重组溶瘤病毒及其构建方法和用途

优先权信息

本申请请求 2020 年 08 月 14 日向中国国家知识产权局提交的、专利申请号为 202010816787.4 的专利申请的优先权和权益，并且通过参照将其全文并入此处。

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体的，本发明涉及重组溶瘤病毒、构建重组病毒的方法、提高溶瘤病毒与靶细胞结合力的方法、药物组合物及其用途。

背景技术

近十几年，溶瘤病毒可以通过诱导机体的抗肿瘤免疫反应来杀伤肿瘤的机制逐渐明确。自 2011 年德国科学家 Jean Rommelaere 第一次将溶瘤病毒疗法称作肿瘤免疫治疗以来，溶瘤病毒目前已经被大众接受作为肿瘤免疫治疗的重要分支。相较于其他肿瘤免疫疗法，溶瘤病毒具有杀伤效率高、靶向性好、副作用小、多种杀伤肿瘤途径避免耐药性和成本低廉等优势。

由于病毒基因组小，比较容易通过基因工程手段进行多种改造，且可以通过常规手段进行病毒的改造和包装，这些技术比较成熟，成本也比较低。因此，容易通过利用溶瘤病毒自身的特征以及利用癌细胞和正常细胞的差异来对溶瘤病毒进行改造，以实现特异性靶向癌细胞。

由于大部分癌细胞自身清除病毒的机制受损(如正常细胞清除病毒的关键因子蛋白激酶 R(PKR)在癌细胞中缺失)，所以病毒更容易在癌细胞中复制扩散。另外，近几十年，随着研究的不断深入，科学工作者们利用癌细胞和正常细胞中很多信号通路和代谢等的不同，通过筛选特定的病毒品种和改造病毒基因组，不断提高溶瘤病毒对肿瘤的靶向性，降低其对正常细胞的危害，提高安全性。例如：已获批的 T-vec 敲除了 HSV-1(单纯疱疹病毒 1 型)的 γ34.5 基因，γ34.5 基因的表达产物可以抑制正常细胞对病毒的清除机制，γ34.5 基因敲除后，病毒将不能在正常细胞中复制；而癌细胞则缺失对病毒的清除机制，因此，γ34.5 基因的敲除并不影响病毒在癌细胞中的复制。目前处于 III 期临床的 JX594(Pexa-Vec)敲除了牛痘病毒(vaccinia viruses)的 TK(胸苷激酶，thymidine kinase)基因，由于病毒的复制与细胞中 TK 水平有关，所以敲除了 TK 的 JX594 仅能在 TK 活性高的癌细胞中进行复制，不能在正常细胞中复制(正常细胞的 TK 活性比癌细胞的 TK 活性低)。CG0070 是在腺病毒主管复制的基因 E1A 前加了 E2F-1 启动子，E2F-1 启动子会受到视网膜母细胞瘤抑制蛋白(Rb)的调

控，而 Rb 在膀胱癌中缺失，因此，Rb 的缺失能够激活 E2F-1 的转录活性，使得 E1A 基因在膀胱癌细胞中表达，病毒也可以可以特异性地在膀胱癌细胞中复制。Reolysin 是未经改造的野生型呼肠孤病毒，其增殖依赖 Ras 信号通路的激活，所以仅能在 Ras 激活的癌细胞中特异性增殖。

然而，目前的肿瘤治疗现状是，仍缺乏一种既能提高肿瘤杀伤特异性(即，相对于正常的非肿瘤细胞，特异性杀伤肿瘤细胞)，又能提高肿瘤治疗的广谱性(即，同时适用于多种肿瘤治疗)的治疗手段。

因此，本领域迫切需要开发一种同时具有较高的肿瘤细胞特异性和肿瘤治疗广谱性的重组溶瘤病毒。

发明内容

本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。本发明的目的就是提供一种同时具有较高的肿瘤细胞特异性和/或肿瘤治疗广谱性的重组溶瘤病毒。

本发明是基于发明人的下列发现而完成的：G 蛋白是 VSV 病毒的外壳蛋白，发明人发现某些水疱性口炎病毒的 G 蛋白能够通过某些肿瘤细胞表面的特异性受体，实现水疱性口炎病毒与肿瘤细胞的高结合力，由于这些肿瘤细胞表面的特异性受体在正常细胞中的表达量非常低，因此，携带这类 G 蛋白的水疱性口炎病毒能够对于肿瘤细胞具有高特异性。另外，由于这些肿瘤细胞表面的特异性受体在多种肿瘤细胞中都有高表达，因此，携带这类 G 蛋白的水疱性口炎病毒具有提高的肿瘤治疗广谱性，即能够在多种肿瘤细胞中发挥功能。

由此，在本发明的第一方面，本发明提出了病毒蛋白在构建重组溶瘤病毒中的用途。根据本发明的实施例，所述蛋白选自：（a）SEQ ID NO：1；（b）SEQ ID NO：2；或（c）与（a）或（b）具有至少 80%同源性的氨基酸序列。利用所述蛋白构建的重组溶瘤病毒对肿瘤细胞的结合力和杀伤力更强。

根据本发明的实施例，上述用途还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述病毒蛋白来自野生型水疱性口炎病毒。

根据本发明的实施例，所述病毒蛋白包含与（a）或（b）具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

根据本发明的实施例，所述重组溶瘤病毒不携带异源基因。根据本发明的实施例，在本文中所描述的术语“异源基因”如无特别说明，是指在野生型水疱性口炎病毒中未曾报道过的基因。或者换句话说，在重组水疱性口炎病毒中所编码的蛋白均为野生型水疱性口炎病毒中表达的。

根据本发明的实施例，所述重组溶瘤病毒的基因组的各个基因编码序列选自野生型水

疱性口炎病毒。

根据本发明的实施例，所述病毒蛋白与细胞受体的结合力的ZDOCK score不低于1800，例如不低于1900，不低于2000，或不低于2100。

根据本发明的实施例，所述细胞受体包括选自CHRNA5、SSTR5、KISS1R、HTR1D、CCR8的至少之一。

根据本发明的实施例，所述重组溶瘤病毒进一步表达选自下列的至少之一：核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及RNA依赖的RNA聚合酶。

根据本发明的实施例，所述重组溶瘤病毒基因组携带：编码所述核蛋白的核酸分子，编码所述磷酸蛋白的核酸分子，编码所述基质蛋白的核酸分子；以及编码RNA依赖的RNA聚合酶的核酸分子。

根据本发明的实施例，所述重组溶瘤病毒基因组所携带的编码所述核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及RNA依赖的RNA聚合酶的核酸分子的至少之一衍生自水疱性口炎病毒Mudd summer亚型病毒株。

在本发明的第二方面，本发明提出了一种构建重组水疱性口炎病毒的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：使起始水疱性口炎病毒表达G蛋白，所述G蛋白包含下列氨基酸序列：（a）SEQ ID NO：1；（b）SEQ ID NO：2；或（c）与（a）或（b）具有至少80%同源性的氨基酸序列，可选的，所述G蛋白来自野生型水疱性口炎病毒，可选的，所述G蛋白包括GenBank索取号为X03633.1的G蛋白和GenBank索取号为DQ408670.1的G蛋白的至少之一，可选的，所述G蛋白包含与（a）或（b）具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的氨基酸序列。如前所述，根据本发明的实施例，表达上述G蛋白的重组水疱性口炎病毒对肿瘤细胞的特异性靶向性更强，对肿瘤的杀伤更加广谱，杀伤效果更加显著。

根据本发明的实施例，上述方法还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，使所述起始水疱性口炎病毒进一步表达选自下列的至少之一：核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及RNA依赖的RNA聚合酶。发明人意外地发现，通过将这些蛋白与GenBank索取号为X03633.1的G蛋白和GenBank索取号为DQ408670.1的G蛋白的至少之一进行组合构建得到的重组病毒，具有更强的肿瘤杀伤活性。发明人认为有可能是因为对于肿瘤细胞而言，多种不同来源的蛋白组合有可能会引发与相同来源的蛋白组合不同的免疫反应，从而进一步提高对肿瘤细胞的杀伤作用。

根据本发明的实施例，使所述起始水疱性口炎病毒携带：编码所述核蛋白的核酸分子；编码所述磷酸蛋白的核酸分子；编码所述基质蛋白的核酸分子；或者编码所述RNA依赖的RNA聚合酶的核酸分子，可选的，所述编码所述核蛋白的核酸分子、所述编码所述磷酸蛋

白的核酸分子、所述编码所述基质蛋白的核酸分子和所述编码所述 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的核酸分子的至少之一衍生自水疱性口炎病毒 Mudd summer 亚型病毒株。由此，可以进一步提高这些蛋白的表达效率，并且进一步提高重组溶瘤病毒对肿瘤的杀伤作用。

在本发明的第三方面，本发明提出了根据前面所述的构建重组水疱性口炎病毒的方法构建的重组溶瘤病毒。根据本发明实施例的溶瘤病毒对肿瘤的杀伤效果更加显著。

在本发明的第四方面，本发明提出了一种提高水疱性口炎病毒与靶细胞结合力的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：使所述水疱性口炎病毒表达 G 蛋白，所述 G 蛋白包含下列氨基酸序列：（a）SEQ ID NO：1；（b）SEQ ID NO：2；或（c）与（a）或（b）具有至少 80%同源性的氨基酸序列。如前所述，根据本发明的实施例，通过表达上述 G 蛋白，能够有效地提高病毒与靶细胞通过细胞表面受体结合的结合力。

根据本发明的实施例，上述方法还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述 G 蛋白来自野生型水疱性口炎病毒。

根据本发明的实施例，所述 G 蛋白包括 GenBank 索取号为 X03633.1 的 G 蛋白和 GenBank 索取号为 DQ408670.1 的 G 蛋白的至少之一。

根据本发明的实施例，所述 G 蛋白包含与（a）或（b）具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

根据本发明的实施例，使所述起始水疱性口炎病毒携带编码所述 G 蛋白的核酸分子。

在本发明的第五方面，本发明提出了根据前面所述的提高溶瘤病毒与靶细胞结合力的的方法构建的重组溶瘤病毒。根据本发明实施例的溶瘤病毒对肿瘤的结合性和靶向性更强，杀伤效果更加显著。

在本发明的第六方面，本发明提出了一种对肿瘤细胞具有高度亲和力的重组溶瘤病毒。根据本发明的实施例，所述重组溶瘤病毒表达对细胞受体亲和力高的病毒蛋白，所述病毒蛋白选自：（a）SEQ ID NO：1；（b）SEQ ID NO：2；或（c）与（a）或（b）具有至少 80%同源性的氨基酸序列。根据本发明的实施例，表达上述病毒蛋白的重组水疱性口炎病毒对肿瘤细胞的特异性靶向性更强，杀伤效果更加显著。

另外，根据本发明的实施例，上述重组水疱性口炎病毒还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述病毒蛋白包含与（a）或（b）具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

根据本发明的实施例，所述重组水疱性口炎病毒不携带异源基因。根据本发明的实施例，在本文中所描述的术语“异源基因”如无特别说明，是指在野生型水疱性口炎病毒中未曾报道过的基因。或者换句话说，在重组水疱性口炎病毒中所编码的蛋白均为野生型水

疱性口炎病毒中表达的。

根据本发明的实施例，所述重组水疱性口炎病毒的基因组的编码序列来自野生型水疱性口炎病毒。

根据本发明的实施例，所述病毒蛋白与细胞受体的结合力的ZDOCK score不低于1800，例如不小于1900，不小于2000，优选不小于2100。本领域技术人员能够理解，通过输入G蛋白和细胞受体的序列，可以容易地获得G蛋白和细胞受体之间的结合力表征参数ZDOCK score。发明人发现，当ZDOCK score不低于1800时，携带G蛋白的病毒与携带对应受体的肿瘤细胞之间的结合力将显著提高。根据本发明的实施例，ZDOCK score是可以常规软件确定的，例如参见Pierce BG, Hourai Y, Weng Z. (2011) Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library. PLoS One 6(9): e24657.。

根据本发明的实施例，所述病毒蛋白包括选自GenBank索取号为X03633.1的G蛋白和GenBank索取号为DQ408670.1的G蛋白的至少之一。其中，GenBank索取号为DQ408670.1对应的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示，GenBank索取号为X03633.1对应的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。本发明的发明人意外地发现，GenBank索取号为X03633.1的G蛋白和GenBank索取号为DQ408670.1的G蛋白与肿瘤细胞的受体具有显著强于其他G蛋白的结合力。

根据本发明的实施例，所述重组水疱性口炎病毒进一步表达选自下列的至少之一：核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及RNA依赖的RNA聚合酶。发明人意外地发现，通过将这些蛋白与GenBank索取号为X03633.1的G蛋白和GenBank索取号为DQ408670.1的G蛋白的至少之一进行组合构建得到的重组病毒，具有更强的肿瘤杀伤活性。发明人认为有可能是因为对于肿瘤细胞而言，多种不同来源的蛋白组合有可能会引发与相同来源的蛋白组合不同的免疫反应，从而进一步提高对肿瘤细胞的杀伤作用。

根据本发明的实施例，所述重组水疱性口炎病毒携带：编码所述核蛋白的核酸分子；编码所述磷酸蛋白的核酸分子；编码所述基质蛋白的核酸分子；或者编码所述RNA依赖的RNA聚合酶的核酸分子。由此，可以进一步提高这些蛋白的表达效率。

根据本发明的实施例，所述编码所述核蛋白的核酸分子、所述编码所述磷酸蛋白的核酸分子、所述编码所述基质蛋白的核酸分子和所述编码所述RNA依赖的RNA聚合酶的核酸分子的至少之一衍生自水疱性口炎病毒Mudd summer亚型病毒株。发明人意外地发现，通过将这些蛋白与GenBank索取号为X03633.1的G蛋白和GenBank索取号为DQ408670.1的G蛋白的至少之一进行组合构建得到的重组病毒，具有更强的肿瘤杀伤活性。

在本发明的第七方面，本发明提出了前面所述的溶瘤病毒在预防或治疗疾病中的用途。

根据本发明的实施例，所述疾病选自癌症或肿瘤。

根据本发明的实施例，所述疾病选自：肺癌，胃癌，肝癌，肠癌，食管癌，乳腺癌，宫颈癌，恶性淋巴瘤，鼻咽癌，白血病的至少之一。

在本发明的第八方面，前面所述的药物组合物或者前面所述的重组水疱性口炎病毒在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或者预防癌症或者肿瘤。

根据本发明的实施例，所述癌症包括肺癌，胃癌，肝癌，肠癌，食管癌，乳腺癌，宫颈癌，恶性淋巴瘤，鼻咽癌，白血病的至少之一。

在本发明的第九方面，本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例，所述药物组合物含有：前面所述的重组水疱性口炎病毒。

根据本发明的实施例，所述药物组合物呈适于吸入或者注射方式给药的形式。

在本发明的第十方面，本发明提出了一种预防或治疗肿瘤的方法。根据本发明的实施例，包括向受试者施用以下中的至少之一：第三或第五方面所述的溶瘤病毒；第九方面所述的药物组合物。根据本发明实施例的方法可使得受试者具有有效预防肿瘤或抑制肿瘤细胞生长的能力。

根据本发明的实施例，上述预防或治疗肿瘤的方法还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述肿瘤包括选自肺癌，胃癌，肝癌，肠癌，食管癌，乳腺癌，宫颈癌，恶性淋巴瘤，鼻咽癌，白血病的至少之一。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 显示了基于肿瘤组织大样本的人类膜受体基因的分析流程图。

图 2 显示了对应的受体基因在各肿瘤中显著上调的病人比例的抖动散点图。

图 3 显示了反映候选配体分别与肿瘤特异性受体结合强度的 ZDOCK score 结果。

图 4 显示了依据筛选出的受体筛选配体的实验结果图。

图 5 显示了 qPCR 检测得到的 BXPC3、HCT-8、HepG2、Su8686、H358、NCL-H460 和 PANC1 细胞样品中的 CHRNA5、KISS1R、HTRID、CCR8 和 SSTR5 的 mRNA 的表达量。

图 6 显示了细胞杀伤实验中所测得的病毒在不同的 MOI 情况下对 BXPC3、HCT-8、HepG2、Su8686、H358 和 PANC1 细胞的杀伤效果。

图 7 显示了具有不同 G 蛋白的病毒株在不同的 MOI 情况下对 NCL-H358 和 NCL-H460 细胞的杀伤效果。

图 8 显示了插入了异源基因的病毒株对 NCL-H358 和 NCL-H460 细胞的杀伤效果。

图 9 显示了 REV DQ408670.1 病毒株对正常细胞安全的实验结果图。

发明详细描述

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

本发明是基于发明人的下列发现而完成的：发明人发现当水疱性口炎病毒的外壳表面携带某种特殊的 G 蛋白时，能够通过某些肿瘤细胞表面的特异性受体，实现水疱性口炎病毒与肿瘤细胞的高结合力，由于这些肿瘤细胞表面的特异性受体在正常细胞中的表达量非常低，因此，携带这类 G 蛋白的水疱性口炎病毒能够对于肿瘤细胞具有高特异性。另外，由于这些肿瘤细胞表面的特异性受体在多种肿瘤细胞中都有高表达，因此，携带这类 G 蛋白的水疱性口炎病毒可以提高的肿瘤治疗广谱性，即能够在多种肿瘤细胞中发挥杀伤功能。具体的，发明人经过广泛而深入的研究，经过大量的筛选，首次意外地开发了一种可用于治疗肿瘤的基因重组水疱性口炎病毒及其药物组合物。具体地，本发明的重组 VSV 病毒中，其糖(G)蛋白可以为GenBank索取号为 X03633.1的G蛋白和GenBank索取号为DQ408670.1的 G 蛋白的至少之一，并且其核(N)蛋白、磷酸(P)蛋白、基质(M)蛋白、及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(L)来自 Mudd summer 病毒株。实验结果表明，G 蛋白对应的 5 种肿瘤特异性受体在多种肿瘤细胞中均有高表达，并且本发明的重组 VSV 病毒能够结合 5 种肿瘤细胞特异性受体，进而特异性感染肿瘤细胞。在此基础上完成了本发明。

重组水疱性口炎病毒

在本发明的第一方面，本发明提出了一种重组水疱性口炎病毒。根据本发明的实施例，所述重组水疱性口炎病毒表达 G 蛋白，所述 G 蛋白包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:1 或 2 具有至少 80%同源性的氨基酸序列。

MKCFLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTG
LQVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQT
KQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNDICP
TVHNSTTWHSDYKVKGLCDSNLISTDITFFSEDRELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGDKACK
MQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILD
YSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRM
VGMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSGLHLSSKAQ

VFEHPHIQDAASQLPDDEILFFGDTGLSKNPIDFVEGWFSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLR VGIYLYIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGR（SEQ ID NO：1）。

MKCLLYLAFLFIGVNCKFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTAL QVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTK QGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTGEWVDSQFINGKCSNYICPT VHNSTTWHSDYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACK MQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILD YSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRM VGMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRTSSGYKFPLYMIGHGMLDSDLHLSSKAQ VFEHPHIQDAASQLPDDESLFFGDTGLSKNPIELVEGWFSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLR VGIHLCIKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK （SEQ ID NO：2）；

根据本发明的实施例，表达上述 G 蛋白的重组水疱性口炎病毒对肿瘤细胞的特异性靶向性更强，对肿瘤的杀伤更加广谱，杀伤效果更加显著。

需要说明的是，本申请所述的“同源性”是指氨基酸序列具有相似性，其氨基酸序列中个别氨基酸的差异不影响蛋白自有功能的发挥。“同源性氨基酸序列”是指一种多肽的氨基酸序列中，进行单一或多个氨基酸的取代、删除、添加而所衍生出的氨基酸序列。具体地，本申请所述的“具有 XXX 序列同源性”是通过如下公式计算获得的：

1-差异氨基酸的数量/基准氨基酸序列的氨基酸数量*100%，

其中，基准氨基酸序列的氨基酸数量是指被比较的氨基酸序列的数量，如所述的“G 蛋白与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 中任一种具有至少 80%序列同源性”中的基准氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。

上述具有同源性的氨基酸序列在生物学上、化学上或者结构上具有相似性，并具有相似的生物学活性。结构上相似指的是氨基酸具有相似长度的侧链，如丙氨酸、甘氨酸或丝氨酸，或具有相似大小的侧链。化学相似性指的是氨基酸具有相同的荷电或者都是亲水或者疏水的。例如疏水残基异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或者甲硫氨酸相互取代。或者极性氨基酸相互取代，例如用精氨酸取代赖氨酸、谷氨酸取代天冬氨酸、谷氨酰胺取代天冬酰胺，丝氨酸取代苏氨酸等等。生物学的相似性是指具有序列同源性的氨基酸序列在生物学功能上类似，如根据本发明实施例的重组 VSV 病毒均具有与肿瘤广谱和特异性的高亲和力和结合力。

水疱性口炎病毒(Vesicular stomatitis Virus, VSV)属于弹状病毒科水疱病毒属的病毒，分为两个血清型:新泽西型(VSV-NJ)和印第安那型(VSV-IND)。病毒粒子为子弹状或圆柱状，大小为 150～180 nm×50～70 nm。病毒有囊膜，囊膜上均匀密布有长约 10 nm 的纤突。病

毒内部为紧密盘旋的螺旋对称的核衣壳。该病毒根据患病动物的口腔粘膜，牙垫，舌头，嘴唇，鼻孔，蹄和乳头中的经典水疱性病变命名。通过昆虫媒介传播，疾病仅限于其自然宿主，例如马，牛和猪。在人类中，感染是轻度且无症状的。

VSV 基因组为不分节段的单股负链 RNA(ssRNA)病毒，长度约为 11KB。从 3’端→5’端依次排列着 N、NS、M、G、L 五个不重叠的基因，分别编码核(N)蛋白、磷酸(P)蛋白、基质(M)蛋白、糖(G)蛋白、及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(L)蛋白等 5 种不同的蛋白。N 基因的 3’端是先导序列(Leader)，5’端是拖尾序列(Trailor)，各基因间有间隔序列。3’端先导 RNA 在感染细胞中是最早的病毒转录物，长度为 47 个核苷酸，不戴帽也不翻译，其功能尚未完全清楚，可能是抑制宿主 RNA 的合成。N 蛋白是启动基因组合成所必需的，可有效的保护病毒 RNA 免受各种核酸酶的消化。N 蛋白有高的免疫原性，刺激机体产生细胞免疫，且在转录复制中担任了重要的角色，它对维持基因组 RNA 呈伸展形式可能是必要的，与复制调节有关。P 蛋白，VSV-NJ 与 VSV-IND 病毒株的同源性为 41%，其作用是与聚合酶 L，核蛋白 N 组成聚合酶复合物以及基因组 RNA 共同维持病毒的转录活性。M 蛋白在病毒致病机制和病毒复制方面起关键作用，富含碱性氨基酸，并含有高度碱性的氨基末端结构域，可通过与核衣壳结合而抑制转录，同时辅助病毒从宿主中出芽，是涉及出芽过程的惟一多肽。G 蛋白是病毒的主要表面抗原，决定着病毒的毒力，也是病毒的保护性抗原。它可刺激机体产生中和抗体。L 基因编码 RNA poly E 蛋白，它可能决定 RNA 的转录活性，与 P 蛋白结合以催化 mRNA 的复制。该蛋白是聚合酶复合物和复制酶复合物的核心成分，涉及起始、延伸、甲基化、戴帽、聚(A)尾形成等等。此外，在每个基因之间的间隔序列有广泛的同源性，这些序列有一个共同的结构，即 3’-AUAC(U) 7NAUUGUCNN-UAG-5’。这些基因之间的保守序列是一种关键信号，以影响多聚酶的活性或酶的切割活性，而在复制过程中，这些信号被掩盖，不起作用。

在本发明中，提供了一种重组的水疱性口炎病毒（VSV）病毒。如本文所用，术语“重组 VSV 病毒”、“重组水疱性口炎病毒”、“本发明重组病毒”可互换使用，是指本发明第一方面所述的能够特异性感染肿瘤细胞的重组 VSV 病毒，所述的重组 VSV 病毒特异性感染肿瘤细胞，并且所述重组 VSV 病毒特异性结合于选自下组的肿瘤细胞的特异性受体 CHRNA5、SSTR5、KISS1R、HTR1D、和 CCR8。

根据本发明的实施例，所述 G 蛋白包含与（a）或（b）具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

根据本发明的实施例，所述重组水疱性口炎病毒不携带异源基因。发明人发现，不携带异源基因的重组水疱性口炎病毒对肿瘤细胞的杀伤效果显著高于携带外源基因的重组水疱性口炎病毒。根据本发明的实施例，在本文中所描述的术语“异源基因”如无特别说明，

是指在野生型水疱性口炎病毒中未曾报道过的基因。或者换句话说，在重组水疱性口炎病毒中所编码的蛋白均为野生型水疱性口炎病毒中表达的。

根据本发明的实施例，所述重组水疱性口炎病毒的基因组的编码序列来自野生型水疱性口炎病毒。

根据本发明的实施例，携带编码所述 G 蛋白的核酸分子。

根据本发明的实施例，所述 G 蛋白与细胞受体的结合力的 ZDOCK score 不低于 1800。本领域技术人员能够理解，通过输入 G 蛋白和细胞受体的序列，可以容易地获得 G 蛋白和细胞受体之间的结合力表征参数 ZDOCK score。发明人发现，当 ZDOCK score 1800 时，例如不小于 1900，不小于 2000，优选不小于 2100，携带 G 蛋白的病毒与携带对应受体的肿瘤细胞之间的结合力将显著提高。根据本发明的实施例，ZDOCK score 是可以常规软件确定的，例如参见 Pierce BG, Hourai Y, Weng Z. (2011) Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library. PLoS One 6(9): e24657.。

根据本发明的实施例，所述 G 蛋白包括选自 GenBank 索取号为 X03633.1 的 G 蛋白和 GenBank 索取号为 DQ408670.1 的 G 蛋白的至少之一。本发明的发明人意外地发现，GenBank 索取号为 X03633.1 的 G 蛋白和 GenBank 索取号为 DQ408670.1 的 G 蛋白与肿瘤细胞的受体具有显著强于其他 G 蛋白的结合力。

根据本发明的实施例，所述重组水疱性口炎病毒进一步表达选自下列的至少之一：核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶。发明人意外地发现，通过将这些蛋白与 GenBank 索取号为 X03633.1 的 G 蛋白和 GenBank 索取号为 DQ408670.1 的 G 蛋白的至少之一进行组合构建得到的重组病毒，具有更强的肿瘤杀伤活性。发明人认为有可能是因为对于肿瘤细胞而言，多种不同来源的蛋白组合有可能会引发与相同来源的蛋白组合不同的免疫反应，从而进一步提高对肿瘤细胞的杀伤作用。

相应地，所述重组水疱性口炎病毒携带：编码所述核蛋白的核酸分子；编码所述磷酸蛋白的核酸分子；编码所述基质蛋白的核酸分子；或者编码所述 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的核酸分子

优选地，所述编码所述核蛋白的核酸分子、所述编码所述磷酸蛋白的核酸分子、所述编码所述基质蛋白的核酸分子和所述编码所述 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的核酸分子的至少之一衍生自水疱性口炎病毒 Mudd summer 亚型病毒株。发明人意外地发现，通过将这些蛋白与 GenBank 索取号为 X03633.1 的 G 蛋白和 GenBank 索取号为 DQ408670.1 的 G 蛋白的至少之一进行组合构建得到的重组病毒，具有更强的肿瘤杀伤活性。发明人认为有可能是因为对于肿瘤细胞而言，多种不同来源的蛋白组合有可能会引发与相同来源的蛋白组合不同的免疫反应，从而进一步提高对肿瘤细胞的杀伤作用。

构建重组水疱性口炎病毒的方法

在本发明的第二方面，本发明提出了一种构建重组水疱性口炎病毒的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：使起始水疱性口炎病毒表达 G 蛋白，所述 G 蛋白包含下列氨基酸序列：（a）SEQ ID NO：1；（b）SEQ ID NO：2；或（c）与（a）或（b）具有至少 80%同源性的氨基酸序列，可选的，所述 G 蛋白来自野生型水疱性口炎病毒，可选的，所述 G 蛋白包括 GenBank 索取号为 X03633.1 的 G 蛋白和 GenBank 索取号为 DQ408670.1 的 G 蛋白的至少之一，可选的，所述 G 蛋白包含与（a）或（b）具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列。如前所述，根据本发明的实施例，表达上述 G 蛋白的重组水疱性口炎病毒对肿瘤细胞的特异性靶向性更强，对肿瘤的杀伤更加广谱，杀伤效果更加显著。

根据本发明的实施例，使所述起始水疱性口炎病毒进一步表达选自下列的至少之一：核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶。发明人意外地发现，通过将这些蛋白与 GenBank 索取号为 X03633.1 的 G 蛋白和 GenBank 索取号为 DQ408670.1 的 G 蛋白的至少之一进行组合构建得到的重组病毒，具有更强的肿瘤杀伤活性。发明人认为有可能是因为对于肿瘤细胞而言，多种不同来源的蛋白组合有可能会引发与相同来源的蛋白组合不同的免疫反应，从而进一步提高对肿瘤细胞的杀伤作用。这些核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶并非限定的，因为发明人发现，当选择了特定的 G 蛋白之后，不同核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶均能够取得很好的技术效果。

根据本发明的实施例，使所述起始水疱性口炎病毒携带：编码所述核蛋白的核酸分子；编码所述磷酸蛋白的核酸分子；编码所述基质蛋白的核酸分子；或者编码所述 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的核酸分子，可选的，所述编码所述核蛋白的核酸分子、所述编码所述磷酸蛋白的核酸分子、所述编码所述基质蛋白的核酸分子和所述编码所述 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的核酸分子的至少之一衍生自示例性的病毒株，如水疱性口炎病毒 Mudd summer 亚型病毒株。由此，可以进一步提高这些蛋白的表达效率，并且进一步提高重组溶瘤病毒对肿瘤的杀伤作用。

提高水疱性口炎病毒与靶细胞结合力的方法

在本发明的第三方面，本发明提出了一种提高水疱性口炎病毒与靶细胞结合力的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：使所述水疱性口炎病毒表达 G 蛋白，所述 G 蛋白包含下列氨基酸序列：（a）SEQ ID NO：1；（b）SEQ ID NO：2；或（c）与（a）或（b）具有至少 80%同源性的氨基酸序列。如前所述，根据本发明的实施例，通过表达上述 G 蛋白，能够有效地提高病毒与靶细胞通过细胞表面受体结合的结合力。

根据本发明的实施例，所述 G 蛋白来自野生型水疱性口炎病毒。

根据本发明的实施例，所述 G 蛋白包括 GenBank 索取号为 X03633.1 的 G 蛋白和 GenBank 索取号为 DQ408670.1 的 G 蛋白的至少之一。

根据本发明的实施例，所述 G 蛋白包含与（a）或（b）具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

根据本发明的实施例，使所述起始水疱性口炎病毒携带编码所述 G 蛋白的核酸分子。

药物组合物及其制药用途

在本发明的第四方面，本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例，所述药物组合物含有：前面所述的重组水疱性口炎病毒。

根据本发明的实施例，所述药物组合物呈适于吸入或者注射方式给药的形式。

更进一步地，本发明提出了前面所述的药物组合物或者前面所述的重组水疱性口炎病毒在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或者预防癌症或者肿瘤。

根据本发明的实施例，所述癌症包括肺癌，胃癌，肝癌，肠癌，食管癌，乳腺癌，宫颈癌，恶性淋巴瘤，鼻咽癌，白血病的至少之一。

本发明提供的药物组合物，包括药学上可接受的载体和有效量的以下活性成分：本发明的特异性感染肿瘤细胞的重组 VSV 病毒。

如本文所用，术语“有效量”或“有效剂量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人和/或动物所接受的量。

如本文所用，“药学上可接受的”的成分是适用于人和/或哺乳动物而无过度不良副反应(如毒性、刺激和变态反应) 的，即具有合理的效益/风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体，包括各种赋形剂和稀释剂。

本发明的药物组合物含有安全有效量的本发明的活性成分以及药学上可接受的载体。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。通常药物制剂应与给药方式相匹配，本发明的药物组合物的剂型为注射剂、口服制剂(片剂、胶囊、口服液)、透皮剂、缓释剂。例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。所述的药物组合物宜在无菌条件下制造。

在一个实施方式中，本发明的药物组合物中还可以包括额外的肿瘤治疗剂。

本发明所述的活性成分的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于：所述的活性成分的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等；患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。例如，由治疗状况的迫切要求，可每天给予若干次分开的剂量，或

将剂量按比例地减少。

本发明所述的药学上可接受的载体包括(但不限于)：水、盐水、脂质体、脂质、蛋白、蛋白-抗体缀合物、肽类物质、纤维素、纳米凝胶、或其组合。载体的选择应与给药方式相匹配，这些都是本领域的普通技术人员所熟知的。

本发明的主要优点包括：

1) 本发明中发现的 G 蛋白对于肿瘤特异性受体的结合力高于其他一般的 G 蛋白，从而保证其对于肿瘤细胞具有很强的选择性。

2) 本发明的重组 VSV 病毒对肿瘤细胞特异性高，而对正常组织和细胞几乎无影响，因此具有较好的安全性能，其副作用较小。

3) 实验结果表明，本发明的重组 VSV 病毒对多种肿瘤组织和细胞的均具有显著的溶瘤和杀伤效果，其杀伤效率高、靶向性好。

下面参考具体实施例，对本发明进行描述，需要说明的是，这些实施例仅仅是描述性的，而不以任何方式限制本发明。

实施例 1 基于肿瘤组织大样本的人类膜受体基因的分析

以下将参考图 1 详细描述基于肿瘤组织大样本的人类膜受体基因的分析的方法。

1.1 人类膜受体基因及其表达数据预处理与分析

本发明从已有的研究中整理总结出在人类细胞中表达的受体基因信息（参考文献：(Synchronous birth is a dominant pattern in receptor-ligand evolution，BMC Genomics. Grandchamp and Monget, 2018 Aug 14;19(1):611. ）。发明人从 UCSC Xena (http://xena.ucsc.edu/) 下载了癌症病人的的基因表达矩阵（归一化值），基因突变信息以及相关临床资料。数据中包含的癌种由：肾上腺皮质癌、膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润癌、宫颈鳞状细胞癌和宫颈内膜腺癌、胆管癌、结肠腺癌、结肠腺癌/ Rectum 腺癌食管癌、淋巴样肿瘤弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、食道癌、FFPE 试验第二阶段、胶质母细胞瘤、胶质瘤、头颈部鳞状细胞癌、肾染色体、泛肾队列（KICH + KIRC + KIRP）、肾脏肾透明细胞癌、肾脏肾乳头状细胞癌、急性髓性白血病、脑低级脑胶质瘤、肝肝细胞癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、间皮瘤、卵巢浆液性囊腺癌、胰腺腺癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、前列腺腺癌、直肠腺癌、肉瘤、皮肤黑色素瘤、胃腺癌、胃和食道癌、睾丸生殖细胞肿瘤、甲状腺癌、胸腺瘤、子宫体子宫内膜癌、子宫癌肉瘤、葡萄膜黑色素瘤。

发明人首先从下载的数据中首先剔除少于三个的样本肿瘤及正常组织信息，然后进行差异表达分析。发明人使用 limma 软件（版本：3.38.3）来执行差异表达分析（参考文献：(Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies.

Nucleic Acids Research, 43, e47，Ritchie, M.E., et al. (2015))。分析中采用了 limma R 包的 voom 模型。只有当基因满足标准|log2FC| > 1，*P* 值<0.05 才会被认定为是差异基因。

1.2 数据分析

使用 R 语言计算各组间膜受体基因表达差异倍数(log2FC)和 p 值。选择|log2FC| 大于等于 2.0 被视为有显著性上调/下调差异表达基因。t 检验的 p 值小于 0.01 被判定为差异有统计学意义。使用 ComplexHeatmap R 包生成每个比较组对的 log2FC 矩阵的热图。

然后，我们根据一系列筛选条件，比如我们选择在肠癌，肺癌，胰腺癌，胃癌和肝癌癌种中选择大于等于 70%的癌症样本中显著上调的基因（即|log2FC|≥2.0 的基因）；本底表达量高等条件，选出 10 余个受体。

具体地，我们对每个基因在不同肿瘤样本中的 log2FC 值，使用 ggplot2 和 ggbeeswarm 软件绘制抖动散点图（如图 2 所示），用以展示该基因在各肿瘤中显著上调的病人比例。

另外，我们将筛选出来的 13 个受体与备选配体做分子对接，选择结合力最优的为最终选择的 5 个受体。

结果如图 3 所示（其中，图 3 所示配体编号以及所对应的配体名称和氨基酸序列捕获号如表 1 所示），CHRNA5(烟碱型胆碱受体α5)、SSTR5(生长抑素受体 5)、KISS1R(吻素受体)、HTR1D(血清素受体 1D)、CCR8(C-C 趋化因子受体 8)为肿瘤细胞和正常细胞中差异表达的受体蛋白。

表 1：

配体代号	配体名称	氨基酸序列捕获号(GENE ID)
1	M35219.1-lig-FL	M35219.1
2	HQ593628.1-lig-FL	HQ593628.1
3	KP872888.1-lig-FL	KP872888.1
4	HQ588112.1- lig-FL	HQ588112.1
5	MH919398.1- lig-FL	MH919398.1
6	MK934319.1- lig-FL	MK934319.1
7	NC-038236.1- lig-FL	NC038236.1
8	EU849003.1- lig-FL	EU849003.1
9	X03633.1- lig-FL	X03633.1
10	EF197793.1-X259G-lig-FL	EF197793.1
11	M35214.1-lig-FL	M35214.1
12	KF880910.1-lig-FL	KF880910.1

13	AF473865.1- lig-FL	AF473865.1
14	KU296059.1-X128G-lig-FL	KU296059.1
15	MH919397.1-lig-FL	MH919397.1
16	DQ408670.1-lig-FL	DQ408670.1

实施例 2 根据受体选择病毒配体

发明人选择 16 种水疱性口炎病毒同源配体，与实施例 1 筛选获得的 5 种肿瘤特异性受体分别进行建模和对接，生成的对接的结果会按照 ZDOCK score 分数进行排序，得分越高，则说明结合越强，结果可信度越高。同时综合分析这些构象的聚类结果，发现，ZDOCK 分数是 ZDOCK 程序计算的形状互补分数，根据参数设置，ZDOCK 分数还将包括静电和去溶剂能项。ZDOCK 分数越高越好。进而发明人通过 ZDOCK score 函数来评价结合的强弱，获得了筛选出肿瘤特异性受体结合能力强的配体（结果如图 4 所示），其中，结合效果最优的配体为 DQ408670.1-lig-F 和 X03633.1-lig-FL，对应的氨基酸序列的捕获号为 DQ408670.1，GENE ID: X03633.1。

实施例 3 基于不同血清型蛋白的基因重组水疱性口炎病毒的构建及扩增

发明人将来源于 Mudd summer 亚型病毒株的 L、N、P、M 蛋白组合结合捕获序列号为 GENE ID: DQ408670.1，GENE ID: X03633.1，GENE ID: KP872888.1 或 GENE ID: HQ593628.1 的 G 蛋白构建重组水疱性口炎病毒 REV DQ408670.1、REV X03633.1、REV KP872888.1 和 REV HQ593628.1。

病毒株 REV DQ408670.1、REV X03633.1、REV KP872888.1 和 REV HQ593628.1 的包装方法如下所述：

体外重组 VSV 需要:包含病毒基因组的全长质粒（包含 G 蛋白），以及病毒包装所需要的骨架蛋白的辅助质粒（N、P、L、M），通过体外转染的方法将质粒转入 BHK21 细胞中，病毒在细胞内组装成熟后出芽释放到细胞外（参考文献：Vesicular stomatitis virus-based vaccine protects hamsters against lethal challenge with Andes virus. Journal of virology 85, 12781-12791, doi:10.1128/JVI.00794-11 (2011) ，Brown, K. S., Safronetz, D., Marzi, A., Ebihara, H. & Feldmann, H. ）。

病毒的扩增使用 Vero 细胞，将一定滴度的病毒加入到培养的 Vero 细胞中，病毒可以感染细胞，并且在细胞中完成自我复制，成熟的病毒释放到细胞培养的上清中，将细胞培养的上清浓缩即可得到病毒浓缩液，滴度测定之后可用于后续实验。

实施例 4 肿瘤细胞受体的检测以及细胞杀伤结果

本实施例中利用实施例 3 构建的不同病毒对不同肿瘤细胞进行杀伤效果验证。

4.1 q-PCR 检测：

用 Trizol 法提取 1×10^6 的 BXPC3、HCT-8、HepG2、Su8686、H358、NCL-H460(H460) 和 PANC1 细胞样品，以 500ng/μL RNA 进行 20μL 体系的反转录，用 SYBR GREEN 法进行荧光定量 PCR 检测 7 个细胞样品中 CHRNA5、KISS1R、HTRID、CCR8 和 SSTR5 基因 mRNA 的表达。

结果如图 5 所示。qPCR 检测结果显示，BXPC3、HCT-8、HepG2、Su8686、H358、NCL-H460 和 PANC1 细胞样品 CHRNA5 受体基因 mRNA 表达水平较高，但不同细胞中，相对表达量高的受体存在差异，比如 H460 细胞中表达量最高的为 CHRNA5, HTR1D 受体，而其它细胞中 CHRNA5 和 CCR8 受体基因表达水平较高。

4.2 细胞杀伤实验(CCK)：

将状态良好的 BXPC3、HCT-8、HepG2、Su8686、H358 和 PANC1 细胞制成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液按 100μL/孔加入 96 孔板中，边缘补齐培养基减少蒸发，过夜培养。用 Opti-MEM 将已知滴度病毒稀释为 MOI：0.01、MOI：0.1 和 MOI：1 的病毒工作液，将 96 孔板中培养液吸弃，每孔加入 50μL 病毒稀释液，每个稀释液重复 3 复孔，另取 Opti-MEM 重复 3 孔作空白对照。病毒稀释液加入 2h 后换液，1%FBS 培养基每孔 100μL。48/72h 后每孔加入 10μL CCK8 检测液，37℃孵育 2h 后 OD450 酶标仪读数。

图 6 显示了 REV DQ408670.1 对不同细胞的 CCK 杀伤结果，CCK 检测结果显示，MOI：0.01、MOI：0.1 和 MOI：1 的 REV DQ408670.1 病毒工作液均对 BXPC3、HCT-8、HepG2、Su8686、H358 和 PANC1 细胞具有显著的杀伤效果。

实验结果如图 7 所示。CCK 检测结果显示， REV DQ408670.1、REV X03633.1 在 MOI：0.01、MOI：0.1 和 MOI：1 的病毒工作液对 NCL-H358 和 NCL-H460 细胞的杀伤效果显著优于 REV KP872888.1 和 REV HQ593628.1。同时结合图 5 结果，NCL-H358 中 CCR8 和 CHRNA5 表达量较高，NCL-H460 中 CHRNA5、HTR1D 表达量较高，以及结合图 3 受体与配体的结合热图结果，DQ408670.1 和 X03633.1 G 蛋白与 CCR8 、HTR1D 受体的结合力强。综合反应了，当重组水疱性口炎病毒与肿瘤细胞受体具有高结合力时，重组病毒对高表达所述受体的肿瘤细胞的杀伤效果更加显著。

实施例 5 基于选定 G 蛋白，不同 L、N、P、M 组合的病毒株对肿瘤细胞杀伤结果

细胞杀伤实验(CCK)：

利用反义遗传学方法，发明人构建了 REV DQ408670.1 病毒株、REV DQ408670.1-V1

和 REV DQ408670.1-V2 病毒株，其中，REV DQ408670.1-V1 是在 REV DQ408670.1 病毒株的基础上变更了 L、M 蛋白，而 REV DQ408670.1-V2 是在 REV DQ408670.1 病毒株的基础上变更了 N、P 蛋白。

将状态良好的 H358 和 H460 细胞制成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液按 100μL/孔加入 96 孔板中，边缘补齐培养基减少蒸发，过夜培养。用 Opti-MEM 将已知滴度 3 株病毒株稀释为 MOI：0.01 的病毒工作液，将 96 孔板中培养液吸弃，每孔加入 50μL 病毒稀释液，每个稀释液重复 3 复孔，另取 Opti-MEM 重复 3 孔作空白对照。病毒稀释液加入 2h 后换液，1%FBS 培养基每孔 100μL。72h 后每孔加入 10μL CCK8 检测液，37℃孵育 2h 后 OD450 酶标仪读数。

实验结果如表 2 所示。3 株病毒株 REV DQ408670.1，REV DQ408670.1-V1 和 REV DQ408670.1-V2 结果相似，在 MOI：0.01 的病毒工作液均对 H358 和 H460 细胞具有显著的杀伤效果。

表 2：MOI:0.01 时病毒对肿瘤细胞的抑制率%

	REV DQ408670.1	REV DQ408670.1-V1	REV DQ408670.1-V2
H358	88.07	78.84	85.27
H460	83.33	81.33	79.36

实施例 6 基于选定 G 蛋白以及插入外源基因的病毒株对肿瘤细胞杀伤结果

细胞杀伤实验(CCK)：

利用反义遗传学方法，发明人在构建的 REV DQ408670.1 病毒株中插入了异源基因 INFβ，以构建病毒株 FJ-INFβ。

将状态良好的 H358 和 H460 细胞制成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液按 100μL/孔加入 96 孔板中，边缘补齐培养基减少蒸发，过夜培养。用 Opti-MEM 将已知滴度 REV DQ408670.1 病毒株和 FJ-INFβ 病毒株分别稀释为 MOI：0.01、MOI：0.1 和 MOI：1 的病毒工作液，将 96 孔板中培养液吸弃，每孔加入 50μL 病毒稀释液，每个稀释液重复 3 复孔，另取 Opti-MEM 重复 3 孔作空白对照。病毒稀释液加入 2h 后换液，1%FBS 培养基每孔 100μL。72h 后每孔加入 10μL CCK8 检测液，37℃孵育 2h 后 OD450 酶标仪读数。

结果如图 8 所示，REV DQ408670.1 病毒株对 H358 和 H460 细胞杀伤显著优于 FJ-INFβ。

实施例 7 REV DQ408670.1 病毒株对正常细胞杀伤检测

细胞杀伤实验(CCK)

将状态良好的肺正常细胞 BEAS-2B 制成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液按 100μL/孔加入 96 孔板中，边缘补齐培养基减少蒸发，过夜培养。用 Opti-MEM 将已知滴度 REV DQ408670.1

病毒稀释为 MOI：0.01、MOI：0.1 和 MOI：1 的病毒工作液，将 96 孔板中培养液吸弃，每孔加入 50μL 病毒稀释液，每个稀释液重复 3 复孔，另取 Opti-MEM 重复 3 孔作空白对照。病毒稀释液加入 2h 后换液，1%FBS 培养基每孔 100μL。72h 后每孔加入 10μL CCK8 检测液，37℃孵育 2h 后 OD_{450} 酶标仪读数。

实验结果如图 9 所示。CCK 检测结果显示，REV DQ408670.1 病毒株在 MOI：0.01、MOI：0.1 和 MOI：1 的病毒工作液均对 BEAS-2B 细胞没有明显的杀伤效果。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、 “示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权利要求书

1、病毒蛋白在构建重组溶瘤病毒中的用途，其特征在于，所述蛋白选自：

（a）SEQ ID NO：1；

（b）SEQ ID NO：2；或

（c）与（a）或（b）具有至少 80%同源性的氨基酸序列。

2、根据权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述病毒蛋白来自野生型水疱性口炎病毒。

3、根据权利要求 1-2 任一所述的用途，其特征在于，所述病毒蛋白包含与（a）或（b）具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

4、根据权利要求 1-3 任一所述的用途，其特征在于，所述重组溶瘤病毒不携带异源基因。

5、根据权利要求 1-4 任一所述的用途，其特征在于，所述重组溶瘤病毒的基因组的各个基因编码序列选自野生型水疱性口炎病毒。

6、根据权利要求 1-5 任一所述的用途，其特征在于，所述病毒蛋白与细胞受体的结合力的 ZDOCK score 不低于 1800。

7、根据权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述细胞受体包括选自 CHRNA5、SSTR5、KISS1R、HTR1D、CCR8 的至少之一。

8、根据权利要求 1-7 任一所述的用途，其特征在于，所述重组溶瘤病毒进一步表达选自下列的至少之一：核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶。

9、根据权利要求 1-8 任一所述的用途，其特征在于，所述重组溶瘤病毒基因组携带：编码所述核蛋白的核酸分子，编码所述磷酸蛋白的核酸分子，编码所述基质蛋白的核酸分子；以及编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的核酸分子。

10、根据权利要求 8-9 任一所述的用途，其特征在于，所述重组溶瘤病毒基因组所携带的编码所述核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的核酸分子的至少之一衍生自水疱性口炎病毒 Mudd summer 亚型病毒株。

11、一种构建重组溶瘤病毒的方法，其特征在于，包括：使起始水疱性口炎病毒表达 G 蛋白，所述 G 蛋白包含下列氨基酸序列：

（a）SEQ ID NO：1；

（b）SEQ ID NO：2；或

（c）与（a）或（b）具有至少 80%同源性的氨基酸序列，

可选的，所述 G 蛋白来自野生型水疱性口炎病毒，可选的，所述 G 蛋白的氨基酸

序列的捕获序列号为 GENE ID: DQ408670.1 或 GENE ID: X03633.1，

可选的，所述 G 蛋白包含与（a）或（b）具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

12、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，使所述起始水疱性口炎病毒进一步表达选自下列的至少之一：

核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶。

13、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于，使所述起始水疱性口炎病毒携带：编码所述核蛋白的核酸分子， 编码所述磷酸蛋白的核酸分子，编码所述基质蛋白的核酸分子，

可选的，所述编码所述核蛋白的核酸分子、所述编码所述磷酸蛋白的核酸分子、所述编码所述基质蛋白的核酸分子和所述编码所述 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的核酸分子的至少之一衍生自水疱性口炎病毒 Mudd summer 亚型病毒株。

14、权利要求 11-13 任一所述方法构建的重组溶瘤病毒。

15、一种提高溶瘤病毒与靶细胞结合力的方法，其特征在于，包括：

使所述溶瘤病毒表达对靶细胞结合力强的 G 蛋白，所述 G 蛋白包含下列氨基酸序列：

（a）SEQ ID NO：1；

（b）SEQ ID NO：2；或

（c）与（a）或（b）具有至少 80%同源性的氨基酸序列，

可选的，所述 G 蛋白来自野生型水疱性口炎病毒，可选的，所述 G 蛋白的捕获序列号为 GENE ID: DQ408670.1 或 GENE ID: X03633.1，

可选的，所述 G 蛋白包含与（a）或（b）具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

16、通过权利要求 15 所述的方法获得重组溶瘤病毒。

17、一种对肿瘤细胞具有高度亲和力的重组溶瘤病毒，其特征在于，所述重组溶瘤病毒表达对细胞受体亲和力高的病毒蛋白，所述病毒蛋白选自：

（a）SEQ ID NO：1；

（b）SEQ ID NO：2；或

（c）与（a）或（b）具有至少 80%同源性的氨基酸序列。

18、根据权利要求 17 所述的重组溶瘤病毒，其特征在于，所述病毒蛋白来自野生型水疱性口炎病毒。

19、根据权利要求 18 所述的重组溶瘤病毒，其特征在于，所述病毒蛋白包含与（a）

或（b）具有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同源性的氨基酸序列。

20、根据权利要求 17-19 任一项所述的重组溶瘤病毒，其特征在于，所述重组溶瘤病毒不携带异源基因。

21、根据权利要求 17-20 任一所述的重组溶瘤病毒，其特征在于，所述重组溶瘤病毒的基因组的各个基因编码序列选自野生型水疱性口炎病毒。

22、根据权利要求 17-21 任一所述的重组溶瘤病毒，其特征在于，所述病毒蛋白与细胞受体的结合力的 ZDOCK score 不低于 1800。

23、根据权利要求 17-22 任一所述的重组溶瘤病毒，其特征在于，所述细胞受体包括选自 CHRNA5、SSTR5、KISS1R、HTR1D、CCR8 的至少之一。

24、根据权利要求 17-23 任一所述的重组溶瘤病毒，其特征在于，所述重组溶瘤病毒进一步表达选自下列的至少之一：核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶。

25、根据权利要求 17-23 任一所述的重组溶瘤病毒，其特征在于，所述重组溶瘤病毒基因组携带：编码所述核蛋白的核酸分子，编码所述磷酸蛋白的核酸分子，编码所述基质蛋白的核酸分子；以及编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的核酸分子。

26、根据权利要求 17-24 任一所述的重组溶瘤病毒，其特征在于，所述重组溶瘤病毒基因组所携带的编码所述核蛋白、磷酸蛋白、基质蛋白以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的核酸分子的至少之一衍生自水疱性口炎病毒 Mudd summer 亚型病毒株。

27、权利要求 14、16-26 任一所述的溶瘤病毒在预防或治疗疾病中的用途。

28、根据权利要求 27 所述的用途，所述疾病选自癌症或肿瘤。

29、根据权利要求 27 或 28 的用途，所述疾病选自：肺癌，胃癌，肝癌，肠癌，食管癌，乳腺癌，宫颈癌，恶性淋巴瘤，鼻咽癌，白血病的至少之一。

30、一种药物组合物，其特征在于，含有：

权利要求 14、16-26 任一项所述的重组溶瘤病毒。

31、根据权利要求 30 的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物呈适于吸入或者注射方式给药的形式。

32、权利要求 30 或 31 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或者预防癌症或者肿瘤。

33、根据权利要求 32 所述的用途，其特征在于，所述癌症包括肺癌，胃癌，肝癌，肠癌，食管癌，乳腺癌，宫颈癌，恶性淋巴瘤，鼻咽癌，白血病的至少之一。

34、一种预防或治疗肿瘤的方法，其特征在于，包括向受试者施用以下中的至少之一：

权利要求 14、16-26 任一所述的溶瘤病毒；

权利要求 30~31 任一项所述的药物组合物。

35、根据权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述肿瘤包括选自肺癌，胃癌，肝癌，肠癌，食管癌，乳腺癌，宫颈癌，恶性淋巴瘤，鼻咽癌，白血病的至少之一。

5