



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114096661 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 25

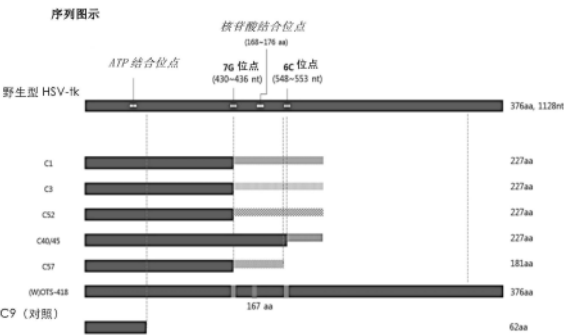
(21) 申请号 202080047363.4	(72) 发明人 黄泰皓 赵蒙
(22) 申请日 2020.06.29	(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 114096661 A	专利代理师 徐迅 崔佳佳
(43) 申请公布日 2022.02.25	(51) Int.Cl.
(30) 优先权数据 10-2019-0077377 2019.06.27 KR	C12N 7/01 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.12.27	C12N 15/54 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/KR2020/008472 2020.06.29	A61K 35/768 (2015.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/263059 KO 2020.12.30	A61K 31/522 (2006.01)
(73) 专利权人 拜耳诺克斯有限公司	A61P 35/00 (2006.01)
地址 韩国京畿道	C12R 1/93 (2006.01)
	(56) 对比文件
	CN 111556899 A, 2020.08.18
	审查员 张谨
	权利要求书1页 说明书16页
	序列表13页 附图23页

(54) 发明名称

改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒

(57) 摘要

本发明涉及一种改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒及其应用。本发明的改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒可以表达HSV-TK片段, 所述片段包括一个效应结构域, 所述效应结构域由能够磷酸化GCV或ACV且不具有胸苷激酶(TK)活性的最小氨基酸序列组成, 从而杀死感染肿瘤病毒的癌细胞, 甚至邻近的癌细胞。此外, GCV或ACV参与抑制病毒增殖, 并且即使在应用了大剂量病毒时也能由此调控病毒引发的副反应。进一步地, 即使由于GCV对病毒增殖的抑制作用, 使病毒颗粒的数量减少, 抗肿瘤效应仍然有所增强。因此, 本发明的改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒能够有效地用于治疗肿瘤。



1. 一种溶瘤病毒,其包含:
一段核苷酸序列,其编码由如SEQ ID NO:5、9或13所示的氨基酸序列组成的多肽,
其中所述溶瘤病毒衍生自痘苗病毒。
2. 如权利要求1所述的溶瘤病毒,其中所述编码多肽的核苷酸序列是SEQ ID NO:6、10或14所示的核苷酸序列。
3. 一种预防或治疗癌症的药物组合物,其包含如权利要求1或2所述的溶瘤病毒作为活性成分。
4. 如权利要求3所述的药物组合物,其中所述癌症选自下组:肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、或其组合。
5. 一种预防或治疗癌症的药物组合物,包含如权利要求1或2所述的溶瘤病毒;和更昔洛韦或阿昔洛韦作为活性成分。
6. 如权利要求5所述的药物组合物,其中包含在所述药物组合物中的所述溶瘤病毒和所述更昔洛韦或阿昔洛韦是同时给药或依次给药的。
7. 如权利要求5所述的药物组合物,其中所述更昔洛韦或阿昔洛韦以 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 到 $50\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 的剂量给药。
8. 如权利要求5所述的药物组合物,其中所述癌症选自下组:肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、或其组合。
9. 一种生产包含一段编码突变HSV-TK的基因的溶瘤痘苗病毒的方法,所述方法包括步骤:
 - i) 从痘苗病毒中去除TK基因,并使痘苗病毒与野生型HSV-TK基因重组;和
 - ii) 在宿主细胞中存在溴化脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)的情况下,持续进行重组痘苗病毒的传代培养,其中所述野生型HSV-TK基因编码如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述野生型HSV-TK基因是如SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列。
11. 如权利要求9所述的方法,其中所述溶瘤痘苗病毒不具有TK活性并能够磷酸化更昔洛韦或阿昔洛韦。
12. 如权利要求1或2所述的溶瘤病毒用于制备治疗癌症的药物的用途,其中所述癌症选自下组:肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、或其组合。

改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒

技术领域

[0001] 本发明设计一种改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒及其应用。

背景技术

[0002] 随着基因重组技术的全面使用,已开始使用强化了肿瘤选择性和抗肿瘤效果的溶瘤病毒开展临床研究。首次被文献报道的重组溶瘤病毒是一种单纯疱疹病毒。其后,针对使用其他病毒溶瘤的研究也已积极开展了。

[0003] 随着基于疱疹病毒的T-Vec(Talimogene laherparepvec)在美国和欧洲已成功地被商业化用于治疗晚期黑色素瘤,溶瘤病毒的使用已经引起了越来越多的注意。另一方面,胸苷激酶(TK)基因缺陷的痘苗病毒也有着大量临床应用;然而,由于其治疗窗较窄,在病毒的临床效果最大化方面有所限制。对于胸苷激酶缺陷痘苗病毒,由于病毒的毒性,狭窄的治疗窗意味着高剂量病毒可获得较好的临床疗效,但也会招致临床风险。

[0004] 事实上,在30名患有原发性肝癌的患者中进行的Pexa-Vec(JX-594;SillaJen, Inc.)二期临床试验表明,临床结果为高剂量组(10^9 pfu)相比低剂量组(10^8 pfu)有更高的生存率。然而,在针对瘤内给药进行的一期临床试验中,在 3×10^9 pfu的剂量中观察到剂量限制毒性(DLT),这使得最大耐受剂量被限定为 1×10^9 pfu。据报道这与药物无关。然而,溶瘤病毒治疗后的早期死亡已有频繁报道,提示了病毒的不良增殖可能导致不可预期的后果。这种剂量依赖性的疗效增加和剂量限制毒性意味着有需要开发一种更安全有效的痘苗病毒。

[0005] 同时,更昔洛韦(GCV)是一种抗病毒药剂,能够有效抗单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、和水痘带状疱疹病毒。当GCV与单纯疱疹病毒的TK结合,其5'端将被磷酸化并转变为三磷酸更昔洛韦(GCV-TP)。GCV-TP抑制了DNA聚合酶的活性,并结合到病毒DNA的3'端,终止DNA的延伸。GCV-TP作为一种剧毒物质,能够阻断细胞内DNA合成,从而表现出细胞毒性。

[0006] 进来,已开展了将HSV1-TK插入溶瘤病毒中的抗肿瘤研究,获得的溶瘤病毒与GCV联用以诱导肿瘤细胞死亡。该研究显示,原本溶瘤病毒感染肿瘤细胞以诱导直接的抗癌效果;而经过HSV1-TK(自杀基因)磷酸化的GCV通过抑制肿瘤细胞增殖而表现出了额外的抗肿瘤效果(Oliver W等人,人类基因治疗,Vol.10,No.16,1999)。HSV1-TK/GCV体系主要被用于使用腺病毒作为载体的溶瘤病毒疗法。然而,联合应用GCV所带来的额外细胞毒性效应仍然具有争议。

[0007] 具体地,观察到将HSV-TK基因插入到有复制能力的腺病毒中获得的溶瘤病毒与GCV联用的情况下,在胶质瘤细胞中的细胞毒性效应会显著上升。另一方面,在其他许多将HSV-TK插入到有复制能力的腺病毒的研究中,并不总是表现出由应用GCV带来的额外抗肿瘤效应(Lambright ES等,Gene Ther,8:946-53)。据报道这是由于HSV-TK/GCV系统不仅参与抑制肿瘤细胞增殖,也参与抑制病毒增殖,而这些效应是相反和相互抵消的。

[0008] 因此,有需要针对特定的将HSV-TK/GCV系统应用于溶瘤病毒的方法,能够在保障安全性的同时加强抗肿瘤效果。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 据此,作为开发改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒的研究的结果,本发明开发了无胸苷激酶(TK)活性并能够磷酸化GCV或ACV的溶瘤病毒,并且已证实该溶瘤病毒和GCV联用时表现出优异的安全性和抗肿瘤效应,由此完成了本发明。

[0011] 解决技术问题的技术方案

[0012] 为达到上述目的,在本发明的一方面,提供了一种溶瘤病毒,所述溶瘤病毒包含一段编码多肽的核苷酸序列,所述多肽包含一个效应结构域,其中所述效应结构域如SEQ ID NO:1所示并且是从单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)衍生出的。

[0013] 在本发明的另一方面,提供了一种预防或治疗癌症的药物组合物,包含所述溶瘤病毒作为活性成分。

[0014] 在本发明的另一方面,提供了一种预防或治疗癌症的药物组合物,包含所述溶瘤病毒和更昔洛韦(GCV)或阿昔洛韦(ACV)作为活性成分。

[0015] 在本发明的另一方面,提供了一种生产溶瘤痘苗病毒的方法,所述溶瘤痘苗病毒包含一段编码突变的HSV-TK的基因,所述方法包括步骤:i)从痘苗病毒中去除TK基因,并使痘苗病毒与野生型HSV-TK基因重组;和ii)在宿主细胞中存在溴化脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)的情况下,持续进行重组痘苗病毒的传代培养。

[0016] 本发明的有益效果

[0017] 本发明的改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒可以表达HSV-TK片段,所述片段包括一个效应结构域或其变体以磷酸化GCV或ACV,所述效应结构域由能够在无胸苷激酶(TK)活性的情况下磷酸化GCV或ACV的最小氨基酸序列组成,从而杀死感染肿瘤病毒的癌细胞,甚至邻近的癌细胞。此外,GCV或ACV也参与抑制病毒增殖,并且即使在应用了大剂量病毒时也能由此调控病毒引发的副反应。进一步地,即使GCV对病毒增殖的抑制作用使得病毒颗粒的数量减少了,所述溶瘤病毒也能表现出增强的抗肿瘤效应。因此,本发明的改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒能够被有效地用于治疗肿瘤。

[0018] 附图简述

[0019] 图1显示了产生突变的痘苗病毒过程的示意图。

[0020] 图2显示了鉴定突变的痘苗病毒(C1到C5)表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0021] 图3显示了鉴定突变的痘苗病毒(C6到C10)表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0022] 图4显示了鉴定突变的痘苗病毒(C11到C20)表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0023] 图5显示了鉴定突变的痘苗病毒(C21到C30)表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0024] 图6显示了鉴定突变的痘苗病毒(C31到C40)表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0025] 图7显示了鉴定突变的痘苗病毒(C41到C50)表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0026] 图8显示了鉴定突变的痘苗病毒 (C51到C55) 表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0027] 图9显示了鉴定突变的痘苗病毒 (C56到C60) 表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0028] 图10显示了鉴定突变的痘苗病毒 (C61到C70) 表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0029] 图11显示了鉴定突变的痘苗病毒 (C71到C80) 表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0030] 图12显示了鉴定突变的痘苗病毒 (C81到C90) 表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0031] 图13显示了鉴定突变的痘苗病毒 (C91到C100) 表达HSV1-TK片段的的结果,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0032] 图14显示了由突变的痘苗病毒 (C1、C3、C52、C40/45、C57、WOTS-418和C19) 表达的HSV1-TK片段的示意图,其中每个都是突变的痘苗病毒的一种实施方式。

[0033] 图15中的图表显示了鉴定分离自HeLa肿瘤细胞系培养液的上清液的荧光素酶活性,该HeLa肿瘤细胞系经过了穿梭质粒载体和WR(Western Reserve)系痘苗病毒处理。

[0034] 图16中的图表显示了鉴定分离自HeLa肿瘤细胞系培养液的颗粒的荧光素酶活性,该HeLa肿瘤细胞系经过了穿梭质粒载体和WR系痘苗病毒处理。

[0035] 图17中的图表显示了鉴定分离自HeLa肿瘤细胞系培养液的上清液的荧光素酶活性,该HeLa肿瘤细胞系经过了穿梭质粒载体和惠氏系痘苗病毒处理。

[0036] 图18显示了鉴定在NCI-H460肿瘤细胞系中应用突变的痘苗病毒 (C1、C3、C19、C45、或C52) (突变痘苗病毒的一种实施方式) 和GCV会引起病毒增殖减少的实验结果。

[0037] 图19显示了鉴定在HeLa肿瘤细胞系中应用突变的痘苗病毒 (C40或C57) (突变痘苗病毒的一种实施方式) 和GCV会引起病毒增殖减少的结果。

[0038] 图20显示了鉴定在NCI-H460肿瘤细胞系中应用突变的痘苗病毒 (C40或C57) (突变痘苗病毒的一种实施方式) 和GCV会引起病毒增殖减少的结果。

[0039] 图21显示了鉴定在NCI-H460肿瘤细胞系中应用突变的痘苗病毒 (C1、C3、C19、C45、或C52) (突变痘苗病毒的一种实施方式) 和GCV会引起病毒增殖减少的结果。

[0040] 图22显示了鉴定在HeLa肿瘤细胞系中联合应用突变的痘苗病毒 (C40或C57) (突变痘苗病毒的一种实施方式) 和GCV会引起细胞毒性增加的结果。

[0041] 图23显示了鉴定在NCI-H460肿瘤细胞系中联合应用突变的痘苗病毒 (C40或C57) (突变痘苗病毒的一种实施方式) 和GCV会引起细胞毒性增加的结果。

[0042] 图24显示了使用突变的痘苗病毒 (WOTS-418) 处理10个肿瘤细胞系,并随后观察每种肿瘤细胞系的细胞活性得到的图表。

[0043] 图25显示了鉴定在A549肿瘤细胞系中联合应用突变的痘苗病毒 (WOTS-418) (突变痘苗病毒的一种实施方式) 和ACV、GCV、或BrdU会引起病毒增殖减少的结果。

[0044] 图26显示了鉴定在NCI-H460肿瘤细胞系联合应用突变的痘苗病毒 (WOTS-418) (突变痘苗病毒的一种实施方式) 和GCV会引起病毒增殖减少的结果。

[0045] 图27显示了给移植了HCT-116肿瘤细胞系的小鼠模型联合应用突变的痘苗病毒

(WOTS-418) 和GCV后,处死小鼠并计算在小鼠肿瘤组织中检测到的病毒颗粒数量得到的图表。

[0046] 图28显示了鉴定在NCI-H460肿瘤细胞系中联合应用突变的痘苗病毒(WOTS-418) (突变痘苗病毒的一种实施方式) 和GCV会引起细胞毒性增加的结果。

[0047] 图29显示了鉴定在NCI-H460肿瘤细胞系联合应用突变的痘苗病毒(WOTS-418) (突变痘苗病毒的一种实施方式) 和GCV会引起细胞毒性增加的结果。

[0048] 图30显示了用移植了人乳腺癌细胞系(MDA-MD-231) 小鼠模型鉴定突变痘苗病毒和羟基脲联合应用引起的抗癌效果的实验时间表示意图。

[0049] 图31显示了向移植有人乳腺癌细胞系的小鼠单独应用或联合应用突变的痘苗病毒(WOTS-418) 和羟基脲,随后测量小鼠肿瘤大小获得的实验结果。

[0050] 图32显示了对移植有小鼠肾癌细胞系(Renca) 的小鼠单独应用或联合应用突变的痘苗病毒(WOTS-418) 和羟基脲,随后测量小鼠肿瘤大小获得的实验结果。

[0051] 图33显示了用移植有人结直肠癌细胞系(CT-26) 小鼠模型鉴定突变痘苗病毒和羟基脲联合应用引起的抗癌效果的实验时间表示意图。

[0052] 图34显示了向移植有人结直肠癌细胞系(CT-26) 的小鼠单独应用或联合应用突变的痘苗病毒(WOTS-418) 和羟基脲,随后测量小鼠肿瘤大小获得的实验结果。

[0053] 图35显示了向移植有人结直肠癌细胞系(CT-26) 的小鼠单独应用或联合应用突变的痘苗病毒(WOTS-418) 和羟基脲,从小鼠中分离CD8⁺T细胞,将CD8⁺T细胞与肿瘤细胞共培养,随后测定分泌INF- γ 的CD8⁺T细胞数量的图表。

[0054] 图36显示了向移植有人结直肠癌细胞系(CT-26) 的小鼠单独应用或联合应用突变的痘苗病毒(WOTS-418) 和羟基脲,从小鼠中分离CD8⁺T细胞,将CD8⁺T细胞与肿瘤细胞共培养,随后对分泌INF- γ 的CD8⁺T细胞进行染色的照片。

[0055] 实施本发明的最佳方式

[0056] 在下文中将详细描述本发明。

[0057] 在本发明的一方面,提供了一种溶瘤病毒,其包含一段编码多肽的核苷酸序列,所述多肽包含一个效应结构域,所述效应结构域如SEQ ID NO:1所示并且是衍生自单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK) 的。

[0058] 如本文所用,术语“单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)”指一种在单纯疱疹病毒的DNA合成过程中参与初始磷酸化反应的酶。此外,HSV-TK还参与抗病毒药剂更昔洛韦(GCV) 或阿昔洛韦(ACV) 的磷酸化。特别地,HSV-TK对GCV或ACV的反应比其他病毒中的TK敏感约10倍。所述HSV可以是1型单纯疱疹病毒(HSV1) 或2型单纯疱疹病毒(HSV2)。具体地,所述HSV可以是HSV1。此外,所述HSV-TK可以是1型单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV1-TK)。

[0059] 如本文所用,术语“效应结构域”指由野生型HSV-1TK的1到145位连续氨基酸组成的蛋白结构域,所述HSV-1TK如SEQ ID NO:15序列所示,由376个氨基酸组成。相比野生型HSV-1TK,所述效应结构域具有较低的TK活性或无TK活性,因此含有编码包括所述效应结构域的多肽的核苷酸序列的溶瘤病毒无法自我增殖。然而,所述效应结构域包括一个ATP结合位并能够磷酸化GCV或ACV。当用GCV或ACV处理被含有编码包括所述效应结构域的多肽的核苷酸序列的溶瘤病毒感染的细胞时,GCV或ACV可能被磷酸化。

[0060] 包含所述效应结构域的多肽可能进一步含有连接到效应结构域C端的0到231个氨

基酸。在此,相比野生型HSV-1TK,所述多肽具有较低的TK活性或无TK活性,因此含有编码所述多肽的核苷酸序列的溶瘤病毒无法自我增殖。此外,所述多肽能够磷酸化GCV或ACV。当用GCV或ACV处理被含有编码所述多肽的核苷酸序列的溶瘤病毒感染的细胞时,GCV或ACV可能被磷酸化。

[0061] 具体地,包含所述效应结构域的多肽可能进一步含有连接到效应结构域C端的0到231、10到200、20到150、或40到100个氨基酸。优选地,包含所述效应结构域的多肽可能进一步含有连接到效应结构域C端的36、82或231个氨基酸。

[0062] 包含所述效应结构域的多肽可由如SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、或13所示氨基酸序列组成。编码所述多肽的核苷酸序列可以是编码如SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、或13所示氨基酸序列的核苷酸序列。具体地,编码所述多肽的核苷酸序列可以是如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、或14所示的核苷酸序列。

[0063] 为了开发改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒,本发明制造了一种包含野生型HSV1-TK基因的重组痘苗病毒,并随后诱导病毒在缺乏TK的情况下进行适应性进化。所述痘苗病毒经过适应性进化后接受荧光素酶活性实验、基因组分析和GCV敏感性实验。通过这些实验,将挑选出表达HSV1-TK片段或其变体的部分的突变的痘苗病毒(C1、C3、C40、C45、C52、和C57)。此外,本发明生产了突变的痘苗病毒(WOTS-418,OTS-418),其含有编码HSV-TK变体的基因,所述变体是由SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的一部分突变而来的。随后,对突变的痘苗病毒(C1、C3、C40、C45、C52、C57和WOTS-418)的核苷酸序列进行分析。结果显示,鉴定出由SEQ ID NO:15所示的野生型HSV-1TK的氨基酸序列中直到145位(参考点)的氨基酸都能够磷酸化GCV或ACV但不具有TK活性。

[0064] 如本文所用,术语“溶瘤病毒”指一种重组病毒,其基因已被操作以特异性地在肿瘤细胞中复制,以使得该病毒能够摧毁肿瘤细胞。所述溶瘤病毒可以由腺病毒、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、慢病毒、逆转录病毒、巨细胞病毒、杆状病毒、呼肠孤病毒、腺相关病毒、粘液瘤病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、新城疫病毒、细小病毒、柯萨奇病毒、塞尼卡病毒、痘苗病毒或痘病毒衍生而来。优选地,所述溶瘤病毒可由痘苗病毒衍生而来。

[0065] 所述痘苗病毒可以是但不限于一种痘苗病毒株,即西储(WR)、纽约痘苗病毒(NYVAC)、惠氏(纽约市卫生局;NYCBOH)、LC16m8、李斯特、哥本哈根、天坛、USSR、塔什干、埃文斯、国际卫生部-J(IHD-J)、或国际卫生部-White(IHD-W)。

[0066] 在本发明的一方面,提供了一种预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包括溶瘤病毒作为活性成分,所述溶瘤病毒包含一段编码多肽的核苷酸序列,所述多肽包含一个效应结构域,所述效应结构域如SEQ ID NO:1所示并且是衍生自单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)的。

[0067] 作为活性成分包含在药物组合物中的溶瘤病毒如上文所述。

[0068] 所述溶瘤病毒的剂量依据个体情况和体重、疾病严重程度、药物剂型、给药的途径和给药时间而有所不同,且能够由本领域技术人员合理地进行选择。剂量可能使患者接受 1×10^3 到 1×10^{18} 病毒颗粒、传染性病毒单位(TCID₅₀),或空斑形成单位(pfu)。具体地,剂量可能使患者接受 1×10^3 、 2×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、 $1 \times$

10^{18} 、或更多的所施用的病毒颗粒、传染性病毒单位、或空斑形成单位,介于上述数值之间各种数值以及范围均包括在内。优选地,溶瘤病毒的给药剂量为 1×10^3 到 1×10^{10} pfu。

[0069] 癌症可选自下组:肺癌、结直肠癌、前列腺癌、甲状腺癌、乳腺癌、脑癌、头颈癌、食管癌、皮肤癌、胸腺癌、胃癌、结肠癌、肝癌、卵巢癌、子宫癌、膀胱癌、直肠癌、胆囊癌、胆道癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、骨癌、眼内黑色素瘤、肛周癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、小肠癌、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性白血病、急性白血病、淋巴细胞淋巴瘤、肾癌、输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脊髓肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、及其组合。

[0070] 本发明的药物组合物可进一步包含药学上可接受的载体。此外,本发明的药物组合物可进一步包含合适的辅料和稀释剂,所述辅料和稀释剂是制备药物组合物过程中常用的。此外,所述药物组合物可以按照常规方法制备为注射剂形式。

[0071] 在制备用于肠外给药的制剂时,可将药物组合物制备为灭菌水溶液、无水溶液、悬浮液、乳液、冻干剂、栓剂等。对于无水溶液或悬浮液,可以使用丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)、注射酯(例如油酸乙酯)等。栓剂的基础材料可以使用Witepsol™、聚乙二醇、Tween™61、可可黄油、月桂酸甘油酯脂肪、甘油明胶等。

[0072] 关于给药途径、剂量和给药频率,可根据患者的病情和副作用存在与否,以多种方式和剂量将药物组合物给予受试者;本领域技术人员可在适当范围内选择最佳给药途径、剂量和给药频率。此外,所述药物组合物可以与对要治疗的疾病有已知疗效的其他药物或生理活性物质联合应用,或可以和其他药物以组合制剂的形式制备。

[0073] 药物组合物可以肠外给药,并可以以任何合适的方式给药,例如肿瘤内、腹膜内、皮下、皮内、鼻内和静脉注射给药。其中优选肿瘤内、腹膜内、或静脉注射给药。另一方面,药物组合物的剂量可以根据给药频率、总剂量、和患者健康状况决定。

[0074] 在本发明的另一方面,提供了一种预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包括溶瘤病毒和更昔洛韦(GCV)或阿昔洛韦(ACV)作为活性成分,所述溶瘤病毒包含一段编码多肽的核苷酸序列,所述多肽包含一个效应结构域,所述效应结构域如SEQ ID NO:1所示并且是衍生自单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)的。

[0075] 包含在所述药物组合物中的溶瘤病毒和GCV或ACV可以同时给药、或以顺序或相反顺序方式联合给药。具体地,包含在所述药物组合物中的溶瘤病毒和GCV或ACV可以同时给药。此外,所述药物组合物的给药方式可以是例如首先给药溶瘤病毒,随后给药GCV或ACV,其中这些成分都包含在所述药物组合物中。此外,所述药物组合物的给药方式可以是例如首先给药溶瘤病毒,随后给药GCV或ACV,随后再次给药溶瘤病毒,其中这些成分都包含在所述药物组合物中。

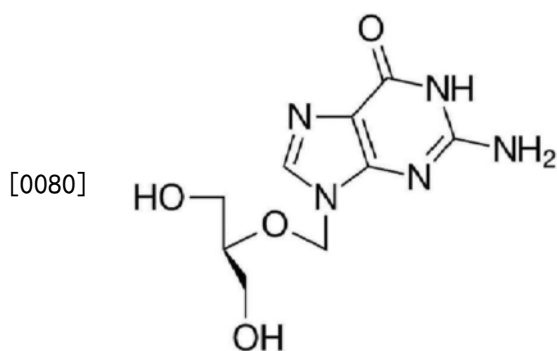
[0076] 包含在药物组合物中作为活性成分的溶瘤病毒如上文所描述。

[0077] 所述溶瘤病毒的剂量依据个体情况和体重、疾病严重程度、药物剂型、给药的途径和时间而有所不同,且能够由本领域技术人员合理地进行选择。剂量可能使患者接受 1×10^3 到 1×10^{18} 病毒颗粒、传染性病毒单位(TCID₅₀),或空斑形成单位(pfu)。具体地,剂量可能使患者接受 1×10^3 、 2×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 5×10^9 、 $1 \times$

10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 、 1×10^{18} 、或更多的所施用的病毒颗粒、传染性病毒单位 (TCID₅₀)、或空斑形成单位 (pfu), 介于上述数值之间各种数值以及范围均包括在内。优选地, 溶瘤病毒的给药剂量为 1×10^3 到 1×10^{10} pfu。

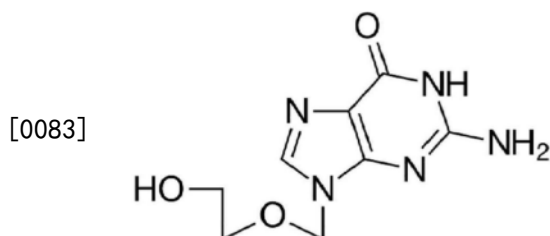
[0078] 如本文所用, 术语“GCV”指一种名为更昔洛韦的抗病毒药剂, 其能够有效地抗单纯疱疹病毒、巨细胞病毒和水痘带状疱疹病毒。所述GCV的5'端被病毒TK磷酸化并转变为三磷酸更昔洛韦 (GCV-TP)。GCV-TP限制了病毒DNA聚合酶的活性, 并结合到病毒DNA的3'端, 从而能够终止DNA的延伸。此外, 磷酸化的GCV能够阻止细胞DNA复制, 从而抑制细胞生长。所述GCV如式1所示。

[0079] [式1]



[0081] 如本文所用, 术语“ACV”指一种名为阿昔洛韦的抗病毒药剂, 其能够有效地抗单纯疱疹病毒、水痘带状疱疹病毒和EB病毒。所述ACV被病毒TK磷酸化并转变为三磷酸阿昔洛韦 (ACV-TP)。ACV-TP限制了病毒DNA聚合酶的活性, 并结合到病毒DNA的3'端, 从而能够终止DNA的延伸。所述ACV如式2所示。

[0082] [式2]



[0084] 此外, 所述GCV或ACV可以 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 到 50mg/kg 的剂量给药。具体地, 所述GCV或ACV可以 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 到 50mg/kg , $1 \mu\text{g/kg}$ 到 40mg/kg , $5 \mu\text{g/kg}$ 到 30mg/kg , 或 $10 \mu\text{g/kg}$ 到 20mg/kg 的剂量给药。

[0085] 癌症可选自下组: 肺癌、结直肠癌、前列腺癌、甲状腺癌、乳腺癌、脑癌、头颈癌、食管癌、皮肤癌、胸腺癌、胃癌、结肠癌、肝癌、卵巢癌、子宫癌、膀胱癌、直肠癌、胆囊癌、胆道癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、骨癌、眼内黑色素瘤、肛周癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、小肠癌、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性白血病、急性白血病、淋巴细胞淋巴瘤、肾癌、输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脊髓肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、及其组合。

[0086] 本发明的药物组合物可进一步包含药学上可接受的载体。此外, 本发明的药物组

合物可进一步包含合适的辅料和稀释剂,所述辅料和稀释剂是制备药物组合物过程中常用的。此外,所述药物组合物可以按照常规方法制备为注射剂形式。

[0087] 在制备用于肠外给药的制剂时,可将药物组合物制备为灭菌水溶液、无水溶液、悬浮液、乳液、冻干剂、栓剂等。对于无水溶液或悬浮液,可以使用丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)、注射酯(例如油酸乙酯)等。栓剂的基础材料可以使用Witepsol™、聚乙二醇、Tween™61、可可黄油、月桂酸甘油酯脂肪、甘油明胶等。

[0088] 关于给药途径、剂量和给药频率,可根据患者的病情和副作用存在与否,以多种方式和剂量向受试者给药;本领域技术人员可在适当范围内选择其最佳给药途径、剂量和给药频率。此外所述药物组合物可以与对要治疗的疾病有已知疗效的其他药物或生理活性物质联合应用,或可以和其他药物以联合制剂的形式制备。

[0089] 所述药物组合物可以肠外给药,并可以以任何合适的方式给药,例如肿瘤内、腹膜内、皮下、皮内、鼻内和静脉注射给药。其中优选肿瘤内、腹膜内、或静脉注射给药。另一方面,所述药物组合物的剂量可以根据给药频率、总剂量、和患者健康状况决定。

[0090] 在本发明的另一方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括步骤:施用溶瘤病毒和更昔洛韦(GCV)或阿昔洛韦(ACV)的步骤,所述溶瘤病毒包含一段编码多肽的核苷酸序列,所述多肽包含一个效应结构域,所述效应结构域如SEQ ID NO:1所示并且是从单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)衍生出的。

[0091] 所述溶瘤病毒、GCV、和ACV如上文所描述。

[0092] 如本文所用,术语“个体”是指患有或正遭受疾病的人,其状态可通过施用本发明的溶瘤病毒和GCV或ACV来缓解、抑制或治疗。

[0093] 在本发明的另一方面,提供了一种溶瘤病毒用于治疗肿瘤的用途,所述溶瘤病毒包含一段编码多肽的核苷酸序列,所述多肽包含一个效应结构域,所述效应结构域如SEQ ID NO:1所示并且是从单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)衍生出的。

[0094] 在本发明的另一方面,提供了一种生产溶瘤痘苗病毒的方法,所述溶瘤痘苗病毒包含一段编码突变的HSV-TK的基因,所述方法包括步骤:i)从痘苗病毒中去除TK基因,并允许痘苗病毒与野生型HSV-TK基因重组;和ii)在宿主细胞中存在溴化脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)的情况下,持续进行重组痘苗病毒的传代培养。

[0095] 野生型HSV-TK基因可以是如SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列。

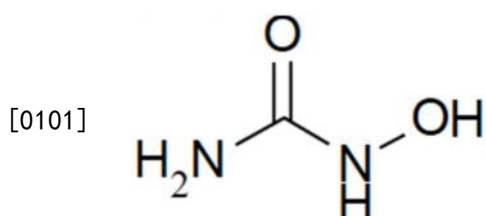
[0096] 所述溶瘤痘苗病毒具有较低的TK活性或无TK活性并能够磷酸化GCV或ACV。

[0097] 所述传代培养可持续进行至少3次,并且优选地持续进行至少10次。

[0098] 在本发明的另一方面,提供了一种预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包括溶瘤病毒和羟基脲作为活性成分,所述溶瘤病毒包含一段编码多肽的核苷酸序列,所述多肽包含一个效应结构域,所述效应结构域如SEQ ID NO:1所示并且是从单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)衍生出的。关于所述溶瘤病毒,见上文描述。

[0099] 如本文所用,术语“羟基脲”是指下式的化合物。

[0100] [式3]



[0102] 已知羟基脲是一种抗肿瘤药剂,能够抑制DNA合成,然而,其确切的机制仍有待阐明。另外,羟基脲可以以含有羟基脲的商业化药物形式包含在所述药物组合物中。含有羟基脲的商业化药物的例子可包括但不限于Hydroxyurea®、Hydrea®、Droxia™、Mylocel™、Siklos®、和Hydrine® cap。所述羟基脲可以口服,且肠外给药也是可行的。

[0103] 包含在所述药物组合物中的溶瘤病毒和羟基脲可以同时给药、或以顺序方式或相反顺序方式联合给药。具体地,溶瘤病毒和羟基脲可以同时给药。此外,可先给药羟基脲,随后给药溶瘤病毒。此外,可先给药溶瘤病毒,随后给药羟基脲。此外,可先给药羟基脲,随后给药溶瘤病毒,随后再次给药羟基脲。

[0104] 此外,所述羟基脲可以以1mg/kg/天到100mg/kg/天,或10mg/kg/天到90mg/kg/天的剂量给药。具体地,所述羟基脲可以以10mg/kg/天到90mg/kg/天、15mg/kg/天到80mg/kg/天、20mg/kg/天到70mg/kg/天、25mg/kg/天到65mg/kg/天、或30mg/kg/天到60mg/kg/天的剂量给药。在本发明的一个实施方式中,所述羟基脲以30mg/kg/天或60mg/kg/天给药。根据用量,所述药物组合物可分量多次给药。具体地,所述药物组合物可分剂量给药如每天1到4次或每天1到2次。

[0105] 癌症可选自下组:肺癌、结直肠癌、前列腺癌、甲状腺癌、乳腺癌、脑癌、头颈癌、食管癌、皮肤癌、胸腺癌、胃癌、结肠癌、肝癌、卵巢癌、子宫癌、膀胱癌、直肠癌、胆囊癌、胆道癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、骨癌、眼内黑色素瘤、肛周癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、小肠癌、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性白血病、急性白血病、淋巴细胞淋巴瘤、肾癌、输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脊髓肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、及其组合。

[0106] 本发明的药物组合物可进一步包含药学上可接受的载体。此外,本发明的药物组合物可进一步包含合适的辅料和稀释剂,所述辅料和稀释剂是制备药物组合物过程中常用的。此外,所述药物组合物可以按照常规方法制备为注射剂形式。

[0107] 在制备用于肠外给药的制剂时,可将药物组合物制备为灭菌水溶液、无水溶液、悬浮液、乳液、冻干剂、栓剂等。对于无水溶液或悬浮液,可以使用丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)、注射酯(例如油酸乙酯)等。栓剂的基础材料可以使用Witepsol™、聚乙二醇、Tween™61、可可黄油、月桂酸甘油酯脂肪、甘油明胶等。

[0108] 关于给药途径、剂量和给药频率,可根据患者的病情和副作用存在与否,以多种方式和剂量向受试者给药;本领域技术人员可在适当范围内选择其最佳给药途径、剂量和给药频率。此外所述药物组合物可以与对要治疗的疾病有已知疗效的其他药物或生理活性物质联合应用,或可以和其他药物以联合制剂的形式制备。

[0109] 所述药物组合物可以肠外给药,并可以以任何合适的方式给药,例如肿瘤内、腹膜内、皮下、皮内、鼻内和静脉注射给药。其中优选肿瘤内、腹膜内、或静脉注射给药。另一方

面,所述药物组合物的剂量可以根据给药频率、总剂量、和患者健康状况决定。

[0110] 在本发明的另一方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括步骤:施用溶瘤病毒。

[0111] 在本发明的另一方面,提供了一种溶瘤病毒用于治疗癌症的用途。

[0112] 在本发明的另一方面,提供了一种溶瘤病毒用于制备治疗癌症的药物的用途。

[0113] 在本发明的另一方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括步骤:施用用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0114] 在本发明的另一方面,提供了一种用于预防或治疗癌症的药物组合物用于治疗癌症的用途。

[0115] 在本发明的另一方面,提供了一种用于预防或治疗癌症的药物组合物用于制备治疗癌症的药物的用途。

[0116] 本发明实施方式

[0117] 接下来,将通过以下实施例更详细地描述本发明。然而,下述实施例仅限于说明作用,并不构成对本发明的限定。

[0118] 实施例1突变的痘苗病毒的制备

[0119] 实施例1.1穿梭质粒载体的构建

[0120] 所使用的穿梭质粒载体是通过合成1型HSVTK基因 (pSE/L启动子) 和萤火虫荧光素酶报告 (p7.5启动子) 基因并将这些基因重组到pUC57amp⁺质粒 (Genewiz,美国) 产生的穿梭质粒载体。

[0121] 实施例1.2突变的痘苗病毒 (C1、C3、C40、C45、C52、和C57) 的构建

[0122] 图1显示了制备突变的痘苗病毒的步骤。具体地,首先,为了获得重组病毒,将HeLa细胞 (ATCC) 以每孔 4×10^5 个细胞接种在6孔板中,然后添加含有10%胎牛血清的EMEM培养基。使用惠氏系野生型痘苗病毒 (纽约市卫生署株,WR-1536,ATCC) 进行MOI为0.05的处理。2小时后,用含2%胎牛血清的EMEM培养基替换培养基,并使用XfectTM聚合物 (Clontech 631317,美国) 将4 μ g穿梭质粒载体 (如实施例1.1所构建) 递送至细胞中。培养4小时后,用含2%胎牛血清的EMEM培养基替换培养基,继续培养72小时。通过检测HeLa细胞中荧光素酶的活性获得含有HSV1-TK基因的重组痘苗病毒。

[0123] 随后,在TK-骨肉瘤 (143B TK-) 细胞系 (ATCC) 中,在BrdU (胸苷类似物,15 μ g/ml) 存在的情况下,通过在能够筛选TK功能缺乏的细胞的生化环境 (TK-选择压力) 中进行10次连续传代培养,从而诱导引发TK活性缺乏的HSV1-TK突变。将具有荧光素酶活性的突变痘苗病毒克隆的裂解物分配到平板上,然后分离出100个具有荧光素酶活性的单空斑。随后,将单空斑扩增,并通过蛋白质印迹鉴定表达不同蛋白大小的HSV-TK片段的克隆 (S3C4#1_C1到S3C4#1_C100)。

[0124] 具体地,用每个15 μ l的100个克隆进行处理以感染HeLa细胞系。随后,在24小时后收集并溶解细胞,以提取蛋白质。将提取的蛋白质进行变性,随后将每个样品40 μ g上样至SDS-PAGE凝胶进行电泳。在电泳后,将样品转移到PVDF膜,并与作为一抗的抗HSV1-TK抗体 (Bethyl A50-101P) 反应。随后,PBST洗涤样品,然后与作为二抗的带HRP标签的抗山羊抗体 (SantaCruz,sc-28037) 反应。再次PBST洗涤样品,使用化学荧光试剂处理,并使用化学荧光成像系统 (Davinch K) 进行检测。结果显示,经鉴定,HSV1-TK片段蛋白在病毒中表达 (图2到

13)。

[0125] 这100个不同克隆基本不具有TK活性,因为它们是在能够筛选缺乏TK功能细胞的生化环境中培养的。另一方面,为了筛选对GCV敏感的克隆,初始时在96孔板中在GCV存在的情况下进行4天的培养,使用实时细胞成像分析系统**Incucyte®** (Essen Biosciences)通过实时成像选取发生细胞凋亡的10个克隆。一般来说,病毒引起的细胞毒性在空斑形成后逐渐增加。但是,在GCV诱导的细胞毒性中,整体细胞毒性在空斑形成后15小时内立即发生。因此,对GCV诱导的细胞毒性进行了定性检测。

[0126] 在最初通过成像分析选择的集落中,检测由GCV施用引起的病毒增殖和细胞毒性的抑制。之后,最终选择了集落S3C4#1_C1、S3C4#1_C3、S3C4#1_C40、S3C4#1_45、S3C4#1_C52、和S3C4#1_C57中的突变的痘苗病毒。集落S3C4#1_C1、S3C4#1_C3、S3C4#1_C40、S3C4#1_45、S3C4#1_C52、和S3C4#1_C57中的突变的痘苗病毒分别命名为“C1”、“C3”、“C40”、“C45”、“C52”、和“C57”。

[0127] 向Macrogen(韩国首尔)申请了对C1、C3、C40、C45、C52和C57的氨基酸进行测序。结果显示,鉴定得到C40和C45的氨基酸序列相同;C1、C3、C40/45、C52、C57具有SEQ ID NOs:3、5、7、9和11所示的氨基酸。特别地,鉴定到在选定的突变痘苗病毒的HSV1-TK中,从N-端的第145个氨基酸开始发生突变(图14)。

[0128] 实施例1.3突变的痘苗病毒(WOTS-418/OTS-418)的制备

[0129] HSV-TK中报道最多的突变是由碱基的插入或缺失引起的移码突变,发生在核苷酸序列部分第430到436位(7Gs)和第548到583位(6Cs)。将野生型HSV-TK插入痘苗病毒中后,98%或以上的突变发生在这些区段。因此,为了在核苷酸序列区段诱发沉默突变,位于430至436位的核苷酸序列GGGGGGG被转变为GGTGGTG,位于548至583位核苷酸序列CCCCC被转变为CCCCTC。此外,所使用的穿梭质粒载体是通过合成编码HSV-TK变体的基因和萤火虫荧光素酶报告基因(p7.5启动子),并将上述基因的重组体装载入pUC57amp⁺质粒(Genewiz,美国)中而产生的穿梭质粒载体,所述HSV-TK变体获取自如SEQ ID NO:15所示的HSV-TK氨基酸序列,第167位丙氨酸替换为酪氨酸。之后,使用如实施例1.2中使用的相同方法,用穿梭质粒载体和WR系(ATCC)或惠氏系痘苗病毒生产突变的痘苗病毒。使用WR系痘苗病毒生产的突变痘苗病毒命名为“WOTS-418”,使用惠氏系痘苗病毒生产的突变痘苗病毒命名为“OTS-418”。

[0130] 最后检测分离自该经过了穿梭质粒载体和WR系痘苗病毒处理的HeLa肿瘤细胞系培养液的上清液和颗粒的荧光素酶活性(图15和16)。此外,检测分离自经过了穿梭质粒载体和WR系痘苗病毒处理的HeLa肿瘤细胞系培养液的上清液的荧光素酶活性(图17)。上述结果确定了编码HSV-TK变体的基因被引入了WR系或惠氏系痘苗病毒。

[0131] 实施例2(体外)应用GCV后突变痘苗病毒(C1、C3、C45、C52)增殖抑制的鉴定

[0132] 检测了实施例1.2中制备的C1、C3、C45和C52在应用GCV后引起的增值能力抑制。在此,集落S3C4#1_C19中的突变的痘苗病毒被用作阴性对照,命名为“C19”。为了检测GCV处理后的C1、C3、C45和C52的病毒颗粒数目差异,使用仅由痘苗病毒特异性表达的E9L进行定量聚合酶链式反应(qPCR)。

[0133] 具体地,准备可识别E9L基因,同时仅与两个互补的DNA链中的一个结合的探针(SEQ ID NO:19和20)。准备的探针在每次病毒增殖发生时都会检测到一个荧光。NCI-H460

肿瘤细胞系以每孔 1.5×10^4 个细胞接种,随后用病毒C1、C3、C19、C45、或C52以0.01到1的MOI进行感染。2小时后,以 $60 \mu\text{M}$ 浓度的GCV进行联合处理。培养48小时,然后使用病毒提取试剂盒提取DNA(QIAamp MinElute Virus Spin, QIAGEN, 57704)。提取到的DNA稀释到 $1\text{ng}/5\mu\text{l}$ 浓度,并进行qPCR。

[0134] 结果显示,对C19而言,尽管应用了GCV,病毒增殖也并没有被抑制。另一方面,证实了对C1、C3、C45和C52而言,在应用GCV后病毒增殖受到了抑制(图18)。这些结果表明,C1、C3、C45和C52表现出了应用GCV后的增殖能力降低。

[0135] 实施例3(体外)应用GCV后突变痘苗病毒(C40、C57)增殖能力降低的鉴定

[0136] 检测了实施例1.2中制备的C40和C57在应用GCV后的增殖能力。为了检测GCV处理后的C40和C57的增殖水平差异,使用E9L基因进行定量聚合酶链式反应(qPCR)。

[0137] 具体地,准备可识别E9L基因,同时仅与两个互补的DNA链中的一个结合的探针。准备的探针在每次病毒增殖发生时都会检测到一个荧光。HeLa肿瘤细胞系以每孔 1×10^4 个细胞接种或NCI-H460肿瘤细胞系以每孔 1.5×10^4 个细胞接种,随后用C40或C57以0.1(0.1pfu/cells)的MOI进行感染。2小时后,以 $50 \mu\text{M}$ 浓度的GCV进行联合处理。培养48小时,然后使用病毒提取试剂盒提取DNA。提取到的DNA稀释到 $1\text{ng}/5\mu\text{l}$ 浓度,并进行qPCR。

[0138] 结果证实了对C40和C57而言,在应用GCV后病毒增殖受到了抑制(图19和20)。这些结果表明,C40和C57表现出了应用GCV后的增殖能力降低。

[0139] 实施例4(体外)应用GCV后突变痘苗病毒(C1、C3、C45、C52)毒性的鉴定

[0140] 为了检测虽然实施例2中C1、C3、C45、和C52因GCV而表现出了增殖抑制,但GCV处理后C1、C3、C45、和C52是否保持了细胞毒性,进行了C1、C3、C19、C45、或C52和GCV的联合使用来比较细胞毒性。具体地,NCI-H460肿瘤细胞系以每孔 1.5×10^4 个细胞接种,随后用C1、C3、C19、C45、或C52以0.01到1的MOI进行感染。2小时后,以 $60 \mu\text{M}$ 浓度的GCV进行联合处理。培养72小时后,使用CCK8试剂盒(Cell Counting Kit 8, Dojindo, Kumamoto, 日本)分析细胞毒性。

[0141] 结果显示,当用C1、C3、C45、或C52和GCV联合使用后,尽管存在GCV诱导的C1、C3、C45、和C52病毒增殖抑制,但NCI-H460肿瘤细胞系额外地被杀伤了25%或以上。另一方面,当C19和GCV联合使用后,NCI-H460肿瘤细胞系被杀伤的程度近似于仅用C19处理的情况(图21)。这些结果表明,在联合应用C1、C3、C45、或C52和GCV的情况下,C1、C3、C45、或C52的细胞毒性增加了。

[0142] 实施例5(体外)应用GCV后突变痘苗病毒(C40、C57)细胞毒性的鉴定

[0143] 为了检测虽然实施例3中C40和C57因GCV而表现出了增殖抑制,但GCV处理后C40和C57是否保持了细胞毒性,进行了C40或C57和GCV的联合使用来分析其细胞毒性。

[0144] 具体地,HeLa肿瘤细胞系以每孔 1×10^4 个细胞接种或NCI-H460肿瘤细胞系以每孔 1.5×10^4 个细胞接种。随后用MOI为0.1(0.1pfu/cells)的C40或C57和 $50 \mu\text{M}$ 浓度的GCV联合处理细胞,感染2小时。培养48小时后,使用CCK8试剂盒(Cell Counting Kit 8)分析细胞毒性。

[0145] 结果显示,当C40或C57和GCV联合使用后,尽管存在GCV诱导的C40和C57病毒增殖抑制,但HeLa细胞系和NCI-H460肿瘤细胞系被杀伤的程度近似于仅用C40或C57处理的情况(图22和23)。这些结果表明,在联合应用C40或C57和GCV的情况下,C40或C57的细胞毒性增

加了。

[0146] 实施例6 (体外) 突变痘苗病毒 (WOTS-418) 细胞毒性的鉴定

[0147] 为了检测实施例1.3中制备的WOTS-418抗肿瘤细胞的细胞毒性,10种肿瘤细胞系人肺癌细胞系 (A549、NCI-H460)、人肾癌细胞系 (A498、Caki-1)、人结直肠癌细胞系 (HT-29、HCT116)、人乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231、MCF)、小鼠乳腺癌细胞系 (4T1) 和小鼠肾癌细胞系 (Renca) 的每一种,以每孔 3×10^3 个细胞接种于96孔板上,随后使用MOI为1 (1pfu/cells) 的WOTS-418处理这些细胞。培养72小时后,使用CCK8试剂盒 (Cell Counting Kit 8) 分析细胞毒性。其中,人肺癌细胞系 (A549) 和小鼠乳腺癌细胞系 (4T1) 是从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得的。此外,人肾癌细胞系 (A498)、人结直肠癌细胞系 (HT-29、HCT-116)、人肺癌细胞系 (NCI-H460)、人乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231、MCF) 和小鼠肾癌细胞系 (Renca) 是从韩国细胞系库 (KCLB) 获得的。

[0148] 结果显示,在人肺癌细胞系 (A549)、人肾癌细胞系 (A498、Caki-1)、人结直肠癌细胞系 (HT-29、HCT-116) 和人乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231、MCF) 中观察到60%以上的细胞毒性 (图24)。

[0149] 实施例7 (体外) 应用ACV、GCV或BrdU后突变痘苗病毒 (WOTS-418) 增殖能力降低的鉴定

[0150] 检测了实施例1.3中制备的WOTS-418在应用GCV后的增殖能力。为了检测GCV处理后的WOTS-418的病毒颗粒数目差异,使用E9L基因进行定量聚合酶链式反应 (qPCR)。

[0151] 具体地,准备同时仅与两个互补的DNA链中的一个结合的可识别E9L基因的探针。准备的探针在每次病毒增殖发生时都会检测到一个荧光。具体地,A549肿瘤细胞系以每孔 1×10^4 个细胞接种,随后用WOTS-418以0.1 (0.1pfu/cells) 的MOI进行感染。2小时后,以200 μ M或300 μ M浓度的ACV、GCV或BrdU进行联合处理。培养48小时后使用病毒提取试剂盒提取DNA。提取到的DNA稀释到1ng/5 μ l的浓度,并进行qPCR。

[0152] 结果证实了对WOTS-418而言,在联合应用ACV、GCV或BrdU后病毒增殖受到了显著的抑制 (图25)。

[0153] 此外,NCI-H460肿瘤细胞系以每孔 1.5×10^4 个细胞接种,随后用WOTS-418以0.1 (0.1pfu/cells) 的MOI进行感染。2小时后,以100 μ M浓度的GCV进行联合处理。培养48小时后使用病毒提取试剂盒提取DNA。提取到的DNA稀释到1ng/5 μ l的浓度,并进行qPCR。

[0154] 结果证实了对WOTS-418而言,在联合应用WOTS-418和GCV后病毒增殖受到了显著的抑制 (图26)。这些结果表明,WOTS-418对ACV、GCV和BrdU具有敏感性,并表现出了应用ACV、GCV或BrdU后的增殖能力降低。

[0155] 实施例8 (体外) 应用GCV后突变痘苗病毒 (WOTS-418) 增殖能力降低的鉴定

[0156] 使用qPCR分析在移植了人结直肠癌细胞系 (HCT-116, 5×10^6 cells/ml) 的小鼠 (Balb/c nu/nu) 模型检测中检测WOTS-418的增殖能力。

[0157] 具体地,小鼠 (balb/c nu/nu) 购自KOATECH (韩国),在经过一周适应期后,进行人结直肠癌细胞系HCT-116肿瘤细胞系 (韩国细胞系库) 的异种移植,移植量为 5×10^6 个细胞。观察直到肿瘤体积达到100mm³到150mm³随后进行WOTS-418和GCV肿瘤内联合给药。其中,WOTS-418 (1×10^6 pfu) 是腹腔内给药。从4天后开始,每天给药一次GCV (50mg/kg),持续3天 (D5、D6、D7)。从第5天开始,每组处死3只小鼠,分离出肿瘤。分离出的肿瘤使用样品均质系

统(OMNI Bead Ruptor 24)均质化,然后使用qPCR对病毒颗粒的数量进行量化。

[0158] 结果显示,GCV处理引起的病毒增殖抑制从第三天开始出现。(图27)

[0159] 实施例9(体外)突变痘苗病毒(WOTS-418)细胞毒性的鉴定

[0160] 为了检测虽然实施例7和8中WOTS-418因GCV而表现出了增殖抑制,但GCV处理后WOTS-418是否保持了细胞毒性,进行了WOTS-418和GCV的联合处理来比较细胞毒性。具体地,NCI-H460肿瘤细胞系以每孔 1.5×10^4 细胞接种。随后用WOTS-418以0.02(0.02pfu/cells)的MOI进行感染。2小时后,以60 μ M或100 μ M浓度的GCV进行联合处理。培养72小时后,使用CCK8试剂盒(Cell Counting Kit 8)分析细胞毒性。

[0161] 结果显示,当WOTS-418和GCV联合使用后,尽管存在GCV诱导的WOTS-418病毒增殖抑制,但NCI-H460肿瘤细胞系额外地被杀伤了30%或以上(图28)。这些结果表明,在联合使用WOTS-418和GCV的情况下,WOTS-418的细胞毒性增加了。

[0162] 实施例10(体外)突变痘苗病毒(OTS-418)细胞毒性的鉴定

[0163] 为了检测应用GCV后OTS-418的细胞毒性,进行了OTS-418和GCV的联合处理以比较细胞毒性。具体地,NCI-H460肿瘤细胞系以每孔 3×10^3 细胞接种。随后用OTS-418以0.02(0.02pfu/cells)的MOI进行感染。2小时后,以6 μ M或60 μ M浓度的GCV进行联合处理。培养72小时后,使用CCK8试剂盒(Cell Counting Kit 8)分析细胞毒性。

[0164] 结果显示,在OTS-418和GCV联合处理的情况下,GCV使OTS-418的细胞毒性增加了。特别地,在浓度为60 μ M的OTS-418和GCV联合处理的情况下,NCI-H460肿瘤细胞系被额外地杀伤了约20%以上(图29)。这些结果表明,在联合应用OTS-418和GCV的情况下,细胞毒性增加了。

[0165] 实施例11检测重组痘苗病毒(WOTS-418)和羟基脲在移植有人乳腺癌细胞系的小鼠:MDA-MB-231中的抗癌效果

[0166] 购自ORIENT BIO(韩国釜山)的Balb/c nu/nu小鼠(雌性,8周龄)经过一周适应期后,移植 5×10^6 个细胞的人乳腺癌细胞系(MDA-MB-231)。观察直到肿瘤体积达到50mm³后开始给药。31天后测量肿瘤体积。

[0167] 将构建的移植有人乳腺癌细胞系的小鼠分为4组(n=5)。接受腹腔内盐水给药的组设为对照组,接受羟基脲(HU,30mg/kg)的组、接受WOTS-418(1×10^7 pfu)的组和同时接受WOTS-418和HU的组归为实验组。WOTS-418总共给药2次(D0、D10),其中在第0天以腹腔内方式给药,随后在第10天以肿瘤内方式给药。羟基脲每天两次腹腔内给药(6次/周)(图30)。

[0168] 连续31天测量肿瘤体积。结果显示,对照组的肿瘤体积缓慢增长,在第17天后开始大幅增加,因而第31天肿瘤体积比初始体积增大了6倍或以上。此外,接受HU治疗组小鼠的肿瘤体积也逐步增长,因而第31天肿瘤体积比初始体积增大了5倍或以上

[0169] 另一方面,观察到对于接受WOTS-418治疗的实验组小鼠的肿瘤体积,肿瘤生长从第14天起受到抑制,直到第31天肿瘤体积都保持不变。另一方面,观察到对于接受WOTS-418和羟基脲治疗的实验组小鼠的肿瘤体积,肿瘤生长从第17天起受到抑制,并表现出肿瘤体积下降的趋势(图31)。

[0170] 上述结果显示,WOTS-418能够抑制肿瘤生长,并证实了虽然单独应用羟基脲进行治疗时无法抑制肿瘤生长,但比起WOTS-418或羟基脲单独应用,WOTS-418和羟基脲联用能够增强抗肿瘤效果。

[0171] 实施例12检测重组痘苗病毒(WOTS-418)和羟基脲在移植有小鼠肾癌细胞系的小鼠:Renca中的抗癌效果

[0172] Balb/c nu/nu小鼠(雌性,8周龄)购自ORIENT BIO(韩国釜山),在经过一周适应期后,进行小鼠肾癌细胞系(Renca,韩国)的同种异体移植。观察直到肿瘤体积达到 100mm^3 ,随后开始给药。28天后测量肿瘤体积。

[0173] 将构建的移植有小鼠肾癌细胞系的小鼠分为3组($n=7$)。接受腹腔内盐水给药的组设为对照组,接受单剂量WOTS-418和羟基脲($1 \times 10^6\text{pfu}$, 30mg/kg)的组、接受多剂量WOTS-418和羟基脲($1 \times 10^6/1 \times 10^7\text{pfu}$, 30mg/kg)的组归为实验组。WOTS-418在第0天和第14天腹腔内给药,羟基脲每天两次腹腔内给药(6次/周)。

[0174] 结果证明,与对照组相比,接受WOTS-418和羟基脲治疗的实验组小鼠肿瘤体积受到了显著抑制,并证明了相比单剂量治疗组,多剂量治疗组的肿瘤体积受到了进一步抑制。此外,还证明了在第二次给药时增加WOTS-418浓度的多剂量治疗组中,抗癌效果有所增强(图32)。

[0175] 实施例13检测重组痘苗病毒(WOTS-418)和羟基脲在移植有小鼠结直肠癌细胞系的小鼠:CT-26中的抗癌效果

[0176] 实验实施例13.1移植有小鼠结直肠癌细胞的小鼠构建以及给药方法

[0177] Balb/c nu/nu小鼠(雌性,8周龄)购自ORIENT BIO(韩国釜山),在经过一周适应期后,进行小鼠结直肠癌细胞系(CT-26,韩国细胞系库)的同种异体移植。观察直到肿瘤体积达到 100mm^3 后开始给药。

[0178] 将构建的移植有小鼠结直肠癌细胞系的小鼠分为4组(G1、G2、G3: $n=15$, G4: $n=14$)。接受腹腔内盐水给药的组设为对照组,接受单用羟基脲(30mg/kg)腹腔内给药的组、接受单用WOTS-418两次腹腔内给药($1 \times 10^8\text{pfu}$, i.p., D0, D3)和两次瘤内给药($1 \times 10^7\text{pfu}$, i.t., D14, D21)的组、和接受WOTS-418和羟基脲以相同剂量和方案联合给药的组归为实验组。WOTS-418在第0和3天腹腔内给药,随后在第14和21天瘤内给药,羟基脲每天一次进行腹腔内给药(6次/周),从病毒给药前开始直到第26天(图33)。

[0179] 在第25天测量肿瘤体积并处死小鼠。随后分离出小鼠的免疫细胞,进行 γ -干扰素检测。

[0180] 实验实施例13.2鉴定肿瘤体积变化

[0181] 在实验实施例13.1中对每组小鼠进行给药,并在第25天测量肿瘤体积。结果显示,与对照组相比,接受WOTS-418单用给药的实验组小鼠、接受羟基脲单用的实验组小鼠、和接受WOTS-418和羟基脲联合给药的实验组小鼠都表现出了肿瘤体积受抑制。特别地,经鉴定接受WOTS-418和羟基脲联合给药的实验组小鼠肿瘤体积受到了显著抑制(图34)。

[0182] 实验实施例13.3 γ -干扰素检测

[0183] 在实验实施例13.1中对每组小鼠进行给药。随后分离出小鼠的免疫细胞,进行 γ -干扰素检测。

[0184] 具体地,使用(Ly-2)微珠试剂盒和磁激活细胞分选技术分离每组小鼠的脾CD8+T细胞,随后(以 $1 \times 10^4\text{cells}$)与CT-26细胞系共培养。对分泌IFN- γ 的CD8+T细胞进行ELISPOT(MABTECH,瑞典)实验,使用LK生物科学(首尔,韩国)对斑点进行扫描和计数。

[0185] 结果显示,相比于分离自对照组小鼠脾脏的CD8+T细胞,在接受WOTS-418单用给药

的实验组、接受羟基脲单用给药的实验组、和接受WOTS-418和羟基脲联合给药的实验组小鼠脾脏中,分离出了大量分泌IFN- γ 的CD8⁺T细胞。特别地,经鉴定接受WOTS-418和羟基脲联合给药的实验组小鼠肿瘤体积受到了显著抑制(图35和36)。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 拜耳诺克斯有限公司
[0003]	<120> 改进了安全性及抗肿瘤效果的溶瘤病毒
[0004]	<130> P2021-2710
[0005]	<150> KR 10-2019-0077377
[0006]	<151> 2019-06-27
[0007]	<160> 20
[0008]	<170> KoPatentIn 3.0
[0009]	<210> 1
[0010]	<211> 145
[0011]	<212> PRT
[0012]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0013]	<220>
[0014]	<223> 效应结构域氨基酸序列
[0015]	<400> 1
[0016]	Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
[0017]	1 5 10 15
[0018]	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
[0019]	20 25 30
[0020]	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
[0021]	35 40 45
[0022]	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
[0023]	50 55 60
[0024]	Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
[0025]	65 70 75 80
[0026]	Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
[0027]	85 90 95
[0028]	Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
[0029]	100 105 110
[0030]	Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
[0031]	115 120 125
[0032]	Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly
[0033]	130 135 140
[0034]	Gly
[0035]	145
[0036]	<210> 2
[0037]	<211> 438
[0038]	<212> DNA
[0039]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0040]	<220>
[0041]	<223> 效应结构域核苷酸序列

[0042]	<400> 2
[0043]	atggettcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggtgc gcgttctcgc 60
[0044]	ggccatagca accgacgtac ggcggttcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
[0045]	cgcctggagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacgtcc tcacgggatg 180
[0046]	gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctggggt cgcgcgacga tatcgtctac 240
[0047]	gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaaacatc 300
[0048]	tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggta 360
[0049]	atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420
[0050]	cctcatgtcg gggggtaa 438
[0051]	<210> 3
[0052]	<211> 227
[0053]	<212> PRT
[0054]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0055]	<220>
[0056]	<223> 突变HSV-TK C1氨基酸序列
[0057]	<400> 3
[0058]	Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
[0059]	1 5 10 15
[0060]	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
[0061]	20 25 30
[0062]	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
[0063]	35 40 45
[0064]	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
[0065]	50 55 60
[0066]	Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
[0067]	65 70 75 80
[0068]	Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
[0069]	85 90 95
[0070]	Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
[0071]	100 105 110
[0072]	Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
[0073]	115 120 125
[0074]	Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly
[0075]	130 135 140
[0076]	Gly Gly Gly Trp Glu Phe Thr Cys Pro Ala Pro Gly Pro His Pro His
[0077]	145 150 155 160
[0078]	Leu Arg Pro Pro Ser His Arg Arg Pro Pro Val Leu Pro Gly Arg Ala
[0079]	165 170 175
[0080]	Ile Pro Tyr Gly Gln His Asp Pro Pro Gly Arg Ala Gly Val Arg Gly
[0081]	180 185 190
[0082]	Pro His Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Lys His Arg Val Gly Gly Pro
[0083]	195 200 205

[0084]	Ser Gly Gly Gln Thr His Arg Pro Pro Gly Gln Thr Pro Ala Pro Arg
[0085]	210 215 220
[0086]	Arg Ala Ala
[0087]	225
[0088]	<210> 4
[0089]	<211> 681
[0090]	<212> DNA
[0091]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0092]	<220>
[0093]	<223> 突变HSV-TK C1核苷酸序列
[0094]	<400> 4
[0095]	atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggtgc gcgttctcgc 60
[0096]	ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
[0097]	cgcttgagc agaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacgtcc tcacgggatg 180
[0098]	gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240
[0099]	gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc 300
[0100]	tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggttgta 360
[0101]	atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420
[0102]	cctcatgtcg gggggggagg ctgggagttc acatgccccg ccccgggccc tcaccctcat 480
[0103]	cttcgaccgc catcccatcg ccgcccctc gtgctaccg gccgcgcgat accttatggg 540
[0104]	cagcatgacc cccagggcgg tgctggcgtt cgtggccctc atcccgccga ccttgcccgg 600
[0105]	cacaaacatc gtgttggggg cccttccgga ggacagacac atcgaccgcc tggccaaacg 660
[0106]	ccagcgcccc ggcgagcggc t 681
[0107]	<210> 5
[0108]	<211> 227
[0109]	<212> PRT
[0110]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0111]	<400> 5
[0112]	Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
[0113]	1 5 10 15
[0114]	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
[0115]	20 25 30
[0116]	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
[0117]	35 40 45
[0118]	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
[0119]	50 55 60
[0120]	Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
[0121]	65 70 75 80
[0122]	Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
[0123]	85 90 95
[0124]	Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
[0125]	100 105 110

[0126]	Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
[0127]	115 120 125
[0128]	Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly
[0129]	130 135 140
[0130]	Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile
[0131]	145 150 155 160
[0132]	Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg
[0133]	165 170 175
[0134]	Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Pro Gly Arg Ala Gly Val Arg Gly
[0135]	180 185 190
[0136]	Pro His Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Lys His Arg Val Gly Gly Pro
[0137]	195 200 205
[0138]	Ser Gly Gly Gln Thr His Arg Pro Pro Gly Gln Thr Pro Ala Pro Arg
[0139]	210 215 220
[0140]	Arg Ala Ala
[0141]	225
[0142]	<210> 6
[0143]	<211> 681
[0144]	<212> DNA
[0145]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0146]	<220>
[0147]	<223> 突变HSV-TK C3核苷酸序列
[0148]	<400> 6
[0149]	atggettcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggtgc gcgttctcgc 60
[0150]	ggccatagca accgacgtac ggcgttcgc cctcgccgc agcaagaagc cacggaagtc 120
[0151]	cgcctggagc agaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacgtcc tcacgggatg 180
[0152]	gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tctcgtctac 240
[0153]	gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc 300
[0154]	tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggttgta 360
[0155]	atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttcttggt 420
[0156]	cctcatgtcg ggggggagc tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc 480
[0157]	ttcgaccgcc atccatcgc cgccctctg tgctaccgg ccgcgcgata ctttatgggc 540
[0158]	agcatgaccc cccagggcgg tgctggcgtt cgtggccctc atcccgccga ctttgcccg 600
[0159]	cacaaacatc gtgttggggg cccttcggga ggacagacac atcgaccgcc tggccaaacg 660
[0160]	ccagcgcccc ggcgagcggc t 681
[0161]	<210> 7
[0162]	<211> 227
[0163]	<212> PRT
[0164]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0165]	<220>
[0166]	<223> 突变HSV-TK C40/45 氨基酸序列
[0167]	<400> 7

[0168]	Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
[0169]	1 5 10 15
[0170]	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
[0171]	20 25 30
[0172]	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
[0173]	35 40 45
[0174]	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr
[0175]	50 55 60
[0176]	Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
[0177]	65 70 75 80
[0178]	Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
[0179]	85 90 95
[0180]	Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
[0181]	100 105 110
[0182]	Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
[0183]	115 120 125
[0184]	Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly
[0185]	130 135 140
[0186]	Gly Gly Gly Trp Glu Phe Thr Cys Pro Ala Pro Gly Pro His Pro His
[0187]	145 150 155 160
[0188]	Leu Arg Pro Pro Ser His Arg Arg Pro Pro Val Leu Pro Gly Arg Ala
[0189]	165 170 175
[0190]	Ile Pro Tyr Gly Gln His Asp Pro Pro Gly Arg Ala Gly Val Arg Gly
[0191]	180 185 190
[0192]	Pro His Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Lys His Arg Val Gly Gly Pro
[0193]	195 200 205
[0194]	Ser Gly Gly Gln Thr His Arg Pro Pro Gly Gln Thr Pro Ala Pro Arg
[0195]	210 215 220
[0196]	Arg Ala Ala
[0197]	225
[0198]	<210> 8
[0199]	<211> 681
[0200]	<212> DNA
[0201]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0202]	<220>
[0203]	<223> 突变HSV-TK C40/45 核苷酸序列
[0204]	<400> 8
[0205]	atggettcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggtgc gcgttctcgc 60
[0206]	ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
[0207]	cgcttgagc agaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacgtcc tcacgggatg 180
[0208]	gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240
[0209]	gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cggaacatc 300

[0210]	tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggta	360
[0211]	atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttctggct	420
[0212]	cctcatgtcg ggggggagge tgggagtta catgccccgc cccgggccct caccctcatc	480
[0213]	ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctaccgg ccgcgcgata ctttatgggc	540
[0214]	agcatgaccc cccaggccgt gctggcggtc gtggccctca tcccgccgac cttgcccggc	600
[0215]	acaacatcg tgttgggggc ctttcggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc	660
[0216]	cagcgccccg gcgagcggt t	681
[0217]	<210>	9
[0218]	<211>	227
[0219]	<212>	PRT
[0220]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0221]	<220>	
[0222]	<223>	突变HSV-TK C52 氨基酸序列
[0223]	<400>	9
[0224]	Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala	
[0225]	1 5 10 15	
[0226]	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg	
[0227]	20 25 30	
[0228]	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr	
[0229]	35 40 45	
[0230]	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr	
[0231]	50 55 60	
[0232]	Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr	
[0233]	65 70 75 80	
[0234]	Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr	
[0235]	85 90 95	
[0236]	Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile	
[0237]	100 105 110	
[0238]	Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met	
[0239]	115 120 125	
[0240]	Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly	
[0241]	130 135 140	
[0242]	Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile	
[0243]	145 150 155 160	
[0244]	Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg	
[0245]	165 170 175	
[0246]	Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Pro Gly Arg Ala Gly Val Arg Gly	
[0247]	180 185 190	
[0248]	Pro His Pro Ala Asp Leu Ala Arg His Lys His Arg Val Gly Gly Pro	
[0249]	195 200 205	
[0250]	Ser Gly Gly Gln Thr His Arg Pro Pro Gly Gln Thr Pro Ala Pro Arg	
[0251]	210 215 220	

[0252]	Arg Ala Ala
[0253]	225
[0254]	<210> 10
[0255]	<211> 1132
[0256]	<212> DNA
[0257]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0258]	<220>
[0259]	<223> 突变HSV-TK C52 核苷酸序列
[0260]	<400> 10
[0261]	atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgtttctcgc 60
[0262]	ggccatagca accgacgtac ggcgttgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
[0263]	cgcctggagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg 180
[0264]	gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctggggt cgcgcgacga tatcgtctac 240
[0265]	gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaaacatc 300
[0266]	tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggttgta 360
[0267]	atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgtttctggt 420
[0268]	cctcatgtcg ggggggaggc tgggagttca catgccccgc ccccgccct caccctcatc 480
[0269]	ttcgaccgcc atcccatgc cgccctctg tgctaccgg ccgcgcgata ctttatgggc 540
[0270]	agcatgaccc ccccgagccg tgctggcggt cgtggccctc atcccgccga ctttgcccgg 600
[0271]	cacaaacatc gtgttggggg cccttcgga ggacagacac atcgaccgc tggccaaacg 660
[0272]	ccagcgcccc ggcgagcggc ttgacctgac tatgctggcc gcgattcgcc gcgtttacgg 720
[0273]	gctgcttgcc aatacgggtg ggtatctgca gggcggcggg tcgtggtggg aggattgggg 780
[0274]	acagctttcg gggacggccg tgccgcccc ggggtgccgag cccagagca acgcggggcc 840
[0275]	acgaccccat atcggggaca cgttatctac cctgtttcgg gccccgagt tgctggcccc 900
[0276]	caacggcgac ctgtataacg tgtttgcctg ggccttgac gtcttgcca aacgcctccg 960
[0277]	tcccatgcac gtctttatcc tggattacga ctaatcgccc gccggtgcc gggacgcct 1020
[0278]	gctgcaactt acctccggga tgggtccagac ccacgtcacc acccaggct ccataccgac 1080
[0279]	gatctgcgac ctggcgcgca cgtttgcgcg ggagatgggg gaggctaact aa 1132
[0280]	<210> 11
[0281]	<211> 181
[0282]	<212> PRT
[0283]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0284]	<220>
[0285]	<223> 突变HSV-TK C57 氨基酸序列
[0286]	<400> 11
[0287]	Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
[0288]	1 5 10 15
[0289]	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
[0290]	20 25 30
[0291]	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
[0292]	35 40 45
[0293]	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr

[0294]	50	55	60
[0295]	Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr		
[0296]	65	70	75
[0297]	Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr		
[0298]		85	90
[0299]	Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile		95
[0300]		100	105
[0301]	Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met		110
[0302]		115	120
[0303]	Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly		125
[0304]	130	135	140
[0305]	Gly Arg Leu Gly Val His Met Pro Arg Pro Arg Pro Ser Pro Ser Ser		
[0306]	145	150	155
[0307]	Ser Thr Ala Ile Pro Ser Pro Pro Ser Cys Ala Thr Arg Pro Arg Asp		160
[0308]		165	170
[0309]	Thr Leu Trp Ala Ala		175
[0310]		180	
[0311]	<210> 12		
[0312]	<211> 543		
[0313]	<212> DNA		
[0314]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0315]	<220>		
[0316]	<223> 突变HSV-TK C57 核苷酸序列		
[0317]	<400> 12		
[0318]	tgctgccc at aaggtatcgc gcggccgggt agcacaggag ggcggcgatg ggatggcggt	60	
[0319]	cgaagatgag ggtgagggcc gggggcgggg catgtgaact cccagcctcc ccccgacatg	120	
[0320]	aggagccaga acggcgctcg tcacggcata aggcattgcc attgttatct gggcgcttgt	180	
[0321]	cattaccacc gccgcgtccc cgcccgatat ctaccctgg tcgaggcggt gttgtgtggt	240	
[0322]	gtagatgttc gcgattgtct cggaagcccc cagcacctgc cagtaagtca tcggctcggg	300	
[0323]	tacgtagacg atatcgtcgc gcgaaccag ggccaccagc agttgcgtgg tgggtggtttt	360	
[0324]	ccccatcccg tgaggaccgt ctatataaac ccgcagtagc gtgggcattt tctgctccag	420	
[0325]	gcggacttcc gtggcttctt gctgccggcg agggcgcaac gccgtacgtc ggttgctatg	480	
[0326]	gccgcgagaa cgcgagcct ggtcgaacgc agacgcgtgt tgatggcagg ggtacgaagc	540	
[0327]	cat	543	
[0328]	<210> 13		
[0329]	<211> 376		
[0330]	<212> PRT		
[0331]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0332]	<220>		
[0333]	<223> 突变HSV-TK WOTS-418 氨基酸序列		
[0334]	<400> 13		
[0335]	Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala		

[0336]	1	5	10	15
[0337]	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg			
[0338]	20	25	30	
[0339]	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr			
[0340]	35	40	45	
[0341]	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr			
[0342]	50	55	60	
[0343]	Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr			
[0344]	65	70	75	80
[0345]	Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Gln Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr			
[0346]	85	90	95	
[0347]	Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile			
[0348]	100	105	110	
[0349]	Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met			
[0350]	115	120	125	
[0351]	Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Val Gly			
[0352]	130	135	140	
[0353]	Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile			
[0354]	145	150	155	160
[0355]	Phe Asp Arg His Pro Ile Tyr Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg			
[0356]	165	170	175	
[0357]	Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala			
[0358]	180	185	190	
[0359]	Leu Ile Pro Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu			
[0360]	195	200	205	
[0361]	Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly			
[0362]	210	215	220	
[0363]	Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly			
[0364]	225	230	235	240
[0365]	Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ser Trp Trp			
[0366]	245	250	255	
[0367]	Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala			
[0368]	260	265	270	
[0369]	Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu			
[0370]	275	280	285	
[0371]	Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu			
[0372]	290	295	300	
[0373]	Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg			
[0374]	305	310	315	320
[0375]	Pro Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys			
[0376]	325	330	335	
[0377]	Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val			

[0378]	340	345	350
[0379]	Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe		
[0380]	355	360	365
[0381]	Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn		
[0382]	370	375	
[0383]	<210> 14		
[0384]	<211> 1131		
[0385]	<212> DNA		
[0386]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0387]	<220>		
[0388]	<223> 突变HSV-TK WOTS-418 核苷酸序列		
[0389]	<400> 14		
[0390]	atggcttcgt acccctgcc tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgtttctcgc	60	
[0391]	ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc	120	
[0392]	cgcttgagc agaaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg	180	
[0393]	gggaaaacca ccaccacga actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tategtctac	240	
[0394]	gtacccgagc cgatgactta ctggcagggt ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc	300	
[0395]	tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggtg	360	
[0396]	atgacaagcg ccagataac aatgggcatg cttatgccg tgaccgacgc cgttctggct	420	
[0397]	cctcatgtcg gtggtgagge tgggagtcca catgccccgc ccccgccct caccctcacc	480	
[0398]	ttcgaccgcc atcccatcta cgcctcctg tgctaccgg ccgcgcgata cttatgggc	540	
[0399]	agcatgaccc ctcaggccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgccgac cttgcccgc	600	
[0400]	acaacatcg tgttgggggc cttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc	660	
[0401]	cagcgcgccg gcgagcggct tgacctggct atgctggccg cgattcgcg cgtttacggg	720	
[0402]	ctgcttgcca atacgtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggtggga ggattggga	780	
[0403]	cagctttcgg ggacggcgt gccgcccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggcccc	840	
[0404]	cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg ccccagagt gctggcccc	900	
[0405]	aacggcgacc tgtataacgt gtttgcttg gccttgagc tcttgccaa acgcctccgt	960	
[0406]	cccatgcaag tctttatcct ggattacgac caatcgccc cggctgcg ggacgcctg	1020	
[0407]	ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cagtcacca cccaggtc cataccgacg	1080	
[0408]	atctgcgacc tggcgcgcac gtttggccg gagatggggg aggctaacta a	1131	
[0409]	<210> 15		
[0410]	<211> 376		
[0411]	<212> PRT		
[0412]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0413]	<220>		
[0414]	<223> 1型单纯疱疹病毒胸苷激酶氨基酸序列		
[0415]	<400> 15		
[0416]	Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala		
[0417]	1 5 10 15		
[0418]	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg		
[0419]	20 25 30		

[0420]	Arg	Gln	Gln	Glu	Ala	Thr	Glu	Val	Arg	Leu	Glu	Gln	Lys	Met	Pro	Thr
[0421]			35					40					45			
[0422]	Leu	Leu	Arg	Val	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Gly	Met	Gly	Lys	Thr	Thr
[0423]			50					55					60			
[0424]	Thr	Thr	Gln	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Arg	Asp	Asp	Ile	Val	Tyr
[0425]	65					70					75					80
[0426]	Val	Pro	Glu	Pro	Met	Thr	Tyr	Trp	Gln	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Thr
[0427]					85					90					95	
[0428]	Ile	Ala	Asn	Ile	Tyr	Thr	Thr	Gln	His	Arg	Leu	Asp	Gln	Gly	Glu	Ile
[0429]					100					105					110	
[0430]	Ser	Ala	Gly	Asp	Ala	Ala	Val	Val	Met	Thr	Ser	Ala	Gln	Ile	Thr	Met
[0431]					115					120					125	
[0432]	Gly	Met	Pro	Tyr	Ala	Val	Thr	Asp	Ala	Val	Leu	Ala	Pro	His	Val	Gly
[0433]					130					135					140	
[0434]	Gly	Glu	Ala	Gly	Ser	Ser	His	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile
[0435]	145						150					155				160
[0436]	Phe	Asp	Arg	His	Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	Arg
[0437]					165					170					175	
[0438]	Tyr	Leu	Met	Gly	Ser	Met	Thr	Pro	Gln	Ala	Val	Leu	Ala	Phe	Val	Ala
[0439]					180					185					190	
[0440]	Leu	Ile	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Gly	Thr	Asn	Ile	Val	Leu	Gly	Ala	Leu
[0441]					195					200					205	
[0442]	Pro	Glu	Asp	Arg	His	Ile	Asp	Arg	Leu	Ala	Lys	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly
[0443]					210					215					220	
[0444]	Glu	Arg	Leu	Asp	Leu	Ala	Met	Leu	Ala	Ala	Ile	Arg	Arg	Val	Tyr	Gly
[0445]	225						230					235				240
[0446]	Leu	Leu	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln	Gly	Gly	Gly	Ser	Trp	Trp
[0447]					245					250					255	
[0448]	Glu	Asp	Trp	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Val	Pro	Pro	Gln	Gly	Ala
[0449]					260					265					270	
[0450]	Glu	Pro	Gln	Ser	Asn	Ala	Gly	Pro	Arg	Pro	His	Ile	Gly	Asp	Thr	Leu
[0451]					275					280					285	
[0452]	Phe	Thr	Leu	Phe	Arg	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Ala	Pro	Asn	Gly	Asp	Leu
[0453]					290					295					300	
[0454]	Tyr	Asn	Val	Phe	Ala	Trp	Ala	Leu	Asp	Val	Leu	Ala	Lys	Arg	Leu	Arg
[0455]	305						310					315				320
[0456]	Pro	Met	His	Val	Phe	Ile	Leu	Asp	Tyr	Asp	Gln	Ser	Pro	Ala	Gly	Cys
[0457]					325					330					335	
[0458]	Arg	Asp	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Met	Val	Gln	Thr	His	Val
[0459]					340					345					350	
[0460]	Thr	Thr	Pro	Gly	Ser	Ile	Pro	Thr	Ile	Cys	Asp	Leu	Ala	Arg	Thr	Phe
[0461]					355					360					365	

[0462]	Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn
[0463]	370 375
[0464]	<210> 16
[0465]	<211> 1134
[0466]	<212> DNA
[0467]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0468]	<220>
[0469]	<223> 1型单纯疱疹病毒胸苷激酶核苷酸序列
[0470]	<400> 16
[0471]	atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc 60
[0472]	ggccatagca accgacgtac ggcgttgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
[0473]	cgcctggagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg 180
[0474]	gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctggggt cgcgcgacga tatcgtctac 240
[0475]	gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaaacatc 300
[0476]	tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggtg 360
[0477]	atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ctttatgccg tgaccgacgc cgttctggtc 420
[0478]	cctcatgtcg gggggtgaga ggctgggagt tcacatgccc cgcccccgcc cctcacctc 480
[0479]	atcttcgacc gccatcccat cgccgccctc ctgtgctacc cggccgcgcg ataccttatg 540
[0480]	ggcagcatga cccccaggc cgtgctggcg ttcgtggccc tcatcccgcc gaccttgccc 600
[0481]	ggcacaaca tcgtgttggg ggcccttcg gagcacagac acatcgaccg cctggccaaa 660
[0482]	cgccagcgcc ccggcgagcg gcttgacctg gctatgctgg ccgcgattcg ccgcgtttac 720
[0483]	gggctgcttg ccaatacggg gcggtatctg cagggcggcg ggtcgtggtg ggaggattgg 780
[0484]	ggacagcttt cggggacggc cgtgccgccc cagggtgccg agccccagag caacgcgggc 840
[0485]	ccacgacccc atatcgggga cacgttatct accctgttcc gggccccga gttgctggcc 900
[0486]	cccaacggcg acctgtataa cgtgtttgcc tgggccttgg acgtcttggc caaacgcctc 960
[0487]	cgtcccatgc acgtctttat cctggattac gaccaatcgc ccgccggctg ccgggacgcc 1020
[0488]	ctgctgcaac ttacctccgg gatggtccag acccacgtca ccacccagg ctccataccg 1080
[0489]	acgatctgcg acctggcgcg cacgtttgcc cgggagatgg gggaggctaa ctaa 1134
[0490]	<210> 17
[0491]	<211> 62
[0492]	<212> PRT
[0493]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0494]	<220>
[0495]	<223> 突变HSV-TK C19 氨基酸序列
[0496]	<400> 17
[0497]	Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
[0498]	1 5 10 15
[0499]	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
[0500]	20 25 30
[0501]	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Leu Glu Gln Lys Met Pro Thr
[0502]	35 40 45
[0503]	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys

[0504]	50	55	60
[0505]	<210> 18		
[0506]	<211> 186		
[0507]	<212> DNA		
[0508]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0509]	<220>		
[0510]	<223> 突变HSV-TK C19 核苷酸序列		
[0511]	<400> 18		
[0512]	atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc	60	
[0513]	ggccatagca accgacgtac ggcgttgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc	120	
[0514]	cgcttgagc agaaaatgcc cacgtactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg	180	
[0515]	gggaaa	186	
[0516]	<210> 19		
[0517]	<211> 16		
[0518]	<212> DNA		
[0519]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0520]	<220>		
[0521]	<223> 探针(E9L)核苷酸序列		
[0522]	<400> 19		
[0523]	caggetacca gttcaa	16	
[0524]	<210> 20		
[0525]	<211> 16		
[0526]	<212> DNA		
[0527]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0528]	<220>		
[0529]	<223> 探针(E9L)核苷酸序列		
[0530]	<400> 20		
[0531]	caggetacca gttcaa	16	

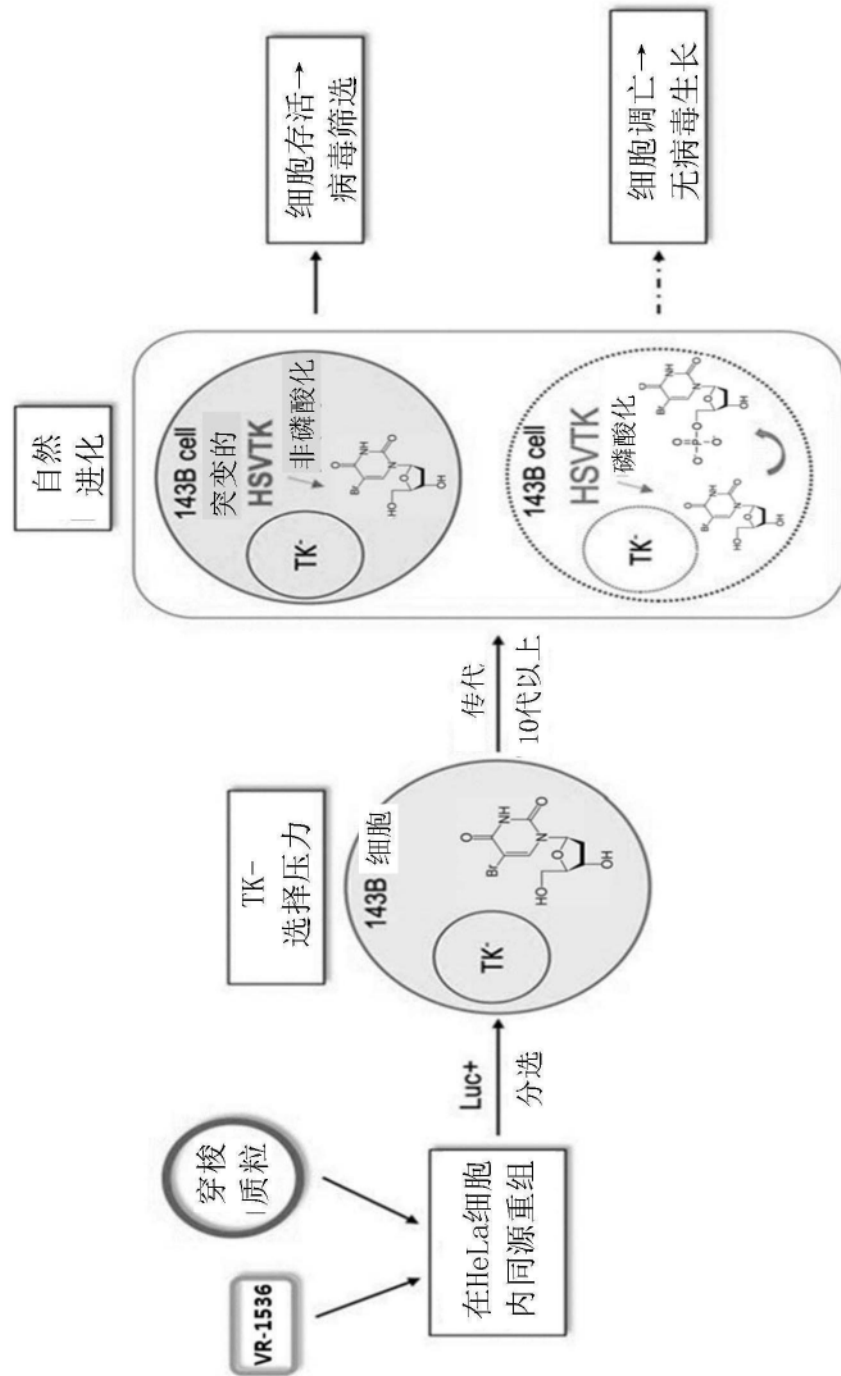


图1

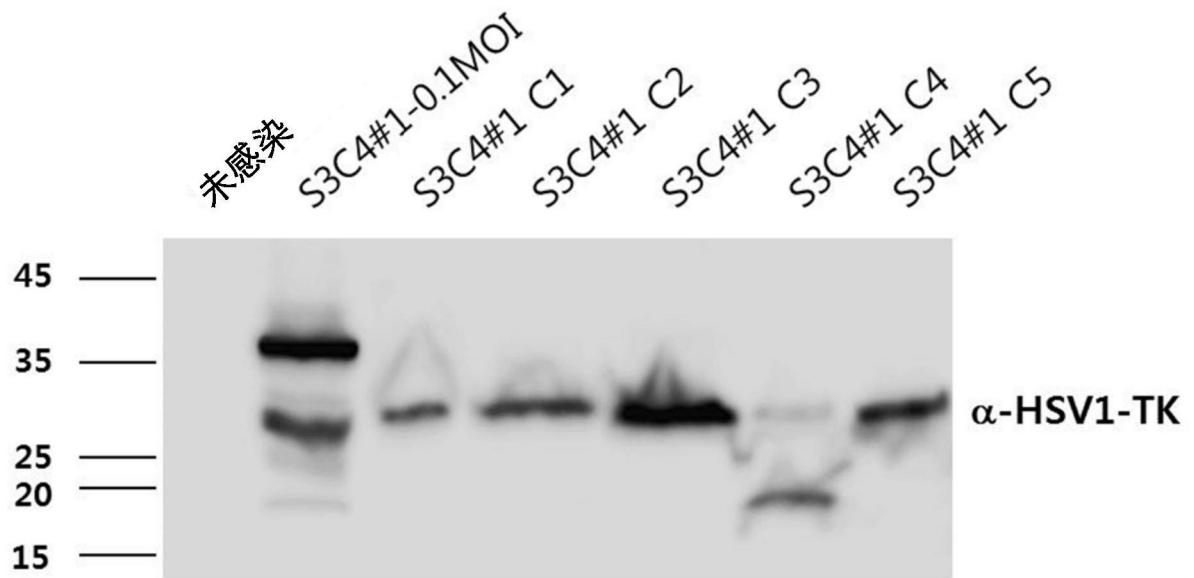


图2

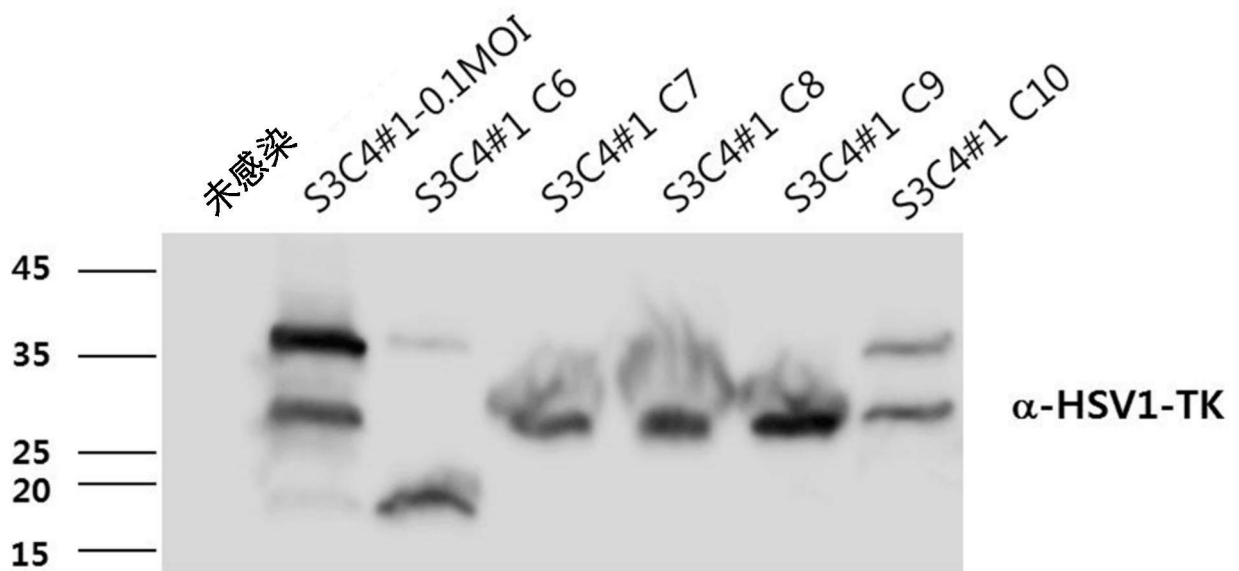


图3

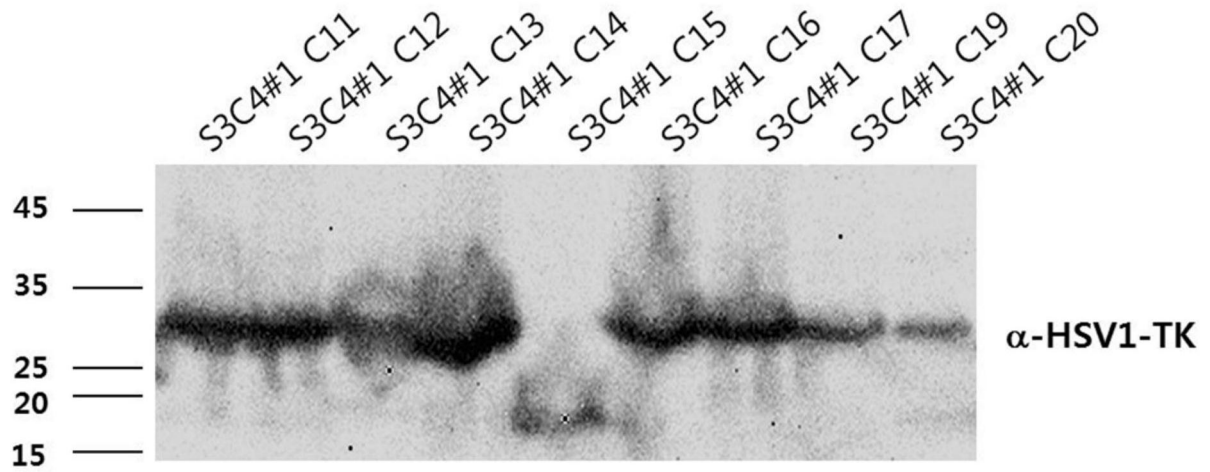


图4

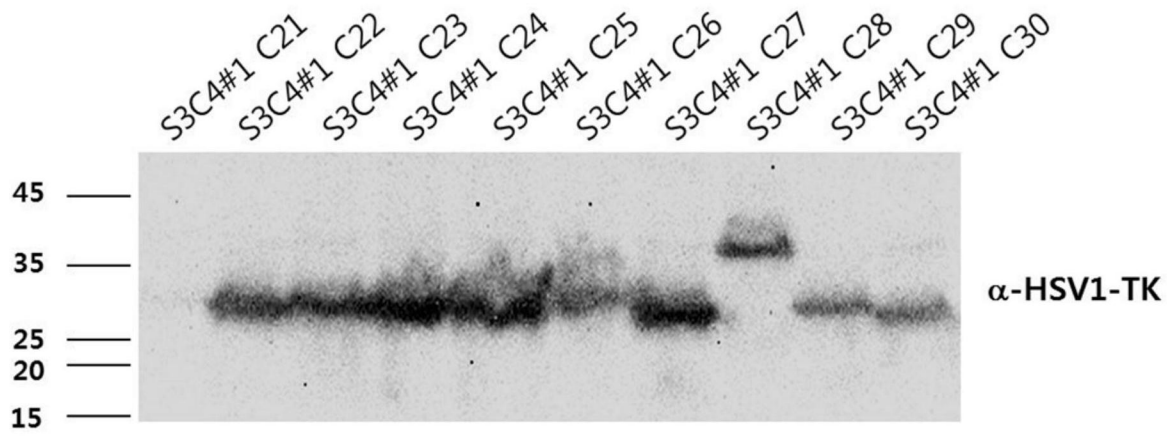


图5

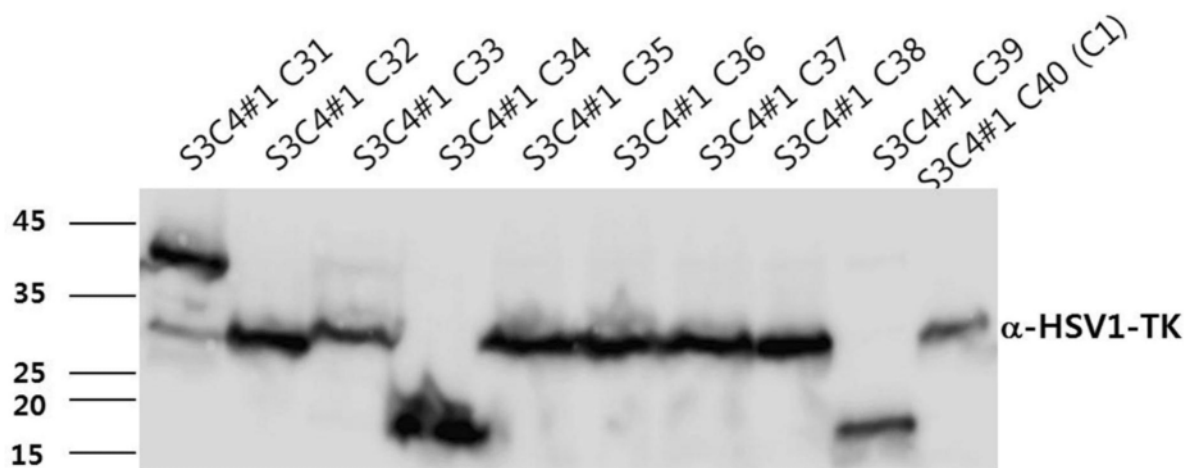


图6

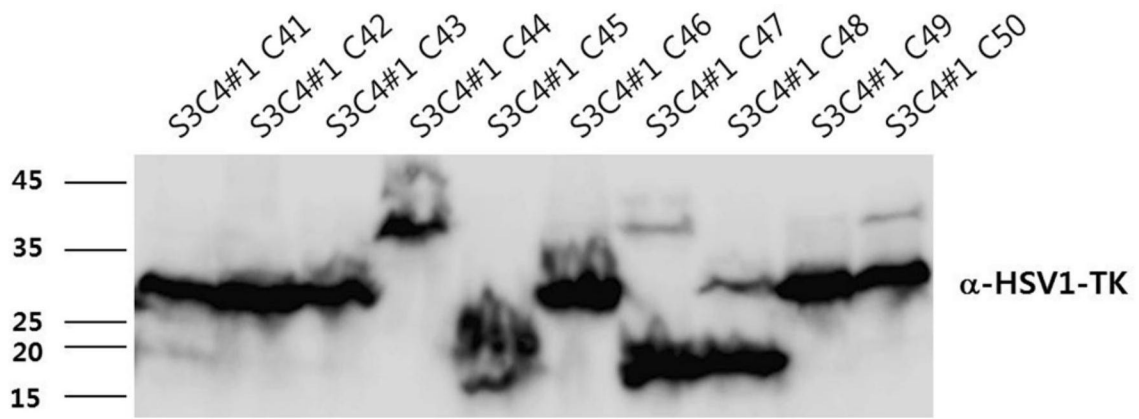


图7

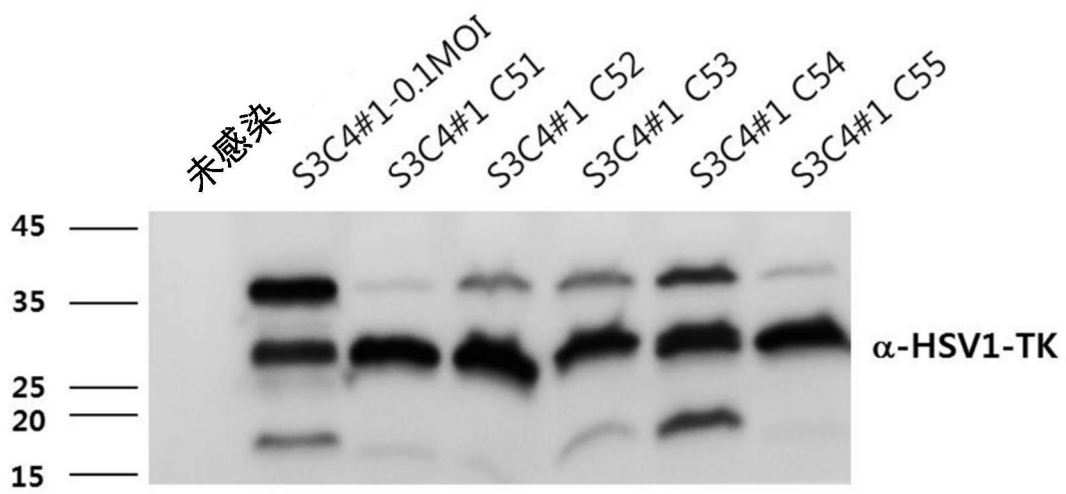


图8

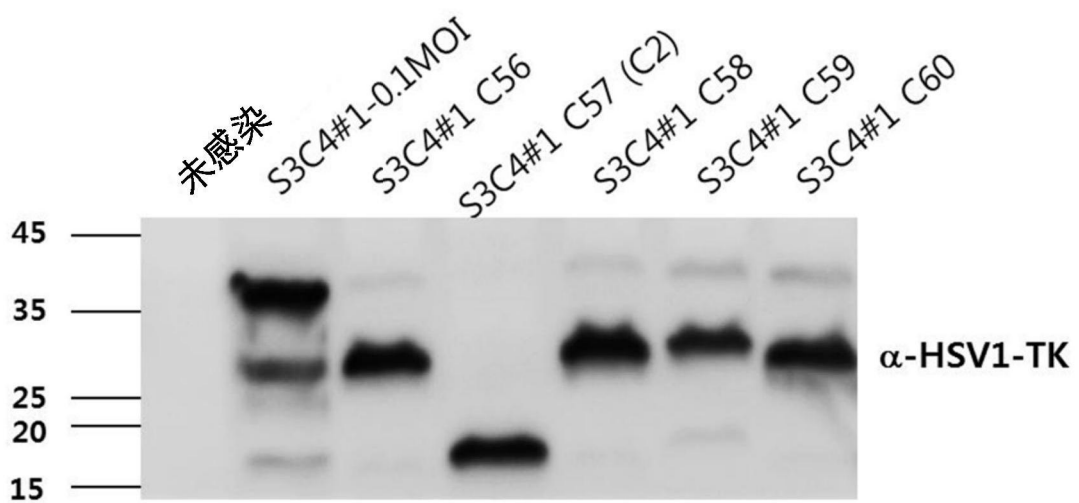


图9



图10



图11



图12



图13

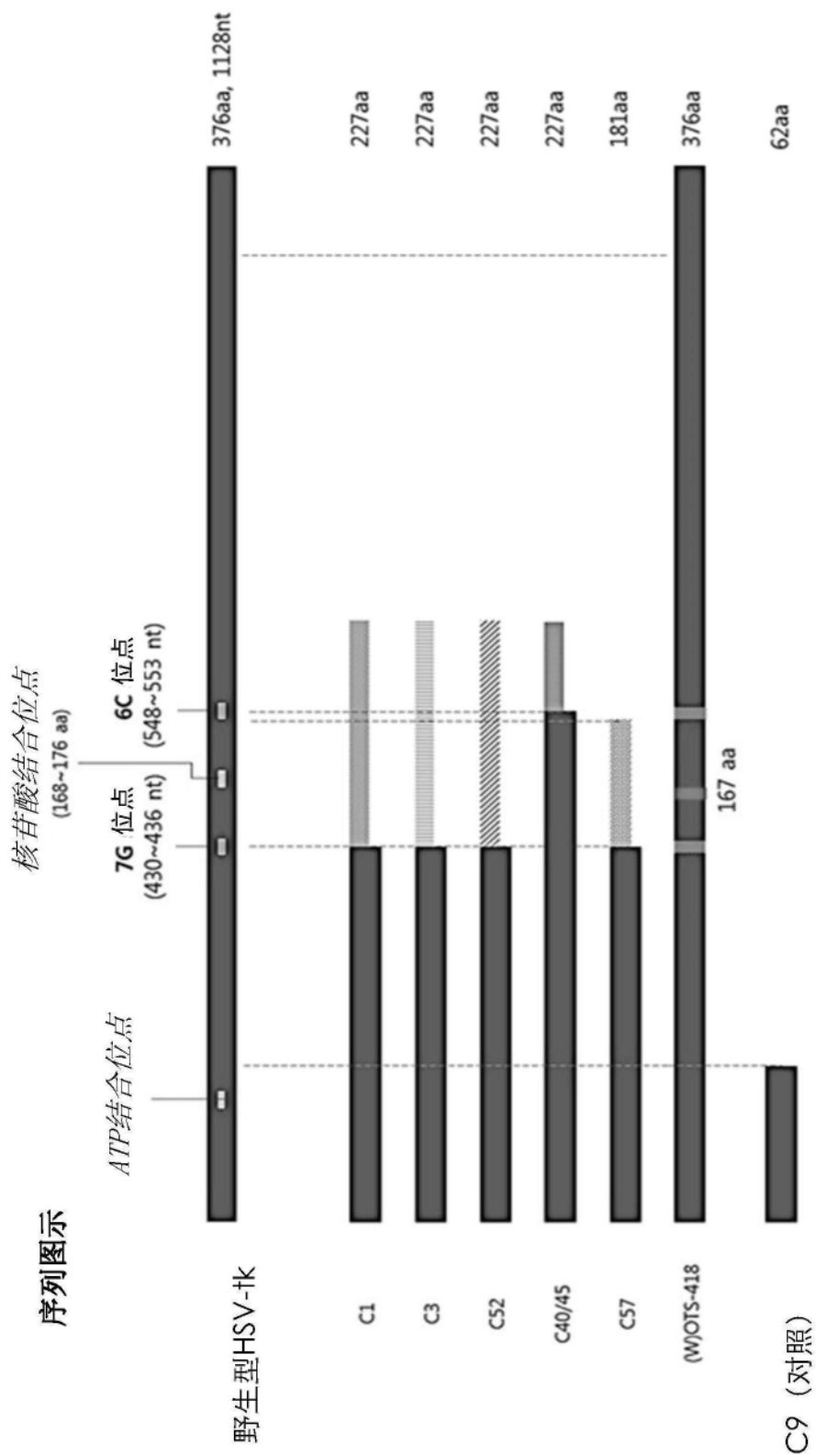


图14

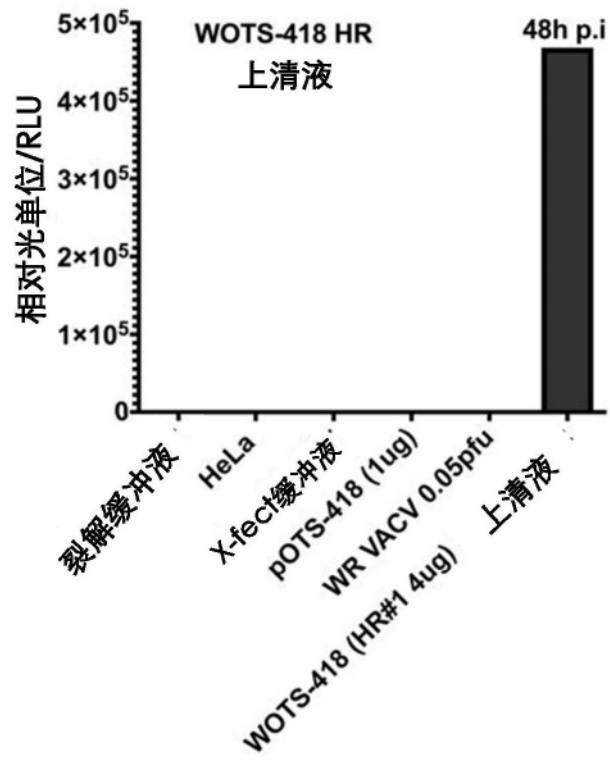


图15

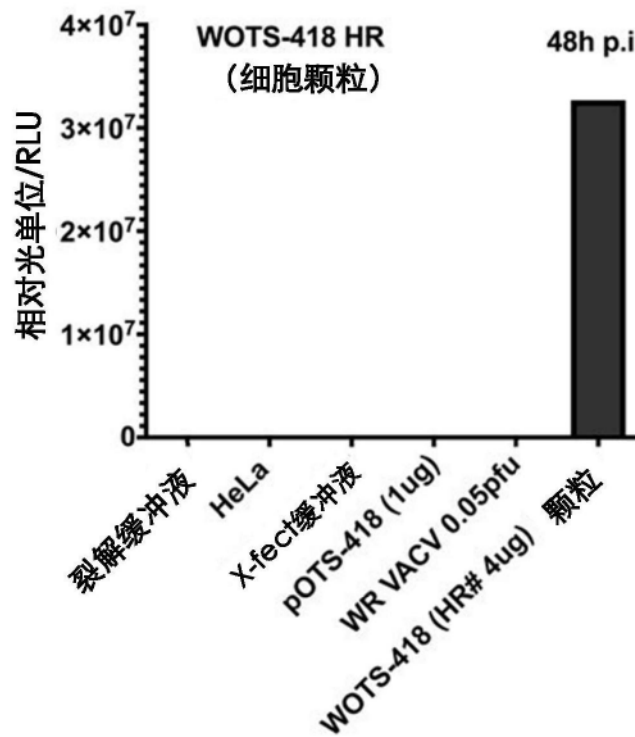


图16

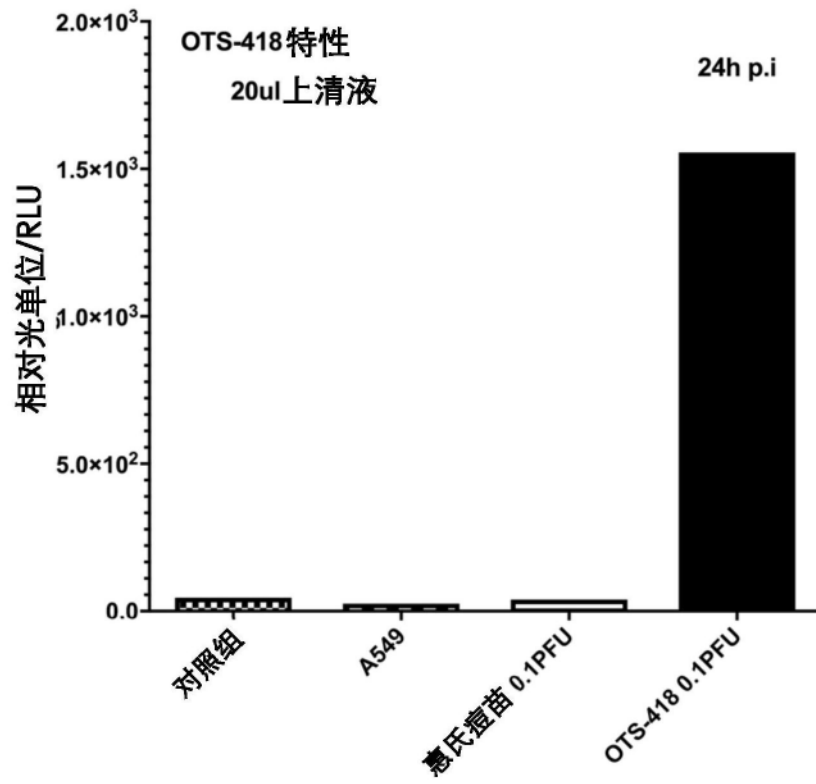


图17

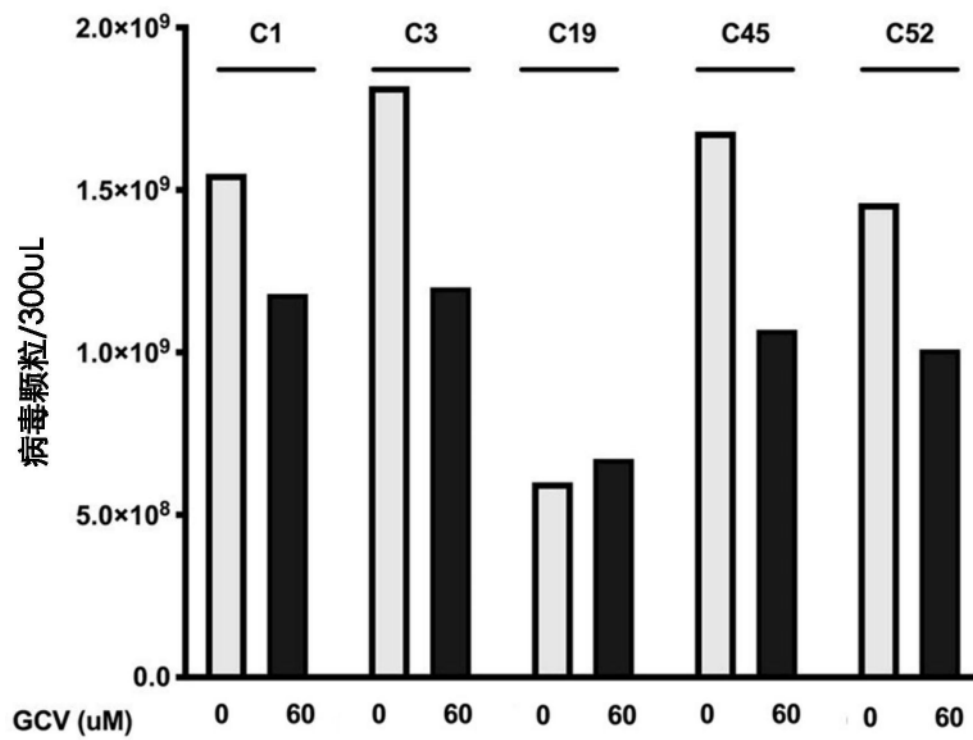


图18

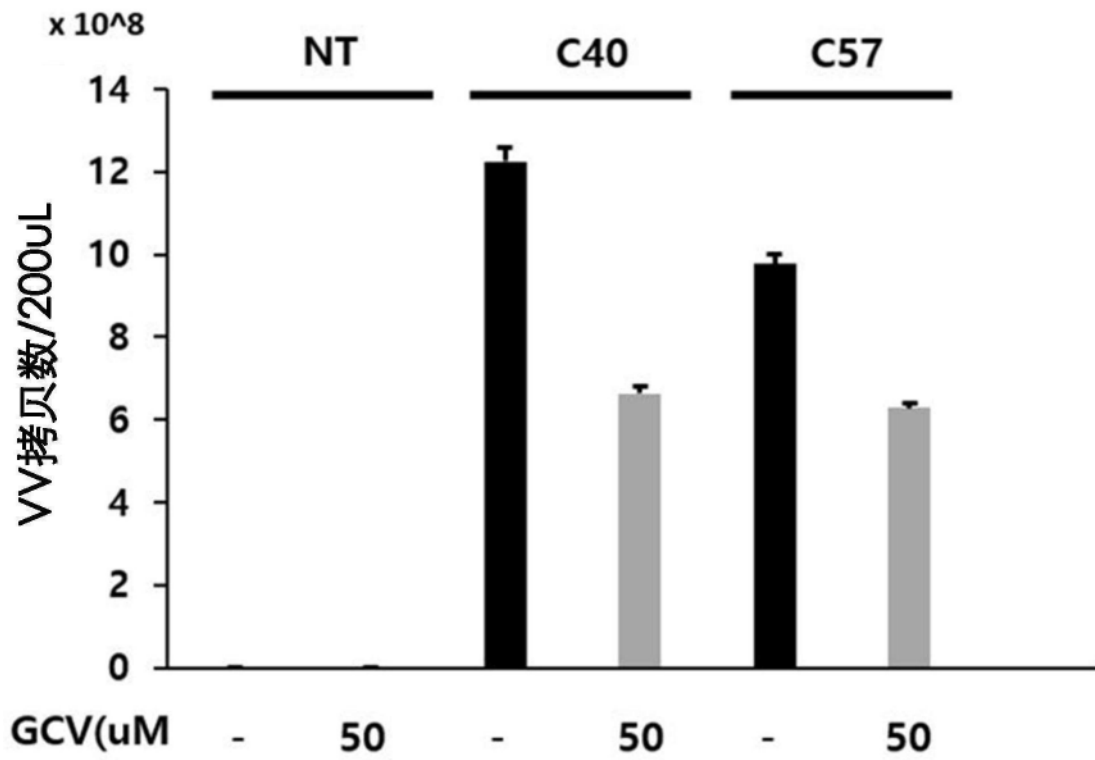


图19

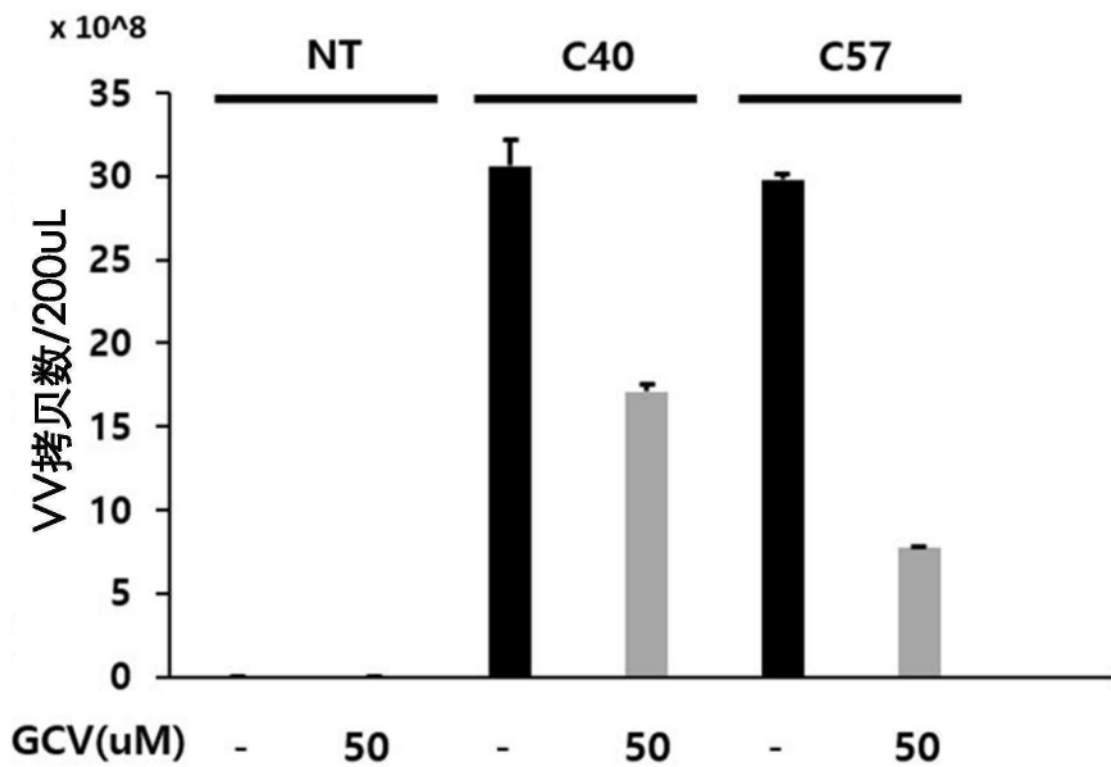


图20

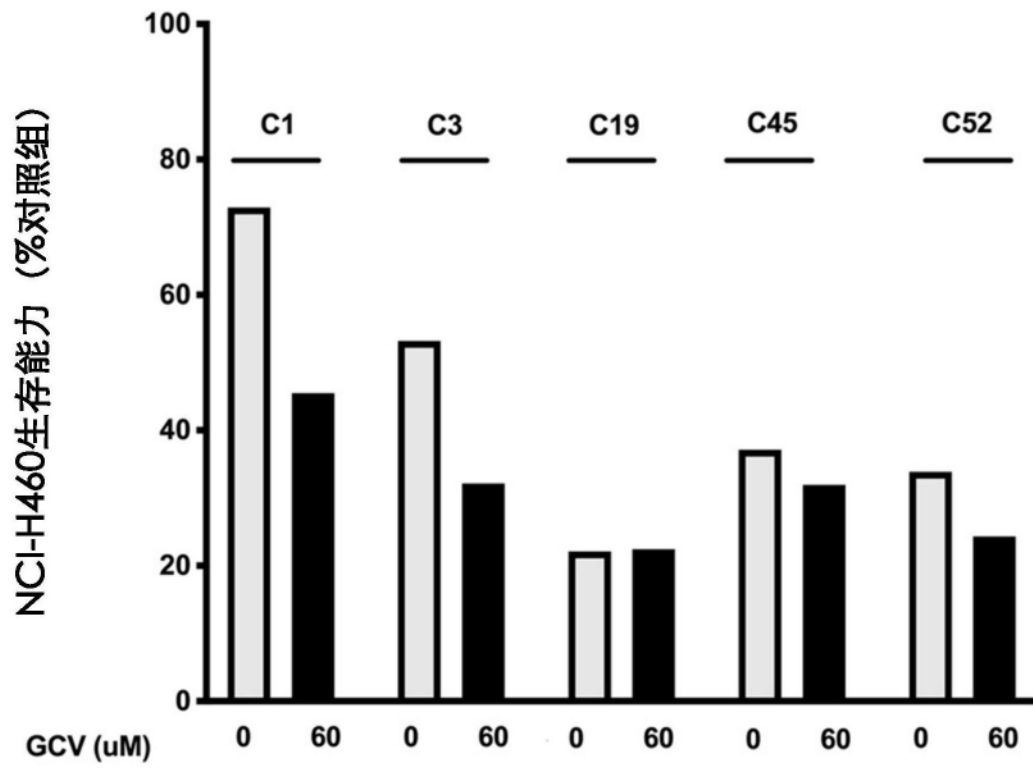


图21

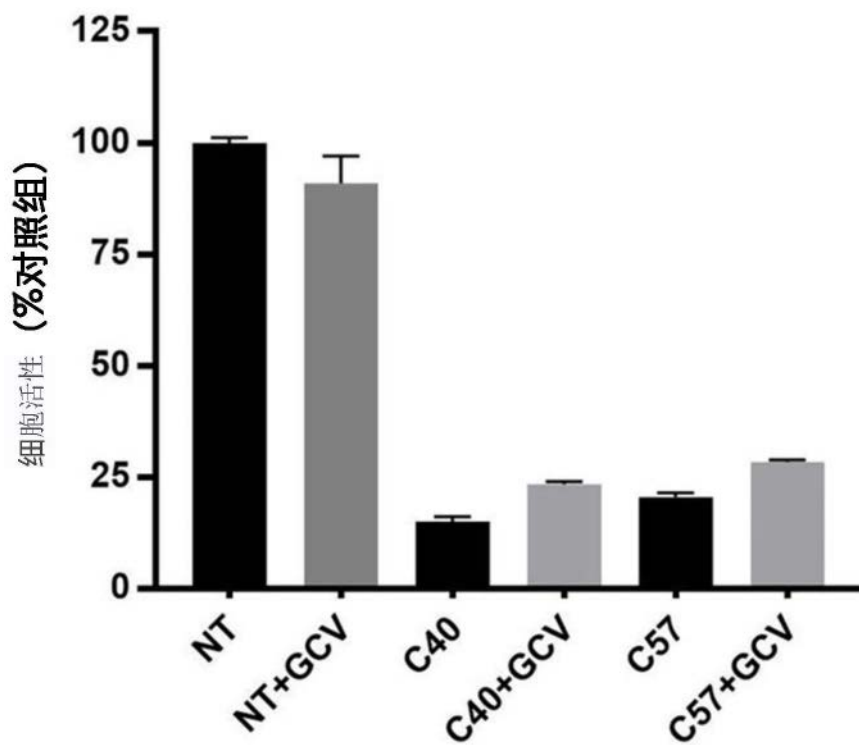


图22

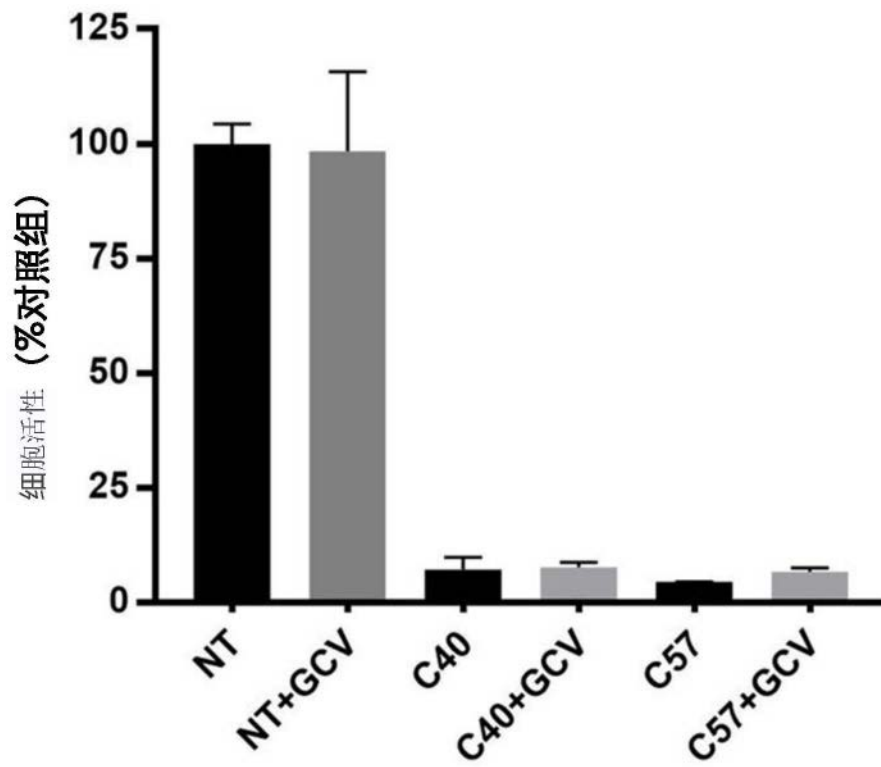


图23

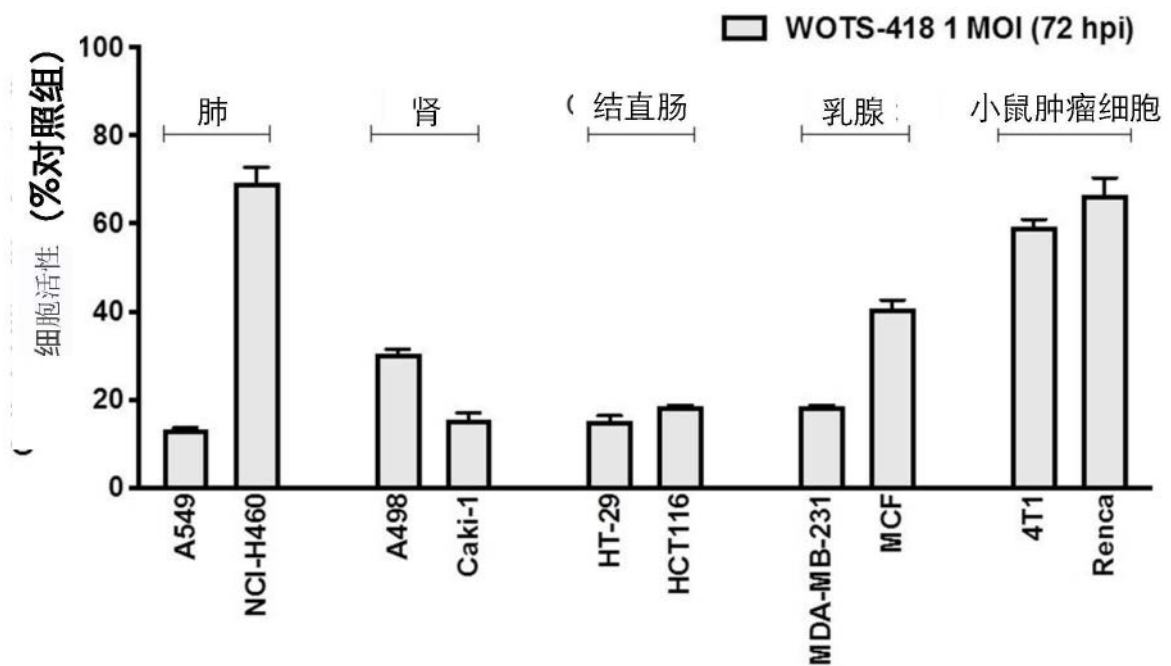


图24

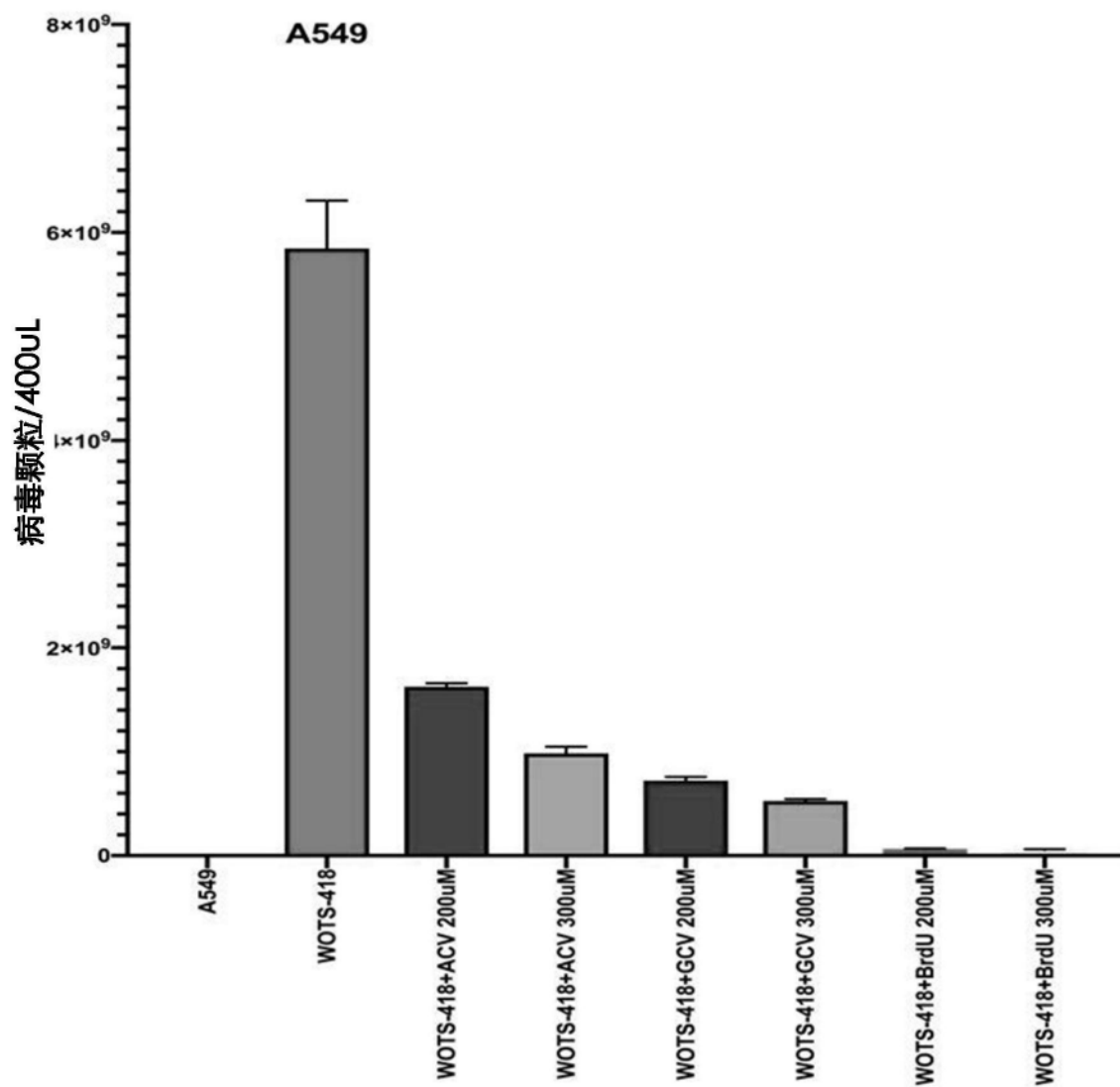


图25

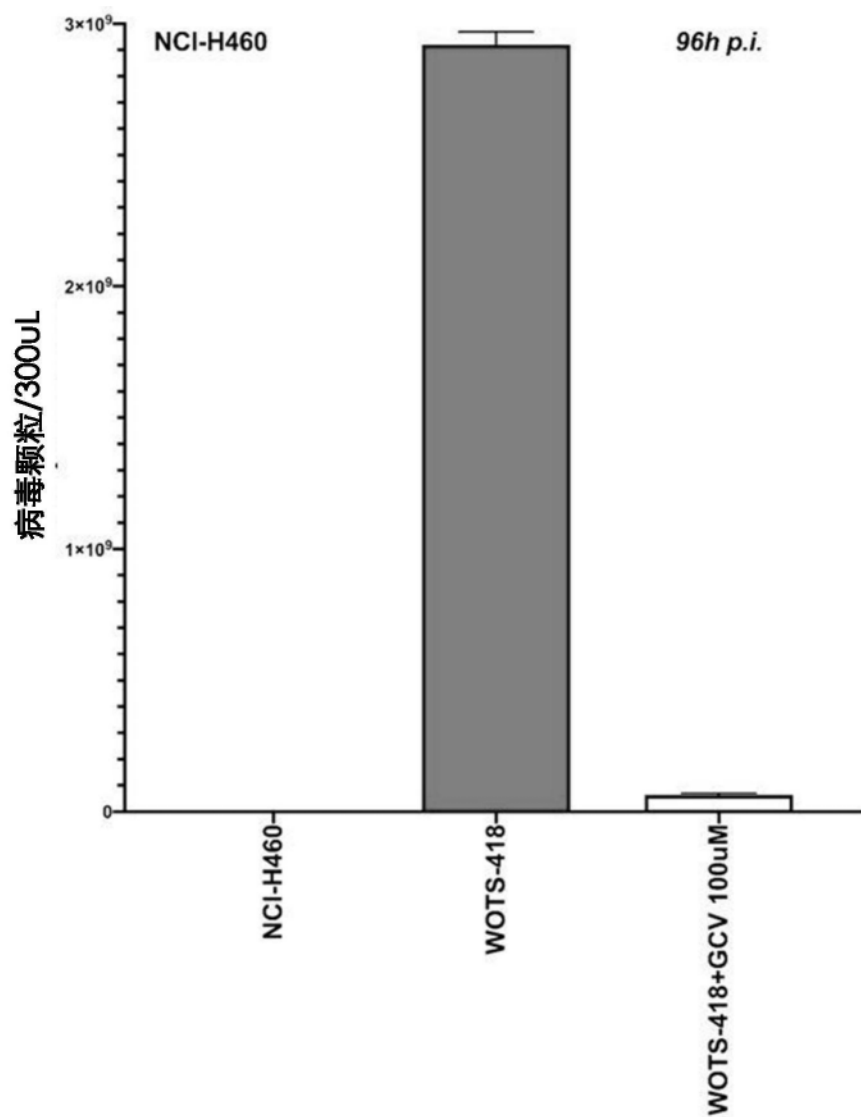


图26

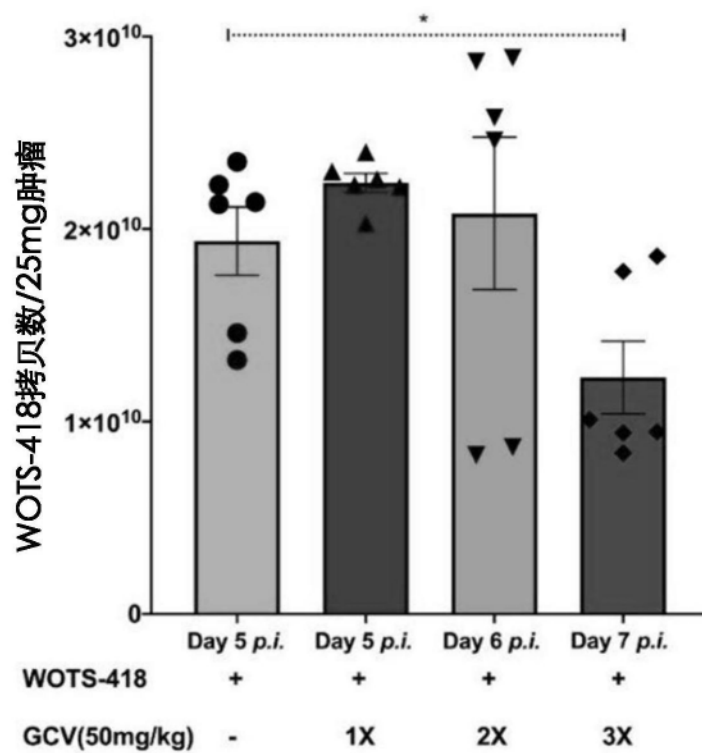


图27

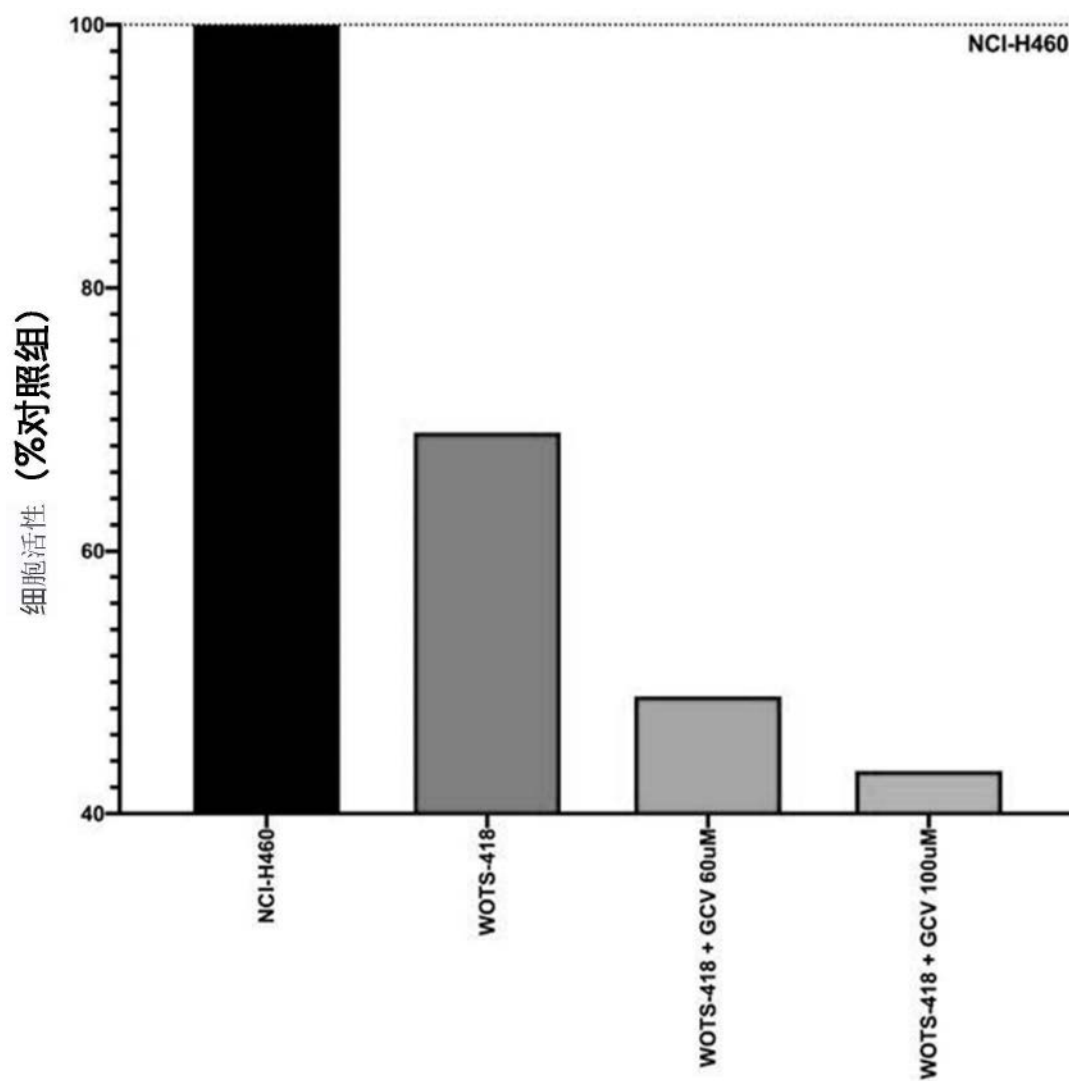


图28

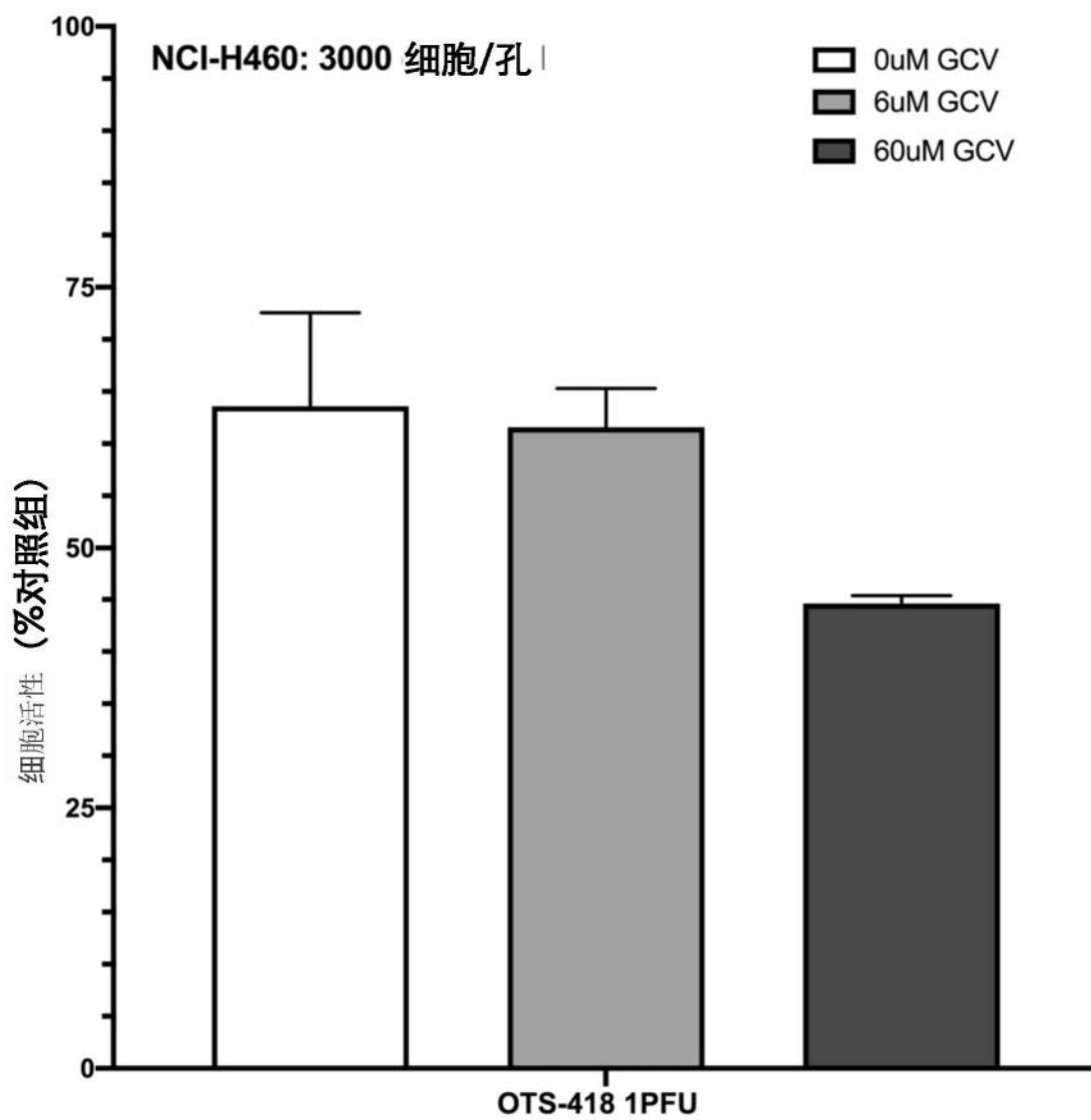


图29

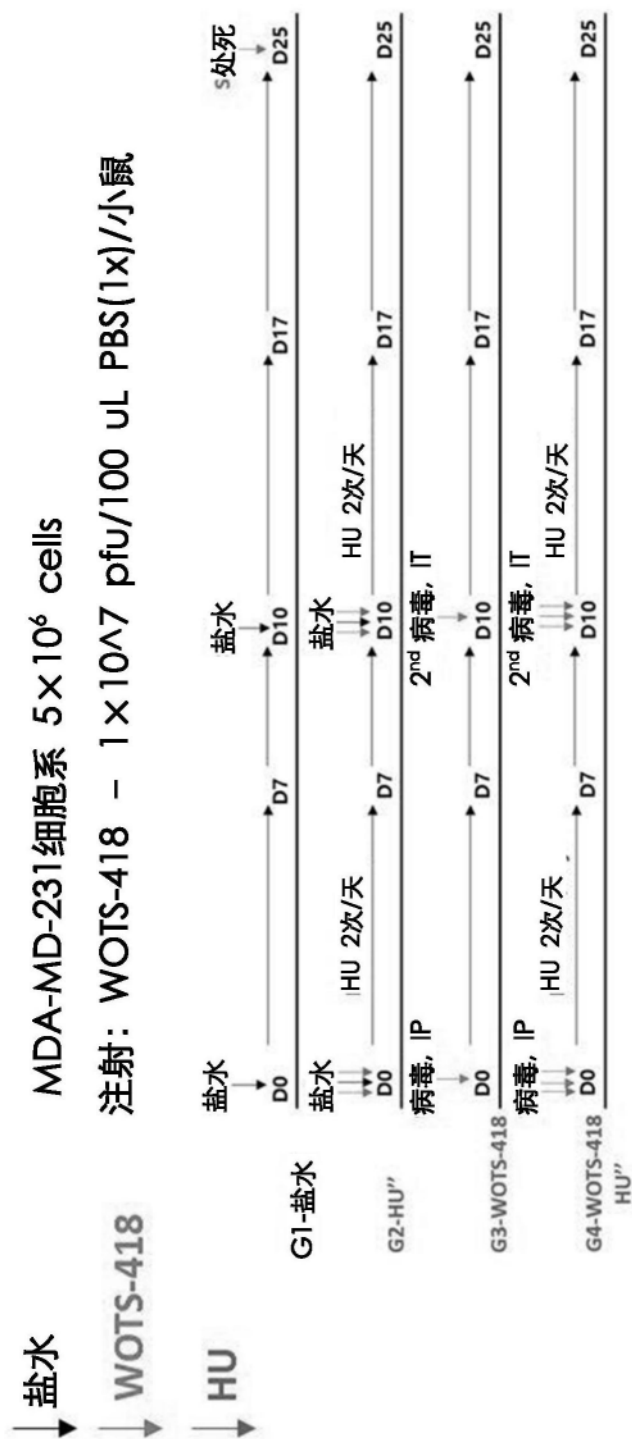


图30

WOTS-418: D0; IP, D10; IT
HU: D0-D5, D10-D15; 2次, IP 注射

MDA-MB-231 肿瘤细胞

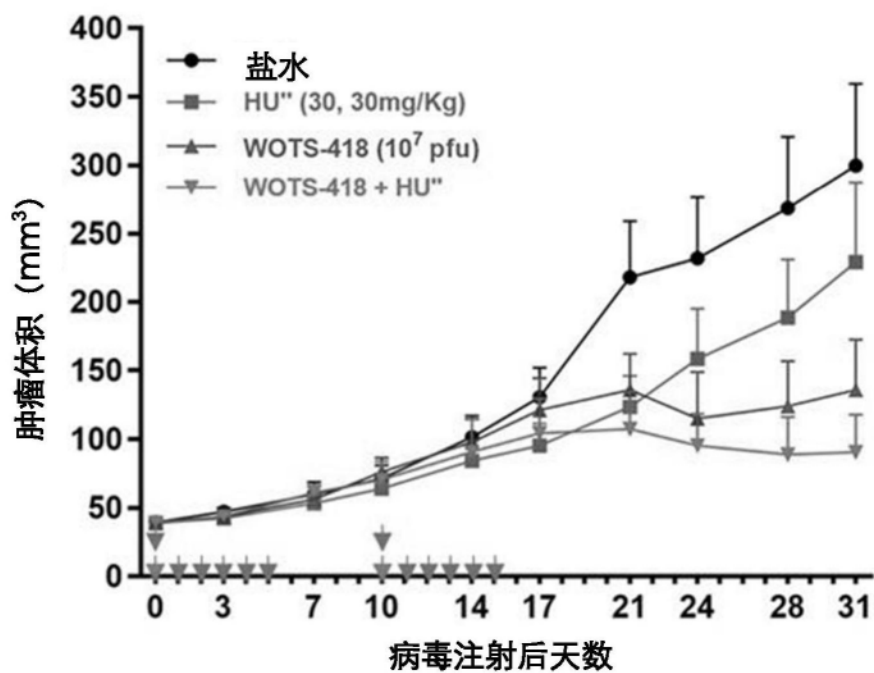


图31

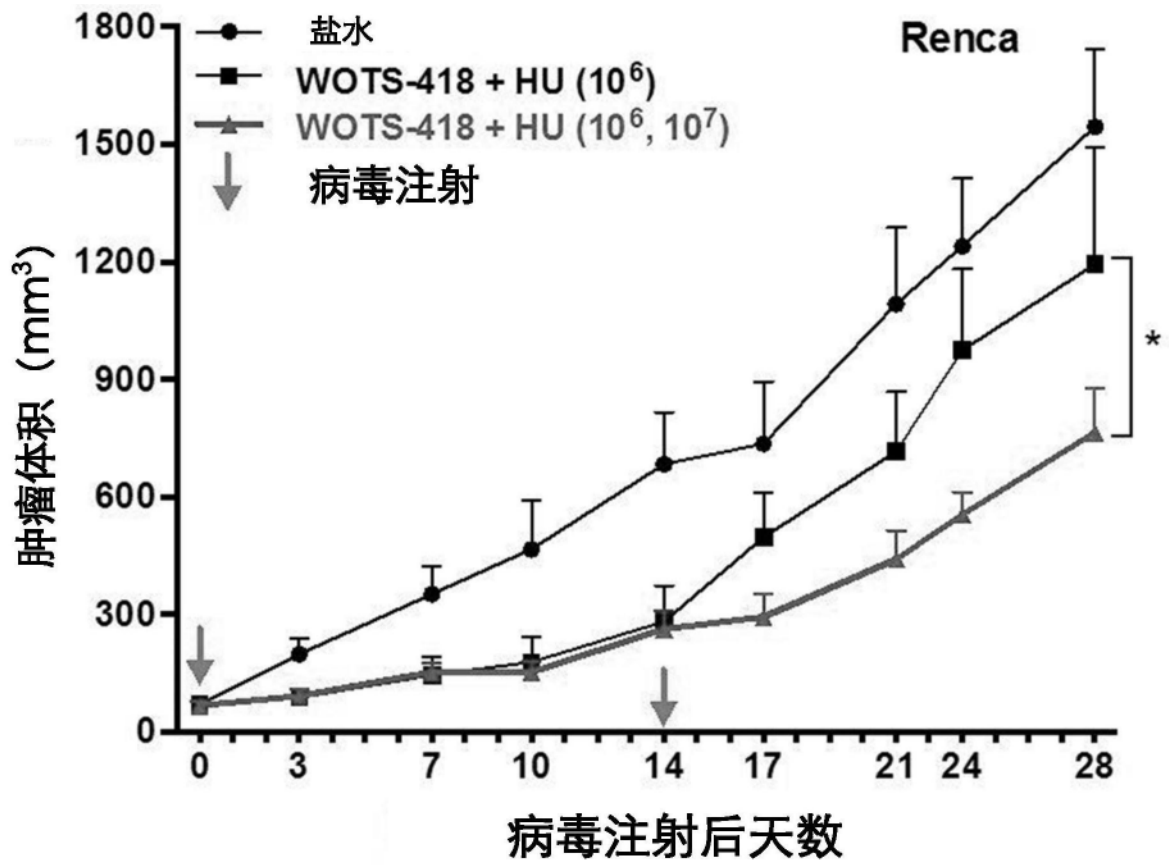


图32

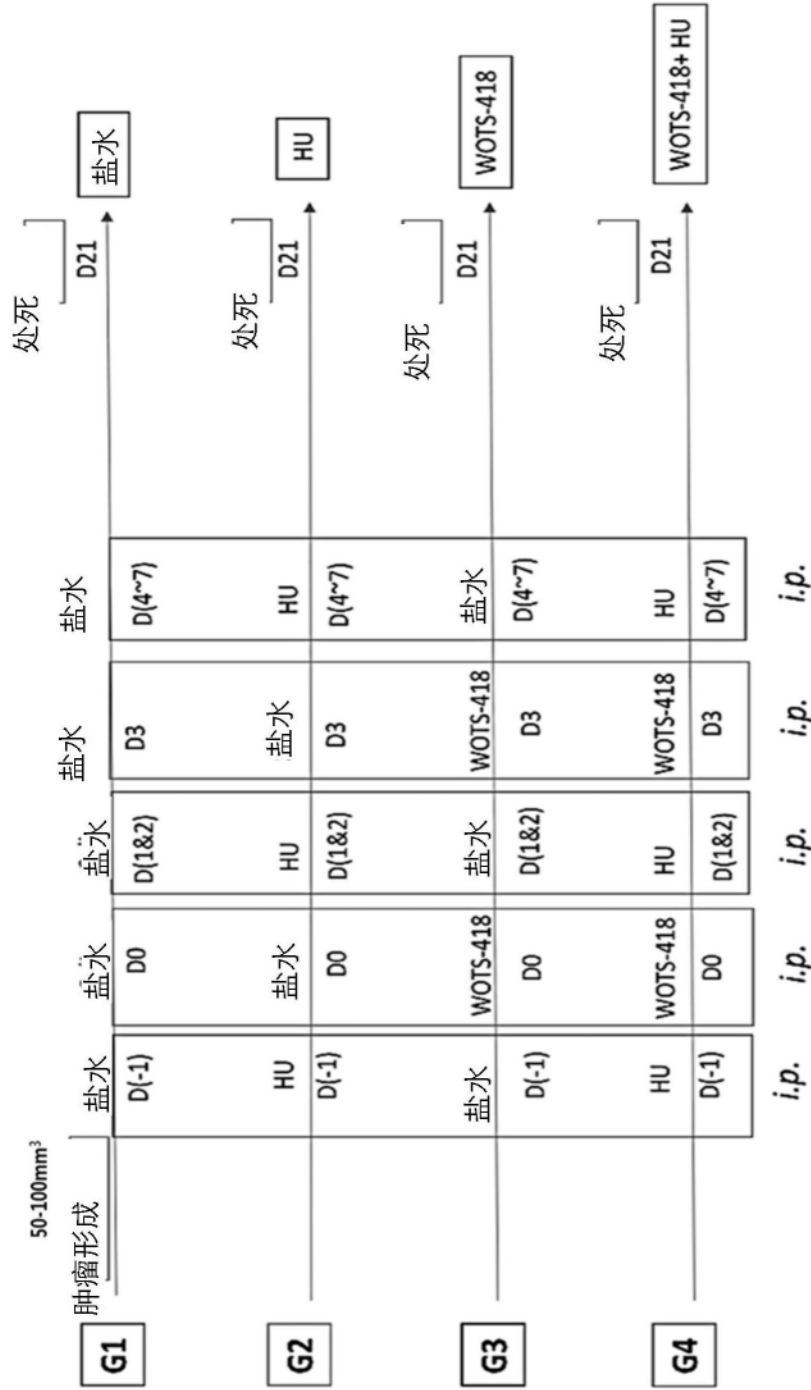


图33

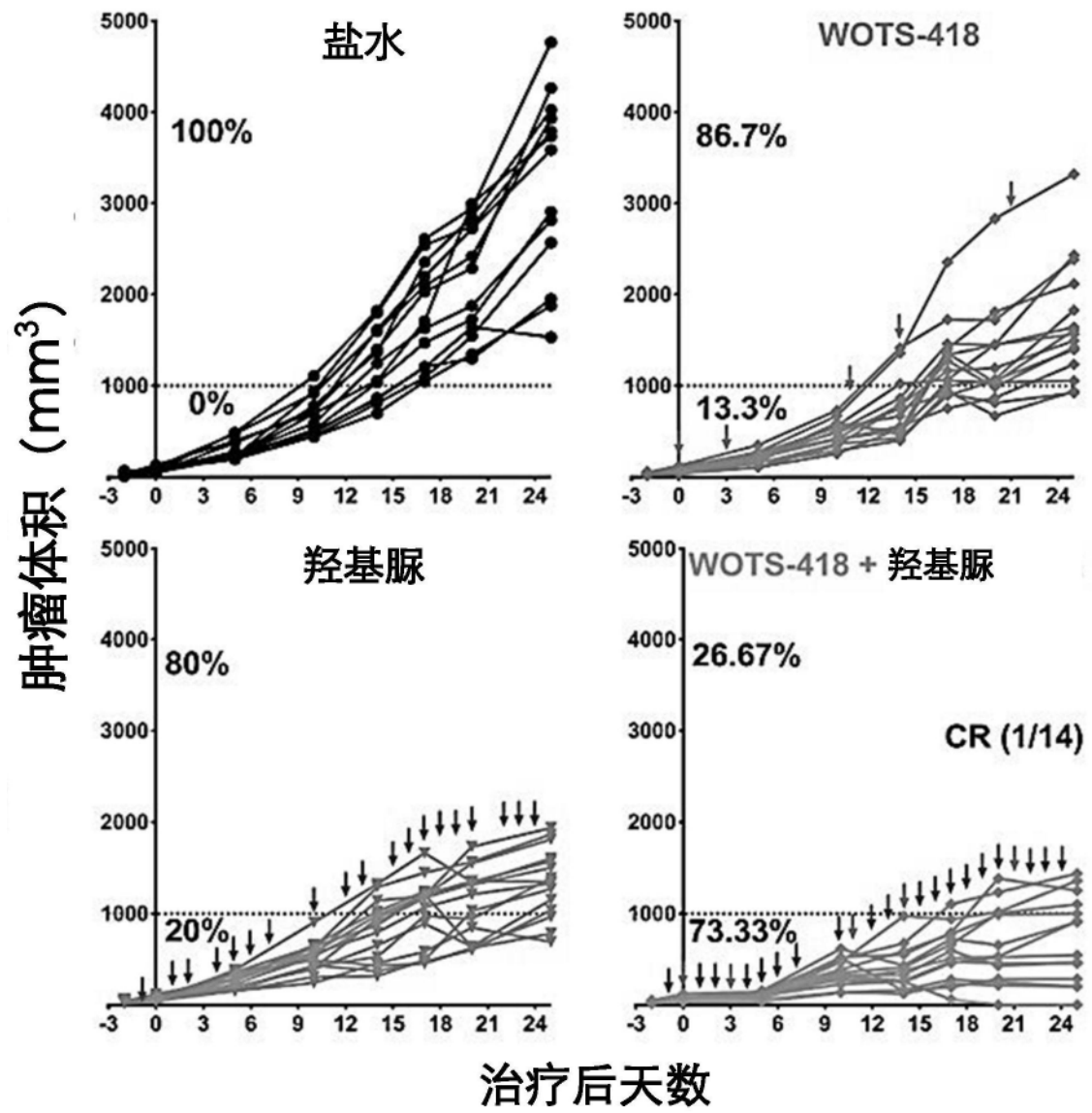


图34

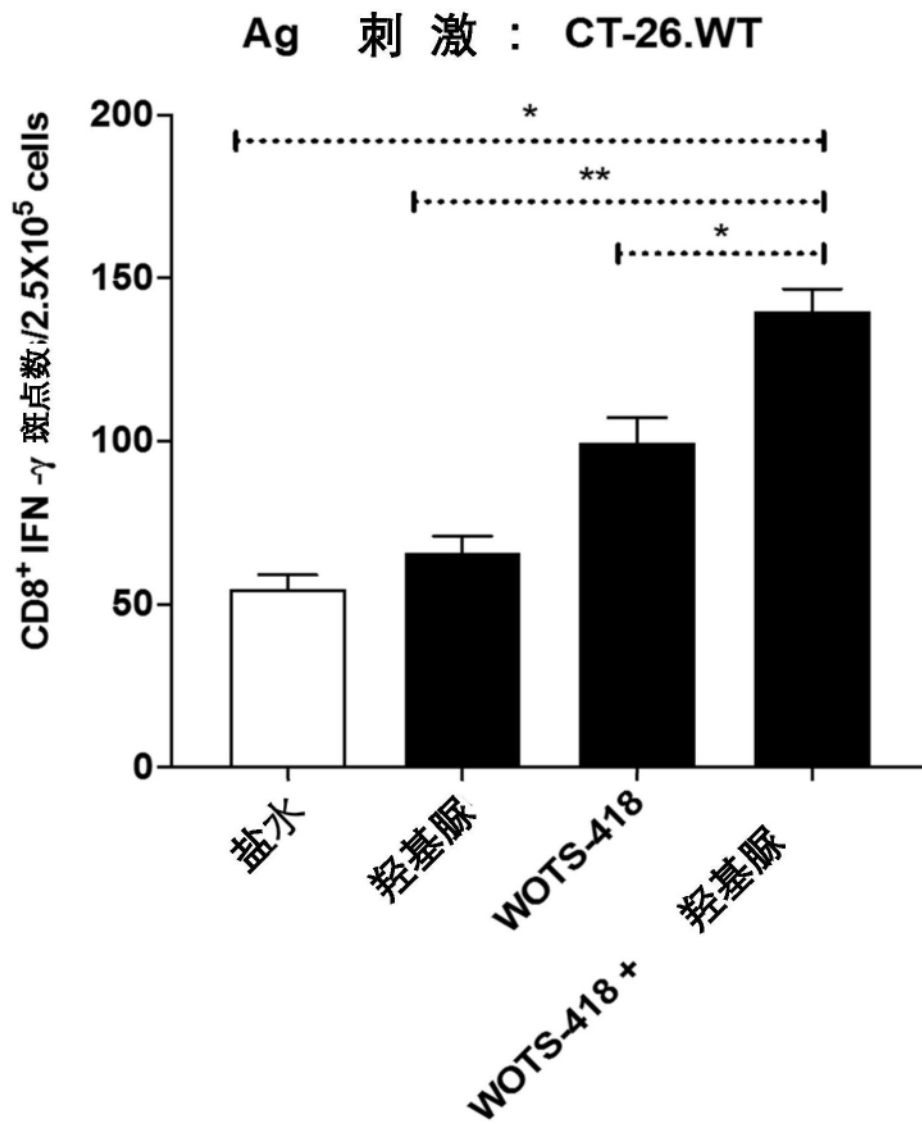


图35

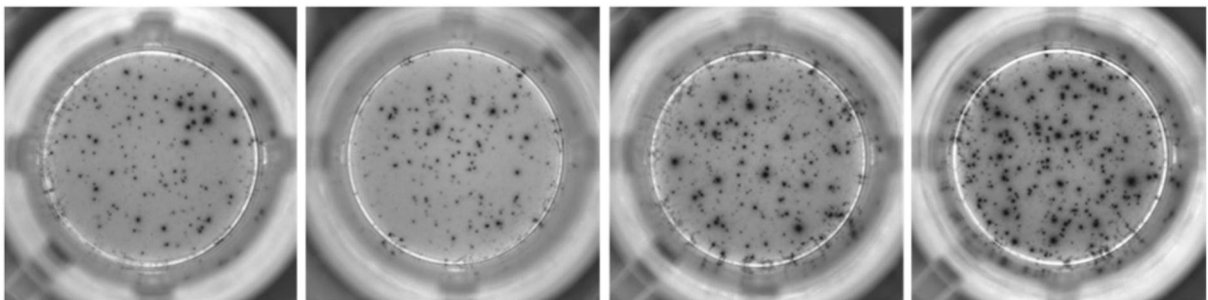


图36