

(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
2021年11月4日 (04.11.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/218802 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 35/768 (2015.01) *C12N 15/38* (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01) *C12N 15/33* (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01) *C12N 15/66* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/089255

(22) 国际申请日: 2021年4月23日 (23.04.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010363270.4 2020年4月30日 (30.04.2020) CN

(71) 申请人: 杭州康万达医药科技有限公司
(**HANGZHOU CONVERD CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道余杭塘路2959号4幢7层, Zhejiang 311121 (CN)。

(72) 发明人: 傅瑾(**FU, Jin**); 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道余杭塘路2959号4幢7层, Zhejiang 311121 (CN)。张蓉(**ZHANG, Rong**); 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道余杭塘路2959号4幢7层, Zhejiang 311121 (CN)。王婷婷(**WANG, Tingting**); 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道余杭塘路2959号4幢7层, Zhejiang 311121 (CN)。秦云(**QIN, Yun**); 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道余杭塘路2959号4幢7层, Zhejiang 311121 (CN)。方吴敏(**FANG, Wumin**); 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道余杭塘路2959号4幢7层, Zhejiang 311121 (CN)。胡放(**HU, Fang**); 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道余杭塘路2959号4幢7层, Zhejiang 311121 (CN)。阎辉(**YAN, Hui**); 中国浙江省杭州市余杭区仓前街道余杭塘路2959号4幢7层, Zhejiang 311121 (CN)。

(74) 代理人: 北京天昊联合知识产权代理有限公司(**TEE&HOWE INTELLECTUAL PROPERTY ATTORNEYS**); 中国北京市东城区东长安街

1号东方广场东方经贸城西一办公楼5层1, 6-12室丁业平, Beijing 100738 (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, 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))。

(54) **Title:** ISOLATED RECOMBINANT ONCOLYTIC POXVIRUS CAPABLE OF BEING REGULATED AND CONTROLLED BY MICRORNA AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 可受微小RNA调控的分离的重组溶瘤痘病毒及其应用

(57) **Abstract:** Provided are an isolated recombinant oncolytic poxvirus capable of being regulated and controlled by microRNA and a use thereof. The isolated recombinant oncolytic poxvirus can be regulated and controlled by microRNA, and the expression level of the microRNA in tumor cells of a mammal is lower than that in normal cells of the same mammal. A target sequence of the microRNA is integrated in a 3'UTR region of an E10R gene in a recombinant oncolytic poxvirus genome.

(57) 摘要: 提供了可受微小RNA调控的分离的重组溶瘤痘病毒及其应用。该分离的重组溶瘤痘病毒能够受微小RNA调控, 该微小RNA的表达量在哺乳动物的肿瘤细胞中比在同种哺乳动物的正常细胞中低, 其中该重组溶瘤痘病毒基因组中的E10R基因的3'UTR区域中整合有该微小RNA的靶序列。



WO 2021/218802 A1

可受微小 RNA 调控的分离的重组溶瘤痘病毒及其应用

5 技术领域

本发明属于生物技术领域，具体而言，涉及可受微小 RNA 调控的分离的重组溶瘤痘病毒、药物组合物及其在治疗肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

10 背景技术

早在 19 世纪末人们就发现多种病毒可缓解肿瘤发展的进程，提示了病毒在肿瘤治疗领域的潜力，痘病毒是双链 DNA 病毒，基于该病毒良好的安全性、稳定性、免疫应答强、强溶瘤作用及在肿瘤内有效扩散等，使其在肿瘤免疫治疗领域获得越来越大的关注。虽然痘病毒具有天然的肿瘤靶向性，但未经基因改造的野生型病毒仍可感染许多正常细胞，可造成一定的风险。目前已报道了几种溶瘤痘病毒的菌株，包括 Western Reserve、Wyeth、Copenhagen、Lister 等已经构建了各自的突变体。在这些突变体中，痘病毒的胸腺激酶（TK）基因是最多被使用的突变区域之一，TK 基因是参与病毒复制程序的主要基因之一，利用 TK 基因在肿瘤组织高表达的特性使得 TK 缺失痘病毒的复制能力在正常组织中受限。其次，痘病毒在宿主细胞内扩散与细胞表皮生长因子受体（EGFR）信号通路的活化密切相关，痘病毒感染细胞后分泌的 VGF 与已感染或邻近未感染细胞表面的 EGFR 结合并激活 EGFR/Ras 信号通路，为痘病毒感染邻近细胞提供有利的环境。因此 VGF 缺失的痘病毒在正常细胞内无法启动 EGFR/Ras 通道使其感染正常细胞受限，而肿瘤细胞中 EGFR 信号通路处于活化状态，故缺失 VGF 基因的痘病毒在肿瘤细胞内的感染不受影响，亦即相对提高了对肿瘤的特异性。但是，在临床实践中，VGF 和/或 TK 缺失型的溶瘤痘病毒在采用全身给药方式施与患者时仍存在安全性风险。

5 虽然 2005 年中国国家药品监督管理局批准了上海三维生物技术
有限公司的基因改构溶瘤腺病毒 H101 上市，用于治疗头颈部肿瘤；
2015 年美国 FDA 以及欧盟 EMA 批准了 Amgen 公司的基因改构溶瘤
单纯疱疹病毒 T-Vec 上市，用于治疗晚期恶性黑素瘤。但目前市场
上尚无溶瘤痘病毒的产品。

因此，在肿瘤和/或癌症的溶瘤病毒免疫治疗中，仍然需要开发
出药效好、且肿瘤特异性更高、更加安全的产品。

发明内容

10 为解决上述现有技术中所存在的问题，本发明提供了分离的重组
溶瘤痘病毒、药物组合物及其在治疗肿瘤和/或癌症的药物中的应
用。

具体而言，本发明提供了：

15 (1) 一种分离的重组溶瘤痘病毒，该重组溶瘤痘病毒能够受微
小 RNA 调控，所述微小 RNA 的表达量在哺乳动物的肿瘤细胞中比在
同种哺乳动物的正常细胞中低，其中该重组溶瘤痘病毒基因组中的
E10R 基因的 3'UTR 区域中整合有所述微小 RNA 的靶序列。

20 (2) 根据 (1) 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述微小 RNA 选
自：miR-9、miR-15a、miR-16、miR-26a、miR-27b、miR-29b、miR-30a、
miR-32、miR-33、miR-34、miR-95、miR-101、miR-122、miR-124、
miR-125a、miR-125b、miR-126、miR-127、miR-128、miR-133b、
miR-139、miR-140、miR-142、miR-143、miR-145、miR-181、miR-192、
miR-195、miR-198、miR-199a、miR-199b、miR-200、miR-203、miR-204、
miR-205、miR-218、miR-219、miR-220、miR-224、miR-345、miR-375；
25 优选 miR-199a 和 miR-199b。

(3) 根据 (1) 所述的重组溶瘤痘病毒，该重组溶瘤痘病毒是
TK 基因功能缺陷型的和/或 VGF 基因功能缺陷型的。

(4) 根据 (1) 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述微小 RNA 的
所述靶序列是重复的，所述重复包含 2-8 个重复。

30 (5) 根据 (3) 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述重组溶瘤痘病

毒的基因组中整合有外源 IL-21 基因，并且该 IL-21 基因能够在肿瘤细胞中表达。

(6) 根据 (3) 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述 TK 基因通过插入外源核苷酸序列而使该 TK 基因功能缺陷。

5 (7) 根据 (5) 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述外源 IL-21 基因插入在所述 TK 基因中，从而使该 TK 基因功能缺陷。

(8) 根据 (3) 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述 VGF 基因通过基因敲除或插入外源核苷酸序列而使该 VGF 基因功能缺陷。

10 (9) 根据 (1) 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述重组溶瘤痘病毒是 WR 株或惠氏株。

(10) 根据 (1) 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述重组溶瘤痘病毒的基因组中还整合有外源筛选基因，所述外源筛选基因包括 gpt 基因和/或 LacZ 基因。

15 (11) 根据 (5) 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述外源 IL-21 基因来自于小鼠或人。

(12) 一种药物组合物，其中该药物组合物包括作为活性成分的根据 (1) - (11) 中任一项所述的重组溶瘤痘病毒，及可药用辅料。

(13) 根据 (12) 所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含 1×10^5 - 5×10^9 pfu 的所述重组溶瘤痘病毒。

20 (14) 根据 (12) 所述的药物组合物，其中所述重组溶瘤痘病毒通过瘤内注射给药或静脉给药。

(15) 一种用于制备 (1) - (11) 中任一项所述的重组溶瘤痘病毒的载体。

25 (16) 根据 (15) 所述的载体，其中所述载体包含在启动子控制下的外源 IL-21 基因。

(17) 一种含有 (15) 或 (16) 所述的载体的宿主细胞。

(18) 根据 (1) - (11) 中任一项所述的重组溶瘤痘病毒在制备用于治疗肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

30 (19) 根据 (18) 所述的用途，其中所述肿瘤和/或癌症包括肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤、结直肠癌、膀胱癌、

乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

(20) 一种治疗肿瘤和/或癌症的方法，包括对肿瘤和/或癌症患者施用根据 (1) - (11) 中任一项所述的重组溶瘤痘病毒。

5 (21) 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述重组溶瘤痘病毒的施用剂量为 1×10^5 - 5×10^9 pfu，每天 1 次，连续施用 1-6 天；或每 2 天 1 次，连续施用 1-6 次。

(22) 根据 (20) 所述的方法，其中所述溶瘤病毒通过瘤内注射给药或静脉给药。

10 (23) 根据 (20) 所述的方法，其中所述肿瘤和/或癌症包括肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

15 本发明与现有技术相比具有以下优点和积极效果：

经过深入的研究和实验，本发明在溶瘤痘病毒的基因组中选择出特定的必需基因 E10R，并提出在 E10R 的 3'UTR 区 (3'非翻译区) 插入外源核苷酸序列，该外源核苷酸序列包含特定微小 RNA 的靶序列，其中所述微小 RNA 的表达量在肿瘤细胞中比在正常细胞中低。这样在感染该溶瘤痘病毒的正常细胞中，高表达的所述微小 RNA 能够靶定到所述溶瘤痘病毒 E10R 的 3'UTR 区对应的 mRNA，通过降解 mRNA 或阻碍其翻译，来抑制 E10R 的表达，从而抑制所述溶瘤痘病毒的复制。而在感染该溶瘤痘病毒的肿瘤细胞中所述微小 RNA 低表达或不表达，因而 E10R 的表达不被抑制，从而保持所述溶瘤痘病毒的复制能力。因此本发明利用体内正常组织与肿瘤组织内特定微小 RNA 表达量不同的特点，来提供一种对肿瘤细胞具有更高、更明显的选择性的新型重组溶瘤痘病毒。本发明人惊奇地发现，本发明的重组溶瘤痘病毒在多种肿瘤细胞中的复制均明显高于正常细胞，从而具有更好的肿瘤特异性、安全性，并且能够显著抑制肿瘤细胞的生长。

25 此外，本发明进一步选择了微小 RNA 的种类，发现多种微小

30

RNA（优选 miR-199）能够有效地实现本发明的目的，所得重组溶瘤痘病毒显示了更强的肿瘤选择性和安全性。

5 本发明的新型重组溶瘤痘病毒可进一步包括 TK 和/或 VGF 基因失活，从而实现了更强的肿瘤细胞选择性，与已有的溶瘤痘病毒（例如 TK 和/或 VGF 缺陷痘病毒）相比，其在正常细胞中的复制及对正常细胞的杀伤显著降低。

10 此外，本发明进一步使所述新型溶瘤痘病毒同时携带免疫调控因子 IL-21 的基因，从而使所得的重组溶瘤痘病毒能够选择性地在肿瘤细胞中复制，并且表达免疫调控因子 IL-21。这样能够充分发挥溶瘤病毒选择性地在肿瘤细胞中复制并杀死肿瘤细胞、以及进一步引起随后的机体免疫反应的作用，同时还能够充分发挥外源 IL-21 的抗肿瘤免疫作用。本发明发现在溶瘤痘病毒中整合 IL-21 基因，能够使溶瘤病毒的溶瘤杀伤作用和 IL-21 的抗肿瘤免疫刺激作用产生协同效果。

15 由此，本发明为癌症治疗提供了更加丰富和有效的产品线，能够提供效果更好、肿瘤特异性更高、更加安全的产品。

附图说明

图 1 示出制备例 1 中质粒 pZB-E10R-miR199T 构建流程图。

20 图 2 示出制备例 1 中 pZB-E10R-miR199T 质粒的鉴定结果；其中泳道 M 为 DNA Marker III（DNA 分子量标记 III），泳道 1 为 pZB-E10R-miR199T 条带。

25 图 3 示出制备例 2 中构建的 VSC20-mT/mCherry 骨架病毒的单克隆重组溶瘤病毒鉴定结果；其中 M 泳道为 DNA 分子量标记，泳道 1 为 VSC20-mT/mCherry 条带，泳道 2 为 VSC20 条带，泳道 3 为阴性对照（无 DNA 样本）。

图 4 示出制备例 2 中构建的 VSC20-mT/mCherry 溶瘤病毒载体的结构。

30 图 5 示出制备例 3 中构建的 MiTDvv-mCherry 骨架病毒的单克隆重组溶瘤病毒鉴定结果；其中 M 泳道为 DNA 分子量标记，泳道 1 为

MiTDvv-mCherry 条带，泳道 2 为 VSC20-mT/mCherry 条带，泳道 3 为阴性对照（无 DNA 样本）。

图 6 示出制备例 3 中构建的 MiTDvv-mCherry 溶瘤病毒载体的结构。

5 图 7 示出制备例 4 中构建的 MiTDvv-hIL21-mCherry 溶瘤病毒的单克隆重组溶瘤病毒鉴定结果；其中 M 泳道为 DNA 分子量标记，泳道 1 为 MiTDvv-hIL21-mCherry 条带，泳道 2 为 DDvv-hIL21 条带，泳道 3 为阴性对照（无 DNA 样本）。

10 图 8 示出制备例 4 中构建的 MiTDvv-hIL21-mCherry 溶瘤病毒的结构。

图 9A 示出制备例 5 中用 PCR 法确认 MiTDvv 骨架病毒及 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒中包含 miR199T 序列及不含 mCherry 序列；其中 M 泳道为 DNA 分子量标记，泳道 1 为 MiTDvv 条带，泳道 2 为 MiTDvv-mCherry 条带，泳道 3 为阴性对照（无 DNA 样本），泳道 4 15 为 DDvv-hIL21 条带，泳道 5 为 MiTDvv-hIL21-mCherry 条带。图 9B 示出制备例 5 中用 PCR 法确认 MiTDvv 骨架病毒缺失了 TK 基因；其中 M 泳道为 DNA 分子量标记，泳道 1 为 MiTDvv 条带，泳道 2 为 VSC20 条带，泳道 3 为阴性对照（无 DNA 样本）。

20 图 10 示出制备例 5 中构建的 MiTDvv 骨架病毒及 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒的结构。

图 11 示出实施例 1 中 MiTDvv 骨架病毒在正常细胞和肿瘤细胞内的复制比较。如图可知 MiTDvv 骨架病毒在人正常细胞 HUVEC 中复制低于在人肿瘤细胞 HeLa 中复制，呈现明显肿瘤选择性复制功能。其中图 11A 示出 MiTDvv 骨架病毒分别感染 HUVEC 细胞（左柱）和 HeLa 细胞（右柱）后 24 小时后的病毒含量，图 11B 示出 MiTDvv 骨架病毒分别感染 HUVEC 细胞（左柱）和 HeLa 细胞（右柱）后 48 小时后的病毒含量；图 11C 示出 MiTDvv 骨架病毒在 HeLa 细胞内复制与在 HUVEC 细胞内复制的比值。图 11A 和 B 中 X 轴为不同的细胞，Y 轴为每毫升培养液中病毒含量；图 11C 中 X 轴为病毒在 HeLa 细胞与 25 HUVEC 细胞中复制的比例，Y 轴为病毒感染时间。

30

图 12 示出实施例 2 中 MiTDvv 骨架病毒与 DDvv 骨架病毒对正常细胞株的体外杀伤比较。如图可知 DDvv 病毒骨架对正常细胞 MRC-5 的杀伤作用明显强于 MiTDvv 溶瘤病毒骨架。其中 X 轴为处理细胞所用的不同的病毒感染量 (MOI)，Y 轴为相应的杀伤率的百分比数值，灰色柱子表示 DDvv 病毒感染，黑色柱子表示 MiTDvv 病毒感染。

图 13 示出实施例 3 中 MiTDvv 骨架病毒与 DDvv 骨架病毒在正常细胞内的复制比较。如图可知 DDvv 溶瘤病毒骨架在正常细胞 MRC-5 内的复制明显高于 MiTDvv 溶瘤病毒骨架。其中 X 轴为处理细胞所用的不同的病毒感染量 (MOI)，Y 轴为相应的每 ml 培养体系中病毒基因的拷贝数，灰色柱子表示 DDvv 病毒感染，黑色柱子表示 MiTDvv 病毒感染。

图 14 示出实施例 4 中 MiTDvv-hIL21 和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对正常细胞的杀伤比较。如图可知 DDvv-hIL21 溶瘤病毒对正常细胞 MRC-5 的杀伤作用明显强于 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒。其中 X 轴为处理细胞所用的不同的病毒感染量 (MOI)，Y 轴为相应的细胞生长抑制率的百分比数值，黑色柱子表示 MiTDvv-hIL21 病毒感染，灰色柱子表示 DDvv-hIL21 病毒感染。

图 15 示出实施例 5 中 MiTDvv-hIL21 和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在正常细胞内的复制比较。如图可知 DDvv-hIL21 溶瘤病毒在正常细胞 MRC-5 内的复制明显高于 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒。其中 X 轴为处理细胞所用的不同的病毒感染量 (MOI)，Y 轴为每毫升培养体系中病毒基因的拷贝数，灰色柱子表示 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒感染，黑色柱子表示 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒感染。

图 16 示出实施例 6 中 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在正常细胞和肿瘤细胞内的复制比较。如图可知 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒在正常细胞 MRC-5 内复制低于在肿瘤细胞 A549 内的复制。图 16A 示出不同滴度病毒感染细胞后的病毒含量，其中 X 轴为处理细胞所用的不同的病毒感染量 (MOI)，Y 轴为每毫升培养体系中病毒基因的拷贝数，灰色柱子表示 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒感染正常细胞，黑色柱子表示 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒感染肿瘤细胞。图 16B 示出 MiTDvv-hIL21

溶瘤病毒在肿瘤细胞 A549 内的复制与在正常细胞 MRC-5 内复制的倍数，其中 X 轴为溶瘤病毒在 A549 细胞中复制与在 MRC-5 细胞中复制的倍数，Y 轴为处理细胞所用的不同的病毒感染量。

5 图 17 示出实施例 7 中 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对不同肿瘤细胞株的体外杀伤作用。图 17A-G 分别为 FaDu 细胞 (A)、A549 细胞 (B)、LOVO 细胞 (C)、MNNG/HOS C1 细胞 (D)、SK-HEP-1 细胞 (E)、PANC-1 细胞 (F)、U251 细胞 (G) 的结果。其中 X 轴为处理细胞所用的不同的病毒感染量 MOI 的 log 值 (lg MOI)，Y 轴为相应的抑制率的百分比数值，实心点为 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒的抑制率，空心
10 方块为阳性对照 10 μ M 紫杉醇的抑制率。

图 18 示出实施例 8 中不同细胞中 miR-199 的表达水平。其中 X 轴为不同肿瘤细胞株，Y 轴为 miR-199 相对表达量。黑色柱子表示高表达株，灰色柱子表示中表达细胞株，白色柱子表示低表达细胞株。

15 图 19 示出实施例 8 中的 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒对肿瘤细胞的杀伤作用与 miR-199 表达的相关性。其中 X 轴为不同肿瘤细胞株，Y 轴为细胞存活率的百分比数值。

20 图 20 示出实施例 9 中对 HCT116 细胞稳转 miR-199 片段的验证。图 20A 示出使用细胞流式仪检测 GFP 表达的结果，其中左图为空白对照组 (HCT116 细胞株) 结果，中图为阴性对照细胞株 HCT116-miRNC 结果，右图为稳定表达 miR-199 的 HCT116-miR199 细胞株结果；图 20B 示出定量 PCR 检测 miR-199 的表达的结果，其中 X 轴为不同细胞株，Y 轴为 miR-199 相对表达量。

25 图 21 示出实施例 9 中用 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒感染高表达 miR-199 的肿瘤细胞的结果。如图可知高表达 miR-199 的肿瘤细胞明显抑制 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒的细胞杀伤作用。其中 X 轴为不同的病毒感染量 (MOI)，Y 轴为相应的细胞生长抑制率的百分比数值，白色柱子表示感染 HCT116-miRNC 的细胞株，黑色柱子表示感染 HCT116-miR199 的细胞株。

30 图 22 示出实施例 10 中 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒对结直肠癌的抑瘤作用。图 22A 示出瘤内注射 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒后，肿瘤体

积随时间的变化；如图可知 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒能够有效地抑制肿瘤的生长；其中 X 轴为给药后时间，Y 轴为肿瘤体积，实心方块表示瘤内注射 MiTDvv-hIL21，空心方块表示瘤内注射 PBS。图 22B 示出瘤内注射 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒后，相对肿瘤生长率 T/C (%) 随时间的变化；如图可知从给药后第 10 天开始，MiTDvv-hIL21 给药组的相对肿瘤生长率小于 40%；其中 X 轴为给药后时间，Y 轴为 T/C(%)，实心方块表示瘤内注射 MiTDvv-hIL21。图 22C 示出瘤内注射 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒后，小鼠体重随时间的变化；如图可知在整个实验过程中小鼠体重未见明显下降；其中 X 轴为给药后时间，Y 轴为小鼠体重，实心方块表示瘤内注射 MiTDvv-hIL21，空心方块表示瘤内注射 PBS。

图 23 示出实施例 11 中 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒对人骨肉瘤的抑瘤作用。图 23A 示出瘤内注射 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒后，肿瘤体积随时间的变化；如图可知 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒能够有效地抑制肿瘤的生长；其中 X 轴为给药后时间，Y 轴为肿瘤体积，实心方块表示瘤内注射 MiTDvv-hIL21，空心方块表示瘤内注射 PBS。图 23B 示出瘤内注射 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒后，相对肿瘤生长率 T/C (%) 随时间的变化；如图可知从给药后第 8 天开始，给药组的相对肿瘤生长率小于 40%；其中 X 轴为给药后时间，Y 轴为 T/C (%)，实心方块表示瘤内注射 MiTDvv-hIL21。图 23C 示出瘤内注射 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒后，小鼠体重随时间的变化；如图可知在整个实验过程中小鼠体重未见明显下降；其中 X 轴为给药后时间，Y 轴为小鼠体重，实心方块表示瘤内注射 MiTDvv-hIL21，空心方块表示瘤内注射 PBS。

图 24 示出实施例 12 中 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒对人肝癌的抑瘤作用。图 24A 示出瘤内注射 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒后，肿瘤体积随时间的变化；如图可知 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒能够有效地抑制肿瘤的生长；其中 X 轴为给药后时间，Y 轴为肿瘤体积，实心方块表示瘤内注射 MiTDvv-hIL21，空心方块表示瘤内注射 PBS。图 24B 示出瘤内注射 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒后，小鼠体重随时间的变化；如图可知在整个实验过程中小鼠体重未见明显下降；其中 X 轴为给药后时间，

Y 轴为小鼠体重，实心方块表示瘤内注射 MiTDvv-hIL21，空心方块表示瘤内注射 PBS。

5 图 25 示出实施例 13 中评价 MiTDvv-hIL21 和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对不同 miR-199 表达水平的肿瘤细胞的杀伤作用。其中 X 轴为不同类别肿瘤细胞，Y 轴细胞生长抑制率，黑色柱子表示 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒，灰色柱子表示 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒。

10 图 26 示出实施例 14 中 MiTDvv-hIL21 和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对不同 miR-199 表达水平的荷瘤小鼠的抑瘤效果比较。图 26A 示出在低表达 miR-199 的人结直肠癌 HCT116 的荷瘤小鼠中，瘤内注射溶瘤痘病毒后，肿瘤体积随时间的变化；其中 X 轴为给药后时间，Y 轴为肿瘤体积，实心方块表示瘤内注射 MiTDvv-hIL21，空心方块表示瘤内注射 DDvv-hIL21；如图可知 MiTDvv-hIL21 抑瘤作用比 DDvv-hIL21 略强。图 26B 示出在高表达 miR-199 的人骨肉瘤 MNNG/HOS C1 的荷瘤小鼠中，瘤内注射溶瘤痘病毒后，肿瘤体积随时间的变化；其中 X 轴为给药后时间，Y 轴为肿瘤体积，实心方块表示瘤内注射 MiTDvv-hIL21，空心方块表示瘤内注射 DDvv-hIL21；如图可知 MiTDvv-hIL21 抑瘤作用比 DDvv-hIL21 弱。

15 图 27 示出实施例 15 中 MiTDvv-hIL21 与 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在小鼠体内的组织分布。图 27A-F 分别示出 MiTDvv-hIL21 和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在小鼠卵巢、子宫、脾、肝、肺、外周血中的分布。其中 X 轴为给药后时间，Y 轴为组织中病毒含量，黑色柱子表示 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒，灰色柱子表示 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒。

20 图 12-15、22-25 中，*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ，***表示 $p < 0.001$ （与相应的对照组比较，使用 One-way ANOVA 统计分析法得到）。

25

具体实施方式

以下通过具体实施方式的描述并参照附图对本发明作进一步说明，但这并非是对本发明的限制，本领域技术人员根据本发明的基本思想，可以做出各种修改或改进，但是只要不脱离本发明的基本思想，均在本发明的范围之内。

30

在本发明中，词语“肿瘤”、“癌症”、“肿瘤细胞”、“癌细胞”涵盖本领域通常认为的含义。

本文所用的词语“溶瘤病毒”或“溶瘤痘病毒”是指能够选择性地 在肿瘤细胞中复制并裂解肿瘤细胞的病毒或痘病毒。

5 本文所用的词语“治疗有效量”是指功能药剂或药物组合物能够表现出可检测的治疗效果或抑制效果的量，或者起到抗肿瘤效果的量。所述效果可以通过本领域任何已知的检验方法检测。

本文所用的词语“给药”或“施用”是指向受试者提供化合物、复合物或组合物（包括病毒和细胞）。

10 本文所用的词语“患者”是指人或非人类生物。因此，本文所述的方法和组合物适用于人类疾病和兽类疾病。在一些实施方案中，患者患有肿瘤。在一些例子中，患者同时患有一种或多种类型的癌症。

本文所用的词语“协同效果”是指两种或多种药剂共同起到的效果，该效果大于其中各药剂的单独效果的总和。

15 本文所用的术语“pfu”或“蚀斑形成单位”（plaque forming unit）是指：产生一个蚀斑的病毒量称为一个蚀斑形成单位（pfu）。

本文所用的术语“MOI”或“感染复数”（Multiplicity of infection）也即，病毒与细胞个数比，是指用以起始病毒感染的每个细胞感染病毒颗粒的粒数。 $MOI = \text{pfu}/\text{细胞}$ ，即细胞个数 \times MOI=总 PFU。

20 基于使用内源性微小 RNA（microRNA（miRNA））来控制病毒复制的策略已经被广泛应用（参见文献“Ylösmäki et al., Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted destruction of E1A mRNA by a cell type-specific MicroRNA. J Virol 82: 11009-11015. 2008”）。miRNA 是一段 20-24bp 小核酸分子，通过与特定靶基因的非编码区序列结合，对靶基因的表达或翻译后的蛋白
25 修饰发挥着重要的生物学作用（参见文献“Ambros et al., The functions of animal microRNAs. Nature 431: 350-355 2004”）。在癌症研究中发现一系列 miRNA 小分子在肿瘤发展过程中的表达发生明显变化（参见文献“Negrini et al., MicroRNAs in human cancer: from
30 research to therapy. J Cell Sci 120: 1833-1840.2007”），呈现多靶点

调控与癌症相关的基因，比如 mTOR、c-Met、HIF-1 α 和 CD44 等（参见文献“Fornari et al., miR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* 70: 5184-5193. 2010”；“Kim et al., MicroRNA miR-199a regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *J Biol Chem* 283:18158-18166.2008”；“Jia et al., Lentivirus-Mediated Overexpression of MicroRNA-199a Inhibits Cell Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cell Biochem Biophys*, 62: 237-44.2011”；“Henry et al., miR-199a-3p targets CD44 and reduces proliferation of CD44 positive hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 403: 120-125.2010”）。

为了提供一种对肿瘤细胞具有明显的选择性的新型重组溶瘤痘病毒，本发明的发明人经过深入的研究和实验摸索，在溶瘤痘病毒的基因组中选择出特定的必需基因 E10R，并提出在 E10R 的 3'UTR 区（3'非翻译区）插入外源核苷酸序列，该外源核苷酸序列包含特定微小 RNA 的靶点序列，其中所述微小 RNA 的表达量在肿瘤细胞中比在正常细胞中低。这样在感染该溶瘤痘病毒的正常细胞中，高表达的所述微小 RNA 能够靶定到所述溶瘤痘病毒 E10R 的 3'UTR 区对应的 mRNA，通过降解 mRNA 或阻碍其翻译，来抑制 E10R 的表达，从而抑制所述溶瘤痘病毒的复制。而在感染该溶瘤痘病毒的肿瘤细胞中所述微小 RNA 低表达或不表达，因而 E10R 的表达不被抑制，从而保持所述溶瘤痘病毒的复制能力。因此本发明利用体内正常组织与肿瘤组织内会发生特定微小 RNA 表达量不同的特点，来提供一种对肿瘤细胞具有更高更明显的选择性的新型重组溶瘤痘病毒。本发明人惊奇地发现，本发明的重组溶瘤痘病毒在多种肿瘤细胞中的复制均明显高于正常细胞，从而具有更好的肿瘤特异性、安全性，并且能够显著抑制肿瘤细胞的生长。进一步而言，由于该新型重组溶瘤痘病毒仅能在缺乏特定微小 RNA 的肿瘤细胞中复制，因此能获得更强的肿瘤细胞选择性，并减低该病毒对正常组织的作用。

基于以上构思，本发明提供了一种分离的重组溶瘤痘病毒，该重组溶瘤痘病毒能够受微小 RNA 调控，所述微小 RNA 的表达量在哺乳动物的肿瘤细胞中比在同种哺乳动物的正常细胞中低，其中该重组溶瘤痘病毒基因组中的 E10R 基因的 3'UTR 区域中整合有所述微小 RNA 的靶序列。

所述微小 RNA 的表达量在哺乳动物的肿瘤细胞中比在同种哺乳动物的正常细胞中低，是指所述微小 RNA 的表达量在哺乳动物的至少一种肿瘤细胞中比在同种哺乳动物的至少一种正常细胞中低。所述哺乳动物包括人。

本发明发现，所述重组溶瘤痘病毒在肿瘤细胞中的复制明显高于正常细胞，并且能够显著抑制肿瘤细胞的生长。

所述微小 RNA 包括本领域已知的在肿瘤细胞中表达量低或不表达的那些，也包括根据本领域技术测定得知其在肿瘤细胞中表达量低或不表达的那些。所述微小 RNA 可以选自：miR-9、miR-15a、miR-16、miR-26a、miR-27b、miR-29b、miR-30a、miR-32、miR-33、miR-34、miR-95、miR-101、miR-122、miR-124、miR-125a、miR-125b、miR-126、miR-127、miR-128、miR-133b、miR-139、miR-140、miR-142、miR-143、miR-145、miR-181、miR-192、miR-195、miR-198、miR-199a、miR-199b、miR-200、miR-203、miR-204、miR-205、miR-218、miR-219、miR-220、miR-224、miR-345、miR-375；优选 miR-199a、miR-199b。其中，miR-199（包括 miR-199a 和 miR-199b）能够最有效地实现本发明的目的，所得重组溶瘤痘病毒显示了更强的肿瘤选择性和安全性。在本发明中，miRNA 是包含 miRNA 前体和成熟的 miRNA 中任一种的概念，但在没有特别说明的情况下，其是指成熟的 miRNA。

在本说明中，上述微小 RNA 的名称编号是本领域公认和熟知的（例如 miRNA 成熟体简写成 miR、高度同源的 miRNA 在数字后加上英文小写字母等，如 miR-199a 和 miR-199b 那样），其分别具有特定的已知的核苷酸序列，可在 miRBase 公共数据库网址（<http://www.mirbase.org/>）中查询到具体核苷酸序列。

成熟的 miRNA（mature RNA）或 miRNA 成熟体是由较长的初

级转录物经过一系列核酸酶的剪切加工而产生的。初级转录物 (pri-miRNA) 长度从几百到几千个碱基不等, 带有 5' 端帽子和 3' poly A 尾巴, 以及一到数个发夹茎环结构。初级转录物经剪切产生约 70 个碱基的 miRNA 前体, 即 pre-miRNA。miRNA 前体 (pre-miRNA) 经进一步剪切, 形成长度约为 22 个碱基的单链成熟 miRNA。在细胞内, 通常可以存在作为前体的 pri-miRNA 和 pre-miRNA, 以及成熟的 miRNA。本说明书中, miRNA 是包含 miRNA 前体和成熟的 miRNA 中任一种的概念, 但在没有特别说明的情况下, 其是指成熟的 miRNA。

5

10

优选地, 所述微小 RNA 的所述靶序列是重复的, 所述重复优选包含 2-8 个重复, 更优选包含 3-4 个重复。在一些实施方案中, 所述微小 RNA 的重复靶序列被 2 个或更多个核苷酸的间隔区 (例如, gg、cc、ggcc) 隔开。所述重复的 miRNA 的靶序列可以是 miRNA 的反向互补序列 (reverse complement)。

15

优选地, 重组溶瘤痘病毒是 TK 基因功能缺陷型的和/或 VGF 基因功能缺陷型的。这样构建的溶瘤痘病毒实现了更强的肿瘤细胞选择性, 与已知的溶瘤痘病毒 (例如 TK/VGF 双缺陷痘病毒) 相比, 其在正常细胞中的复制及对正常细胞的杀伤显著降低。

20

本发明在提及溶瘤病毒的基因时所使用的术语“功能缺陷”是指该溶瘤病毒无法发挥该基因应有的功能, 即功能丧失, 该目的可通过 (例如) 在基因中插入外源片段或敲除该基因而实现。

因此, 可以在所述 TK 基因中插入外源核苷酸序列, 从而使其功能缺陷。也可以在所述 VGF 基因中插入外源核苷酸序列和/或敲除该基因, 从而使其功能缺陷。

25

优选地, 所述重组溶瘤痘病毒的基因组中整合有外源 IL-21 基因, 并且该 IL-21 基因能够在肿瘤细胞中表达。

30

IL-21 (即白细胞介素-21 (interleukin-21)) 是一种多向性 I 型细胞因子, 主要由 T 细胞产生, 调节先天免疫和获得性免疫应答, 在抗肿瘤免疫反应中发挥了重要作用。已有文献报道 IL-21 对各类免疫细胞及信号转导的作用 (参见文献: “Leonard, W. J. & Wan, C. IL-21

Signaling in Immunity. *F1000Research* **5**, 1–10 (2016).”) , 各类免疫细胞主要包括: 1) $CD4^+$ T 细胞: 促进增殖、产生细胞因子; T_{fh} 细胞: 促进分化、提高发育中心功能; T_{h17} 细胞: 促进分化、增殖; Treg 细胞: 抑制其产生与存活; 2) NKT 细胞: 增殖、增强细胞毒性; 3) $CD8^+$ T 细胞: 提升细胞毒性、增殖和/或存活、抗肿瘤作用; 4) NK 细胞: 促进细胞成熟、增殖、提高细胞毒性作用、增强抗肿瘤活性; 5) DC 细胞: 抑制抗原递呈功能、诱导凋亡; 6) 巨噬细胞: 提升吞噬作用; 7) B 细胞: 促进增殖和/或凋亡、促进浆细胞分化和免疫球蛋白的生成; 8) 另外 IL-21 可激活多种与肿瘤相关信号通道, 包括 JAK/STAT、MARK/PI3K 等信号通道, 调控肿瘤的发展过程。在肿瘤免疫治疗中, 激活 NK 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的细胞毒性是关键, 许多研究已充分表明 IL-21 在这一程序中起着重要作用。IL-21 促进 NK 细胞成熟使其产生 IFN- γ 、颗粒酶 B 和穿孔素, 诱发 NK 细胞介导的抗肿瘤细胞毒性作用, 及通过抗体依赖细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 提升 NK 细胞的杀伤力 (参见文献: “Spolski, R. & Leonard, W. J. Interleukin - 21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 379–395 (2014).”) 。其次, IL-21 通过诱导 $CD8^+$ T 细胞的增殖、诱导记忆 T 细胞的生成、促进 IFN γ /颗粒酶 B 的分泌等, 以增强 $CD8^+$ T 细胞对肿瘤的杀伤和有利于对复发肿瘤细胞产生记忆性免疫应答。重要的是不同于 IL-2, IL-21 不会诱导 Treg 细胞的扩增, 也进一步增强了 $CD8^+$ T 细胞的免疫功能应答 (参见文献: “Spolski, R. & Leonard, W. J. Interleukin - 21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 379–395 (2014).”) 。基于 IL-21 对免疫细胞的多样化作用, 体现了 IL-21 可在肿瘤微环境内“重新活化”多种效应细胞。

本发明通过在新型溶瘤痘病毒的基因组中插入能够调节免疫的 IL-21 基因, 进一步强化了溶瘤病毒的抗肿瘤作用。这样不仅能够充分发挥溶瘤病毒选择性地在肿瘤细胞中复制并杀死肿瘤细胞、以及进一步引起随后的机体免疫反应的作用, 同时还能够充分发挥外源 IL-21 的抗肿瘤免疫作用。本发明发现在溶瘤痘病毒中整合 IL-21 基

因，能够使溶瘤病毒的溶瘤杀伤作用和 IL-21 的抗肿瘤免疫刺激作用产生协同效果。

优选地，将外源 IL-21 基因插入到 TK 基因中，这样能够使该 TK 基因发生功能缺陷，并且在感染肿瘤细胞之后能够表达 IL-21 基因。

在本发明中，可使用的痘病毒包括惠氏株或 WR 株，WR 株的一个例子为 VSC20。

在一个优选的实施方案中，所述重组溶瘤痘病毒是对 VSC20 痘病毒进行基因改造而得到的。VSC20 痘病毒是 VGF 基因缺失的痘病毒，其中在 C11R 位点插入 LacZ 基因，制备方法可参见科技文献：

“McCart, JA, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res* (2001) 61: 8751–8757.”。所述基因改造包括在该 VSC20 痘病毒的 E10R 基因 3’UTR 区域插入重复的特定微小 RNA 的靶序列，例如 miR-199 (miR-199a-3p 或 miR-199b-3p) 的靶序列。

在一些实施方案中，本发明利用基因工程的手段构建了含有 E10R 基因左右同源臂和重复的特定微小 RNA 的靶序列的穿梭质粒，然后将该穿梭质粒引入到 VSC20 痘病毒中，通过重组机制获得 E10R 基因 3’UTR 区域插入了重复的特定微小 RNA 靶序列的重组病毒。构建穿梭质粒的一个具体实施方案的流程如图 1 所示。

所述基因改造还可以包括将外源序列（例如 IL-21 基因）插入该 VSC20 痘病毒的 TK 基因中，从而使该 TK 基因功能缺陷，其具体方法如制备例 3 或 4 所述，或者可如中国专利公开 CN109554353A 所述，其全文以引用的方式并入本文。

所述重组溶瘤痘病毒的基因组中还可以整合有外源筛选基因，所述外源筛选基因包括 *gpt*（鸟嘌呤磷酸核糖转移酶）基因、LacZ 基因、荧光蛋白基因（例如红色荧光蛋白基因）。优选不包括荧光蛋白基因，以避免荧光蛋白的表达在患者体内带来的安全隐患。

所述重组溶瘤痘病毒的基因组中也可以不整合有外源筛选基

因。

5 在一些实施方案中，本发明通过分别使用痘病毒启动子 p7.5 控制 gpt 基因，以及人工合成痘病毒早/晚期启动子 pSEL 控制外源 IL-21 基因，使用体外细胞内重组技术将 gpt 和 IL-21 基因插入到痘病毒 VSC20 株的 TK 基因区中，以此构建溶瘤病毒，两个启动子以背靠背的方式分别启动各自调控基因的表达。

优选地，所述外源 IL-21 基因来自于小鼠或人。

本发明的重组溶瘤痘病毒可通过生物工程领域的相关已知方法获得。

10 基于本发明开发的重组溶瘤痘病毒，本发明还提供了一种药物组合物，其中该药物组合物包括作为活性成分的根据本发明所述的重组溶瘤痘病毒，及可药用辅料。

15 优选地，所述药物组合物包含治疗有效量的所述重组溶瘤痘病毒。在某些实施方案中，所述药物组合物的活性成分包括 1×10^5 至 5×10^9 pfu/天剂量的根据本发明所述的重组溶瘤痘病毒（例如， 1×10^5 至 3×10^9 pfu/天剂量的根据本发明所述的重组溶瘤痘病毒、 1×10^5 至 1×10^8 pfu/天剂量的根据本发明所述的重组溶瘤痘病毒等）。

所述溶瘤病毒可采用本领域通常所采用的给药方式给药，例如通过瘤内注射给药或静脉给药。

20 本发明的药物组合物还可以包含本领域已知的其它活性成分，例如白细胞介素-2 (IL-2)、IL-15、IL-17、IL-18、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等，其施用剂量和施用方式可以按照各自常规的方式进行。如果包含其它活性成分，那么所述重组溶瘤痘病毒应独立地存在于所述药物组
25 合物中而不与其它活性成分相互混合。例如，将重组溶瘤痘病毒独立地装在独立容器中。

本领域的技术人员可以理解，本发明的药物组合物还可包含合适的可药用的辅料。

30 在一些实施方案中，本发明的药物组合物包含一种或多种可药用载体。可以通过本领域已知的方法制备药物制剂。例如，可以将化

合物等活性成分与常见的赋形剂、稀释剂（例如磷酸盐缓冲液或生理盐水）、组织培养基、和载体（例如自体血浆或人血清白蛋白）进行配制，并作为悬浮剂施用。其它的载体可以包括脂质体、胶团、纳米胶囊、聚合纳米颗粒、固体脂颗粒（例如参见文献“E. Koren and V. Torchilin, *Life*, 63:586-595, 2011”）。本发明的药物组合物的具体配制方法可参见科学文献和专利文献中的描述，例如参见最新版雷明登氏药物科学，Maack 出版公司，Easton PA ("Remington's")。

本发明另一方面还提供了一种用于制备本发明所述的重组溶瘤痘病毒的载体。

所述载体可通过重组机制改造痘病毒内的 E10R 基因。例如，在一个具体实施方案中，如图 4 所示，重组载体包含 E10R 基因左右同源臂、重复的 miR-199（hsa-miR-199a-3p 或 hsa-miR-199b-3p）的靶序列、及启动外源筛选基因 mCherry/Zeocin 的表达框。优选地，所述载体还可通过重组机制使痘病毒内的 TK 基因发生功能缺陷。在另一个具体实施方案中，如图 6 所示，重组载体包含 E10R 基因左右同源臂、重复的 miR-199（hsa-miR-199a-3p 或 hsa-miR-199b-3p）的靶序列、启动外源筛选基因 mCherry/Zeocin 的表达框、及 TK 同源片段 TK-L、TK-R。当痘病毒为 WR 株时，TK 基因的序列为 NCBI（即，美国国立生物技术信息中心，网址：<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>）的 GenBank 中编号为 NC_006998 的痘病毒基因中第 80724-81257bp 所示的序列，则 TK-L 的序列可为例如第 80724-80961bp 所示序列片段，TK-R 的序列可为例如第 81033-81257bp 所示序列片段。重复的 miR-199（hsa-miR-199a-3p 或 hsa-miR-199b-3p）的靶序列插入位点可为例如 E10R 基因左侧同源臂第 56974 bp 处。在另一个具体实施方案中，如图 8 所示，重组载体包含 E10R 基因左右同源臂、重复的 miR-199（hsa-miR-199a-3p 或 hsa-miR-199b-3p）的靶序列、启动外源筛选基因 mCherry/Zeocin 的表达框、TK 同源片段 TK-L、TK-R、及启动 IL-21 基因和外源筛选基因 gpt 的表达框。该载体可通过细胞内重组机制使 IL-21 基因表达框和 gpt 基因表达框插入到痘病毒的 TK 基因区中（使（例如）GenBank 中编号为 NC_006998 的痘病毒基因

中第 80962-81032bp 所示的序列片段缺失), 从而使重组痘病毒丧失 TK 基因功能。重复的 miR-199(hsa-miR-199a-3p 或 hsa-miR-199b-3p) 的靶序列插入位点可为例如 E10R 基因左侧同源臂第 56974 bp 处。

5

本发明另一方面还提供了一种含有本发明所述的载体的宿主细胞。

本发明另一方面还提供了本发明所述的重组溶瘤痘病毒在制备用于治疗肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

10

所述肿瘤和/或癌症包括但不限于: 肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤(例如脑胶质瘤)、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

本发明另一方面还提供了一种治疗肿瘤和/或癌症的方法, 包括对肿瘤和/或癌症患者施用根据本发明所述的重组溶瘤痘病毒。

15

所述肿瘤和/或癌症包括但不限于: 肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤(例如脑胶质瘤)、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

20

在本发明的一个优选实施方案中, 所述重组溶瘤痘病毒的施用剂量为治疗有效量, 每天 1 次, 连续施用 1-6 天; 或每 2 天 1 次, 连续施用 1-6 次。所述治疗有效量优选为 1×10^5 至 5×10^9 pfu/天剂量(例如, 1×10^5 至 3×10^9 pfu/天剂量、 1×10^5 至 1×10^8 pfu/天剂量等)。

25

如果需要, 还可以将本发明的重组溶瘤痘病毒与其它药物联合使用, 例如白细胞介素-2 (IL-2)、IL-15、IL-17、IL-18、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等, 其施用剂量和施用方式可以按照各自常规的方式进行。

可以根据实际情况和需要对患者进行一次或多次本发明的治疗肿瘤和/或癌症的方法。

30

所述溶瘤病毒可采用本领域通常所采用的给药方式给药, 例如通过瘤内注射给药或静脉给药。

本发明还提供了一种治疗剂，包含：

(a) 第一药物组合物，其中该第一药物组合物包含位于第一可药用载体中的本发明所述的重组溶瘤痘病毒；和

5 (b) 第二药物组合物，其中该第二药物组合物包含位于第二可药用载体中的 NK 细胞。

在一些实施方案中，所述第一可药用载体和第二可药用载体是相同的。在另一些实施方案中，所述第一可药用载体和第二可药用载体是不同的。

在一些情况下，所述治疗剂也可以理解为药物的组合。

10 所有溶瘤病毒杀伤肿瘤细胞的机制都大体相似。在不同实施方案中，通过瘤内注射或静脉给药的方式，溶瘤病毒与肿瘤细胞接触，感染进入肿瘤细胞内。由于溶瘤病毒的特性是，其主要在肿瘤细胞内复制增殖，而在正常细胞内低复制或不复制，因此被感染的肿瘤细胞中会出现大量的溶瘤病毒，造成肿瘤细胞的溶解和死亡。肿瘤细胞的溶解会释放出大量的肿瘤抗原和增殖的溶瘤病毒，抗原会进一步激活体内的免疫系统，刺激体内的 NK 细胞和 T 细胞继续攻击尚未死亡的肿瘤细胞，同时新的溶瘤病毒会继续感染尚未被感染的肿瘤细胞。

15 NK 细胞是广谱型杀伤肿瘤细胞的免疫细胞，NK 细胞可以辨别肿瘤细胞与正常细胞的区别。NK 通过与肿瘤细胞接触，识别确认其为非正常细胞，然后通过受体识别、抗体靶向识别 (ADCC)、颗粒酶分泌、穿孔素分泌和分泌干扰素间接杀伤等多种协同手段，达到杀死肿瘤细胞的效果。体外实验显示，一个健康的 NK 细胞在生命期内可以连续杀死 27 个肿瘤细胞。

20 NK 细胞还具有抗病毒的功能。当正常细胞感染了病毒后，随着病毒的大量复制，细胞体现出衰老病变，体现在细胞膜上的蛋白簇的组成发生变化，在这个过程中，NK 细胞就可以敏锐而高效地识别被感染的细胞，通过类似于杀伤肿瘤细胞的上述手段，杀死被感染的细胞，从而达到抑制病毒复制增殖的目的。随后在抗原刺激和干扰素等因子的作用下，其它免疫细胞会持续作用，抵抗病毒。

30 本发明考虑了溶瘤病毒和 NK 细胞各自的特点，巧妙地将其联

用，在联用时，NK 细胞的抗病毒机制对于被溶瘤病毒感染的肿瘤细胞同样适用，并且与其抗肿瘤机制互补。此外，联用还使得含有溶瘤病毒的肿瘤细胞成为了 NK 细胞的特异性靶标，从而增强了 NK 细胞的肿瘤杀伤作用。溶瘤病毒选择性地癌细胞内增殖，在胞内起作用
5 杀伤癌细胞，同时能够导致癌细胞膜上的蛋白受体簇发生变化，增强 NK 细胞对癌细胞的识别，NK 细胞在癌细胞外攻击，两者联合起来协同杀伤癌细胞，具有更好的治疗效果。进一步地，本发明所述的重组溶瘤痘病毒还优选同时表达外源 IL-21，而表达的外源 IL-21 能够提升 NK 细胞的杀伤力从而进一步增强 NK 细胞的杀伤作用，使得本
10 发明所述的重组溶瘤痘病毒与 NK 细胞的联用能够对肿瘤的杀伤效果产生令人惊奇的效果。

优选的是，所述第一药物组合物的活性成分为本发明所述的重组溶瘤痘病毒，并且所述第二药物组合物的活性成分为所述 NK 细胞。

15 优选地，所述第一药物组合物和所述第二药物组合物各自独立地存在于所述治疗剂中而互不混合。

在本发明中，所述 NK 细胞可以选自自体 NK 细胞和异体 NK 细胞；优选地，所述 NK 细胞为经体外扩增得到的自体 NK 细胞或经体外扩增得到的异体 NK 细胞。NK 细胞的大规模体外扩增培养技术是
20 已知的，并且已经基本成熟（参见（例如）以下科技文献：“Somanchi SS, Lee DA. Ex Vivo Expansion of Human NK Cells Using K562 Engineered to Express Membrane Bound IL21. *Methods Mol Biol.* 2016;1441:175-93.” 或 “Phan MT, Lee SH, Kim SK, Cho D. Expansion of NK Cells Using Genetically Engineered K562 Feeder Cells. *Methods
25 Mol Biol.* 2016;1441:167-74.”）。临床数据证实自体 NK 细胞、半相合异体 NK 细胞（属于异体 NK 细胞）、以及脐血制备 NK 细胞回输人体后均无毒副作用，无长期依赖性，安全有效。

可用于治疗的 NK 细胞的纯度范围可以是：自体 NK 细胞的纯度可为大于等于 85%，异体 NK 细胞的纯度可为大于等于 90%；其中的
30 杂质细胞可为 NK-T 和/或 $\gamma\delta$ T 细胞。优选地，NK 细胞活性（存活率）

大于等于 90%，NK 细胞杀伤力活性大于等于 80%。

在本发明的所述联用治疗方案中，本发明进一步探索优化了溶瘤病毒和 NK 细胞各自的施用剂量，这是至关重要的。优选地，所述第一药物组合物包含 1×10^5 - 5×10^9 pfu/天剂量的所述重组溶瘤痘病毒（例如， 1×10^5 - 3×10^9 pfu/天剂量的所述重组溶瘤痘病毒、 1×10^5 - 1×10^8 pfu/天剂量的所述重组溶瘤痘病毒等），并且所述第二药物组合物包含 1×10^7 - 1×10^{10} 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞（优选地，所述第二药物组合物包含 1×10^8 至 5×10^9 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞；还优选地，所述第二药物组合物包含 1×10^9 至 4×10^9 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞；更优选地，所述第二药物组合物包含 1×10^9 至 3×10^9 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞）。优选的是，该治疗剂的活性成分由 1×10^5 至 5×10^9 pfu/天剂量的所述重组溶瘤痘病毒（例如， 1×10^5 至 3×10^9 pfu/天剂量的所述重组溶瘤痘病毒、 1×10^5 至 1×10^8 pfu/天剂量的所述重组溶瘤痘病毒等）和 1×10^7 至 1×10^{10} 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞（例如， 1×10^8 至 5×10^9 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞、 1×10^9 至 4×10^9 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞、 1×10^9 至 3×10^9 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞等）组成。

所述重组溶瘤痘病毒可采用本领域通常所采用的给药方式给药，例如通过瘤内注射给药或静脉给药。

NK 细胞可采用本领域通常所采用的给药方式给药，例如可通过静脉给药。

本领域的技术人员可以理解，本发明的治疗剂还可包含合适的可药用的辅料。

本发明的治疗剂还可以包含本领域已知的其它活性成分，例如白细胞介素-2 (IL-2)、IL-15、IL-17、IL-18、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等。

在一些实施方案中，本发明的治疗剂包含一种或多种可药用载体。可以通过本领域已知的方法制备药物制剂。例如，可以将化合物等活性成分与常见的赋形剂、稀释剂（例如磷酸盐缓冲液或生理盐

水)、组织培养基、和载体(例如自体血浆或人血清白蛋白)进行配制,并作为悬浮剂施用。其它的载体可以包括脂质体、胶团、纳米胶囊、聚合纳米颗粒、固体脂颗粒(例如参见文献“E. Koren and V. Torchilin, Life, 63:586-595, 2011”)。本发明的治疗剂的具体配制方法可参见科学文献和专利文献中的描述,例如参见最新版雷明登氏药物科学, Maack 出版公司, Easton PA ("Remington's")。

本发明的治疗剂可以治疗多种肿瘤和/或癌症,包括但不限于:肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤(例如脑胶质瘤)、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

本发明的治疗剂的施用方法为,对肿瘤和/或癌症患者首先施用所述重组溶瘤痘病毒,然后,在施用所述重组溶瘤痘病毒之后的第 18-72 小时(例如,第 20-70 小时、第 22-48 小时、第 24-48 小时、第 30-48 小时等),对所述肿瘤和/或癌症患者施用所述 NK 细胞。

“在施用所述重组溶瘤痘病毒之后的第 18-72 小时(例如,第 20-70 小时、第 22-48 小时、第 24-48 小时、第 30-48 小时等),对所述肿瘤和/或癌症患者施用所述 NK 细胞”是指首次 NK 细胞的施用与首次重组溶瘤痘病毒施用的时间间隔为 18-72 小时(例如,20-70 小时、22-48 小时、24-48 小时、30-48 小时等),或首次 NK 细胞的施用与在其之前最相邻一次的所述重组溶瘤痘病毒施用的时间间隔为 18-72 小时(例如,20-70 小时、22-48 小时、24-48 小时、30-48 小时等)。优选地,首次 NK 细胞的施用与在其之前最相邻一次的所述重组溶瘤痘病毒施用的时间间隔为 18-72 小时(例如,20-70 小时、22-48 小时、24-48 小时、30-48 小时等)。还优选地,首次 NK 细胞的施用与在其之前最相邻一次的所述重组溶瘤痘病毒施用的时间间隔为 24-48 小时。

在本发明的一个优选实施方案中,所述重组溶瘤痘病毒的施用剂量为治疗有效量,每天 1 次,连续施用 1-6 天;并且所述 NK 细胞的施用剂量为 1×10^7 至 1×10^{10} 个细胞/天剂量(例如, 1×10^8 至 $5 \times$

10⁹ 个细胞/天剂量、1×10⁹ 至 4×10⁹ 个细胞/天剂量、1×10⁹ 至 3×10⁹ 个细胞/天剂量），每天 1 次，连续施用 1-6 天。在本发明的另一个优选实施方案中，所述重组溶瘤痘病毒的施用剂量为治疗有效量，每 2 天 1 次，连续施用 2-6 天；并且所述 NK 细胞的施用剂量为 1×10⁷ 至 1×10¹⁰ 个细胞/天剂量（例如，1×10⁸ 至 5×10⁹ 个细胞/天剂量、1×10⁹ 至 4×10⁹ 个细胞/天剂量、1×10⁹ 至 3×10⁹ 个细胞/天剂量），每 2 天 1 次，连续施用 2-6 天。无论本发明采用上述何种实施方案或其它实施方案，只要满足在施用所述重组溶瘤痘病毒之后的第 18 小时至 72 小时，对所述肿瘤和/或癌症患者施用 NK 细胞的条件即可。

其中所述重组溶瘤痘病毒的施用和 NK 细胞的施用可以是间隔给药方式（例如，第 1 天施用所述重组溶瘤痘病毒，第 2 天施用 NK 细胞，第 3 天施用所述重组溶瘤痘病毒，第 4 天施用 NK 细胞...以此类推）；或依次给药方式（例如，第 1 天施用所述重组溶瘤痘病毒，第 2 天依次施用所述重组溶瘤痘病毒和 NK 细胞，第 3 天依次施用所述重组溶瘤痘病毒和 NK 细胞，第 4 天依次施用所述重组溶瘤痘病毒和 NK 细胞...以此类推）；或其它给药方式（例如首先施用所述重组溶瘤痘病毒，每天 1 次，连续施用 1-6 天，之后间隔 18-72 小时再施用 NK 细胞，每天 1 次，连续施用 1-6 天）。优选的是，首先施用所述重组溶瘤痘病毒，在所述重组溶瘤痘病毒全部施用之后间隔 18-72 小时再施用 NK 细胞。在本发明的一个优选实施方案中，对肿瘤和/或癌症患者首先施用所述重组溶瘤痘病毒，所述重组溶瘤痘病毒的施用剂量为治疗有效量，施用 1 次；并且在施用所述重组溶瘤痘病毒之后的第 18 小时至 72 小时，对所述肿瘤和/或癌症患者施用所述 NK 细胞，所述 NK 细胞的施用剂量为 1×10⁷ 至 1×10¹⁰ 个细胞/天剂量（例如，1×10⁸ 至 5×10⁹ 个细胞/天剂量、1×10⁹ 至 4×10⁹ 个细胞/天剂量、1×10⁹ 至 3×10⁹ 个细胞/天剂量），施用 1 次。所述重组溶瘤痘病毒的治疗有效量优选为 1×10⁵ 至 5×10⁹ pfu/天剂量（例如，1×10⁵ 至 3×10⁹ pfu/天剂量、1×10⁵ 至 1×10⁸ pfu/天剂量等）。

本发明还提供了本发明所述的治疗剂在制备用于治疗肿瘤和/或癌症的药物中的应用。

所述肿瘤和/或癌症包括但不限于：肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤（例如脑胶质瘤）、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

5 本发明另一方面还提供了一种用于治疗肿瘤和/或癌症的具有协同作用的联合药物的药盒，包括装有本发明所述重组溶瘤痘病毒的第一容器和装有本发明所述 NK 细胞的第二容器，其中所述第一容器和所述第二容器是独立的；以及载明给药时机和给药方式的说明书。优选的是，该药盒由分别独立地装有本发明所述的重组溶瘤痘病毒和本发明所述的 NK 细胞的独立容器组成，以及载明给药时机和给药方式的说明书。

10 所述肿瘤和/或癌症包括但不限于：肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤（例如脑胶质瘤）、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

15 优选地，装有本发明所述重组溶瘤痘病毒的第一容器包含治疗有效量的所述重组溶瘤痘病毒，并且装有 NK 细胞的第二容器包含足够提供 1×10^7 - 1×10^{10} 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞（例如， 1×10^8 至 5×10^9 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞、 1×10^9 至 4×10^9 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞、 1×10^9 至 3×10^9 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞等）。所述重组溶瘤痘病毒的治疗有效量优选为 1×10^5 至 5×10^9 pfu/天剂量（例如， 1×10^5 至 3×10^9 pfu/天剂量、 1×10^5 至 1×10^8 pfu/天剂量等）。

20 25 优选地，所述装有所述重组溶瘤痘病毒的第一容器包含 1×10^5 - 1×10^8 pfu/天剂量的所述重组溶瘤痘病毒，并且所述装有 NK 细胞的第二容器包含 1×10^9 至 3×10^9 个细胞/天剂量的所述 NK 细胞。

在本发明中，所述 NK 细胞可以选自自体 NK 细胞和异体 NK 细胞；优选地，所述 NK 细胞为经体外扩增得到的自体 NK 细胞或经体外扩增得到的异体 NK 细胞。

30 所述重组溶瘤痘病毒可采用其各自的本领域通常所采用的给药

方式给药，例如通过瘤内注射给药或静脉给药。

NK 细胞可采用本领域通常所采用的给药方式给药，例如可通过静脉给药。

5 所述肿瘤和/或癌症包括但不限于：肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤（例如脑胶质瘤）、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

本发明另一方面还提供了一种治疗肿瘤和/或癌症的方法，包括以下依次进行的步骤：

10 1) 对肿瘤和/或癌症患者施用根据本发明所述的重组溶瘤痘病毒；

2) 在施用所述重组溶瘤痘病毒之后的第 18-72 小时（例如，第 20-70 小时、第 22-48 小时、第 24-48 小时、第 30-48 小时等），对所述肿瘤和/或癌症患者施用本发明所述的 NK 细胞。

15 “在施用所述重组溶瘤痘病毒之后的第 18-72 小时（例如，第 20-70 小时、第 22-48 小时、第 24-48 小时、第 30-48 小时等），对所述肿瘤和/或癌症患者施用本发明所述的 NK 细胞”是指首次 NK 细胞的施用与首次重组溶瘤痘病毒施用的时间间隔为 18-72 小时（例如，20-70 小时、22-48 小时、24-48 小时、30-48 小时等），或首次
20 NK 细胞的施用与在其之前最相邻一次的所述重组溶瘤痘病毒施用的时间间隔为 18-72 小时（例如，20-70 小时、22-48 小时、24-48 小时、30-48 小时等）。优选地，首次 NK 细胞的施用与在其之前最相邻一次的所述重组溶瘤痘病毒施用的时间间隔为 18-72 小时（例如，20-70 小时、22-48 小时、24-48 小时、30-48 小时等）。还优选地，首次
25 NK 细胞的施用与在其之前最相邻一次的所述重组溶瘤痘病毒施用的时间间隔为 24-48 小时。

30 所述肿瘤和/或癌症包括但不限于：肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤（例如脑胶质瘤）、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

溶瘤病毒能够在肿瘤或癌症细胞中选择性复制，经过一定时间达到峰值。本发明的发明人发现，在经过一段时间的复制之后，肿瘤细胞里的溶瘤病毒会促进 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤。因此，本发明提出的重组溶瘤痘病毒和 NK 细胞的施用顺序和间隔实现了两者作用峰值的双峰重叠。

本发明进一步探索优化了所述重组溶瘤痘病毒和 NK 细胞各自的施用剂量，其与上述施用顺序和施用间隔的配合是至关重要的，其决定了所述重组溶瘤痘病毒的抗肿瘤疗效、NK 细胞的抗肿瘤疗效、以及两者对肿瘤细胞的最佳协同杀伤。

在本发明的一个优选实施方案中，所述重组溶瘤痘病毒的施用剂量为治疗有效量，每天 1 次，连续施用 1-6 天；并且所述 NK 细胞的施用剂量为 1×10^7 至 1×10^{10} 个细胞/天剂量（例如， 1×10^8 至 5×10^9 个细胞/天剂量、 1×10^9 至 4×10^9 个细胞/天剂量、 1×10^9 至 3×10^9 个细胞/天剂量），每天 1 次，连续施用 1-6 天。在本发明的另一个优选实施方案中，所述重组溶瘤痘病毒的施用剂量为治疗有效量，每 2 天 1 次，连续施用 2-6 天；并且所述 NK 细胞的施用剂量为 1×10^7 至 1×10^{10} 个细胞/天剂量（例如， 1×10^8 至 5×10^9 个细胞/天剂量、 1×10^9 至 4×10^9 个细胞/天剂量、 1×10^9 至 3×10^9 个细胞/天剂量），每 2 天 1 次，连续施用 2-6 天。无论本发明采用上述何种实施方案或其它实施方案，只要满足在施用所述重组溶瘤痘病毒之后的第 18 小时至 72 小时，对所述肿瘤和/或癌症患者施用 NK 细胞的条件即可。其中重组溶瘤痘病毒的施用和 NK 细胞的施用可以是间隔给药方式（例如，第 1 天施用重组溶瘤痘病毒，第 2 天施用 NK 细胞，第 3 天施用重组溶瘤痘病毒，第 4 天施用 NK 细胞...以此类推）；或依次给药方式（例如，第 1 天施用重组溶瘤痘病毒，第 2 天依次施用重组溶瘤痘病毒和 NK 细胞，第 3 天依次施用重组溶瘤痘病毒和 NK 细胞，第 4 天依次施用重组溶瘤痘病毒和 NK 细胞...以此类推）；或其它给药方式（例如首先施用重组溶瘤痘病毒，每天 1 次，连续施用 1-6 天，之后间隔 18-72 小时再施用 NK 细胞，每天 1 次，连续施用 1-6 天）。优选的是，首先施用重组溶瘤痘病毒，在重组溶瘤痘病毒全部施用之

后间隔 18-72 小时再施用 NK 细胞。在本发明的一个优选实施方案中，对肿瘤和/或癌症患者首先施用所述重组溶瘤痘病毒，所述溶瘤病毒的施用剂量为治疗有效量，施用 1 次；并且在施用所述溶瘤病毒之后的第 18 小时至 72 小时，对所述肿瘤和/或癌症患者施用所述 NK 细胞，所述 NK 细胞的施用剂量为 1×10^7 至 1×10^{10} 个细胞/天剂量（例如， 1×10^8 至 5×10^9 个细胞/天剂量、 1×10^9 至 4×10^9 个细胞/天剂量、 1×10^9 至 3×10^9 个细胞/天剂量），施用 1 次。所述重组溶瘤痘病毒的治疗有效量优选为 1×10^5 至 5×10^9 pfu/天剂量（例如， 1×10^5 至 3×10^9 pfu/天剂量、 1×10^5 至 1×10^8 pfu/天剂量等）。

5

10

可以根据实际情况和需要对患者进行一次或多次本发明的治疗肿瘤和/或癌症的方法。

在本发明中，所述 NK 细胞可以选自自体 NK 细胞和异体 NK 细胞；优选地，所述 NK 细胞为经体外扩增得到的自体 NK 细胞或经体外扩增得到的异体 NK 细胞。

15

所述肿瘤和/或癌症包括：肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤（例如脑胶质瘤）、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

20

所述重组溶瘤痘病毒可采用本领域通常所采用的给药方式给药，例如通过瘤内注射给药或静脉给药。

NK 细胞可采用本领域通常所采用的给药方式给药，例如可通过静脉给药。

以下通过例子的方式进一步解释或说明本发明的内容，但这些例子不应被理解为对本发明的保护范围的限制。

25

例子

以下除非特别说明，否则以下例子中所用实验方法均使用生物工程领域的常规实验流程、操作、材料和条件进行。

30

以下除非特别说明，否则各试剂的百分浓度（%）均指该试剂的体积百分浓度（%（v/v））。

以下例子中所用的生物材料如下：

5 1. CV1 非洲绿猴肾细胞（培养基：10%FBS +MEM+1%P/S）来源于 ATCC，MRC-5 人正常胚肺成纤维细胞（培养基：10%FBS +DMEM+1%P/S）来源于中国科学院上海细胞库，HEK-293 和 HEK-293T 人胚肾细胞（培养基：10%FBS +DMEM+1%P/S）分别来源于 Agilent Technologies 和中国科学院上海细胞库，HUVEC 人正常脐静脉内皮细胞（10%FBS+H-004B+1%P/S）来源于上海澳赛尔斯有限公司。

2. 肿瘤细胞：肿瘤细胞来源及细胞培养基见下表 A

10 表 A

细胞株	来源	培养基
HCT116	ATCC	10%FBS +McCoy's 5A+1%P/S
SKOV3	中国科学院上海细胞库	10%FBS +McCoy's 5A+1%P/S
SaoS2	中国科学院上海细胞库	10%FBS +McCoy's 5A+1%P/S
SK-BR-3	ATCC	10%FBS +McCoy's 5A+1%P/S
U251	中国科学院上海细胞库	10%FBS +DMEM+1%P/S
PANC-1	ATCC	10%FBS +DMEM+1%P/S
SK-HEP-1	中国科学院上海细胞库	10%FBS +MEM+1%P/S
FaDu	杭州市第一人民医院	10%FBS +MEM+1%P/S
MNNG/HOS C1	ATCC	10%FBS +MEM+1%P/S
Hela	ATCC	10%FBS +MEM+1%P/S
HepG2	中国科学院上海细胞库	10%FBS +MEM+1%P/S
MCF-7	ATCC	10%FBS +MEM+1%P/S
C33A	武汉细胞库	10%FBS +MEM+1%P/S
A549	ATCC	10%FBS +F12K+1%P/S
LOVO	ATCC	10%FBS +F12K+1%P/S

CFPAC-1	ATCC	10%FBS +IMDM+1%P/S
CV1	ATCC	10%FBS +MEM+1%P/S
NCI-H1299	ATCC	10%FBS +RPMI1640
U87MG	ATCC	10%FBS +MEM

McCoy's 5A、F12K、IMDM、DMEM、RPMI1640 和 MEM 购自 GIBCO 公司。胎牛血清 FBS 购自 SIGMA 公司，青霉素-链霉素（P/S）溶液 (100X) 购自碧云天公司。

3. 病毒：骨架载体 VSC20 痘病毒是 VGF 基因缺失的痘病毒，
 5 制备方法可参见科技文献：“McCart, JA, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res* (2001) 61: 8751–8757.”。对其进行基因改造，包括使用人工合成痘病毒早/晚期启动子 pSEL 调控外源人 IL21 基因，使用细胞内重组技术将人 IL21 基因插入到痘
 10 病毒 VSC20 株的 TK 基因区中，从而构建得到溶瘤痘病毒 DDvv-hIL21（参见中国专利申请公开 CN109554353A）。

作为对照病毒的溶瘤痘病毒 DDVV-RFP 是已知的，属于溶瘤痘
 病毒 WR 株（可参见（例如）科技文献：“X Song, et al. T-cell Engager-armed Oncolytic Vaccinia Virus Significantly Enhances
 15 Antitumor Therapy *Molecular Therapy*. (2014); 22 1, 102-111”），该病毒的 TK 基因和 VGF 基因均为功能缺陷型，且携带有外源红色荧光蛋白（RFP）基因。由于 RFP 基因仅起到筛选/报告作用，因此溶瘤痘病毒 DDVV-RFP 的抗肿瘤功能基本等同 TK 基因和 VGF 基因功能缺陷型的溶瘤痘病毒。溶瘤痘病毒 DDvv-RFP 也可采用本领域常规技
 20 术对 VSC20 痘病毒进行基因改造而得到。VSC20 痘病毒是 VGF 基因缺失的痘病毒，制备方法可参见科技文献：“McCart, JA, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res* (2001) 61: 8751–8757.”。所述基因改造包括使用人工合成痘病毒早/
 25 晚期启动子 pSEL 调控外源 RFP 基因，使用体外细胞内重组技术将 RFP 基因插入到痘病毒 VSC20 株的 TK 基因区中，从而构建得到溶

瘤痘病毒 DDVV-RFP。

4. C57BL/6 小鼠、BalBc-Nude 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。重度免疫缺陷型 NCG 小鼠得自江苏集萃药康生物科技有限公司。

5 5. 培养板：6 孔细胞培养板、24 孔细胞培养板、96 孔细胞培养板均得自 Corning（康宁）公司。

6. gpt 药物配制：使用 0.1N NaOH 分别配制 10mg/ml 霉酚酸（400×）、10mg/ml 40×黄嘌呤（40×）、10mg/ml 次黄嘌呤（670×），避光-20℃ 储存。使用时配制 1×工作液：取在 40ml DMEM
10 内分别加入 100μl 的 400×霉酚酸、40μl 的 40×黄嘌呤及 60μl 的 670×次黄嘌呤，混匀，使用 0.22μm 滤膜过滤，备用。

7. PBS 配方：8mM Na₂HPO₄、136mM NaCl、2mM KH₂PO₄、2.6mM KCl，pH7.2-7.4。

8. 病毒纯化液配方：60%（w/v）、50%（w/v）、40%（w/v）、
15 30%（w/v）蔗糖溶液

以下例子中所用的细胞计数方法如下：

MTT 法：每孔细胞中加入 10μl MTT 溶液（5 mg/ml），在 37℃ 培养箱培养 4~6 小时，吸弃培养液，每孔加入 150μl DMSO，置摇床上低速震荡 10 分钟，使结晶物充分溶解，使用酶标仪检测其在 490nm
20 处的吸光值（OD490）。抑制率计算公式：细胞增殖抑制百分率（IR%）
= 1-（OD490 供试品-OD490 空白）/（OD490 阴性对照-OD490 空白）
×100%。

以下例子中所用的缩写说明如下：

25 miR199T：miR199（hsa-miR-199a-3p 或 hsa-miR-199b-3p）的靶序列

FBS：胎牛血清

P/S：青霉素-链霉素

mCherry/Zeocin：红色荧光蛋白/博莱霉素

30 DMSO：二甲亚砜

制备例 1: pZB-E10R-miR199T 质粒构建

为构建携带 4 个重复 miR199T 序列的穿梭质粒 pZB-E10R-miR199T, 首先用基因合成方法合成 4×miR199T 重复片段, 每个片段之间使用 GG 连接, 插入到痘病毒基因 E10R 的 3'UTR 区(插入位点为 E10R 基因左侧同源臂第 56974 bp 处)。然后插入由 mH5 启动子启动的 mCherry/Zeocin 基因, 其 5'和 3'端各含一个同向的 LoxP 序列。miR199T 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.1) 如下:
5'-acagtagtctgcacattggta-3' (其对应的 miRNA 成熟体的 miRBase 数据库登录号为 MIMAT0000232 (hsa-miR-199a-3p) 或 MIMAT0004563 (hsa-miR-199b-3p))。

构建过程概括而言, 利用含有痘病毒基因 E10R 的左右同源臂和 mCherry/Zeocin 基因的 pcDNA3.1(+)-E10R-mCherry/Zeocin、含 4 个重复 miR199T 的质粒 pUC-57-miR199T (北京擎科新业生物技术有限公司合成构建) 及 pCB 质粒 (来源可参见文献“房有容等, Zeocin 和 GFP 双筛选标记重组痘苗病毒载体的构建.《国际流行病学传染病学杂志》, 2012. 39(3):148-152.”) 通过酶切及同源重组获得 pZB-E10R-miR199T (如图 1)。

具体操作如下:

下述 PCR 程序可在常规范围以内的温度和循环条件下根据实际情况做适当调整而进行, 属于本领域的常规技术, 故不赘述。

1) pcDNA3.1(+)-E10R-mCherry/Zeocin 质粒构建: 以痘病毒 Dvv-VSC20 (病毒来源可参见文献“McCart, JA, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. Cancer Res (2001) 61: 8751-8757.”) 基因组为模板, 通过 PCR 法 (引物序列如下: L-armE10: AGTCCTCGAGCTAATATTGAGAAATTCATC (SEQ ID NO.2); E10R1: CTGCACATTGGTTATTAAGAAGCATAGTCTGGAACATCATATGGA TATAAAGGGTTAACCTTTGTC (SEQ ID NO.3)) 获得 E10R 基因及

左侧同源臂 F1 片段。以 F1 片段为模板，通过 PCR（引物序列如下：
L-armE10: AGTCCTCGAGCTAATATTGAGAAATTCATC（SEQ ID
NO.2）； E10R2:
TGGTTAGGACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGACAGTAGTCTGCA
5 CATTGGTTATTAAG（SEQ ID NO.4））获得 E10R 左侧同源臂片段
F2。以 pCBmCZ-tTFNGR 质粒（来源可参见文献“房有容等，Zeocin
和 GFP 双筛选标记重组痘苗病毒载体的构建.《国际流行病学传染病学杂志》，2012. 39(3):148-152.”）为模板通过 PCR 的方法(引物序列
如下：199H5:
10 ATGTGCAGACTACTGTCCTAACCAATGTGCAGACTACTGTCCAAA
AATTGAAAATAAATAC（SEQ ID NO.5）； Zeo-rev,
GATCAAGATCTTTAGTCCTGCTCCTCGGCCAC（SEQ ID NO.6）)获
得含 mH5 启动子和 mCherry/Zeocin 片段 F3。以痘病毒 Dvv-VSC20 基
因组为模板通过 PCR 法（引物序列如下：E11UP:
15 GATCAAGATCTTTATAAACTTAACCCATTATAAAAC（SEQ ID
NO.7）； R-arm, AGTCGGATCCTTGACAGTCTTGAACAATTATAC
（SEQ ID NO.8））获得含痘病毒 E10R 右侧同源臂 F4。将 F2 和 F3
片段磷酸化后通过 T4 DNA 连接酶（Thermo 公司，E10011）连接，以
连接片段为模板，通过 PCR 法（引物序列如下：L-armE10,
20 AGTCCTCGAGCTAATATTGAGAAATTCATC（SEQ ID NO.2）；
Zeo-rev, GATCAAGATCTTTAGTCCTGCTCCTCGGCCAC（SEQ ID
NO.6））获得含 E10R 左侧同源臂和 mCherry/Zeocin 序列的融合片段
F5。采用限制性内切酶 Bgl II（Thermo 公司，ER0082）分别酶切片段
F4 和 F5 后，再通过 T4 DNA 连接酶连接，获得包含 E10R 左右同源臂
25 和 mCherry/Zeocin 序列的 E10R-mCherry/Zeocin 片段。采用限制性内
切酶 BamH I（Thermo 公司，FD0054）和 Xho I（Thermo 公司，FD0694）
分别切 E10R-mCherry/Zeocin 片段和质粒 pCDNA3.1(+)(Invitrogen)，
再通过 T4 DNA 连接酶连接，大肠杆菌 DH5 α (TIANGEN 公司，CB101)
转化，挑单克隆获得 pCDNA3.1(+)-E10R-mCherry/Zeocin 质粒，测序确
30 认正确。

2) pZB-1 质粒构建: 采用 PCR 法以 pCB 质粒为模板, 获得线性化 L-pCB 片段 (所用引物序列为: zP12-F: CCGCTCGAGGCTGGCGTTTTTCCATAGG (SEQ ID NO.33); zP12-R: CGCg gatccCGGTCTGGTTATAGGTACATTGAG (SEQ ID NO.34)), 将 pcDNA3.1(+)-E10R-mCherry/Zeocin 及 L-pCB 采用限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 双酶切得到 L-E10R-E11L/D 和 L-pCB/D 片段, 再通过 T4 DNA 连接酶连接, 最后通过大肠杆菌 DH5 α 转化, 挑单克隆获得 pZB-1 质粒, 测序确认正确。

3) pZB-2 质粒构建: 以 pZB-1 质粒模板, 采用 PCR 法 (引物序列如下: zP13-F: CCCAAGCTTTTAGTCCTGCTCCTCGGCC (SEQ ID NO.9); zP11m-R: ATA ACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTTTATAAACT TAACCCATTATAAAAC (SEQ ID NO.10)) 在 mCherry/Zeocin 3' 插入 LoxP 序列 (ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT (SEQ ID NO.11)) 获得 L-pZB-1 片段 (4815bp), 使用 T4 DNA 连接酶自我连接, 大肠杆菌 DH5 α 转化, 挑单克隆获得 pZB-2 质粒, 测序确认正确。

4) pZB-E10R-miR199T 质粒构建: 以 pZB-2 质粒为模板, 采用 PCR 法 (引物序列如下: zP11-F: CGCGTATTTGGGATCAGATG (SEQ ID NO.12); zP11-R: CAAAGGTTCTTGAGGGTTGTG (SEQ ID NO.13)) 获得包含 L-E10R-E11L-LoxP 的片段 (4689bp)。pUC-57-miR199T 采用限制性内切酶 Kpn I (Thermo 公司, FD0524) 和 Sac I (Thermo 公司, FD1133) 双酶切得到 L-miR199T 片段: CAATTTAACACAACCCTCAAGAACCTTTGTATTTATTTTCAATTTT TATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGGACAGTAGT CTGCACATTGGTTAGGACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGACAGT AGTCTGCACATTGGTTAGGACAGTAGTCTGCACATTGGTTATTAA GAAGCATAGTCTGGAACATCATATGGATATAAAGGGTTAACCTTT GTCACATCGATCGCGTATTTGGGATCAGATGGTAC (SEQ ID NO.35)。通过一步克隆的方法 (TreliefTM sosoo cloning 试剂盒 ver.2,

北京擎科新业生物技术有限公司，TSV-S2)与包含 L-E10R-E11L-LoxP 的片段 (4689bp) 连接，大肠杆菌 DH5 α 转化，挑单克隆获得 pZB-E10R-miR199T 质粒。BamH I 和 Sma I (Thermo 公司，FD0663) 酶切验证 (图 2)，并采用 Z10、Z11、Z14 和 Z15 引物 (北京擎科新业生物技术有限公司) 测序确认正确 (测序引物序列见表 1)。

表 1

引物	序列 5'-3'	公司
Z10	GTTGATCGGCACGTAAGAGG (SEQ ID NO.14)	北京擎科新业生物技术有限公司
Z11	GTCACAGAAACCATGCCGTGTAG (SEQ ID NO.15)	
Z14	GGAGCTTCCAGGGGGAAAC (SEQ ID NO.16)	
Z15	GACCTCAGCGTCGTAGTGG (SEQ ID NO.17)	
zP19	CCAATTAATGCACCGAACATC (SEQ ID NO.18)	
zP20	ATGAATTGGAGGAGATGGTGG (SEQ ID NO.19)	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO.20)	
P1	ATCGCATTTTCTAACGTGATGGAT (SEQ ID NO.21)	
P2	TATCTAACGACACAACATCCATT (SEQ ID NO.22)	
P5	GCACGGTAAGGAAGTAGATC (SEQ ID NO.23)	
P18	CAGTACACGGTCTCAGCATAA (SEQ ID NO.24)	

制备例 2: VSC20-mT/mCherry 病毒的包装及鉴定

10 1) 溶瘤痘病毒的重组: a) CV1 细胞铺于 6 孔板中, 4×10^5 个细胞/孔, 使得次日细胞密度达到 80%-90%。弃掉 6 孔板中的 MEM, 每孔分别加入 1 ml 无血清无抗生素的 MEM 培养基, 其中含有 8×10^3 pfu 的 Dvv-VSC20 病毒使其感染浓度为 0.02MOI, 37°C 培养 2 小时, 弃掉培养液, 置换为 2%FBS + 1%P/S 的 MEM 培养基, 加入 300 μ l 质粒/Lipo3000 (LipofectamineOR 3000 转染试剂, Invitrogen™, L3000-015)

混合液（溶液 A：2 μ g pZB-E10R-miR199T 质粒和 4 μ l 的 P3000 试剂（Invitrogen™，L3000-015）加入到 300 μ l 的 Opti-MEM I 中混匀，室温孵育 5 分钟；溶液 B：10 μ l 的 Lipo3000，加入至 300 μ l 的 Opti-MEM I 中混匀，室温孵育 5 分钟；溶液 A 及溶液 B 混合，室温孵育 15 分钟），
5 放置于培养箱（37 $^{\circ}$ C，5% CO₂）中继续培养。b）24-48 小时后显微镜下观察见细胞完全病变后，收集上清及细胞，反复冻融 3 次，300g 离心 5 分钟，收集上清中释放的病毒，标注为 P0 代病毒。c）取出 200 μ l 的病毒，使用 TIANamp Virus DNA/RNA 试剂盒（TIANGEN 公司，DP315）抽提病毒基因组，采用 PCR 法使用 zP19/zP20 引物鉴定
10 VSC20-mT/mCherry 重组成功。

2) 单克隆重组溶瘤痘病毒的筛选：a) CV1 细胞铺于 5 个 100 mm 培养皿中，使得次日细胞密度达到 80%-90%，弃 MEM 培养基，每个培养皿中分别加入 3 ml 无血清培养液梯度稀释的 P0 代病毒（梯度稀释为 10⁻¹-10⁻⁵），放入培养箱 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 孵育 2 小时，期间每隔 30
15 分钟十字混匀一次，再继续孵育 2 小时后，弃培养基，加入 10 ml 的 2%(w/v)琼脂糖凝胶（含 2%FBS 的 MEM 培养基），待凝固后放于培养箱 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 继续培养。b) 48 小时左右，挑取带有红色荧光的单个空斑至 200 μ l 的无菌 PBS 中，反复冻融三次释放病毒，每个空斑分别取 100 μ l 的病毒液在 24 孔板中采用 CV1 细胞（细胞达到 80%满）
20 进行小扩，约 48 小时待细胞完全病变后，收集病毒标记为 P1-X（X 为数字 1，2，3，4.....，代表不同病毒克隆），每个空斑吸取 200 μ l 病毒液使用 TIANamp Virus DNA/RNA 试剂盒抽提基因组，使用 PCR 法鉴定，其余病毒液保存于 -80 $^{\circ}$ C。重复以上筛选步骤 4 次，得 P5 代病毒，PCR 使用引物 zP19 和 zP20（引物序列见表 1）得 2310bp 条带，确认
25 VSC20-mT/mCherry 单克隆重组病毒（图 3）。采用 Z11、Z15、zP19 和 zP20 测序（引物序列见表 1）确认序列无误。VSC20-mT/mCherry 病毒载体缺失 VGF 基因功能、在 E10R 基因 3'UTR 区域插入 4 个重复 miR199T 序列及 mCherry 红色标记基因以供筛选（图 4）。

30 制备例 3：MiTDvv-mCherry 骨架病毒的包装及鉴定

1) 溶瘤痘病毒的重组: CV1 细胞铺于 6 孔板中, 4×10^5 个细胞/孔, 使得次日细胞密度达到 80%-90%; 弃掉 6 孔板中的 MEM 培养基, 两个孔分别加入 1 ml 无血清无抗生素的 MEM 培养基, 其中含有 8×10^3 pfu 的 VSC20-mT/mCherry 使其感染浓度为 0.02MOI, 37°C 培养 2 小时, 弃掉培养液置换为 2%FBS+1%P/S 的 MEM 培养基, 加入 300 μ l pCB 质粒/Lipo3000 混合液 (配制同制备例 2), 24-48 小时后显微镜下观察见细胞完全病变后, 收集上清及细胞, 反复冻融 3 次, 300g 离心 5 分钟, 收集上清中释放的病毒, 标注为 P0 代病毒, 使用 TIANamp Virus DNA/RNA 试剂盒 (TIANGEN, DP315) 抽提病毒基因组, 采用 PCR 法使用 P5/P18 引物确认 MiTDvv-mCherry 病毒重组成功。

2) gpt 药物筛选: 使用 60 mm 培养皿培养 CV1 细胞, 达到 80% 满时加入 1ml 用 MEM 稀释后的病毒稀释液, 含 150 μ l P0 代病毒, 感染 2 小时后, 加 4ml 含 0.5 \times gpt 筛选药物进行筛选, 观察细胞病变, 收集病毒标注 P1 代病毒; 重复 2 次以上步骤获得 P3 代病毒。

3) 单克隆重组溶瘤痘病毒的筛选: 具体操作同制备例 2, 使用 CV1 细胞感染梯度稀释的 P3 代病毒 4 小时后, 加入 10ml 的 2%(w/v) 琼脂糖凝胶对病毒固定培养 48 小时左右, 挑取红色荧光的单个空斑进行 PCR 法鉴定, 根据 PCR 结果取阳性克隆进行 P4-P5 代重复筛选, 获得 MiTDvv-mCherry 单克隆病毒, PCR 法鉴定含 1840bp (引物 P5 和 P18 序列见表 1) 条带且不含 622bp (引物 P1 和 P2 序列见表 1) 条带 (图 5)。并采用引物 P5 和 P18 测序检测确认 (北京擎科新业生物技术有限公司), MiTDvv-mCherry 骨架病毒是双缺失 VGF 功能基因和 TK 功能基因、在 E10R 基因 3'UTR 区域插入 4 个重复片段 miR199T 序列及 mCherry 红色标记基因、同时在 TK 基因区域携带 gpt 筛选基因 (图 6)。

制备例 4: MiTDvv-hIL21-mCherry 溶瘤病毒的包装及鉴定

1) 溶瘤痘病毒的重组: CV1 细胞铺于 6 孔板中, 4×10^5 个细胞/孔, 使得次日细胞密度达到 80%-90%; 弃掉 6 孔板中的 MEM 培养基, 两个孔分别加入 1 ml 无血清无抗生素的 MEM 培养基, 其中含有

5 8×10^3 pfu 的 DDvv-hIL21 病毒（制备方法如中国专利公开 CN109554353A 所述，其全部内容以引用方式并入本文），使其感染浓度为 0.02MOI。37°C 培养 2 小时，弃掉培养液替换为 2%FBS + 1%P/S 的 MEM 培养基，加入 300 μ l pZB-E10R-miR199T 质粒/Lipo3000 混合液（配制同制备例 2），24-48 小时后显微镜下观察见细胞完全病变后，收集上清及细胞，反复冻融 3 次，300g 离心 5 分钟，收集上清中释放的病毒，标注为 P0 代病毒。使用 TIANamp Virus DNA/RNA 试剂盒（TIANGEN，DP315）抽提病毒基因组，采用 PCR 法使用 zP19/zP20 引物确认 MiTDvv-hIL21-mCherry 溶瘤病毒重组成功。

10 2) 单克隆重组溶瘤痘病毒的筛选：具体操作同制备例 2)，使用 CV1 细胞感染梯度稀释的 P0 代病毒 4 小时后，加入 10ml 的 2%(w/v) 琼脂糖凝胶对病毒固定培养 48 小时左右，挑取红色荧光的单个空斑进行 PCR 法鉴定，根据 PCR 结果取阳性克隆进行 P2-P5 代重复筛选，获得单克隆病毒，PCR 法鉴定（引物 zP19 和 zP20 序列见表 1）含 2310bp
15 （图 7），并采用 Z11、Z15、zP19 和 zP20 测序（引物序列见表 1）确认序列无误（北京擎科新业生物技术有限公司）。MiTDvv-hIL21-mCherry 溶瘤病毒双缺失 VGF 功能基因和 TK 功能基因，在 E10R 基因 3'UTR 区域插入 4 个重复 miR199T 序列及 mCherry 红色标记基因，同时在 TK 基因区域携带 IL-21 功能基因（图 8）。

20

制备例 5：通过 Cre-LoxP 剪切系统制备 MiTDvv 骨架病毒和 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒

25 MiTDvv 骨架病毒（去除 mCherry/Zeocin 序列的 MiTDvv-mCherry 病毒）和 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒（去除 mCherry/Zeocin 序列的 MiTDvv-hIL21-mCherry 病毒）的获得：

30 1) CV1 细胞铺于 6 孔板中， 4×10^5 个细胞/孔，使得次日细胞密度达到 70%左右，换置 5%FBS + 1%P/S 的 MEM 培养基后每孔加入 300 μ l pBS185 CMV-Cre 质粒（该质粒由 CMV 启动子启动，能在哺乳动物细胞内表达 Cre 酶，购自 Addgene，货号#11916）/Lipo3000 混合液（配制同制备例 2），于培养箱中 37°C，5% CO₂ 培养 24 小时后，每孔分

别加入 8×10^5 pfu 的 MiTDvv-mCherry 和 MiTDvv-hIL21-mCherry 病毒，同时设置只加病毒和只转质粒的对照孔，十字混匀，继续培养 24 小时后显微镜下观察，待细胞完全病变后，收集病毒，反复冻融 3 次，300 g 离心 5 分钟，收集上清液，标注为 P0 代病毒。

5 2) CV1 细胞铺于 5 个 100mm 培养皿中，使得次日细胞密度达到 80%-90%，将 P0 代病毒按 10 倍梯度稀释为 10^{-1} - 10^{-5} ，弃培养皿中 MEM 培养基，每个培养皿中分别加入 3 ml MEM 培养基进行梯度稀释的病毒液，放入培养箱 37°C，5% CO₂ 孵育 2 小时，期间每隔 30 分钟十字混匀一次，再继续孵育 2 小时后，弃培养基，加入 10 ml 的 2%(w/v)琼脂糖凝胶，待凝固后放于培养箱继续培养，48 小时左右，挑取不带有红色荧光的单个空斑至 200 μ l 的无菌 PBS 中，反复冻融三次释放病毒，
10 每个空斑分别取 100 μ l 的病毒液在 24 孔板中采用 80%满孔的 CV1 细胞进行小扩，约 48 小时待细胞完全病变后，收集病毒标记为 P1-X (X 为数字 1, 2, 3, 4.....，代表不同病毒克隆)，每个空斑吸取 200 μ l 病毒液抽提基因组，使用 PCR 法鉴定 (引物 zP19 和 zP20，序列见表 1)。
15

3) 重复步骤 2) 1 次，获得 P2 代单克隆病毒 MiTDvv 和 MiTDvv-hIL21，使用 PCR 法鉴定 (引物 zP19 和 zP20，序列见表 1)，并采用 zP19 和 zP20 测序 (引物序列见表 1) 确认序列无误 (北京擎科新业生物技术有限公司) 后，保存于 -80°C。

20 PCR 和测序结果显示，MiTDvv 骨架病毒中 4 个重复的 miR199T 序列已整合到 Dvv-VSC20 痘病毒 E10R 3'端 UTR 区，且不含 mCherry/Zeocin 序列，gpt 基因整合到 TK 区使 TK 功能失活；MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒中 4 个重复的 miR199T 序列已整合到 DDvv-hIL21 痘病毒 E10R 3'端 UTR 区，且不含 mCherry/Zeocin 序列，
25 即 2 株病毒重组成功 (图 9)，病毒结构如图 10。

制备例 6: 溶瘤病毒的生产 and 纯化

1) HeLa 细胞铺于 150 mm 培养皿以使其第二天达到 80%左右，共 50 个皿，分别以 0.2 MOI P2 代 1 号单克隆 MiTDvv 骨架病毒和 P2 代 1 号单克隆 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒进行感染，约 2-3 天后，显微镜
30

下观察细胞发生病变呈圆串珠状，使用细胞刮刀收集培养液和细胞；

2) 25924×g 4℃离心 30 分钟，弃掉上清，沉淀物中加入 20ml 含 10%FBS 的 MEM，重悬，使用液氮/高压灭菌水反复冻融三次，25924×g 4℃离心 30 分钟，沉淀物使用 20ml PBS 清洗，25924×g 4℃离心 30 分钟，沉淀物重悬于 10mL 的 10 mM Tris pH9.0。60W 4℃超声 30 秒、间隔 30 秒、共 3 分钟，300×g 离心 5 分钟，收集上清备用。另取 13.2 ml 超速离心管，加入 6ml 36%(w/v)的蔗糖，从上往下缓慢加入 5ml 病毒上清，32900×g 4℃离心 80 分钟，沉淀物重悬于 5ml 1mM Tris pH9.0，超声 30 秒、间隔 30 秒、共 3 分钟；

3) 蔗糖梯度纯化管的制备及加样：使用 13.2ml 超速离心管分别缓慢加入 2.2ml 40%(w/v)、36%(w/v)、32%(w/v)、28%(w/v)、24%(w/v) 蔗糖溶液，制备成蔗糖梯度纯化管，随后贴着离心管壁在液面上缓慢加入 2 ml 步骤 2) 所得病毒悬液，26000×g 4℃离心 50 分钟后，肉眼可见超速离心管中间呈乳白色的病毒条带，使用 18G-5ml 针管针头刺穿超速离心管吸取病毒条带，置于新的离心管中（记录吸取病毒条带的体积为 V1）；

4) 加入 2 倍 V1 体积的 1mM Tris pH9.0 缓冲液清洗病毒去除残余的蔗糖，32900g 4℃离心 1 小时，弃上清，沉淀物重悬于 5 ml 的 1mM Tris pH9.0，4℃超声 30 秒、间隔 30 秒、共 3 分钟，分装 50 μl/管在无菌 EP 管中，储存于-80℃，同时采用常规空斑法进行病毒滴度检测，MiTDvv-hIL21 滴度检测结果为 6.4×10^9 pfu/ml，MiTDvv 滴度检测结果为 1.92×10^9 pfu/ml。

实施例 1：MiTDvv 骨架病毒对肿瘤细胞的选择性复制

人正常脐静脉内皮细胞 HUVEC 和人宫颈癌细胞 Hela 以 3×10^5 细胞/孔铺入 6 孔板，37℃，5% CO₂ 培养过夜，使其在第二天达到 70%。分别加入 0.1MOI 的通过上述方法制备的 MiTDvv 病毒，感染 2 小时后，换成含 5% FBS 的各自培养基，培养 24 小时和 48 小时后，收取细胞培养液和细胞，反复冻溶 3 次以完成裂解细胞，裂解液使用常规空斑法检测病毒含量。

结果如图 11 所示,在 0.1 MOI 感染条件下,MiTDvv 病毒在 HUVEC 正常细胞内复制低于在 HeLa 肿瘤细胞内复制。图 11A 示出 MiTDvv 骨架病毒分别感染 HUVEC 细胞和 HeLa 细胞后 24 小时后的病毒含量,图 11B 示出 MiTDvv 骨架病毒分别感染 HUVEC 细胞和 HeLa 细胞后 48 小时后的病毒含量;图 11C 示出 MiTDvv 骨架病毒在 HeLa 细胞内复制与在 HUVEC 细胞内复制的比值,其中病毒感染细胞后 24 小时和 48 小时后,病毒在 HeLa 细胞内复制量分别是在 HUVEC 细胞内复制量的 50.46 倍和 60.56 倍。

5

10

实施例 2: MiTDvv 骨架病毒与 DDvv-RFP 骨架病毒对正常细胞株的体外杀伤比较

人正常胚肺成纤维细胞 MRC-5 以 1×10^4 细胞/孔铺入 96 孔板, 37°C , 5% CO_2 培养过夜,使其在第二天达到 80%。分别加入 0.03MOI 和 0.1MOI 的通过上述方法制备的 DDvv-RFP 和 MiTDvv 病毒,感染 2 小时后,换成含 5% FBS 的 DMEM 培养基。使用 xCELLigence 实时无标记细胞分析仪(RTCA)SP (ACEA, xCELLigenc RTCA SP) 检测细胞生长状况,检测时间为 24 小时 ($n=6$, 2-3 次重复实验)。实验中保留一组只有细胞不含病毒的孔(无病毒感染),作为阴性对照组,对照组均在相同时间做相应换液操作,每组为 6 个复孔。细胞杀伤率为实验组与阴性对照组百分比值。

15

20

结果如图 12 所示,在不同的 MOI 值情况下, MiTDvv 病毒对 MRC-5 正常细胞的杀伤显著均低于 DDvv 病毒 ($p < 0.001$)。

25

实施例 3: MiTDvv 骨架病毒与 DDvv-RFP 骨架病毒在正常细胞内的复制比较

人正常胚肺成纤维细胞 MRC-5 以 1×10^5 细胞/孔铺入 24 孔培板,使用 2%FBS 的 DMEM 培养基 37°C , 5% CO_2 培养过夜,使其在第二天达到 80%。分别加入 0.1 MOI 和 0.3 MOI 的通过上述方法制备的 DDvv-RFP 病毒和 MiTDvv 病毒,感染 2 小时后,换成含 5% FBS 的培养基。实验中保留一组只有细胞不含病毒的孔,作为阴性对照组,对

30

照组均在相同时间做相应换液操作。37℃，5% CO₂ 培养 24 小时后收集培养液和细胞，使用 TIANamp 病毒 DNA/RNA 试剂盒（TIANGEN，DP315）抽提病毒基因组，用 QPCR 法检测病毒 A46R 基因以进行病毒含量检测，引物序列如表 2。实验重复 3 次，取平均值做统计学分析。

5 表 2

引物	序列 5'-3'	公司
A46R-F	CAGGGAAACGGATGTATA (SEQ ID NO.25)	北京擎科新业生物技术有限公司
A46R-R	TGTGTTACAGAATCATATAAGG (SEQ ID NO.26)	

结果如图 13 所示，在不同的 MOI 值情况下，MiTDvv 病毒在 MRC-5 正常细胞中的复制均显著低于 DDvv 病毒(*p<0.01; **p<0.05)。

10 实施例 4：比较 MiTDvv-hIL21 和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对正常细胞的杀伤

人肺正常成纤维细胞 MRC-5 以 1×10⁴ 细胞/孔铺入 96 孔培养皿，使其在第二天达到 80%，分别加入 0.3 MOI、1MOI 的通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒，感染 2 小时
15 后，换液使用含 5% FBS 的 DMEM 培养液 37℃，5% CO₂ 培养 12 小时，使用 xCELLigence 实时无标记细胞分析仪(RTCA)SP (ACEA, xCELLigenc RTCA SP) 检测细胞生长状况。实验中保留一组 MRC-5 细胞，不加病毒，作为空白组对照组，对照组均在相应时间做相应换液操作。每组为 6 个孔，实验重复三次以上，取平均值做统计学分析。

20 结果如图 14 所示，MiTDvv-hIL21 和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对人肺正常成纤维细胞 MRC-5 的杀伤呈剂量递增趋势，在同一剂量下，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对人肺正常成纤维细胞 MRC-5 的杀伤明显弱于 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒 (0.3MOI, p<0.05; 1MOI, p<0.01)。

25 实施例 5：比较 MiTDvv-hIL21 和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在正常

细胞内的复制

人肺正常成纤维细胞 MRC-5 以 1×10^5 细胞/孔铺入 24 孔培养板，使其在第二天达到 80%，分别加入 0.1 MOI、0.3MOI 的通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒，感染 2 小时后，换液使用含 5% FBS 的 DMEM 培养液，37℃，5% CO₂ 培养 24 小时后收集培养液和细胞，使用 TIANamp 病毒 DNA/RNA 试剂盒抽提病毒基因组，用实时荧光定量 PCR 法检测病毒 A46R 基因进行病毒含量检测，引物序列如表 2。实验中保留一组 MRC-5 细胞不加病毒，作为空白对照组，对照组均在相应时间做相应换液操作。每组为 3 个复孔，取平均值做统计学分析。

结果如图 15 所示，在 0.1MOI 和 0.3MOI 感染条件下，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在正常细胞 MRC-5 中的复制比 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒均明显减低。

实施例 6: 比较 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在正常细胞和肿瘤细胞内的复制

人肺正常成纤维细胞 MRC-5 和人非小细胞肺癌细胞 A549 分别以 1×10^5 细胞/孔铺入 24 孔培养皿，使其在第二天达到 80%，分别加入 0.03 MOI、0.3MOI、3MOI 的通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒感染 2 小时后，换液使用含 5% FBS 的 DMEM 培养液，37℃，5% CO₂ 培养 24 小时后收集培养液和细胞，使用 TIANamp 病毒 DNA/RNA 试剂盒抽提病毒基因组，用实时荧光定量 PCR 法进行病毒含量检测，病毒基因为 A46R，引物序列如表 2。实验中保留一组细胞不加病毒，作为空白对照组，对照组均在相应时间做相应换液操作，每组为 3 个复孔。

结果如图 16A 所示，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在肿瘤细胞 A549 内的复制明显高于正常细胞 MRC-5。其中 0.03MOI、0.3MOI、3MOI 的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在肿瘤细胞 A549 中的复制与在正常细胞 MRC-5 中的复制比值 (A549/ MRC-5) 分别为 51、23、16 (图 16B)，其中 X 轴为溶瘤病毒在 A549 细胞中复制与在 MRC-5 细胞中复制的比

值（即 A549/MRC-5），Y 轴为病毒感染 MOI。

实施例 7: MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对不同肿瘤细胞株的体外杀伤

- 5 在 96 孔板中铺各类人肿瘤细胞，包括 SK-HEP-1 细胞（人肝癌细胞）、A549 细胞（人非小细胞肺癌细胞）、FaDu 细胞（人头颈部癌细胞）、PANC-1（人胰腺癌细胞）、U251 细胞（人脑胶质瘤细胞）、LOVO 细胞（人结直肠癌细胞）、MNNG/HOS C1 细胞（人骨肉瘤细胞），每孔 4000-5000 个细胞，37℃，5% CO₂ 培养过夜后使其达到 70%。
- 10 各孔吸弃一半体积的培养基，换液加入等体积含不同浓度通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒（0.001MOI、0.003MOI、0.01MOI、0.03MOI、0.1MOI、0.3MOI、1MOI、3MOI、10MOI）的无血清培养液感染 4 小时后，使用含 5% FBS 的细胞培养液换液，37℃，5% CO₂ 培养 48 小时（MNNG/HOS C1、A549、LOVO、FaDu）或 72 小时（SK-HEP-1、
- 15 U251、PANC-1），使用 MTT 法检测肿瘤细胞凋亡情况（n=6，2-3 次重复实验）。本试验的对照组为：阴性对照组（无病毒感染）及阳性对照组（10μM 紫杉醇，购自北京双鹭药业），每个处理组及对照组均设置 6 个复孔，细胞杀伤率（抑制率）为实验组或阳性对照组与阴性对照组百分比值。
- 20 结果显示，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对肿瘤细胞的杀伤作用呈剂量依赖关系（图 17），对 SK-HEP-1 细胞、U251 细胞、PANC-1 细胞、MNNG/HOS C1 细胞、A549 细胞、LOVO 细胞、FaDu 细胞的半数抑制率（IC₅₀）分别为 0.18、0.79、0.54、0.53、0.66、0.68、0.29（表 3）。

表 3

细胞株	IC ₅₀	
	48 小时	72 小时
FaDu	0.29	-
A549	0.66	-
LOVO	0.68	-
MNNG/HOS C1	0.53	-
SK-HEP-1	-	0.18
PANC-1	-	0.54
U251	-	0.79

实施例 8：评价不同细胞中 miR-199 成熟体表达水平与 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒细胞杀伤作用的相关性

- 5 1)评价不同肿瘤细胞 miR-199 的表达水平:将 HEK-293T 细胞(注:所有肿瘤细胞的 miR-199 的表达量是相对于 HEK-293T 细胞的)、MNNG/HOS C1 细胞、SaoS2 细胞(人骨肉瘤细胞)、A549 细胞、FaDu 细胞、SK-BR-3 细胞(人乳腺癌细胞)、HepG2 细胞(人肝癌细胞)、Hela 细胞(宫颈癌细胞)、SKOV3 细胞(人卵巢癌细胞)、MCF-7 细胞(人乳腺癌细胞)、C33A 细胞(人宫颈癌细胞)、LOVO 细胞、U251 细胞、HCT116 细胞(人结直肠癌细胞)、SK-HEP-1 细胞、CFPAC-1 细胞(人胰腺癌细胞)、PANC-1 细胞(人胰腺癌细胞)、NCI-H1299 细胞(人非小细胞肺癌)、U87MG 细胞(人脑胶质瘤细胞)分别铺于
- 10 6孔板上,细胞完全满盘后,弃除培养液,加入 1ml Trizol 试剂(Invitrogen 公司)提取 RNA,取 1 μ g RNA 使用反转录试剂盒(天根 cat# KR116-02)合成 cDNA 后,使用荧光定量 PCR 试剂盒(天根 cat# FP215-02)检测肿瘤细胞内 miR-199 成熟体(hsa-miR-199a-3p 或 hsa-miR-199b-3p)表达,采用通用茎环序列 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC
- 15

(SEQ ID NO.36) 加上 miR199-3p 成熟体 3'端的 7 个碱基的反向重复序列得到反转录引物 miR199-RT, 见表 4; QRT-PCR 引物序列 (由北京擎科新业生物技术有限公司合成) 如表 4, 同时使用内源基因 U6 作为内参计算 miR-199 的相对表达量。结果显示, MNNG/HOS C1 细胞、
 5 SaoS2 细胞是 miR-199 高表达株(++ , ≥10), FaDu 细胞、HepG2 细胞、SK-BR-3 细胞是 miR-199 中表达细胞株 (+ , ≥1 且 <10) , 其他肿瘤细胞株都是 miR-199 低表达细胞株 (± , <1) (图 18)。

表 4

引物	序列 5'-3'
U6-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAAATATG (SEQ ID NO.27)
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACATA (SEQ ID NO.28)
U6-R	CGCAGGGTCCGAGGTATTC (SEQ ID NO.29)
miR199-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTAACCAA (SEQ ID NO.30)
miR199-F	GCCGACAGTAGTCTGCACATTGG (SEQ ID NO.31)
miR199-R	CGCAGGGTCCGAGGTATTC (SEQ ID NO.32)

注: U6-RT 和 miR199-RT 为反转录引物; U6-F 和 U6-R 为 U6 的 QPCR 引物; miR199-F
 10 和 miR199-R 为 miR199 的 QPCR 引物。

2) 根据图 18 显示的细胞内 miR-199 的表达水平, 分别选择低、中、高表达的肿瘤细胞株 PANC-1、SK-HEP-1、FaDu、MNNG/HOS C1 细胞对通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒进行杀伤作用比较: 在 96 孔板分别铺 MNNG/HOS C1、FaDu、SK-HEP-1、PANC-1
 15 细胞, 每孔细胞数根据细胞生长速率调整, 培养过夜后使其达到 80%, 弃液后分别加入 100μl 含 0.1 MOI MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒的无血清培养液感染 4 小时后, 换液使用含 5% FBS 的细胞培养液培养 48 小时, 使用 MTT 法检测肿瘤细胞凋亡情况 (n=6, 2-3 次重复实验)。本试验的对照组为: 阴性对照组 (无病毒感染), 每个处理组及对照组均设置 6 个复孔, 细胞存活率为加病毒的实验组与阴性对照组的百分比值。
 20

结果显示, MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对低表达 miR-199 的肿瘤细胞的杀伤明显强于高表达 miR-199 的肿瘤细胞 (图 19)。

5 实施例 9: 评价 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对同类稳转高表达 miR-199 肿瘤细胞的杀伤作用

本实验的目的是为进一步验证本发明溶瘤病毒的机理。由于 TK/VGF 双缺失的溶瘤痘病毒本身对不同类肿瘤细胞存在杀伤差异, 因此为进一步验证本发明 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒能够受到微小 RNA 的调控, 因此构建了稳转高表达 miR-199 (包括 has-miR-199a-3p 和 has-miR-199b-3p) 的肿瘤细胞, 来在同一种肿瘤细胞中进行比较。

10 1) 构建携带 miR-199 的慢病毒: HEK-293 细胞 (Agilent Technologies) 使用 10%FBS+1%P/S 的 DMEM 培养基铺于 6 孔板中, 4×10^5 个细胞/孔, 使得次日细胞密度达到 70%左右, 换置 5%FBS+1%P/S 的 DMEM 培养基后, 每孔加入 300 μ l 质粒/Lipo3000 混合液 (配制同制备例 2) (制备 LV-miR199 慢病毒的质粒包含: p59-rev、pP60-VSV-G、p61-gag-P01 和 LV3-has-miR199-GFP, 购自上海吉玛制药技术有限公司, LV3-has-miR199-GFP 质粒包含能够表达 miR199 成熟体 hsa-miR-199a-3p 或 hsa-miR-199b-3p 的 DNA 序列:

20 5'-GATCCGACAGTAGTCTGCACATTGGTTATTCAAGAGATAACCAATGCAGACTACTGTCTTTTTTTGAATT-3' (SEQ ID NO.37), 并能表达可用于筛选和检测的 GFP 绿色荧光; 制备 LV-miRNC 慢病毒的质粒包含: p59-rev、pP60-VSV-G、p61-gag-P01 和 LV3-shNC, 购自上海吉玛制药技术有限公司, LV3-shNC 为对照质粒包含一段无关的对照 DNA 序列:

25 5'-GATCCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCGGAGAACTTTTTTTGAATT-3' (SEQ ID NO.38); 其中 LV3 是吉玛公司慢病毒质粒载体的编号, hsa 表示人源)。培养箱中 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 48 小时后收取上清, 4 $^{\circ}$ C 5000rpm/分钟离心 30 分钟, 收取上清, 0.45 μ m 滤膜过滤分装成 1ml 每管, -80 $^{\circ}$ C 保存, 分别为携带 miR-199 的慢病毒 LV-miR199 及骨架慢病毒 LV-miRNC。

2) 构建高表达 miR-199 的肿瘤细胞：分别使用 LV-miR199 慢病毒及骨架慢病毒 LV-miRNC 感染 HCT116 细胞（常规操作故不赘述）后，进行单克隆阳性细胞挑选，从而构建稳定表达 miR-199 的 HCT116-miR199 细胞株及阴性对照细胞株 HCT116-miRNC。使用细胞流式仪的绿色荧光通道检测 GFP 的表达（图 20A）和 PCR 法（图 20B）鉴定确认（可根据实验情况按常规操作调整，故不赘述）。QPCR 引物序列如表 4。流式检测结果显示，HCT116-miR199 细胞株及 HCT116-miRNC 细胞阳性转染率分别为 99.91%和 99.64%，PCR 结果确认 HCT116-miR199 细胞株高表达 miR-199（包括 has-miR-199a-3p 和 has-miR-199b-3p）。

3) 将 HCT116-miR199 细胞株及 HCT116-miRNC 细胞株分别用 10%FBS 的培养基以每孔 5000 个细胞铺于 96 孔板，培养过夜后使其达到 80%，弃液后分别加入 100 μ l 含 0.03MOI、0.3MOI、3MOI 的通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒无血清培养液，感染 4 小时后，换液使用含 5% FBS 的细胞培养液 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养 48 小时，使用 MTT 法检测肿瘤细胞凋亡情况（n=6，2-3 次重复实验）。本试验的对照组为：阴性对照组（无病毒感染），每个处理组及对照组均设置 6 个复孔，细胞杀伤率为实验组与阴性对照组百分比值。结果显示，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在高表达 miR-199 的肿瘤细胞中的杀伤力明显降低（图 21）。

实施例 10：MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对结直肠癌的抑瘤作用

使用对数生长期人结直肠癌 HCT116 细胞，构建重度免疫功能缺失的 NCG 小鼠肿瘤模型。实验采用重度免疫功能缺失的 NCG 小鼠（得自江苏集萃药康生物科技有限公司）（8 周龄，雌性），以每只 100 万个 HCT116 细胞接种于小鼠后腿背部皮下，当肿瘤体积在 100mm³ 左右时，瘤内注射通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒 5 \times 10⁵pfu/只小鼠，给药体积为 50 μ l，每组 4 只小鼠，每 3 天检测瘤体大小及体重。实验中设置给予 PBS 的对照组。结果显示，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒能够有效地抑制肿瘤的生长（图 22A）。给药后第 10 天开

始，给药组的相对肿瘤生长率（T/C，即给药组肿瘤体积与对照组肿瘤体积的百分比率，该值<40%时表示药物有效）小于 40%（图 22B）。在整个实验过程中小鼠体重未见明显下降（图 22C）。

5 实施例 11: MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对人骨肉瘤的抑瘤作用

使用对数生长期人骨肉瘤 MNNG/HOS C1 细胞，构建重度免疫功能缺失的 NCG 小鼠肿瘤模型。实验采用重度免疫功能缺失的 NCG 小鼠（得自江苏集萃药康生物科技有限公司）（8 周龄，雌性），每只给予 50 万个 MNNG/HOS C1 细胞接种于小鼠后腿背部皮下，当肿瘤体积在 100mm³ 左右时，瘤内注射通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒 1×10⁶pfu/只小鼠，给药体积为 50μl，每组 4 只，每 3 天检测瘤体大小及体重。实验中设置 PBS 的对照组。结果显示 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒也能够小鼠体内有效地抑制高表达 miR-199 的 MNNG/HOS C1 肿瘤的生长（图 23A）。给药后第 8 天开始相对肿瘤生长率（T/C）小于 40%（图 23B）。在整个实验过程中小鼠体重未见明显下降（图 23C）。

实施例 12: MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对人肝癌的抑瘤作用

使用对数生长期人肝癌 SK-HEP-1 细胞，构建重度免疫功能缺失的 NCG 小鼠肿瘤模型。实验采用重度免疫功能缺失的 NCG 小鼠（得自江苏集萃药康生物科技有限公司）（7 周龄，雌性），每只给予 1000 万个 SK-HEP-1 细胞接种于小鼠后腿背部皮下，当肿瘤体积在 100mm³ 左右时，瘤内注射通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒 2×10⁵pfu/只小鼠，给药体积为 50μl，每组 3-4 只小鼠，每 3 天检测瘤体大小及体重。实验中设置 PBS 的对照组。结果显示 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒能够有效的抑制肿瘤的生长（图 24A），在整个实验过程中小鼠体重未见明显下降（图 24B）。

30 实施例 13: 评价 MiTDvv-hIL21 和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对不同 miR-199 表达水平的肿瘤细胞的杀伤作用

在 96 孔板分别铺各类人肿瘤细胞，包括 MNNG/HOS C1、SaoS2、FaDu、SK-BR-3、HepG2、Hela、SKOV3、C33A、LOVO、U251、HCT116、SK-HEP-1、CFPAC-1、PANC-1 细胞，每孔 4000-5000 个细胞，37℃，5% CO₂ 培养过夜后使其达到 70%。换液加入含 0.3-10 MOI（由于各种肿瘤细胞对病毒敏感度不同，使用之前体外实验摸索的感染 MOI：0.3MOI 感染 MNNG/HOS C1、FaDu；1MOI 感染 LOVO、U251、SK-HEP-1；3MOI 感染 SaoS2、SK-BR-3、HepG2、Hela、SKOV3、C33A、CFPAC-1、PANC-1；10MOI 感染 HCT116）的通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒或 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒的无血清培养液感染 4 小时，之后换液使用含 5% FBS 的细胞培养液 37℃，5% CO₂ 培养 48 小时，使用 MTT 法检测肿瘤细胞凋亡情况（n=6，2-3 次重复实验）。本试验的阴性对照组为无病毒感染，每个处理组及对照组均设置 6 个复孔，细胞杀伤率（细胞生长抑制率）为实验组与阴性对照组百分比值。结果显示，在高表达 miR-199 的肿瘤细胞 MNNG/HOS C1 和 SaoS2 中，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对细胞杀伤无差别，但在中或低表达 miR-199 的肿瘤细胞 FaDu、SK-BR-3、HepG2、Hela、SKOV3、C33A、LOVO、U251、HCT116、SK-HEP-1、CFPAC-1、PANC-1 等细胞中，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒表现更强的杀伤力（图 25）。

20

实施例 14：评价 MiTDvv-hIL21 和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒对不同 miR-199 表达水平的荷瘤鼠的抑瘤效果

分别使用对数生长期人结直肠癌 HCT116 细胞和对数生长期人骨肉瘤 MNNG/HOS C1 细胞，构建重度免疫功能缺失的 NCG 小鼠肿瘤模型，其中按照实施例 10 和 11 所述的构建模型的方法，分别将高表达 miR-199 的人骨肉瘤 MNNG/HOS C1 和低表达 miR-199 的人结直肠癌 HCT116 细胞接种在 NCG 小鼠后腿背部皮下，当肿瘤体积在 100mm³ 左右时，分别瘤内注射通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤病毒和 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒，其中 MNNG/HOS C1 荷瘤鼠给药剂量为 1×10⁶pfu/只小鼠，HCT116 荷瘤鼠给药剂量为 5×10⁵pfu/只小鼠，给药

30

体积均为 50 μ l，每组 3 只小鼠，每 3 天检测瘤体大小及体重。结果显示，在 HCT116 和 MNNG/HOS C1 肿瘤模型组中都表现出较好的抑瘤作用，两者比较而言，在低表达 miR-199 的 HCT116 肿瘤中，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒抑瘤作用强于 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒（图 26A），然而在高表达 miR-199 的 MNNG/HOS C1 肿瘤中，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒抑瘤作用比 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒弱（图 26B）。

实施例 15：评价 MiTDvv-hIL21 与 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在小鼠体内的组织分布

8 周龄的正常 C57BL/6N 雌性小鼠静脉给予 200 μ l PBS，其中分别包含 1×10^9 pfu/kg 通过上述方法制备的 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒与 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒，每组 5 只小鼠。分别于给药后第一天（D1）、第三天（D3）、第 7 天（D7）及第 15 天（D15）处死 1 组小鼠（5 只），收取外周血、心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、卵巢、子宫，使用 QPCR 法检测痘病毒在各脏器的分布，检测病毒基因为 A46R，引物序列如表 2 所示。结果显示，MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒在卵巢、子宫、肝脏和脾脏内的复制比 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒低，在肺内病毒含量与给予 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒相似，在外周血中 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒含量比 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒高（图 27）。心脏和肾内未检测到 MiTDvv-hIL21 溶瘤痘病毒或 DDvv-hIL21 溶瘤痘病毒（图未显示）。

25

30

权 利 要 求 书

1. 一种分离的重组溶瘤痘病毒，该重组溶瘤痘病毒能够受微小 RNA 调控，所述微小 RNA 的表达量在哺乳动物的肿瘤细胞中比在同种哺乳动物的正常细胞中低，其中该重组溶瘤痘病毒基因组中的 E10R 基因的 3'UTR 区域中整合有所述微小 RNA 的靶序列。

2. 根据权利要求 1 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述微小 RNA 选自：miR-9、miR-15a、miR-16、miR-26a、miR-27b、miR-29b、miR-30a、miR-32、miR-33、miR-34、miR-95、miR-101、miR-122、miR-124、miR-125a、miR-125b、miR-126、miR-127、miR-128、miR-133b、miR-139、miR-140、miR-142、miR-143、miR-145、miR-181、miR-192、miR-195、miR-198、miR-199a、miR-199b、miR-200、miR-203、miR-204、miR-205、miR-218、miR-219、miR-220、miR-224、miR-345、miR-375；优选 miR-199a 和 miR-199b。

3. 根据权利要求 1 所述的重组溶瘤痘病毒，该重组溶瘤痘病毒是 TK 基因功能缺陷型的和/或 VGF 基因功能缺陷型的。

4. 根据权利要求 1 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述微小 RNA 的所述靶序列是重复的，所述重复包含 2-8 个重复。

5. 根据权利要求 3 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述重组溶瘤痘病毒的基因组中整合有外源 IL-21 基因，并且该 IL-21 基因能够在肿瘤细胞中表达。

6. 根据权利要求 3 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述 TK 基因通过插入外源核苷酸序列而使该 TK 基因功能缺陷。

7. 根据权利要求 5 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述外源 IL-21

基因插入在所述 TK 基因中，从而使该 TK 基因功能缺陷。

8. 根据权利要求 3 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述 VGF 基因通过基因敲除或插入外源核苷酸序列而使该 VGF 基因功能缺陷。

5

9. 根据权利要求 1 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述重组溶瘤痘病毒是 WR 株或惠氏株。

10

10. 根据权利要求 1 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述重组溶瘤痘病毒的基因组中还整合有外源筛选基因，所述外源筛选基因包括 gpt 基因和/或 LacZ 基因。

11. 根据权利要求 5 所述的重组溶瘤痘病毒，其中所述外源 IL-21 基因来自于小鼠或人。

15

12. 一种药物组合物，其中该药物组合物包括作为活性成分根据权利要求 1-11 中任一项所述的重组溶瘤痘病毒，及可药用辅料。

20

13. 根据权利要求 12 所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含 1×10^5 - 5×10^9 pfu 的所述重组溶瘤痘病毒。

14. 根据权利要求 12 所述的药物组合物，其中所述重组溶瘤痘病毒通过瘤内注射给药或静脉给药。

25

15. 一种用于制备权利要求 1-11 中任一项所述的重组溶瘤痘病毒的载体。

16. 根据权利要求 15 所述的载体，其中所述载体包含在启动子控制下的外源 IL-21 基因。

30

17. 一种含有权利要求 15 或 16 所述的载体的宿主细胞。

18. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的重组溶瘤痘病毒在制备用于治疗肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

5

19. 根据权利要求 18 所述的用途，其中所述肿瘤和/或癌症包括肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

10

20. 一种治疗肿瘤和/或癌症的方法，包括对肿瘤和/或癌症患者施用根据权利要求 1-11 中任一项所述的重组溶瘤痘病毒。

15

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述重组溶瘤痘病毒的施用剂量为 1×10^5 - 5×10^9 pfu，每天 1 次，连续施用 1-6 天；或每 2 天 1 次，连续施用 1-6 次。

22. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述溶瘤病毒通过瘤内注射给药或静脉给药。

20

23. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述肿瘤和/或癌症包括肺癌、黑色素瘤、头颈部癌症、肝癌、颅内肿瘤、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、胃癌、食道癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、骨癌、睾丸癌、骨肉瘤。

25

30

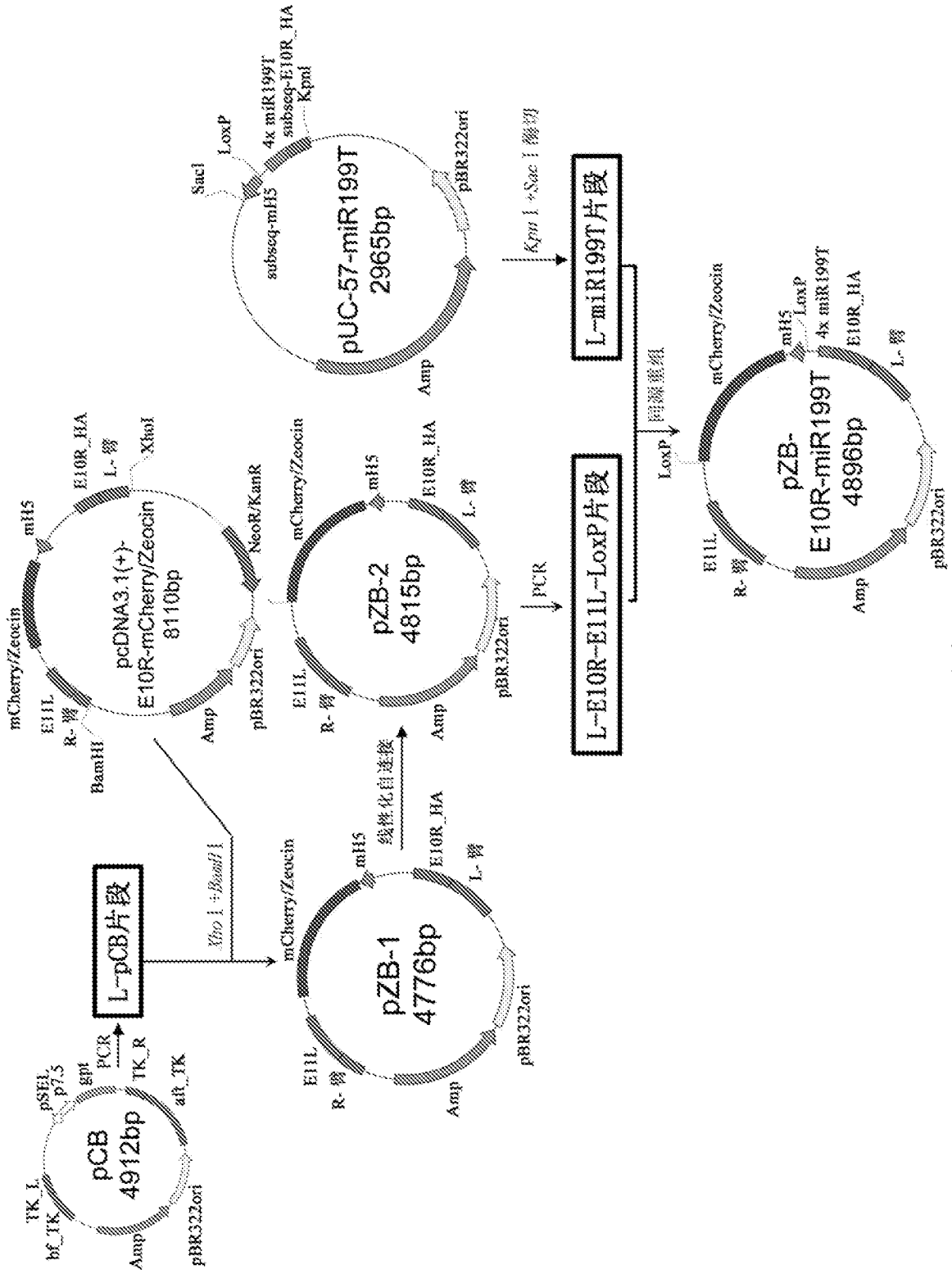


图 1

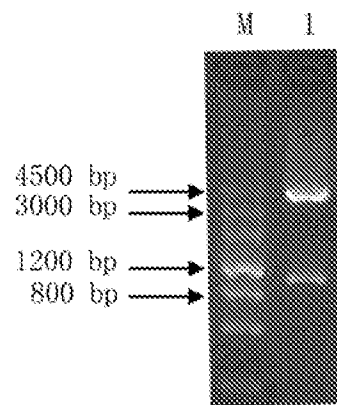


图 2

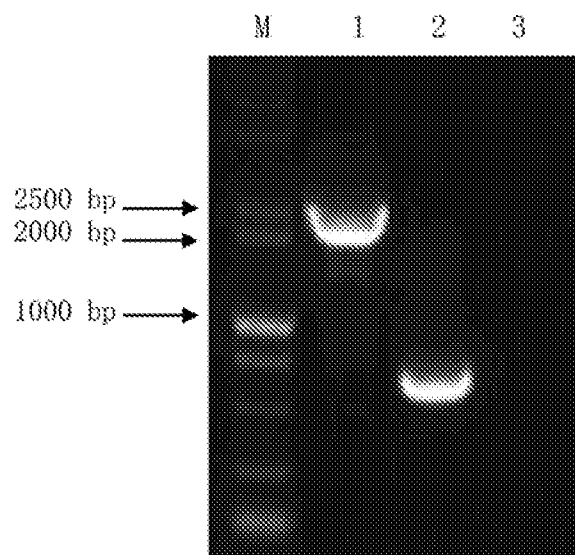


图 3

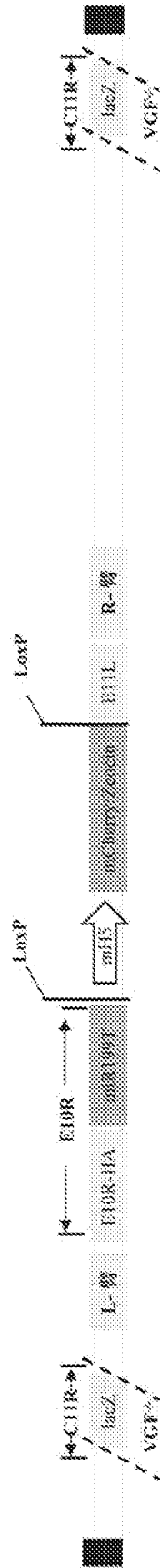


图 4

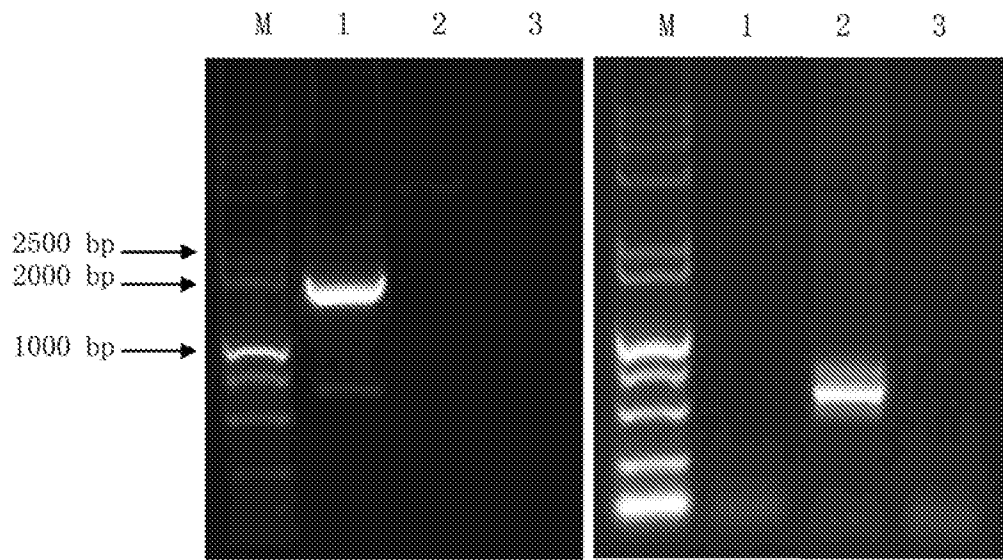


图 5

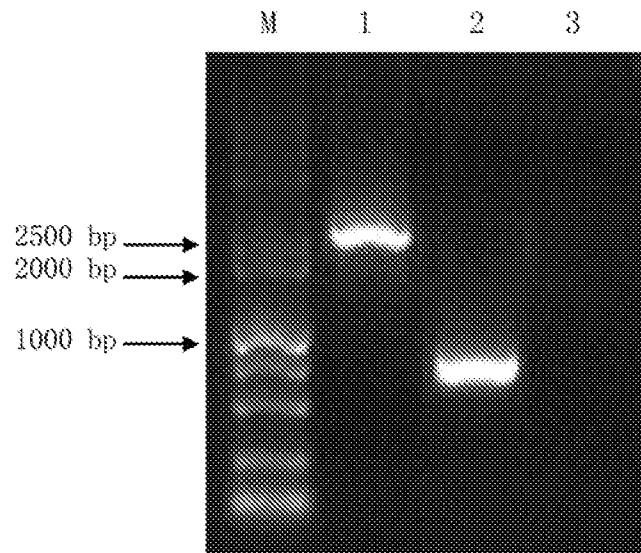


图 7

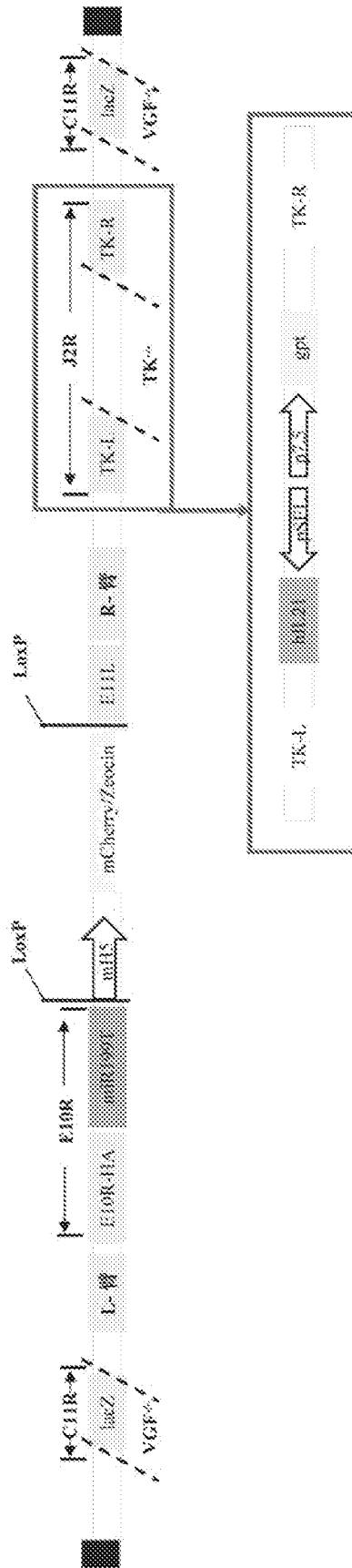


图 8

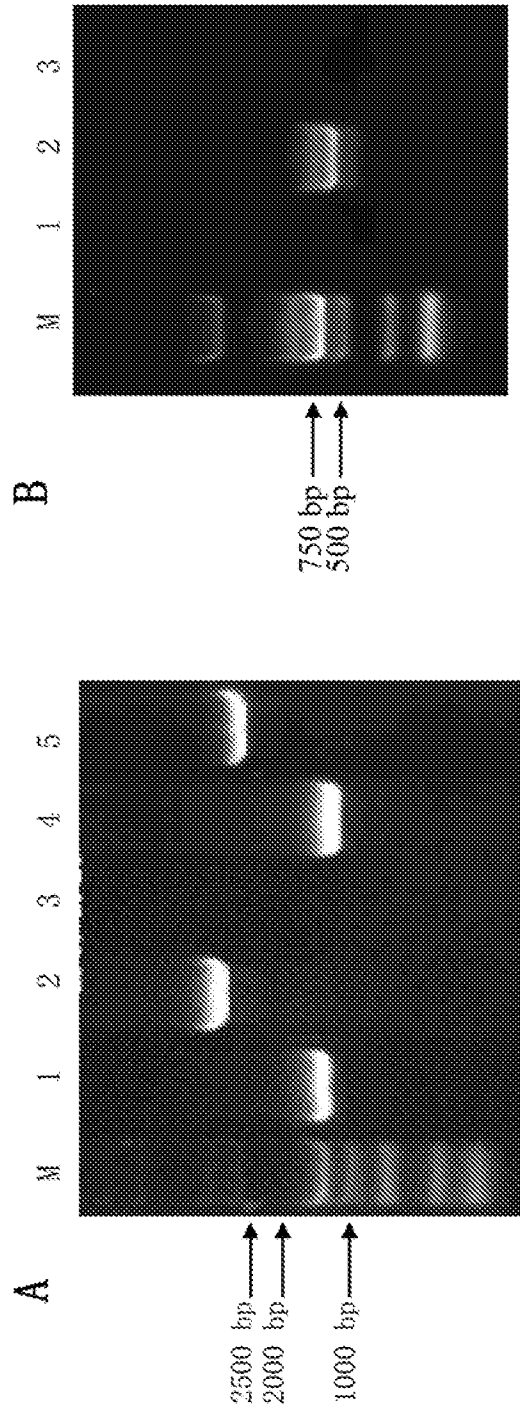


图 9

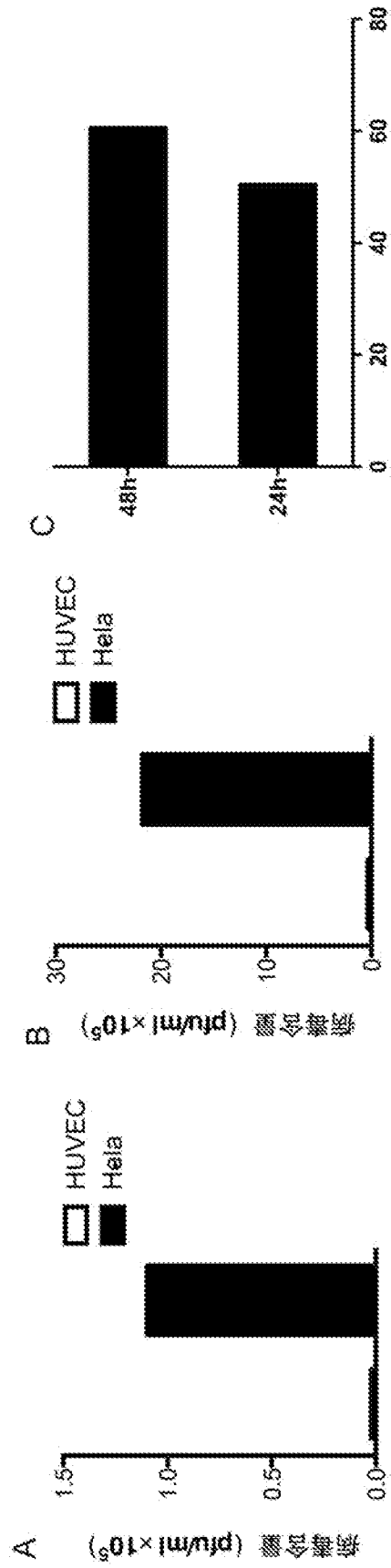


图 11

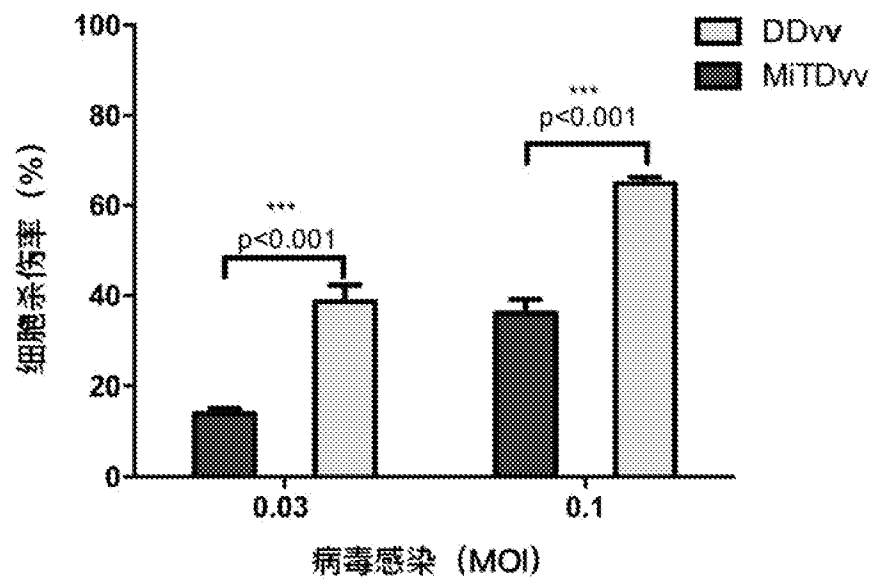


图 12

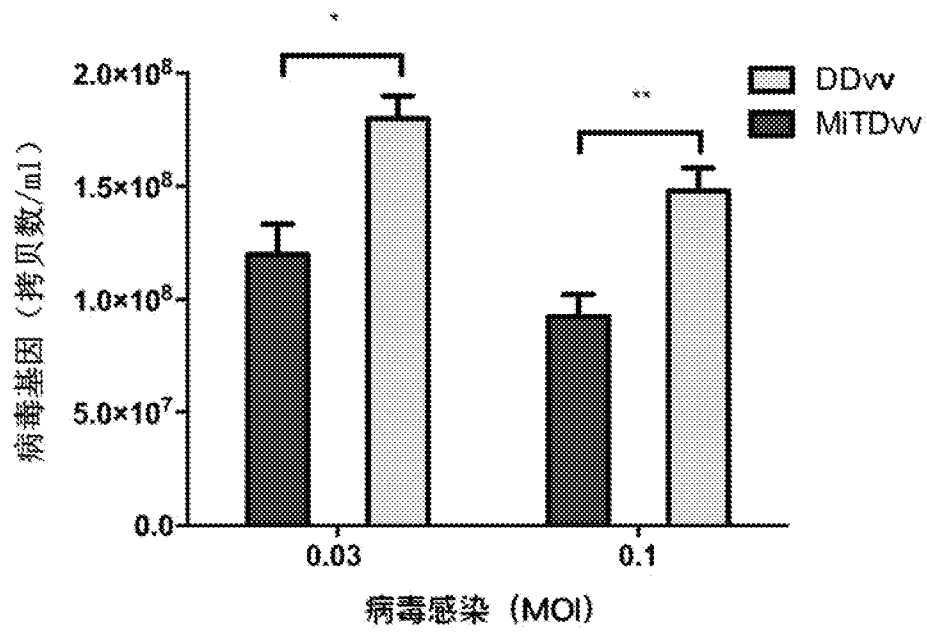


图 13

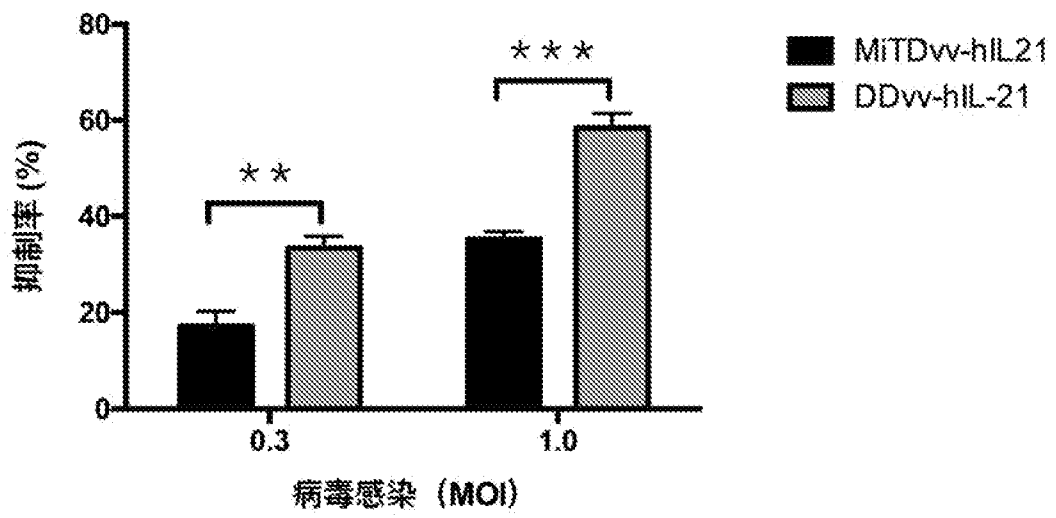


图 14

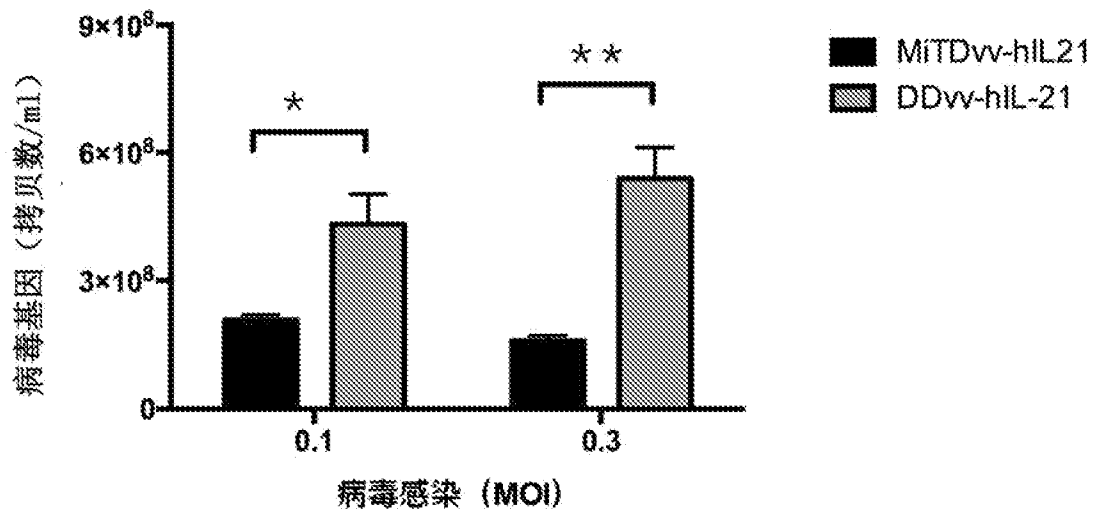


图 15

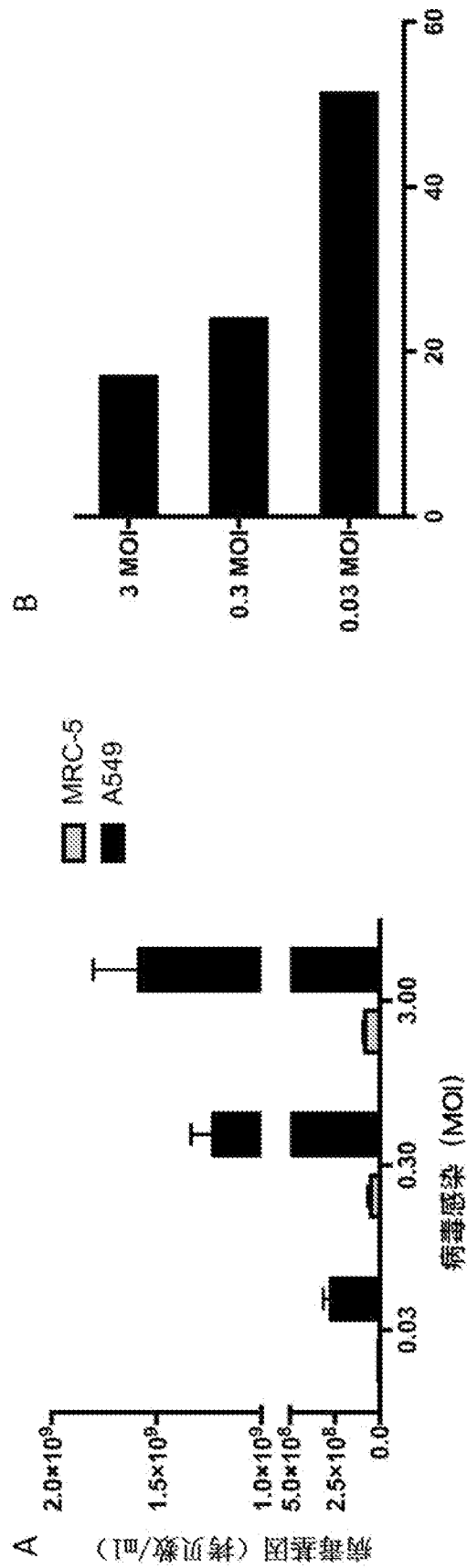


图 16

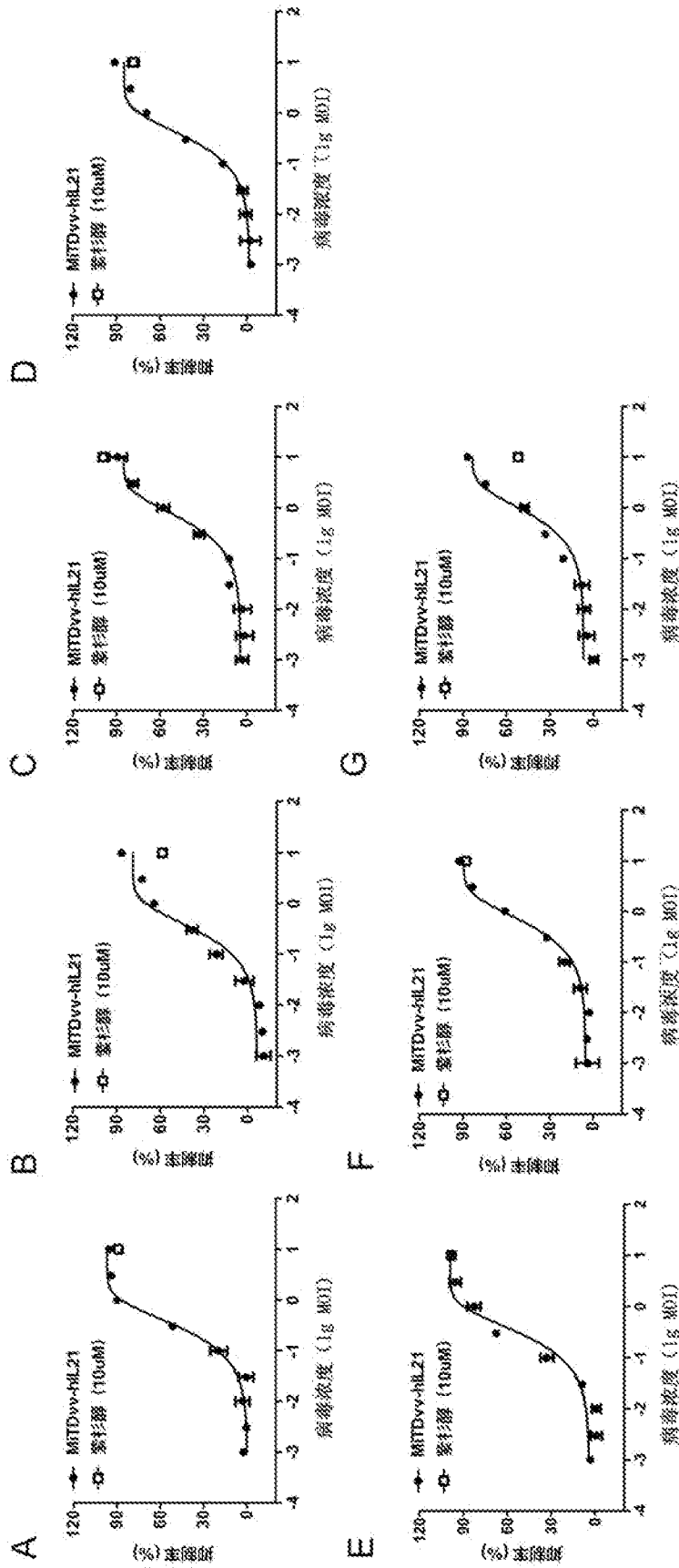


图 17

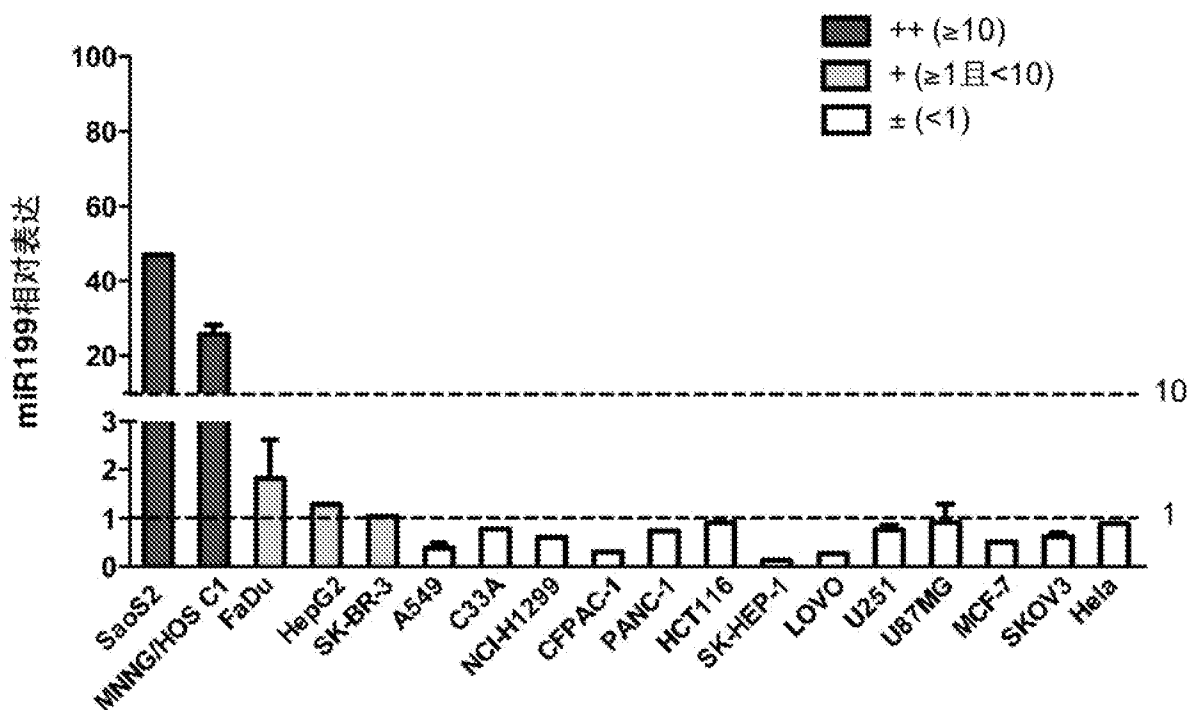


图 18

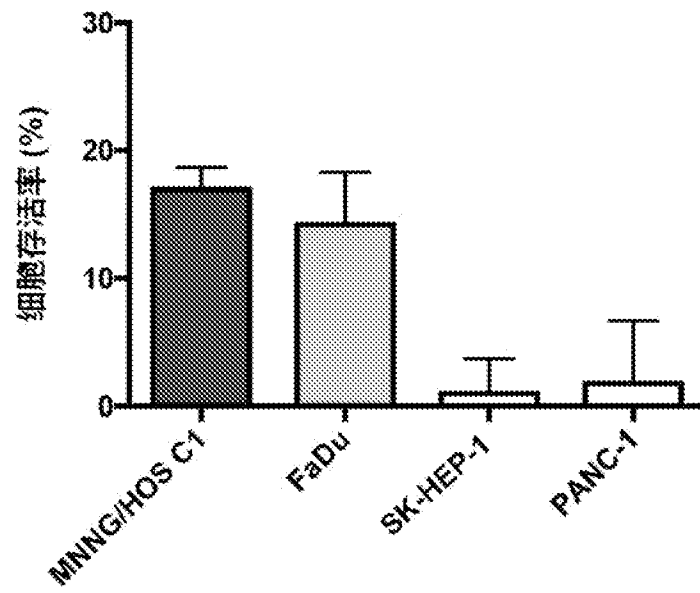


图 19

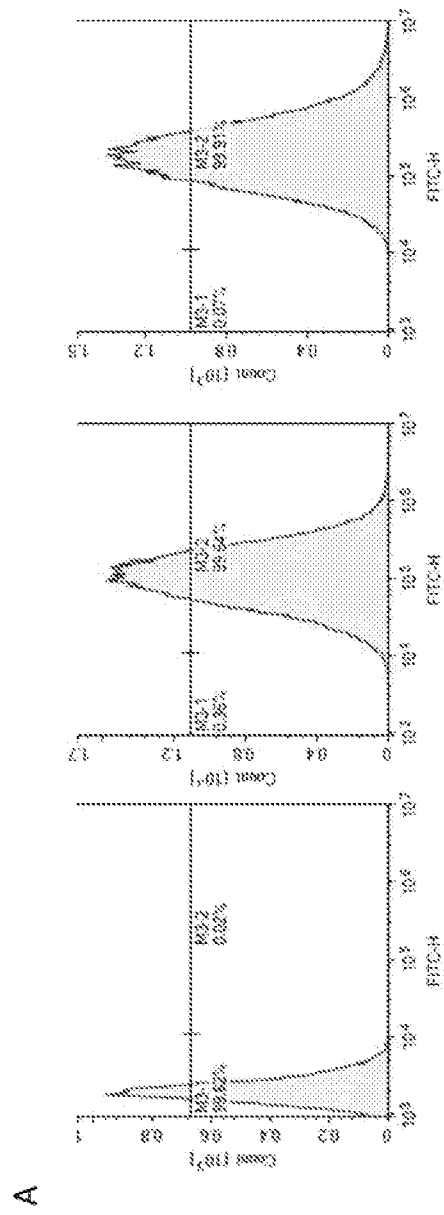
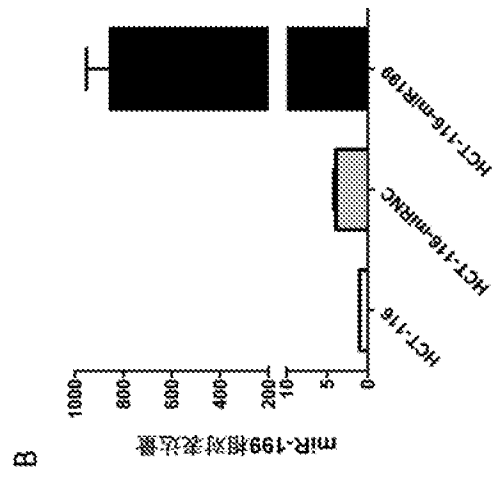


图 20

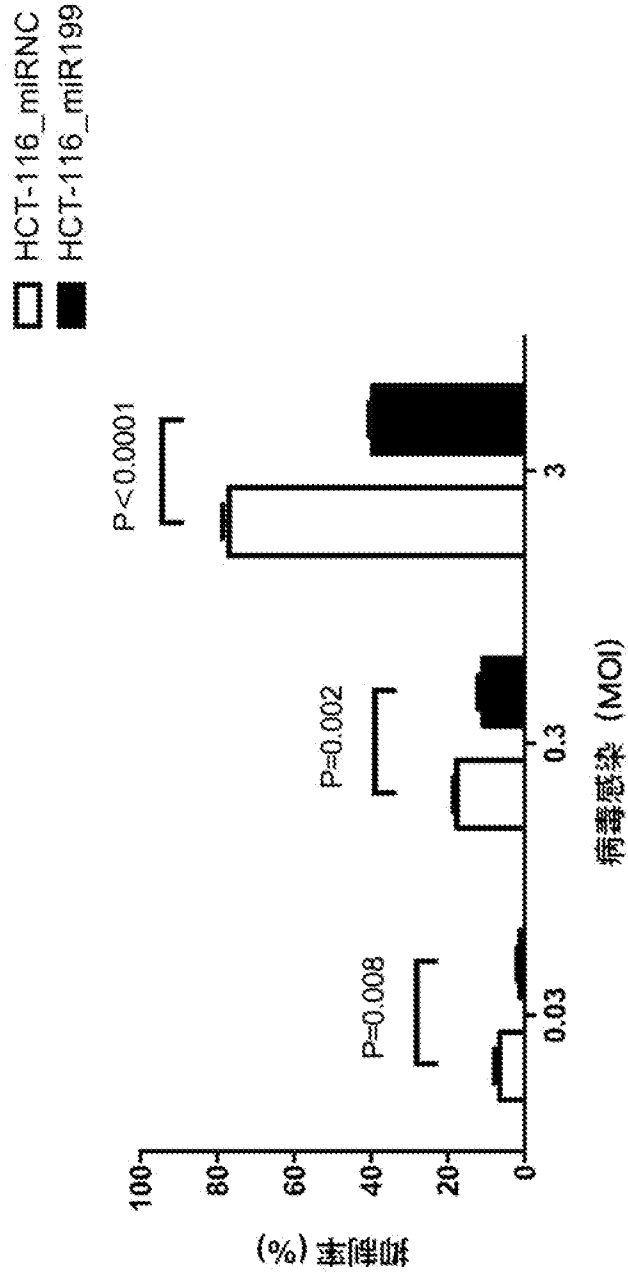


图 21

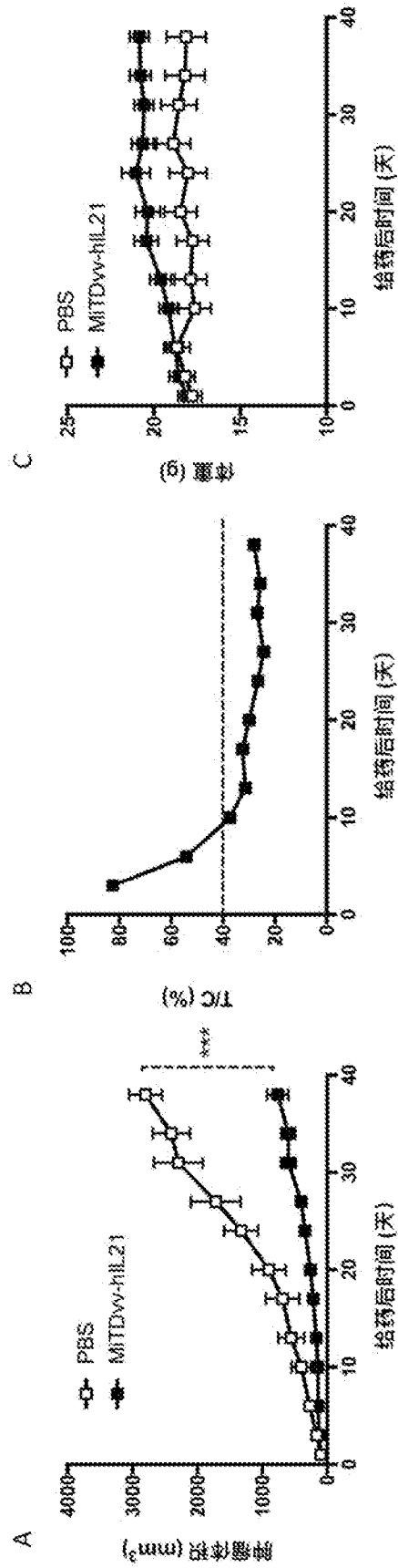


图 22

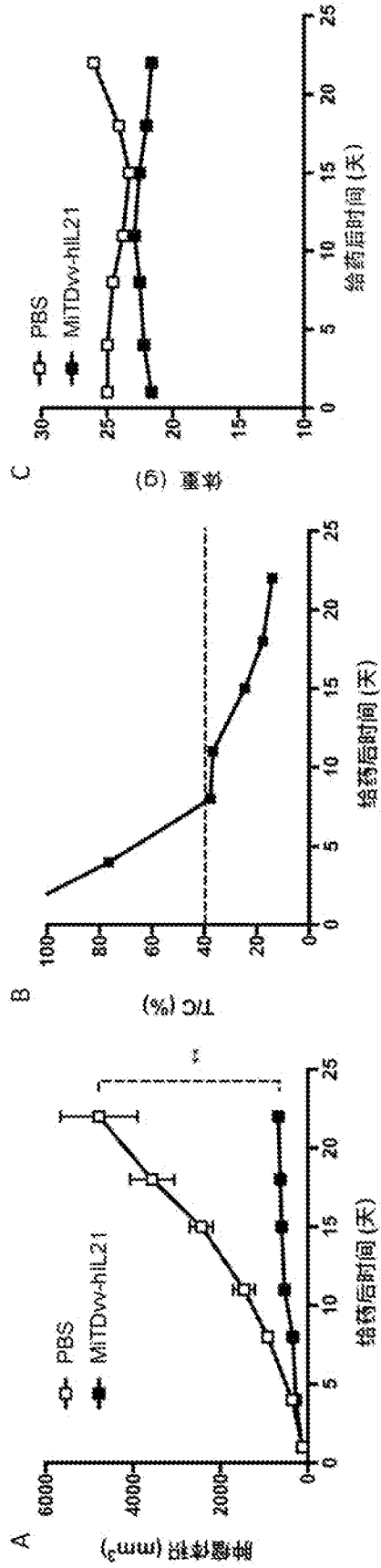


图 23

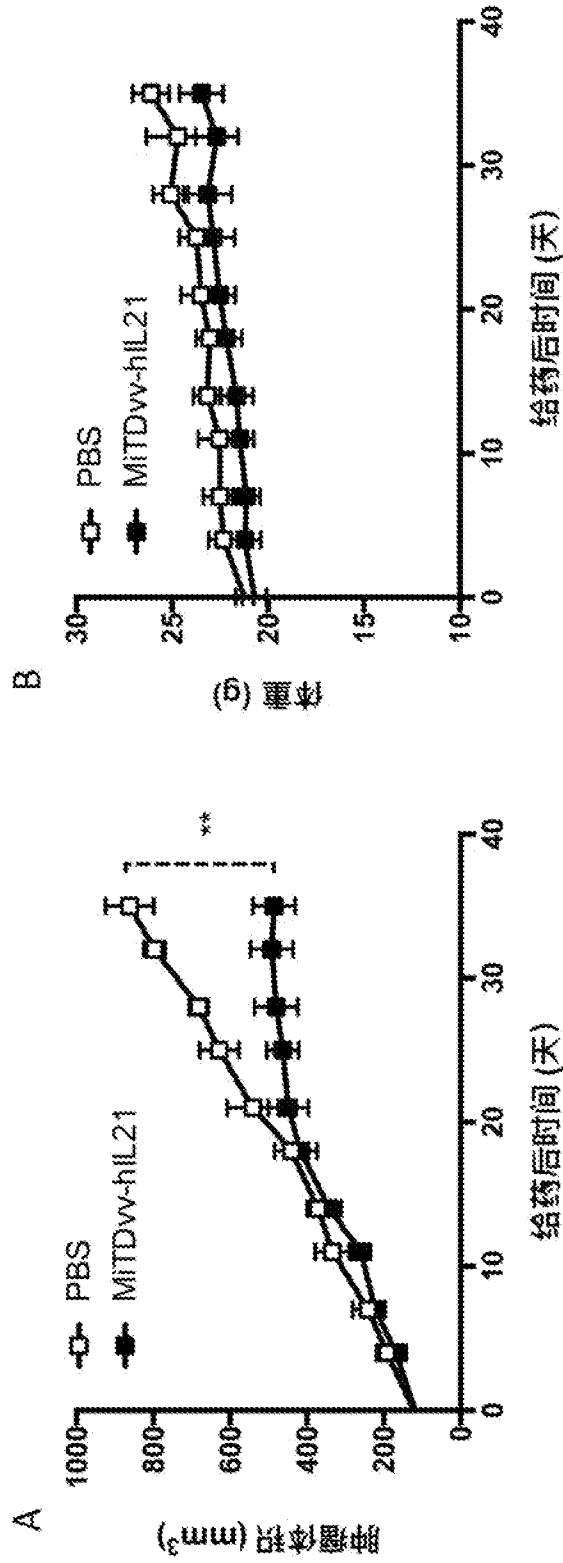


图 24

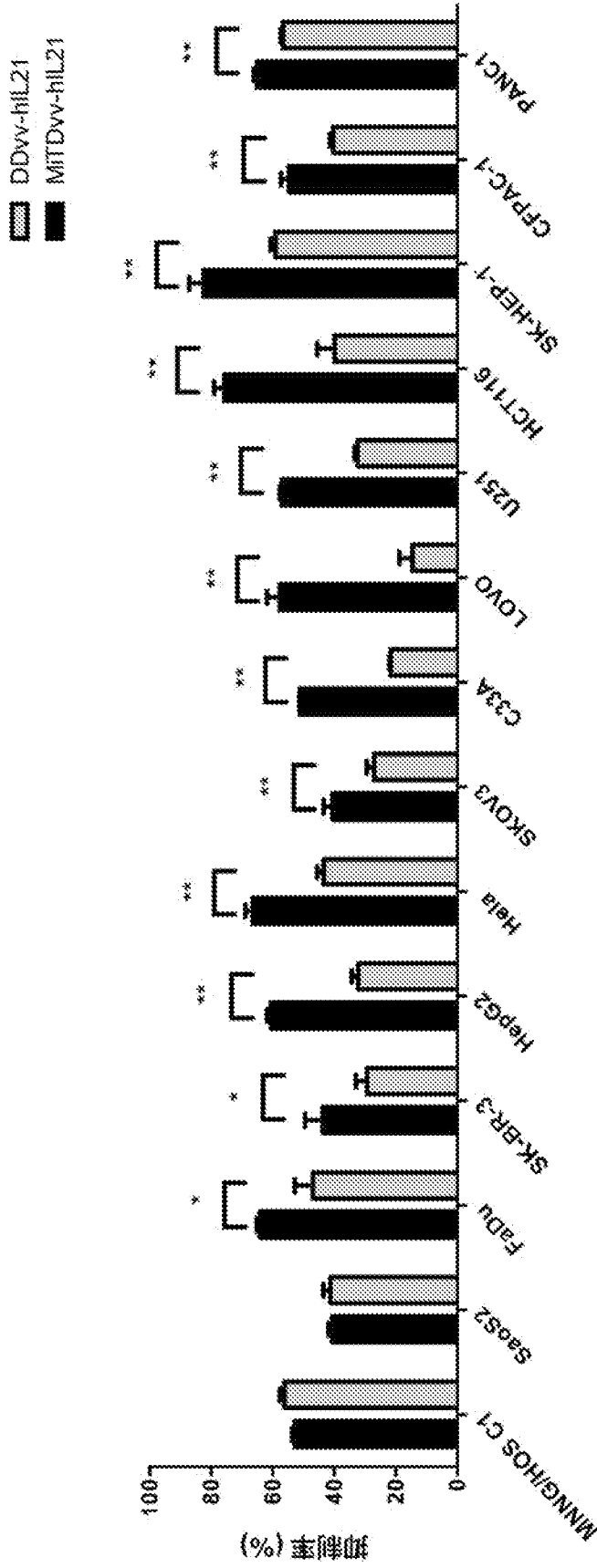


图 25

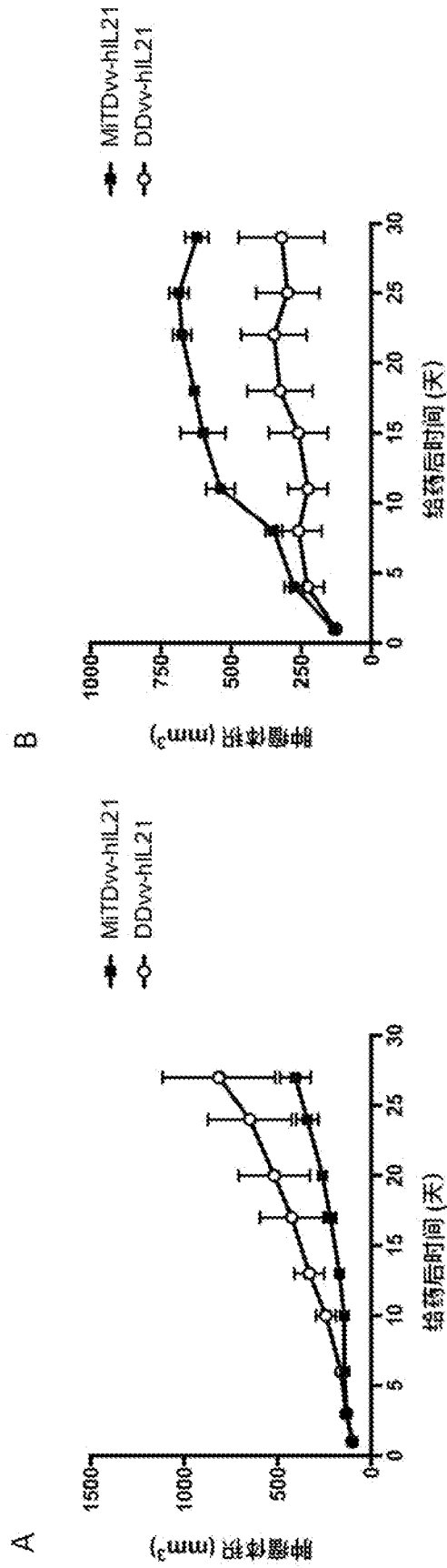


图 26

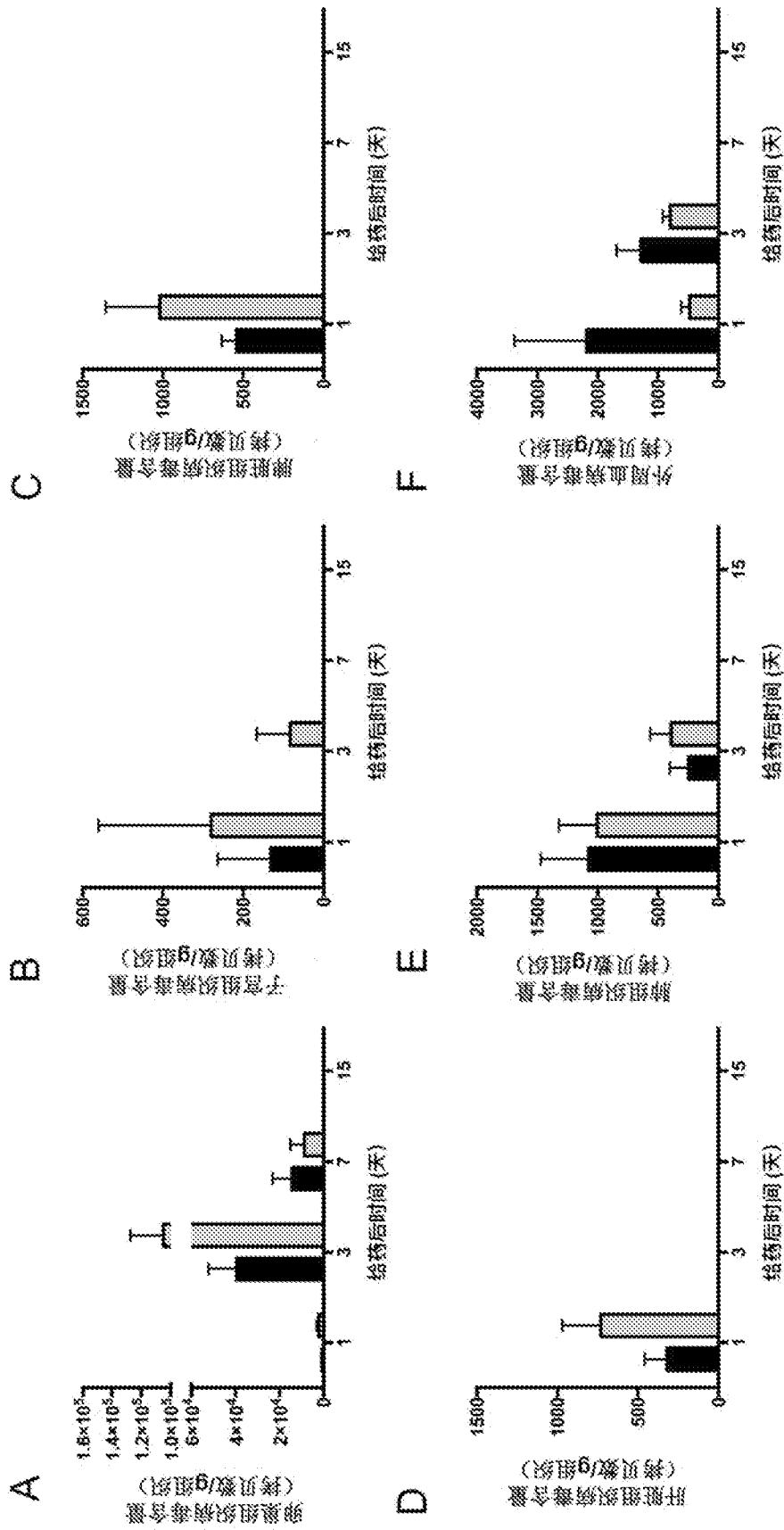


图 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/089255

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 35/768(2015.01)i; C12N 7/00(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/38(2006.01)i; C12N 15/33(2006.01)i; C12N 15/66(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) A61K; C12N; 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, VEN(DWPI+SIP0ABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI-WEB OF SCIENCE, Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统; CHINESE PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE RETRIEVAL SYSTEM; Search Terms: 溶瘤病毒, 痘病毒, 微小RNA, 靶序列, 靶标, 癌症, 肿瘤, Oncolytic virus, Poxvirus, miRNA, miR, target, cancer, tumor		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	刘超等 (LIU, Chao et al.). "表达mIL-21的溶瘤痘苗病毒对小鼠乳腺癌的治疗作用 (Therapeutic Effect of the Oncolytic Vaccinia Viruses with Expression of mIL-21 on Breast Cancer of Mouse)" 中国肿瘤生物治疗杂志 (<i>Chinese Journal of Cancer Biotherapy</i>), Vol. 24, No. 5, 09 May 2017 (2017-05-09), see the abstract, and page 473	15-17
A	CN 104178460 A (SHANGHAI FIRST PEOPLES HOSPITAL) 03 December 2014 (2014-12-03) see entire document	1-19
A	CN 108884448 A (ONCORUS INC.) 23 November 2018 (2018-11-23) see entire document	1-19
A	CN 109745343 A (BEIJING WEIYUAN LIKANG BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 14 May 2019 (2019-05-14) see entire document	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 12 July 2021		Date of mailing of the international search report 30 July 2021
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.

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 13ter.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 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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:

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.: **20-23**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] The subject matter of claims 20-23 relates to methods of treatment with respect to humans or animals.
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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/089255

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104178460	A	03 December 2014	CN	104178460	B	13 July 2018
CN	108884448	A	23 November 2018	AR	107469	A1	02 May 2018
				US	2020147156	A1	14 May 2020
				TW	201730335	A	01 September 2017
				RU	2018130673	A3	19 May 2020
				WO	2017132552	A1	03 August 2017
				CA	3011933	A1	03 August 2017
				BR	112018015390	A2	18 December 2018
				RU	2018130673	A	28 February 2020
				JP	2019508063	A	28 March 2019
				EP	3408382	A1	05 December 2018
				AU	2017212713	A1	26 July 2018
				US	10391132	B2	27 August 2019
				SG	11201806134S	A	30 August 2018
				US	2018339004	A1	29 November 2018
				KR	20180136435	A	24 December 2018
				MX	2018009126	A	21 August 2019
CN	109745343	A	14 May 2019	EP	3778882	A1	17 February 2021
				TW	1704226	B	11 September 2020
				CN	108635380	A	12 October 2018
				TW	201945542	A	01 December 2019
				WO	2019196617	A1	17 October 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/089255

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 35/768(2015.01)i; C12N 7/00(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/38(2006.01)i; C12N 15/33(2006.01)i; C12N 15/66(2006.01)i</p> <p>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</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; C12N; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>数据库: CNABS, VEN (DWPI+SIP0ABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI-WEB OF SCIENCE, Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统; 检索词: 溶瘤病毒, 痘病毒, 微小RNA, 靶序列, 靶标, 癌症, 肿瘤, Oncolytic virus, Poxvirus, miRNA, miR, target, cancer, tumor</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>刘超等. “表达mIL-21的溶瘤痘苗病毒对小鼠乳腺癌的治疗作用” 中国肿瘤生物治疗杂志, 第24卷, 第5期, 2017年 5月 9日 (2017 - 05 - 09), 参见摘要, 第473页</td> <td>15-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104178460 A (上海市第一人民医院) 2014年 12月 3日 (2014 - 12 - 03) 参见全文</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108884448 A (昂克诺斯公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 参见全文</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109745343 A (北京唯源立康生物科技有限公司) 2019年 5月 14日 (2019 - 05 - 14) 参见全文</td> <td>1-19</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	刘超等. “表达mIL-21的溶瘤痘苗病毒对小鼠乳腺癌的治疗作用” 中国肿瘤生物治疗杂志, 第24卷, 第5期, 2017年 5月 9日 (2017 - 05 - 09), 参见摘要, 第473页	15-17	A	CN 104178460 A (上海市第一人民医院) 2014年 12月 3日 (2014 - 12 - 03) 参见全文	1-19	A	CN 108884448 A (昂克诺斯公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 参见全文	1-19	A	CN 109745343 A (北京唯源立康生物科技有限公司) 2019年 5月 14日 (2019 - 05 - 14) 参见全文	1-19
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	刘超等. “表达mIL-21的溶瘤痘苗病毒对小鼠乳腺癌的治疗作用” 中国肿瘤生物治疗杂志, 第24卷, 第5期, 2017年 5月 9日 (2017 - 05 - 09), 参见摘要, 第473页	15-17															
A	CN 104178460 A (上海市第一人民医院) 2014年 12月 3日 (2014 - 12 - 03) 参见全文	1-19															
A	CN 108884448 A (昂克诺斯公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 参见全文	1-19															
A	CN 109745343 A (北京唯源立康生物科技有限公司) 2019年 5月 14日 (2019 - 05 - 14) 参见全文	1-19															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 7月 12日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 7月 30日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>石迪</p> <p>电话号码 010-62411299</p>															

第1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:

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： 20-23
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求20-23的主题涉及针对人体或动物的治疗方法。
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。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/089255

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)
CN	104178460	A	2014年 12月 3日	CN	104178460	B	2018年 7月 13日
CN	108884448	A	2018年 11月 23日	AR	107469	A1	2018年 5月 2日
				US	2020147156	A1	2020年 5月 14日
				TW	201730335	A	2017年 9月 1日
				RU	2018130673	A3	2020年 5月 19日
				WO	2017132552	A1	2017年 8月 3日
				CA	3011933	A1	2017年 8月 3日
				BR	112018015390	A2	2018年 12月 18日
				RU	2018130673	A	2020年 2月 28日
				JP	2019508063	A	2019年 3月 28日
				EP	3408382	A1	2018年 12月 5日
				AU	2017212713	A1	2018年 7月 26日
				US	10391132	B2	2019年 8月 27日
				SG	11201806134S	A	2018年 8月 30日
				US	2018339004	A1	2018年 11月 29日
				KR	20180136435	A	2018年 12月 24日
				MX	2018009126	A	2019年 8月 21日
CN	109745343	A	2019年 5月 14日	EP	3778882	A1	2021年 2月 17日
				TW	1704226	B	2020年 9月 11日
				CN	108635380	A	2018年 10月 12日
				TW	201945542	A	2019年 12月 1日
				WO	2019196617	A1	2019年 10月 17日