

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

发明名称：基于中国HSV临床分离株的溶瘤病毒及其构建方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，涉及病毒学、分子生物学及肿瘤学，具体涉及基于中国HSV临床分离株的溶瘤病毒及其构建方法和应用。

背景技术

[0002] 近年来，肿瘤免疫疗法已逐渐成为继手术、化疗、放疗之后的第四大肿瘤治疗手段。溶瘤病毒作为一种新型肿瘤免疫生物疗法，为恶性肿瘤的治疗带来了新希望。溶瘤病毒（oncolytic virus, OV）是一类天然或者经过人工修饰改造，特异在肿瘤细胞内复制杀伤肿瘤而不伤及正常细胞的病毒。溶瘤病毒主要通过直接杀伤肿瘤细胞、诱导机体抗肿瘤系统性免疫以及阻止肿瘤血管生成等多方面实现治疗肿瘤目的，具有杀伤效率高、毒副作用小、适应症广以及成本低等优势。另外，当其与免疫检查点抑制剂、放/化疗等联合应用时，具有协同效应，可进一步提高肿瘤治疗的效果，有着巨大的应用前景，成为未来肿瘤治疗的新方向。

[0003] 利用病毒治疗肿瘤的概念已有100多年的历史。随着基因工程技术的不断发展，溶瘤病毒已经发展到第三代，如今有160多种不同的溶瘤病毒正在进行临床前及临床试验。全球基于十余类病毒载体在研发溶瘤病毒药物，根据基因组构成，OV载体可分为两大类：一类是DNA病毒载体，其包括腺病毒、单纯疱疹病毒、痘病毒和细小病毒等；一类是RNA病毒载体，其包括呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、新城疫病毒、M1病毒和水疱型口炎病毒等。腺病毒和疱疹病毒是目前应用最多的两类溶瘤病毒载体。

[0004] 2015年基于单纯疱疹病毒1型（Herpes simplex virus, HSV1）载体的溶瘤病毒药物Imlygic（又名T-VEC）被美国FDA批准，作为黑色素瘤患者不可切除病灶的局部治疗方案。这是经过FDA批准的首个、也是唯一一个溶瘤病毒疗法，2016年在欧洲和加拿大也获批上市。2021年6月，日本第一三共株式会社的溶瘤HSV

病毒产品G47 被日本厚生劳动省（MHLW）批准，用于治疗恶性胶质细胞瘤。两种oHSV溶瘤病毒的相继上市标志着溶瘤病毒技术的成熟，全球各大制药巨头纷纷通过收购或合作方式布局溶瘤病毒药物研发。

[0005] HSV-1在人群中广泛流行，主要引起口面部疱疹，高达90%的人在65岁时检测出血清HSV既往感染阳性。然而，HSV-1临床株（即从患唇疱疹个体中取样分离的病毒株）在进化生物学特性（如感染力、毒力、复制效率等）方面存在实质性的自然变异。目前全球基于单纯疱疹病毒开发溶瘤病毒多是选用典型的HSV-1 “实验室”标准株如17+、KOS或F株，这些毒株已通过长期的连续传代弱化，或可能不是癌症治疗的最佳溶瘤病毒骨架。T-VEC最初是在将两个临床分离株与17+毒株进行比较后筛选的，两株临床株病毒对人肿瘤细胞的杀伤效果均优于17+毒株，其中最有望的毒株JS1被筛选并构建转化为T-VEC。

[0006] 目前溶瘤病毒行业尚存在技术瓶颈难题，如溶瘤病毒安全性、临床治疗实体瘤/转移瘤效果不佳、肿瘤靶向性弱、抗体中和作用、载体大规模制备效率低等。随着相关技术的快速发展，病毒载体层面的问题日益凸显，亟待攻关研制高效治疗实体瘤的新型溶瘤病毒，OV病毒载体的深度改造和优化仍是研发核心内容。而且国外HSV-1流行感染株和中国人群流行的HSV-1感染株势必不同、存在实质性的自然变异，所以构建更适合国人和增效的新型HSV溶瘤病毒具有重要意义。

发明概述

技术问题

[0007] 为了解决现有技术中的不足，本发明旨在提供一种基于中国HSV临床分离株的溶瘤病毒及其构建方法和应用。

问题的解决方案

技术解决方案

[0008] 本发明提供一种单纯疱疹病毒HSV1-CH007株，其保藏编号为CCTCC NO: V202173。

[0009] 本发明提供一种病毒载体，其通过敲除单纯疱疹病毒HSV1-CH007株基因组中神经毒力因子 γ 34.5双拷贝基因得到。

- [0010] 进一步地，所述病毒载体在敲除的 γ 34.5 基因座位插入外源基因表达盒；或，
- [0011] 所述病毒载体在其基因组任何插入不影响功能的位点插入外源基因表达盒；
- [0012] 所述外源基因表达盒中的外源基因选自表达任意目的蛋白的基因。
- [0013] 本发明提供所述的病毒载体在病毒学基础研究、大携载容量病毒载体、溶瘤病毒、目的基因递送、神经系统靶向基因治疗药物、动物感染模型建立或抗病毒药物筛选中的应用。
- [0014] 本发明提供一种溶瘤病毒载体，其通过敲除单纯疱疹病毒 HSV1-CH007 株基因组中神经毒力因子 γ 34.5 双拷贝基因得到靶向肿瘤细胞内复制的重组病毒。
- [0015] 进一步地，在敲除的 γ 34.5 基因座位插入肿瘤治疗序列基因表达盒，进一步增强溶瘤效果；或，
- [0016] 所述在溶瘤病毒载体基因组任何插入不影响功能的位点插入肿瘤治疗序列基因表达盒，进一步增强溶瘤效果；
- [0017] 优选地，所述肿瘤治疗序列基因选自免疫检查点蛋白抗体基因、肿瘤免疫治疗细胞因子基因和免疫调控增强基因中的一种或以上；
- [0018] 优选地，所述肿瘤治疗序列基因表达盒包含启动子和肿瘤治疗序列基因；
- [0019] 优选地，在肿瘤治疗序列基因下游引入 WPRE 增强表达元件；
- [0020] 优选地，所述肿瘤治疗序列基因为免疫检查点蛋白 PD1 抗体基因；
- [0021] 优选地，在敲除的 γ 34.5 基因座位还插入荧光蛋白表达盒，便于重组病毒筛选及在体感染标记指示，所述荧光蛋白表达盒的转录方向与所述肿瘤治疗序列基因表达盒保持一致。
- [0022] 本发明提供一种溶瘤病毒，其包含所述的溶瘤病毒载体。
- [0023] 本发明提供一种抗肿瘤药物组合物，包含所述的溶瘤病毒。
- [0024] 本发明提供一种溶瘤病毒载体的构建方法，包括，敲除单纯疱疹病毒 HSV1-CH007 株基因组中神经毒力因子 γ 34.5 双拷贝基因；
- [0025] 优选地，还包括在敲除的 γ 34.5 基因座位或基因组任何插入不影响功能的位点插入肿瘤治疗序列基因表达盒。
- [0026] 本发明提供一种溶瘤病毒的构建方法，包括如下步骤：
- [0027] (1) 靶向载体构建

[0028] 克隆 γ 34.5 基因上下游同源臂，将克隆的上下游同源臂片段连入骨架载体，获得重组载体1；构建包括启动子（如hUbC、CMV启动子等）、绿色荧光蛋白基因和WPPE片段的EGFP表达盒（WPPE为土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件，用于增强外源基因表达水平），连入重组载体1，获得表达绿色荧光蛋白的重组靶向质粒载体；

[0029] 优选地，还包括在重组载体1插入肿瘤治疗序列基因表达盒，具体地：构建包括启动子（如hUbC、CMV启动子等高效启动转录的启动子）、肿瘤治疗序列基因（PD1单链抗体基因）和红色荧光蛋白mCherry基因通过自剪切肽（2A）绑定表达的肿瘤治疗序列基因表达盒，替换表达绿色荧光蛋白的重组靶向质粒载体的EGFP表达框，获得表达肿瘤治疗序列基因的重组靶向质粒载体；

[0030] （2）溶瘤病毒构建

[0031] 将敲除 γ 34.5 基因表达绿色荧光蛋白的重组靶向质粒载体与HSV1-CH007株基因组DNA共转染293T细胞，待细胞病变后收集上清，感染Vero细胞，挑斑绿色荧光的病毒嗜斑，经过5轮以上的挑斑纯化后即得表达绿色荧光蛋白的重组病毒；

[0032] 优选地，插入肿瘤治疗序列基因的溶瘤病毒的构建，方法包括：将表达肿瘤治疗序列基因的重组靶向质粒载体与表达绿色荧光蛋白的重组HSV1-CH007株病毒基因组DNA共转染293T细胞，待细胞病变后收集上清，感染Vero细胞，在绿色荧光背景下挑斑红色荧光的病毒斑，经过5轮以上的挑斑纯化后即得。

[0033] 进一步地，本发明上述溶瘤病毒的构建方法，包括如下步骤：

[0034] （1）靶向载体构建

[0035] 克隆临床株HSV1-CH007 γ 34.5 基因上下游同源臂片段，设计引物克隆 γ 34.5 基因上游同源臂（UHA，长440bp，GC含量78%）（SEQ ID NO.1），下游同源臂（DHA，长500bp，GC含量68%）（SEQ ID NO.2），将克隆的上下游同源臂片段以infusion技术连入基于pcDNA3.1+骨架构建的3.1+ Δ RL1载体（实验室自主构建），克隆上下游同源臂片段选择的酶切位点分别为MluI和AgeI对，SbfI和XbaI对，在克隆的上下游同源臂中间引入一个多克隆位点接头，引入的6种内切酶分别是-AgeI-ClaI-EcoRI-EcoRV-KpnI-PacI-SbfI-，便于后续克隆外源基因或表达控制元件等插入靶向载体，获得的质粒载体命名为pHSV-CH007 Δ γ 34.5。

[0036] 以实验室自主构建的含hUbC-3EGFP表达框序列的质粒为模板，克隆三个绿色荧光基因串联的真核表达框片段hUbC-3EGFP (SEQ ID NO. 3)，以及WPRES-bGH PA片段 (SEQ ID NO. 4)，hUbC是选用的启动活性强的泛素启动子，hUbC-3EGFP片段 (长度3538bp) 经C1aI、KpnI酶切连入pHSVCH007 Δ γ 34.5载体获得pHSV-CH007 Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP载体；WPRES-bGH PA片段 (长度846bp) 经KpnI、PacI酶切连入pHSV-CH007 Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP载体，从而构建获得表达绿色荧光蛋白的重组靶向质粒pHSV-CH007 Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRES-bGH PA载体 (SEQ ID NO. 5)。

[0037] 优选地，还包括插入肿瘤治疗序列基因表达盒，具体地：

[0038] 合成肿瘤治疗序列基因序列，例如可以为表达PD1抗体 (α PD1Ab) 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等。选择FUGW质粒 (Addgene编号14883) 作为重组靶向载体的构建骨架，此轮重组以hUbC启动子片段和WPRES片段作为同源臂，可替换掉上述靶向质粒载体中的3EGFP序列；合成PD1抗体的基因序列 (α PD1) (SEQ ID NO. 6)，通过自剪切肽P2A和红色荧光蛋白 (mCherry) 基因 (SEQ ID NO. 7) 串联获得表达框mCherry-P2A- α PD1Ab (SEQ ID NO. 8)；该表达框片段 (长度1599bp) 通过Infusion方法克隆入经BamHI、EcoRI双酶切的FUGW质粒，替换掉原来的EGFP荧光基因，获得重组质粒pFUW-hUbC-mCherry-P2A- α PD1Ab (SEQ ID NO. 9)。

[0039] (2) 溶瘤病毒构建

[0040] 将pHSV-CH007 Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRES-bGH PA与HSV1-CH007株基因组DNA共转染293T细胞，待大部分细胞表现出细胞病变后，收集细胞和上清，用离心后的细胞裂解液或上清感染Vero细胞，在细胞上覆盖含有2%胎牛血清、抗生素和1%琼脂糖的DMEM维持培养基，1天后观察感染细胞有无荧光表达确定新型病毒是否重组成功；2-3天后，挑斑分离良好的表达绿色荧光的病毒嗜斑，连续10倍稀释后感染新的Vero细胞进行下一轮挑斑纯化，经过6轮嗜斑挑斑、单克隆纯化，完全去除无荧光表达的野生型临床株HSV1-CH007病毒，获得纯化的溶瘤病毒HSV CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRES；

[0041] 优选地，插入肿瘤治疗序列基因的溶瘤病毒的构建，方法包括：

[0042] 将重组质粒pFUW-hUbC-mCherry-P2A- α PD1Ab与所述溶瘤病毒HSV

CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRE基因组DNA共转染293T细胞，待大部分细胞出现细胞病变后，收集细胞和病毒上清，感染Vero细胞，去除上清液，并上铺含有2%胎牛血清、抗生素和1%琼脂糖的培养基，2-3天后挑斑分离良好的表达红色荧光的嗜斑，即绿色背景视野中挑取红色荧光斑，连续10倍稀释后感染新的Vero细胞进行下一轮纯化，经过5轮挑斑、单克隆纯化，完全去除表达绿色荧光蛋白的HSV1 CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP母本病毒，获得单克隆化的携带肿瘤治疗序列基因序列的溶瘤病毒HSV CH007- Δ γ 34.5-hUbC-mCherry-P2A-肿瘤治疗序列基因序列-WPRE。

发明的有益效果

有益效果

[0043] (1) 本发明提供的单纯疱疹病毒中国临床分离株HSV1-CH007分离自国内流行的HSV1临床株，而非国外引进的传代很多次的常见实验室标准株，以中国临床分离株HSV1-CH007作为溶瘤病毒骨架，经改造和优化所构建的HSV溶瘤病毒更适宜中国人肿瘤患者治疗。

[0044] (2) 本发明以HSV1-CH007作为OV亲本株，经减毒、肿瘤靶向复制、武装化治疗基因等系列遗传改造，构建获得基于HSV1-CH007的溶瘤病毒，构建得到的溶瘤病毒复制效率高，能够高效溶杀实体瘤和转移瘤。在HSV1-CH007溶瘤病毒基因组中插入表达PD1抗体 (α PD1Ab) 的基因，溶瘤病毒感染裂解肿瘤细胞的同时，病毒会直接表达免疫检查点蛋白抑制剂，达到溶瘤+免疫激活的协同杀瘤效应。体外和体内实验表明研制的oHSV-CH007溶瘤病毒具有良好的肿瘤细胞感染效率和溶瘤效果。

[0045] (3) 本发明敲除HSV1-CH007病毒株最主要的神经毒力基因 γ 34.5后，可作为一种低毒、大容量的基于HSV临床株的外源基因长效高表达的基因递送病毒载体，可实现外源基因的高效转导及高丰度表达。

[0046] (4) 本发明基于HSV1-CH007临床株改造的病毒载体适于做溶瘤病毒、外源基因长效高表达的基因递送载体等。另外低毒HSV1-CH007载体在神经系统靶向基因治疗、病毒复制与致病机理分析、动物感染模型建立、抗病毒药物筛选等方

面具有广泛的应用价值。

对附图的简要说明

附图说明

- [0047] 图1为HSV1-CH007- $\Delta \gamma$ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRE基因组结构示意图；
- [0048] 图2为HSV1-CH007- $\Delta \gamma$ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRE病毒重组、挑斑纯化的细胞图；
- [0049] 图3为构建的条件复制型HSV1-CH007重组病毒基因组分子鉴定；
- [0050] 图4为条件复制型HSV1-CH007- $\Delta \gamma$ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRE溶瘤病毒骨架载体裂解肿瘤细胞效果分析；
- [0051] 图5为构建的溶瘤病毒oHSVCH007- $\Delta \gamma$ 34.5-hUbC-mCherry-P2A- α PD1Ab-WPRE（简写为oHSVCH007- $\Delta \gamma$ 34.5- α PD1Ab-mCherry）的基因组结构示意图；
- [0052] 图6为oHSVCH007- $\Delta \gamma$ 34.5- α PD1Ab-mCherry溶瘤病毒重组挑斑及纯化的细胞图；
- [0053] 图7为oHSVCH007- $\Delta \gamma$ 34.5- α PD1Ab-mCherry溶瘤病毒的在体毒性测试；
- [0054] 图8为U87MG-GFP恶性胶质瘤细胞株构建、纯化及外源荧光蛋白表达情况；
- [0055] 图9为构建U87MG-GFP恶性胶质瘤颅内荷瘤小鼠模型；
- [0056] 图10为oHSVCH007- $\Delta \gamma$ 34.5- α PD1Ab-mCherry溶瘤病毒能有效感染和溶杀恶性胶质瘤组织。
- [0057] 保藏说明
- [0058] 筛选出来的单纯疱疹病毒中国临床分离株HSV1-CH007，经单克隆纯化后的低传代株野生型病毒按要求和规定数量于2021年10月29日保藏于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, 简称CCTCC)，地址为中国. 武汉. 武汉大学。HSV1-CH007分类命名为单纯疱疹病毒中国临床分离株HSV1-CH007，保藏编号为CCTCC NO: V202173。

发明实施例

本发明的实施方式

- [0059] 为了更清楚地理解本发明，现参照下列实施例及附图进一步描述本发明。实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。实施例中，各原始试剂材料均可商购获得，未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件，

或按照仪器制造商所建议的条件。

[0060] 实施例1：单纯疱疹病毒临床株HSV1-CH007的分离、筛选

[0061] 1、HSV临床株的分离与鉴定

[0062] 我们通过与武汉大学人民医院、中国人民解放军中部战区总医院等临床医院皮肤科医生合作，从门诊口面部疱疹患者采样疱疹水疱液，经过培养、纯化、鉴定分离到18株HSV1型临床病毒株。通过克隆病毒gD、gB基因并测序，和从国外引进的F株、H129临床株比对基因序列均存在一定的碱基突变，而且分离的临床株间基因也存在差异，体现在进化生物学特性（如感染力、毒力、复制效率等）会存在差异，表明从中国健康人群分离的HSV临床株中比较和筛选溶瘤病毒亲本株很有必要。

[0063] 2、HSV临床株的比较和筛选

[0064] 我们从临床株筛选溶瘤病毒骨架载体的原则如下：①健康人群口面部疱疹来源；②基因型测序鉴定为HSV1型；③感染肿瘤细胞裂解活性高；④对阿昔洛韦敏感、无耐药性。通过系统比较临床毒株的复制效率、细胞毒性、裂解肿瘤细胞活性等，筛选出临床株CH007作为备选亲本株。单纯疱疹病毒临床株HSV1-CH007的保藏编号为CCTCC NO: V202173。

[0065] 分离的HSV1临床株野生型病毒毒性还较大，经扩增纯化后颅内注射小鼠在3-5天内全部死亡。为研制溶瘤病毒药物，首先需要对HSV1临床株进行减毒和靶向复制改造等建立安全性的病毒载体。为开发更高效溶杀实体瘤的新型溶瘤病毒，设计集成采用中国临床病毒株、删除致病基因、免疫增强因子武装、携带免疫检查点蛋白抗体等多种增效策略，来研制高效溶杀实体瘤和转移瘤的增效oHSV。

[0066] 实施例2：肿瘤靶向、条件复制型HSV1-CH007重组改造的靶向载体构建

[0067] （1）双拷贝神经毒力基因 γ 34.5敲除的靶向载体构建

[0068] 敲除双拷贝 γ 34.5基因：克隆测序临床株HSV1-CH007 γ 34.5基因及其上下游序列，设计引物克隆 γ 34.5基因上游同源臂（UHA，长440bp，GC含量78%）（SEQ ID NO.1），下游同源臂（DHA，长500bp，GC含量68%）（SEQ ID NO.2）；克隆的上下游同源臂片段以及荧光蛋白表达盒片段利用infusion技术连入基于pcD

NA3.1+骨架构建的3.1+ΔRL1载体；克隆上下游同源臂片段时选择的酶切位点分别为MluI和AgeI对，SbfI和XbaI对，获得的质粒载体命名为pHSV-CH007 Δ γ 34.5。该载体在克隆的上下游同源臂中间引入一个多克隆位点接头，引入的6种内切酶分别是-AgeI-ClaI-EcoRI-EcoRV-KpnI-PacI-SbfI-，便于后续克隆外源基因或表达控制元件等插入靶向载体。

[0069] 具体步骤如下：

[0070] 首先，分别使用以下引物扩增 γ 34.5 UHA和DHA片段：

[0071] UHA-F: gtacgggccagatatacgcgtCGGGGCCGCGGAGCGGGgggaggagc,

[0072] UHA-R: TtaacccatcgatggaccggtGGAGACAGAGAGCGTGCCGgggtggttag;

[0073] DHA-F: aatccttaattaaggcctgcaggCGTTACACCCGAGGCGGCctgggtcttc,

[0074] DHA-R: ggttttaaacgggccctctagaCGGGCCAATGCGCGAGGGgccgtgtg.

[0075] 多片段重组使用的是来自南京诺唯赞公司的多片段infusion试剂盒。将获得的载体命名为pHSV-CH007 Δ γ 34.5。

[0076] (2) 携载绿色荧光蛋白基因表达盒的重组靶向载体构建

[0077] 以实验室自主构建的含hUbC-3EGFP表达框序列的质粒为模板，克隆三个绿色荧光基因串联的真核表达框片段(hUbC-3EGFP)(SEQ ID NO.3)，以及WPRES-bGH ploy(A)片段(SEQ ID

NO.4)，hUbC是选用的启动活性强的泛素启动子。hUbC-3EGFP片段(长度3538bp)经ClaI、KpnI酶切连入pHSV-CH007 Δ γ 34.5载体获得pHSV-CH007 Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP载体；WPRES-bGH

PA片段(长度846bp)经KpnI、PacI酶切连入pHSV-CH007 Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP载体，从而构建获得表达绿色荧光蛋白的重组靶向质粒pHSV-CH007 Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRES-bGH PA载体(SEQ ID NO.5)。

[0078] 实施例3：肿瘤靶向、条件复制型HSV1-CH007溶瘤病毒重组、挑斑纯化

[0079] 双拷贝神经毒力基因 γ 34.5完全敲除、携带表达EGFP的HSV1-CH007重组病毒构建：

[0080] 为了获得病毒基因组中最主要神经毒力基因 γ 34.5双拷贝完全敲除的HSV1-CH007重组株，我们抽提靶向载体pHSV-CH007 Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRES与临床株

病毒HSV1-CH007基因组DNA共转染培养在六孔板中的293T细胞，实验方法按照Lipofectamine 2000 (Invitrogen)说明书进行：待大部分细胞表现出细胞病变后，收集培养基，用PBS收集细胞。经三轮冷冻-震荡-涡旋后，用上清和细胞裂解液分别感染六孔板中的Vero细胞。感染1小时后，去除上清液，在细胞上覆盖含有2%胎牛血清、1%抗生素和1%琼脂糖的DMEM维持培养基。1天后观察感染细胞有无荧光表达确定新型病毒是否重组成功，2-3天后，挑斑分离良好的表达绿色荧光的病毒嗜斑，连续10倍稀释后感染新的Vero细胞进行下一轮挑斑纯化。经过6轮嗜斑挑斑、单克隆纯化，完全去除无荧光表达的野生型临床株HSV1-CH007病毒，获得纯化的重组病毒HSV1 CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRE，病毒基因组示意图如图1，病毒重组挑斑及完全纯化的细胞图如图2所示，上排为重组病毒斑（绿色荧光）的荧光图和明场图；下排为重组病毒完全挑纯后的感染细胞荧光图及明场图。

[0081] 实施例4：HSV1-CH007重组病毒的扩增制备

[0082] 纯化后的HSV1-CH007重组溶瘤病毒通过感染生长在10 cm平皿上的Vero细胞进行批量生产及纯化。将HSV1

CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRE重组OV载体按照MOI=0.01感染Vero细胞，待细胞出现明显的变圆病变之后（大约3天），将含病毒的上清液收集到50mL离心管中，通过离心去除细胞碎片（6400 rpm，10分钟），上清液使用0.22 μ m的滤膜过滤，最后使用贝克曼高速离心机进行浓缩（30000 rpm，3小时）；将浓缩后的病毒沉淀使用少量PBS（PH=7.4）重悬，在4℃条件下过夜，并不断摇动；第2天混匀病毒液，接着将重悬的病毒溶液加到20%的蔗糖溶液上层进行超速离心（30000

rpm，3小时）、浓缩纯化；最后将溶解后的病毒进行分装，冻存在-80℃冰箱中。使用Vero细胞进行标准嗜斑实验来测定浓缩后HSV CH007重组病毒的滴度，滴度以每毫升的嗜斑形成单位（PFU/mL）表示。浓缩后的HSV1

CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRE重组OV病毒滴度经测定约为 5×10^9 PFU/mL。

[0083] 实施例5：条件复制型HSV1-CH007重组病毒基因组分子鉴定

[0084] 取浓缩纯化的HSV1

CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRE重组病毒（图3中简写CH007 Δ 3-G）、野生型 wtCH007病毒（阳性对照），以我们前期基于HSV1 H129株构建的 γ 34.5双拷贝基因已完全敲除的H306病毒（参看发表文章J Chem Neuroanat.

2019;100:101662. doi: 10.1016/j.jchemneu.2019.101662）作为阴性对照，在100℃灭活10分钟，后续用于 γ 34.5基因的分子鉴定。以 γ 34.5

ORF片段（726bp）设计引物，引物序列为 γ 34.5-F: 5'

ATGGCCCGCCGCCGCCGCCGCCATCGCGCCCCCGCCGCCCGG 3'（SEQ ID

NO.10）； γ 34.5-R: 5' TTAGACCGAGTTCGCCGGGCCGGCTCCGCGGGCCAGGGCCCGGGC

3'（SEQ ID NO.11）。由于 γ 34.5基因GC含量高达82%，需选用高GC buffer体

系扩增 γ 34.5 ORF基因片段：PCR反应体系为50 μ l，其中灭活病毒样用量为1-5 μ l，2 $\times$ PrimeStar high-GC buffer 25 μ l，20 μ M/ μ l引物各0.7

μ l，dNTPs 5 μ l，Prime star HS高保真酶0.6 μ l，补灭菌水到50 μ l。PCR

扩增条件为：98℃ 5min，（98℃ 30s，60℃ 30s，72℃ 1min）循环32次，72℃延伸10min，16℃

30min。分子鉴定结果如图3所示，阳性对照为野生型HSV1-CH007病毒，经PCR扩增出一条长700

bp左右的 γ 34.5基因目的条带；阴性对照（H306）无条带；而HSV1-CH007重组病毒HSV CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRE（图中简写CH007 Δ 3-G）多次重复实验无论选用1 μ l、3 μ l、5 μ l浓缩病毒进行PCR反应均未扩增出 γ 34.5目的条带，结果说明HSV1 CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3EGFP-WPRE重组溶瘤病毒基因组中的双拷贝 γ 34.5基因已被完全敲除。

[0085] 实施例6：肿瘤靶向、条件复制型HSV1 CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3GFP溶瘤病毒骨架溶瘤效果分析

[0086] HSV1-CH007临床株病毒通过遗传改造敲除最主要的神经毒力基因 γ 34.5，赋予了病毒在机体内只能靶向肿瘤细胞内复制扩增、裂杀肿瘤细胞的特性，而感染正常的机体细胞为复制缺陷型，不能增殖产生子代病毒。为检测构建的HSV1 CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3GFP溶瘤病毒骨架的溶瘤效果，将HSV1 CH007重组病毒

感染常见的肿瘤细胞株进行测试，图4所示为体外培养的恶性胶质母细胞瘤细胞株U87MG以及溶瘤病毒感染裂解细胞的结果：没有感染病毒的U87MG恶性胶质瘤细胞胞体呈现聚团以及长而明显的细胞突起和胞间网络化形态；将制备的HSV1 CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3GFP溶瘤病毒按MOI=0.01感染U87MG细胞，感染后12小时就能观察到肿瘤细胞感染重组病毒后表达绿色荧光蛋白，24小时观测大部分肿瘤细胞均被感染、胞体呈绿色荧光；第2天后肿瘤细胞出现明显的细胞病变，细胞突起萎缩变圆；到第3天U87MG细胞全部圆缩，大部分细胞已凋亡（图4），结果表明基于临床分离的HSV1-CH007临床株改造构建的重组溶瘤病毒HSV1 CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3GFP能高效的感染并裂杀恶性肿瘤细胞。

[0087] 实施例7：武装化PD1抗体基因的HSV1-CH007溶瘤病毒构建

[0088] 目前应用溶瘤病毒开展的临床治疗或临床试验中均发现OV联合免疫检查点抑制剂给药具有协同效应，溶瘤病毒能实现更好的溶瘤效果。我们设计通过遗传改造使HSV溶瘤病毒基因组本身直接携带抗PD-1蛋白的抗体基因，这样oHSV溶瘤病毒感染裂解肿瘤细胞的同时可在肿瘤细胞内组成性表达PD-1蛋白抗体，从而达到联合用药的增效目的，且能降低成本、简化临床联合给药途径，溶瘤病毒复制增殖和免疫检查点抑制剂表达均在感染的肿瘤细胞内完成，能更好的靶向协同实现高效溶杀肿瘤目的。选择FUGW质粒（Addgene编号14883）作为重组靶向载体的构建骨架；合成PD1抗体的基因序列（ α PD1）（SEQ ID NO.6），通过自剪切肽P2A和红色荧光蛋白（mCherry）（SEQ ID NO.7）基因串联获得表达框mCherry-P2A- α PD1Ab（SEQ ID NO.8）；该表达框片段（长度1599bp）通过Infusion方法克隆入经BamHI、EcoRI双酶切的FUGW质粒，替换掉原来的EGFP荧光基因，获得重组质粒pFUW-hUbC-mCherry-P2A- α PD1Ab（SEQ ID NO.9）。oHSV1-CH007基因组携带PD1抗体基因的溶瘤病毒构建步骤如下：将抽提的靶向载体pFUW-hUbC-mCherry-P2A- α PD1Ab与上述构建的重组病毒HSV1 CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3GFP基因组DNA共转染293T细胞，质粒转染表达红色荧光蛋白，而病毒感染的细胞同时表达绿色荧光蛋白，如果重组成功mCherry-P2A- α PD1Ab基因序列会同源重组替换掉3EGFP基因，新重组病毒将只表达红色荧光蛋白；待大部分细胞出现细胞病变后，收集细胞和病毒上清。经三轮冷

冻-震荡-涡旋后，感染六孔板的Vero细胞，1小时后去除上清液，并上铺含有2%胎牛血清、抗生素和1%琼脂糖的培养基。2-3天后挑斑分离良好的表达红色荧光的嗜斑，即绿色背景视野中挑取红色荧光斑，连续10倍稀释后感染新的Vero细胞进行下一轮纯化。经过5轮挑斑、单克隆纯化，完全去除表达绿色荧光蛋白的HSV1 CH007- Δ γ 34.5-hUbC-3GFP母本病毒，获得单克隆化的携带PD1抗体基因的溶瘤病毒oHSV1

CH007- Δ γ 34.5-hUbC-mCherry-P2A- α PD1Ab-WPRE（缩写为oHSVCH007- Δ γ 34.5- α PD1Ab-mChe），病毒基因组示意图如图5，病毒重组挑斑及纯化的细胞图如图6所示。

[0089] 实施例8：武装化PD1抗体基因的oHSVCH007- Δ γ 34.5- α PD1Ab-mChe溶瘤病毒的在体毒性测试

[0090] 将构建的溶瘤病毒oHSVCH007- Δ γ 34.5- α PD1Ab-mChe大量扩增、纯化浓缩，经嗜斑实验测定制备的溶瘤病毒滴度为 8×10^9 PFU/ml。经颅内注射 2×10^6 PFU病毒感染小鼠VTA脑区，观察小鼠一直状态良好；14天后灌流小鼠、取脑组织切片观察，可见在注射脑区VTA和病毒经末梢吸收感染的脑区LH、LHb等都有很好的红色荧光标记，只在注射部位观察到有一定炎症反应，其它脑区标记到的神经元都状态良好（图7）。相对的HSV1-CH007野生型病毒感染小鼠症状明显、一周内小鼠全部死亡。实验表明通过自主技术构建的oHSVCH007- Δ γ 34.5- α PD1Ab-mChe溶瘤病毒具有低毒性、所载的外源抗体蛋白等得到高效表达，感染机体正常组织如神经元细胞溶瘤病毒为复制缺陷型，不会增殖传播致死动物。

[0091] 实施例9：构建表达绿色荧光蛋白的人源恶性胶质母细胞瘤细胞株U87MG-GFP

[0092] 为构建新型肿瘤荷瘤动物模型测试oHSVCH007溶瘤病毒效果，我们建立了人源肿瘤细胞株工程化改造技术。利用慢病毒会整合到宿主细胞基因组的特性来构建组成性表达目的蛋白的新型U87MG稳转细胞株；为便于新细胞系的流式细胞筛选纯化，首先构建并制备表达绿色荧光蛋白的慢病毒LentiV-hUbC-EGFP-WPRE；人源胶质母细胞瘤细胞株U87MG感染慢病毒后能稳定表达绿色荧光蛋白，经流式分选纯化后获得新型恶性胶质瘤细胞株U87MG-GFP；如图8所示，制备的工程化细胞株U87MG-GFP纯度很高，几乎所有细胞都稳定表达绿色荧光蛋白，而且细胞

状态良好，和野生型U87MG一致，保种到基于U87MG工程化改造的胶质瘤细胞库。

[0093] 实施例10：利用遗传改造的U87MG-GFP建立恶性胶质母细胞瘤动物模型

[0094] 培养工程化改造的U87MG-GFP细胞株，制备对数生长期的肿瘤细胞悬液；通过脑立体定位方式移植接种于BALB/c裸鼠右侧大脑CPU脑区，接种剂量5微升，肿瘤细胞数量为 1×10^6 个；连续观察裸鼠移植胶质瘤后症状，利用小动物磁共振成像仪监测胶质瘤的成瘤状态。磁共振成像（MRI）扫描过程中，使用MSME（multi spin multi echo）T1-weight 序列获得功能像。胶质瘤细胞株接种后第4周核磁扫描结果如图9所示，未注射肿瘤细胞的健康裸鼠无肿瘤核磁信号（图9A），注射U87MG-GFP的裸鼠在CPU区域形成明显的肿瘤病灶（图9B），说明胶质母细胞瘤荷瘤动物建模成功。

[0095] 为进一步评估胶质瘤建模情况，第四周核磁扫描后小鼠进行心脏灌流和脑组织取材，冰冻切片得到脑组织切片；经DAPI染色处理后，利用OLYMPUS VS120 全玻片扫描系统进行成像。如图9C所示，注射U87MG-GFP的裸鼠在CPU区域形成大而明显的实体肿瘤，因改造的胶质瘤细胞U87MG-GFP组成性表达绿色荧光蛋白，肿瘤组织呈现明亮的绿色荧光（图9C）。以上结果表明工程化改造的胶质瘤细胞株状态良好，在体移植造模脑肿瘤成功，为oHSV溶瘤病毒效果评价打下了坚实基础。

[0096] 实施例11：oHSVCH007- $\Delta \gamma$ 34.5- α PD1Ab-mChe溶瘤病毒能高效溶杀恶性胶质母细胞瘤

[0097] 我们将纯化制备的oHSVCH007- $\Delta \gamma$ 34.5- α PD1Ab-mChe溶瘤病毒在建立的恶性胶质瘤荷瘤动物模型上进行了测试。将上述工程化构建的人脑星形胶质母细胞瘤（WHO IV级）细胞株U87MG-GFP定位接种于BALB/c裸鼠皮层下CPU脑区，4周后经核磁共振检测小鼠大脑已成瘤、呈侵袭性生长（图9C）。制备的oHSVCH007- $\Delta \gamma$ 34.5- α PD1Ab-mChe溶瘤病毒通过瘤内给药方式注射到恶性胶质瘤瘤体内，14天后灌流裸鼠，取脑组织切片观察，发现oHSVCH007- $\Delta \gamma$ 34.5- α PD1Ab-mChe溶瘤病毒在胶质母细胞瘤体内能有效复制增殖，在病毒感染的肿瘤组织区域出现明显的组织空洞和凋亡炎症反应（图10），结果说明基于中国临床分离株HSV

1-CH007构建的新型溶瘤病毒oHSVCH007- Δ γ 34.5- α PD1Ab-mCh_e溶瘤病毒能高效溶杀恶性胶质母细胞瘤细胞，和注射PBS缓冲液的对照组荷瘤小鼠相比肿瘤组织体积明显缩小，验证了基于中国HSV临床分离株构建的增效溶瘤病毒具有良好的安全性和溶瘤活性。

[0098] 显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种单纯疱疹病毒HSV1-CH007株，其保藏编号为CCTCC NO: V202173。
- [权利要求 2] 一种病毒载体，其特征在于，通过敲除单纯疱疹病毒HSV1-CH007株基因组中神经毒力因子 γ 34.5双拷贝基因得到。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的病毒载体，其特征在于，所述病毒载体在敲除的 γ 34.5基因座位插入外源基因表达盒；或，
所述病毒载体在其基因组任何插入不影响功能的位点插入外源基因表达盒；
所述外源基因表达盒中的外源基因选自表达任意目的蛋白的基因。
- [权利要求 4] 权利要求2所述的病毒载体在病毒学基础研究、大携载容量病毒载体、溶瘤病毒、目的基因递送、神经系统靶向基因治疗药物、动物感染模型建立或抗病毒药物筛选中的应用。
- [权利要求 5] 一种溶瘤病毒载体，其特征在于，通过敲除单纯疱疹病毒HSV1-CH007株基因组中神经毒力因子 γ 34.5双拷贝基因得到。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的溶瘤病毒载体，其特征在于，在敲除的 γ 34.5基因座位插入肿瘤治疗序列基因表达盒；或，
所述在溶瘤病毒载体基因组任何插入不影响功能的位点插入肿瘤治疗序列基因表达盒；
优选地，所述肿瘤治疗序列基因选自免疫检查点蛋白抗体基因、肿瘤免疫治疗细胞因子基因和免疫调控增强基因中的一种或以上；
优选地，所述肿瘤治疗序列基因表达盒包含启动子和肿瘤治疗序列基因；
优选地，在肿瘤治疗序列基因下游引入WPRE增强表达元件；
优选地，所述肿瘤治疗序列基因为免疫检查点蛋白PD1抗体基因；
优选地，在敲除的 γ 34.5基因座位还插入荧光蛋白表达盒，所述荧光蛋白表达盒的转录方向与所述肿瘤治疗序列基因表达盒保持一致。
- [权利要求 7] 一种溶瘤病毒，其包含权利要求5或6所述的溶瘤病毒载体。

- [权利要求 8] 一种抗肿瘤药物组合物，其特征在于，包含权利要求7所述的溶瘤病毒。
- [权利要求 9] 一种溶瘤病毒载体的构建方法，其特征在于，敲除单纯疱疹病毒HSV1-CH007株基因组中神经毒力因子 γ 34.5双拷贝基因；
优选地，还包括在敲除的 γ 34.5基因座位或基因组任何插入不影响功能的位点插入肿瘤治疗序列基因表达盒。
- [权利要求 10] 一种溶瘤病毒的构建方法，其特征在于，包括如下步骤：
(1) 靶向载体构建
克隆 γ 34.5基因上下游同源臂，将克隆的上下游同源臂片段连入骨架载体，获得重组载体1；构建包括启动子、绿色荧光蛋白基因和WPRE片段的EGFP表达盒，连入重组载体1，获得表达绿色荧光蛋白的重组靶向质粒载体；
优选地，还包括在重组载体1插入肿瘤治疗序列基因表达盒，具体地：
构建包括启动子、肿瘤治疗序列基因和红色荧光蛋白mCherry基因通过自剪切肽（2A）绑定表达的肿瘤治疗序列基因表达盒，替换表达绿色荧光蛋白的重组靶向质粒载体的EGFP表达框，获得表达肿瘤治疗序列基因的重组靶向质粒载体；
(2) 溶瘤病毒构建
将敲除 γ 34.5基因表达绿色荧光蛋白的重组靶向质粒载体与HSV1-CH007株基因组DNA共转染293T细胞，待细胞病变后收集上清，感染Vero细胞，挑斑绿色荧光的病毒嗜斑，经过5轮以上的挑斑纯化后即得表达绿色荧光蛋白的重组病毒；
优选地，插入肿瘤治疗序列基因的溶瘤病毒的构建，方法包括：将表达肿瘤治疗序列基因的重组靶向质粒载体与表达绿色荧光蛋白的重组HSV1-CH007株病毒基因组DNA共转染293T细胞，待细胞病变后收集上清，感染Vero细胞，在绿色荧光背景下挑斑红色荧光的病毒斑，经过5轮以上的挑斑纯化后即得。

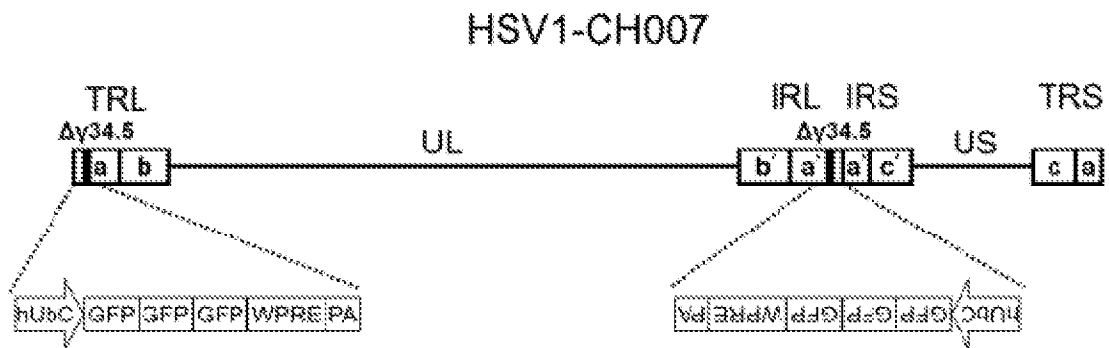


图 1

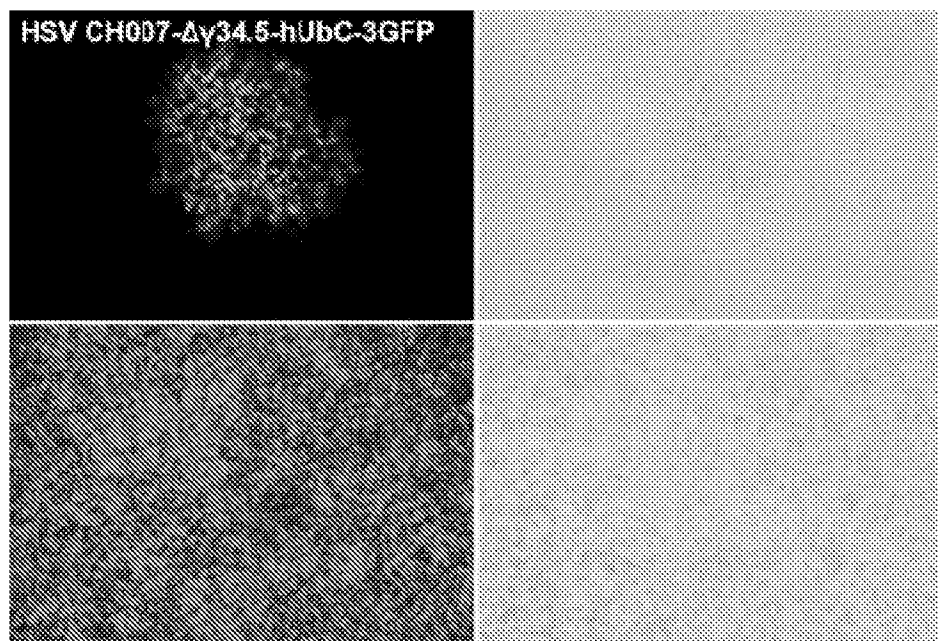


图 2

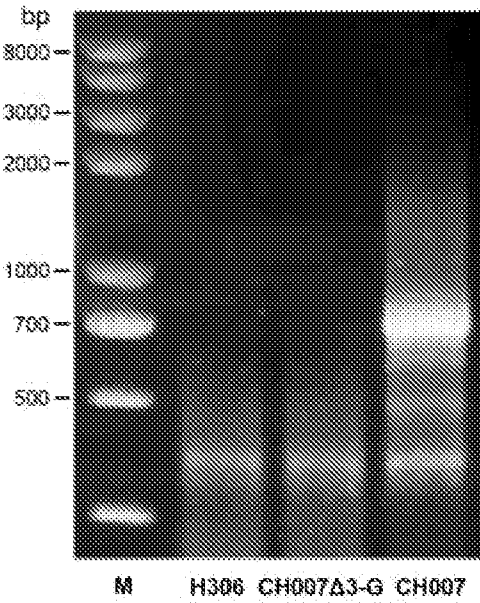


图 3



图 4

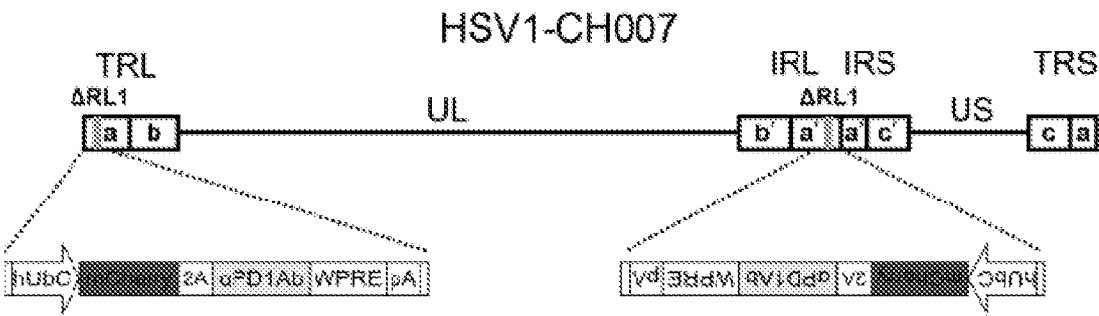


图 5

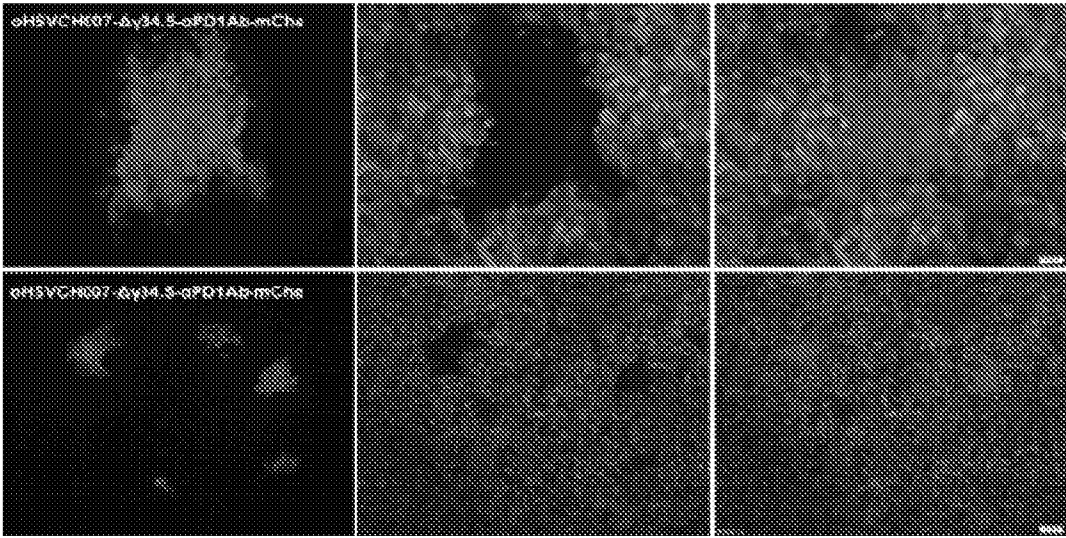


图 6

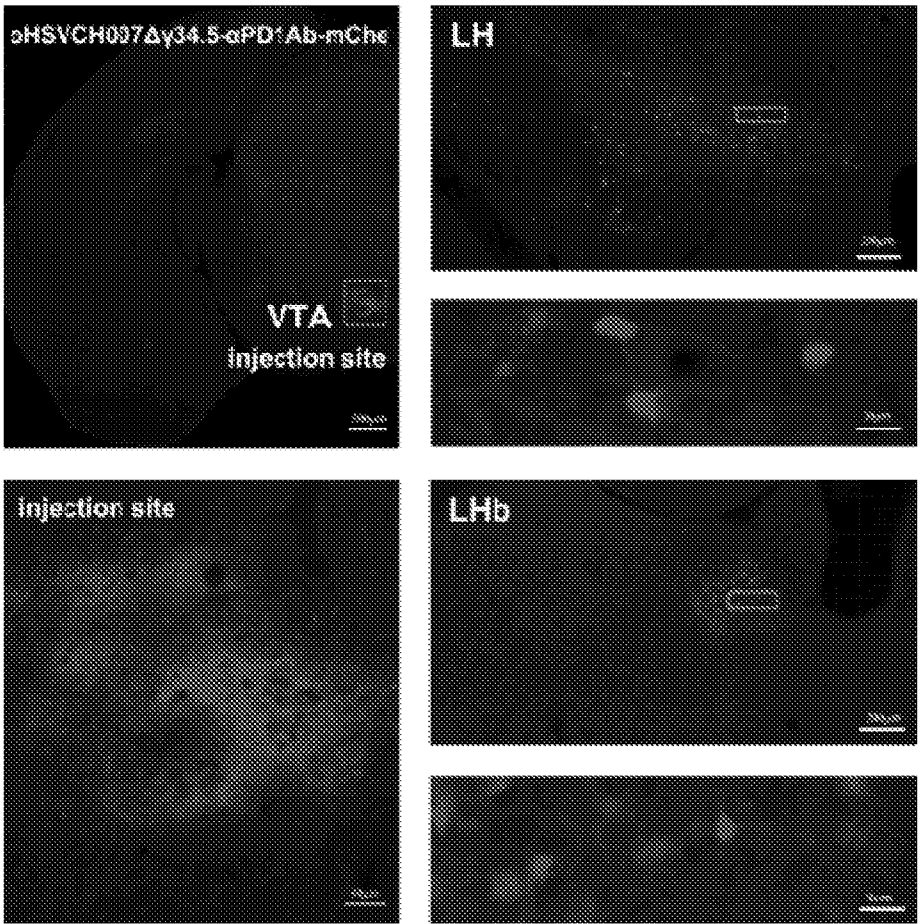


图 7

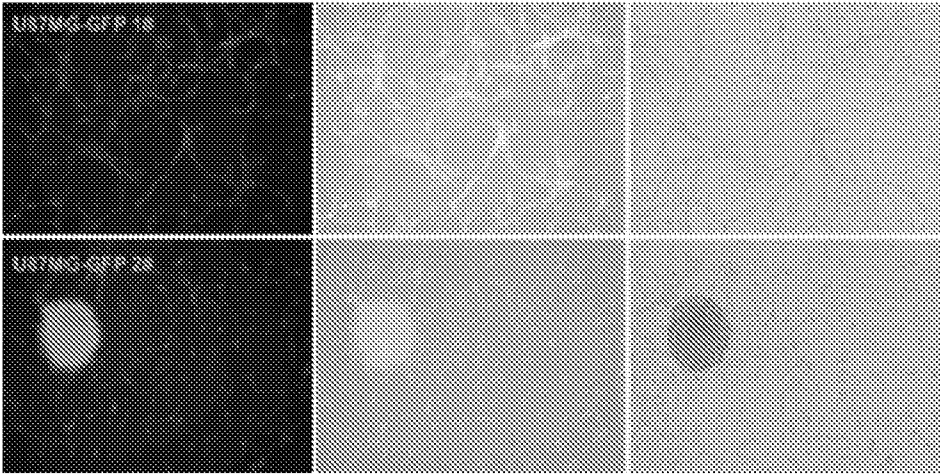


图 8

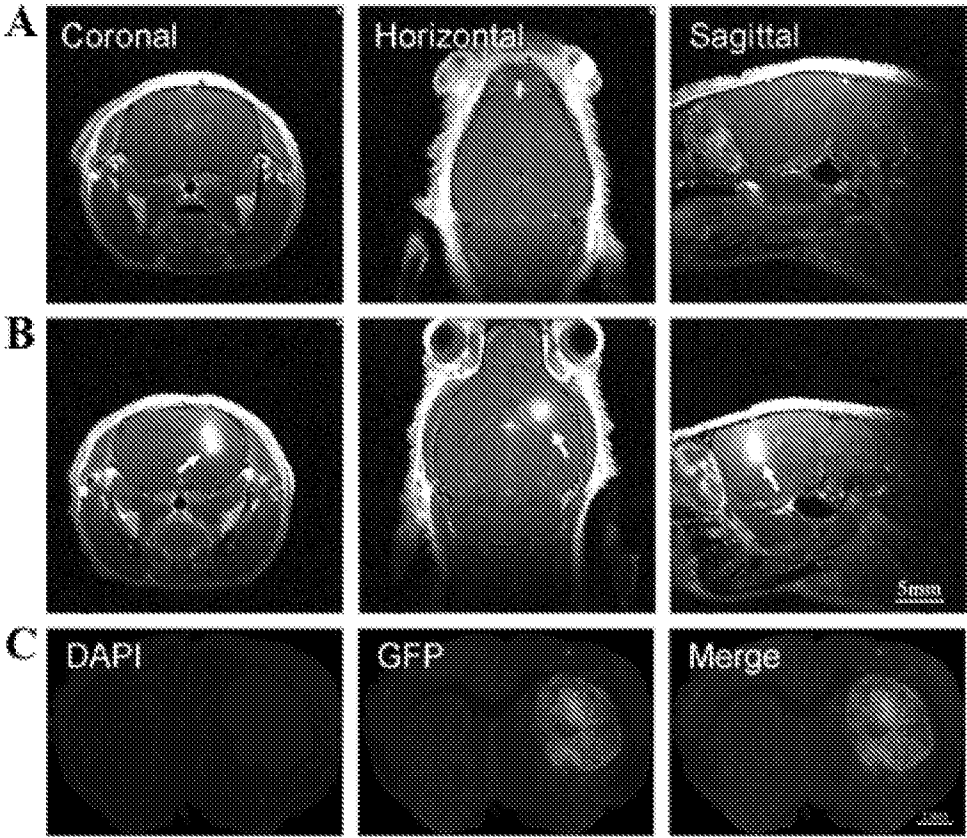


图 9

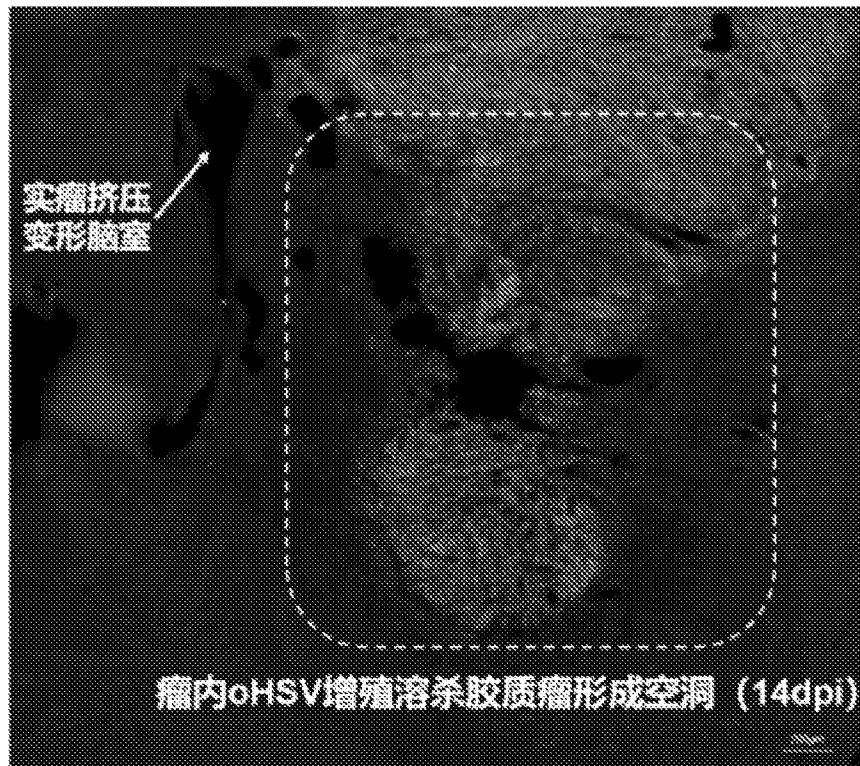


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/138484

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/869(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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)

C12N; A61K; 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)

CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, EPTXT, PUBMED, ISI WEB, NCBI, STNext, 中国生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 溶瘤病毒, oncolytic virus, OV, 单纯疱疹病毒, Herpes simplex virus, HSV1, 敲除, knockout, 神经毒力因子, γ 34.5 ICP34.5, 双拷贝, 插入, insert, PD-1, 抗体**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TIAN, Chao et al. "Enhanced anti-tumor response elicited by a novel oncolytic HSV-1 engineered with an anti-PD-1 antibody" <i>CANCER LETTERS</i> , No. 518, 15 June 2021 (2021-06-15), pages 49-58	1-10
X	US 2015250837 A1 (MORNINGSIDE TECHNOLOGY VENTURES, LTD.) 10 September 2015 (2015-09-10) embodiment 4	1-10
X	CN 110117577 A (WUHAN INSTITUTE OF PHYSICS AND MATHEMATICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 13 August 2019 (2019-08-13) description, paragraphs 5-24	1-10
X	US 2019169253 A1 (VIROGIN BIOTECH CANADA, LTD.) 06 June 2019 (2019-06-06) figure 1	1-10
X	CN 111979269 A (SHANGHAI FUNUOJIAN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 24 November 2020 (2020-11-24) embodiments 1-17	1-10



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 application or patent 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

02 August 2022

Date of mailing of the international search report

18 August 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/138484

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 0116331 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 08 March 2001 (2001-03-08) embodiment 1	1
X	US 5728379 A (GEORGETOWN UNIVERSITY) 17 March 1998 (1998-03-17) claim 6	1
X	陈珺 等 (CHEN, Jun et al.). "溶瘤病毒在神经胶质瘤治疗中的研究进展 (Progress in Oncolytic Virotherapy for the Treatment of Glioma)" <i>生命科学 (Chinese Bulletin of Life Sciences)</i> , Vol. 32, No. 9, 30 September 2020 (2020-09-30), pages 953-962	1-10
X	郝蒙茹 等 (HAO, Mengru et al.). "HSV-1溶瘤病毒在肿瘤治疗研究中的新进展 (The Advances of Oncolytic Herpes Simplex Virus in Cancer Therapy)" <i>病毒学报 (Chinese Journal of Virology)</i> , Vol. 32, No. 4, 31 July 2016 (2016-07-31), pages 516-522	1-10
A	WO 0116331 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 08 March 2001 (2001-03-08) entire document	2-10
A	US 5728379 A (GEORGETOWN UNIVERSITY) 17 March 1998 (1998-03-17) entire document	2-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/138484

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/138484

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2015250837	A1	10 September 2015	WO	2014047350	A1	27 March 2014
CN	110117577	A	13 August 2019	None			
US	2019169253	A1	06 June 2019	AU	2017305335	A1	07 March 2019
				CA	3032669	A1	08 February 2018
				WO	2018026872	A1	08 February 2018
				EP	3490583	A1	05 June 2019
				JP	2019523022	A	22 August 2019
CN	111979269	A	24 November 2020	None			
WO	0116331	A1	08 March 2001	DE	60016429	D1	05 January 2005
				IL	148360	A	03 December 2007
				IL	148360	D0	12 September 2002
				ZA	200202413	B	25 June 2003
				KR	20020092905	A	12 December 2002
				AT	283921	T	15 December 2004
				CA	2383372	A1	08 March 2001
				PT	1212428	E	31 March 2005
				AU	3477400	A	26 March 2001
				SI	1212428	T1	30 June 2005
				MX	PA02002142	A	10 April 2003
				ES	2233349	T3	16 June 2005
				JP	2003508055	A	04 March 2003
				EP	1212428	A1	12 June 2002
US	5728379	A	17 March 1998	CA	2223691	A1	19 December 1996
				JP	H11506931	A	22 June 1999
				ES	2227593	T3	01 April 2005
				AT	274593	T	15 September 2004
				WO	9639841	A1	19 December 1996
				AU	6149596	A	30 December 1996
				DE	69633236	D1	30 September 2004
				EP	0839054	A1	06 May 1998

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/138484

A. 主题的分类

C12N 15/869(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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)

C12N; A61K; 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))

CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, EPTXT, PUBMED, ISI WEB, NCBI, STNext, 中国生物序列检索系统: 溶瘤病毒, oncolytic virus, OV, 单纯疱疹病毒, Herpes simplex virus, HSV1, 敲除, knockout, 神经毒力因子, Y 34.5 ICP34.5, 双拷贝, 插入, insert, PD-1, 抗体

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
X	TIAN, C. 等. "Enhanced anti-tumor response elicited by a novel oncolytic HSV-1 engineered with an anti-PD-1 antibody" CANCER LETTERS, 第518期, 2021年6月15日 (2021 - 06 - 15), 第49-58页	1-10
X	US 2015250837 A1 (MORNINGSIDE TECHNOLOGY VENTURES, LTD.) 2015年9月10日 (2015 - 09 - 10) 实施例4	1-10
X	CN 110117577 A (中国科学院武汉物理与数学研究所) 2019年8月13日 (2019 - 08 - 13) 说明书第5-24段	1-10
X	US 2019169253 A1 (VIROGIN BIOTECH CANADA, LTD.) 2019年6月6日 (2019 - 06 - 06) 图1	1-10
X	CN 111979269 A (上海复诺健生物科技有限公司) 2020年11月24日 (2020 - 11 - 24) 实施例1-17	1-10
X	WO 0116331 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2001年3月8日 (2001 - 03 - 08) 实施例1	1

☒ 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

2022年8月2日

国际检索报告邮寄日期

2022年8月18日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

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

李恩

电话号码 86-(10)-53961874

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
X	US 5728379 A (GEORGETOWN UNIVERSITY) 1998年3月17日 (1998 - 03 - 17) 权利要求6	1
X	陈珺 等. “溶瘤病毒在神经胶质瘤治疗中的研究进展” 生命科学, 第32卷, 第9期, 2020年9月30日 (2020 - 09 - 30), 第953-962页	1-10
X	郝蒙茹 等. “HSV-1溶瘤病毒在肿瘤治疗研究中的新进展” 病毒学报, 第32卷, 第4期, 2016年7月31日 (2016 - 07 - 31), 第516-522页	1-10
A	W0 0116331 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2001年3月8日 (2001 - 03 - 08) 全文	2-10
A	US 5728379 A (GEORGETOWN UNIVERSITY) 1998年3月17日 (1998 - 03 - 17) 全文	2-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/138484

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2015250837	A1	2015年9月10日	WO	2014047350	A1	2014年3月27日
CN	110117577	A	2019年8月13日	无			
US	2019169253	A1	2019年6月6日	AU	2017305335	A1	2019年3月7日
				CA	3032669	A1	2018年2月8日
				WO	2018026872	A1	2018年2月8日
				EP	3490583	A1	2019年6月5日
				JP	2019523022	A	2019年8月22日
CN	111979269	A	2020年11月24日	无			
WO	0116331	A1	2001年3月8日	DE	60016429	D1	2005年1月5日
				IL	148360	A	2007年12月3日
				IL	148360	D0	2002年9月12日
				ZA	200202413	B	2003年6月25日
				KR	20020092905	A	2002年12月12日
				AT	283921	T	2004年12月15日
				CA	2383372	A1	2001年3月8日
				PT	1212428	E	2005年3月31日
				AU	3477400	A	2001年3月26日
				SI	1212428	T1	2005年6月30日
				MX	PA02002142	A	2003年4月10日
				ES	2233349	T3	2005年6月16日
				JP	2003508055	A	2003年3月4日
				EP	1212428	A1	2002年6月12日
US	5728379	A	1998年3月17日	CA	2223691	A1	1996年12月19日
				JP	H11506931	A	1999年6月22日
				ES	2227593	T3	2005年4月1日
				AT	274593	T	2004年9月15日
				WO	9639841	A1	1996年12月19日
				AU	6149596	A	1996年12月30日
				DE	69633236	D1	2004年9月30日
				EP	0839054	A1	1998年5月6日