

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/112 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480015761.9

[43] 公开日 2006 年 7 月 12 日

[11] 公开号 CN 1802175A

[22] 申请日 2004.6.7

[21] 申请号 200480015761.9

[30] 优先权

[32] 2003. 6. 6 [33] DE [31] 10326187.7

[86] 国际申请 PCT/DE2004/001178 2004.6.7

[87] 国际公布 WO2004/108155 德 2004.12.16

[85] 进入国家阶段日期 2005.12.6

[71] 申请人 赞塔里斯有限公司

地址 德国美因河畔法兰克福

[72] 发明人 J·芬斯特雷 W·格贝尔

U·拉普 J·施特里茨克

A·施密特 I·根特舍韦

T·波塔彭克

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 吴亦华

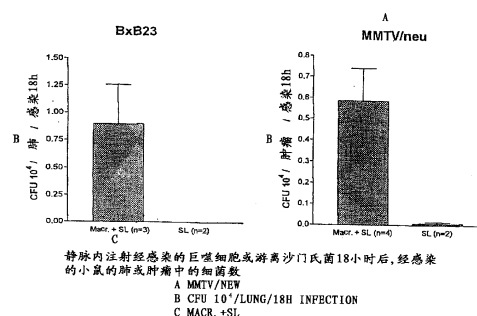
权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 4 页

[54] 发明名称

用作细菌载体的细胞

[57] 摘要

本发明涉及细胞生产药物组合物的用途，该细胞装载了含有外源 DNA 的微生物，尤其是细菌微生物。优选，外源 DNA 编码所限定的活性剂且该药物组合物用于预防或治疗通过所述活性剂可以治疗的疾病。



1. 一种哺乳动物细胞，其是装载细菌的，用于预防或治疗疾病，其中细胞是自体的、同种异体的或异种的，且选自“巨噬细胞、树突细胞、粒细胞、淋巴细胞、肿瘤细胞和组织细胞”。

2. 如权利要求 1 中所要求的细胞，通过辐射或其它方法来将其灭活。

3. 如权利要求 1 或 2 中所要求的细胞，其中细菌是活的、无毒的、减毒的或死的。

4. 如权利要求 1 至 3 任一项所要求的细胞，其中细菌选自“结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、牛分枝杆菌菌株 BCG、BCG 次代菌株、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、非洲分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、鸟分枝杆菌副结核亚种、星状诺卡氏菌、其他诺卡氏菌属菌种、嗜肺性军团病杆菌、其他军团杆菌属菌种、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、其他沙门氏菌菌种、志贺氏菌菌种、鼠疫耶尔森氏菌、溶血性巴斯德氏菌、多杀巴斯德氏菌、其他巴斯德氏菌属菌种、胸膜肺炎放线杆菌、单核细胞增生利斯特氏菌、绵羊利斯特氏菌、流产布鲁氏杆菌、其他布鲁氏杆菌属菌种、肺炎衣原体、砂眼衣原体、鹦鹉热衣原体和 Q 热病原体”。

5. 如权利要求 1 至 4 任一所要求的细胞，其中细菌含有重组 DNA，该 DNA 编码至少一种活性物质。

6. 如权利要求 1 至 5 任一所要求的细胞，其中在合适启动子的辅助下由细菌本身来产生至少一种活性物质，或其表达受真核启动子控制。

7. 如权利要求 1 至 6 任一所要求的细胞，其中发生胞内的、膜结合的或分泌生产。

8. 如权利要求 1 至 7 任一所要求的细胞，其中活性物质选自“感染物如病毒、细菌、支原体、寄生虫的抗原，肿瘤特异性抗原，尤其是致癌基因编码的蛋白质，抗体，抗体的抗原决定簇结合片段和含有

抗体的至少一个抗原决定簇结合片段的融合蛋白，该抗体定向例如肿瘤细胞上的、淋巴细胞如 T 淋巴细胞上的、或内皮细胞如肿瘤内皮细胞上的抗原，酶，尤其是激活药物无活性前体的酶，例如， β -葡糖苷酸酶，磷酸酯酶，水解酶，脂酶，免疫抑制细胞因子如 IL-10，免疫刺激细胞因子如 IL-1、IL-2、IL-3 或 IL-6，趋化因子，干扰素，生长因子如 G-CSF、GM-CSF、M-CSF、FGF；VEGF 或 EGF，或细胞因子、趋化因子、干扰素或生长因子的抑制性蛋白质”。

9. 如权利要求 1 至 8 任一所要求的细胞用于预防或治疗疾病的用途，其中活性物质阻断肿瘤组织中的负调节因子。

10. 如权利要求 1 至 8 任一所要求的细胞用于预防或治疗疾病的用途，其中细菌作为肿瘤组织中的促炎症刺激物。

11. 如权利要求 1 至 8 任一所要求的细胞用于预防或治疗疾病的用途，其中同时使用树突细胞或巨噬细胞作为疫苗抗原的载体。

12. 如权利要求 1 至 8 任一所要求的细胞用于预防或治疗疾病的用途，其中活性物质和/或疫苗抗原离体装载至树突细胞上或巨噬细胞上。

13. 如权利要求 12 中所要求的用途，其中疫苗抗原由所限定的肽构成。

14. 如权利要求 10 中所要求的用途，其中将细胞和表达组织抗原或肿瘤抗原的另一细胞融合。

15. 如权利要求 14 中所要求的用途，其中融合细胞是自体肿瘤细胞。

16. 如权利要求 1 至 8 任一所要求的细胞用于预防或治疗疾病的用途。

17. 细胞，尤其是如权利要求 1 至 8 任一所要求的细胞用于生产药物组合物的用途，其装载了含有外源 DNA 的微生物，尤其是细菌微生物。

18. 如权利要求 17 中所要求的用途，其中外源 DNA 编码所限定的活性物质，且其中药物组合物用来预防或治疗通过该活性物质可以预防和/或治疗的疾病。

用作细菌载体的细胞

发明领域

本发明涉及经细菌感染的细胞及其用于生产药物组合物的用途，尤其是用于治疗癌症。

发明背景和现有技术

对于治疗以前不能治愈或不能充分治愈的疾病的新方法包括基因治疗和免疫治疗的各种可能性。

基因治疗的意向是将编码所需蛋白质的核酸序列通过合适的载体运送至目标组织中并穿透进入其中的细胞中，并转化它们来表达所需的蛋白质。已经发展和测试了用于基因治疗的各种不同技术方法。然而，总地来看，各种方法测试的临床结果全部趋向于失望，尤其是对于肿瘤疾病。技术问题是对此的实质性原因。因此，对于治疗效果，核酸序列的载体显示出对目标细胞的特异性太低，可以被转化的细胞数量太少，所需蛋白质表达的强度和持续时间太小。

已经建立的免疫治疗形式之一是用抗原来免疫，称为接种疫苗。用抗原免疫后，身体产生特定的抗体和/或特定的细胞毒素淋巴细胞，其具有预防或治疗活性，例如对抗感染物。数十年来已经尝试了各种方法来通过接种疫苗治疗以前不能充分治疗或不能治愈的疾病。最前沿的是通过肿瘤接种疫苗来治疗肿瘤疾病。目的是通过肿瘤疫苗引起针对肿瘤的免疫反应，导致肿瘤细胞的胞溶并最终消灭所有的肿瘤组织。然而，至今使用经测试的各种肿瘤疫苗在肿瘤治疗中还没有获得突破。实质性原因源自所谓的肿瘤宿主对其肿瘤的免疫耐受性。因此，尽管用大量免疫治疗方法来诱导相对好的肿瘤特异性 T-细胞反应是可能的，但是这经常和破坏肿瘤效果没有关联（例如，Thurner 等，J. Exp Med 190: 1669-1678 (1999)）。最近的探索指向各种原因。这些包括

特异性 T 细胞不能足够地穿透进入肿瘤组织 (Mukai 等, *Cancer Research* 59: 5245-5249 (1999)) 和/或肿瘤内 T 细胞的失活 (例如通过 TFG- β 或通过表达负调节标记如肿瘤组织中的 B7-H1 或通过刺激具有免疫抑制效果的调控 T 细胞 (Review: Bach, *Nature Reviews*, 3: 189-198 (2003)))。

目前在不同临床阶段中采用不同方法用于肿瘤接种且经常是基于树突细胞 (概述于 Bancherau 等, *Cell*, 106: 271-4 (2001))。用树突细胞免疫的最常见类型包括离体激活细胞、将其装载 (“pulsen”) 抗原 (例如纯化的蛋白质、肿瘤细胞提取物或限定的肽) 并随后将其给药。或者, 还使用了包括细胞融合的方法。在这种情况下, 例如, 通过合适的方法如电场将经辐射的肿瘤细胞融合至树突细胞并随后给药 (Kugler 等, *Nat Med* 6: 332-6 (2000))。

已经发展了一种新方法, 在重组减毒细菌的帮助下, 例如沙门氏菌和利斯特氏菌 (*listeriae*) 作为选定肿瘤抗原的载体来突破患者对其肿瘤的免疫耐受性 (DE 102 08 653; DE 102 06 325, 未公开)。还没有了解通过其突破所述免疫耐受性的机理的全部细节。然而, 注射后发生细菌如沙门氏菌或利斯特氏菌在肿瘤组织中累积, 并通过这些细菌在肿瘤组织中引起炎症, 看来在这中间起了实质性作用。因此, 已知静脉内给药沙门氏菌后, 这些细菌可能在肿瘤组织中累积。然而, 动力学研究已经显示在注射细菌后的早期, 肿瘤组织中只发现少数细菌, 且这些能够在肿瘤组织中择优地焦点生长。因此, 如果在静脉内注射后在肿瘤中观察到相对大量的细菌, 它们源自相对少的母体 (Mei 等, *Anticancer Res* 22: 3261-6 (2002))。然而, 这对于治疗用途是不理想的, 例如用沙门氏菌作为基因载体的基因治疗情况中, 因为在这种情况下, 肿瘤的移生是不均衡的; 相反, 只产生了少数高细菌数的焦点。

除了实际的肿瘤细胞和结缔组织以外, 肿瘤含有相当数量的白细胞, 尤其是淋巴细胞 (肿瘤-浸润淋巴细胞; TIL) 和巨噬细胞 (肿瘤-相关巨噬细胞; TAM)。设想白细胞的肿瘤定位通过肿瘤细胞的表达产

物来影响,尤其是通过细胞因子、内皮素以及通过缺氧(Sica等, *Int Immunopharmacol*, 2: 1045-1054 (2002); Grimshaw等, *Eur J Immunol*, 32: 2393-2400 (2002))。

位于肿瘤中的白细胞的功能是自相矛盾的。尤其是已经证明 TAM 具有抗肿瘤活性(抗原呈递;细胞毒性;Funada等, *Oncol Rep*, 10: 309-313 (2003); Nakayama等, *AntiCancer Res* 22: 4291-4296); Kataki等, *J Lab Clin Med*, 140: 320-328 (2002))和促进肿瘤生长活性(分泌生长因子;促进血管生成和病灶转移; Leek 和 Harris J., *Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7: 177-189 (2002); 细胞毒性细胞因子如 IL-1 α ; IL-1 β ; IL-6; TNF α 减少的分泌; Kataki等, *J Lab Clin Med*, 140: 320-328 (2002))。

已经作出一些时间的尝试通过给药细胞毒性淋巴细胞、TIL、自然杀伤细胞、巨噬细胞或树突细胞来影响肿瘤生长。然而,临床结果是自相矛盾的(Faradji等, *Cancer Immunol Immunotherap*, 33: 319-326 (1991); Montovani等, *Immunology Today*, 13: 265-270 (1992); Ravaut等, *British J of Cancer*, 71: 331-336 (1995); Semino等, *Minerva Biotec*, 11: 311-317, 1999))。实验上显示可能的是注射轻度激活的巨噬细胞可以导致肿瘤生长的促进,但是注射高度激活的巨噬细胞可以导致肿瘤生长的抑制(Mantovani等, *Immunology Today*, 13: 265-270 (1992))。关于这一点,经激活的巨噬细胞的给药看来似乎偏好肿瘤的位置(Fidler, *Adv Pharmacol*, 30: 271-326 (1974); Chokri等, *Int J Immunol*, 1: 79-84, (1990))。注射用编码抗肿瘤蛋白的基因序列体外转化的淋巴细胞至今在肿瘤治疗中还没有导致任何临床上的突破(Hege 和 Roberts, *Current Opinion in Biotechnology*, 7: 629-634 (1996))。然而,在这些研究中显示了淋巴细胞,还有其它细胞,尤其是肿瘤细胞,在静脉内注射后,可以到达肿瘤组织(Shao J等, *Drug Deliv* 2 (2001)),但是大多数给药的细胞位于正常组织如肺、脾和肝中(Adams J, *Clin Pathol Mol Path* 49: 256-267 (1996))。

本发明的技术问题

本发明是基于通过将含有编码活性物质的外源 DNA 的微生物定位于靶细胞，尤其是定位于肿瘤的方法可以改善生产方法的技术问题。

本发明的认知和原理以及实施方案

本发明是基于以下的认知：已经受到感染的（即用细菌体外装载的）巨噬细胞或树突细胞，在静脉内给药后将它们运送至肿瘤组织中，在静脉内注射体外装载细菌的巨噬细胞后，定位于肿瘤中的细菌量显著高于静脉内注射相应量游离细菌后；肿瘤中累积被感染的异种肿瘤细胞，且甚至经感染的细胞预先通过辐射失活，仍然维持该效果。

例如，如果巨噬细胞用作沙门氏菌的载体，在两个不同的转基因肿瘤模型中（肺肿瘤模型：Raf 转基因小鼠，Kerkhoff 等，Cell Growth Differ, 11: 185-90（2000），乳房肿瘤模型：Her-2 转基因鼠，Bouchard 等，Cell, 57: 931-6（1989）），静脉内给药装载沙门氏菌的巨噬细胞 18 小时后，在肿瘤组织中检测到的沙门氏菌比静脉内注射相应量游离沙门氏菌后的高十倍多。

在使用异种肿瘤系时，发现是相似的。肿瘤细胞系 4T1（ATCC No. CRL-2539）源自 BALB/c 小鼠乳腺组织的肿瘤，在感染减毒利斯特氏菌后给药于所述的 Raf 肿瘤模型中（C57BL/6 为基础）。使用经感染的细胞这种情况下发现，在肿瘤组织中也是极大增加数量的细菌，甚至在细胞预先经过辐射的情况下也维持这种现象。

因此原理上可能的是将这些令人惊讶的观察延伸至任何细胞，只要这些细胞可以通过细菌感染或细菌能在其上牢固附着，并因此是这些细菌的载体。因此，例如在上述的肿瘤模型中，在静脉内注射沙门氏菌感染的肿瘤细胞后，发现肿瘤组织中沙门氏菌的定位比静脉内注射相应量游离沙门氏菌后大得多。

细菌具有强烈辅助效果，尤其是通过细菌的组成部分，如脂多糖（LPS）、细胞壁成分、鞭毛、具有免疫刺激 CpG 基序的细菌 DNA，其

中所有的和抗原呈递细胞上的各种所谓的 Toll 样受体 (TLR) 相互作用, 并因此能刺激它们。因此期望用细菌感染的细胞并将这些细胞给药, 不仅能带来细菌在肿瘤中累积的提高, 而且该感染还能引起炎症以及增强全身和局部免疫反应。因此该方法还可以作为免疫治疗的一部分来提高局部免疫反应。

因此, 本发明涉及装载了细菌的哺乳动物细胞, 并涉及这些细胞用于预防或治疗疾病的用途。

本发明范围内的细胞可以是例如自体的、同种异体的或异种的巨噬细胞、淋巴细胞、树突细胞或肿瘤细胞。当使用肿瘤细胞时, 它们优选是经辐射过的或用细胞抑制剂处理过的, 以此来阻断它们的分裂能力。优选通过本领域技术人员已知方法从血液或肿瘤中分离这样的细胞。然而, 还可能的是使用正常组织或肿瘤的在培养中建立的称为细胞系的自体的、同种异体的或异种的细胞。这样的细胞系是以任何种类和数量可获得的, 例如来自细胞文库如美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。此外还可能的是使用通过本领域技术人员已知方法改造过的细胞。在此的改造包括尤其是基因修饰, 以及另外的细胞装载如用肽、蛋白质、药物活性物质或病毒颗粒。

本发明范围内的装载是将细菌吸附至细胞上, 通过细胞和/或细胞感染的细菌吞噬作用。

本发明范围内的细菌是例如革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌, 优选任意地胞内细菌, 优选沙门氏菌或利斯特氏菌, 优选细菌能够分裂但不具有对接受者的致病性或其毒性是减毒的或是灭活的。减毒细菌的特征在于例如这些细菌的至少一个染色体的用于代谢酶的至少一个基因是被删除的或突变的, 使得代谢酶是有缺陷的。这些细菌中, 可能的是 i) 删除染色体中合成芳族氨基酸的酶的一个基因, 例如 *aroA* 基因, 其编码芳族氨基酸生物合成中的第一个酶, 使得这些细菌的生长依赖于芳族氨基酸的存在, ii) 可能是使细菌移动的蛋白质未削弱地表达, 例如因为 *iap* 和 *actA* 基因的能力, 保留其功能, 和 iii) 删除染色体中编码色氨酸-tRNA 合成酶的基因 *trpS*, 已经引入这些细菌

的质粒中, iv) 通过合适的复制源例如 *ori pAM β 1* (Simon 和 Chopin, 1988) 使其复制稳定, v) 其包括编码色氨酸-tRNA 合成酶的 *trpS* 基因, vi) 其包括细胞内容素的基因, 例如噬菌体 A118 的胞溶基因 (*ply118*; Loessner 等, 1995), 该胞溶基因在启动子控制下在哺乳动物细胞的胞液中可被激活, 例如 *actA* 启动子 (*PactA*, Dietrich 等, 1998), 和 vii) 其包括编码至少一种活性物质的至少一个核苷酸序列, 该序列在启动子控制下在细菌或哺乳动物细胞中可被激活, 启动子的激活可以是非细胞特异性的、细胞特异性的、细胞周期特异性的、细胞功能特异性的或取决于代谢物、药物或氧浓度。

由于必需的代谢蛋白质的至少一个基因的缺失, 这种类型的细菌呈现出毒性的剧烈降低, 例如通过它们体内增殖能力测量的, 且仍然显示了显著提高的细菌感染、细菌在胞液中的裂解、该细菌含有的质粒的释放, 和质粒编码的活性物质的稳定表达。这样的细菌微生物通常包含编码活性物质的外源核酸序列, 且任选地在调控核酸序列控制下, 其中微生物染色体 DNA 中, 细菌固有的编码细菌酶表达的核酸序列是被删除的或突变的, 附带条件是其产生的翻译产物是非功能性的, 且其中微生物含有编码酶的非外源核酸序列。

胞内细菌的实例是: 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、牛分枝杆菌 (*M. bovis*)、牛分枝杆菌菌株 BCG、BCG 次代菌株、鸟分枝杆菌 (*M. avium*)、胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)、非洲分枝杆菌 (*M. africanum*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、海分枝杆菌 (*M. marinum*)、溃疡分枝杆菌 (*M. ulcerans*)、鸟分枝杆菌副结核亚种、星状诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*)、其他诺卡氏菌属菌种、嗜肺性军团病杆菌 (*Legionella pneumophila*)、其他军团病杆菌菌种、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)、其他沙门氏菌菌种、志贺氏菌 (*Shigella*) 菌种、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)、溶血性巴斯德氏菌 (*Pasteurella haemolytica*)、多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*)、其他巴斯德氏菌属菌种、胸膜肺炎放线

杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、绵羊利斯特氏菌 (*L. ivanovii*)、流产布鲁氏杆菌 (*Brucella abortus*)、其他布鲁氏杆菌属菌种、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)、砂眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、鸚鵡热衣原体 (*Chlamydia psittaci*) 和 Q 热病原体 (*Coxiella burnetii*)。

沙门氏菌减毒的实例是：pab 基因、pur 基因、aro 基因、asd、dap 基因、nadA、pncB、galE、pmi、fur、rpsL、ompR、htrA、hemaA、cdt、cya、crp、dam、phoP、phoQ、rfc、poxA、galU、metL、methH、mviA、sodC、recA、ssrA、ssrB、sirA、sirB、sirC、inv、hilA、hilC、hilD、rpoE、flgM、tonB 或 slyA 及其组合的失活突变。通过用于沙门氏菌减毒的实例方法使所列基因失活突变是本领域技术人员熟知的。

本发明进一步涉及为细菌载体的细胞，已经将编码蛋白质的核酸序列引入这些细菌中，这些蛋白质优选表现出预防或治疗疾病的活性物质。

这样的蛋白质可以是例如：感染物如病毒、细菌、支原体、寄生虫的抗原，肿瘤特异性抗原，尤其是致癌基因编码的蛋白质，抗体，抗体的抗原决定簇结合片段和含有抗体的至少一个抗原决定簇结合片段的融合蛋白，该抗体定向对抗肿瘤细胞上的、淋巴细胞如 T 淋巴细胞上的、或内皮细胞如肿瘤内皮细胞上的抗原，酶，尤其是激活药物无活性前体的酶，例如， β -葡糖苷酸酶，磷酸酯酶，水解酶，脂酶，免疫抑制细胞因子如 IL-10，免疫刺激细胞因子如 IL-1、IL-2、IL-3 或 IL-6，趋化因子，干扰素，生长因子如 G-CSF、GM-CSF、M-CSF、FGF；VEGF 或 EGF，或细胞因子、趋化因子、干扰素或生长因子的抑制性蛋白质。

通过合适的启动子来调控这些基因在细菌中的表达，所述启动子可以源自细菌或病毒或真核生物且是非特异性、细胞特异性或功能特异性可激活的。

本发明进一步优选的实施方案中使用基因核酸序列，其能够跨膜表达或通过细菌分泌该基因编码的蛋白质。这样称为信号序列的实例描述于参考文献 EP 1042495、EP 1015023 和 Hess 等，PNAS USA 93:1458-1463 (1996)。

本发明进一步涉及本发明细胞用于预防或治疗疾病的用途。本发明的细胞优选用于治疗肿瘤疾病或免疫疾病。为了该目的，引入细菌的基因编码蛋白质，其具有以下特征：i) 是肿瘤细胞毒性的，ii) 具有促炎症作用，iii) 抑制负调控的免疫细胞，如通过抑制 CTLA-4、B7-H1 或 CD25 或 TGF β ，iv) 具有免疫抑制作用或 v) 可以将细胞毒性的、免疫调节或免疫抑制物质的无活性前体转化成活性物质。

为了预防或治疗疾病，优选给药 100 至 10^9 个细胞，每个细胞优选携带约 0.1 (统计学平均) 至 100 个细菌。将这样的细胞局部给药于皮肤，进入循环、进入体腔、进入组织、进入器官，或口服、直肠或支气管给药至少一次。

使用本发明细胞的疾病是例如肿瘤疾病、自体免疫疾病。慢性炎症和器官移植。

以下通过示范性实施方案更详细地解释本发明。

说明本发明的实施例

实施例 1: 通过感染的自体骨髓巨噬细胞提供鼠伤寒沙门氏菌 7207

1.1: 骨髓巨噬细胞的分离 (M Φ)

将约 2-3 个月大的 BxB 23 小鼠或约 2 个月大的 MMTV/neu 转基因小鼠用于分离骨髓巨噬细胞。根据以下实验方案分离巨噬细胞：i) 从小鼠卸下股骨，ii) 将培养皿中的骨去除软组织并两侧割开，iii) 用 2ml DMEM 10 (DMEM Gibco, 含有 10% FCS Gibco, 2mM L-谷氨酰胺 Gibco, 50 μ M β -巯基乙醇 Gibco) 在 Bluecap 注射器辅助下用 DMEM 10 漂洗骨髓，iv) 在 1200rpm 下离心 5 分钟，抽吸并置于 5ml 分化培养基中。将分化培养基 (DMEM10 + 10ng/ml GM-CSF (重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子; RD 系统, Wiesbaden Cat. No.: 415-ML) 中的细胞数

调节至 1×10^5 个细胞/ml 并以 5ml 为一份分配至 Nunc 培养皿中 (NUNCTM, 58mm, NUNC No.:16955), v) 在 37℃ 和 10%CO₂ 下孵育 8 天, vi)

1.2: 用鼠伤寒沙门氏菌 7207 (SL7207) 体外感染巨噬细胞

用 DMEM 洗涤附着在 NUNC 细胞培养皿上的 MΦ, 然后用细胞刮器收集附着的细胞, 计数并放入分化培养基中。根据以下的实验方案进行 SL7207 的感染 (Hoiseth S.K. 等, Nature 291:238-239 (1981)):

- i) 37℃ 培养箱中, 1 小时: MOI (感染倍数) 1:20, ii) 将 10^6 个巨噬细胞接种于 NUNC 培养皿中的 2ml 培养基中并用 2×10^7 个细菌 (MOI = 20) 在 37℃ 孵育 1 小时, iii) 然后洗涤, iv) 用庆大霉素 (终浓度 100μg/ml (Sigma)) 在 37℃ 孵育 1 小时, v) 洗涤、测定细胞数、涂布于脑心浸液 (BHI) 平板 (Gibco) 上来计数细菌菌落形成单位 (CFU)。

1.3: 装载巨噬细胞的结果

用 20 的 MOI 和 1 小时的装载时间可以恒定地检测到 10^5 个巨噬细胞中约有 10^4 个沙门氏菌。装载 12 小时后, 装载密度大致保持恒定并显示根本没有细菌繁殖。

1.4: 将 SL7207 “体外” 感染的巨噬细胞给药于 BxB23 和 MMTV/neu 肿瘤小鼠

将体外感染的并悬浮于 100μl PBS 中的 5×10^5 个骨髓巨噬细胞静脉内注射入每只 BxB23 和 MMTV/neu 肿瘤小鼠的尾静脉中 (所用的实验动物显示出改善的肿瘤发展, 年龄约 12 个月, BxB23 小鼠中的肺质量由于肺肿瘤为 0.75-1.25g)。根据实验, 每只小鼠注射细菌数为 $3-5 \times 10^4$ 的鼠伤寒沙门氏菌 7207 (通过计数 CFU 来测定)。作为对照, 将鼠伤寒沙门氏菌 7207 静脉内给药至 BxB23 和 MMTV/neu 肿瘤小鼠中 (悬浮于 100μl PBS 中的 2.5×10^5 个细菌每只小鼠)。18 小时后, 牺牲动物并测定肺中 (BxB23) 和肿瘤中 (MMTV) 的 CFU (涂布于 BHI 平

板)。在静脉内注射鼠伤寒沙门氏菌 aroA7207 后,在对照组中研究感染的进程。为了该目的,使用相同实验方案在不同时间通过测定 CFU 来研究细菌数。

1.5: 静脉内注射后鼠伤寒沙门氏菌 7207 在肿瘤中的累积:

在给药沙门氏菌感染的巨噬细胞后,感染 18 小时后,在 BxB23 小鼠的带有肿瘤的肺中和 MMTV/neu 小鼠的乳房肿瘤中检测到的沙门氏菌量,比用游离沙门氏菌处理的对照组中动物的高十倍。注射装载细菌的巨噬细胞后,甚至在注射 18 小时后细菌的累积(高于注射裸细菌 10 倍,参见图 1 及相关表格),和对照组(即,在单独注射细菌后)中仅在一些天后(注射 5 天后)相对获得的一样高。因此,在本发明装载细菌的细胞辅助下,可以在实质上较短的时间内在肿瘤中累积比注射纯细菌悬浮液后所可能的显著多的细菌。在注射本发明细胞后的第 1、7、14 天对肺和器官中 CFU 的测定,揭示了 CFU 保持于恒定的高水平或在带有肿瘤的 BxB23 小鼠的肺中升高了,而 C57BL/6 对照小鼠肺中的 CFU 以及 BxB23 小鼠和 C57BL/6 小鼠脾中的显著低于各自肺中的值或不再能检测到(参见图 2 和图 3,及相关表格;图 2 显示了带有(肺)肿瘤 BxB23 小鼠肺中与 C57BL/6 对照动物肺中的 CFU 比较,图 3 显示了在静脉内注射 5×10^5 个鼠伤寒沙门氏菌后,MMTV/neu 小鼠乳房肿瘤中和脾中的 CFU 比较)。

实施例 2: 通过感染异种细胞提供单核细胞增生利斯特氏菌 (*L. monocytogene*)

将来自 BALB/c 小鼠乳腺肿瘤的肿瘤细胞系的 4T1 细胞(ATCC CRL-2539)用减毒的单核细胞增生利斯特氏菌菌株感染,且在 1 小时的时间段内 MOI 为 10。然后将细胞洗涤,并通过在庆大霉素存在下孵育一小时来杀灭游离细菌。CFU 的测定揭示了细胞装载为每个细胞 0.15 个细菌。将细胞数调节值每 ml PBS 中 5×10^6 个细胞。此外,通过辐射将一些感染的细胞灭活。每只小鼠静脉内注射 0.1ml 该悬浮液

[即, 5×10^5 个感染细胞 (利斯特氏菌测量的 CFU: 7.3×10^4)、 3.5×10^5 感染并经辐射的细胞或 (计数的 CFU) 3.5×10^5 个游离利斯特氏菌, 各在 $100\mu\text{l}$ PBS 中]至带有肿瘤的 BxB23 小鼠中 (年龄 > 10 个月) 或相同大小的 C57BL/6 小鼠中。

所用的辐射剂量是减少的, 通过 CFU 测定来检测, 游离细菌中最大量为 25%, 使得在经辐射过的细胞中计算的感染剂量约为 3.8×10^4 个细菌。

感染 17 小时后, 通过连续涂布 BHI 平板 (Gibco) (检测极限为每个器官 10 个细菌) 测定肺和脾中的细菌 CFU。

根据脾中可检测的 CFU, 所有动物显示了成功感染。注射本发明活的或经辐射过的细胞后, 带有肿瘤的 BxB23 小鼠和 C57BL/6 对照小鼠肺中的 CFU 量明显高于注射细菌悬浮液后的, 且和 C57BL/6 对照小鼠肺中的细菌数相比较, 注射本发明细胞后的细菌数在带有肿瘤的 BxB23 小鼠肺中明显增加 (10 倍)。所有组的脾中可检测的细菌 CFU 显著比肺中的多, 但是在注射本发明细胞或细菌悬浮液后, 在带有肿瘤的 BxB23 小鼠和 C57BL/6 对照小鼠中, 不可能检测到细菌 CFU 量的明显差异 (参见图 4 及相关表格)。

如在上述实验中的对照组已经证明的, 用减毒鼠伤寒沙门氏菌 7207 装载的巨噬细胞, 在减毒单核细胞增生利斯特氏菌的情况中也是如此, 在注射本发明细胞和纯细菌悬浮液约 5 天的时间段内, 脾和其它不带有肿瘤的器官中细菌 CFU 数量减少, 但是注射本发明的细胞和纯细菌悬浮液后最多 14 天带有肿瘤的 BxB23 小鼠和 C57BL/6 对照小鼠中的含量明显低于带有 (肺) 肿瘤 BxB23 肺中的 CFU 水平。

与此相反, 在注射本发明细胞后, 带有 (肺) 肿瘤 BxB23 小鼠肺中细菌 CFU 初始提高的量至少坚持整个时间段或甚至开始时还有所增加, 只在延长的平台期后再次下落。

表 1: 静脉内注射经感染的巨噬细胞或游离沙门氏菌 18 小时后, 被感染的小鼠的肺或肿瘤中的细菌数

小鼠系	鼠伤寒沙门氏菌 + 巨噬细胞			鼠伤寒沙门氏菌		
	CFU	SEM	n	CFU	SEM	n
BxB23 (肺)	9.000	3.600	3	0	0	2
MMTV Her (肿瘤)	5.850	1.552	4	66	66	2

表 2: 在带有 (肺) 肿瘤的 BxB23 小鼠肺中和在 C57BL/6 对照动物肺中的 CFU 比较

天数	BxB23			WTC57/B16		
	CFU	SEM	n	CFU	SEM	n
2	1.485	1.335	2			
3	1.255	229	7	700	600	2
4	910	210	2			
5	2.469	1.503	6			
7	4.499	1.694	6	500	400	2
14	2.900	1.700	2	750	250	2
18	2.225	975	2			

表 3: 静脉内注射 5×10^5 个鼠伤寒沙门氏菌 aroA 后, 在 MMTV/neu 小鼠的乳房肿瘤和脾中的 CFU 比较

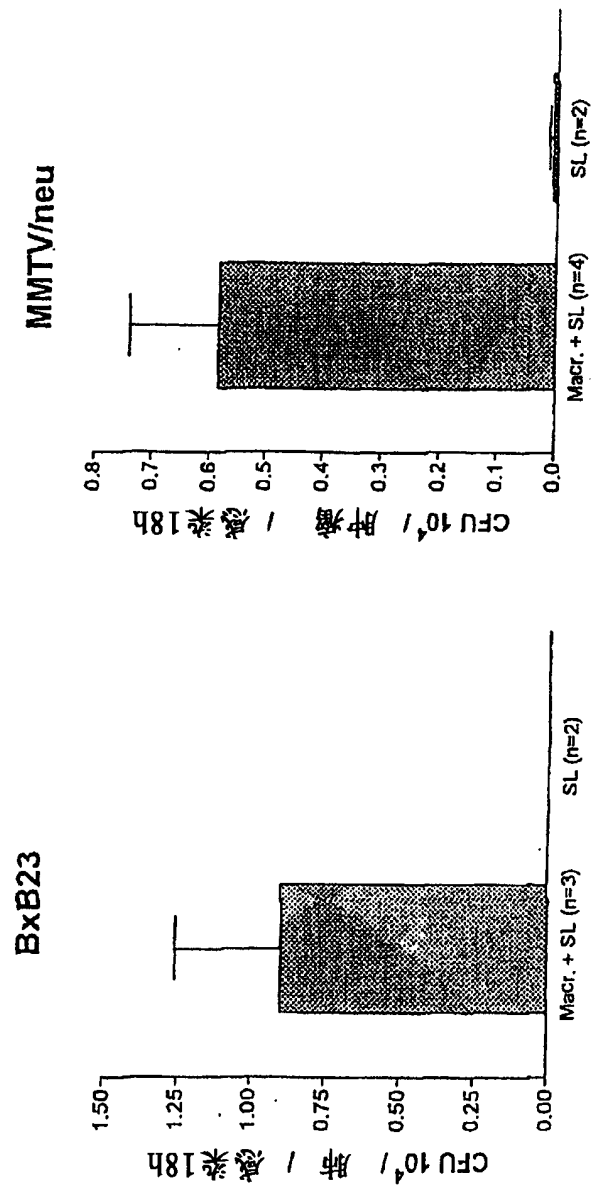
天数	肿瘤			脾		
	对数 (CFU)	SEM	n	对数 (CFU)	SEM	n
3	2.67	0.24	2	4.65	0.10	2
4	3.19	0.68	4			
18	3.20	0.20	2	2.14	0.06	2

表 4: 用 25 戈瑞 (经辐射的细胞) 或未经辐射的 (经感染的细胞) 经感染的 4T1 乳房肿瘤细胞或游离利斯特氏菌感染 17 小时后, 被感染的小鼠中的细菌数

	BxB23			C57BL/6	
	经感染的细胞	经感染的被辐射细胞	单核细胞增生利斯特氏菌 aroA	经感染的细胞	单核细胞增生利斯特氏菌 aroA
对数 (CFU)	3.572	2.437	0.6344	2.601	0.4337
SEM	0.1333	0.5261	0.6344	0.01688	0.4337
n	3	3	3	3	3

表 5: 注射用 25 戈瑞 (经辐射的细胞) 或未经辐射的 (经感染的细胞) 经感染的 4T1 乳房肿瘤细胞或游离利斯特氏菌感染 17 小时后, 被感染的小鼠脾中的细菌数

	BxB23			C57BL/6	
	经感染 的细胞	经感染的 被辐射细胞	单核细胞增生利 斯特氏菌 aroA	经感染 的细胞	单核细胞增生利 斯特氏菌 aroA
对数 (CFU)	5.224	2.934	4.045	4.37	4.57
SEM	0.1596	0.4338	0.9131	0.3023	0.2573
n	3	3	3	3	3



静脉内注射经感染的巨噬细胞或游离沙门氏菌18小时后，经感染的小鼠的肺或肿瘤中的细菌数

图1

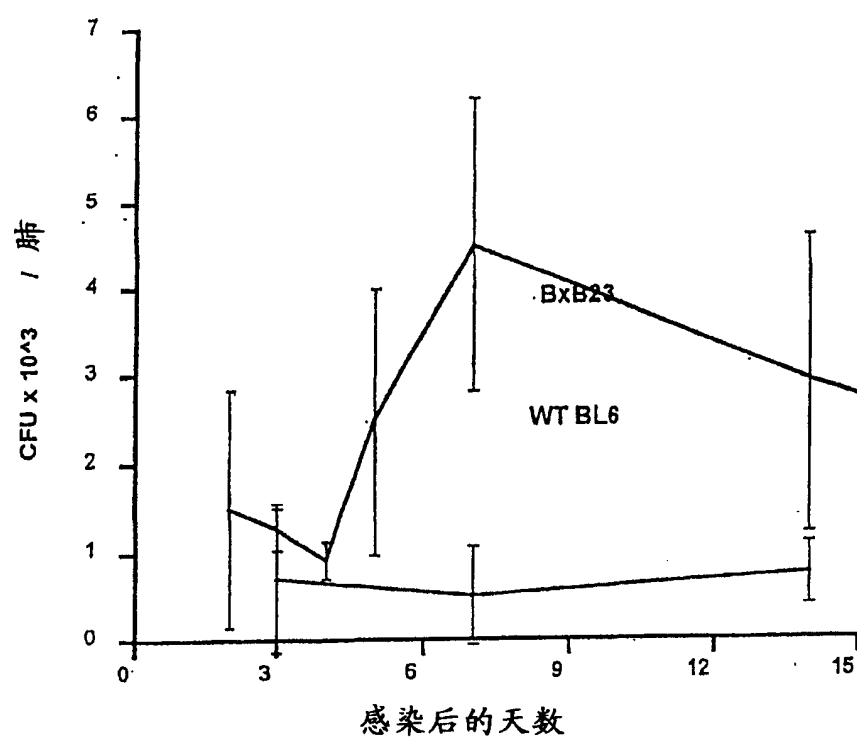
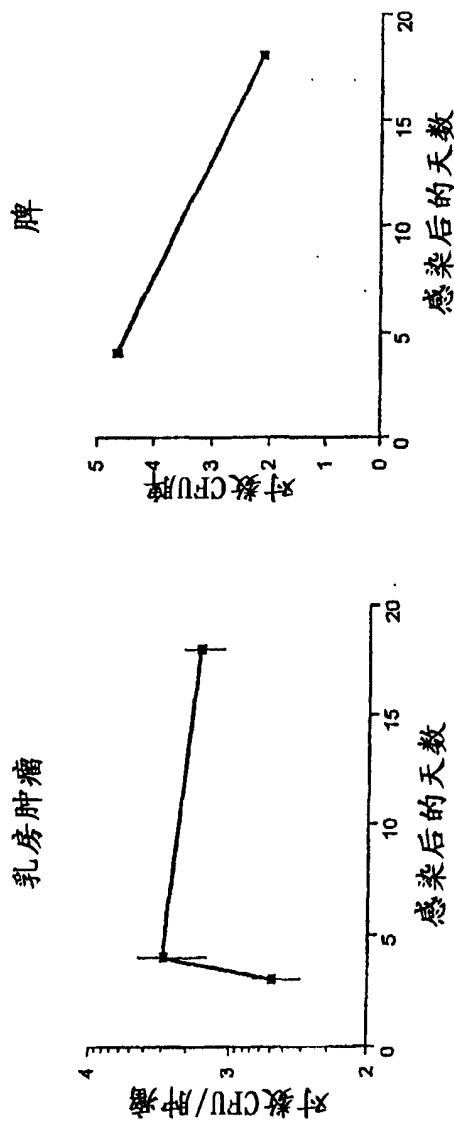
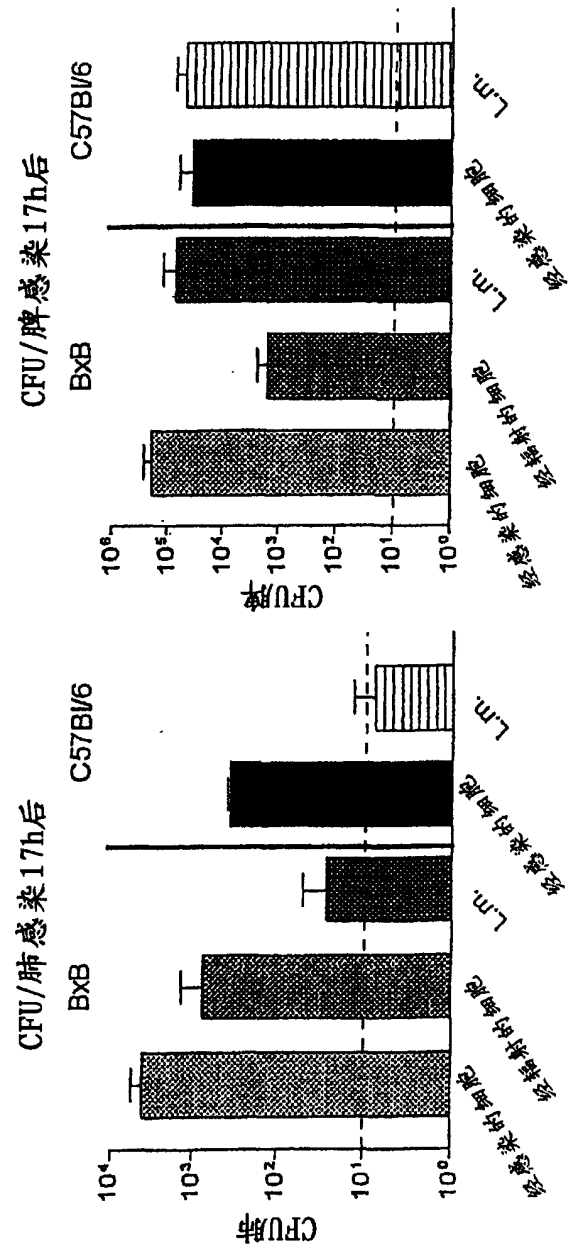


图2



静脉内注射 5×10^5 个鼠伤寒沙门氏菌后,MMTV/new小鼠的乳房肿瘤中的CFU比较

图 3



用经感染的以25戈瑞辐射的(经辐射的细胞)或未经辐射的(经感染的细胞) 4T1乳房肿瘤细胞,或游离利斯特氏菌感染17小时后,经感染的小鼠的肺或脾中的细菌数

图 4