



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104204805 B

(45)授权公告日 2017.08.01

(21)申请号 201380014047.7

(22)申请日 2013.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104204805 A

(43)申请公布日 2014.12.10

(30)优先权数据
61/610,970 2012.03.14 US(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.09.12(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/031646 2013.03.14(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/138650 EN 2013.09.19(73)专利权人 萨克生物研究学院
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 C·奥谢 C·帕沃斯

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 孙占华 张广育

(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)
C12Q 1/70(2006.01)

(56)对比文件

CN 1424401 A,2003.06.18,
CN 101098882 A,2008.01.02,
CN 1902326 A,2007.01.24,
CN 1706955 A,2005.12.14,
US 2010016406 A1,2010.01.21,
WO 2012003287 A3,2012.08.02,
US 2008242608 A1,2008.10.02,
WO 0073478 A2,2000.12.07,

薛淑雅等.重组腺病毒载体靶向性策略的研究进展.《中国医药生物技术》.2014,第9卷(第2期),

Vladimir Ponomarev et al.A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging.《European Journal of Medicine and Molecular Imaging》.2004,第31卷(第5期),

Yuanhao Li et al.Dual Promoter-Controlled Oncolytic Adenovirus CG5757 Has Strong Tumor Selectivity and Significant Antitumor Efficacy in Preclinical Models.《Clin Cancer Res》.2005,第11卷(第24期),

审查员 李进进

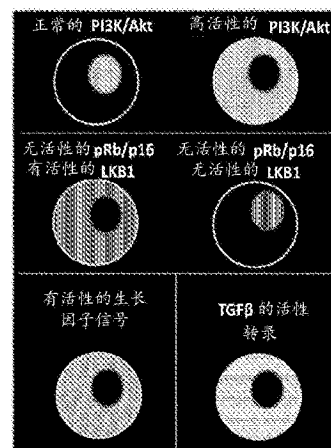
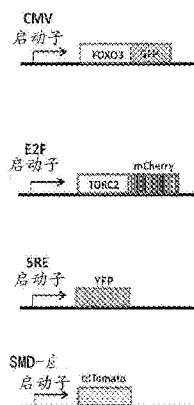
权利要求书2页 说明书23页 附图6页

(54)发明名称

腺病毒肿瘤诊断法

(57)摘要

本文提供了使用重组腺病毒检测受试者中癌症的组合物和方法。更具体地,使用重组腺病毒诊断患者的癌症以及进一步使用重组腺病毒筛选有效治疗所述患者癌症的化合物。



1. 含有第一癌细胞报告模块、第二癌细胞报告模块和癌细胞结合模块的重组报告性腺病毒,其中所述第一癌细胞报告模块包括与第一报告基因可操作地连接的并且在肿瘤细胞和非肿瘤细胞中具有差异活性的癌症应答启动子,并且所述第二癌细胞报告模块包括与第二报告基因可操作地连接的癌症应答启动子。

2. 权利要求1的重组报告性腺病毒,还包括免疫逃避模块。

3. 权利要求1的重组报告性腺病毒,其中所述第一报告基因或所述第二报告基因包括荧光报告基因。

4. 权利要求1的重组报告性腺病毒,还包含第三癌细胞报告模块,其中所述第三癌细胞报告模块包括与第三报告基因可操作连接的癌症应答启动子。

5. 权利要求4的重组报告性腺病毒,其中所述第一癌细胞报告模块能表达第一报告基因表型,所述第二癌细胞报告模块能表达第二报告基因表型,并且所述第三癌细胞报告模块能表达第三报告基因表型。

6. 权利要求5的重组报告性腺病毒,其中所述第一报告基因表型、所述第二报告基因表型和所述第三报告基因表型均为可检测地不同的。

7. 权利要求1-6中任一项的重组报告性腺病毒用于制备检测受试者中癌症的试剂的用途,包括:

(i) 给予受试者所述试剂;

(ii) 使所述试剂感染所述受试者中的癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞;

(iii) 从受试者中获得含有所述报告病毒感染的癌细胞的样品;以及

(iv) 检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。

8. 权利要求1-6中任一项的重组报告性腺病毒用于制备检测受试者中癌症的试剂的用途,包括:

(i) 从受试者中获得含有癌细胞的样品;

(ii) 使所述试剂与所述癌细胞接触;

(iii) 使所述试剂感染所述癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞;以及

(iv) 检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。

9. 权利要求7的用途,还包括给予所述受试者癌症治疗。

10. 权利要求8的用途,还包括给予所述受试者癌症治疗。

11. 权利要求1-6中任一项的重组报告性腺病毒用于制备测定测试化合物是否抑制来自癌症患者的癌细胞的生长的试剂的用途,包括:

(i) 从受试者中获得含有癌细胞的样品;

(ii) 将所述试剂与所述癌细胞接触;

(iii) 使所述试剂感染所述癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞;

(iv) 使所述报告病毒感染的癌细胞有足够的时间去生长;

(v) 测定所述报告病毒感染的癌细胞的生长水平;以及

(vi) 将所述水平与对照水平相比,其中和对照水平相比的低水平表明所述测试化合物抑制来自所述患者的癌细胞的生长。

12. 权利要求7-11中任一项的用途,其中所述癌症为肺癌、皮肤癌或乳腺癌。

13. 权利要求7-11中任一项的用途,其中所述癌细胞为循环癌细胞。

14. 权利要求7-11中任一项的用途,其中所述癌细胞为恶变前细胞。
15. 权利要求7-11中任一项的用途,其中所述样品为体液或组织样品。
16. 权利要求15的用途,其中所述体液为血液。
17. 权利要求7或8的用途,其中所述检测包括检测报告基因表型。
18. 权利要求17的用途,其中所述报告基因表型为荧光报告基因表型。
19. 检测癌症的试剂盒,所述试剂盒包括权利要求1-6中任一项的重组报告性腺病毒。
20. 筛选癌症药物的试剂盒,所述试剂盒包括抑制癌症的化合物和权利要求1-6中任一项的重组报告性腺病毒。
21. 分离癌细胞的试剂盒,所述试剂盒包括用于检测表达的报告基因表型的装置和权利要求1-6中任一项的重组报告性腺病毒。
22. 权利要求1的重组报告性腺病毒,其中所述癌细胞结合模块包括结合CD46的腺病毒尾丝蛋白。
23. 权利要求1的重组报告性腺病毒,其中所述癌细胞结合模块包括Ad3、Ad11或Ad34尾丝结。
24. 权利要求1的重组报告性腺病毒,其中所述癌症应答启动子仅在以下中具有活性:
 - (a) pRb/p16无活性细胞;
 - (b) 具有激活的EGFR/RAS/RAF/MAPK途径的细胞;或
 - (c) 具有有活性的转化生长因子(TGF)- β 信号传导的细胞。
25. 权利要求24的重组报告性腺病毒,其中所述癌症应答启动子为E2F、血清应答元件(SRE)或SMAD-应答启动子。
26. 权利要求1的重组报告性腺病毒,其中所述报告基因编码融合蛋白,所述融合蛋白包括荧光蛋白以及指导所述融合蛋白定位至细胞质或细胞核的蛋白。
27. 权利要求26的重组报告性腺病毒,其中所述指导融合蛋白定位的蛋白为FOXO3或CRTC2。
28. 权利要求1的重组报告性腺病毒,其中所述第一报告基因和/或所述第二报告基因编码绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白或红色荧光蛋白。
29. 权利要求28的重组报告性腺病毒,其中所述荧光蛋白包括mCherry或tdTomato。

腺病毒肿瘤诊断法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2012年3月14日提交的美国临时申请No.61/610,970的优先权,所述临时申请为了所有目的全文纳入本文。

[0003] 对联邦政府资助研发做出的发明的权利的声明

[0004] 本发明是在美国国家卫生研究院授予的政府支持的基金R01HG004876、R21RR024453和R43RR031424下进行的。政府对本发明拥有某些权利。

背景技术

[0005] 细胞从实体瘤扩散到身体远端的被称为转移的过程造成了所有肿瘤相关的死亡的90%以上。起源于原发性肿瘤的细胞可进入循环系统并流动以侵入远离原发性肿瘤的器官和组织并在其中定殖和增殖。因此,这些循环肿瘤细胞(CLC)的检测为转移性癌细胞的早期鉴定和治疗靶向提供了宝贵的机会(Cristofanilli,2004;de Bono,2008)。目前用于检测CTC的技术包括反转录酶-聚合酶链式反应(RT-PCR)、流式细胞术、荧光原位杂交以及最近的微流体技术。遗憾的是,RT-PCR不能区分活的转移性CTC和源于原发性肿瘤的核酸或细胞片段。

[0006] 基于抗体的技术不能用于检测所有癌症,而仅能检测那些表达最常见的和被很好地表征的标记物的癌症。当前系统的CTC计数(enumeration)仅提供了一层关于癌症诊断的信息。已经证明 **CellSearch®** (Veridex,Raridan NJ) 装置取得了CTC分析的商业成功并且其被FDA批准用于乳腺、前列腺和结肠,然而在卵巢、直肠和肺中的使用还有待批准。所述 **CellSearch®** 系统的局限性包括:(a) 依赖于EpCAM的表达水平(Punnoose EA,等人,PLoS ONE.2010;5(9):e12517), (b) 不使用间充质标记物(Punnoose EA,等人,PLoS ONE.2010;5(9):e12517), (c) 依赖于抗体亲和力用来捕获(Nagrath S,等人,Nature,2007;450(7173):1235-9.18097410), 以及最重要的(d) 缺少CTC表型特征。

[0007] 没有任何抗体具有100%的肿瘤或组织特异性,而且抗体既结合活的CTC也可以结合死的CTC。因此需要更敏感的、更加特异的以及可应用更加广泛的检测血液中非常少量的CTC的技术。另外,急需开发新的诊断剂和工具,其不仅能检测和捕获CTC还能对它们的恶性潜能进行定量以及“预先”确定在切除个体患者的肿瘤中最有效疗法。

[0008] 尽管癌症在基因组范围内具有复杂性和可变性,但是共同点是它们都具有生长失调的表型,即所谓的癌症标志,这是由相对少量的关键途径发生突变而引起的。申请人没有将重心放在检测大量的且在肿瘤之间高度可变的单个基因损伤上,而是构建了诊断性病毒,所述病毒在其基因组中整合了多个转录和分子模块以感染和检测患者的肿瘤,报告肿瘤的分子“标志”以及“预先”报告肿瘤对不同疗法的反应。使用这些试剂,任何给定肿瘤的分子损伤和恶性特征可被快速识别(24小时以内)并可通过标准化自动平台来评分。另外,这些试剂也能作为报告分子以快速且直接地测定患者的肿瘤是否可能对具体治疗产生反应。

发明内容

[0009] 在一方面,提供了检测受试者中癌症的方法。所述方法包括给予受试者重组报告性腺病毒。使所述重组报告性腺病毒感染受试者中的癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞。从受试者中获得含有所述报告病毒感染的癌细胞的样品并检测所述报告病毒感染的癌细胞,从而检测了所述受试者中的癌症。

[0010] 在另一方面,提供了检测受试者中癌症的方法。所述方法包括从受试者中获得含有癌细胞的样品。使重组报告性腺病毒与所述癌细胞接触。使所述重组报告性腺病毒感染所述癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞,检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。

[0011] 在另一方面,提供了确定测试化合物是否抑制了来自癌症患者的癌细胞的生长的方法。所述方法包括从受试者中获得含有癌细胞的样品。将重组报告性腺病毒与所述癌细胞接触。使所述重组报告性腺病毒感染所述癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞。使所述报告病毒感染的癌细胞生长足够的时间。测定所述报告病毒感染的癌细胞的生长水平并将所述水平与对照水平对比,其中与对照水平相比的低水平表明所述测试化合物抑制了来自所述患者的细胞癌的生长。

[0012] 在另一方面,提供了分离来自受试者的样品中报告病毒感染的癌细胞的方法。所述方法包括将所述报告病毒感染的癌细胞与未感染的细胞分离,其中所述分离至少部分地基于所述报告病毒感染的癌细胞的表达的报告基因表型。

[0013] 在另一方面,提供了含有癌细胞报告分子模块和癌细胞结合模块的重组报告性腺病毒。

[0014] 在另一方面,提供了检测受试者中癌症的方法。所述方法包括将本文(包括其中的实施方案)中提供的含有重组报告性腺病毒给予受试者。使所述重组报告性腺病毒感染所述受试者中的癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞。从含有所述报告病毒感染的癌细胞的受试者中获得样品,并检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。

[0015] 在另一方面,提供了检测受试者中癌症的方法。所述方法包括从受试者中获得含有癌细胞的样品。将本文(包括其中的实施方案)中提供的重组报告性腺病毒与所述癌细胞接触。使所述重组报告性腺病毒感染癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞,检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。

[0016] 在另一方面,提供了检测测试化合物是否抑制了来自癌症患者的癌细胞的生长的方法。所述方法包括从受试者中获得含有癌细胞的样品以及将本文(包括其中的实施方案)中提供的重组报告性腺病毒与所述癌细胞接触。使所述重组报告性腺病毒感染癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞。使所述报告病毒感染的癌细胞生长足够的时间并测定所述报告病毒感染的癌细胞的生长水平。将所述水平与对照水平对比,其中与对照水平相比的低水平表明所述测试化合物抑制了来自所述患者的癌细胞的生长。

[0017] 在另一方面,提供了检测癌症的试剂盒。所述试剂盒包括本文(包括其中的实施方案)中提供的重组报告性腺病毒。

[0018] 在另一方面,提供了用于筛选癌症药物的试剂盒。所述试剂盒包括癌症抑制性化

合物和本文(包括其中的实施方案)中提供的重组报告性腺病毒。

[0019] 在另一方面,提供了用于分离癌细胞的试剂盒。所述试剂盒包括用于检测表达的
报告基因表型的装置和本文(包括其中的实施方案)中提供的重组报告性腺病毒。

附图说明

[0020] 图1.癌症的标志

[0021] 图2.Adsembly在体外反应中快速地从模块部分装配Ad基因组。图2上部分:被分成
转录和功能模块并被克隆到质粒上的基因组。图2中间部分:将E1、E3和E4模块用肿瘤特异
性启动子驱动的荧光蛋白修饰以突出CTC。图2下部分:多位点特异性的病毒在体外重新装
配和重建示意图。

[0022] 图3.p16被沉默时E2F-应答启动子被激活。

[0023] 图4.将空间滤波器(遮罩)放置在所述器件外观的放大图像中。染色细胞的输入荧
光脉冲信号用不同的空间滤波器调节,然后将所述信号用PMT记录,产生了时间域上的不同
的光电流波形,其对应于细胞通过微流体通道时的不同的位置,例如(111)、(1101)或
(1011)。这种时空编码技术通过使用仅仅一个PMT来区分3种或甚至更多种信号,从而降低
了系统的大小和成本。

[0024] 图5.图5(a)装置结构。将250 μ m宽的主流体通道分成3个亚通道。中间的通道用于
收集废液,同时左边和右边的通道用于收集样品。通过光纤将照明光(488nm激光)递送到所
述装置中并由涂有Teflon AF的光流体波导引导。将PZT驱动器整合至装置中。方块中是由
PDMS制成的装置的分选接合点。图5(b)当PZT驱动器垂下时,目的细胞被推到右边的分选通
道,同时非靶细胞直接进入中间的废液通道而不会引发PZT。图5(c)流动模式观察。左边:
通过叠加用高速CMOS摄像机每0.3ms拍摄的照片对分选到右边通道的荧光珠进行的追踪。
右边:不同电压强度下进入PZT驱动器的微珠的轨迹曲线图。其有助于设置用于足够偏转的
阈值电压。

[0025] 图6.使用NanoSort-UCSD μ FACS系统从未染色细胞中分选出荧光染色的红白血病
细胞(K562)的说明。得到230倍的富集因子(40)。

[0026] 图7.操作流程和预期的来自转导的CTC的荧光读出。

[0027] 图8.通过病毒载体对CTC进行表型分析。

[0028] 图9.选择的肿瘤诊断途径的荧光读出。该图列出了一组最初的4种诊断性表达盒
(左边)和它们在细胞中的预期表型(右边)。CMV-[Foxo3-GFP]盒具有组成型活性,因此GFP
能在所有含有有活性的CMV启动子的细胞类型中表达。在含有低活性PI3K/Akt的细胞中,例
如非肿瘤组织,Foxo3-GFP融合蛋白定位到细胞核中。然而,在含有高活性PI3K/Akt的细胞
中,例如在肿瘤细胞中,Foxo3-GFP融合蛋白定位到细胞质中。E2F-[mCherry-CRTC2]盒仅仅
在具有无活性pRB的细胞(例如在几乎所有的肿瘤中)中有活性。在这些细胞中,如果肿瘤抑
制子Lkb1是完整的,则mCherry-CRTC2融合蛋白定位在细胞质中。然而,在缺失了Lkb1功能
的肿瘤细胞中,mCherry-CRTC2融合蛋白则定位到细胞核中。所述血清应答元件(SRE)启动
子仅在具有激活的生长因子信号传导或有丝分裂原刺激的细胞中表达YFP,指示该细胞是
快速分裂的细胞例如肿瘤。最后,SMAD-应答启动子盒驱动含有有活性的TGF β 信号传导的细
胞中tdTomato的表达,在某些癌症中,这种现象与转移表型联系在一起。当结合在一起时,

该四种表达盒提供了五种不同的癌症相关途径的信息。

[0029] 图10.对腺病毒Adsembly模块进行改造以构建肿瘤诊断病毒。使用Adsembly基因组组装方法构建病毒。在该图表中,示出了其中放置了起初的四种癌症诊断表达盒中每一种的Adsembly模块。将两种盒克隆到E1模块中,因为在之前的实验中已经证明了E1模块允许双表达盒的存在。将E3模块的E3A/E3B部分删除并用单个盒子替换。没有显示在表1中列出的对尾丝基因的改造,所述尾丝也存在于E3模块中。最后,将E4区域删除并用单个模块替换。可在材料与方法中找到关于删除和插入的更具体的信息。对这些Adsembly载体改造以后,将它们用在常规Adsembly反应中以构建含有一种或更多所述肿瘤诊断表达盒的病毒。

具体实施方式

[0030] I. 定义

[0031] “核酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其

[0032] 多聚体,以及它们的互补序列。所述术语包括含有已知的核酸类似物或修饰的主链残基或修饰的连接核酸,所述核酸可以是合成的、天然存在的和非天然存在的,具有与参照核酸相似的结合特性,并且以与参考核酸类似的方式代谢。这样的类似物的实例包括,但不限于,硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性磷酸甲酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。

[0033] 除非另有说明,特定的核酸序列也暗含其保守性修饰的变体(例如,简并密码子置换)和互补序列以及明确指定的序列。具体地,简并密码子置换可以通过产生其中一个或多个所选(或所有)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷置换的序列来实现(Batze等, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka等人, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini等人, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。术语核酸可与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸和多核苷酸互换使用。

[0034] 特定的核酸序列还暗含“剪接变体”。相似地,由核酸编码的特定的蛋白质暗含由该核酸的剪接变体编码的任何蛋白。“剪接变体”,顾名思义,是基因可变剪切的产物。转录后,可将起始的核酸转录物剪接以使不同的(可变的)核酸剪接产物编码不同的多肽。剪接变体的产生机制不同,但是都包括外显子的可变剪接。通过通读转录从相同的核酸衍生的不同多肽也包含在此定义中。剪接反应的任何产物(包括所述剪接产物的重组体形式)包括在此定义中。钾通道剪接变体的实例在Leicher等, *J. Biol. Chem.* 273 (52):35095-35101 (1998)中论述。

[0035] 可采用本领域熟知的常规连接和限制性酶切技术构建含有所需的治疗基因的编码和调控序列的合适的载体(见Maniatis等人, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982))。可以对分离的质粒、DNA序列、或合成的寡核苷酸进行切割、加尾和重新连接以形成所需的形式。

[0036] 当将核酸与另一核酸序列置于功能性关系中时,该核酸被“可操作地连接”。例如,如果前序列或分泌性前导序列的DNA被表达为参与多肽分泌过程中的前蛋白,那么所述前序列或分泌性前导序列的DNA与所述多肽的DNA可操作地连接;或者如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么该启动子或增强子与所述编码序列可操作地连接;如果核糖体结

合位点位于可促进翻译的位置,那么所述核糖体结合位点与所述编码序列可操作地连接。一般,“可操作地连接”意指连接的DNA序列是相邻的,并且,在分泌性前导序列的情况下是邻近的并且处于阅读相中。然而,增强子不必是邻接的。通过在适宜的限制酶切位点处连接来实现连接。如果这样的位点不存在,则依据常规实践使用合成的寡核苷酸接头或连接体。

[0037] 在两条或多条核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同”或“同一性”百分数指的是使用以下描述的使用默认参数的BLAST或BLAST2.0序列比对算法或通过手动比对以及视觉观察(见,例如,NCBI网址等)测定的相同的或者具有特定百分数的相同氨基酸残基或核苷酸的两条或多条序列或亚序列(即在比较窗口或指定区域内进行最大相关性的比较和比对时,在指定的区域内大约60%同一性、优选65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高的同一性)。然后将这些序列称为“基本相同的”。该定义也指的是,或者可以应用于测试序列的互补(compliment)序列。所述定义还包括具有缺失和/或添加的序列、以及具有置换的那些序列。如下所述,所述优选的算法可产生缺口(gap)等。优选地,同一性存在于长度为至少约25个氨基酸或核苷酸的区域内,或更优选地,在长度为至少约50-100个氨基酸或核苷酸的区域内。

[0038] 在序列比对时,一般一种序列作为测试序列与之比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入电脑,如果需要的话,指定序列坐标,并指定序列算法程序参数。优选地,使用默认程序参数,或者指定替代参数。然后基于所述程序参数,序列比较算法计算所述测试序列相对于参考序列的序列同一性百分数。

[0039] 本文使用的“比较窗口”包括涉及具有任何一个选自如下邻接位置数目的区段:20-600、通常约50-约200、更通常约100-约150,其中在将两个序列以最佳方式进行比对后,可以将一条序列与具有相同数目邻接位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域熟知的。可通过以下方法进行最佳的用于比较的序列比对,例如,通过Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) 的局部同源算法,通过Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) 的同源比对算法,通过Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) 的相似性搜索法,通过这些算法的计算机化工具(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 或者通过人工比对和视觉观察(见例如, Current Protocol in Molecular Biology (Ausubel等, eds. 1995增刊))。

[0040] 适合用于测定序列同一性和序列相似性百分数的算法的优选实例为BLAST和BLAST2.0算法,所述算法分别记载于在Altschul等, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977) 和Altschul等, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) 中。使用具有本文所述参数的BLAST和BLAST2.0来测定本发明的核酸和蛋白的序列同一性百分数。本领域已知,进行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心公开获得。该算法包括首先通过鉴定查询序列中的具有长度W的短的字串,来鉴定高计分序列对(HSP),当将所述短字串与数据库序列中的具有相同长度的字串进行比对时,所述短的字串匹配或者满足一些阳性值的阈值得分T。T被称为相邻字串得分阈值(Altschul等, 上文)。这些起始相邻字串匹配(hit)作为种子用于起始搜索寻找包含它们的更长的HSP。只要累积比对得分可增加,就将所述字串匹配沿着每条序列双向延伸。对于核酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖分;通常>0)和N(错配残基的罚分;通常<0)计算累积得分。对于氨基酸序列,使用得分矩阵来计算累积得分。所述字串匹

配在每个方向上的延伸在下列情况下会终止：当累积比对得分从其最大获得值降低了数量X时；由于一个或多个负得分残基比对的累积，所述累积得分达到零或更低时；或者到达任一序列的末端时。所述BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序（对于核酸序列）使用字符串长度（W）为11、期望值（E）为10、M=5、N=-4以及两条链的比较作为默认值。对于氨基酸序列，所述BLASTN程序使用字符串长度（W）为3、期望值（E）为10以及BLOSUM62得分矩阵（见Henikoff&Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)）比对（B）为50、期望值（E）为10、M=5、N=-4以及两条链的比较作为默认值。

[0041] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可以互换使用，是指氨基酸残基的多聚体。所述术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸多聚体，以及天然存在的氨基酸多聚体和非天然存在的氨基酸多聚体。

[0042] 术语“氨基酸”指的是天然存在的和合成的氨基酸，以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸，以及后来被修饰的那些氨基酸，例如，羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指的是具有和天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物，即，与氢、羧基、氨基和R基团结合的 α -碳，例如，高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这类类似物具有修饰的R基团（例如正亮氨酸）或者修饰的肽主链，但是保留着和天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指的是具有与氨基酸通常的化学结构不同，但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。

[0043] 本文中的氨基酸可被称为其通常已知的IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的三字母符号或单字母符号。类似地，核苷酸可被称为其通常接受的单字母密码。

[0044] “保守性修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列。就具体的核酸序列而言，保守性修饰变体指的是编码相同的或基本相同的氨基酸序列的那些氨基酸，或者当核酸不编码氨基酸序列时，保守性修饰变体指的是其基本相同的序列。由于遗传密码的简并性，大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如，密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此，在每一个由一个密码子指定为丙氨酸的位置上，所述密码子可改变为任何一个所述的相应密码子，而不会改变所编码的多肽。这类核酸改变是“沉默改变”，其是保守性修饰改变的一种。本文中每一条编码多肽的核酸序列也描述了所述核酸的每一种可能的沉默改变。技术人员会理解，核酸中的每一个密码子（除了AUG，其通常是甲硫氨酸的唯一密码子，以及TGG，其通常是色氨酸的唯一密码子）都可被修饰从而产生功能相同的分子。因此，对于表达产物而言，而并未对于实际探针序列而言，编码多肽的核酸的每一个沉默改变都暗含在每一个所述序列中。

[0045] 对于氨基酸序列，技术人员应理解，对核酸、肽、多肽或蛋白序列进行能够改变、添加或删除所编码的序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸的单个置换、删除或添加，这类单个置换、删除或添加产生“保守性修饰变体”，在所述保守性修饰变体中所述改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸所置换。提供了功能相似的氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。这类保守性修饰变体除了包括上述之外，还包括本发明的多态变体、种间同源序列和等位基因。

[0046] 下列八组中每组都含有相互之间为保守性置换的氨基酸。1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K)；

5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(见,例如,Creighton, Proteins(1984))。

[0047] 当用于例如细胞、病毒、核酸、蛋白质或载体时,术语“重组的”表示,所述细胞、病毒、核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源核酸或蛋白质或者通过改变天然氨基酸或者蛋白质而被修饰或者表示所述细胞源自这样修饰的细胞。因此,例如,重组的细胞表达在天然(非重组)形式的细胞中不存在的基因或者表达那些原本异常表达、低水平表达或根本不表达的天然基因。

[0048] 短语“严格杂交条件”指的是在这种条件下通常在核酸的复杂混合物中,探针与其靶亚序列杂交而不与其它序列杂交。严格条件是序列依赖性的,并且在不同的环境下是不同的。较长的序列在较高温度下特异性杂交。核酸杂交的广泛指南见于Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes,“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays”(1993)。通常,将严格条件选择为在确定的离子强度和pH下比特定序列的熔点(T_m)值低约5-10°C。 T_m 是(在确定的离子强度、pH和核酸浓度下)达到平衡后(靶序列过量存在时,在 T_m 下,平衡时50%的探针被占用)与靶序列互补的探针的50%与靶序列杂交时的温度。严格条件还可以通过加入去稳定剂(例如甲酰胺)来获得。对于选择性或特异性杂交,阳性信号至少两倍于背景,优选10倍于背景杂交。示例性的严格杂交条件可如下:在50%甲酰胺、5x SSC和1%SDS中,在42°C下孵育,或者,在5x SSC、1%SDS中,在65°C下孵育、在65°C下用0.2x SSC和0.1%SDS洗涤。

[0049] 在严格条件下不与彼此杂交的核酸,如果其编码的多肽基本相同,则它们仍然是基本相同的。例如,当使用遗传密码允许的最大密码子简并性来构建核酸拷贝时,会发生这种情形。在这些情况下,核酸一般在中等严格杂交条件下进行杂交。示例性的“中等严格杂交条件”包括在40%甲酰胺、1 M NaCl、1%SDS的缓冲液中在37°C下杂交,并在45°C下用1X SSC洗涤。阳性杂交为至少两倍于背景。普通技术人员会容易地理解,其他杂交和洗涤条件可用于提供具有相似严格性的条件。确定杂交参数的其他指南在大量参考文献中提供,例如,Current Protocols in Molecular Biology,ed.Ausubel et al.,John Wiley&Sons。

[0050] 对于PCR,尽管退火温度取决于引物长度而可在约32°C-48°C间变化,但是约36°C的温度一般用于低严格性扩增。尽管高严格性退火温度取决于引物长度和特异性而可在约50°C到约65°C范围内,但是对于高严格性PCR扩增,一般温度为约62°C。高和低严格性扩增的一般循环条件包括90°C-95°C变性阶段持续30 sec-2min、退火阶段持续30sec-2min、以及约72°C延伸阶段持续1-2min。低和高严格性扩增反应的方案和指南在例如Innis et al.(1990)PCR Protocols,A Guide to Methods and Applications,Academic Press, Inc.N.Y.)中提供。

[0051] 术语“转染作用”、“转导作用”、“转染”或“转导”可互换使用并被定义为将核酸分子或蛋白质引入到细胞的过程。使用非病毒或基于病毒的方法将核酸引入到细胞中。所述核酸分子可以是编码完整蛋白或者其功能部分的序列。一般,核酸载体包括蛋白表达必需的元件(例如,启动子、转录起始位点等)。转染的非病毒方法包括不使用病毒DNA或病毒颗粒作为递送系统而将核酸分子引入到细胞中的任何适当的方法。示例性的非病毒转染方法

包括磷酸钙转染、脂质体转染、核转染、声致穿孔、热击转染、磁转染和电穿孔。对于基于病毒的方法,任何有用的病毒载体都可用于本文描述的方法中。病毒载体的实例包括,但不限于反转录病毒、腺病毒、慢病毒和腺-伴随病毒载体。在一些方面,使用腺病毒载体按照本领域熟知的常规步骤将核酸分子引入至细胞中。术语“转染作用”或“转导作用”也指的是将蛋白质从外部环境引入至细胞中。一般,蛋白质的转导作用或转染作用依赖于能够穿过细胞膜的多肽或蛋白质与目的蛋白的结合。参见,例如,Ford等,(2001) *Gene Therapy* 8:1-4 and Prochiantz (2007) *Nat. Methods* 4:119-20。

[0052] 转染基因的表达可在宿主细胞中瞬时或稳定发生。在“瞬时表达”过程中,所述转染核酸没有整合到宿主细胞基因组中,并且在细胞分裂过程中未转移到子代细胞中。因为所述转染核酸的表达仅限于转染的细胞,因此所述基因的表达随着时间而都丢失。相比之下,当转染基因与另一个赋予转染细胞选择优势的基因共转染时,所述转染基因可发生稳定表达。这样的选择优势可以是对给予细胞的某种毒素的抗性。可通过转座子介导的将转染基因插入到宿主基因组中来进一步实现所述转染基因的表达。在转座子介导的插入过程中,所述基因以可预测的方式放置在两个转座子接头序列之间,所述两个转座子接头序列使得能够插入至宿主基因组中并随后被切除。

[0053] 当提及细胞培养物本身或培养过程时,术语“培养”、“正在培养”、“生长”、“正在生长”、“维持”、“正在维持”、“扩增”、“正在扩增”等可互换使用,意指在适合存活的条件在体外(例如,离体)维持细胞。使得培养的细胞能够存活,并且培养可导致细胞生长、分化或分裂。所述术语并不意味着在培养物中的细胞都能存活、生长或分裂,因为一些细胞可自然衰老等。一般将细胞培养在培养基中,所述培养基可在培养的过程中更换。

[0054] 术语“培养基”和“培养液”指的是细胞培养环境。培养基一般为等渗溶液,并且可以为液态的、凝胶状的、或半固态的,例如,以提供细胞粘附的基质或支持物。本文使用的培养基可包括用于培养细胞所必需的营养支持物、化学支持物和结构支持物的组分。

[0055] “对照”样品或数值指的是充当参照的样品,通常为已知的参照,用于与测试样品进行比较。例如,可从测试条件(例如,存在测试化合物)中获取测试样品,并将所述测试样品与来自已知条件(例如,不存在测试化合物(阴性对照)、或者存在已知化合物(阳性对照))中的样品进行比较。对照也可表示从很多测试或结果收集而来的平均值。本领域技术人员会理解,可设计对照用于评估任何数量的参数。例如,可设置对照以基于药理学数据(例如,半衰期)或治疗学量度(例如,副作用的比较)来比较治疗效果。本领域技术人员应理解哪些对照在给定的情形中价值,并且应能够基于与对照数值进行的比较来分析数据。对照还可以对确定数据的显著性有价值。例如,如果对于给定参数的数值在对照中的变化性很大,则认为测试样品的变化不显著。

[0056] 在包含“另外的”、“其他的”、或“第二”组分的组合物(例如,癌细胞报告模块、报告基因表型)中,本文使用的第二组分不同于其他组分或第一组分。“第三”组分不同于其它、第一和第二组分,并且类似地,其他列举的或另外的组分也不同。

[0057] 用于本文时,术语“癌症”指的是哺乳动物中的所有类型的癌症、肿瘤或恶性肿瘤,包括白血病、癌和肉瘤。示例性的癌症包括脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、头&颈癌、肝癌、肾癌、肺癌、非小细胞性肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、肉瘤、胃癌、子宫癌和髓母细胞瘤。另外的实例包括,霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌、横纹肌

肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、原发性脑瘤、原发性脑癌、恶性胰岛瘤(malignant pancreatic insulanoma)、恶性类癌、膀胱癌、恶变前皮肤病损、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、神经母细胞瘤、食管癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、内分泌和外分泌胰腺肿瘤以及前列腺癌。

[0058] 术语“白血病”广义上指的是造血器官的进行性恶性疾病,并且一般由血液和骨髓中白细胞和它们的前体的异常增殖和发育来表征。白血病通常在临床上基于以下几点进行分类:(1)急性或慢性疾病的持续时间和特性;(2)涉及细胞的类型:骨髓细胞(骨髓内产生的)、淋巴细胞(淋巴生成的)或单核细胞;和(3)白血病或非白血病(亚白血病)血液中异常细胞数量的增加或非增加。P₃₈₈白血病模型能够预测体内抗白血病活性而被广泛接受。认为不管正在进行治疗的白血病的类型是什么,在P₃₈₈测定中测试为阳性的化合物通常在体内表现出一定水平的抗白血病活性。因此,本发明包括治疗白血病的方法,以及,优选地,治疗以下类型白血病的方法:急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性早幼粒细胞性白血病、成人T-细胞白血病、白细胞不增多性白血病、非白血性白血病(aleukocytchemic leukemia)、嗜碱性粒细胞性白血病、干细胞性白血病、牛白血病、慢性髓细胞性白血病、皮肤白血病、胚细胞性白血病、嗜酸性粒细胞性白血病、格罗斯白血病、多毛细胞白血病、成血性白血病、成血细胞性白血病、组织细胞性白血病、干细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、白细胞减少性白血病、淋巴性白血病、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、成淋巴性白血病、淋巴样白血病、淋巴肉瘤细胞性白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞白血病、小原粒性白血病、单核细胞性白血病、成髓细胞性白血病、髓细胞性白血病、骨髓性粒细胞性白血病、粒单核细胞性白血病、内格利白血病、浆细胞白血病、多发性骨髓瘤、浆细胞性白血病、前髓细胞性白血病、里德尔细胞性白血病、席林白血病、干细胞性白血病、亚白血性白血病和未分化细胞性白血病。

[0059] 术语“肉瘤”通常指的是由类似胚性结缔组织的物质组成的肿瘤并且通常由嵌入在纤维状物质或均一物质中的紧密堆积的细胞组成。可以用抗肿瘤的硫醇结合的线粒体氧化剂和抗癌剂的结合来治疗的肉瘤包括:软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑肉瘤、黏液肉瘤、骨肉瘤、Abemethy's肉瘤、脂肪肉瘤(adipose sarcoma)、脂肪肉瘤(liposarcoma)、腺泡状软组织肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄状肉瘤、绿色瘤肉瘤、绒毛膜癌、胚胎性肉瘤、肾母细胞瘤(Wilms'tumor sarcoma)、子宫内膜肉瘤、间质肉瘤、尤因氏肉瘤、筋膜肉瘤、成纤维细胞肉瘤、巨细胞肉瘤、粒细胞肉瘤、霍奇金肉瘤、特发性多发性色素沉着出血性肉瘤、B细胞免疫母细胞肉瘤、淋巴瘤、T细胞免疫母细胞肉瘤、延森肉瘤、卡波西肉瘤、枯氏细胞肉瘤、血管肉瘤、白血病性肉瘤、恶性间叶肉瘤、骨膜外肉瘤、网状细胞肉瘤、劳斯肉瘤、浆液囊性肉瘤、滑膜肉瘤和毛细血管扩张性肉瘤。

[0060] 术语“黑色素瘤”指的是起源于皮肤和其他器官的黑素细胞系统的肿瘤。可以用抗肿瘤药硫醇结合的线粒体氧化剂和抗肿瘤剂的结合治疗的黑色素瘤包括:例如,肢端雀斑样黑色素瘤、无黑色素黑色素瘤、良性幼年黑色素瘤、克劳德曼黑色素瘤、S91黑色素瘤、Harding-Passey黑色素瘤、幼年型黑色素瘤、恶性雀斑样黑色素瘤、恶性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、指甲下黑色素瘤(subungal melanoma)和浅表扩张性黑色素瘤。

[0061] 术语“癌”指的是由易于浸润周围组织并产生转移的上皮细胞组成的恶性肿瘤(new growth)。可以用抗肿瘤药硫醇结合的线粒体氧化剂和抗肿瘤剂的结合治疗的示例性

的癌包括,例如,腺泡癌(acinar carcinoma)、腺泡癌(acinous carcinoma)、腺样囊性癌(adenocystic carcinoma)、腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma)、腺癌、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌(basal cell carcinoma)、基底细胞癌(carcinoma basocellulare)、基底细胞样癌、基底鳞状细胞癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管原癌、脑样癌、胆管细胞癌、绒毛膜癌、胶体癌、粉刺状癌、子宫体癌、筛形癌、胸廓癌、皮肤癌、柱状癌、柱状细胞癌、导管癌、硬癌、胚胎性癌、髓样癌、表皮样癌、腺样上皮细胞癌、外植癌、溃疡性癌、硬癌(carcinoma fibrosum)、胶样癌(gelatiniformi carcinoma)、胶样癌(gelatinous carcinoma)、巨细胞癌(giant cell carcinoma)、巨细胞癌(carcinoma gigantocellulare)、腺癌、颗粒细胞癌、发母质癌、多血癌、肝细胞癌、许特尔细胞癌、粘液癌、hypemephroid carcinoma,幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、克罗姆佩柯赫尔癌(Krompecher's carcinoma)、库尔契茨基细胞癌(Kulchitzky-cell carcinoma)、大细胞癌、豆状癌(lenticular carcinoma)、豆状癌(carcinoma lenticulare)、脂瘤样癌、淋巴上皮癌、髓样癌(carcinoma medullare)、髓样癌(medullary carcinoma)、黑色素癌、软癌、粘液癌(mucinous carcinoma)、粘液癌(carcinoma muciparum)、克鲁肯伯格瘤(carcinoma mucocellulare)、粘液表皮样癌、粘液癌(carcinoma mucosum)、粘液癌(mucous carcinoma)、粘液瘤样癌(carcinoma myxomatodes)、鼻咽癌、燕麦细胞癌、骨化性癌(carcinoma ossificans)、骨化性癌(osteoid carcinoma)、乳头状癌、门脉周癌、浸润前癌、鳞状细胞癌(prickle cell carcinoma)、粉刺癌(pultaceous carcinoma)、肾细胞癌、贮备细胞癌、肉瘤样癌、施奈德氏(schneiderian)癌、硬癌(scirrhou carcinoma)、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、硬癌(solanoid carcinoma)、球形细胞癌、梭形细胞癌、髓样癌(carcinoma spongiosum)、鳞状癌、鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma)、绳捆癌、血管扩张性癌(carcinoma telangiectaticum)、血管扩张性癌(carcinoma telangiectodes)、移行细胞癌、结节性皮癌(carcinoma tuberosum)、结节性皮癌(tuberos carcinoma)、疣状癌和绒毛状癌。

[0062] 本文中的“治疗有效剂量或治疗有效量”意指能产生给药目的疗效的剂量。准确的剂量和制剂取决于治疗的目的,并且可由本领域技术人员使用已知的技术来确定(见,例如,Lieberman,Pharmaceutical Dosage Forms (vols.1-3,1992);Lloyd,The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(1999);Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th Edition,Gennaro,Editor(2003),and Pickar,Dosage Calculations(1999))。

[0063] 术语“可药用的盐”或“可药用的载体”意指包括依据本文所述的化合物中的具体的取代基,使用相对无毒的酸或碱而制备的活性化合物的盐。当本发明化合物含有相对酸性的官能度时,可通过在净相(neat)或在合适的惰性溶剂中将中性形式的这类化合物与足量的所需碱接触在适合的惰性溶剂中接触来获得碱加成盐。可药用碱加成盐的实例包括:钠盐、钾盐、钙盐、铵盐、有机胺盐或镁盐、或相似的盐。当本发明化合物含有相对碱性的官能度时,可通过在净相或在合适的惰性溶剂中将中性形式的这类化合物的中性形式与足量的所需酸接触来获得酸加成盐。可药用酸加成盐的实例包括:衍生自无机酸如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、碳酸氢盐(monohydrogencarbonic acid)、磷酸、磷酸氢盐(monohydrogenphosphoric acid)、磷酸二氢盐(dihydrogenphosphoric acid)、硫酸、硫酸

氢盐(monohydrogensulfuric acid)、氢碘酸或亚磷酸等的酸加成盐;以及衍生自相对无毒的有机酸如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、富马酸、乳酸、扁桃酸、苯二甲酸、苯磺酸、对-甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、甲磺酸等的盐。也包括氨基酸的盐例如精氨酸盐等和有机酸的盐例如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸等(见,例如Berge等, *Journal of Pharmaceutical Science* 66:1-19 (1977))。本发明某些特定的化合物同时含有使所述化合物转换成碱加成盐或酸加成盐的碱性和酸性官能度。本领域技术人员已知的其他可药用载体适用于本发明。

[0064] II. 方法

[0065] 在一方面,提供了检测受试者中癌症的方法。所述方法包括给予受试者重组报告性腺病毒。使所述重组报告性腺病毒能够感染受试者中的癌细胞,由此形成报告病毒感染的癌细胞。从所述受试者中获得含有所述报告病毒感染的癌细胞的样品并检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。本文提供的重组报告性腺病毒是包含至少一个(例如,一个)编码报告蛋白质的序列的重组腺病毒。重组报告性腺病毒的非限制性实例在表2和图9中显示。根据公开的申请PCT/US2011/048006中记载的方法形成本文(包括实施方案)提供的重组报告性腺病毒,所述申请为了所有目的全文纳入本文。所述报告蛋白可以是荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白)或它可以是被荧光标记从而易于检测的蛋白。可通过将荧光标记的抗体与报告蛋白结合来实现荧光标记。在一些实施方案中,所述重组报告性腺病毒包括可操作地与编码荧光蛋白的核酸连接的巨细胞病毒启动子。在一些其他实施方案中,所述荧光蛋白为绿色荧光蛋白。在一些实施方案中,所述重组报告性腺病毒包括可操作地与编码荧光蛋白的核酸连接的E2F启动子。在一些其他实施方案中,所述荧光蛋白为红色荧光蛋白。在一些实施方案中,所述重组报告性腺病毒包括可操作地与编码荧光蛋白的核酸连接的SRE启动子。在一些其他实施方案中,所述荧光蛋白为黄色荧光蛋白。在一些实施方案中,所述重组报告性腺病毒包括可操作地与编码荧光蛋白的核酸连接的SMAD-应答启动子。在一些其他实施方案中,所述荧光蛋白为红色荧光蛋白。

[0066] 在另一方面,提供了检测受试者中癌症的方法。所述方法包括从受试者中获得含有癌细胞的样品。将重组报告性腺病毒与所述癌细胞接触。使所述重组报告性腺病毒能够感染癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞,检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。在一些实施方案中,根据本文提供的方法的检测包括检测报告基因的表型。在一些其他实施方案中,所述报告基因表型为荧光报告基因表型。当用本文提供的重组报告性腺病毒感染细胞(例如,癌细胞)时,用足以表达报告表型的量的重组报告性腺病毒感染所述细胞。

[0067] 在另一方面,提供了测定测试化合物是否抑制来自癌症患者的癌细胞的生长的方法。所述方法包括从受试者中获得含有癌细胞的样品。将重组报告性腺病毒与所述癌细胞接触。使所述重组报告性腺病毒能够感染癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞。使所述报告病毒感染的癌细胞能够有足够的时间生长。测定所述报告病毒感染的癌细胞的生长水平并将所述水平与对照水平相比,其中和对照水平相比的低水平表明所述测试化合物抑制了来自所述患者的癌细胞的生长。本文提供的对照水平是在没有所述测试化合物存在的条件下癌细胞的生长水平。

[0068] 在一些实施方案中,根据本文提供的方法的癌症是肺癌、皮肤癌或乳腺癌。在其他

实施方案中,根据本文提供的方法的癌细胞是循环癌细胞。在一些实施方案中,所述癌细胞是恶变前细胞。在一些实施方案中,根据本文提供的方法的样品是体液。在一些其他实施方案中,所述体液为血液。在其他实施方案中,所述体液为血清或血浆。在其他实施方案中,所述体液为尿液、唾液、肺组织、支气管肺泡灌洗样品或呼出气冷凝物。

[0069] 在另一方面,提供了分离来自受试者的样品中报告病毒感染的癌细胞的方法。所述方法包括将所述报告病毒感染的癌细胞与未感染细胞分离,其中所述分离至少部分基于所述报告病毒感染的癌细胞的表达的报告基因表型。在一些实施方案中,所述报告基因表型是荧光活性的水平。在其他实施方案中,所述报告基因表型是细胞生长的水平。在其他实施方案中,所述报告基因表型是异常细胞形态的水平。在一些实施方案中,所述方法进一步包括使得所述报告病毒感染的癌细胞能够有足够的时间去生长,从而表达所述表达的报告基因表型。在一些实施方案中,所述未感染细胞是非癌细胞。在其他实施方案中,所述样品为血液样品。

[0070] 在另一方面,提供了检测受试者中癌症的方法。所述方法包括将本文(包括其实施方案)提供的重组报告性腺病毒给予受试者。使所述重组报告性腺病毒能够感染所述受试者中的癌细胞,从而形成报告病毒感染的癌细胞。从含有所述报告病毒感染的癌细胞的受试者中获得样品,并检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。

[0071] 在另一方面,提供了检测受试者中癌症的方法。所述方法包括从受试者中获得含有癌细胞的样品。将本文(包括其实施方案)提供的重组报告性腺病毒与癌细胞接触。使所述重组报告性腺病毒能够感染所述癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞,检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。在一些实施方案中,所述方法进一步包括给予所述受试者癌症治疗。

[0072] 提供了测定测试化合物是否抑制来自癌症患者的癌细胞的生长的方法。所述方法包括从受试者中获得含有癌细胞的样品以及将本文(包括其实施方案)提供的重组报告性腺病毒与癌细胞接触。使所述重组报告性腺病毒能够感染癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞。使所述报告病毒感染的癌细胞能够有足够的时间去生长并测定所述报告病毒感染的癌细胞的生长水平,将所述水平与对照水平相比,其中与对照水平相比的低水平表明所述测试化合物抑制了来自所述患者的癌细胞的生长。

[0073] III. 组合物

[0074] 本文特别提供了用于癌细胞的诊断和检测的重组报告性腺病毒。在一方面,提供了含有癌细胞报告模块和癌细胞结合模块的重组报告性腺病毒。本文提供的癌细胞报告模块包括编码报告蛋白的报告基因。所述报告蛋白可以是荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白)或它可以是被荧光标记从而易于检测的蛋白。可通过将荧光标记的抗体与报告蛋白结合来实现荧光标记。本文提供的癌细胞结合分子是能够结合由癌细胞表达的分子的分子(例如,细胞受体)。所述细胞结合分子可以是小分子或蛋白。在一些实施方案中,所述癌细胞报告模块包括可操作地与报告基因连接的癌症应答启动子。本文提供的癌症应答启动子是在癌细胞中具有活性的启动子,其中所述活性是可检测地不同于非癌细胞中所述启动子的活性。在一些实施方案中,与所述启动子在非癌细胞中的活性相比,所述活性降低。在其他实施方案中,与所述启动子在非癌细胞中的活性相比,所述活性增加。在一些其他实施方案中,所述报告基因是荧光报告基因。

[0075] 在一些实施方案中,所述重组腺病毒还包含免疫逃避模块。本文提供的免疫逃避模块是蛋白质或多肽,如果所述重组报告性腺病毒表达了所述蛋白质或多肽,则其防止所述重组报告性腺病毒被癌症患者的免疫系统检测。

[0076] 在一些实施方案中,所述癌细胞报告模块是第一癌细胞报告模块,所述重组报告性腺病毒还包括第二癌细胞报告模块和第三癌细胞报告模块。在一些实施方案中,所述第一癌细胞报告模块能表达第一报告基因表型,所述第二癌细胞报告模块能表达第二报告基因表型,所述第三癌细胞报告模块能表达第三报告基因表型。在一些其他实施方案中,所述第一报告基因表型、第二报告基因表型和第三报告基因表型均为可检测地不同的。在一些实施方案中,所述第一报告基因表型指示第一癌症,第二报告基因表型指示第二癌症,第三报告基因表型指示第三癌症。在一些其他实施方案中,所述第一癌症、所述第二癌症和所述第三癌症各自不同。在一些实施方案中,第一报告基因表型、第二报告基因表型和第三报告基因表型指示单一癌症。

[0077] IV. 试剂盒

[0078] 在另一方面,提供了用于检测癌症的试剂盒。所述试剂盒包括本文(包括其实施方案)提供的重组报告性腺病毒。在一些实施方案中,所述试剂盒包括用于从来自受试者的组织或细胞样品中分离细胞(例如,潜在的癌细胞)的试剂,例如本文描述的那些(例如磁珠或其他基于亲和性的分离材料,贮存缓冲液等)。因此,所述试剂盒可包括能够与至少一种细胞特异性的标记物特异性结合的抗体或其他试剂。所述试剂盒也可包括用于在处理和检测过程中盛装样品的试管或其他容器。所述试剂盒还包括在适于感染细胞和检测细胞的条件下将所述重组报告性腺病毒给予所述患者的说明书。

[0079] 在另一方面,提供了用于筛选癌症药物的试剂盒。所述试剂盒包括癌症抑制性化合物和本文(包括其实施方案)中提供的重组报告性腺病毒。在一些实施方案中,所述试剂盒包括用于给药癌症抑制性化合物的试剂(例如贮存缓冲液)和用于检测报告基因表型的桌面检测设备。

[0080] 在另一方面,提供了用于分离癌细胞的试剂盒。所述试剂盒包括用于检测表达的报告基因表型的装置和本文(包括其实施方案)中提供的重组报告性腺病毒。在一些实施方案中,所述试剂盒包括用于从来自受试者的组织或细胞样品中分离癌细胞的试剂,例如本文描述的那些(例如磁珠或其他基于亲和性的分离材料,贮存缓冲液等)。因此,所述试剂盒可包括能够与至少一种癌细胞特异性标记物特异性结合的抗体或其他试剂。所述试剂盒也可包括用于在处理和检测过程中盛装样品的试管或其他容器。所述试剂盒还包括在适于感染癌细胞和检测癌细胞的条件下将所述重组报告性腺病毒给予所述患者的说明书。

[0081] V. 具体实施方式

[0082] 申请人意欲开发标准化自动平台,所述标准化自动平台能够在分子混合和预后能力的水平上提供床旁检测诊断以告知临床决定,而这一点在任何其它的检测系统、生物标记物或相关的基因表达谱中是不可能做到的。已经开发了一种从血液中检测、计数、表征和分离有活力的CTC的无创性测试。该测试警告临床医生源自原发病灶的癌症的存在或进展,同时告知关于根据循环癌细胞的数目性质和由遗传畸变失调的肿瘤途径来确定应该用多大的力度来治疗患者的临床决策。此外,使用由技术员操作的快速经济的自动平台,基于有力的转录报告分子和分子标记,可确定哪条关键的癌症途径失调。可以分离、捕获所述CTC,

并将其直接用于检测它们对不同的潜在治疗方案应答的能力以及它们告知关于哪一种治疗选择最可能获得最大功效的临床医师决策的能力。

[0083] 通过荧光蛋白读出数据来提供关于肿瘤途径的定量和定性数据的病毒载体

[0084] 目前在肿瘤基因组中已经鉴定出100,000种以上的突变(Stratton MR,Campbell PJ,Futreal PA,Nature.2009;458(7239):719-24.19360079)其中至少350个基因表现为频发突变(Futreal PA等人,Nat Rev Cancer,.2004;4(3):177-83.14993899)。尽管这是新的遗传学知识,癌症患者的诊断、预后和治疗仍然主要依赖于主观组织病理学、转变的替代性生物标记物、可变的表面标记物或相关的基因表达谱。随着NDA测序的发展,不久可能会对每一个癌症患者的肿瘤进行测序。然而,即使这种情况有可能,但是这些数据也不会显示癌症微环境内的决定肿瘤表型的表观遗传修饰和关键相互作用,或者也不能使人们预测这些因子如何相互作用以测定患者的临床结果或患者肿瘤对于不同治疗的应答。

[0085] 尽管癌症具有复杂性和遗传变异性,但是所有的癌症都具有决定它们恶性潜能的表型,即所谓的“癌症标志”,这是相对少数关键途径中发生突变的结果。(图1,(Hanahan D, Weinberg RA,Cell,2000;100(1):57-70.10647931))。在各个肿瘤中,尽管使这些途径失调的突变有所不同,但都聚集在关键转录元件和效应因子的下游。例如,RTKs、RAS、PTEN、PI-3K或RAF中的突变可导致肿瘤能够足以依靠自身来完成生长因子信号传导,而RB本身的突变、p16的缺失(点突变和表观遗传沉默)或细胞周期蛋白的过表达可使RB肿瘤抑制因子途径失活(Du W,Searle JS,Curr Drug Targets,2009;10(7):581-9.19601762;Sherr CJ,Cel,2004;116(2):235-46.14744434;Rossi DJ,Weissman IL,Cell,2006;125(2):229-31.16630811;Gazdar AF,Oncogene,2009;28 Suppl 1:S24-31.19680293;Yuan TL,Cantley LC,Oncogene,.2008;27(41):5497-510.18794884)。所述突变的获得和它们产生的表型特征的获得不是同时发生的,但是经常经过进展阶段并且发生在很长的一段时间内。可使用基于诊断性的转录报告分子和细胞的测定来从功能上测定这些关键分子活性的失调程度。例如,Rb或p16中的突变导致E2F驱动的启动子的激活(Du W,Searle JS,Curr Drug Targets,2009;10(7):581-9.19601762;SherrCJ,Cel,2004;116(2):235-46.14744434)。类似地,SMAD的细胞核和细胞质的定位指示TGFβ途径的信号传导和转移(Shi Y,Massague J.,Cell,2003;113(6):685-700.12809600)。在基础研究和药物筛选应用中,将这些基于转录和细胞的荧光定位的读出结果用作肿瘤途径活性的报告分子。

[0086] 申请人没有将重心放在检测大量且在肿瘤之间高度可变的单个基因损伤上,而是构建了病毒诊断性靶标(drones),所述病毒诊断性靶标(drones)将多种转录模块和分子模块整合到其基因组中以检测患者的肿瘤,报告肿瘤的分子“标记”以及其早期对不同治疗的反应。为了实现这一目的,申请人开发了变形的新技术平台,所述技术平台是申请人近期开发的用来构建新一代肿瘤选择性复制腺病毒(0'Shea CC,Oncogene,2005;24(52):7636-9.16299525;0'Shea CC.,Oncogene,2005;24(52):7640-55.16299526)。腺病毒是天然多基因表达载体,其能够在转染一小时内到达细胞核(0'Shea CC,Oncogene,2005;24(52):7636-9.16299525;0'Shea CC.,Oncogene,2005;24(52):7640-55.16299526;Leopold PL,Crystal RG,Adv Drug Deliv Rev.,2007;59(8):810-21.17707546)。申请人的'Adsembly'使得从来自于基因组构建部件(构建于具有与Ad2/5不同趋向性和特性或者已经被遗传修饰以赋予改变的功能的60个以上的人和动物腺病毒)和外源元件的文库在体外快速从头装

配自定义的腺病毒基因组(图2)(O'Shea CC, Oncogene, 2005; 24 (52): 7636-9. 16299525)。申请人已经使用该技术构建了60个以上具有多种突变和转基因表达盒的新病毒, 并且已经表明使用该方法构建的病毒能够进行高效价生长。

[0087] E1、E2和E3区域不是培养中复制所必需的或者其可由可获得的细胞系补充(Goncalves MA, de Vries AA, Rev Med Virol., 2006; 16 (3): 167-86. 16710837)。这些区域中的每一个都具有独立的启动子元件, 所述启动子元件通过选择性剪接来驱动多种基因产物(16种基因)的表达。申请人将这开发为一个系统, 用来改造(engineer)单个的有效诊断剂, 所述诊断剂包括对不同癌症样品中的失调的途径活性进行多路定量测量(表1)。将所述天然病毒启动子用在含有关键突变/表型的癌症中激活的启动子替换。这些启动子驱动4种不同的荧光报告基因融合蛋白的表达, 所述荧光报告基因融合蛋白提供关于患者肿瘤中失调的关键途径的额外的信息, 例如, 细胞核和细胞质的NF- κ B(发炎)、TORC2(LKB1突变和代谢)、FOXO(PI3-K/AK突变)或者SMAD 4(TGF β 途径突变)(Shi Y, Massague J., Cell, 2003; 113 (6): 685-700. 12809600; Oeckinghaus A, Ghosh S., Cold Spring Harb Perspect Biol., 2009; 1 (4): a000034. 20066092; Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN, Cell, 2006; 124 (3): 471-84. 16469695; Weidinger C et al., Endocr Relat Cancer, 2008; 15 (4): 917-29. 18775975)。使用这些试剂, 任何给定肿瘤的分子损伤和恶性特征可被快速识别(24小时以内)并可通过NanoSortlab-on-a-chip μ FACS来评分。另外, 这些试剂也能作为报告分子被用于快速且直接地检测患者的肿瘤是否可能对具体治疗产生反应。申请人的技术在几个重要方面对之前记载的基于病毒的CTC检测方法(Fong SM等人, Surgery, 2009; 146 (3): 498-505. 19715807; Kojima T等人, J Clin Invest., 2009; 119 (10): 3172-81. 19729837)进行了改进。通过使用“Adsembly”, 可构建肿瘤应答荧光元件的文库。Adsembly可实现多种特制的用于特定类型肿瘤和途径突变检测的腺病毒的快速构建。Adsembly还使得能够简化腺病毒的重定向, 因此使CTC转导的机会最大。最后, Adsembly使得容易从不同基因组模块进行多基因表达, 所述多基因表达增加了在CTC检测过程中可获得的信息量。

[0088] Lab-On-A-Chip技术

[0089] 已经提出了改善CTC计数和捕获的方法, 并且已经证明流式细胞术是成功的(Allan AL, Keeney M., J Oncol., 2010; 2010: 426218. 20049168)。流式细胞术可在多种参数下进行快速却高度特异的定量的逐个细胞分析, 以及能够对CTC进行分选用于进一步的分子表征。另外, 流式细胞术是成熟的、公认的、具有商业可行性的技术。然而, 多种障碍使得目前的流式细胞术在CTC的床旁检测(point-of-care)分析中不实用。首先, 必须通过人工将各个抗体移液到细胞样品中来对细胞进行标记。由于抗体处理、移液不准确、储存的不一致、抗体批次的差异, 该过程可能会导致数据方面产生较大差异。第二, 目前的流式细胞仪很昂贵而且具有较大的占地面积(即, 不可移动)。最后, 目前的流式细胞仪在进行操作时在技术上和分析上都具有挑战性。

[0090] 为了解决这些技术问题, 申请人已经开发了将微流体(microfluidics)、光子学(photonics)、微声学(microacoustics)与创新性的分析技术结合在一起的lab-on-a-chip技术。这些由NanoSort, Inc授予独占许可的专利技术能通过坚固、便携的、便宜的装置使得流式细胞术能进行床旁检测(point-of-care), 所述技术仅以当前工业翘楚的几分之一成本和空间满足或超出当前工业翘楚的性能(Cho SH, Chen CH, Tsai FS, Godin JM, Lo YH,

Lab Chip.,2010;10(12):1567-73.20379604;Cho SH et al.,Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.,2009;2009:1075-8.19965141;Chen CH等人,Biomed Microdevices,2009;11(6):1223-31.19649710;Chen CH,等人,In:Hawkins AR,editor.Handbook of Optofluidics:CDC Press;2010.p.664;Godin J,Lo YH,Biomed Opt Express,2010;1(5):1472-9.21258563)。

[0091] 基于病毒的检测器和诊断介导的CTC的荧光显示

[0092] 申请人构建了一系列替换病毒E1、E3和E4转录单元的肿瘤途径活性模块,已将使用另外的修饰将所述模块重新组装到病毒骨架中,以赋予新的组织嗜性和其他活性。已经在人肿瘤细胞系(其具有已知的表型/突变)以及原代细胞中验证了这些病毒诊断试剂,并且已经在培养物和人血液样品中都得到了证实。

[0093] 第一组诊断性腺病毒已经被改造以表达四种不同的荧光生物标记物,所述荧光生物标记物被用来诊断具有在RB/p16、TGFβ、生长因子/PI-3K/Ras/MAPK、LKB1/AMPK途径中的突变的肿瘤细胞,不仅对所述肿瘤细胞进行标记为了检测和收集,还确定所述肿瘤细胞的恶化潜能和其对治疗的反应。来自Sanger中心和Cosmic数据库的最新数据显示EGFR在28%的肿瘤中增加/突变,RB(12%)、p16(13%)、Ras(17%)、LKB1(9%)、SMAD4(2%)。该方法的可行性已经通过以下证明:使用这类肿瘤特异性启动子用于开发溶瘤病毒,以选择性地诱导病毒基因在癌症中的表达,从而确保肿瘤进行选择性地病毒复制(O'Shea CC,Oncogene,2005;24(52):7636-9.16299525;O'Shea CC,Oncogene,2005;24(52):7640-55.16299526;Huang TG et al.,Gene Ther.,2003;10(15):1241-7.12858189;McCormick F.,Cancer Biol Ther.,2003;2(4Suppl 1):S157-60.14508094;Ries SJ,Brandts CH,Drug Discov Today,2004;9(17):759-68.15450242;Chiocca EA,Nat Rev Cancer,2002;2(12):938-50.12459732)。

[0094] 例如,来自健康女性的乳腺组织含有不同的人乳腺上皮细胞(vHMEC)的亚群,在所述人乳腺上皮细胞亚群中p16^{INK4a}是表观遗传沉默的(Holst CR,Cancer Res.,2003;63(7):1596-601.12670910)并且所述人乳腺上皮细胞亚群被认为代表了乳腺癌恶变前的前体(Tlsty TD,J Mammary Gland Biol Neoplasia,2004;9(3):263-74.15557799;Crawford YG等人,Cancer Cell,2004;5(3):263-73.15050918;Romanov SR等人,Nature,2001;409(6820):633-7.11214324)。在图3中,申请人表明,其中天然E1启动子被细胞E2F启动子(Johnson L等人,Cancer Cell,2002;1(4):325-37.12086848)替换的病毒特异性地驱动vHMEC和HMEC中下游病毒蛋白的表达。申请人使用类似的策略检测和分离CTC,但是使用了不能复制的病毒,其中病毒基因现在被荧光标记物替换,这使得能够使用整合的lab-on-a-chipμFACS对CTC进行检测、定量和分选。

[0095] 为了达到此目的,将病毒“E1”模块启动子和开放阅读框用E2F启动子替换,所述E2F启动子能够驱动TORC2-eYFP融合蛋白。这样能够鉴定在pRb/p16途径和LKB1中有突变的细胞。用两种盒子替换病毒“E3”模块启动子和开放阅读框。由血清应答元件(SRE)调控的CMV启动子能够驱动mCherry,从而鉴定EGFR/RAS/RAF/MAPK途径的高度激活,TGFβ调控的启动子能够驱动mOrange,从而鉴定具有转移潜能的细胞。病毒“E4”模块启动子和开放阅读框被驱动eGFP-FOXO的CMV主要IE启动子替换,所述eGFP-FOXO在几乎所有的细胞中表达并且既可以作为标准化荧光的方法也可以作为鉴定在PTEN/PI-3K/AKT途径中有突变的细胞的

方法。

[0096] 为了确保CTC感染,申请人还引入了新创新。第一个被发现的Ad5是用于基础和临床研究中的最主要的腺病毒。Ad5的细胞受体是和E-钙黏蛋白一起标记上皮细胞的CAR。然而,CAR的表达经常在正在进行上皮向间质转化(EMT)的细胞中下调,例如这种现象可能发生在转移过程中。为了感染和检测这些细胞,申请人已经构建和验证了几种结合到不同细胞受体(例如CD46)的尾丝假型病毒,从而使CTC转导的可能性最大(表2)。

[0097] 已经在原代肺和乳腺上皮细胞以及一组含有已知分子损伤的肺和乳腺癌细胞系中对该最初的一系列五种病毒(每种都靶向一种可选的受体但是都含有相同的表达盒)进行了检验(Neve RM等,Cancer Cell,2006;10(6):515-27.17157791)。在MOI=30下用所述五种病毒的每一种转导细胞24小时,接着用FACS和显微镜进行荧光检测。证实了在培养物中肿瘤的选择性基因表达之后,申请人优化了人血液样品情况中的病毒转导。之前已经证明能复制的腺病毒载体(Kojima T et al.,J Clin Invest.,2009;119(10):3172-81.19729837)和复制缺陷型腺病毒载体(Lyons M et al.,Mol Ther.,2006;14(1):118-28.16580883)都能转导全血样品中的细胞(包括掺有肿瘤细胞的样品)。将7.5 ml从血库中获得的失效的全血(expired whole blood)用含有氯化铵的红细胞裂解缓冲液处理。接着以1、10、100或1000个细胞/ml血液的浓度向所述样品中掺入肺癌细胞或乳腺癌细胞(Punnoose EA等,PLoS ONE.2010;5(9):e12517)。掺入原代肺或乳腺上皮细胞作为副对照。对两种转导方案进行检测。在一种情形中,将细胞沉淀并以每种病毒 10^4 、 10^5 和 10^6 PFU的浓度将五种病毒的混合物加入到样品中。在第二种情形下,不沉淀细胞而将病毒加入到全血中。加入病毒以后,将细胞在37℃下振荡孵育16或24小时,离心收集,用PBS洗涤2次,并通过 μ FACS分选。

[0098] 用于CTC分离的NanoSort-UCSD台式 μ FACS

[0099] NanoSort使用由一些NIH NCRR资助部分支持的来自Yuhwa Lo'sUCSD实验室的技术开发了唯一的全功能lab-on-a-chip微型荧光激活细胞分选器(μ FACS)原型(Cho SH,Chen CH,Tsai FS,Godin JM,Lo YH,Lab Chip.,2010;10(12):1567-73.20379604;Cho SH等人,Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.,2009;2009:1075-8.19965141;Chen CH等人,Biomed Microdevices,2009;11(6):1223-31.19649710;Chen CH等人,In:Hawkins AR,editor.Handbook of Optofluidics:CDC Press;2010.p.664)。所述lab-on-a-chip μ FACS使用了用于荧光和散射检测的芯片光学波导和独特设计的时空编码的结构。光学询问后,所述装置使用整合的压电磁盘驱动器通过转移有限体积(100pL到1nL)的流体来分选单个细胞。图4示出了在检测点处的来自光倍增管(PMT)的典型的时空编码的荧光信号(1110),短时间后接着进行另一个时空编码的荧光信号(1011),由此来确认成功的分选(Cho SH等人,Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.,2009;2009:1075-8.19965141;Godin J,J Biophotonics.,2008;1(5):355-76.19343660)。该装置具有以下独特特征:确认单独分选事件的成功以及确保滞留每个CTC。所述检测信号(编码为1110)应该记录而随后的(1011)信号没有记录,该系统立刻检测到CTC已经离开了分选器。在这种情况下,用户可以选择第二次处理样品以捕获CTC。

[0100] 图5示意性地示出了所述压电分选器的原理和该芯片分选器如何有效地转换(switch)液流。本文所示的液流转换速度受限于申请人的CCD摄像机的速度,因此实际的液

流转换速度从而分选速度在实际中要快几倍。图6显示了细胞分选的结果同时表1总结了NanoSort-UCSD的 μ FACS和BD的Mo-Flow系统之间的比较。使用 μ FACS系统,申请人完成了CTC的计数和分离。

[0101] FACS (荧光激活的细胞分选) 被用作用于CTC计数和分离的基本模型,所述模型具有修饰和优化的lab-on-chip设计。这些修饰包括所述压电分选器和微流体流动限制的设计。和目前的优化速度而非特异性的设计不同,优化的分选使用了使收集效率最大化以确保能够分选每个单个CTC的设计。关于流动限制,目前的设计使用了鞘流 (sheath flow) 以产生侧流限制,还使用了由Naval研究实验室发明的“人字形式样”以实现在横向方向上的流动限制 (Howell PB, Jr., Lab Chip, 2008; 8 (7) : 1097-103. 18584084)。然而,由于大的悬浮细胞 (例如, CTCs) 具有较强升力,因此“人字形”设计对其不太有效 (Godin J. 整合微流体的光学系统. La Jolla: University of California, San Diego; 2010)。申请人会研究并优化可选的流动限制设计 (例如, 利用弯曲通道中的惯性力和偏心力 (Bhagat A等人, 微流体和纳米流体, 2009; 7 (2) : 217-26; Bhagat AAS等人, 流体物理, 2008; 20 (10) : 101702-4; Di Carlo D等人, Anal Chem, 2008; 80 (6) : 2204-11. 18275222; Di Carlo D等人, Proc Natl Acad Sci U S A, 2007; 104 (48) : 18892-7. 18025477)) 来改善CTC限制并聚焦在流动流中。流动流中改善的CTC限制降低了荧光和散射信号的变异系数 (CV), 这能够降低计数误差。

[0102] 使用NanoSort装置测试样品。申请人接着使用商品流式细胞仪 (例如, FACSria, BD) 来测量“收集的样品”和“废液”中的细胞浓度。收集的样品和废液间的细胞比率显示了计数准确性和分选效率

[0103] 结合使用肿瘤选择性荧光病毒载体和 μ FACS以检测和分离来自临床血液样品的CTC

[0104] 为了验证肿瘤特异性荧光病毒载体和 μ FACS技术在临床样品中的应用, 申请人从来自于UCSD Moore癌症中心的来自IV期非小细胞肺癌患者中获取外周血样品。该特定的肿瘤对申请人的病毒很合适, 因为该肿瘤是上皮来源的 (CD45-、EpCAM+ 和细胞角蛋白8和18+、和/或细胞角蛋白19+) 并且可以使用CellSearch CTC平台 (Veridex) 对其进行检验。另外, 该肿瘤尤其适用于申请人的病毒, 因为该肿瘤是几种不同的人腺病毒的天然和主要靶标。将7.5 ml全血收集在肝素化试管中, 并用含有氯化铵的红细胞裂解缓冲液处理。接着将五种病毒的混合物加入到样品中并在37°C下振荡孵育24小时。转导后, 将细胞以1000xg进行沉淀、用PBS洗涤两次并通过 μ FACS进行分选。收集在背景上发荧光的细胞用于进一步的显微镜处理。申请人会确定用来诊断癌症标志的细胞质或细胞核染色 (图7和8)。

[0105] 将所述NanoSort实验方案和最好的用于检验的可商购的系统CellSearch (Veridex) 进行比较。两种方法都分析7.5mL血液。将由临床实验室 (ApoCell, Houston, TX) 进行CellSearch。对结果进行分析、由小组进行讨论并准备公布在同行评议的出版物中。

[0106] VI. 实验步骤

[0107] 所有的载体都是在Ad5 Adsembly载体的基础上操作而来。

[0108] Δ E1 {SREp-YFP} - {CMVp- [Foxo3-GFP]} 质粒的构建

[0109] 通过PCR得到质粒pENTR Ad5 Δ E1 CMV-GFP的骨架。该片段含有具有驱动eGFP的CMV启动子的插入片段的Ad5基因组 (GenBank登录号AC_000008/GI:56160529F) 的376-3514位的删除。通过PCR从质粒pSRE-luc上得到SRE启动子, 并通过PCR从质粒pCDNA3上得到BGH

多腺苷酸化信号。使用序列和连接非依赖性克隆 (SLIC) 将SRE启动子和BGH多聚A结合到pENTR Ad5 Δ E1 CMV-GFP骨架中以构建质粒pENTR Ad5 Δ E1 SREp-CMV-GFP。这也在SRE启动子和BGH多聚A信号之间产生了PacI限制性酶切位点。通过PCR从Ultimate ORF Collection (Invitrogen) 中的含有Foxo3的cDNA的质粒上得到Foxo3 cDNA。通过SLIC将其直接融合到通过PCR获得的质粒pENTR Ad5 Δ E1 SREp-CMV-GFP的骨架中GFP的N-末端。这产生质粒pENTR Ad5 Δ E1 SREp-CMV-[Foxo3-GFP]。最后,通过PCR从质粒pLanYFP-NT上得到lan-YFP的cDNA,并通过SLIC将其克隆到PacI-酶切的质粒pENTR Ad5 Δ E1 SREp-CMV-[Foxo3-GFP]上。这产生质粒pENTR Δ E1 {SREp-YFP} - {CMVp-[Foxo3-GFP]}。

[0110] Δ E3 {SMADrp-tdTomato} 质粒系列的构建

[0111] 将该五种质粒 (pENTR Ad5 E3、pENTR Ad5 E3 Ad5/3尾丝、pENTR Ad5 E3 Ad5/11尾丝、pENTR Ad5 E3 Ad5/34尾丝、以及pENTR Ad5 E3 Ad5-RGD尾丝) 的每个都做下面一系列的改变。首先,通过定点诱变将E3启动子中的27539-27542位的TATA盒子序列 (GenBank Accession AC_000008) 突变为CATC。并且,将27509-27514位的ATF结合位点从TCGTCA突变为TAGGCA。这两种改变降低了E3启动子的基本活性以减少假阳性读出。接着通过PCR得到这些载体的骨架以删除E3A和E3B区域 (28130-30807位),使用SLIC将PacI限制性酶切位点前的SMAD-应答启动子 (SMADrp) 插入到该骨架中。最后,通过PCR得到tdTomato并使用SLIC将其插入到PacI-消化的载体中。

[0112] Δ E4 {E2F1p-[mCherry-CRTC2]} 质粒的构建

[0113] 通过PCR得到pENTR Ad5 E4的骨架以删除Ad5基因组的32927-35815位,并使用SLIC将其与PacI限制性酶切位点前的E2F1启动子结合。通过PCR从病毒ONYX-411的DNA上得到E2F1启动子。这产生质粒pENTR Ad5 Δ E4 E2F1p。通过PCR从Ultimate ORF Collection中的含有CRTC2 cDNA的质粒上得到CRTC2 cDNA,并且从质粒pmcherry-C1上得到mCherry cDNA。用SGLRS氨基酸接头将CRTC2融合到mCherry的C-末端,使用SLIC将其克隆到PacI消化的载体pENTR Ad5 Δ E4 E2F1p上。这构建了质粒pENTR Ad5 Δ E4 {E2F1p-[mCherry-CRTC2]}。

[0114] 关于PCR,使用Phusion酶 (NEB) 进行所有的PCR。所有的PCR都使用1x HF缓冲液、200μM每种dNTP、0.5μM每种引物和10ng模板进行。PCR条件如下:98℃30秒——10个循环的98℃10秒、65℃30秒 (每2个循环温度降低1℃)、对于每1kb的PCR产物长度72℃30秒——72℃5分钟,4℃保持。

[0115] 关于SLIC,将线性片段用外切核酸酶在室温下在以下20μl反应体系中处理12分钟,所述反应体系为:50mM Tris pH8、10mM MgCl₂、50μg/mL BSA、200mM尿素、5mM DTT和0.5μl T4 DNA聚合酶。通过加入1μl 0.5M EDTA将反应终止,接着在75℃下孵育20分钟。然后在新试管中将等量的T4处理的DNA混合至约20μl体积。对于结合两个片段的SLIC,使用10μl的各反应液。对于结合三个片段的SLIC,使用7μl的各反应液。通过以下方式将片段退火:加热到65℃10分钟,接着缓慢冷却以每5秒降低温度0.5℃直至25℃。退火后,转化5μl反应液并筛选克隆。

[0116] 关于从改造的入门载体质粒构建病毒,使用Adsembly基因组装配方法构建这些病毒。将20 fmol的双向DEST载体与50 fmol的Ad5 E1入门载体以及各10 fmol的Ad5 E3和E4入门载体结合。将这些载体在10μl的终体积中与2μl LR Clonase II (Invitrogen) 结合。将该反应在25℃下过夜孵育 (12-16小时)。通过加入1μl蛋白酶K (Invitrogen) 并在37℃下孵

育10分钟终止反应。然后将5 μ l反应液转化到对ccdB基因产物敏感的高效感受态细菌中(>1e9 cfu/ μ g)。随后分离菌落并筛选完整的基因组。根据生产商的说明书使用FuGENE6 (Roche) 将阳性克隆转染到293-E4细胞中,五天后回收病毒。

[0117] 转导原代细胞和肿瘤细胞以测定来自病毒的荧光读出。将正常非肿瘤细胞和各种肿瘤细胞放置在显微镜室载玻片上。第二天,去除培养基并加入病毒接种物。病毒接种物的总感染复数等于30。2小时以后,移除所述接种物并加入新鲜培养基。24小时以后,将细胞用PBS洗涤一次,并用4%多聚甲醛固定30分钟。固定以后,将细胞用PBS洗涤一次并进行荧光成像。

[0118] VII. 表格

[0119] 表1. CTC的定量和定性测定

癌症表型/ 标志	肿瘤途径和突变	肿瘤诊断 靶标元件
生长因子 非依赖性	RTK&TK, RAS, RAF, PI-3K, PTEN, TSC1/2, LKB1 激素信号	FOXO核输出 mTOP依赖的UTR TORC2核转运 细胞核p42/p44 MAPK ER/AR启动子 (例如PSA) SRE启动子
对抗生长信号 的不灵敏性	Rb, p16, TGF β , CyclinD/CDK, MYC	E2F启动子 细胞核/磷酸化 SMAD
抗凋亡特性	P53, ARF, FAS/TNFR, BCL2	p53 激活的启动子
持续的血管 生成	VEGF, FGF, VHL	VEGF启动子 HIF启动子和 降解
组织浸润 和转移	E-钙黏蛋白 APC/ β -连环素突变 Wnt TGF β	细胞核/磷酸化 SMAD 病毒摄取 TCF/LEF启动子 细胞核 β -连环素
发炎	NF- κ B 干扰素	细胞核NF- κ B/Jun IRE启动子

[0121] 表2用于癌症诊断的构建的病毒

[0122] 一组最初的用于癌症诊断而构建的腺病毒。缩写的病毒名称在第一列中列出。后面的四列列出了由病毒编码的癌症诊断表达盒的各个部分。其包括使用的启动子、用于该启动子的荧光蛋白读出、与荧光蛋白融合的蛋白(荧光融合蛋白)(如果适用的话)、以及使用的多腺苷酸化信号(多聚A信号)。第6列显示了血清型,从血清型中得到该病毒的尾丝结(fiber knob)蛋白。Ad-RGD指的是含有插入到尾丝蛋白H1-环中的RGD多肽基序的Ad5尾丝。最后一列描述了哪种表型能激活启动子以及融合蛋白在细胞中的定位的位置(如果适用的话)。然而,这一列仅包括含有一个或两个表达盒的病毒,所述来自任何给定病毒的表达盒

可以和其他的盒结合,允许四个或更多个表达盒都来自单一病毒。

[0123]

病毒	表达盒 (s)					启动子活性和 反应
	启动子	荧光蛋白	转录融合蛋白	多聚A 信号	尾丝结	
$\Delta E1$ {SREp-YFP}{CMVp- {Foxo3-GFP}}	血清应答元件	Isn-YFP	无	8GH	Ad5	响应于生长因子信号传 导和有丝分裂原时
	即刻早期响应CMV	eGFP	FOXO3	SV40	Ad5	组成型。当Akt无活性时, GFP在细胞核中;当Akt 有活性时,GFP在细胞质中。
$\Delta E3$ {SMADp-tdTomato}	SMAD-应答	tdTomato	无	Ad5 E3	Ad5	响应于 TGF- β 信号传导时
$\Delta E3$ {SMADp- tdTomato}; Ad5/3 fiber	SMAD-应答	tdTomato	无	Ad5 E3	Ad3	响应于 TGF- β 信号传导时
$\Delta E3$ {SMADp- tdTomato}; Ad5/11 fiber	SMAD-应答	tdTomato	无	Ad5 E3	Ad11	响应于 TGF- β 信号传导时
$\Delta E3$ {SMADp- tdTomato}; Ad5/34 fiber	SMAD-应答	tdTomato	无	Ad5 E3	Ad34	响应于 TGF- β 信号传导时
$\Delta E3$ {SMADp- tdTomato}; Ad5-RGD fiber	SMAD-应答	tdTomato	无	Ad5 E3	Ad5-RGD	响应于 TGF- β 信号传导时
$\Delta E3$ {E2F1p-{mCherry- CRIC2}}	人E2F1	mCherry	CRIC2	Ad5 E3	Ad5	当pRB无活性时。 当EKB1无活性时,mCherry 在细胞核中;当EKB1有活 性时,mCherry在细胞质中

[0124] VIII. 实施方案

[0125] 实施方案1.检测受试者中癌症的方法,所述方法包括(i)给予受试者重组报告性腺病毒;(ii)使所述重组报告性腺病毒能够感染所述受试者中的癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞;(iii)从所述受试者中获得含有所述报告病毒感染的癌细胞的样品;以及(iv)检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。

[0126] 实施方案2.检测受试者中癌症的方法,所述方法包括(i)从受试者中获得含有癌细胞的样品;(ii)将重组报告性腺病毒与所述癌细胞接触;(iii)使所述重组报告性腺病毒能够感染癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞;以及(iv)检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。

[0127] 实施方案3.测定测试化合物是否抑制来自癌症患者的癌细胞的生长的方法,所述方法包括(i)从受试者中获得含有癌细胞的样品;(ii)将重组报告性腺病毒与所述癌细胞接触;(iii)使所述重组报告性腺病毒能够感染癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞;(iv)使所述报告病毒感染的癌细胞能够有足够的时间去生长;(v)测定所述报告病毒感染的癌细胞的生长水平;以及(vi)将所述水平与对照水平相比,其中与所述对照水平相比的低水平表明所述测试化合物抑制了来自所述患者的癌细胞的生长。

[0128] 实施方案4.实施方案1、2或3中任一个的方法,其中所述癌症为肺癌、皮肤癌或乳腺癌。

[0129] 实施方案5.实施方案1、2或3中任一个的方法,其中所述癌细胞为循环癌细胞。

[0130] 实施方案6.实施方案1、2或3中任一个的方法,其中所述癌细胞为恶变前细胞。

[0131] 实施方案7.实施方案1、2或3中任一个的方法,其中所述样品为体液或组织样品。

[0132] 实施方案8.实施方案7的方法,其中所述体液为血液。

[0133] 实施方案9.实施方案1或2中任一个的方法,其中所述检测包括检测报告基因表型。

[0134] 实施方案10.实施方案9的方法,其中所述报告基因表型为荧光报告基因表型。

[0135] 实施方案11.分离来自受试者的样品中的报告病毒感染的癌细胞的方法,所述方法包括将所述报告病毒感染的癌细胞与未感染的细胞分离,其中所述分离至少部分地基于所述报告病毒感染的癌细胞的表达的报告基因表型。

[0136] 实施方案12.实施方案11的方法,还包括使所述报告病毒感染的癌细胞有足够的时间去生长,从而表达所述表达的报告基因表型。

[0137] 实施方案13.实施方案11的方法,其中所述未感染的细胞为非癌细胞。

[0138] 实施方案14.实施方案11的方法,其中所述样品为血液样品。

[0139] 实施方案15.含有癌细胞报告模块和癌细胞结合模块的重组报告性腺病毒。

[0140] 实施方案16.实施方案15的重组报告性腺病毒,还包括免疫逃避模块。

[0141] 实施方案17.实施方案15的重组报告性腺病毒,其中所述癌细胞报告模块包括与报告基因可操作地连接的癌症应答启动子。

[0142] 实施方案18.实施方案17的重组报告性腺病毒,其中所述报告基因为荧光报告基因。

[0143] 实施方案19.实施方案15的重组报告性腺病毒,其中所述癌细胞报告模块是第一癌细胞报告模块,所述重组报告性腺病毒还包含第二癌细胞报告模块和第三癌细胞报告模块。

[0144] 实施方案20.实施方案19的重组报告性腺病毒,其中所述第一癌细胞报告模块能表达第一报告基因表型,所述第二癌细胞报告模块能表达第二报告基因表型,所述第三癌细胞报告模块能表达第三报告基因表型。

[0145] 实施方案21.实施方案20的重组报告性腺病毒,其中所述第一报告基因表型、所述第二报告基因表型和所述第三报告基因表型均为可检测地不同的。

[0146] 实施方案22.实施方案20的重组报告性腺病毒,其中所述第一报告基因表型指示第一癌症,所述第二报告基因表型指示第二癌症,并且所述第三报告基因表型指示第三癌症。

[0147] 实施方案23.实施方案22的重组报告性腺病毒,其中所述第一癌症、所述第二癌症和所述第三癌症均独立地是不同的。

[0148] 实施方案24.实施方案20的重组报告性腺病毒,其中所述第一报告基因表型、所述第二报告基因表型和所述第三报告基因表型指示单一癌症。

[0149] 实施方案25.检测受试者中癌症的方法,所述方法包括(i)给予受试者实施方案15-24中任一个的重组报告性腺病毒;(ii)将所述重组报告性腺病毒能够感染所述受试者中的癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞;(iii)从所述受试者中获得含有所述报告病毒感染的癌细胞的样品;以及(iv)检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。

[0150] 实施方案26.检测受试者中癌症的方法,所述方法包括(i)从受试者中获得含有癌细胞的样品;(ii)将实施方案15-24中任一个的重组报告性腺病毒与癌细胞接触;(iii)使所述重组报告性腺病毒感染所述癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞;以及(iv)检测所述报告病毒感染的癌细胞从而检测了所述受试者中的癌症。

[0151] 实施方案27.实施方案25或26中任一个的方法,还包括给予所述受试者癌症治疗。

[0152] 实施方案28.测定测试化合物是否抑制来自癌症患者的癌细胞的生长的方法,所

述方法包括(i)从受试者中获得含有癌细胞的样品;(ii)将实施方案15-24中任一个的重组报告性腺病毒与所述癌细胞接触;(iii)使所述重组报告性腺病毒感染所述癌细胞从而形成报告病毒感染的癌细胞;(iv)使所述报告病毒感染的癌细胞有足够的时间去生长;(v)测定所述报告病毒感染的癌细胞的生长水平;以及(vi)将所述水平与对照水平相比,其中和对照水平相比的低水平表明所述测试化合物抑制来自所述患者的癌细胞的生长。

[0153] 实施方案29.检测癌症的试剂盒,所述试剂盒包括实施方案15-24中任一个的重组报告性腺病毒。

[0154] 实施方案30.筛选癌症药物的试剂盒,所述试剂盒包括抑制癌症的化合物和实施方案15-24中任一个的重组报告性腺病毒。

[0155] 实施方案31.分离癌细胞的试剂盒,所述试剂盒包括用于检测表达的报告基因表型的装置和实施方案15-24中任一个的重组报告性腺病毒。

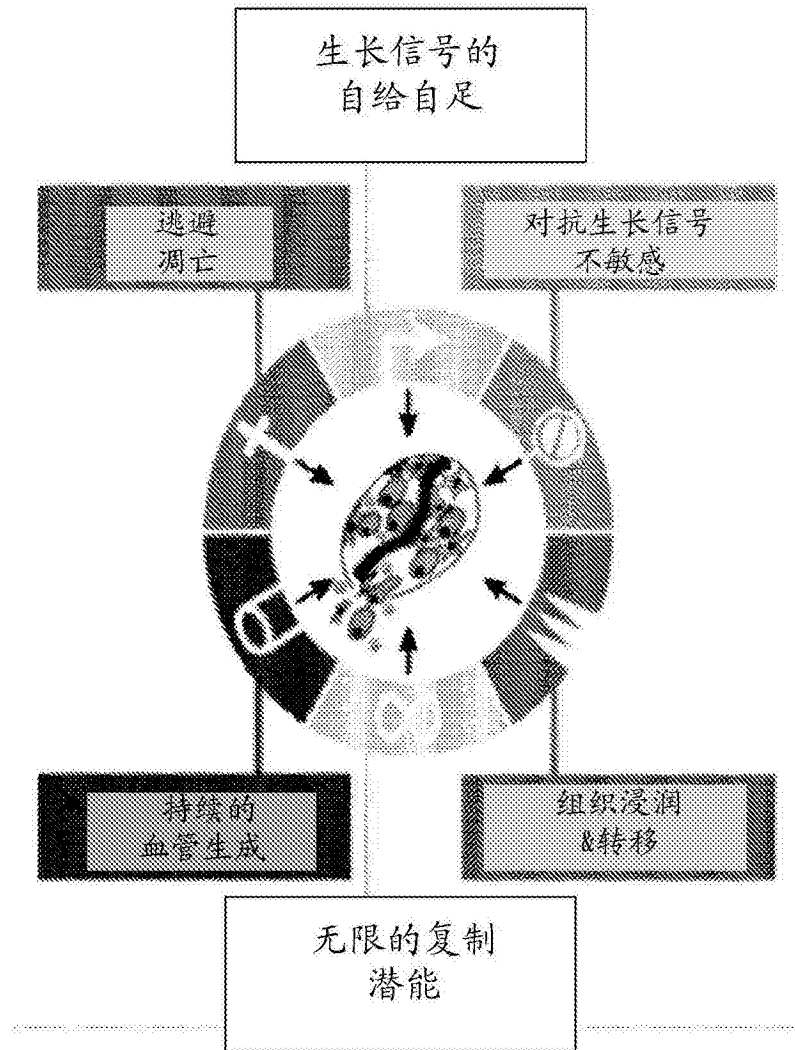


图1

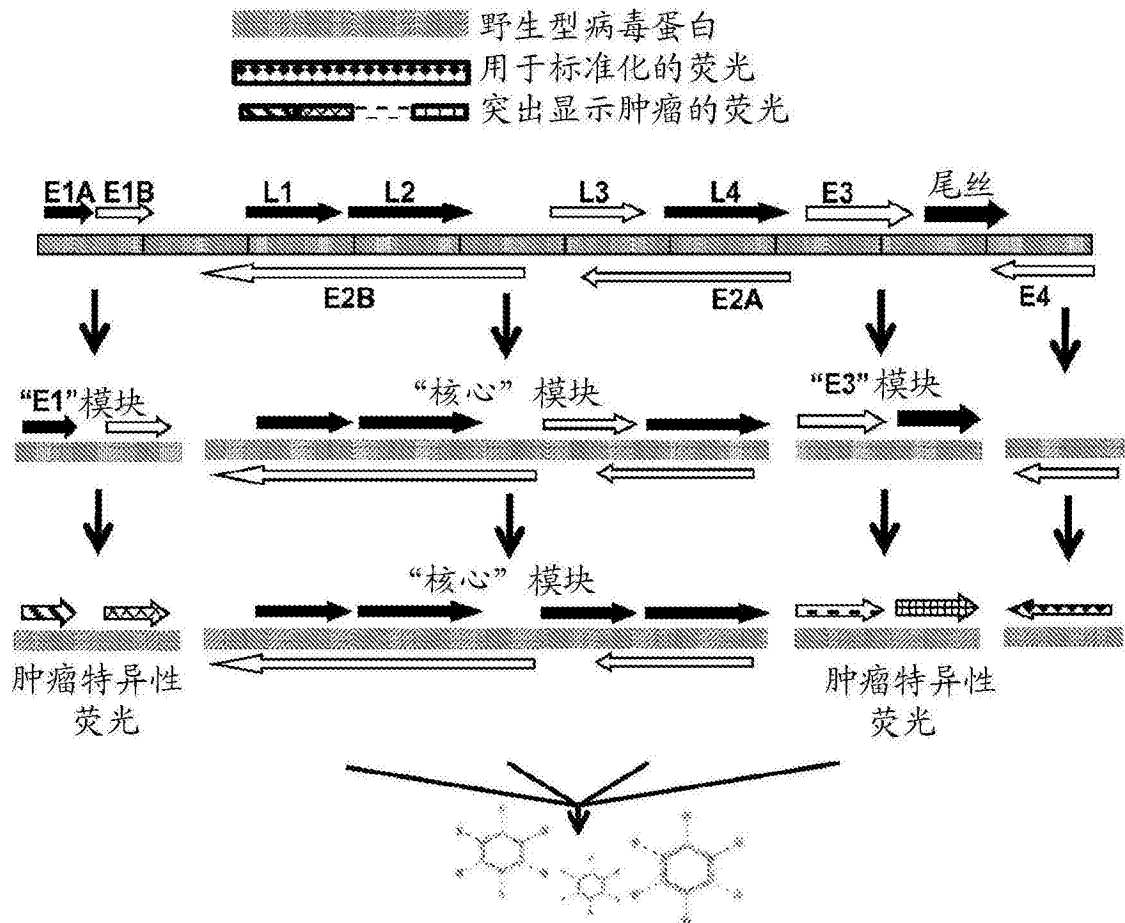


图2

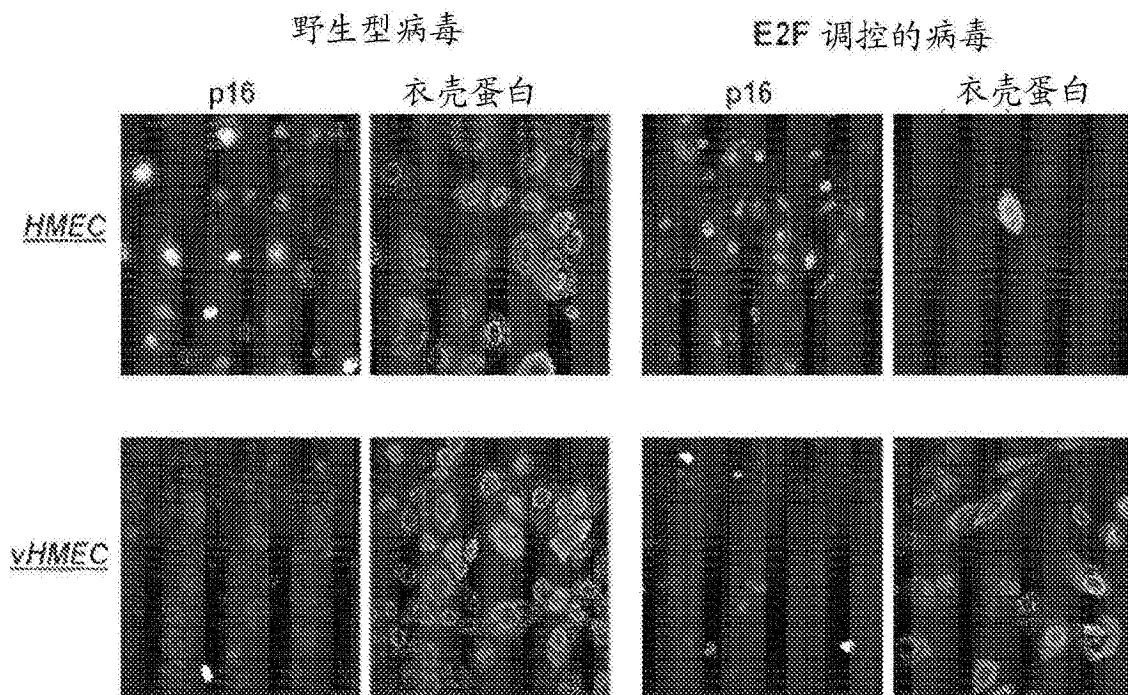


图3

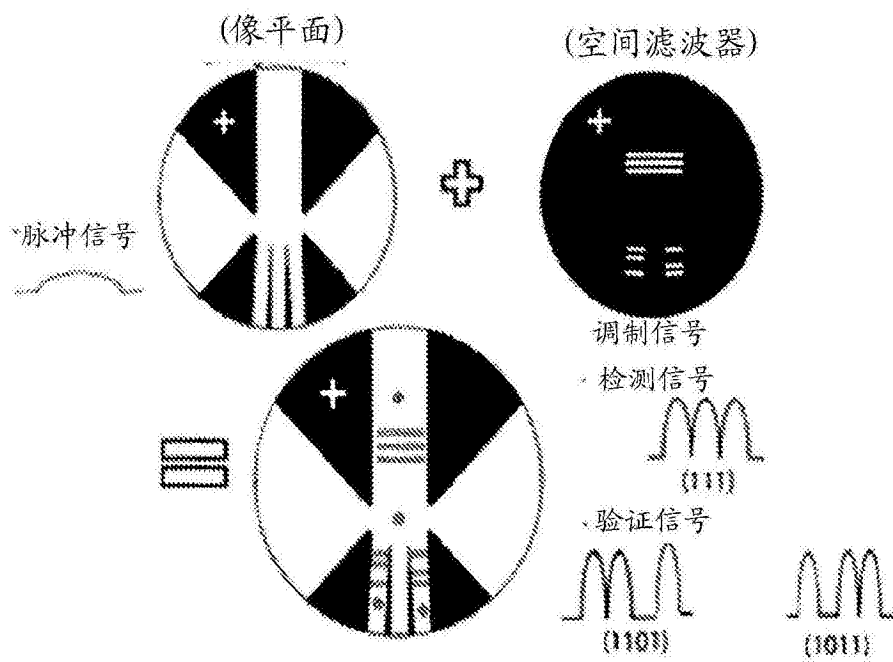


图4

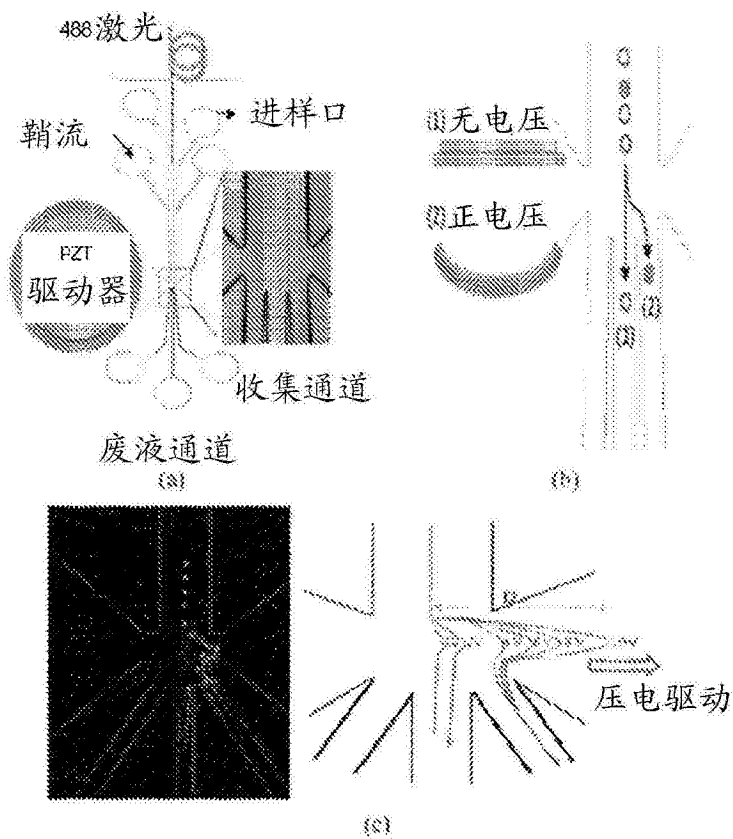


图5

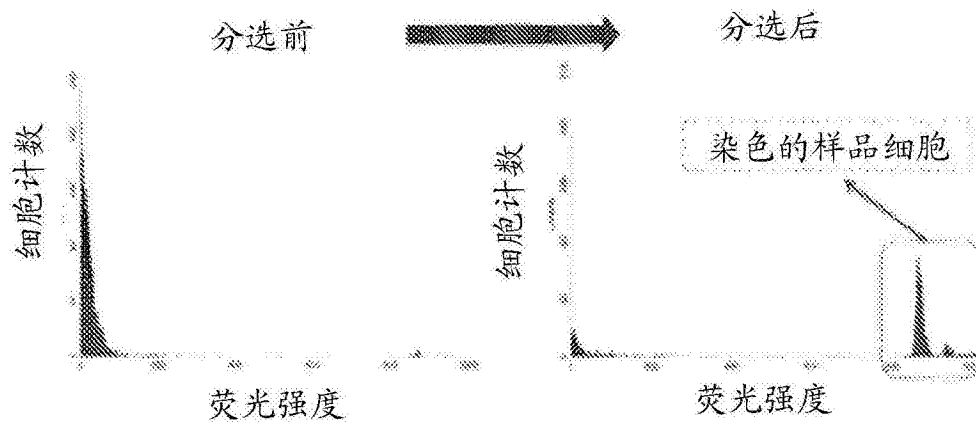


图6

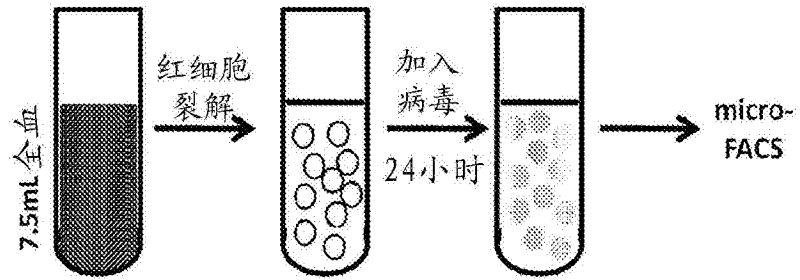


图7

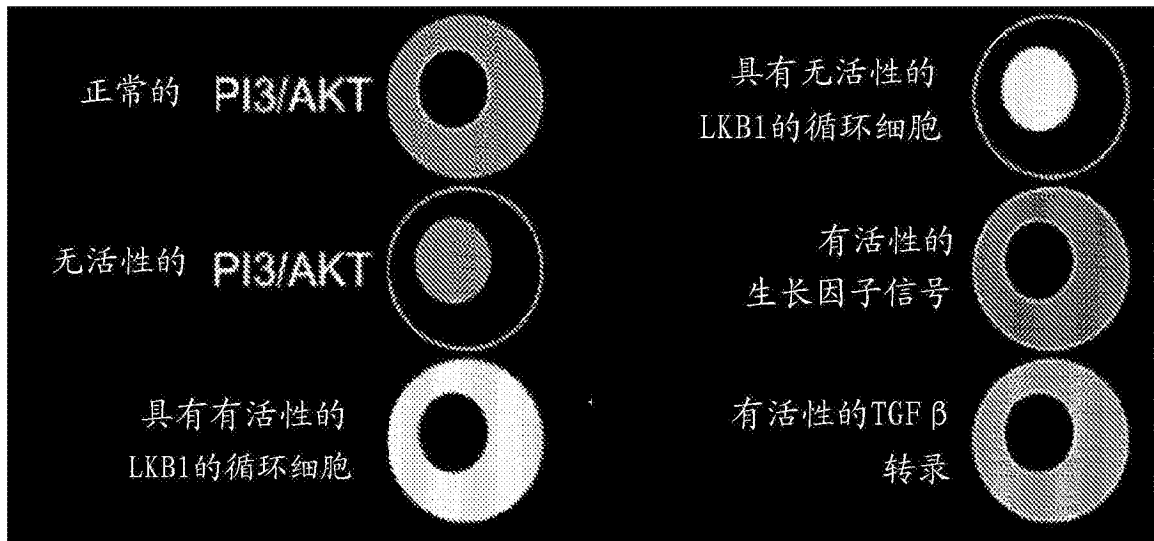


图8

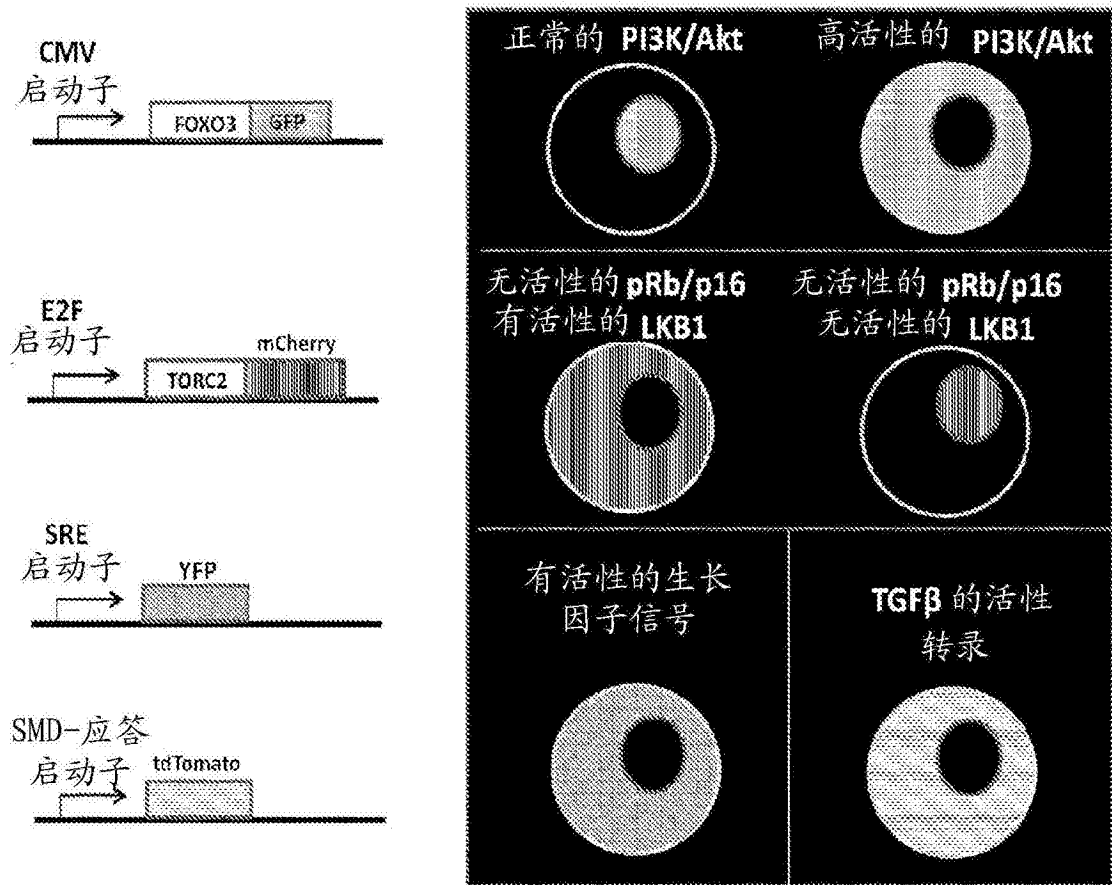


图9

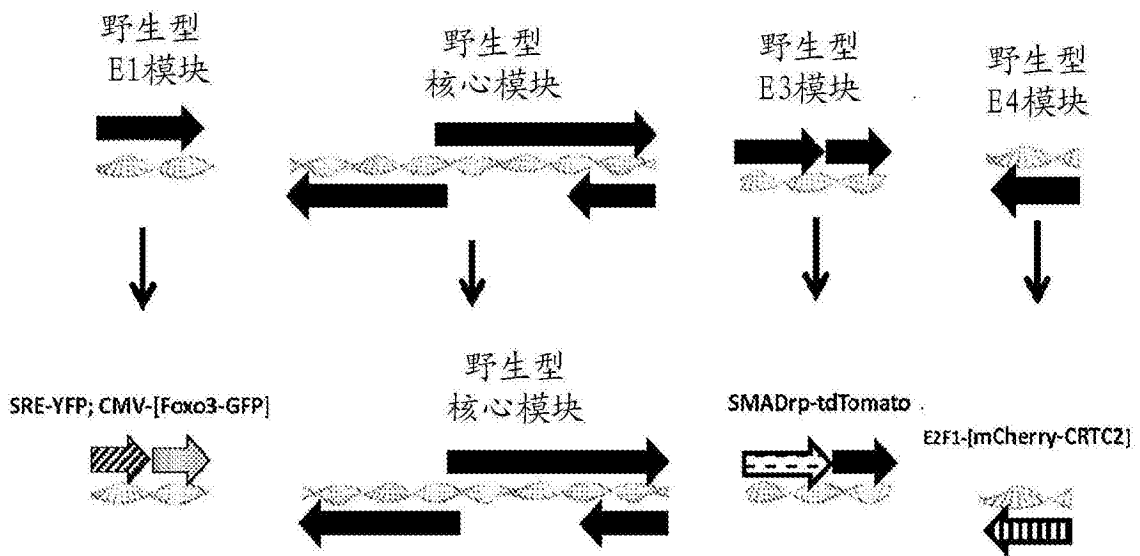


图10