

重组新城疫病毒及制备方法、重组质粒、及其应用

技术领域

本发明总地涉及生物技术领域，具体涉及重组新城疫病毒及制备方法、重组质粒、及其应用。

背景技术

治疗癌症的手段主要有手术、放疗、化疗、免疫疗法、单克隆抗体疗法和病毒疫苗。

恶性肿瘤是危害人类健康的重大疾病之一。《2015 全球癌症统计》数据显示，2015 年全球新增约 1410 万例癌症病例，癌症死亡人数达 820 万。预计到 2025 年，全球每年新增癌症病例数将高达 2449 万例。长期以来，人们治疗癌症的方法主要以传统的手术切除和放化疗为主，这些手段可以在一定程度上控制肿瘤的发展，但是对于晚期肿瘤扩散患者的疗效有限，并且这些手段同时对人体的正常细胞产生严重的创伤。因此，急需一种新的治疗恶性肿瘤的方法，溶瘤病毒疗法是一种通过病毒选择性感染肿瘤细胞来杀伤肿瘤的新型肿瘤治疗方法。作为肿瘤免疫的重要组成部分，与其他肿瘤免疫疗法相比具有很大优势。溶瘤病毒疗法历经三个阶段的发展，已取得了很大的成效。目前可以通过携带外源基因增加抗肿瘤效果，其中 T-vec 携带 GM-CSF 后，展现出良好疗效，于 2015 年获得美国 FDA 批准用于首次复发不可切除的黑色素瘤局部治疗。同年 12 月 T-vec 又获得欧盟批准，表明溶瘤病毒的发展具有很大潜力。

20 世纪 50 年代，人们发现 NDV (Newcastle disease virus 新城疫病毒) 能抑制胃癌转移。因此 NDV 可作为一种新兴的肿瘤生物治疗因子，其本身的高靶向性以及分子生物技术的成熟使其在肿瘤治疗中的应用研究越来越深入。NDV 为单股负链 RNA 病毒，编码 6 种结构蛋白 (L、NP、P、HN、F、M)。

与其他溶瘤病毒相比，新城疫病毒具有天然靶向肿瘤细胞、广谱抗肿瘤特性，在抗肿瘤方面具有更大的优势，但如何提高其溶瘤效果和保证其安全性，仍然是我们需要面临的巨大难题。

发明内容

本发明的目的在于提供重组新城疫病毒及制备方法、重组质粒、及其应用。

本发明提供了一种重组新城疫病毒，将新城疫病毒 Losata 的 F 蛋白替换为新城疫病毒强毒株的 F 蛋白而获得。

可选地，如上述的重组新城疫病毒，所述重组新城疫病毒的 F 蛋白的编码 DNA 如 SEQ ID NO:1 自 5'末端 7274-8935 位所示。

可选地，如上述的重组新城疫病毒，将新城疫病毒 Losata 的基因组中的 F 基因替换为新城疫病毒强毒株的 F 基因而获得。优选地，所述重组新城疫病毒的 F 基因的对应 DNA 如 SEQ ID NO:1 自 5'末端 7274-8935 位所示。更优选地，所述重组新城疫病毒的基因组对应的 DNA 如 SEQ ID NO:1 所示。

可选地，如上述的重组新城疫病毒，所述重组新城疫病毒的基因组对应的 DNA 还包括外源基因，所述外源基因选自 DR5、TRAIL、hIL2、P53、PD1、CD 和 mIL12 中的一种或多种。

优选地，所述外源基因为 DR5、TRAIL、hIL2、P53、PD1、CD 或 mIL12。

优选地，所述外源基因为 mIL12-hIL2、P53-hIL2、PD1-hIL2 或 DR5-TRAIL。

优选地，所述 DR5 如 SEQ ID NO:2 所示，所述 TRAIL 如 SEQ ID NO:3 所示，所述 hIL2 如 SEQ ID NO:4 所示，所述 P53 如 SEQ ID NO:5 所示，所述 PD1 如 SEQ ID NO:6 所示，所述 CD 如 SEQ ID NO:7 所示，所述 mIL12 如 SEQ ID NO:8 所示。

优选地，所述外源基因位于所述重组新城疫病毒的 P 基因和 M 基因之间。

本发明还提供了一种重组质粒，将 pBrLosata 质粒中的 F 基因替换获得，所述重组质粒的 F 基因如 SEQ ID NO:1 自 5'末端 7274-8935 位所示。

可选地，如上述的重组质粒，所述重组质粒为如 SEQ ID NO:1 所示的 DNA 分子质粒。

可选地，如上述的重组质粒，所述重组质粒还包括外源基因，所述外源基因选自 DR5、TRAIL、hIL2、P53、PD1、CD 和 mIL12 中的一种或多种。

优选地，所述外源基因为 DR5、TRAIL、hIL2、P53、PD1、CD 或 mIL12。

优选地，所述外源基因为 mIL12-hIL2、P53-hIL2、PD1-hIL2 或 DR5-TRAIL。

优选地，所述 DR5 如 SEQ ID NO:2 所示，所述 TRAIL 如 SEQ ID NO:3 所示，所述 hIL2 如 SEQ ID NO:4 所示，所述 P53 如 SEQ ID NO:5 所示，所述 PD1 如 SEQ ID NO:6 所示，所述 CD 如 SEQ ID NO:7 所示，所述 mIL12 如 SEQ ID NO:8 所示。

优选地，所述外源基因位于所述重组新城疫病毒的基因组 P 基因和 M 基因之间。

本发明还提供了一种重组新城疫病毒的制备方法，将上述的重组质粒转染至细胞或细胞系并培养，获得重组新城疫病毒。

可选地，如上述的制备方法，将上述的重组质粒、辅助质粒共转染至细胞或细胞系并培养。所述细胞为哺乳动物细胞。辅助质粒例如为 pBL-N 质粒、pBL-P 质粒、pBL-L 质粒。

本发明还提供了上述的重组新城疫病毒、上述的重组质粒在制备药物中的应用。所述药物的功能如下 (a) 和/或 (b) 和/或 (c)：(a) 治疗肿瘤；(b) 抑制肿瘤细胞增殖；(c) 杀伤肿瘤细胞。

本发明还提供了一种药物，包括上述的重组新城疫病毒，和/或上述的重组质粒。所述药物的功能如下 (a) 和/或 (b) 和/或 (c)：(a) 治疗肿瘤；(b) 抑制肿瘤细胞增殖；(c) 杀伤肿瘤细胞。

可选地，所述肿瘤选自肝癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、神经母细胞瘤、肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、神经胶质瘤、肌肉瘤、食道癌、子宫癌、乳腺癌和结肠癌中的一种或多种。

可选地，所述肿瘤细胞选自肝癌细胞、乳腺癌细胞、非小细胞肺癌细胞、黑色素瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、肺癌细胞、胰腺癌细胞、甲状腺癌细胞、肾癌细胞、神经胶质瘤细胞、肌肉瘤细胞、食道癌细胞、子宫癌细胞、乳腺癌细胞和结肠癌细胞中的一种或多种。

本申请首先筛选出促细胞融合效果较强的毒株，获取其结构蛋白基因，利用反向遗传操作技术以及分子克隆技术，替换 Losata 的结构蛋白基因，且进一步地插入外源基因，成功构建和拯救出重组嵌合病毒。将重组嵌合病毒在鸡胚中连续传代 10 代，增殖稳定性实验结果证明，重组新城疫病毒可以在鸡胚中持续稳定的增殖，并且系统地比较重组嵌合病毒杀伤肿瘤细胞的效果。

本申请的重组嵌合病毒能有效抑制肿瘤细胞，促进肿瘤细胞的凋亡，有效地治疗肿瘤，并且具有良好的安全性。

附图说明

图 1 为实施例 1 毒株筛选试验结果；
图 2 为实施例 2 外源基因表达位置确定试验结果；
图 3A-3E 为实施例 4 细胞融合实验检测重组嵌合病毒对肿瘤细胞的杀伤作用；
图 4 为实施例 5 MTT 法检测重组嵌合病毒对 HepG-2 细胞的杀伤作用；
图 5 为实施例 5 MTT 法检测重组嵌合病毒对 U251 细胞的杀伤作用；
图 6 为实施例 5 MTT 法检测重组嵌合病毒对 MDA-MB-231 细胞的杀伤作用；
图 7 为实施例 5 MTT 法检测重组嵌合病毒对 A549 细胞的杀伤作用；
图 8 为实施例 5 MTT 法检测重组嵌合病毒对 A375 细胞的杀伤作用；
图 9 为实施例 5 Annexin V/PI 法检测重组嵌合病毒对肝癌细胞的杀伤效果
图 10 为实施例 6 重组嵌合病毒治疗 H22 荷瘤小鼠肿瘤体积的统计；
图 11 为实施例 6 重组嵌合病毒治疗 H22 荷瘤小鼠后肿瘤重量的统计；
图 12 为实施例 6 重组嵌合病毒治疗 H22 荷瘤小鼠后存活率统计；
图 13 为实施例 6 重组嵌合病毒治疗 H22 荷瘤小鼠后肿瘤组织病理观察；
图 14 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 HCCLM3 细胞的杀伤结果；
图 15 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 SK-MEL5 细胞的杀伤结果；
图 16 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 A549 细胞的杀伤结果；
图 17 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 ASPC-1 细胞的杀伤结果；
图 18 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 FTC133 细胞的杀伤结果；
图 19 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 786-O 细胞的杀伤结果；
图 20 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 HT1080 细胞的杀伤结果；
图 21 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 KYSE-150 细胞的杀伤结果；
图 22 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 Hela 细胞的杀伤结果；
图 23 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 MCF7 细胞的杀伤结果；
图 24 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 HCT116 细胞的杀伤结果；
图 25 为实施例 7 MTT 法检测表达外源基因的重组嵌合病毒对 U87-MG 细胞的杀伤结果。

具体实施方式

以下结合附图和实施例，对本发明的具体实施方式进行更加详细的说明，以便能够更好地理解本发明的方案以及其各个方面的优点。然而，以下描述的具体实施方式和实施例仅是说明的目的，而不是对本发明的限制。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。下述实施例中如未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段和市售的常用仪器、试剂，可参见《分子克隆实验指南(第 3 版)》(科学出版社)、《微生物学实验(第 4 版)》(高等教育出版社)以及相应仪器和试剂的厂商说明书等参考。

提及“pBrLosata 质粒”的文献：“Identification of Optimal Insertion Site in Recombinant Newcastle Disease Virus (rNDV) Vector Expressing Foreign Gene to Enhance Its Anti-Tumor Effect”, Ziye Pan, PLOS ONE.; 哈尔滨博翱医药技术开发有限公司。

提及“pBL-N 质粒”、“pBL-P 质粒”和“pBL-L 质粒”的文献：Genetically engineered Newcastle disease virus expressing interleukin 2 is a potential drug candidate for cancer immunotherapy, Fuliang Bai, Immunology letters.; 哈尔滨博翱医药技术开发有限公司。

pBrLosata 质粒中具有新城疫病毒的 NP 基因、P 基因、M 基因、F 基因、HN 基因和 L 基因，其中 P 基因和 M 基因之间具有 PmeI 和 Sac II 酶切识别位点。将 pBrLosata 质粒、pBL-N 质粒、pBL-P 质粒和 pBL-L 质粒共转染哺乳动物细胞并培养(pBL-N 质粒、pBL-P 质粒和 pBL-L 质粒起辅助作用，pBrLosata 质粒提供病毒的全基因组)，得到毒株 Losata。

文中涉及的外源基因包括死亡受体基因 *DR5*、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体基因 *TRAIL*、人源白细胞介素基因 *2hIL2*、抑癌基因基因 *P53*、程序性死亡受体 1 基因 *PDI*、自杀基因 *CD*、鼠源白细胞介素基因 *12mIL12*。

pMD19-T: 购至宝生物工程(大连)有限公司(大连 TaKaRa 公司)

BHK-21 细胞(幼仓鼠肾细胞): 购至 ATCC

肝癌细胞 HepG2、乳腺癌细胞 MDA-MB-231、非小细胞肺癌细胞 A549、神经母细胞瘤细胞 U251、黑色素瘤细胞 A375、肝癌细胞 HCCLM3、黑色素瘤细胞 SK-MEL5、胰腺癌细胞 ASPC-1、甲状腺癌细胞 FTC133、肾癌细胞 786-O、神经胶质瘤细胞 U87-MG、

肌肉瘤细胞 HT1080、食管癌细胞 KYSE-150、子宫癌细胞 Hela、乳腺癌细胞 MCF7、结直肠癌细胞 HCT116: 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心

高糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶, 新生牛血清 (FCS)、胎牛血清 (FBS): 购自 GIBCO 公司

SPF 鸡胚: 购自中国科学院哈尔滨兽医研究所

Balb/c 小鼠 (昆明小鼠): 购自北京维通利华公司

实施例 1 毒株筛选

取处于对数生长期的鸡胚成纤维细胞, 经胰蛋白酶消化后收集, 接种于 6 孔板中, 三株新城疫病毒强毒株 F48E9、Turkey/US(ND)/43084/92 (TkND)、Game fowl/US(CA)/211472/02 (CA02) 和一株中强毒株 Anhinga (毒株为 Southeast Poultry Research Laboratory 赠送, 本实验室保存, 涉及毒株的文献为 Evaluation of Newcastle disease virus chimeras expressing the Hemagglutinin-Neuraminidase protein of velogenic strains in the context of a mesogenic recombinant virus backbone. Virus Research, Volume 129, Issue 2, November 2007, Pages 182-190) 分别以 0.1 MOI 感染细胞, control 组为无病毒的 SPF 鸡胚尿囊液。24 h 后取出 6 孔板, 于荧光倒置显微镜下观察细胞融合效果, 通过分析合胞体形成的能力, 筛选具有强融合能力的毒株用作后续实验, 结果如图 1, F48E9 的促融合能力最强。

实施例 2、重组嵌合病毒的制备

一、重组质粒的构建 (以 F 基因替换为例)

1、筛选溶瘤效果较强的毒株 F48E9, NCBI 上获取其 F 基因序列 (GenBank: AY508514.1), 设计 Overlap PCR 引物。

2、提取病毒 RNA, 采用 F 基因特异性引物 PCR 扩增 F 基因片段, 连接 pMD19-T, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒进行鉴定, 鉴定正确的 pMD19-T-F 质粒用作下一步实验。

3、采用 PCR 技术, 以 pBrLosata 质粒为模板扩增所需要的目的片段 A 和 B, (A 片段引物: P1: 5' CACGTG AAAGCGCCAGAGAAGATTCCCGGGA 3'; P2: 5' TTTGGGGCCCATCTTGACCTGGAGGGCGCCAACCGG 3'; P3: 5' TCCAGGTGCAAGATGGGCCCAATCTTCTACCAATG 3'。B 片段引物: P6: 5' CCTCATCTGTGT TCAGATTCTGTAGTGGCCCTCAT 3'; P7: 5' ACAAGAATCTGAACACAGATGAGGAACGAAGGTTTCC 3'; P8: 5' GGCCTCTCAGGCCACGCGTCGCGCGGGCCGGTT 3')。以 pMD19-T-F 质粒为模板扩增所需要的目的片段 F, 胶回收纯化 A、F、B 片段。然后通过 Overlap PCR 的方法, 以纯化后的 A、F、B 片段为模板, 扩增目的片段 A-F-B, 连接 pMD19-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒进行鉴定, 鉴定正确的质粒命名为 pMD19-T-A-F-B, 该质粒带有 PmlI、SfiI 两个酶切位点。

4、用限制性内切酶 PmlI、SfiI 酶切步骤 3 中的质粒 pMD19-T-A-F-B, 胶回收酶切产物。

5、用限制性内切酶 PmlI、SfiI 酶切 pBrLosata 质粒, 胶回收载体。

6、将步骤 4 的酶切产物和步骤 5 的载体连接, 得到重组嵌合质粒 pBrLosata-F。对重组嵌合质粒进行 PCR 和双酶切鉴定, 鉴定正确的质粒样品分装并送至上海生工进行测序, 测序结果使用序列分析软件 DNAMAN 进行比对, 将测序结果与目的序列一致的质粒命名为 pBrLosata-F, 重组嵌合质粒 pBrLosata-F 的核苷酸序列如序列表的 SEQ ID NO:1 所示 (序列表的 SEQ ID NO:1 中, 自 5' 末端第 7274-8935 位核苷酸为 F 基因的核苷酸序列)。

用同样的方式构建其他的重组嵌合质粒: pBrLosata-HN (HN 基因序列 GenBank: AY034892.1) pBrLosata-P (P 基因序列 GenBank: AF327300.1)、pBrLosata-M (M 基因序列 GenBank: AF089819.1)。

二、外源基因最佳插入位置的确定

1、采用分子生物学的方法在 pBrLosata-F 质粒的 NP/P、P/M、M/F、F/HN 位点分别引入酶切位点。获得重组质粒 pBrLosata-F-NP/P (Asc I、Sfi I)、pBrLosata-F-P/M (Sac II、Pme I)、pBrLosata-F-M/F (HpaI、MluI)、pBrLosata-F-F/HN (HpaI、MluI)。

2、采用红荧光蛋白 RFP 基因特异性引物 PCR 扩增携带不同酶切位点的 RFP 基因片段 (红荧光蛋白 RFP 基因序列 GenBank: MG719763.1), 连接 pMD19-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒进行鉴定, 该质粒带有不同的酶切位点。

3、用限制性内切酶酶切步骤 2 中的质粒, 胶回收酶切产物。

4、用限制性内切酶酶切步骤 1 中的重组质粒, 胶回收载体。

5、将步骤 3 的酶切产物和步骤 4 的载体连接, 得到重组质粒 pBrLosata-F-NP/P-RFP、pBrLosata-F-P/M-RFP、pBrLosata-F-M/F-RFP、pBrLosata-F-F/HN-RFP。

6、步骤 5 中的重组质粒与辅助质粒共转染 BHK-21 细胞, 获得重组病毒 rLosata-F-NP/P-RFP、rLosata-F-P/M-RFP、rLosata-F-M/F-RFP、rLosata-F-F/HN-RFP。

7、取处于对数生长期的 MCF7 细胞, 经胰蛋白酶消化后收集, 接种于 6 孔板中, 重组嵌合病毒 rLosata-F-NP/P-RFP、rLosata-F-P/M-RFP、rLosata-F-M/F-RFP、rLosata-F-F/HN-RFP。分别以 1 MOI 感染细胞, 亲本病毒 rLosata 用作对照, control 组为无病毒的 SPF 鸡胚尿囊液。24 h 后取出 6 孔板, 于流式细胞仪下检测各病毒感染后细胞的平均荧光强度。结果见图 2, P、M 位点之间红荧光强度最强, 表明 P、M 位点之间 RFP 表达量最高。

三、插入外源基因的重组质粒的构建 (以 PD1 基因插入为例)

1、分离人外周血细胞中的单核细胞并提取 RNA 并反转录成 cDNA,

根据 GenBank 已发表的人 PD1 序列 (AY238517.1), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物 P1 和 P2 用于克隆完整 PD1 基因。引物两端设计 PmeI 和 Sac II 酶切位点, 以匹配 pBrLosata-F 载体质粒;

2、步骤 1 的 PCR 产物连接 pMD19-T, 转化大肠杆菌, 提取质粒进行鉴定, 鉴定正确的 pMD19-T-PD1 质粒用作下一步实验。

3、用限制性内切酶 PmeI 和 Sac II 酶切步骤 2 中的质粒 pMD19-PD1, 胶回收酶切产物。

4、用限制性内切酶 PmeI 和 Sac II 酶切 pBrLosata-F 质粒, 胶回收载体。

5、将步骤 3 的酶切产物和步骤 4 的载体连接, 得到重组嵌合质粒 pBrLosata(F)-PD1, 其中, PD1 基因插入质粒 P 基因和 M 基因之间。对重组嵌合质粒进行 PCR 和 PmeI 和 Sac II 双酶切鉴定, 鉴定正确的质粒样品分装并送至上海生工进行测序, 测序结果使用序列分析软件 DNAMAN 进行比对, 经测序结果与目的序列一致。重组嵌合质粒 pBrLosata(F)-PD1 的 PD1 核苷酸序列如序列表的 SEQ ID NO.6 所示。

用同样的方法构建其他的插入外源基因的重组嵌合质粒，构建的重组嵌合质粒具体如下：pBrLosata(F)-DR5（DR5 序列如 SEQ ID NO:2 所示）、pBrLosata(F)-TRAIL（TRAIL 序列如 SEQ ID NO:3 所示）、pBrLosata(F)-hIL2（hIL2 序列如 SEQ ID NO:4 所示）、pBrLosata(F)-P53（P53 序列如 SEQ ID NO:5 所示）、pBrLosata(F)-CD（CD 序列如 SEQ ID NO:7 所示）、pBrLosata(F)-mIL12（mIL12 序列如 SEQ ID NO:8 所示）、pBrLosata(F)-DR5-TRAIL（即外源基因为 DR5 和 TRAIL 的组合）、pBrLosata(F)-mIL12-hIL2（即外源基因为 mIL12 和 hIL2 的组合）、pBrLosata(F)-P53-hIL2（即外源基因为 P53 和 hIL2 的组合）和 pBrLosata(F)-PD1-hIL2（即外源基因为 PD1 和 hIL2 的组合）。

四、重组嵌合病毒的制备

1、将 pBrLosata 质粒、重组嵌合质粒 pBrLosata-HN、pBrLosata-F、pBrLosata-P、pBrLosata-M、pBrLosata(F)-DR5、pBrLosata(F)-TRAIL、pBrLosata(F)-hIL2、pBrLosata(F)-P53、pBrLosata(F)-PD1、pBrLosata(F)-CD、pBrLosata(F)-mIL12、pBrLosata(F)-DR5-TRAIL、pBrLosata(F)-mIL12-hIL2、pBrLosata(F)-P53-hIL2 和 pBrLosata(F)-PD1-hIL2。分别同辅助质粒 pBL-NP 质粒、pBL-P 质粒和 pBL-L 质粒共转染 BHK-21 细胞（每 1×10^6 个细胞约转染 2 μ g 重组嵌合质粒、1 μ g pBL-N 质粒、0.5 μ g pBL-P 质粒和 0.25 μ g pBL-L 质粒），置于 5% CO₂、37°C 环境中静置培养 72h。

2、取步骤 1 得到的转染细胞，反复冻融 3 次，离心收取细胞上清液，然后接种于 9-11 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔，置于 37°C 环境中培养 72h，收集鸡胚尿囊液进行 HA 检测。

3、取步骤 2 得到的 HA 呈阳性的鸡胚尿囊液进行传代，接种于新的 9-11 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔，置于 37°C 环境中培养 72h，收集鸡胚尿囊液进行 HA 检测，连续传 10 代，检测重组病毒的增殖稳定性。

4、取步骤 3 得到的鸡胚尿囊液大量繁殖病毒，接种于新的 9-11 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔，置于 37°C 环境中培养 72h，收集鸡胚尿囊液进行 HA 检测，选取 HA 效价大于 2^9 的尿囊液进行混合后分装备用。

5、收取各组尿囊液进行 Western Blot 检测各外源基因的表达，结果显示，与 rLosata 组相比，表达外源基因的重组嵌合病毒能够稳定表达外源基因。

以下描述如无特别指明，重组嵌合病毒、嵌合病毒、重组病毒为该方法制备的重组嵌合病毒。rLosata-HN、rLosata-F、rLosata-P、rLosata-M、rLosata(F)-DR5、rLosata(F)-TRAIL、rLosata(F)-hIL2、rLosata(F)-P53、rLosata(F)-PD1、rLosata(F)-CD、rLosata(F)-mIL12、rLosata(F)-DR5-TRAIL、rLosata(F)-mIL12-hIL2、rLosata(F)-P53-hIL2 和 rLosata(F)-PD1-hIL2 分别指使用重组嵌合质粒 pBrLosata-HN、pBrLosata-F、pBrLosata-NP、pBrLosata-M、pBrLosata(F)-DR5、pBrLosata(F)-TRAIL、pBrLosata(F)-hIL2、pBrLosata(F)-P53、pBrLosata(F)-PD1、pBrLosata(F)-CD、pBrLosata(F)-mIL12、pBrLosata(F)-DR5-TRAIL、pBrLosata(F)-mIL12-hIL2、pBrLosata(F)-P53-hIL2 和 pBrLosata(F)-PD1-hIL2 通过该方法制备的重组嵌合病毒。

以下描述若无特别指明，亲本病毒指新城疫病毒 rLosata、F48E9。

实施例 3、重组嵌合病毒毒力及致病力的测定

一、EID₅₀ 的测定

将拯救的重组嵌合病毒或亲本病毒用灭菌处理的 PBS 分别连续 10 倍梯度稀释，从 37°C 培养箱中取出鸡胚，每个稀释度接种 6 枚 9-11 日龄 SPF 鸡胚（100 μ L/枚），37°C 培养箱中继续孵育 4-6 天后，每个鸡胚都需通过 HA 实验检测，记录每个稀释度感染的鸡胚数，根据 Reed and Muench method 方法计算重组嵌合病毒或亲本病毒的 EID₅₀。

二、TCID₅₀ 的测定

1、用含有 10%FBS、1%抗生素的 DMEM 培养基接种 DF-1 细胞于 96 孔微量培养板内，37°C，5%CO₂ 培养箱中过夜。

2、接种重组嵌合病毒和亲本病毒前，将步骤 1 中加入的原有细胞培养基弃掉，加入含有 10%尿囊液、1%抗生素的 180 μ L DMEM 新鲜培养基。

3、取 20 μ L 重组嵌合病毒或亲本病毒接种于最上排细胞孔内，轻轻吹打混匀后，吸取 20 μ L 混合液向下方细胞孔做连续的 10 倍梯度稀释。每个病毒设置 3 个重复样品。

4、37°C、5%CO₂ 细胞培养箱中，重组嵌合病毒或亲本病毒接种孵育 1 小时后，弃去步骤 3 加入的培养基并用 PBS 清洗一次，之后加入含 10%尿囊液，1%抗生素的 200 μ L DMEM 新鲜培养基。

5、37°C，5%CO₂ 细胞培养箱中继续培养，72h 后于光学倒置显微镜下观察细胞病变孔并记录病变孔的个数，根据 Reed and Muench method 方法计算该病毒的效价。

三、MDT 的测定

重组嵌合病毒或亲本病毒分别用灭菌后的 PBS 进行 10 倍梯度稀释，将倍比稀释的病毒通过尿囊腔接种于 6 枚 10 日龄 SPF 鸡胚（100 μ L/枚），37°C 培养箱连续培养 7 天，每隔 12h 检查并记录每个稀释度接种鸡胚的死亡时间和死亡数，最后以病毒最高稀释倍数接种鸡胚全部死亡的平均时间为该病毒的 MDT。

四、ICPI 的测定

按照 OIE 标准，重组嵌合病毒或亲本病毒分别先用灭菌处理的 PBS 进行 10 倍梯度稀释，经脑内接种 10 只 1 日龄 SPF 雏鸡（50 μ L/只），连续观察 10 天，记录雏鸡每天发病率和死亡率，并根据 Reed and Muench method 方法计算病毒的脑内致病指数。

实施例 3 重组嵌合病毒毒力及致病力的测定结果见表 1。亲本毒株 F48E9 的 ICPI 值为 1.81，rLosata-HN、rLosata-P 和 rLosata-M 的 ICPI 值显著低于 F48E9，分别为 0.11、0.40、0.27，rLosata-F 的 ICPI 为 1.59，较 F48E9 也有所下降。结果表明：与亲本毒株 F48E9 相比，HN、P、M 和 F 替换均能降低 F48E9 对鸡的致病力。rLosata-F 作为重组病毒，相比于 F48E9，可控性更高且相对安全。

表 1 病毒滴度、毒力及致病力的比较

Virus	HA	TCID ₅₀	EID ₅₀	MDT	ICPI
rLosata	2 ⁹	2.09×10 ⁷	6.67×10 ⁹	>120h	0.00
F48E9	2 ⁹	2.24×10 ⁸	5.13×10 ⁹	58h	1.81
rLosata-HN	2 ⁸	1.1×10 ⁷	1×10 ⁹	>120h	0.11
rLosata-P	2 ⁹	1×10 ⁸	4.92×10 ⁹	>120h	0.40

rLosata-F	2 ⁹	2.24×10 ⁸	6.67×10 ⁹	62h	1.59
rLosata- M	2 ⁹	1.62×10 ⁸	4.67×10 ⁹	>120h	0.27
rLosata(F)-DR5	2 ⁹	4.67×10 ⁷	3.98×10 ⁹	60h	1.57
rLosata(F)-TRAIL	2 ⁹	4.6×10 ⁷	2.29×10 ⁹	64h	1.59
rLosata(F)-hIL2	2 ¹⁰	1.71×10 ⁸	6.67×10 ⁹	66h	1.55
rLosata(F)-P53	2 ⁹	3.92×10 ⁷	3.37×10 ⁹	66h	1.58
rLosata(F)-PD1	2 ¹⁰	1.92×10 ⁸	4.92×10 ⁹	64h	1.56
rLosata(F)-CD	2 ⁹	4.11×10 ⁷	2.12×10 ⁹	64h	1.59
rLosata(F)-mIL12	2 ⁹	3.16×10 ⁷	3.52×10 ⁹	68h	1.54
rLosata(F)-DR5-TRAIL	2 ⁹	3.16×10 ⁷	3.61×10 ⁹	60h	1.59
rLosata(F)-mIL12-hIL2	2 ⁹	1.61×10 ⁸	4.67×10 ⁹	66h	1.58
rLosata(F)-P53-hIL2	2 ⁹	4.11×10 ⁷	3.92×10 ⁹	64h	1.59
rLosata(F)-PD1-hIL2	2 ¹⁰	1.92×10 ⁸	5.13×10 ⁹	68h	1.58

实施例4、细胞融合实验检测重组嵌合病毒对肿瘤细胞的杀伤作用

肿瘤细胞为肝癌细胞 HepG2、乳腺癌细胞 MDA-MB-231、非小细胞肺癌细胞 A549、黑色素瘤细胞 A375、神经母细胞瘤细胞 U251。

一、重组嵌合病毒感染肿瘤细胞

取处于对数生长期的肿瘤细胞，经胰蛋白酶消化后收集，接种于6孔板中，重组嵌合病毒 rLosata-HN、rLosata-F、rLosata-P、rLosata-M 分别以1 MOI 感染细胞，亲本病毒 rLosata 用作对照，control 组为无病毒的 SPF 鸡胚尿囊液。24 h 后取出6孔板，于荧光倒置显微镜下观察细胞融合效果。结果见图3A-3E。

结果表明，与亲本病毒相比，重组嵌合病毒 rLosata-HN、rLosata-P、rLosata-M 产生合胞体数量高于 rLosata，但差异不显著；而嵌合病毒 rLosata-F 产生合胞体的数量高于 rLosata，差异极显著。

实施例5、重组嵌合病毒对肿瘤细胞的作用效果

肿瘤细胞为肝癌细胞 HepG2、乳腺癌细胞 MDA-MB-231、非小细胞肺癌细胞 A549、黑色素瘤细胞 A375、神经母细胞瘤细胞 U251。

一、MTT 法检测重组嵌合病毒对肿瘤细胞的抑制作用

将对数生长期的肿瘤细胞进行胰酶消化，然后用含10%小牛血清的 DMEM 培养基或 RPMI-1640 培养基制成 2×10^4 个细胞/mL 的细胞悬液。将细胞悬液接种于96孔板（每孔200微升），置于5% CO₂、37℃环境中静置培养24h，弃培养上清，用PBS缓冲液洗涤，洗涤后分组。每组实验孔内各加入0.01MOI、0.1 MOI、1 MOI、10 MOI 的嵌合病毒 100 μL，对照组内分别加入0.01MOI、0.1 MOI、1 MOI、10 MOI 的 rLosata 100 μL；阴性对照孔内加100 μL DMEM。病毒感染1h后，弃去病毒液，每孔加入200 μL PBS 洗涤一次，加入含有5%血清的细胞维持液进行培养。分别培养24 h、48 h 后，向每孔加入20 μL MTT 溶液（5 mg/mL），孵育4 h，弃培养液，向每孔加入150 μL DMSO，震荡10 min 后，酶标仪于测定490 nm 处的 OD 值，计算细胞生长的抑制率。

抑制率=（阴性对照处理孔的 OD 值-试验处理孔的 OD 值）/阴性对照处理孔的 OD 值×100%。

对 HepG-2 细胞的抑制率见图4；对 U251 细胞的抑制率见图5；对 MDA-MB-231 细胞的抑制率见图6；对 A549 细胞的抑制率见图7；对 A375 细胞的抑制率见图8；

结果表明：亲本病毒 rLosata 和嵌合病毒 rLosata-HN、rLosata-F、rLosata-P、rLosata-M 均对以上细胞具有抑制效果，嵌合病毒 rLosata-F 的抑制效果显著高于亲本病毒 rLosata；其他嵌合病毒 rLosata-HN、rLosata-NP、rLosata-M 的抑制效果高于亲本病毒 rLosata，差异不显著；而且重组病毒对肿瘤细胞的杀伤效果与时间和剂量成正相关。

二、Annexin V/PI 法检测重组嵌合病毒对肝癌细胞的杀伤效果

收集对数生长期的 HepG2 肿瘤细胞，制备成 1×10^4 个/mL（含0.001%胰酶）的细胞悬液，混匀后加入6孔板中，待细胞长到60-80%，进行分组实验。

添加无病毒 SPF 鸡胚尿囊液的 HepG2 细胞作为空细胞对照组（control），加入1MOI rLosata 的 HepG2 细胞作为对照组，加入1MOI 重组嵌合病毒的 HepG2 细胞为实验组。

感染12 h 后，用0.25%的胰酶消化细胞（ 0.5×10^6 个），用PBS洗2次，用移液器吸取500 μL Binding Buffer 轻柔的悬浮细胞，加入FITC 标记的10 μL Annexin-V，混匀，再加入5 μL PI 混匀，避光反应5-15min 后立即用流式细胞术定量检测，同时设有不加 AnnexinV-FITC 及 PI 的 HepG2 细胞作为阴性对照。

结果见图9，结果表明，亲本病毒和重组嵌合病毒均能诱导肿瘤细胞发生凋亡，rLosata-F 病毒的效果显著强于 rLosata 病毒，其余的重组嵌合病毒的效果与 rLosata 病毒差异不显著。

实施例6、重组嵌合病毒对肿瘤的治疗作用及病毒安全性检测

一、重组嵌合病毒对肿瘤的治疗作用

1、建立 Balb/c 小鼠 H22 肝癌动物模型

取6周龄昆明小鼠进行实验，将H22小鼠肝癌细胞接种于昆明小鼠腹腔，7天后待腹水长出断颈处死。无菌条件下抽取含有H22细胞的腹水，加入适量PBS，配成癌细胞悬液，细胞计数及测定细胞活力，活细胞率达95%。调整细胞密度为 10^6 个/mL 备用。每只 Balb/c 小鼠右侧腹股沟皮下注入剂量0.2 mL，约含 2×10^5 个肿瘤细胞。8-12 天后形成实体瘤直径在5-8 mm，造模成功，可进行后续实验。取肿瘤直径在5-8mm 的小鼠，去除形态、大小差异大的个体，作为模型小鼠。

2、重组嵌合病毒对肿瘤的治疗作用

将模型小鼠随机分为六组，每组15只，分别处理如下：

rLosata-HN 组：每天向模型小鼠的瘤内注射0.2mL 实施例1制备的 rLosata- HN 病毒液（含 10^7 pfu 病毒），治疗14天；

rLosata-F 组：每天向模型小鼠的瘤内注射0.2mL 实施例1制备的 rLosata-F 病毒液（含 10^7 pfu 病毒），治疗14天；

rLosata-P 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.2mL 实施例 1 制备的 rLosata-P 病毒液（含 10^7 pfu 病毒），治疗 14 天；
rLosata-M 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.2mL 实施例 1 制备的 rLosata-M 病毒液（含 10^7 pfu 病毒），治疗 14 天；
rLosata 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.2mL rLosata 病毒液（含 10^7 pfu 病毒），治疗 14 天；
尿囊液组（Model）：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.2mL 尿囊液，治疗 14 天。

隔天测量肿瘤体积，治疗结束后，杀鼠，剥瘤，测量肿瘤体积和重量（结果如图 10，图 11）。剩余小鼠在治疗结束后观察小鼠的存活情况，control 组为未经任何处理的正常小鼠（图 12）。结果表明，与尿囊液组相比，亲本病毒和嵌合病毒均对肿瘤有显著的抑制效果，rLosata-P 和 rLosata-M 的抗肿瘤效果高于 rLosata-HN 组，差异不显著，而 rLosata-F 的抑制效果显著高于以上三种嵌合病毒。与尿囊液组相比，亲本病毒和嵌合病毒均能显著的提高小鼠存活率，与 rLosata 组相比，只有 rLosata-F 能显著提高小鼠存活率。

3、肿瘤病理切片的观察

为观察 NDV 嵌合病毒与对照组治疗后肿瘤组织细胞形态，取治疗后各组小鼠肿瘤组织，按常规方法制备肿瘤组织石蜡切片。在显微镜下观察各治疗组肿瘤组织形态特征，并进行比较分析。

结果表明：治疗后模型组肿瘤组织结构致密，细胞形态完好，生长旺盛；rLosata 病毒对照组肿瘤组织出现轻微坏死；rLosata-HN、rLosata-P、rLosata-M 组细胞结构不完整，并伴有一定程度的淋巴细胞浸润；rLosata-F 组肿瘤组织松散，细胞结构不完整并伴有大量的淋巴细胞浸润（参见图 13）。

二、重组嵌合病毒的安全性检测

急性毒性试验

选用健康 4-6 周昆明系小白鼠，共 20 只，雌雄各半，分为两组，每组 10 只。对照组小鼠正常饲养。实验组每只小鼠腹腔内注射 1×10^4 pfu rLosata-F，注射之后观察 48h。实验的小鼠若出现呼吸受到抑制、四肢步伐不平稳、有瘫痪症状、惊厥、皮毛战栗等不良反应和死亡小鼠均为阳性。

亚急性毒性试验

选用健康 4-6 周昆明系小白鼠，共 20 只，雌雄各半，分为两组，每组 10 只。实验组小鼠每天每只腹腔注射 1×10^4 pfu rLosata-F，对照组小鼠正常饲养。连续记录小鼠 4 周内的反应情况，主要观察小鼠的进水、进食、毛色、体重等方面，若一切正常且无不良反应或死亡者，为阴性。

结果表明，重组嵌合病毒对小鼠的正常生长无不良影响，安全性可靠。

实施例 7、表达外源基因的重组嵌合病毒对肿瘤细胞的作用效果

肿瘤细胞为肝癌细胞 HCCLM3、黑色素瘤细胞 SK-MEL5、肺癌细胞 A549、胰腺癌细胞 ASPC-1、甲状腺癌细胞 FTC133、肾癌细胞 786-O、神经胶质瘤细胞 U87-MG、肌肉瘤细胞 HT1080、食管癌细胞 KYSE-150、子宫癌细胞 Hela、乳腺癌细胞 MCF7、结直肠癌细胞 HCT116。

一、MTT 法检测重组嵌合病毒对肿瘤细胞的抑制作用

将对数生长期的肿瘤细胞进行胰酶消化，然后用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基、F12 培养基或 RPMI-1640 培养基制成 2×10^4 个细胞/mL 的细胞悬液。将细胞悬液接种于 96 孔板（每孔 200 微升），置于 5% CO_2 、37℃ 环境中静置培养 24h，弃培养上清，用 PBS 缓冲液洗涤，洗涤后分组。每组实验孔内各加入 0.1 MOI 表达外源基因的嵌合病毒 100 μL ，对照孔内加入 0.1 MOI 的 rLosata-F；阴性对照孔内加 100 μL DMEM。病毒感染 1 h 后，弃去病毒液，每孔加入 200 μL PBS 洗涤一次，加入含有 5% 血清的细胞维持液进行培养。培养 24 h 后，向每孔加入 20 μL MTT 溶液（5 mg/mL），孵育 4 h，弃培养液，向每孔加入 150 μL DMSO，震荡 10 min 后，酶标仪于测定 490 nm 处的 OD 值，计算细胞生长的抑制率。

抑制率 = (阴性对照处理孔的 OD 值 - 试验处理孔的 OD 值) / 阴性对照处理孔的 OD 值 * 100%。

对 HCCLM3 细胞的抑制率见图 14；对 SK-MEL5 细胞的抑制率见图 15；对 A549 细胞的抑制率见图 16；对 ASPC-1 细胞的抑制率见图 17；对 FTC133 细胞的抑制率见图 18；对 786-O 细胞的抑制率见图 19；对 HT1080 细胞的抑制率见图 20；对 KYSE-150 细胞的抑制率见图 21；对 Hela 细胞的抑制率见图 22；对 MCF7 细胞的抑制率见图 23；对 HCT116 细胞的抑制率见图 24；对 U87-MG 细胞的抑制率见图 25；

结果表明：rLosata(F)-DR5、rLosata(F)-TRAIL、rLosata(F)-hIL2、rLosata(F)-P53、rLosata(F)-PD1、rLosata(F)-CD、rLosata(F)-mIL12、rLosata(F)-DR5-TRAIL、rLosata(F)-mIL12-hIL2、rLosata(F)-P53-hIL2 和 rLosata(F)-PD1-hIL2 均对以上细胞具有抑制效果，且对 HCCLM3、SK-MEL5、FTC133、786-O、U87-MG 和 HT1080 的抑制率强于 A549、ASPC-1、KYSE-150、Hela、MCF7 和 HCT116，而且，不同的毒株对于 A549、ASPC-1、KYSE-150、Hela、MCF7 和 HCT116 的细胞毒性不完全一致。在这 12 种肿瘤细胞中，rLosata(F)-DR5、rLosata(F)-TRAIL 和 rLosata(F)-DR5-TRAIL 对 Hela 细胞的抑制率较高，rLosata(F)-P53 和 rLosata(F)-P53-hIL2 对 A549 和 ASPC-1 细胞的抑制率较高，rLosata(F)-hIL2、rLosata(F)-mIL12 和 rLosata(F)-mIL12-hIL2 对 A549、KYSE-150、Hela 细胞的抑制率较高，rLosata(F)-CD 对 A549 细胞的抑制率较高，rLosata(F)-PD1 和 rLosata(F)-PD1-hIL2 对 A549、MCF7 和 HCT116 细胞的抑制率较高。

实施例 8、表达外源基因的重组嵌合病毒对肿瘤的治疗作用

1、根据实施例 6 中所述的方法建立 Balb/c 小鼠 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠。

2、重组嵌合病毒对肿瘤的治疗作用

将模型小鼠随机分为 13 组，每组 10 只，分别处理如下：

rLosata(F)-DR5 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-DR5 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；
rLosata(F)-TRAIL 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-TRAIL 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；
rLosata(F)-hIL2 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-hIL2 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；
rLosata(F)-P53 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-P53 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；
rLosata(F)-PD1 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-PD1 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；
rLosata(F)-CD 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-CD 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；
rLosata(F)-mIL12 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-mIL12 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；

rLosata(F)-DR5-TRAIL 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-DR5-TRAIL 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；

rLosata(F)-mIL12-hIL2 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-mIL12-hIL2 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；

rLosata(F)-P53-hIL2 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-P53-hIL2 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；

rLosata(F)-PD1-hIL2 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 实施例 1 制备的 rLosata(F)-PD1-hIL2 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；

rLosata-F 组：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL rLosata 病毒液（含 5×10^7 pfu 病毒），治疗 21 天；

尿囊液组（Model）：每天向模型小鼠的瘤内注射 0.1mL 尿囊液，治疗 21 天。

隔天测量肿瘤体积，治疗结束后，杀鼠，剥瘤，测量肿瘤重量（结果如表 2）。结果表明，与尿囊液组相比，rLosata-F 和表达外源基因的重组嵌合病毒均对肿瘤有显著的抑制效果，rLosata(F)-DR5、rLosata(F)-TRAIL、rLosata(F)-CD 的抗肿瘤效果高于 rLosata-F 组，差异不显著；rLosata(F)-P53 和 rLosata(F)-mIL12 的抗肿瘤效果显著高于 rLosata-F 治疗组；rLosata(F)-hIL2 和 rLosata(F)-PD1 的抗肿瘤效果相较于 rLosata-F 组差异极显著。而对于双基因治疗组，相比于单基因治疗，对肿瘤的抑制效果进一步增强，其中 rLosata(F)-mIL12-hIL2 和 rLosata(F)-PD1-hIL2 治疗组的效果最佳，治疗结束后个别小鼠的肿瘤几乎消退。

表 2 表达外源基因的重组嵌合病毒治疗结束后平均体积和肿瘤重量

	治疗前平均体积	治疗结束后平均体积	治疗结束后肿瘤平均瘤重
Model	119.86mm ³	2086.74mm ³	1.43g
rLosata-F	142.58mm ³	1352.75mm ³	1.05g
rLosata(F)-DR5	156.98mm ³	898.80mm ³	0.96g
rLosata(F)-TRAIL	106.97mm ³	859.95mm ³	0.82g
rLosata(F)-hIL2	156.61mm ³	412.25mm ³	0.42g
rLosata(F)-P53	115.59mm ³	618.95mm ³	0.74g
rLosata(F)-PD1	123.55mm ³	429.5mm ³	0.56g
rLosata(F)-CD	107.38mm ³	986.08mm ³	0.94g
rLosata(F)-mIL12	125.63mm ³	583.95mm ³	0.79g
rLosata(F)-DR5-TRAIL	116.88mm ³	479.13mm ³	0.39g
rLosata(F)-mIL12-hIL2	133.55mm ³	320.46mm ³	0.19g
rLosata(F)-P53-hIL2	135.61mm ³	401.46mm ³	0.28g
rLosata(F)-PD1-hIL2	117.43mm ³	359.53mm ³	0.21g

实施例 9、插入外源基因的重组嵌合病毒安全性检测

选用健康 6 周 SPF 级 Balb/c 小白鼠分组，每组 10 只。对照组小鼠正常饲养。实验组小鼠每只腹腔注射 5×10^8 pfu（10 倍治疗剂量）重组嵌合病毒（rLosata(F)-DR5、rLosata(F)-TRAIL、rLosata(F)-hIL2、rLosata(F)-P53、rLosata(F)-PD1、rLosata(F)-CD、rLosata(F)-mIL12、rLosata(F)-DR5-TRAIL、rLosata(F)-mIL12-hIL2、rLosata(F)-P53-hIL2 或 rLosata(F)-PD1-hIL2）后观察 30 天。结果出现明显不良反应如精神萎靡，皮毛竖起及死亡者为阳性。观察结束后，取各组小鼠的血清，检测 AST、ALT 等相关指标。

结果显示：注射第 2 天时，实验组个别小鼠皮毛竖起，饮食饮水未受到影响。连续注射一个星期后，小鼠皮毛恢复正常，继续观察一个月，各实验组小鼠均未出现明显不良反应如精神萎靡，皮毛竖起，且无小鼠死亡。观察结束后，取各组小鼠的血清，采用 ELISA 方法检测 AST、ALT、BUN 和 CREA 等相关指标。结果显示：与正常小鼠相比，各实验组谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 活性以及血尿素氮 (BUN)、肌酐 (CREA) 的浓度略微升高，差异不显著。结果表明：嵌合病毒治疗不会引起肝肾损伤和严重的毒副作用。

最后应说明的是：显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例，而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之中。