻融和超声以及低速离心（2000×g,4℃10 分钟）去除细胞碎片，测定重组病毒的滴度。病毒滴度以病毒在 34.5℃培养的 Vero 细胞中形成的溶斑形成单位（PFU）来表示。对于 HSV－HSP 来说，确定 Hsp70 的表达，并采用滴度水平最高的传代用于培养病毒。HSV－HSP 的病毒滴度为 5×10^7 PFU/ml。同时，测定辅助病毒 HSV-1 的滴度，其制值为 6×10^7 PFU/ml。

HSV－HSP 的体外溶瘤活性

HSV－1 能够在很多类型的肿瘤细胞中都能够复制。人们发现鼠的结肠癌细胞系 CT26 易受 HSV 感染的影响。这种细胞系免疫原性很弱并且不能激发可检测到的肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）。CT26 型肿瘤经细胞因子治疗后仍然容易复发。现已证明 CT26 的 MHC－I 限制性优势免疫抗原是一个九肽，来源于内生性亲嗜性鼠白血病前病毒的膜蛋白（gp70）。研究已证实了诱导产生的肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）对皮下接种的 CT26 肿瘤的抗瘤效果。其中将鼠肿瘤细胞 CT26 培养于 24 孔板（每孔 1×10^5）并由 HSV-HSP 或 HSV 以不同的感染复数（0.01-10）感染。在感染复数（MOI）0.1 时，用 HSV－HSP 或 HSV 对 CT26 细胞感染，感染 4 天后导致 70%的肿瘤细胞的死亡。在感染复数（MOI）为 1 时，用 HSV－HSP 或 HSV 对 CT26 细胞感染，感染 4 天

后导致 99%的肿瘤细胞的死亡（如图 2 所示）。感染的肿瘤细胞经培养后，用放射性标记及免疫沉淀/SDS－PAGE 可以检测到 HSP70 的表达。这些数据表明插入的 HSP70 并没有降低 HSV 的复制能力和细胞毒性。

HSV－HSP 抑制远端肿瘤的生长

同系的 BALB/c 小鼠上进一步评价 HSV－HSP 对 CT26 肿瘤的治疗效果。BALB/c 来自于 Charles River (Wilmington, MA, USA)。所有动物实验都经动物关心和使用委员会（Animal Care and Use Committee）批准。将动物分成 3 组，第一和第二组作为实验组，第三组作为对照组。将小鼠用 CT26 肿瘤细胞（1×10^5）在小鼠肋部对称部位分别进行皮下注射。将这些小鼠作为患有转移性肿瘤的动物的模型。当皮下注射的肿瘤迅速生长（最大直径达到 5 毫米）时，将第一组每只动物非对称（右面）的瘤内接种 HSV-HSP（1×10^6 PFU），并于第一次接种 7 天后进行第二次接种。将第二组每只动物非对称（右面）的瘤内接种 HSV－1（1×10^6 PFU，并于第一次接种 7 天后进行第二次接种。HSV-1 作为接种 HSV－HSP 的对照以评价病毒因素的影响。将第三组小鼠每只动物非对称（右面）的瘤内接种热休克蛋白 HSP70，并于第一次接种 7 天后进行第二次接种，来评价热休克蛋白本身的作用。肿瘤体积用卡尺测量，体积的计算公式(V=h×w×d)。如果小鼠垂死或其肿瘤直径超过 18 毫米，将被处死，并记录下日期来研究其存活率。用非配对法 t 检验进行方差统计，软件为 StaView4.5(Abacus Concepts, Berkeley, CA)。用 HSV－HSP 接种能引起非常显著的抗肿瘤效果，无论是被注射一侧的肿瘤，还是同只动物身体上未经注射的对称端的肿瘤的生长都明显受到抑制（如图 3 所示）。经注射 HSV－HSP 的小鼠身上的肿瘤无论在注射侧还是在非注射侧都已经消退得无法检测到。而注射 HSV－1 只能引起经过注射的肿瘤生长的抑制，对于未被注射的对侧肿瘤仅有一定的影响（如图 3 所示）。仅注射 HSP70 的对照组显示出在对注射侧和非注射侧的肿瘤都没有影响。这些结果表明重组的 HSV 通过表达 HSP70 能够激发强的免疫应答从而抑制了远端肿瘤的生长。

实施例 2

重组腺病毒的构建

通过 pLEP 和 pREP 双质粒系统来构建重组腺病毒

首先用腺病毒 Ad1055 野生型为模板，通过 PCR 方法扩增得到碱基 559 到 2262 的 II 型腺病毒 E1 区。得到的 1715 碱基对的片段包含 5'末端的 HindIII 限制位点和 3'末端的 XhoI 限制位点，以及在碱基 2253 处（C→T）和 2262 处（G→T）两个突变位点，能够在 E1b 55kD 蛋白的读码框的 79 和 82 密码子处分别引入成熟前翻译终止密码子。PCR 产物片段用 NheI/XhoI 酶切后克隆到经同样酶切处理的 pBS-(IRES) (Alexe V. Gordadze et al. J. of Virology 2001, vol 75:5899-5912)中

得到 pBS-(IRES)-E1A,并通过用 SpeI/XhoI 酶切释放(IRES)-E1A 片段。以 SKOV3 细胞的 cDNA 为模板，通过实施例 1 中所述的类似方法 PCR 扩增得到人的热休克蛋白 Hsp70 DNA。扩增得到的片段包括 5'末端的 HindIII 位点和 3'末端的 SpeI 位点。利用 pLEP 上的多克隆位点，将 HindIII/SpeI 酶切的 HSP 片段,SpeI/XhoI 酶切的(IRES)-E1A 片段和 HindIII/XhoI 酶切的 pLEP 载体片段，连接后得到重组质粒 pLEP-HSP-E1A。（过程如图 4 所示）

上述质粒 pLEP-HSP-E1A 用 Pi-PspI 酶切，同时将 pREP 质粒用 Pi-PspI 酶切，并将两者于 16℃过夜进行连接反应。连接产物用 Strategen 公司的 γ 噬菌体进行包装，将包装产物与大肠杆菌（DK1 或 DH5α）混合孵育，并加入 LB 培养液 37℃摇床孵育 30 分钟。将被 γ 噬菌体感染的大肠杆菌涂含有氨苄青霉素和四环素两种抗生素的 LB 琼脂平板，筛选具有抗性的菌落，并酶切鉴定，得到重组质粒 pAd-Hsp70/E1A。将重组质粒 pAd-Hsp70/E1A 用 I-CeuI 酶切将重组的腺病毒 DNA 从质粒中释放出来，并将酶切后的质粒加入 HEBS 缓冲液，在其中加入 2.5M 的 $CaCl_2$, 形成的 DNA/ $Ca_3(PO_4)_2$ 混合物转染 293 细胞，在 CO_2 孵箱中培养 6-7 天后，能观察到培养的细胞层中出现清亮的空斑（CPE），这表明重组病毒颗粒开始形成。当整个平板都出现 CPE 时，1500 转离心 10 分钟收获细胞，冻融三次裂解细胞收获重组病毒 Ad-Hsp/E1A，重组病毒的滴度约为 10^7-10^8。（过程如图 5 所示）

体外溶瘤活性和肿瘤抑制能力

采用与实施例 1 相似的步骤，进行体外溶瘤试验和在动物模型上的抑瘤试验，取得了相似的试验结果。重组腺病毒通过表达 HSP70 能够激发潜在的免疫应答从而抑制了远端肿瘤的生长。

实施例 3

表达热休克蛋白的沙门氏菌的构建

我们采用鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium) SL3261[19]，其中芳香族氨基酸 aroA 突变，其所需要的营养物质只有肿瘤细胞才能够提供，所以突变株能够选择性的侵袭肿瘤细胞，在肿瘤细胞中复制并导致肿瘤细胞裂解死亡；而在正常细胞中 SL3261 则不能够生存。通过将 HSP70 序列插入到 pcDNA3.1 质粒中构建得到重组质粒 pcDNA-HSP 质粒，（如图 6 所示）。由 CMV 启动子调控 HSP70 蛋白的表达，属于瞬时高表达。

抑瘤活性

在同系的 BALB/c 小鼠上评价表达热休克蛋白的鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 对肿瘤的治疗效果。将动物分成 3 组，第一和第二组作为实验组，第三组作为对照组。

用 SMMC7721 肿瘤细胞 (上海细胞保藏中心)（1×10^5）在小鼠肩部对称部位分别进行皮下注射。将这些小鼠作为患有转移性肿瘤的动物的模型。当皮下注射的肿瘤迅速生长（最大直径达到 5 毫米）时，将第一组每只动物非对称（右面）的瘤内接种携带表达质粒 pcDNA-HSP 的 SL3261（1×10^7PFU），并于第一次接种 7 天后进行第二次接种。将第二组每只动物非对称（右面）的瘤内接种 SL3261（1×10^6 PFU），并于第一次接种 7 天后进行第二次接种，作为对照以评价细菌本身因素的影响。将第三组小鼠每只动物非对称（右面）的瘤内接种热休克蛋白 HSP70，并于第一次接种 7 天后进行第二次接种，来评价热休克蛋白本身的作用。肿瘤体积用卡尺测量，体积的计算公式(V=h×w×d)。如果小鼠垂死或其肿瘤直径超过 18 毫米，将被处死，并记录下日期来研究其存活率。用非配对法 t 检验进行方差统计，软件为 StaView4.5(Abacus Concepts, Berkeley, CA)。用表达热休克蛋白的鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 接种能引起非常显著的抗肿瘤效果，无论是被注射的一侧肿瘤，还是同只动物身体上未经注射的对称端的肿瘤的生长都明显收到抑制（如图 7 所示）。而注射鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 只能引起经过注射的肿瘤生长的抑制，对于未被注射的对侧肿瘤的影响甚微（如图 7 所示）。这些结果表明伤寒沙门氏菌 SL3261 也能够通过表达 HSP70 能够激发潜在的免疫应答从而抑制了远端肿瘤的生长。

本专利申请将下列文献以其全文引入作为参考。

参考文献

1. Kirn D., L. Robert, Martuza & James Zwiebel (2001) Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future direction. *Nature*, **7**,781
2. Kirn D.H. & McCormick F. (1996) Replicating virus as selective cancer therapeutics. *Molecular Medicine Today,* **2,** 519.
3. Kirn D., Hermiston T. & McCormick F.(1998) ONYX-015:clinical data are encouraging. *Nature Medicine*,**4**,1341.
4. Matzinger P.(1998) An innate sense of danger. *Seminars in Immunology*,**10**,399.
5. Hartl F.U.(1996) Molecular chaperones in cellular protein folding.*Nature*,**381**,571.
6. Udono H.Levey D.L. & Srivastava P.K.(1994) Cellar requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo. *Proceeding of The National Academy of Sciences of The United Ststes of America*,**91**,3077.
7. Udono H.& Srivastava P.K.(1993) Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *Journal of Experimental Medicine*, **178**, 1391.
8. Li Z. & Srivastava P.K.(1993) Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *EMBO Journal*,**12**,3143.
9. Heiss C.C., Williams A., Olesch J.& Kirn D.H.(1999) Efficacy of a replication-

competent adenovirus(ONYX-015) following intratumoral injection: intramural spread and distribution effects. *Cancer Gene Therapy*,**6**,499.

10. Heiss C.C., Williams A.M., Xue S., Propst M. &Kirn D.H.(1999) Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Research*,**59**,2623.
11. Oliff A., Gibbs J.B. &McCormick F.(1996) New molecular targets for cancer therapy. *Scientific American*,**275**,144.
12. Hall A.R., O'Carroll S.J.& BraiThwaite A.W.(1998) p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nature Medicine*,**4**,1068.
13. Dix B.R., O'Carroll S.J., Myers C.J., Edwards S.J. & Braithwaite A.W.(2000) Efficient induction of cell death by adenovirus requires binding of E1B 55k and p53.*Cancer Research*,**60**,2666.
14. Rogulski K.R., Freytag S.O., Zhang K., Gilbert J.D., Palielli D.L., Kim J.H., Heise C.C & Kirn D.H.(2000) In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. *Cancer Research*,**60**,1193.
15. Kwong A.D. & Frenkel N. (1995) Biology of Herpes simple virus (HSV) defective viruses and development of the amplicon system. In Viral Vectors. In: *Gene Therapy and Neuroscience Applications* (ed. M.G. Kaplitt & A.D. Loewy), p.25. Academic Press,San Diego.
16. Mineta T., Rabkin S.D., Yazaki T., Hunter W.D. & Martuza R.L.(1995) Attenuated multi-mutated herpes virus-1 for The treatment of malignant gliomas. *Nature Medicine*,1,938.
17. Spaete R.R. & Frenkel N.(1982) The hepes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector. *Cell*,**30**,295.
18. .Kaplitt,M.G., J.G.Pfaus, S.P.Kleopoulos, B.A.Hanlon, S.D.Rabkin, D.W.Pfaff, 1991. Expression of a functional foreign gene in adult mammalian brain following in vivo transfer via a herpes simplex virus type 1 defective viral vector. *Mol. Cell. Neurosci.* **2**:320.
19. Brown A, Hormaeche CE, Demarco de Hormache R, et al.(1987) An attenuated aroA Salmonella typhimurium vaccine ellicts humoral and cellular immunity to cloney β-galactosidase in mice. *J Infect Dis*, **155**:86-92
20. John M. Pawelek, K.Brooks Low, and David Bermudes. (1997) Tumor targeted Salmonella as a novel anticancer vector. *Cancer Research* **57**: 4537.
21. Theys J., Landuyt W., Nuyts S., et al. (2001) Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by engineered Clostridium acetobutylicum. *Cancer Gene Ther*, **8(4)**:294-7

权利要求书

1. 一种溶瘤微生物，其中该微生物表达能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白，并且该微生物能选择性地在肿瘤细胞中生长以裂解肿瘤细胞。

2. 如权利要求 1 所述的微生物，其中所述的能粘附肿瘤细胞抗原的蛋白是热休克蛋白或其变体。

3. 如权利要求 2 所述的溶瘤微生物，其中所述的热休克蛋白来源于哺乳动物或病原微生物。

4. 如权利要求 3 所述的微生物，其中所述的热休克蛋白来源于人，包括热休克蛋白 Hsp70、Hsp90、Hsp94、Hsp96 和其他的热休克蛋白。

5. 如权利要求 3 所述的溶瘤微生物，其中所述的热休克蛋白来源于病原微生物，所述的病原微生物包括结核分支杆菌(*M. tuberculosis*)、麻风分支杆菌(*M. leprae*)、克氏椎虫(*Tryanosoma cruzi*)和恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)。

6. 如权利要求 1 所述的溶瘤微生物，其中所述的微生物是病毒。

7. 如权利要求 2 所述的溶瘤微生物，其中所述的微生物是病毒。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的溶瘤微生物，其中所述的病毒包括腺病毒（*Adenovirus*）、单纯疱疹病毒（*Herpesvirus*）、水泡性口炎病毒（*Vesiculovirus*）、新城疫病毒(*Newcastle Disease Virus*)、呼肠孤病毒(*Reovirus*)以及其他能选择性地在肿瘤细胞中生长的病毒。

9. 如权利要求 8 所述的溶瘤微生物，其中所述的病毒为腺病毒。

10. 如权利要求 8 所述的溶瘤微生物，其中所述的病毒为单纯疱疹病毒。

11. 如权利要求 1 或 2 所述的溶瘤微生物，其中所述的微生物是细菌。

12. 如权利要求 11 所述的溶瘤微生物，其中所述的细菌包括伤寒沙门氏菌(*Salmonella*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、志贺氏菌(*Shigella*)、李斯特菌(*Listeria*) 、鼠疫杆菌(*Yersinia*)和梭菌(*Clostridium*)以及其他能选择性地在肿瘤细胞中生长的细菌。

13. 一种抗原提呈细胞，其是被含有编码能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段的 DNA 序列的载体转化的，所述载体可任选地进一步含有编码免疫增强分子的 DNA 序列。

14. 如权利要求 13 所述的抗原提呈细胞，其中所述能粘附肿瘤细胞抗原的蛋白为热休克蛋白或其变体。

15. 一种微生物组合物，包括：

a) 溶瘤微生物，该微生物能选择性地在肿瘤细胞中生长以裂解肿瘤细胞；和

b) 表达能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白及其片段的载体；

其中所述的微生物或载体任选地进一步含有编码免疫增强分子的 DNA 序列。

16. 如权利要求 15 所述的微生物组合物，其中所述能粘附肿瘤细胞抗原的蛋白为热休克蛋白或其变体。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的微生物组合物，其中所述的溶瘤微生物是溶瘤病毒或溶瘤细菌。

18. 如权利要求 17 所述的微生物组合物，其中所述的溶瘤病毒包括腺病毒、单纯疱疹病毒、水泡性口炎病毒、新城疫病毒、呼肠孤病毒以及其他能选择性地在肿瘤细胞中生长的病毒。

19. 如权利要求 17 所述的微生物组合物，其中所述的溶瘤细菌包括伤寒沙门氏菌、双歧杆菌、志贺氏菌、李斯特菌、鼠疫杆菌、梭菌以及其他能选择性地在肿瘤细胞中生长的细菌。

20. 如权利要求 15 所述的微生物组合物，其中所述的载体为包含编码能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段的 DNA 的质粒。

21. 如权利要求 15 所述的微生物组合物，其中所述的载体为复制缺陷型载体。

22. 如权利要求 20 或 21 所述的微生物组合物，其中所述的粘附肿瘤细胞抗原并被抗原提呈细胞所识别的蛋白是热休克蛋白或其变体。

23. 一种药物组合物，其主要含有：

a) 溶瘤微生物，即能选择性地在肿瘤细胞中生长的微生物；

b) 能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片段；和
c) 任选地含有的免疫增强因子、免疫佐剂和可药用载体，其中免疫增强因子可以由溶瘤微生物产生。

24. 权利要求 23 所述的药物组合物，其中所述的微生物是溶瘤病毒，包括腺病毒、单纯疱疹病毒、水泡性口炎病毒、新城疫病毒、呼肠孤病毒和其他能选择性地在肿瘤细胞中生长的病毒。

25. 权利要求 23 所述的药物组合物，其中所述的微生物是溶瘤细菌，包括伤寒沙门氏菌、双歧杆菌、志贺氏菌、李斯特菌、鼠疫杆菌、梭菌和其他能选择性地在肿瘤细胞中生长的细菌。

26. 权利要求 23－25 中任一项所述的药物组合物，其中所述的能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白是热休克蛋白或其变体。

27. 一种治疗肿瘤的免疫治疗剂，其包含权利要求 1-12 中任一项所述的溶瘤微生物，或者权利要求 13 或 14 所述的抗原提呈细胞、或者权利要求 15-22 中任一项所述的微生物组合物或权利要求 23-26 中任一项所述的药物组合物。

28. 权利要求 27 所述的免疫治疗剂，其进一步含有免疫增强因子、免疫佐剂或可药用载体。

29. 一种治疗肿瘤的方法，用含有编码能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白或其片断的 DNA 的载体转化患者的抗原提呈细胞。

30. 权利要求 29 所述的治疗肿瘤的方法，其中所述的能粘附肿瘤细胞抗原的并被抗原提呈细胞所识别的蛋白是热休克蛋白或其变体。

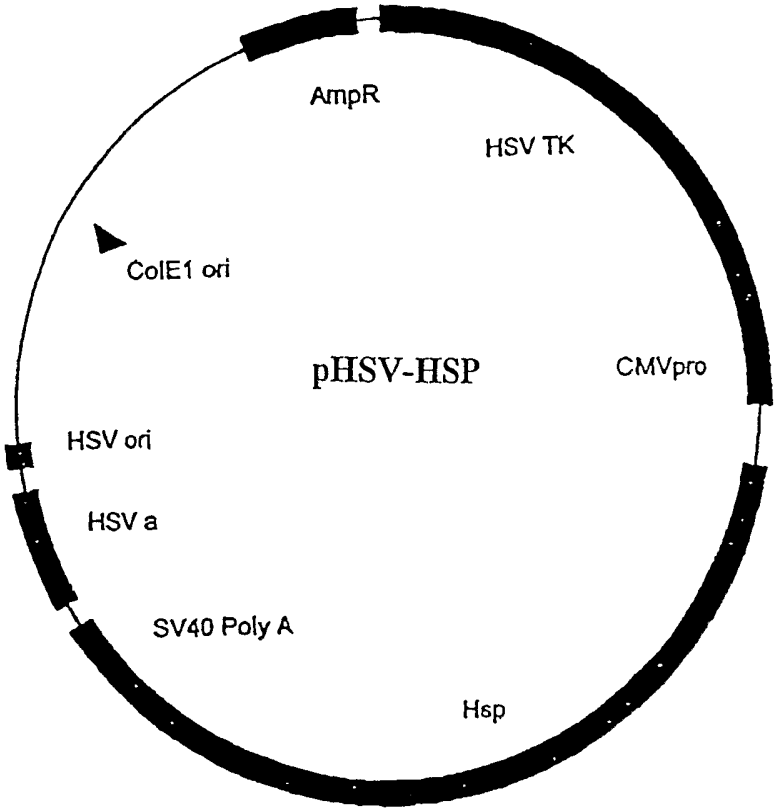
31. 一种治疗肿瘤的方法，包括给肿瘤患者施用一种免疫有效量的权利要求 1－12 中任一项所述的溶瘤微生物、权利要求 13 或 14 所述的抗原提呈细胞、权利要求 15-22 中任一项所述的微生物组合物、权利要求 23－26 中任一项所述的药物组合物或权利要求 27 或 28 所述的免疫治疗剂。

32. 权利要求 29－31 中所述的治疗肿瘤的方法，其中所述的肿瘤包括良性肿瘤和恶性肿瘤。

33. 权利要求 32 所述的治疗肿瘤的方法，其中所述的恶性肿瘤包括黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、结肠癌、卵巢癌、宫颈癌和白血病。

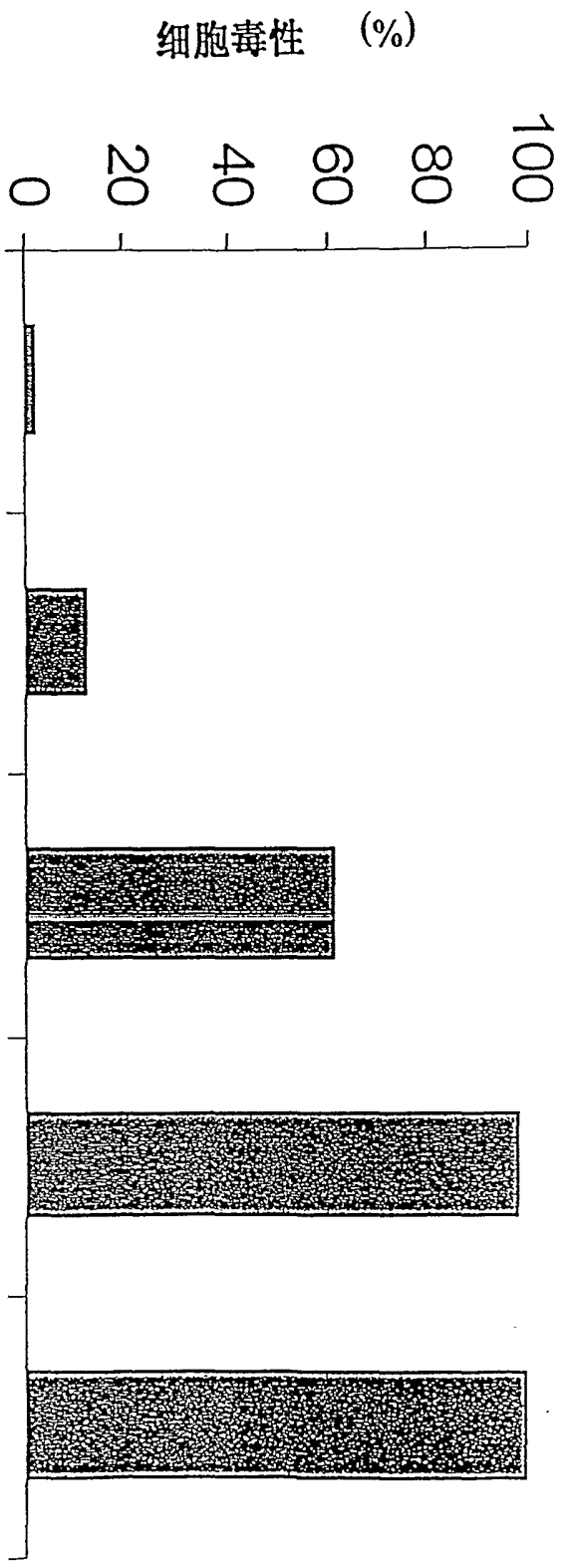
34. 权利要求 32 所述的治疗肿瘤的方法，其中所述的施用是通过肿瘤内注射、肌肉内注射、口服、粘膜内给药、腹膜内给药、静脉内给药或直肠内给药方式完成的。

35. 权利要求 1-12 中任一项所述的溶瘤微生物、权利要求 13 或 14 所述的抗原提呈细胞、权利要求 15-22 中任一项所述的微生物组合物、权利要求 23-26 中任一项所述的药物组合物，用于制备抗肿瘤药物的应用。



重组质粒 pHSV-HSP

图 1



HSV-HSP 体外细胞毒性实验

图 2

原位肿瘤注射 HSV-HSP 对远端肿瘤的抑制

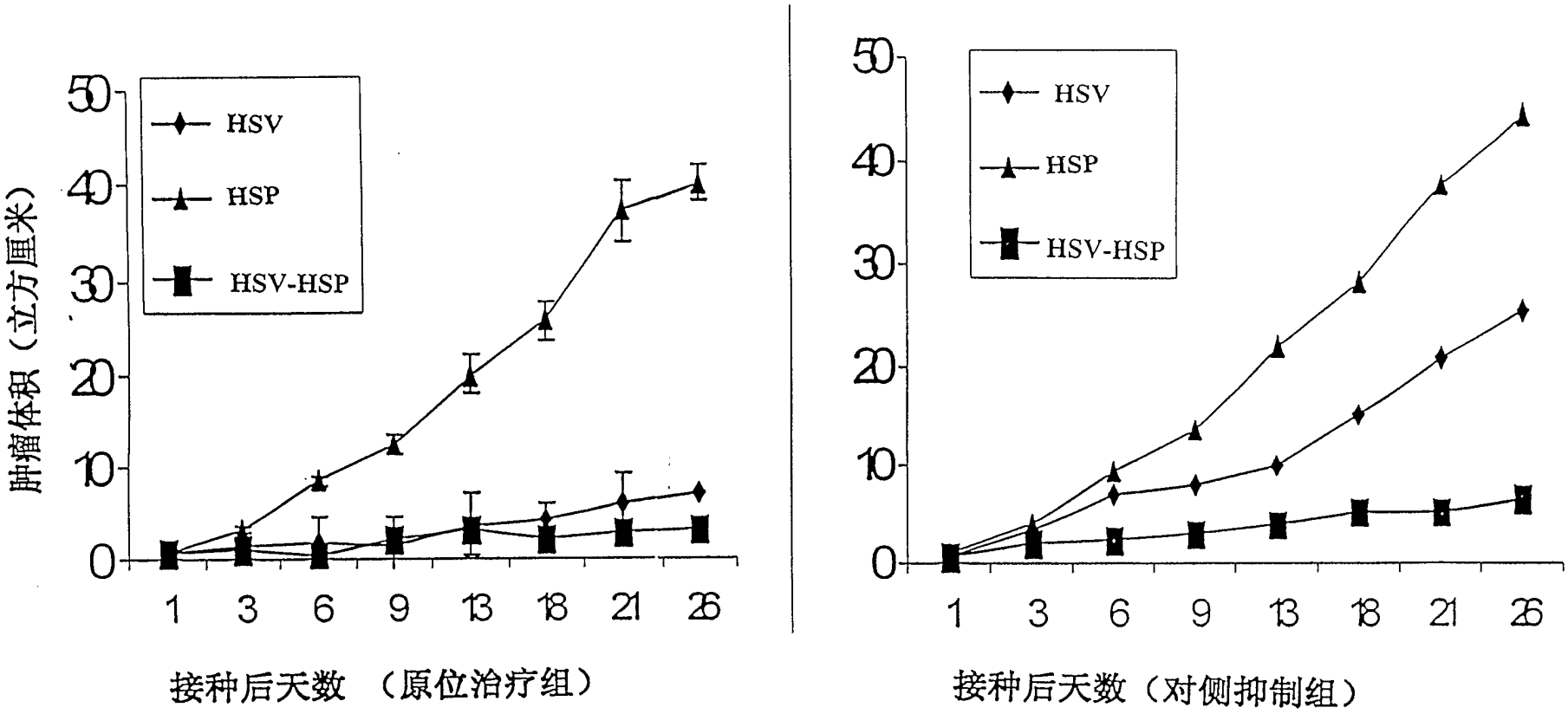
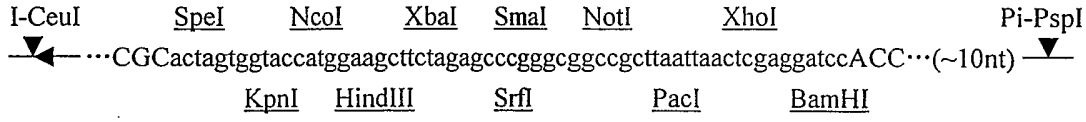


图 3

A． pLEP 的多克隆位点



B． pLEP-Hsp-E1a1b(t)的构建

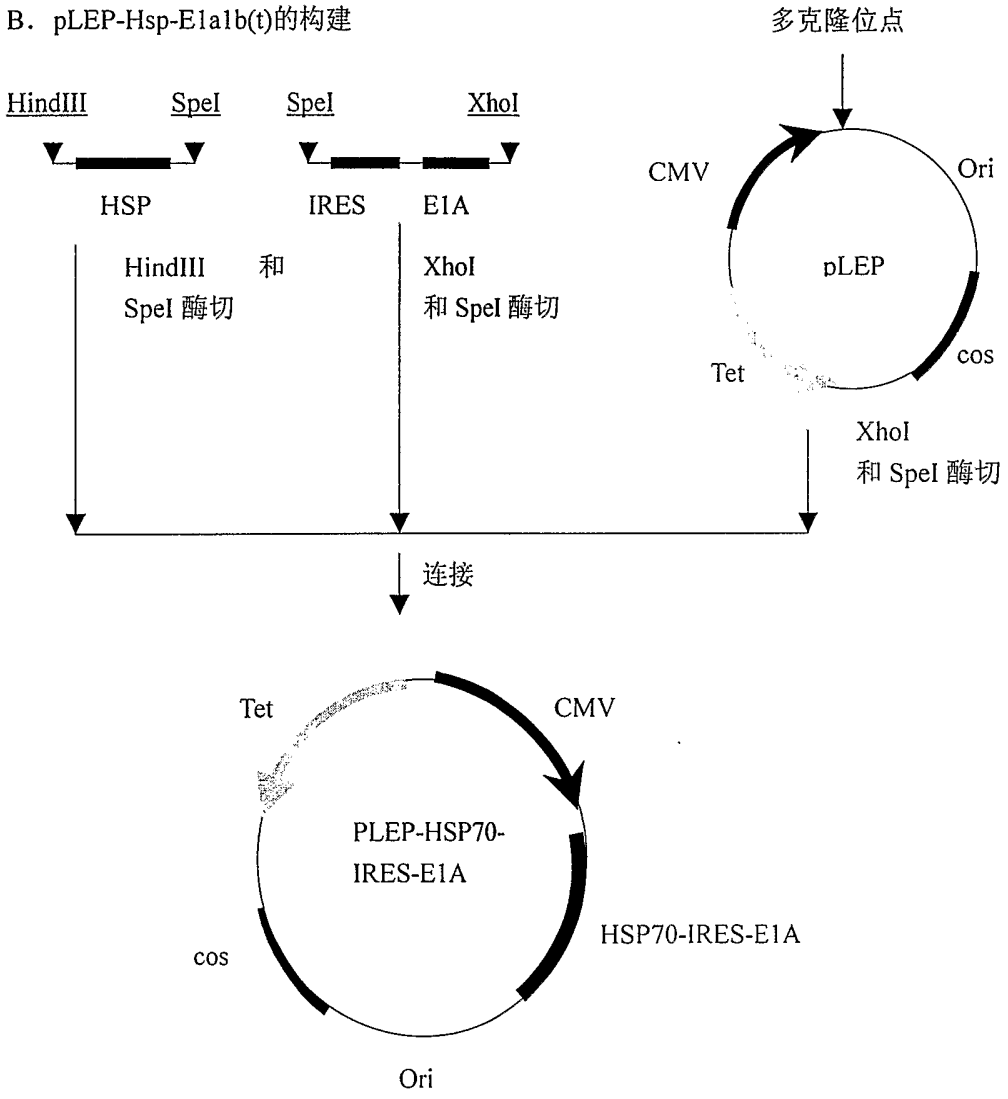


图 4. 质粒 pLEP-HSP70-IRES-E1A 的构建

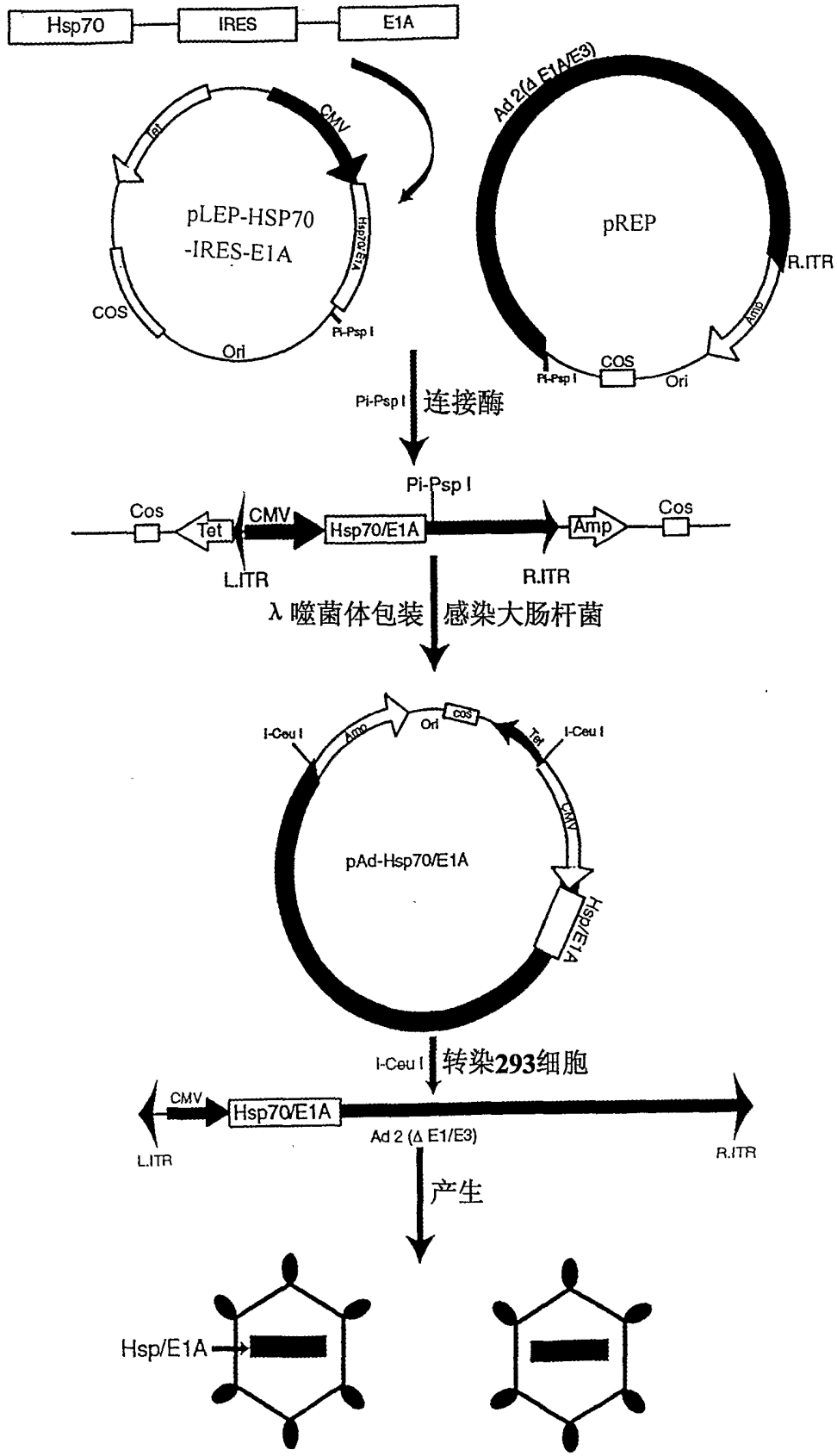
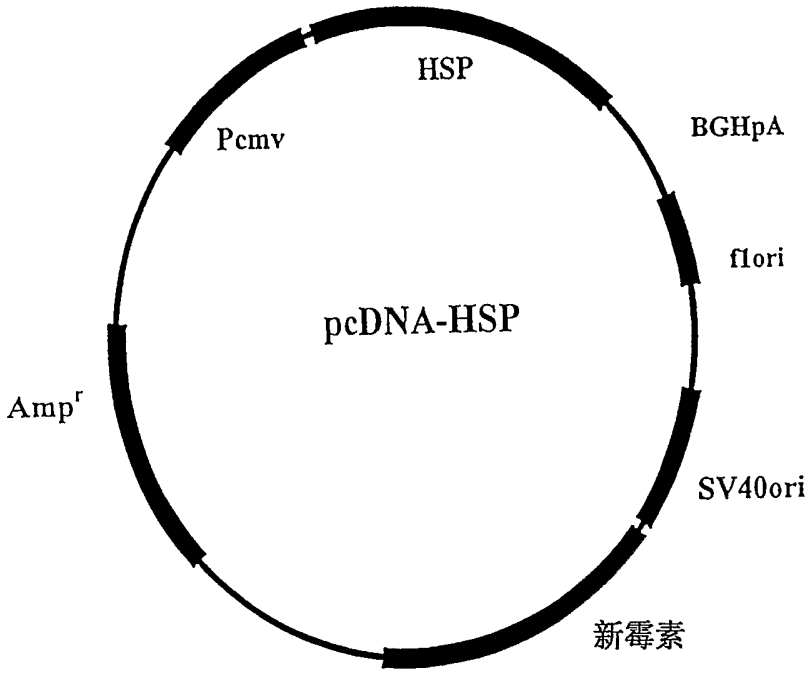


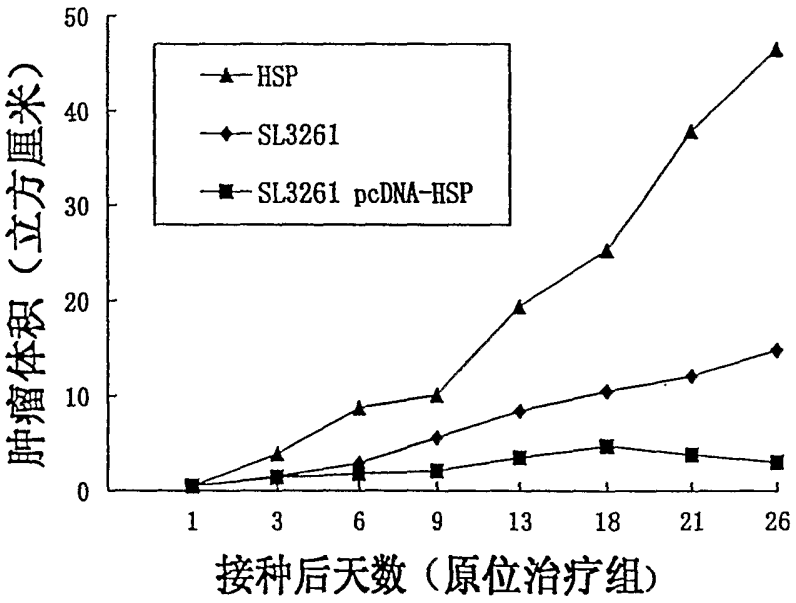
图 5. 表达 Hsp70 的重组腺病毒 Ad-Hsp/E1A 的构建过程



重组质粒 pcDNA-HSP

图 6

原位注射 SL3261 （pcDNA-HSP） 对远端肿瘤的抑制



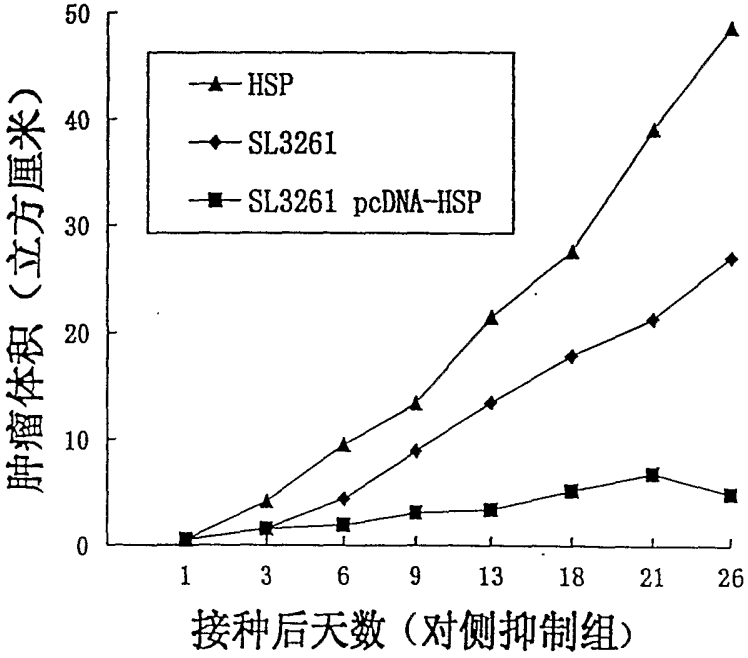


图 7

序 列 表

<110> CHEN, siyi (陈思毅)
HU, fang (胡放)
Hangzhou Conquer Biotech Co., Ltd. (杭州康科生物技术有限公司)

<120> expressing HSP oncolytic microorganisms and use thereof(表达热休克蛋白的溶瘤微生物及其应用)

<130>

<140> pct
<141> 2001-10-08

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述:引物

<400> 1
ggtatggaag atccctcgag atc 23

<210> 2
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述:引物

<400> 2
tactaatcta cctcctcaat ggtggg 26

<210> 3
<211> 10494
<212> DNA

<400> 3
gcggctgacc ggagcgtccg ttgggcgaca aacaccagga cggggcacag gtacactatc 60
gggccgccgg gtaaaagaag tgagaacgcg aagcgttcgc acttcgtccc aatatatata 120

tattattagg gcgaagtgcg agcactggcg ccgggatcca aatgagtctt cggacctcgc 180
gggggccgct taagcggtgg ttagggtttg tctgacgcgg ggggaggggg aaggaacgaa 240
acactctcat tcggaggcgg ctcggggttt ggtggttacc tggggctgtg cggttgggac 300
ggcgcccgtg ggcccgggcg gccgggggcg gcgggggccg gcatggcggc gcggcgggcc 360
atggagacag agagcgtgcc ggggtggtag agtttgacag gcaagcatgt gcgtgcagag 420
gcgagtagtg cttgcctgtc taactcgctc gtctcggccg cgggggggccc gggctgcgcc 480
gccgcgcttt aaagggccgc gcgcgacccc cgggggggtgt gtttcggggg gggcccgttt 540
tcgctcctcc ccccgctcct ccccccgctc ctcccccccgc tcctcccccc gctcctcccc 600
ccgctcctcc ccccgctcct ccccccgctc ctcccccccgc tcctcccccc gctcctcccc 660
ccgctcctcc ccccgctcct ccccccgctc ctcccccccgc tcctcccccc gctcctcccc 720
ccgctcctcc ccccgctcct ccccccgctc ctcccccccgc tcctcccccc gctcctcccc 780
gctcccgcgg ccccgccccc aacgcccgct cctccccgct cccgcggccc cgcccccaac 840
gcccgctcct ccccgctccc gcggccccgc ccccaacgcc cgccgcgcgc gcgcacgccg 900
cccggaccgc cgcccgcctt ttttgcgcgc cgccccgccc gcgggggggcc cgggctgcca 960
caggtgtaac aacaccaaca gaacaccaac agcacggcgc accggcgact ccggttcctc 1020
atccacacgt cacacgtcac gtcatccacc acacctgccc accaacacaa ctcacagcga 1080
caacacaccg cgcaacaact cctgttcctc atccacacgt caccgcgcac cccccgctcc 1140
tccagacgtc ccccagcgca acacgccgct cctgtcacac accaccgccc cagccctccc 1200
cagccccagc cctccccagc cccagccctc cccagcccca gccctcccca gccccagccc 1260
tccccagccc cagccctccc cagccccagc cctccccagc cccagccctc cccagcccca 1320
gccctcccca gccccagccc tccccagccc cagccctccc cagccccagc cctccccagc 1380
cccagccctc cccagcccca gccctcccca gccccagccc tccccagccc cagccctccc 1440
cagccccagc cctccccagc cccagccctc cccagcccca gccctcccca gcgcgtcccg 1500
cgctccctcg gggggttcg ggcatctcta cctcagtgcc gccaatctca ggtcagagat 1560
ccaaaccctc cggcgctgga cgacggggga gctggtgctc gggtgcgatg ccgcgctggt 1620
gcgcgcgcgc tacgggcggg aattcttgaa gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt 1680
tataggttaa tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa 1740
atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca 1800
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc 1860
aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc 1920
acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 1980
acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 2040
ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtgttgacg 2100
ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 2160
caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg 2220
ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga 2280
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg 2340
aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgcagcaa 2400
tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac 2460
aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 2520
cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca 2580
ttgcagcact ggggccttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt cttggtggcc 2640
acgggcacgc agaagagcgc cgcgatcctc ttaagcaccc ccccgccctc cgtggaggcg 2700
ggggtttggt cggcgggtgg taactggcgg gccgctgact cgggcgggtc gcgcgcccca 2760
gagtgtgacc ttttcggtct gctcgcagac ccccgggcgg cgccgccgcg taaagccgcc 2820
gggggtccgt gtcctgtctc ggttggccgg acccgggccc gagcccgagc agtagccggc 2880
gccatgtcgg tggtgggcat agacctgggc ttccagagct gctacgtcgc tgtggcccgc 2940
gccggcggca tcgagactat cgctaatgag tatagcgacc gctgcacgcc ggcttgcatt 3000
tcttttggtc ctaagaatcg ttcaattgga gcagcagcta aaagccaggt aatttctaat 3060

gcaaagaaca cagtccaagg atttaaaaga ttccatggcc gagcattctc tgatccattt 3120
gtggaggcag aaaaatctaa ccttgcatat gatattgtgc agtggcctac aggattaaca 3180
ggtataaagg tgacatatat ggaggaagag cgaaatttta ccactgagca agtgactgcc 3240
atgcttttgt ccaaactgaa ggagacagcc gaaagtgttc ttaagaagcc tgtagttgac 3300
tgtgttgttt cggttccttg tttctatact gatgcagaaa gacgatcagt gatggatgca 3360
acacagattg ctggtcttaa ttgcttgcga ttaatgaatg aaaccactgc agttgctctt 3420
gcatatggaa tctataagca ggatcttcct cgcttagaag agaaaccaag aaatgtagtt 3480
tttgtagaca tgggccactc tgcttatcaa gtttctgtat gtgcatttaa tagaggaaaa 3540
ctgaaagttc tggccactgc atttgacacg acattgggag gtagaaaatt tgatgaagtg 3600
ttagtaaatc acttctgtga agaatttggg aagaaataca agctagacat taagtccaaa 3660
atccgtgcat tattacgact ctctcaggag tgtgagaaac tcaagaaatt gatgagtgca 3720
aatgcttcag atctcccttt gagcattgaa tgttttatga atgatgttga tgtatctgga 3780
actatgaata gaggcaaatt tctggagatg tgcaatgatc tcttagctag agtggagcca 3840
ccacttcgta gtgttttgga acaaaccaag ttaaagaaag aagatattta tgcagtggag 3900
atagttggtg gtgctacacg aatccctgcg gtaaaagaga agatcagcaa atttttcggt 3960
aaagaactta gtacaacatt aaatgctgat gaagctgtca ctcgaggctg tgcattgcag 4020
tgtgccatct tatcgcctgc tttcaaagtc agagaatttt ctatcactga tgtagtacca 4080
tatccaatat ctctgagatg gaattctcca gctgaagaag ggtcaagtga ctgtgaagtc 4140
ttttccaaaa atcatgctgc tcctttctct aaagttctta cattttatag aaaggaacct 4200
ttcactcttg aggcctacta cagctctcct caggatttgc cctatccaga tcctgctata 4260
gctcagtttt cagttcagaa agtcactcct cagtctgatg gctccagttc aaaagtgaaa 4320
gtcaaagttc gagtaaatgt ccatggcatt ttcagtgtgt ccagtgcatc tttagtggag 4380
gttcacaagt ctgaggaaaa tgaggagcca atggaaacag atcagaatgc aaaggaggaa 4440
gagaagatgc aagtggacca ggaggaacca catgttgaag agcaacagca gcagacacca 4500
gcagaaaata aggcagagtc tgaagaaatg gagacctctc aagctggatc caaggataaa 4560
aagatggacc aaccacccca atgccaagaa ggcaaaagtg aagaccagta ctgtggacct 4620
gccaatcgag aatcagctat atggcagata gacagagaga tgctcaactt gtacattgaa 4680
aatgagggta agatgatcat gcaggataaa ctggagaagg agcggaatga tgctaagaac 4740
gcagtggagg aatatgtgta tgaaatgaga gacaagctta gtggtgaata tgagaagttt 4800
gtgagtgaag atgatcgtaa cagttttact ttgaaactgg aagatactga aaattggttg 4860
tatgaggatg gagaagacca gccaaagcaa gtttatgttg ataagttggc tgaattaaaa 4920
aatctaggtc aacctattaa gatacgtttc caggaatctg aagaacgacc aaattatttg 4980
aagaactaga gaacttaggg aaacagatcc aacagtatat gaaaataatc gcggcaacgg 5040
gctcgctggg tcctaggctc aatggggacc gtatacgtgg acaggctctg gagcatccgc 5100
acgactgcgg tgatattacc ggagaccttc tgcgggacga gccgggtcac atctgacggt 5160
tcactaaacc agctctgctt atatagacct cccaccgtac acgcctaccg cccatttgcg 5220
tcaatggggc ggagttgtta cgacattttg gaaagtcccg ttgattttgg tgccaaaaca 5280
aactcccatt gacgtcaatg gggtggagac ttggaaatcc ccgtgagtca aaccgctatc 5340
cacgcccatt gatgtactgc caaaaccgca tcaccatggt aatagcgatg actaatacgt 5400
agatgtactg ccaagtagga aagtcccata aggtcatgta ctgggcataa tgccaggcgg 5460
gccatttacc gtcattgacg tcaatagggg gcgtacttgg catatgatac acttgatgta 5520
ctgccaagtg ggcagtttac cgtaaatact ccacccatga cgtcaatgga aagtccctat 5580
tggcgttact atgggaacat acgtcattat tgacgtcaat gggcgggggt cgttgggcgg 5640
tcagccaggc gggccattta ccgtaagtta tgtaacgcgg aactccatat atgggctatg 5700
aactaatgac cccgtaattg attactatta caatacgccc gcgtttcttc cttttcccca 5760
ccccaacccc caagttcggg tgaaggccca gggctcgcag ccaacgtcgg ggcggcaagc 5820
cctgccatag ccacgggccc cgtgggttag gccgccccga ctgcatctgc gtgttcgaat 5880
tcgccaatga caagacgctg ggcggggttt gtgtcatcat agaactaaag acatgcaaat 5940
atatttcttc cggggacacc gccagcaaac gcgagcaacg ggccacgggg atgaagcagc 6000

ggccgagttt ccgcgggacc ccggccagct gctttacatc ccgaagacct acctgctcgg 6060
ccggcccccg aacgcgagcc tgcccgcccc caccacggtc gagccgaccg cccagcctcc 6120
cccctcggtc gcccccctta agggtctctt gcacaatcca gccgcctccg tgttgctgca 6180
tggcttcgta cccctgccat caacacgcgt ctgcgttcga ccaggctgcg cgttctcgcg 6240
gccatagcaa ccgacgtacg gcgttgcgcc ctcgccggca acaagaagcc acggaagtcc 6300
gcctggagca gaaaatgccc acgctactgc gggtttatat agacggtcct cacgggatgg 6360
ggaaaaccac caccacgcaa ctgctggtgg ccctgggttc gcgcgacgat atcgtctacg 6420
tacccgagcc gatgacttac tggcgggtgc tgggggcttc cgagacaatc gcgaacatct 6480
acaccacaca acaccgcctc gaccagggtg agatatcggc cggggacgcg gcggtggtaa 6540
tgacaagcgc ccagataaca atgggcatgc cttatgccgt gaccgacgcc gttctggctc 6600
ctcatatcgg gggggaggct gggagctcac atgccccgcc cccggccctc accctcatct 6660
tcgaccgcca tcccatcgcc gccctcctgt gttacccggc cgcgcgatac cttatgggca 6720
gcatgacccc ccaggccgtg ctggcgttcg tggccctcat cccgccgacc ttgcccggca 6780
caaacatcgt gcttggggcc cttccggagg acagacacat cgaccgcctg gccaaacgcc 6840
agcgccccgg cgagcggctt gacctggcta tgctggctgc gattcgccgc gtttacgggc 6900
tacttgccaa tacggtgcgg tatctgcagt gcggcgggtc gtggcgggag gactggggac 6960
agctttcggg gacggccgtg acgccccagg gtgccgagcc ccagagcaac gcgggcccac 7020
gaccccatat cggggaaacg ttatttaccc tgtttcgggc ccccgagttg ctggcccccа 7080
acggcgacct gtacaacgtg tttgcctggg ccttggacgt cttggccaaa cgcctccgtc 7140
ccatgcacgt ctttatcctg gattacgacc aatcgcccgc cggctgccgg gacgccctgc 7200
tgcaacttac ctccgggatg gtccagaccc atgtcaccac cccaggctcc ataccgacga 7260
tctgcgacct ggcgcgcacg tttgcccggg agatggggga ggctcactga ggacggggtc 7320
ccccatgggg aatggtttat ggttcgtggg ggttattatt ttgggcgttg cgtggggtca 7380
ggtccacgac tggactgagc agacagaccc atggtttttg gatggcctgg gcatggaccg 7440
catgtactgg cgcgacacga acaccgggcg tctgtggctg ccaaacaccc ccgaccccca 7500
aaaaccaccg cgcggatttc tggcgccgcc ggacgaacta aacctgacta cggcatctct 7560
gccccttctt cgctggtacg aggagcgctt ttgttttgta ttggtcacca ggggtctgac 7620
gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc 7680
ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag 7740
taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt 7800
ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag 7860
ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca 7920
gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact 7980
ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca 8040
gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctgcaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg 8100
tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatccccc 8160
atgttgtgca aaaaagcggt tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg 8220
gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca 8280
tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt 8340
atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc gccacatagc 8400
agaactttaa aagtgctcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc 8460
ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca 8520
tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa 8580
aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac aataccggaa ggaacccgcg 8640
ctatgacggc aataaaaaga cagaataaaa cgcacgggtg ttgggtcgtt tgttcataaa 8700
cgcggggttc ggtcccaggg ctggcactct gtcgataccc caccgagacc ccattgggac 8760
gttcccgggc ctgggtaacg ttttcggccg tccctgaccc cgaggccctg acgttcccgc 8820
ggggagacaa cgtggcgacg gcgagccacc cgagcgggcc gcgtgataca ccgccccccc 8880
gaccgccggt tggggcccgg cggcacccga cgacggagct ggacatcacg cacctgcaca 8940

acgcgtccac gacctggttg gccacccggg gcctgttgag atccccaggt aggtacgtgt 9000
atttctcccc gtcggcctcg acgtggcccg tgggcatctg gacgacgggg gagctggtgc 9060
tcgggtgcga tgccgcgctg gtgcgcgcgc gctacgggcg ggaattcttg aagacgaaag 9120
ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg 9180
tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccCta tttgtttatt tttctaaata 9240
cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga 9300
aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgcct gacattttcg gtgcgagtat 9360
ccgtaccatt cagaactggc aggaacaggg aatgcccgtt ctgcgaggcg gtggcaaggg 9420
taatgaggtg ctttatgact ctgccgccgt cataaaatgg tatgccgaaa gggatgctga 9480
aattgagaac gaaaagctgc gccgggagcc cggcggcacc tcgctaacgg attcaccact 9540
ccaagaattg gagccaatca attcttgcgg agaactgtga atgcgcaaac caacccttgg 9600
cagaacatat ccatcgcgtc cgccatctcc agcagccgca cgcggcgcat ctcggggccg 9660
acgcgctggg ctacgtcttg ctggcgttcg cgacgcgagg ctggatggcc ttccccatta 9720
tgattcttct cgcttccggc ggcatcggga tgcccgcgtt gcaggccatg ctgtccaggc 9780
aggtagatga cgaccatcag ggacagcttc aaggatcgct cgcggctctt accagcgcca 9840
gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc 9900
ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact 9960
ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct 10020
gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag 10080
ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca 10140
cgaacccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa 10200
cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 10260
gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg cctaactacg gctacactag 10320
aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg 10380
tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt ggtttttttg tttgcaagca 10440
gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctac 10494

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal application No.
PCT/CN01/01616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC[7] C12N1/21

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC[7] C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, EPOQUE(WPI), NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
P, X	WO, A, 0179548(CORNELL RES FOUND INC) 25.October 2001, See the whole document	1—35
X	WO, A, 0125399(VION PHARM INC) 12.April 2001, See the whole document	1—35
X	CA, A, 2300467(DNAVEC RES INC) 29.December 2000, See the whole document	1—35

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A"document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"earlier document but published on or after the international filing date

"L"document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O"document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 June 2002(14.06.02)	4 July 2002 (04.07.02)
Name and mailing address of the ISA/ The Chinese Patent Office 6, Xitucheng Road, Haidian District, Beijing, 100088, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer PAN, aiqun Telephone No. 86-10-62093906

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal application No.
PCT/CN01/01616

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO-A-0179548	25-10-01	None	
WO-A-0125399	12-04-01	AU-A-0079936	10-05-01
CA-A-2300467	29-12-00	JP-A-01010973	16-01-01

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN01/01616

A. 主题的分类

Int.Cl[7]: C12N1/21

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

Int.Cl[7]: C12N1/21

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和，如果实际可行的，使用的检索词)

WPI,CNPT, BIOSIS,CA

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
P, X	WO, A，0179548 (康乃尔基础研究院) 25.10 月 2001，参见全文	1－35
X	WO, A，0125399 (VION 药物公司) 12.4 月 2001，参见全文	1－35
X	CA, A, 2300467 (DNAVEC 研究院) 29.12 月 2000，参见全文	1－35

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型：
"A" 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件
"E" 在先文件，但是在国际申请日的同一日或之后公布的
"L"对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件
"P" 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件
"T"在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件，它与申请不相抵触，但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理
"X"特别相关的文件；当该文件被单独使用时，要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性
"Y"特别相关的文件；当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起，这种结合对本领域技术人员是显而易见的，要求保护的发明不能认为具有创造性
"&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
14.6 月 2002(14.06.02)	04 7月 2002(04.07.02)

国际检索单位名称和邮寄地址	受权官员：
中国专利局 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)	潘爱群
传真号：86-010-62019451	电话号码：86－10－62093906

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN01/01616

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO-A-0179548	25-10-01	无	
WO-A-0125399	12-04-01	AU-A-0079936	10-05-01
CA-A-2300467	29-12-00	JP-A-2001010973	16-01-01