

(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
2012 年 12 月 6 日 (06.12.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/163119 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/861 (2006.01) *C12R 1/93* (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/071757
- (22) 国际申请日: 2012 年 2 月 29 日 (29.02.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201110143385.3 2011 年 5 月 31 日 (31.05.2011) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 北京锤特生物科技有限公司 (BEIJING BIO-TARGETING THERAPEUTICS TECHNOLOGY INC.) [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命园路 29 号 1 号楼 2 层 A215, Beijing 102206 (CN)。
- (72) 发明人: 姜国忠 (JIANG, Guozhong); 中国河南省郑州市科学大道 100 号, Henan 450001 (CN)。 黄汉熙

(WONG, Hanshi); 中国河南省郑州市科学大道 100 号, Henan 450001 (CN)。 曹风雨 (CAO, Fengyu); 中国河南省郑州市科学大道 100 号, Henan 450001 (CN)。 莱蒙·尼克 (LEMOINE, Nick); 英国伦敦市嘉德院广场玛丽女王-伦敦大学巴兹和伦敦医学和牙科学学院癌症研究所和英国癌症研究临床中心, London (GB)。

- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 王尧河 (WANG, Yaohe) [CN/CN]; 中国河南省郑州市科学大道 100 号, Henan 450001 (CN)。
- (74) 代理人: 郑州大通专利商标代理有限公司 (ZHENGZHOU DATONG PATENT & TRADEMARK AGENT LTD.); 中国河南省郑州市花园路 2 号, Henan 45003 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,

[见续页]

(54) Title: CONSTRUCTION AND APPLICATION OF MUTANT TYPE B HUMAN ADENOVIRUS AD11 HAVING ENHANCED ONCOLYTIC POWER

(54) 发明名称: 溶肿瘤能力增强的 B 型人腺病毒 Ad11 突变体的构建和应用

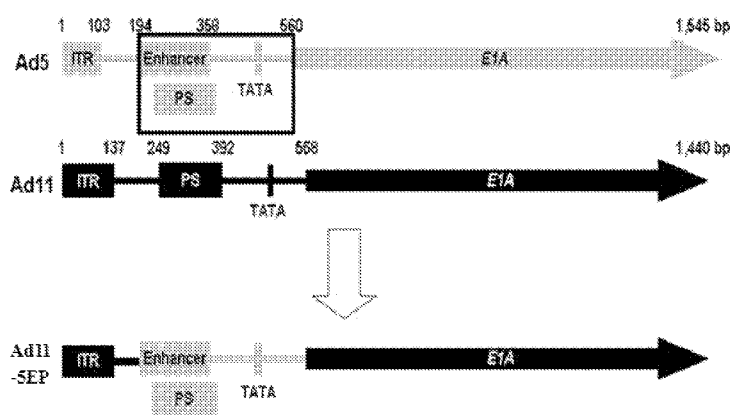


图 1 /Fig.1

(57) Abstract: A method for constructing type-B recombinant human adenoviral vectors Ad11-5EP and Ad11-5ETel-GFP, and applications thereof. Construction of the adenoviral vector Ad11-5EP utilizes homologous recombination to substitute a 365 bp-long gene upstream segment of the Ad5 E1A coding sequence (comprising the enhancer and promoter of Ad5 E1A) to the corresponding region of type-B human adenovirus subtype 11 Ad11, thereby constructing said vector Ad11-5EP. The method for constructing the type-B recombinant human adenoviral vector Ad11-5ETel-GFP is simultaneous homologous recombination of the genomes of the constructed shuttle vectors pSSENTel, pSSGFP and Ad11-5EP, so as to produce said Ad11-5ETel-GFP. Vector Ad11-5EP possesses a stronger oncolytic effect than the wild-type Ad11, which enhances the power to kill tumor cells. Measurements of tumour growth and tumour clearance rates show that Ad11-5EP effectively reduces tumour growth rates, while the tumour-free ratio among tumour-bearing mice using Ad11-5EP is noticeably better than for Ad11. Constructed Ad11-5ETel-GFP can be used for treating tumours, or for specific, sensitive and economical detection of tumour cells in circulating blood.

(57) 摘要:

[见续页]



GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT,

BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

提供 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP 和 Ad11-5ETel-GFP 的构建方法及其应用。腺病毒载体 Ad11-5EP 的构建是利用同源重组将 Ad5E1A 编码序列上游的 365bp 段基因 (包括 Ad5E1A 的增强子和启动子) 置换到 B 型人腺病毒 11 亚型 Ad11 的相应区域, 构建成载体 Ad11-5EP。B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5ETel-GFP 的构建方法是由构建的穿梭载体 pSSENTel、pSSGFP 与 Ad11-5EP 基因组同时同源重组产生 Ad11-5ETel-GFP。Ad11-5EP 载体具有比野生型 Ad11 更强的溶肿瘤作用, 增强了杀伤肿瘤细胞的能力。通过肿瘤生长和肿瘤清除率的测定表明, Ad11-5EP 能有效降低肿瘤生长速度, 且荷瘤鼠无瘤率显著好于 Ad11; 构建的 Ad11-5ETel-GFP 可用于治疗肿瘤或检测血液循环中的肿瘤细胞, 可特异、敏感、经济的用于循环血液中的肿瘤细胞的检测。

说明书

溶肿瘤能力增强的 B 型人腺病毒 Ad11 突变体的构建和应用

技术领域

[0002] 本发明涉及腺病毒载体及其应用，特别是涉及 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP 和 Ad11-5ETel-GFP 的构建方法及其应用。

技术背景

[0003] 近年来，肿瘤病毒治疗特别是腺病毒在肿瘤治疗方面的应用发展非常迅速。2005 年，E1B 55K 和 E3B 缺陷型腺病毒(H101)首次在中国被批准用于治疗头颈部肿瘤，然而，腺病毒来源的 H101 对某些恶性肿瘤的疗效很差，比如发病高致死性强的胰腺癌。限制肿瘤疗效的原因之一是这些肿瘤低表达腺病毒受体(CAR)，而且，静脉注射的腺病毒很快被抗体及补体中和而灭活，此外，腺病毒还可以被 Kuffer 细胞吞噬，病毒 hexon 蛋白与凝血因子 X 结合，然后转导肝细胞，所以过量腺病毒容易导致明显的肝细胞毒性及肝损伤。

[0004] Ad11 是 B 型人腺病毒的一种亚型。在溶肿瘤治疗方面，Ad11 明显优越于 Ad5。除了 CD46 受体外，Ad11 还可以结合其他细胞表面受体 X。Tuve 等报道 Ad11 是 B 腺病毒亚群中唯一的既结合 CD46 又结合 X 的病毒，说明 Ad11 可以感染更广范的肿瘤细胞，由此解决了 Ad5 应用中病毒受体下调而导致感染率低的难题。Ad11 较 Ad5 另外一个优越之处在于人群中 Ad11 的中和抗体较低为 10-31%，Ad5 是 45-90%，并且中间无交叉活性。当静脉注射 Ad11 到表达 CD46 的转基因鼠时，未发现明显的肝内转导和肝毒性现象。而且，Ad11 能够高效转导树突状细胞，因此重组 Ad11 可以表达肿瘤特异抗原，通过增强免疫反应来更好的用于肿瘤免疫治疗。

[0005] 关于 Ad5 以外的其它腺病毒血清型作为疫苗或基因转换载体的应用已经有了大量报道。但它们作为溶肿瘤病毒的研究才刚刚起步，相关报道也不深入。Sandberg 等最近体内外研究显示，Ad11 能够有效地在前列腺癌细胞系 PC-3 中转导、复制并裂解，但该作者没有与通用的 Ad5 进行比较。Shashkova 等应用人肿瘤细胞系体外试验及人前列腺癌细胞系 DU 145 体内研究，比较了 Ad5、Ad6、Ad11 和 Ad35 之间的溶肿瘤效率，发现 Ad5、Ad6 和 Ad11 有相似的抗肿瘤效果，而 Ad35 则无抗肿瘤作用。重要的是，仅仅 Ad5 产生了肝脏毒性。后来人们因此建立了嵌合型溶肿瘤 Ad5(将 Ad5 的纤毛替换成 B 亚群腺病毒的)，目的是使嵌合型溶肿瘤 Ad5 通过结合细胞膜上 CD46 受体来提高抗肿瘤效果。但是与完整的 B 亚群腺病毒相

比较,这种方法仍不能克服针对 Ad5 hexon 抗体的中和能力。

[0006] 循环肿瘤细胞 (Circulating tumour cells, CTCs) 数与肿瘤患者的临床分期、疗效及短的生存率相关。肿瘤患者外周血液的 CTCs 水平可作为监控和调整治疗及判断预后的依据。这就迫切需要一种特异的、敏感的方法去检测这些细胞。近年来,免疫细胞计数分析和定量 PCR 等方法的应用已经能够在血液中检测出少量的 CTCs,然而缺少特异的生物学标志物及高额的检测费用限制了这些方法的普及应用。

[0007] 复制选择性溶肿瘤腺病毒是一类新的肿瘤治疗药物。值得注意的是,最近已经报导用表达 GFP 的复制选择性溶肿瘤腺病毒 Ad5 在上亿外周血细胞中检测 CTCs。然而,肿瘤细胞的遗传性变化是影响腺病毒感染的重要因素,肿瘤细胞中低表达 CAR 会显著降低 Ad5 的感染能力,进而影响肿瘤细胞的阳性检出率。并且发现,除了已知的影响机制如 CAR 低表达以外,另外一些肿瘤相关基因如 CEACAM6 也能影响 Ad5 进入到细胞核中,进而减少了 Ad5 对肿瘤细胞的感染能力。这些数据表明在一些肿瘤细胞中用 Ad5 检测 CTCs 的方法可能敏感性较低。

发明内容

[0008] 本发明要解决的技术问题:提供一种具有肿瘤靶向性和抗肿瘤效果的腺病毒载体 Ad11-5EP,还提供一种用于治疗肿瘤或检测血循环中肿瘤细胞的 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5ETel-GFP。

[0009] 本发明的技术方案:

发明人首次在人肿瘤细胞系中体外比较了 Ad11 和 Ad5 的抗肿瘤潜能,发现在 25 个被检细胞系中仅仅有 9 个对 Ad11 敏感。其中 PC-3 对 Ad5 不敏感而对 Ad11 敏感。与 Ad5 相比较,Ad11 在体内明显抑制 PC-3 细胞的皮下肿瘤生长,并且提高了荷瘤动物的无瘤率。同样,用对 Ad5 敏感而对 Ad11 不敏感的 MIA PaCa-2 细胞重复上述实验,Ad11 的抗肿瘤能力明显降低。

[0010] 尽管人肿瘤细胞中普遍高表达 Ad11 的受体,但野生型 Ad11 却不能有效地杀死这些肿瘤细胞。发明人对此进行了广泛而深入的研究。用两种不同的方法,发明人论证了与 Ad5 相比,有更多的 Ad11 吸附在肿瘤细胞膜上,这一结果与该细胞是否对 Ad11 敏感无关。吸附的 Ad11 病毒颗粒能够有效地进入到细胞核内,说明与 Ad5 相比在病毒感染的早期阶段细胞核内就有较高水平的 Ad11。发明人调查比较了两种病毒在肿瘤细胞中的早期基因表达,用特异引物作定量 PCR 方法来检测比较 E1A 的 mRNA 水平。在所有这些细胞系中病毒感染 2 小时后,发现较高水平的 Ad11 感染产生了较高水平的 E1A mRNA 表达。其中 Ad11 不敏感细胞中(MIA PaCa-2 和 LNCaP)Ad5 的 E1A mRNA 表达水平在感染 2 小时后明显降低。同样,Ad11

敏感的 Capan-2 和 PC-3 细胞 Ad11 E1A mRNA 呈较高水平。Ad11 E1A mRNA 直接影响着病毒的复制, 所以 Ad11 E1A mRNA 在 MIA PaCa-2 和 LNCaP 细胞中的下调会降低病毒复制水平, 相应地降低 hexon 蛋白的合成能力, 这一发现与最初观察到的 Ad11 低水平的病毒子的产生及细胞毒性相一致。这些结果表明 Ad11 的复制及其杀伤能力与它的感染性无关, 而与它的早期基因的增强子和启动子活性有关。

[0011] 为了解决上述问题, 本发明构建了一种肿瘤靶向性腺病毒载体(Ad11-5EP)。实验表明 Ad11-5EP 是一个非常有用的基本载体, 可用于开发新的复制选择性溶肿瘤腺病毒, 以期治疗更广泛的人类肿瘤。

[0012] 为了进一步探索该新型腺病毒载体的应用, 增强检测血循环肿瘤细胞的敏感性, 在 Ad11-5EP 基础上, Ad5 启动子被人端粒酶基因启动子所取代, 然后通过同源重组产生了一个表达信号基因的复制选择型腺病毒(Ad11-5ETel-GFP)。由于端粒酶在 95% 人肿瘤细胞中高表达, 所以 Ad11-5ETel-GFP 只能选择性地在肿瘤细胞中复制并表达 GFP, 而在正常上皮细胞中没有活性。

[0013] 本发明的具体技术方案如下:

一种 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP 的构建方法, 利用同源重组将 Ad5 E1A 编码序列上游的 365bp 段基因, 包括 Ad5 E1A 的增强子和启动子, 置换到 B 型人腺病毒 11 亚型 Ad11 的相应区域, 构建成 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP。

[0014] 所述同源重组时, 左臂序列是 Ad11 基因组前 392bp 段基因, 右臂为 Ad5 E1A 增强子及启动子序列的 195-559bp 段基因和 Ad11 E1A 的 568-1125bp 段基因, 按顺序连接到一起形成片段, 左臂和右臂分别连接到 pSS-ChI 两侧多克隆位点上, 建立穿梭载体 pSS-A1A7; pSS-A1A7 被 PmeI 酶切并纯化, PmeI 消化片段同时与 pAd11 在 BJ5183 细胞内进行同源重组, 然后在含氨苄青霉素及氯霉素两种抗生素的琼脂板上筛选; 阳性克隆分别经 SmaI 酶切, 移除抗氯霉素基因表达盒序列, 生成 pAd11-Ad5EP, pAd11-Ad5EP 经 NotI 酶切线性化后, 转染到 293 细胞中产生腺病毒 Ad11-5EP。

[0015] 所述氨苄青霉素、氯霉素的浓度分别为 100mg/ml、25mg/ml。

[0016] 利用 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP 改造复制选择性溶肿瘤腺病毒的方法为下列方法其中之一:

(1) 删除腺病毒在正常细胞中生存必需的但在肿瘤细胞中不需要的基因 E1A CR2 区域或抗凋亡基因 E1B 21K;

(2) 插入肿瘤特异启动子, 驱动 E1A 基因的表达;

(3)根据肿瘤细胞表面特异受体,改造腺病毒的嗜细胞性;

(4)结合 MicroRNA 技术,赋予病毒选择性地在肿瘤细胞中进行复制。

[0017] 一种 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5ETel-GFP 的构建方法,包括以下步骤:

(1) 先用两个不同的抗生素抗性表达盒构建载体 pSS-ChI 和 pSS-kna,在抗氯霉素基因表达盒序列两侧引入 *SwaI* 酶切位点,在抗卡那霉素基因表达盒序列两侧引入 *sbfi* 酶切位点;

(2) 从 pUC18 克隆得到 pBR32 复制的起始序列,通过人工合成的包含多克隆位点的核苷酸序列与抗氯霉素基因表达盒序列相连接产生 pSS-ChI,同源重组抗氯霉素基因表达盒序列上游左臂序列和下游右臂序列,将抗氯霉素上游左臂序列和下游右臂序列分别平端或粘端插入到 pSS-ChI 两侧的多克隆位点内,构建重组用的穿梭载体;

(3) 从 pUC18 克隆得到 pBR32 复制的起始序列,通过人工合成的包含多克隆位点的核苷酸序列与抗卡那霉素基因表达盒序列相连接产生 pSS-kna,同源重组抗卡那霉素基因上游左臂序列和下游右臂序列,将抗卡那霉素基因上游左臂序列和下游右臂序列分别平端或粘端插入到 pSS-kna 两侧的多克隆位点内,构建重组用的穿梭载体;

(4) pSSENTel 的构建,左臂序列是 Ad11 基因组的前 392bp 序列,右臂为 Ad5 E1A 增强子的 195-378bp 段基因、人 TERT 启动子的-714-0bp 段基因 和 Ad11 E1A 的 568-1125bp 序列按顺序连接在一起形成的片段,同时在人 TERT 启动子的两侧分别引入两个限制性酶切位点 *XbaI* 和 *NcoI*,左臂和右臂分别平端插入到 pSS-ChI 的相应两侧 *SnaBI* 和 *EcoRV*,最终生成 pSSENTel;

(5) pSSGFP 的构建,左臂为 Ad11 基因组从 27301 到 27837bp 的 DNA 片段与 EGFP 基因通过 *NcoI* 的连接产物,并在 EGFP 的 3' 处引入 *SnaBI* 位点;右臂是 Ad11 基因组从 28337 到 28920bp 的 DNA 片段,左臂和右臂分别平端插入到 pSS-kna 两侧的 *SnaBI* 和 *EcoRV* 位点,最终生成 pSSGFP;

(6) pSSENTel 和 pSSGFP 分别被 *PmeI* 酶切并纯化,两个 *PmeI* 消化片段同时与 pAd11 在 BJ5183 细胞内进行同源重组,然后在含氨苄青霉素、卡那霉素及氯霉素三种抗生素的琼脂板上进行筛选;阳性克隆分别经 *SwaI* 和 *SbfI* 酶切,移除抗氯霉素基因表达盒序列和卡那霉素基因表达盒序列,生成 pAd11-5ETel-GFP; pAd11-5ETel-GFP 经 *NotI* 酶切线性化后,转染到 293 细胞中产生腺病毒 Ad11-5ETel-GFP。

[0018] 所述氨苄青霉素、卡那霉素及氯霉素浓度依次为 100mg/ml、50ug/ml、25mg/ml。

[0019] 所述 pSSENTel 中的 Tel 序列能够被其他肿瘤特异基因的启动子所取代,生成一个肿瘤特异的溶肿瘤腺病毒;所述 pSSGFP 中的 GFP 序列能够被另外信号基因或治疗基因取代。

[0020] 所述 pSSGFP 中的 Ad11 18.5 基因的启动子能够被更强的肿瘤特异启动子所取代。

[0021] 所述的 B 型人腺病毒载体 Ad11-5EP 在用于治疗肿瘤中的应用。

[0022] 所述的 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5ETel-GFP 在用于治疗肿瘤或检测血循环中肿瘤细胞的应用。

[0023] 本发明的积极有益效果：

(1) 本发明的肿瘤靶向性腺病毒载体 Ad11-5EP，是在野生型 Ad11 的基础上，其 E1A 的增强子和启动子被 Ad5 E1A 的增强子和启动子所取代得到的，该载体比野生型 Ad11 有更强的溶肿瘤作用，从而增强了对肿瘤细胞的杀伤能力。

[0024] (2) 本发明的肿瘤靶向性腺病毒载体 Ad11-5EP，具有肿瘤靶向性和抗肿瘤效果。通过溶肿瘤潜能试验表明，Ad11-5EP 比 Ad5 显示出更好的细胞杀伤能力，比 Ad11 产生更强的细胞毒性。通过肿瘤生长和肿瘤清除率的测定表明，Ad11-5EP 能有效地降低肿瘤的生长速度，并且荷瘤鼠无瘤率显著好于 Ad11。

[0025] (3) 本发明的肿瘤靶向性腺病毒载体 Ad11-5EP 可作为一种肿瘤靶向性基因工程药物治疗肿瘤，将会产生较好的社会效益和经济效益。

(4) 本发明的 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5ETel-GFP 的构建方法，由构建的穿梭载体 pSSENTel、pSSGFP 与 Ad11-5EP 基因组同时进行同源重组产生重组病毒 Ad11-5ETel-GFP。Ad11-5ETel-GFP 可用于治疗肿瘤或检测血循环中肿瘤细胞，通过 Ad11-5ETel-GFP 中的 GFP 在人正常上皮细胞及癌细胞中的表达试验以及检测 CTCs 的实验表明，d11-5ETel-GFP 对肿瘤细胞非常敏感，它能够感染大多数肿瘤细胞，用该载体可特异的、敏感的、经济的用于循环血液中肿瘤细胞的检测。

附图说明

[0026] 图 1：B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP 的构建示意图。

[0027] 图 2：Ad11-5EP 对 Ad11 敏感人肿瘤细胞的溶肿瘤潜能的比较。

[0028] 图 3：Ad11-5EP 对 Ad11 不敏感人肿瘤细胞的溶肿瘤潜能的比较；

图 2、图 3 中，□表示 Ad5，■表示 Ad11，▨表示 Ad11-5EP。

[0029] 图 4：MIA PaCa-2 细胞皮下种植异体肿瘤模型中 Ad5、Ad11 和 Ad11-5EP 处理后肿瘤的生长曲线图。

[0030] 图 5：MIA PaCa-2 细胞皮下种植异体肿瘤模型中 Ad5、Ad11 和 Ad11-5EP 处理后动物肿瘤清除率；

图 4、图 5 中，1 表示 PBS，2 表示 Ad11，3 表示 Ad11-5EP，4 表示 Ad5。

[0031] 图 6: 穿梭载体 pSSENTel 和 pSSGFP 及复制选择性溶肿瘤腺病毒质粒 pAd11-5ETel-GFP 的构建过程示意图。

[0032] 图 7: Ad11-5ETel-GFP 中的 GFP 在人正常上皮细胞及癌细胞中的表达比较图; 图中, 1 为白光下图像, 2 为荧光下图像。

[0033] 图 8: Ad11-5ETel-GFP 检测血液中肿瘤细胞数的统计柱状图。

[0034] 图 9: Ad11-5ETel-GFP 荧光显微镜下检测的血液中肿瘤细胞数图像。

具体实施方式

[0035] 以下通过实例对本发明进一步说明, 并不是限定本发明的保护范围, 本领域的技术人员根据说明书可以对这些实施方案进行修改, 只要不脱离本发明的精神和范围都可以得到类似或相同的结果, 均在本发明的保护范围之内。

[0036] 实例 1: B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP 的构建方法

利用同源重组将 Ad5 E1A 编码序列上游的 365bp 段基因, 包括 Ad5 E1A 的增强子和启动子, 置换到 B 型人腺病毒 11 亚型 Ad11 的相应区域, 构建成 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP。

[0037] 左臂序列是 Ad11 基因组前 392bp, 右臂为 Ad5 E1A 增强子及启动子序列 (195-559bp) 和 Ad11 E1A (568-1125bp) 按顺序连接到一起的片段, 左臂和右臂分别连接到 pSS-ChI 两侧多克隆位点上, 建立穿梭载体 pSS-A1A7。pSS-A1A7 被 PmeI 酶切并纯化。PmeI 消化片段同时与 pAd11 在 BJ5183 细胞内进行同源重组, 然后在含氨苄青霉素及氯霉素两种抗生素 (浓度依次为 100mg/ml、25mg/ml) 的琼脂板上筛选。阳性克隆分别经 SwaI 酶切, 以移除抗氯霉素基因表达盒序列, 最终生成 pAd11-Ad5EP。pAd11-Ad5EP 经 NotI 酶切线性化后, 转染到 293 细胞中产生腺病毒 Ad11-Ad5EP (参见图 1)。

[0038] 实例 2: Ad5、Ad11 和 Ad11-5EP 在 Ad11 敏感及不敏感人肿瘤细胞中的溶肿瘤潜能。

[0039] 在 Ad11 敏感人肿瘤细胞 Capan-2、PaTu8988s、PC-3、MCF7、HT-29 和不敏感人肿瘤细胞 MIA PaCa-2、MDA-MB-231、HCT116、LNCaP 和 A549 中对 Ad5、Ad11 和 Ad11-5EP 进行体外杀伤实验, 用 2% 胎牛血清的培养基将上述 10 种细胞制成细胞悬液, 接种于 96 孔板中央, 14~18h 之后, 倍比稀释病毒。以 1×10^4 pfu/细胞为起始浓度, 10 倍比稀释病毒溶液, 加入 10 μ l/孔感染 96 孔板中各种细胞, 感染后 6 天加入 MTS 检测它们的溶肿瘤潜能。

[0040] 结果显示: 在所有 Ad11 敏感细胞系中, Ad11-5EP 比 Ad5 显示出更好的细胞杀伤能力, 比 Ad11 产生更强的细胞毒性 (参见图 2)。而在 Ad11 不敏感细胞系中, Ad11-5EP 的性能得到显著提高 (参见图 3)。Ad11-5EP 在 90% (9 / 10) 的细胞系中都显示高敏感性, 说明比 Ad5 和 Ad11 拥有更好的杀伤肿瘤的效力, Ad11-5EP 在体外扩大了有效杀伤肿瘤细胞的范围。

[0041] 实例 3: Ad5、Ad11 和 Ad11-5EP 在 MIA PaCa-2 细胞皮下种植异体肿瘤模型中的抗肿瘤效果。

[0042] 在 BALA/c 裸鼠($n=8$ / 组)右侧背部皮下接种 MIA PaCa-2 细胞 (因为 MIA PaCa-2 对 Ad11 不敏感而对 Ad5 敏感), 构建皮下移植瘤模型, 当肿瘤体积达到 180 mm^3 时, 第 1、3、5 天瘤内分别注射 PBS 或病毒(Ad5、Ad11 和 Ad11-5EP, 1×10^{10} 病毒颗粒 / 注射), 观察肿瘤生长和肿瘤清除率。结果发现 Ad11-5EP 如 Ad5 一样能有效地降低肿瘤的生长 (参见图 4), 并且荷瘤鼠无瘤率显著好于 Ad11 处理组 (参见图 5)。

[0043] 实例 4: B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5ETel-GFP 的构建方法。

[0044] (1) 先用两个不同的抗生素抗性表达盒构建两个不同载体 pSS-ChI 和 pSS-kna, 其中抗氯霉素基因表达盒序列两侧引入 SmaI 酶切位点, 而抗卡那霉素基因表达盒序列两侧为 SbfI 切位点;

(2) 从 pUC18 克隆得到 pBR32 复制起始序列, 然后通过人工合成的包含多克隆位点 (PmeI-KpnI-SacII-NotI-XhoI-XbaI-SgfI-SnaBI-SmaI 和 SmaI-EcoRV-FseI-HindIII-SrfI-SalI-BglII-PmeI) 的核苷酸序列与抗氯霉素基因表达盒序列相连接产生 pSS-ChI, 同源重组需要的上游(左臂)和下游(右臂)序列分别平端或粘端插入到两侧的多克隆位点内, 构建成重组用的穿梭载体;

(3) 从 pUC18 克隆得到 pBR32 复制起始序列, 然后通过人工合成的包含多克隆位点 (PmeI-KpnI-SacII-NotI-XhoI-XbaI-SgfI-SnaBI-SmaI-SbfI 和 SbfI-SmaI-EcoRV-FseI-HindIII-SrfI-SalI-BglII-PmeI) 的核苷酸序列与抗卡那霉素基因表达盒序列相连接产生 pSS-kna, 同源重组需要的上游(左臂)和下游(右臂)序列分别平端或粘端插入到 pSS-kna 两侧的多克隆位点内构建成重组用的穿梭载体;

(4) pSSENTel, 左臂序列是 Ad11 基因组前 392bp, 右臂为 Ad5 E1A 增强子(195-378bp)、人 TERT 启动子 (-714-0bp) 和 Ad11 E1A (568-1125bp)按顺序连接到一起的片段, 在人 TERT 启动子两侧分别引入两个限制性酶切位点 XbaI 和 NcoI, 左臂和右臂分别平端插入到 pSS-ChI 的相应两侧(SnaBI 和 EcoRV), 最终生成 pSSENTel;

(5) pSSGFP, 左臂为 DNA 片段(Ad11 基因组 DNA 从 27301 到 27837bp)与 EGFP 基因通过 NcoI 的连接产物, 在 EGFP 的 3' 引入一个 SnaBI 位点, 右臂是 Ad11 基因组 DNA 从 28337 到 28920bp 的 DNA 片段, 左臂和右臂分别平端插入到 pSS-kna 相应两侧的 SnaBI 和 EcoRV 位点, 最终生成 pSSGFP;

(6) pSSENTel 和 pSSGFP 分别被 PmeI 酶切并纯化, 两个 PmeI 消化片段同时与 pAd11 在

BJ5183 细胞内进行同源重组，然后在含氨苄青霉素、卡那霉素及氯霉素三种抗生素（浓度依次为 100mg/ml、50ug/ml、25mg/ml）的琼脂板上筛选。阳性克隆分别经 *Swa*I 和 *Sbf*I 酶切，以移除抗氯霉素基因表达盒序列和卡那霉素基因表达盒序列，最终生成 pAd11-5ETel-GFP（参见图 6）。

[0045] pAd11-5ETel-GFP 经 *Not*I 酶切线性化后，转染到 293 细胞中产生腺病毒 Ad11-5ETel-GFP。

[0046] 实例 5：Ad11-5ETel-GFP 中的 GFP 在人正常上皮细胞及癌细胞中的表达。

[0047] Ad11-5ETel-GFP 感染人胰腺癌细胞系 SUIT-2 和人正常支气管上皮细胞系 NHBE（感染浓度 100pfu/细胞），24 小时后用免疫荧光显微镜观察 GFP 的表达。GFP 在肿瘤细胞 SUIT-2 中呈现高表达，而在正常细胞 NHBE 中较低（参见图 7），说明 Ad11-5ETel-GFP 对肿瘤细胞敏感。

[0048] 实例 6：Ad11-5ETel-GFP 检测循环肿瘤细胞 CTCs。

[0049] 分别将 10、25、50、100、200 个人胰腺癌细胞 SUIT-2 混入 3ml 血液中，裂解红细胞后离心收集有核细胞，然后用 900 μ l DMEM 培养基重悬有核细胞，加入 1×10^4 pfu 的 Ad11-5ETel-GFP，孵育 24 小时，最后用免疫荧光显微镜计数 GFP 阳性细胞（参见图 8）。外周血细胞混入 0、10、100、1000 个人胰腺癌细胞 SUIT-2 细胞（感染浓度 100pfu/细胞），24 小时后用免疫荧光显微镜下观察荧光细胞（参见图 9），结果表明 Ad11-5ETel-GFP 对肿瘤细胞非常敏感。

[0050]

1. 一种 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP 的构建方法, 其特征是: 利用同源重组将 Ad5 E1A 编码序列上游的 365bp 段基因, 包括 Ad5 E1A 的增强子和启动子, 置换到 B 型人腺病毒 11 亚型 Ad11 的相应区域, 构建成 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP。
2. 根据权利要求 1 所述的构建方法, 其特征是: 所述同源重组时, 左臂序列是 Ad11 基因组前 392bp 段基因, 右臂为 Ad5 E1A 增强子及启动子序列的 195-559bp 段基因和 Ad11 E1A 的 568-1125bp 段基因, 按顺序连接到一起形成片段, 左臂和右臂分别连接到 pSS-ChI 两侧多克隆位点上, 建立穿梭载体 pSS-A1A7; pSS-A1A7 被 PmeI 酶切并纯化, PmeI 消化片段同时与 pAd11 在 BJ5183 细胞内进行同源重组, 然后在含氨苄青霉素及氯霉素两种抗生素的琼脂板上筛选; 阳性克隆分别经 SmaI 酶切, 移除抗氯霉素基因表达盒序列, 生成 pAd11-Ad5EP, pAd11-Ad5EP 经 NotI 酶切线性化后, 转染到 293 细胞中产生腺病毒 Ad11-5EP。
3. 根据权利要求 2 所述的构建方法, 其特征是: 所述氨苄青霉素、氯霉素的浓度分别为 100mg/ml、25mg/ml。
4. 利用权利要求 1 所述的 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP 改造复制选择性溶肿瘤腺病毒的方法为下列方法其中之一:
 - (1)删除腺病毒在正常细胞中生存必需但在肿瘤细胞中不需要的基因 E1A CR2 区域或抗凋亡基因 E1B 21K;
 - (2)插入肿瘤特异启动子, 驱动 E1A 基因的表达;
 - (3)根据肿瘤细胞表面特异受体, 改造腺病毒的嗜细胞性;
 - (4)结合 MicroRNA 技术, 赋予病毒选择性地 在肿瘤细胞中进行复制。
5. 一种 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5ETel-GFP 的构建方法, 其特征是: 所述方法包括以下步骤:
 - (1)先用两个不同的抗生素抗性表达盒构建载体 pSS-ChI 和 pSS-kna, 在抗氯霉素基因表达盒序列两侧引入 SmaI 酶切位点, 在抗卡那霉素基因表达盒序列两侧引入 sbfI 酶切位点;
 - (2)从 pUC18 克隆得到 pBR32 复制的起始序列, 通过人工合成的包含多克隆位点的核苷酸序列与抗氯霉素基因表达盒序列相连接产生 pSS-ChI, 同源重组抗氯霉素基因表达盒序列上游左臂序列和下游右臂序列, 将抗氯霉素上游左臂序列和下游右臂序列分别平端或粘端插入到 pSS-ChI 两侧的多克隆位点内, 构建重组用的穿梭载体;
 - (3)从 pUC18 克隆得到 pBR32 复制的起始序列, 通过人工合成的包含多克隆位点的核苷酸序列与抗卡那霉素基因表达盒序列相连接产生 pSS-kna, 同源重组抗卡那霉素基因上游左臂序列和下游右臂序列, 将抗卡那霉素基因上游左臂序列和下游右臂序列分别平端或粘端插入到

pSS-kna 两侧的多克隆位点内, 构建重组用的穿梭载体;

(4) pSSENTel 的构建, 左臂序列是 Ad11 基因组的前 392bp 序列, 右臂为 Ad5 E1A 增强子的 195-378bp 段基因、人 TERT 启动子的-714-0bp 段基因 和 Ad11 E1A 的 568-1125bp 序列按顺序连接在一起形成的片段, 同时在人 TERT 启动子的两侧分别引入两个限制性酶切位点 XbaI 和 NcoI, 左臂和右臂分别平端插入到 pSS-ChI 的相应两侧 SnaBI 和 EcoRV, 最终生成 pSSENTel;

(5) pSSGFP 的构建, 左臂为 Ad11 基因组从 27301 到 27837bp 的 DNA 片段与 EGFP 基因通过 NcoI 的连接产物, 并在 EGFP 的 3' 处引入 SnaBI 位点; 右臂是 Ad11 基因组从 28337 到 28920bp 的 DNA 片段, 左臂和右臂分别平端插入到 pSS-kna 两侧的 SnaBI 和 EcoRV 位点, 最终生成 pSSGFP;

(6) pSSENTel 和 pSSGFP 分别被 PmeI 酶切并纯化, 两个 PmeI 消化片段同时与 pAd11 在 BJ5183 细胞内进行同源重组, 然后在含氨苄青霉素、卡那霉素及氯霉素三种抗生素的琼脂板上进行筛选; 阳性克隆分别经 SwaI 和 SbfI 酶切, 移除抗氯霉素基因表达盒序列和卡那霉素基因表达盒序列, 生成 pAd11-5ETel-GFP; pAd11-5ETel-GFP 经 NotI 酶切线性化后, 转染到 293 细胞中产生腺病毒 Ad11-5ETel-GFP。

6. 根据权利要求 5 所述的构建方法, 其特征是: 所述氨苄青霉素、卡那霉素及氯霉素浓度依次为 100mg/ml、50ug/ml、25mg/ml。

7. 根据权利要求 5 所述的构建方法, 其特征是: 所述 pSSENTel 中的 Tel 序列能够被其他肿瘤特异基因的启动子所取代, 生成一个肿瘤特异的溶肿瘤腺病毒; 所述 pSSGFP 中的 GFP 序列能够被另外信号基因或治疗基因取代。

8. 根据权利要求 5 所述的构建方法, 其特征是: 所述 pSSGFP 中的 Ad11 18.5 基因的启动子能够被更强的肿瘤特异启动子所取代。

9. 权利要求 1 的 B 型人腺病毒载体 Ad11-5EP 在用于治疗肿瘤中的应用。

10. 权利要求 5 的 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5ETel-GFP 在用于治疗肿瘤或检测血循环中肿瘤细胞的应用。

说明书附图

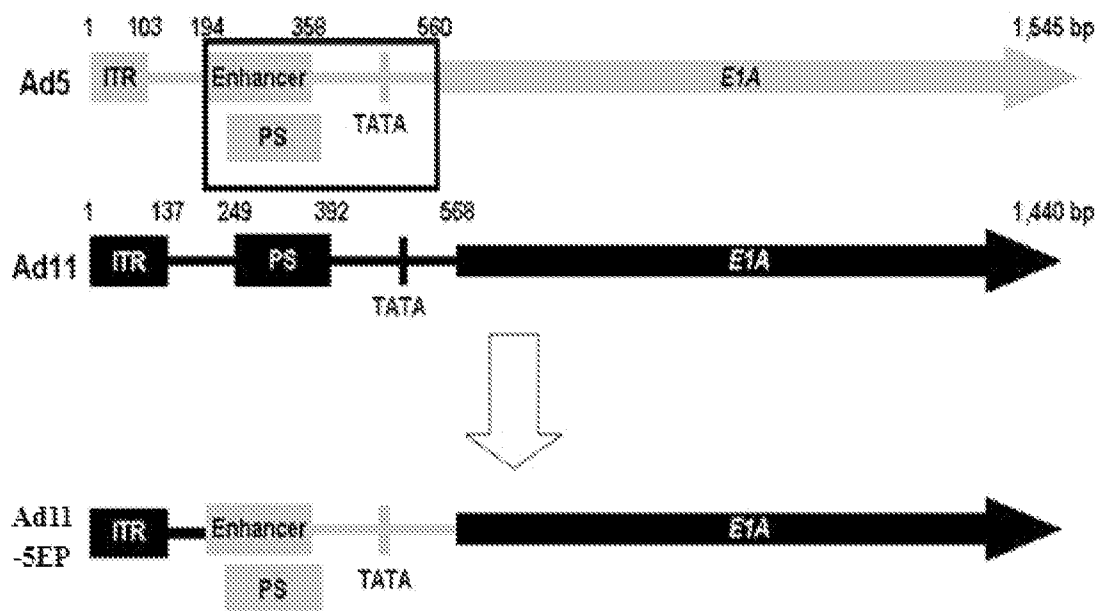


图 1

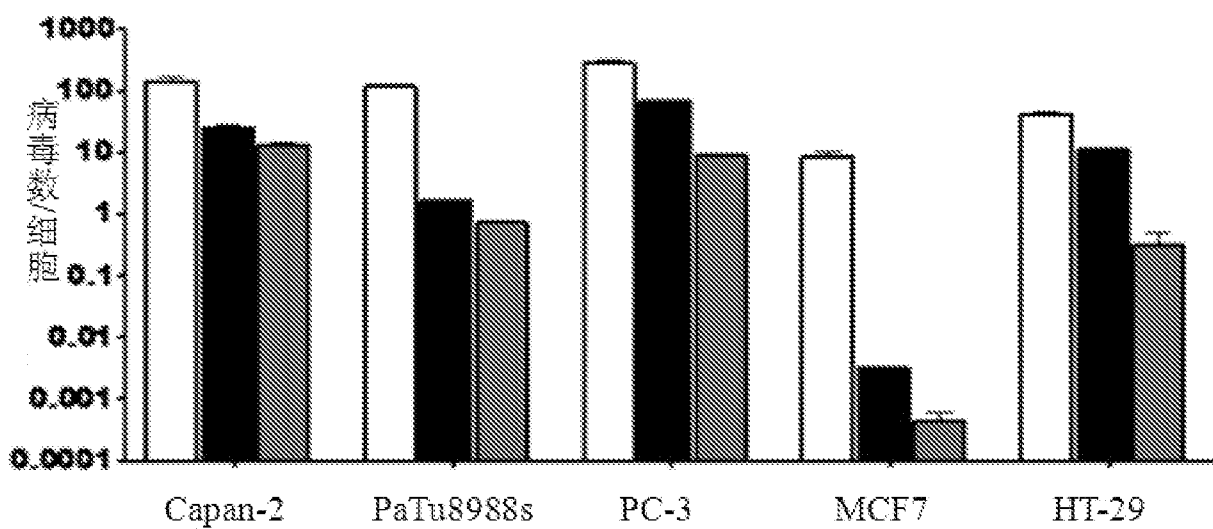


图 2

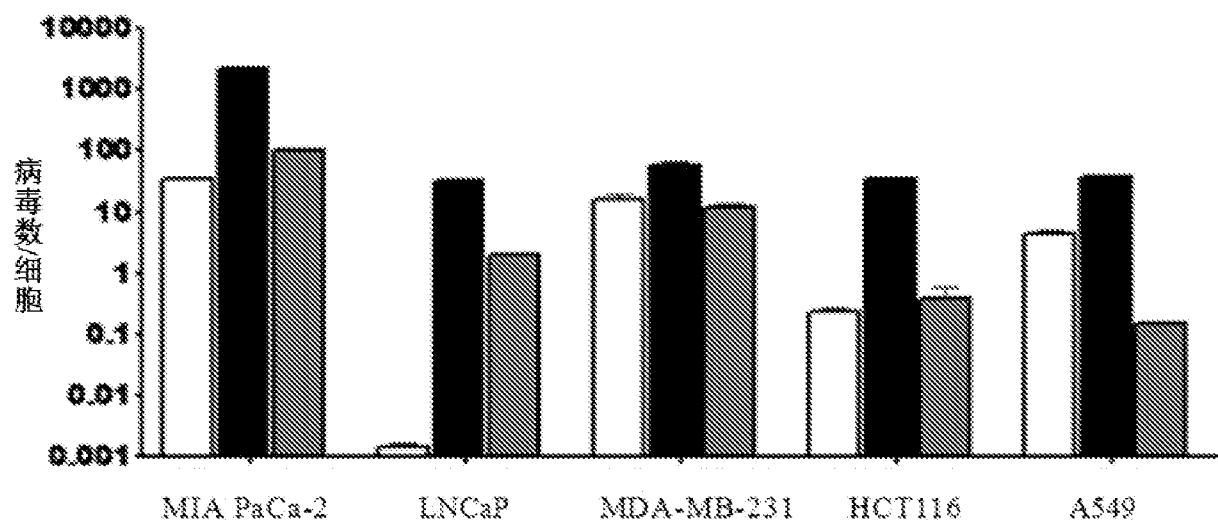


图 3

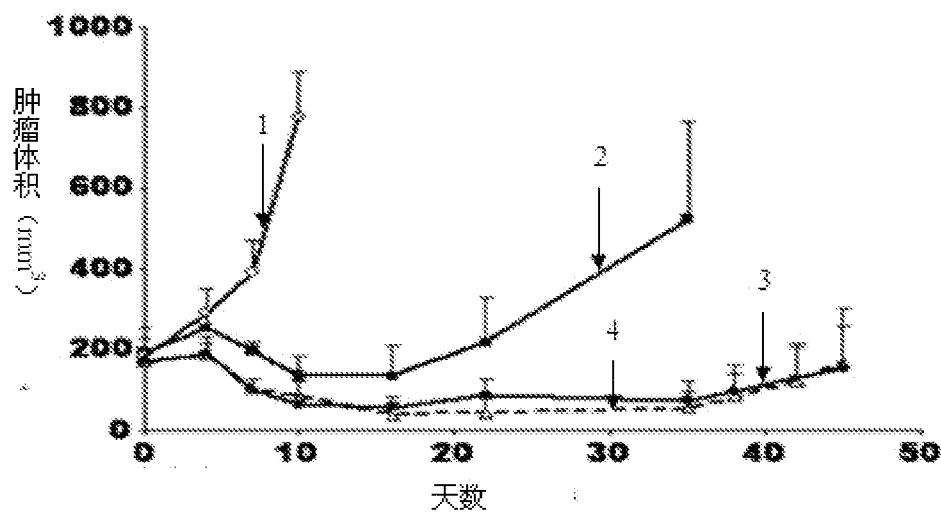


图 4

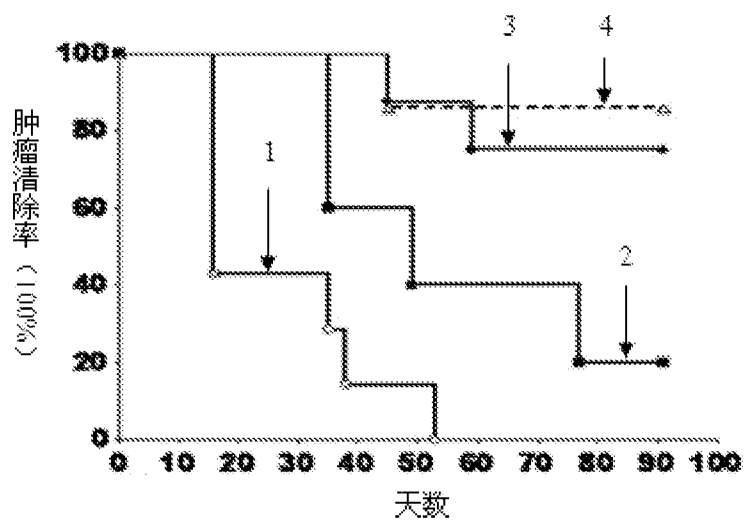


图 5

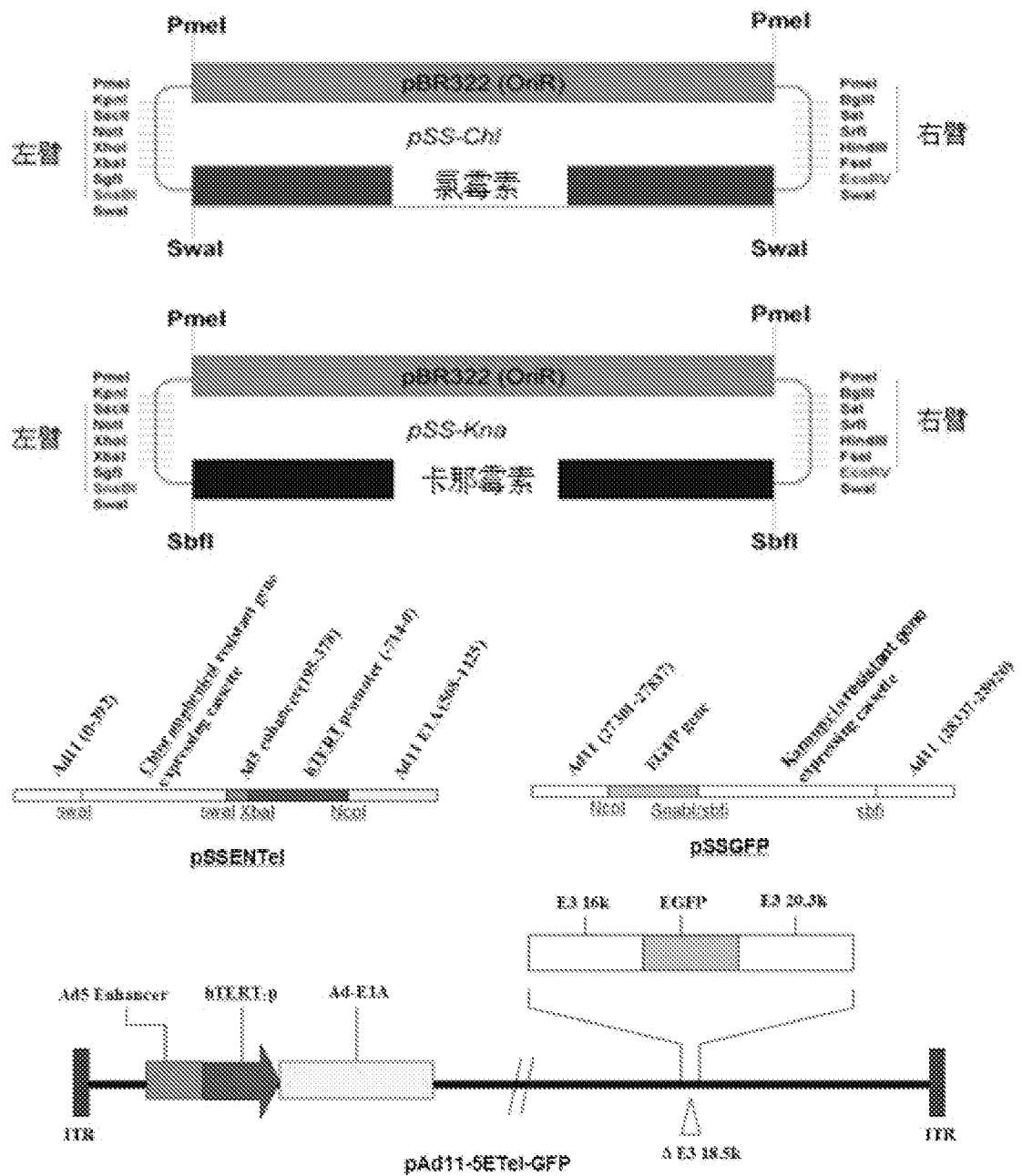


图 6

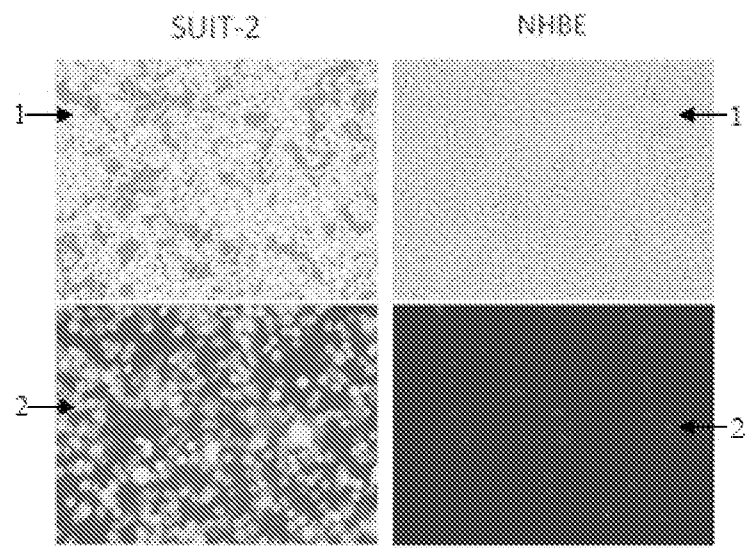


图 7

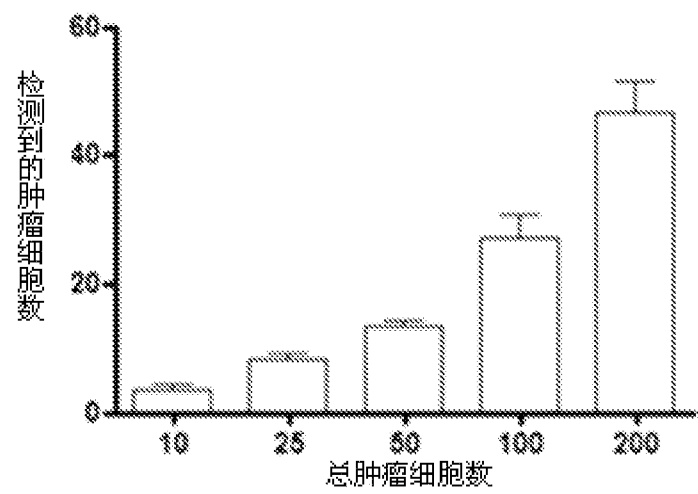


图 8

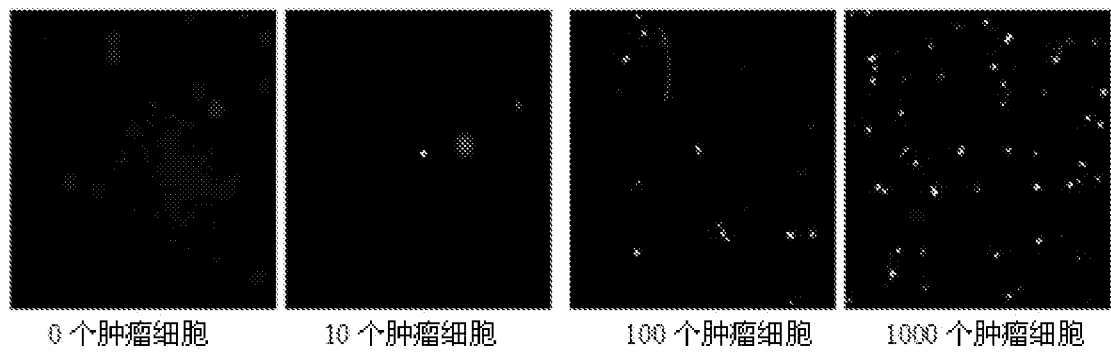


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/071757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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: C12N, A61K, C12R, A61P

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

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

DATABASE: CNABS, CNTXT, CJFD, CSCD, SIPONPL, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, PUBMED, NCBI, EMBL, GOOGLE SCHOLAR

SERCH TERMS: ADENOVIRUS, VECTOR?, PLASMID?, SEROTYPE 5, AD5, SEROTYPE 11, AD11, PROMOTER?, ENHANCER?, RECOMBINANT, CHIMERIC, ONCOLYTIC, CYTOTOXICITY

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	WONG HH <i>et al.</i> , Modification of the early gene enhancer-promoter improves the oncolytic potency of adenovirus 11, Mol Ther. 15 November 2011 (15.11.2011), Vol. 20, No. 2, page 306-316, ISSN: 1525-0016, see the whole document	1-10
A	Xinyu Zheng <i>et al.</i> , Adenoviral E1a Expression Levels Affect Virus-Selective Replication in Human Cancer Cells, Cancer Biology & Therapy. 30 November 2005 (30.11.2005), Vol. 4, No. 11, page 1255-1262, ISSN: 1538-4047, see the whole document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 27 May 2012 (27.05.2012)	Date of mailing of the international search report 07 June 2012 (07.06.2012)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer LIAO, Yajing Telephone No. (86-10)62411074

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/071757

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Elena V. Shashkova <i>et al.</i> , Characterization of human adenovirus serotypes 5, 6, 11, and 35 as anticancer agents, Virology, 25 November 2009 (25.11.2009), Vol. 394, No. 2, page 311-320, ISSN: 0042-6822, see the whole document	1-10
A	Ya-Fang Mei <i>et al.</i> , Comparative analysis of the genome organization of human adenovirus 11, a member of the human adenovirus species B, and the commonly used human adenovirus 5 vector, a member of species C. Journal of General Virology, 01 August 2003 (01.08.2003), Vol. 84, No. 8, page 2061-2071, ISSN: 0022-1317, see the whole document	1-10
A	EP1818408A1 (Crucell Holland B.V.) 15 August 2007 (15.08.2007), see the whole document	1-10
PX	CN1022607A (BEIJING BIO-TARGETING THERAPEUTICS TECHNOLOGY INC.) 30 November 2011 (30.11.2011), see the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/071757

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:9-10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: claims 9-10 relate to a method for treating or diagnosing disease in human or animal body. The present report only searched the subject matters of claims 9-10 as the use of B type recombinant human adenoviral vector Ad11-5EP or Ad11-5ETel-GFP in preparing medication for treating tumor or checking the existence of tumor cells in blood.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/ CN2012/071757

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1022607A	30.11.2011	None	
EP1818408A1	15.08.2007	EP1818408B1	16.08.2011
		ES2372823T3	26.01.2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/071757

A.CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/861(2006.01)i

C12N15/66(2006.01)i

A61K48/00(2006.01)i

C12R1/93 (2006.01)n

A61P35/00 (2006.01)n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/071757

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(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(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N, A61K, C12R, A61P

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, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CNABS, CNTXT, CJFD, CSCD, SIPONPL, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, PUBMED, NCBI, EMBL, GOOGLE SCHOLAR

检索词: 腺病毒, 载体, 质粒, 血清型 5, 血清型 11, E1A, 启动子, 增强子, 重组, 嵌合, 溶肿瘤, 细胞毒性, adenovirus, vector?, plasmid?, serotype 5, Ad5, serotype 11, Ad11, promoter?, enhancer?, recombinant, chimeric, oncolytic, cytotoxicity

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
T	Wong HH 等, Modification of the early gene enhancer-promoter improves the oncolytic potency of adenovirus 11. Mol Ther. 15.11 月 2011(15.11.2011), 第 20 卷, 第 2 期, 第 306-316 页, ISSN: 1525-0016. 参见全文	1-10
A	Xinyu Zheng 等, Adenoviral E1a Expression Levels Affect Virus-Selective Replication in Human Cancer Cells. Cancer Biology & Therapy. 30.11 月 2005(30.11.2005), 第 4 卷, 第 11 期, 第 1255-1262 页, ISSN: 1538-4047. 参见全文	1-10

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
27.5 月 2012 (27.05.2012)

国际检索报告邮寄日期
07.6 月 2012 (07.06.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员

廖雅静
电话号码: (86-10) 62411074

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Elena V. Shashkova 等, Characterization of human adenovirus serotypes 5, 6, 11, and 35 as anticancer agents. Virology. 25.11 月 2009 (25.11.2009), 第 394 卷, 第 2 期, 第 311-320 页, ISSN: 0042-6822. 参见全文	1-10
A	Ya-Fang Mei 等, Comparative analysis of the genome organization of human adenovirus 11, a member of the human adenovirus species B, and the commonly used human adenovirus 5 vector, a member of species C. Journal of General Virology. 01.8 月 2003(01.08.2003), 第 84 卷, 第 8 期, 第 2061-2071 页, ISSN: 0022-1317. 参见全文	1-10
A	EP1818408A1 (Crucell Holland B.V.) 15.8 月 2007(15.08.2007), 参见全文	1-10
PX	CN102260712A (BEIJING BIO-TARGETING THERAPEUTICS TECHNOLOGY INC.) 30.11 月 2011(30.11.2011), 参见全文	1-10

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求：9 和 10

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：权利要求 9-10 属于人或动物的疾病的治疗或诊断方法。

本检索报告针对权利要求 9 和 10 中的 B 型重组人腺病毒载体 Ad11-5EP 或 Ad11-5ETel-GFP 在制备治疗肿瘤或检测血液中的肿瘤细胞的药物中的应用进行了检索。

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/071757

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102260712A	30.11.2011	无	
EP1818408A1	15.08.2007	EP1818408B1	10.08.2011
		ES2372823T3	26.01.2012

A. 主题的分类

C12N15/861(2006.01)i

C12N15/66(2006.01)i

A61K48/00(2006.01)i

C12R1/93 (2006.01)n

A61P35/00 (2006.01)n