

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01131218.1

[51] Int. Cl.

C12N 15/861 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 39/235 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1294268C

[22] 申请日 2001.9.3 [21] 申请号 01131218.1

[73] 专利权人 上海三维生物技术有限公司

地址 201206 上海市浦东金桥出口加工区
桂桥路 1150 号

[72] 发明人 梁 旻

审查员 卢 阳

[74] 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有

限公司

代理人 丁业平

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 6 页

[54] 发明名称

可在肿瘤细胞内特异性复制并扩散的重组腺病毒载体

[57] 摘要

本发明“可在肿瘤细胞内特异性复制并扩散的重组腺病毒载体”，提供了基于病毒疗法的治疗肿瘤疾病的方法和组合物。本发明构建了一种基因工程重组腺病毒，其中含有 5 型腺病毒 E1a 基因，研究表明，该病毒可特异性的在肿瘤细胞内复制，E1a 基因可以促进该重组腺病毒在肿瘤细胞内的复制及在肿瘤细胞间的扩散。试验结果表明，此重组腺病毒可用于肿瘤的病毒治疗及基因治疗。

1. 一种重组腺病毒载体，其删除了 E1 和/或 E3 区基因，具有以 3' - 5' 方向插入的外源插入基因腺病毒 E1a 基因，并且在外源插入基因两侧具有一对倒置重复的 DNA 序列，在两个同样的该病毒基因组的这个倒置重复的序列之间可以发生同源重组。

2. 权利要求 1 中所述的重组腺病毒载体，该重组腺病毒载体包括以下组件：

- a. 一段腺病毒左侧倒置末端重复序列；
- b. 一段腺病毒包装序列，位于左侧倒置末端重复序列的 3' 端；
- c. 一段启动子序列，位于腺病毒包装序列的 3' 端；
- d. 一对倒置重复序列，第一段倒置重复序列位于启动子序列的 3' 端，第二段重复序列位于外源 DNA 序列的 5' 端；
- e. 一段外源 DNA 序列，为腺病毒 E1a 基因，以 3' - 5' 方向反向连接于第一段倒置重复序列的 3' 端；
- f. 至少一个腺病毒基因，位于第二段倒置重复序列的 3' 端；
- g. 腺病毒右侧倒置末端重复序列，位于腺病毒基因的 3' 端。

3. 权利要求 2 中所述的腺病毒载体，其中在所述的第一段倒置重复序列 3' 端后具有一段双向转录终止位点序列，可以阻断转录进行。

4. 权利要求 3 中所述的腺病毒载体，其中所述的双向转录终止位点序列是双向的 SV40 多聚腺苷序列。

5. 一种由权利要求 1 中的病毒载体之间的同源重组而产生新的腺病毒载体的方法，将至少 2 个权利要求 1 中的病毒在活体外引入肿瘤细胞中，这两个病毒之间会发生重组，产生新的重组腺病毒载体，该新的重组腺病毒载体含有可以表达的腺病毒 E1a

基因。

6. 一种药物组合物，含有可杀死肿瘤细胞的权利要求 1-4 中任意一项的重组腺病毒载体及可用药用载体。

7. 一种组合物，其包括一种具有选自权利要求 1-4 中的任意一种腺病毒特性的重组腺病毒载体，以及一种化学治疗化合物。

8. 一种组合物，其包括一种具有选自权利要求 1-4 中的任意一种腺病毒特性的重组腺病毒载体，以及一种免疫抑制化合物。

9. 权利要求 1-4 中任意一项所述的重组腺病毒载体在制备用于治疗肿瘤的药物组合物中的用途。

可在肿瘤细胞内特异性复制并扩散的重组腺病毒载体

发明领域：

本发明涉及基因治疗及病毒治疗领域，具体的涉及到利用 E1a 基因促进一种特殊的重组腺病毒载体 (Ad. IR) 特异性的在肿瘤细胞中的复制与扩散。

发明背景：

恶性肿瘤的基因治疗，要求病毒载体可以高效的特异性的进入肿瘤细胞，表达治疗性基因，或特异性的在肿瘤细胞内复制，进而杀死肿瘤细胞。

目前作为基因治疗的常见载体有逆转录病毒载体，腺病毒载体和腺相关病毒载体，其中作为肿瘤基因治疗较为常用的是腺病毒载体。

腺病毒是一种双链 DNA 病毒，其基因组长度约为 36kb，分为早期转录区和晚期转录区。目前发现，人腺病毒有 47 个血清型，分属 A—F 6 个亚属，其中 C 亚属的 5 型腺病毒是目前人们研究最为详细的一种。

将腺病毒删除 E1 区及 E3 区所得到的腺病毒载体常被称为第一代腺病毒载体，这种载体可插入并表达长度为 8kb 以内的外源基因，这种腺病毒载体本身不能复制产生子代病毒，腺病毒载体 DNA 也不整合入宿主细胞的基因组中。

腺病毒载体可感染多种类型细胞，包括静止期细胞。腺病毒载体可以较容易的大规模培养并获得高滴度的病毒纯品。这些特点使得腺病毒作为常用的肿瘤基因治疗载体。

腺病毒作为肿瘤基因治疗的载体，提高其对肿瘤细胞的感染效率及特异性是十分重要的。

有报道一种新型的腺病毒载体 (Ad. IR) (Steinwaerder DS. et. al. Nature medicine. 2001 Feb; 7(2): 240-243) 将腺病毒载体中插入两段倒置重复序列, 可以使腺病毒在复制过程中发生可定位的同源重组, 产生一个截短的基因结构, 使插入倒置重复序列中反向的外源基因可以正向表达。而这种腺病毒载体的复制只发生在快速生长的肿瘤细胞中。所以, 被反向插入于腺病毒载体中的外源基因即可以特异性的表达于肿瘤细胞中, 如果外源基因是具有杀伤性的治疗基因, 则其在其中表达的肿瘤细胞就会被杀死。

对于肿瘤基因治疗载体, 一方面要求其可以在肿瘤细胞内特异性表达外源基因; 另一方面, 也希望其能在肿瘤细胞内特异性复制、产生子代病毒侵染周围未被感染的肿瘤细胞, 提高对肿瘤细胞的杀伤效果。同时, 要求其在正常细胞中尽可能不复制, 减低对正常细胞的杀伤。为达到这两个目的, 将 Ad. IR 腺病毒载体与 5 型腺病毒 E1a 基因结合将会产生一个理想的结果。

5 型腺病毒 E1a 基因位于病毒基因组左端, 具有有 84% 的保守性。E1a 编码两个主要的蛋白, 一个有 243 个氨基酸 (12S, 243R), 一个有 289 个氨基酸 (13S, 289R)。E1a-12S 和 E1a-13S 蛋白通过激活病毒基因的表达促使病毒复制。(Shenk, T. 1996. Adenoviridea, P: 2111-2148.) E1a-12S 和 E1a-13S 蛋白是腺病毒最初表达的两个蛋白, 具有激活腺病毒其它基因, 特别是 E2 区和 E4 区基因的功能, 而这两个区的功能是有关腺病毒的复制。

E1a 直接活化细胞基因, 诱导细胞 DNA 复制, 与细胞周期调控蛋白质 pRb, pRb 相关蛋白 (P107/P130) 或 P300 相互作用。

E1a 与 pRb 家族蛋白分子的结合, 释放出 E2F 家族的转录因子, 造成宿主细胞中一些有关 DNA 合成的基因被正向调控, 使静止期细胞进入 S 期。这些和一些其它在 S 期激活的细胞因子, 产生了一个适合病毒 DNA 合成的环境。在正常细胞中, E1a

诱导细胞周期负调控造成 P53 蛋白的累积, 刺激 P53 介导 G1 期细胞停滞 (el-Deiry, W. S. et. al., 1993. Cell. 75: 817-25; Xiong, Y. et. al. 1993. Nature, 366: 701-4) 或进入细胞凋亡途径。另外, E1a 诱导的凋亡也能通过不依据 P53 途径发生。(Teodoro, J. G. et. al. 1995. Oncogene. 11: 467-74)

E1a 基因过去曾被认为是一个癌基因, 可使动物胚胎细胞发生永生化, 并可与其他病毒或细胞的癌基因相互作用。

在动物实验中, E1a 并不能单独诱发癌变, 而需与 E1b 等其它基因共同起作用。5 型腺病毒本身没有致癌性, 其它型有致癌性的腺病毒与其单独的 E1a 基因没有必然的联系。近十年来, 很多实验证实, 5 型腺病毒 E1a 基因不但对人体细胞没有致癌性, 而且实际上可以有抑制肿瘤生长的作用。E1a 的肿瘤抑制作用可能与 E1a 对多种基因的调控有关, 主要表现在以下几个方面:

- ① neu 基因过度表达与人体恶性肿瘤特别是头颈口腔鳞癌密切相关, 也与肿瘤的预后及耐药性相关。而有证据显示, E1a 基因在转录水平可以特异性的抑制 neu 基因的表达, 可以抑制如粘附、侵袭等与肿瘤转移相关的特性, E1a 基因也能抑制癌基因诱导的包括细胞多形性等在内的癌变特性, 也可提高高表达 neu 基因的乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性 (Yu DH, et. al. Molecular basis of oncology. 1995: 131-162; Ueno NT, et. al. Proc AACR, 1998, 39: 360 (Abstract))
- ② E1a 通过提高细胞 P53 水平诱导细胞凋亡, 产生抗肿瘤作用。
- ③ E1a 可以提高细胞对 5-氟尿嘧啶、顺铂等化疗药及辐射所诱导的细胞凋亡的敏感性。
- ④ E1a 可在宿主细胞表面表达, 提高机体对细胞表达 E1a 基因的细胞的杀伤、清除, 达到抗肿瘤效果。

作为肿瘤基因治疗, 现有问题是提高其特异性地在肿瘤细胞中的表达, Ad. IR 重组腺病毒载体具有这一特征, 而 Ad. IR 载体应用于临床的前景在于提高其对肿瘤细胞的感染率或使其

可以在肿瘤细胞中特异地有效地复制，并扩散感染周围未被感染物的肿瘤细胞，提高对肿瘤细胞的杀伤效率。

E1a 基因作为抗肿瘤基因近年来已运用于临床试验中。本发明人经过研究试验，将 E1a 基因插入 Ad. IR 载体，构建出一种新的肿瘤基因治疗腺病毒载体 M003，目的是提供一种腺病毒载体可以特异性的肿瘤细胞中复制，表达 E1a 基因，从而特异高效的杀死肿瘤细胞。

本发明所提供的腺病毒载体可以在肿瘤内特异性表达外源基因的原理是基于此载体在肿瘤细胞内特异性的复制并重组。

本发明所提供的腺病毒载体可以促进其在肿瘤内的扩散。对于这种肿瘤特异性载体，载体病毒的扩散有利于诱导肿瘤细胞凋亡，增强病毒从受感染肿瘤细胞中释放并感染其它周围未被感染的肿瘤细胞，从而增强对肿瘤细胞的杀伤效果。

本发明还提供了含有此肿瘤特异性载体病毒及可药用载体的药物组合物。

本发明还提供了此肿瘤特异性载体在制备用于治疗肿瘤药物组合物中的用途。

发明概述：

本发明涉及一种重组腺病毒载体，其删除了 E1 和/或 E3 区基因，具有以 3'-5'方向插入的外源插入基因腺病毒 E1a 基因，并且在外源插入基因两侧具有一对倒置重复的 DNA 序列，在两个同样的该病毒基因组的这个倒置重复的序列之间可以发生同源重组。

本发明的重组腺病毒载体优选包括以下组件：a. 一段腺病毒左侧倒置末端重复序列；b. 一段腺病毒包装序列，位于左侧倒置末端重复序列的 3' 端；c. 一段启动子序列，位于腺病毒包装序列的 3' 端；d. 一对倒置重复序列，第一段倒置重复序列位于启动子序列的 3' 端，第二段重复序列位于外源 DNA 序列的 5' 端；e. 一段外源 DNA 序列，为腺病毒 E1a 基因，以 3'-5' 方向反向连接于第一段倒置重复序列的 3' 端；f. 至少一

个腺病毒基因，位于第二段倒置重复序列的 3' 端；g. 腺病毒右侧倒置末端重复序列，位于腺病毒基因的 3' 端。

对于上述的腺病毒载体，优选的是，在所述的第一段倒置重复序列 3' 端后具有一段双向转录终止位点序列，可以阻断转录进行。该双向转录终止位点序列优选是双向的 SV40 多聚腺苷序列。

本发明还涉及一种由本发明的病毒载体之间的同源重组而产生新的腺病毒载体的方法，其中将至少 2 个本发明的病毒在活体外引入肿瘤细胞中，这两个病毒之间会发生重组，产生新的重组腺病毒载体，该新的重组腺病毒载体含有可以表达的腺病毒 E1a 基因。

本发明还涉及一种药物组合物，其含有可杀死肿瘤细胞的上述重组腺病毒载体及可用药用载体。

本发明还涉及一种组合物，其包括一种具有上述腺病毒特性的重组腺病毒载体，以及一种化学治疗化合物。

本发明还涉及一种组合物，其包括一种具有上述腺病毒特性的重组腺病毒载体，以及一种免疫抑制化合物。

本发明还涉及上述重组腺病毒载体在制备用于治疗肿瘤的药物组合物中的用途。

附图说明：

1. M003 及 M005 重组腺病毒基因结构
2. Ad. IR 重组腺病毒载体同源重组产生新的重组腺病毒
3. E1a 基因促进 M003 重组腺病毒的复制
4. E1a 基因在不同时间促进 M003 重组腺病毒的复制
5. E1a 基因促进 M003 重组腺病毒对肿瘤细胞的杀伤作用
6. E1a 基因促进腺病毒载体在肿瘤细胞间的扩散

发明详述:

本发明中所构建的重组腺病毒载体是经过改造的 5 型腺病毒。5 型腺病毒的基因组含有 35935 个核苷酸。5 型腺病毒是目前研究的最为清楚的一种病毒。流行病学上主要引起人的呼吸道感染, 有明显的自愈性。腺病毒作为疫苗应用于人体已有几十年的历史, 从未发现有转化人正常细胞及致癌现象发生。

本发明所构建的重组腺病毒载体如图 1 中所使示的 M003 和 M005。在 M003 中, 腺病毒载体 E1a 的启动子区被删除, 加入 RSV 病毒启动子 (RSVp) 控制整个腺病毒载体的复制。RSVp 启动子下游是一个表达组件。5'—3' 方向依次由碱性磷酸酶基因 (AP), 内部核糖体进入位点基因 (IRES), E1a 基因和多聚腺苷基因 (polyA) 组成, 并呈 3'—5' 方向倒置于腺病毒基因组中, 该表达组件两侧分别带有倒置重复序列 (IR)。M005 是研究用的一个对照病毒, 基本结构与 M003 完全一致, 只是其中的 E1a 基因方向与其在 M003 中刚好相反, 为 5'—3' 方向。理论上讲, 当病毒在肿瘤细胞中复制时, 两个病毒基因组之间会在两个倒置重复序列之间发生重组 (图 2), RSV 启动子会被复制并反向连接到表达组件的下游, 产生一个小的表达单元, 在这个单元中, 原先在 M003 病毒中 3'—5' 方向插入的 E1a 基因及 AP 基因可以得到表达。而在 M005 病毒中 5'—3' 方向插入的 E1a 基因不能表达, 这样就可以观察到 E1a 基因在 Ad. IR 病毒载体生长复制过程中所起的作用。

本发明的优点:

本发明解决了肿瘤基因治疗领域中的两个问题:

(1) 如何在肿瘤细胞内特异性的表达基因, 通过使用 Ad. IR 重组腺病毒载体, 可以在肿瘤细胞内特异性表达外源基因, 如果特异表达的是一些细胞毒性外源基因或与细胞凋亡有关的外源基因, 将对多种肿瘤的治疗提供一种有效的手段。

(2)如何促进肿瘤基因治疗载体的抗肿瘤效果。目前的肿瘤基因治疗载体普遍存在感染杀伤效率低的问题。本发明中所使用的重组腺病毒载体，利用 5 型腺病毒 E1a 基因，促进病毒载体在肿瘤细胞内的复制及在肿瘤细胞间的扩散。同时，E1a 基因也可以发挥抗肿瘤作用。

定义

除非另有不同定义，在此使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域中一般技术人员通常所理解的一样。尽管任何与在此描述的相似或相同的任何方法和材料都可用于本发明的实施或试验。在此仅对优选的方法和材料予以描述。为本发明现就以下术语予以定义：

在此使用的“外源基因”这一术语指插入本发明中所用腺病毒载体中的编码任何感兴趣的蛋白的 DNA 序列。插入外源基因长度的上限取决于腺病毒载体的包装限度。插入的外源基因可编码任何研究所需的蛋白，可以具有药用或其它特征。外源基因可用常规方法制备得来，如合成，及由天然来源提取、克隆等得来。

在此使用的“同源”这一术语指一段核苷酸，它其中有至少 70%以上区域与另一端核苷酸序列相同，它们之间可以发生同源重组。

在此使用的“肿瘤特异性基因表达”和“肿瘤特异性”这两个术语是指腺病毒载体在肿瘤细胞中的表达。虽然此载体在正常细胞中也会有表达，但表达水平很低，使得载体复制和包装无法有效进行，以至于可以将这样低的复制包装水平忽略不计。

在此使用的“第一代腺病毒载体”或“第一代重组腺病毒载体”这一术语是指任何腺病毒载体，删除了 E1 和/或 E3 区基因，致使腺病毒载体不能复制。

实施例 I 重组腺病毒 M003 和 M005 的构建

1. M003 病毒的构建

以下描述了 M003、M005 两个重组腺病毒的构建。它们都是带有倒置重复序列的 5 型腺病毒载体，其中 M003 重组腺病毒含有有功能的 E1a 基因，而 M005 含有无功能的 E1a 基因。

除非另外说明，本发明所采用的技术，均是本领域常规技术，如分子克隆技术、微生物学技术、细胞生物学技术，这些技术在文献中均有充分解释。如 Sambrook 等的《分子克隆实验室手册》第二版（1989）等。

质粒载体的构建：用点突变的方法在 pXC1 质粒 E1a 基因前构建出一个 AgeI 酶切位点，用 AgeI 和 HpaI 限制性内切酶将 E1a 基因切割下来，回收基因片段。用 BstXI 和 BsrGI 内切酶切割 pIRES2-EGFP 质粒，回收含 IRES 基因的质粒片段，将两个回收片段连接，构成一个新的质粒 pIRES.E1a。

用 EcoRI 和 NsiI 内切酶切割质粒 pLAPSN，回收含有 AP 基因的 DNA 片段。用 EcoRI 和 PstI 内切酶切割质粒 pIRES.E1a，回收大片段，与 AP 基因片段连接，构成质粒 pAP.IRES.E1a。

用 FspI 切割 pAP.IRES.E1a，回收 3.6kb 长度片段，此为表达组件 AP.IRES.E1a。用 AvrII 和 B1pI 切割质粒 pAd.IR.BG，回收大片段，与表达组件 AP.IRES.E1a 连接，构成质粒 pM003。采用磷酸钙沉淀法将质粒 pM003 与质粒 pBHG10 共转染 293 细胞，将细胞表面铺 0.5% 琼脂，内含 1X MEM, 7% 胎牛血清，置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱培养，约 9 天后，培养皿琼脂层下细胞出现噬斑，挑取噬斑，进行扩增，提取重组腺病毒 DNA，进行 DNA 酶切分析，确定正确的重组腺病毒毒株。

2. M005 病毒的构建

M005 重组腺病毒的构建方法与 M003 病毒的步骤完全一致，只是在第一步克隆时将 E1a 基因反向与 IRES 基因相连，造成 E1a 基因不能表达。

M003 及 M005 重组腺病毒属于由复制激活产生重组的腺病毒载体 (Ad. IR), 如图 2 所示, 两个同种病毒在倒置重复序列 (IR) 之间产生重组, 产生一个短的表达单元, 左侧的启动子被复制连接到右侧倒置重复序列的右侧, 使原来反向插入不能表达的外源基因 (这里是 E1a 基因), 得以表达。由于该载体同源重组只发生在肿瘤细胞内, 故外源插入基因的特异性表达也只发生在肿瘤细胞内。

实施例 2

E1a 基因促进 M003 病毒在细胞内的复制

将 M003 及 M005 重组腺病毒和野生对照病毒分别感染 293PMT 细胞, 制备 M003 及 M005 甲基化病毒, 培养条件为 37℃, DMEM 培养液, 10%胎牛血清, 5%CO₂。纯化病毒采用氯化铯密度梯度超速离心法, 两次离心纯化。

将 M003 及 M005 甲基化病毒及对照病毒分别感染 SKHep1 细胞, 在感染后的不同时间点提取细胞中的总 DNA, 用内切酶 HindIII+XbaI 酶切过夜, 0.8%琼脂糖电泳分离。用腺病毒基因片段放射性探针杂交, 做核酸印渍 (Southern Blot) 分析。结果如图 3 及图 4 所示, 从图 3 中可见, 表达 E1a 基因的 M003 病毒, 其复制水平与野生型腺病毒相当, 而 M005 病毒及对照非复制型腺病毒载体没有产生明显的复制现象。从不同时间点的结果来看, 野生型腺病毒在 SKHep1 细胞中的复制情况是, 在感染病毒后的 24 小时内病毒复制逐渐增强, M003 重组腺病毒在 SKHep1 细胞中的复制在感染后的 36 小时逐渐达到最高, 而 M005 重组腺病毒在 SKHep1 细胞中没有有效复制。这些结果显示, 表达 E1a 基因的 M003 病毒基因组在细胞内完成同源重组后, E1a 基因被有效表达, 加速了病毒基因组在 SKHep1 细胞内的复制。

实施例 3

E1a 基因促进 M003 病毒对肿瘤细胞的杀伤效果

将 M003 病毒, 非复制型腺病毒载体和野生型腺病毒以不同的感染系数 (MOI=3, 10, 30, 100, 300, 1000) 感染 SKHep1 细胞 (不支持非复制型腺病毒载体复制), LOVO 细胞 (人大肠癌细胞株), HeLa 细胞 (人宫颈癌细胞株), 和 293 细胞 (5 型腺病毒转化的人胚胎肾细胞, 支持非复制型腺病毒载体复制), 以上细胞分别培养于 96 孔板中, 培养条件是 DMEM 培养基, 10%胎牛血清, 37℃, 5% CO₂。48 小时后, 将细胞固定, 进行结晶紫染色, 结果见图 5。从图 5 中可见, 对于 SKHep1 细胞, 肿瘤细胞, M003 病毒与野生型腺病毒具有相近的杀伤力, 而非复制型腺病毒载体对 SKHep1 细胞, LOVO 细胞, HeLa 细胞的杀伤力和 M003 病毒及野生型腺病毒相比有很大差别, 显示 E1a 基因的表达促进了 M003 重组腺病毒对肿瘤细胞的杀伤效果。

实施例 4

在动物体内试验中 E1a 基因促进 M003 重组腺病毒在肿瘤细胞间的扩散

通过 B17 小鼠门静脉接种人宫颈癌细胞 HeLa 细胞, 三周以后, 小鼠肝内形成人肿瘤细胞肝内转移模型。

M003 及 M005 重组腺病毒培养于 293 细胞内, 培养条件为 DMEM 培养基, 10%胎牛血清, 37℃, 5% CO₂。用氯化铯密度梯度离心法纯化病毒, 35, 000rpm 两次离心纯化病毒, 最后将病毒稀释配于含有 1mM MgCl₂, 10mM Tris, pH7.5, 10%甘油的溶液中。

由肝内肿瘤模型小鼠的尾静脉分别注射 M003 及 M005 重组腺病毒, 两天后再次注射。三天后杀死小鼠, 将肝组织切片, 进行碱性磷酸酶染色, 结果见图 6。

由图 6 中可见, M003 及 M005 重组腺病毒都特异性的在肿

瘤细胞中表达碱性磷酸酶基因，而 M003 病毒由于 E1a 基因的表达，随着时间的延长，表达碱性磷酸酶基因的肿瘤细胞染色呈簇状，显示病毒在肿瘤细胞间的扩散。这说明 E1a 基因促进了复制激活同源重组的腺病毒载体 (Ad. IR) 在肿瘤细胞中特异性的表达及在肿瘤细胞间的扩散。

尽管本发明为了便于明确理解而通过举例方式在某些方面做了详细描述，但显然在权利要求的范围内进行一定的变化和修饰是可行的。

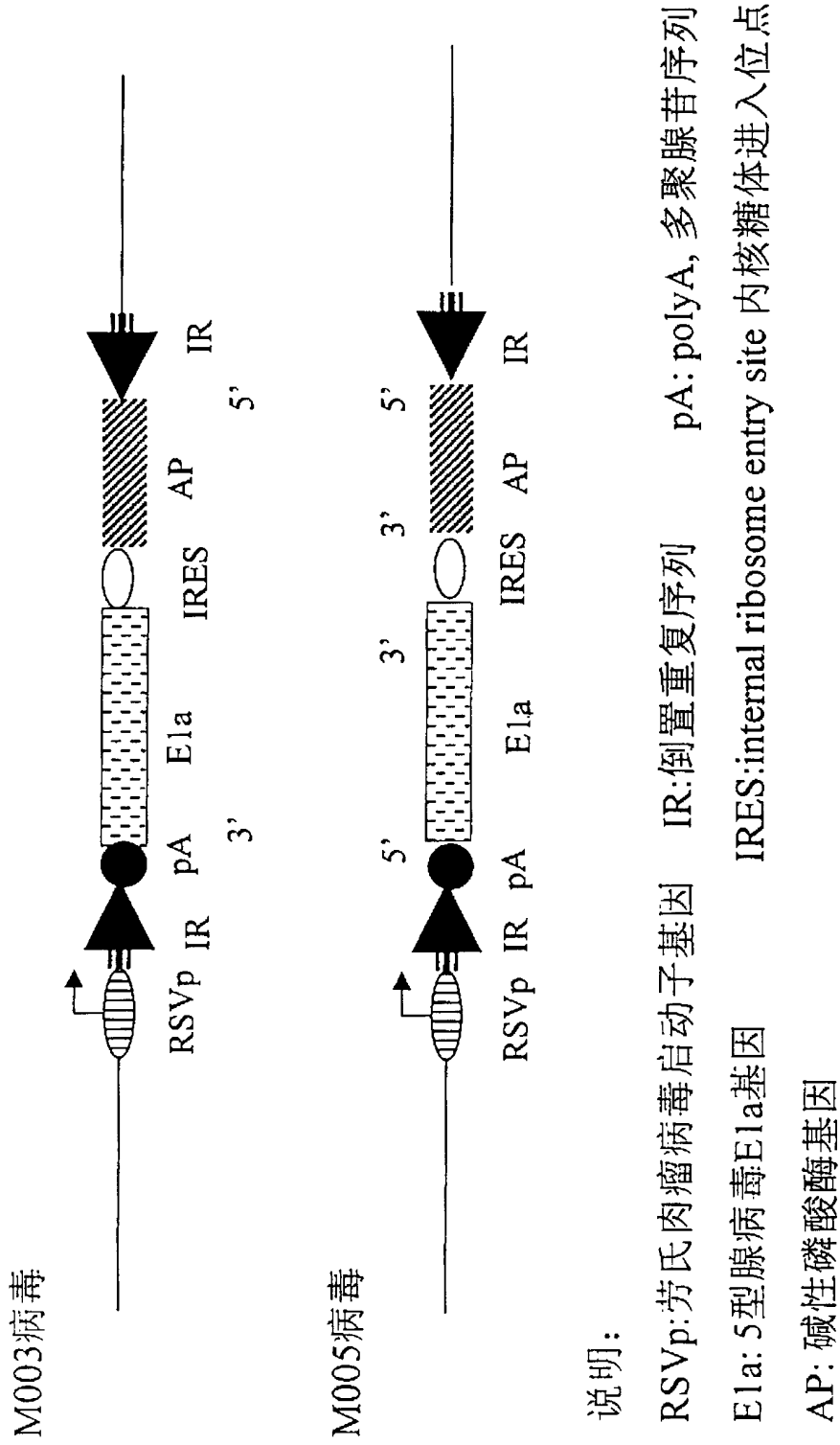


图1 M003及M005重组腺病毒基因结构

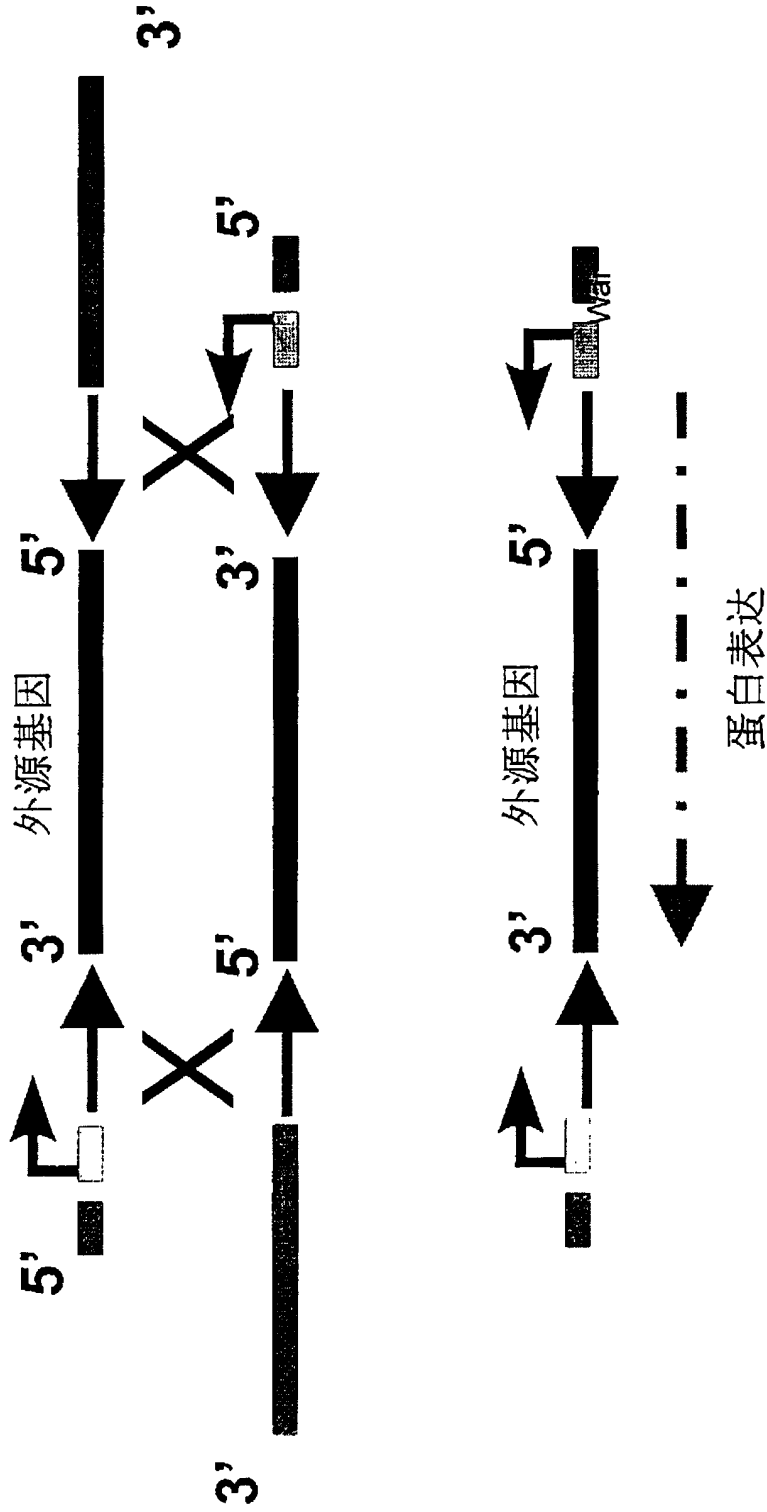
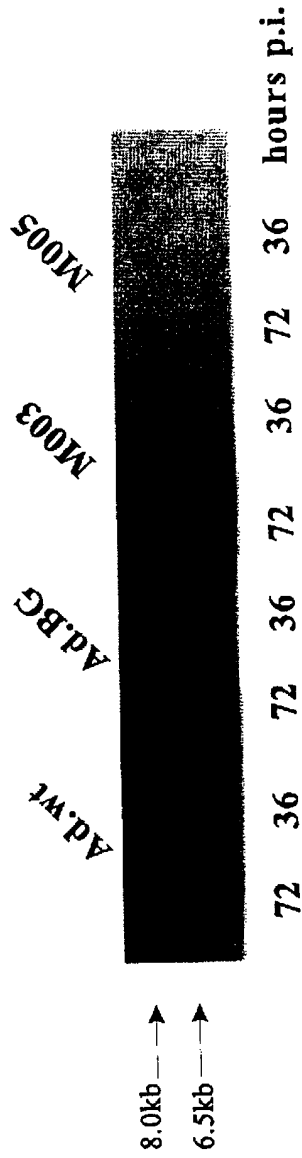


图2 Ad.IR 腺病毒载体同源重组产生新的重组腺病毒



说明：
 Ad.WT 野生型腺病毒
 Ad.BG 非复制型腺病毒
 M003 M003重组腺病毒
 M005 M005重组腺病毒

图3 E1a基因促进M003重组腺病毒复制

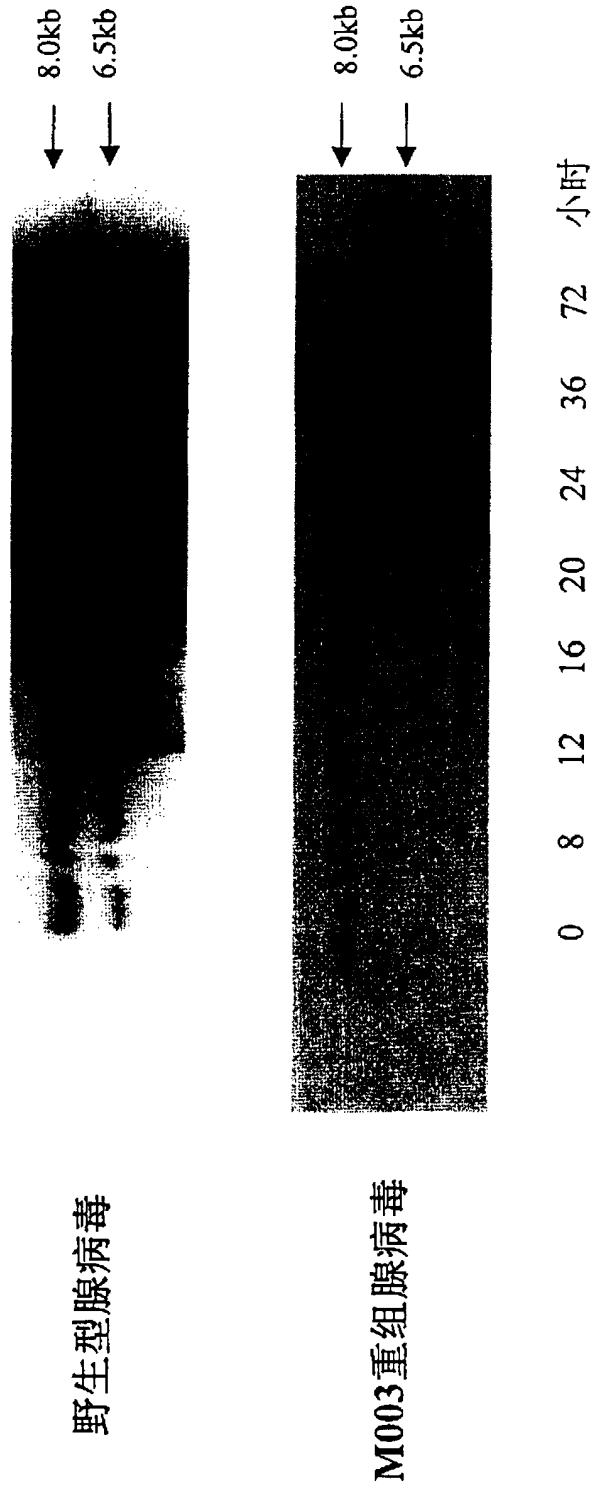
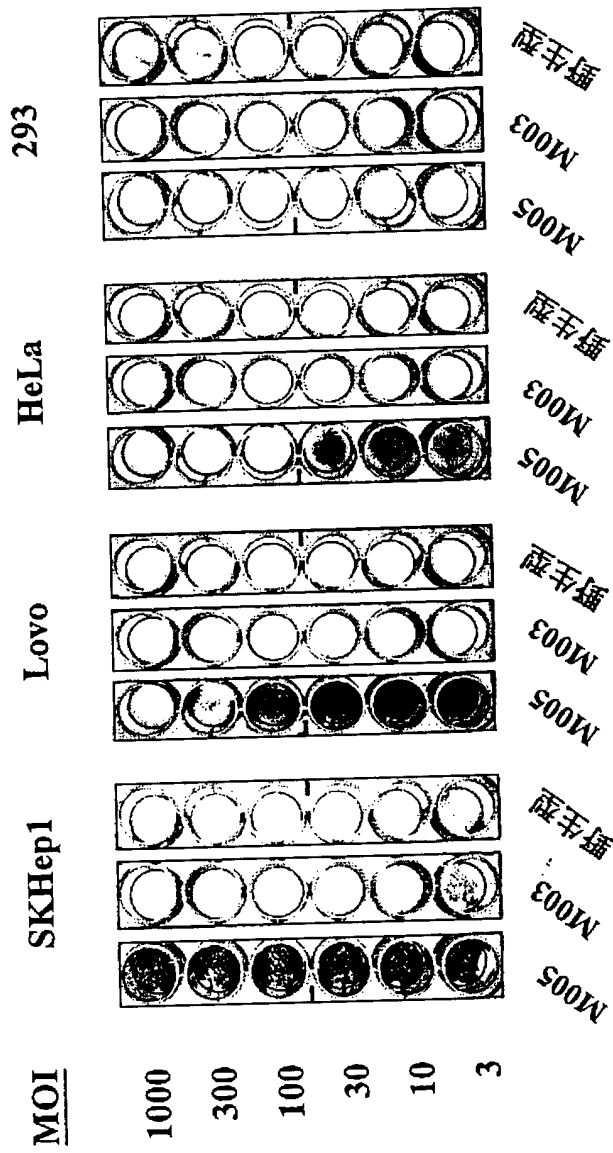


图4 E1a基因在不同时间促进M003重组腺病毒的复制

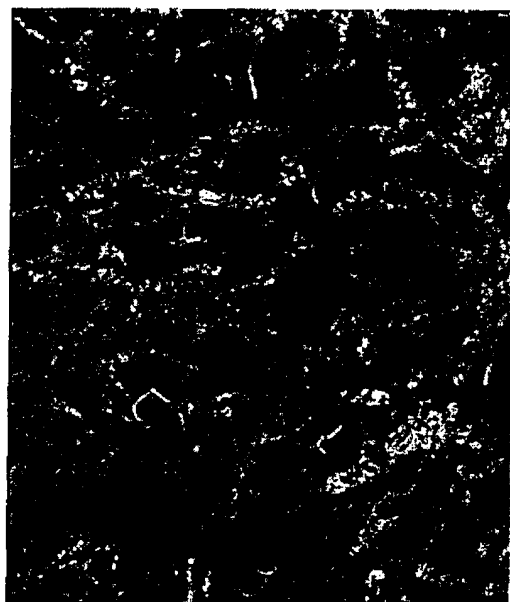


说明：
 M005: M005病毒 M003: M003病毒 野生型: 野生型腺病毒
 MOI: 感染系数（病毒数/细胞数）

图5 E1a基因促进M003重组腺病毒对肿瘤细胞的杀伤作用



M005病毒



M003病毒

图6 E1a基因在体内促进M003重组腺病毒在肿瘤细胞内扩散