

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/861

C12N 15/20 C12N 15/31

A61P 35/00

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01113007.5

[43] 公开日 2003 年 1 月 1 日

[11] 公开号 CN 1388248A

[22] 申请日 2001.5.25 [21] 申请号 01113007.5  
[71] 申请人 钱其军  
地址 200438 上海市长海路 225 号甲 1 号 503 室  
[72] 发明人 钱其军 车小燕 岑信棠 吴孟超

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司  
代理人 姚静芳

权利要求书 5 页 说明书 21 页

[54] 发明名称 高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒及其构建方法

[57] 摘要

本发明提供一类高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒及其构建方法。该腺病毒选择性地在肿瘤细胞内增殖,而在正常细胞内基本不增殖,通过将编码干扰素的核苷酸序列插入肿瘤细胞内增殖的腺病毒基因组中的非增殖必需区域,随着腺病毒在肿瘤细胞内复制,使编码干扰素的核苷酸序列拷贝数增加,在肿瘤细胞高效表达干扰素,抑制肿瘤细胞的生长及血管形成,激发免疫反应,从而抑制肿瘤形成、生长及转移。同时该病毒能在而且基本上限于肿瘤细胞内增殖,也能特异性直接杀灭肿瘤细胞。

ISSN 1008-4274

1. 一种能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于将编码干扰素的核苷酸序列插入肿瘤细胞内特异性增殖的病毒基因组中的非增殖必需区域，该病毒选择性地 在肿瘤细胞内增殖，而在正常细胞内基本不增殖，通过病毒在肿瘤细胞内复制增殖，导致编码干扰素的核苷酸序列拷贝数增加，从而干扰素基因表达量增加，该肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒可以是以下任何一种：
  - (1) 腺病毒增殖必需基因的转录起始点与编码起始位点之间插入肿瘤细胞特异性激活的顺式作用元件；
  - (2) 腺病毒可以是下述任何一种蛋白功能缺失：腺病毒 E1B 55Kda 蛋白功能缺失，腺病毒 E1B 19Kda 蛋白功能缺失，腺病毒 E1A 蛋白功能缺失
2. 根据权利要求 1 所述能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒的构建方法，其特征在于：
  - (1) 将编码干扰素的核苷酸序列直接插入肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒基因组中的非增殖必需区域；
  - (2) 腺病毒增殖必需基因的转录起始点与编码起始位点之间插入肿瘤细胞特异性激活的顺式作用元件；顺式作用元件可以是下述任何一种：(a). 甲胎蛋白增强子及启动子；(b). 癌胚抗原增强子及启动子；(c). 酪氨酸酶增强子及启动子；(d). ErbB2 增强子及启动子；(e). ErbB3 增强子及启动子；

(f). ErbB4 增强子及启动子; (g). DF3 乳腺癌相关抗原增强子; (h). 前列腺素特异性抗原增强子及启动子; (i). 腺血管舒缓素增强子及启动子; (j). EB 病毒中的 Orip; (k). EB 病毒 Orip 中的 FR 增强子; (l). EB 病毒 BamHI C-启动子; (m). EB 病毒中的 Orip 联合 EB 病毒 BamHI C-启动子; (n). EB 病毒 Orip 中的 FR 联合单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶基本启动子或 SV40 基本启动子;

(3) 腺病毒的蛋白功能缺失可以是下述任何一种: 腺病毒 E1B 55Kda 蛋白功能缺失, 腺病毒 E1B 19Kda 蛋白功能缺失, 腺病毒 E1A 蛋白功能缺失。

3. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒, 其特征在于它由要腺病毒增殖必需基因的转录起始点与编码起始位点之间区域插入某种肿瘤细胞特异性激活的顺式作用元件构成, 该种顺式作用元件可以是下述任何一种: 甲胎蛋白增强子及启动子, 癌胚抗原增强子及启动子, 酪氨酸酶增强子及启动子, ErbB2 增强子及启动子, ErbB3 增强子及启动子, ErbB4 增强子及启动子, DF3 乳腺癌相关抗原增强子, 前列腺素特异性抗原增强子及启动子, 腺血管舒缓素增强子及启动子, EB 病毒中的 Orip, EB 病毒 Orip 中的 FR 增强子, EB 病毒 BamHI C-启动子, EB 病毒中的 Orip 联合 EB 病毒 BamHI C-启动子, EB 病毒 Orip 中的 FR 联合单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶基本启动子或 SV40 基本启动子, 在 EB 病毒感染或潜伏感染细胞中特异性激活的顺式

作用元件，腺病毒增殖必需基因为腺病毒早期基因。

4. 根据权利要求 3 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于所述腺病毒增殖必需基因至少含有以下一个腺病毒的早期表达基因：E1A、E1B、E2、E4。
5. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于所述腺病毒 E1B55Kda 通过基因点突变、缺失突变及插入突变导致 E1B 55Kda 蛋白功能缺失。
6. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于所述腺病毒 E1B19Kda 通过基因点突变、缺失突变及插入突变导致 E1B 19Kda 蛋白功能缺失。
7. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于所述腺病毒 E1A 通过基因点突变、缺失突变及插入突变导致 E1A 蛋白功能缺失。
8. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于所述编码干扰素的核苷酸序列为编码干扰素- $\alpha$  的核苷酸序列。
9. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于所述编码干扰素的核苷酸序列为编码干扰素- $\beta$  的核苷酸序列。
10. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于所述编码干扰素的核苷酸序列为编码干扰素- $\gamma$  的核苷酸序列。

11. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于所述编码干扰素的核苷酸序列受启动子控制。
12. 根据权利要求 11 所述的启动子，其特征在于所述启动子为 SV40 启动子。
13. 根据权利要求 11 所述的启动子，其特征在于所述启动子为 RSV LTR 启动子。
14. 根据权利要求 11 所述的启动子，其特征在于所述启动子为人巨细胞病毒 IE 启动子。
15. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于该病毒与化学抗肿瘤药物组成复合物。
16. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于将该重组病毒用于抑制肿瘤细胞的生长。
17. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒的应用，其特征在于将该重组病毒用于体外感染肿瘤细胞，病毒在肿瘤细胞内复制及增殖，导致编码干扰素的核苷酸序列拷贝数增加及干扰素表达量增加。
18. 根据权利要求 1 所述的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其特征在于将该重组病毒用于体内选择性地肿瘤细胞内复制及增殖，导致编码干扰素的核苷酸序列拷贝数增加及其表达量增加，抑制肿瘤血管的形成，抑制肿瘤形成、生长及转移，同时该病毒能在而且基本上限于肿瘤细胞内增殖，也能特异

性直接杀灭肿瘤细胞。

## 高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒及其构建方法

本发明涉及生命科学领域，具体涉及一种能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，及其构建和增殖的方法。

恶性肿瘤严重危及人类的生命健康。目前对恶性肿瘤的常规治疗仍为手术及放、化疗，这种常规治疗对极大多数肿瘤的疗效仍不十分理想，对于极大多数化疗药物而言，其治疗指数仍较低，即其治疗剂量与毒性剂量较为接近。故这种治疗方案通常伴有明显的毒性作用，包括危及生命的骨髓抑制等。因此，研究选择性杀灭肿瘤细胞而不影响正常细胞的方法对肿瘤治疗非常重要，这种选择性杀灭肿瘤细胞的方法主要依赖于肿瘤细胞的特异性标记，其疗效也决定于该肿瘤标记是否严格限制于肿瘤细胞内。

干扰素可分为 I 及 II 型两类干扰素。

I 型干扰素包括干扰素- $\alpha$  及干扰素- $\beta$ 。干扰素- $\alpha$  主要由单核吞噬细胞产生，此外，B 淋巴细胞和成纤维细胞也能合成干扰素- $\alpha$ ；干扰素- $\beta$  则主要由成纤维细胞产生。人干扰素- $\alpha$  和干扰素- $\beta$  基因连锁位于 9 号染色体。干扰素- $\alpha$  家族的基因至少有 20 个，约 1-2kb 长，无内含子，可编码约 20 个结构相关的、分子量约 18-26kDa 不等的多肽，含 189-195 个氨基酸残基，包括 23 个氨基酸的信号肽。干扰素- $\beta$  基因只有一个，约 777bp，无内含子，编码 187 个氨基酸残基组成的蛋白，包括 21 个氨基酸的信号肽。I 型干扰素可抑制部分肿瘤细胞增殖，促进组织相容性复合体 (MHC) -I 类分子表达，增强细胞毒 T 细胞的杀伤效应，增强自然杀伤细胞 (NK 细胞) 及巨噬

细胞杀伤活性。抑制肿瘤新生血管生成。

II型干扰素即干扰素- $\gamma$ 。主要由活化的T细胞(包括 $T_H0$ 、 $T_H1$ 细胞)和NK细胞。人干扰素- $\gamma$ 基因位于12号染色体,6kb长,含4个外显子和3个内含子,编码166个氨基酸组成的蛋白,包括23个氨基酸的信号肽。干扰素- $\gamma$ 干扰素促进组织相容性复合体(MHC)-I类及MHC-II分子表达,激活单核/巨噬细胞系统,促进静止的CD4+T细胞分化为 $T_H1$ 细胞,并抑制 $T_H2$ 细胞的增殖,增强细胞毒T细胞的成熟及杀伤活性,增强自然杀伤细胞(NK细胞),抑制肿瘤新生血管生成。

肿瘤特异性增殖的病毒的根据肿瘤细胞与正常细胞某些生物学特性的差异,经过改造的病毒只能特异性地在肿瘤细胞内增殖、裂解肿瘤细胞,然后释放出病毒颗粒,再次感染其它肿瘤细胞,再次增殖、裂解,如此产生放大效应,由于病毒能够弥散到全身各个组织及脏器,因而能感染所有肿瘤细胞,从而杀灭局部及转移的肿瘤,而不影响正常细胞。

但迄今为止,尚未见到应用肿瘤特异性增殖的病毒系统高效表达干扰素的报告。

本发明的目的在于提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒及其构建方法。

本发明的目的在于提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒的复合物。

本发明的目的在于研究上述能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒的应用。



本发明提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，将编码干扰素的核苷酸序列插入肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒基因组中的非增殖必需区域，该腺病毒选择性地在肿瘤细胞内增殖，而在正常细胞内基本不增殖，通过腺病毒在肿瘤细胞内复制增殖，导致编码干扰素的核苷酸序列拷贝数增加，从而干扰素基因表达量增加，该肿瘤细胞内特异性增殖的病毒可以是以下任何一种：  
(1) 腺病毒增殖必需基因的转录起始点与编码起始位点之间插入肿瘤细胞特异性激活的顺式作用元件；(2) 腺病毒可以是下述任何一种蛋白功能缺失：腺病毒 E1B 55Kda 蛋白功能缺失，腺病毒 E1B 19Kda 蛋白功能缺失，腺病毒 E1A 蛋白功能缺失。

上述重组病毒可以是腺病毒中任何一种型，编码干扰素的核苷酸序列可以是编码干扰素- $\alpha$ 的核苷酸序列等。

本发明提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒的构建方法，(1) 将编码干扰素的核苷酸序列直接插入肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒基因组中的非增殖必需区域；(2) 腺病毒增殖必需基因的转录起始点与编码起始位点之间插入肿瘤细胞特异性激活的顺式作用元件；顺式作用元件可以是下述任何一种：(a). 甲胎蛋白 (AFP) 增强子及启动子；(b). 癌胚抗原 (CEA) 增强子及启动子；(c). 酪氨酸酶增强子及启动子；(d). ErbB2 增强子及启动子；(e). ErbB3 增强子及启动子；(f). ErbB4 增强子及启动子；(g). DF3 乳腺癌相关抗原 (MUC1) 增强子；(h). 前列腺素特异性抗原增强子及启动子；(i). 腺血管舒缓素增强子及启动子；(j). EB 病毒爱泼斯坦氏-巴尔氏病毒 (Epstein-Barr virus, 按常规简称为 EB 病毒) 中的 Orip；(k). EB 病毒 Orip 中的 family of 30bp repeats (按常规简称为 FR)；(l) EB 病毒 BamHI C-启动子；(m). EB 病毒中的 Orip 联合 EB

病毒 BamHI C-启动子; (n).EB 病毒 Orip 中的 FR 联合单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶基本启动子或 SV40 基本启动子; (3) 腺病毒的蛋白功能缺失可以是下述任何一种: 腺病毒 E1B 55Kda 蛋白功能缺失, 腺病毒 E1B 19Kda 蛋白功能缺失, 腺病毒 E1A 蛋白功能缺失。

腺病毒在肿瘤细胞内特异性增殖及复制, 而在正常细胞不增殖及复制, 主要通过以下方法实现:

(1) 选择性对腺病毒增殖必需基因的控制: 基因转录激活的调节受反式作用因子(如转录因子)与顺式作用元件相互作用的影响。当缺乏或出现某些转录因子会影响基因的转录水平。应用肿瘤组织特异性激活顺式作用元件(包括启动子或增强子)控制目的基因, 使该目的基因特异性在肿瘤细胞内表达, 而在正常的细胞内不表达或低水平表达。本发明应用肿瘤组织特异性启动子或增强子来控制腺病毒增殖及复制的必需基因, 从而使腺病毒增殖必需基因只能在肿瘤的细胞中表达, 导致腺病毒只能在肿瘤的细胞内增殖, 而在正常细胞内基本不增殖。

本发明采用细胞专一的反应元件是由肿瘤细胞特异性激活顺式作用元件组成, 其顺式作用元件可以是下述任何一种:

甲胎蛋白(AFP) 增强子及启动子为肝癌细胞特异性激活增强子及启动子。

癌胚抗原(CEA) 增强子及启动子为胃癌及结肠癌细胞特异性激活增强子及启动子。

酪氨酸酶增强子及启动子为黑色素瘤细胞特异性激活增强子及启动子。

ErbB2 增强子及启动子为乳腺癌细胞特异性激活增强子及启动

子。

ErbB3 增强子及启动子为乳腺癌细胞特异性激活增强子及启动子。

ErbB4 增强子及启动子为乳腺癌及胃癌细胞特异性激活增强子及启动子。

DF3 乳腺癌相关抗原 (MUC1) 增强子为乳腺癌细胞特异性激活增强子及启动子。

前列腺素特异性抗原增强子及启动子, 该前列腺素特异性抗原增强子位于前列腺素特异性抗原起始转录位点的 nt-5322 ~ nt-3739, 启动子位于前列腺素特异性抗原起始转录位点的 nt-540 ~ nt+12, 该增强子与启动子特异性激活于前列腺细胞及前列腺癌细胞。

腺血管舒缓素增强子及启动子特异性激活于前列腺细胞及前列腺癌细胞。

爱泼斯坦氏-巴尔氏病毒 (Epstein-Barr virus, 按常规简称为 EB 病毒) 中的 Orip、EB 病毒 Orip 中的 FR、EB 病毒 BamHI C-启动子、EB 病毒中的 Orip 联合 EB 病毒 BamHI C-启动子、EB 病毒 Orip 中的 FR 联合单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶基本启动子或 SV40 基本启动子、在 EB 病毒感染或潜伏感染细胞中特异性激活的顺式作用元件。

本发明提出的在于提供一类能特异性杀灭肿瘤细胞的增殖型重组腺病毒, 它至少有一个腺病毒增殖所必需的基因的肿瘤细胞特异性激活的顺式作用元件制。它由在腺病毒增殖必需基因的转录起始位点与编码起始位点之间区域插入某种顺式作用元件而构成。该顺式作用元件特异性在肿瘤细胞内激活, 产生转录活性, 而在正常细胞内不激活, 不能产生转录活性。该顺式作用元件可以是下述顺序

之一：甲胎蛋白 (AFP) 增强子及启动子，癌胚抗原 (CEA) 增强子及启动子，酪氨酸酶增强子及启动子，ErbB2 增强子及启动子，ErbB3 增强子及启动子，ErbB4 增强子及启动子，DF3 乳腺癌相关抗原 (MUC1) 增强子，前列腺素特异性抗原增强子及启动子，腺血管舒缓素增强子及启动子，EB 病毒中的 Orip、EB 病毒 Orip 中的 FR、EB 病毒 BamHI C-启动子、EB 病毒中的 Orip 联合 EB 病毒 BamHI C-启动子、EB 病毒 Orip 中的 FR 联合单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶基本启动子或 SV40 基本启动子、在 EB 病毒感染或潜伏感染细胞中特异性激活的顺式作用元件。

本发明中，采用腺病毒增殖必需基因至少含有以下一个腺病毒的早期表达基因：E1A、E1B、E2、E4。

(2). 腺病毒在正常细胞复制必需而在肿瘤细胞中非必需的基因编码的蛋白功能选择性地缺失：正常细胞与肿瘤存在着某些基因表达上的差异，某些腺病毒在正常细胞内复制所必需的基因，在肿瘤细胞内并不需要，因此，去除这些基因编码的蛋白功能有望使在肿瘤细胞内特异性复制，而不能在正常细胞中复制。

腺病毒蛋白功能缺失可以是以下任何一种：腺病毒 E1B 55kDa 的基因点突变、缺失突变、插入突变导致 E1B 55kDa 蛋白质功能异常。腺病毒 E1B 19kDa 的基因点突变、缺失突变、插入突变导致 E1B 19kDa 蛋白质功能异常。腺病毒 E1A 的基因点突变、缺失突变、插入突变导致 E1A 蛋白质功能异常。

(3). 依赖于肿瘤细胞某个信号转导途径异常而产生的病毒复制，呼吸道肠道过滤性病毒 (Reovirus) 感染后其早期病毒基因转录可激活双链 RNA 依赖的蛋白激酶 (PKR)，而该激酶可抑制该病毒的其它基因的转录，从而使病毒不能有效复制，而当细胞中 Ras 处于激活状

态则可抑制该激酶，从而使该病毒活跃复制。Ras 基因是一个癌基因，当它被不正常激活时，即可能发生癌变。呼吸道肠道过滤性病毒复制及增殖依赖于 Ras 异常激活的信号途径，即在 Ras 高表达的肿瘤细胞内复制及增殖。

(4). 选择性进入肿瘤细胞：改变它们表面的结合蛋白可使其与某些特定的肿瘤组织结合，从而使病毒只能感染特定的肿瘤组织。目前这方面改造主要集中于腺病毒外壳蛋白——纤维蛋白(Fiber)、五邻体(penton)及六邻体蛋白(hexon)，尤其在纤维蛋白中头部 HI 环中或 C 末端最常见，包括插入肿瘤膜表面具有高亲和力的某种配体、短肽及抗体 Fab 区域。

干扰素广泛应用于抗病毒治疗，具有抑制肿瘤细胞生长及抑制肿瘤新生血管形成，激活多种抗肿瘤免疫机制。研究表明干扰素在体内有明显抑制肿瘤的作用。

本发明提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其编码干扰素的核苷酸序列为编码干扰素- $\alpha$ 的核苷酸序列。

本发明提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其编码干扰素的核苷酸序列为编码干扰素- $\beta$ 的核苷酸序列。

本发明提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其编码干扰素的核苷酸序列为编码干扰素- $\gamma$ 的核苷酸序列。

本发明提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，其编码干扰素的核苷酸序列受启动子控制。该启动子可以为以下启

致编码干扰素的核苷酸序列拷贝数增加及干扰素表达量增加。

本发明提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，可用于体内选择性地在肿瘤细胞内复制及增殖，导致编码干扰素的核苷酸序列拷贝数增加及其表达量增加，抑制肿瘤细胞生长及血管形成，激发免疫反应，从而抑制肿瘤形成、生长及转移。同时该病毒能在而且仅限于肿瘤细胞内增殖，也能特异性直接杀灭肿瘤细胞。

本发明具有如下有益效果

1. 本发明提供一类治疗肿瘤的能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒，动物实验证明，这种重组腺病毒可用于治疗肿瘤。
2. 本发明提供一类高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒的构建方法。该方法通常易行可用于构建高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒。
3. 本发明提供一种在体内及体外杀灭肿瘤细胞、而不影响正常细胞，并在体内及体外肿瘤细胞内高效表达干扰素，与化学抗肿瘤药物结合，更有效地杀灭肿瘤细胞，达到高效低毒应用于治疗肿瘤的目的。

人类腺病毒有 6 个不同亚属，分为 A、B、C、D、E 及 F。它们对宿主细胞的亲嗜性、致癌性及疾病性史并不相同。本发明以腺病毒 C 亚属中的 5 型 (Ad5) 作为例证对本发明加以进一步具体说明，本发明构建手段均是现有技术人员能够实现。

例一、携带人干扰素- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ )、小鼠干扰素- $\alpha$  (mIFN- $\alpha$ )、人干扰素- $\beta$  (hIFN- $\beta$ )、小鼠干扰素- $\beta$  (mIFN- $\beta$ )、人干扰素- $\gamma$

动子之一: 猴病毒 40 (Simian virus40, 按常规简称为 SV40) 启动子、劳斯氏肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus, 按常规简称为 RSV) LTR 启动子及人巨细胞病毒(按常规简称为 HCMV) IE 启动子等。

本发明在上述这种修饰病毒基因组中非增殖必需区域插入编码干扰素的核苷酸序列, 本发明所述的编码干扰素的核苷酸序列为干扰素- $\alpha$  (interferon- $\alpha$ , 简记为 IFN- $\alpha$ )、干扰素- $\beta$  (interferon- $\beta$ , 简记为 IFN- $\beta$ ) 及干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , 简记为 IFN- $\gamma$ ) 基因。随着病毒在肿瘤细胞内复制, 使编码干扰素的核苷酸序列拷贝数增加, 使肿瘤细胞高效表达干扰素, 抑制肿瘤细胞生长及血管形成, 激发免疫反应, 从而抑制肿瘤形成、生长及转移。同时, 这种修饰后的病毒载体可被用于在某些细胞混合物中杀灭某种特殊靶细胞, 通过给予修饰后的病毒能选择性地在该种靶细胞中增殖, 从而使这种靶细胞被增殖的病毒选择性的杀灭; 在体外培养或在动物体内通过将修饰后的病毒与细胞复合物混合, 病毒只能在靶细胞增殖, 也就是说除了靶细胞, 其它细胞不能被这种病毒杀死。由于病毒在靶细胞内增殖及扩增, 从而使混合细胞中的该靶细胞被杀灭, 一旦靶细胞被破坏, 病毒不能够再增殖。

本发明提出的高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒与化学治疗药物(如顺铂、5-氟脲嘧啶丝裂霉素 C 等)、生物毒素(如蛇毒素)、单克隆抗体一起可以组成复合物, 其作为抗肿瘤药物效果更好。与 X-线联合应用可产生更为有效的抗肿瘤效应。

本发明提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒, 用于抑制肿瘤细胞的生长。

本发明提供一类能高效表达干扰素的肿瘤细胞内特异性增殖的腺病毒, 用于体外感染肿瘤细胞, 病毒在肿瘤细胞内复制及增殖, 导

(hIFN- $\gamma$ ) 基因及小鼠干扰素- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ ) 的 E1 区缺失的腺载体的构建

pCA13 及 pCA14 载体购于加拿大 Microbix Biosystem Inc. (Toronto), pCA13 及 pCA14 含有 5 型腺病毒序列 bp22-5790 并缺失 E1 区 342 至 3523bp 片段, 在 E1 缺失区插入了人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子 (-299--+72) 及 SV40 poly A 加尾信号。人与小鼠的干扰素- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) 基因、人与小鼠的干扰素- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) 基因、人与小鼠的干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 基因购于美国 InvivoGen 公司, 人干扰素- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ ) 基因来源于美国 InvivoGen 公司质粒 pORF-hIFN- $\alpha$ 、小鼠的干扰素- $\alpha$  (mIFN- $\alpha$ ) 基因来源于美国 InvivoGen 公司质粒 pORF-mIFN- $\alpha$ 、人干扰素- $\beta$  (hIFN- $\beta$ ) 基因来源于美国 InvivoGen 公司质粒 pORF-hIFN- $\beta$ 、小鼠的干扰素- $\beta$  (mIFN- $\beta$ ) 基因来源于美国 InvivoGen 公司质粒 pORF-mIFN- $\beta$ 、人干扰素- $\gamma$  (hIFN- $\gamma$ ) 基因来源于美国 InvivoGen 公司质粒 pORF-hIFN- $\gamma$  及小鼠的干扰素- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ ) 基因来源于美国 InvivoGen 公司质粒 pORF-mIFN- $\gamma$ 。

携带人干扰素- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ ) 及小鼠干扰素- $\alpha$  (mIFN- $\alpha$ )、的 E1 区缺失的腺载体的构建。

将 pORF-hIFN- $\alpha$  质粒用 Age I+Nhe I 双酶切, 得含有人 IFN- $\alpha$  基因的 588bp 片段, 将其定向插入 pUC19 质粒 (购于美国 ATCC 公司) 的 Xma I 及 Xba I 位点, 命名为 pUC19-hIFN- $\alpha$ 。应用 EcoR I+Sal I 双酶切 pUC19-hIFN- $\alpha$ , 获得含有人 IFN- $\alpha$  基因的 602bp 片段, 将其定向插入 pCA14 质粒 EcoR I+Sal I 酶切位点中, 命名 pCA14-hIFN- $\alpha$ 。

应用多聚酶链反应 (PCR) 技术扩增小鼠 IFN- $\alpha$  基因, 以 pORF-mIFN- $\alpha$  质粒为模板进行 PCR,



引物 1(含 EcoR I 酶切位点 5'-mIFN- $\alpha$  引物): TTG GAA TTC ACC ATG  
GCT AGG CTC TGT GC

引物 2(含 BamH I 酶切位点 3'-mIFN- $\alpha$  引物): GCG GGA TCC TTA TCA  
CTC CTC CTT GCT CA

Primer1 与 primer2 进行 PCR 扩增, 回收 570bp 片段, 应用 EcoR I+BamH I 酶切, 将该基因插入 pUC19 载体(购于美国 ATCC 公司)中进行测序, 其测序结果表明小鼠 IFN- $\alpha$  基因正确, 命名为 pUC19 - mIFN- $\alpha$ 。应用 EcoR I+BamH I 双酶切, 获得含有 mIFN- $\alpha$  基因的 570bp 片段, 将其定向插入 pCA13 质粒 EcoR I+BamH I 酶切位点中, 命名 pCA13-mIFN- $\alpha$ 。

携带人干扰素- $\beta$  (hIFN- $\beta$ ) 及小鼠干扰素- $\beta$  (mIFN- $\beta$ ) 的 E1 区缺失的腺载体的构建。

应用多聚酶链反应 (PCR) 技术扩增人 IFN- $\beta$  基因, 以 pORF-hIFN- $\beta$  质粒为模板进行 PCR,

引物 3(含 EcoR I 酶切位点 5'-hIFN- $\beta$  引物): CCG GAA TTC CGG ATG  
ACC AAC AAG TGT CTC

引物 4(含 BamH I 酶切位点 3'-hIFN- $\beta$  引物): CGC GGA TCC GCG TCA  
GTT TCG GAG GTA ACC

Primer3 与 primer4 进行 PCR 扩增, 回收 570bp 片段, 应用 EcoR I+BamH I 酶切, 将该基因插入 pUC19 载体(购于美国 ATCC 公司)中进行测序, 其测序结果表明人 IFN- $\beta$  基因正确, 命名为 pUC19 - hIFN- $\beta$ 。应用 EcoR I+BamH I 双酶切, 获得含有 hIFN- $\beta$  基因的 574bp 片段, 将其定向插入 pCA13 质粒 EcoR I+BamH I 酶切位点中, 命名 pCA13-hIFN- $\beta$ 。

将 pORF- mIFN- $\beta$  质粒用 SgrAI+Nhe I 双酶切, 得含小鼠 IFN- $\beta$  基因的 601bp 片段, 将其定向插入 pUC19 质粒(购于美国 ATCC 公司)的 Xma I 及 Xba I 位点, 命名为 pUC19-mIFN- $\beta$ 。应用 EcoR I+Sal I 双酶切 pUC19-mIFN- $\beta$ , 获得含有小鼠 IFN- $\beta$  基因的 615bp 片段, 将其定向插入 pCA14 质粒 EcoR I+Sal I 酶切位点中, 命名 pCA14-mIFN- $\beta$ 。

携带人干扰素- $\gamma$  (hIFN- $\gamma$ ) 基因及小鼠干扰素- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ ) 的 E1 区缺失的腺载体的构建。

将 pORF- hIFN- $\gamma$  质粒用 SgrAI+Nhe I 双酶切, 得含人 IFN- $\gamma$  基因的 522bp 片段, 将其定向插入 pUC19 质粒(购于美国 ATCC 公司)的 Xma I 及 Xba I 位点, 命名为 pUC19-hIFN- $\gamma$ 。应用 EcoR I+Sal I 双酶切 pUC19-hIFN- $\gamma$ , 获得含有人 IFN- $\gamma$  基因的 537bp 片段, 将其定向插入 pCA14 质粒 EcoR I+Sal I 酶切位点中, 命名 pCA14-hIFN- $\gamma$ 。

应用多聚酶链反应 (PCR) 技术扩增人鼠 IFN- $\gamma$  基因, 以 pORF-mIFN- $\gamma$  质粒为模板进行 PCR,

引物 5 (含 EcoR I 酶切位点 5'-mIFN- $\gamma$  引物): CCG GAA TTC ATG GCT  
GTT TCT GGC TGT TAC TGC C

引物 6 (含 BamH I 酶切位点 3'-mIFN- $\gamma$  引物): AAT GGA TCC TCA GCA  
GCG ACT CCT TTT CCG CTT C

Primer5 与 primer6 进行 PCR 扩增, 回收 450bp 片段, 应用 EcoR I+BamH I 酶切, 将该基因插入 pUC19 载体(购于美国 ATCC 公司)中进行测序, 其测序结果表明小鼠 IFN- $\gamma$  基因正确, 命名为 pUC19-mIFN- $\gamma$ 。应用 EcoR I+BamH I 双酶切, 获得含有 mIFN- $\gamma$  基因的 450bp 片

段, 将其定向插入 pCA13 质粒 EcoR I+BamH I 酶切位点中, 命名 pCA13-mIFN- $\gamma$ 。

例二、腺病毒 E1b 55Kda 蛋白基因部分缺失及在缺失区插入终止密码子载体的构建

pXC.1 载体购于加拿大 Microbix Biosystem Inc. (Toronto), pXC.1 含有 5 型腺病毒序列 bp22-5790。应用内切酶 Bgl II 将该载体在 3329bp 中切开, 然后用内切酶 Hind III 再作部分酶切, 回收 9372bp DNA 片段, 应用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段对 3' 凹端补平, 即为 pXC.1 载体中缺失 2809bp-3329bp 区域(具体方法参见分子克隆实验指南, 科学出版 1992 出版)。

合成两个 DNA 寡核苷酸片段做一个连接头, 其 DNA 寡核苷酸序列为

primer7 TAATGAGTAACTAA

primer8 TTAGTTACTCATTA

将两个 DNA 寡核苷酸片段各 0.1 $\mu$ g 混合, 100 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟, 然后缓慢降温复性, 复性后应用 T4 噬菌体多核苷酸激酶进行磷酸化。将该磷酸化后的连接头与缺失 2809-3329bp 区域的 pXC.1 载体片段进行连接, 命名为 pXC-del E1b(方法参见分子克隆实验指南, 科学出版社 1992 出版)。在插入连接头两端附近位置中合成引物, 分别为

primer 9 CTG GCC AAT ACC AAC CTT A

primer10 ATA TGA GCT CAC AAT GCT TC

对 pXC-del E1b 进行聚合酶链式反应(PCR) 进行体外扩增(方法参见分子克隆实验指南, 科学出版社 1992 出版), 其 PCR 产物进行测

序。结果显示: CTGGCCAATACCAACCTTATCCTACACGGTGTAAGCTTAATGAGTAA  
CTAAGATCTGGAAGGTGCTGAGGTACGATGAGACCCGCACCAGGTGCAGACCCTGCGAGT  
GTGGCGGTAAACTATTAGGAACCAGCCTGTGATGCTGGATGTGACCGAGGAGCTGAGGCC  
CGATCACTTGGTGCTGGCCTGCACCCGCGCTGAGTTTGGCTCTAGCGATGAAGATACAGA  
TTGAGGTACTGAAATGTGTGGGCGTGGCTTAAGGGTGGGAAAGAATATATAAGGTGGGGG  
TCTTATGTAGTTTTGTATCTGTTTTGCAGCAGCCGCCGCCATGAGCACCAACTCGTT  
TGATGGAAGCATTGTGAGCTCATAT, 这表明 pXC-del E1b 为 pXC.1 载体中  
缺失了 2809-3329 区域并在该区域中插入 TAATGAGTAACTAA, 并在两  
个终止密码子后保留了 Bgl II 酶切位点。

例三、携带人干扰素- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ )、小鼠干扰素- $\alpha$  (mIFN- $\alpha$ )、  
人干扰素- $\beta$  (hIFN- $\beta$ )、小鼠干扰素- $\beta$  (mIFN- $\beta$ )、人干扰素- $\gamma$   
(hIFN- $\gamma$ ) 基因及小鼠干扰素- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ ) 的 E1b 55Kda 蛋白基因部  
分缺失的腺病毒载体的构建

应用 Bgl II 分别酶切 pCA14-hIFN- $\alpha$ 、pCA13-mIFN- $\alpha$ 、pCA13-  
hIFN- $\beta$ 、pCA14-mIFN- $\beta$ 、pCA14-hIFN- $\gamma$  及 pCA13-mIFN- $\gamma$ , 分别  
回收 1188bp (含有人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子 (-299--+72)、  
含有人干扰素- $\alpha$  及 SV40 poly A 加尾信号)、1139bp (人巨细胞病毒  
(HCMV) IE 启动子 (-299--+72)、小鼠干扰素- $\alpha$  及 SV40 poly A 加  
尾信号)、1143bp (人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子 (-299--+72)、  
人干扰素- $\beta$  及 SV40 poly A 加尾信号)、1201bp (人巨细胞病毒 (HCMV)  
IE 启动子 (-299--+72)、小鼠干扰素- $\beta$  及 SV40 poly A 加尾信号)、  
1123bp (人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子 (-299--+72)、人干扰素- $\gamma$   
及 SV40 poly A 加尾信号) 及 1019bp (人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动  
子 (-299--+72)、小鼠干扰素- $\gamma$  及 SV40 poly A 加尾信号), 将其  
插入 pXC-del E1b Bgl II 酶切位点。

应用 PCR 技术分别验证其插入的正方向: 其 Bgl II 上游引物 primer9: CTG GCC AAT ACC AAC CTT A, 分别与人干扰素- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ )、小鼠干扰素- $\alpha$  (mIFN- $\alpha$ )、人干扰素- $\beta$  (hIFN- $\beta$ )、小鼠干扰素- $\beta$  (mIFN- $\beta$ )、人干扰素- $\gamma$  (hIFN- $\gamma$ ) 基因及小鼠干扰素- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ ) 3'-primer 进行扩增

引物 11 (3'-hIFN- $\alpha$  引物): TCA AGA TGA GCC CAG GTC

引物 12 (3'-mIFN- $\alpha$  引物): TTA TCA CTC CTC CTT GCT CA

引物 13 (3'-hIFN- $\beta$  引物): GCG TCA GTT TCG GAG GTA ACC

引物 14 (3'-mIFN- $\beta$  引物): GCT CAG TTT TGG AAG TTT C

引物 15 (3'-hIFN- $\gamma$  引物): TTA CTG GGA TGC TCT TCG

引物 16 (3'-mIFN- $\gamma$  引物): GCA GCG ACT CCT TTT CCG CTT C

其 PCR 扩增长度分别为 1080bp、1031bp、1035bp、1123bp、1015bp 及 1001bp。表明含有人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子+人干扰素- $\alpha$  +SV40 poly A 加尾信号、人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子+小鼠干扰素- $\alpha$ +SV40 poly A 加尾信号、人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子+人干扰素- $\beta$ +SV40 poly A 加尾信号、人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子+小鼠干扰素- $\beta$ +SV40 poly A 加尾信号、人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子+人干扰素- $\gamma$ +SV40 poly A 加尾信号及人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子+小鼠干扰素- $\gamma$ +SV40 poly A 加尾信号, 正向插入 pXC-del E1b Bgl II 酶切位点, 分别命名为 pXC-del E1b-hIFN- $\alpha$ 、pXC-del E1b-mIFN- $\alpha$ 、pXC-del E1b-hIFN- $\beta$ 、pXC-del E1b-mIFN- $\beta$ 、pXC-del E1b-hIFN- $\gamma$  及 pXC-del E1b-mIFN- $\gamma$ 。

例四、携带人干扰素- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ )、小鼠干扰素- $\alpha$  (mIFN- $\alpha$ )、人干扰素- $\beta$  (hIFN- $\beta$ )、小鼠干扰素- $\beta$  (mIFN- $\beta$ )、人干扰素- $\gamma$

(hIFN- $\gamma$ ) 基因及小鼠干扰素- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ ) 的 E1b 55Kda 蛋白基因部分缺失的腺病毒载体的重组

E1 转化人胚胎肾细胞株 293 细胞株购于加拿大 Microbix Biosystem Inc. (Toronto), 是由剪切的 5 型腺病毒 DNA 转化人胚胎肾细胞而成, 它含有及表达 5 型腺病毒 E1 区, 腺病毒 DNA 对其具有高转染率。将含有 5 型腺病毒左臂的质粒联合含有 5 型腺病毒右臂的质粒共转染 293 细胞, 通过同源重组可产生具有感染力的腺病毒。我们将 pXC-del E1b-hIFN- $\alpha$ 、pXC-del E1b-mIFN- $\alpha$ 、pXC-del E1b-hIFN- $\beta$ 、pXC-del E1b-mIFN- $\beta$ 、pXC-del E1b-hIFN- $\gamma$  及 pXC-del E1b-mIFN- $\gamma$  分别与含有 5 型腺病毒右臂的质粒 pBHGE3 通过 Lipofectamine 共转染至 293 细胞, 其具体方法参见 GIBCO BRL 公司的操作说明。pBHGE3 购于加拿大 Microbix Biosystems Inc. (Ontario)。共转染后 9-14 天出现病毒空斑, 经过三次病毒空斑纯化, 该腺病毒命名为 CNHK200-hIFN- $\alpha$ 、CNHK200-mIFN- $\alpha$ 、CNHK200-hIFN- $\beta$ 、CNHK200-mIFN- $\beta$ 、CNHK200-hIFN- $\gamma$  及 CNHK200-mIFN- $\gamma$ , 具体方法参见 Gene Transfer and Expression Protocols, Murray EJ 主编, Humana Press 1991 出版。

#### 病毒的产生及基因组结构

重组腺病毒方法参见例一内容。其名称见下

病毒	名称	含 Ad5 左臂质粒	含 Ad5 右臂质粒
Ad5-del E1b - hIFN- $\alpha$	CNHK200-hIFN- $\alpha$	PXC-del E1b- hIFN- $\alpha$	PBHGE3
Ad5-del E1b - mIFN- $\alpha$	CNHK200-mIFN- $\alpha$	PXC-del E1b- mIFN- $\alpha$	PBHGE3

Ad5-del E1b - hIFN- $\beta$	CNHK200-hIFN- $\beta$	PXC-del E1b- hIFN- $\beta$	PBHGE3
Ad5-del E1b - mIFN- $\beta$	CNHK200-mIFN- $\beta$	PXC-del E1b- mIFN- $\beta$	PBHGE3
Ad5-del E1b - hIFN- $\gamma$	CNHK200-hIFN- $\gamma$	PXC-del E1b- hIFN- $\gamma$	PBHGE3
Ad5-del E1b - mIFN- $\gamma$	CNHK200-mIFN- $\gamma$	PXC-del E1b- mIFN- $\gamma$	PBHGE3

腺病毒在 293 细胞中大量繁殖，应用氯化铯梯度离心的方法大量纯化腺病毒（具体方法参见 Gene Transfer and Expression Protocols, Murray EJ 主编, Humana Press 1991 出版）。Ad5-del E1b-hIFN- $\alpha$  (CNHK200-hIFN- $\alpha$ ) 为 5 型腺病毒，在 2809-3329bp 区域 (E1b 55Kda 蛋白基因部分序列) 缺失突变，并在缺失突变区域中插入含有两个终止密码子的序列 TAATGAGTAACTAA，并在终止密码子后 Bgl II 酶切位点中正向插入含有人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子 (-299--+72)、含有人干扰素- $\alpha$  及 SV40 poly A 加尾信号基因序列，病毒其他 DNA 序列与 5 型腺病毒相同。

Ad5-del E1b -mIFN- $\alpha$  (CNHK200-mIFN- $\alpha$ ) 为 5 型腺病毒，在 2809-3329bp 区域 (E1b 55Kda 蛋白基因部分序列) 缺失突变，并在缺失突变区域中插入含有两个终止密码子的序列 TAATGAGTAACTAA，并在终止密码子后 Bgl II 酶切位点中正向插入含有人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子 (-299--+72)、含有小鼠干扰素- $\alpha$  及 SV40 poly A 加尾信号基因序列，病毒其他 DNA 序列与 5 型腺病毒相同。

Ad5-del E1b -hIFN- $\beta$  (CNHK200-hIFN- $\beta$ ) 为 5 型腺病毒，在 2809-3329bp 区域 (E1b 55Kda 蛋白基因部分序列) 缺失突变，并在缺

失突变区域中插入含有两个终止密码子的序列 TAATGAGTAACTAA, 并在终止密码子后 Bgl II 酶切位点中正向插入含有人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子 (-299--+72)、含有人干扰素- $\beta$  及 SV40 poly A 加尾信号基因序列, 病毒其他 DNA 序列与 5 型腺病毒相同。

Ad5-del E1b-mIFN- $\beta$  (CNHK200-mIFN- $\beta$ ) 为 5 型腺病毒, 在 2809-3329bp 区域 (E1b 55Kda 蛋白基因部分序列) 缺失突变, 并在缺失突变区域中插入含有两个终止密码子的序列 TAATGAGTAACTAA, 并在终止密码子后 Bgl II 酶切位点中正向插入含有人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子 (-299--+72)、含有小鼠干扰素  $\beta$  及 SV40 poly A 加尾信号基因序列, 病毒其他 DNA 序列与 5 型腺病毒相同。

Ad5-del E1b-hIFN- $\gamma$  (CNHK200-hIFN- $\gamma$ ) 为 5 型腺病毒, 在 2809-3329bp 区域 (E1b 55Kda 蛋白基因部分序列) 缺失突变, 并在缺失突变区域中插入含有两个终止密码子的序列 TAATGAGTAACTAA, 并在终止密码子后 Bgl II 酶切位点中正向插入含有人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子 (-299--+72)、含有人干扰素- $\gamma$  及 SV40 poly A 加尾信号基因序列, 病毒其他 DNA 序列与 5 型腺病毒相同。

Ad5-del E1b-mIFN- $\gamma$  (CNHK200-mIFN- $\gamma$ ) 为 5 型腺病毒, 在 2809-3329bp 区域 (E1b 55Kda 蛋白基因部分序列) 缺失突变, 并在缺失突变区域中插入含有两个终止密码子的序列 TAATGAGTAACTAA, 并在终止密码子后 Bgl II 酶切位点中正向插入含有人巨细胞病毒 (HCMV) IE 启动子 (-299--+72)、含有小鼠干扰素  $\gamma$  及 SV40 poly A 加尾信号基因序列, 病毒其他 DNA 序列与 5 型腺病毒相同。

例五、携带人干扰素- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ )、小鼠干扰素- $\alpha$  (mIFN- $\alpha$ )、人干扰素- $\beta$  (hIFN- $\beta$ )、小鼠干扰素- $\beta$  (mIFN- $\beta$ )、人干扰素- $\gamma$  (hIFN- $\gamma$ ) 基因及小鼠干扰素- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ ) 的 E1b 55Kda 蛋白基因部



分缺失的腺病毒体外肿瘤细胞复制、增殖并高效表达人干扰素- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ )、小鼠干扰素- $\alpha$  (mIFN- $\alpha$ )、人干扰素- $\beta$  (hIFN- $\beta$ )、小鼠干扰素- $\beta$  (mIFN- $\beta$ )、人干扰素- $\gamma$  (hIFN- $\gamma$ ) 基因及小鼠干扰素- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ )，并在体外特异性杀灭肿瘤细胞

将 CNHK200-hIFN- $\alpha$ 、CNHK200-mIFN- $\alpha$ 、CNHK200-hIFN- $\beta$ 、CNHK200-mIFN- $\beta$ 、CNHK200-hIFN- $\gamma$  及 CNHK200-mIFN- $\gamma$  分别感染肝癌细胞株 Hep 3B、293 及正常人成纤维细胞，细胞按  $2 \times 10^5$ /孔接种 6 孔板，分别感染重组腺病毒 CNHK200-hIFN- $\alpha$ 、CNHK200-mIFN- $\alpha$ 、CNHK200-hIFN- $\beta$ 、CNHK200-mIFN- $\beta$ 、CNHK200-hIFN- $\gamma$ 、CNHK200-mIFN- $\gamma$  及野生型 5 型腺病毒  $4 \times 10^5$  pfu，48 小时后应用 293 细胞株测定其病毒滴度，具体方法参见前述文献 2，结果为：

	293	Hep3B	正常成纤维细胞
野生型 5 型腺病毒	$1 \times 10^5$	$7 \times 10^4$	$5 \times 10^4$
CNHK200-hIFN- $\alpha$	$1 \times 10^5$	$8 \times 10^4$	$1 \times 10$
CNHK200-mIFN- $\alpha$	$1 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$	$1.5 \times 10$
CNHK200-hIFN- $\beta$	$1 \times 10^5$	$6.0 \times 10^4$	$1.5 \times 10$
CNHK200-mIFN- $\beta$	$1 \times 10^5$	$7.8 \times 10^4$	$2 \times 10$
CNHK200-hIFN- $\gamma$	$1 \times 10^5$	$4.9 \times 10^4$	$2 \times 10$
CNHK200-mIFN- $\gamma$	$1 \times 10^5$	$9 \times 10^4$	$2 \times 10$

将肝癌细胞株 Hep3B 及正常人成纤维细胞分别感染重组腺病毒 CNHK200-hIFN- $\alpha$ 、CNHK200-mIFN- $\alpha$ 、CNHK200-hIFN- $\beta$ 、CNHK200-mIFN- $\beta$ 、CNHK200-hIFN- $\gamma$  及 CNHK200-mIFN- $\gamma$ ，MOI 为 1，37℃ 孵

育 1 小时, 感染后 7 天收集细胞, 应用 QIAamp DNA Blood mini kit (德国 QIAGEN 公司) 提取病毒 DNA, 方法参见 QIAGEN 公司操作说明。应用 Nhe I 和 Xho I 双酶切, 用 0.8% 的琼脂糖电泳, 将其转至尼龙膜, 用  $^{32}\text{P}$  标记人 5 型腺病毒 1178bp BstXI 加 Xho I 片段 (位于腺病毒 nt4611-5789), 进行 souther blot 杂交, 以 pXC.1 作为病毒拷贝数对照 (方法参见分子克隆实验指南, 科学出版 1992 出版), CNHK200-hIFN- $\alpha$ 、CNHK200-mIFN- $\alpha$ 、CNHK200-hIFN- $\beta$ 、CNHK200-mIFN- $\beta$ 、CNHK200-hIFN- $\gamma$  及 CNHK200-mIFN- $\gamma$  在肝癌细胞株 Hep3B 及正常人成纤维细胞的每个细胞病毒拷贝数分别为  $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$  及  $<10$ 、 $<10$ 、 $<10$ 、 $<10$ 、 $<10$ 、 $<10$ 。

将上述 CNHK200-hIFN- $\alpha$ 、CNHK200-mIFN- $\alpha$ 、CNHK200-hIFN- $\beta$ 、CNHK200-mIFN- $\beta$ 、CNHK200-hIFN- $\gamma$  及 CNHK200-mIFN- $\gamma$  提取的 DNA 分别应用 Bgl II 酶切, 用 1% 的琼脂糖电泳, 将其转至尼龙膜, 用  $^{32}\text{P}$  分别标记人干扰素- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ )、小鼠干扰素- $\alpha$  (mIFN- $\alpha$ )、人干扰素- $\beta$  (hIFN- $\beta$ )、小鼠干扰素- $\beta$  (mIFN- $\beta$ )、人干扰素- $\gamma$  (hIFN- $\gamma$ ) 基因及小鼠干扰素- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ ) 的 cDNA 片段作为探针, 进行 souther blot 杂交, 以 pCA14-hIFN- $\alpha$ 、pCA13-mIFN- $\alpha$ 、pCA13-hIFN- $\beta$ 、pCA14-mIFN- $\beta$ 、pCA14-hIFN- $\gamma$  或 pCA13-mIFN- $\gamma$  作为病毒拷贝数对照 (方法参见分子克隆实验指南, 科学出版 1992 出版), CNHK200-hIFN- $\alpha$ 、CNHK200-mIFN- $\alpha$ 、CNHK200-hIFN- $\beta$ 、CNHK200-mIFN- $\beta$ 、CNHK200-hIFN- $\gamma$  及 CNHK200-mIFN- $\gamma$  在肝癌细胞株 Hep3B 及正常人成纤维细胞的每个细胞病毒拷贝数分别为  $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$  及  $<10$ 、 $<10$ 、 $<10$ 、 $<10$ 、 $<10$ 、 $<10$ 。

例七、携带人干扰素- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ )、小鼠干扰素- $\alpha$  (mIFN- $\alpha$ )、人干扰素- $\beta$  (hIFN- $\beta$ )、小鼠干扰素- $\beta$  (mIFN- $\beta$ )、人干扰素- $\gamma$

(hIFN- $\gamma$ )基因及小鼠干扰素- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ )的 E1b 55Kda 蛋白基因部分缺失的腺病毒载体在裸鼠体内治疗移植肿瘤的任用.

将 4-5 周龄的 SCID 小鼠皮下接种肝癌细胞株 Hep 3B 细胞  $1 \times 10^7$ , 两周后给予  $1 \times 10^9$  pfu CNHK200-hIFN- $\alpha$ 、CNHK200-mIFN- $\alpha$ 、CNHK200-hIFN- $\beta$ 、CNHK200-mIFN- $\beta$ 、CNHK200-hIFN- $\gamma$  及 CNHK200-mIFN- $\gamma$  或用相同剂量的对照腺病毒 Ad5-Lac Z, 其未治疗组及对照腺病毒治疗组 4 周后肿瘤体增加 4 倍以上, 而治疗组则肿瘤明显缩小, 部分肿瘤完全消失。