

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 2 月 24 日 (24.02.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/036618 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 35/74 (2015.01) *C12N 15/70* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/74* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/110159

(22) 国际申请日: 2020 年 8 月 20 日 (20.08.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010830264.5 2020 年 8 月 18 日 (18.08.2020) CN

(71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 刘陈立(LIU, Chenli); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。董宇轩(DONG, Yuxuan); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。郭旋(GUO, Xuan); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。陈茜(CHEN, Qian); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。胡勇(HU, Yong); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。艾亮霞(AI, Liangxia); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。张昊(ZHANG, Hao); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京三友知识产权代理有限公司 (BEIJING SANYOU INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市金

(54) Title: BACTERIAL TARGETING VECTOR CARRYING CYTOKINE OR POLYNUCLEOTIDE THEREOF AND USE THEREOF IN TUMOR TREATMENT

(54) 发明名称: 携带细胞因子或其多核苷酸的细菌靶向载体及其在肿瘤治疗中的应用

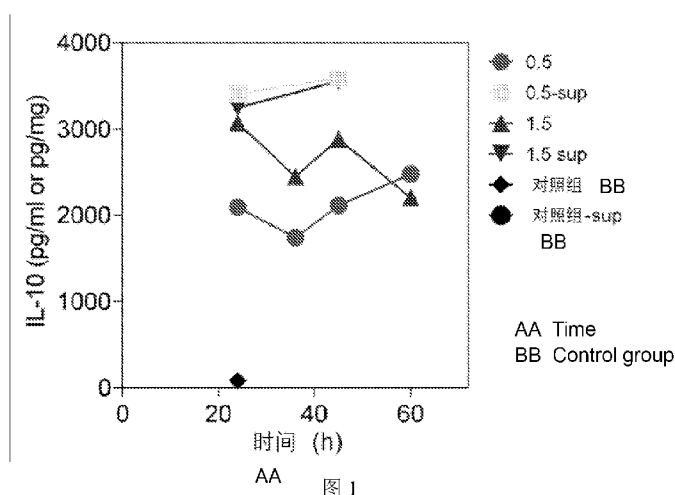


图 1

(57) Abstract: A bacterial targeting vector and use thereof in tumor treatment, in particular, a bacterial targeting vector carrying a cytokine such as interleukin 6 and interleukin 10 or carrying a polynucleotide such as mRNA of the cytokine and use thereof in tumor treatment. An attenuated chassis bacterium capable of targeting solid tumors can be used as a delivery carrier of a tumor therapy molecule, and achieve expression and controllable release of a human/murine cytokine, thereby achieving anti-tumor effects.

(57) 摘要: 细菌靶向载体及其在肿瘤治疗中的应用, 特别是涉及携带细胞因子, 如白介素6和白介素10或携带细胞因子的多核苷酸, 如mRNA的细菌靶向载体及其在肿瘤治疗中的应用。具备靶向实体瘤内的减毒底盘细菌可以作为肿瘤治疗分子的递送载体, 实现人/鼠源细胞因子的表达及可控释放, 从而达到抗肿瘤效果。



WO 2022/036618 A1

融街 35 号国际企业大厦 A 座 16 层,
Beijing 100033 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

携带细胞因子或其多核苷酸的细菌靶向载体及其在肿瘤治疗中的应用

交叉参考相关引用

- 5 本申请要求 2020 年 08 月 18 日递交的申请号为 202010830264.5、发明名称为“携带细胞因子或其多核苷酸的细菌靶向载体及其在肿瘤治疗中的应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

- 10 本发明涉及肿瘤靶向治疗领域，具体而言涉及携带细胞因子，特别是白介素 6 和白介素 10，或编码所述细胞因子的多核苷酸，如 mRNA 的细菌靶向载体及其在肿瘤治疗中的应用。

背景技术

- 15 目前常规的肿瘤治疗方法，如手术疗法、放疗和化疗等，都暴露出对正常组织的损害和严重的毒副作用等缺陷，已无法满足患者的临床需求。新兴的诸如 CAR-T 技术，检查点抑制剂等疗法为肿瘤治疗带来了全新的希望，但是肿瘤免疫疗法也存在着一定局限性，并且其对实体瘤治疗效果较差，这限制了免疫疗法进一步的开发应用。所以，如何扩大免疫疗法的选择范围，是实现免疫疗法突破的关键。
- 20 肿瘤细菌疗法的研究历史可追溯到 150 年前。肿瘤细菌疗法是依赖于细菌繁多的种类、运动性、肿瘤趋向性、侵袭能力和细胞毒性等特征来实现肿瘤干预。活细菌具有主动靶向肿瘤并特异性定植瘤内的独特能力，而且能够靶向包括转移瘤在内的绝大多数肿瘤类型。活细菌还能够依赖鞭毛更好地渗入瘤内组织。而传统抗癌药物虽然治疗毒性效力强，但其随血液循环系统遍及周身，其无差别的攻击使正常细胞大量死亡。肿瘤复杂的脉管系统又阻碍着传统抗癌药物的深入递送，使其难以发挥良好的肿瘤杀伤效果。
- 25 所以，如何实现将细菌疗法与传统疗法联合便能很好地弥补两者各自的不足。

基因工程技术和合成生物学理念的发展成熟，为肿瘤细菌疗法与免疫疗法的联合提供了更有效、更安全的治疗策略。通过基因工程技术改造细菌能够表达细胞因子等抗肿瘤活性分子，利用细菌天然的肿瘤靶向性等诸多优点，实现抗肿瘤活性分子在肿瘤区的

靶向性表达；应用合成生物学的技术理念，对底盘细胞重构优化，设计合成靶向和调控等功能模块，能够使细菌具备特异靶向肿瘤、可控释放药物、显著肿瘤干预和更强安全性等诸多优良性质。

目前已有多篇文章报道了细菌与免疫联合疗法的实例。通过改造减毒细菌靶向递送
5 细胞因子等抗肿瘤药剂，从而进一步增强抗肿瘤效果。Xiao-qin Ha 等(“Inhibitory Effects of the Attenuated *Salmonella* typhimurium Containing the IL-2 Gene on Hepatic Tumors in Mice”, Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2012, Article ID 946139)证明了表达 IL-2 的减毒沙门氏菌相比沙门氏菌对照组具有更好的抑制肝癌细胞增殖的潜力。与 IL-2 的工作相似，M Loeffler 等于 2008 年报道了表达 IL-18
10 的减毒鼠伤寒沙门氏菌(“IL-18-producing *Salmonella* inhibit tumor growth”, Cancer Gene Therapy (2008) 15, 787 - 794)。LIGHT、IL-18 和 CCL21 等细胞因子在实体瘤的原位表达，通过诱导肿瘤区 T 细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞等增殖，激活肿瘤内的免疫抑制环境，对于肝癌等实体瘤的干预及转移瘤的抑制都具有一定作用。另外，韩国全南国立大学的研究人员利用改造的沙门氏菌，开发了一种组成型治疗系统中。对
15 减毒的 $\Delta ppGpp$ 鼠伤寒沙门氏菌进行基因工程化改造，使其分泌创伤弧菌鞭毛蛋白 FlaB，对 TLR5 和 TLR4 信号通路协同活化，提高了肿瘤抑制因子的分泌，显著增强了沙门氏菌对结肠直肠癌细胞的杀伤能力。

中国专利申请 CN102526760A 公开了一种治疗实体瘤的重组减毒沙门氏菌疫苗和药物组合物，其中重组减毒沙门氏菌疫苗包含同时携带白细胞介素 2 和肝细胞生长因子拮
20 抗剂 NK4 双基因的真核表达质粒，因此其实质是将质粒本身释放到人体中进行真核表达。

PCT 专利申请 W02015032165A1 公开了一种靶向肿瘤的细菌递送和表达系统，用于进行原核-真核递送，并在哺乳动物细胞中表达治疗分子。其所递送和表达的治疗载体是成孔李斯特菌溶血素(pore-forming listeriolysin)。并且没有实现采用原核载体完成递送和释放治疗剂的目的。

25 Christoph Pöhlmann 等(“Periplasmic Delivery of Biologically Active Human Interleukin-10 in *Escherichia coli* via a Sec-Dependent Signal Peptide”, J Mol Microbiol Biotechnol 2012;22:1 - 9)用大肠杆菌分泌表达具备生物活性的人源细胞因子白介素 10，并用于炎性肠病的治疗。其将克隆自 E. coli K-12 MG1655 的信号肽 ompF 基因替换人源白介素 10 基因的真核生物信号序列，由此实现原核信号肽 ompF 基因与人
30 源白介素 10 基因的融合，并克隆到 BAC pSG1107 质粒载体中，由 T7 启动子启动表达，

实现异源蛋白的跨膜递送，引导细胞外分泌。其在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达后，在培养上清液和胞内中的表达量分别为 5.8 ± 1.7 和 355.8 ± 86.3 ng/ml。

目前还没有采用针对靶向肿瘤优化的用于精准递送和释放细胞因子的原核载体，和采用该载体的治疗应用。

5

发明内容

为了解决现有技术的问题，本发明的目的是提供一种靶向肿瘤的原核递送载体及其在肿瘤治疗中的应用。

在第一方面，本发明提供了一种靶向肿瘤的原核递送载体，所述载体是靶向实体瘤
10 厌氧区的底盘细菌，并且包含表达细胞因子的多核苷酸，其中，

所述细胞因子选自白介素 6，白介素 10，白介素 8，白介素 18，白介素 33 和 $\text{TNF-}\alpha$ ，并且

所述多核苷酸是 DNA 或 mRNA。

在本发明的第一方面中，所述底盘细菌选自减毒的鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella*
15 *enterica* serovars Typhimurium)、减毒的人源伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovars Typhi)、大肠杆菌 (*E. coli*) 和乳酸菌 (Lactic acid bacteria)。

在本发明的第一方面中，所述底盘细菌是减毒的鼠伤寒沙门氏菌。

在本发明的第一方面中，所述多核苷酸是 DNA，所述载体还包含与表达所述细胞因子的 DNA 融合的信号肽 pelB 和 OmpF。

20 在本发明的第一方面中，所述多核苷酸是 mRNA，所述 mRNA 还包含 5' 端的 m7G 加帽结构和 3' 端的多聚腺苷酸尾结构。

在本发明的第一方面中，所述细胞因子选自白介素 6 和白介素 10。

在本发明的第一方面中，所述原核递送载体包含肿瘤环境敏感的启动子。所述原核递送载体还可以包含其他启动子，所述其他启动子为组成型启动子和诱导型启动子，所
25 述诱导型启动子例如为 IPTG 诱导型启动子或 aTc 诱导型启动子。

在本发明的第一方面中，所述肿瘤为发现在以下部位的实体瘤：宫颈、乳腺、前列腺、胃肠道 (例如食道、口咽、胃、小肠或大肠，结肠、直肠)、膀胱、骨、皮肤、头部或颈部、肝脏、胆囊、肺、胰腺、唾液腺、肾上腺、甲状腺、大脑 (如神经胶质瘤) 神经节，所述肿瘤优选为结肠癌、乳腺癌、黑色素瘤、肺癌、胶质母细胞瘤。

30 在本发明的第一方面中，所述载体通过肌肉注射、静脉注射、皮下注射、腹腔注射、

经脑内施用、经口腔施用、经鼻腔施用或口服施用进行施用。

在第二方面，本发明提供了如上所述的原核递送载体在肿瘤治疗中的应用，其中，所述原核递送载体与选自以下的治疗剂联用：化学药物，如烷基化剂(如硫代特帕和环磷酸胺)、烷基磺酸盐、阿兹环烯类药物、乙胺和甲胺、氮芥类、抗生素、嘌呤类似物、嘧啶类似物、雄酮类、抗肾上腺素、拓扑异构酶抑制剂、卡培他滨；化疗药物：调节或抑制肿瘤激素作用的抗激素药物；免疫靶向药物：吉非替尼、易瑞沙、劳拉替尼、厄洛替尼、贝伐珠单抗。

在本发明的第二方面中，所述联用为同时施用，或依次施用，或分开施用。

本发明的具备靶向实体瘤内的减毒底盘细菌可以作为肿瘤治疗分子的递送载体，实现人/鼠源细胞因子的表达及可控释放，从而达到抗肿瘤效果。

附图说明

图 1 是实施例 1 制备的 IL10 cmRNA 以不同浓度转染 293T 细胞后在所示时间观察到的 IL-10 蛋白的表达情况。

图 2 是实施例 2 采用的原始质粒和所构建的质粒的示意图。图 2（左）为原始质粒模板，pSC101-GFP-Kana；图 2（右）为插入信号肽的质粒，pSC101-pelB-GFP-Kana。

图 3 是实施例 2 所构建的质粒 pSC101-pelB-GFP-Kana 在 RNA 水平上的表达情况。

图 4 是实施例 3 所构建的包含 IL-6 和 IL-10 的质粒示意图。图 4（左）为质粒 pSC101-pelB-IL-6-Kana；图 4（右）为质粒 pSC101-pelB-IL-10-Kana。

图 5 是本发明的白介素 10 携带自身真核信号肽的质粒构建(带有真核信号肽的 pET30a-IL10)及测序结果。

图 6 是本发明的白介素 10 携带 E. coli 信号肽的质粒构建(带有 E. coli ompF 信号肽的 pET30a-IL10)及测序结果。

图 7 是本发明的白介素 10 携带沙门氏菌信号肽 ompF 质粒构建(带有沙门氏菌 ompF 信号肽的 pET30a-IL10)及测序结果。

图 8 是本发明的白介素 10 携带 pelB 信号肽质粒构建(带有 pelB 信号肽的 pET22b-IL10)及测序结果。

图 9 至图 11 分别是实施例 4 制备的 4 种质粒的转染细胞后的菌液 PCR 鉴定结果。

图 12 显示携带不同信号肽的 IL-10 在 BL21 (DE3) 中的表达水平。BL21 (DE3) 携带不同信号肽的裂解上清液中的 IL-10 的表达水平（左）和 LB 培养基上清液中的表达水平

(右) 。 BL21(DE3)-pET22b(+)-pelB-IL-10 (图 中 用 pelB 表 示) , BL21(DE3)-pET30a-ompF-IL-10 (图中用 ompF 表示) , BL21(DE3)-pET30a-IL-10 (图中用 eukaryon 表示) 。

5 具体实施方式

尽管可以对本发明进行各种修改并且本发明可以具有各种形式,但是下面将详细说明和解释具体实例。然而,应当理解的是,这些并不旨在将本发明限制于特定的公开内容,并且本发明包括其所有修改、等同物或替代物而不脱离本发明的精神和技术范围。

在下文中,将更详细地解释根据本发明具体实施方式的靶向肿瘤的原核递送载体及其在肿瘤治疗中的应用。

在本发明的一个或多个实施方式中,本发明的靶向肿瘤的原核递送载体是靶向实体瘤厌氧区的底盘细菌,并且包含表达细胞因子的多核苷酸,其中,所述细胞因子选自白介素 6, 白介素 10, 白介素 8, 白介素 18, 白介素 33 和 TNF- α , 优选白介素 6 或白介素 10。并且所述多核苷酸是 DNA 或 mRNA。

在本发明的一个或多个实施方式中,本发明应用于原核递送载体在肿瘤治疗中的应用,其中,所述原核递送载体与选自以下的治疗剂联用:化学药物,如烷基化剂(如硫代特帕和环磷酰胺)、烷基磺酸盐、阿兹环烯类药物、乙胺和甲胺、氮芥类、抗生素、嘌呤类似物、嘧啶类似物、雄酮类、抗肾上腺素、拓扑异构酶抑制剂、卡培他滨;化疗药物:调节或抑制肿瘤激素作用的抗激素药物;免疫靶向药物:吉非替尼、易瑞沙、劳拉替尼、厄洛替尼、贝伐珠单抗。所述联用为同时施用,或依次施用,或分开施用。

在本发明的一个或多个实施方式中,本发明提供了使用本发明原核递送载体治疗肿瘤的方法,所述原核递送载体是靶向肿瘤,特别是靶向实体瘤厌氧区的底盘细菌,并且包含表达细胞因子的多核苷酸,其中,所述细胞因子选自白介素 6, 白介素 10, 白介素 8, 白介素 18, 白介素 33 和 TNF- α , 优选白介素 6 或白介素 10。并且所述多核苷酸是 DNA 或 mRNA。

在本发明治疗方法的一个或多个实施方式中,所述原核递送载体可以与选自以下的治疗剂联用:化学药物,如烷基化剂(如硫代特帕和环磷酰胺)、烷基磺酸盐、阿兹环烯类药物、乙胺和甲胺、氮芥类、抗生素、嘌呤类似物、嘧啶类似物、雄酮类、抗肾上腺素、拓扑异构酶抑制剂、卡培他滨;化疗药物:调节或抑制肿瘤激素作用的抗激素药物;免疫靶向药物:吉非替尼、易瑞沙、劳拉替尼、厄洛替尼、贝伐珠单抗。所述联用为同

时施用，或依次施用，或分开施用。

在本发明的一个或多个实施方式中，本发明还提供了本发明的原核递送载体在制备用于治疗肿瘤的药物中的应用，其中，所述原核递送载体与选自以下的治疗剂联用：化学药物，如烷基化剂(如硫代特帕和环磷酰胺)、烷基磺酸盐、阿兹环烯类药物、乙胺和甲胺、氮芥类、抗生素、嘌呤类似物、嘧啶类似物、雄酮类、抗肾上腺素、拓扑异构酶抑制剂、卡培他滨；化疗药物：调节或抑制肿瘤激素作用的抗激素药物；免疫靶向药物：吉非替尼、易瑞沙、劳拉替尼、厄洛替尼、贝伐珠单抗。所述联用为同时施用，或依次施用，或分开施用。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述底盘细菌选自减毒的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovars Typhimurium)、减毒的人源伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovars Typhi)、大肠杆菌(*E.coli*)和乳酸菌(*Lactic acid bacteria*)，优选减毒的鼠伤寒沙门氏菌。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述多核苷酸是 DNA，所述载体还包含与表达所述细胞因子的 DNA 融合的信号肽 *pelB*。本发明的载体还包含肿瘤环境敏感的启动子。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述多核苷酸是 mRNA，所述 mRNA 还包含 5' 端的 m7G 加帽结构和 3' 端的多聚腺苷酸尾结构。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述肿瘤为发现在以下部位的实体瘤：宫颈、乳腺、前列腺、胃肠道(例如食道、口咽、胃、小肠或大肠、结肠、直肠)、膀胱、骨、皮肤、头部或颈部、肝脏、胆囊、肺、胰腺、唾液腺、肾上腺、甲状腺、大脑(如神经胶质瘤)神经节，所述肿瘤优选为结肠癌、乳腺癌、黑色素瘤、肺癌、胶质母细胞瘤。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述载体或药物通过肌肉注射、静脉注射、皮下注射、腹腔注射、经脑内施用、经口腔施用、经鼻腔施用或口服施用进行施用。

本发明的原核递送载体可采取以下方式构建并验证：(1)利用化学修饰方法修饰细胞因子 mRNA；(2)利用细菌载体递送表达经化学修饰的细胞因子 mRNA；(3)异源表达细胞因子的质粒载体系统的构建；(4)ELISA 或 Western Blot 鉴定细胞因子的表达情况；(5)体外实验测试细菌分泌细胞因子的功能；(6)通过荷瘤小鼠模型测试白介素 10 治疗肿瘤的作用。

本发明的细胞因子 mRNA 在细菌中以质粒的方式存在，随着细菌递送进瘤内后，释放表达，在瘤内行使翻译功能，经化学修饰之后会显著延长时间，避免降解。

本发明的一个方面涉及到采用一种修饰体外转录白介素 6 或白介素 10 细胞因子

mRNA 的方法, 将其导入底盘微生物, 从而通过细菌经血管进入实体瘤, 实现 mRNA 在实体瘤内分泌及翻译过程。

具体而言, 例如本发明可采用以下方式实现细胞因子 mRNA 的修饰和体外转录: 利用细菌载体递送表达经化学修饰的细胞因子 mRNA 的系统构建。为了实现 mRNA 在体外有效翻译, 本发明在体外转录合成 mRNA 时, 掺入了 5'端的 m7G 加帽结构和 3'端的多聚腺苷酸(polyA 尾)结构。加帽的过程是由 T7 RNA 聚合酶共转录来实现的; 加尾的过程, 是用 Poly(A)聚合酶在 mRNA 分子 3'端, 加上 poly(A)尾, 再用 DNase 酶消化 DNA 模板。cmRNA 经过质粒表达, 电转进底盘细菌, 从而实现 cmRNA 的跨膜分泌, 随即在胞外翻译生成 IL-6/IL-10 蛋白质。

本发明的另一方面涉及利用信号肽融合细胞因子的方式, 实现目的蛋白表达及胞外分泌。

具体而言, 信号肽与细胞因子的融合和表达通过以下方式实现: 细菌异源表达鼠源细胞因子 IL-6 和 IL-10 的质粒载体系统的构建。细胞因子的异源表达极易形成包涵体, 为避免此问题的出现, 本发明拟采用信号肽融合表达的目的基因。信号肽能够引导合成蛋白质的胞外转移。本发明采用来源于胡萝卜软腐欧文氏菌果胶裂解酶的信号肽 pelB 作为本发明研究。另外, 本发明可选地采用 6×His tag 纯化标签, 作为后续目的基因的标记检测。通过酶联免疫吸附实验(ELISA)检测细菌上清液中的 IL-6 和 IL-10, 由此验证 IL-6 和 IL-10 是否实现胞外分泌。

对于如上构建的经化学修饰的细胞因子 mRNA 的系统, 和细菌异源表达鼠源细胞因子 IL-6 和 IL-10 的质粒载体系统, 均可以按照以下固相酶联免疫斑点技术和/或细菌分泌细胞因子 IL-6 和 IL-10 对荷瘤小鼠治疗作用的测试方式来确定所表达细胞因子 IL-6 和 IL-10 的活性。

固相酶联免疫斑点技术(ELISPOT)体外鉴定细胞因子 IL-6 和 IL-10 的功能作用为明确细菌分泌的细胞因子 IL-6 和 IL-10 是否具备 T 细胞激活功能。本发明采用 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞体外培养, 并通过固相酶联免疫斑点技术(ELISPOT)检测 T 细胞激活情况。同时, 设计对照实验, 对体外培养的 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞, 直接使用细胞因子 IL-6 和 IL-10 刺激 T 细胞。

细菌分泌细胞因子 IL-6 和 IL-10 对荷瘤小鼠治疗作用的测试。为证明表达细胞因子 IL-6 和 IL-10 的减毒沙门氏菌对实体瘤的抑制作用, 本发明通过构建巨噬细胞缺陷小鼠, 排除巨噬细胞分泌 IL-10 等的因素干扰, 观察小鼠的肿瘤大小并通过收集小鼠肿瘤血清,

检测 TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子的分泌情况。

本发明还可以采用基于 pET-22b(+)和 pET30a 改造构建的递送系统。

本发明启动子可以是组成型启动子 J23101 和 IPTG 或 aTc 诱导表达启动子。

5 本发明的核糖体结合位点(RBS)可以是 B0034, 以及多种不同表达强度的 RBS, 包括但不限于 BBa J61100、BBa J61101、BBa J61139 等 40 余种。这些 RBS 可用于表征目的蛋白的表达强度。

本发明的底盘微生物可以是大肠杆菌 BL21(DE3), Nissle 1917 和沙门氏菌 SL7207 (aroA-) 等。

本发明的以上各种实施方式具有以下有益效果:

10 (1)应用信号肽融合表达白介素 10 细胞因子, 应用于肿瘤治疗, 开拓了一个新的应用方向;

(2)所使用的底盘微生物主要是减毒的沙门氏菌菌株, 对实体瘤的杀伤效果显著;

(3)应用化学修饰白介素 6 或白介素 10 细胞因子 mRNA 的方法, 能够有效增强细胞因子的半衰期, 延长作用时间, 提高治疗效果;

15 (4)本发明中构建的细菌载体表达细胞因子白介素 6 或白介素 10 的表达量更高。

实施例

提供以下非限制性实施例。

实施例 1: IL-10 mRNA 的制备和细胞内表达

20 采用 IL-10 的 DNA 为模板, 将 IL-10 的 DNA 构建在具有 T7 启动子的质粒上, 线性化后以其为模板, 通过体外转录反应合成 RNA, 在合成反应中引入 5' 端的 m7G 帽子结构和 3' 端的多聚腺苷酸 (polyA) 结构, 同时加入 m5C, Pseudo-UTP 等化学修饰碱基提高其稳定性和翻译效率。加帽的过程是在 20 μ l 体外转录体系中加入 1 μ g 的模板 DNA, 并加入 150 nmol ATP, m5C, Pseudo-UTP 的同时以 4:1 的比例添加 ARCA
25 (ARCA:GTP=4:1, 总量仍为 150 nmol), 经由 T7 RNA 聚合酶在 37 摄氏度条件下体外转录 6 小时实现。接着用 TURBO DNase 消化 DNA 模版在 37 摄氏度下反应 30 分钟后进行加尾反应, 加尾反应 1 小时。扩大反应体系 5 倍, 在 100 μ l 反应体系中外源添加 100 nmol ATP 和 250 nmol MnCl₂, 37 摄氏度反应条件下利用 Poly(A)聚合酶在 RNA 的 3' 端合成多聚腺苷酸。最后通过 LiCl 沉淀法纯化合成的 mRNA。

30 为了验证 IL-10 mRNA 在细胞中具备正常翻译的功能, 将经过化学修饰的 cmRNA

转染至 293T 细胞，转染剂量分别为每孔 0.5ug 和 1.5ug，并以细胞孵育 24h 后为时间起点，在 24h，36h，48h，60h 分别提取细胞组织液及细胞上清液，ELISA 测定 IL-10 蛋白的表达量，结果如图 1 和表 1 所示。表 1 是转染 293T 细胞 IL-10 的表达量 (pg/mL)。

从图 1 和表 1 可以看出，与未转染 RNA 的细胞对照组相比，转染 RNA 的细胞组织液中的 IL-10 蛋白表达量显著提高，说明 IL-10 cmRNA 在细胞中正常翻译；上清液中的 IL-10 蛋白表达量处在相对较高水平，说明蛋白正常翻译并大量分泌到胞外。

表 1

时间(h)	0.5	0.5-上清	1.5	1.5-上清	对照	对照-上清
24	2093.86	3408.14	3071.00	3245.29	85.29	-39
36	1741.00		2449.57			
45	2115.29	3585.29	2882.43	3553.86		
60	2479.57		2202.43			

实施例 2：GFP 作为目的基因对 pelB 信号肽的功能鉴定

10 (1) pSC101-pelB-GFP-kana 质粒的构建

选择国际基因工程机器大赛 iGEM 基因元件库中的 pSC101-GFP-Kana 质粒(Austin iGEM 2019: Characterization of metabolic burden of the Anderson Series, 见网址 http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_J23101)为模板，该质粒由 J23101 组成型启动子启动表达目的基因 GFP。通过一步克隆 One Step-Cloning 的方式，设计正反向引物扩增出信号肽 pelB 以及骨架片段，并根据同源重组的方式，将 pelB 片段插入质粒，得到 pSC101-pelB-GFP-kana 质粒，如下图 2 所示。图 2（左）为原始质粒模板，pSC101-GFP-Kana；图（右）为插入信号肽的质粒，pSC101-pelB-GFP-Kana。

(2) pelB 信号肽在 RNA 水平上的功能鉴定

将上述构建的质粒电转到减毒的鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella Typhimurium*(参考减毒沙门氏菌 YB1, 有 Chang-Xian Li 等公开于 *Oncology Letters*, 2017 年 1 月 Volume 13 Issue 1, DOI: 10.3892/ol.2016.5453)中，在 RNA 水平测试 GFP 的表达情况。其中，对于 GFP 表达的 RNA 水平分析，借助 Real-time PCR 测试，设计 Real-time PCR 正反向引物，qP-pelB-F1/R1，序列为 GGCAGCCGCTGGATTGTTAT/TGTTGCATCACCTTCACCCT，Tm 值为 60 度；选择 SL7207 (aroA-) 和转入原始模板质粒的 SL7207 为对照组进行试验，并同时选择反

25 转录前的样品作为对照组，避免由于基因组 DNA 未处理干净而造成的误差。图 3 显示

了 GFP 在 RNA 水平上的表达情况。结果如图 3 所示，Real-time PCR 测试时，选择了 rho 作为内参基因，计算得出样本结果数据与 rho 内参基因的比值，结果如下：电转质粒 PSC101-pelB-GFP-Kana 的细菌中，GFP 在 mRNA 水平高表达，SL7207 和转入原始模板质粒的 SL7207 的对照组均无 mRNA 表达。

5

实施例 3：IL-6 和 IL-10 作为目的基因，质粒递送系统的构建

选择上述说明的 pSC101-pelB-GFP-Kana 质粒为模板，反向设计正反向引物，正向引物序列是：5' - GTCGACACTTAATTAACGGCA-3'；反向引物序列：5' - CTCGAGATTTCTCCTCTTTCG-3' 扩增骨架载体；鼠源 IL-10 基因扩增自 Puc-IL-10-AMP 质粒，正向引物序列是：5' -GAAAGAGGAGAAATCTCGAGATGA-3'；反向引物序列：5' -GCCGTTAATTAAGTGTCGACAC-3'。通过一步克隆 One Step-Cloning 的方式，将目的片段插入进骨架中，得到 pSC101-pelB-IL-10-kana 质粒。

PCR 高保真扩增酶使用 Takara 公司产品 PrimerSTAR MAX Premix (2×)，dNTP 浓度 0.4 mM (2×)，PCR 反应条件如下：

15	体系		程序
	模板：质粒 pET-22b	2 μl	1: 98°C 5min
	酶：2× pro Taq (AG)	10μl	2: 98°C 10s
	引物 1	0.4μl	3: 55°C 30s
	引物 2	0.4μl	4: 72°C 6min
			以上步骤 2-4 重复 30 个循环
20	ddH ₂ O: 无 RNA 酶的水 ddH ₂ O	7.2μl	5: 72°C 5min
			6: 12°C ∞

pSC101-pelB-IL-6-kana 构建方式同理所述，如图 4 所示。

实施例 4：带有 ompF 信号肽的 pET30a-IL10 和带有 pelB 信号肽的 pET22b-IL10 的构建、转化和表达

构建：分析 IL-10 的蛋白序列，发现 IL-10 前 22 个氨基酸是一个真核信号肽，为促进 IL-10 在原核载体的成功表达及跨膜递送，申请人原核信号肽 pelB 和 ompF 将原真核序列信号肽替换掉，并采用诱导型质粒表达载体提高目的蛋白的可溶表达量，成功构建质粒：带有 ompF 信号肽的 pET30a-IL10 和带有 pelB 信号肽的 pET22b-IL10。pET30a 和

pET22b 是常用的 IPTG 诱导表达载体。构建的质粒见图 5-图 8。

转化：分别将上述质粒电转入 BL21(DE3)和减毒沙门氏菌 ZG1。分别将质粒带有真核信号肽的 pET30a-IL10 构建在 BL21(DE3)和 ZG1 中能够实现正常表达 IL-10 的菌株；另外，将带有 *E.coli* ompF 信号肽的 pET30a-IL10 和带有沙门氏菌 ompF 信号肽的 pET30a-IL10 构建在 BL21(DE3)和 ZG1 中实现 IL-10 的表达及胞质分泌；以及将带有 *pelB* 信号肽的 pET22b-IL10 质粒构建在 BL21(DE3)和 ZG1 中实现 IL-10 的表达及胞质分泌。菌液 PCR 鉴定结果见图 9-图 11。

分别将携带 pET30a-ompF-IL10 和 pET22b(+)-pelB-IL10 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)以及用作对照的携带带有真核信号肽的 pET30a-IL10 的大肠杆菌 BL21(DE3)用 LB 培养基扩大体系培养，培养体积 4ml，当细菌培养到对数期后期的时候（OD 值 0.6 左右），向其中分别加入终浓度为 1/0.5/0 毫摩的 IPTG，16℃诱导表达过夜（24h），收集菌体和 LB 培养液，菌体用蛋白裂解液裂解完全，14000g 离心 30 分钟，分别收集裂解液上清液和 LB 培养基上清液。通过免疫荧光吸附实验 ELISA 定量分析白介素 10 的表达情况。结果见图 12。结论：说明 IL-10 在 *pelB* 和 *OmpF* 信号肽的作用下，实现可溶蛋白的表达水平在 70-80 ng/(10⁸ CFU)。

权利要求书

1. 一种靶向肿瘤的原核递送载体，所述载体是靶向实体瘤厌氧区的底盘细菌，并且包含表达细胞因子的多核苷酸，其中，
5 所述细胞因子选自白介素 6，白介素 10，白介素 8，白介素 18，白介素 33 和 TNF- α ，并且
所述多核苷酸是 DNA 或 mRNA。
2. 如权利要求 1 所述的原核递送载体，所述底盘细菌选自减毒的鼠伤寒沙门氏菌、
10 减毒的人源伤寒沙门氏菌、大肠杆菌和乳酸菌。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的原核递送载体，所述多核苷酸是 DNA，所述载体还包含与表达所述细胞因子的 DNA 融合的信号肽 pelB 和 OmpF。
4. 如权利要求 1 或 2 所述的原核递送载体，所述多核苷酸是 mRNA，所述 mRNA 还包含 5'端的 m7G 加帽结构和 3'端的多聚腺苷酸尾结构。
- 15 5. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的原核递送载体，当所述多核苷酸是 DNA 时，所述原核递送载体包含肿瘤环境敏感的启动子，以及其他启动子，所述其他启动子为组成型启动子和诱导型启动子，所述诱导型启动子例如为 IPTG 诱导型启动子或 aTc 诱导型启动子。
6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的原核递送载体，所述肿瘤为发现在以下部位的
20 实体瘤：宫颈、乳腺、前列腺、肠道、膀胱、骨、皮肤、头部或颈部、肝脏、胆囊、肺、胰腺、唾液腺、肾上腺、甲状腺、大脑神经节，所述肿瘤优选为结肠癌、乳腺癌、黑色素瘤、肺癌、胶质母细胞瘤。
7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的原核递送载体，所述载体通过肌肉注射、静脉注射、皮下注射、腹腔注射、经脑内施用、经口腔施用、经鼻腔施用或口服
25 施用进行施用。
8. 权利要求 1 至 7 中任一项所述的原核递送载体在肿瘤治疗中的应用，其中，所述原核递送载体与选自以下的治疗剂联用：化学药物、化疗药物、免疫靶向药物。
9. 如权利要求 8 所述的应用，其中，所述化学药物为烷基化剂、烷基磺酸盐、阿
30 兹环烯类药物、乙胺和甲胺、氮芥类、抗生素、嘌呤类似物、嘧啶类似物、雄

酮类、抗肾上腺素、拓扑异构酶抑制剂、卡培他滨；所述化疗药物为调节或抑制肿瘤激素作用的抗激素药物；所述免疫靶向药物为吉非替尼、易瑞沙、劳拉替尼、厄洛替尼、贝伐珠单抗。

10. 如权利要求 9 所述的应用，其中，所述烷基化剂为硫代特帕和环磷酰胺。

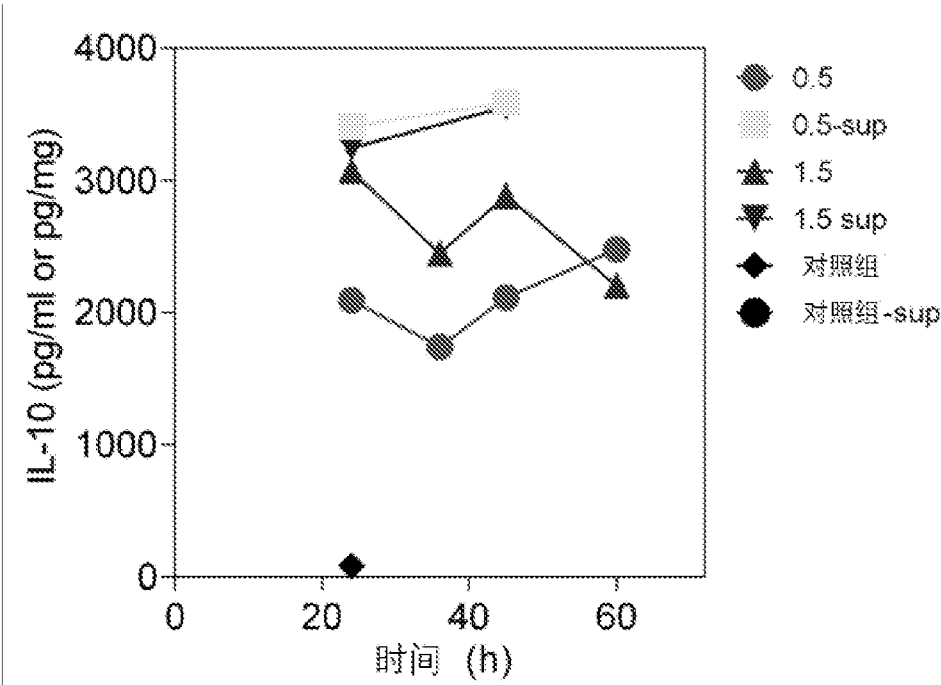


图 1

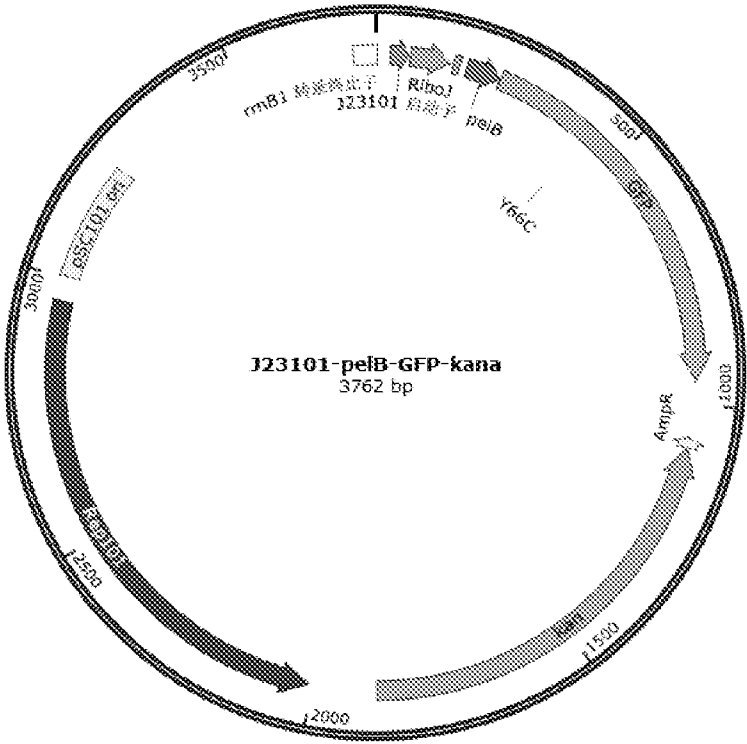


图 2

荧光定量PCR测定GFP转录本表达结果

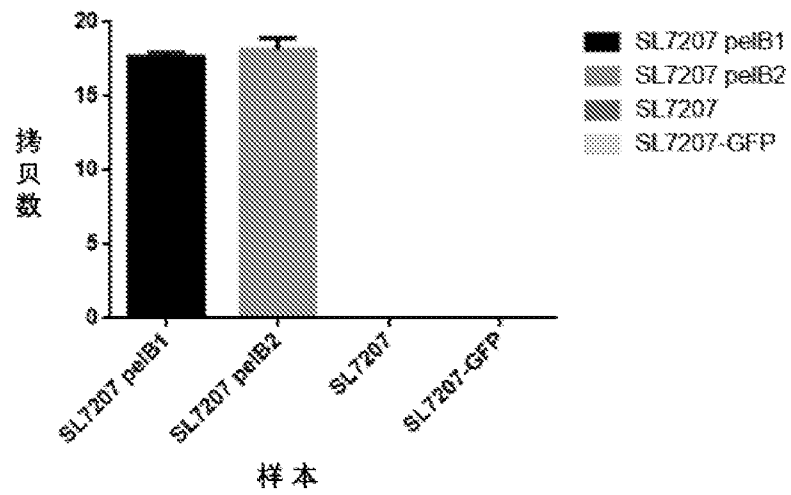


图 3

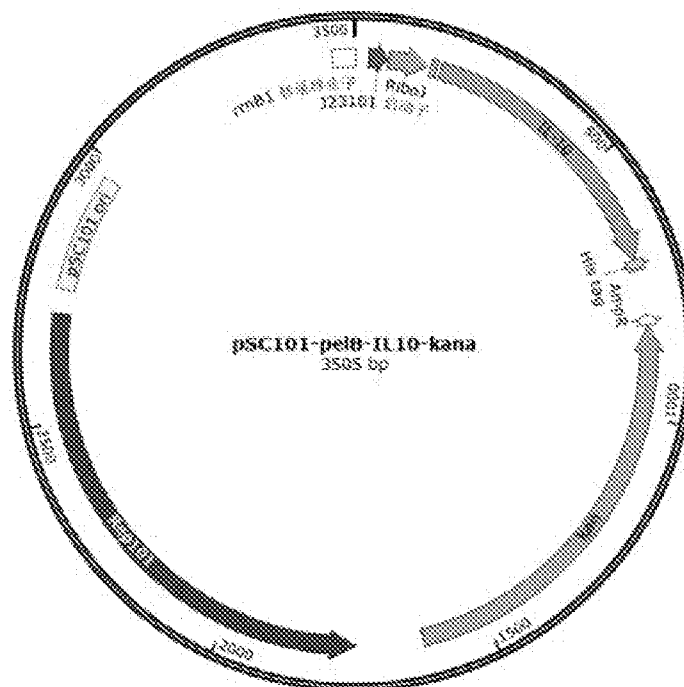


图 4

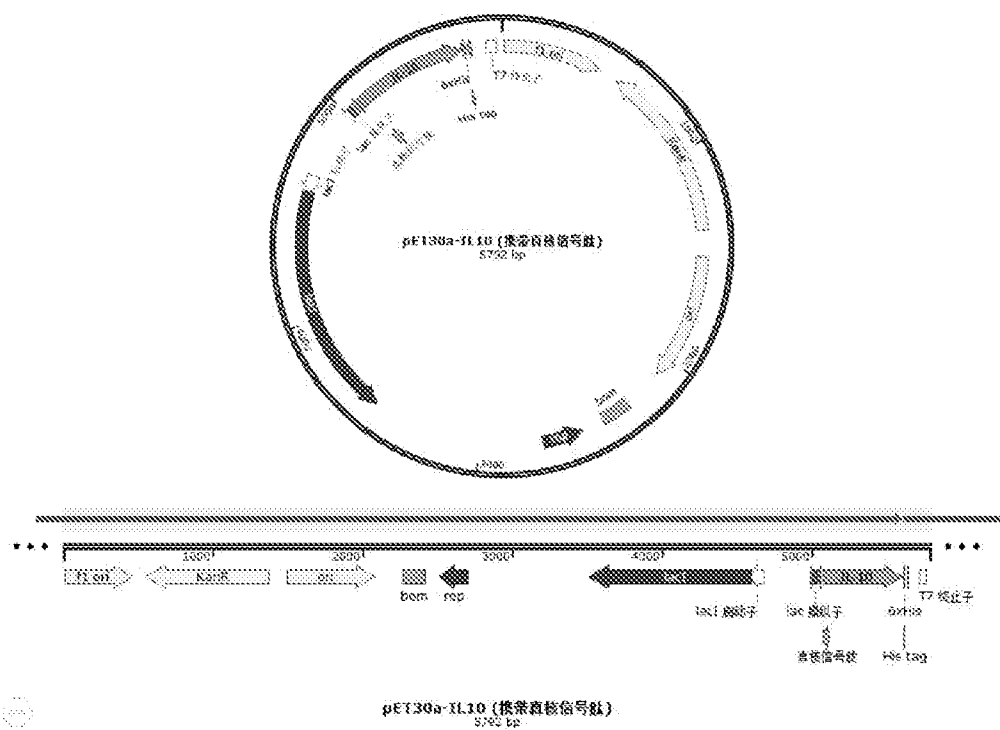


图 5

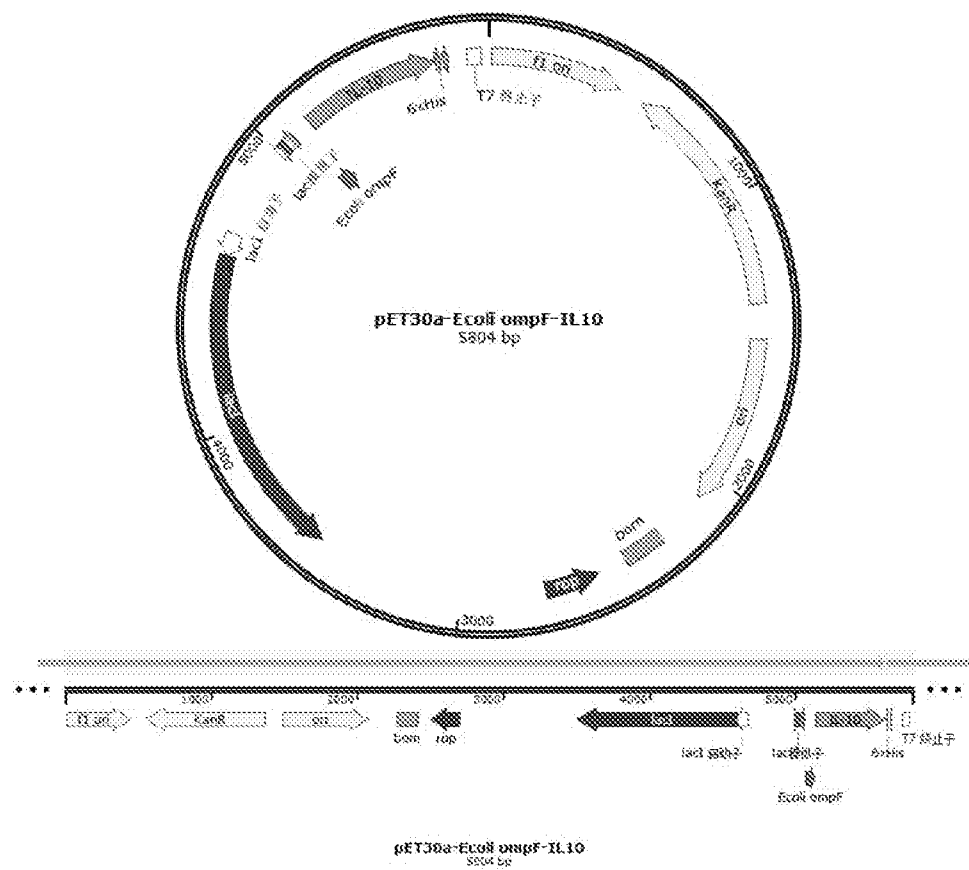


图 6

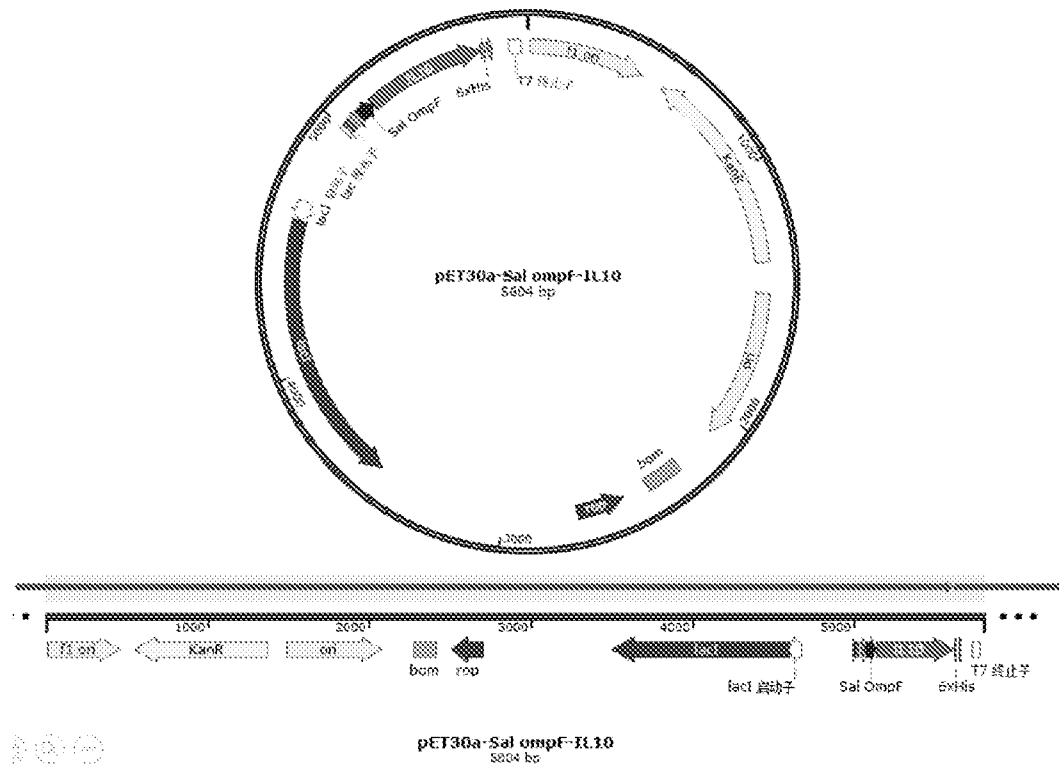


图 7

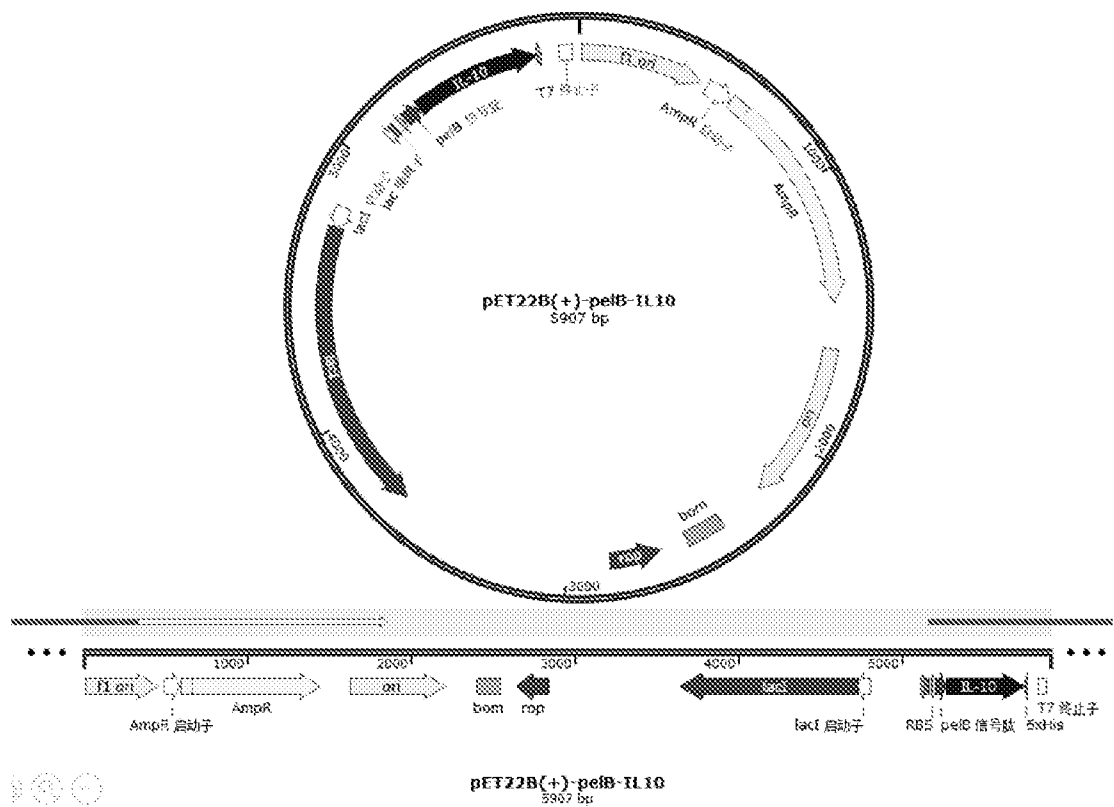


图 8

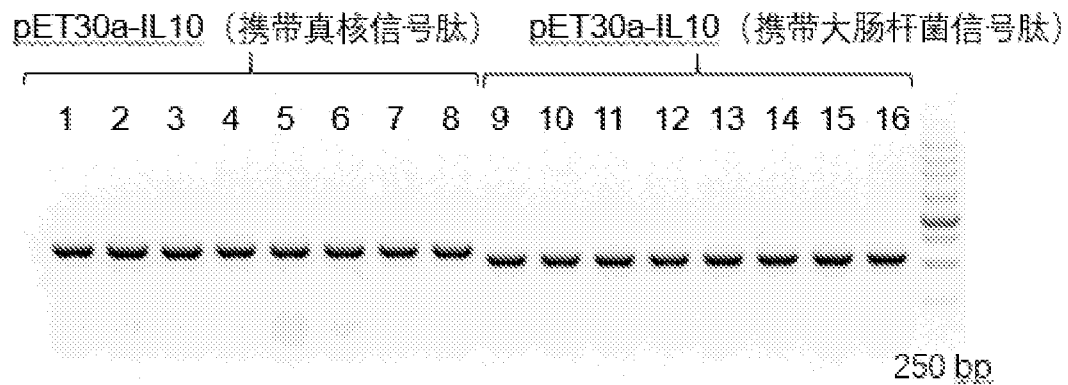


图 9

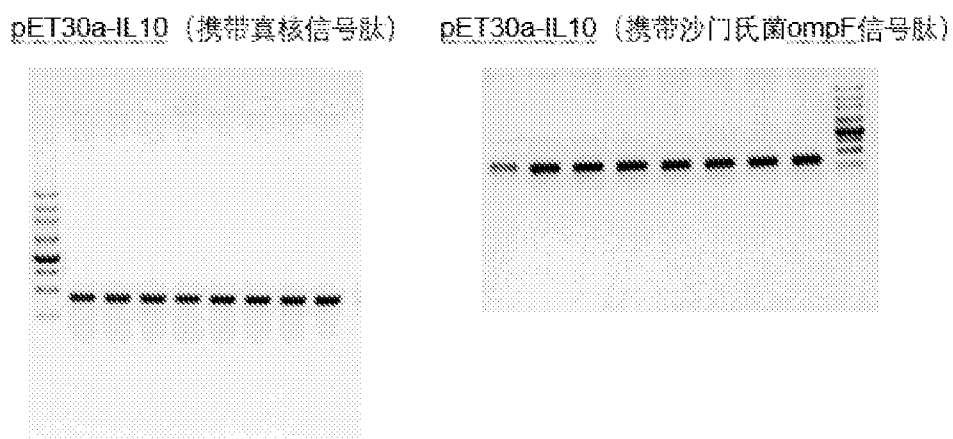


图 10

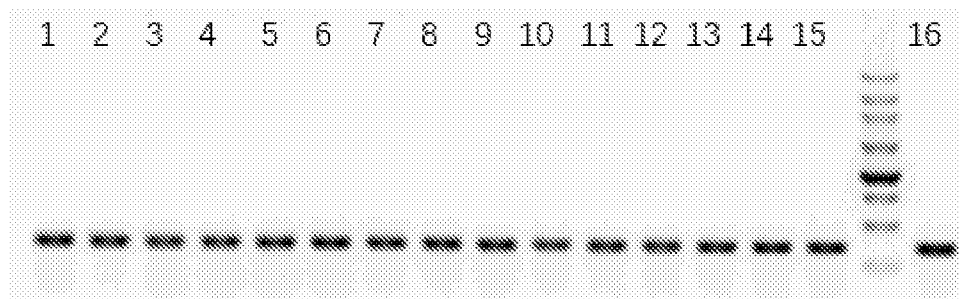


图 11

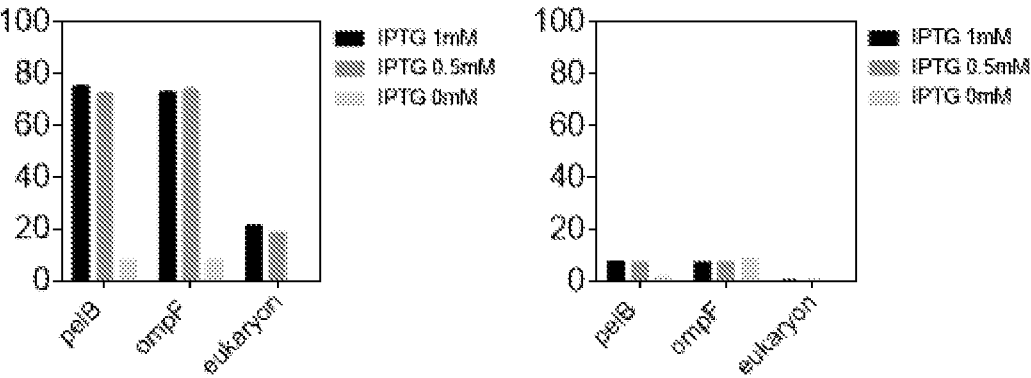


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/110159

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/74(2015.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 15/74(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, C12N, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 万方, EBI, NCBI, 百度, ISI Web of Knowledge, PUBMED: 中国科学院深圳先进技术研究院, 刘陈立, 董宇轩, 郭旋, 陈茜, 胡勇, 艾亮霞, 张昊, 原核, 载体, 厌氧区, 实体瘤, 肿瘤, 底盘细菌, 底盘微生物, 伤寒沙门氏菌, *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella enterica* serovars Typhi, 大肠杆菌, *E.coli*, 乳酸菌, Lactic acid bacteria, 减毒, 大肠埃希氏菌, 乳杆菌, 乳球菌, Nissle, 白介素, il, interleukin, TNF, 信号肽, peIB, OmpF

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110913875 A (SYNLOGIC OPERATING COMPANY, INC) 24 March 2020 (2020-03-24) claims 1-14, 70-71, 90-104, description paragraphs 9, 90-110, 138, 147-155, 167-171, 173, 175, 701-706, 1323-1328, 1380-1390	1-10
X	LOEFFLER, M. et al. "IL-18-producing <i>Salmonella</i> inhibit tumor growth" <i>Cancer Gene Ther.</i> , Vol. 15, No. 12, 31 December 2008 (2008-12-31), pp. 787-794	1-10
X	CN 102526760 A (PLA LANZHOU MILITARY REGION, LANZHOU GENERAL HOSPITAL) 04 July 2012 (2012-07-04) claims 1-10, and embodiments 1 and 2	1-10
X	CN 111315868 A (NEW PORTAL LTD.) 19 June 2020 (2020-06-19) claims 1-37, embodiments 1-9	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 April 2021

Date of mailing of the international search report

19 May 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088
 China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/110159**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103656684 A (NANJING SINOGEN BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 26 March 2014 (2014-03-26) entire document	1-10
A	CN 111358811 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 03 July 2020 (2020-07-03) entire document	1-10
A	CN 107636146 A (SYNLOGIC INC.) 26 January 2018 (2018-01-26) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/110159

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **8-10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 8-10 relate to a method for treating tumors, and therefore do not comply with PCR Rule 39.1(iv). The present report is provided on the basis of claims 8-10 modified to the use of a prokaryotic delivery vector for preparing drugs for treating tumors.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/110159

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110913875	A	24 March 2020	MX	2019008196	A	16 December 2019
				BR	112019013863	A2	03 March 2020
				CA	3049579	A1	12 July 2018
				US	2019336544	A1	07 November 2019
				WO	2018129404	A8	13 June 2019
				EP	3565566	A1	13 November 2019
				IL	267830	D0	26 September 2019
				JP	2020505016	A	20 February 2020
				AU	2018205276	A1	18 July 2019
				SG	11201906161V	A	27 August 2019
				WO	2018129404	A1	12 July 2018
CN	102526760	A	04 July 2012	None			
CN	111315868	A	19 June 2020	WO	2019047166	A1	14 March 2019
				AU	2018328465	A1	19 March 2020
				SG	11202001797 T	A	30 March 2020
				JP	2020533978	A	26 November 2020
				WO	2019047679	A1	14 March 2019
				AU	2017430856	A1	02 April 2020
				JP	2020532994	A	19 November 2020
				SG	11202001796 S	A	30 March 2020
				CN	111278978	A	12 June 2020
				EP	3679142	A1	15 July 2020
				US	2020323926	A1	15 October 2020
				EP	3679123	A1	15 July 2020
CN	103656684	A	26 March 2014	CN	103656684	B	24 February 2016
CN	111358811	A	03 July 2020	None			
CN	107636146	A	26 January 2018	RU	2017130462	A	02 April 2019
				KR	20170121291	A	01 November 2017
				WO	2016141108	A1	09 September 2016
				CA	2978315	A1	09 September 2016
				RU	2017130462	A3	23 September 2019
				AU	2016226234	A1	21 September 2017
				IL	254226	D0	31 October 2017
				SG	11201707025 W	A	28 September 2017
				WO	2016141108	A8	21 December 2017
				HK	1250244	A1	07 December 2018
				BR	112017018656	A2	17 April 2018
				JP	2018512841	A	24 May 2018
				MX	2017011037	A	02 March 2018
				EP	3265105	A1	10 January 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/110159

A. 主题的分类 A61K 35/74(2015.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 15/74(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																				
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K, C12N, A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 万方, EBI, NCBI, 百度, ISI, Web of Knowledge, PUBMED; 中国科学院深圳先进技术研究院, 刘陈立, 董宇轩, 郭旋, 陈茜, 胡勇, 艾亮霞, 张昊, 原核, 载体, 厌氧区, 实体瘤, 肿瘤, 底盘细菌, 底盘微生物, 伤寒沙门氏菌, Salmonella enterica serovars Typhimurium, Salmonella Typhimurium, Salmonella enterica serovars Typhi, 大肠杆菌, E.coli, 乳酸菌, Lactic acid bacteria, 减毒, 大肠埃希氏菌, 乳杆菌, 乳球菌, Nissle, 白介素, il, interleukin, TNF, 信号肽, pelB, OmpF																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 110913875 A (同生运营公司) 2020年 3月 24日 (2020 - 03 - 24) 权利要求1-14、70-71、90-104, 说明书第9、90-110、138、147-155、167-171、173、175、701-706、1323-1328、1380-1390段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>LOEFFLER, M. 等. "IL-18-producing Salmonella inhibit tumor growth" Cancer Gene Ther., 第15卷, 第12期, 2008年 12月 31日 (2008 - 12 - 31), 第787 - 794页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 102526760 A (中国人民解放军兰州军区兰州总医院) 2012年 7月 4日 (2012 - 07 - 04) 权利要求1-10, 实施例1-2</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 111315868 A (新实有限公司) 2020年 6月 19日 (2020 - 06 - 19) 权利要求1-37, 实施例1-9</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103656684 A (南京华贞生物医药科技有限公司) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 110913875 A (同生运营公司) 2020年 3月 24日 (2020 - 03 - 24) 权利要求1-14、70-71、90-104, 说明书第9、90-110、138、147-155、167-171、173、175、701-706、1323-1328、1380-1390段	1-10	X	LOEFFLER, M. 等. "IL-18-producing Salmonella inhibit tumor growth" Cancer Gene Ther., 第15卷, 第12期, 2008年 12月 31日 (2008 - 12 - 31), 第787 - 794页	1-10	X	CN 102526760 A (中国人民解放军兰州军区兰州总医院) 2012年 7月 4日 (2012 - 07 - 04) 权利要求1-10, 实施例1-2	1-10	X	CN 111315868 A (新实有限公司) 2020年 6月 19日 (2020 - 06 - 19) 权利要求1-37, 实施例1-9	1-10	A	CN 103656684 A (南京华贞生物医药科技有限公司) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 110913875 A (同生运营公司) 2020年 3月 24日 (2020 - 03 - 24) 权利要求1-14、70-71、90-104, 说明书第9、90-110、138、147-155、167-171、173、175、701-706、1323-1328、1380-1390段	1-10																		
X	LOEFFLER, M. 等. "IL-18-producing Salmonella inhibit tumor growth" Cancer Gene Ther., 第15卷, 第12期, 2008年 12月 31日 (2008 - 12 - 31), 第787 - 794页	1-10																		
X	CN 102526760 A (中国人民解放军兰州军区兰州总医院) 2012年 7月 4日 (2012 - 07 - 04) 权利要求1-10, 实施例1-2	1-10																		
X	CN 111315868 A (新实有限公司) 2020年 6月 19日 (2020 - 06 - 19) 权利要求1-37, 实施例1-9	1-10																		
A	CN 103656684 A (南京华贞生物医药科技有限公司) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 全文	1-10																		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																				
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期																		
2021年 4月 29日		2021年 5月 19日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员																		
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		李娟娟 电话号码 86-(10)-53962095																		

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 111358811 A (深圳先进技术研究院) 2020年 7月 3日 (2020 - 07 - 03) 全文	1-10
A	CN 107636146 A (同生公司) 2018年 1月 26日 (2018 - 01 - 26) 全文	1-10

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 8-10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求8-10涉及肿瘤的治疗方法，因此不符合PCT细则第39.1(iv)的规定。本报告基于权利要求8-10修改为原核递送载体在制备治疗肿瘤药物中的用途而作出。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/110159

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110913875	A	2020年 3月 24日	MX	2019008196	A	2019年 12月 16日
				BR	112019013863	A2	2020年 3月 3日
				CA	3049579	A1	2018年 7月 12日
				US	2019336544	A1	2019年 11月 7日
				WO	2018129404	A8	2019年 6月 13日
				EP	3565566	A1	2019年 11月 13日
				IL	267830	D0	2019年 9月 26日
				JP	2020505016	A	2020年 2月 20日
				AU	2018205276	A1	2019年 7月 18日
				SG	11201906161V	A	2019年 8月 27日
				WO	2018129404	A1	2018年 7月 12日
CN	102526760	A	2012年 7月 4日	无			
CN	111315868	A	2020年 6月 19日	WO	2019047166	A1	2019年 3月 14日
				AU	2018328465	A1	2020年 3月 19日
				SG	11202001797T	A	2020年 3月 30日
				JP	2020533978	A	2020年 11月 26日
				WO	2019047679	A1	2019年 3月 14日
				AU	2017430856	A1	2020年 4月 2日
				JP	2020532994	A	2020年 11月 19日
				SG	11202001796S	A	2020年 3月 30日
				CN	111278978	A	2020年 6月 12日
				EP	3679142	A1	2020年 7月 15日
				US	2020323926	A1	2020年 10月 15日
				EP	3679123	A1	2020年 7月 15日
CN	103656684	A	2014年 3月 26日	CN	103656684	B	2016年 2月 24日
CN	111358811	A	2020年 7月 3日	无			
CN	107636146	A	2018年 1月 26日	RU	2017130462	A	2019年 4月 2日
				KR	20170121291	A	2017年 11月 1日
				WO	2016141108	A1	2016年 9月 9日
				CA	2978315	A1	2016年 9月 9日
				RU	2017130462	A3	2019年 9月 23日
				AU	2016226234	A1	2017年 9月 21日
				IL	254226	D0	2017年 10月 31日
				SG	11201707025W	A	2017年 9月 28日
				WO	2016141108	A8	2017年 12月 21日
				HK	1250244	A1	2018年 12月 7日
				BR	112017018656	A2	2018年 4月 17日
				JP	2018512841	A	2018年 5月 24日
				MX	2017011037	A	2018年 3月 2日
				EP	3265105	A1	2018年 1月 10日