

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/02

A61K 39/112 C07K 14/525

C12N 1/02 C12N 15/63

C12N 15/74 G01N 33/48

A61P 35/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96196140.6

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1138563C

[22] 申请日 1996.6.5 [21] 申请号 96196140.6
[30] 优先权
[32] 1995. 6. 7 [33] US [31] 08/486,422
[32] 1996. 6. 4 [33] US [31] 08/658,034
[86] 国际申请 PCT/US96/10250 1996.6.5
[87] 国际公布 WO96/40238 英 1996.12.19
[85] 进入国家阶段日期 1998.2.6
[71] 专利权人 耶鲁大学
地址 美国康涅狄格州
[72] 发明人 J·M·帕瓦烈克 D·伯穆狄斯
K·B·洛
审查员 任 怡

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 罗 宏 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 103 页 附图 37 页

[54] 发明名称 用于实体肿瘤包括黑素瘤的诊断和治疗的载体

[57] 摘要

本发明涉及分离和使用超感染性的、肿瘤特异性的载体，它们是寄生虫菌株，包括但不限于细菌，真菌和原生生物。在某些实施方案中，该寄生虫包括但不限于诸如鼠伤寒杆菌这样的细菌沙门菌属、细菌鸟分枝杆菌和原生动物 *Leishmania amazonensis*。在其它实施方案中，本发明涉及用于实体肿瘤的超感染性、肿瘤特异性、含自杀基因的寄生虫菌株的分离。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于已存在的实体肿瘤癌症的体积减少或生长抑制的组合物，包含有效量的肿瘤特异性的细菌微生物的分离群或分离群
5 单菌落克隆，该细菌微生物在注射到患有实体肿瘤癌症的患者体内之后优先地在肿瘤中复制，该微生物是沙门氏菌。

2. 权利要求 1 的组合物，其中肿瘤特异性的细菌微生物经遗传工程改造以表达自杀基因。

3. 权利要求 2 的组合物，其中自杀基因通过一种选自 ATCC 保藏号为 No.97592 的 pTK-Sec3，ATCC 保藏号为 No.97593 的
10 pCD-Sec1 或 ATCC 保藏号为 No.97594 的 pSP-SAD4-5 的质粒来编码。

4. 权利要求 2 的组合物，其中自杀基因选自由 p450 氧化还原酶，HSV 胸苷激酶，大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶，羧肽酶 G2， β -
15 葡糖醛酸酶，青霉素-V-酰胺酶，青霉素-G-酰胺酶， β -内酰胺酶， β -葡糖苷酶，硝基还原酶和羧肽酶 A 组成的组

5. 权利要求 2 的组合物，其中自杀基因选自由自由 HSV 胸苷激酶和大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶组成的组。

6. 权利要求 1 的组合物，其中肿瘤特异性的微生物是超感染的，肿瘤特异性的微生物。
20

7. 权利要求 1 的组合物，其中肿瘤特异性的微生物是减毒的。

8. 权利要求 7 的组合物，其中减毒的微生物表达一种改造的脂质 A 分子。

9. 权利要求 7 的组合物，其中减毒的微生物诱导 TNF- α 表达的程度比非减毒的微生物低。
25

10. 权利要求 1 的组合物，其中肿瘤特异性微生物选自由以下菌株组成的组：ATCC 保藏号为 No.55684 的鼠伤寒杆菌菌株 #14028^{pop-1}，ATCC 保藏号为 No.55683 的鼠伤寒杆菌菌株

#14028^{pop-2}, ATCC 保藏号为 No.55681 的鼠伤寒杆菌菌株#72^{pop-1}, ATCC 保藏号为 No.55682 的鼠伤寒杆菌菌株#72^{pop}。

11. 权利要求 1 的组合物, 其中肿瘤特异性微生物通过以下步骤产生:

5 (a) 将微生物与肿瘤细胞条件培养基接触足够的时间, 以便微生物向肿瘤细胞条件培养基趋化;

 (b) 分离向肿瘤细胞条件培养基趋化的微生物群体。

12. 权利要求 6 的组合物, 其中超感染的肿瘤特异性微生物通过以下步骤产生:

10 (a) 将实体肿瘤细胞的细胞培养物与微生物接触足够的时间, 以便微生物能够感染肿瘤细胞;

 (b) 从受感染的细胞培养物中分离超感染性的、肿瘤细胞特异性微生物群体。

13. 权利要求 6 的组合物, 其中超感染的肿瘤特异性微生物通过以下步骤产生:

15 (a) 将患有实体肿瘤细胞癌的哺乳动物与微生物接触足够的时间, 以便微生物能够感染肿瘤细胞;

 (b) 从受感染的肿瘤细胞中分离超感染性的、肿瘤细胞特异性微生物群体。

20 14. 权利要求 1, 11, 12 或 13 的组合物, 其中实体瘤细胞癌是黑素瘤癌。

 15. 权利要求 1, 11, 12 或 13 的组合物, 其中实体肿瘤细胞癌是结肠癌。

25 16. 权利要求 1, 11, 12 或 13 的组合物, 其中实体肿瘤癌选自以下癌症组成的组: 肺癌, 肝癌, 肾癌, 前列腺癌和乳腺癌。

用于实体肿瘤包括黑素瘤的诊断和治疗的载体

5

本申请是申请日为 1995 年 6 月 7 日的美国专利申请顺序号 08/486,422 的部分继续申请, 将该文献的全部内容引入本文作为参考。

1. 发明领域

10 本发明涉及分离和使用超感染性、肿瘤特异性、减毒的寄生虫菌株, 它们包括但不限于细菌, 真菌和原生生物。在某些实施方案中, 该寄生虫包括用于诊断和治疗肉瘤, 癌和其它实体肿瘤(solid tumor)癌的细菌沙门菌属(诸如鼠伤寒杆菌)、细菌鸟分枝杆菌和原生动 Leishmania amazonensis。在其它实施方案中, 本发明涉及分离和使用超感染性、肿瘤特异性、含自杀基因的寄生虫菌株。

15

2. 发明背景

不应将本申请第 2 部分中引证和鉴定的任何参考文献解释为承认这类参考文献是作为本发明前的现有技术而可以得到的。

实体肿瘤的化学疗法中一个主要难题是以足够的浓度传递治疗剂(诸如药物)来消灭肿瘤细胞, 而同时将对正常细胞的损害降到最低度。因此, 许多实验室中的研究都涉及生物学传递系统的设计, 诸如用于将药物, 药物前体转化酶, 和/或基因靶向传递给肿瘤细胞的抗体, 细胞因子和病毒。Houghton 和 Colt, 1993, <<肿瘤诊断和控制中的新观点>>1: 65 - 70; de Palazzo 等, 1992a, <<细胞免疫学>>142: 338 - 347; de Palazzo 等, 1992b, <<癌症研究>>52: 5713 - 5719; Weiner 等, 25 1993a, <<免疫疗法杂志>>13: 110 - 116; Weiner 等, 1993b, <<免疫学杂志>>151: 2877 - 2886; Adams 等, 1993, <<癌症研究>>53: 4026 - 4034; Fanger 等, 1990, <<联邦实验生物学联合会杂志>>4: 2846 - 2849; Fanger 等, 1991, <<当代免疫学>>12: 51 - 54; Segal 等, 1991, <<纽约科学院年鉴>>636: 288 - 294; Segal 等, 30 <<免疫生物学>>185: 390 - 402; Wunderlich 等, 1992, <<国际临床实验室研究杂志>>22: 17 - 20; George 等, 1994, <<免疫学杂志>>152: 1802 - 1811; Huston 等, 1993, <<国际免疫学回顾>>10: 195 - 217; Stafford 等, 1993, <<癌症研究>>53: 4026 - 4034; Haber 等, 1992, <<纽约科学院年鉴>>667: 365 - 381; Haber 等, 1992,

- <<纽约科学院年鉴>>667: 365 - 381; Feloner 和 Rhodes, 1991, <<自然>>349: 351 - 352; Sarver 和 Rossi, 1993, <<AIDS 研究和人类逆转录病毒>>9:483 - 487; Levine 和 Friedman, 1993, <<美国儿童疾病杂志>>147: 1167 - 1176; Friedman, 1993, <<分子遗传医学>>3: 1 - 32; Gilboa 和 Smith, 1994, <<遗传学趋势>>10: 139 - 144; Saito 等, 1994, <<癌症研究>>54: 3516 - 3520; Li 等, 1994, <<血液>>83: 3403 - 3408; Vieweg 等, 1994, <<癌症研究>>54: 1760 - 1765; Lin 等, 1994, <<科学>>265: 666 - 669; Lu 等, 1994, <<人体基因疗法>>5: 203 - 208; Gansbacher 等, 1992, <<血液>>80: 2817 - 2825; Gastl 等, 1992, <<癌症研究>>52: 6229 - 6236。

由于它们的生物特异性, 这类系统理论上能够将治疗剂传递给肿瘤。然而, 在将治疗剂转传递给实体肿瘤时存在许多障碍, 该传递可损害作为传递系统的抗体, 细胞因子和病毒的有效性, 这已经是显而易见的。Jain, 1994, <<美国科学>>7: 58 - 65 (Jain)。例如, 为使化学治疗剂消灭转移的肿瘤细胞, 它们必须

- a) 经脉管系统扩散到肿瘤;
- b) 从向肿瘤供血的小血管中外渗;
- c) 穿过肿瘤基层而达到那些远离供血系统的肿瘤细胞; 和
- d) 与靶肿瘤细胞进行有效地相互作用 (粘附, 侵染, 药物前体的激活等)。

尽管抗体和病毒能够表达肿瘤细胞的特异性识别位点, 但是它们完全取决于为达到这些位点的扩散和传送的能力。根据 Jain 所述:

一种在培养皿中破坏癌细胞的药剂理论上应能够在体内杀死这类细胞... 然而, 遗憾的是, 现存药典中的药物还不能显著地降低由成年人中多数常见实体肿瘤而导致的死亡数量, 在他们中间, 癌症是肺癌, 乳腺癌, 结肠癌, 直肠癌, 前列腺癌, 和脑癌... 在血液中含有的药物开始攻击肿瘤中的恶性细胞前, 它必须完成三个关键任务。它必须进入肿瘤内位于接近恶性细胞的显微血管, 离开血管进入周围基层 (间质组织), 且最终通过基层迁移到细胞。遗憾的是, 肿瘤经常以妨碍这些步骤中每一步的方式来发展。

Jain 指出向肿瘤供血的血管在形状上是不规则和蟠曲的, 使得血流量与正常具有血管的组织中的血流量相比经常受到限制。此外, 许多阻碍

血流的肿瘤中具有异常高的间隙压力。Jain 进一步指出控制经循环系统将药剂转运至肿瘤细胞的两个主要力量是迁移（经流动的液体运输分子）和扩散（分子从高浓度区域迁移到低浓度区域）。由于肿瘤经常不均匀地形成血管，许多肿瘤内的细胞通过经基质扩散的过程来吸收养分。Jain 和合作者获得的数据表明“具有 150,000 道尔顿分子量的连续补充的单克隆抗体需几个月时间才能在测定半径为一厘米且在其中中心没有血液供应的肿瘤内达到均匀的浓度”。

2.1. 细菌感染和癌症

10 关于细菌和癌症，病史回顾显示出许多临床观察资料，其中据报道在带有细菌感染的病人体内癌退化了。Nauts 等在 1953，Acta Medica Scandinavica 145：1 - 102，（增刊 276）中指出：

通过注射细菌产物来治疗癌症是以下述事实为基础的，
即两百多年来，已经观察到在急性感染（主要是链球菌
15 的感染）后肿瘤开始退化。如果这些情况没有太大改进
且感染足够严重或持久，那么肿瘤会完全消退且病人会
保持免于复发。

Shear 在 1950，J. A. M. A. 142：383 - 390（Shear）中观察到
在细菌感染的急性发作期后，波士顿儿童医院内未治疗的白血病患者有 75
20 % 发生了自发缓解。Shear 指出：

致病和非致病生物体是否是一种恶性疾病显微病灶的自然
自然控制剂，且在感染性疾病的控制中取得了进展时，
我们是否去掉了一种癌症的自然控制剂？

随后来自许多实验室研究的证据表明通过刺激宿主免疫系统可介
25 导至少某些抗癌作用，导致癌细胞免疫排斥增强。例如，由诸如沙门氏菌
属这样的革兰氏阴性菌释放的脂多糖（LPS）内毒素可引发由宿主免疫系
统的细胞（诸如巨噬细胞）释放肿瘤坏死因子（TNF），Christ 等，1995，
<<科学>>268：80 - 83。依次提高 TNF 水平可引发最终导致肿瘤细胞死
亡的以细胞因子介导的反应的级联。在这方面，Carswell 等在 1975，<<
30 美国国家科学院学报>>72：3666 - 3669 证实注射有卡介苗（BCG）的
小鼠 TNF 的血清水平升高且 TNF 阳性血清引起小鼠中肉瘤 Meth A 和其它
肿瘤坏死。此外，Klimpel 等在 1990，<<免疫学杂志>>145：711 - 717
中表明体外感染志贺氏菌属或沙门氏菌属的成纤维细胞对 TNF 的敏感性
增加了。

作为如上所述的这类观察的结果,在某些癌症治疗方案中,经常使用的是用注射 BCG 免疫癌症病人。参见 Sosnowski, 1994, Compr. Ther.20: 695 - 701; Barth 和 Morton, 1995, <<癌症>>75(增刊 2): 726 - 734; Friberg, 1993, 《肿瘤药物学和肿瘤药物治疗》10: 31 - 36 中对于 BCG 疗法的综述。

2.2. 寄生虫和癌细胞

尽管已经认识到寄生虫的天然生物特异性和进化适应性一段时间且已经建议将它们的特殊系统用作新型治疗程序的模型,但是很少有实际应用寄生虫作为载体的报道或建议。

在这方面, Pidherney 等在 1993, 《癌症通讯》72: 91 - 98 (Pidherney 等)和 Alizadeh 等在 1994, <<感染免疫>>62: 1298 - 1303 (Alizadeh 等)中已提供了资料,这些资料是:当将致病性无生命的变形虫 (*Acanthamoeba castellani*) 加入到生长在培养基中的肿瘤细胞中时或
15 将它们直接注射入裸鼠肿瘤内时,它们具有对人肿瘤细胞(包括黑素瘤)的杀肿瘤能力的证据。Pidherney 等得出结论:

在抗药性或抗放射性肿瘤的治疗中利用致病/无生命的变形虫和其不含细胞的产物的杀肿瘤特性值得进一步研究。

然而, Pidherney 等还指出这类致病性/无生命的变形虫可作为以细菌为食的非生命生物体存在,或作为产生有生命危险的脑膜脑炎或失明性角膜炎的机会致病菌而存在。

因此,任何寄生虫可有效地作为治疗载体是显而易见的,例如,对于人体肿瘤来说,寄生虫作为载体的益处必须超过其作为病原体对病人的危害。所以,尽管 Pidherney 等和 Alizadeh 等证明了致病性变形虫对肿瘤细胞的细胞毒性,并进一步建议将它们用于治疗抗药性和抗放射性肿瘤,
25 但是对于这些生物体固有的致病性来说,他们没有提供一旦将这些致病性变形虫注射入癌症病人的解决方法。此外,他们没有提供例如用于分离超感染性、肿瘤特异性致病性变形虫的菌株的遗传选择的方法,他们也没有
30 建议将含有用于药物前体转化酶和/或自杀基因产物的合成和分泌的诱导型基因的遗传构建体插入变形虫基因组。

同样, Lee 等在 1992, <<美国国家科学院学报>>89: 1847 - 1851 (Lee 等)和 Jones 等在, 1992, <<感染免疫>>60: 2475 - 2480 (Jones 等)中分离了鼠伤寒杆菌的突变体,该突变体在体外侵入 HEP-2 (人类表

皮样癌)细胞的数量要明显高于野生型菌株。在细菌的需氧生长条件下分离“超感染性”突变体,正常情况下该条件抑制野生型菌株侵入 HEP-2 动物细胞的能力。然而, Lee 等和 Jones 等没有建议使用这类突变体作为治疗载体,他们也没有建议通过对表现出对黑素瘤或体内超过正常细胞的其它癌有优先感染性的突变体进行选择来分离肿瘤特异性细菌。由于没有肿瘤特异性或其它形式的减毒,由 Lee 等和 Jones 等所述的这类超感染性鼠伤寒杆菌很可能是广泛感染性的,导致癌症病人体内广泛的感染。此外,由于没有对肿瘤特异性的选择或使用其它形式的减毒,对癌症病人来说,将这类细菌用作治疗载体会增加广泛感染和脓毒性休克的危险。

- 10 Pan 等在 1995, <<天然药物>>1: 471 - 477 (Pan 等)中描述了使用单核细胞增生利斯特氏菌作为疫苗而用于小鼠抵抗带有表达由李斯特菌属疫苗表达的同一抗原的肿瘤细胞致命性攻击的免疫接种。此外,在肿瘤形成后以抗原特异性 T - 细胞 - 依赖方式进行免疫接种时,他们显示出所形成的肿瘤退化了。然而, Pan 等没有指出单核细胞增生利斯特氏菌
15 可用作肿瘤特异性载体,该载体可在肿瘤内定向并扩增。相反, Pan 等指出重组单核细胞增生利斯特氏菌具有将外源抗原传递至免疫系统并引入细胞介导的抵抗相同抗原的免疫的能力。

- Sizemore 等在 1995, <<科学>>270: 299 - 302 (Sizemore 等)中描述了使用减毒的志贺氏菌属细菌作为用于 DNA 介导的免疫的 DNA 传递载体而用于以 DNA 为媒介的免疫接种。Sizemore 等指出减毒的志贺氏
20 菌属菌株侵入培养物中的哺乳动物细胞并将含有外源基因的 DNA 质粒传递至细胞的细胞质中。作为该过程的结果,在哺乳动物细胞中产生外源蛋白。将志贺氏菌属载体设计成把 DNA 传递至结肠粘膜,提供有效的口腔和粘膜 DNA 免疫接种方法以及其它基因免疫疗法策略。然而, Sizemore
25 等没有建议使用这类减毒的志贺氏菌属作为肿瘤载体,其中可将它们用于靶向肿瘤并由此在肿瘤中表达基因。相反, Sizemore 等预计其用于在口腔传递和粘膜侵染后的疫苗接种疗法中。

- 以前试验了梭状芽孢杆菌属作为用于实体肿瘤的潜在治疗载体。专性厌氧菌梭状芽孢杆菌属孢子在坏死组织内萌发的倾向是众所周知的。破
30 伤风和气性坏疽是由该属中致病性成员成功地定居在坏死组织而产生的。

Parker 等在 1947, <<实验性生物医学协会会刊>>pp.461 - 467 中第一次指出直接将溶组织梭状芽孢杆菌的芽孢注射入由溶癌作用(即液化)以及肿瘤退化引起的小鼠中生长的移植肉瘤内。一般来说,梭状芽孢杆菌属介导的溶癌作用过程伴随有小鼠的急性毒性和死亡。Malmgren 和

Flanigan 在 1955, <<癌症研究>>15: 473 中指出患有乳腺癌, 肝癌和其它肿瘤的小鼠在静脉注射破伤风梭状芽胞杆菌孢子的 48 小时内死亡, 而对对照组的不带有肿瘤的动物在 40 天内无症状。Mose 和 Mose 在 1964, <<癌症研究>>24: 212 - 216 (Mose 和 Mose) 中描述了由丁酸梭状芽胞杆菌 (菌株 M - 55, 一种非致病性土壤分离株) 在肿瘤中的定居和溶癌作用。Mose 和 Mose 通过对他们自身施用孢子确定 M - 55 菌株缺乏人体致病性, 正如 Carey 等在 1967, <<欧洲癌症杂志>>3:37-46 中所报道的。Mose 和 Mose 报道, 使用丁酸梭状芽胞杆菌菌株 M - 55, 静脉注射孢子可导致小鼠 Erlich 腹水肿瘤 (在实验中作为一种实体肿瘤生长) 的溶癌作用。以一种类似方式制备的形成需氧孢子的生物体 (例如, 脑膜芽胞杆菌, 枯草芽胞杆菌) 在相同条件下没有表现出任何溶癌作用。Mose 和 Mose 得出结论: 由于细菌的厌氧代谢的需要, 梭状芽胞杆菌的溶癌作用局限于肿瘤厌氧区。

Gericke 和 Engelbart 在 1964, <<癌症研究>>24: 217 - 221 中指出静脉注射菌株 M - 55 的孢子可使许多不同肿瘤广泛消退, 而与未治疗的患肿瘤的动物相比, 经梭状芽胞杆菌治疗的患肿瘤动物的存活时间缩短。此外, 他们发现, “器官或淋巴结中的转移瘤不受芽孢的影响, 除非转移肿瘤已经达到相当的大小时。”

Thiele 等在 1964, <<癌症研究>>24: 222 - 223 中指出静脉注射的大量非致病性梭状芽胞杆菌 (包括 M - 55) 的芽孢在小鼠肿瘤组织内而不是在正常组织内定居并萌发。Thiele 等 (1964, <<癌症研究>>24: 234 - 238) 发现: 当在肿瘤发展的早期即当肿瘤很小时将芽孢给药时, 芽孢治疗没有效果。而芽孢在足够大小的肿瘤内产生溶癌作用, 在较小的肿瘤或转移瘤中没有产生效果。在溶癌作用过程中, 动物经常死亡。Carey 等 (1967, <<欧洲癌症杂志>>3: 37 - 46) 得出结论: 已注意到小的肿瘤和转移瘤可抵抗溶癌作用, 而大的肿瘤特别适合溶癌作用。因此, 芽孢萌发的定性差异很可能不是癌变和正常组织本身的特征, 而与在大肿瘤块内发现的生理和生化条件有关。

近来的分子遗传学研究已经集中在作为潜在肿瘤载体的梭状芽胞杆菌属的厌氧细菌上。Fox 等在 1996, <<基因疗法>>3: 173 - 178 中使用梭状芽胞杆菌属表达载体能够将大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因转化进拜氏梭状芽胞杆菌中, 导致在转化的梭状芽胞杆菌细菌的生长培养基上清液和细胞提取物中胞嘧啶脱氨酶的活性增加。当将这类上清液加入小鼠 EMT6 癌的培养物中时, 它们使得细胞对 5 - 氟胞嘧啶敏感, 大概是通过将它转

化成毒性的 5 - 氟尿嘧啶的原因。同样, Minton 等在 1996, FEMS Microbiol. Rev.17: 357 - 364 中将大肠杆菌硝基还原酶基因插入拜氏梭状芽胞杆菌并通过使用针对大肠杆菌硝基还原酶基因的抗体能够在鼠肿瘤模型体内检测该基因的表达。硝基还原酶基因产物可激活 CB1954 (一种有效力的烷化剂)。

在上述参考文献(或对本发明人来说已知的任何其它参考文献)中没有建议使用任何微生物(除专性厌氧菌梭状芽胞杆菌以外)作为用于实体肿瘤的潜在治疗载体。

2.3.减毒的沙门菌属

10 Bacon 等在 1950, <<实验病理学基础研究杂志>>31: 703 - 713; <<实验病理学基础研究杂志>>31: 714 - 724; 1951, <<实验病理学基础研究杂志>>32: 85 - 96 中表明: 沙门菌属对小鼠体内毒力的减毒作用可以通过营养缺陷的突变, 即通过使用缺乏合成生长所需前体分子能力的突变体而获得。更具体地说, 作者表明在小鼠体内沙门菌属需要嘌呤(Pur⁻)营养缺陷体是减毒的。

15 Hoiseth 和 Stocker 等在 1981<<自然>>291: 238 - 239 中表明: 对于 C57BL 小鼠体内的毒性来说, 带有需要芳香氨基酸(Aro⁻)的鼠伤寒杆菌营养缺陷突变体是减毒的。此外, Su 等在 1992<<微生物病理>>13: 465 - 476 中表明将一种这样的 Aro⁻突变体(鼠伤寒杆菌的减毒抗原载体菌株, SL3261)用作一种疫苗。志贺毒素 B - 亚单位/溶血素 A (C - 末端)融合蛋白的表达并进行胞外输出, 在接种了这些细菌的小鼠体内导致抗原特异性免疫反应。

25 O'Callaghan 等在 1988<<感染免疫>>56: 419 - 423 中描述了是 Aro⁻ 和 Pur⁻的鼠伤寒杆菌, 并发现尽管它们在 BALB/c 小鼠体内是高度减毒的, 但是在静脉注射后, 它们在肝和脾内会保留几周。当进行口服或静脉注射给药时, 发现它们作为疫苗是无效的。

Johnson 等在 1991, <<分子微生物学>>5: 401 - 407 (Johnson 等)中表明: 通过在热激诱导蛋白质 HtrA (一种丝氨酸蛋白酶)中的突变可以实现沙门菌属毒性的减毒作用。Chabalgoity 等在 1996, <<分子微生物学>>19: 791 - 801 中表明: 将这类减毒的 htrA⁻ 鼠伤寒杆菌用作活疫苗。

然而由 Bacon 等, Hoiseth 和 Stocker, O'Callaghan 等, Johnson 等, Su 等在 1992, Chabalgoity 等在 1996 提供的这些参考文献中没有一份、也没有任何关于表 4 (见下文)中的研究指出这类鼠伤寒杆菌的减毒

株在实体肿瘤内可以存活并增殖，也没有建议将这类减毒突变体用作实体肿瘤治疗的载体。

2.4.本发明的目的

与用于将治疗剂传递至实体肿瘤的许多物理屏障有关的难题是在有效传递系统的设计中存在的明显而困难的障碍。因此，在本领域中，提供能够克服这些障碍的传递系统是长期以来所需要的。

本发明的一个目的是使用并提供更加先进的生物载体诸如寄生虫作为新型传递系统并能满足肿瘤治疗的需要，所述的生物载体具有几个明显优点，将它们中的某些列在下面。

10 抗菌素敏感性：肿瘤特异性寄生载体对外部给予的抗菌素敏感是一个优点。通过抗菌素的给药可以将寄生物（诸如细菌）在它们的宿主内杀灭。在完成治疗过程时，这种抗菌素敏感性允许杀灭来自癌症病人身体的寄生物。

15 生物特异性：载体对其靶细胞（例如，一种肿瘤细胞）表达特异性是一个优点。肿瘤细胞载体的特异性越强，有效治疗所需的接种物越少，由此减少了脓毒性休克或广泛感染对癌症病人的危害。寄生虫表现出很大程度的天然生物特异性，它们进化了利用各种特异性识别和侵染机理使寄生虫得以进化。（关于生物特异性的一般性讨论，参见：Falkow, 1991, 《细胞》65: 1099 - 1102; Tumomanen, 1993, 《美国微生物协会》20 59: 292 - 296）。

突变体的分离和遗传操作：在设计和分离作为肿瘤特异性治疗载体的寄生虫过程中，寄生物适合于遗传操作是一个优点。可以将具有单倍体基因组和较短世代时间的寄生虫（例如，细菌，诸如鼠伤寒杆菌和肠侵袭性大肠杆菌）很容易地进行诱变，随后进行富集过程而用于分离带有所需新特征的菌株（一般参见，Neidhart 等（编辑）1987，大肠杆菌和鼠伤寒杆菌，《细胞和分子生物学》。美国微生物协会，pp 990 - 1033）。此外，对于分子遗传学科学来说，用于遗传分析和稳定地将遗传构建体引入这些细菌的方法是众所周知的。

30 趋化性：对于肿瘤特异性载体来说，对癌细胞的趋化反应是一个优点，例如，作为一种用于载体通过诸如由脉管系统中内皮细胞产生的基底膜基质侵入的刺激物，或作为一种刺激物而用于寻找由肿瘤基质包围的癌细胞的载体。寄生虫和共生体或互生生物中的趋化反应，特别是在诸如大肠杆菌和鼠伤寒杆菌这样的细菌中的趋化反应，已经得到了很充分地记载。关于趋化性的综述，参见 Macnab, 1992, 《遗传回顾年鉴》26:

131 - 158。

靶细胞内的复制：对于肿瘤特异性载体来说，在靶细胞内有复制的能力是一个优点。这样一种能力使得在受感染的癌细胞内治疗载体的数量得到了扩增，因此增加了载体的治疗功效。癌细胞内载体的子代进一步感染周围或较远的癌细胞，因此在肿瘤细胞群内扩增载体的数量。

5 厌氧和需氧代谢：对于肿瘤特异性载体来说，在需氧或厌氧条件下表达侵染和扩增的能力是一个优点。实体肿瘤一般包括有血管的、含丰富氧气的区以及坏死的缺氧区。在两种环境中都起作用的载体在肿瘤细胞中达到的比例高于仅能够在一种环境（诸如，一种专性厌氧菌或需氧菌）中起作用的载体。

3. 本发明的概述

本发明提供了用于将基因和/或基因产物体外或体内传递到和/或进入靶哺乳动物细胞的组合物和方法。由微生物载体（包括细菌，真菌和原虫寄生虫）来传递基因和/或基因产物，所述的微生物载体经选择和/或遗传改造成对于特殊类型的靶哺乳动物细胞具有特异性的。在优选的实施方案中，在需氧和厌氧条件下都起作用的载体是超感染性的、肿瘤特异性微生物，将它们用于诊断或治疗肉瘤，癌，淋巴瘤或其它实体肿瘤癌，诸如生殖系肿瘤(germ line)和中枢神经系统肿瘤，包括但不限于乳腺癌，前列腺癌，20 颈癌，子宫癌，肺癌，卵巢癌，睾丸癌，甲状腺癌，星形细胞瘤，神经胶质瘤，胰癌，胃癌，肝癌，结肠癌，和黑素瘤。

用于本发明方法的载体包括但不限于：*Borrelia burgdorferi*，马尔他布鲁氏菌，大肠杆菌，肠侵袭性大肠杆菌，嗜肺军团菌，伤寒沙门氏菌，鼠伤寒杆菌，志贺菌属，链球菌属，苍白密螺旋体，小肠结肠炎耶尔森氏菌，沙眼衣原体，单核增生细胞利斯特氏菌，鸟分枝杆菌，牛分枝杆菌，25 结核分枝杆菌，BCG，人型枝原体，五日热立克次氏体，新型隐球酵母，荚膜组织胞浆菌，*Pneumocystis carinii*，*Eimeria acervulina*，*Neospora caninum*，*Plasmodium falciparum*，*Sarcocystis suis hominis*，鼠弓形体，*Leishmania amazonensis*，*Leishmania major*，*Leishmania mexicana*，30 *Leptomonas karyophilus*，植物单胞菌属，克氏锥虫，*Encephalitozoon cuniculi*，*Nosema helminthorum*，*Unikaryon legeri*。

本文所用的，鼠伤寒杆菌包括所有的沙门菌属的种。长期以来认为沙门菌属的各种“种”实际上是由所有细菌分类学可接受的标准产生的单一种。目前将该单一种称为“*Salmonella enterica*”。F. Neidhardt（编辑）

《大肠杆菌和沙门菌属》，1996，卷I，pp. xx，美国金属协会出版社，华盛顿特区。

5 本发明的一个实施方案是提供用于分离超感染性的、减毒的、肿瘤特异性的微生物突变体的方法，所述的微生物诸如细菌，真菌和原虫寄生虫。此外，本发明提供了在诊断和治疗恶性和/或转移实体肿瘤癌中使用这些微生物的方法，所述的实体肿瘤癌诸如黑素瘤或结肠癌。而且，这些突变体寄生虫可以表达特异性基因产物，它们中的某些可分泌入受感染细胞的细胞质和液泡区。

10 本发明提供了用于分离超感染性的靶细胞特异性微生物的方法。在具体的实施方案中，本发明提供了超感染性的、肿瘤特异性的寄生虫菌株的分离和利用，所述的寄生虫诸如细菌沙门菌属（包括鼠伤寒杆菌），细菌鸟分枝杆菌和原虫 *Leishmania amazonensis*。肿瘤特异性载体也可以含有自杀基因。

15 本发明的一个实施方案提供了分离超感染性、肿瘤特异性沙门菌属（例如，鼠伤寒杆菌）突变体的方法和制备含有这种突变体的组合物的方法以及将该组合物用于诊断和治疗肉瘤，癌，黑素瘤，结肠癌和其它实体肿瘤癌的方法。本发明的另一个实施方案提供了分离超感染性、肿瘤特异性的沙门菌属突变体的方法和制备含有这种突变体的组合物，所述的沙门菌属含有一种自杀基因。在一个具体的实施方案中，自杀基因是来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶或来自大肠杆菌的胞嘧啶脱氨酶或人类微粒体 p450
20 氧化还原酶。

本发明的另一个实施方案提供了分离超感染性、肿瘤特异性原虫（*Leishmania amazonensis*）突变体组合物的方法和制备含有这种突变体的组合物的方法以及将该组合物用于诊断和治疗肉瘤，癌，黑素瘤，结肠癌
25 和其它实体肿瘤癌的方法。

本发明的另一个实施方案提供了分离超感染性、肿瘤特异性细菌鸟分枝杆菌突变体的方法和制备含有这种突变体的组合物的方法以及将它们用于诊断和治疗肉瘤，癌，黑素瘤，结肠癌和其它实体肿瘤癌的方法。

30 本发明的另一个实施方案提供了用于寄生虫载体毒性的减毒的方法，以便减小宿主内的脓毒性休克或其它并发症的危险，即病人接受载体传递的基因疗法。这类方法包括：寄生虫的诱变；寄生虫突变体的分离，所述的突变体带有增强的肿瘤特异性、用于自杀基因表达的增强的特异性并伴随降低的在体内感染正常宿主细胞的能力；带有增强的向癌细胞分泌产物趋化能力的突变体的分离；带有遗传改造的脂多糖组分的突变体的分

离以及带有改造的毒性基因的突变体的分离，从而实现在癌细胞内寄生虫载体的特异性存活，与在宿主体正常细胞的情形相反。

本发明进一步包括将微生物载体用于诊断或治疗实体肿瘤癌。

参照下面的定义，本发明的详尽描述，具体实施方案的说明性实施例和附图，可以更完整地理解本发明，其中：

4. 定义

减毒：减毒，除了减毒的传统定义以外，其中将微生物或载体进行修饰以便微生物或载体是低致病性的，减毒意图还包括修饰微生物或载体以便能够将较低滴度的该微生物或载体对病人进行给药并仍可获得与之相当的结果。如同对病人给予了较高滴度的亲本微生物或载体一样。当将微生物或载体对病人进行给药时，减毒的最终结果是减轻了毒性和其它副作用的危害。

自杀基因：自杀基因的定义是当将基因传递至靶细胞并由本发明的载体表达时，它可导致靶细胞和/或载体的死亡。

超感染性：超感染性载体的定义是与野生型载体相比，它能够更容易地附着和/或感染靶细胞。根据接种物群体密度，可观测到的感染靶细胞的超感染性载体与野生型载体之比接近 4：1，优选 30：1，更优选 90：1。最优选的情况是，可降低接种物的量并减少感染时间，以便仅超感染性载体具有附着和/或感染体外细胞培养物中生长的癌细胞或作为体内肿瘤的时间。

肿瘤特异性：肿瘤特异性载体的定义是载体能够区别癌性靶细胞和非癌性对应细胞，以便载体优先在癌性靶细胞内附着，感染和/或保持生存。

5. 附图的简要说明

附图 1. 附图 1 描绘了用于表达药物前体转化酶的 DNA 盒系统。

通过使用含有特殊限制性核酸内切酶位点 NotI, NsiI, NcoI, SfiI 或 PacI 的引物的 PCR 可以生成每一种成分，所述的位点可使各个成分进行简单的互换。例如，（A）是诸如胸苷激酶，胞嘧啶脱氨酶或人类微粒体 p450 氧化还原酶这样的药物前体转化酶的编码序列；（B）是一种启动子，它在诱导的，组成的或细胞特异性的方式中是有活性的；（C）是一种 N -

末端分泌信号序列, 诸如 β -内酰胺酶信号序列; 和(D)是C-末端分泌信号序列, 诸如肠侵袭性大肠杆菌溶血素A信号序列。

附图2A - B. 附图2A - B是感染人黑素瘤细胞系M2的鼠伤寒杆菌野生型菌株ATCC号14028的显微照片。将ATCC号14028的起始群体在用于附图2A - B所示的感染测定前进行感染入M2黑素瘤细胞并将它们从M2黑素瘤细胞中回收的10个循环。附图2A. 一种受感染的黑素瘤细胞的光学显微照片。附图2B. 表示细胞核的细胞DAPI染色, (n), 和细胞内部的大量细菌, (箭头)。

附图3A - C. 附图3A - C是在摄入人黑素瘤细胞系M2的过程中鼠伤寒杆菌野生型菌株ATCC号14028的显微照片。附图3A. 宿主细胞的相差显微照片。附图3B. 表示细菌位置的宿主细胞的DAPI染色, (箭头), 和宿主细胞核, (n)。附图3C. 表示带有溶酶体和/或黑素体的细菌的共同定位的宿主细胞的溶酶体糖蛋白LAMP-1抗体染色。

附图4A - 4F涉及生产转化酶表达构建体和使用同样构建体的表达。

附图4A - B. 在鼠伤寒杆菌超感染性克隆72中含有 β -内酰胺酶分泌信号序列的单纯疱疹胸苷激酶基因的表达。附图4A. 使用一种抗TK单克隆抗体的鼠伤寒杆菌菌株的免疫印迹分析。电泳泳道1: 细菌仅含有质粒载体p279; 电泳泳道2: 菌株14028wt (CDC6516-60) (MO) 含有TK的细胞质表达形式 (pHETK2); 电泳泳道3: 菌株14028克隆72含有TK的细胞质表达形式 (pHETK2); 电泳泳道4: 菌株14028wt (MO) 含有 β -内酰胺酶融合体形式的TK (p5-3); 电泳泳道5: 菌株14028克隆72含有TK的 β -内酰胺酶融合体形式 (p5-3); 电泳泳道6: 菌株14028wt (MO) 含有TK的 β -内酰胺酶融合体形式 (p21A-2); 电泳泳道7: 菌株14028克隆72含有TK的 β -内酰胺酶融合体形式 (p21A-2)。相对分子量 $\times 10^3$ 在左侧表示。在“仅有载体”的对照组中可见无抗体反应性 (电泳泳道1)。在每一个有细胞质表达的TK存在的泳道中 (泳道2和3), 可以观察到蛋白质的两种主要同种型; 含有先导序列的高分子量的同种型和已将先导序列以蛋白水解方式裂解掉的低分子量的同种型。在每一个细菌表达TK基因 β -内酰胺酶信号序列融合体的泳道 (泳道4至7) 中, 也可以观察到蛋白质的两种主要同种型: 含有信号序列的高分子量的形式及已将信号序列以蛋白水解方式裂解掉的低分子量的同种型, 后者与胞质酶的加工形式表观分子量相同。

附图4B. 与附图A中每一个样品有关的相对TK酶活性。将酶的

活性表达为标准测定中 ^{125}IdC 磷酸化计数的总数, 见 Summers 和 Summers, 1977, 《病毒学杂志》24: 314 - 318。在来自仅有载体的样品(泳道1)的细菌提取物中存在小背景。在野生型和含有 TK pHETK2 胞质形式的超感染性克隆 72 中观察到了显著高水平的 TK 活性(泳道 2 和 3)。在野生型和含有 β - 内酰胺酶信号序列融合体同种型的 TK p5 - 3 的超感染性克隆 72 中, 都观察到了类似的水平(泳道 4 和 5)。在野生型和含有 β - 内酰胺酶信号序列融合体同种型的 TK p21A - 2 的超感染性克隆 72 中, 都观察到了低水平的 TK 活性(泳道 6 和 7)。

附图 4 - C 是不同单纯疱疹病毒胸苷激酶分泌和表达构建体的示意图。

附图 4 - D 是不同人微粒体细胞色素 p450 氧化还原酶表达结构的示意图。

附图 4 - E 是大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶分泌和表达构建体的示意图。

附图 4 - F 是表示由不同细菌将 5 - FC 转化成 5 - FU 的量的坐标图。

附图 5A - B. 附图 5A - B 是来自于 DBA/2J 小鼠皮下生长的 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交体#48 的组织切片的显微照片。从在两天前已接种了 3×10^5 c. f. u. 携带 HSV TK 基因的鼠伤寒杆菌超感染性克隆#72 (克隆#72⁵⁻³⁻²) 的小鼠中切下肿瘤。附图 5A. 用苏木精和曙红染色的切片显示带有坏死的中央区域的肿瘤细胞, 用箭头代表。附图 5B. 用 Brown-Brenn 染色剂 (组织革兰氏染色剂) 染色的切片显示在肿瘤坏死区域内的革兰氏阴性菌, 用箭头代表。当光学显微镜下观察时, 细菌相对于黄色背景染成了粉红色/紫色。

附图 6. 附图 6 是从在 42 小时前已腹膜内接种了 4×10^6 鼠伤寒杆菌超感染性克隆 72 的 DBA/2J 小鼠中切下的 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交体#48 肿瘤的切片的电子显微照片。显微照片中可见的部分是两种鼠伤寒杆菌细菌 (用箭头代表) 以及大量黑素体 (m), 黑素瘤细胞特征性的亚细胞器。沙门菌属和该黑素体的共同定位表明细菌在黑素瘤细胞的细胞质中存在。放大倍数 = 21,000x。

附图 7. 附图 7 是来自于 C57BL/6J 小鼠皮下生长的 B16F10 黑素瘤的组织学切片的显微照片。从在 42 小时前已接种了 1.8×10^5 c. f. u. 携带 HSV TK 基因的鼠伤寒杆菌超感染性克隆#72 的小鼠中切下肿瘤。来自相同肿瘤的切片按附图 8 所述用电子显微镜观察。用 Brown-Brenn 染色剂 (组织革兰氏染色剂) 染色该切片且显示在肿瘤坏死区域内的革兰氏阴性菌, 用

箭头代表。当在光学显微镜下观察时，细菌相对于黄色背景染成了粉红色/紫色。

附图 8. 附图 8 是来自从 C57BL/6J 小鼠中切下的 B16F10 黑素瘤肿瘤 10 切片的电子显微照片，所述的小鼠在 42 小时前已腹膜内接种了 1.8×10^5 携带 HSV TK 基因的鼠伤寒杆菌超感染性克隆#72。来自相同肿瘤的切片按附图 7 所述用光学显微镜观察。该显微照片显示在胞外空间（用箭头代表）内和坏死区域内的大量鼠伤寒杆菌，。在死亡的黑素瘤细胞的细胞质内还可以观察到单个细菌。死亡的黑素瘤细胞的细胞质还含有大量黑色的黑素体（m），这是 B16F10 黑素瘤的特征。放大倍数 = 9,750x。

附图 9A - D. 附图 9A - D 描述的是在各种治疗条件下，DBA/2J 小鼠体内 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交体#48 肿瘤的生长情况。给小鼠在上背区皮下接种 3×10^5 黑素瘤细胞。8 - 10 天后可触摸到肿瘤，并给某些小鼠进一步接种携带 HSV TK 基因的鼠伤寒杆菌超感染性克隆#72。用细菌接种后 24 小时后，给某些组的小鼠进一步腹膜内接种 2.0mg 的 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤。在 5 天的期限内重复 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤的接种 6 次。点代表在所示天数时每个治疗组 2 - 5 只小鼠体内肿瘤的卡钳测量值。以 mm 为单位测定每个肿瘤的长，宽和高并以 mm^3 为单位计算体积。将每组小鼠的平均肿瘤体积在 0 天（治疗开始的第一天）定为 100 %。（附图 9A）。对照组小鼠：不接种沙门菌属；不接种 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤；（附图 9B）。仅接种 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤；（附图 9C）。仅接种沙门菌属；（附图 9D）。接种沙门菌属和 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤。

附图 10A - B. 附图 10A 表示对照组小鼠且附图 10B 表示鼠伤寒杆菌感染的 (7B) DBA/2J 小鼠。给小鼠接种（皮下）Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交体#48 肿瘤细胞。当可触摸到的肿瘤出现时，给某些小鼠接种（腹膜内） 3×10^5 c. f. u. 含有 HSV TK 基因的鼠伤寒杆菌克隆#72（克隆#72⁵⁻³⁻²），让它们随意取食和饮水 10 天，然后用溶于它们饮用水的 SulfatrimTM 抗菌素再处理几天并拍照。在笼内用沙门菌属治疗和未治疗的小鼠中，所述小鼠体内的肿瘤是肿瘤发展的一般状态的代表。

附图 11A - 11H 涉及 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤对肿瘤细胞生长（体外或体内）的影响。

附图 11A - B. 附图 11A - B 描述了对照组（附图 11A）和鼠伤寒杆菌感染的（附图 11B）DBA/2J 小鼠。给小鼠接种（皮下）Cloudman

S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交体#48 肿瘤细胞。当可触摸到的肿瘤出现时，给某些小鼠接种 3×10^5 c. f. u. 含有 HSV TK 基因的鼠伤寒杆菌克隆#72（克隆#72⁵⁻³⁻²）。然后给对照组和沙门菌属感染的小鼠注射（腹膜内）2.0mg 的 9 - （1，3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基）鸟嘌呤，在 4 天期间总共注射 5 次。然后将小鼠用溶于它们饮用水的 SulfatrimTM 抗菌素治疗若干天并拍照。在笼内用沙门菌属治疗和未治疗的小鼠中，所述小鼠是肿瘤发展的一般状态的代表。

附图 11（C - E）表示 9 - （1，3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基）鸟嘌呤对接种和未接种鼠伤寒杆菌克隆 YS7211（附图 11 - 1 A）；克隆 YS7213（附图 11 - 1 B）和克隆 YS7212（附图 11 - 1 C）小鼠体内 B16F10 黑素瘤生长的影响。

附图 11 - F 是表示在有或没有 $10 \mu\text{g/ml}$ 或 $25 \mu\text{g/ml}$ 9 - （1，3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基）鸟嘌呤存在的情况下单层培养物中 B16F10 黑素瘤细胞生长情况的示意图。

附图 11 - G 是一个示意图，该图表示，在有和没有 9 - （1，3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基）鸟嘌呤存在的情况下，在接种携带 HSV 胸苷激酶基因的鼠伤寒杆菌克隆 YS7211（YS7211/p5-3）后 9 - （1，3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基）鸟嘌呤对小鼠体内 B16F10 黑素瘤生长的影响。

附图 11 - H 是一个示意图，该图表示在接种携带 HSV 胸苷激酶基因的鼠伤寒杆菌克隆 YS7211（YS7211/p5-3）后，9 - （1，3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基）鸟嘌呤的总量对小鼠体内 B16F10 黑素瘤生长的影响。

附图 12A - B 是电子显微照片。附图 12A 是来自从 BALB/c nu/nu 小鼠中切下的 HCT 116 人结肠肿瘤的切片的电子显微照片。在 72 小时前已给该小鼠腹膜内接种了 2.8×10^5 c. f. u. 含有 HSV TK 基因的鼠伤寒杆菌超感染性克隆#72（克隆#72⁵⁻³⁻²）。显微照片中显示的是在与肿瘤有关的中性粒细胞细胞质内的大量鼠伤寒杆菌。如箭头所示，某些细菌正在进行分裂。中性粒细胞或多形核白血细胞的特征在于其多叶型细胞核（n），（放大倍数 = $21,000\times$ ）。

附图 12 - B 是表示胞外空间内以及单细胞（可能是一种中性粒细胞，见照片上部的左侧）内含有的大量鼠伤寒杆菌（用箭头代表）的电子显微照片。在该区域内还可观察到的是两种未鉴定的细胞，由很大的胞内空间以及细胞碎片所示，似乎处于死亡状态。

附图 13. 附图 13A - B 描述了 *Leishmania amazonensis* 对人黑素瘤细胞系 M2 的附着。附图 13A. 表示附着于细胞上的寄生虫（箭头）的相

差显微照片。附图 13B. 表示寄生虫 DNA (箭头) 和宿主细胞的细胞核 (n) 的 DAPI 染色。

附图 14. 附图 14A - C 是在摄入人黑素瘤细胞系 M2 的过程中 *Leishmania amazonensis* 的显微照片。附图 14A. 进入宿主细胞的利什曼原虫属锥鞭体 (箭头) 的相差。附图 14B. 表示寄生虫 (箭头) 的位置和宿主细胞的细胞核 (n) 的 DAPI 染色。附图 14C. 表示细菌和溶酶体共同定居的宿主细胞的溶酶体糖蛋白 LAMP - 1 抗体染色。

附图 15A - D. 附图 15A - C 是表示鼠伤寒杆菌克隆 72 和克隆 YS7212 在仅用葡萄糖补充的基础培养基 56; 含有葡萄糖加腺嘌呤, 维生素 B1, 异亮氨酸, 缬氨酸和尿嘧啶的培养基 56; 或仅含有肿瘤提取物 (10%) 的培养基 56 中生长情况的示意图。

附图 15 - D 是描述在培养物中感染人 M2 黑素瘤细胞后, 鼠伤寒杆菌克隆 72 和 YS7212 生长情况的示意图。

附图 16A - D 是表示在接种和没有接种鼠伤寒杆菌菌株 YS721 (附图 16 - A); YS7213 (附图 16 - B); YS7211 (附图 16 - C) 和 YS7212 (附图 16 - D) 的 C57B6 小鼠体内 B16F10 黑素瘤生长情况的示意图。

附图 17 是表示当用携带胞嘧啶脱氨酶表达构建体 YS7212/pCD-Sec1 的肿瘤特异性载体感染动物时, CD 和 5 - 氟胞嘧啶结合物延长携带 B16F10 肺转移瘤的动物存活期的示意图。

附图 18 是表示用从鼠伤寒杆菌的野生型和减毒菌株中分离的脂多糖培养的人体巨噬细胞产生的 TNF - α 产量的示意图。

附图 19 是一种柱状图表, 该图表表示在用或不用 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤治疗的情况下, 分别表达 HSV 胸苷激酶基因, YS7211/p5-3 和 YS7212/p5-3 的克隆 YS7211 和 YS7212 对患有转移 B16F10 肿瘤小鼠的影响。

6. 本发明的详细描述

本发明涉及用于实体肿瘤癌的新型治疗和诊断寄生性载体的分离以及它们的用途, 所述的实体肿瘤癌诸如肉瘤, 癌, 淋巴瘤或其它实体肿瘤癌, 例如生殖系肿瘤和中枢神经系统肿瘤, 包括但不限于乳腺癌, 前列腺癌, 颈癌, 子宫癌, 肺癌, 卵巢癌, 睾丸癌, 甲状腺癌, 星形细胞瘤, 神经胶质瘤, 胰癌, 胃癌, 肝癌, 结肠癌, 黑素瘤。下文具体描述的内容是新型胞内寄生虫载体; 用于分离该新型载体的方法; 所分离载体的遗传改造; 以及在固体恶性肿瘤 (包括转移肿瘤和肿瘤细胞) 的治疗和检测中

利用新型载体和其它载体的方法。

6.1. 新型载体及其分离方法

- 5 分离的载体（例如是细菌，真菌或原生生物）能够区分癌细胞和非癌性对应细胞。例如，分离的载体能够识别来自黑素细胞的黑素瘤细胞或识别来自正常结肠上皮细胞的结肠癌细胞。表 I 是胞内寄生性和致病性微生物的有代表性的目录，该目录决不用来限制本发明，所述的微生物用作本发明和/或分离新型突变体菌株的肿瘤特异性载体，所述的菌株是本发明中使用的超感染性和肿瘤特异性载体。

表 I

用作载体的生物体的代表性目录

	革兰氏阴性菌
5	<i>Borrelia burgdorferi</i>
	马尔他布鲁氏菌
	大肠杆菌
	肠侵袭性大肠杆菌
	嗜肺军团菌
10	伤寒沙门氏菌
	鼠伤寒杆菌
	志贺菌属
	苍白密螺旋体
	小肠结肠炎耶尔森氏菌
15	革兰氏阳性菌
	BCG (卡介菌)
	沙眼衣原体
	单核增生细胞利斯特氏菌
20	鸟分枝杆菌
	牛分枝杆菌
	结核分枝杆菌
	人型枝原体
	五日热立克次氏体
25	链球菌属
	真菌
	新型隐球酵母
	荚膜组织胞浆菌
	卡氏肺囊虫
30	Apicomplexans
	<i>Eimeria acervulina</i>
	<i>Neospora caninum</i>
	恶性疟原虫
35	兔弓形虫

Kinetoplastida**Leishmania amazonensis****Leishmania major**5 **Leishmania mexacana****Leptomonas Karyophilus**

植物单胞菌属

克氏锥虫

10 小孢子虫

Encephaltozoon cuniculi**Nosema helminthorum****Unikaryon legeri**

细菌鼠伤寒杆菌, 细菌鸟分枝杆菌和原虫 *Leishmania amazonensis* 每种都是本发明特别有用的载体, 这是因为这些微生物体中的每一种都表现出附着和透入组织培养物内某些实体肿瘤细胞的天然优选性, 这与非癌性对照细胞相反。由于这些载体 (诸如沙门菌属) 具有识别癌细胞和其非癌性对应细胞的天然能力, 所以它们可直接适用于本发明的诊断和治疗方法。然而, 与“野生型”亲代菌株相比, 通过以下文 6.1.1-6.1.4 部分中所述的本发明方法, 可以增强并选择这种肿瘤特异性能力以及超感染性的能力。

6.1.1 通过经体外组织培养物循环的分离

本发明的一个实施方案是通过经预选择的靶细胞 (优选一种实体肿瘤细胞) 循环微生物来分离本发明的新型载体, 在体外组织培养物中使用一重或多重感染循环以便循环的群体和/或其中的克隆分离物与起始微生物群体相比表现出增强的靶肿瘤细胞感染性且与非癌性对照细胞相比表现出增强的选择性。该方法要求选择一种寄生虫或病原体并向特殊类型的实体肿瘤体外组织培养物系统中加入该微生物, 实验者希望将该实体肿瘤用作一种靶细胞。例如, 如果实验者需要以黑素瘤肿瘤为靶, 那么靶细胞可以是 M2 人黑素瘤细胞。将肿瘤细胞和微生物共同培养, 这一过程使微生物有足够的时间来附着和/或感染肿瘤细胞, 在这种培养之后, 将肿瘤细胞培养物用含有可有效抵抗所用特殊微生物的抗菌剂的缓冲剂或培养基进行洗涤。抗菌剂可杀死任何还没有附着和感染肿瘤细胞的微生物。如果需要, 可以将受感染的肿瘤细胞培养物在含有抗菌素的培养基中进一步培养不同的时间, 这取决于所分离微生物的群体类型。例如, 对于较长的培养时间来说, 与微生物的起始群体相比, 所分离的微生物群体增强了在肿瘤细胞内部的存活和/或增殖能力。另外, 使用标准的技术可以将分离的群体进行培养以便分离单菌落克隆。

将受感染的动物细胞进行收集并溶胞, 从而释放出摄入的微生物。然后, 例如通过离心 (2000x g, 4 分钟) 并在新鲜培养基中重新悬浮可以将该微生物进行分离。可以将所分离的微生物群体用于附加的感染入靶肿瘤细胞且从其中分离出来的循环。在进行附加的感染循环之前, 可以首先将分离的微生物群体放入合适的生长培养基中 1 - 2 个倍增时间以确保其生存力。还可以将分离的微生物群体进行培养以便分离并收集单菌落克隆。所分离的微生物也可以进行公知的体外技术以便确定与不进行体外选

择的“野生型”亲代菌株相比它们的相对感染和选择能力。例如，在平行的比较中，通过使用用来测定已附着或侵入靶肿瘤细胞的微生物数量和/或它们识别癌细胞和非癌性细胞能力的测定方法，实验者可以检测与“野生型”相比所分离微生物的相对感染性。此外，在这些体外测定方法中，诸如微生物群体密度这样的参数可以改变，所述的测定方法帮助测定所检测克隆或群体的接种物总浓度对微生物识别靶肿瘤细胞和其非癌性对应细胞能力的影响。

对于通过经体外组织培养物的循环而分离的超感染性、肿瘤特异性载体的说明性实施例，参见下文的第7部分。

10

6.1.2.通过经体内实体肿瘤的循环的分离

本发明的另一个实施方案是通过经体内实体肿瘤循环微生物而分离本发明的新型载体。使用哺乳动物中的实验性肿瘤模型来进行这一过程，所述的肿瘤模型诸如（例如但不限于）在 C57B6 小鼠体内形成黑素瘤的 B16 小鼠黑素瘤肿瘤和在 nu/nu 和其它免疫损伤的小鼠体内形成结肠癌的 HCT116 人结肠癌细胞。另外，将从癌症病人的外科手术获得的肿瘤组织的新鲜活检组织用于接种 nu/nu, scid 或其它免疫损伤的小鼠。将小鼠体内已从接种的癌细胞中生长的这些肿瘤以一种与体外靶细胞类似的方式用作分离超感染性和肿瘤特异性载体的体内靶向物。可以将任何在小鼠或任何其它动物体内生长的肿瘤在本发明中用作体内分离超感染性和肿瘤特异性载体的靶向物。

一旦通过例如皮下接种癌细胞或移植肿瘤块而在小鼠体内产生了肿瘤，就可以将所选择的微生物接种入小鼠体内。在微生物与肿瘤共同定位和/或感染肿瘤细胞接种过程后预测定的感染时间之后，处死小鼠，切下肿瘤，称重并匀浆。将等份的样品稀释进适当的微生物生长培养基中并在适当的生长条件下培养 1 - 2 个群体倍增时间，从而确保回收用于成功地接种入患肿瘤小鼠的存活微生物。此外，如果所分离的群体在患肿瘤小鼠体内进行成功地接种，那么在每次成功地接种时，可以减少接种物中微生物的数量和感染时间，从而增加对肿瘤特异性分离物选择的严格性。另外，使用标准的技术可以培养分离的群体以便分离单菌落克隆。还可以将分离的微生物用于体外检测，以便测定与不进行体内选择过程的“野生型”亲代菌株相比它们的相对感染和选择能力。

对于患肿瘤小鼠体内分离的超感染性、肿瘤特异性载体的说明性实施例，参见下文的第9部分。

6.1.3. 使用以靶肿瘤细胞为条件的培养基的体外趋化性而进行的分离

- 本发明的另一个实施方案是通过趋化提供用于分离超感染性和/或肿瘤特异性载体的方法，使得所分离的微生物增加向肿瘤细胞分泌产物趋化的能力。该方法要求使用装满液体对照培养基或以 Adler (1973, 《普通微生物学杂志》 74: 77 - 91) 所述的靶肿瘤细胞为条件的培养基的毛细管。条件培养基是其中已生长有靶细胞且随后过滤以除去细胞的培养基。将毛细管的一端用火焰熔封；然后将毛细管快速通过火焰几次并立即将开口端向下插入一个装有条件或对照培养基的烧杯中。当毛细管冷却时，将液体从内部上升。

- 将装满的毛细管开口端向下插入一装有培养基和一种预选择的微生物悬浮液的离心管中。在 37°C 时培养一段预测定的时间，其中微生物趋化入毛细管，在这一过程后，用镊子将毛细管取出，将熔封端打开并将开口的毛细管转入装有适于特殊微生物的营养培养基的离心管中。重要的是将毛细管的上顶部用一种特殊类微生物的合适培养基进行覆盖，从而保证在离心过程中从毛细管中定量地回收微生物。例如，将毛细管以 4000 x g 进行离心 4 分钟，迫使微生物从管中脱离。移开毛细管，将微生物重新悬浮，并将等份的样品分布在固体或液体形式的合适培养基上以便定量。

- 微生物进入装有条件培养基的毛细管的数量与对照品相比有了显著增加，这表明了条件培养基中发现的对靶细胞分泌产物的阳性趋化反应。可以将由这种体外技术分离的群体进行成功地趋化性检测分离或用于分离单菌落克隆。在区分靶癌细胞和非癌性对应细胞的能力以及超感染性的能力方面，这些克隆或群体可与“野生型”亲代菌株相比。

- 对于经使用肿瘤细胞条件培养基的体外趋化而分离的超感染性、肿瘤特异性载体的说明性实施例来说，参见下文的第 8 部分。

6.1.4. 诱变载体的分离

- 在用于分离超感染性、肿瘤特异性微生物的任何上述方法中，在将微生物进行本发明的任何分离或选择过程前，可以将“野生型”亲代微生物首先进行诱变。例如，将细菌用亚硝基胍和紫外线 B 照射进行处理，以便将遗传基因物质进行修饰，导致在微生物中定性和定量地产生基因表达的改变。其它类型的化学和高能量诱变在本领域中是众所周知的。例如，烷化剂，诸如二甲基亚硝胺或乙基甲磺酸酯，或嵌入剂，诸如溴化乙锭。

其它方法包括引入基因群或带有新型启动子的基因的融合体的转座子诱变。在本发明中可以使用任何诱变剂以生成可随后进行任何本发明选择方法的突变体微生物菌株。

对于诱变的所说明性实施例，参见下文的第 7.1 部分。

5

6.2. 用于将基因和/或基因产物传递至靶实体肿瘤细胞以及毒性减毒的选择载体的遗传操作

6.2.1. 将基因和/或基因产物传递至靶向位点的遗传操作

在上述选择过程中实验者获得超感染性、肿瘤特异性载体后，实验者将这类载体进行遗传改造，以便将任何所需的基因或基因产物传递至一种靶向位点，优选一种实体肿瘤的位点，更优选的情况是将它们传递入肿瘤细胞本身，肿瘤的坏死区域或进入与肿瘤相关的淋巴细胞和巨噬细胞中。另外，实验者可以遗传改造天然出现的具有感染肿瘤细胞和/或是肿瘤细胞特异性的微生物。通过各种本领域公知的方法，例如，转化法或电穿孔法，可以遗传改造这些载体。在本发明优选的实施方案中，将载体进行改造，以便将自杀基因传递至靶肿瘤细胞。这些自杀基因包括药物前体转化酶，诸如单纯疱疹胸苷激酶（TK）和细菌胞嘧啶脱氨酶（CD）。TK使无毒性底物无环鸟苷和 9 - （1，3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基）鸟嘌呤磷酸化，经掺入基因组 DNA 将毒性传给它们。CD 将无毒性的 5 - 氟胞嘧啶（5 - FC）转化成 5 - 氟尿嘧啶（5 - FU），通过将它掺入 RNA 而成为有毒性的。本发明包括的另外的药物前体转化酶实例包括对丝裂霉素 C 和甲基丝裂霉素 C 起作用的细胞色素 p450 NADPH 氧化还原酶（Murray 等，1994，《实验性药物治疗杂志》270：645 - 649）。

将药物前体转化酶广泛应用于恶性肿瘤的基因疗法中（Vile 和 Hart，1993，《癌症研究》53：3860 - 3864；Moolten 和 Wells，1990，《国家癌症研究所杂志》82：297 - 300；Wagner 等，1981，《美国国家科学院学报》78：1441 - 1445；Mullen，1994，《癌症研究》54：1503 - 1506；Huber 等，1993，《癌症研究》53：4619 - 4625；Waldman 等，1983，《生物化学杂志》258：11571 - 11575；Mullen 等，1992，《美国国家科学院学报》89：33 - 37；Austin 和 Huber，1993，《分子药理学》43：380 - 387）。表 2 是有代表性的药物前体转化酶目录（Bagshawe，1995，《药物发展研究》34：220 - 230）。

已经将药物前体转化酶在几种细菌中进行了表达。已经将单纯疱疹病毒在大肠杆菌中进行了表达（Garapin，1980，《美国国家科学院学报》

78: 815 - 819; Waldman 等, 1983, 《生物化学杂志》 258: 11571 - 11575)。同样, Simula 等在《毒理学》 1993, 82: 3 - 20 中在对丝裂霉素有敏感性的鼠伤寒杆菌中表达了药物前体转化酶细胞色素 p450 氧化还原酶。

表 2

用于载体疗法的有代表性的药物前体转化酶

酶	药物前体	参考文献
羧肽酶 G2	苯甲酸芥	Bashawe 等, 1988
5		Springer 等, 1990
	苯胺芥	Davies 等, 1994
	苯酚芥	Springer 等
β -葡糖醛酸酶	羟基苯胺芥-葡糖	Roffer 等, 1991
10	醛酸糖苷	
	表柔比星-葡糖醛	Halsma 等, 1992
	酸糖苷	Mitaku 等, 1994
青霉素-V-酰胺酶	阿霉素-N	Kerr 等, 1990
15	苯氧基乙酰	
青霉素-G-酰胺酶	N-(4'-羟苯基乙酰	Bignami 等, 1992
	基)-岩沙海葵毒素	
	阿霉素	
	苯丙胺酸氮芥	vrudhula 等, 1993
20	氮芥-头孢菌素	Alexander 等, 1991
	β -苯二胺	
	长春花碱衍生物-	
	头孢菌素	
	头孢菌素芥	Meyer 等, 1993
25		
β -葡糖苷酶	氰基苯基甲基- β -	Rowlandson-Busza 等
	D-葡糖-	, 1991
	pyranosiduronic acid	
30	硝基还原酶	Knox 等, 1988;
	5-(adaridin-1-基-)	Somani 和 Wilman,
	2,4-二硝基苯甲酰胺	1994
	羧肽酶 A	Haenseler 等, 1992
	氮甲蝶呤-丙氨酸	

- Bashawe 等, 1988, 《癌症概要杂志》 58: 700 - 703
- Springer 等, 1990, 《化学药物杂志》 33: 677 - 681
- Davies 等, 1994, 《肿瘤学年鉴》 5 (增刊 5): 73 (摘要)
- Springer 等, 1994, “定向抗体酶药物前体疗法 (ADEPT) 中的新型
5 双碘苯酚芥”, 收入在: 第十一届 Hammersmith 国际研讨会大纲《单克隆
抗体应用中的进展》, 伦敦: Hammersmith 医院 (摘要)。
- Halsma 等, 1992 (a), 《癌症免疫学的免疫治疗》 34: 343 - 348
- Roffer 等, 1991, 《生物化学药理学》 42: 2062 - 2065
- Halsma 等, 1992 (b), 《癌症概要杂志》 88: 474 - 478
- 10 Mitaku 等, 1994, 《肿瘤学年鉴》 5 (增刊 5): 76 (摘要)
- Kerr 等, 1990, 《癌症免疫学及免疫治疗》 31: 202 - 206
- Bignami 等, 1992, 《癌症研究》 52: 5759 - 5764
- Vrudhula 等, 1993, 《药物化学杂志》 38: 919 - 923
- Alexander 等, 1991, 《四面体通讯》 32: 3296 - 3972
- 15 Meyer 等, 1993, 《癌症研究》 53: 3956 - 3963
- Svensson 等, 1992, 《生物共轭体化学》 3: 176 - 181
- Rowlandson-Busza 等, 1991, “扁桃苷特异性激活后的细胞毒性”,
收入在: 《单克隆抗体》, Epemetos AA (编辑), 伦敦: Chapman 和
Hall, pp.179 - 183
- 20 Knox 等, 1988; 《生物化学药理学》 41: 4661 - 4669
- Somani 等, 1994, 《肿瘤学年鉴》 5 (增刊 5): 73 (摘要)
- Haenseler, E., Esswein, A., Vitols, K. S., Montejano, V., Mueller 等,
1992, 《生物化学》 31: 214 - 220
- 25 然而, 当在诸如沙门菌属或大肠杆菌这样的细菌中合成诸如 TK 和
CD 这样的药物前体转化酶时, 它们一般不从细菌中分泌。因此, 设计表
达构建体以便通过微生物分泌微生物产生的基因产物。由此, TK 或 CD
能够在靶肿瘤细胞的细胞质和靶肿瘤的间隙空间内生成磷酸化的无环鸟
苷, 9 - (1, 3) - 二羟 - 2 - 丙氧甲基鸟嘌呤, 或 5 - FU。通过将
30 一种例如来自 β -内酰胺酶基因的分泌信号序列引入表达构建体中进行
TK 和 CD 的分泌 (Talmadge 等, 1980, 《美国国家科学院学报》 77:
3369 - 3373)。

除了 β -内酰胺酶外, 本发明还包括另外的信号序列。例如, 已知
有几种方法使细菌分泌入周质和培养基外部。最典型的分泌序列是含有疏

水跨膜穿越结构域的 N - 末端信号序列。这些序列起指导蛋白质通过膜的作用并在当或蛋白质通过膜后将它们除去。原核和真核 N - 末端信号序列是相似的, 且已经证明真核 N - 末端信号序列能够在细菌内起分泌序列的作用。在优选的实施方案中, 将编码酶 β -内酰胺酶 (青霉素酶) 的基因用作信号序列的来源。这种信号序列是分泌入周质和培养基外部的细菌酶的良好研究实例。

此外, 有些细菌蛋白质使用位于 C - 末端的不同分泌信号。肠侵袭性大肠杆菌溶血素 A (hlyA) 是本组中最好的研究成员。已经证明分泌信号存在于蛋白质的最后 60 个氨基酸中, 且当来源于溶血素操纵子的辅助蛋白质 (hlyC, A, B, 和 D) 存在时, 这一区域向其它蛋白质转移可导致它们分泌入培养基 (Su 等, 1992, 《微生物病理学》 13: 465 - 476)。由 Pugsley 回顾的有代表性的分泌蛋白质目录列在表 3 中, (Pugsley A. P., 1988, “革兰氏阴性菌穿过外膜的蛋白质分泌”, 在《蛋白质转移和细胞器的生源论》中, R. C. Dand 和 P. W. Robbins (编辑), 学院出版公司, Harcourt Brace Jovanovich, 出版商, San Diego, pp 607 - 652)。

表 3

前转化酶分泌信号的来源

	蛋白质	生物体	转染大肠杆菌中 的定位和信号类型	参考文献
5	壳多糖酶	粘质沙雷氏菌	释放入培养基 N - 末端信号	14
	α -溶血素	大肠杆菌	释放入培养基 C - 末端信号	9
10	不耐热的 肠毒素 I	各种大肠杆菌 菌株	类似于霍乱毒素 的 2 个亚单位 (A 和 B); 两者中的 N - 末端信号; 主要 在周质中	12, 7, 29
15	耐热的 肠毒素 I 不耐热的 肠毒素 II	各种大肠杆菌 菌株 各种大肠杆菌 菌株	N - 末端信号肽; 分泌入培养基 N - 末端信号肽	11, 28 17
20	支链淀粉 酶 丝氨酸 蛋白酶 果胶酶	Kelbsiella pneumoniae 粘质沙雷氏菌 菊欧文氏杆菌	向培养基中释放; N - 末端信号肽 分泌入培养基; N - 末端信号肽 主要在周质内	3, 27, 6 31 15, 5
25	果胶酶	胡萝卜欧文氏 杆菌	周质	18, 32
	蛋白酶 气单胞 菌溶素	菊欧文氏杆菌 嗜水气单胞菌	分泌入培养基 周质, N - 末端信号序列 (加工的)	30, 1 13
30	磷脂酶 C	铜绿假单胞菌	不由大肠杆菌 N - 末端信号 序列分泌	4, 19, 26
	外毒素 A	铜绿假单胞菌	不由大肠杆菌	10

		分泌	
	霍乱毒素 霍乱弧菌	主要是周质; 2 个亚单位	25, 20
	溶血素 霍乱弧菌	周质	21
5	DNA 酶 霍乱弧菌	周质	22, 8
	耐热的 副溶血弧菌	周质 N - 末端	24
	溶血素	信号肽	
	IgA 蛋白酶 Haemophilis influenzae	周质	2
10	IgA 蛋白酶 Nisseria gonorrhoeae	分泌入培养基	16
	百日咳毒素 百日咳博 特氏杆菌	周质; 均带有 N - 末端信号肽 的 5 个亚单位	23
15	1. Barras 等, 1986, FEMS Microbiol. Lett. 34:343-348 2. Bricker 等, 1983, 《美国国家科学院学报》 80: 2681 - 2685 3. Chapon 等, 1985, 《细菌学杂志》 164: 639 - 645 4. Coleman 等, 1983, 《细菌学杂志》 153: 909 - 915 5. Collmer 等, 1985, 《细菌学杂志》 161: 913 - 920 6. d'Enfert 等, 1987, 《欧洲分子生物学实验室杂志》 6: 3531 - 3538 7. DaRas 等, 1980, 《自然》 288: 499501 8. Focareta 等, 1985, FEMS Microbiol. Lett. 29: 161 - 166 9. Goebel 等, 1984, “大肠杆菌质粒编码的溶血素决定族的结构, 功 能和调节”, 收入在: 《细菌中的质粒》, D. R. Hehnski, S. N. Cohn, D. B. Cloewell, D. A. Jackson, 和 A. Hollaender (编辑), pp 791 - 805, Plenum, 纽约。 10. Gray 等, 1984, 《美国国家科学院学报》 81: 2645 - 2649 11. Guzman-Verduzco 等, 1983, 《细菌学杂志》 154: 146 - 151 12. Hirst 等, 1984, 《美国国家科学院学报》 81: 7752 - 7756 13. Howard 等, 1986, 《普通分子遗传学》 204: 289 - 295 14. Jones 等, 1986, 《欧洲分子生物学实验室杂志》 5: 2377 - 2383 15. Keen 等, 1984, 《细菌学杂志》 159: 825 - 831 16. Koomey 等, 1982, 《美国国家科学院学报》 79: 7881 - 7885		
20			
25			
30			

- 17.Lee 等, 1983, 《感染免疫》 42: 264 - 268
- 18.Lei 等, 1983, 《基因》 35: 63 - 70
- 19.Lory 等, 1983, 《基因》 22: 95 - 101
- 20.Mekalanos 等, 1983, 《自然》 306: 551 - 557
- 5 21.Mercuris 等, 1985, 《普通分子遗传学》 200: 472475
- 22.Newland 等, 1985, 《感染免疫学》 47: 691 - 696
- 23.Nicosia 等, 1986, 《美国国家科学院学报》 83: 4631 - 4635
- 24.Nishibuchi 等, 1985, 《细菌学杂志》 162: 558 - 564
- 25.Pearson 等, 1982, 《美国国家科学院学报》 79: 2976 - 2980
- 10 26.Prichard 等, 1986, 《细菌学杂志》 167: 291 - 298
- 27.Pugsley, A. P., 1988, “蛋白质通过革兰氏阴性菌外膜的分泌”,
收入在:《蛋白质转移和细胞器生源论》, R. C. Dand 和 P. W. Robbins (编
辑), 学院出版公司, Harcourt Brace Jovanovich, 出版商, San Diego,
pp 607 - 652
- 15 28.So 等, 1980, 《美国国家科学院学报》 77: 4011 - 4015
- 29.Spicer 等, 1982, 《生物化学杂志》 257: 5716 - 5721
- 30.Wandersman C. (引入到 Pugsley 中的未公开结果, 1988)
- 31.Yanigida 等, 1986, 《细菌学杂志》 166: 937 - 944
- 32.Zink 等, 1985, 《应用环境微生物学》 49: 714 - 717

20

在本发明的另一个实施方案中,从表达构建体中表达的所需基因处于某些类型的启动子的特殊调节控制之下。这些启动子可以是组成型的,其中基因是连续表达的、诱导型的,其中基因仅在有诱导物分子或细胞型的特殊控制下的情况下是表达的,其中基因(包括但不限于自杀基因)仅

25 在某些细胞类型中是表达的。此外,包括药物前体转化酶的外源基因的表达不断改变细菌的表型。由此,在外源控制下驱动药物前体转化酶的表达是一个优点。这允许利用诸如靶向肿瘤定向这样的细菌表型并扩增后有利于表达药物前体酶。诱导型启动子在特殊条件下驱动基因的表达。此外,

30 外源性诱导型启动子对包括可人工引入的化学信号的特殊刺激起反应。使用一种证明可用于人体的外源引入的药剂来驱动药物前体酶的表达是一个优点。细菌的“SOS”反应(Friedberg等,《DNA的修复和诱变》pp.407 - 455,美国微生物协会出版,1995)是一种由大量药剂诱导的反应,所述的药剂包括证明可用于人体的化疗烷化剂,诸如丝裂霉素(Oda等,1985,《突变研究》147: 219 - 229, Nakamura等,1987,《突变研

究》192: 239 - 246; Shimda等, 1994,《致癌》15: 2523 - 2529)。属于本组的启动子元件包括 umuC, sulA 和其它 (Shinagawa等, 1983,《基因》23: 167 - 174; Schnarr等, 1991,《生物化学》73: 423 - 431)。sulA 启动子包括 sulA 基因的 ATG 和后面的 27 个核苷酸以及
5 ATG 上游的 70 个核苷酸 (Cole, 1983,《普通分子遗传学》189: 400 - 404)。因此, 它在表达外源基因和生成用于缺少起始密码子序列的基因融合体中是有用的。

例如, 在一个实施方案中, 基因的表达由在特殊靶细胞中激活的细菌启动子来控制。在本实施方案一个优选的方式中, 细菌启动子主要在特
10 殊的靶细胞中激活。例如, 在另一个实施方案中, 基因的表达由仅在特殊肿瘤细胞中激活的细菌启动子来控制。在带有必需分泌信号序列启动子控制下表达基因的表达结构的说明性实例在附图 1 中用图表示。

在本发明的一个优选实施方案中, 基因的表达处于仅在靶细胞中激活的启动子控制下。用许多不同的方法来分离在靶肿瘤细胞中是特殊或优
15 选活性的微生物启动子。例如, 一种方法是仅使用 IVET (体内表达技术) 启动子筛选过程用于分离特殊诱导的基因。这一过程通过使用例如一种由 Sau3A 限制酶产生的鼠伤寒杆菌 DNA 插入片段的随机库并将片段克隆入启动子载体 pIVET 中进行 (Slauch等, 1994,《酶学方法》235: 481 - 492; Mahan等, 1993,《科学》259: 686 - 688)。克隆位点
20 在用于需要循环 AMP 合成的 purA 基因启动子的位置上。将这一有代表性的库转染回鼠伤寒杆菌中, 并诱导导致内源 purA 基因置换的整合过程。携带整合的 TVET 质粒的细菌群体允许感染患有选择细胞型实体肿瘤的动物, 并在 24 小时后, 将细菌从肿瘤中分离。仅那些接受了质粒的细菌能够存活, 所述质粒的 Sau3A 限制的 DNA 不规则片段在肿瘤细胞中起启动子
25 的作用。除了控制 purA 的转录外, Sau3A 限制的 DNA 启动子还控制 β -半乳糖苷酶基因的表达。两类使细菌在肿瘤内存活的启动子是分离的, 组成型的且可调节的。该组成型启动子继续控制肿瘤内部和外部两种基因的阳性表达。而可调节的启动子在细胞而不是在靶细胞内不再是活性的。

用于鉴别在肿瘤中是活性的启动子的另一种方法是使用双向凝胶
30 电泳来鉴别肿瘤特异性诱导的微生物基因产物。例如, 为了在黑素瘤细胞而不是在巨噬细胞内测定特殊或择优表达的基因产物, 该方法要求三个平行的感染以串联方式进行: (1) 使 5×10^7 克隆的微生物感染 5×10^6 黑素瘤细胞, (2) 使 5×10^7 克隆的微生物感染 5×10^6 巨噬细胞, 和 (3) 在 LB 肉汤中维持生长期的 5×10^7 克隆的微生物。感染 30 分钟后,

将细胞用含有 10 μ g/ml 庆大霉素（对于黑素瘤细胞来说）的 DMEM，含有 10 μ g/ml 庆大霉素的 RPMI 1640（对于巨噬细胞来说）和不含庆大霉素的 LB（对于游离微生物来说）进行洗涤。2 小时后，将细胞用 50mg/ml 环己酰亚胺进行预处理以抑制宿主细胞蛋白质的合成，时间持续 15 分钟。

5 然后，将细胞洗涤并放入含有 75 μ Ci/ml ^{35} S - 甲硫氨酸的标记培养基（无甲硫氨酸）中 30 分钟，随后放入正常培养基中 1 小时。收集细胞，在 7M 的脲缓冲剂中使细胞变性并将细胞进行等电聚焦（IEF），随后进行十二烷基硫酸钠（SDS）聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）和放射自显影分析。在黑素瘤细胞中特异性表达的基因产物作为蛋白质斑点出现，所述的蛋白质

10 斑点来自微生物感染的黑素瘤，而不是来自微生物感染的巨噬细胞或来自游离的微生物。使用由来源于制备型 IEF 和 SDS - PAGE 凝胶的蛋白质制备的抗血清从 λ gt11 表达文库中克隆特异性表达的微生物基因。随后来自粘粒文库中的克隆产生用于肿瘤特异性表达的基因产物的含有启动子元件的 DNA 片段。

15 用于分离在靶肿瘤细胞中特别或择优激活的启动子的另一种方法是转座子诱变。转座子诱变产生随机突变体库，可检测这些突变体在上皮细胞而不是在靶细胞中的存活能力。首先可检测突变体在上皮细胞中的持续存在的耐久能力。对不再能够存活的突变体不进行选择。随机挑选存活的突变体并将它们放入使用 96 孔平板计数的系统中。靶肿瘤细胞在 96 孔

20 平板内生长，并在微生物与宿主之比约为 10: 1 时，用微生物逐一感染靶肿瘤细胞 30 分钟，随后洗涤并用 10 μ g/ml 庆大霉素进行处理。24 小时后，冲洗平板，并用 0.4 % 台盼蓝染色以便使用 96 孔平板读数器来测定活细胞（亮清）与死细胞（蓝色）之比。将在靶肿瘤细胞内不能存活的微生物从原始计数的平板中回收。然后使用一种作为遗传标记的转座子将基因

25 克隆以便分离含有肿瘤特异性表达基因的 DNA 和其启动子。

当将可表达各种药物前体或“自杀基因”的载体传递给宿主时，这些载体不应将抗生素抗性传递给宿主，且更重要的是细菌应尽可能保持对许多抗菌素同样的敏感性。因此，这些载体不应携带任何抗生素抗性标记物。在没有选择性压力的情况下，这可以在细菌中维持表达载体中造成一个

30 难题。然而，有许多没有利用抗生素抗性而可以稳定地维持载体的方法。例如，正如 Donnenberg 在 1991，美国微生物协会《会议年鉴》摘要 B - 111，p. 4；Donnenberg 和 kaper 在，1991，《感染免疫》59: 4310 - 4317；和 Ried 和 Collmer 在 1987，《基因》57: 239 - 246 中所述，一种这样的方法是构建表达药物前体转化酶或其它“自杀基因”的在染色

体上整合的载体。另一种方法是使用平衡致死系统构建编码“自杀基因”或药物前体转化酶的稳定游离型质粒。确定这类平衡致死系统在于载体为补偿细菌中缺陷的功能进行编码,使得载体的存在对细菌的存活来说是必不可少的。这类系统由 Galan 等在 1990,《基因》94: 29 - 35 中描述。

5 这种系统超过染色体整合的优点在于质粒是多拷贝的和(由此)获得较高的表达水平。

6.2.2. 用于毒性减毒的遗传操作

本发明包括的许多微生物是人和动物体内疾病的致病剂。例如,由于与脓毒性休克发作有关的高死亡率,来自革兰氏阴性菌产生的脓毒病是一个严重问题(R. C. Bone, 1993,《临床微生物学研究》6: 57 - 68)。因此,为使在人和动物的诊断和治疗中安全使用这些载体,要对微生物载体可导致疾病的毒性方面进行减毒。在本发明中,除了减毒的传统定义外(其中将微生物或载体进行修饰以便微生物或载体是低致病性的),减毒

10 还包括修饰微生物或载体以便可以将这种产生的微生物或载体以较低的滴度对病人进行给药且仍然获得类似的效果,如同对病人给予较高滴度的亲代微生物或载体一样。由于将该载体对病人进行了给药,最终的结果是减少了毒性休克或其它副作用的危害。用许多技术可将这类减毒的微生物进行分离。这类方法包括微生物抗菌素敏感性菌株的利用,微生物的诱变,

15 在培养物或在患肿瘤的动物中对肿瘤特异性、超感染性微生物突变体的选择,对缺乏在正常细胞(包括巨噬细胞和中性粒细胞)中存活所必需的毒性因子的微生物突变体的选择,以及带有改造的细胞壁脂多糖的微生物新菌株的构建。例如,在 6.1 部分和后面描述用于分离超感染性、肿瘤特异性载体的方法中,这些相同的方法也是用于分离减毒载体的方法;超感染性、肿瘤特异性载体被定义为是减毒的。当载体是高特异性和超感染性时,

20 与非癌性对应物相比在靶细胞处发现的感染细菌数量间的差异随微生物培养物稀释度的增加而变得越来越大,使得可以使用较低滴度的微生物载体而获得阳性结果。

此外,通过经例如同源重组技术和化学或转座子诱变使编码确保微生物在宿主细胞特别是巨噬细胞和中性粒细胞内存活的毒性因子的 DNA

30 序列缺失或破坏可以将微生物减毒。例如,在沙门菌属中已经鉴别了许多这些毒性因子。许多(但不是全部)这些所研究的毒性因子与巨噬细胞中的存活有关,使得将这些因子因应激(例如,酸化)而在巨噬细胞内进行特异性表达,或将它们用于诱导的特异性宿主细胞反应,例如,巨胞饮作

用，见 Fields 等，1986，《美国国家科学院学报》83：5189 - 5193。
表 4 是沙门菌属毒性因子（如果通过同源重组技术或化学或转座子诱变而消除就产生减毒的沙门菌属）的说明性目录。

表 4

用于鼠伤寒杆菌和其它细菌的代表性毒性因子	
毒性因子或基因座, 特殊应激	参考文献
5 克服或刺激的反应	
酸化作用	Alpuche-Aranda 等, 1992
5' - 腺苷酸单磷酸	Biochenko 和 Levashev, 1987
10 溶细胞素	Libbey 等, 1994
防卫素抗性基因座	Fields 等, 1989
DNAK	Buchmeier 和 Hefferon, 1990
菌毛	Ernst 等, 1990
15 GroEL	Buchmeier 和 Hefferon, 1990
诱导的巨胞饮作用	Aipuche Aranda, 等 1994
	Ginocchio 等, 1992
20 InV 基因座	Jones 等, 1993
	Betts 和 Finlay, 1992
	Galon 和 Curtis III
	Ginocchio 等, 1992
脂蛋白	Stone 等, 1992
25 LPS	Gianeella 等, 1973
	Stone 等, 1992
溶酶体融合体抑制	Ishibashi 等, 1992
巨噬细胞存活基因座	Fields 等, 1989
氧化性应激 (Sox; 在大肠杆菌内)	Nunoshiba 等, 1993
30 PhoP 和 PhoQ	Behlau 和 Miller, 1993
	Groisman 等, 1993
	Miller 等, 1989
Pho 激活的基因 (pag; 例如, pagB 和 pagC)	Abshire 和 Neidhardt, 1993
35	Hefferon 等, 1992

		Miller 等, 1992
		Miller 等, 1989
		Pulkkinen 和 Miller ,
		1991
5		Stone 等, 1992
	PhoP 和 PhoQ 调节的基因 (prg)	Miller 等, 1989
		Behlau 和 Miller ,
		1993 ; 1994
	孔蛋白	Tufano 等, 1988
10	血清抗性肽	Hackett 等, 1987
	毒性因子	Abshir 和 Neidhart ,
		1993
		Loos 和 Wassenaar
		1994
15		Mahan 等, 1995
		Sansonetti , 1992
	毒性质粒	Gulig 和 Curtis ,
		1987
		Rhen 等, 1993
20		Riikonen 等,
		1992
	spvB (毒性质粒)	Fierer 等, 1993
	traT (毒性质粒)	Rhen 和 Sukupolvi ,
		1988
25	ty2	Elsinghorst 等, 1989
	Abshiro 等, 1993 , 《细菌学杂志》 175 : 3734 - 3743	
	Alpuche-Aranda 等, 1992 , 《美国国家科学院学报》 89 : 10079 - 83	
	Alpuche-Aranda 等, 1994 《实验药理学杂志》 179 : 601 - 6088	
30	Baumler 等, 1994 , 《感染免疫》 62 : 1623 - 1630	
	Behlau 等, 1993 , 《细菌学杂志》 175 : 4475 - 4484	
	Belden 等, 1994 , 《感染免疫》 62 : 5095 - 5101	
	Betts 等, 1992 , 《加拿大微生物学杂志》 38 : 852 - 7	
	Biochenko 等, 1987 , Bull. Eksp. Biol. Med. 103 : 190 - 2	
35	Biochenko 等, 1988 , Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 7 : 9 -	

11

Biochenko 等, 1985, Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 12: 67

- 9

Bowe 等, 1994, 《酶学方法》 236: 509 - 26

5 Buchmeier 等, 1989, 《感染免疫》 57: 1 - 7

Buchmeier 等, 1990, 《科学》 248: 730 - 732

Buchmeier 等, 1995, 《儿童调查杂志》 95: 1047 - 53

Buchmeier 等, 1993, 《分子微生物学》 7: 933 - 936

Dragunsky 等, 1989, 《生物学标准杂志》 17: 353 - 60

10 Emoto 等, 1993, 《免疫学杂志》 150: 3411 - 3420

Ernst 等, 1990, 《感染免疫》 58: 2014 - 2016

Elsinghorst 等, 1989, 《美国国家科学院学报》 86: 5173 - 5177

Fields 等, 1986, 《美国国家科学院学报》 83: 5189 - 93

Fields 等, 1989, 《科学》 243: 1059 - 62

15 Fierer 等, 1993, 《感染免疫》 61: 5231 - 5236

Gianella 等, 1973, 《感染性疾病杂志》 128: 69 - 75

Galan 等, 1989, 《微生物病原体》 6: 433 - 443

Galan 等, 1990, 《感染免疫》 58: 1879 - 1885

Chinocchio 等, 1992, 《美国国家科学院学报》 89: 5976 - 5980

20 Gulig 等, 1987, 《感染免疫》 55: 2891 - 901

Hackett 等, 1987, 《感染性疾病杂志》 155: 540 - 549

Heffernan 等, 1992, 《细菌学杂志》 174: 84 - 91

Ishibashi 等, 1992, 《微生物病原体》 13: 317 - 323

Libby 等, 1994, 《美国国家科学院学报》 91: 489 - 493

25 Loos 等, 1994, 《免疫感染》 22: 14 - 19

Mahan 等, 1995, 《美国国家科学院学报》 92: 669 - 673

Miller 等, 1989, 《美国国家科学院学报》 86: 5054 - 5058

Miller 等, 1992, 《感染免疫》 60: 3763 - 3770

Nunoshiba 等, 1993, 《美国国家科学院学报》 90: 9993 - 9997

30 Pollack 等, 1986, 《自然》, 322: 834 - 836

Pulkkinen 和 Miller, 1991, 《细菌学杂志》 173: 86 - 93

Rhen 等, 1993, 《分子微生物学》 10: 45 - 56

Rhen 等, 1988, 《微生物病原体》 5: 275 - 285

Riikonen 等, 1992, 《微生物病原体》 13: 282 - 291

Sansonetti, 1992, Rev. Prat. 42: 2263 - 3367

Stone 等, 1992, 《细菌学杂志》 174: 3945 - 3952

Tufano 等, 1988, 《欧洲流行病学杂志》 4: 110 - 114

- 5 用于所分离载体减毒的另一种方法是修饰可导致微生物毒性的微生物成分。例如, 脂多糖 (LPS) 或内毒素是主要导致细菌性脓毒病病理反应的原因。导致这一反应的 LPS 成分是脂质 A (LA)。LA 毒性作用的消除或缓和产生减毒的细菌, 因为 1) 病人中脓毒性休克的危害减轻了和 2) 可耐受较高水平的细菌载体。球形红假单胞菌 (红假单胞菌属) 和
- 10 荚膜红假单胞菌属每种都具有一种在实验性动物体内不引起脓毒性休克反应的单磷酸基脂质 A (MLA), 并且进一步是一种内毒素拮抗剂。
- Loppnow 等, 1990, 《感染免疫》 58: 3743 - 3750; Takayma 等, 1989, 《感染免疫》 57: 1336 - 1338。

- 球形红假单胞菌和其它革兰氏阴性菌间脂质代谢基因的脂质代谢
- 15 和遗传组织中已知的相似性以及红色细菌基因弥补大肠杆菌突变的能力 (Benning 和 Somerville, 1992 (A), 《细菌学杂志》 174: 6479 - 6487; 1992 (B), 《细菌学杂志》 174: 2352 - 2360; Carty 等, 1994, FEMS Microbiol. Lett. 118 (3): 227 - 231) 表明: 例如, 可以将沙门菌属和其它细菌进行遗传改造以产生 MLA, 由此降低其诱发脓
- 20 毒性休克的潜力。本发明优选的实施方案在于一种表达 MLA 而不是 LA 且还在肿瘤特异性启动子控制下表达 HSV TK 的沙门菌属的菌株。

- 作为一个说明性实例, 产生 MLA 的大肠杆菌或鼠伤寒杆菌的生成要求构建一种由来自球形红假单胞菌的 10 KB 片段组成的 DNA 基因文库, 所述的球形红假单胞菌在 λ gtlI 和 pUC19 质粒中产生并转染入大肠杆
- 25 菌。通过使用一种抗体筛选方法来对产生 MLA 的克隆进行阳性选择以检测 MLA, 诸如 ELISA。在另一个实例中, 在 pSuperCos 中生成一个由来自球形红假单胞菌的 40 KB DNA 片段组成的粘粒文库, 然后转染入鼠伤寒杆菌。通过使用一种检测 MLA 的抗体筛选方法诸如 ELISA 来对产生 MLA 的克隆进行阳性选择。

- 30 用于改造沙门菌属 LPS 的另一个实例涉及将突变引入 LPS 生物合成途径中。在大肠杆菌和鼠伤寒杆菌中控制它们的 LPS 生物合成的几个酶促步骤和遗传基因座已经得到了鉴别 (Raetz, 1993, 《细菌学杂志》 175: 5745 - 5753 和其中的参考文献)。在 LPS 途径中使用遗传的和酶的损伤已经将鼠伤寒杆菌和大肠杆菌的几个突变体菌株分离。一种这样的

突变体 *firA* 在编码酶 UDP - 3 - O (R - 30 羟基豆蔻酰) - 胍基乙酸 N - 酰基转移酶的基因中突变, 该酶可调节内毒素生物合成中的第三步 (Kelley 等, 1993, 《生物化学杂志》 268: 19866 - 19874)。具有这类突变的鼠伤寒杆菌和大肠杆菌产生一种不同于野生型脂质 A 的脂质 A, 不同点在于它含有一种 17 脂肪酸, 一种十六烷酸 (Roy 和 Coleman, 1994, 《细菌学杂志》 176: 1639 - 1646)。Roy 和 Coleman 证明: 除了在内毒素的生物合成中阻断第三步外, *firA* 突变还降低了调节脂质 A 生物合成第六步的脂质 A 4' 激酶的酶促活性。

一旦用本领域公知的任何方法将菌株进行减毒, 那么减毒表型的稳定性是重要的, 它使得在病人的治疗过程中, 菌株不能回复至更有毒性的表型。例如, 只要通过在染色体水平上而不是在上位的缺失或其它非回复性突变而破坏毒性基因或将“自杀基因”稳定地整合入细菌染色体, 那么可以获得这样的稳定性。

确保减毒表型的另一种方法是改造细菌, 以使用一种以上的方式将它进行减毒, 例如, 一种脂质 A 生产途径中的突变, 诸如 *firA* 突变 (Hirvas 等, 1991, 《欧洲分子生物学协会杂志》 10: 1017 - 1023), 以及对于一种或多种营养物或代谢物的营养缺陷体的一种或多种突变, 诸如尿嘧啶的生物合成, 嘌呤的生物合成和精氨酸的生物合成, 正如 Bochner 在 1980, 《细菌性杂志》 143: 926 - 933 中所述。在本发明一个更优选的实施方案中, 选择以肿瘤为靶并表达药物前体转化酶的细菌载体对于尿嘧啶, 芳香氨基酸, 异亮氨酸和缬氨酸来说是营养缺陷型的且能合成一种改变的脂质 A。

6.3. 使用分离载体和其它载体的体外癌症诊断和实体肿瘤的体内治

疗

6.3.1. 体外诊断

本发明的一个实施方案是提供将本发明载体用于实体肿瘤癌 (包括但不限于黑素瘤) 的体外诊断检测和和诊断试剂盒的方法。此外, 该试剂盒可以包括肿瘤特异性非减毒的载体。体外诊断检测和试剂盒以载体对癌细胞而不是对其非癌性对应细胞增强的特异性为基础。例如 (而决不限于), 从病人体内对推定的实体肿瘤进行活检。将肿瘤活检组织切碎比并消化成一种单细胞悬浮液。将等份的悬浮液和非癌性对应或对照细胞进行培养并用一种根据本发明的肿瘤特异性载体进行感染。

在一个培养期后, 通过本领域技术人员公知的任何方法来测定与非

癌性对应或对照细胞相比附着和/或感染活检细胞的肿瘤特异性微生物的数量。与非癌性对应或对照细胞相比发现的与靶细胞相联的载体数量较高表明靶细胞是癌性的，例如，与非癌性对照细胞相比，约 5 - 10 倍的载体感染肿瘤细胞。非癌性对应或对照细胞是肿瘤细胞来源的正常细胞，例如，
5 对于黑素瘤细胞来说，非癌性对应或对照细胞是黑素细胞，对于结肠癌来说，对应细胞是结肠上皮细胞。在一个实施方案中，测定载体/靶细胞的数量比率。在另一个实施方案中，在感染后，将细胞固定并用一种识别 DNA 的染色剂或抗体进行处理，以便使靶细胞细胞质中含有的载体 DNA 可见。靶细胞细胞质中 DNA 的存在表明活检的靶细胞是癌性的。在本发明的一个
10 实施方案中，，诊断方法包括将怀疑是癌细胞的细胞样品置于肿瘤特异性载体或微生物环境中。该方法还包括将非癌性对应细胞样品置于肿瘤特异性载体或微生物环境中作为比较对照组。在培养一段微生物可以附着和/或感染癌细胞的时间后，可以对怀疑是癌性细胞和非癌性对应对照细胞的微生物或载体的感染性进行比较。

15 本发明的诊断试剂盒包括一种有效量的肿瘤特异性载体。该试剂盒可以进一步包括一种合适量的非癌性对照细胞。可以将载体/或细胞进行冰冻，冻干或在固体培养基上或液体培养基中生长。该诊断试剂盒可以进一步包括惰性组分和其它试剂盒成分，诸如小瓶，包装成分等，它们对本领域技术人员来说是众所周知的。

20 在某些实施方案中，用于本发明诊断方法的有用载体可以进一步包括肿瘤特异性、减毒的或非减毒的载体。在其它的实施方案中，本发明的试剂盒可以包括肿瘤特异性、减毒的或非减毒的载体。

对于实体肿瘤癌症（包括但不限于黑素瘤）的体外诊断的说明性实施例来说，参见第 22， 25 和 26 部分。

25 6.3.2. 实体肿瘤的体内治疗

用于体内癌症治疗的载体是本发明载体的亚群。已经将用于体内治疗的载体进行了减毒，使得当用它们对宿主进行给药时，载体已经具有较低的毒性并更容易从宿主系统中除去。在一个优选的实施方案中，载体对于
30 靶肿瘤细胞来说是超感染性的、减毒的和特异性的。在一个更优选的实施方案中，载体对广范围的抗菌素也是敏感的。

此外，所分离的载体可以编码“自杀基因”，诸如药物前体转化酶或其它基因，它们由载体在靶肿瘤中或接近靶肿瘤处进行表达和分泌。该基因可以处于组成型，诱导型或细胞型特异性启动子的控制下。在一个优

选的实施方案中, 仅当载体已经侵入靶肿瘤细胞的细胞质时将自杀基因进行表达和分泌, 由此限制了由于自杀基因表达到肿瘤靶向位点的影响。

在一个优选的实施方案中, 载体(将它对宿主给药)表达 HSV TK 基因。在 TK 基因的表达和将 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤对宿主给药同时发生时, 将 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤在可自由透入核苷酸三磷酸的微生物的周质中磷酸化。磷酸化的 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤(一种毒性错误的 DNA 前体)可以很容易地离开微生物的周质壁并进入宿主细胞的细胞质和细胞核, 在那里它掺入宿主细胞的 DNA, 由此导致宿主细胞的死亡。

10 本发明的另一个实施方案是提供用本发明分离的减毒载体治疗实体肿瘤癌的方法。例如, 用本领域任何公知的方法(包括本发明的体外诊断法)来诊断患有实体肿瘤癌症的病人。使用带有靶细胞系的本发明方法或使用靶组织小鼠体内模型肿瘤已经可以分离治疗中所用的载体。在另一个实施方案中, 将活检的肿瘤细胞用于分离一种载体的选择性检测, 该载体对于病人的肿瘤来说是超感染性和肿瘤特异性的。在一个优选的实施方案中, 将载体进行遗传修饰, 例如, 以便如 6.2.2 部分中所述使毒性因子缺失, 表达一种自杀基因或两者兼而有之。此外, 分析所分离载体对抗菌素的敏感性, 以便在成功地治疗后或如果因将所分离载体进行给药导致病人发生并发症而确保载体从病人体内消除。

20 当对患者(例如, 对于兽医使用来说是针对一种动物或对于临床使用来说是针对人)进行给药时, 可以将载体单独使用或将载体与任何生理学载体结合, 诸如水, 水溶液, 生理盐水, 或其它生理上可接受的赋形剂。一般来说, 剂量范围从大约 $1 - 1 \times 10^8$ c.f.u./kg, 优选约 $1 - 1 \times 10^2$ /kg。

25 可以将本发明的载体通过许多途径来进行给药, 包括但不限于口服, 局部, 注射包括但不限于静脉注射, 腹膜内注射, 皮下注射, 肌肉注射, 肿瘤内注射即直接注射入肿瘤, 等。

下面的一系列实施例以说明而决不限定本发明范围的形式提供。

7. 实施例: 超感染性、肿瘤特异性鼠伤寒杆菌的体外分离

30 7.1. 超感染性、肿瘤特异性克隆分离前的诱变

在 37°C 时, 将鼠伤寒杆菌菌株 # 14028 在基础培养基 56 加甘油 (0.5%) 中按指数规律生长至 $OD^{600} = 0.3$, 然后将它在冰上冷冻。取出等份的样品以便在 LB 琼脂平板上滴定培养物的菌落形成单位 (c.f.u.)。将培养物进行洗涤并重新悬浮在柠檬酸钠 (0.1M, pH5.5) 中, 用新鲜的

亚硝基胍 (NG, $50 \mu\text{g/ml}$, 20 分钟, 37°C) 培养, 通过离心洗涤一次, 重新悬浮在培养基 56 中, 冷冻, 并再次取出等份样品以便在 LB 琼脂平板上滴定培养物的 c.f.u.。将另一等份的 NG 处理的细菌稀释 (1: 5) 入 LB 肉汤中并生长至静止期而用于在 -80°C , 12 % 甘油中冷冻保藏。

- 5 将剩余的细菌用紫外线 (剂量 = 50J/m^2 , $\lambda = 254\text{nm}$) 照射。取出等份的样品并在 LB 琼脂平板上滴定细胞的 c.f.u., 将另一等份的样品按 1: 4 稀释入 LB 肉汤, 生长至静止期, 并在 -80°C , 12 % 甘油中冷冻保藏。

- 10 诱变过程通过四个标准在菌株中产生增加的突变数量: 1) 在诱变后减少存活的细菌 (亚硝基胍 = 6 倍; 紫外线 B 照射 = 400 倍); 2) 营养缺陷型 (需要营养) 突变体的增加率达 (2 %); 3) 麦芽糖突变体的增加率达 (2 %); 4) 半乳糖突变体的增加率达 (0.5 %)。

7.2. 特别用于癌细胞的超感染性鼠伤寒杆菌克隆 #70 和 #71 的分离

- 15 如 7.1 部分所述, 用亚硝基胍和 UV 照射将鼠伤寒杆菌野生型菌株 #14028 进行诱变。简单地说, 在 37°C 时, 将细菌在基础培养基 56 加甘油 (0.5 %) 中按指数规律生长至 $\text{OD}^{600} = 0.3$, 在冰上冷冻, 洗涤, 重新悬浮在含有 $50 \mu\text{g/ml}$ 亚硝基胍的柠檬酸钠中并在 37°C 下培养 20 分钟。通过离心将细菌洗涤一次并重新悬浮在培养基 56 中。然后将细菌用 UV 线以
- 20 50J/m^2 , $\lambda = 254\text{nm}$ 的剂量照射。

- 在用沙门菌属感染前, 将人 M2 黑素瘤细胞按约 2×10^5 细胞/烧瓶的量接种入 Corning 组织培养瓶 (25cm^2) 中的 4 ml 含青霉素 (100 单位/ml) 和链霉素 ($100 \mu\text{g/ml}$) 的 DMEM 细胞培养物培养基内, 并在 37°C 、通气 (5 % CO_2)、加湿培养箱中培养过夜。第 2 天将细胞用预加温
- 25 的补充了 10 % 胎牛血清而无抗菌素的 Dulbecco 极限必需培养基 (DMEM/FBS) 冲洗两次。

- 在 37°C 时, 将鼠伤寒杆菌的突变群体在 LB 琼脂上或液体培养物中培养过夜。1 天后用一个铂金圈将细菌转移至 LB 肉汤或 DMEM/FBS 中, 将浓度调整至 $\text{OD}^{600} = 0.1$ (约 2×10^8 c.f.u./ml), 并在 37°C 下,
- 30 使细菌在一种旋转器上进行进一步生长。在生长至所需的群体密度 (在光密度为 600nm 处监测) 后, 将细菌在 DMEM/FBS 中稀释至浓度为 10^6 c.f.u./ml, 并在 37°C 下再培养 20 分钟。

将诱变的细菌群体进行感染入培养物中人 M2 黑素瘤细胞并从其中分离的单循环。诱变的群体部分在琼脂上克隆生长, 且分别分离 20 个克隆

的鼠伤寒杆菌并检测它们每个个体对人 M2 黑素瘤细胞的感染性。将细菌按 4 ml/瓶加入到 25 cm² Corning 组织培养瓶内的动物细胞培养物中, 并在 37· C、通气 (5 % CO₂/95 % 空气)、加湿培养箱中用动物细胞进行培养。用动物细胞培养 15 分钟后, 将含有细菌的培养基倾出并将培养物用加温的含有硫酸庆大霉素 (20 μ g/ml) 的 DMEM/FBS (4 ml) 缓慢地冲洗, 所述的硫酸庆大霉素是一种可杀死胞外而不是胞内细菌的抗菌素。将含有硫酸庆大霉素的培养基倾出, 将新鲜的 DMEM/FBS/硫酸庆大霉素培养基加入, 并将细胞在 37· C 下培养 60 分钟。在用硫酸庆大霉素培养 60 分钟后, 将培养基倾出, 用 DMEM/FBS (不含硫酸庆大霉素) 冲洗培养瓶 1x, 并加入溶于游离有 Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ 生理盐水 (4ml) 的 1mM EDTA 或 EDTA/胰蛋白酶溶液 (Sigma 化学公司, 1x)。在 37· C 下用 EDTA 或 EDTA/胰蛋白酶培养 20 分钟后, 振荡培养瓶使动物细胞悬浮, 并取出等份的样品用于定量。在 Coulter 计数器 (Coulter 电子仪器有限公司) 中将动物细胞定量并通过在 LB 琼脂上涂布等份的样品, 在 37· C 下培养且对克隆计数而将细菌进行定量。将定量表示为感染 (抗庆大霉素) 细菌数量/10⁶ 动物细胞。

发现两种克隆 (“ 70 ” 和 “ 71 ”) 是超感染性的黑素瘤细胞, 它们具有比诱变的野生型菌株 (没有列出数据) 高 5 - 10 倍的感染能力。还评价克隆 70 和 71 在培养物中以下的人体细胞的相对特异性: 表 4 (A) 中所述的 M2 黑素瘤细胞和正常人黑素细胞; “ CaCo ” 结肠癌细胞和正常人体结肠上皮 #1790。

表 4 (A)

鼠伤寒杆菌特异性侵入细胞培养物中黑素瘤与黑素细胞和结肠癌与结肠上皮的比较: 克隆 “ 70 ” 和 “ 71 ” *

人 细胞系	感染沙门菌属/10 ⁶		人体细胞:	
	克隆 70	(比率) *	克隆 71	(比率) *
正常	1.4 ± 0.2 × 10 ⁶	-	1.2 ± 0.3 × 10 ⁶	
黑素细胞				
M2	7.3 ± 2.0 × 10 ⁶	(5.2)	5.7 ± 0.7 × 10 ⁶	(4.8)
黑素瘤				
结肠 上皮 (#1790)	1.5 ± 0.1 × 10 ⁶		0.8 ± 0.2 × 10 ⁶	
结肠	7.2 ± 2.0 × 10 ⁶	(4.8)	2.3 ± 0.3 × 10 ⁶	(2.9)

癌
(CaCo)

*癌细胞: 正常对应细胞

5 * 结果代表平均值 $\pm$ 三次感染的 SD.

细菌克隆#70 和#71 表现出对黑素瘤和结肠癌细胞的侵染优先性强于对正常黑素细胞和正常结肠上皮细胞。

10 7.3. 经在体外细胞培养物中的循环而进行的鼠伤寒杆菌超感染性克隆#72

的分离

如 7.1. 部分所述用亚硝基胍和紫外线 B 照射将沙门菌属野生型菌株 #14028 进行诱变。使 5×10^8 诱变细菌的起始群体生长至 $OD_{600} = .450$,
15 将它在 DMEM/FBS 中稀释至浓度为 5×10^7 c.f.u./ml, 并使它感染人 M2 黑素瘤细胞 15 分钟。将感染的细菌从黑素瘤细胞中分离, 并再次使它感染新鲜的、未感染的黑素瘤细胞群体。将经第二轮循环的感染细菌再次分离并进行进一步感染入人 M2 黑素瘤细胞且从其中分离的循环。在完成 4 个这样的循环后, 将命名为 14028^{pop-1} 的黑素瘤循环细菌的群体涂板在琼脂
20 上, 并挑出 100 个独立的克隆且检测它们 (与野生型细菌相比) 感染 M2 黑素瘤细胞的能力。对 14028^{pop-1} 的选择过程的结果和所选群体的亚克隆详细地列在在表 5 中。

另外, 将等份的 14028^{pop-1} 在 M2 黑素瘤细胞中进行两个进一步的循环。然后将这种 6 次循环的群体对照正常人黑素细胞进行 7 个循环的阴性选择。将 6 次循环的群体加入正常人黑素细胞的培养物中并培养 15 分钟。收集上清液并将它加回到正常人黑素细胞的新鲜培养物中。将这种阴性选择过程进行 7 次。将这种 6 次 - 7 次循环的群体再次加入 M2 黑素瘤细胞中, 使它感染黑素瘤细胞 15 分钟, 并从 M2 细胞中收集细菌。将这种 6 次 - 7 次 - 1 次循环的群体命名为 14028^{pop-2} 。

30 4 次循环的鼠伤寒杆菌混合群体 (命名为 14028^{pop-1}) 表现出对黑素瘤细胞的感染性比野生型细菌的起始诱变群体增加了 3 倍。在 100 个从沙门菌属的群体 14028^{pop-1} 中分离的克隆中, 发现两种克隆 (#6 和 #72) 是显著超感染性的黑素瘤细胞。剩余的细菌克隆表现出类似或低于野生型菌株的感染性。在表 5 所列的实验中, 在 15 分钟的感染期过程中, 克隆 #6 的
35 感染性比诱变的野生型菌株高约 25 倍, 且克隆 #72 的感染性比诱变的野生

型菌株高约 55 倍。大肠杆菌（菌株 K - 12，#CSH 101）的感染性至少比野生型鼠伤寒杆菌低两个数量级，因此，证明了鼠伤寒杆菌感染某些动物细胞的天然能力。

5

表 5		
M2 人黑素瘤细胞与各种培养物* 中分离的鼠伤寒杆菌群体的感染		
沙门菌属		
菌株	感染细菌/10 ⁶	黑素瘤细胞 (% 野生型)
10 野生型	3.8 ± 3.0 × 10 ⁴	100
鼠伤寒杆菌		
#14028		
(诱变的)		
#14028 ^{pop-1}	1.1 ± 0.4 × 10 ⁵	290
15 克隆#6	8.6 ± 1.0 × 10 ⁶	2260
克隆#72	2.1 ± 0.2 × 10 ⁶	5500
大肠杆菌	<10 ²	<1
K - 12		

20

* 结果代表平均值 ± 三次感染的 SD

在表 5 所示的几个这样的实验中，克隆#72 超出野生型菌株对黑素瘤细胞的感染性可以在 5 - 90 倍的范围内变化。这种变化看来取决于黑素瘤细胞感染前细菌生长的密度。因此，测定群体密度对野生型和克隆#72 之间相对感染性的影响。

25

野生型鼠伤寒杆菌和超感染性克隆#72 在 LB 琼脂平板上作为一种菌苔生长。用铂金圈取出部分培养物并将它们按约 2 × 10⁸ c.f.u./ml (OD⁶⁰⁰=0.1) 的浓度接种入 LB 肉汤。然后在 37 · C 下将培养物放在旋转器上并监测光密度作为群体密度的函数。在指定的光密度处，将等份的

30

细菌取出，在黑素瘤生长培养基 (DMEM/10 % FBS) 中稀释至密度为 1 × 10⁶ c.f.u./ml，并使它感染人 M2 黑素瘤细胞。如上所述进行感染性测定。结果见表 6。

表 6

野生型鼠伤寒杆菌和超感染性克隆#72 对人黑素瘤细胞的感染性：细菌群体密度⁺的作用

	光密度： (600nm)	沙门菌属/10 ⁶ 黑素瘤细胞		感染比率：
		克隆#72	野生型	(克隆#72： 野生型)
5	0.200	-0-	-0-	(无感染性)
	0.300	9.0 × 10 ³	-0-	(不确定)
	0.400	5.0 × 10 ⁴	-0-	(不确定)
	0.500	4.5 × 10 ⁵	5.0 × 10 ³	90： 1
	0.600	1.2 × 10 ⁶	3.7 × 10 ⁴	32： 1
10	0.700	2.3 × 10 ⁶	2.5 × 10 ⁵	9： 1
	0.800	3.2 × 10 ⁶	5.6 × 10 ⁵	6： 1
	0.900	3.6 × 10 ⁶	7.3 × 10 ⁵	5： 1

⁺ 结果代表两次实验的平均值。两次间的偏差 < ± 15%

结果表明两种细菌菌株的感染性高度取决于感染前细菌群体的密度，然而，在低群体密度时，克隆#72 按比例比野生型菌株的感染性更强。

表 5 和 6 中所示的结果还通过相差和光学显微镜检得到了证明，所述的相差和光学显微镜检揭示了附图 2 和 3 中所示命名为“ M10 ”的鼠伤寒杆菌 10x 黑素瘤循环的群体的超感染性。

还发现感染前当野生型菌株 14028 和克隆 72 在厌氧条件下生长时，它们可同样好地感染人 M2 肿瘤细胞。然而，当菌株在需氧条件下生长时，菌株 14028 的感染性受到了强烈地抑制，而克隆 72 仍保持了诱变的状态。因此，克隆 72 在厌氧或需氧生长条件下都是感染性的且与需氧生长条件下的野生型相比是超感染性的。

7.4.鼠伤寒杆菌对癌细胞的优先选择性：野生型菌株与超感染性克隆#72 比较

将 7.3 部分中分离的超感染性鼠伤寒杆菌克隆#72 与非诱变的野生型菌株#14028 在对人 M2 黑素瘤细胞，正常人体黑素细胞，结肠癌细胞和正常结肠上皮的相对感染性方面进行比较。结果见表 7。

表 7

培养物* 中野生型鼠伤寒杆菌和超感染性克隆#72 对各种正常和癌细胞的肿瘤特异性

5	动物	感染沙门菌属/ 10 ⁶ 动物细胞			
	细胞系	野生型	(比率) *	克隆#72	(比率) *
10	正常	1.2 ± 0.7 × 10 ⁴		2.7 ± 0.4 × 10 ⁵	
	黑素细胞 (包皮, 人)				
	M2 人 黑素瘤	2.5 ± 0.6 × 10 ⁴	(2.1)	1.7 ± 1.1 × 10 ⁶	(6.3)
15	正常	6.6 ± 0.8 × 10 ³		5.2 ± 3.0 × 10 ⁵	
	结肠 上皮 (1790 , 人)				
	结肠癌 (HTB39 , 人)	3.0 ± 2.0 × 10 ⁴	(4.6)	9.5 ± 3.0 × 10 ⁵	(1.8)
20	“ 正常 ”	1.8 ± 0.8 × 10 ³		5.5 ± 1.4 × 10 ⁵	
	成纤维 细胞 (3T3 , 小鼠)				
	转化的 巨噬细胞 (J774 , 小鼠)	2.4 ± 0.6 × 10 ⁴	(1.3)	4.6 ± 0.8 × 10 ⁶	(8.4)
30					

* 结果代表平均值 ± 三次感染的 SD

* 癌细胞: 正常对应细胞

两种细菌菌株中的每一种显示出超过对正常细胞的对人癌细胞的
35 优先侵染性都。当与野生型菌株比较时, 在所有情况中克隆#72 都是超感
染性的。此外, 克隆#72 表现出对人黑素瘤细胞超过对正常黑素细胞的侵
染特异性明显地比野生型菌株表现出的程度高。

7.5.培养物中鼠伤寒杆菌野生型菌株 14028 和超感染性

克隆 72 对各种人体癌细胞的感染性

在另一系列的实验中，测定了克隆 72 和野生型菌株 14028 对各种培养物中生长的人体癌的相对感染性。所用的实验方案如 7.2.部分所述。结果列在表 7（A）中。

表 7（A）

培养物中鼠伤寒杆菌野生型和超感染性克隆 72 对各种人体癌的感染性					
沙门菌属/10 ⁶ 人体细胞					
细胞系	原代肿瘤 的来源	野生型:	克隆#	比率	
		14028	72	72 :	14028
M2	黑素瘤	4.0 ± 3.8 × 10 ⁴	4.2 ± 3.5 × 10 ⁵	11:1	
HTB57	肺	2.8 ± 1.3 × 10 ³	4.5 ± 2.1 × 10 ⁴	16:1	
HTB183	肺	1.0 ± 0.3 × 10 ⁵	4.1 ± 1.8 × 10 ⁵	4:1	
HTB54	肺	2.1 ± 0.7 × 10 ⁴	1.7 ± 0.2 × 10 ⁵	8:1	
A549	肺	3.7 ± 5.6 × 10 ⁴	4.5 ± 4.9 × 10 ⁵	12:1	
CRL1740	前列腺	2.3 ± 0.4 × 10 ⁵	1.8 ± 0.2 × 10 ⁶	8:1	
CRL1611	肾	3.2 ± 1.2 × 10 ⁵	1.8 ± 0.2 × 10 ⁵	6:1	
HTB52	肝	1.8 ± 0.3 × 10 ⁵	2.6 ± 0.8 × 10 ⁵	1.4:1	
MCF7	乳腺	7.3 ± 2.6 × 10 ⁴	3.6 ± 0.9 × 10 ⁵	5:1	

结果代表平均值 ± n = 3 - 9 次分别感染的 SD。

野生型菌株 14028 和克隆#72 均能够感染培养物中检测的人体癌细胞。在所有情况中，克隆 72 与野生型菌株相比均是超感染性的。

然而，当与其它所检测的癌细胞系相比时，人肺细胞系 HTB57 对鼠伤寒杆菌感染性的接受能力要显著的低。在另一系列实验中，将人肺细胞系 HTB57 移植入小鼠体内。在植入了 1 × 10⁷HTB57 细胞的全部 10 只 nu/nu 小鼠中，甚至在几个月后，没有观察到肿瘤“产生”。当这些细胞作为肿瘤生长时是否接受鼠伤寒杆菌的感染尚未测定。

7.6.讨论

总之，结果表明如下： a) 鼠伤寒杆菌的感染性取决于细菌的群体密度和 b)在需氧生长条件下，在所有细菌群体密度且特别是低群体密度时，超感染性克隆#72 与野生型菌株的区别在于其对黑素瘤细胞的感染性增加。在低群体密度时感染的能力在将克隆#72 用作肿瘤特异性载体的过程中是一个优点，这是因为它使得将较低 c.f.u.的细菌接种入癌症病人，由

此减少了病人体内脓毒性休克的危险。另外, 该结果证实了用于鼠伤寒杆菌的超感染性、肿瘤特异性突变体分离的方法。这类突变体由克隆#6, #70, #71 和#72 所代表, 对于细菌的黑素瘤感染性来说, 将这些克隆经富集过程分离。结果进一步表明在培养物中野生型鼠伤寒杆菌表现出对人体癌细胞的特异性要超过对正常人体细胞。此外, 尽管最初选择了克隆 72 对人黑素瘤细胞系 M2 的超感染性, 但是另外还发现当与野生型菌株 14028 比较时, 它对人体结肠癌细胞和转化的小鼠巨噬细胞也是超感染性的 (见表 7)。所分离的突变体克隆的超感染性和肿瘤特异性表达代表细菌的减毒且对于在人体癌症的诊断和治疗中将这类沙门菌属克隆用作肿瘤特异性载体来说存在明显的优点。

8. 实施例: 对黑素瘤分泌产物具有趋化能力的鼠伤寒杆菌突变体的体外选

择

黑素瘤细胞是一种人工生产的杂交系, 该杂交系是从聚乙二醇诱导的 Cloudman S91 小鼠黑素瘤细胞和来自 DBA/2J 小鼠的腹膜巨噬细胞间的融合体中分离的。将本文中所用的杂交细胞系称作 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交#48。该杂交细胞系在 DBA/2J 小鼠体内形成快速生长的转移肿瘤。见, Pawelek 等, 1995, 《皮肤病学调查杂志》 104: 605。在 30 C 时, 将 5×10^6 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交#48 细胞在一种通气、加湿培养箱中的 75cm² 培养瓶内的 DMEM/FBS 培养物培养基中进行培养, 所述的培养基含有 10 % 胎牛血清且不含抗菌素。将含有 DMEM/FBS 而不含黑素瘤细胞的对照瓶平行地培养。72 小时后, 将培养基取出, 通过 0.45 μ 的滤器进行无菌过滤, 并在 4 C 下保存。

用亚硝基胍和 UV 将如上所述的鼠伤寒杆菌超感染性克隆#72 进行诱变。诱变过程产生的克隆#72 中突变数量的增加类似于前面所示当将野生型菌株#14028 进行诱变时的情况。将这种克隆 72 的诱变群体 (“72^{mut}”) 进一步用于对于具有对黑素瘤细胞分泌产物 (即黑素瘤条件培养物培养基) 增强的趋化能力的突变体进行选择。

用潜在的趋化引诱剂装载毛细管的过程由 Adler 进行了修改 (Adler, 1973, 《普通微生物学杂志》 74: 77 - 91)。如上所述, 将对照和黑素瘤条件培养基 (如上所述) 装入如 Adler 所述的 2 λ 毛细管 (“微细管”, Drummond 科学公司)。用镊子挟住毛细管。将一端用火焰熔封; 然后将毛细管快速通过火焰几次并立即将开口端向下插入装有 1

ml 对照或黑素瘤条件培养基的 10ml 烧杯中。当毛细管冷却时（约 10 分钟），液体吸入了约 1cm。

通过离心收集在 37· C 下 LB 中生长的鼠伤寒杆菌并将它重新悬浮在含有 10⁸c.f.u./ml 浓度的对照 DMEM/FBS 培养基中。将等份的样品（200 μ l, 2 × 10⁷c.f.u.）吸入到 1.5ml 微量离心管中。然后将装满的毛细管（如上所述）开口端向下插入装有鼠伤寒杆菌的 Beckman 微量离心管中，并通过在 37· C 下进行培养而开始进行检测。30 - 60 分钟后，用镊子将毛细管取出，用金属钳将熔封端打破，并将毛细管转入装有 3 mlLB 肉汤的 15ml 锥形离心管中。重要的是将毛细管的上端用 LB 肉汤覆盖以便确保通过如下所述的离心步骤定量回收细菌。然后将离心管中的毛细管离心（1000x，4 分钟）以迫使细菌脱离毛细管。通过涡流旋转而将细菌重新悬浮，并将等份的样品涂布在 LB 琼脂平板上用于定量。与装有对照条件培养基的毛细管相比，进入装有黑素瘤条件培养基毛细管的细菌数量上的显著增加显示出细菌对黑素瘤分泌的产物的趋化反应。

在 37· C 时，将等份的如上所述诱变的超感染性鼠伤寒杆菌（“72^{mut}”）放在一种旋转器上，使它们生长至在波长为 600nm 处光密度为 0.4 - 0.6，并进行如上所述的趋化过程。通过用黑素瘤条件培养基成功地攻击而将趋化循环过程重复 4 次。将 4 次循环后获得的群体命名为 #72^{pop-2}。在第 4 次循环后，将等份的细菌混合群体在甘油中冷冻。将另外从第 4 次循环中获得的等份鼠伤寒杆菌混合群体与未循环的诱变克隆 72（“72^{mut}”）的混合群体比较向对照和黑素瘤条件培养基的相对趋化能力。结果见表 8。

表 8

鼠伤寒杆菌对所培养黑素瘤细胞*的条件生长培养基的阳性趋化反应的证据

沙门菌属 菌株	细菌/毛细管: 对照培养基	条件培养基	比率:
#72 ^{mut} (诱变的, 未循环)	1.2 × 10 ³ ± 0.2	4.4 × 10 ³ ± 2.7	3.7:1
#72 ^{pop-2} (诱变的, 已循环 4x)	0.5 × 10 ³ ± 0.1	1.8 × 10 ³ ± 0.4	3.6:1

* 结果代表平均值 ± 四份毛细管样品的 SD。

所试验的两种细菌群体表现出对黑素瘤条件培养基的阳性趋化反应超过对照条件培养基, 这表明对黑素瘤条件培养基接近 4: 1 的优选性。尽管群体#72^{pop-2}对黑素瘤条件培养基的趋化反应与群体#72^{mut}对黑素瘤条件培养基的趋化反应相比没有统计学差异, 但是群体#72^{pop-2}对对照培养基的趋化反应比群体#72^{mut}对对照培养基的趋化反应显著减少了。所以, 群体#72^{pop-2}进入装有对照培养基的毛细管的倾向显著地减少了。这些结果表明一般来说群体#72^{pop-2}的移动性是低效的, 然而, 在将它置于黑素瘤条件培养基中时, 群体#72^{pop-2}表现出与对照群体相同的趋化反应。

对于由表 8 中细菌#72^{mut}和#72^{pop-2}群体表达的不同趋化表型来说, 无论机理如何, 结果都表明可以通过将细菌置于黑素瘤条件培养基的成功攻击中的选择过程来改造该表型。对于对黑素瘤细胞条件培养基的趋化反应来说, 很可能在这些实验中分离的诱变、趋化循环的细菌混合群体含有许多表达同样是不同表型的不同突变体。

15 9. 实施例: 经患肿瘤小鼠体内循环的鼠伤寒杆菌肿瘤特异性突变体的分离

将接种入 DBA/2J 小鼠的来自 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交细胞系#48 的肿瘤细胞用作减毒、肿瘤特异性鼠伤寒杆菌选择的靶肿瘤。用如 7.1. 部分所述的亚硝基胍和 UVB 将超感染性鼠伤寒杆菌克隆#72 进行诱变, 产生来源于克隆#72 的诱变群体。该诱变过程产生的克隆#72 中突变数量上的增加类似于前面所示当将野生型菌株#14028 诱变的情况。将 Cloudman 黑素瘤/巨噬细胞杂交#48 细胞接种 (皮下) 入 DBA/2J 小鼠, 浓度为 0.1ml 生理盐水中 10^6 细胞/接种点, 且在上背和胁腹区中总数为 4 个接种点/小鼠。8 - 10 天后, 形成可触摸到的肿瘤, 给小鼠接种 (经腹膜内) 来源于超感染性克隆#72 的诱变沙门菌属群体。感染 2 小时后, 将小鼠处死, 取出肿瘤, 称重, 并将它在一种特氟隆匀浆器内的 5 个体积 (vol/wt) LB 肉汤中匀浆。然后将等份的匀浆产物在 LB 肉汤中稀释成约 1: 4, 在 37 °C 时, 将它们放在一种旋转器上, 并通过 1 - 2 个群体倍增时间进行培养, 应在 OD^{600} 处对它们进行监测, 以便对于成功地接种患肿瘤小鼠来说确保存活细菌的回收。通过 4 个对小鼠感染的循环来重复该过程, 随后从肿瘤中回收。在每一循环的开始, 把接种的细菌数量和感染时间比前次循环减少, 以便增加对肿瘤特异性突变体选择的严格性。将 4 个循环后回收获得的群体命名为#72^{pop-1}。这一过程的结果在下面的表 9 中详细描述。

表 9

对患肿瘤小鼠体内黑素瘤特异性鼠伤寒杆菌的选择

5	感染循环	接种#总数细菌/小鼠	感染时间	肿瘤*中回收的#细菌总数
	1	1×10^{10}	120 分钟	2.1×10^7
	2	1×10^9	80 分钟	1.6×10^6
	3	6×10^8	60 分钟	1.7×10^6
	4	2×10^8	40 分钟	1.4×10^5

10

将*感染的沙门菌属从每一循环的 4 - 8 个单独的肿瘤中集中。

这些结果表明可将感染的细菌从体内肿瘤中回收。这些结果还表明：由于分离的细菌比接种的细菌少，所以体内循环产生富集的群体。

15

10. 实施例：黑素瘤细胞内鼠伤寒杆菌的增殖

靶组织内传递基因的载体的增殖可以在靶组织内扩增基因并使得可以减小所接种载体的滴度，由此减少宿主中脓毒性休克的危害。下面的实施例表明鼠伤寒杆菌在黑素瘤细胞内增殖。

20

10.1. 在培养的人 M2 黑素瘤细胞内的增殖

发现使用如下所述的约 30 - 60 分钟的倍增时间，鼠伤寒杆菌在培养物中的人 M2 黑素瘤细胞内增殖。将野生型沙门菌属菌株#14028 和超感染性克隆#72 按 10^6 细菌 c.f.u./ml 培养基分别引入 2×10^5 黑素瘤细胞/25cm² 组织培养瓶的人 M2 黑素瘤细胞的培养基中。1 小时后，加入庆大霉素（20 μ g/ml）以杀死外部而不是摄入的细菌，并将黑素瘤细胞收集且在所指定的时间点处测定摄入细菌的数量。结果列在表 10 中。

25

表 10

鼠伤寒杆菌野生型菌株#14028 和克隆#72 在培养的人 M2 黑素瘤细胞*内的增殖

30	沙门菌属菌株	时间（小时）	沙门菌属/ 10^6 黑素瘤细胞	增加倍数
	#14028 野生型	1	6.8×10^5	---
		2	1.8×10^6	2.6x
		4	1.8×10^7	26x
		6	5.4×10^7	79x
35	克隆#72	1	5.8×10^6	---
		2	8.0×10^6	1.4x
		4	3.2×10^7	5.5x

6	1.4×10^8	24x
---	-------------------	-----

* 数据代表两次和三次测定的平均值，重复样品间的偏差 $<\pm 25\%$ ，

5 10.2.小鼠体内生长的黑素瘤肿瘤的增殖

用 10^6 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交#48 细胞给小鼠在四个区域（上背的左右侧和肋腹的左右侧）进行皮下接种。在可触摸到的肿瘤出现后（8 - 10 天），用 2×10^8 鼠伤寒杆菌给小鼠进一步进行接种（腹膜内）。所试验的沙门菌属菌株是野生型#14028 和超感染性克隆#72。在用细菌接种后 4 小时和 21 小时，将小鼠从眼眶取血，并通过用甲氧氟烷麻醉而使小鼠在无知觉的状态下死亡。以无菌方式取出肿瘤和肝，用无菌的 NaCl（0.9 %）冲洗，称重并按 5：1 的比例（体积：肿瘤 wt）在 LB 肉汤中匀浆。通过将匀浆产物涂布在 LB 平板上、在 37℃ 下培养过夜，并对细菌克隆计数来对细菌进行定量。数据代表平均值 $\pm$ S.D.。将小鼠体内细菌接种 4 小时和 21 小时的结果详细记录在表 11（A）和 11（B）中。

表 11

A.鼠伤寒杆菌接种（腹膜内）入患 Cloudman S91 黑素瘤 DBA/2J 小鼠后 4 小时的分布

20	<u>沙门菌属</u> <u>菌株</u>	<u>沙门菌属/</u> <u>ml 血</u>	<u>沙门菌属/</u> <u>gm 肿瘤（湿 wt）</u>	<u>沙门菌属/</u> <u>gm 肝（湿 wt）</u>	<u>肿瘤/肝</u>
	野生型	6×10^5	$8.9 \pm 2.5 \times 10^4$ (n=4)	3.6×10^5	1:4
	克隆 72	2×10^5	$3.5 \pm 3.3 \times 10^4$ (n=4)	2.4×10^5	1:7

B.鼠伤寒杆菌接种（腹膜内）入患 Cloudman S91 黑素瘤 DBA/2J 小鼠后 21 小时的分布

25	<u>沙门菌属</u> <u>菌株</u>	<u>沙门菌属/</u> <u>ml 血</u>	<u>沙门菌属/</u> <u>gm 肿瘤（湿 wt）</u>	<u>沙门菌属/</u> <u>gm 肝（湿 wt）</u>	<u>肿瘤/肝</u>
	野生型	1.0×10^4	$1.3 \pm 0.8 \times 10^9$ (n=4)	4.4×10^6	300:1
	克隆 72	6.7×10^3	$2.1 \pm 2.7 \times 10^9$ (n=4)	5.2×10^5	4000:1

30 在接种沙门菌属后 4 小时，对于野生型克隆 14028 和克隆 72 来说，在肿瘤中存在的细菌比在血流和肝脏中存在的少。然而，截至到 21 小时时，在肿瘤中发现了大量密集的细菌，使得对于超感染性突变体克隆 72 来说，在肿瘤中细菌/g 组织之比为 4,000：1，超过了在肝中的细菌/g 组织之比。在接种细菌后 21 小时，对于野生型沙门菌属菌株和克隆 72 来说，肿瘤中鼠伤寒杆菌的数量是相似的，且它们远大于原始接种的沙门菌属总

数，这表明细菌的野生型和克隆 72 菌株在肿瘤内增殖。由此，将鼠伤寒杆菌感染黑素瘤细胞并在它们中增殖的能力在表 10 所示的细胞培养物和
在表 11A 及 11B 所示小鼠体内生长的肿瘤中进行表达。

野生型菌株 14028 在肝中表现出的感染性比克隆 72 表现出的要高。由野生型鼠伤寒杆菌表现对肝的高感染性与在高细菌接种浓度
($>10^9$ c.f.u./小鼠，没有列出数据) 时所观察到的野生型菌株对 DBA/2J 小鼠的杀伤力比克隆 72 产生的杀伤力大这一情况相一致。使用如表 18， 15.2. 部分中所示的患 B16F10 黑素瘤的 C57BL/6J 小鼠也能观察到类似的结果。同时，这些结果表明体外对具有增强的肿瘤特异性的细菌或其它寄生虫菌株的选择可产生带有减轻宿主体内毒性的突变体菌株。

10.3.鼠伤寒杆菌在患肿瘤的小鼠体内的分布

下列实验表明沙门菌属能够在患多重移植的皮下黑素瘤肿瘤或天然发生的转移瘤的动物中定居并增殖。

10.3.1.沙门菌属直接接种入 Cloudman S91 黑素瘤肿瘤后的分布

给 DBA/2J 小鼠的 4 个区域（上背部和肋腹的左侧和右侧）皮下接种 10^6 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交体/位点。在接种后 8 - 10 天可触摸到的肿瘤出现后，选择有代表性的动物，并用鼠伤寒杆菌超感染性克隆#72 按 c.f.u.为 7×10^4 或 7×10^6 细菌/肿瘤对 4 个肿瘤中的 2 个（右侧上背和左侧肋腹）进行直接接种。在接种后 21 小时时，用甲氧氟烷使小鼠在无知觉的状态下死亡。以无菌方式取出肿瘤和肝，将它们用无菌 NaCl（0.9 %）冲洗，称重，并用 NaCl 按 5： 1 的比例（体积：肿瘤 wt）将它们匀浆。通过将匀浆产物涂布在 LB 平板上，在 37 C 下培养过夜并对细菌克隆计数来对细菌进行定量。结果见表 12。

表 12

鼠伤寒杆菌克隆 72 在直接接种入肿瘤的患 Cloudman S91 黑素瘤小鼠后 21 小时的分布

接种物/肿瘤	沙门菌属/g 肿瘤（湿 wt）	沙门菌属/g 肝（湿 wt）	肿瘤/肝
7.2×10^4			
肿瘤 1*	1×10^9	3.0×10^5	3,300:1
肿瘤 2	3×10^7		100:1
肿瘤 3	1×10^8		330:1
7.2×10^6			

肿瘤 1*	4×10^9	5.0×10^6	800:1
肿瘤 2	3×10^9		600:1
肿瘤 3	3×10^7		6:1
*接种的肿瘤			

5 总之，在直接将超感染性鼠伤寒杆菌克隆#72 接种入特定的肿瘤后两天，在远端未接种的肿瘤中发现了细菌。在该肿瘤中发现的沙门菌属数量远超过接种入小鼠的沙门菌属的数量，这证明鼠伤寒杆菌在肿瘤内增殖。结果表明鼠伤寒杆菌可以在肿瘤内增殖，经循环系统离开该肿瘤，转移到远端的肿瘤，并在远端肿瘤内增殖。

10.3.2.进入 Cloudman S91 黑素瘤转移瘤的沙门菌属分布

这一实验显示细菌能够以天然发生的实体肿瘤转移瘤为靶。

15 将 1×10^5 Cloudman S91 黑素瘤细胞皮下接种在 DBA/2J 小鼠的尾部。在约 4 周后，形成软组织转移瘤（~ 0.5g）尾部中的原始肿瘤无可见的证据。将鼠伤寒杆菌克隆 72 按 2×10^5 c.f.u.进行腹膜内接种。在接种 48 小时后处死小鼠，并取出肝脏和肿瘤，将它们在 Luria 肉汤中匀浆，并在 LB 琼脂平板上通过系列稀释来对鼠伤寒杆菌进行定量。

20 表 12（A）中所示的结果表明鼠伤寒杆菌克隆 72 可以靶向转移肿瘤并在其中增殖。

表 12（A）

鼠伤寒杆菌克隆 72 在患有软组织黑素瘤转移瘤*的 DBA/2J 小鼠体内的分布

25	组织	沙门菌属/g 组织	肿瘤/肝
	肝	3.1×10^6	---
	肿瘤	3.2×10^9	1000:1

*结果代表单个动物的测定结果。

30 11. 实施例：野生型鼠伤寒杆菌菌株 14028 和超感染性突变体克隆 72 的抗

菌素敏感性

11.1. 体外检测的敏感性

35 检测野生型鼠伤寒杆菌菌株 14028 和超感染性突变体克隆 72 的抗菌素敏感性，且发现它们每种都对目前在治疗细菌感染中使用的 12 种不同

的抗菌素是敏感的。按照标准的方案来对细菌进行检测以测定如临床实验室观察到的抗菌素敏感性，以便不给病人提供一种微生物对其有抵抗作用的抗菌素。通过将细菌经过圆盘扩散敏感性技术试剂盒（ Remel.Corp., Lenexa, Kansas ）来检测细菌的抗菌素敏感性。将数据列在表 13 中。

5

表 13		
抗菌素敏感性		
	野生型	克隆 72
10	氯苄青霉素	S
	头孢哌酮	S
	头孢他啶	S
	Cefaroxime	S
	庆大霉素	S
15	美洛西林	S
	头孢唑啉	S
	环丙氟哌酸	S
	Unasyn	S
	头孢曲松	S
20	TMP/SMX	S

20

11.2.体内检测的敏感性

通过给小鼠腹膜内注射细菌来进一步检测鼠伤寒杆菌克隆 72 对抗菌素的敏感性。用抗菌素恩氟沙星治疗半数的小鼠，并观察恩氟沙星（一种环丙氟哌酸的活性类似物）对小鼠存活的影响。

25

用 10⁵cfu 鼠伤寒杆菌克隆 72 给 6 周龄的 C57B6 雌性小鼠进行腹膜内接种。在用细菌接种 4 天后，用 100 μ g/0.1mlBAYTRIL™（恩氟沙星）给小鼠中的 3 只进一步腹膜内接种，并给小鼠的饮用水补充 25 μ g/mlBAYTRIL™。4 天后，对所有小鼠给予不含 BAYTRIL™ 的新鲜饮用水。在总计 21 天后，使所有存活的小鼠在无知觉的状态下死亡并终止实验。结果见下面的表 13（A）。

30

表 13（A）	
注射鼠伤寒杆菌克隆 72 ± 溶于饮用 H ₂ O 的 BAYTRIL®（恩氟沙星）的 C57B6 小鼠的存活期	
条件	死亡的平均时间 ± S.D.

无抗菌素	9.3 ± 5 天
恩氟沙星（接种后 4 - 10 天）	>21 天

仅给予细菌而没有抗菌素的小鼠在接种后平均 9 天后死亡。给予细菌且随后接受抗菌素治疗的小鼠在至少 21 天时还存活，且当终止实验时它们没有表现出沙门菌属的毒性症状。因此，结果清楚地表明可以通过用抗菌素恩氟沙星的治疗而使小鼠脱离鼠伤寒杆菌导致的死亡。这些结果与表 13 中所列出的结果一致，表 13 表现了经圆盘扩散敏感性技术而观察到的鼠伤寒杆菌 14028 和克隆 72 的抗菌素敏感性。

结果进一步强调了将抗菌素敏感性细菌用作人体肿瘤治疗中的载体的优点，这是因为当需要时可以通过引入抗菌素而将该细菌杀灭。

12. 实施例：黑素瘤细胞中细菌型启动子增强的表达

在本发明一个优选的实施方案中，在与宿主体内正常细胞相反的癌性靶细胞中对基因（位于一种分离的超感染性载体中，诸如携带 HSV TK 基因的鼠伤寒杆菌克隆 72⁵⁻³⁻²）进行特异性诱导。已经证明当细菌侵入与上皮细胞相反的巨噬细胞时，几种沙门菌属启动子基因具有较高的相对诱导性，所述的启动子基因包括 pagB 和 pagC（Miller 等，1989，《美国国家科学院学报》86：5054 - 5058；Miller 等，1992，《感染免疫》60：3763 - 3770；Alpuche Aranda 等，1992，《美国国家科学院学报》89：10079 - 10083）。为了检测当沙门菌属侵入黑素瘤细胞时这些启动子是否也被激活，我们使用了携带与 β - 半乳糖苷酶报道基因融合的启动子构建体的沙门菌属。

将人黑素瘤 M2 细胞（Cunningham 等，1992，《科学》，255：325 - 327），人体上皮 1790 细胞和小鼠巨噬细胞系 J774 细胞（美国典型培养物保藏中心）按 1×10^6 宿主细胞的密度接种在 25cm^2 的 Corning 组织培养瓶中。用 5×10^7 鼠伤寒杆菌 #14028/ml DMEM 培养基将细胞感染 1 小时，将细胞用新鲜的培养基进行洗涤，并进一步用加有培养基的 $50 \mu\text{g/ml}$ 庆大霉素培养 6 小时以杀死外部而不是摄入的沙门菌属。然后通过等在渗的 1mMEDTA 溶液中从基底层刮取黑素瘤细胞而收集它们。将细胞沉淀，重新悬浮在 PBS 中并取出等份的样品用于在黑素瘤细胞中所发现的细菌的定量。将黑素瘤细胞的剩余部分用于 β - 半乳糖苷酶活性的测定。

所应用的是三种鼠伤寒杆菌克隆：i) 菌株 14028，其中将 β - 半乳糖苷酶进行组成型表达；ii) 菌株 14028，其中通过 pagB 启动子的激活

来表达β-半乳糖苷酶; iii)菌株 14028, 其中其中通过 pagC 启动子的激活来表达β-半乳糖苷酶。因此, 通过测定β-半乳糖苷酶活性来进行黑素瘤细胞中细菌 pagB 和 pagC 启动子诱导的分析。结果详细列在表 14 中。

5

表 14

细菌启动子 PAGB 和 PAGC 在培养的人黑素瘤 M2 细胞*中的增强的表达

细胞系	启动子诱导的活性:		组成型活性
	pagB		pagC
10 人体上皮	1.3:1		7.2:1
小鼠转化的巨噬细胞	2.9:1		17:1
人体黑素瘤	3.8:1		31:1

* pagB 和 pagC 的相对激活通过启动子诱导性β-半乳糖苷酶活性的表达来评价。

15

在人体黑素瘤细胞中诱导 pagB 和 pagC 沙门菌属启动子。在黑素瘤细胞中诱导的水平高于在上皮或巨噬细胞系中所见的诱导水平。这些数据表明可以将 pagB 和 pagC 启动子用于以一种黑素瘤细胞特异性方式来表达基因, 诸如 HSV TK 或大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶。

20

13. 实施例: 药物前体转化酶的克隆和表达

下面的部分列出了用于本发明方法和组合物的药物前体转化酶表达的有用系统。

25

13.1. 鼠伤寒杆菌中单纯疱疹病毒胸苷激酶的克隆和表达

已知单纯疱疹胸苷激酶 (HSV TK) 是一种在抑制黑素瘤肿瘤生长中的有效药物前体转化酶 (Bonnekoh 等, 1995,《皮肤病学调查杂志》104: 313 - 317)。因此, 进行将带有β-半乳糖苷酶信号序列的 HSV TK 基因插入到鼠伤寒杆菌野生型菌株 14028 和来源于该野生型菌株的超感染性肿瘤特异性突变体克隆 72 中这一过程。

30

经 PCR 的单纯疱疹胸苷激酶的克隆

通过碱裂解, 苯酚/氯仿萃取和乙醇沉淀来制备载体 pHETK2 的质粒 DNA (Garapin 等, 1981,《美国国家科学院学报》78: 815 - 819)。对于单纯疱疹胸苷激酶来说, 以全部序列为基础的 PCR 引物 (McKnight,

1980, 《核酸研究》 8: 5949 - 5964) 是: 正向 5' -
GATCATGCATGGCTTCGTACCCCGGCC - 3' (序列鉴定号: 1) 和反向
5' - CTAGATGCATCAGTGGCTATGGCAGGGC - 3' (序列鉴定号: 2),
它相应于公开序列的碱基 310 - 328 (正向) 和 1684 - 1701 (反向),
5 在每一种引物的 5' 末端都带有加入的 GTACATGCAT (序列鉴定号: 1 的
部分) 或 CTAGATGCAT (序列号: 2 的部分) (NsiI 位点和间隔区) 序
列。每种反应混合物都包括 50ng DNA 模板, 10 pmole 的每种引物,
100mM 脱氧核苷酸三磷酸, 1.5mM Mg^{++} 和 0.5 单位的 Taq 聚合酶 (Perkin
Elmer Cetus, Norwalk, CT)。通过由 94 °C 下 1 分钟; 50 °C 下 15 秒;
10 55 °C 下 1 分钟和 72 °C 下 2 分钟组成的 35 个循环进行扩增。将扩增的
DNA 进行纯化并克隆入 pBluescript I I KS+ 中并用 T3 和 T7 引物进行序列
测定, 以证实已经克隆了正确的 DNA 或将它克隆入用 PstI 切断的提供 β
- 半乳糖苷酶信号序列的 p279 中 (Talmadge 等, 1980, 《美国国家科学
学院学报》 77: 3369 - 3373)。使用经用 [α - ^{32} P]dCTP 随机引物 (Boehringer
15 Mannheim, Indianapolis, IN) 从原始模板中产生的探针来筛选转化体。
通过免疫印迹来进一步筛选阳性克隆。

SDS - PAGE 和免疫印迹

按照 Weber 和 Osborn 在 1975 “蛋白质和十二烷基磺酸钠”: 聚丙烯
酰胺凝胶上的分子量测定和相关方法(收入在: H. Neurath 和 R. Hill (编
20 辑) 《蛋白质》, 第三版, 卷 1, 学院出版社, 纽约 pp.179 - 223) 中所
述对细菌裂解物进行十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS -
PAGE)。按照 Towbin 等在 1979 《美国国家科学院学报》 76: 4350 -
4354 中所述进行免疫印迹。一般将第一抗 TK 抗体按 1: 1000 稀释使用。
第二抗小鼠抗体是碱性磷酸酶 - 共轭物 (Promega, Madison, WI),
25 将它按 1: 7,500 稀释使用, 随后进行氮蓝四唑 (NBT) 和 5 - 溴 - 4 -
氯 - 吲哚基磷酸酯 (BCIP) 的比色测定 (Promega)。

胸苷激酶测定

通过在一种微量离心机中以 12,000 x g 将 1ml 对数期的细菌培养物
沉淀 30 秒来制备细菌裂解物。将沉淀和上清液分别保存, 并通过以 12,000
30 x g 离心 10 分钟而将上清液进一步澄清。通过在含有 1mg/ml 溶菌酶和 1
% (v/v) 曲通 X - 100 的 100 μ l 磷酸盐缓冲盐水悬浮而将沉淀进一步
处理, 并将它进行三个循环的快速冷冻和融化。通过以 12,000 x g 离心 2
分钟来澄清所得物质。使用由 Summers 和 Summers 在 1977 《病毒学杂志》
24: 314 - 318 中所述的测定的修改方式来测定胸苷激酶的活性。在 37

C 时, 将反应混合物培养 1 小时, 然后将它们结合在 DE81 纸 (Whatman) 上, 洗涤, 并在一种 γ - 计数器中测定相关的放射性。

沙门菌属的转化

通过如 O'Callaghan 和 Charbit 在 1990 《普通分子遗传学》 223 :
5 156 - 158 中所述的电穿孔进行沙门菌属菌株的转化。将质粒转染入沙门菌属, 包括 pHETK2 (Garapin 等, 1981, 《美国国家科学院学报》 78 : 815 - 919) p279 (Talmadge 等, 1980, 《美国国家科学院学报》 77 : 3369 - 3373) 和 β - 内酰胺酶融合体的两种独立分离物, p5-3 和 p21A-2 (参见表示 p5-3 和 p21A-2 简图的附图 4 - C, 其中将这些质粒命名为
10 “ pTK Sec1 ”)。转染的鼠伤寒杆菌菌株是野生型 14028 和超感染性克隆 72。

将两种独立的 β - 内酰胺酶 - TK 基因融合构建体分离并在鼠伤寒杆菌 14028 野生型和克隆 72 中表达。免疫印迹分析和相应的酶活性测定如附图 4A 和 4B 中所示。所有三种含 TK 的载体(胞质中表达的 pHETK2 和
15 β - 内酰胺酶融合体 p5-3 和 p21A-2) 经免疫印迹和酶的测定是可以检测到的。从培养物上清液中回收到的酶活性。由于免疫印迹分析显示出信号序列的加工, 所以向鼠伤寒杆菌的周质空间分泌是可以预计的。

13.2. 使用各种启动子和分泌信号表达单纯疱疹胸苷激酶的系统

20 使用其它启动子和其它分泌信号而制备许多构建体来表达 TK。

13.2.1. LACI 启动子控制下的融合体表达为葡萄球菌属蛋白质

通过如上面 13.1 部分所述的 PCR 将单纯疱疹胸苷激酶进行扩增, 并将它克隆入 pBluescript 的 PstI 位点。将这种 TK 克隆从 bluescript 亚克隆至分泌载体 pEZZ18 的 BamHI 和 HindIII 位点 (Promega, Madison, WI;
25 Nilsson 和 Abrahansen, 1990, 《酶学方法》 185 : 144 - 161)。这一过程产生了一种在 lacI 启动子控制下的带有葡萄球菌属蛋白质 A 的读框内融合体。将这种质粒命名为 pTK-Sec2 并将它在附图 4 - C 中用简图表示。经免疫印迹测定质粒 pTK-Sec2 表达胸苷激酶。

13.2.2. 粘质沙雷氏菌壳多糖酶信号序列和启动子的克隆

通过 PCR 来克隆粘质沙雷氏菌壳多糖酶 I 的启动子和信号序列 (Jones 等, 1986, 《欧洲分子生物学协会杂志》 5 : 467 - 473)。正向和反向引物具有以下序列:

CTAGACTAGTTTGTCAATAATGACAACACCC (正向) (序列鉴定号: 3)

和 GATCGGATCCTTGCCCGGCGCGGCCTG (反向) (序列鉴定号: 4), 它们分别含有 SpeI 和 BamHI 位点。将所得产物克隆入 pSP72 中并通过 DNA 序列测定来证实。将这种质粒命名为 pSP - CHT 并在附图 4 - C 中也用简图表示。

5

13.2.3. 作为一种在壳多糖酶启动子控制下的壳多糖酶信号序列融合体的表

达

使用 BamHI 和 HindIII 将 pBluescript 中的单纯疱疹胸苷激酶亚克隆入 pSP - CHT 载体。这一过程产生了一种在壳多糖酶启动子控制下的带有壳多糖酶信号序列的读框内融合体。将这种质粒命名为 pTK - Sec3 并在附图 4 - C 中也用简图表示。经免疫印迹测定质粒 pTK-Sec3 表达胸苷激酶。

13.3. 使用一种外源诱导性启动子在细菌中表达 p450 氧化还原酶药物前体

转化酶

通过使用分别插入了 HindIII 和 EcoRV 限制位点的正向

(CTAGAAGCTTATAAGGGTTGATCTTTGTTGTC) (序列鉴定号: 5) 和反向 (GTACGATATCCAGAACGATGTGCATAGCCTG) (序列鉴定号: 6) 引物的 PCR 从大肠杆菌基因组 DNA 中克隆 sulA 启动子元件 (GENBANK#V00358; Cole, 1983)。PCR 的条件是由 95 °C 下 1 分钟; 55 °C 下 1 分钟和 72 °C 下 1 分钟组成的 35 个循环。将产物克隆入 pSP72 并用 T7 引物来进行序列测定, 从而证明已经获得了正确的 DNA。所克隆的 DNA 片段与公开的序列 100 % 相同。

25 通过将如上所述获得的 sulA 启动子克隆入 p450 氧化还原酶基因的 HindIII 和 EcoRV 位点, 将在 pBluescript 的 EcoRI 位点中的缺失了由 Yamano 等在 1989, 《分子药理学》 35: 83 - 88 中所述的 cDNA 的第一个起始 ATG (缺失开始端的 11 个核苷酸) 的依赖于 NADPH 的细胞色素 p450 氧化还原酶 (p450, OR) cDNA 克隆与 sulA 启动子和起始序列
30 融合。所得融合体由 sulA 启动子组成, 包括 sulA ATG (甲硫氨酸) 和随后的 9 个氨基酸 (YTSGYAHRS) (序列鉴定号: 7) 以及随后的从 DNA 多接头和 PCR 引物中引入的 6 个氨基酸 (SGYRIP) (序列鉴定号: 8), 在它们之后有 p450 OR 的第 2 个氨基酸 (是 G)。将这种构建体 pSP - SAD4 - 5 在附图 4 - D 中用简图表示。

13.4.表达 p450 氧化还原酶的药物前体转化对细菌生长的影响

以前已证明（ Shiba 等， 1959 ，《自然》 183： 1056 - 1057 ）有
些细菌的菌株对低水平的丝裂霉素是敏感的。因此，为了比较带有和不带
有 sulA：： p450 OR 表达质粒的特异性细菌菌株的敏感性，进行下面的实
验。如果该构建体是具有功能的，则预计 p450 OR 基因的存在可产生丝裂
霉素激活增强导致细菌生长减少。在本实验中使用的 sulA：： p450 OR 表
达质粒与 pSP - SAD4 - 5 （ 13.3 部分）类似，除了它位于 pBluescript
（ pBS ）主链中并具有 β - 半乳糖苷酶转录单位以外。将这种构建体在附
图 4 - D 中也用简图表示。通过电穿孔将 pBS 质粒（带有和不带有该表达
构建体）转染入大肠杆菌 DH5 α 中，并获得含有正确质粒的克隆且通过质
粒分离和 DNA 限制分析来证实。对于两种具有质粒的菌株中的每种来说，
将一种新鲜的、 4 小时（对数晚期）的培养物按 1： 100 稀释入含有 100
μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 中以便对存在的质粒进行选择，并使该培养物在
37 °C、 250rpms 条件下生长。将丝裂霉素 C 按 0.0 μ g/ml， 0.1 μ g/ml
和 0.5 μ g/ml 的量加入到该培养物中。

在 2 和 18 小时的时间点处，使用一种 Perkin Elmer 双光束分光光
度计在 600nm 处测定光密度。将结果列在表 14 （ A ）中。

表 14A			
在有丝裂霉素 C 的情况下细菌培养物的生长			
OD ₆₀₀ t=加药后 2 小时			
加入的丝裂霉素 C 的量 (μ /ml)			
质粒	0	0.1	0.5
pBS	0.052	0.050	0.053
sulA::p450 OR	0.037	0.030	0.024
OD ₆₀₀ t=加药后 18 小时			
加入的丝裂霉素 C (μ /ml)			
质粒	0	0.1	0.5
pBS	2.33	2.23	1.93
sulA::p450 OR	2.26	0.34	0.071

在没有药物的情况下，含有 pBS 和 sulA：： p450 OR 的大肠杆菌
菌株 DH5 α 在 2 和 18 小时的时间点处生长的比较表明该构建体的存在部

分抑制生长率而不能抑制在 18 小时获得较高的最终 OD。这些数据还表明在较高丝裂霉素浓度时仅能部分抑制只携带 pBS 主链质粒的细菌。然而, 在两种丝裂霉素浓度下, 携带 *suIA*:: p450 结构的细菌在较早和较晚的时间点处都表现出了显著的抑制。这些数据表现出由 *suIA*:: p450 构建体的存在而产生的一种对丝裂霉素的强剂量反应。

13.5. 鼠伤寒杆菌中胞嘧啶脱氨酶的表达

已经证明大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶 (CD) 是一种用于基因疗法的有效的药物前体转化酶 (Hirschowitz 等, 1995,《人体基因疗法》 6: 1055 - 1063; Huber 等, 1993,《癌症研究》 53: 4619 - 4626; Huber 等, 1994,《美国国家科学院学报》 91: 8302 - 8306; Moolten, 1994,《癌症基因疗法》 1: 279 - 287; Mullen 等, 1992,《美国国家科学院学报》 89: 33 - 37; Mullen 等, 1994,《癌症研究》 54: 1503 - 1506; Trihn 等, 1995,《癌症研究》 55: 4808 - 4812)。CD 通过将无毒性的 5 - 氟胞嘧啶 (5 - FC) 转化成有毒性的化合物 5 - 氟尿嘧啶 (5 - FU) 而起作用。沙门菌属具有一种内源性 CD, 然而, 它的表达受分解代谢物的抑制 (West 和 O'Donovan, 1982,《细菌学杂志》 149: 1171 - 1174)。如下所述克隆, 使用组成型具活性的 β - 内酰胺酶启动子的 CD 表达载体以确保肿瘤内 CD 的表达。

CD 的克隆和表达

以大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶的全部序列为基础的 PCR 引物 (Huber 等, 1993,《癌症研究》 53: 4619 - 4629) 是正向: 5' - GATCATGCATGTGGAGGCTAACAGT - 3' (序列鉴定号: 9) 和反向: 5' - CTAGATGCATCAGACAGCCGCTGCAAGGC - 3' (序列鉴定号: 10), 它相应于公开的序列, 在每一引物的 5' 末端都带有是一个 NsiI 位点和间隔区的加入序列 GATCATGCAT (序列鉴定号: 9 的部分) 或 CTAGATGCAT (序列鉴定号: 10 的部分)。每 25 μ l 反应混合物包括 50ngDNA 模板, 10 微摩尔的每种引物, 100mM 脱氧核苷酸三磷酸, 1.5mM Mg 和 0.5 单位 Taq 聚合酶 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)。通过由 94 $^{\circ}$ C 下 1 分钟; 50 $^{\circ}$ C 下 15 秒; 55 $^{\circ}$ C 下 1 分钟和 72 $^{\circ}$ C 下 2 分钟组成的 35 个循环进行扩增。将扩增的 DNA 在一种琼脂糖凝胶上进行纯化并将正确大小的带克隆入 1) pBluescript I IKS+ 且用 T3 和 T7 引物进行序列测定以证实已经克隆了正确的 DNA 以及 2) 用 PstI 切割的 p279 中, 该切割提供了 β - 内酰胺酶信号序列和组成型 β - 内酰胺酶启动

子。将第二种构建体命名为 pCD-Sec1 并在附图 4 - E 中用简图表示。使用一种 [α - ^{32} P]dcTP 标记的寡核苷酸探针来筛选转化体。使用下述的抗 CD 抗体经免疫印迹来进一步筛选阳性克隆。

抗胞嘧啶脱氨酶的第一抗体

- 5 将 CD 从 pBluescript 亚克隆入 pGEX I 中并用 IPTG 表达。发现所表达的蛋白质是不溶性的且存在于包涵体中。通过在 0.1 % w/v 曲通 X - 100 中洗涤从包涵体中纯化 CD - 谷胱甘肽 - S - 转移酶 (GST) 融合蛋白, 重新沉淀并重新悬浮于 SDS - PAGE 样品缓冲液中。将该物质在 3mm 制备的 10 % 聚丙烯酰胺凝胶上进行分离, 并在 4 °C 时用 3M 乙酸钠显色后
- 10 将其切下。将纯化的条带匀浆并将它用 Freund's 完全的 (0 天) 和不完全的 (14 天) 佐剂给 DBA2J 小鼠腹膜内注射。6 周后对小鼠进行取血并通过免疫印迹证实血清抗体结合所克隆的 CD 的能力。

SDS - PAGE 和免疫印迹

- 按照 Weber 和 Osborn (1975 , “蛋白质和十二烷基磺酸钠” : 聚丙烯酰胺凝胶上的分子量测定和相关方法, 收入在: H. Nuerath 和 R. Hill (编辑) 《蛋白质》第三版, 卷 I, 学院出版社, 纽约, pp.179 - 223) 所述, 将 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 在细菌裂解物上进行。按照 Towbin 等 (1979 , 《美国国家科学院学报》 76 : 4350 - 4354) 所述进行免疫印迹。将上述第一抗 CD 抗体一般按 1 : 500 稀释使用。第
- 15 二抗小鼠抗体是碱性磷酸酶 - 共轭物 (Promega 和 Madison , WI) , 将它按 1 : 7,500 稀释使用, 随后进行氮蓝四唑 (NBT) 和 5 - 溴 - 4 - 氯 - 吲哚基磷酸酯 (BCIP) 比色检测 (Promega 和 Madison , WI) 。
- 20

CD 酶测定

- 通过将 50ml 过夜的细菌培养物在 3000x g 下沉淀 10 分钟并将它们重新悬浮在 2.5ml 的 pBS 中来制备细菌裂解物。将细胞进行超声处理并通
- 25 过在 12,000x g 下的微量离心机中沉淀 10 分钟来除去细胞碎片。所进行的酶测定法是对 Muller 等 (1992 , 《美国国家科学院学报》 89 : 33 - 37) 所述进行的修改。在 37 °C 时, 将 10 μ l 细胞提取物用 1 μ l [H^3]-5FC (1 μ Ci/ μ l) 进行培养。将 1 μ l 点在 Kodak 13254 微晶硝酸纤维素 TLC 平板上 (Esatman Kodak, Rochester New York) , 并使用含有未标记的 5FC 和 5FU 标记的的丁醇: 水 = 95 : 5 将它分离。根据分离的标记泳道切下
- 30 平板并用液体闪烁计数来对它进行定量。

沙门菌属的转化

通过如 O'Callaghan 和 Charbit (1990 , 《普通分子遗传学》 223 :

156 - 158) 所述的电穿孔来进行沙门菌属菌株的转化。转染入沙门菌属的质粒是 p279 和 pCD-Sec1。所转染的鼠伤寒杆菌菌株是下文第 18 部分所述的菌株 YS721, YS7211, YS7212 和 YS7213。所转染的大肠杆菌菌株是菌株 DH5 α 和 KL498 (Δ cod)。

5 携带 CD 表达构建体的沙门菌属的生物分布

使携带 CD 表达构建体 pCD-Sec1 的鼠伤寒杆菌克隆 YS7212 在 LB 培养基中生长至 $OD_{600} = 0.8$ 。将等份的 1.0×10^6 细菌腹膜内注射接种入在细菌感染前 16 天已植入了 2×10^5 B16 黑素瘤细胞的 C57/B6 小鼠体内。在细菌感染后 2 天时, 处死小鼠并通过匀浆和系列稀释涂板对肿瘤和肝测定存在的细菌。

表达的 pCD-Sec1 蛋白质产物通过免疫印迹分析与抗 CD 抗血清结合。当将这种克隆转移至缺乏 CD 的大肠杆菌菌株 KL498 时, 通过对 5FC 转化成 5FU 的测定发现它提供了高程度的酶的表达, 如附图 4 - F 中所示。附图 4 - F 还表明: 所克隆的 CD 表达质粒提供了比大肠杆菌菌株 MG1655 15 更高水平的转化, 所述的大肠杆菌菌株 MG1655 表达编码对内源性 CD 的野生型单倍体 cod 基因。

14. 实施例: 小鼠体内黑素瘤肿瘤中鼠伤寒杆菌克隆 #72⁵⁻³⁻² 的增殖

在如 10.2 部分所述的一组类似实验中, 给 DBA/2J 小鼠 (大约 10 20 周龄) 在上背和肋腹的右侧和左侧 4 个位点中的每个位点处接种 (皮下) 3×10^5 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交 #48 细胞。在将肿瘤细胞从组织培养物接种入小鼠 10 - 12 天后可触摸到肿瘤。在接种肿瘤细胞 (皮下) 2 周后, 给患肿瘤的小鼠另外接种 (腹膜内) 2×10^5 c.f.u. 含带有 β - 内酰胺酶信号序列的 TSV TK 基因的鼠伤寒杆菌克隆 72, 该克隆命名为 25 72⁵⁻³⁻²。在没有抗菌素治疗时细菌感染 2 和 10 天后, 处死有代表性的患肿瘤的动物, 并将它们的肿瘤和肝匀浆且定量鼠伤寒杆菌 c.f.u./g 组织。此外, 在感染后 10 天将细菌的各个克隆从肝和肿瘤的匀浆产物中分离并检测它们的遗传标记 xyl^{neg} (没有代谢木糖的能力, 克隆 #72 的特征) 和 tet^{res} (抵抗抗菌素四环素)。所接种的鼠伤寒杆菌克隆 #72 的基因型是 xyl^{neg} 和 tet^{res} 。 30 由于 HSV TK 基因携带在携带 tet^{res} 标记的质粒上, 所以认为沙门菌属的 tet^{res} 克隆携带 HSV TK 基因。

将结果列在表 15 和 16 中。感染 2 天后, 肿瘤含有 1.5×10^9 沙门菌属/g 组织和 2.0×10^5 沙门菌属/g 肝的平均值, 肿瘤: 肝之比的平均值为约 7,500: 1。

表 15

鼠伤寒杆菌接种入（腹膜内）患 Cloudman S91 黑素瘤的 DBA/2J 小鼠 2 天后的分布

5	组织	沙门菌属/g 组织	肿瘤/肝
	肝 (n=2)	2.0×10^5	---
	肿瘤 (n=4)	$1.5 \pm 0.9 \times 10^9$	7,500:1

10 感染 10 天后（表 16），肿瘤含有 2.9×10^9 沙门菌属/g 肿瘤和 2.7×10^5 沙门菌属/g 肝的平均值，比例为 11,000:1（肿瘤：肝），这类似于感染后 1 - 2 天所见的细菌分布。这些结果表明：一旦接种（腹膜内）入患肿瘤的小鼠，沙门菌属就可进入循环系统，感染肿瘤细胞在肿瘤内增殖，并以一种区室化的形式存在在那里。

表 16

鼠伤寒杆菌接种入（腹膜内）患 Cloudman S91 黑素瘤的 DBA/2J 小鼠后 10 天的分布

20	组织	沙门菌属/gm	肿瘤/肝	木糖	四环素
	肝	2.7×10^5	---	neg	9/10res
	肿瘤				
	#1	4.2×10^9	16,000:1	neg	3/7res
	#2	3.1×10^9	12,000:1	neg	7/8res
25	#3	1.3×10^9	4,800:1	neg	8/8res
	平均值	2.9×10^9	11,000:1		

30 结果进一步表明：感染 10 天后，所有实验的细菌克隆都是 xyl^{neg} ，证明了它们与所接种克隆 #72⁵⁻³⁻² 的遗传相关性；并且 27/33 克隆保持了 tet^{res} ，证明了在宿主细菌内含 HSV TK 的质粒的高度保留量（82 %）。在这里没有列出的实验中，发现在患肿瘤小鼠体内感染 42 小时后相同的质粒 100 % 保留了下来。

35 概括在表 14，15 和 16 中的上述实验的继续实验中，将患黑素瘤小鼠体内的沙门菌属感染继续进行总计 4 周。为缓解鼠伤寒杆菌中毒的症状（颤抖，毛缠结），将动物给予抗菌素最后 2 周。这类抗菌素治疗包括

在小鼠饮水水中按最终浓度为 15ml SULFATRIM^M/500ml 饮用水使用 SULFATRIM^M Pediatric 悬浮液（Schein 药物公司；磺胺恶唑 40mg/ml，甲氧苄啶 8mg/ml）。在实验终止时，经无痛苦致死术将存活的动物处死，并取出肿瘤和肝。将部分组织（1 - 2mm³）固定在福尔马林中并染色供组织学检查。将剩余部分称重，在 5 ml LB 肉汤/g 组织中匀浆，并在 LB 琼脂平板上对沙门菌属的数量进行定量。将结果列在表 17 中。

表 17			
0	鼠伤寒杆菌接种入（腹膜内）患黑素瘤的 DBA/2J 小鼠后 4 周的分布		
	<u>组织</u>	<u>沙门菌属/g 组织</u>	<u>肿瘤/肝</u>
	肝	5.1×10^7	---
	肿瘤		
	#1	2.2×10^9	43:1
5	#2	9.4×10^8	18:1
	#3	2.3×10^9	45:1
	#4	2.0×10^8	6:1
	平均值	$1.4 \pm 1 \times 10^9$	28:1

切下的黑素瘤肿瘤比对照组动物在死亡时的 5 - 10gm 肿瘤按重量计平均低 1 克（未列出数据）。发现这些肿瘤含有 1.4 × 10⁹ 沙门菌属/g 肿瘤的平均值，这与在接种后 1，2，和 10 天所见的感染肿瘤的细菌数量类似。然而，在 4 周的感染过程中，肝内沙门菌属的数量增加了，使得与表 14，15 和 16 中所示用感染期达 10 天所获得的比例相比，细菌在肿瘤中与在肝中的平均比例降低至 28：1。

15. 实施例：鼠伤寒杆菌在体内黑素瘤中的显微检测

15.1. 鼠伤寒杆菌在 DBA/2J 小鼠体内生长的 Cloudman S91 黑素瘤中的检测

为了研究患肿瘤小鼠体内沙门菌属感染的组织病理学，将有代表性的黑素瘤肿瘤从感染或没有感染沙门菌属的无知觉死亡小鼠中取出。将部分组织（1 - 2mm³）固定在福尔马林中，包埋并切片，用苏木精和曙红对切片进行染色，或进行组织革兰氏染色供组织学检查。这些研究结果如附图 5A - B 所示。

附图 5A - B 是来自在 DBA/2J 小鼠体内皮下生长的 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交#48 黑素瘤组织学切片的显微照片。将肿瘤从已在 2 天前接种了 3×10^5 c.f.u. 携带 HSV TK 基因的鼠伤寒杆菌超感染性克隆 72 (72^{5-3-2}) 中切下。将部分肿瘤称重, 按 5ml/g 肿瘤浸入 LB 中, 用一种毛
5 玻璃匀浆器将它匀浆, 并将肿瘤匀浆产物按不同的稀释度涂板在 LB - 琼脂培养平板上以确定肿瘤中鼠伤寒杆菌的数量。细菌的定量显示出肿瘤含有 1.4×10^9 鼠伤寒杆菌/g。附图 5A. 用苏木精和曙红染色的部分表示一种具有坏死区域肿瘤的截面, 用箭头表示。附图 5B. 用组织革兰氏染色剂染色的切片显示肿瘤坏死区的一个区域中的革兰氏阴性菌。当用光学显微
10 镜观察时, 细菌相对于黄色背景染成了粉红色/紫色。沙门菌属感染的坏死区被死亡的肿瘤细胞包围, 这些死亡的肿瘤细胞用组织革兰氏染色剂未染色但能通过含黑色素的黑素体进行检测 (见附图 6)。这些结果表明: 当细菌经循环系统引入具有肿瘤的宿主中时, 沙门菌属能够达到实体肿瘤的坏死区。

15 在另一组分析中, 用电子显微镜观察沙门菌属感染的小鼠体内生长的 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交#48 黑素瘤肿瘤的切片。为了启动该实验, 用 8×10^5 肿瘤细胞给小鼠皮下接种。在 11 天后检测到可触摸的肿瘤块, 在此时用 3.6×10^6 c.f.u. 鼠伤寒杆菌超感染性克隆#72 给小鼠腹膜内接种。接种后 42 小时, 通过甲氧氟烷麻醉将小鼠处死。用无菌技术将肿
20 瘤切下。肿瘤内细菌的定量显示出肿瘤在 42 小时切下时含有约 7.5×10^9 鼠伤寒杆菌/g。相反, 来自相同小鼠肝中鼠伤寒杆菌的浓度约是 2.0×10^7 /g, 细菌在肿瘤与肝中之比约为 400: 1。

将第二部分肿瘤切成 $1 - 2\text{mm}^3$ 的片, 并在 4°C 时将它们固定在 1/2 强度 Karnovsky's 固定剂中 6 小时, 随后在二甲胂酸盐缓冲剂中洗涤过
25 夜。用 1% OsO_4 和 1.5% 亚铁氰化钾在二甲胂酸盐缓冲剂中将肿瘤组织后固定 2 小时并包埋在 Spurr's 树脂中。将超薄切片用乙酸双氧铀和乙酸铅染色。用 Zeiss109 电子显微镜观察它们。

附图 6 中所示的内容是包括两种分离的鼠伤寒杆菌以及大量黑素体 (它们是存在于黑素瘤细胞细胞质中的特化的亚细胞器) 的黑素瘤肿瘤
30 内视野的电子显微照片。细菌以及黑素体的存在提供了鼠伤寒杆菌经小鼠血流进入黑素瘤细胞的细胞质的证明。电子显微照片中的鼠伤寒杆菌看起来与小鼠实验性感染后预先在肠上皮细胞中出现的那些相同, 见 Takeuchi, 1967, 《美国病理学杂志》50: 109 - 1361。

总之, I) 使用光学显微镜的检测显示出鼠伤寒杆菌存在于生长在

感染的 DBA/2J 小鼠体内 Cloudman S91 黑素瘤的坏死区域； ii) 使用电子显微镜的检测显示出鼠伤寒杆菌还存在于黑素瘤肿瘤细胞的细胞质中。

15.2.鼠伤寒杆菌在生长在 C57BL/6J 小鼠体内的小鼠 B16
F10 黑素瘤肿瘤中的分布

给 C57BL/6J 小鼠（ 11 - 13 周龄）在两个位点（上背及胁腹）以 3.5×10^5 B16F10 小鼠黑素瘤细胞/位点进行皮下接种。当可触摸到的肿瘤出现（约 2 周）后，给动物进一步腹膜内接种约 10^5 下列三种菌株的细菌：
i)野生型大肠杆菌 K - 12 菌株#CSH101； ii) 鼠伤寒杆菌菌株 14028； 和
iii)携带 HSV 胸苷激酶基因的突变体鼠伤寒杆菌超感染性克隆 72（ 72^{5-3-2} ）。感染约 2 天后，通过用甲氧氟烷麻醉使小鼠在无知觉状态下死亡。以无菌方式将肿瘤和肝取出，用无菌 0.9 % Nacl 冲洗，称重，并在 LB 肉汤中按 5： 1 的比例（肉汤体积： 肿瘤重量）匀浆。匀浆前将 1 - 2mm³ 的组织片从有代表性的肿瘤中取出，用 1/2 强度 Karnovsky's 固定剂固定，并加工以供用电子显微镜分析。通过涂板在 LB 平板上、 37℃ 下培养过夜且对细菌菌落计数而对匀浆产物中的细菌进行定量。

结果如下： i)发现野生型大肠杆菌在浓度平均 $<10^3$ /g 肿瘤和 $<10^2$ /g 肝的接种动物肿瘤和肝中的数量相对较低。 ii)发现在感染细菌范围为 $2 \times 10^7 - 6 \times 10^8$ c.f.u./g 肿瘤和 4×10^6 c.f.u./g 肝条件下，野生型鼠伤寒杆菌在肿瘤和肝中的数量显著高于大肠杆菌。两组接种了野生型鼠伤寒杆菌的 C57BL/6J 小鼠中的一组死亡，可能是由于脓毒性休克。 iii)还发现鼠伤寒杆菌超感染性克隆 72 在肿瘤和肝中的数量显著高于大肠杆菌，此外，克隆 72 鼠伤寒杆菌数量/g 肝显著低于野生型鼠伤寒杆菌数量/g 肝。将结果详细列在下面的表 18 中。

表 18

鼠伤寒杆菌和大肠杆菌接种（腹膜内）入患 B16F10 肿瘤的 C57B6 小鼠体内 2 天后的分布

细菌菌株	小鼠	组织	细菌/gm 组织	肿瘤/肝
大肠杆菌 K - 12 (CSH#101)	A	肝	355	-
		肿瘤#1	1200	4:1
		肿瘤#2	50	1:7
	A'	肝	100	-
		肿瘤#1	50	1:7

5	鼠伤寒杆菌 (14028 野生型)	B	肝	4.3×10^6	-
			肿瘤#1	2.3×10^7	5:1
			肿瘤#2	6.0×10^8	136:1
	B'	(死亡)	-	-	-
10	鼠伤寒杆菌 (克隆#72 ⁵⁻³⁻²)	C	肝	2.0×10^4	-
			肿瘤#1	1.0×10^8	5,000:1
			肿瘤#2	1.2×10^5	6:1
	C'	肝	8.5×10^4	-	-
		肿瘤#1 (2.5g)	9.3×10^8	11,000:1	

总之，在 B16F10 黑素瘤肿瘤内感染并增殖的能力方面，鼠伤寒杆菌表现出超过大肠杆菌的天然能力。此外，在减轻 C57BL/6J 小鼠肝的感染方面，超感染性克隆 72⁵⁻³⁻² 表现出优于其野生型亲代菌株 14028 的性能，即野生型菌株 14028 表现出的对肝的感染性要大于克隆 72⁵⁻³⁻²。由野生型沙门菌属表现出的对肝的较高感染性与所观察到的野生型菌株对 DBA/2J 小鼠的杀伤力和在 DBA/2J 小鼠中肝的感染性比由表 11B 所示克隆 72 产生的大相一致。同时，表 11B 和 18 中的结果提供了体外对带有增强肿瘤特异性细菌菌株或其它的寄生虫的选择可以产生具有体内减轻宿主毒性的突变体菌株的首要证据。

15.3. 鼠伤寒杆菌在生长在 C57BL/6J 小鼠体内的 B16F10 黑素瘤中的
显微检

测

将有代表性的 B16F10 黑素瘤肿瘤从带有或不带有沙门菌属感染的无知觉死亡小鼠中取出。将部分组织 (1-2mm³) 在福尔马林中固定，包埋并切片，用苏木精和曙红将切片染色，或进行组织革兰氏染色以供组织学检查。这些研究结果如附图 7A - B 所示。附图 7A 和 7B 是来自 C57BL/6J 小鼠体内皮下生长的 B16F10 黑素瘤的组织学切片的光学显微照片。将肿瘤从已在 2 天前接种了 2×10^5 c.f.u. 鼠伤寒杆菌超感染性克隆 (携带 HSV TK 基因的 72⁵⁻³⁻²) 的小鼠中切下。肿瘤内的细菌定量表明：在用细菌感染后 2 天切下时，肿瘤含有约 9×10^8 c.f.u. 鼠伤寒杆菌/g。相反，鼠伤寒杆菌在来自同一小鼠肝中的浓度约为 2.0×10^5 /g，在肿瘤与肝中的细菌之比约为 400： 1。附图 7：用组织革兰氏染色剂染色的切片显示出在肿瘤

内坏死区中有革兰氏阴性细菌。感染的坏死区被死亡的黑素瘤细胞包围，该黑素瘤细胞不被组织革兰氏染色剂染色但因有黑化的黑素体存在而在色彩中出现褐色。当用光学显微镜观察时，细菌相对于黄色背景染成了粉红色/紫色。结果表明：当经循环系统将细菌引入患肿瘤的宿主时，沙门菌属可进入 B16 黑素瘤肿瘤的坏死区。

将上述肿瘤的第二部分切成 1mm^3 的小块，并在 4°C 时将它们固定在 $1/2$ 强度 Karnovsky's 固定剂中 6 小时，随后在二甲胍酸盐缓冲剂中洗涤过夜。用 1% OsO_4 和 1.5% 亚铁氰化钾在二甲胍酸盐缓冲剂中将肿瘤组织后固定 2 小时并包埋在 Spurr's 树脂中。将超薄切片用乙酸双氧铀和乙酸铅染色。如附图 8 所述用 Zeiss109 电子显微镜观察它们。

附图 8 中的电子显微照片表明在坏死区的胞外空间中有大量鼠伤寒杆菌，用箭头表示。在死亡的黑素瘤细胞胞质中还可见单个细菌。死亡的黑素瘤细胞的细胞质还含有大量黑色的黑素体，这是 B16F10 黑素瘤的特征。

电子显微照片中的鼠伤寒杆菌看起来与小鼠实验性感染后肠上皮细胞中以前所见的一致，Takeuchi, 1967,《美国病理学杂志》50: 109 - 136。

总之，i)用光学显微镜的检测显示出鼠伤寒杆菌大量存在于生长在感染的 B16F10 小鼠体内的 B16F10 黑素瘤的坏死区中；ii)用电子显微镜的检测显示出鼠伤寒杆菌还存在于肿瘤细胞的细胞质中。在与肿瘤相关的中性粒细胞中还观察到了沙门菌属。

16. 实施例：将传递超感染性肿瘤特异性基因的鼠伤寒杆菌用于患黑素瘤肿

瘤小鼠的治疗

16.1. Cloudman S91 黑素瘤的治疗

将鼠伤寒杆菌超感染性突变体 72^{5-3-2} （组成上表达带有 β -内酰胺酶信号序列的单纯疱疹病毒胸苷激酶基因）用于小鼠体内黑素瘤的基因疗法（见附图 4 - C）。给 DBA/2J 小鼠（约 10 周龄）在上背及肋腹的左侧和右侧上 4 个位点处接种（皮下） 3×10^5 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交细胞。在接种肿瘤细胞后 10 - 12 天可触摸到肿瘤。

在接种肿瘤细胞 2 周后，给患肿瘤小鼠进一步接种（腹膜内） 2×10^5 c.f.u. 命名为 72^{5-3-2} 的鼠伤寒杆菌克隆 72，它含带有 β -内酰胺酶分泌信号序列的 HSV 胸苷激酶。接种细菌 20 小时后，给某些小鼠进一步接种

(腹膜内) 2.5mg 溶于等渗盐水的 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤钠 (Cytovene, Syntex 实验室, Palo Alto, Calif.)。这些相同的小鼠在 3 天期内 4 次接受这一剂量的 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤。对照组患肿瘤小鼠也给予 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤但没有细菌。给另一组患肿瘤小鼠接种细菌, 但不给予 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤。在不同时间时, 还将合适组的小鼠 (经上述处理) 按 15ml SulfatrimTM/500ml 饮用水的浓度给予抗菌素 SulfatrimTM Pediatric 悬浮液 (Schein 药物公司; 磺胺恶唑 40mg/ml, 甲氧苄啶 8mg/ml)。

10 结果如下:

1) 如附图 9 所示通过测径器的测定, 给予 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤和抗菌素治疗 (溶于饮用水的 SulfatrimTM) 但无细菌的对照组患黑素瘤肿瘤小鼠形成快速生长的肿瘤, 在大小上开始每 3 - 4 天增加一倍。这些动物因 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤治疗而表现出很小或没有表现出副作用, 证明了预先对在没有合适胸苷激酶转化酶的情况下小鼠体内 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤药物前体最小毒性的报道 (Bonnekoh 等, 1995, 《皮肤病学研究杂志》 104: 313 - 317)。截至到接种肿瘤细胞后 30 天, 该组中所有小鼠已经形成了块状的皮下肿瘤 (5-10gm) 并死于黑素瘤。

2) 给予一组患肿瘤小鼠细菌总计 10 天而不给予抗菌素且不给予 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤。这些动物具有的肿瘤在肿瘤大小上显著比对照组小鼠减小了 (附图 10)。单独沙门菌属对减小肿瘤大小的影响在如下述观察到的沙门菌属加 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤对肿瘤的影响后几天变得明显了。然而, 所有“单独沙门菌属”组中的动物都出现了沙门菌属感染的症状 (颤抖, 毛缠结) 且这些动物中的 50 % 在感染后 5 - 10 天之间死亡。将剩余的动物用抗菌素 SulfatrimTM (Schein 药物公司, 口服型悬浮液) 按 15ml/500ml 饮用水的浓度进行治疗。这种治疗在 24 - 48 小时内减轻了小鼠群体中沙门菌属感染的临床症状。来自这一治疗方案的存活动物具有的肿瘤显著小于对照组动物的肿瘤且在 30 天期限后保持了存活, 此时, 所有对照组动物都死于黑素瘤。

3) 在 4 天治疗期过程中, 给予另一组患肿瘤小鼠 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤加细菌。约 50 % 的动物在这种治疗的 1 - 2 天内死亡, 显然是 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤转化成了

其毒性的、磷酸化形式，它是由小鼠体内沙门菌属克隆 72⁵⁻³⁻²表达的 HSV TK 引起的。此时，终止 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤治疗并将存活的动物用 SulfatrimTM 抗菌素处理以控制沙门菌属的感染，置于沙门菌属而没有抗菌素环境中的总时间为 4 天。来自这一治疗方案的存活者具有 5 的肿瘤显著小于对照组动物的肿瘤且在 30 天期限后保持了存活，此时，所有对照组动物都死于黑素瘤 (附图 11) 。

在另外一组实验中，在各种治疗和未治疗的患肿瘤小鼠中用测径器测定了肿瘤的发展情况。给患有如上所述 Cloudman S91 黑素瘤/巨噬细胞杂交#48 黑素瘤肿瘤的小鼠组接种 (腹膜内) 3×10^5 c.f.u. 携带单纯疱疹病毒胸苷激酶基因的鼠伤寒杆菌超感染性克隆 72 (72⁵⁻³⁻²)。接种细菌后 24 小时，给小鼠进一步按 2.0mg 的剂量接种 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤，在 5 天的期限中共接种 6 次。然后给小鼠运用溶于其饮用水的 15ml/500ml SulfatrimTM 和 20 μ g/ml BaytrilTM (moles) 的结合进行抗菌素治疗。BaytrilTM 或恩氟沙星是 1 - 环丙基 - 7 - (4 - 乙基 - 1 - 哌嗪基) - 6 - 氟 - 1, 4 - 二氢 - 4 - 氧代 - 3 - 喹啉羧酸。用测径器 15 定期测定肿瘤的长，宽和高来评价肿瘤的生长，并通过对肿瘤生物学科学来说公知的技术计算按 mm³ 计的肿瘤体积。将结果绘制在半对数标度坐标图上并计算世代时间 (在体积上倍增一次按小时计的时间)。使用下面的公式：

20 世代时间 = $0.69 (t) / (T_1 / T_2)$ ，其中 t 等于曲线的线性部分上起始肿瘤体积 (T₁) 和最终肿瘤体积 (T₂) 之间按小时计的时间。

结果如附图 9 和表 19 中所示。在未治疗的对照组小鼠与用 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤治疗而没用沙门菌属感染的小鼠体内肿瘤的平均倍增时间是相似的，分别为 83 小时和 94 小时。小鼠体内 25 用沙门菌属治疗 5 天而没用 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤的肿瘤以 125 小时的平均速率倍增。在小鼠体内用沙门菌属治疗 5 天并使用了 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤的肿瘤在 10 天的测定期内没用表现出生长，且在有些情况中，由于这种治疗而使肿瘤消退了。

30 表 19

DBA/2J 小鼠体内含 TK 的鼠伤寒杆菌 ± 用 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤治疗对 Cloudman S91 黑素瘤生长的影响

治疗 (小时)	平均肿瘤倍增时间
--------------	----------

	无	83
	9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤	94
	鼠伤寒杆菌	125
	鼠伤寒杆菌	没有生长
5	+9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤	

总之, a) 接受 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤和抗菌素治疗而没用沙门菌属的对照组患肿瘤动物在接种肿瘤细胞 30 天内死于块状肿瘤; b) 接受单独沙门菌属、随后是抗菌素治疗的动物表现出比对照动物减小的肿瘤生长率和延长的存活期; c) 接受 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤和沙门菌属结合治疗、随后是抗菌素治疗的动物表现出比对照动物较小的肿瘤生长或没有肿瘤生长。结果表明: 表达单纯疱疹病毒胸苷激酶基因的鼠伤寒杆菌能够在黑素瘤肿瘤内将 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤转成其磷酸化的形式, 由此减小了肿瘤的大小并延长了小鼠的存活期。

16.2.B16F10 黑素瘤的治疗

给 C57B6 小鼠皮下接种 (左侧上背区) 5×10^5 来自培养物的 B16F10 黑素瘤细胞。在肿瘤移植后 8 天时, 给某些小鼠进一步腹膜内接种 2×10^6 c.f.u. 减毒的鼠伤寒杆菌菌株 YS721, YS7211, YS7212 或 YS7213 (见下文的第 18 部分), 它们每种都携带 TSV TK 基因。在肿瘤移植后第 11 天时, 将 GCV (9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤钠, CYTOVENETM, Syntex 实验室, Palo Alto, CA.) 按下列治疗方案腹膜内接种入各组小鼠 ($n=5$ 和 $n=10$): a) 总剂量 = 7.5mg/小鼠 (第 11 天 2.5mg, 第 12 天 1.25mg, 第 18 天 2.5mg, 第 19 天 1.25mg); b) 总剂量 = 5.0mg/小鼠 (第 11 天 2.5mg, 第 12 天 2.5mg); c) 总剂量 = 3.75mg/小鼠 (第 11 天 2.5mg, 第 12 天 1.25mg); d) 总剂量 = 2.5mg/小鼠 (第 11 天 1.25mg, 第 12 天 1.25mg); e) 总剂量 = 1.25mg/小鼠 (第 11 天 1.25mg)。在肿瘤移植后第 18 天时 (细菌接种后 10 天), 给予所有动物溶于其饮用水的恩氟沙星抗菌素 (BAYTRILTM) 0.2mg/ml 并用这种抗菌素补充剂维持 2 周。通过测径器测定来评价肿瘤的生长并按 mm^3 计算体积。当其肿瘤测定值之和 (长+宽+高) 达到 60mm 时, 或当它们濒临死亡时 (不想活动, 停止饮水), 将动物在无知觉状态下处死并列为死亡。

将所得结果在附图 11C - H 和表 19 (A) 中说明。

表 19 (A)

接种鼠伤寒杆菌 ± HSV TK 基因的 C57B6 小鼠的存活期: 9 - (1, 3 - 二羟 - 2 - 丙氧甲基) 鸟嘌呤的影响

5	菌株	(n=)	GCV	时间	治疗组/对照组
				天数 ± S.D.	T/C
	对照组	(10)	-o-	25 ± 0	1.0
		(10)	3.75mg	27 ± 1	1.1
10	YS7212	(10)	-o-	42 ± 2	1.7
	YS7212	(10)	3.75mg	33 ± 4	1.3
	YS7212/p5-3	(10)	-o-	45 ± 3	1.8
	YS7212/p5-3	(10)	3.75mg	40 ± 4	1.6
	YS7213	(10)	-o-	34 ± 2	1.3
	YS7213	(10)	3.75mg	35 ± 2	1.4
15	YS7213/p5-3	(10)	-o-	29 ± 2	1.2
	YS7213/p5-3	(10)	3.75mg	33 ± 2	1.3
	YS7211	(10)	-o-	40 ± 4	1.6
	YS7211	(10)	3.75mg	35 ± 4	1.4
	YS7211/p5-3	(10)	-o-	34 ± 2	1.4
	YS7211/p5-3	(5)	1.25mg	30 ± 4	1.2
20		(5)	2.50mg	37 ± 4	1.5
		(5)	3.75mg	38 ± 4	1.5
		(5)	5.0mg	42 ± 6	1.7
		(5)	7.5mg	39 ± 6	1.6

25

*肿瘤细胞接种后的死亡时间。

对于患 B16F10 黑素瘤的小鼠来说, 来自不同治疗方案的结果如下:

30

1) GCV 对没有接种细菌的患肿瘤动物的影响

35

将给予了黑素瘤细胞而不使用细菌的小鼠在接种肿瘤细胞后第 11 - 12 天按 3.75mg - 10mg/小鼠的剂量(这取决于实验)用 GCV 进行治疗,。在所有实验中, 用 GCV 治疗而不使用细菌的小鼠在肿瘤体积上表现出的减小较少, 所述的肿瘤体积在 5 天的 GCV 治疗中仍是显而易见的且在整个实验期内仍保持存在, 如附图 11C - E 中所示。正如表 19 (A) 中所概述的, 与没有治疗的对照组动物的存活时间相比, GCV 还引发了较小但却是可重复的存活时间的增加。这些在没有细菌治疗条件下 GCV 的效果不取决

于所研究范围内的剂量。

这些结果表明: 在本实验中所用的 B16F10 细胞有能力将 GCV 转化成其毒性的、磷酸化形式。与这种想法相同, 发现当将 GCV 以 25 μ g/ml 而不是附图 11 - F 所示的 10 μ g/ml 补充入培养基时, 培养物中 B16F10 黑素瘤细胞的增殖明显地受到了抑制。将 GCV 对患 Cloudman S91 黑素瘤 × 巨噬细胞杂交 48 (而没有接种细菌) DBA/2J 小鼠的相似影响记录在表 19 中。

2) GCV 对用不含 HSV TK - 质粒的细菌治疗的患肿瘤动物的影

10 响

当给患肿瘤小鼠接种沙门菌属菌株 YS7211, YS7212 和 YS7213 (它们中无一含有 HSV TK 基因), 且然后用 GVC 处理时, GCV 介导的肿瘤生长的抑制是显著的。甚至当考虑到 GCV 对对照组动物体内 B16F10 肿瘤的抑制作用时, 用 GCV 所获得的肿瘤抑制显著高于单独使用细菌所观察到的肿瘤抑制。这表明鼠伤寒杆菌可能是通过内源性磷酸转移酶而不用 HSV TK 基因能够将 GCV 转化成其的磷酸化、毒性形式, (Littler 等, 1992, 《自然》358: 160 - 162; Sullivan 等, 1992, 《自然》358: 362 - 364)。与这种想法一致的是发现除抑制肿瘤生长外, 有些细菌和 GCV 的结合治疗是高毒性的, 可缩短动物的存活时间, 如表 19 (A) 所示。毒性可能是由那些集中在诸如肝或骨髓这样的正常组织中的细菌产生磷酸化的 GCV 所导致的。

3) GCV 对用含 HSV TK 质粒细菌治疗的患肿瘤动物的影响

接种了含 HSV TK 质粒的沙门菌属克隆 YS7211 (YS7211/p5-3) 的患肿瘤小鼠甚至在无 GCV 治疗的情况下也表现出对肿瘤生长的抑制作用并可延长存活期, 如附图 11 - G 中所示。此外, 具有肿瘤和 YS7211/p5-3 且另外用 3.75mgGCV 治疗的动物表现出对肿瘤生长的抑制作用明显高于没有 GCV 条件下所观察到的情况。当植入肿瘤 28 天后进行测定时, 使用 YS7211/p5-3 作为载体, 以 GCV 介导的肿瘤抑制作用很明显以一种剂量反应性方式, 如附图 11 - H 所示。对于有些种类的 GCV 治疗的、患肿瘤小鼠来说, 当与接种了 YS7211/p5-3 而不给予 GCV 的小鼠相比时, 肿瘤的抑制作用与增加的平均存活时间相关。

总之:

1) 在没有接种沙门菌属的患肿瘤动物中, GCV 对肿瘤生长的抑

制作用较小与存活期的较小延长相关。

2) 接种了不含 HSV TK 质粒的沙门菌属的患肿瘤动物与 GCV 反应而表现出显著的肿瘤抑制作用, 这比不用细菌治疗的动物中所观察到的情况高。此外, 有些 GCV 与细菌的结合治疗对于动物来说是高毒性的, 可能是通过由诸如肝或骨髓这样的肿瘤外组织中的细菌将 GCV 转化成其毒性的形式而导致的。

3) 接种了含有 HSV TK 质粒的沙门菌属的患肿瘤动物还与 GCV 反应而表现出强肿瘤抑制作用。在这些实验中不可能评价与 GCV 磷酸化作用中内源性沙门菌属酶相比 HSV TK 的相对影响性。然而, 使用含有 HSV TK 表达质粒的克隆 YS7211 作为载体, 以 GCV 介导的肿瘤抑制作用和存活期的延长证明是以一种剂量依赖性方式, 见附图 11 - H。

17. 实施例: 鼠伤寒杆菌在生长在 nu/nu 小鼠体内人肿瘤中的定位
下列实验证明了沙门菌属在实验性动物体内人肿瘤中的定位。

17.1. 沙门菌属在人结肠肿瘤中的定位

给 NU/NU (BALB C) 小鼠 (9 - 10 周龄) 在两个区域 (上背及肋腹) 进行皮下接种, 每处均接种 1.5×10^7 HCT116 人结肠癌细胞。在可触摸到的、形成血管的肿瘤出现后 (约 2 周), 给动物进一步腹膜内接种 3×10^5 携带 HSV 胸苷激酶基因的鼠伤寒杆菌超感染性克隆 72^{S-3-2}。感染 3.5 小时, 21 小时和 72 小时后, 通过用甲氧氟烷麻醉使小鼠在无知觉的状态下死亡。以无菌方式取出肿瘤和肝, 用无菌 NaCl (0.9 %) 进行冲洗, 称重, 并用 LB 肉汤按 5 : 1 的比例 (肉汤体积 : 肿瘤重量) 将它们匀浆。在 72 小时 (匀浆前), 将片状物 (1-2mm³) 从有代表性的肿瘤中取出, 用 1/2 强度 Karnovsky's 固定剂进行固定, 并加工以供用电子显微镜的分析。通过在 LB 平板上涂板, 37 ° C 下培养过夜和对细菌菌落计数来对匀浆产物中的细菌进行定量。

结果如下: 在 3.5 小时和 21 小时时, 甚至当将匀浆产物未经稀释而涂板在 LB 琼脂平板上时, 在肿瘤和肝中存在少量水平的细菌。然而, 3 天后, 3/6 动物的结肠肿瘤中出现高水平的沙门菌属, 肿瘤: 肝中的细菌之比达 36,000 : 1。将这些动物的数据总结在下面的表 20 中。

表 20		
鼠伤寒杆菌接种 (腹膜内) 入患人结肠癌的 NU/NU 小鼠后 3 天的分布		
小鼠 A	沙门菌属/gm 组织	肿瘤/肝

	肝	2.6×10^4	
	肿瘤	6.9×10^8	26,500:1
	小鼠 D		
	肝	1.6×10^6	
5	肿瘤	3.1×10^9	2,000:1
	小鼠 E		
	肝	1.0×10^5	
	肿瘤	3.6×10^9	36,000:1

10 附图 12 - A 中所示的是来自从小鼠 A（表 20）中切下的 HCT 结
肠肿瘤切片的电子显微照片，其中发现沙门菌属的数量是 6.9×10^8 /g 肿
瘤，且肿瘤：肝感染细菌之比为 26,500:1。显微照片中所示的是与肿瘤相
关的中性粒细胞细胞质中的液泡内大量的鼠伤寒杆菌。有些细菌正在进行
15 分裂，如箭头所示。中性粒细胞或多形核白血细胞的特征在于其多叶形细胞
核（n）。在如本文所述受感染的 B16F10 黑素瘤中也观察到了与肿瘤相
关的中性粒细胞中的沙门菌属。在感染患肿瘤小鼠后，与结肠和黑素瘤的
肿瘤相关的中性粒细胞中存在的细菌提示沙门菌属可以刺激对肿瘤细胞的
宿主细胞免疫反应。在将寄生虫用作肿瘤特异性治疗载体过程中，肿瘤免
疫性的增强是另一个潜在的优点。

20

17.2.沙门菌属在不同人体肿瘤内的定位

25 给 Nu/nu（BALB C）小鼠（9 - 12 周龄）在左侧上背区皮下接
种 $1 - 1.5 \times 10^7$ 人肺癌 A 549，人结肠癌 HCT 116，人肾癌 CRL 1611，
或人肝癌 HTB 52 的细胞（美国典型培养物保藏中心）。当可触摸到的肿
瘤形成时，对于具有人肺，肝和肾肿瘤的动物来说，给小鼠进一步接种 2
 $- 5 \times 10^6$ cfu 鼠伤寒杆菌克隆 72，对于具有人结肠肿瘤的动物来说，给
予克隆 72⁵⁻³⁻²。克隆 72⁵⁻³⁻²携带 HSV 胸苷激酶转录单位。在处死动物 66
- 96 小时后，取出肿瘤和肝并称重。将肿瘤按 5 个体积 LB 肉汤/克湿重组
30 织进行匀浆。通过在 LB 琼脂平板上系列稀释而对匀浆产物中细菌的数量
进行定量。结果列在表 20（A）中并代表平均值 $\pm$ n=3 - 4 只动物的标
准偏差。

表 20（A）

鼠伤寒杆菌克隆 72 在具有人肺，结肠，肾和肝癌的 NU/NU 小鼠体内的

生物分布
沙门菌属/g 组织:

	起始肿瘤	肿瘤	肝	肿瘤 wt (mg)	肿瘤: 肝
5	肺癌	$3.2 \pm 1.4 \times 10^9$	$1.0 \pm 0.3 \times 10^7$	462 ± 186	320:1
	结肠癌	$2.5 \pm 1.6 \times 10^9$	$5.8 \pm 8.9 \times 10^5$	428 ± 235	4300:1
	肝癌	$6.7 \pm 11 \times 10^8$	$5.7 \pm 9.0 \times 10^6$	103 ± 29	120:1
	肾癌	$1.4 \pm 1.8 \times 10^8$	$6.0 \pm 3.0 \times 10^5$	103 ± 99	230:1

正如表 20 - A 中所示, 当腹膜内接种入 nu/nu 小鼠时, 鼠伤寒杆菌克隆 72 能够以人肺, 结肠, 肾, 和肝癌为靶且可以在它们中增殖, 一般 (但不总是) 能达到 $10^8 - 10^9$ /g 肿瘤的水平。在所用的 BALB/c nu/nu 小鼠中, 皮肤是无毛的和透明的, 使得经目视可确定所有肿瘤均是有血管的。沙门菌属感染的肿瘤湿重范围是: 肺癌, 220 - 600mg; 结肠癌, 160 - 600mg; 肝癌, 70 - 120mg; 和肾癌, 40 - 250mg。

将细菌菌落随机从接种克隆 72 后 96 小时的具有肾癌和肝癌的 nu/nu 小鼠中获得的肝和肿瘤匀浆产物中取出并通过重复涂板用来检测它们的表型。在所有检测的匀浆产物中, 发现 50/50 的菌落是 Ade⁻ 和 Xyl^{neg}, 与克隆 72 表型一致。

结果进一步证明了这样一种意图, 即将鼠伤寒杆菌衍生物用作广范围实体肿瘤的治疗载体, 而与肿瘤的来源或大小无关。在几种研究中, 沙门菌属克隆 72 和其衍生物可靶向高度血管化的肿瘤并在其中扩增, 所述的高度血管化的肿瘤对 nu/nu 小鼠中的人肿瘤而言小到 40 - 100mg, 且对 C57B6 小鼠体内的 B16F10 黑素瘤而言为带有较大坏死区的 4 - 8g 肿瘤。靶向小的血管化肿瘤并在其中扩增的能力表明了鼠伤寒杆菌作为治疗肿瘤载体的显著优点。

17.3. 经电子显微术定位人肺癌 A549 中的鼠伤寒杆菌

给小鼠在左侧上背区皮下接种 5×10^6 A549 细胞。6 周后, 可触摸到肿瘤并给动物腹膜内接种 3×10^6 鼠伤寒杆菌克隆 72, 持续时间为 66 小时。将动物处死并将部分肿瘤进行匀浆, 发现它们含有 1.6×10^9 鼠伤寒杆菌/g。制备肿瘤的中心部分而用于下述的电子显微术: 将部分肿瘤切成 $1 - 2\text{mm}^3$ 的小块, 并在 4^o C 时将它们固定在 1/2 强度 Karnovsky's 固定剂中 6 小时, 随后在二甲胍酸盐缓冲剂中洗涤过夜。用 1 % OsO₄ 和 1.5 % 亚铁氰化钾在二甲胍酸盐缓冲剂中将肿瘤组织后固定 2 小时并包埋在 Spurr's 树脂中。将超薄切片用乙酸双氧铀和乙酸铅染色。将它们通过 Zeiss109 电

子显微镜进行拍照。对于比较目的来说，应注意的是附图 12 - B 电子显微照片所示的鼠伤寒杆菌与引起显示的在小鼠实验性感染后肠上皮细胞中的鼠伤寒杆菌相类似，见 Takeuchi, 1967, 《美国病理学杂志》 50: 109 - 1361。

5 附图 12 - B 中所示的是胞外空间中的并在单个细胞（可能是中性粒细胞）内包含的大量鼠伤寒杆菌（用箭头表示），见上部左侧。在该视野内还观察到的是两种未鉴定的细胞以及细胞碎片，所述的未鉴定细胞看起来是如较大细胞内空间所表示的死亡细胞。

10 18. 实施例：鼠伤寒杆菌经营养缺陷体突变的减毒

下列研究表明：克隆 72 的毒性降低（见，例如，上述第 15.2 部分）是由于一种 Pur^- 表型。进一步描述的内容是分离作为另外的营养缺陷突变体（以不同的组合表达 Ade^- , Ilv^- , Arg^- , Aro^- , 和 Ura^- 表型）的克隆 72 减毒衍生物的分析。

15 18.1. 营养缺陷体的突变

检验克隆 72 的营养缺陷突变并发现它具有对腺嘌呤和维生素 B1 的生长需要，这表明一种嘌呤生物合成途径（ Pur^- ）中的突变。将实验设计成检测 Ade^- 突变是否能够导致上述所观察到的克隆 72 的减毒。将野生型
20 菌株 14028 和克隆 72 的群体用如 7.1. 部分所述的 UV 照射和亚硝基胍进行诱变。从诱变的菌株 14028 群体中分离出三种独立的 Pur^- 营养缺陷突变体克隆并命名为克隆 N, Q, 和 T。从诱变的克隆 72 群体中分离出三种独立的 Pur^+ 回复体克隆并命名为克隆 R, U, 和 W。

25 给 C57/6 小鼠腹膜内接种 2×10^6 c.f.u. 所获得的鼠伤寒杆菌的每种菌株。使小鼠随意取食和饮水并监测笼中死亡或濒临死亡的小鼠。使濒临死亡的小鼠（不活动，停止饮水）在无知觉状态下死亡并与其它死亡的小鼠一起统计。在注射细菌后 10 或 30 天后，使存活的动物在无知觉状态下死亡。

结果见表 20 (B)

30

表 20 (B)					
注射了不同鼠伤寒杆菌营养缺陷突变体的 C57B6 小鼠的存活期					
菌株	表型	死亡时间 (天数 ± S.D.)	存活者>10 天	存活者>30 天	
14028	野生型	3.0 ± 0.5	n.a.	n.a.	
5	72	超感染性, ade ⁻	5.8 ± 1.4	n.a.	n.a.
	R	72, Pur ⁻	3.9 ± 0.4	n.a.	n.a.
	U	72, Pur ⁻	3.9 ± 1.3	n.a.	n.a.
	W	72, Pur ⁺	4.1 ± 0.9	n.a.	n.a.
	T	14028, Pur ⁻	6.8 ± 1.5	n.a.	n.a.
10	N	14028, Pur ⁻	n.a.	4/8	n.d.
	Q	14028, Pur ⁻	n.a.	5/8	n.d.
	YS721	72, Ilv ⁻	n.a.	10/11	6/11
	YS7211	72, Ilv ⁻ , Arg ⁻	n.a.	8/8	7/8
	YS7213	72, Ilv ⁻ , Aro ⁻	n.a.	8/8	8/8
15	YS7212	72, Ilv ⁻ , Ura ⁻	n.a.	8/8	6/8
结果为平均值 ± n=8 - 12 动物的 SD					
n.a., 不适用; n.d., 没有做.					

如表 20 (B) 所示, 克隆 72 比野生型菌株 14028 毒性低。然而, 3 种克隆 72 的 Pur⁻回复体 (U, W, 和 T) 表达的毒性均与 14028 类似。相反, 从菌株 14028 中分离的 3 种 Pur⁻营养缺陷突变体 (T, N 和 Q) 均比 14028 或克隆 72 毒性低。

从克隆 72 中分离的另外的营养缺陷体产生更低毒性的菌株。例如, 克隆 72 是一种需要克隆 72 衍生物 (Ilv⁻) 的异亮氨酸 - 缬氨酸, 且克隆 YS721 的毒性显著低于克隆 72。同样, 诸如克隆 YS7211 (Arg⁻), YS7212 (Ura⁻) 和 YS7213 (Aro⁻) 这样的克隆 YS721 营养缺陷衍生物在毒性上均显著低于 YS721 本身。

18.2. 克隆 72 的超感染性表型在遗传上不同于其对营养缺陷嘌呤需求的证

据
对上述 18.1 部分中的各种鼠伤寒杆菌 Pur⁻和 Pur⁺菌株测定其感染培养物中人 M2 黑素瘤细胞的能力。所用的体外感染测定如 18.1 部分中所述。

结果如表 20 (C) 中所述。

表 20 (C)

由各种鼠伤寒杆菌嘌呤突变体对体外人 M2 黑素瘤细胞的感染性

菌株	表型	感染沙门菌属/10 ⁶ 黑素瘤细胞/15' (± S.D.)	x 野生型
14028	野生型	1.0 ± 0.2 × 10 ⁵	1.0x
5 72	超感染性, ade ⁻	9.8 ± 0.7 × 10 ⁵	9.8x
R	72, Pur ⁻	5.9 ± 1.4 × 10 ⁵	5.9x
U	72, Pur ⁺	1.1 ± 0.2 × 10 ⁶	11x
W	72, Pur ⁺	1.1 ± 0.3 × 10 ⁶	11x
N	14028, Pur ⁻	1.9 ± 0.5 × 10 ⁵	1.9x
10 Q	14028, Pur ⁻	1.5 ± 1.0 × 10 ⁵	1.5x
T	14028, Pur ⁻	1.1 ± 0.4 × 10 ⁵	1.5x

结果为平均值 ± 三次感染的 SD。将细菌在稀释和用于感染测定前在 LB 肉汤中培养至 O.D.₆₀₀ = .600。

如表 20 (C) 中所示, 与野生型菌株 14028 相比, 克隆 72 表现出对人 M2 黑素瘤细胞的超感染性。14028 Pur⁻衍生物中无一在感染性方面显著区别于菌株 14028 本身, 且所有克隆 72 Pur⁺衍生物表达的超感染性均类似于克隆 72 本身。结果表明: 克隆 72 表现出嘌呤需求, 这就是克隆 72 在小鼠体内毒性降低的原因, 且从克隆 72 的超感染性表型中经遗传分离。这些结果表明来自嘌呤营养缺陷体的突变和回复突变均不能影响克隆 72 的超感染性表型特征的表达。

18.3.鼠伤寒杆菌克隆 72 的减毒衍生物的超感染性表型的保留

在下列实验中, 在体外评价上述 18.1 部分中克隆 72 的某些营养缺陷衍生物的感染性。将所评价的沙门菌属克隆的表型列在上述 18.1 部分的表 20 (B) 中。使用的是表 10.1 部分所述的感染性测定。

将结果列在表 20 (D) 中。

表 20 (D)

鼠伤寒杆菌营养缺陷体对培养物中人黑素瘤细胞的感染性

菌株	感染沙门菌属/10 ⁶ 黑素瘤细胞/15 分钟	x 野生型
14028 (野生型)	4.3 ± × 10 ⁴	1.0x
克隆 72	4.4 ± × 10 ⁵	10x
克隆 YS721	3.2 ± × 10 ⁵	7.4x
35 克隆 YS7211	2.0 ± × 10 ⁵	4.7x
克隆 YS7212	1.7 ± × 10 ⁵	4.0x

克隆 YS7213

 $1.3 \pm \times 10^3$

0.03x

结果代表平均值 $\pm$ 10 - 19 次分别感染的 SD。使细菌在用于感染测定的稀释前在 LB 肉汤中生长至 $O.D_{600} = 0.5$ 。

当与野生型菌株 14028 比较时, 鼠伤寒杆菌克隆 YS721, YS7211 和 YS7212 (尽管每种都多少比克隆 72 对 M2 黑素瘤细胞的感染性低) 仍然是超感染性的, 表明了它们对超感染性表型的部分保留。相反, 发现克隆 YS7213 (Ade^- , Ilv^- , Aro^-) 具有显著降低的感染性, 其对 M2 黑素瘤细胞的感染性比野生型菌株 14028 低约 30 倍。

10 18.4. 带有营养添加剂或 B16F10 黑素瘤提取物的鼠伤寒杆菌 PUR^- 和

URA⁻ 突变体的生长

按下列方式制备肿瘤提取物: 将 B16F10 黑素瘤肿瘤细胞 (5×10^5) 皮下移植入 68 周龄的雌性 C57B6 小鼠体内。3 - 4 周后, 处死小鼠并以无菌方式取出肿瘤且在 $-20^\circ C$ 下快速冷冻。将总计 51g 的冷冻汇集的肿瘤在 $4^\circ C$ 下融化并在一种加盖的 Virtis 组织匀浆器内的 255ml (5 个体积) 冷水中剧烈匀浆 1 小时。用 10% 三氯乙酸 (TCA) 提取所得匀浆产物, 将它放在冰上 15 分钟, 并在 $4^\circ C$ 时在 Beckman J21 离心机中以约 $20,000 \times g$ 离心 15 分钟。在室温下进行进一步的过程。将透明、无色的上清液部分 (300ml) 保留并通过将它与 1 个体积 (300ml) 的无水乙醚一起手工振荡 1 分钟来进行提取。在提取过程中, 使混合物沉降并将上相 (含有乙醚, 提取的 TCA, 以及来自肿瘤提取物的醚溶性化合物) 经抽吸而取出并通过批准的环境保护程序弃去。在 5 个这样的提取循环过程中, 水相的 pH 从起始值约为 pH 1 上升到最终值为 pH 4 - 5, 与蒸馏 H_2O 的 pH 类似, 这表明已将 TCA 有效地除去。给水相通氮气 15 分钟, 此时, 乙醚的气味已经消失。

然后将溶液通过一种 0.2 的微量滤器进行过滤, 分成等份, 并直接用于本文中的测定或在 $-20^\circ C$ 下储存以供进一步使用。

在 $35^\circ C$ 时, 使野生型菌株 14028 和其营养缺陷衍生物克隆 72 (Pur^- , 维生素 B1⁻) 以及 YS7212 (Ade^- , 维生素 B1⁻, Ilv^- , Ura^-) 在 5ml Luria 肉汤 (LB) 中的斜面上生长过夜。1 天后将 0.1ml 的每种培养物稀释入 10ml 培养基 56 ($0.037M KH_2PO_4$, $0.06M Na_2HPO_4$, $0.02\% MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $0.2\% (NH_4)_2SO_4$, $0.001\% Ca(NO_3)_2$ 和 $0.00005\% FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 该培养基补充了 $0.2 \mu g/ml$ 维生素 B1, 33μ

g/ml 腺嘌呤, 50 μ g/ml 尿嘧啶, 83 μ g/ml 异亮氨酸, 83 μ g/ml 缬氨酸和 0.3% 葡萄糖, 并在 37 $^{\circ}$ C 时使稀释入培养基 56 的培养物在一种旋转器生长过夜。1 天后通过离心来收集培养物并将它重新悬浮在简单培养基 56 (1 ml 培养物加 9 ml 培养基 56) 中。然后向等份 (0.25 ml) 的这些悬浮液中以下列形式加入含有各种补充剂的培养基 56:

- A. 培养基 56 加葡萄糖;
- B. 培养基 56 加葡萄糖, 维生素 B1, 腺嘌呤, 异亮氨酸, 缬氨酸, 和尿嘧啶; 以及
- C. 培养基 56 和肿瘤提取物 (10%)。

10 将细菌放入一种涡流 H₂O 浴 (37 $^{\circ}$ C) 中, 且随后用一种分光光度计来观测作为 OD₆₀₀ 函数的细菌生长情况。所有培养物的起始光密度在 0.005-0.07 的范围。

正如附图 15A - C 中所表明的, 野生型菌株 14028 能够在试验的所有三种培养基 (包括最基本的三种, 培养基 56 加葡萄糖) 中以近似相同的速率增殖。不同于野生型菌株, 克隆 72 和 YS7212 均不能够在培养基 56 加葡萄糖中生长, 表现出通过重复在琼脂上涂板而最初观察到它们的营养需求。相反, 克隆 72 和克隆 YS7212 能够在补充了 10% 肿瘤提取物的培养基 56 中生长。以相同方式制备的肝提取物还能够维持克隆 72 和 YS7212 的生长。

20 由于沙门菌属营养缺陷菌株的生长状态取决于养分的有效性, 所以尽管本发明者不希望限定作用的具体机理, 但看来这类营养缺陷体仍具有作为肿瘤载体的优点, 这是因为肿瘤的环境理论上能够产生这类养分, 例如在肿瘤的坏死空间中或在活跃分裂细胞内。因此, 对营养缺陷体来说, 诸如沙门菌属这样的生物体的突变不仅能够降低它们的体内毒性, 而且可以

25 提供用于其选择性群体和在实体肿瘤内扩增的内在机理。

18.5. 鼠伤寒杆菌 PUR⁻ 和 URA⁻ 突变体在培养物中人 M2 黑素瘤细胞内的

增殖

30 在这部分中要证明的是所培养的 M2 黑素瘤细胞的内环境还可以满足这些克隆的营养缺陷需求, 这是因为一旦克隆 72 和克隆 YS7212 在需氧条件下侵入所培养的 M2 黑素瘤细胞, 那么它们能够进行几个循环的分裂。

使鼠伤寒杆菌克隆 72 和 YS7212 生长至 O.D.₆₀₀=0.8 或约

10⁹c.f.u./ml。然后将两种菌株按 10⁶ c.f.u./ml 加入 7.2.部分中所述的人 M2 黑素瘤细胞培养基中。用沙门菌属感染 15 分钟后, 将真核细胞培养物用新鲜的培养基冲洗并加入含有庆大霉素 (10 μg/ml) 的培养基。在 6 小时的期间内每间隔 1 小时如 7.2.部分中所述处理培养物以供沙门菌属/10⁶ 黑素瘤细胞的定量。此外, 将不含黑素瘤细胞而含有细菌的对照瓶平行地用含有黑素瘤细胞的实验瓶进行处理。

结果如附图 15 - D 所示。在 6 小时的期限内, 含有沙门菌属而不含黑素瘤细胞的对照瓶中没有存活的细菌, 这证明伴随有庆大霉素治疗的洗涤过程成功地杀灭了所有未在动物细胞内的定居受保护的存活的细菌。

相反, 在 M2 黑素瘤细胞存在的情况下, 鼠伤寒杆菌克隆 72 和 YS7212 每种均可在 6 小时期限内显著增加其数量, 对于每一菌株来说, 均具有约 2 小时的倍增时间。相差和电子显微镜分析表明 M2 黑素瘤细胞能够在液泡内将感染的沙门菌属分隔化。结果显示沙门菌属在黑素瘤细胞内的净生长率是一种稳态函数, 这反映出黑素瘤细胞既有通过提供营养需求来刺激营养缺陷体生长的能力, 又有通过抗细菌机理来抑制营养缺陷体生长的能力。

18.6.鼠伤寒杆菌营养缺陷减毒菌株在患 B16 黑素瘤肿瘤 C57B6 小鼠体内的

生物分布

这些研究表明克隆 YS721, YS7213, YS7211 和 YS7212 在体内肿瘤中有以肿瘤为靶并增殖的能力。

给 6 - 8 周龄的 C57B6 雌性小鼠皮下接种 (左侧上背) 2.5-5.0 × 10⁵B16F10 小鼠黑素瘤细胞。当肿瘤生长到约 0.5g (肿瘤接种后 14 - 16 天) 时, 给动物进一步腹膜内接种指定的鼠伤寒杆菌菌株。对于菌株 14028 和 72 来说, 细菌接种物为 4 × 10⁵c.f.u./小鼠, 且对于菌株 YS721, YS7211, YS7212 和 YS7213 来说, 细菌接种物为 2 - 4 × 10⁶cfu/小鼠。在细菌接种后 40 和 96 小时后, 处死小鼠, 以无菌方式取出肿瘤和肝, 用无菌 NaCl (0.9%) 冲洗, 称重, 并在 LB 肉汤中按 5: 1 (体积: 肿瘤重量) 的比例进行匀浆。通过将匀浆产物涂布在 LB 琼脂平板上, 在 37·C 下培养过夜并对细菌菌落计数来对细菌定量。列在表 20 (E) 中的结果表示平均值 ± n = 4 - 7 只动物的 SD。

表 20 (E)

鼠伤寒杆菌的野生型和减毒菌株在患 B16 黑素瘤肿瘤的 C57B6 小鼠体内的生物分布
沙门菌属/g 组织

	菌株	肿瘤	肝	肿瘤: 肝
5	A. 细菌接种后 40 小时			
	14028	$6.5 \pm 6.8 \times 10^9$	$2.4 \pm 2.8 \times 10^7$	270:1
	72	$1.7 \pm 1.2 \times 10^9$	$1.9 \pm 2.3 \times 10^5$	9000:1
	YS721	$8.7 \pm 3.1 \times 10^8$	$4.2 \pm 3.6 \times 10^6$	210:1
	YS7211	$3.3 \pm 3.0 \times 10^7$	$8.1 \pm 8.4 \times 10^5$	41:1
10	YS7212	$3.9 \pm 7.3 \times 10^7$	$1.1 \pm 0.8 \times 10^6$	35:1
	YS7213	$1.5 \pm 2.8 \times 10^8$	$4.0 \pm 3.1 \times 10^5$	375:1
	B. 细菌接种后 96 小时			
	14028	濒临死亡/死亡		
	72	濒临死亡/死亡		
15	YS721	$3.2 \pm 1.5 \times 10^9$	$4.7 \pm 6.9 \times 10^6$	680:1
	YS7211	$1.6 \pm 2.2 \times 10^9$	$6.3 \pm 9.9 \times 10^6$	253:1
	YS7212	$1.1 \pm 7.4 \times 10^9$	$5.1 \pm 8.6 \times 10^5$	2200:1
	YS7213	$1.3 \pm 2.5 \times 10^9$	$2.2 \pm 6.9 \times 10^5$	5900:1

20 正如由所有情况中肿瘤含有的鼠伤寒杆菌比开始接种的多 10 - 1000 倍这一发现所证明的, 每种试验菌株均能够以肿瘤组织为靶并在肿瘤内复制到不同的程度。此外, 在所有情况中, 肿瘤: 肝的细菌/g 组织的比例至少为 35: 1 且在有些情况中接近 10^4 。将本研究中分析的肿瘤列在按重量从 0.5-2.0g 排列的表 20 (E) 中。在所有条件下和试验的菌株中, 克隆 72 在接种 40 小时后表现出最高肿瘤: 肝比率。此外, 鼠伤寒杆菌菌株 14028 以及克隆 72 和其衍生物还能够靶向例如 4 - 8g 的较大 B16F10 黑素瘤肿瘤并在其中扩增。另外, 正如 10.3.2.部分和表 12A 中所示, 克隆 72 可以靶向小到 40mg 的人实体肿瘤并在其中扩增。

30 然而, 克隆 72 和野生型菌株 14028 对 C57B6 小鼠、尤其是患肿瘤的小鼠具有强烈的毒性。例如, 注射了菌株 14028 和 72 的患 B16F10 黑素瘤的 C57B6 小鼠在接种细菌后具有的平均存活时间分别为 2.1 ± 0.4 天 ($n=6$) 和 4.7 ± 0.5 天 ($n=9$)。因此未测定在 96 小时时不测定这些菌株的生物分布。同样, 克隆 YS721 (尽管与 14028 和克隆 72 相比是减毒的) 在患黑素瘤的小鼠体内仍然是毒性的。例如, 注射了克隆 YS721 的患 B16F10 黑素瘤的小鼠具有的平均存活时间为 8.1 ± 0.2 天 ($n=11$)。沙门菌属克隆 YS7211, YS7212 和 YS7213 (在检验的菌株中具有最小毒性)

每种均在接种后 96 小时表现出大于 10^9 cfu 细菌/g 肿瘤的密度，具有的肿瘤：肝的比例分别为 153：1，2200：1，和 5900：1。

18.7. 鼠伤寒杆菌营养缺陷体在患肿瘤小鼠体内培养后的表型稳定性

5 性

营养缺陷表型的遗传回复理论上能够导致预先减毒细菌的毒性增加。因此，将细菌在患肿瘤小鼠体内培养后，检测菌株 YS7211，YS7212 和 YS7213 营养缺陷表型的稳定性。

10 将从接种 YS7211，YS7212 或 YS7213 后 40 小时动物的肝和肿瘤匀浆产物中获得的鼠伤寒杆菌从 LB 平板上挑出，并重复涂布在补充了不同组合的营养添加剂的基础培养基琼脂平板上。补充剂是异亮氨酸，缬氨酸，腺嘌呤/维生素 B1，精氨酸，尿嘧啶，芳香氨基酸，和葡萄糖。对于三种菌株的每种来说，从肿瘤和肝匀浆产物中回收的 50/50 细菌克隆表现出最初接种菌株所预期的表型，这表明在本实验中菌株在遗传上是足够稳定的，基本上不会在所试验条件下回复。

20 然而，应注意的是所用的营养缺陷菌株在整个这些研究中不是绝对稳定的。在有些情况中观察到了遗传回复体，最值得注意的是在 YS7211 菌株中观察到了从 Arg^- 至 Arg^+ 的回复体。例如，在 96 小时前接种了带有含胸苷激酶质粒的克隆 YS7211 的患肿瘤小鼠中，发现从肝中分离的全部 50 种细菌是 Pur^- ， Ilv^- ，和 Arg^- ，这表明在小鼠体内已经发生了回复生物体的回复突变和选择性生长。克隆 YS7211，YS7212 和 YS7213 营养缺陷表型在小鼠体内相对稳定的这一发现由接种了这些细菌小鼠的长期存活所证明。

25 18.8. 接种了鼠伤寒杆菌营养缺陷突变体的患肿瘤 C57B6 小鼠的肿瘤生长

和存活期增加的抑制

30 给 C57B6 雌性小鼠（5 - 7 周龄）在左侧上背区皮下接种 5×10^5 生长在培养物中的 B16F10 黑素瘤细胞，在接种肿瘤细胞后第 8 天时，给小鼠进一步腹膜内接种 $2 - 4 \times 10^6$ c.f.u. 鼠伤寒杆菌菌株 YS721，YS7211，YS7212 或 YS7213。使用测径器定期测定肿瘤的长，宽和高且按 mm^3 计算成肿瘤体积来评价肿瘤的生长。附图 16A - D 中所示的肿瘤生长结果代表平均值 $\pm$ 包括 5/5 动物存活的 5 只动物/组 SD。在一组中一只或多只动物死亡后，当将数据如附图 16A - D 所示进行绘制时，存活动

物的平均肿瘤大小不再显示。

在肿瘤细胞植入 33 天后停止所有肿瘤测定，即使用克隆 YS7211 治疗的 5/5 患肿瘤动物仍然在此时存活。使动物随意取食和饮水。细菌接种后 23 天（实验#1）或 10 天（实验#2），将对照组和细菌治疗的小鼠给予 Baytril™（恩氟沙星，0.2mg/ml 饮用水）并在这种抗菌素上维持总计 2 周。在实验#1 中，记录小鼠濒临死亡（不活动，停止饮水）或死亡的时间。将结果列在表 20（F）中，该表为平均存活率±所试验条件的 SD。在实验#2 中，当肿瘤生长到 4g 时处死动物并将它们列为实验#1 中所述的其它类死亡。用于评价存活期的两种不同方法导致与实验#1（28 天）相比实验#2（26 天）中对照组动物的存活时间多少有些缩短。

表 20（F）				
接种了鼠伤寒杆菌的患 B16F10 黑素瘤的 C57B6 小鼠的存活期				
肿瘤细胞接种后的死亡时间:				
菌株		(天数 ± SD)	治疗组/对照组 (T/C)	
对照组 (无细菌)	实验 1	28 ± 2	1.0	
	2	26 ± 3	1.0	
	YS7211	1 36 ± 9	1.3	
	2	41 ± 10	1.6	
YS7213	1	36 ± 5	1.3	
	2	38 ± 6	1.5	
YS7212	1	51 ± 7	1.8	
	2	55 ± 32.1		

结果代表平均值± 5 只动物的 SD。

附图 16A - D 表示相对于将 5×10^5 B16F10 黑素瘤细胞皮下接种入 C57B/6 小鼠后的时间的平均值± SD 肿瘤体积 (mm³)。所有四种沙门菌属克隆 (即克隆 YS721，YS7211，YS7212 和 YS7213) 可引发动物体内肿瘤生长的抑制。通过 Ade⁻和 Ilv⁻营养缺陷体减毒的克隆 YS721 对患肿瘤的小鼠来说仍然是毒性的且与不给予细菌的对照组患肿瘤动物相比不能导致存活期的延长。既然对照组动物的死亡显然是由于很大的肿瘤块 (4 - 8g) 的原因，那么接种了克隆 YS721 的患肿瘤动物的死亡看来是细菌毒性的结果，这是因为这些动物体内具有的肿瘤相当小且其本身没有生命危险。在死亡时肿瘤的范围在从不能触摸到至小于 0.5g。

相反, 用克隆 YS7211，YS7212 和 YS7213 (每种的毒性均比克隆 YS721

低) 治疗患肿瘤的小鼠除了可导致肿瘤生长的抑制外, 还可导致存活期的显著增加。由各个沙门菌属克隆导致的肿瘤生长的抑制程度(如附图 16A - D 所观察到的) 与它们引发存活期增加的能力有关, 如表 20 (F) 中所观察到的。对于对照组动物来说, 肿瘤生长到 1g (1000mm³) 的平均时间约为 18 天, 对于用 YS7213 和 YS7211 治疗的动物来说约为 31 天, 且对于用 YS7212 治疗的动物来说约为 45 天(推断)。与用克隆 YS7213, YS7211 和 YS7212 治疗动物的平均存活时间 38, 41 和 55 天相比, 这与对照组患肿瘤动物的相应平均存活时间为 26 天相一致。

因此, 在所试验的沙门菌属减毒菌株中, 抑制肿瘤生长和延长存活期效力的顺序是 YS7212>YS7211>YS7213。使用抗菌素(恩氟沙星)的早期治疗(即与细菌接种后 23 天相比为 10 天)可增加接种沙门菌属的患肿瘤动物的存活时间, 但不能增加对照组动物的存活时间。

18.9. 表达胞嘧啶脱氨酶的营养缺陷鼠伤寒杆菌的抗肿瘤活性

在 0 天时, 通过经外侧尾静脉将 1×10^5 细胞注射入 C57B/6 小鼠来建立 B16F10 的实验性转移瘤模型。在第 5 天时, 将等份的 0.2ml 携带胞嘧啶脱氨酶表达构建体的 YS7212 细菌悬浮液(见针对 CD 构建体的附图 4E)(约为 1×10^7 CFU/ml) 腹膜内注射入小鼠。在第 7 天时, 将 5-氟胞嘧啶(取 0.4ml 等份按 10mg/ml 溶于 PBS)(最终剂量: 200mg/kg), 腹膜内注射入小鼠。每天记录动物的死亡数。将结果列在附图 17 中。

附图 17 清楚地表明 CD 和 5-氟胞嘧啶的结合可延长沙门菌属表达的患 B16F10 肺转移瘤动物的存活期。

19. 实施例: 鼠伤寒杆菌通过脂多糖生物合成中突变的减毒

使用 LPS 途径中的遗传和酶损害已经分离了鼠伤寒杆菌和大肠杆菌的几种突变体菌株(Raetz, 1993, 《细菌学杂志》175: 5745 - 5753)。一种这类突变体 firA⁻的突变是在编码酶 UDP - 3 - O (R - 30 羟基肉豆蔻酰) - 胍基乙酸 N - 酰基转移酶的基因内进行的, 该基因可调节内毒素生物合成中的第三步(Kelley 等, 1993, 《生物化学杂志》268: 19866 - 19874)。具有这类突变的鼠伤寒杆菌和大肠杆菌菌株可产生一种不同于野生型脂质 A 的脂质 A, 不同点在于它含有 17 脂肪酸, 十六烷酸(Roy 和 Coleman, 1994, 《细菌学杂志》176: 1639 - 1646)并具有降低的脂质 A 4' 激酶活性。

将 firA⁻突变体用于研究其经人体单核细胞诱导 TNF α 产生的能力以及

在小鼠体内靶向肿瘤的能力。

19.1. 鼠伤寒杆菌 *firA*⁻ 经人血单核细胞诱导 TNF - α 产生的能力

Hirvas 等在 1991 《欧洲分子生物学协会杂志》 10: 1017 - 1023 中描述了鼠伤寒杆菌菌株 SH5014 和其 *firA*⁻ 衍生物 SH7622。这些菌株的基因型如下:

菌株 SH5014 *ilv*-1178 *thr*-914 *his*-6116 *metA*22 *metE*551 *trpB*2

xyl-404 *H1*-b *H2*-e, n, x *flaA*66 *rpsL*120 *rfaJ*4041;

菌株 SH7622 *ilv*-1178 *thr*-914 *his*-6116 *metA*22 *metE*551 *trpB*2

xyl-404 *H1*-b *H2*-e, n, x *flaA*66 *rpsL*120 *rfaJ*4041, *ssc*-1 (*firA*¹⁸)。

将鼠伤寒杆菌 *firA*⁻ 菌株 SH7622 的衍生物挑出, 命名为 SH7622 - 64, 并用作本部分以及下面 19.2 部分中实验的 *firA*⁻ 菌株。将 SH7622 - 64 用于选择其对抗菌素新生霉素的超敏感性和温度敏感性生长, 这是 *firA*⁻ SH7622 菌株的特征。

从鼠伤寒杆菌菌株 14028 和其衍生物克隆 72, 克隆 YS7212, 和克隆 YS7213; 以及菌株 SH5014 和其 *firA*⁻ 衍生物 (克隆 SH7622 - 64) 中提取出 LPS, 方法如下: 使细菌在 500ml LB 肉汤中生长至 $O.D_{600}=0.9$ 或约 2×10^9 cfu/ml。通过离心收集它们, 且沉淀含有约 10^9 cfu/ml。通过离心收集它们, 且将含有 10^{12} 细菌的沉淀取出并在 - 20 °C 下冷冻储存。为提取 LPS, 将沉淀重新悬浮在 18.3ml H₂O 中, 并加入 15 ml 重蒸馏的苯酚 (H₂O: 苯酚, 55: 45, 体积/体积)。在 69 - 70 °C 时, 将混合物放入一种振动水浴中 1 小时以产生单相混合物, 然后在冰上冷却。将冷却的混合物分离成主要含有蛋白质的苯酚相和含有脂多糖和核酸的水相 (Galanos, C., Luderitz, O., 和 Westphal, O., 1969)。将水相冷冻干燥至干燥并将白色松散的冷冻干燥材料用作 LPS 的来源。将 LPS 称重并按 1mg/ml 溶于 H₂O, 作为下述使用人体巨噬细胞培养中的稀释用贮存物。

按如下方式制备人体巨噬细胞且所有过程均在室温下进行: 将来自健康人志愿者的血液 (60ml) 收集入一种肝素化注射器中。7 ml 等份血液在 15 ml Corning 塑料离心管中的 4 ml IsolympTM (密度 - 1.077g/ml; 9.0g3,5 - 双 (乙酰氨基) - 2,4,6, - 三碘苯甲酸钠和 5.7g 菲可 400TM/100ml H₂O; Pharmacia Fine Chemicals, A. B. Uppsala, 瑞典) 上分层, 将它们以 2000x g 离心 45 分钟。血红细胞通过 IsolympTM 沉淀, 中性粒细胞和其它细胞沉降入这种界面上的分离带中, 且上述淋巴细胞/巨噬细胞带是血

清, 可见其黄色。用移液管从每支管中取出血清, 将它们集成总体积约 30 ml 并储存以供向下述培养基中补充。将淋巴细胞/巨噬细胞带集成约 15 ml 总体积, 用 40 ml RPMI 1640 培养基稀释, 并以 1000x g 离心 5 分钟。将浑浊的上清液去除并获得约 0.2ml 沉淀的白细胞。用补充了 15 % 人血清 (上述), 青霉素 (100 单位/ml) 和链霉素 (100 μ g/ml) 的 50 ml RPMI 1640 培养基重新悬浮细胞。用血细胞计数器来测定从 60 ml 全血中回收的存活淋巴细胞和巨噬细胞, 计数约为 7×10^7 细胞。将这些细胞 (淋巴细胞和单核细胞) 一起按 0.5ml/孔分配入 24 孔 Corning 组织培养平板内, 在 37 $^{\circ}$ C 下的通气加湿培养箱内培养 15 分钟。

第 2 天用不含血清而含有抗菌素的 RPMI 1640 将该培养物冲洗两次。在每次冲洗间, 将培养物在 37 $^{\circ}$ C 的培养箱内培养约 1 小时以促进淋巴细胞和其它非贴壁细胞的去除。发现贴壁细胞占大多数, 尽管它们不全来源于血液单核细胞, 即借助附着培养皿的特征而与其血液单核细胞状态相区别的巨噬细胞。例如, 在涂布入培养物后 48 小时测定贴壁细胞群体内巨噬细胞百分数的组织学测定中, 发现该群体对于酶的非特异性酯酶表达来说基本上 100 % 是阳性的, 所述的非特异性酯酶是一种通常用作区别单核细胞和巨噬细胞与淋巴细胞和其它细胞类的标记物。结果表明: 在下述 LPS 攻击中应用的如果不是所有的细胞, 那么它们多数来源于单核细胞。

在上述第二次冲洗后, 将不含血清、含有抗菌素、补充了 LPS 的 RPMI 1640 的按所指定的浓度加入细胞中, 并在 37 $^{\circ}$ C 下将培养物放入一种通气、加湿培养箱中过夜。20 小时后, 将带孔平板的培养物在一种 Beckman GS-15 离心机中以 8000x g 离心 10 分钟, 将上清液除去并用 QUANTI-KINETM 人体 TNF - α 免疫测定试剂盒 #DTA50 (R & D 系统, Minneapolis, MN) 测定 TNF - α 的含量。将通过人体巨噬细胞产生的 TNF - α 以 pg/ml 绘制成 pg/ml 加入到培养基中细菌 LPS 的函数并表示在附图 18 中。

菌株 14028 和其衍生物克隆 72, 克隆 YS7212 和克隆 YS7213 以及菌株 SH5014, 所有这些菌株以剂量依赖形式的 LPS 浓度诱导人体巨噬细胞产生 TNF - α 。来自每种菌株的低至 100 pg/ml (0.1ng/ml) 的 LPS 浓度可刺激 TNF - α 的产生, 且在浓度为 10^3 pg/ml 和 10^4 pg/ml 时逐渐增加刺激强度, 经巨噬细胞诱导 TNF - α 产生至 600 - 800 pg/ml 的水平。经 LPS 诱导的 TNF - α 水平与患有脓毒性休克综合征病人以及注射了大肠杆菌 LPS 的人志愿者中发现的 TNF - α 循环水平相类似 (Morrison 等, 1994, 《美国金属协会新闻》60: 479 - 484)。相反, 来自 firA⁻菌株

SH7622 - 64 的 LPS 对巨噬细胞产生 TNF - α 的刺激要小得多, 且仅在浓度为 10^4 pg/ml 时才能检测到。因此, 根据剂量反应的比较, 当与来自 firA⁻ 亲代菌株 SH5014 的 LPS 相比时, 来自菌株 SH7622 - 64 的 LPS 刺激巨噬细胞 TNF - α 产生的有效性仅约为 1 %。此外, 结果表明: 菌株 YS7212 和 YS7213 每种产生的 LPS 均与野生型菌株 14028 产生的 LPS 类似, 正如经刺激人体巨噬细胞所估计的一样。

19.2.通过产生 firA⁻突变的鼠伤寒杆菌的肿瘤靶向

将 M27 小鼠肺肿瘤细胞或 B16F10 小鼠黑素瘤细胞 (5×10^5) 皮下移植入 C57B6 小鼠。当可触摸到肿瘤时, 使 SH7622 - 64 在 37 °C 下在 LB 肉汤中生长至密度约为 10^9 cfu/ml (OD₆₀₀ = 0.8)。将等份的 $5 - 10 \times 10^6$ cfu 取出并接种入患肿瘤的小鼠。在细菌接种后 48 小时 (M27 肺) 和 96 小时 (B16F10 黑素瘤) 时, 将动物处死, 取出肿瘤和肝, 称重, 并将它们按 5ml/g 组织的比例在 LB 肉汤中匀浆。通过在 LB 琼脂平板上系列稀释来对匀浆产物中的细菌进行定量。将结果列在表 20 (G) 中。

表 20 (G)				
通过具有脂多糖生物合成的 firA ⁻ 突变的鼠伤寒杆菌的肿瘤定位				
沙门菌属/g 组织:				
20	初始肿瘤	肿瘤	肝	肿瘤: 肝
	M27 肺	2.9×10^6	-o-	n.a.
	B16	3.2×10^5	1×10^2	3200:1

结果来源于单个动物。

如表 20 (G) 中所示, 当腹膜内接种入小鼠时, 菌株 SH7622 - 64 能够集中在 B16F10 黑素瘤和 M27 肺肿瘤内。这些结果连同 19.1 部分中的结果表明来自这种特殊 firA⁻ 菌株的 LPS 在其诱导人体巨噬细胞中 TNF - α 的能力方面受到了强烈地抑制, 这证明通过内毒素生物合成中的突变而减毒的沙门菌属可以用作体内的肿瘤载体。

20. 实施例: 鼠路易斯肺癌中克隆 YS721 和 YS7211 的肿瘤特异性累积
本实施例证明营养缺陷突变体沙门菌属克隆 YS721 和 YS7211 集中在肺癌。

在 0 天时, 通过给 C57B/6 小鼠皮下注射 5×10^5 细胞来建立路易斯肺癌的实验性模型。在第 14 天时, 给小鼠腹膜内注射等份的 0.2ml 细菌悬浮

液（约 1×10^7 CFU/ml）。在第 16 天时，收集肿瘤和肝并匀浆，且通过涂板系列稀释来测定细菌数。相对分布的结果见表 20（H）。

表 20（H）			
小鼠体内克隆 YS721 和 YS7211 的肿瘤特异性累积			
菌株	病原体数/g 肝	病原体数/g 肿瘤	比例：肿瘤/肝
YS721	9.8×10^6	4.7×10^{10}	4.8×10^3
	4.3×10^5	3.2×10^{10}	7.3×10^4
	1.1×10^6	1.4×10^9	1.3×10^3
	1.6×10^6	1.0×10^{12}	6.2×10^5
	3.0×10^4	2.3×10^9	7.7×10^4
YS7211	1.4×10^4	2.6×10^{10}	1.9×10^6
	1.9×10^5	2.7×10^8	1.4×10^3
	2.3×10^5	6.0×10^{11}	2.6×10^6
	1.0×10^6	5.0×10^{11}	5.0×10^5

极高含量的细菌集中在这些肿瘤以及其它肿瘤，这表明：对于一种肿瘤模型谱来说，营养缺陷突变可保持细菌的肿瘤特异性累积。

20 21. 实施例： B16F10 黑素瘤转移肿瘤的治疗

转移瘤形成了实体肿瘤治疗的主要难题之一。当可以将较大的肿瘤检测到并实施外科手术切除时，较小的转移瘤形成了经常导致死亡的未治疗的肿瘤源。所以，有效的癌症治疗应是有效地抗转移瘤。

25 在第 0 天时，通过经外侧尾静脉给 C57B/6 小鼠注射 1×10^5 细胞来建立 B16F10 的实验性转移瘤模型。在第 5 天时，将等份的 0.2mlYS7211/p5-3 和 YS7212/p5-3（YS7211 和 YS7212 每种均携带 HSV 胸苷激酶表达质粒）细菌悬浮液（约 1×10^7 CFU/ml）腹膜内注射入小鼠。在第 7 天时，将 9 - （1，3 - 二羟 - 2 - 苯氧甲基）鸟嘌呤（取 0.1ML 等份以 22mg/ml 溶于 PBS）（最终剂量：100mg/kg）腹膜内注射入小鼠。通过定期处死
30 小鼠并检查肺来监测肿瘤的发展。在第 28 天时，将所有动物处死并将正常和患肿瘤的肺进行称重。

附图 19 清楚地表明：接种了携带 HSV 胸苷激酶基因的 YS7212（YS7212/p5-3）并进一步用 GCV 治疗的动物在 B16F10 肺转移瘤的数量和程度上均表现出了降低。

22. 实施例：使用鼠伤寒杆菌对黑素瘤组织活检物的诊断

按照本发明方法的黑素瘤诊断可以使用例如鼠伤寒杆菌按如下方式进行：将怀疑是黑素瘤的活检标本部分在三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水

- 5 (TBS) 中用剪刀剪碎，然后在 37°C 时，在含胰蛋白酶，胶原酶和 EDTA (Sigma 化学公司) 的无 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 的盐水中培养 60 分钟以便把组织分离成单个的细胞。然后通过离心将细胞冲洗成不含分离酶。将细胞重新悬浮在 1ml DMEM/10 % FBS 中并加入到具有盖玻片的 24 孔 Corning 组织培养室中的孔内。在 37°C 时，将细胞在一种通气 (5 % $\text{CO}_2/95\%$) 加湿培养箱中培养 3 小时以使它们附着盖玻片。

- 完成活检细胞的附着后，加入鼠伤寒杆菌的减毒、超感染性、黑素瘤特异性菌株 ($10^6 - 10^7 \text{c.f.u./ml}$)。在 37°C 时，将细菌和活检细胞一起培养 15 分钟以便通过鼠伤寒杆菌感染黑素瘤细胞，然后将细胞用 TBS 冲洗以除去未感染的细菌。在 3 % 牛血清白蛋白中用 0.01 % 皂苷将细胞渗透 5 分钟，在 TBS 中用 2.5mg/ml 4'-6'-二脒基 - 2 - 苯基吲哚 (DAPI) 和皂苷 (0.01 %) 对细胞的 DNA 染色 10 分钟，用 TBS 洗涤，将它们固定在含有 1, 4 - 重氮二环 (2, 2, 2) 辛烷 (DABCO, Kodak) 的 Mowiol (Calbiochem) 中并用相差和荧光显微镜进行观察。活检细胞的细胞质中出现的 DAPI 染色表明它们是黑素瘤细胞，即由黑素瘤特异性鼠伤寒杆菌感染的细胞是黑素瘤细胞而不是黑素细胞。

23. 实施例：经单核细胞增生利斯特氏菌靶向黑素瘤肿瘤

本实验表明：当对患黑素瘤的动物进行给药时，单核细胞增生利斯特氏菌可以靶向肿瘤细胞并在其中增殖。

- 25 给 C57B/6 小鼠在左侧上背处皮下接种 $5 \times 10^5 \text{B16F10}$ 黑素瘤细胞。当肿瘤生长到约 1 - 2g (肿瘤细胞移植后 16 天) 时，给动物腹膜内接种 $7 \times 10^5 \text{cfu}$ 单核细胞增生利斯特氏菌野生型菌株 43251。在接种入小鼠前，使利斯特氏菌属培养物在 LB 培养基中生长过夜，达到 OD_{600} 为 0.25。在指定的时间处死动物并取出肿瘤和肝，匀浆并通过系列稀释涂布到 L.B. 平板上来对细菌数量定量。

30 在接种单核细胞增生利斯特氏菌后 24, 48, 和 96 小时分析肿瘤。结果见表 20 (I)。

表 20 (I)

单核细胞增生利斯特氏菌在患 B16F10 黑素瘤肿瘤 C57B/6 小鼠体内的 扩增

	接种后的时间	单核细胞增生利斯特氏菌/g 组织:		
		肿瘤	肝	肿瘤: 肝
5	24 小时	$1.5 \pm 1.4 \times 10^3$	$8.0 \pm 6.1 \times 10^4$	1:5
	48 小时	$6.3 \pm 8.5 \times 10^2$	$1.3 \pm 1.0 \times 10^5$	1:210
	96 小时	$5.2 \pm 6.8 \times 10^5$	$5.7 \pm 9.0 \times 10^5$	1:1

结果代表平均值 $\pm$ 三次测定的 SD。

- 正如表 20 (I) 中所示, 发现在这一时间期限内细菌在肿瘤内的水平上升了约 100 倍, 这表明野生型单核细胞增生利斯特氏菌能够以肿瘤为靶并在它们中增殖。单核细胞增生利斯特氏菌菌株 43251 在 C57B/6 小鼠体内是毒性的, 导致小鼠在腹膜内接种了 7×10^5 cfu 5 天后死亡。

24. 实施例: LEISHMANIA AMAZONENSIS 显示的肿瘤细胞特异性

15 24.1. LEISHMANIA AMAZONENSIS 对体外人黑素瘤细胞的特异性附着

- 将 *Leishmania amazonensis* 锥鞭体看作是高生物特异性的, 因为它们实际上不能够感染除巨噬细胞外的任何细胞类型。由于已知人体黑素瘤用来表达某些巨噬细胞样特征, 所以测定 *Leishmania amazonensis* 是否能够进入培养物中的人体黑素瘤细胞。在 24 °C 时, 使 *Leishmania amazonensis* 锥鞭体在含有 15 % 热灭活胎牛血清的 Schneider's 果蝇属培养基 (GIBCO BRL) 中生长, 直到寄生虫处于晚对数期 (通常为 3 - 4 天) 为止。在 *L. amazonensis* 感染测定中所用的动物细胞是可在给 C57B6 小鼠注射时形成非转移肿瘤的小鼠黑素瘤细胞系 (B16/F1), 两种人体转移黑素瘤细胞系 (M2 和 M2 - A7) 和作为阴性对照的人体包皮成纤维细胞 (HFF)。

- 25 使这些不同的细胞类在 24 孔平板中的玻璃盖玻片上或在塑料 Lab-Tec[®] (Nunc) 载玻片上生长, 对于 HFF 细胞, 使用具有 10 % 胎牛血清的 MEM 培养基; 对于 B16/F1 细胞来说, 使它们生长在具有 10 % 马血清的 Ham's F10 培养基中; 且对于 M2 和 M2 - A7 细胞来说, 使它们生长在具有用 10mM HEPES 缓冲的 10 % 胎牛血清的 DMEM 中。

- 30 将利什曼原虫属寄生虫用 5 % 正常人血清进行预培养约 1 小时并在 32 °C 下将所培养的细胞用 $0.5 - 5.0 \times 10^6$ 寄生虫/ml 感染约两小时。在培养后, 将细胞用磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤两次并在约 4 °C 时将细胞用 3 % 低聚甲醛固定约 30 分钟。将抗利什曼原虫属抗体用固定的细胞按常规工作稀释度 (1: 100,000) 在具有 3 % 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 中培

养约 1 小时。洗涤后, 将荧光偶联的抗小鼠抗体 (Boehringer Mannheim) 与细胞按常规工作稀释度 (1: 500) 培养约 1 小时, 然后将它们从细胞中洗涤出去。将细胞用 0.02 % 皂苷 (Sigma, 用于去除脂质的去污剂, 从而使抗体透过) 在三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水 (TBS) 中渗透 10 分钟并
5 在具有 0.02 % 皂苷的 TBS 中用 5.0mg/ml DAPI 染色剂 (Sigma) 对 DNA 进行染色。将细胞用 TBS 洗涤并用带有 DABCO (Kodak, 一种维持荧光发射的化合物) 的 Mowiol (Calbiochem) 固定在玻璃载玻片上。在没有宿主细胞膜渗透的情况下, 通过无法与抗利什曼原虫属单克隆抗体反应来测定存在的摄入的寄生虫。

10 在加入活的寄生虫后, 立即使用反向相显微镜进行的观察表明: 在这些细胞系中, 仅当活动的寄生虫遇到转移黑素瘤细胞时, 它们会立即附着, 这表明转移细胞可能具有一种合适的利什曼原虫属受体。这些结果见附图 13。

为测定是否摄入了利什曼原虫属寄生虫, 使 M2 人黑素瘤细胞生长, 用
15 利什曼原虫属感染它们并在 4 °C 时将它们用 3 % 低聚甲醛不经渗透如上所述固定约 30 分钟, 洗涤并用针对利什曼原虫属表面蛋白单克隆抗体、随后用罗丹明偶联的抗小鼠抗体进行免疫染色。在三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水 (TBS) 中洗涤后, 将细胞用 0.01 % 皂苷在 3 % BSA 中渗透 5 分钟, 并在 TBS 中用 2.5mg/ml 4' - 6' 二脒基 - 2 - 苯基吲哚 (DAPI) 和 0.01
20 % 皂苷对 DNA 染色 10 分钟, 用 TBS 洗涤, 将它们固定在含有 1, 4 - 重氮二环 (2, 2, 2) 辛烷 (DABCO, Kodak) 的 Mowiol 中并用相差和荧光显微镜进行观察。这一过程可检测所有的寄生虫并将摄入的寄生虫 (不能接近在非通透细胞内染色的抗体) 与附着但没有摄入的寄生虫区别开。

25 寄生虫由 M2 细胞摄入 (没有列出数据)。估计摄入过程发生在 3 % 的黑素瘤细胞内。这些发现表明: a) 活的利什曼原虫属寄生虫能够进入黑素瘤细胞, 和 b) 在该过程中涉及的可能仅是一种黑素瘤细胞的亚群。

24.2. 黑素瘤摄入利什曼原虫属后的溶酶体融合

30 在巨噬细胞被利什曼原虫属侵染的正常过程中, 溶酶体与吞噬体融合。为了测定这一过程是否还发生在利什曼原虫属侵入黑素瘤细胞时, 使寄生虫与溶酶体糖蛋白 (lgp) 标记物共同定位。除将细胞用针对人溶酶体糖蛋白 (LAMP - 1) 的单克隆抗体、随后用罗丹明偶联的抗小鼠抗体进行免疫染色以外, 使细胞如上所述生长, 感染并固定。在 TBS 中洗涤后, 将

细胞用 2.5mg/ml DAPI 对 DNA 染色 10 分钟, 用 TBS 洗涤, 将细胞固定在含有 DABCO 的 Mowiol 中并用相差和荧光显微镜进行观察。与 LAMP - 1 共同定位的寄生虫如附图 14A - C 中所示。共同定位证实摄入了寄生虫且表明溶酶体融合过程发生在利什曼原虫属被摄入黑素瘤细胞时。总之,

- 5 Leishmania amazonensis 在其野生型状态下表现出至今还未报道的对人体黑素瘤细胞的侵染能力。

25. 实施例: 在人体组织活检物内使用 LEISHMANIA AMAZONENSIS 的 诊

10 断

- 按照本发明方法的黑素瘤诊断可以使用例如 Leishmania amazonensis 按如下方式进行: 将怀疑是黑素瘤的活检标本部分在三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水 (TBS) 中用剪刀剪碎, 然后在 37°C 时, 在含胰蛋白酶, 胶原酶和 EDTA 的无 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 的盐水中培养 60 分钟以便把组织分离成单个的细
15 胞。然后通过离心将细胞冲洗成不含分离酶。将细胞重新悬浮在 1ml DMEM/10 % FBS 中并加入到具有盖玻片的 24 孔 Corning 组织培养室中的孔内。在 37°C 时, 将细胞在一种通气 (5 % CO_2) 加湿培养箱中培养约 3 小时以使它们附着盖玻片。

- 完成活检细胞的附着后, 加入已按照本发明方法分离的 Leishmania
20 amazonensis 锥鞭体的黑素瘤特异性菌株。在 37°C 时, 将寄生虫和活检细胞一起培养约 2 小时以便通过 Leishmania amazonensis 感染黑素瘤细胞, 然后将细胞用 TBS 冲洗以除去未感染的寄生虫。在 3 % 牛血清白蛋白中用 0.01 % 皂苷将细胞渗透 5 分钟, 在 TBS 中用 2.5mg/ml 4'-6'-二脒基 - 2 - 苯基吲哚 (DAPI) 和皂苷 (0.01 %) 对 DNA 染色 10 分钟, 用 TBS 洗涤,
25 将它们固定在含有 1, 4 - 重氮二环 (2, 2, 2) 辛烷 (DABCO, Kodak) 的 Mowiol (Calbiochem) 中并用相差和荧光显微镜进行观察。活检细胞的细胞质中出现的 DAPI 染色表明它们是黑素瘤细胞。

26. 实施例: 使用鸟分枝杆菌诊断黑素瘤的人体组织活检物

- 30 发现鸟分枝杆菌与黑素瘤细胞相联而不与正常黑素细胞相联。这种对于黑素瘤细胞的识别能力证明了鸟分枝杆菌作为黑素瘤诊断和治疗中的载体的能力。使用鸟分枝杆菌的黑素瘤诊断按如下方式进行: 将怀疑是黑素瘤的活检标本部分在三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水 (TBS) 中用剪刀剪碎, 然后在 37°C 时, 在含胰蛋白酶, 胶原酶和 EDTA 的无 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 的盐水中

培养 60 分钟以便把组织分离成单个的细胞。然后通过离心将细胞冲洗成不含分离酶。将细胞重新悬浮在 1ml DMEM/10 % FBS 中并涂布在 24 孔平板内的 12mm 玻璃盖玻片上, 使每个孔中含有 1×10^5 细胞。在 37 °C 时, 将细胞在一种通气 (5 % CO₂) 加湿培养箱中培养 3 小时以使细胞附着盖玻片。

完成活检细胞的附着后, 加入已通过本发明方法分离的鸟分枝杆菌的黑素瘤特异性菌株。在 37 °C 时, 将细菌和活检细胞一起培养 15 分钟以便通过鸟分枝杆菌感染黑素瘤细胞, 然后将细胞用 TBS 冲洗以除去未感染的细菌。在 3 % 牛血清白蛋白中用 0.01 % 皂苷将细胞渗透 5 分钟, 在 TBS 中用 2.5mg/ml 4'-6'-二脒基 - 2 - 苯基吲哚 (DAPI) 和皂苷 (0.01 %) 对 DNA 染色 10 分钟, 用 TBS 洗涤, 将它们固定在含有 1, 4 - 重氮二环 (2, 2) 辛烷 (DABCO, Kodak) 的 Mowiol (Calbiochem) 中并用相差和荧光显微镜进行观察。活检细胞的细胞质中出现的 DAPI 染色表明它们是黑素瘤细胞。

15

27. 微生物的保藏

将下列微生物于 1995 年 6 月 1 日保存在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) Rockville, MD, 并已给予它们指定的保藏号:

	<u>微生物</u>	<u>ATCC 保藏号</u>
20	克隆#70	55686
	克隆#71	55685
	克隆#72	55680
	克隆#72 ⁵⁻³⁻²	97179
	群体#72 ^{pop-1}	55684
25	群体#72 ^{pop-2}	55683
	群体#14028 ^{pop-1}	55681
	群体#14028 ^{pop-2}	55682

将下列微生物于 1996 年 5 月 29 日保存在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) Rockville, MD, 并已给予它们指定的保藏号:

	<u>微生物</u>	<u>ATCC 保藏号</u>
30	克隆 YS721	55788
	克隆 YS7211	55787
	克隆 YS7212	55789

克隆 YS7213

55786

将下列质粒于 1996 年 5 月 29 日保存在美国典型培养物保藏中心
(ATCC) Rockville, MD, 并已给予它们指定的保藏号:

5	<u>微生物</u>	<u>ATCC 保藏号</u>
	pTK-Sec3	97592
	pCD-Sec1	97593
	pSP-SAD4-5	97591

- 10 本文所要求和描述的本发明的范围不受本文所公开的具体实施方案的限制, 因为这些实施方案是作为本发明几个方面的说明。实际上, 除了本文表示和描述的内容以外, 根据上面的描述对本发明做各种修改对于本领域技术人员来说是显而易见的。这样的修改也落在所附权利要求的范围内。
- 15 本文引用了许多参考文献, 其全部公开内容以完整的形式引入本文作为参考。

序列表

- (1) 一般信息:
- (i) 申请人: Pawelek, John M.
- 5 Bermudes, David
Low, Kenneth Brooks
- (ii) 发明标题: 用于实体肿瘤包括黑素瘤诊断和治疗的载体
- (iii) 序列数: 10
- (iv) 联系地址:
- 10 (A) 联系人: Pennie & Edmonds
(B) 街: 1155 Avenue of the Americas
(C) 城: 纽约
(D) 州: 纽约
(E) 国家: 美国
- 15 (F) ZIP: 10036 - 2711
- (v) 计算机可读形式:
- (A) 媒体类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM PC 兼容机
- (C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS
- 20 (D) 软件: PatentIn Release #1.0, 版本#1.30
- (vi) 当前申请数据:
- (A) 申请号: 待指定
- (B) 申请日: 随同该日期
- (C) 分类:
- 25 (viii) 律师/代理人信息:
- (A) 姓名: Baldwin, Geraldine F.
- (B) 注册号: 31 , 232
- (C) 参考/摘要号: 8002 - 036
- (ix) 电信信息:
- 30 (A) 电话: (212) 790 - 9090
(B) 电传: (212) 869 - 9741/8864
(C) 电报: 66141 PENNIE
- (2) 序列鉴定号: 1 的信息:
- (i) 序列特征:

- (A) 长度: 27 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链: 单链
(D) 拓扑结构: 线型
- 5 (ii) 分子类型: DNA
- (xi) 序列描述: 序列鉴定号: 1:
GATCATGCATGGCTTCGTACCCCGGCC
(2) 序列鉴定号: 2 的信息:
- 10 (i) 序列特征:
(A) 长度: 28 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链: 单链
(D) 拓扑结构: 线型
- 15 (ii) 分子类型: DNA
- (xi) 序列描述: 序列鉴定号: 2:
CTAGATGCATCAGTGGCTATGGCAGGGC
(2) 序列鉴定号: 3 的信息:
- 20 (i) 序列特征:
(A) 长度: 31 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链: 单链
(D) 拓扑结构: 线型
- 25 (ii) 分子类型: DNA
- (xi) 序列描述: 序列鉴定号: 3:
CTAGACTACGTTTGTCAATAATGACAACACCC
(2) 序列鉴定号: 4 的信息:
- 30 (i) 序列特征:
(A) 长度: 30 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链: 单链
(D) 拓扑结构: 线型
- 35 (ii) 分子类型: DNA

(xi) 序列描述: 序列鉴定号: 4:

GATCGGATCCTTGCCCGGCGCGGCGGCCTG

(2) 序列鉴定号: 5 的信息:

5 (i) 序列特征:

(A) 长度: 32 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链: 单链

(D) 线型

10 (ii) 分子类型: DNA

(xi) 序列描述: 序列鉴定号: 5:

CTAGAAGCTTATAAGGGTTGATCTTTGTTGTC

(2) 序列鉴定号: 6 的信息:

15 (i) 序列特征:

(A) 长度: 31 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链: 单链

(D) 拓扑结构: 线型

20 (ii) 分子类型: DNA

(xi) 序列描述: 序列鉴定号: 6:

GTACGATATCCAGAACGATGTGCATAGCCTG

(2) 序列鉴定号: 7 的信息:

25 (i) 序列特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 未知

(ii) 分子类型: 肽

30

(xi) 序列描述: 序列鉴定号: 7:

TyrThrGlyTyrAlaHisArgSer

15

(2) 序列鉴定号: 8 的信息:

35 (i) 序列特征:

- (A) 长度: 6 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链: 单链
 - (D) 拓扑结构: 未知
- 5 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: 序列鉴定号: 8:

SerGlyTyrArgIlePro

1 5

- 10 (2) 序列鉴定号: 9 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 25 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链: 单链
 - 15 (D) 拓扑结构: 线型
- (ii) 分子类型: DNA

(xi) 序列描述: 序列鉴定号: 9:

GATCATGCATGTGGAGGCTAACAGT

- 20 (2) 序列鉴定号: 10 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链: 单链
 - 25 (D) 拓扑结构: 线型
- (ii) 分子类型: DNA

(xi) 序列描述: 序列鉴定号: 10:

CTAGATGCATCAGACAGCCGCTGCGAAGGC

30

35

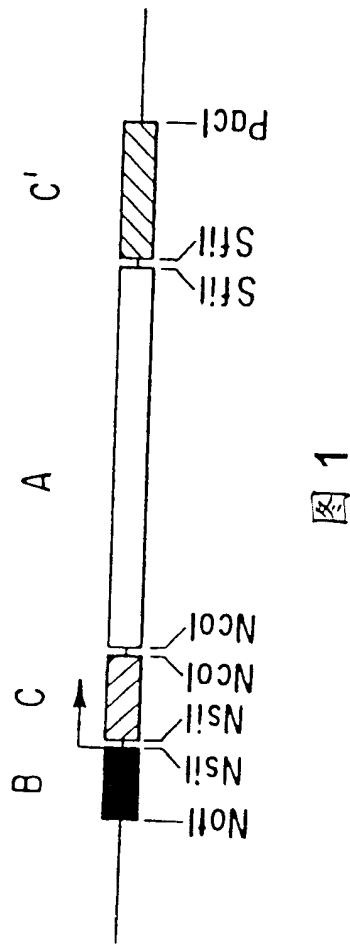


图 1

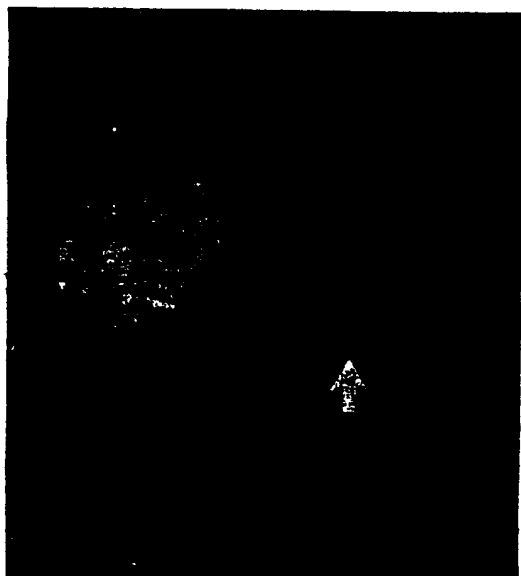


图 2 B

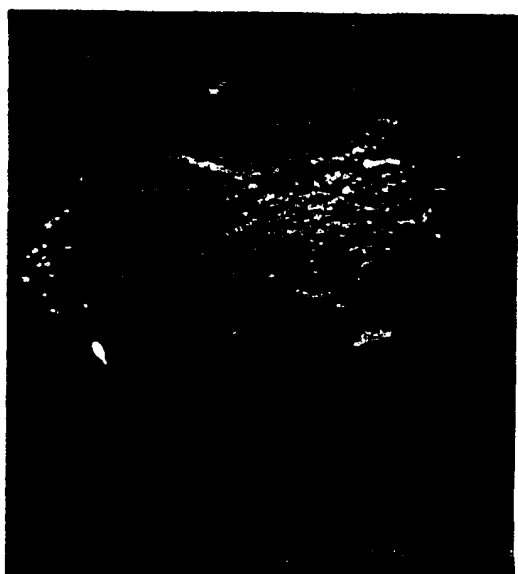


图 2 A



图 3 A

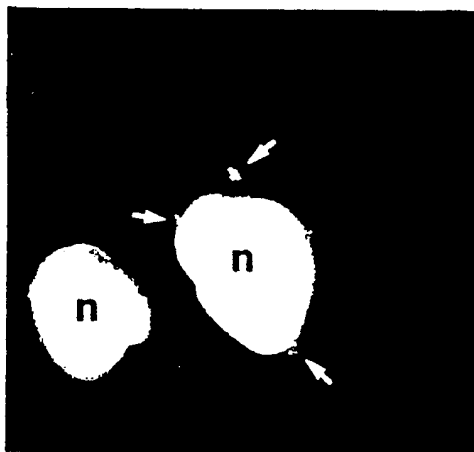
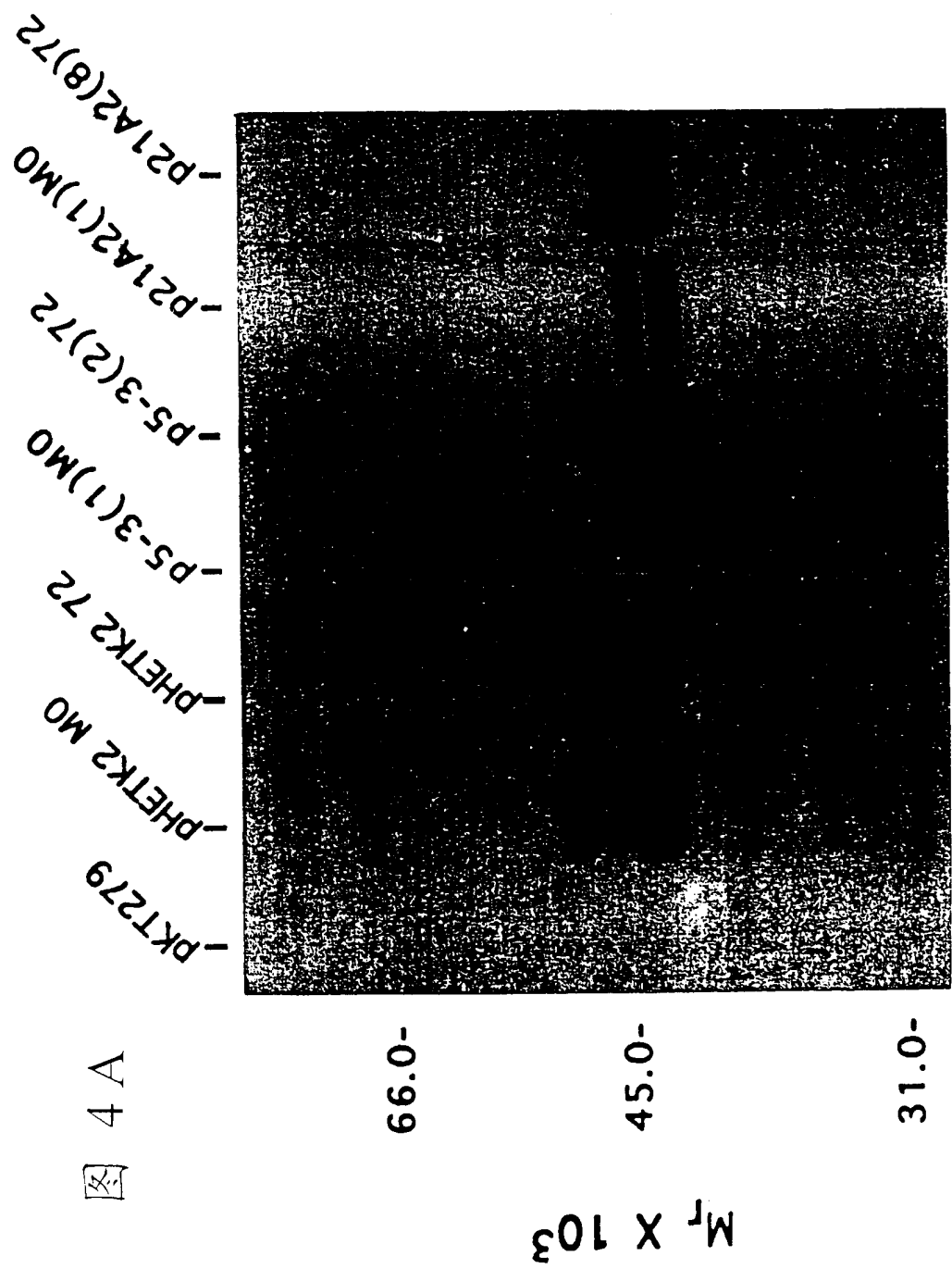


图 3 B



图 3 C



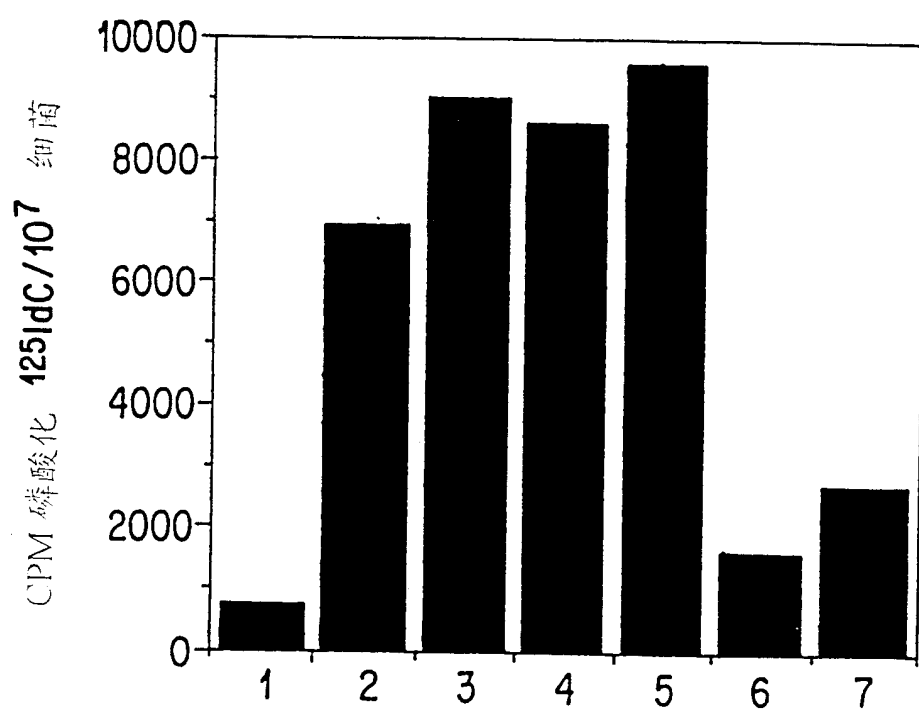
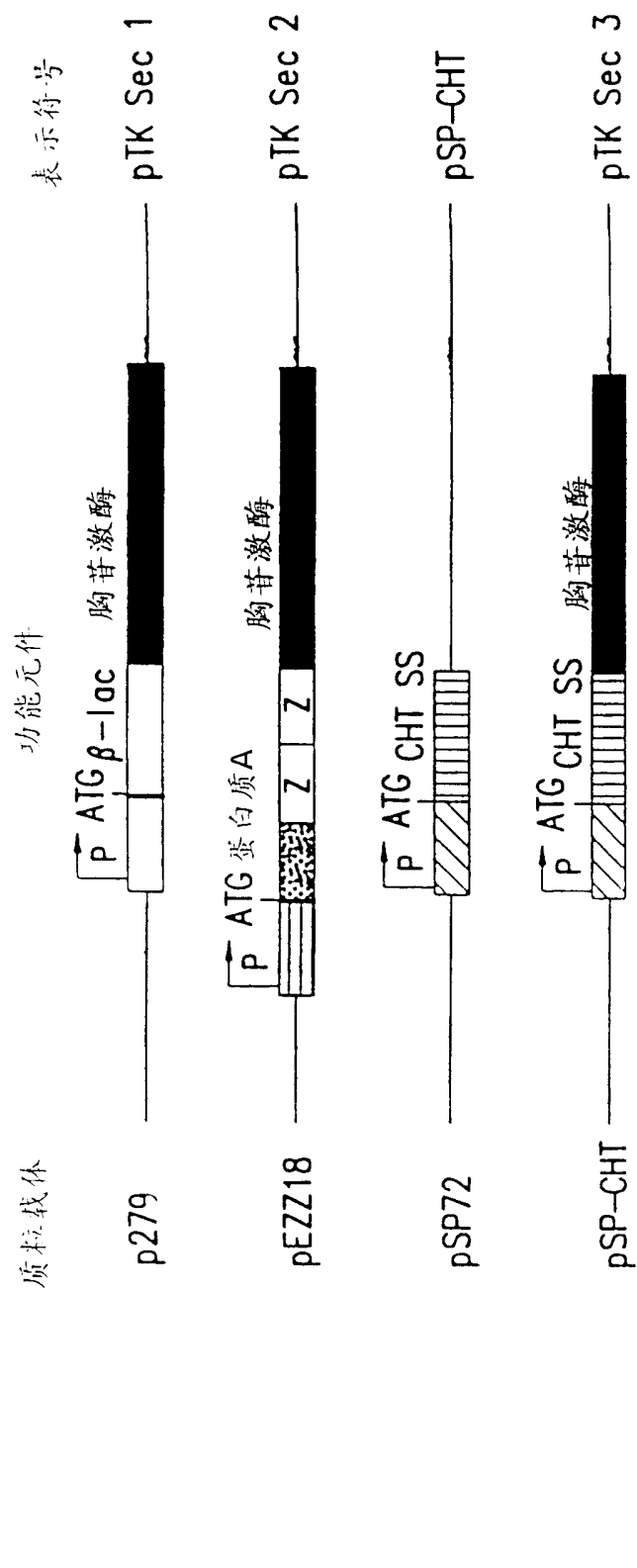
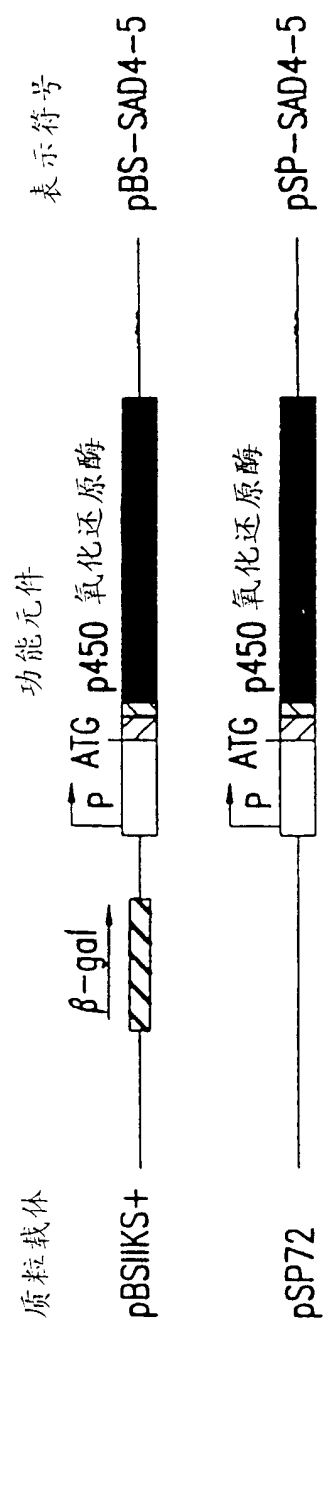


图 4 B



- [] = β -内酰胺酶启动子
- [] = lac I 启动子
- [] = 壳多糖酶启动子
- [] = 蛋白质A信号序列
- [] = 壳多糖信号序列
- [P] = 启动子转录起始
- [Z] = 蛋白质A IgG结合区域
- [] = 胸苷激酶

图 4 C



= sulA 启动子

= sulA 启动子转录起始

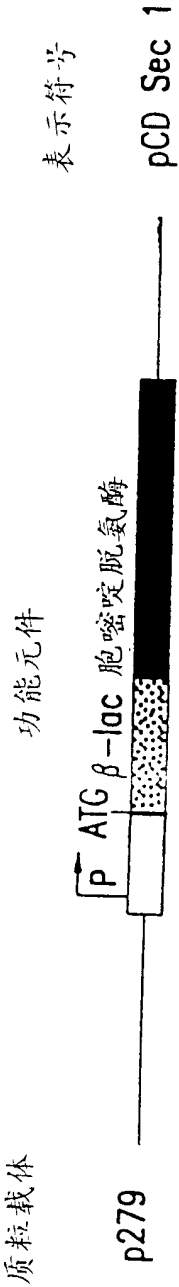
= sulA 的前10个氨基酸

= 来自多接头的氨基酸

= p450 氧化还原酶

= β -半乳糖苷酶转录取向

图 4 D



-  = β -内酰胺酶启动子
-  = β -内酰胺酶信号序列
-  = 启动子转录起始
-  = 胞嘧啶脱氨酶

图 4 E

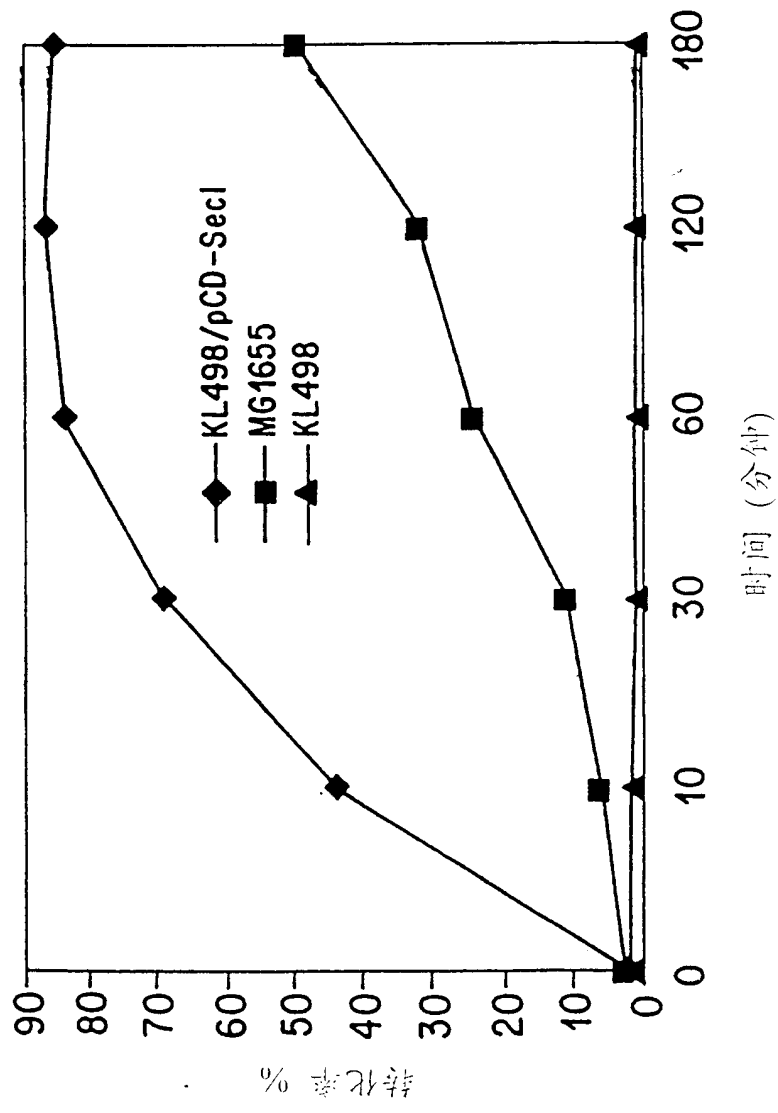


图 4 F

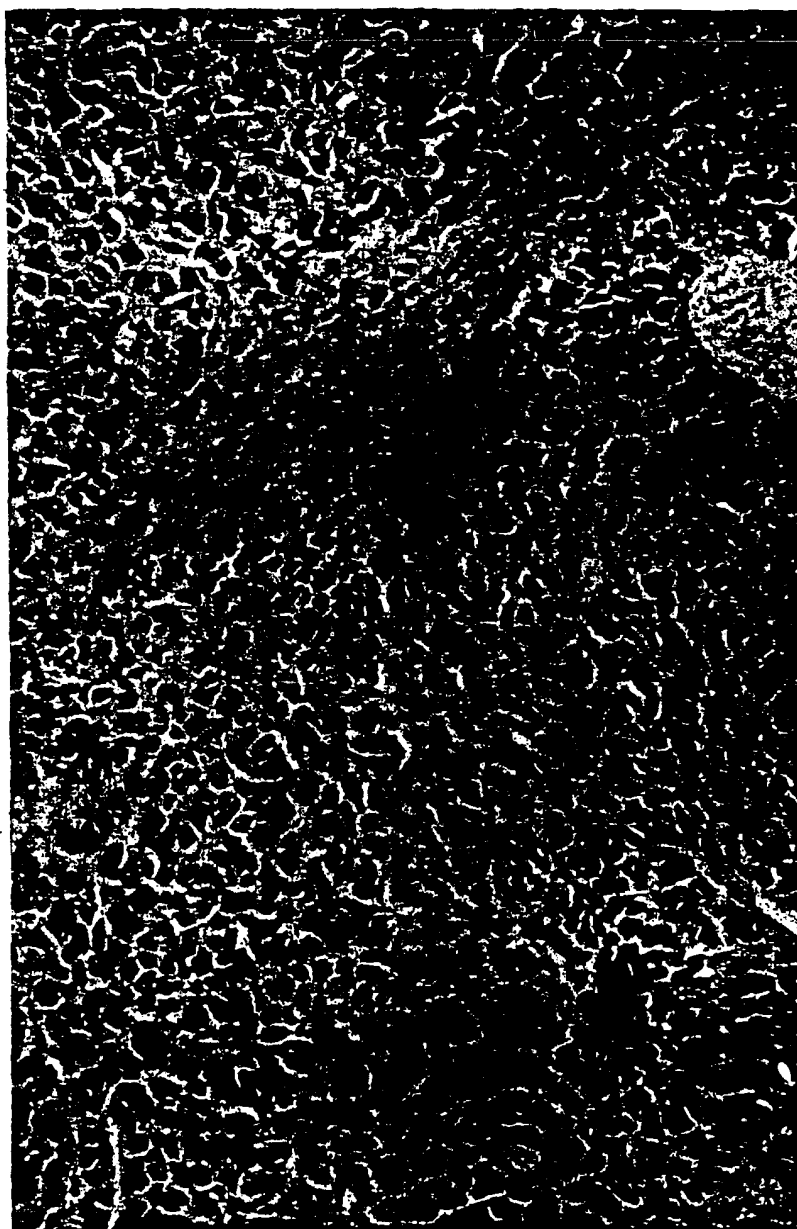


图 5 A

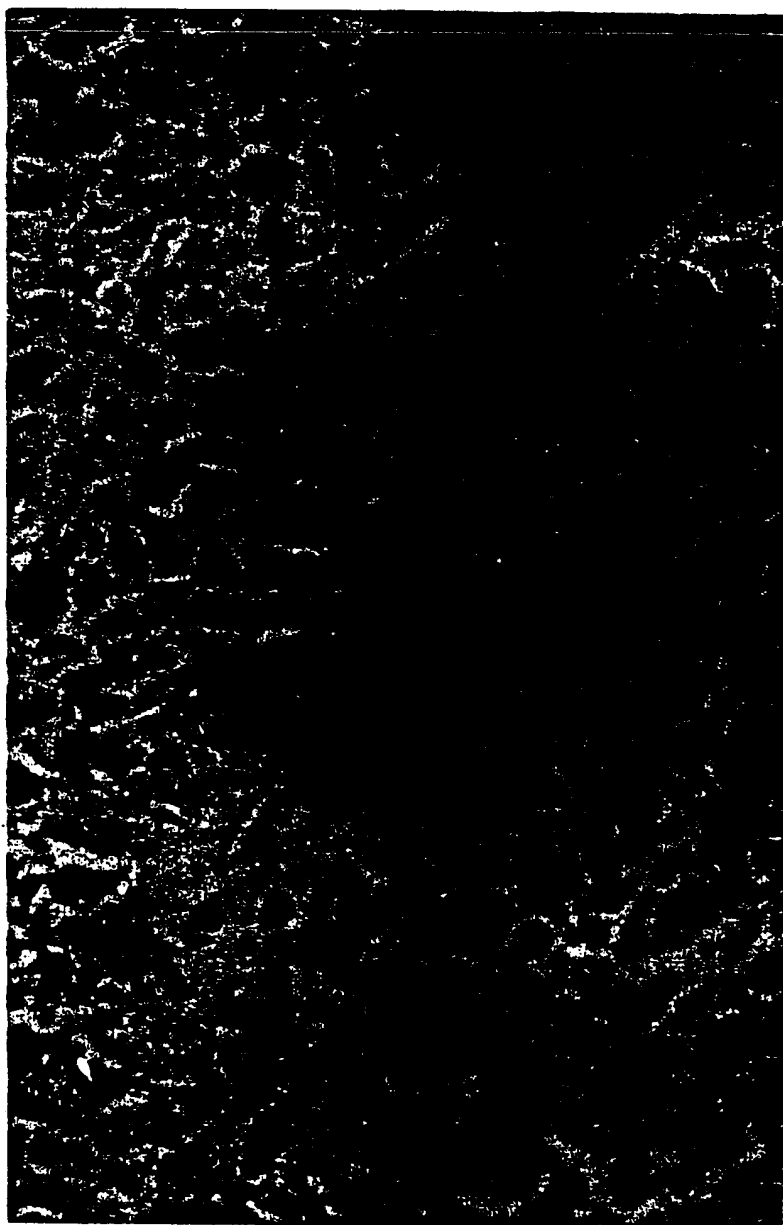


图 5 B

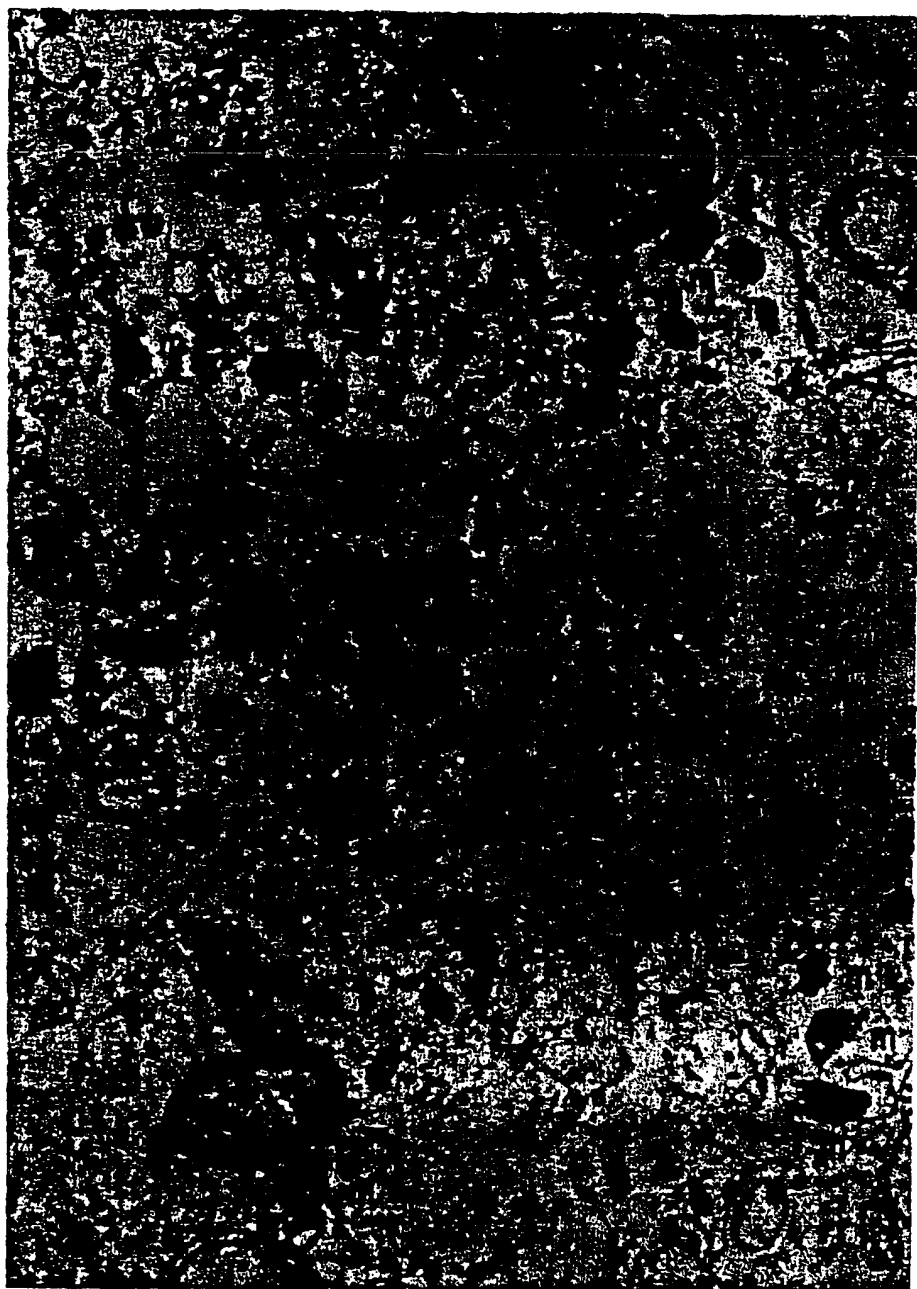


图 6

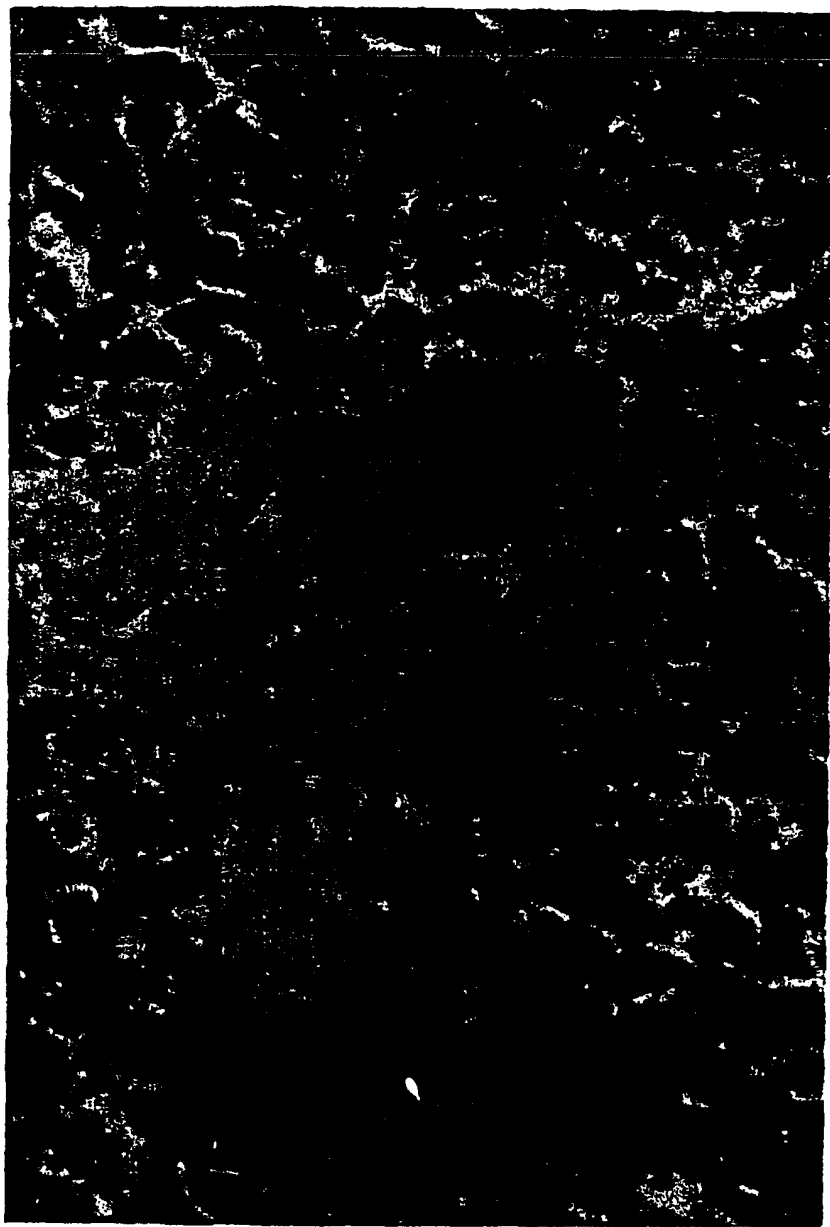


图 7



图 8

Cloudman S91 肿瘤的生长

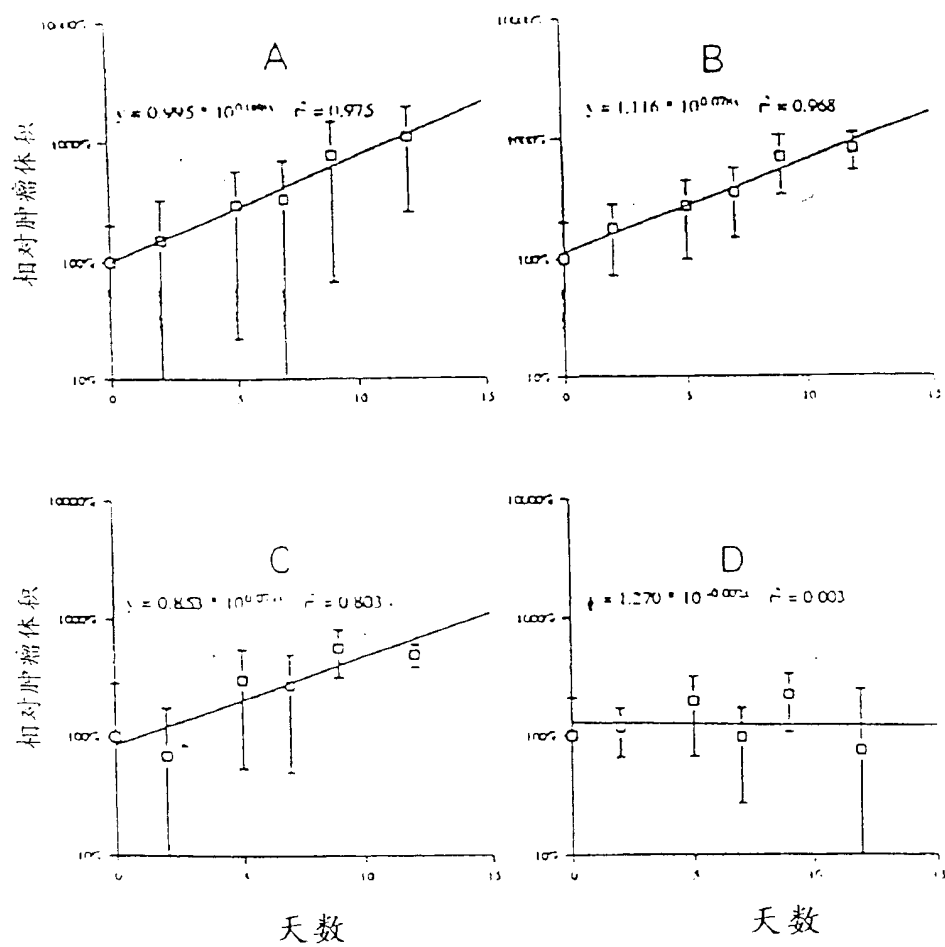
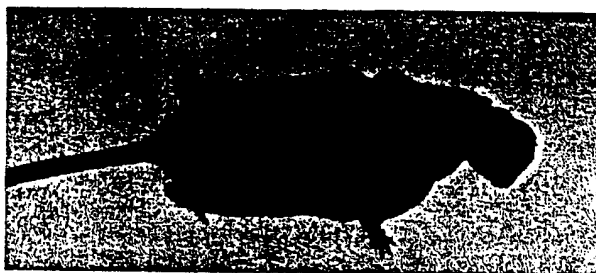


图 9



对照组

图 10 A



载体(10 天)

图 10 B

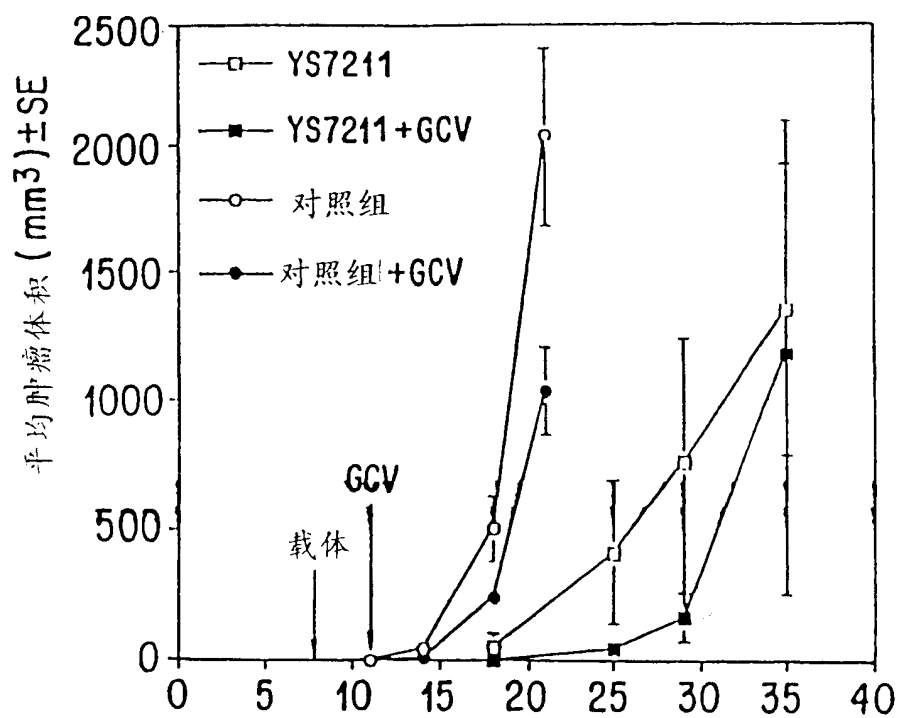


图 11 C 肿瘤植入后的天数

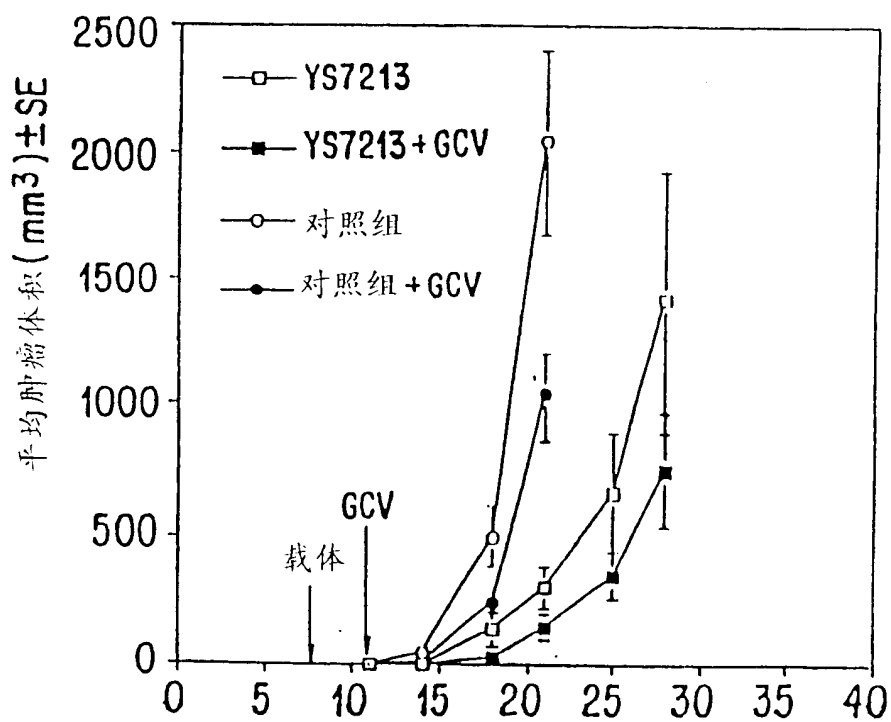


图 11 D 肿瘤植入后的天数

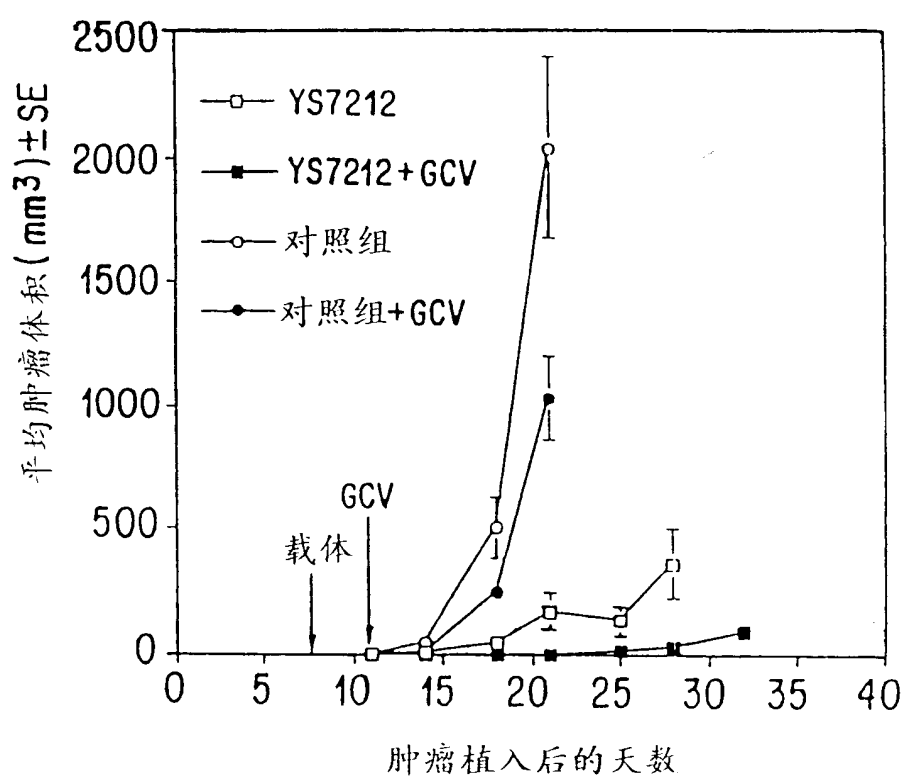


图 11 E

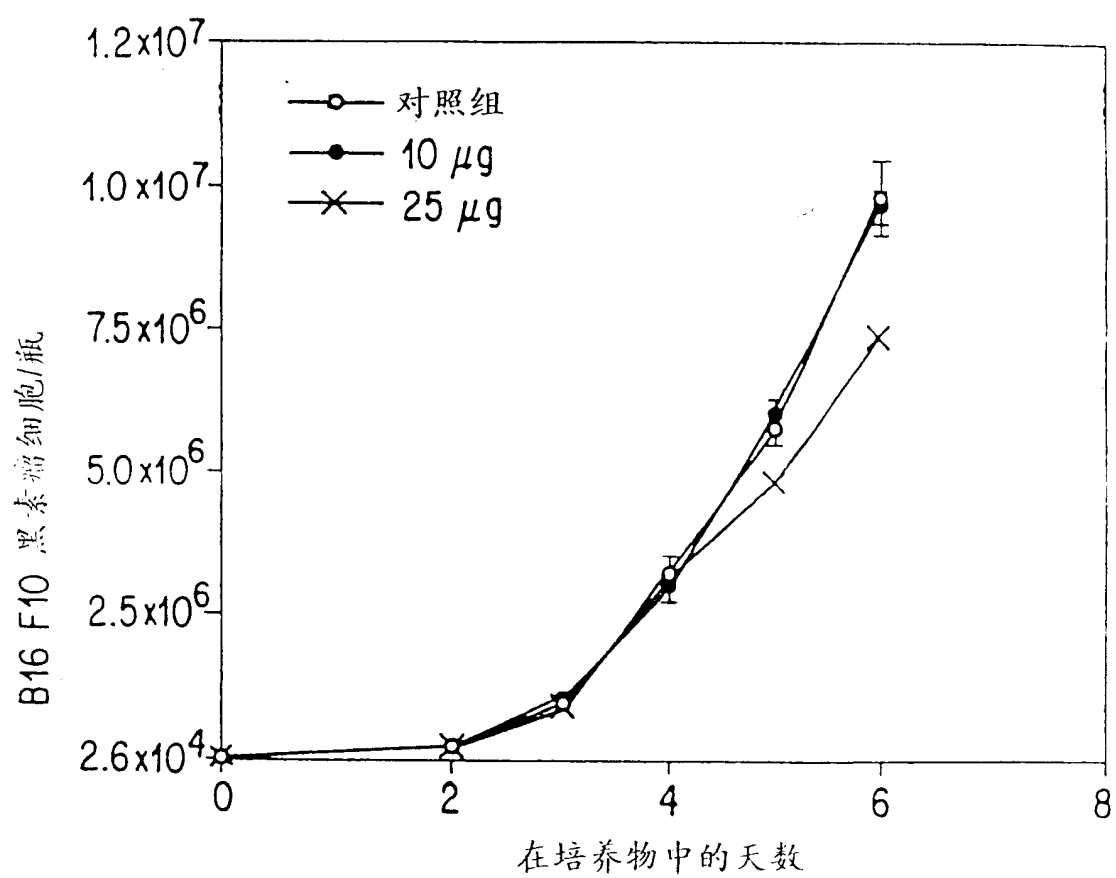
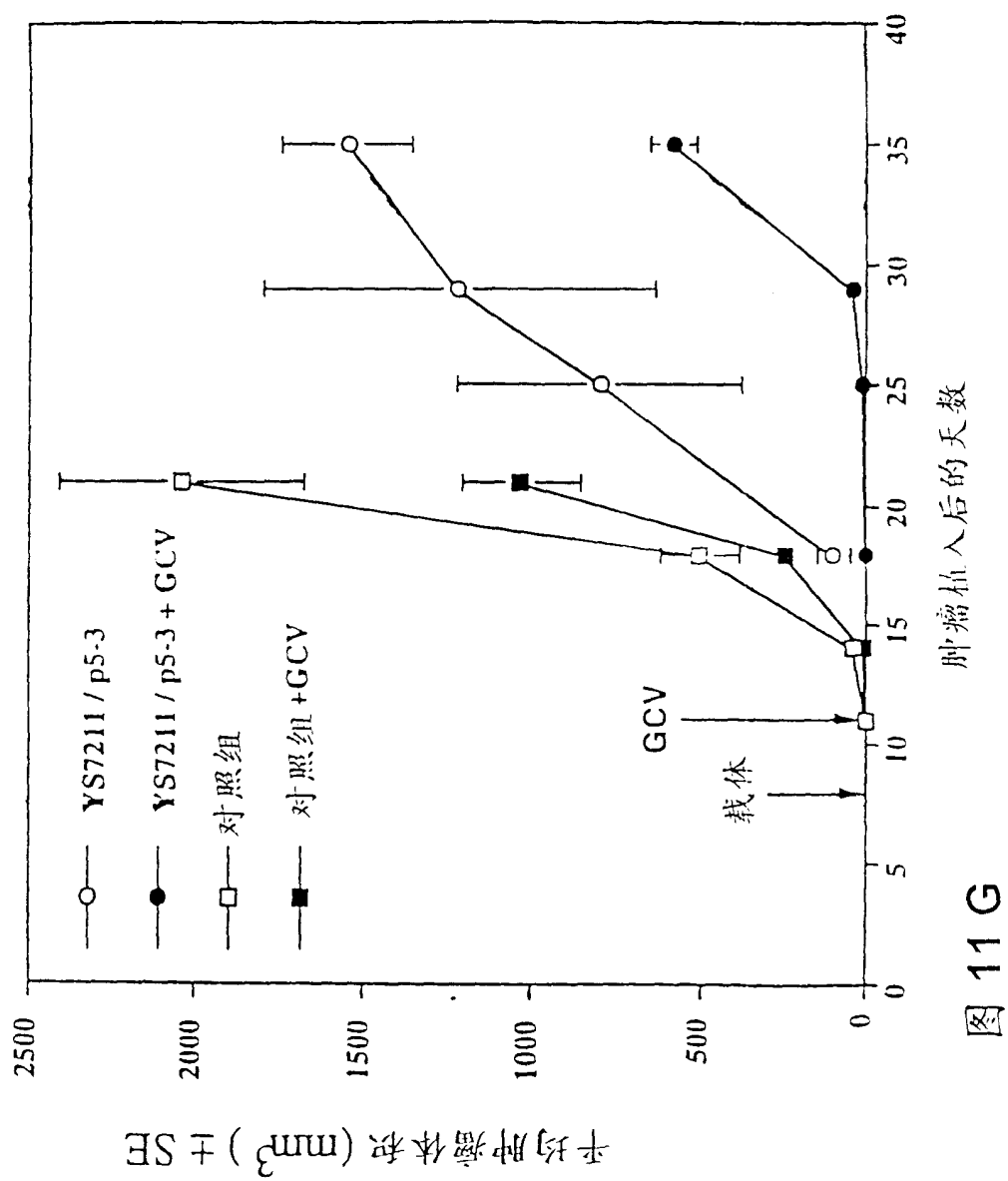


图 11 F



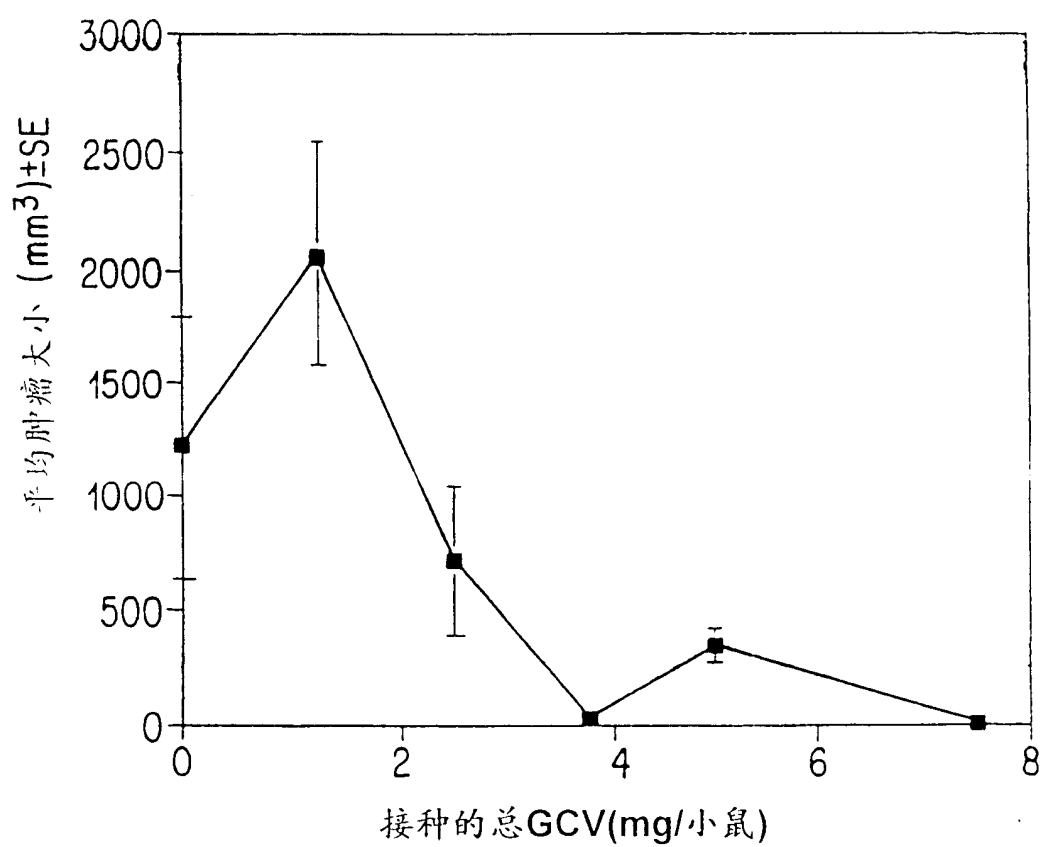


图 11 H



对照组 + GCV

图 11 A



TK 载体 + GCV

图 11 B

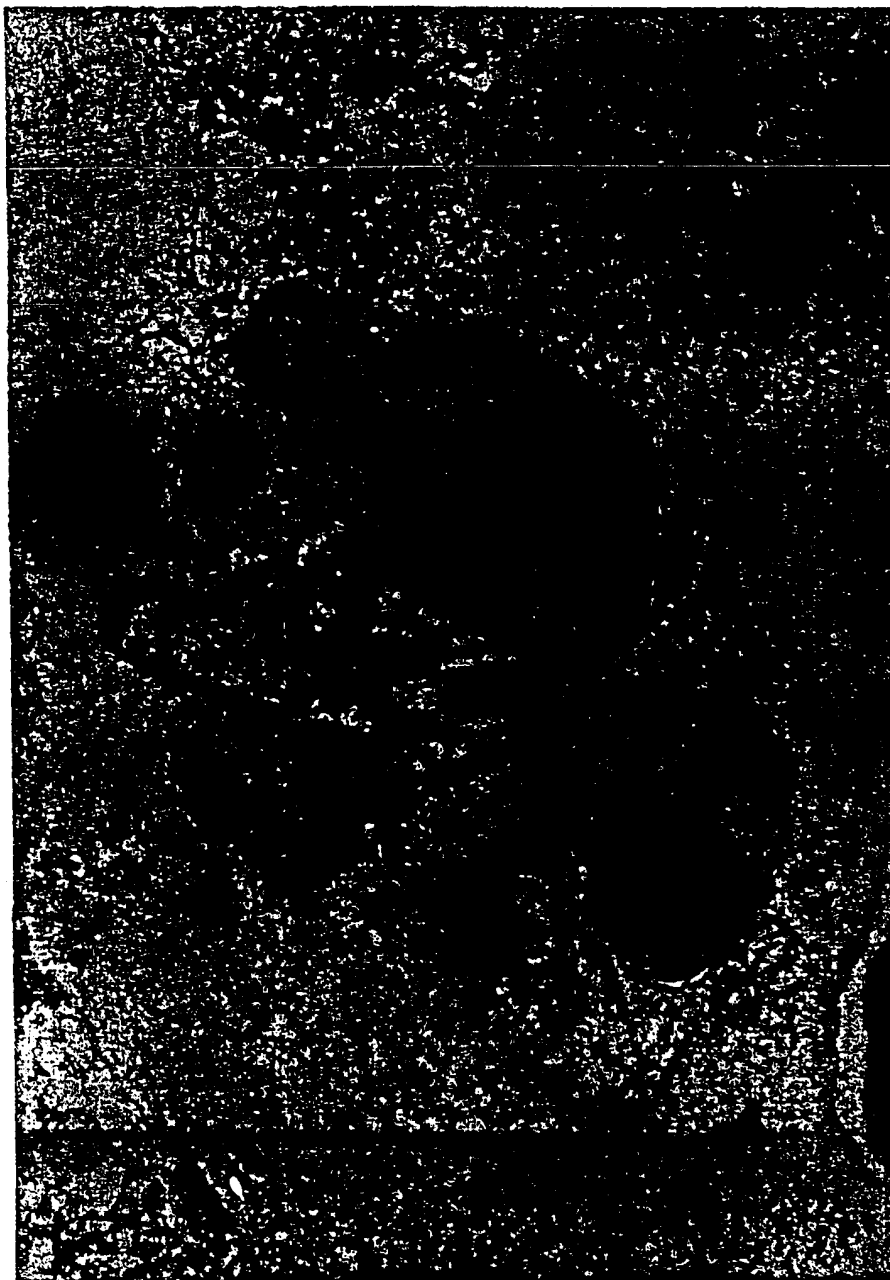


图 12 A

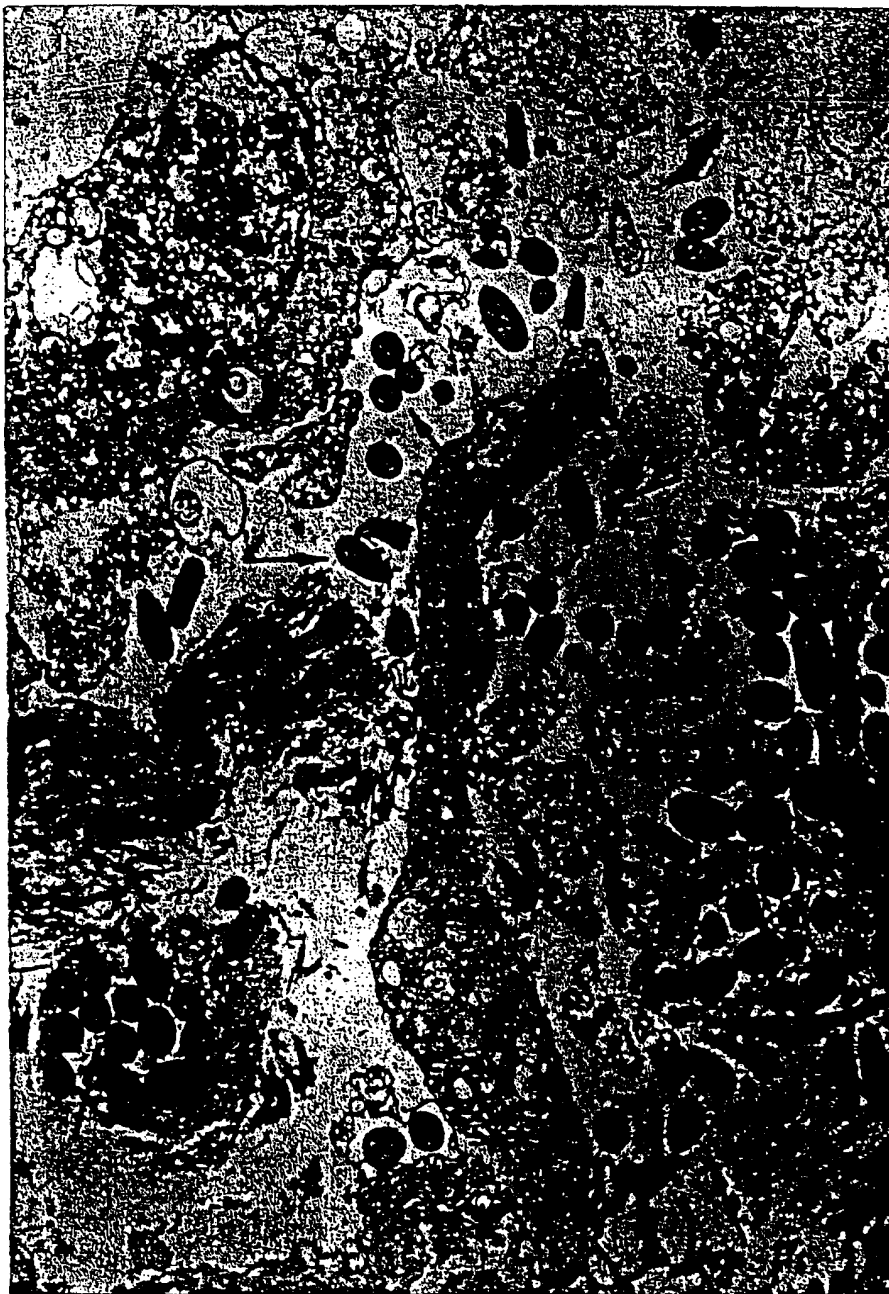


图 12 B

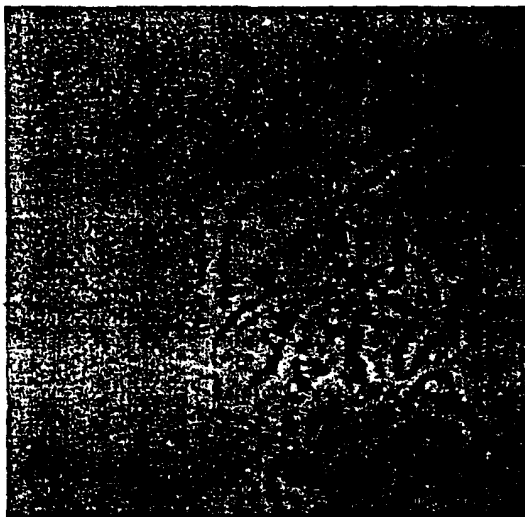


图 13 A

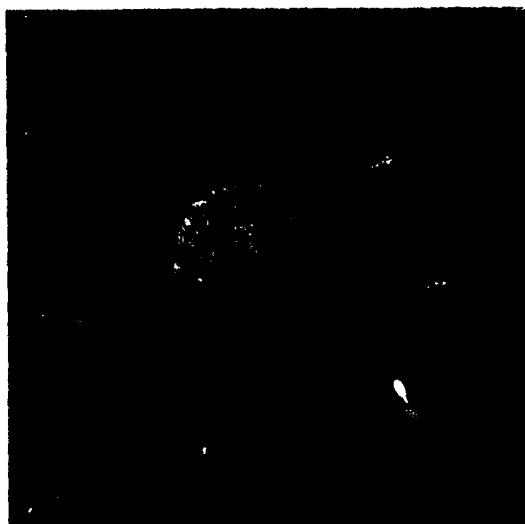


图 13 B



图 14 A

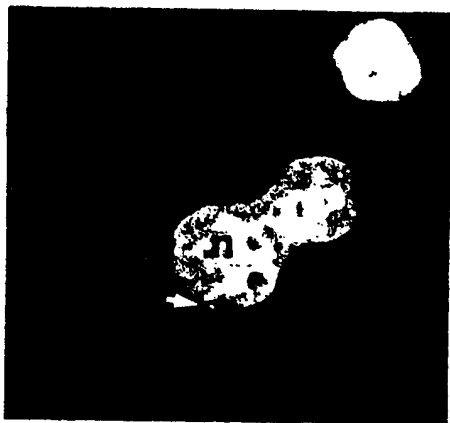


图 14 B



图 14 C

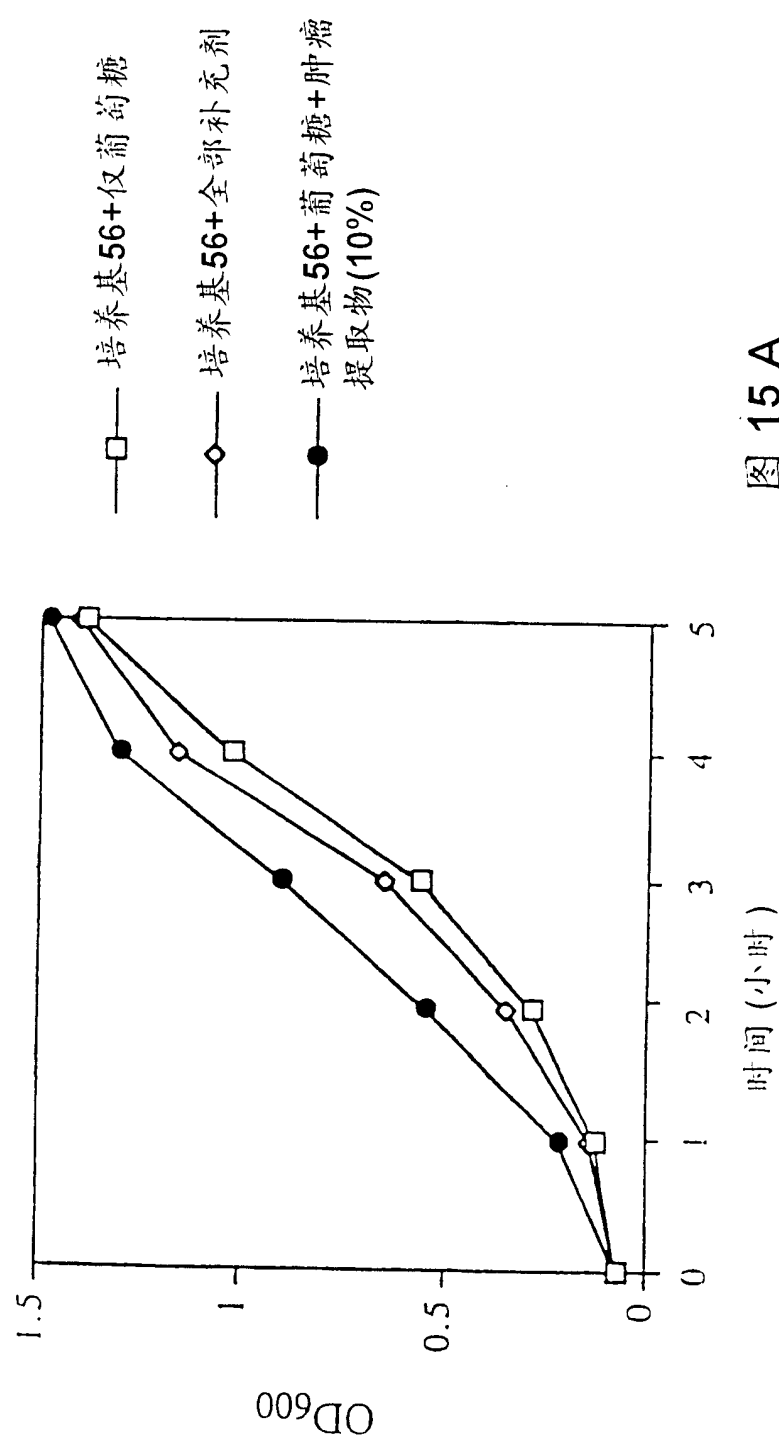


图 15 A

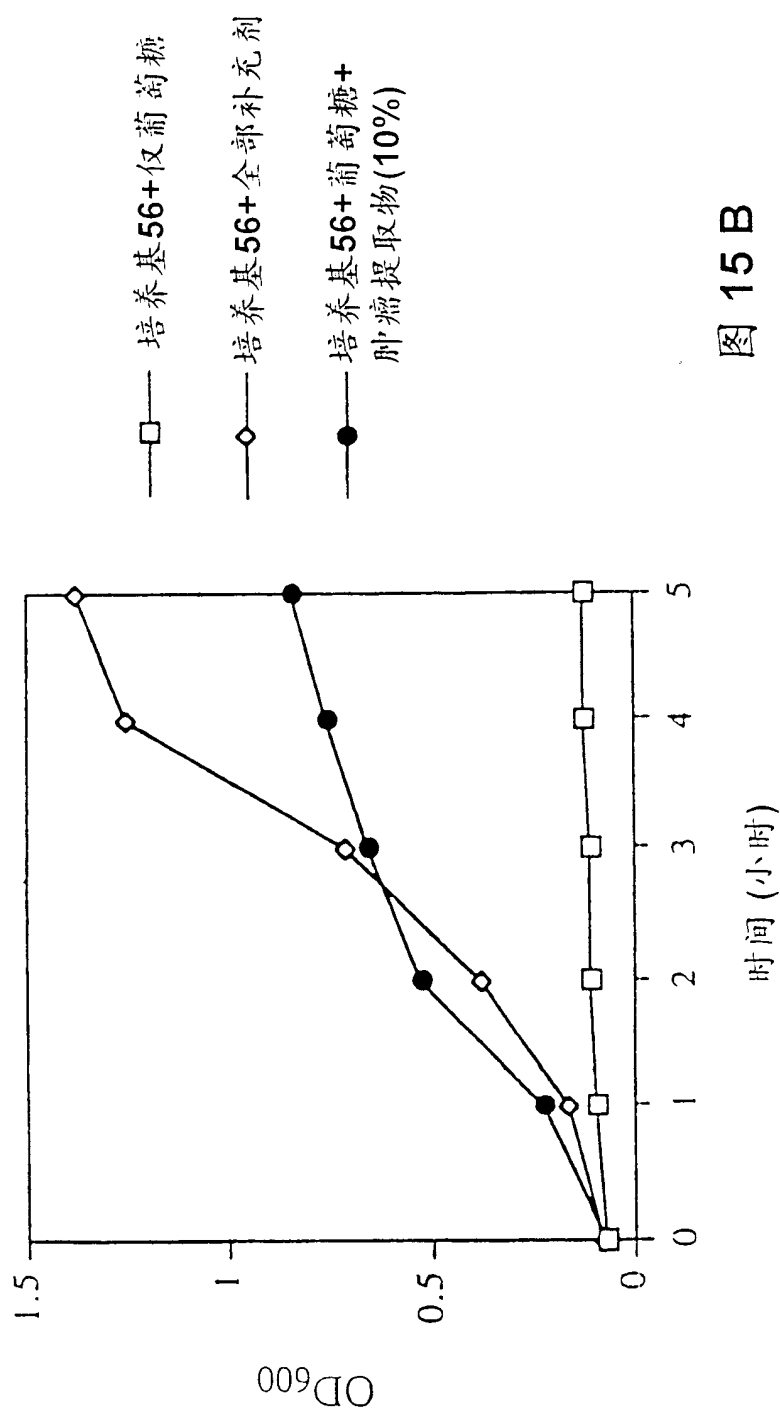


图 15 B

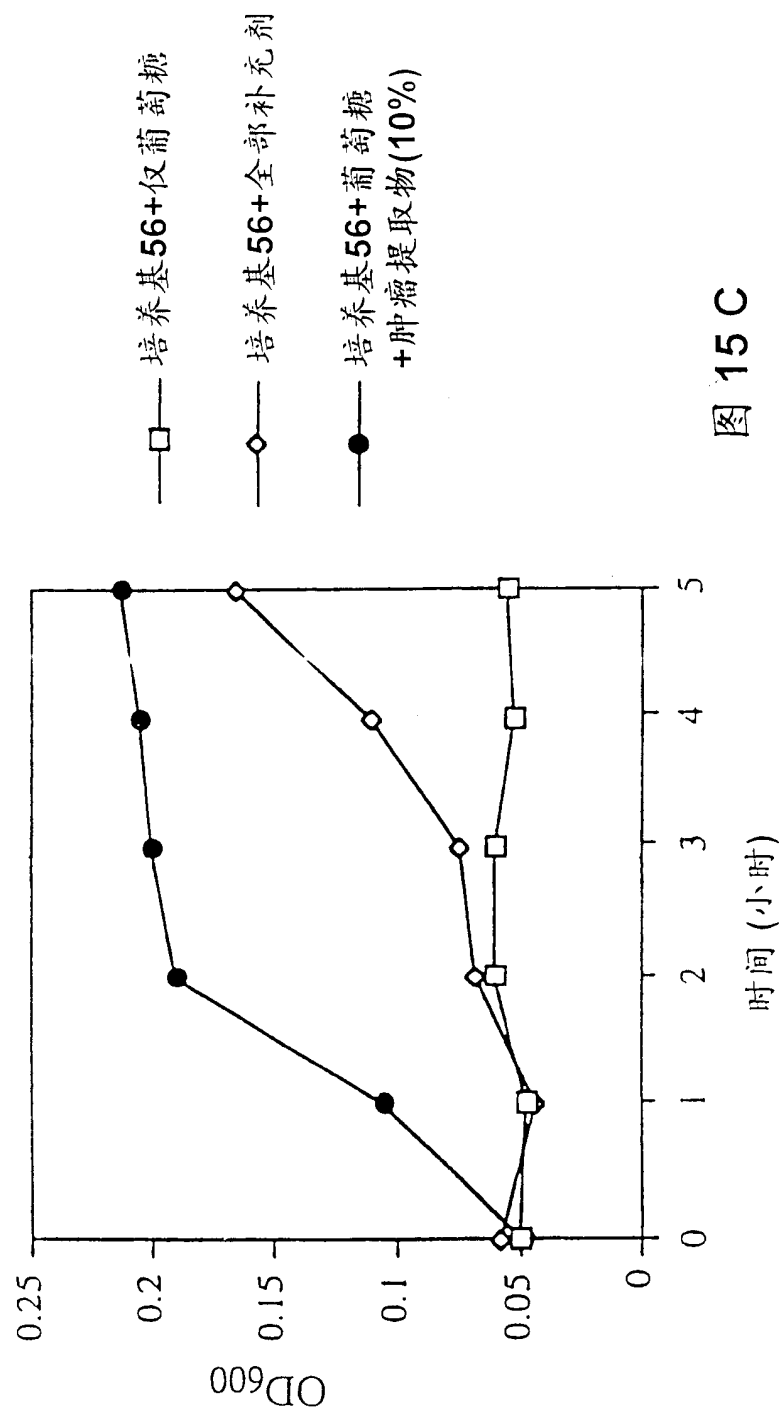


图 15 C

人体M2黑素瘤培养物中克隆72和YS7212的生长

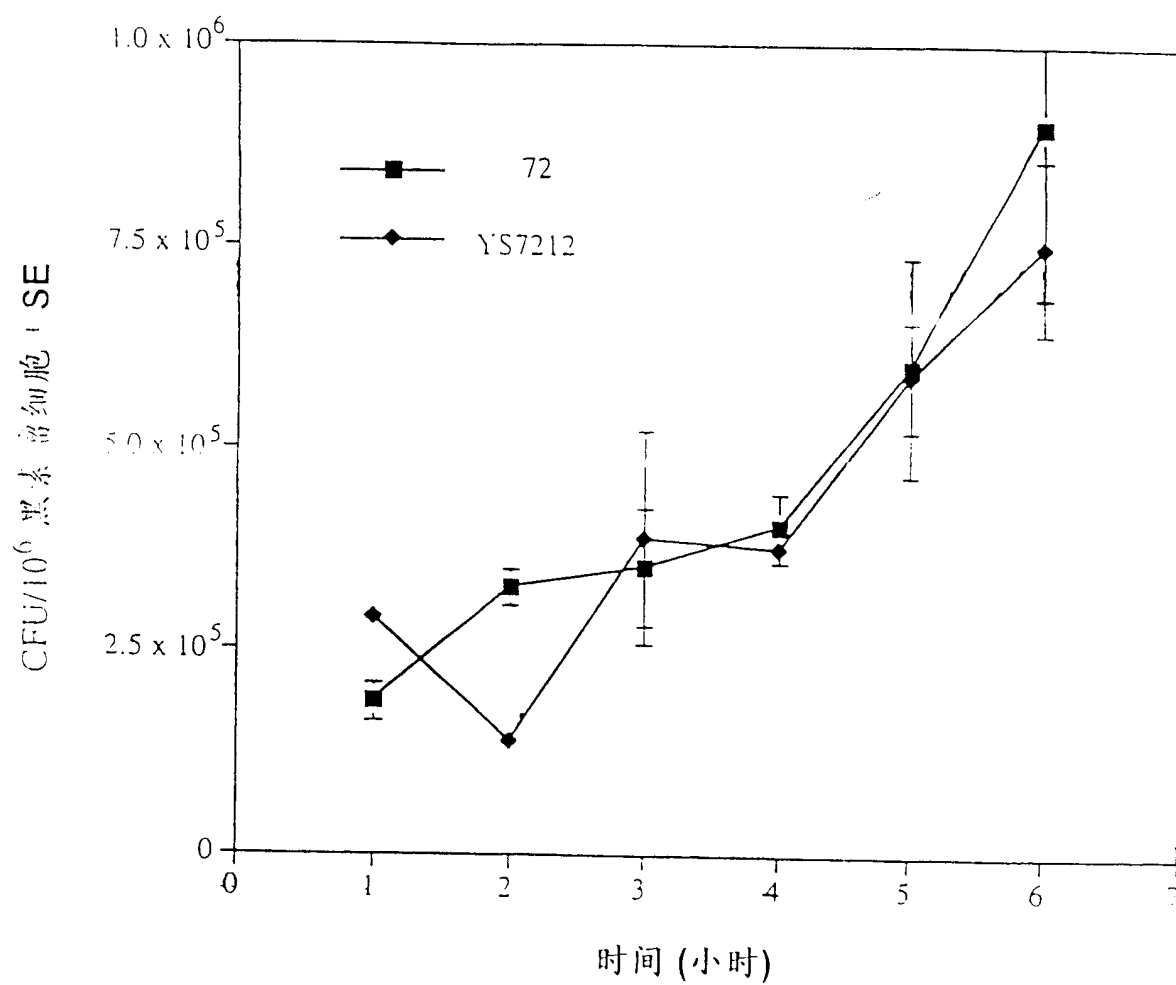
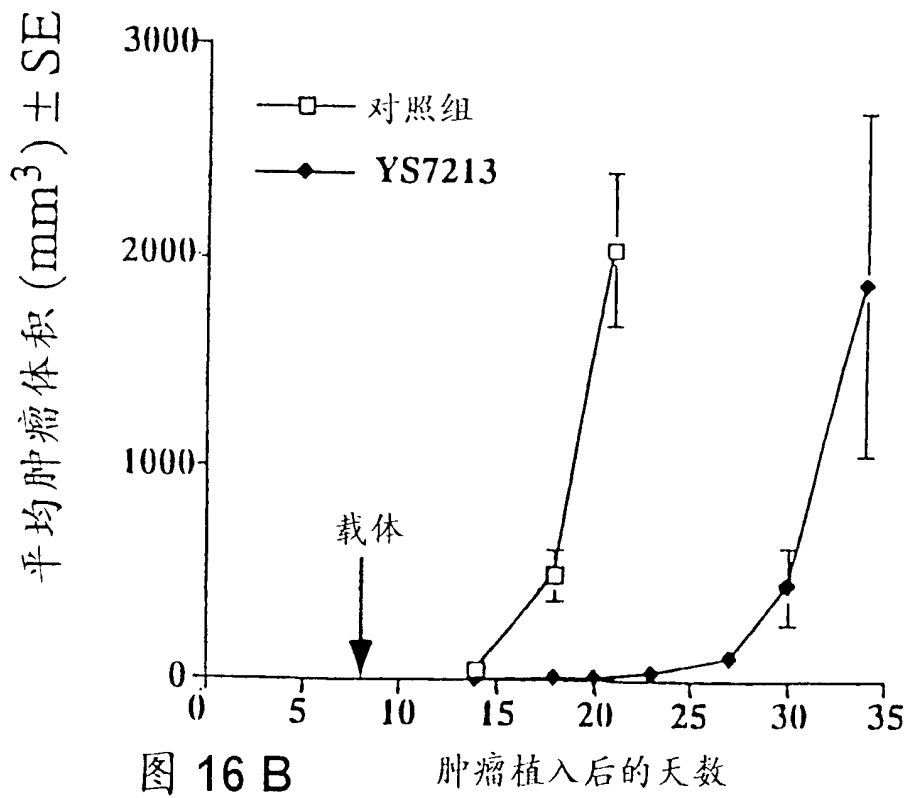
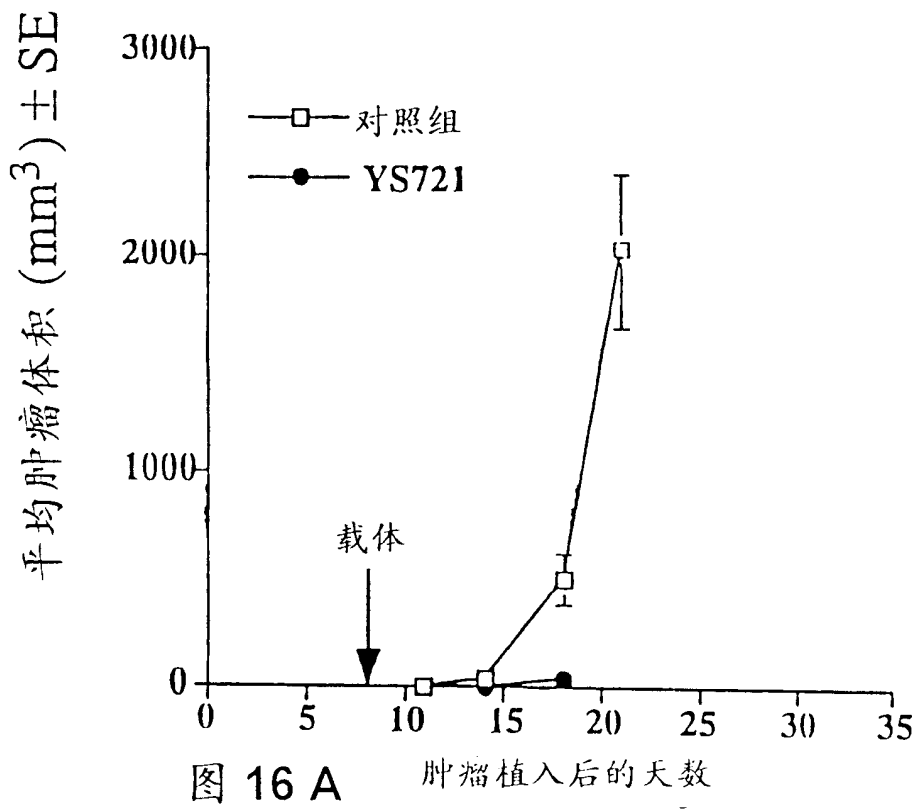
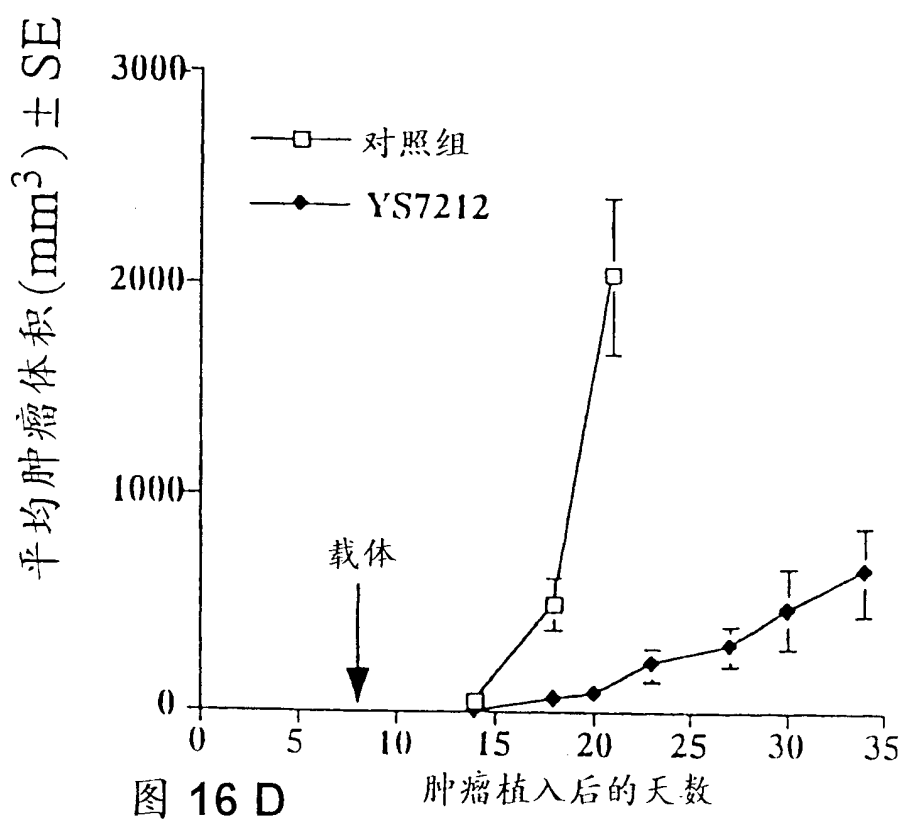
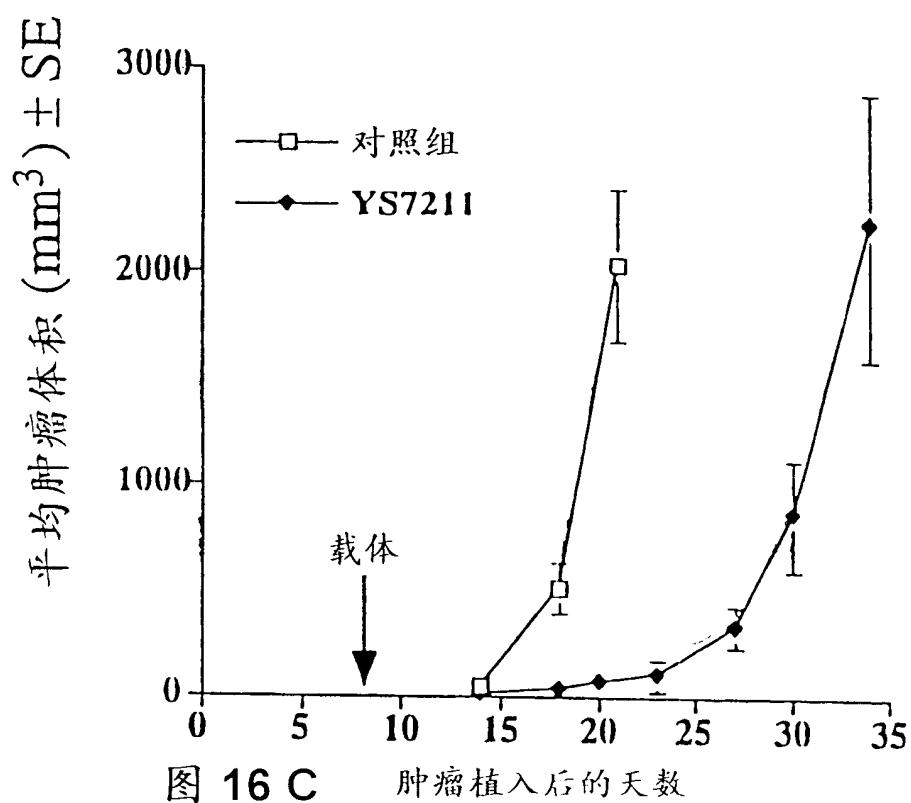


图 15 D





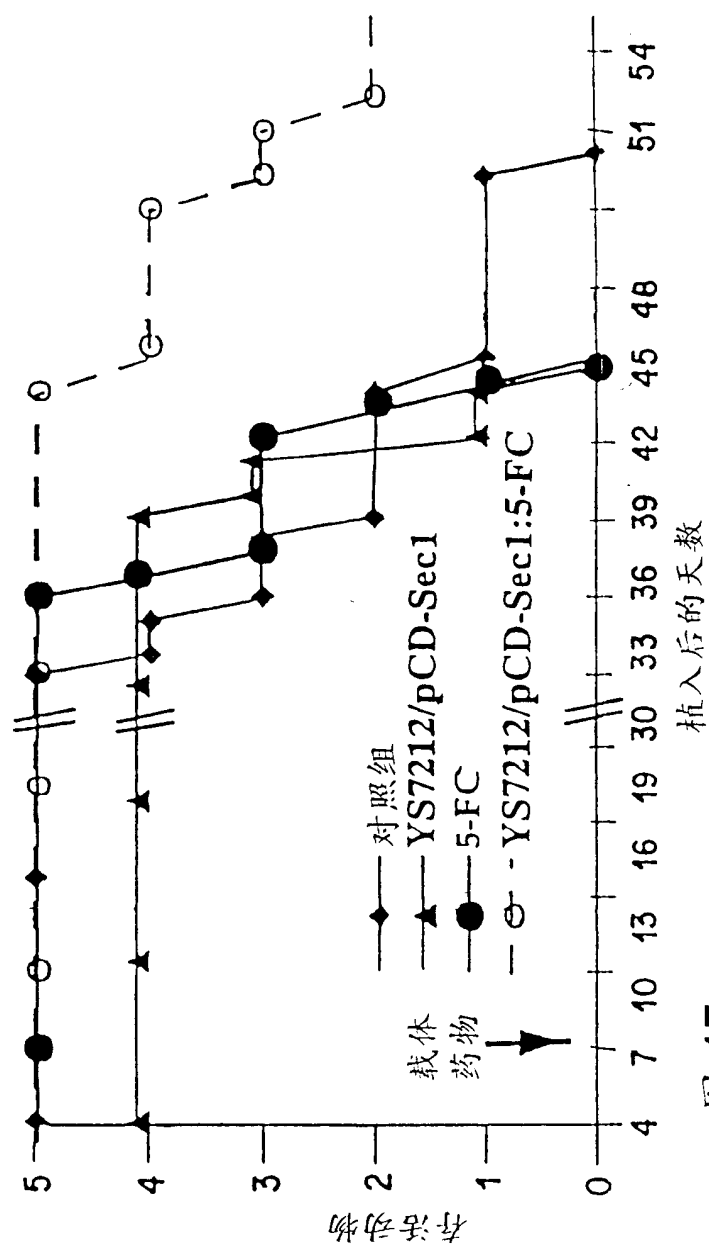


图 17

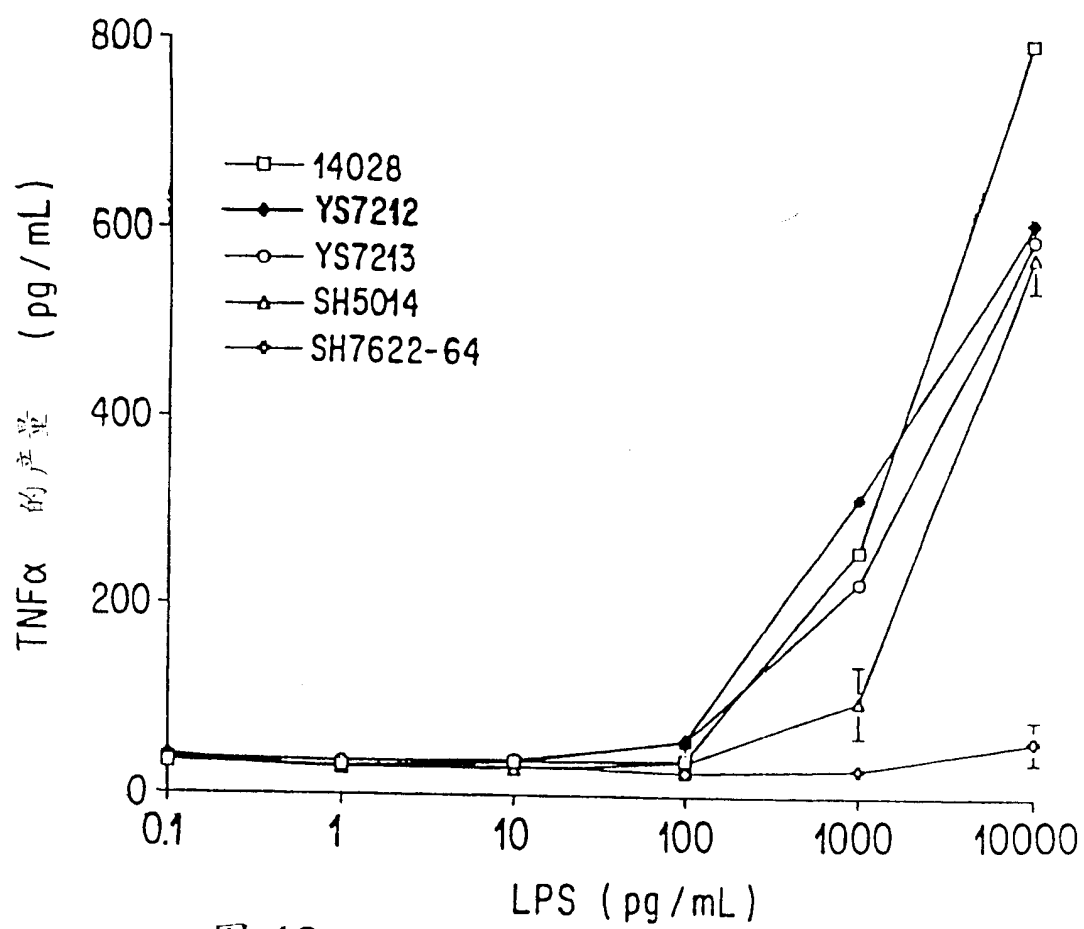


图 18

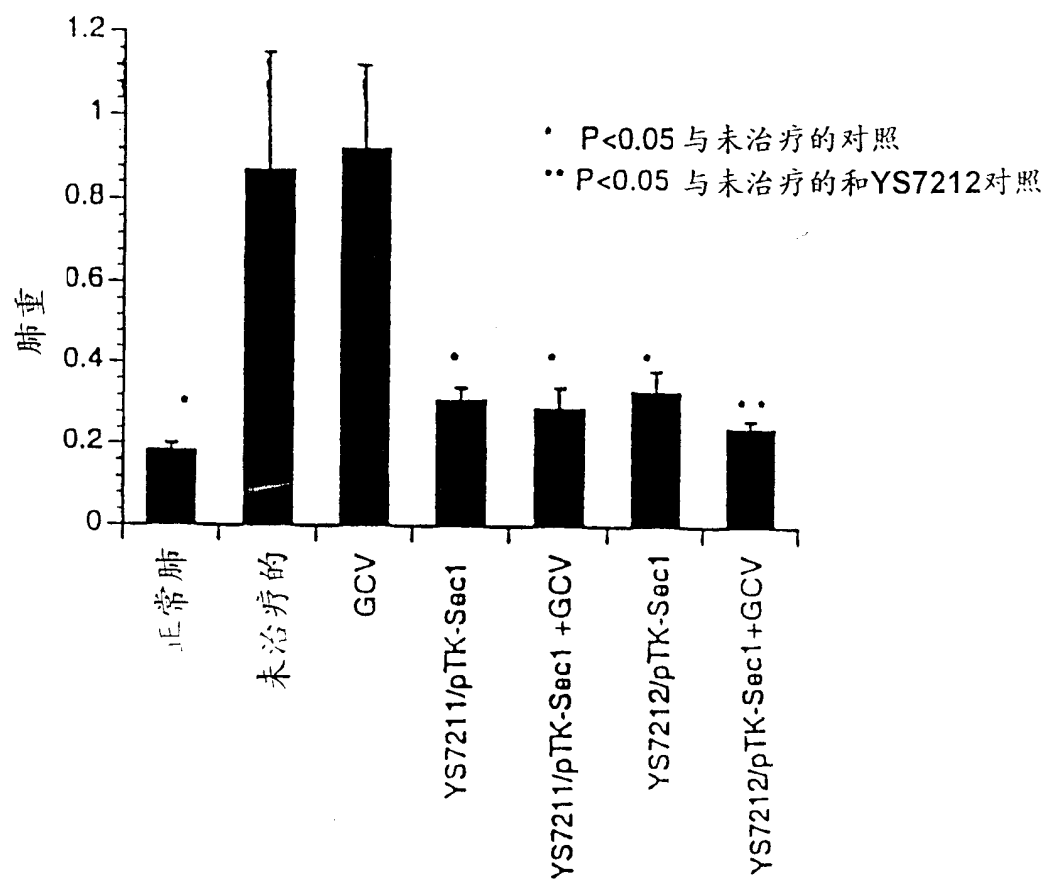


图 19