



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107349226 B

(45)授权公告日 2020.08.25

(21)申请号 201710516707.1

(22)申请日 2014.08.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107349226 A

(43)申请公布日 2017.11.17

(62)分案原申请数据
201410425510.3 2014.08.26

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:V201423 2014.07.17

(73)专利权人 广州威溶特医药科技有限公司
地址 510663 广东省广州市科学城揽月路3
号广州国际企业孵化器G区G416-G428

(72)发明人 颜光美 肖晓 胡骏 李凯
梁剑开 林园 张海鹏

(74)专利代理机构 北京市万慧达律师事务所
11111

代理人 谢敏楠 王虎

(51)Int.Cl.
A61K 35/768(2015.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 102858959 A,2013.01.02
WO 0011201 A1,2000.03.02

审查员 李杏

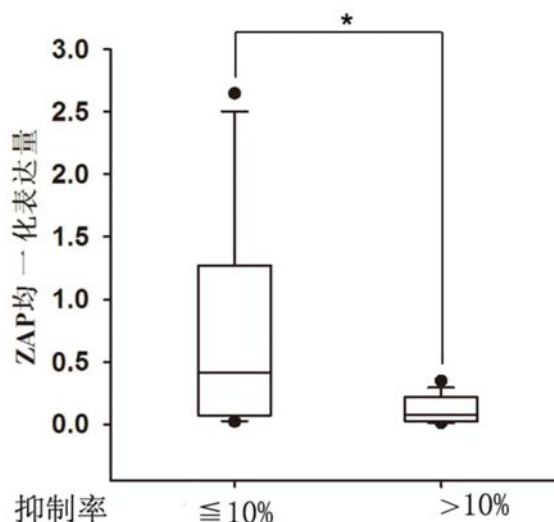
权利要求书1页 说明书16页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

甲病毒在制备抗肿瘤药物方面的应用

(57)摘要

本分案申请属于生物医药领域,涉及甲病毒在制备抗肿瘤药物方面的应用,所述的甲病毒为M1病毒或盖塔病毒。进一步地本发明确定了对上述甲病毒治疗敏感的特定肿瘤类型,从而为抗肿瘤用药方案提供了更为安全有效的解决方案。



1. 甲病毒在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在於所述的甲病毒为M1病毒;所述M1病毒的保藏编号:CCTCC V201423;所述的肿瘤为ZAP低表达肿瘤或ZAP阴性肿瘤。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在於所述的肿瘤为ZAP低表达的实体瘤或ZAP阴性的实体瘤。

3. 如权利要求1所述的应用,其特征在於所述的肿瘤为ZAP低表达或ZAP阴性的肝癌、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、胶质瘤、黑色素瘤、胰腺癌、鼻咽癌、肺癌或胃癌。

4. 如权利要求1所述的应用,其特征在於所述的药物为注射剂、片剂、胶囊或贴剂。

5. 如权利要求1所述的应用,其特征在於所述的药物为注射剂。

6. 一种抗肿瘤用药系统,其特征在於包括ZAP表达水平检测试剂,以及甲病毒;所述的甲病毒为M1病毒;所述M1病毒的保藏编号:CCTCC V201423。

7. 如权利要求6所述的系统,其特征在於所述的肿瘤为肝癌、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、胶质瘤、黑色素瘤、胰腺癌、鼻咽癌、肺癌或胃癌。

8. 如权利要求6所述的系统,其特征在於所述的肿瘤为ZAP低表达肿瘤或ZAP阴性肿瘤。

9. 如权利要求6所述的系统,其特征在於所述的肿瘤为ZAP低表达的实体瘤或ZAP阴性的实体瘤。

10. 如权利要求6所述的系统,其特征在於所述的肿瘤为ZAP低表达或ZAP阴性的肝癌、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、胶质瘤、黑色素瘤、胰腺癌、鼻咽癌、肺癌或胃癌。

11. 一种抗肿瘤药物,其特征在於包括甲M1病毒和ZAP抑制剂;所述甲病毒为M1病毒所述M1病毒的保藏编号:CCTCC V201423。

12. 如权利要求11所述的药物,其特征在於所述的ZAP抑制剂为肿瘤靶向ZAP抑制剂。

13. 如权利要求11所述的药物,其特征在於所述的肿瘤为肝癌、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、胶质瘤、黑色素瘤、胰腺癌、鼻咽癌、肺癌或胃癌。

14. 如权利要求11所述的药物,其特征在於所述的药物为注射剂、片剂、胶囊或贴剂。

15. 如权利要求11所述的药物,其特征在於所述的药物为注射剂。

16. ZAP抑制剂在制备甲M1病毒抗肿瘤增敏剂/耐药逆转剂方面的应用;所述甲病毒为M1病毒;所述M1病毒的保藏编号:CCTCC V201423。

17. 如权利要求16所述的应用,其特征在於所述的肿瘤为肝癌、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、胶质瘤、黑色素瘤、胰腺癌、鼻咽癌、肺癌或胃癌。

甲病毒在制备抗肿瘤药物方面的应用

[0001] 本申请为申请号201410425510.3、申请日2014.08.26、发明名称“甲病毒在制备抗肿瘤药物方面的应用”的中国发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于生物医药领域,涉及一种甲病毒在制备抗肿瘤药物方面的应用。

背景技术

[0003] 肿瘤源于正常细胞中基因和表观遗传学的积累变化,这种改变驱使正常细胞转变为恶性肿瘤。这个复杂病理变化过程决定了不同肿瘤在发生、维持以及转移中机制的多样性。目前,手术切除、化疗和放疗是临床治疗肿瘤常用的方法,然而手术切除肿瘤易复发,放、化疗毒副作用大。

[0004] 15~20%人类的癌症与病毒感染有关,如乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)与肝癌、人乳头瘤病毒(HPV)与宫颈癌等。

[0005] 甲病毒属病毒属于披膜病毒科,是一类有包膜结构的单正链RNA病毒,主要通过节肢动物作为传播媒介。29种甲病毒中有13种可引起人、畜疾病(David M.Knipe, Peter M.Howley, Chapter 23, Alphaviruses, Fields Virology 6th edition:651-685, 2013)。

[0006] 甲病毒委内瑞拉马脑炎病毒可作为载体转导树突细胞治疗肿瘤(Moran TP, Burgents JE, Long B, et al: Alphaviral vector-transduced dendritic cells are successful therapeutic vaccines against neu-overexpressing tumors in wild-type mice. Vaccine 25:6604-6612, 2007)。然而,这种病毒曾引起人类发热、抽搐、流产甚至死亡,因此选择性与安全性问题严重影响病毒在抗肿瘤治疗中的应用。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种安全有效的病毒抗肿瘤药物。

[0008] 本发明的进一步目的在于提供一种针对特定肿瘤类型的安全有效的病毒抗肿瘤药物。

[0009] 本发明的进一步目的在于针对特定的个体/肿瘤提供一种安全有效的病毒抗肿瘤药物。

[0010] 本发明的进一步目的在于提供一种有效的抗肿瘤用药系统及用药方法。

[0011] 本发明的进一步目的在于提供一种更为有效的抗肿瘤药物和肿瘤治疗方法。

[0012] 发明通过以下技术方案实现上述目的。

[0013] 发明提供了甲病毒在制备抗肿瘤药物中的应用,所述的甲病毒为M1病毒或盖塔病毒。

[0014] M1病毒(Alphavirus M1)属于甲病毒属(Alphavirus),于1964年从中国海南岛库蚊属(Culex)蚊虫中分离得到(Li XD, et al: Isolation of Getah virus from mosquitoes collected on Hainan Island, China, and results of a serosurvey. Southeast Asian

J Trop Med Public Health 23:730-734,1992.)。2008年M1病毒的全基因组序列被测定 (Zhai YG, et al: Complete sequence characterization of isolates of Getah virus (genus Alphavirus, family Togaviridae) from China. J Gen Virol 89:1446-1456, 2008.)。其获取方式可选但不限于通过上述文献方法获得, 或者通过以下保藏信息获得 (保藏编号: CCTCC V201423; 保藏时间: 2014年7月17日; 分类命名: Alphavirus M1; 保藏单位: 中国典型培养物保藏中心; 保藏地址: 湖北省武汉市武昌珞珈山武汉大学)。

[0015] 本发明研究者此前对M1病毒的研究结果表明, 其对一些肿瘤细胞具有杀伤作用, 例如对大鼠恶性胶质瘤细胞C6, 人恶性胶质瘤细胞U251和U-87; 然而, 对另外一些肿瘤细胞则不具备杀伤作用, 例如对人恶性胶质瘤细胞T98G。这些研究并不能确定M1病毒具备有效抗肿瘤效应。

[0016] 本发明进一步提供了该病毒所适用的肿瘤类型, 以提高M1病毒作为抗肿瘤药物时的治疗有效性。

[0017] 进一步优选地, 本发明以M1病毒作为抗肿瘤药物所适用的肿瘤类型包括肝癌、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、胶质瘤、黑色素瘤、胰腺癌、鼻咽癌、肺癌、胃癌中的一种或多种。

[0018] 发明人发现, M1病毒对各种肿瘤细胞引起不同程度的细胞死亡。M1病毒 (MOI=10) 处理肿瘤细胞48小时, 胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌和黑色素瘤细胞死亡率超过50%; 结直肠癌 (LoVo、HCT-8、SW620和SW480)、肝癌 (Hep3B、Huh-7和Huh-6)、膀胱癌和乳腺癌细胞死亡率超过40%; 胶质瘤、宫颈癌、肺癌细胞死亡率超过30%; 胃癌细胞死亡率超过20%。上述结果提示M1病毒作为抗肿瘤药物效果最显著的针对以下癌症类型: 胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌和黑色素瘤; 其次为: 结直肠癌、肝癌、膀胱癌和乳腺癌; 再其次为: 胶质瘤、宫颈癌、肺癌; 而最不显著的为胃癌。

[0019] 鉴于M1病毒属于盖塔相似病毒, 其与盖塔病毒同源性高达97.8%, 本领域技术人员有理由认可, 基于M1病毒的抗肿瘤效果, 盖塔病毒也可类似地与M1病毒起到相似的作用和效果。

[0020] 进一步地, 本发明提供了一种可以针对特定个体/肿瘤更为准确有效地给予治疗方案和治疗药物的方法, 以及针对特定个体/肿瘤相关的药物。

[0021] 发明人首次发现, 所述的病毒适合用于治疗ZAP低表达肿瘤或ZAP阴性肿瘤, 优选用于治疗ZAP低表达的实体瘤或ZAP阴性的实体瘤。

[0022] M1病毒治疗肿瘤的有效性, 与肿瘤ZAP表达调控密切相关。M1病毒的复制受到ZAP的抑制, 并且ZAP在多种肿瘤中低表达或阴性, M1病毒可选择性地治疗ZAP低表达或ZAP阴性的肿瘤/个体。

[0023] ZAP是锌指CCCH型抗病毒蛋白1缩写, 其英文名是Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1, 它由zc3hav1基因编码。文献报道细胞内ZAP通过诱导RNA降解和翻译抑制的机制来抑制某些病毒的复制, 比如埃博拉病毒和马尔堡病毒, 但ZAP对其他病毒复制无抑制作用, 例如水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒和黄热病病毒等。

[0024] 发明人发现M1病毒能够显著在ZAP低表达/ZAP阴性的细胞株中引起细胞死亡, M1病毒在荷瘤动物体内富集于ZAP低表达/ZAP阴性的肿瘤组织, 并抑制肿瘤生长, 同时M1病毒抑制ZAP低表达/ZAP阴性的人离体活肿瘤组织的存活。

[0025] 发明人首次发现在多个不同种类肿瘤中,ZAP的表达量在肿瘤组织中低于癌旁非瘤组织。临床多种肿瘤病理标本的免疫组化分析表明,在69%的肝癌、52%的结直肠癌和61%的膀胱癌组织中ZAP表达水平显著低于相对应的癌旁非瘤组织。M1病毒可用于选择性治疗ZAP低表达/ZAP阴性的肿瘤。

[0026] 发明人的实验结果首次证明M1病毒的复制受到ZAP抑制,ZAP表达水平是M1病毒选择性引起肿瘤细胞死亡和抑制肿瘤生长的决定因素。发明人的研究发现M1病毒抗肿瘤效果与ZAP的表达水平直接相关。发明人发现,敲低ZAP后的肿瘤细胞感染M1病毒,肿瘤细胞存活率较未敲低ZAP的细胞显著降低。因此,作为一种可选的优选治疗方案,可以在给予癌症患者M1病毒治疗时,同时或预先给予ZAP抑制剂,以提高肿瘤对M1病毒的敏感性。

[0027] 因此,为了进一步提高M1病毒作为抗肿瘤药物治疗的有效率,在治疗方案的选择中,可以首先判断患者肿瘤的ZAP表达情况,再针对性地给予M1病毒的治疗方案,以此来提高治疗方案的有效性,避免无效给药所造成的时间上的拖延和药物滥用。例如,在给药前先测定患者肿瘤ZAP表达情况,如果是ZAP低表达或ZAP阴性的肿瘤,可直接给以M1病毒治疗;如果是ZAP正常表达/ZAP高表达肿瘤,则可在M1病毒给药前或同时给予ZAP抑制剂(例如ZAP表达或功能抑制剂,ZAP干扰片段,或者ZAP抗体等),以提高肿瘤对M1病毒的敏感性,提高治疗有效性。肿瘤ZAP表达量的高低直接影响到M1治疗的有效性。ZAP表达量越低的肿瘤越有利于M1的治疗效果。判断某个体/肿瘤是否适于利用M1进行治疗,可先检测肿瘤ZAP的表达水平。判断ZAP表达水平高低可以优选但不限于以下方式:

[0028] ZAP低或高表达是指两组(个)样本之间ZAP mRNA或者蛋白质数量比较后得出的结论,如果一组(个)样本比另外一组(个)ZAP mRNA或者蛋白质数量少或多称为该样本ZAP低或高表达;ZAP阴性是指样本完全不表达ZAP mRNA或蛋白。用于ZAP mRNA和蛋白的数量比较的样本可以是肿瘤细胞和正常细胞、肿瘤组织与癌旁非瘤组织,或者M1治疗有效与无效的肿瘤。

[0029] 作为一种可选的方式,肿瘤的ZAP高、低或阴性表达均指肿瘤组织与相应癌旁非瘤组织比较,ZAP mRNA和蛋白的数量多、少或者无表达。若前者的ZAP的mRNA或蛋白均一化表达量比后者少(即肿瘤组织较癌旁非瘤组织的ZAP均一化表达量比值 <1),则属于ZAP低表达,适于利用M1进行治疗。更为有效的治疗对象为肿瘤组织较癌旁非瘤组织的ZAP均一化表达量比值 <0.8 的肿瘤,更优选 <0.6 ,更优选 <0.4 ,更优选 <0.3 ,更优选 <0.2 ,更优选 <0.1 ,最为优选的,是肿瘤组织ZAP阴性。这些肿瘤组织与相应癌旁非瘤组织包括但不限于病理穿刺手术或外科切除手术来源组织样本。临床调查发现,在有些肿瘤组织中ZAP表达量甚至高于癌旁非瘤组织,这些肿瘤或肿瘤患者将不适宜直接利用M1进行治疗。

[0030] ZAP mRNA或蛋白检测方法包括但不限于QRT-PCR、Northern Blot、Western Blot、免疫组织化学、ELISA等。为准确判定不同样本之间ZAP mRNA或蛋白数量的差异,首先计算出每一个样本ZAP mRNA或蛋白的均一化表达量。均一化表达量是指每个样本的ZAP mRNA或蛋白值和样本内参ZAP mRNA或蛋白平相除,进行均一化处理得出该样本ZAP均一化表达量。在不同检测方法中内参可以不同,其共同特征是在不同细胞或组织样本中内参表达量一致,这样经过均一化处理的不同样本的ZAP表达量才具备可比性,用于判断样本之间ZAP mRNA或蛋白的数量差异。

[0031] 在本发明的一个示例性实施例中(图4),M1病毒对人离体培养的活肝癌组织和结

直肠癌组织具有不同的抑制生长效果(表2和表3),肿瘤生长抑制率超过10%的样本合计达到32例,而肿瘤生长抑制率小于等于10%的19例。进一步通过QRT-PCR方法分析这两组每个肿瘤组织中ZAP和内参mRNA的表达水平(各自 2^{-Ct} 值),用每个样本的 $2^{-Ct-ZAP}$ 除以 $2^{-Ct-内参}$ 获得各自ZAP均一化表达量。对上述两组样本的ZAP均一化表达量统计分析发现,抑制率超过10%样品组的ZAP均一化表达量为 0.117 ± 0.890 ,低于抑制率小于等于10%组(0.791 ± 0.108),二者均数比值为0.148。

[0032] 作为另一种可选的方式,肿瘤的ZAP高、低或阴性表达指肿瘤细胞(例如来源于肿瘤患者的培养肿瘤细胞)与正常细胞比较,ZAP mRNA和蛋白质的数量多、少或者无表达。若前者的ZAP的mRNA或蛋白质均一化表达量比后者少(即肿瘤细胞较正常细胞的ZAP均一化表达量比值 <1),则属于ZAP低表达,适于利用M1进行治疗。更为有效的治疗对象为肿瘤细胞较正常细胞的ZAP均一化表达量比值 <0.8 的肿瘤,更优选 <0.6 ,更优选 <0.4 ,更优选 <0.3 ,更优选 <0.2 ,更优选 <0.1 ,最为优选的,是肿瘤细胞ZAP阴性。

[0033] 在本发明的一个示例性实施例中(图3c),运用Western Blot方法测定HepG2肝癌细胞细胞株和L-02正常肝细胞株ZAP蛋白表达水平差异,同时测定作为不同样本之间表达量一致的标准参照 β -actin,Western blot检测条带灰度代表被检测分子数量,ZAP均一化蛋白表达量=ZAP条带灰度平均值/ β -actin条带灰度平均值。HepG2的ZAP均一化蛋白表达量与L-02的比值为0.8,ZAP在Hep G2低表达。在感染M1病毒后,Hep G2细胞存活率只有 $70.4\% \pm 3.5\%$,而同样处理的L-02存活率达 $100.3 \pm 10.0\%$,二者存活率差异具备统计学意义。

[0034] 在另一个示例性实施例中(图3a和图3b),肿瘤细胞株T24、SCaBER、LoVo和Hep3B的ZAP无论mRNA(图3a)还是蛋白质(图3b)在通过QRT-PCR和Western blot检测后,分别与各自内参比较后的均一化表达量为未检出或接近于0(<0.1),即ZAP表达阴性或接近阴性(<0.1);M1感染后这些肿瘤细胞后引起细胞死亡,细胞存活率显著下降到T24 21.1% 、SCaBER 11.5% 、LoVo 6.9% 和Hep3B 3.8% (表1)。而图3a和图3b中的正常细胞L-02和HEB中ZAP无论mRNA(图3a)还是蛋白质的均一化表达量与上述肿瘤细胞的比值大于1,属于ZAP高表达,在M1感染后没有引起这些正常细胞存活率明显下降,L-02为 100.3% ,HEB 98.8% (表1)。

[0035] 由此,发明同时提供了一种抗肿瘤用药系统,其特征包括ZAP表达水平检测试剂,以及甲病毒;所述的甲病毒为M1病毒或盖塔病毒。通过先检测患者肿瘤的ZAP表达水平,再针对性地采取合适的给药方案。

[0036] 同时,发明还提供了一种抗肿瘤药物,其包括甲病毒和ZAP抑制剂;所述甲病毒为M1病毒或盖塔病毒。所述的ZAP抑制剂为ZAP表达或功能抑制剂、ZAP干扰片段或者ZAP抗体等。

[0037] 为了避免M1病毒同时对正常细胞的杀伤作用,优选地,所给予的ZAP抑制剂针对性地给予或靶向于肿瘤组织,为肿瘤靶向性ZAP抑制剂。

[0038] 作为可选的实施方案,本发明所提供的抗肿瘤药物可以是注射剂、片剂、胶囊、贴剂等。作为优选的实施方案,本发明的抗肿瘤药物是注射剂;优选地,可采用静脉注射。

[0039] 作为可选的给药方式,本发明M1病毒可以通过静脉或瘤内注射方式给药。瘤内注射方式每天给予 2×10^5 PFU/kg $\sim 2 \times 10^9$ PFU/kg;以静脉注射的方式每天给予 2×10^6 PFU/kg $\sim 2 \times 10^{10}$ PFU/kg。与溶剂对照组相比,M1病毒组显著抑制了肿瘤的生长。

[0040] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0041] 本发明所提供的抗肿瘤药物,可用于治疗多种肿瘤,包括肝癌、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、胶质瘤、黑色素瘤、胰腺癌、鼻咽癌、肺癌、胃癌。细胞学实验证明M1病毒引起多种肿瘤细胞的死亡;动物实验证明M1病毒在体内显著抑制肝癌、结直肠癌的生长;在人离体活肿瘤组织培养实验证明M1病毒显著抑制肝癌、结直肠癌组织存活。

[0042] 本发明所提供的抗肿瘤药物,可优先的治疗ZAP低表达/ZAP阴性肿瘤,包括但不限于肝癌、结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、胶质瘤、黑色素瘤、胰腺癌、鼻咽癌、肺癌、胃癌。

[0043] 本发明所提供的抗肿瘤药物,具有选择性抗肿瘤作用,安全性良好。M1病毒能选择性引起肿瘤细胞死亡,而对正常细胞的存活无影响,表明M1病毒具有肿瘤细胞选择性;在荷瘤裸鼠体内,经尾静脉注射的M1病毒能高度富集于肿瘤组织,而在正常组织内病毒量较低,二者病毒量相差约 $10^2\sim 10^6$ 倍,进一步阐明了M1病毒的肿瘤选择性。同时给予M1病毒并不影响裸鼠体重和精神状态,表明M1病毒安全性良好。

[0044] 本发明首次针对特定的个体/肿瘤提供安全有效的病毒抗肿瘤药物。本发明药物选择性地治疗ZAP低表达/ZAP阴性的肿瘤,由此提高了用药有效率,防止无效给药和药物滥用。

[0045] 本发明提供了更为有效的用药方法和用药系统,通过先检测患者肿瘤的ZAP表达水平,再针对性地给予药物治疗,或者辅以其他手段给予治疗,可以提高M1病毒的治疗针对性和有效性。

[0046] 本发明提供了更为有效的抗肿瘤药物和肿瘤治疗方法,在给药前或给药同时,辅以ZAP抑制剂,从而可以提高了肿瘤对药物的敏感性。

附图说明

[0047] 图1 M1病毒显著引起肿瘤细胞病变效应;

[0048] a) M1病毒感染引起肿瘤细胞形态学病变;

[0049] b) M1病毒感染对正常细胞株形态学没有影响,Control表示OptiPRO™SFM培养基对照组,M1表示M1病毒感染实验组。

[0050] 图2 M1病毒有效抑制荷瘤鼠肿瘤生长;

[0051] a) M1病毒瘤内注射后对Hep3B荷瘤鼠肿瘤体积与动物体重的影响,M1表示M1病毒处理组,溶剂表示OptiPRO™SFM培养基溶剂对照组,n=9;

[0052] b) M1病毒瘤内注射后对LoVo荷瘤鼠肿瘤体积与动物体重的影响,n=11;

[0053] c) M1病毒静脉注射后对Hep3B荷瘤鼠肿瘤体积与动物体重的影响,n=9;

[0054] d) QRT-PCR检测静脉注射M1病毒后在Hep3B荷瘤鼠的组织分布,n=6;

[0055] 肿瘤体积与体重数据以平均值±标准差表示,ANOVA法统计;箭头表示M1病毒处理组,圆圈表示OptiPRO™SFM培养基对照组,ns表示无统计学差异;i.t表示瘤内注射,i.v表示静脉注射;*表示未检测到M1病毒的mRNA表达。

[0056] 图3 M1病毒选择性引起ZAP低表达/ZAP阴性肿瘤细胞死亡;

[0057] a) ZAP mRNA表达量在不同细胞中的差异表达;ND表示未检测到ZAP的mRNA表达;

[0058] b) ZAP的蛋白表达量在不同细胞中的差异表达; β -actin是内参;

[0059] c) 细胞ZAP蛋白水平与M1病毒感染引起的细胞存活率改变。 β -actin是内参, students' t检验统计分析, ** $P < 0.01$;

[0060] d) M1病毒显著引起敲低ZAP水平后的正常细胞L-02、肿瘤细胞PLC和HCT116死亡。空心圆/空心三角/空心倒三角表示干扰敲低ZAP, 实心圆/实心三角/实心倒三角表示乱码干扰阴性对照, 采用students' t检验统计分析, */#/&表示 $P < 0.05$, &&表示 $P < 0.01$, ns表示无统计学差异;

[0061] e) 在敲低ZAP的正常细胞L-02、肿瘤细胞PLC和HCT116中M1病毒相对滴度增加, 采用students' t检验统计分析, *表示 $P < 0.05$;

[0062] f) 在敲低ZAP的正常细胞L-02、肿瘤细胞PLC和HCT116中M1病毒RNA表达增加, 采用students' t检验统计分析, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$;

[0063] g) 在敲低ZAP的正常细胞L-02、肿瘤细胞PLC和HCT116中M1病毒蛋白NS3, E1表达增加, GAPDH作为内参;

[0064] h) 过表达ZAP部分阻断由M1病毒引起的肿瘤细胞死亡, 采用students' t检验统计分析, #表示 $P < 0.05$, ns表示无统计学差异;

[0065] i) 过表达ZAP的肿瘤细胞中病毒M1病毒相对滴度减少, 采用students' t检验统计分析, **表示 $P < 0.01$;

[0066] j) 过表达ZAP的肿瘤细胞中病毒M1病毒的RNA减少, 采用students' t检验统计分析, **表示 $P < 0.01$;

[0067] k) 过表达ZAP的肿瘤细胞中, M1病毒的蛋白NS3, E1表达增加, β -actin作为内参。

[0068] 图4 M1病毒对人离体活肿瘤组织抑制率与ZAP mRNA表达水平负相关;

[0069] QRT-PCR检测ZAP的mRNA表达, 比较M1病毒无效组(抑制率 $\leq 10\%$)与M1病毒有效组(抑制率 $> 10\%$) ZAP相对表达量的差别, M1病毒处理抑制率小于等于10%的肿瘤组织ZAP均一化表达量中位数是0.414, 大于10%的肿瘤组织ZAP表达量中位数为0.075。采用秩和检验统计分析, $P < 0.05$ 。

[0070] 图5 ZAP在多种肿瘤临床病理组织中低表达;

[0071] a) 免疫组化染色检测临床肿瘤病理组织中ZAP的表达情况, N: 癌旁非瘤组, T: 肿瘤组;

[0072] b) 在多种肿瘤临床病理组织中, 肿瘤组ZAP表达显著低于癌旁非瘤组, N: 癌旁非瘤组, T: 肿瘤组; N与T秩和检验进行统计分析, *** $P < 0.001$;

[0073] c) 在多种肿瘤临床病理组织中, 肿瘤组织ZAP表达低于癌旁非瘤组织的病例比率。

具体实施方式

[0074] 以下实施方式是对本发明作进一步说明, 但本发明的实施方式不局限于以下的实施例介绍, 凡依照本发明的原理或理念所作的等同的变化或变通都应视为本发明保护的范畴。

[0075] 在没有特别指明的情况下, 本发明采用的材料及实验方法为常规材料及方法。

[0076] 实施例1 M1病毒选择性引起肿瘤细胞死亡

[0077] 1) M1病毒显著引起肿瘤细胞形态学病变

[0078] 材料:

[0079] 肝细胞癌Hep3B、人膀胱移行细胞癌T24、人结直肠癌LoVo,人永生化正常肝细胞株L-02,M1病毒,高糖DMEM培养基,F-12培养基,倒置相差显微镜。

[0080] 方法:

[0081] a) 细胞的培养:人肝细胞癌细胞株Hep3B细胞株,人膀胱移行上皮细胞癌细胞株T24,人永生化正常肝细胞株L-02,生长在含10%FBS、100U/ml青霉素及0.1mg/ml链霉素的DMEM完全培养基中;人结直肠癌细胞株LoVo生长在含10%FBS、100U/ml青霉素及0.1mg/ml链霉素的F-12完全培养基中。所有细胞株均置于5%CO₂,37℃恒温密闭式孵箱(相对湿度95%)内培养传代,倒置显微镜观察生长情况。大约2~3天传代一次,取处于对数生长期的细胞用于正式实验。

[0082] b) 细胞显微镜下观察:选择对数生长期细胞,DMEM或F-12完全培养液(含10%胎牛血清、1%双抗)制成细胞悬液,细胞以 2.5×10^4 /孔的密度接种在24孔培养板内。用M1病毒(MOI=1)感染48小时后,在倒置相差显微镜下观察细胞形态学的变化。

[0083] 结果:

[0084] 相差显微镜下观察细胞形态,Hep3B细胞,T24细胞和LoVo细胞均是单层贴壁生长,并且细胞紧密排列,表型一致。而M1病毒(MOI=1)处理48h后,细胞的形态发生了明显改变,较对照组细胞,感染病毒组细胞数目明显减少,胞体收缩成球状,折光率明显增强,呈死亡病变样,如图1a。如图1b显示了M1病毒感染对正常细胞的影响,采用同样滴度的M1病毒感染L-02细胞,没有发现细胞数目,形态有明显的变化。结果表明M1病毒对肿瘤细胞有选择性引起细胞死亡,而对正常细胞存活没有影响。

[0085] 2) M1病毒选择性地降低肿瘤细胞株存活

[0086] 材料:

[0087] 34株肿瘤细胞株(见表1)、3株人永生化正常细胞株(见表1)、M1病毒、高糖DMEM培养基、F-12培养基、MTT(四甲基偶氮唑蓝)。

[0088] 方法:

[0089] a) 接种细胞、给药处理:选择对数生长期细胞,DMEM(或F-12)完全培养液(含10%胎牛血清、1%双抗)制成细胞悬液,以每孔 4×10^3 /孔的密度接种在96孔培养板内。12小时后见细胞完全贴壁,实验分实验组和对照组,实验组:M1病毒(MOI=10)感染细胞;对照组:高糖DMEM溶剂对照组,两组均设5个复孔。

[0090] b) MTT与细胞内的琥珀酸脱氢酶反应:培养至48h时,每孔加入MTT 15 μ l(5mg/ml),继续孵育4小时,此时镜检可观察到、活细胞内形成的颗粒状蓝紫色甲臞结晶。

[0091] c) 溶解甲臞颗粒:小心吸去上清,加DMSO 100 μ l/孔溶解形成的结晶,在微型振荡器上震荡5min,然后在酶联检测仪上用波长570nm检测各孔的光密度(OD值)。每组实验重复3次。细胞存活率=药物处理组OD值/对照组OD值 $\times 100\%$ 。

[0092] 结果:

[0093] 如表1所示,M1病毒(MOI=10)处理肿瘤细胞48小时,胰腺癌、鼻咽癌、前列腺癌和黑色素瘤细胞死亡率超过50%;结直肠癌(LoVo、HCT-8、SW620和SW480)、肝癌(Hep3B、Huh-7和Huh-6)、膀胱癌和乳腺癌细胞死亡率超过40%;胶质瘤、宫颈癌、肺癌细胞死亡率超过30%;胃癌细胞死亡率超过20%。而3株正常细胞(L-02、HEB和SV-HUC-1)以及PLC和HCT116细胞存活率没有统计学显著变化。结果表明M1病毒感染选择性引起大部分肿瘤细胞死亡。

[0094] 表1.M1病毒显著降低肿瘤细胞存活率

[0095]	细胞株	来源	存活率 (%)	统计学意义
--------	-----	----	---------	-------

	Hep3B	肝癌	3.8	-
	Huh-7	肝癌	52.2±10.0	**
	Huh-6	肝癌	59.0±8.9	**
	Hep G2	肝癌	70.4±3.5	*
	PLC	肝癌	80.5	-
	HCT116	肝癌	81.3±4.3	ns
	LoVo	结直肠癌	6.9	-
	HCT-8	结直肠癌	35.4±5.2	**
	SW620	结直肠腺癌	43.7±6.7	**
	SW480	结直肠癌	53.8±8.4	**
	SCaBER	膀胱癌	11.5±4.4	**
	T24	膀胱癌	21.1±3.8	**
	UM-UC-3	膀胱癌	39.8±19.6	**
	5637	膀胱癌	50.2±19.0	**
[0096]	Capan-1	胰腺癌	40.4±10.1	**
	PANC-1	胰腺癌	49.3±16.3	**
	SW1990	胰腺癌	45.6±16.9	**
	MIA PaCa-2	胰腺癌	49.1±13.2	**
	U-87 MG	恶性胶质瘤	32.4	-
	U-251	恶性胶质瘤	34.7±4.9	**
	T98G	多型性胶质母细胞瘤	38.2	-
	U-138 MG	恶性胶质瘤	40.1	-
	MGR2	胶质瘤	63.2	-
	MDA-MB-468	乳腺癌	43.7±10.1	**
	MDA-MB-231	乳腺癌	58.9±2.7	**
	C-33 A	宫颈癌	14.8±1.8	**
	HeLa	宫颈癌	66	-
	22Rv1	前列腺癌	39.1	-
	CNE-2	鼻咽癌	24.5	-
	CNE-1	鼻咽癌	48.2	-

	A-375	黑色素瘤	47.3±19.2	*
	A549	肺癌	68.2	-
	NCI-N87	胃癌	76.4±9.3	*
[0097]	HGC-27	胃癌	79.2	-
	L-02	正常肝细胞	100.3±10.0	ns
	HEB	胶质细胞	98.8	-
	SV-HUC-1	输尿管上皮永生化细胞	97.2	-

[0098] (附:**p<0.01,*p<0.05,ns:差异不具有统计学意义,统计方法:students' t检验,-:未统计。)

[0099] 实施例2 M1病毒选择性有效抑制肿瘤生长

[0100] 1) 在荷瘤鼠体内M1病毒有效抑制肿瘤生长

[0101] 材料:

[0102] M1病毒、人肝癌细胞株Hep3B、人结直肠癌细胞株LoVo、58只4周龄雌性BALB/c裸鼠

[0103] 方法:

[0104] a) 荷瘤鼠模型建立:将 5×10^6 Hep3B或者LoVo细胞注入到4周龄BALB/c裸鼠背侧皮下。

[0105] b) 瘤内给药:当Hep3B肿瘤体积达到约 50mm^3 或LoVo肿瘤体积达到约 70mm^3 时,开始瘤内注射给药,12天内共注射6次(2×10^6 PFU/次)M1病毒,OptiPROTMSFM培养基注射为溶剂对照组。每两天测量肿瘤的长宽和体重,肿瘤的面积依据公式:长 \times 宽²/2。

[0106] c) 静脉给药:当Hep3B细胞肿瘤体积达到约 50mm^3 时,静脉注射M1病毒(3×10^7 PFU/次),隔三天后,接受第二次静脉注射。OptiPROTMSFM培养基注射为溶剂对照组。每三天测量体重和肿瘤的长宽,肿瘤的面积依据公式:长 \times 宽²/2。

[0107] 结果:

[0108] 在BALB/c裸鼠上建立了皮下荷瘤Hep3B(图2a和2c)和LoVo(图2b)裸鼠模型后,连续多次瘤内(图2a和图2b)或静脉注射(图2c)给予M1病毒,观察裸鼠肿瘤体积与动物体重变化状况。在Hep3B裸鼠模型中,采用瘤内注射给药方式如图2a,第20天终止实验,溶剂对照组肿瘤体积平均值为 $0.368 \pm 0.051\text{cm}^3$,M1病毒组肿瘤体积平均值为 $0.172 \pm 0.058\text{cm}^3$,统计表明M1病毒显著抑制Hep3B荷瘤鼠肿瘤生长,并且M1病毒组裸鼠平均体重($16.4 \pm 1.54\text{g}$)与对照组裸鼠平均体重($17.0 \pm 1.16\text{g}$)比较无显著差异,且精神状态良好,表明M1病毒安全性良好;在LoVo裸鼠模型中,采用瘤内给药方式如图2b,第24天终止实验,对照组肿瘤体积平均值为 $0.546 \pm 0.087\text{cm}^3$,M1病毒组肿瘤体积平均值为 $0.389 \pm 0.049\text{cm}^3$,统计表明M1病毒显著抑制LoVo荷瘤鼠肿瘤生长,并且M1病毒组裸鼠平均体重($18.9 \pm 1.40\text{g}$)与对照组裸鼠平均体重($19.4 \pm 1.86\text{g}$)相比,无显著差异,且精神状态良好,表明M1病毒安全性良好;在Hep3B裸鼠模型中,采用静脉注射给药方式如图2c,第21天终止实验,对照组肿瘤平均体积为 $0.247 \pm 0.067\text{cm}^3$,M1病毒组肿瘤平均体积为 $0.134 \pm 0.057\text{cm}^3$,统计表明M1病毒显著抑制Hep3B荷瘤鼠肿瘤生长,并且M1病毒组裸鼠平均体重($17.2 \pm 2.50\text{g}$)与对照组平均裸鼠体重($17.5 \pm 2.16\text{g}$)相比,无显著差异,且精神状态良好,表明M1病毒安全性良好;

[0109] 2) M1病毒选择性的富集于肿瘤组织

[0110] 材料:

[0111] 24只4周龄雌性BALB/c裸鼠、肝癌细胞株Hep3B、Trizol,组织匀浆机、实时荧光定量PCR仪

[0112] β -actin引物:

[0113] 正义链 (SEQ ID No.1:GATCATTGCTCCTCCTGAGC)

[0114] 反义链 (SEQ ID No.2:ACTCCTGCTTGCTGATCCAC)

[0115] M1病毒非结构蛋白NS1引物:

[0116] 正义链 (SEQ ID No.3:GTTCCAACAGGCGTCACCATC)

[0117] 反义链 (SEQ ID No.4:ACACATTCTTGTCTAGCACAGTCC)

[0118] 方法:

[0119] 向4周龄的裸鼠背侧皮下注入 5×10^6 Hep3B细胞。4天后,每只小鼠尾静脉注入M1病毒(3×10^7 PFU)。给药后分别与第1、2、3以及4天处死裸鼠,收集组织样品(包括肿瘤、心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉),并抽提组织RNA。然后,用QRT-PCR的方法检测M1病毒的量,以检测M1病毒非结构蛋白NS1代表M1病毒量,同时检测 β -actin内参,相对M1病毒RNA量按照公式计算: $2^{-(C_{t-NS1} - C_{t-内参})}$ 。 C_{t-NS1} 、 $C_{t-内参}$ 来自Applied Biosystems 7500Fast Real-Time PCR System仪器读数。

[0120] 结果:

[0121] 如图2d所示,在裸鼠皮下Hep3B肿瘤模型体中,在4个不同时间点上M1病毒在肿瘤组织内的数量超过其他器官组织 $10^2 \sim 10^6$ 倍以上,说明M1病毒选择性的富集于肿瘤组织。

[0122] 实施例3 M1病毒选择性引起ZAP低表达/ZAP阴性肿瘤细胞死亡

[0123] M1病毒选择性引起ZAP低表达的肿瘤细胞死亡,而对正常细胞无影响,ZAP的表达水平是M1病毒选择性的决定性因素。在正常细胞和ZAP正常表达/高表达的肿瘤细胞中通过干扰RNA,敲低ZAP的表达水平后,M1病毒能够显著的引起细胞死亡。同时,在低表达ZAP的肿瘤细胞中过表达ZAP能部分阻断由M1病毒引起的肿瘤细胞死亡。

[0124] 1) M1病毒不引起ZAP表达水平高的正常细胞和肿瘤细胞死亡

[0125] 材料:

[0126] M1病毒、人肝细胞L-02、人胶质细胞HEB、人膀胱癌细胞SCaBER及T24、人肝癌细胞株Hep3B和PLC、人肝癌细胞株Hep G2、人结直肠癌细胞株LoVo和HCT116;Western bolt:细胞总蛋白抽提液(M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent,Thermo)、ZAP抗体(Thermo,USA)、 β -actin抗体(Neomarker,USA);抽提RNA、PCR:RNA提取试剂Trizol、实时定量PCR仪Applied Biosystems 7500Fast Real-Time PCR System(Life,USA)、

[0127] ZAP引物:

[0128] ZAP正义链 (SEQ ID No.5:TCACGAACTCTCTGGACTGAA)

[0129] ZAP反义链 (SEQ ID No.6:ACTTTTGCATATCTCGGGCATAA)

[0130] β -actin引物同实施例2。

[0131] 方法:

[0132] 选择对数生长期细胞,DMEM或F-12完全培养液(含10%的胎牛血清、1%的双抗)制成细胞悬液,细胞以 2×10^5 /皿的密度接种在35mm皿内。提取RNA,PCR检测细胞中ZAP mRNA

表达量,本实验内参为 β -actin。ZAP mRNA均一化表达量计算按照公式进行:ZAP均一化mRNA表达量 $=2^{-(C_{t-ZAP}-C_{t-内参})}$ 。 C_{t-ZAP} 、 $C_{t-内参}$ 来自Applied Biosystems 7500Fast Real-Time PCR System仪器读数,表示PCR扩增过程中,荧光信号开始由本底进入指数增长阶段的阈值所对应的循环次数。

[0133] 抽提细胞总蛋白、定量,进行Western Blot实验(电泳、转膜、封闭、孵育一抗和二抗、显影)。通过成像仪软件Image Lab对ZAP和内参 β -actin条带灰度扫描,检测条带灰度,计算ZAP均一化蛋白表达量按照以下公式进行:ZAP均一化蛋白表达量=ZAP条带灰度/内参条带灰度。试验重复3次,取平均值计算ZAP均一化蛋白表达量。

[0134] 结果:

[0135] 如图3a和3b所示,ZAP在肿瘤细胞SCaBER、T24、Hep3B和LoVo中mRNA(图3a)和蛋白(图3b)均一化表达量几乎检测不到,显著低于正常细胞(L-02和HEB)以及肿瘤细胞(PLC、HCT116)。

[0136] M1病毒引起ZAP低表达/阴性的肿瘤细胞死亡,但不导致ZAP高表达的细胞死亡。正常细胞(L-02和HEB)和部分肿瘤细胞(PLC、HCT116)在感染M1病毒后存活率没有统计学意义的改变,L-02为100.3%,HEB 98.8%(表1)。而肿瘤细胞SCaBER、T24、Hep3B和LoVo在感染M1病毒后,细胞存活率显著下降到T24 21.1%、SCaBER 11.5%、LoVo 6.9%和Hep3B 3.8%(表1)。

[0137] 如图3c和表1所示,Hep G2肝癌细胞ZAP蛋白均一化表达量低于L-02正常细胞,比值为0.8。L-02细胞感染M1病毒后存活率并无明显改变,而Hep G2细胞在感染M1病毒后存活率降低到70.4%,二者具有统计学差异。这进一步说明M1病毒选择性导致ZAP低表达的肿瘤细胞死亡。

[0138] 2) M1病毒显著引起敲低ZAP水平后的正常细胞和肿瘤细胞死亡

[0139] 材料:

[0140] M1病毒、人肝细胞L-02、人肝癌细胞PLC、人结直肠癌细胞HCT116、ZAP RNA干扰片段、MTT(甲基偶氮唑蓝)、LipofectamineTMRNAiMAX(invertrogen,USA) Western bolt:细胞总蛋白抽提液(M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent,Thermo)、ZAP抗体(Thermo,USA)、M1病毒NS3抗体(Beijing Protein Innovation)、M1病毒E1抗体(Beijing Protein Innovation)、GAPDH抗体(CST,USA);抽提RNA、PCR:Trizol、实时定量PCR仪(Applied Biosystems 7500Fast Real-Time PCR System)、 β -actin、M1病毒非结构蛋白NS1引物同实施例2:

[0141] ZAP干扰片段(Si RNA)设计针对靶序列SEQ ID No.7:5' CCAAGAGTAGCACTTGTTA3'

[0142] Si RNA正义链(SEQ ID No.8:5' CCAAGAGUAGCACUUGUUA dTdT 3')

[0143] Si RNA反义链(SEQ ID No.9:3' dTdT GGUUCUCAUCGUGAACAAU 5')

[0144] ZAP乱码干扰片段对照(siNC):正义链和反义链的核苷酸比例与Si RNA片段一样但是排列顺序完全随机。

[0145] 方法:

[0146] 选择对数生长期细胞,DMEM完全培养液(10%胎牛血清、1%双抗)制成细胞悬液,细胞以 1×10^5 /孔的密度接种在6孔板内。24小时后,加入RNAiMAX包裹的Si RNA片段。48小时后,感染M1病毒。感染48小时后,处理样本。

[0147] 每孔加入MTT 20 μ l (5mg/ml), 4小时后检测吸光度值, 计算细胞存活率, siZAP实验组以ZAP RNA干扰片段处理, siNC对照组以ZAP乱码干扰片段处理。

[0148] a) 收集细胞上清液, 用TCID50的方法检测病毒滴度。

[0149] b) 抽提RNA样本, PCR, 通过检查M1病毒非结构蛋白NS1量来检测M1病毒量, β -actin为内参。

[0150] c) 抽提蛋白质样本, Western blot检测ZAP蛋白表达和M1病毒蛋白NS3和E1, 内参是GAPDH, ZAP均一化表达量计算除内参GAPDH代替 β -actin外, 其他同实施例3之1)。

[0151] d) 试验重复3次, 数据以平均值 \pm 标准差表示; 与各自对照组比较进行students' t检验统计, */#/&表示 $P < 0.05$, **/&&表示 $P < 0.01$, ns表示无统计学差异。

[0152] 结果:

[0153] 如图3d-3g所示, 以ZAP RNA干扰片段处理人正常肝细胞L-02、人肝癌细胞PLC和人结直肠癌细胞HCT116后, ZAP蛋白表达量显著下降至检测不到(图3g), 而M1病毒蛋白NS3和E1蛋白明显增加; 在感染M1病毒(MOI=100)后, 显著引起敲低ZAP水平后的L-02细胞(siZAP组)存活率降低为 $69.7\% \pm 3.45\%$, PLC细胞存活率降低为 $63.9\% \pm 11.5\%$, HCT116细胞存活率降低为 $49.6\% \pm 1.21\%$ (图3d); 如图3e所示, 在感染M1病毒48小时后敲低ZAP(siZAP组)的L-02细胞中相对M1病毒滴度为相应siNC组的 4.10 ± 1.38 倍, HCT116细胞(siZAP组)为相应siNC组的 3.39 ± 1.27 倍, PLC细胞(siZAP组)为相应siNC组的 32.6 ± 2.34 倍。同时如图3f所示, 在感染M1病毒48小时后敲低ZAP(siZAP组), 的L-02细胞中M1病毒RNA表达量是相应siNC组的 16.3 ± 8.20 倍, HCT116细胞中是相应siNC组的 8.82 ± 4.02 倍, PLC细胞中是相应siNC组的 30.5 ± 12.23 倍; 以上结果表明M1病毒显著引起敲低ZAP水平后的正常细胞和肿瘤细胞死亡。

[0154] 3) 过表达ZAP拮抗M1病毒引起的肿瘤细胞死亡

[0155] 材料:

[0156] M1病毒、人肝癌细胞Hep3B、表达GFP的pReceiver-M02-GFP质粒(空白对照质粒, 广州复能基因)、表达ZAP的pReceiver-M02-ZAP质粒(过表达ZAP质粒)、FuGENE HD转染试剂、MTT(甲基偶氮唑蓝)

[0157] 抽提RNA、PCR: Trizol、实时定量PCR仪(Applied Biosystems 7500Fast Real-Time PCR System)、 β -actin、M1病毒非结构蛋白NS1引物同实施例2。

[0158] Western bolt: 细胞总蛋白抽提液(M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo)、ZAP抗体(Thermo, USA)、M1病毒NS3抗体(Beijing Protein Innovation)、M1病毒E1抗体(Beijing Protein Innovation)、GAPDH抗体(CST, USA)。

[0159] 方法:

[0160] 选择对数生长期细胞, DMEM完全培养液(10%的胎牛血清、1%的双抗)调制成细胞悬液, 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种在6孔板内。24小时后, 分别转染过表达GFP对照质粒和过表达ZAP质粒, 获得表达绿色荧光蛋白的细胞和ZAP过表达的细胞。48小时后, 感染M1病毒。感染48小时后, 处理样本并检测:

[0161] a) MTT法检测细胞存活率, 每孔加入MTT 20 μ l (5mg/ml), 4小时后570nm波长检测吸光度值, 其他处理同实施例1。

[0162] b) 收集细胞上清液, 用TCID50的方法检测病毒滴度。

[0163] c) 抽提样品总RNA样本, QRT-PCR法检测M1病毒RNA表达量, 其计算按照实施例2方法进行。

[0164] d) 收集蛋白质样本, Western blot检测ZAP蛋白表达量和M1病毒蛋白NS3、E1蛋白表达量, 处理方法同实施例3之1)。

[0165] e) 每次试验均重复3次, 数据以平均值±标准差表示。与各自对照组比较, 采用students' t检验进行统计, #表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ns表示差异不具有统计学意义。

[0166] 结果:

[0167] 如图3k所示, 人肝癌细胞Hep3B转染了ZAP过表达质粒后, 通过Image Lab软件对不同样本的ZAP和内参 β -actin条带进行灰度扫描后计算各自ZAP均一化蛋白表达量。ZAP均一化蛋白表达量ZAP过表达组是 1.61 ± 0.05 , 过表达GFP对照组是 0.03 ± 0.01 , 均数前者是后者的53.7倍; M1病毒蛋白NS3和E1蛋白明显增加;

[0168] 如图3h所示, 过表达ZAP部分阻断M1病毒感染引起的Hep3B细胞死亡。使用不同M1病毒滴度感染后48小时, 当MOI=0.1时, 过表达ZAP组细胞存活率均数为 $74.7\% \pm 8.94\%$, 显著高于过表达GFP对照组细胞存活率($59.0\% \pm 6.27\%$); 当MOI=1时, 过表达ZAP组细胞存活率均数为 $69.4\% \pm 6.95\%$, 显著高于过表达GFP对照组存活率($51.4\% \pm 5.31\%$); 当MOI=10时, 过表达ZAP组细胞存活率均数为 $63.7\% \pm 6.04\%$, 显著高于过表达GFP对照组存活率($40.5\% \pm 3.19\%$);

[0169] 如图3i所示, 感染M1病毒后过表达ZAP的Hep3B细胞中M1相对病毒滴度是相应过表达GFP对照组的 $31.5 \pm 11.6\%$ 。同时, 感染M1病毒后过表达ZAP的Hep3B细胞中M1病毒RNA表达量是相应过表达GFP对照组的 $9.5 \pm 4.7\%$ 。

[0170] 实施例4 M1病毒抑制ZAP低表达人离体活肿瘤组织(ex vivo)生长

[0171] 材料:

[0172] DMEM高糖培养基、TECIA (Tissue Culture-MTT Endpoint Computer Image Analysis Chemo-sensitivity Test)、 β -actin和ZAP引物同实施例3之1)。

[0173] 方法:

[0174] a) 人离体活肝癌组织和结直肠癌组织培养

[0175] 离体活组织由中山大学肿瘤防治中心手术切除获得, 保存于 4°C , 4小时内送实验室进行药物敏感性试验, 所有病例均经病理组织学检查确诊。在无菌条件下取出瘤组织, 切成直径 $0.5 \sim 1\text{mm}$ 组织块, 放置于24孔培养板上, 每孔4~6块, 每孔加入1ml DMEM培养基。培养1小时后, 用药敏试验专用图像分析仪摄取肿瘤组织块的投射照明图像, 测定比较每孔瘤块面积(area, A)分析M1病毒对人离体活肿瘤组织的抑制作用。

[0176] b) 药物处理及组织活性测定

[0177] 肿瘤组织在 CO_2 细胞培养箱培养12小时, 状态稳定后, 加入 10^7 PFU的M1病毒和阳性对照药物5-氟尿嘧啶(5-Fu, 10mg/L), 感染96小时后, 加MTT (5mg/ml) $50\mu\text{l}$ /孔, 培养3小时, 再用药敏试验专用图像分析仪摄取肿瘤组织块的漫射光照明图像, 测定每孔瘤块被甲臞蓝染的面积和显色程度(blue area, BA), 按下式计算组织存活率(survival fraction, SF):

$$[0178] \quad SF = \frac{BA_{\text{药物处理}}/A_{\text{药物处理}}}{BA_{\text{对照}}/A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

[0179] 肿瘤组织抑制率 (Cell inhibition, CI): $CI = (1-SF) \times 100\%$, $BA_{\text{药物处理}}$ 表示 M1 病毒/5-Fu 处理组的蓝染面积, $A_{\text{药物处理}}$ 表示 M1 病毒/5-Fu 处理组的瘤块面积, $BA_{\text{对照}}$ 表示溶剂对照处理组的蓝染面积, $A_{\text{对照}}$ 表示溶剂对照处理组的瘤块面积。

[0180] c) ZAP mRNA 均一化表达量检测

[0181] 按照 M1 病毒对肿瘤抑制率 10% 为标准, 将全部上述病例组织分为两组, 分别抽提样本 RNA, QRT-PCR 法检测 ZAP mRNA、 β -actin (内参) 水平, 比较两者 ZAP 均一化表达量的差别, 采用秩和检验统计分析; 计算 ZAP 均一化表达量方法同实施例 3 之 1)。

[0182] 结果:

[0183] a) 如表 2 所示, 在肝癌组织中, 抑制率超过 10% 的病例比例 M1 病毒组为 59.5%, 高于 5-Fu 组 (53.8%), 证明 M1 病毒在有效率上高于目前临床治疗肝癌的药物 5-Fu。

[0184] 表 2 M1 病毒、5-Fu 抑制人离体活肝癌组织存活率

	抑制率 (%对照)	M1 病毒处理 (%)	5-Fu 处理 (%)
[0185]	>10%	22 (59.5%)	14 (53.8%)
	\leq 10%	15 (40.5%)	12 (46.2%)
	病例个数	37	26

[0186] b) 如表 3 所示, 在结直肠癌组织中, 抑制率超过 10% 的病例比例 M1 病毒组为 71.4%, 高于 5-Fu 组 (61.5%), 证明 M1 病毒在有效率上高于目前临床治疗结直肠癌的药物 5-Fu。

[0187] 表 3 M1 病毒、5-Fu 抑制人离体活结直肠癌组织生长

	抑制率 (%对照)	M1 病毒处理 (%)	5-Fu 处理 (%)
[0188]	>10%	10 (71.4%)	8 (61.5%)
	\leq 10%	4 (28.6%)	5 (38.5%)
	病例个数	14	13

[0189] c) 将上述 M1 病毒处理后的人离体活肿瘤组织按照抑制率 10% 为标准分为两组, 进一步分析这些组织中 ZAP mRNA 表达水平与抑制率的相关性。M1 病毒处理抑制率超过 10% 的样品组 ZAP 均一化表达量为 0.117 ± 0.890 , 低于抑制率小于等于 10% 组 (0.791 ± 0.108), 二者均数比值为 0.148。如图 4 所示, M1 病毒处理抑制率小于等于 10% 的肿瘤组织 ZAP 均一化表达量中位数是 0.414, 大于 10% 的肿瘤组织 ZAP 表达量中位数为 0.075。采用秩和检验的方法统计表明差异具有统计学意义, $P < 0.05$, 说明 M1 病毒能够选择性的引起 ZAP 低表达/ZAP 阴性的肿瘤组织死亡。

[0190] 实施例5 ZAP在多种肿瘤临床病理组织中低表达

[0191] 材料:

[0192] 来自506位患者8张组织芯片(包括肝癌、结直肠癌、膀胱癌以及配对癌旁组织), ZAP抗体(Thermo, USA), APERIO全自动数字病理切片扫描仪

[0193] 方法:

[0194] 将来自多中心的8张组织芯片进行免疫组化染色(IHC), APERIO扫描仪扫描并用配套软件计算染色密度, 检测ZAP均一化表达量; ZAP均一化表达量 = 视野内ZAP染色强度/视野内细胞数目, 视野内细胞数目用作均一化标准。

[0195] 结果:

[0196] 应用组织免疫化学方法, 发明人检测了ZAP在人多种肿瘤病理样本表达情况, 图5a显示了人肝癌、结直肠癌、膀胱癌病理组织样本中ZAP的免疫组化染色代表性图谱, ZAP染色在肿瘤组织中相对癌旁组织较浅。

[0197] 如图5b所示, 对肝癌、结直肠癌、膀胱癌和各自相应癌旁非瘤组织ZAP蛋白均一化表达量的平均值进行统计分析, 结果表明在上述每种肿瘤组织中平均的ZAP蛋白均一化表达量显著低于各自癌旁非瘤组织, ZAP在肿瘤组织中低表达。全部肝癌肿瘤组织的平均ZAP均一化表达量为 5.83 ± 8.49 , 显著低于相应癌旁非瘤组织(11.8 ± 11.5), 二者均值比值为0.494; 全部结直肠癌肿瘤组织的平均ZAP均一化表达量为 2.41 ± 3.60 , 显著低于相应癌旁非瘤组织(8.30 ± 8.94), 二者均值比值为0.290; 全部膀胱癌肿瘤组织的平均ZAP均一化表达量为 2.93 ± 4.63 , 低于癌旁非瘤组织(10.3 ± 8.36), 二者均值比值为0.284;

[0198] 如图5c表明, 在所分析全部肝癌病例中, ZAP低表达的病例数占比69%; 在所分析全部结直肠癌病例中, ZAP低表达的病例占比52%; 在所分析全部膀胱癌病例中, ZAP低表达的病例占比61%。因此ZAP成为M1病毒抗肿瘤治疗肝癌、结直肠癌以及膀胱癌的选择性分子标记。

[0199] 实施例6 M1病毒制备方法

[0200] 材料:

[0201] 非洲绿猴肾细胞Vero, 高糖DMEM培养基, OptiPRO™SFM培养基(1×), M1病毒, 100mm细胞培养皿, 离心机

[0202] 方法:

[0203] 选择对数生长期细胞, DMEM完全培养基(含10%胎牛血清、1%双抗)制成细胞悬液, 细胞接种在100mm细胞培养皿内。待细胞的融合度达到80%~90%时, 换成OptiPRO™SFM培养基。再加入50 μ l (MOI=0.01) M1病毒感染, 当细胞出现大面积病变(约36小时), 收集细胞上清。2000~3000RPM离心5min, 小心吸出上清, 混匀分装, 于-80℃冰箱保存。

[0204] 上述实施例为本发明的示例性实施方式及效果说明, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均未脱离本发明的内容, 都包含在本发明的保护范围内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 广州威溶特医药科技有限公司
- [0003] <120> 甲病毒在制备抗肿瘤药物方面的应用
- [0004] <130> PT20170111-DD-P
- [0005] <160> 9
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] gatcattgct cctcctgagc 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 20
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列
- [0017] <400> 2
- [0018] actcctgctt gctgatccac 20
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 21
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <400> 3
- [0024] gttccaacag gcgtcaccat c 21
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 24
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <400> 4
- [0030] acacattctt gtctagcaca gtcc 24
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 21
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列
- [0035] <400> 5
- [0036] tcacgaactc tctggactga a 21
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 23

- [0039] <212> DNA
[0040] <213> 人工序列
[0041] <400> 6
[0042] acttttgcat atctcgggca taa 23
[0043] <210> 7
[0044] <211> 19
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 人工序列
[0047] <400> 7
[0048] ccaagagtag cacttggtta 19
[0049] <210> 8
[0050] <211> 21
[0051] <212> DNA/RNA
[0052] <213> 人工序列
[0053] <400> 8
[0054] ccaagaguag cacuuguuat t 21
[0055] <210> 9
[0056] <211> 21
[0057] <212> DNA/RNA
[0058] <213> 人工序列
[0059] <400> 9
[0060] uaacaagugc uacucuuggt t 21

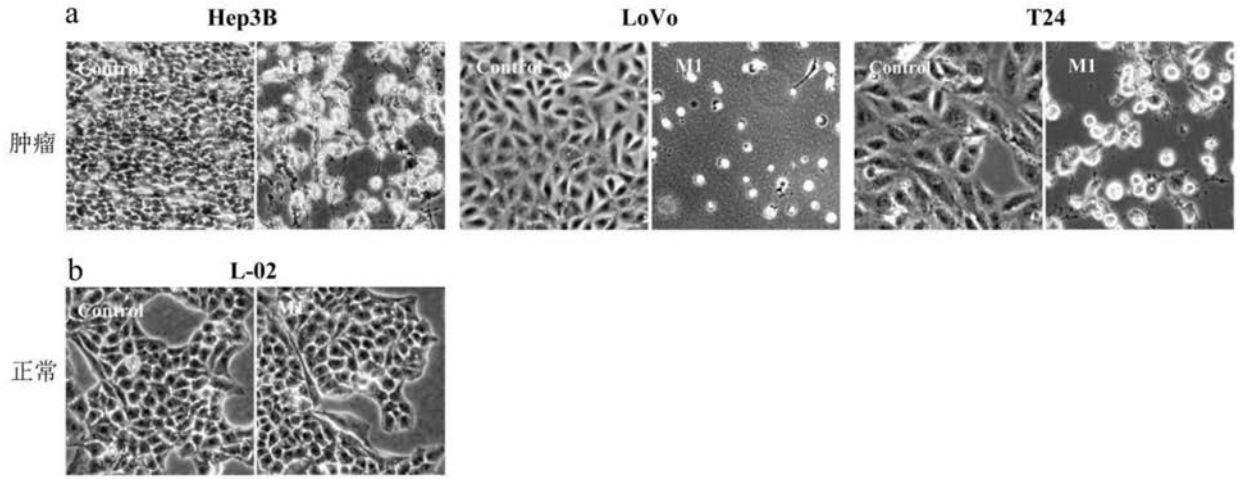


图1

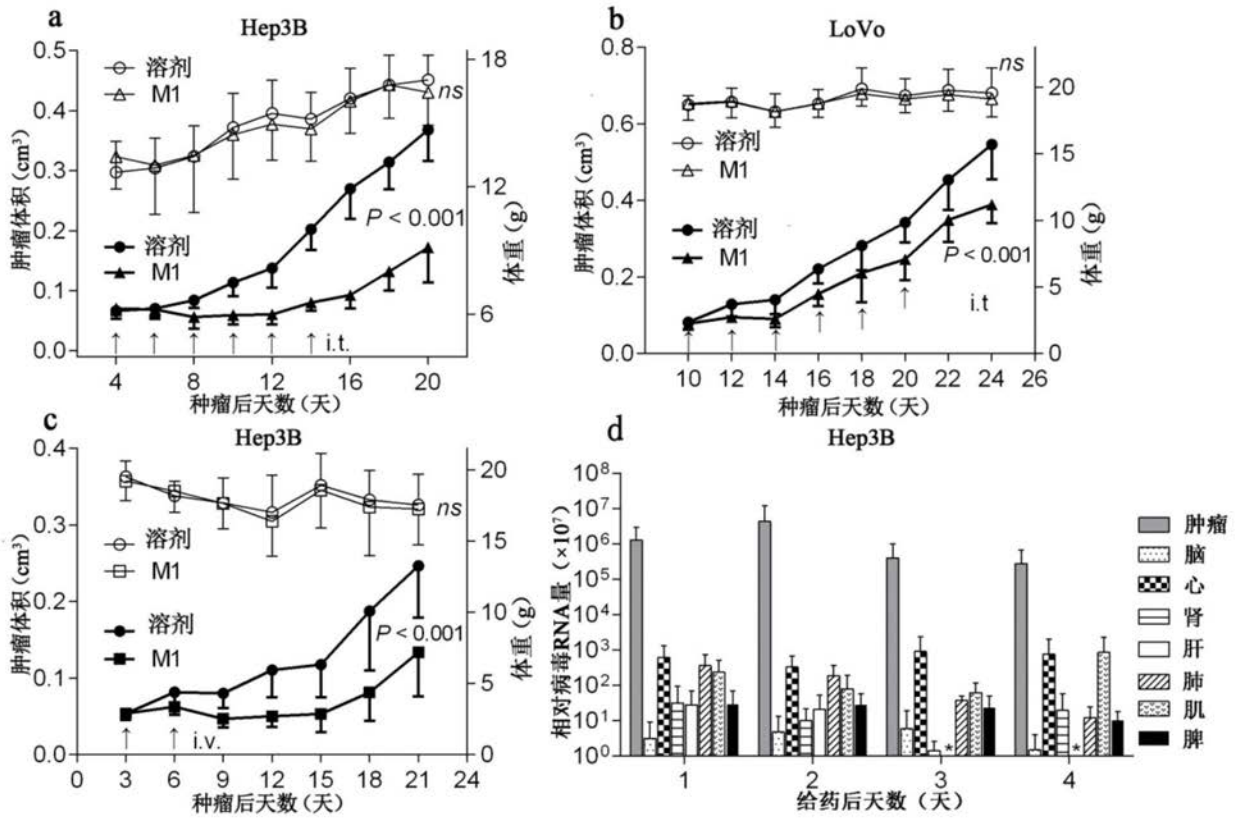


图2

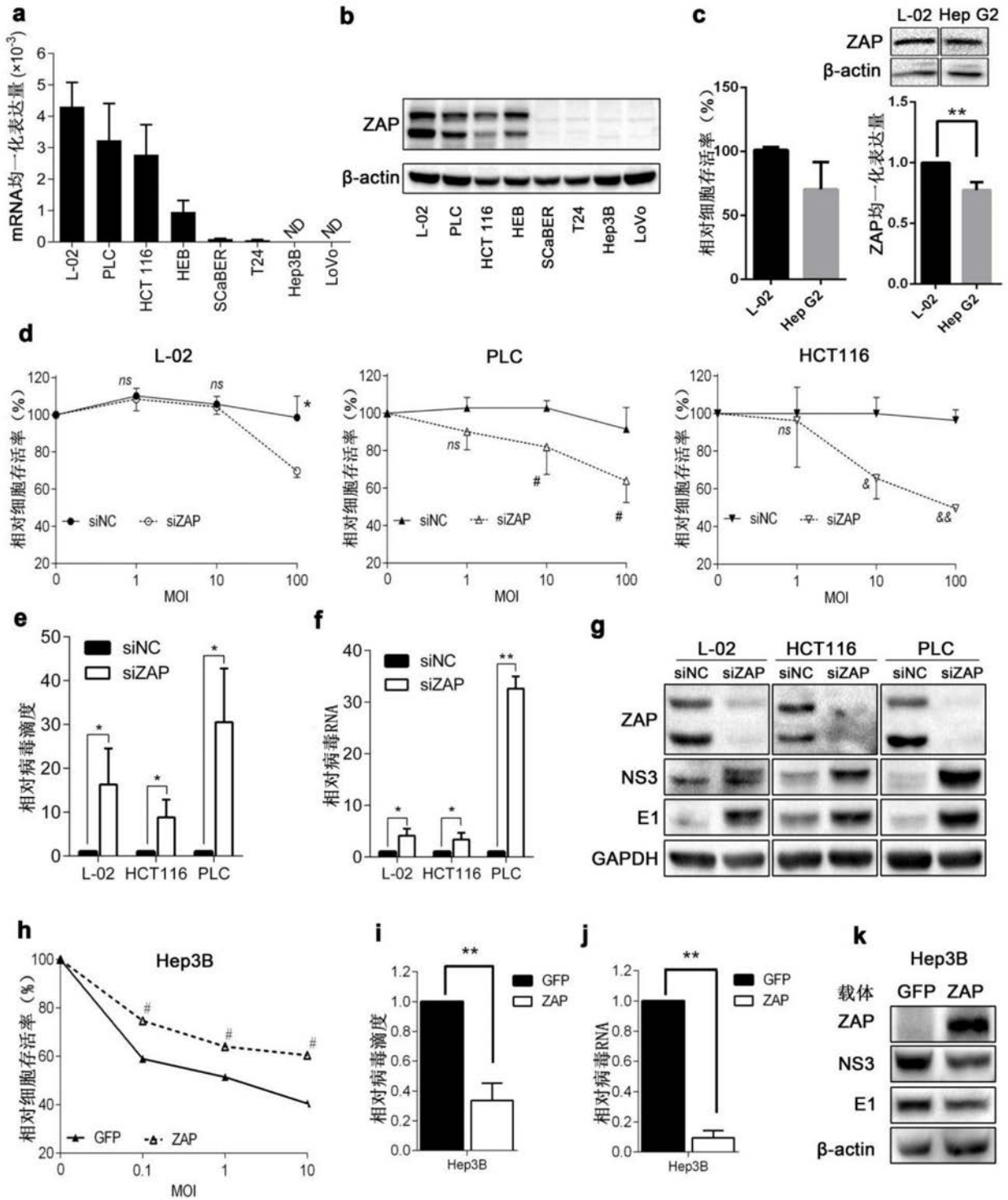


图3

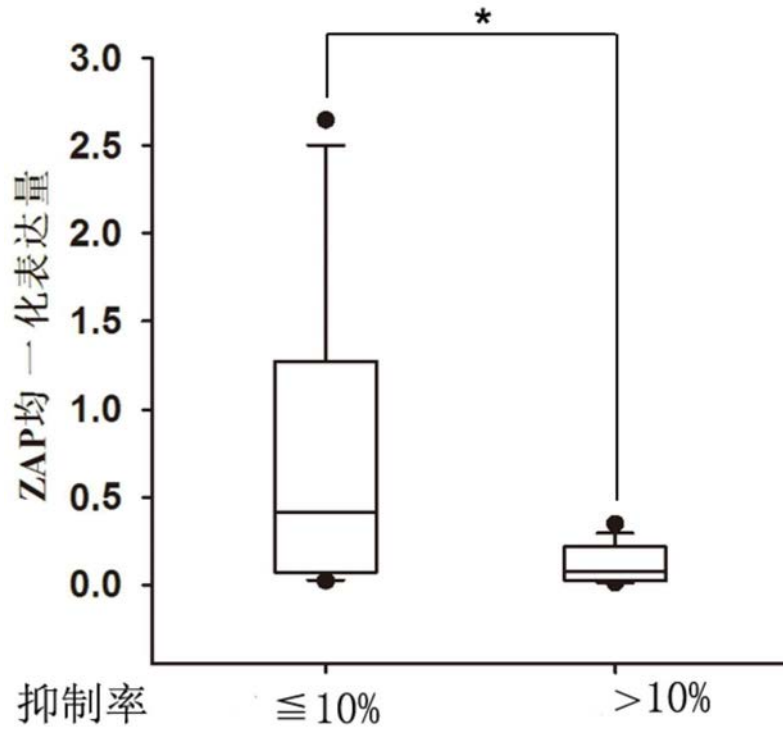


图4

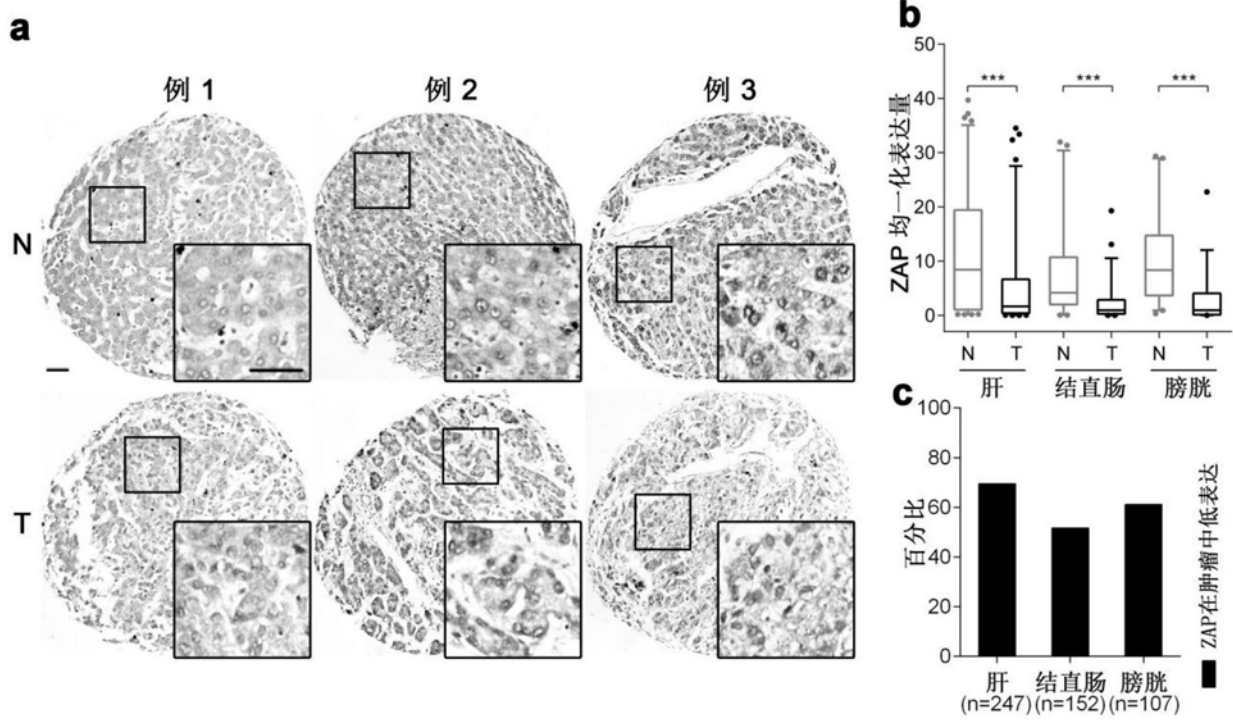


图5