



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103038359 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 10

(21) 申请号 201180033543. 8

(22) 申请日 2011. 06. 03

(30) 优先权数据

12/802, 340 2010. 06. 04 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 01. 06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/001018 2011. 06. 03

(87) PCT申请的公布数据

W02011/152883 EN 2011. 12. 08

(71) 申请人 德克萨斯 A&M 大学体系

地址 美国德克萨斯州

申请人 利兰·斯坦福青年大学托管委员会

(72) 发明人 J·D·奇里洛 J·C·萨凯帝尼

饶江洪 谢贺新

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

C12Q 1/34 (2006. 01)

C12Q 1/04 (2006. 01)

G01N 33/52 (2006. 01)

G01N 33/15 (2006. 01)

C12R 1/32 (2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 41 页 附图 53 页

(54) 发明名称

细菌 β -内酰胺酶在体外诊断及体内成像、
诊断和治疗中的用途

(57) 摘要

本发明提供使用针对细菌性酶的底物,用于检测、量化、区分、诊断和成像病原性细菌或与其相关的状况的方法。比较在细菌的存在下由底物或酶产品与对照发射的荧光、冷光或比色信号,以检测和定位所述病原性细菌。本发明提供一种通过测量在存在或不存在潜在的治疗剂下由底物或产品发射的信号而用于筛选治疗剂以治疗病理生理状况的方法和一种通过使生物样品接触底物并使由分支杆菌 β -内酰胺酶产品发射的信号成像而用于检测受试者中的分支杆菌感染的诊断方法。本发明还提供发荧光的底物或包含有效诱导颜色或 pH 变化的着色染料或化学试剂的底物。

1. 一种用于实时检测受试者中的病原性细菌的方法,其包含:
向受试者中引入针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的底物或者使来自于受试者的生物样品或从表面获得的生物样品与针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的底物接触;
使受试者或样品的 β -内酰胺酶对于底物活性得到的产物成像;和
获取由 β -内酰胺酶产物发射的波长信号,从而检测受试者中的病原性细菌。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其进一步包含建立发射信号的 3D 重建,以测定受试者中病原性细菌的位置。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其进一步包含量化和 / 或区分生物样品中的已感染细胞与未感染细胞。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中通过利用流式细胞术、共聚焦显微镜法或荧光光谱法中的一种或多种来进行已感染细胞的区分和 / 或量化步骤。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述底物是荧光基因底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5. 2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800. 2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述底物包含有效地诱导颜色或 pH 变化的着色染料或化学试剂。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述底物被连接至颗粒或微球或被连接至生物素。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述生物样品是痰液、胸腔积液、尿液、血液、唾液、粪便或通过擦拭受试者上感兴趣的区域而获得的样品。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述病原性细菌是拟杆菌属、梭菌属、链球菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属、嗜血杆菌属、军团菌属、分支杆菌属、埃希氏菌属、沙门氏菌属、志贺氏菌属或李斯特菌属的细菌物种。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述病原性细菌包含结核分支杆菌复合物或鸟分支杆菌复合物。
11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中获取的信号是荧光、冷光或比色信号。
12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中成像波长是从大约 300nm 至大约 900nm 并且发射波长是从大约 300nm 至大约 900nm。
13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述成像波长是大约 540nm 至大约 730nm 并且所述发射波长是大约 650nm 至大约 800nm。
14. 一种用于诊断与受试者中的病原性细菌相关的病理生理状况的方法,其包含:
向受试者施用针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的底物或使衍生自受试者的生物样品接触针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的底物;
使受试者的 β -内酰胺酶对于底物活性的产物成像;和
在产物的发射波长下实时测量信号强度,其中大于测量的对照信号的信号强度与病理生理状况的诊断相关联。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其进一步包含建立信号的 3D 重建,以确定微生物病原体的位置。

16. 根据权利要求 14 所述的方法,其进一步包含量化和 / 或区分生物样品中的已感染细胞与未感染细胞。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中通过利用流式细胞术、共聚焦显微镜法或荧光光谱法中的一种或多种来进行已感染细胞的区分和 / 或量化步骤。

18. 根据权利要求 14 所述的方法,其进一步包含施用有效治疗病理生理状况的一种或多种治疗性化合物。

19. 根据权利要求 14 所述的方法,其进一步包含:

向受试者再次施用所述底物或使衍生自受试者的生物样品接触所述底物;和

使受试者或所述生物样品成像以监控治疗性化合物的有效性;其中与诊断信号相比的发射信号的降低表明对病理生理状况的治疗效果。

20. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述病理生理状况是结核病。

21. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述生物样品是痰液、胸腔积液、尿液、血液、唾液、粪便或通过擦拭受试者上感兴趣的区域而获得的样品。

22. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述病原性细菌包含拟杆菌属、梭菌属、链球菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属、嗜血杆菌属、军团菌属、分支杆菌属、埃希氏菌属、沙门氏菌属、志贺氏菌属或李斯特菌属的细菌物种。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述病原性细菌包含结核分支杆菌复合物或鸟分支杆菌复合物。

24. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述底物是荧光基因底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5. 2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800. 2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物。

25. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述底物包含有效地诱导颜色或 pH 变化的着色染料或化学试剂。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述底物被连接至颗粒或微球或被连接至生物素。

27. 根据权利要求 14 所述的方法,其中测得的信号是荧光、冷光或比色信号。

28. 根据权利要求 14 所述的方法,其中成像波长是从大约 300nm 至大约 900nm 并且发射波长是从大约 300nm 至大约 900nm。

29. 根据权利要求 28 所述的方法,其中所述成像波长是大约 540nm 至大约 730nm 并且所述发射波长是从大约 650nm 至大约 800nm。

30. 一种用于检测受试者中分支杆菌感染的诊断方法,其包含:

从受试者处获得生物样品;

使生物样品接触分支杆菌 β -内酰胺酶的底物;

使生物样品的 β -内酰胺酶对于底物活性的产物成像;和

在产物的发射波长下测量信号强度,其中大于测量的对照信号的信号强度显示分支杆菌感染的存在。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其进一步包含量化和 / 或区分生物样品中的已感染细胞与未感染细胞。

32. 根据权利要求 31 所述的方法,其中通过利用流式细胞术、共聚焦显微镜法或荧光光谱法中的一种或多种来进行已感染细胞的区分和 / 或量化步骤。

33. 根据权利要求 30 所述的诊断方法,其进一步包含:

重复所述方法步骤一次或多次,以监控基于分支杆菌感染检测的施用于受试者的治疗方案的治疗有效性;其中与对照相比的测量信号的降低与治疗方案的阳性应答相关联。

34. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述生物样本是痰液、胸腔积液、尿液、血液、唾液、粪便或通过擦拭受试者上感兴趣的区域而获得的样品。

35. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述分支杆菌感染由结核分支杆菌或结核分支杆菌复合物或鸟分支杆菌或鸟分支杆菌复合物引起。

36. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述底物是荧光基因底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5. 2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800. 2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物。

37. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述底物包含有效地诱导颜色或 pH 变化的着色染料或化学试剂。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述底物被连接至颗粒或微球或被连接至生物素。

39. 根据权利要求 30 所述的方法,其中测得的信号是荧光、冷光或比色信号。

40. 根据权利要求 30 所述的方法,其中成像波长是从大约 300nm 至大约 900nm 并且发射波长是从大约 300nm 至大约 900nm。

41. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述成像波长是从大约 540nm 至大约 730nm 并且所述发射波长是从大约 650nm 至大约 800nm。

42. 一种用于筛选治疗性化合物的方法,所述治疗性化合物有效用于治疗与受试者中的病原性细菌有关的病理生理状况,其包含:

选择针对病原性细菌的潜在的治疗性化合物;

使细菌细胞或包含所述细菌细胞的生物样品接触其细菌 β -内酰胺酶底物;

使所述细菌细胞或包含所述细菌细胞的生物样品接触潜在的治疗性化合物;和

在存在和不存在所述潜在的治疗性化合物下测量由所述细菌细胞产生的荧光、冷光或比色信号;其中与不存在治疗性化合物的信号相比的存在治疗性化合物的信号的降低表明所述化合物对抗病原性细菌的治疗效果。

43. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述底物是荧光基因底物 CC1、CC2、CHPQ、CR2、CNIR1、CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5. 2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、CNIR800、CNIR800. 2、CNIR800-3、CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物。

44. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述底物包含有效地诱导颜色或 pH 变化的着色染料或化学试剂。

45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述底物被连接至颗粒或微球或被连接至生物素。

46. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述病原性细菌包含拟杆菌属、梭菌属、链球

菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属、嗜血杆菌属、军团菌属、分支杆菌属、埃希氏菌属、沙门氏菌属、志贺氏菌属或李斯特菌属的细菌物种。

47. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述病原性细菌包含结核分支杆菌复合物或鸟分支杆菌复合物。

48. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述病理生理状况是结核病。

49. 根据权利要求 42 所述的方法,其中由细菌细胞产生的信号具有从大约 300nm 至大约 900nm 的波长。

50. 根据权利要求 49 所述的方法,其中所述由细菌细胞产生的信号具有从大约 650nm 至大约 800nm 的波长。

51. 一种针对细菌 β -内酰胺酶的底物,所述底物基于 β -内酰胺酶对其的活性产生可检测的荧光、冷光或比色信号。

52. 根据权利要求 51 所述的底物,其中所述底物是荧光基因底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5. 2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800. 2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物。

53. 根据权利要求 51 所述的底物,其中所述底物包含着色染料或化学试剂,所述着色染料或化学试剂基于 β -内酰胺酶对其的活性有效地产生颜色或 pH 变化。

54. 根据权利要求 51 所述的底物,其进一步包含与其连接的颗粒、微球或生物素。

55. 一种用于可视化检测生物样品中病原性细菌的分析设备,其包含:

平台,所述平台具有用于接收孵育混合物的装置,所述孵育混合物包含生物样品和针对与病原性细菌有关的 β -内酰胺酶的生色底物,并且所述平台具有用于捕获和浓缩由 β -内酰胺酶对于底物的活性产生的着色产物的装置,所述装置与所述接收装置液体相连。

56. 根据权利要求 55 所述的分析设备,其进一步包含用于仅允许着色产物从所述接收装置向下游流动的装置。

57. 根据权利要求 55 所述的分析设备,其进一步包含在所述接收装置下游的内部对照。

58. 根据权利要求 55 所述的分析设备,其进一步包含用于吸收在所述接收装置下游的流体的装置。

59. 根据权利要求 55 所述的分析设备,其中所述底物包含着色染料或化学试剂。

60. 根据权利要求 55 所述的分析设备,其中所述底物被连接至颗粒或微球。

61. 根据权利要求 55 所述的分析设备,其中所述底物包含化学试剂,所述设备进一步包含第二试剂,以便由所述化学试剂产生颜色。

62. 根据权利要求 55 所述的分析设备,其中所述底物与生物素连接,所述设备进一步包含抗生物素蛋白,以便捕获与生物素连接的底物。

细菌 β -内酰胺酶在体外诊断及体内成像、诊断和治疗中的用途

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本国际申请依据法条 35U. S. C. § 120 要求享有于 2010 年 6 月 4 日提交的美国序号为 12/802, 340 的未决的部分接续申请(continuation-in-part patent application)的优先权, 其依据法条 35U. S. C. § 120 要求享有于 2009 年 8 月 6 日提交的美国序号为 12/462, 644 的未决的非临时申请的优先权, 其依据法条 35U. S. C. § 119(e) 要求享有于 2008 年 12 月 24 日提交的美国序号为 61/203, 605 的临时申请(目前已放弃)以及于 2008 年 8 月 6 日提交的美国序号为 61/188, 112 的临时申请(目前已放弃)的优先权, 将上述申请的全部内容整体并入文中以供参考。

技术领域

[0003] 本发明通常涉及药物、病原微生物学和成像技术领域。更具体而言, 本发明涉及在受试者的体外或体内成像过程中用于检测和定位细菌病原体的化合物和报告子。

背景技术

[0004] 在世界范围内, 许多细菌感染造成显著的发病率和死亡率, 并且许多最重要的细菌物种是 β -内酰胺酶阳性的, 这使其耐受标准的青霉素样抗生素。许多这种感染和青霉素耐受的出现的诊断通常是困难的, 并且在灵敏地测定之前需要大量诊断实验室培养。

[0005] 例如, 目前将近三分之一的世界人口感染了结核病并且其仍然对公共卫生构成严峻的威胁。当意识到在世界范围内持续存在有多药耐药和广泛耐药菌株(其不能够被轻易治疗)时, 人们对其的关注度也大大提高。用于量化和评价在实验室中、组织培养细胞中以及动物模型和人类感染过程中的结核病活力的现有方法限于菌落形成单位(CFU)的测定和/或组织和痰液的显微成像法。这些方法费时, 往往难以解释, 并且相对不敏感。大多数方法需要侵入性过程, 在动物和人的情况下, 所述侵入性过程必须在死后进行。无论是在动物模型中还是在患者体内, 这些不足均使得所述方法难以跟踪疾病的进展, 疫苗的有效性和治疗的结果。光学成像方法将允许直接观察结核病在感染过程中的活力、疗法的有效性以及使用活体动物以非侵入性方式在疾病过程中实时定位细菌。

[0006] 因此, 本领域中公认的需要是用于成像和诊断细菌性疾病的改进方法。更具体而言, 现有技术针对 β -内酰胺酶阳性细菌的灵敏度和特异性实时光学成像方法方面存在缺陷, 所述 β -内酰胺酶阳性细菌能够在体外和活体受试者体内使用来诊断和定位细菌感染、迅速筛选新的疗法以及鉴定新的药物靶标。本发明满足了本领域中这一长期的需要和愿望。

发明内容

[0007] 本发明涉及一种用于实时检测受试者中病原性细菌的方法。该方法包含向受试者或来源于其的生物样品中引入针对病原性细菌 β -内酰胺酶的荧光、冷光或比色底物,

并且使受试者或样品的 β -内酰胺酶对于底物的活性所得到的产物成像。获取由 β -内酰胺酶产物发射的波长信号,从而检测受试者中的病原性细菌。本发明涉及一种相关的方法,其进一步包含建立发射信号的 3D 重建,以测定受试者中病原性细菌的位置。本发明涉及另一种相关的方法,其进一步包含在发射信号比测量的对照信号的强度大的基础上,实时诊断与病原性细菌相关的病理生理状况。例如,所述荧光、冷光或比色底物是 CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、笼式荧光素(caged luciferin)、比色试剂或其衍生物或类似物。

[0008] 本发明涉及一种用于实时检测病原性细菌的相关的方法。该方法包含向受试者中引入针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的底物或者使所述针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的底物接触来自于受试者的或由受试者表面获得的生物样品,并且使受试者或样品的 β -内酰胺酶对于底物的活性所得到的产物成像。获取由 β -内酰胺酶产物发射的波长信号,从而检测受试者中的病原性细菌。本发明涉及一种相关的方法,其进一步包含在生物样品中量化和区分已感染细胞与未感染细胞的步骤中的一种或两种。本发明涉及另一种相关的方法,其进一步包含建立发射信号的 3D 重建,以测定受试者中病原性细菌的位置。例如,所述底物可以是荧光基因(fluorogenic)底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5. 2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800. 2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物,或者包含一种着色染料或化学试剂的底物,所述着色染料或化学试剂基于 β -内酰胺酶对它们的活性有效地产生颜色或 pH 变化。

[0009] 本发明还涉及一种用于诊断与受试者中的病原性细菌相关的病理生理状况的方法。该方法包含为受试者施用针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的荧光基因或冷光底物或使衍生自所述受试者的生物样品接触针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的荧光基因或冷光底物,并且使受试者的 β -内酰胺酶对于底物的活性的产物成像。在产物的发射波长下实时测量荧光、冷光或比色信号强度,以使得大于测量的对照信号的荧光、冷光或比色信号强度与病理生理状况的诊断相关联。本发明涉及一种相关的方法,其进一步包含建立信号的 3D 重建,以测定微生物病原体的位置。本发明涉及另一种相关的方法,其进一步包含施用有效治疗病理生理状况的一种或多种治疗性化合物。本发明涉及另一种相关的方法,其包含向受试者再次施用荧光基因化合物并使受试者再次成像或使衍生自受试者的生物样品与所述荧光基因底物接触;并且使受试者或所述生物样品成像以监控治疗性化合物的有效性,以使得与诊断信号相比的发射信号的降低表明对病理生理状况的治疗效果。例如,所述荧光基因或冷光底物是 CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、笼式荧光素、比色试剂或其衍生物或类似物。

[0010] 本发明涉及一种用于诊断与受试者中病原性细菌相关的病理生理状况的相关的方法。该方法包含为受试者施用针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的底物或使其接触衍生自受试者的生物样品,并且使受试者的 β -内酰胺酶对于底物的活性的产物成像。在产物的发射波长下实时测量信号强度(例如,荧光、冷光或比色信号);其中大于测量的对照信号的信号强度与病理生理状况的诊断相关联。本发明涉及一种相关的方法,其进一步包含在生物样品中量化和区分感染细胞与未感染细胞的步骤中的一种或两种。本发明涉及另一种相关的方法,其进一步包含建立信号的 3D 重建,以测定微生物病原体的位置。特别地,所述底

物可以是荧光基因底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5. 2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800. 2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物,或者包含一种着色染料或化学试剂,所述着色染料或化学试剂基于 β -内酰胺酶对它们的活性有效地产生颜色或 pH 变化。

[0011] 本发明进一步涉及一种用于检测受试者中分支杆菌感染的诊断方法。所述方法包含从受试者处获得生物样品,并且使所述生物样品与分支杆菌 β -内酰胺酶接触。使所述生物样品成像来检测 β -内酰胺酶对于底物的活性的产物,以及在产物的发射波长下测量信号强度,其中大于测量的对照信号的信号强度显示分支杆菌感染的存在。本发明涉及一种相关的方法,其进一步包含在生物样品中量化和区分已感染细胞与未感染细胞的步骤中的一种或两种。本发明涉及另一种相关的方法,其进一步包含重复这些方法步骤一次或多次,以监控基于分支杆菌检测的施用于受试者的治疗方案的治疗有效性,其中与对照相比的测量信号的降低与治疗方案的阳性应答相关联。所述底物可以是荧光基因底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5. 2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800. 2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物,或者包含一种着色染料或化学试剂,所述着色染料或化学试剂基于 β -内酰胺酶对它们的活性有效地产生颜色或 pH 变化。

[0012] 此外,本发明进一步涉及一种用于筛选治疗性化合物的方法,所述治疗性化合物有效用于治疗与受试者中的病原性细菌有关的病理生理状况。该方法包含选择一个针对病原性细菌的潜在的治疗性化合物,使细菌细胞或包含所述细菌细胞的生物样品与荧光、冷光或比色检测剂接触,以及使细菌细胞与潜在的治疗性化合物接触。在存在和不存在所述潜在的治疗性化合物的条件下测量由细菌细胞或包含所述细菌细胞的生物样品产生的荧光、冷光或比色信号,以便与不存在治疗性化合物的条件下的信号相比存在治疗性化合物的条件下的信号的降低表明所述化合物对抗病原性细菌的治疗效果。例如,所述荧光、冷光或比色检测剂是 CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、笼式荧光素、比色试剂或其衍生物。

[0013] 本发明涉及一种用于筛选治疗性化合物的方法,所述治疗性化合物有效用于治疗与受试者中的病原性细菌相关的病理生理状况。该方法包含紧接上文描述的,使用荧光基因底物作为检测剂的步骤,所述荧光基因底物是 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5. 2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800. 2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物,或者包含一种着色染料或化学试剂,所述着色染料或化学试剂基于 β -内酰胺酶对于它们的活性有效地产生颜色或 pH 变化。

[0014] 此外,本发明进一步涉及一种用于使病原性细菌成像的方法。该方法包含使病原性细菌与针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的荧光基因底物接触,对于 β -内酰胺酶对于底物的活性的产物,向病原性细菌递送一个激发波长,并获取发射自产物的荧光、冷光或比色信号。产生获取的信号 3D 重建,从而使病原性细菌成像。

[0015] 此外,本发明进一步涉及一种针对细菌 β -内酰胺酶的底物,所述底物基于 β -内酰胺酶对其的活性产生可检测的荧光、冷光或比色信号。代表性底物包括但不限于 CDC-1、

CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5.2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800.2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物,或者包含一种着色染料或化学试剂,所述着色染料或化学试剂基于 β -内酰胺酶对它们的活性有效地产生颜色或 pH 变化。本发明涉及另一种相关的底物,其进一步包含颗粒、微球或与其连接的生物素。

[0016] 此外,本发明进一步涉及一种用于实时检测受试者中的病原性细菌的方法。该方法包含向受试者引入用与 γ 发射相关的同位素进行放射性标记的底物,其中所述底物针对 β -内酰胺酶或者病原性细菌特定的其它酶或蛋白质。对于受试者的放射性标记底物的 γ 发射,在所述底物上的活性过程中成像,并获取由发射的 γ 射线产生的信号。产生基于 γ 射线产生的信号强度的,放射性标记在受试者中的浓度的 3D 重建,从而检测病原性细菌。本发明涉及一种相关的方法,其进一步包含基于病原性细菌的检测实时诊断与病原性细菌相关的病理生理状况。本发明涉及另一种相关的方法,其进一步包含施用一种或多种治疗性化合物,所述治疗性化合物有效用于治疗病理生理状况。此外,本发明涉及另一种相关的方法,其进一步包含向受试者再次施用放射性标记的底物以及使所述受试者再次成像以监控治疗性化合物的有效性;其中与诊断时的 γ 发射相比的 γ 发射的降低表明对病理生理状况的治疗效果。

[0017] 此外,本发明进一步涉及如本文所述的针对适合于 PET 或 SPECT 成像的细菌 β -内酰胺酶的放射性标记底物。

[0018] 此外,本发明进一步涉及一种用于可视化检测生物样品中病原性细菌的分析设备。所述分析设备包含平台,所述平台具有用于接收孵育混合物的装置,所述孵育混合物包含生物样品和针对与病原性细菌有关的 β -内酰胺酶的生色底物,并且所述平台具有用于捕获和浓缩由 β -内酰胺酶对于底物的活性产生的着色产物的装置,所述装置与所述接收装置液体相连。本发明涉及一项相关的发明,其进一步包含用于仅允许着色产物从所述接收装置向下游流动的装置。本发明涉及一项相关的发明,其进一步包含在所述接收装置下游的内部对照。本发明涉及另一项相关的发明,其中底物包含化学试剂并且设备进一步包含第二试剂,以便由所述化学试剂产生颜色。本发明涉及另一项相关的发明,其中底物与生物素连接并且设备进一步包含抗生物素蛋白,以便捕获与生物素连接的底物。

[0019] 通过对下列本发明的优选实施方案的描述,其它的和进一步的目的、特征和优点将是显而易见的,所述本发明的优选实施方案的给出仅出于公开的目的。

附图说明

[0020] 为了达到和详细理解本发明的上述特征、优点和目的,以及将变得更加清楚的其它内容,通过引用在附图中阐明的本发明的具体实施方案可以获得上面简要概括的本发明更加具体的描述。这些附图形成本说明书的一部分。然而,值得注意的是,附图仅仅阐明本发明的优选实施方案,而不应被认为是限制了本发明的范围。

[0021] 图 1A-1C 显示在用 CNIR4 浸泡之前的 BlaC 突变体结晶(图 1A)和保留 CNIR4 底物的 BlaC 突变体结晶(图 1B)。图 1C 阐明通过 Mtb BlaC 的头孢噻肟催化以及通过内酰胺环水解形成的产物。

[0022] 图 2A-2C 描述在通过 β -内酰胺酶水解之前和之后的 CC1 和 CC2 (图 2A)、CHPQ

(图 2B) 以及 CR2 (图 2C) 的结构。

[0023] 图 3 描绘 CNIR1、CNIR2、CNIR3 和 CNIR4 的结构及其通过 β -内酰胺酶的水解。

[0024] 图 4A-4D 描绘用于制备近红外底物 CNIR5 的合成方案(图 4A),用于大规模、商业化制备 CNIR5 的替代合成方案(图 4B),在存在和不存在 β -内酰胺酶的条件下荧光强度对 CNIR5 波长的图(图 4C)和 CNIR5-QSY22 的结构(图 4D)。

[0025] 图 5A-5D 描绘 QSY21 (图 5A)、QSY21 二磺酸(图 5B)和 QSY22 二磺酸(图 5C)的结构以及 QSY22 二磺酸的化学合成(图 5D)。

[0026] 图 6A-6B 描绘 CNIR7 的结构(图 6A)及其化学合成(图 6B)。

[0027] 图 7A-7B 描绘用于 CNIR9 (图 7A)和 CNIR10 (图 7B)的合成方案。

[0028] 图 8A-8F 描述荧光基因底物 CDC-1-5 的合成方案和水解动力学。图 8A 显示 CDC-1-4 的合成。图 8B-8C 显示在 TEM-1B1a 或 Mtb BlaC 分别处理之后探针 CDC-1、2、3、4 于 455nm 处的发射对时间的图。(底物浓度 :5mM ;PBS (pH=7.4)中的 TEM-1B1a 浓度为 2nM ;PBS(pH=7.4)中的 Mtb BlaC 浓度为 10nM ;于 400nm 处激发)。图 8D 显示 CDC-5 的合成。图 8E 显示在 β -内酰胺酶处理之后底物 CDC-1 于 455nm 处的发射对时间的图(实线 :采用 Mtb BlaC 处理 ;虚线 :采用 TEM-1B1a 处理 ;探针浓度 :5mM ;PBS (pH=7.4)中的 TEM-1B1a 浓度 :20nM ;于 400nm 处激发)。图 8F 显示在 β -内酰胺酶处理之后探针 CDC-5 于 455nm 处的发射对时间的图(实线 :采用 Mtb BlaC 处理 ;虚线 :采用 TEM-1B1a 处理 ;探针浓度 :5mM ;PBS (pH=7.4)中的 Mtb BlaC 浓度 :20nM ;于 400nm 处激发)。

[0029] 图 9A-9F 描述 XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-26 和 XHX3-32 的化学结构(图 9A-9E),并表明细菌数量与使用 XHX2-81、XHX2-91、XHX3-26 和 XHX3-32 的荧光信号之间的相关性(图 9F)。激发 :360nm (1xPBS);最大发射 :453nm (1xPBS);XHX-2-81 (DMSO 中 10mM, 60mL);XHX-2-91 (DMSO 中 100mM, 10mL);XHX-3-26 (DMSO 中 20mM, 42mL);XHX-3-32 (DMSO 中 100mM, 100mL)。

[0030] 图 10A-10B 描述 Bluco 的化学合成(图 10A)和 Bluco 用于 β -内酰胺酶的连续报告生物发光测定法(SREL)成像的用途(图 10B)。

[0031] 图 11A-11D 描述用于制备 CNIR 和 CNIR 样探针及其衍生物和类似物的替代化学合成路线(图 11A-11B)和如此合成的探针结构,如 CNIR5. 2 和 CNIR800. 2(图 11C)和 CNIR800-3 (图 11D)。

[0032] 图 12A-12B 阐明含有 CNIR5 的大肠杆菌中(图 12A)和结核分支杆菌中(图 12B)Bla 活性的检测。对照含有 LB 介质和 CNIR5,而不含转化的大肠杆菌。

[0033] 图 13A-13H 描绘荧光发射光谱(图 13A-13D)和荧光标记掺入的动力学(图 13E-13H)。显示了用 TEM-1B1a 裂解之前(CNIR)和裂解 10 分钟之后(CNIR+B1a)的 CNIR4 (图 13A)、CNIR5 (图 13B)、CNIR9 (图 13C)和 CNIR10 (图 13D)的发射光谱。显示了将 CNIR4 (图 13E)、CNIR5 (图 13F)、CNIR9 (图 13G)和 CNIR10 (图 13H)荧光标记直接掺入到野生型 Mtb 和 Mtb BlaC 突变体(blaCm)中的动力学。

[0034] 图 14A-14B 描绘含有 CNIR4(图 14A)和 CNIR5(图 14B)底物的大肠杆菌 TEM-1 β -内酰胺酶和结核分支杆菌 BlaC β -内酰胺酶的动力学。

[0035] 图 15A-15H 描绘在含有 CNIR4 (图 15A, 15E)、CNIR5 (图 15B, 15F)、CNIR9 (图 15C, 15G)和 CNIR10 (图 15D, 15H)的介质中单独的结核分支杆菌细菌的荧光掺入动力学和其中

的分布比例(图 15A-15H)。

[0036] 图 16A-16H 描绘在含有 CNIR4 (图 16A, 16E)、CNIR5 (图 16B, 16F)、CNIR9 (图 16C, 16G) 和 CNIR10 (图 16D, 16H) 的结核分支杆菌细菌感染的巨噬细胞的荧光掺入动力学(图 16A-16D) 和其中的分布比例(图 16E-16H)。

[0037] 图 17 描绘荧光共焦显微镜图像,其显示 CNIR4 向结核分支杆菌感染的巨噬细胞中的细胞内掺入。DAPI 着色(蓝色)指示出受感染细胞的细胞核,绿色荧光来自于 GFP 标记的结核分支杆菌并且红色荧光来自于裂解的 CNIR4。

[0038] 图 18A-18E 描绘通过以 10^8 (每只小鼠的左后部)、 10^7 (左前部)、 10^6 (右前部) 的各种浓度的 CNIR4 (图 18A)、CNIR5 (图 18B)、CNIR9 (图 18C) 和 CNIR10 (图 18D) 的皮内接种的来自于结核分支杆菌感染的小鼠的荧光。图 18E 相当于每一个化合物于每一个用于感染的细菌的浓度的信号对背景图。

[0039] 图 19A-19E 是来自于已经通过气溶胶接种在肺部感染结核分支杆菌的小鼠的荧光图像和针对 CNIR4 (图 19A)、CNIR5 (图 19B)、CNIR9 (图 19C) 和 CNIR10 (图 19D) 测量的荧光信号。在图 19A-19D 的每一张图中,每块平板中左边的小鼠是未感染的,左数第二只小鼠采用 blaC 基因发生突变的结核分支杆菌感染,并且每块平板中右边的两只小鼠采用野生型结核分支杆菌感染。每块平板中右边的三只小鼠在成像之前 24 小时静脉给予 CNIR4、CNIR5、CNIR9 或 CNIR10。图 19E 是背部图像中肺部区域内每个化合物的信号对背景的图。

[0040] 图 20A-20F 是来自于通过气溶胶感染结核分支杆菌的小鼠并且使用底物 CNIR5 于 1 小时(图 20A)、18 小时(图 20B)、24 小时(图 20C)和 48 小时(图 20D)成像的荧光图像。在每个面板的背视图、腹视图、左视图、右视图中,左侧小鼠是未感染的并且右侧小鼠是感染的。所有小鼠在于标记的时间点成像之前均采用 CNIR5 静脉注射。图 20F 是量化由图 19A 的顶部平板中圈定的感兴趣的区域获得的荧光信号的图。

[0041] 图 21A-21B 描绘来自于通过气溶胶感染结核分支杆菌的(图 21A) 和未感染的(图 21B) 小鼠的并且使用透照(而不是反射)以减少背景信号而成像的荧光图像。

[0042] 图 22A-22D 阐明在左肩具有异种移植的野生型 C6 肿瘤并且右肩具有 cmv-bla 稳定化转染的 C6 肿瘤的裸鼠上采用 CNIR5(7nmol) 的 Bla 表达的图像。图 22A 显示在指定时间点的重叠荧光和亮场图像。图 22B 显示每个肿瘤的平均强度对时间的绘制图。图 22C 显示切除的肿瘤和器官的图像。图 22D 显示来自两种肿瘤的提取物中 Bla 的 CC1 分析结果。

[0043] 图 23A-23C 阐明在左肩具有异种移植的野生型 C6 肿瘤并且右肩具有 cmv-bla 稳定化转染的 C6 肿瘤的裸鼠上采用 CNIR6 (7nmol) 的 Bla 表达的图像。图 23A 是 CNIR6 的化学结构。图 23B 显示在指定时间点的重叠荧光和亮场图像。图 23C 显示每个肿瘤的平均强度对时间的绘制图。

[0044] 图 24A-24B 阐明 4 小时(图 24A) 和 24 小时(图 24B) 后,7.5 纳摩尔 CNIR5 在各种组织中的生物分布。

[0045] 图 25A-25B 是使用静脉内的 CNIR5 作为成像剂的,感染结核分支杆菌的小鼠(图 25A) 和未感染的对照小鼠(图 25B) 的体内图像。

[0046] 图 26A-26C 阐明使用 CNIR 探针的 SREL 检测阈值。图 26A 是一张柱状图,其显示使用 β -内酰胺酶 CNIR 探针用 SREL 成像能够检测出 100 个以下的细菌。图 26B-26C 是未感染的(图 26B) 或感染结核分支杆菌的(图 26C) 活小鼠的体内图像。

[0047] 图 27A-27E 描绘 CNIR5 检测临床样品中的结核杆菌的评价能力结果(图 27A),测定痰样本中结核杆菌检测阈值的结果(图 27B),加标痰样本中信号强度和细菌数量之间的相关性(图 27C),加标痰样本和 PBS 中信号强度和细菌数量的比较(图 27D),以及异烟肼 + 利福平治疗分支杆菌的评价,包括获得可测量信号的时间(图 27E)。

[0048] 图 28 描绘 IRDye800 系列荧光团的结构。

[0049] 图 29 描绘头孢哌酮和所提议的 CNIR 探针的结构。

[0050] 图 30 是建立 Bluco 底物的小型偏倚库(biased library)的方案。

[0051] 图 31 展示在 3' 位含有烯丙基连接的新型探针的结构。

[0052] 图 32 描绘在 3' 位含有氨基甲酸酯连接的新型探针的结构。

[0053] 图 33A-33D 描绘利用被连接至胶乳颗粒或微球的轭合底物 / 着色染料(图 33A)或者产生轭合物 / 底物 / 颜色的化学试剂(图 33B)以及被连接至生物素的轭合物 / 底物 / 着色染料(图 33C)或者产生轭合物 / 底物 / 颜色的化学试剂(图 33B)的用于诊断分析的可视化检测系统。

具体实施方式

[0054] 如本说明书中所使用,“一”可以指一或多。如本权利要求书中所使用,当与词语“包含”配合使用时,词语“一”可以指一或一以上。如本文所使用,“另一”或“其它”可以指至少第二或更多的相同或不同的要求保护的元素或组分。此外,除了另有规定以外,单数的术语包括复数的情况,复数的术语包括单数的情况。

[0055] 如本文所使用,除非明确说明指的是唯一的备选物或者备选物是互相排斥的,否则尽管本公开支持的定义指的是唯一的备选物和“和 / 或”,权利要求书中的术语“或”均用于指“和 / 或”。

[0056] 如本文所使用,术语“接触”指的是任何适合的方法,所述方法在体内或体外,在生物样品中,使荧光基因底物,例如,荧光基因化合物、荧光蛋白质、冷光蛋白、或者比色蛋白质或其它比色试剂或其衍生物,或者适合于 PET 或 SPECT 成像的放射性标记的底物接触病原性细菌,所述病原性细菌例如但不限于结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mbt)、牛分支杆菌(*Mycobacterium bovis*, M. bovis)、鸟分支杆菌(*Mycobacterium avium*, M. avium)、结核分支杆菌复合物或鸟分支杆菌复合物,或者接触拟杆菌属(*Bacteroides*)、梭菌属(*Clostridium*)、链球菌属(*Streptococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、军团菌属(*Legionella*)、埃希氏杆菌属(*Escherichia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、志贺氏菌属(*Shigella*)或李斯特菌属(*Listeria*)中的一个物种,或者接触 β -内酰胺酶或特定针对病原性细菌的其它酶或蛋白质。在体外或离体中,这通过使一种或多种细菌细胞或者 β -内酰胺酶或者其它的酶或蛋白质暴露于合适介质中的荧光基因底物或者荧光基因化合物或者荧光、冷光或比色蛋白质或者其它比色试剂或其衍生物中。所述细菌细胞或者 β -内酰胺酶或者其它的酶或蛋白质在获得自受试者的样品中。所述细菌细胞可以包含或者可以不包含有活力的样品。所述 β -内酰胺酶或者其它的酶或蛋白质可以接触有活力的细菌细胞,可以通过已知的和标准的方法从细菌细胞中提取,其自身可以存在于生物样品中,或者可以包含通过已知的和标准的方法转染至细菌细胞中的重组系统。所述样品可以包括但不

限于胸腔积液或痰液和可能具有细菌的,包括血液、唾液、尿液和粪便的其它体液。可选地,对于体外接触而言,生物样品可以通过(例如)擦抹从表面获得,所述表面例如但不限于仪器、器皿、设施、工作表面、衣服或者人体上一个或多个感兴趣的区域。如此获得的样品可以被转移至适合的介质中,用于通过本领域中已知的或标准的方法来成像。对于体内应用而言,如本文中所述,任何已知的施用荧光基因底物,即,荧光基因化合物,荧光、冷光或比色蛋白质,其它的比色试剂或其衍生物,或放射性标记的底物的方法都是适合的。

[0057] 如本文所使用,短语“荧光基因底物”指的是化合物或蛋白质或肽或其它生物学活性分子,其在适合的酶的存在下得到通过适宜波长的激发而发射或产生荧光或冷光信号的产物,或者可以生成产生比色信号的产物。例如但不限于,在 β -内酰胺酶,荧光素酶或 β -半乳糖苷酶或其它酶的存在下,荧光基因底物可以产生荧光、冷光或比色产物。

[0058] 如本文所使用,短语“放射性标记的底物”指的是化合物或蛋白质或肽或其它生物学活性分子,其附着于或连接至或合并入寿命短暂的同位素,所述同位素发射用于正电子发射断层显像(Positron Emission Tomography, PET)的正电子和用于单光子发射计算机断层显像(Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT)的 γ 射线。

[0059] 如本文所使用,短语“ β -内酰胺酶阳性细菌”指的是自然分泌 β -内酰胺酶或者在发病过程中获取 β -内酰胺酶的病原性细菌。

[0060] 如本文所使用,术语“受试者”指的是接受治疗或者从其中获得生物样品的任何靶标。优选地,所述受试者是哺乳动物,更优选地,所述受试者是牲畜或人。

[0061] 在本发明的一个实施方案中,提供了一种用于实时检测受试者中的病原性细菌的方法,其包含为受试者或来自所述受试者的生物样品施用针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的荧光、冷光或比色底物;使所述受试者或样品的 β -内酰胺酶对于底物的活性的产物在激发波长下成像;并且在由 β -内酰胺酶产物发射的波长处获取信号;从而检测受试者中的病原性细菌。

[0062] 关于该实施方案,所述方法包含建立发射信号的 3D 重建,以测定受试者中病原性细菌的位置。在另一个进一步的实施方案中,所述方法包含在发射信号比测量的对照信号的强度大的基础上,实时诊断与病原性细菌相关的病理生理状况。病理生理状况的实例是结核病。

[0063] 在本发明的某些实施方案中,荧光底物可以是荧光基因底物。所述荧光基因底物的实例是 CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、笼式荧光素、比色试剂或其衍生物。同样,在所有的实施方案中,所述成像或激发波长以及所述发射波长可以独立地为从大约 300nm 至大约 900nm。在某些实施方案中,所述成像或激发波长是从大约 540nm 至大约 730nm 并且所述发射信号可以是大约 650nm 至大约 800nm。在某些实施方案中,比色指示可以通过颜色变化或仪器测量由人眼可视化地鉴定,以测定一个指定的数值。此外,病原性细菌可以包含拟杆菌属、梭菌属、链球菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属、嗜血杆菌属、军团菌属、分支杆菌属、埃希氏菌属、沙门氏菌属、志贺氏菌属或李斯特菌属的细菌物种。特别地,所述病原性细菌可以包含结核分支杆菌复合物或鸟分支杆菌复合物。

[0064] 在本发明的一个相关的实施方案中,提供了一种用于使病原性细菌成像的方法,其包含向受试者中引入针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的荧光基因底物,或者使来自于所

述受试者的或由表面获得的生物样品接触针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的荧光基因底物；向病原性细菌递送一个激发波长用于 β -内酰胺酶对于底物的活性的产物；获取发射自所述产物的荧光、冷光或比色信号；以及产生获取的信号的 3D 重建，从而使所述病原性细菌成像。在该实施方式的各方面中，所述病原性细菌可以与如上所述的荧光基因或冷光底物在体内或体外接触。同样，在该实施方案的所有方面中，所述病原性细菌和所述激发和发射波长如上所述。

[0065] 在另一个相关的实施方案中，本发明提供了一种用于实时检测病原性细菌的方法，其包含向受试者或来自于所述受试者的生物样品中引入针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的底物；使所述受试者或样品的 β -内酰胺酶对于底物的活性得到的产物成像；并且获取由 β -内酰胺酶产物发射的波长信号，从而检测受试者中的病原性细菌。

[0066] 关于该实施方案，所述方法包含建立发射信号的 3D 重建，以测定受试者中病原性细菌的位置。在另一个进一步的实施方案中，所述方法可以包含量化和区分生物样品中的已感染细胞与未感染细胞。特别地，在该进一步的实施方案中，通过利用流式细胞术、共聚焦显微镜法或荧光光谱法中的一种或多种来进行已感染细胞的区分和 / 或量化步骤。

[0067] 在两个实施方案中，底物可以是荧光基因底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5.2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800.2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32，或其衍生物或类似物。可选地，所述底物可以包含一种着色染料或化学试剂，所述着色染料或化学试剂有效地诱导颜色或 pH 变化。此外，所述底物可以被连接至颗粒、微球或被连接至生物素。同样，在两个实施方案中，所述生物样品可以是痰液、胸腔积液、尿液、血液、唾液、粪便或通过擦拭受试者身上感兴趣的区域而获得的样品。获取的信号可以是荧光、冷光或比色信号。所述病原性细菌、所述成像波长和所述发射波长如上所述。

[0068] 在本发明的另一个实施方案中，提供了一种用于诊断与受试者中的病原性细菌相关的病理生理状况的方法，其包含向受试者施用针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的荧光基因或冷光底物；使所述受试者的 β -内酰胺酶对于底物的活性的产物在激发波长下成像；以及在产物的发射波长下实时测量荧光、冷光或比色信号强度；其中大于测量的对照信号的荧光、冷光或比色信号强度与病理生理状况的诊断相互关联。

[0069] 关于该实施方案，所述方法包含建立信号的 3D 重建，以测定微生物病原体的位置。在另一个进一步的实施方案中，所述方法包含施用一种或多种治疗性化合物，所述治疗性化合物有效用于治疗病理生理状况。此外，所述方法包含向受试者再次施用荧光基因或冷光底物；并使受试者再次成像以监控治疗性化合物的有效性；其中与诊断信号相比的发射信号的降低表明对病理生理状况的治疗效果。在所有的实施方案中，所述病理生理状况、病原性细菌、荧光基因底物以及成像或激发和发射波长如上所述。

[0070] 在本发明的一个相关的实施方案中，提供了一种用于诊断与受试者中的病原性细菌相关的病理生理状况的方法，其包含向受试者施用针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的底物，或使衍生自所述受试者的生物样品接触针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的底物；使受试者的 β -内酰胺酶对于底物的活性的产物成像；以及在产物的发射波长下实时测量信号强度；其中大于测量的对照信号的信号强度与病理生理状况的诊断相互关联。关于该实施方案，所述方法包含建立 3D 图像，施用适合于诊断的病理生理状况的治疗性化合物和再次

施用如上所述的底物。在另一个进一步的实施方案中,所述方法包含如上所述的量化和/或区分生物样品中的已感染细胞和未感染细胞。

[0071] 在这些实施方案中,所述底物可以是如上所述的荧光基因底物、着色染料或化学试剂。同样,所述病理生理状况可以是结核病并且所述生物样品可以是痰液、胸腔积液、尿液、血液、唾液、粪便或通过擦拭受试者身上感兴趣的区域而获得的样品。所述测量的信号可以是荧光、冷光或比色信号。所述病原性细菌、成像或激发波长和发射波长如上所述。

[0072] 在本发明的另一个相关的实施方案中,提供了一种诊断与受试者中的病原性细菌相关的病理生理状况的方法,其包含使从受试者获得的样品接触针对病原性细菌的 β -内酰胺酶的比色底物;其中 β -内酰胺酶对于底物的活性的产物引起肉眼可见的颜色变化,进而指示诊断。所述底物可以被放置在带(strip)、棉签(q-tip)、背景(background)或其它可视化指示器(indicator)上。颜色变化可以是肉眼可见的,并且无需任何仪器或来自于外部能量来源的激发即可得到鉴定。

[0073] 在本发明的其它另一个实施方案中,提供了一种用于检测受试者中的分支杆菌感染的诊断方法,其包含从受试者获得生物样品;使生物样品接触分支杆菌 β -内酰胺酶的荧光底物;使生物样品的 β -内酰胺酶对于荧光基因底物的活性的产物成像;以及在产物的发射波长下测量信号强度;其中大于测量的对照信号的信号强度表明分支杆菌感染的存在。关于该实施方案,所述方法提供重复上述方法步骤一次或多次,以监控基于分支杆菌感染的检测的,施用于受试者的治疗方案的治疗有效性;其中与对照相比的测量的荧光信号的降低与治疗方案的阳性应答相互关联。在另一个进一步的实施方案中,如上所述,所述方法包含在生物样品中量化和区分感染细胞和未感染细胞的步骤中的一种或两种。

[0074] 在两个实施方案中的各个方面中,所述底物可以是荧光基因底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5, CNIR5. 2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800, CNIR800. 2, CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32, 或其衍生物或类似物。可选地,所述底物可以包含一种着色染料或化学试剂,所述着色染料或化学试剂有效地诱导颜色或 pH 变化的。此外,所述底物可以被连接至颗粒、微球,或被连接至生物素。同样,所述生物样品可以是痰液、胸腔积液、尿液、血液、唾液、粪便或通过擦拭受试者身上感兴趣的区域而获得的样品。另外,所述分支杆菌感染可以由结核分支杆菌或结核分支杆菌复合物或鸟分支杆菌或鸟分支杆菌复合物造成。此外,所述测量信号可以是荧光、冷光或比色信号。所述成像和发射波长可以如上所述。

[0075] 在本发明的其它另一个实施方案中,提供了一种用于筛选治疗性化合物的方法,所述治疗性化合物有效用于治疗与受试者中的病原性细菌相关的病理生理状况。所述方法包含选择一个针对病原性细菌的潜在的治疗性化合物;使细菌细胞与荧光、冷光或比色检测剂接触;使细菌细胞与潜在的治疗性化合物接触;以及在存在或不存在所述潜在的治疗性化合物的条件下测量由细菌细胞产生的荧光、冷光或比色信号;其中与不存在治疗性化合物的信号相比的存在治疗性化合物的信号的降低表明所述化合物对抗病原性细菌的治疗效果。在该实施方案中,所述病理生理状况和所述病原性细菌如上所述。

[0076] 在该实施方案的一个方面中,病原性细菌可以是重组细菌,其中使细菌与荧光、冷光或比色检测剂接触的步骤包含用含有荧光、冷光或比色检测剂的表达载体来转化野生型细菌。在这方面中,所述荧光、冷光或比色检测剂可以包含荧光蛋白。荧光蛋白的实例有

mPlum、mKeima、Mcherry 或 tdTomato。同样在这方面中,所述表达载体可以包含 β -半乳糖苷酶基因,其中所述方法进一步包含在 β -半乳糖苷酶的存在下使重组细菌细胞与有效用于发射荧光信号的荧光团接触。荧光团的实例有 C2FDG、C12RG 或 DDAOG。此外,在这方面中,所述表达载体可以包含荧光素酶基因,其中所述方法进一步包含使重组细菌细胞与 D-荧光素接触。荧光素酶的实例是萤火虫荧光素酶、叩头虫红(click beetle red)或 rLuc8。

[0077] 在该实施方案的另一个方面中,所述荧光检测剂可以是细菌 β -内酰胺酶的荧光基因底物。在一个实施例中,病原性细菌可以与荧光基因底物 CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、笼式荧光素、比色试剂或其衍生物体内接触。在另一个实施例中,病原性细菌可以与荧光基因底物 CC1、CC2、CHPQ、CR2、CNIR1 或 CNIR6 在体内接触。

[0078] 在本发明的一个相关的实施方案中,提供了一种用于筛选治疗性化合物的方法,所述治疗性化合物有效用于治疗与受试者中的病原性细菌相关的病理生理状况。所述方法包含选择一个针对病原性细菌的潜在的治疗性化合物;使细菌细胞或包含其的生物样品与细菌 β -内酰胺酶的底物接触;使细菌细胞或包含其的生物样品与潜在的治疗性化合物接触;以及在存在或不存在潜在的治疗性化合物的条件下测量由细菌细胞产生的荧光、冷光或比色信号;其中与不存在治疗性化合物的信号相比的存在治疗性化合物的信号的降低表明所述化合物对抗病原性细菌的治疗效果。

[0079] 在该实施方案的一个方面中,所述底物可以是荧光基因底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5.2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800.2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物。可选地,所述底物可以包含一种着色染料或化学试剂,所述着色染料或化学试剂有效地诱导颜色或 pH 变化。此外,所述底物可以被连接至颗粒、微球,或被连接至生物素。同样,病原性细菌和病理生理状况如上所述。此外,由细菌细胞产生的信号可以具有从大约 300nm 至大约 900nm 的波长。特别地,所产生的信号可以具有从大约 650nm 至大约 800nm 的波长。

[0080] 在本发明的其它另一个实施方案中,提供了一种针对细菌 β -内酰胺酶的底物,所述底物基于 β -内酰胺酶对于其的活性产生可检测的荧光、冷光或比色信号。在该实施方案的各个方面中,所述底物可以是荧光基因底物 CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5.2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800.2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 或 XHX3-32,或其衍生物或类似物,或者可以包含着色染料或化学试剂,所述着色染料或化学试剂基于 β -内酰胺酶对于它们的活性有效地产生颜色或 pH 变化。同样,底物可以进一步包含与其连接的颗粒、微球或生物素。

[0081] 在本发明的其它另一个实施方案中,提供了一种用于实时检测受试者中的病原性细菌的方法,其包含向所述受试者引入用与 γ 发射相关的同位素进行放射性标记的底物;其中所述底物用于 β -内酰胺酶或者病原性细菌特定的其它酶或蛋白质;使受试者的在对于底物的活性过程中来自于放射性标记底物的 γ 发射成像;获取由发射的 γ 射线产生的信号;以及产生基于由 γ 射线产生的信号强度的放射性标记在受试者中的浓度的 3D 重建,从而检测病原性细菌。

[0082] 关于该实施方案,所述方法包含基于病原性细菌检测的,与病原性细菌相关的病理生理状况的实时诊断。在另一个进一步的实施方案中,所述方法包含施用一种或多种有效用于治疗病理生理状况的治疗性化合物。在其它另一个进一步的实施方案中,所述方法包括向受试者再次施用放射性标记的底物;以及使受试者再次成像,以监控所述治疗性化合物的有效性;其中与诊断时的 γ 发射相比的 γ 发射的降低表明对病理生理状况的治疗效果。在这些进一步的实施方案中,所述病理生理状况可以是结核病。

[0083] 在所有这些实施方案的一个方面中,所述放射性标记可以是发射正电子的同位素并且可以通过正电子发射断层显像(PET)来成像。在另一个方面中,放射性标记可以是直接发射 γ 射线的同位素并且可以通过单光子发射计算机断层显像(SPECT)来成像。在这些实施方案的所有方面中,其它酶或蛋白质可以是 β -内酰胺酶样酶或结合青霉素的蛋白质。同样,在所有实施方案中,细菌物种可以如上所述。

[0084] 在本发明的其它另一个实施方案中,提供了适合于 PET 或 SPECT 成像的,针对细菌 β -内酰胺酶的放射性标记的底物。在该实施方案中,放射性标记可以是氟-18、氮-13、氧-18、碳-11、镓-67、碘-123 或铟-111。

[0085] 在本发明的其它另一个实施方案中,提供了一种用于可视化检测生物样品中的病原性细菌的分析设备,所述分析设备包含平台,所述平台具有用于接收孵育混合物的装置,所述孵育混合物包含生物样品和针对与病原性细菌有关的 β -内酰胺酶的生色底物,并且所述平台具有用于捕获和浓缩由 β -内酰胺酶对于底物的活性产生的着色产物的装置,所述装置与所述接收装置液体相连。

[0086] 关于该实施方案,所述分析设备可以包含用于仅允许着色产物从所述接收装置向下游流动的装置。在另一个进一步的实施方案中,所述分析设备可以包含在所述接收装置下游的内部对照。在其它另一个进一步的实施方案中,所述分析设备可以包含用于吸收在所述接收装置下游的流体的装置。

[0087] 在所有实施方案中,所述底物可以包含一种着色染料或化学试剂。同样在所有实施方案中,所述底物可以被连接至颗粒或微球。在这些实施方案的一个方面中,所述底物包括化学试剂并且所述设备进一步包含第二试剂,以便由所述化学试剂产生颜色。在这些实施方案的另一个方面中,所述底物被连接至生物素并且所述设备进一步包含抗生物素蛋白,以便捕获与生物素连接的底物。

[0088] 本发明提供了用于细菌性疾病和/或感染的光学成像系统和方法。对于在疾病过程中细菌的量化和定位以及抗微生物药活性的体内实时分析而言,这些系统和方法是极其敏感的工具。可以预期,这些系统有效用于在单细胞水平上检测细菌病原体。这些体内成像(IVI)系统和方法能够直接应用于处于临床环境中的患者。

[0089] 本文的系统和方法能够适用于自然拥有 β -内酰胺酶活性或获取 β -内酰胺酶活性的细菌物种。在不受限制的情况下, β -内酰胺酶阳性细菌物种的实例有拟杆菌属、梭菌属、链球菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属、军团菌属、分支杆菌属、嗜血杆菌属、埃希氏菌属、沙门氏菌属、志贺氏菌属或李斯特菌属。特别考虑的是分支杆菌(例如,结核分支杆菌和牛分支杆菌)的诊断、定位和量化。尽管本文所述的系统和方法的优势在于它不需要待检测的细菌菌株的工程,但是可以预期,提高 β -内酰胺酶的表达、活性和/或分泌的方法以提高检测的灵敏度。因此,可以预期,通过借助于任何能够应用的方法向任何感兴趣的细菌物种

或菌株中引入 β -内酰胺酶,检测 β -内酰胺酶细菌物种以允许其敏感地检测,所述方法允许足够水平的 β -内酰胺酶的表达和分泌。这可以通过在体外或体内使用已知的和标准的递送方法来实现,包括使用适合于向哺乳动物递送载体的噬菌体。

[0090] 本发明的体内成像系统可以检测由化合物或报告子产生的荧光、冷光或比色信号,所述化合物或报告子用作针对 β -内酰胺酶活性的底物。成像系统是本领域公知的和商购可得的。例如,连续报告-酶荧光(SREF)系统、连续报告-酶冷光(SREL)系统或生物冷光系统可以用于检测 β -内酰胺酶活性产物。此外,获取的信号可以用来产生用于定位细菌病原体的3D表示法(representation)。对于这些系统,成像领域的普通技术人员基于所使用的化合物和/或报告子以及待检测的信号类型能够很好地选择激发和发射波长。一般来说,成像或激发波长和发射波长二者均可以是大约300nm至大约900nm。激发信号的实例可以在大约540nm至大约730nm的范围内并且发射信号在大约650nm至大约800nm的范围内。同样可以预期,本发明的体内成像系统还可以检测其它信号,如通过辐射产生的信号,或者通过其它 β -内酰胺酶对于合适的底物或其它检测剂的活性产生的任何能够检测的或者能够读取的信号。

[0091] 本发明的 β -内酰胺酶底物可以是化学底物或量子点底物。用于使用SREL或SREF成像的底物,例如,可以是荧光团、笼式荧光素或者其它的荧光、冷光或比色化合物、报告子或者其它的检测剂,其为所需应用提供最好的信号。在允许良好渗透入任何组织的水平下,所述底物具有非常低的毒性或者没有毒性,并且具有高信噪比。所述信号是近红外、红外或红光信号,例如,从大约650nm至大约800nm。

[0092] 例如,底物可以是荧光基因底物或量子点底物,其产生基于体外或体内的 β -内酰胺酶裂解的信号。荧光基因底物可以包含FRET供体,如靛青(indocyanine)染料,例如,Cy5、Cy5.5或CY7或IRDye800和FRET淬灭剂,如淬灭组QSY21、QSY21二磺酸盐、QSY22或QSY22二磺酸盐或IRDyeQC-1。此外,荧光基因底物可以包含全乙酰化D-葡萄糖胺,以提高细胞的穿透性和/或可以被连接至小肽,例如(但不限于)TAT。此外,所述底物可以被修饰,以提高其信号强度、组织穿透能力、特异性或在所有组织中很好地分布的能力。此外,可以预期,用于组织、细胞或与这些底物联合的其它化合物的其它标记方法有利于改善灵敏度和细菌病原体的检测。例如,荧光基因底物可以包含(但不限于包含)甲基、甲氧基或苄基部分和/或可以含有用于离去基团更大释放的顺式或反式双键。

[0093] 特别地,荧光基因底物可以检测细菌细胞培养物中或体外单一培养的细菌细胞中的 β -内酰胺酶活性。化学荧光基因底物的实例有CC1、CC2、CHPQ、CR2、CNIR1或CNIR6。可选地,对于体内成像应用而言,荧光基因底物可以是CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT或CNIR800,或其衍生物或类似物,或者类似于CNIR5(如CNIR5.2)或类似于CNIR800(如CNIR800.2或CNIR800-3)的荧光基因底物。本发明还提供用于体外和体内成像的荧光基因底物CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4和CDC-5,或其衍生物或类似物,其基于Mtb BlaC的水解来释放作为荧光团的7-羟基香豆素,或者提供类似于CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4和CDC-5(特别是CDC-5)的荧光基因化合物,如(但不限于)XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26或XHX3-32,或其衍生物或类似物。这些荧光基因底物在连续报告-酶荧光(SREF)系统中是有用的。可以预期,所述 β -内酰胺酶底物有效用于检测体外或体内的单个细菌细胞。

[0094] 用于体内检测 β -内酰胺酶的荧光基因底物的另一个实例是笼式荧光素,如(但不限于)Bluco、Bluco2 或 Bluco3。该底物包含 D-荧光素(萤火虫荧光素酶(Fluc)的底物)和 β -内酰胺(β -内酰胺酶的底物)。通过酶的 β -内酰胺裂解释放 D-荧光素,其基于 Fluc 的氧化而发冷光。笼式荧光素在连续报告-酶冷光(SREL)系统或其它生物冷光成像系统中是有用的。

[0095] 荧光蛋白同样可以用于体外和体内检测细菌病原体。荧光蛋白(FP)如 mPlum、mKeima、Mcherry 和 tdTomato 被克隆到表达载体中。感兴趣的细菌病原体(如结核分支杆菌)与 FP 构建体一起转化。通过细菌的荧光蛋白表达产生基于成像的能够检测的信号。其它成像系统可以利用被转化以分泌其它酶(如 β -半乳糖苷酶)的重组细菌,其在荧光团(例如, C2FDG、C12RG 或 DDAOG)的存在下产生荧光信号。此外,其它成像系统利用表达其它荧光素酶(如叩头虫红或 rLuc8)的其它重组系统,其在底物(例如, D-荧光素)的存在下产生信号。

[0096] 此外,底物可以包含着色的或可视化染料。着色的或可视化染料可以是(但不限于)德克萨斯红、罗丹明、溴甲酚染料(多种颜色)、花青染料。此外,底物可以包含一种基于 β -内酰胺酶活性而产生颜色变化的化学试剂,所述颜色变化如源自 pH 变化的或其它化学诱导的颜色变化。

[0097] 可选地,可以使用正电子发射断层显像(PET)或单光子发射计算机断层显像(SPECT)的成像系统。探针可以包含针对本文所述的病原性细菌的 β -内酰胺酶、 β -内酰胺酶样酶或其它类似的酶或蛋白质的底物。PET 和 SPECT 成像技术是本领域中公知的。对于 PET 成像,底物探针可以采用发射正电子的放射性同位素标记,如(但不限于)氟 -18、氧 -18、碳 -11 或氮 -13。对于 SPECT 成像,底物探针可以采用发射 γ -射线的放射性同位素标记,如(但不限于)锝 -99m、碘 -123 或铟 -111。使用标准的和公知的化学和放射化学合成技术可以合成 PET 和 SPECT 探针。

[0098] 可以预期,使用小分子(如头孢哌酮)可以使探针的设计和特异性最大化,以建立 β -内酰胺酶口袋的模型。因此,使用这种高通量小分子系统,底物可以被设计为具有用于诊断目的的最大灵敏度,以及适合于产生有效地穿透深部组织的用现有的成像设备能够检测的信号并避免与其它细菌物种的交叉反应。同样,这样的敏感和特异的底物探针在单一细菌的水平下是有效的,并能够增加由其获得的信号量 100 倍至 1000 倍。同样,可以预期,不同于结核分支杆菌中的 β -内酰胺酶的 β -内酰胺酶样酶和结合青霉素的蛋白质能够被设计为改善探针的特异性。

[0099] 本文所述的系统和方法有效用于实时地检测、定位、量化和测定细菌病原体的活力。体外采用细胞培养或单一培养的细胞或者离体采用临床样品或标本使用 SREL 或 SREF 或者在受试者体内使用任何公开的成像系统可以进行成像。体外使用的样品可以包括(但不限于)活检、胸腔积液、痰液和包括可能含有细菌病原体的血液、唾液、尿液和粪便的其它体液。因此,本文提供的系统和方法有效用于诊断与细菌病原体相关的病理生理状况,如疾病或感染。因为能够检测非常低的水平,包括单一细菌,所以诊断能够是即时的并且处在比现有的诊断方法更早的感染点。本文所述的系统和方法可以用于测试和定期筛查可能面临细菌感染风险的医护人员。另外,这些系统和方法同样能够用于筛选和检测仪器、器皿、设施、工作表面、衣服或者人体上的污染。因为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 感染存在于高达 40% 的医护人员中并且主要的感染部位是鼻道和由过度清洗造成的手部裂缝, 所以本发明作为针对医疗中心和工人中的细菌病原体的筛选方法是有用的。这些系统和方法必要时可以用在农业和动物园应用中以检测 β -内酰胺酶。

[0100] 同样, 信号强度与细菌数量的相关性很好地处于现有成像技术的限制范围内。因此, 能够实时监控化合物、药物、药物组合物或其它治疗剂的功效。因此, 本文所描述的系统和方法提供一种用于筛选抗菌剂的高通量系统。因为 β -内酰胺酶的检测需要细菌活力, 所以在一种或多种治疗剂的存在下的酶水平提供抗微生物活性的测量。适合于特定细菌的底物的使用允许快速测量 β -内酰胺酶水平的变化和治疗剂有效性的几乎即时的测定。对于一次测量微孔板中一个至数千个样品而言, 通量系统是有用的。

[0101] 更特别地, 本文所描述的 REF 系统有利于使用流式细胞仪、共聚焦显微镜或荧光光谱仪的, 用于检测和量化感染细胞的许多其它的体外方法。一旦 β -内酰胺酶底物处在细胞当中, 由细胞内细菌分泌的 β -内酰胺酶就裂解 β -内酰胺环, 进而以近红外荧光色来标记感染的细胞。使用流式细胞仪能够区分和量化感染的细胞和未感染的细胞。同样, 使用不同颜色标记的细菌, (例如, 但不限于, 绿色荧光蛋白标记的细菌和冰冻切片), 采用荧光共聚焦显微镜来观察和分析感染的组织。特别地, 在一个非限制性实例中, 如果利用产生蓝色的 DAPI 对细胞核染色, 那么人们可能看到细胞质中积累的绿色的细菌和红色的裂解 β -内酰胺酶底物。此外, 由于使用裂解底物的特定的激发和发射波长 β -内酰胺酶底物可以标记已感染的细胞, 所以采用荧光光谱仪来量化感染的细胞或均质化的感染的组织。

[0102] 下面给出实施例用于阐明本发明的各种实施方式的目的, 其并不意味着以任何方式来限制本发明。

[0103] 实施例 1

[0104] 培养物中结核分支杆菌中的 Bla 检测

[0105] 使用生长至早期对数期的全细胞和全细胞溶菌产物(lysate), 对于结核分支杆菌中 Bla 的检测, 比较潜在的荧光基因底物化合物和已知化合物, 包括头孢硝噻吩(Calbiochem)、CENTA Bla 底物(Calbiochem)、Fluorocillin Green (Molecular Probes)、CCF2-AM (Invitrogen) 和 CCF4-AM (Invitrogen)。针对所有这些样品分析稀释液, 以测定产生显著信号的细菌的最低数量或溶菌产物的量。在采用完整细胞分析之前和之后以及对于溶菌产物的溶解之前进行效价测定, 以测定实际所使用的 CFU 的数量。使用在细菌培养基中于 37°C 孵育 15-120 分钟的 96 孔板, 采用分光光度法一式四份地评价灵敏度和重现性。起初, 以生产商建议的浓度使用化合物, 并且对于 CNIR5 而言为 2nM (即, 用于体内成像)。在培养基中评价灵敏度和重现性最好的化合物的不同浓度, 以测定最大信号所需的最小浓度。用于这些实验的对照包括阳性对照耻垢分支杆菌(*M. smegmatis*) 和商购可得的 Bla (Sigma) 并且阴性对照是缺乏 Bla 的 *Mtb blaC* 突变体 (PM638, 由罗切斯特大学, M. Pavelka 博士提供) (1)。同样评价了通过 BCG 的 Bla 的生产, 因为在某些情况下, BCG 用于 BL2 处的 IVI, 其中更广泛的成像设备都是现成的。

[0106] 评价 blaC 突变体和野生型结核杆菌中的重组 Bla 构建体

[0107] 两个多拷贝和两个单拷贝载体用于 *Mtb* 中的 Bla 表达。多拷贝载体基于 pJDC89, 所述 pJDC89 携带来自于 pMV262 的 hsp60 的启动子 (Phsp60), 其已被证明在中等水平表达

基因。该载体还携带潮霉素抗性, Phsp60 的多接头下游, 大肠杆菌的复制起点和分支杆菌 pAL5000 的复制起点。为了增加来自于该载体的表达, 采用 L5 启动子(PL5) 替换 Phsp60, 其以高于 Phsp6050 倍至 100 倍的水平表达基因。两个启动子是相对组成型的, 并且应该在大多数体内条件下表达。除非另有说明, 使用 In-Fusion2.0PCR 克隆系统(Clontech) 进行大多数克隆, 其允许使用引物上用于感兴趣区域的 PCR 的, 具有同源性的 15 个碱基对的最小区域, 将片段直接克隆到任何线性的构建体中。

[0108] 通过克隆含有 ccdB 基因以及每个启动子下游的左侧和右侧 Gateway 重组序列的 PCR 片段, 将两个构建的载体修饰为 Gateway (Invitrogen) 供体载体。携带该区域的载体必须被保持在允许该区域保持的 ccdB 幸存者(Survivor)菌株中; 然而, 在其它大肠杆菌菌株中, 该区域将是致命的并且用于防止克隆过程中非重组载体的保持。这些启动子和相关的 Gateway 区域被克隆到 pYUB412 中, 其携带潮霉素抗性、大肠杆菌的复制起点、L5 噬菌体附着位点(attP) 和 L5 重组酶, 以便其在分支杆菌染色体中的 attB 位点上整合, 并通过单拷贝稳定的分支杆菌保持。使用通过 Gateway BP 反应(Invitrogen) 携带 Gateway 重组序列的引物, 通过 PCR 将 Mtb Bla 克隆到这些载体的每一个当中。通过如(2)所述的电穿孔, 将这些载体转化到 Mtb 和 blaC 突变体中。与作为阴性对照的 blaC 突变体和单独含有适当的载体骨架的野生型相比较, 使用针对内源性 Bla 分析所描述的体外分析和信号强度, 评价所得的 Mtb 菌株以检测。

[0109] 虽然 CNIR5 是高度膜穿透的, 通过使 Bla 靶向宿主细胞膜可以增加信号的强度。所述宿主细胞膜具有用于报告子的比单独的细菌更大的表面积并且促进接近化合物。由于分支杆菌吞噬体不是静态的, 其与数个脂质和受体回收途径(receptor recycling pathway) 相互作用, 并且具有几个存在于回收核内体中的标记物, 适当靶向的蛋白质将通过分支杆菌吞噬体接近宿主细胞的质膜。Mtb Bla 通过位于其氨基末端的 TAT 信号从细菌中分泌, 形成使该蛋白质定向于理想的质膜的羧基末端标签(tag)。糖基磷脂酰肌醇(GPI) 锚定蛋白质(如在巨噬细胞表面优良表达的 CD14), 通过羧基末端的信号序列定位至质膜。

[0110] 采用来自于 CD14 的羧基末端 24 个氨基酸 GPI 锚定蛋白质信号序列和来自于 Mtb 的 Bla 构建融合(Bla::GPI)。然后使用 Gateway 系统将该融合蛋白质放置到针对 Mtb 的所有四个表达系统中, 并且将其转化到野生型 Mtb 和 blaC 突变体中。使用细胞内分析, 针对感染的巨噬细胞表面上的 Bla 水平来评价得到的表达 Bla::GPI 的菌株、作为阴性对照的 blaC 突变体和原始 Bla。不仅测试了完整的感染巨噬细胞, 而且测试了采用 0.1% 的 Triton 溶解的感染巨噬细胞。

[0111] 水解之前和水解之后的底物荧光光谱

[0112] 采集 1mL 浓度为 1 μ M 的 PBS 溶液中的激发和发射光谱。向该溶液中加入 10nM 的纯化 Bla, 再次采集激发和发射光谱, 直至没有进一步的变化。通过比较 690nm (其为峰值发射波长) 处的发射强度来估计 Bla 水解之后探针荧光信号的增加。

[0113] 作为 Bla 底物的探针的体外酶促动力学

[0114] $\sim$ 690nm 处荧光强度增加的速率(v) 被用作衡量探针水解的速率。以 1nM 的 Mtb Bla 浓度, 在 5、10、20、50、80 μ M 的不同浓度下测量速率(v)。底物的水解速率($1/v$) 相对底物浓度($1/[\text{探针}]$) 的双倒数绘制图用于估计用于 Bla 水解的探针的 K_{cat} 和 K_m 值。

[0115] 底物的生物稳定性

[0116] 由 ~690nm 处荧光强度增加的速率同样能够估计生理条件下底物的自发水解速率。因此通过于室温孵育 1 小时后的荧光定量能够很容易地评价底物在水性缓冲液和血清中的稳定性。

[0117] 培养细胞中的成像 Bla 表达

[0118] 采用 Bla 转染的 (cmv-bla) 和野生型的 Jurkat 和 C6 神经胶质瘤细胞系测试底物, 并且使用公开的成像条件, 采用荧光显微镜来成像 (3)。

[0119] mRNA 水平和 NIRF 信号之间的线性相关性

[0120] 以各种比例 (10%、20%、40%、60% 和 80% 的 cmv-bla 细胞), 5×10^5 /mL 的细胞密度来混合野生型的和 cmv-bla 的 Jurkat 细胞。在每种细胞混合物中孵育 5 μ M 的底物 30 分钟之后, 采用冷的 PBS 洗涤每个样品, 离心并溶解。对最终的上清液进行荧光测量。使用 northern 分析来量化 mRNA 和 Bla 酶的水平。mRNA 浓度对 Cy5.5 荧光强度的绘制图揭示两者之间是否存在线性关系。

[0121] 培养物中结核杆菌 β -内酰胺酶的定位和调节

[0122] 通过贯穿于 0.05 的 O.D. 下接种并生长至静止期 (O.D. =2) 的 Mtb 整个生长曲线的 qRT-PCR 测试 Bla 的转录。通过每天从相同培养物的等分中分离 RNA 来评价转录水平, 并且所有培养物一式三份地生长。如前面所述, 进行 RNA 分离 (4) 和使用 SYBR Green 的 qRT-PCR (5)。在生长曲线上的一个或两个关键点, 通过 Northern 印记法确认 RNA 的水平, 并且针对 16SrRNA 将所有的测量进行归一化。数据被比作在相同条件下使用全细菌和全细胞溶解产物的采用头孢硝噻的 Bla 活性测量。

[0123] 测试 β -内酰胺诱导 blaC 的能力。在存在和不存在 β -内酰胺下, 以贯穿生长曲线的相同方式来分析 RNA 转录。将 50、250 和 500 μ g/ml 的羧苄青霉素 (其杀死 Bla 阴性的 Mtb) 与生长至早期对数期的 Mtb 共同孵育两个小时, 并且与全细胞和全细胞溶解产物中的 Bla 活性一起测定 blaC 的转录水平。使用标准曲线来量化 Bla 水平, 所述标准曲线使用商购可得的 Bla (Sigma) 构建, 并且以相同方式生长的 Mtb blaC 突变体将被包括在内作为 Bla 活性的阴性对照。

[0124] 巨噬细胞中的 Bla 检测

[0125] 基本上, 将 J774A.1 细胞以 1×10^4 细胞/孔的密度接种于 96 孔平底板中并于 37°C 孵育过夜。以从 1000 至 0.001 细菌/细胞的各种感染多样性 (multiplicity), 加入生长至早期对数期的 Mtb 的单一细胞悬浮液, 并于 37°C 孵育 30 分钟。然后采用 PBS 和添加有 200 μ g/ml 阿米卡星的新鲜介质将孔洗涤两次, 并于 37°C 孵育 2 小时以杀死胞外细菌。然后采用 PBS 来洗涤孔并且在分光光度法测量信号之前, 在加有不同浓度的测试化合物的新鲜介质中孵育 60 至 180 分钟。在添加化合物之前, 采用 0.1% 的 Triton X-100 来溶解副本孔 (duplicate well), 以评价宿主细胞穿透性在所获得的测量中的作用。

[0126] 在所有的时间点上, 四个未处理孔用来测定与孔相关的 CFU 的数量。针对那些被证明是最有效的化合物, 通过荧光显微镜法来确认信号的定位。以类似的方式进行显微镜法分析, 但是使用 8 孔室玻片来定位信号, 测定具有阳性信号的细菌的百分比, 并评价的定位信号的强度。

[0127] 生物检定和药代动力学

[0128] 在注射后的不同时间间隔 (30 分钟、240 分钟、12 小时、24 小时、48 小时和 72 小

时),通过颈椎脱臼处死麻醉小鼠(每个时间点三只小鼠)。通过心脏穿刺收集血液样本,并且迅速收获组织(肿瘤、心、肾、肝、膀胱、胃、大脑、胰腺、小肠和大肠、肺以及脾),以通过荧光计来测量近红外荧光。数据表示为每克组织中的荧光单元(FU) [FU/(g 组织)]。

[0129] β -内酰胺酶的活性测定

[0130] 使用以下方案测量异种移植的肿瘤中的 Bla 酶水平:采用冷的 PBS 将获得的肿瘤洗涤两次;添加来自于 Promega 的溶解缓冲液(每克组织 4mL),并匀浆化组织溶液;使匀浆冷冻和解冻 3 次,并通过离心收集上清液;使用荧光基因底物 CC1 来测定 Bla 活性。通过以下来自于 Qiagen Inc 的 RNA 提取方案来证实 cmv-bla 肿瘤中 Bla 的 mRNA 并进行 RT-PCR 试验。这些测量验证了观察到的 cmv-bla 转染肿瘤中的近红外信号与 Bla 活性是否相关。

[0131] Bla RNA 体内表达的测定

[0132] 使用针对结核杆菌的标准 RNA 提取方法(6)提取体内表达的 Bla RNA,并且运行与组成对照 rRNA 基因有关的 qRT-PCR。这些测量提供了一种手段来评价与观察到的 IVI 信号水平相比,Bla 在所有组织中的表达水平。已收获的 RNA 水平本应该处于 RT-PCR 检测限以下,然而组织中却存在能够量化的 CFU,在使用 phi29 聚合酶(Fidelity Systems)的 RT-PCR 之前对 cDNA 进行扩增,所述 phi29 聚合酶有能力以高逼真度以线性方式来扩增 DNA,允许扩增后模板水平的真实量化。

[0133] 体内 Bla 菌株的表达、稳定性和毒力

[0134] 通过气溶胶,以介于 100-1000cfu/ 肺之间的量感染八组 Balb/c 小鼠(每组四只)。从 -80℃ 储备液中解冻细菌菌株,两次通过 27G 注射器针头以产生单细胞悬浮液并用于气溶胶感染。使用在威斯康星大学构建的“Madison”盒来进行气溶胶感染,所述“Madison”盒被设计为将飞沫核直接递送至肺泡腔(7-10)。在被设计为处理致命性结核杆菌菌株的已认证的 ABSL3 设施中进行采用 Mtb 的感染。感染的老鼠被安置在比较医学中心(Center for Comparative Medicine)的 ABSL3 隔室中直至尸检。在所有时间点(第 1、14、28 和 72 天)对用于每一种细菌菌株(blaC 和 WT)的一组小鼠(共四只)进行尸检,以测定针对 blaC 的 CFU、RNA 水平以及肺和脾中的 Bla 活性。RNA 转录水平和使用头孢硝噻的 Bla 活性如本文所述。

[0135] 针对为 IVI 提供保障的两种重组菌株,测试了重组 Bla 体内表达的稳定性和毒力效果。如上所述,通过气溶胶,以介于 100-1000cfu/ 肺之间的量感染十二组 Balb/c 小鼠(每组四只)。在所有时间点(第 1、14、28 和 72 天)对用于每一种细菌菌株(野生型、构建体 1 和构建体 2)的一组小鼠(共四只)进行尸检,以测定 CFU、进行组织病理学检验、测定适当的构建体的存在以及肺和脾中的 Bla 活性。使用 Bla 分析来测定携带构建体的细菌种群的百分比,所述 Bla 分析在来自于 CFU 滴度板的至少 20 个单独菌落上进行。Bla 活性分析在匀浆化的组织上进行以评价剩余 Bla 的总体水平。Bla 活性将使用本文所述的头孢硝噻来评价。

[0136] 实施例 2

[0137] 使用细胞移植模型的生体组织内检镜(intra-vital microscopy)成像

[0138] 将通用供体 Tr、CD8+T 细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞移植到采用 BCG 感染的同系小鼠中,并且采用体内生物冷光成像法(BLI)和图像指导的生体组织内检镜(IVM)使这些细胞的经时分布成像。一种转基因小鼠系(其中荧光素酶通过 β -肌动蛋白启

动子产生)提供组织和细胞的来源,所述组织和细胞将在非转基因动物中发光(11-12)。该小鼠系(L2G85),显示来自于萤火虫荧光素酶(Fluc)的明亮的生物冷光,和微弱的 GFP 荧光,所以其与一个单独的在淋巴细胞中表现出强烈的 GFP 表达和荧光的种系交配。因此,在通用供体干细胞和其它细胞的空间分布后,能够进行它们所展现的接受者中的 BLI、重新分布或将被清除,并通过利用 GFP 的 IVM 能够随后观察到检测的细胞。

[0139] L2G85 小鼠在 FVB 背景下构建,所以 FVB/NJ (Jackson Labs) 野生型小鼠被用作针对来自于 L2G85 的细胞的接受者,防止移植细胞的排斥。采用 20 μ l 生理盐水中 10^4 CFU 的 BCG 鼻内地感染总共 80 只 FVB/NJ 小鼠。于 24 小时处死四只小鼠,以测定感染后肺部中的初始 CFU。于感染后第 14 天处死另外四只小鼠,用于组织病理学检验并测定肺和脾中的 CFU。同样于第 14 天,将剩余的 72 只小鼠分成 4 组,并且具有通过尾部静脉注射引入的 L2G85Tr、CD8T 细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或无细胞(对照组)。于第 28、42 和 56 天,如(12)所描述,使六组(包括对照组)小鼠(每组四只)在 D- 荧光素的存在下成像。

[0140] 成像之后,通过使用光纤共焦荧光显微镜(Cell-viZio, Mauna Kea)的生体组织内检镜(IVM)进行明显病变的更详细检查。IVM 使用由成千上万的光纤组成的灵活的迷你探针。施以全身麻醉并且通过一个快速愈合的小切口来探查区域,防止手术后需要处死动物,并允许细胞水平上的可视化。

[0141] 在成像之后处死对照组小鼠,以测定肺和其它器官中的 CFU,其中在引入细胞的小鼠体内观察到信号。获得背部、腹部和两个侧面的图像,以更好地测定光子发射的来源。通过解剖组织、在 D- 荧光素中孵育新鲜组织以及在不含上覆组织的条件下使其成像,在一个子集的动物中获得进一步的确认。在所有用于荧光显微镜法的明显感染的组织上进行详细的病理组织学检验,以使表达 GFP 的移植细胞可视化并进行苏木精-伊红染色和抗酸染色以鉴定组织内的细菌和细胞。

[0142] 在肉芽肿形成过程中对于单个细菌和免疫细胞的体内成像

[0143] 使用移植模型,选择两种允许肉芽肿形成的最佳可视化的移植细胞类型,用于存活小鼠中细菌和宿主细胞的同时可视化。选择三个时间点,其中病变刚好变得可见、很好地形成以及其中能够观察到来自于移植细胞的信号的最近的时间点。采用 20 μ l 生理盐水中 10^4 CFU 的 BCG 表达 IVI 报告子(例如 tdTomato)鼻内地感染总共 32 只 FVB/NJ 小鼠。另外一个组的四只对照小鼠是未感染的。于 24 小时处死四只实验小鼠,以测定感染后肺部中的初始 CFU。于感染后第 14 天处死另外四只小鼠,用于组织病理学检验并测定肺和脾中的 CFU。同样于第 14 天,将剩余的 24 只小鼠分成 4 组,并且使 12 只含有允许通过尾部静脉注射引入的肉芽肿形成的可视化的 L2G85 细胞,作为对照组的 12 只不含细胞。在三个时间点,如(12)所描述,使两组(含有细胞组与不含细胞组)小鼠(每组四只)在 D- 荧光素的存在下成像。

[0144] 成像之后,通过使用光纤共焦荧光显微镜(Cell-viZio, Mauna Kea)的生体组织内检镜(IVM)进行明显病变的更详细检查。施以全身麻醉并且通过一个小切口来探查区域。在成像之后处死对照组小鼠,以测定肺和其它器官中的 CFU,其中在引入细胞的小鼠体内观察到信号。获得背部、腹部和两个侧面的图像,以更好地测定光子发射的来源。通过解剖组织、在 D- 荧光素中孵育新鲜组织以及在不含上覆组织的条件下使其成像,在一个子集的动物中获得进一步的确认。对于解剖组织中的两个移植细胞和细菌报告子信号使用过滤器组

件。在用于荧光显微镜法的所有明显感染的组织上进行详细的病理组织学检验,以使表达 GFP 的移植细胞和细菌报告子信号可视化并进行苏木精-伊红染色和抗酸染色以鉴定组织内的细菌和细胞。

[0145] 成像分析

[0146] 在使用购自 Xenogen Inc 的 Living Image 软件的 PC 计算机上处理已采集的图像。绘制肿瘤上感兴趣的区域(ROI)的全身荧光图像。IVIS 成像系统的关键特征之一在于它是针对一种美国国家标准和技术研究院(NIST)的可追踪光谱辐射源而校准的。该校准提供了 CCD 照相机计数向受试者表面上的辐射的转换,所述转换通过考虑经过镜片和光圈的损失(f/stop)和核算用于成像的时间和像素而完成。因此,所得的图像以表面辐射的物理单位表示(光子/秒/平方厘米/表面辐射)。来自于感染的小鼠、对照组小鼠和正常组织的 ROI 的整合信号(以光子/秒为单位)在不同小鼠间之间进行比较(感染:对照:正常组织的比率)使用 GraphPad Prism3.0 进行统计分析($P < 0.05$, GraphPad 软件, San Diego, CA)。

[0147] 实施例 3

[0148] 结核分支杆菌 BlaC 和 BlaC 突变体的酶的结晶

[0149] 在数月的结晶之后获得非常好的 BlaC 晶体。使用 0.1M Tris-HCl、pH8.0、20. $\text{MNH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 的结晶条件来制备与青霉素的共结晶。这些晶体允许完整蛋白质的活性位点和中间体的可视化,但由于晶体本身的翻转(turnover),初始的结合底物是不可见的。为了克服这个障碍,Mtb BlaC 突变体酶由参与水解的 Glu 残基(E166A)中的突变构建,其允许酶上 acy- 中间体的捕集和催化所需的特定相互作用的可视化。该突变体已经采用快速(即,大约两个星期)的结晶过程来结晶,所述结晶过程产生高品质的 Mtb BlaC 突变体,该突变体准备用底物来吸收(图 1A)。这表明,采用直接吸收过夜能够将底物掺入到 Mtb BlaC 突变体结晶中。在移除到新鲜溶液之后,晶体保留底物,如图 1B 中针对 CNIR4 的情况所示。直接吸收提供了一种多个底物更加快速的分析。结晶的 BlaC 突变酶已经能够实现先导化合物(头孢噻肟)的水解中间体结构的首次鉴定(图 1C),所述先导化合物在解析 BlaC 催化机制以改善底物化合物的设计中是有用的。

[0150] 实施例 4

[0151] 用于 β -内酰胺酶检测的荧光基因底物:CC1、CC2、CHPQ 和 CR2

[0152] 荧光基因化合物 CC1、CC2、CHPQ 和 CR2 有效用于检测体外和单一培养细胞中的 Bla 活性。这些探针在通过 Bla 的水解之前是没有荧光的并且在 Bla 反应之后变成荧光的(图 2A-2C)。能够根据需要选择一系列不同的荧光发射以检测 Bla:从 CC1 和 CC2 的蓝色、CHPQ 的绿色到红色 CR2)。这些新的荧光基因底物小于 CCF2,易于制备,使用简便,具有用于检测 Bla 活性的高灵敏度并且促进在多样性生物样本中 Bla 活性的检测。

[0153] 内酰胺的 3' 碳原子和离去基团之间的烯烃基团的插入有助于改善通过 Bla 的水解的动力学效率。例如,对于 CC1, k_{cat} 值是 174s^{-1} ,但是其没有插入双键的类似物的 k_{cat} 值仅是 35s^{-1} 。催化效率大约增加 5 倍。可以预期,该设计能够作为一般的策略以创建用于 Bla 的种类繁多的荧光基因底物,包括用于整体动物荧光成像的近红外底物。

[0154] 同样,可以预期,采用新型淬灭剂 QC-1 和近红外荧光团 IRDye800CW 可以改善探针。此外,通过添加磺酸盐基团可以修饰基于 IRDye 的探针。

[0155] CNIR1、CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR9 和 CNIR10

[0156] 为了采用全身荧光成像法使活体动物中的 B1a 表达成像,近红外 / 红外的荧光基因底物是有益的,因为红外 / 近红外光具有更好的组织穿透性和比可见光更少的光散射,以及少得多的血红蛋白吸收(13)。化合物 CNIR1、CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR9 和 CNIR10 是一系列用于使培养细胞中的 B1a 表达成像的近红外荧光基因底物(图 3,图 6A-6B)。这些化合物作为用于建造用于 B1a 的细胞穿透性近红外荧光基因底物的框架是有用的,并且能够用于测试电荷对于细菌细胞内或动物中的探针可用性的影响。

[0157] 报告 B1a 活性是基于荧光共振能量转移(FRET)。探针含有 FRET 供体和 FRET 淬灭剂。为了体内成像,理想情况下的荧光团应该具有 650nm 以上的发射和低毒性。靛青染料(Cy5、Cy5.5 和 Cy7)具有从 650 到 800nm 的发射,并且已经用于在成千上万的患者,几乎无副作用的报道。因此, CY5 被选作 FRET 供体。已经阐明,淬灭基团, QSY21 (而不是具有从 540 到 730nm,峰值在 660nm 处的宽吸收光谱的荧光剂本身),是一种针对 Cy5 发射的有效淬灭剂。

[0158] CNIR1 基本上是非荧光的,但是一旦采用 B1a 处理,就会产生一种高度发荧光的产物,其于 660nm 波长处的发射强度增加 57 倍(14)。然而,CNIR1 本身不是细胞穿透性的,从而不能够使 B1a 体内成像。为了改善 CNIR1 的膜穿透性,CNIR1 与全乙酰化 D- 葡萄糖胺结合,CNIR3,具有良好的细胞穿透性,并且能够使单一活体细胞中的 B1a 表达成像。在 QSY21 上添加两个磺酸盐基团,以改善溶解度,得到 CNIR4。

[0159] CNIR5 和 CNIR6

[0160] CNIR1 到 CNIR4 均基于 Cy5。对于动物体内成像,因其更长的发射波长而更加优选 Cy5.5。因此,采用 Cy5.5 来替代 Cy5 并合成 CNIR5 (图 4A)。通过 HPLC 来纯化最终产物,并且通过质谱仪来表征($C_{122}H_{123}N_{11}O_{39}S_{10}$ 质量的计算值:2687.98;通过 MALDI-MS 的观察值 $[M+H]^+$:2687.68)。当受激时,CNIR5 本身于 690nm 的波长发射微弱的荧光,但是一旦采用 B1a 处理,其强度增加 9 倍以上(图 4D)。在 pH7.1 的磷酸盐缓冲的生理盐水(PBS)中测量通过 B1a 的水解动力学:催化常数 $k_{cat}=0.62\pm0.2s^{-1}$,以及米氏常数 $K_m=4.6\pm1.2\mu M$ (该值由水解速率对底物浓度的双倒数曲线的加权最小二乘拟合获得)。其催化效率(k_{cat}/K_m)是 $1.36\times10^5s^{-1}$ 。CNIR5 在 PBS 中以及小鼠血清中是非常稳定的,其具有 $1.75\times10^{-7}s^{-1}$ 的自发水解速率,即,甚至在 12 小时培养之后,几乎未观察到荧光增加。同样,可以通过采用 QSY22 替换 QSY21 来合成 CNIR5 (图 4B)。该合成非常类似于 CNIR5 的合成,并且是没有问题的。下面将讨论 QSY22 的合成。CNIR6 是 CNIR5 不含全酰化 D- 葡萄糖胺的类似物,并且作为对照组是有用的。

[0161] CNIR5 也可以用于大规模的,商业用途的合成。在图 4A 中描绘的合成方案不适合于大规模的合成,这主要是因为碱性条件下探针的不稳定性。N,N- 二异丙基乙胺(DIPEA) (淬灭剂和近红外染料 Cy5.5 与内酰胺的耦合所必需的有机碱)通常加速 β - 内酰胺环上碳-碳双键的迁移,这产生 CNIR5 的异构体。这显著增加了纯化过程的困难。为了在合成的早期避免将内酰胺化合物 6 元环上的硫化物氧化成亚砷的异构化并且在合成的晚期将所述亚砷还原为硫化物(图 4C)。在硫化物的氧化以及淬灭剂和染料的耦合过程中没有检测到异构化。

[0162] CNIR7

[0163] CNIR7 是 CNIR5 的修饰,改善其用于 B1a 体内成像的灵敏度。CNIR5 中使用的淬灭

基团 QSY21 二磺酸盐于 675nm 处具有最大吸收,但是 Cy5.5 于 690nm 处具有最大发射。因此,由于含有 CNIR5,淬灭效率只有 90%,这在很大程度上有助于观察到的背景荧光。在 QSY21 和 Cy5 (CNIR1) 的 FRET 对中,由于 QSY21 和 Cy5 之间更好的光谱重叠,淬灭效率在 98% 以上。因此,能够于 690nm 吸收的淬灭基团将更好地淬灭 Cy5.5 并降低背景信号。据报道,对于 QSY21,当二氢吡啶被四氢喹啉替代时,吸收最大值红移 14nm。

[0164] 因此,通过采用四氢喹啉替代 QSY21 中的二氢吡啶基团来合成新结构的 QSY22 二磺酸盐(图 5A-5D),其最大吸收应该类似地红移 14nm。由于两者之间的结构差异仅在于 QSY22 使用含有六元稠环的四氢喹啉,而 QSY21 使用含有五元的吡啶,使用磺化化学并且将会预期苯环上相同的磺化位点(对位)。因此,QSY22 二磺酸盐应该更有效地淬灭 Cy5.5 并且导致较低的背景信号。

[0165] 其次,对于 CNIR5, k_{cat} 值大约为 0.6s^{-1} ,其远远小于 CC1 和 CCF2。在淬灭剂和 Cy5.5 之间插入的双键应该也导致 k_{cat} 的增加。第三,FRET 供体(Cy5.5)和淬灭剂(QSY22 二磺酸盐)之间的距离被减小,以改善能量传递效率。CNIR5 具有含有半胱氨酸的长的连接基团,用于转运子(transporter)的掺入。在新的 CNIR7 中,所述转运子被连接至 Cy5.5 上的其它偶联位点,因此,不再需要包括长的连接子(linker)。此外,2-氨基苯硫酚替代 CNIR5 中的 4-氨基苯硫酚,并且进一步缩短 Cy5.5 和淬灭剂之间的距离。NIR 底物(CNIR7)的最终设计及其化学合成如图 6A-6B 所示。它的合成能够在更短的路线中完成并且将比 CNIR5 更容易。

[0166] CNIR7 同样可以包含短的阳离子肽(如 TAT 序列),以取代乙酰化的 D-葡萄糖胺。D-氨基酸用于替代 L-氨基酸,以避免肽酶水解。已经阐明短的阳离子肽如触角足(Antennapedia)的同源异型域(homedomain)的三级螺旋(15-16)、HIV-1Rev 蛋白和 HTLV-1Rex 蛋白的基本结构域以及 HIV-1Tat 蛋白的基本结构域能够穿透细胞的质膜。

[0167] CNIR9 和 CNIR10

[0168] 图 5D 中合成的淬灭剂 QSY22 被连接于内酰胺环上,以生产如图 7A 中所示的合成方案中所描绘的 CNIR9。CNIR9 显示出基于裂解的非常强的荧光,但是在不存在通过 B1a 的断裂下,显示出非常弱的荧光。如图 7B 中所示的合成方案中所描绘,采用更短的桥连基团和更少的硫酸盐来合成类似的化合物(CNIR10)。

[0169] CNIR800 和衍生物

[0170] CNIR800 被设计为含有新的荧光团(IRDye800),其在更长的波长(800nm)下发荧光以提高 REF 成像的灵敏度。CNIR800 的更长的波长穿透组织,优于 CNIR5 的 Cy5.5 荧光团,并且由于自发荧光而降低背景,因为在大多数组织中,自发荧光的波长在 700nm 以下。CNIR800 显示出非常低的背景荧光和采用 B1aC 裂解之后非常大的差异(25 倍)。CNIR800.2 (图 11C)是采用不同连接子的 CNIR800 探针,所示连接子通过实施例 5 中所描述的可替代的方法合成,CNIR800-3 (图 11D)本身是 CNIR800 衍生物,其在内酰胺环的 R2 位置上含有甲氧基取代。此外,CNIR800 衍生物可以包含 R2 位置上的甲基取代或 R1 位置上连接于 7- 胺的苄基。

[0171] CDC1-5 底物

[0172] 由于 Mtb B1aC 具有比 TEM-1B1a 更大的活性位点,合理的是,内酰胺环上更大的取代基可能有助于改善 TEM-1B1a 上用于 Mtb B1aC 的荧光底物的特异性。首先评价内酰胺环

的胺上的取代基的效果。为了简化合成并加快筛选过程,发荧光的底物包含胺-取代的内酰胺环,所述胺-取代的内酰胺环释放作为荧光团的 7-羟基香豆素。基于 TEM-1B1a 或 Mtb BlaC 的处理,释放 7-羟基香豆素并产生荧光信号。因此,通过简单地监控基于荧光团释放的底物的荧光强度,能够获得 TEM-1B1a 和 Mtb BlaC 的水解动力学(表 1)。

[0173] 如新的图 8A 中所描绘,合成荧光基因探针 CDC-1 和 CDC-2,其中 CDC-2 是 CDC-1 的亚砷对应物(counterpart)。类似地,还制备了具有连接于内酰胺环胺基团的较大的取代基的探针 CDC-3 和 CDC-4。已经表明,探针 CDC-1 是 TEM-1B1a 优选的探针,其提供比 Mtb BlaC 快得多的水解动力学。预期,具有更大取代基的 CDC-3 能够改善对于 Mtb BlaC 的特异性。

[0174] 通过分别在 TEM-1B1a 和 Mtb BlaC 存在下的不同时间点测量荧光强度,来采用荧光仪测定探针的水解动力学。令人惊讶的是,如图 8B 所示,在 2nM TEM-1B1a 的存在下,底物 CDC-3 显示出甚至比 CDC-1 (TEM-1B1a 优选的底物)更快的水解动力学。这四种探针均为显而易见的 TEM-1 优选的,因为在相同的酶浓度(PBS 中的 2nM)、相同的时间量下采用 Mtb BlaC 处理之后荧光强度低得多。在 2nM MtbBlaC 的存在下荧光强度的增强是如此之低,以至于甚至难以精确测量。然后,10nMMtb BlaC 用于测定 Mtb BlaC 的水解动力学(图 8C)。不幸的是,小的探针 CDC-1 提供了甚至比更大尺寸的探针 CDC-3 更快的采用 Mtb BlaC 的水解动力学,这说明对于 BlaC 特异性,胺上取代基的尺寸并不是关键的。亚砷探针 CDC-2 和 CDC-4 均分别显示出比它们各自的硫化物对应物 CDC-1 和 CDC-3 慢得多的采用 TEM-1B1a 和 Mtb BlaC 的水解动力学,特异性没有任何显著的改善。

[0175] 研究在探针的内酰胺环上直接取代的基团的效果。如该图 8D 所描绘,合成在内酰胺环的 7-位上具有甲氧基的底物 CDC-5。采用如上所述的类似分析来测定 CDC-5 的水解动力学并且使用 CDC-1 作为对照。与 CDC-1 (图 8E)不同,CDC-5 清楚地显示出高的 Mtb BlaC 偏好(图 8F)。在采用 PBS 中 20nM 的 TEM-1B1a 处理 15 分钟之后,探针 CDC-5 的荧光强度仅有略微增加,然而采用相同浓度的 MtbBlaC 能够检测到 30 倍以上的荧光增加,这表明对于内酰胺环的深刻的取代影响。采用 Mtb BlaC 处理 15 分钟的 CDC-5 的荧光强度是采用 TEM-1B1a 处理者的 10 倍以上。已被证明,CDC-5 是观察到的第一个 Mtb BlaC 优选的荧光基因探针。这样的取代结构能够容易地适用于 CNIR5 样或者 CNIR800 或 CNIR800 样,近红外探针的合成。

[0176] 表 1

[0177] 基于香豆素的内酰胺探针的动力学参数。

[0178]

名称	结构	<i>blaC</i>			TEM-1 <i>bla</i>		
		K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ M ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ M ⁻¹)
CDC-1		63	13	2.1×10^5	135	48	3.6×10^5
CDC-3		69	6	8.7×10^4	59	77	1.3×10^6
CDC-OMe		47	1	2.1×10^4	50	7.6×10^{-4}	15.2
CDC-OEt		131	2.6×10^{-2}	1.9×10^2	ND	ND	ND
CCl		37	6	1.6×10^5	60	137	2.3×10^6
4-65		148	10	6.8×10^4	133	10	7.5×10^4
4-64		139	0.52	3.7×10^3	ND	ND	ND
CDC-2		136	0.51	3.8×10^3	454	7	1.5×10^4

[0179] 一般地,表 1 阐明内酰胺底物对于 TEM-1Bla 显示出较 BlaC 更好的水解动力学;然而,当甲氧基或乙氧基被引入到内酰胺环的 7-位碳上(新的图 5 中的 R2)时,这种趋势被翻转。例如,blaC 的探针 CDC-OMe 的 k_{cat}/K_m 值比 TEM-1Bla 的 k_{cat}/K_m 值大 1400 倍。通过 TEM-1Bla 的 CDC-OEt 和 4-64 的水解是如此之慢,以至于不能被测定。质子被稍微大一点的基团替代具有超过 TEM-1Bla 的对 BlaC 选择性的更深远的影响。硫化物的氧化显著降低 TEM-1Bla 和 BlaC 二者的动力学效率。与更大的乙氧基相比,更加优选甲氧基,因为乙氧基取代与甲氧基取代相比导致大大降低的动力学。TEM-1Bla 在 R1 上出现一个大的取代, k_{cat}/K_m 值随着 R1 尺寸的下降而下降(CDC-3>CDC-1>4-65)。然而,对于 BlaC, CDC-1 显示出最大的 k_{cat}/K_m 值。

[0180] 其它底物

[0181] XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26 和 XHX3-32 是 CNIR800 底物的衍生物或类似物,其展现出超过 TEM-1 的对分支杆菌 BlaC 的选择性(图 9A-9E)。化合物 XHX3-32 与

CDC-5 的结构类似,并且阐明 100 个细菌以下的检测阈值并且可以低至 10 个细菌(图 9F)。XHX3-1 包含 IRDye800 荧光团和连接于用于合成 CNIR800 的内酰胺骨架的 IRDyeQC-1 淬灭剂,其赋予更加快速的组织分布和更加敏感的小鼠中 Mtb 的检测。然而,这并不排除使用基于 Cy5.5 的用于检测的荧光团系统。XHX3-2 具有改善的离去基团和双键的掺入,以增加酚性基团的释放动力学。可以预期,由于大得多的烯丙基,双键的构型是反式,而不是以前的顺式构型。

[0182] 用于使结核杆菌中的 Bla 成像的笼式 Bla 底物

[0183] 针对 Bla (Bluco) 的笼式底物的结构(图 10A),包括 D- 荧光素(萤火虫荧光素酶(Fluc)的底物)和 β - 内酰胺(Bla 的底物)。D- 荧光素的酚性基团对于其通过 Fluc 的氧化是至关重要的。当该酚性基团通过醚键直接偶联至头孢菌素的 3' 位时,所得到的轭合物将成为针对 Fluc 的差的底物,但仍然是针对 Bla 的底物。通过 Bla 的 β - 内酰胺环的开环将会触发自发的碎裂,导致 3' 位醚键的裂解,并释放出游离的 D- 荧光素,其在发光反应中能够通过 Fluc 被氧化。为了改善轭合物的稳定性,头孢菌素上的硫化物被氧化成亚砷,得到最终结构 Bluco。通过多步有机合成来完成 Bluco 的制备,(图 10B)。由于 Bluco 的尺寸比 CNIR 系列探针小得多,它可以更好地穿透结核分支杆菌的细胞壁。在此,能够简单地利用 7 位氨基的确定的取代来设计 TB- 特异性笼式冷光底物,用于 TB 中 Bla 的 SREL 成像。同样可以合成 Bluco 以通过双键的插入(Bluco2)和氨基甲酸酯连接的使用(Bluco3)具有改善的 K_{cat} 。

[0184] 实施例 5

[0185] CNIR 荧光基因底物的可替代的合成

[0186] 在一种可替代的合成方案中,利用基于模块的方法,能够合成 CNIR 探针(图 11A)。使用以前的化学过程可以大量制备单元 1 和单元 2。不使用碱催化的偶联,在游离的半胱氨酸和引入到内酰胺单元 2 的硫醇酯之间实施温和的化疗结扎。在该条件下,没有预料到异构化。能够以高纯度大量地分离产物 3。3 上的游离氨基易于轭合至 NIR 染料,如 Cy5.5 和 NIR800。通过标准 NHS 酯介导的偶联,所述硫醇基团通过马来酰亚胺基团轭合至淬灭剂。由于两种偶联是正交的,它们可以在一锅法合成中进行,并通过 HPLC 来纯化最终产物。有机碱(如 N,N- 异丙基乙胺(DIPEA))的使用(这是异构化的主要来源)已被淘汰。此外,在引入淬灭剂之后,不需要脱保护化学过程,这提高了产率,因为已经观察到淬灭剂 QC-1 在三氟乙酸介导的脱保护条件中分解。重要的是,只需要一次最终的 HPLC 纯化。

[0187] 在另一种可替代的合成方案中(图 11B),前体 1.1 是用于合成 CNIR5 的中间体。中间体 1.1 上的游离氨基能够类似地与 NIR 染料(如 Cy5.5 和 NIR800)和 PBS 中的淬灭剂反应。由于避免了有机碱(如 N,N- 二异丙基乙胺(DIPEA))的使用(异构化的主要来源),该反应是干净的,而不需要 HPLC。进行内酰胺上的保护基团的脱保护,并且 7- 位上的氨基被偶联至 PBS 中的 NIR 染料(例如,CY5.5 或 NIR800)。使最终的反应产物经历 HPLC 纯化。相比于图 11A 中所示的方案,染料和淬灭剂偶联中不使用有机碱,以便预期在最终产物中不会发生异构化。如同采用图 11A 中的化学合成方案,只需要一次 HPLC 纯化,从而得到大产量的探针。

[0188] 这些化学合成方案能够产生 CNIR 探针,如 CNIR5.2 和 CNIR800.2 (图 11C)。虽然 CNIR800.2 和 CNIR5.2 具有略微不同的被连接至淬灭剂的连接基团,但是不会预期探针属

性将被改变。CNIR800 衍生物或类似物的探针,如(但不限于)CNIR800-3、XHX3-1 和 XHX3-2,同样可以使用这种化学过程进行大规模的合成。

[0189] 实施例 6

[0190] 针对 CNIR4、CNIR5、CNIR9 和 CNIR10 的 FRET 和荧光掺入动力学

[0191] 体外 FRET :大肠杆菌和结核分支杆菌中采用 CNIR5 的 Bla 活性检测

[0192] 检测 CNIR5 检测活细菌中 Bla 活性的能力。采用耐氨苄青霉素的质粒转化大肠杆菌,并于 30℃ 生长过夜。收集细胞并在添加 500nM 的 CNIR5 之前用 LB 介质洗涤两次。每隔一定时间采集荧光光谱(例如 :640nm),并且数据如图 12A 所示。在测量结束时(t=160 分钟),添加纯化 Bla 的溶液以验证 CNIR5 的完全水解。结果表明,CNIR 能够检测到大肠杆菌中的 Bla。相较而言,当在相同条件下使用来自于 Invitrogen Inc. 的荧光基因底物 CCF2/AM 时,没有检测到 LB 介质中活大肠杆菌中的 Bla。图 12B 阐明 CNIR5 能够检测介于 100-1000 之间的结核分支杆菌,其具有所存在的细菌数量和荧光信号之间良好的相关性。

[0193] FRET 谱

[0194] 图 13A-13D 是在采用 Bla 裂解 10 分钟之前和之后,CNIR4、CNIR5、CNIR9 和 CNIR10 的每一种探针的 FRET 发射光谱。所有四个探针在 β -内酰胺酶裂解之前几乎均不显示荧光并且在裂解之后显示出最大发射的 8.5 倍(660nm, CNIR4),24 倍(690nm, CNIR5),9.5 倍(690nm, CNIR9)和 10 倍(690nm, CNIR10)的增加。如图 13E-13H 所描绘,这些探针中的每一种与 Mtb 的共孵育导致细菌的直接标记,伴有共孵育 18h 后 CNIR4 荧光的 2 倍增加, CNIR5 荧光的 3 倍增加, CNIR9 荧光的 1.5 倍增加和 CNIR10 的 2 倍增加。

[0195] 采用 CNIR4 和 CNIR5 底物的大肠杆菌 TEM-1 和结核分支杆菌 Bla-C 的动力学

[0196] 表 2 比较了采用 CNIR4 和 CNIR5 作为底物的大肠杆菌 TEM-1 和结核分支杆菌 Bla-C β -内酰胺酶的动力学(图 14A-14B)。

[0197] 测定了使用这些 CNIR 探针向结核分支杆菌中掺入的荧光动力学。CNIR4 和 CNIR5 探针的掺入和分布被用作培养基中单独的结核分支杆菌中(图 15A-15H)和采用巨噬细胞感染的结核分支杆菌中(图 16A-16H)的底物。

[0198] 表 2

	TEM-1 CNIR4	TEM-1 CNIR5	Bla-C CNIR4	Bla-C CNIR5
[0199] Km (μ M)	2.677950938	1.868473092	13.3035901	5.897114178
Vmax (μ M/S)	0.028860029	0.016342807	0.00573132	0.003584872
Kcat (1/S)	0.577200577	0.326856134	0.11462632	0.071697437

[0200] CNIR4 向结核分支杆菌中的掺入

[0201] 荧光共焦显微镜法阐明 CNIR4 被掺入到感染巨噬细胞的结核分支杆菌细胞内部当中(图 17)。DAPI 染色(蓝色)显示感染的细胞的细胞核,绿色荧光来自于 GFP 标记的结核分支杆菌并且红色荧光来自于裂解的 CNIR4。请注意,来自于 CNIR4 的荧光在感染的细胞内建立,而未感染的细胞不显示荧光。

[0202] CNIR 探针体内荧光信号的检测

[0203] 采用各种浓度的结核分支杆菌皮内注射感染小鼠。左下象限接受 10^8 个细菌,左上象限接受 10^7 个细菌并且右上象限接受 10^6 个细菌。在 CNIR4、CNIR5、CNIR9 和 CNIR10 探针

的每一个存在下测定荧光(图 18A-18E)。CNIR5 显示出最大的荧光信号并在其中随着接种物浓度的增加而增加,其次是 CNIR10 和 CNIR9。CNIR4 没有表明荧光的增加。此外,在小鼠中测量来自于 CNIR4、CNIR5、CNIR9 和 CNIR10 探针的荧光,所述小鼠已经感染野生型结核分支杆菌或具有通过气溶胶接种的肺部中具有 b1aC 基因突变的结核分支杆菌(图 19A-19D)。CNIR10 显示出最大的总荧光,其次是 CNIR9、CNIR5 和 CNIR4 (图 19E)。

[0204] CNIR5 用作底物,使荧光掺入成像,并对在对照组小鼠和通过气溶胶感染结核分支杆菌并使用底物 CNIR5 成像的小鼠中,荧光掺入动力学对时间作图。与第 1、18、24、48 和 96 小时获得来自于对照组和感染的小鼠的图像(图 20A-20E)。气溶胶感染后于 48 小时出现 CNIR5 的峰值掺入(图 20F)。图 21A-21B 分别描绘未感染的小鼠或通过气溶胶感染结核分支杆菌的小鼠的荧光图像,其使用透照法(而不是反射率)成像,以减少背景信号。

[0205] 实施例 7

[0206] 采用 CNIR5 的体内成像:小鼠肿瘤模型中的 CNIR5

[0207] 向裸鼠的左肩中注射大约 1×10^6 的 C6 大鼠神经胶质瘤细胞,并且在相同裸鼠的右肩中注射相同数量的采用 cmv-b1a 稳定转染的 C6 大鼠神经胶质瘤细胞。当肿瘤的尺寸达到大约 6mm 时,通过尾静脉向麻醉下的小鼠注射 7.0nmol 的 CNIR5。在 IVIS200 成像仪中扫描小鼠,所述成像仪具有 Cy5.5 过滤器组件(激发:615-665nm,发射:695-770nm)和在注射后不同时间的一秒的获取时间。

[0208] 图 22A 是注射前和注射后 2、4、12、24、48 和 72 小时采集的一系列代表图像。在注射后早期的 2 小时处,cmv-b1a 肿瘤显示出比野生型(wt) C6 肿瘤更高的荧光强度。在 24 小时处,反差达到最高值 1.6,并且随后在 48 小时和 72 小时开始下降至大约 1.3(图 22B)。在成像结束时,处死小鼠以收集器官和肿瘤,用于离体成像和生物分布研究以证实成像数据。图 22C 是在注射 CNIR5 24 小时之后收集自处死小鼠的肿瘤和器官的荧光图像,这与表现来自于切离的 cmv-b1a 肿瘤比 wt C6 肿瘤更高的 Cy5.5 发射的体内成像数据一致。为了验证 cmv-b1a 肿瘤中 B1a 的表达,进行来自于采用 CNIR5 注射的小鼠的切离肿瘤的 CC1 分析(图 22D);结果表明,cmv-b1a 肿瘤具有高水平的酶表达,而野生型肿瘤几乎不具有 B1a 活性。

[0209] 为了进一步表明所观察到的反差归因于通过肿瘤中表达的 B1a 的 CNIR5 的活化,制备 CNIR6 (一个 CNIR5 的类似物,但不含全乙酰化的 D-葡萄糖胺)作为对照(图 23A)。CNIR6 能够通过 B1a 在体外水解,其与 CNIR5 一样有效,但不是细胞穿透性的,因而 CNIR6 将不能够使 B1a 体内图像。在图 23B-23C 中,贯穿整个成像期间,cmv-b1a 肿瘤和对照肿瘤之间没有任何显著的反差。这清楚地表明, CNIR5 进入到靶细胞中并且被 B1a 激活。该结果同样表明针对 CNIR5 的 D-葡萄糖胺基团对 B1a 体内成像的重要性。

[0210] 静脉注射接种后小鼠中 CNIR5 的生物分布与药代动力学

[0211] 向 Balb/c 小鼠中静脉注射 CNIR5。各组小鼠被处死用于器官收集和处理。通过各个器官中经时的荧光强度来评价 CNIR5 的存在。图 24A-24B 分别显示注射后 4 小时和 24 小时的 CNIR5 信号。在所有器官中观察到稳定的信号,这说明在 24 小时内 CNIR5 是系统性的,并且在这段时间内不会显著退化。

[0212] 体内成像以定位含用 B1a 的小鼠中的结核分支杆菌感染

[0213] 如实施例 1 所述,通过气溶胶,以介于 100-1000cfu/肺之间的量感染六组 Balb/c

小鼠(每组四只)。一组的四只小鼠用于在所有的时间点成像,并且在每一个时间点另一组的四只小鼠被处死并进行尸检,用于组织病理学研究和测定肺和脾中的 cfu。在第 24 小时、7、14、28 和 72 天,在相同的 ABSL3 套件中使用 Xenogen IVIS200 成像工作站进行成像。不感染细菌但是注射检测剂的对照组的小鼠用于成像,以控制来自于未裂解化合物的背景荧光。在避光室中采用异氟烷来麻醉动物并于 640nm 的激发下成像,并且于 690nm 处捕获图像。使用尾静脉静脉内注射 5nmol 的 CNIR5(其已被证明对于 IVI 是足够的)。在注射化合物之前和注射后第 1、2 和 4 小时获取图像。如果在任何这些时间点上观察到信号,在比随后的信号耗散晚 24、48 和 72 小时的时候使动物成像。

[0214] 显示了感染野生型结核分支杆菌的小鼠(图 25A)和对照小鼠(图 25B)的体内图像。在成像之前,两种小鼠均采用 CNIR5 的静脉注射来感染。该图像显示,感染的小鼠具有来自于肺部的信号。信号的 3D 重建表明平均信号位置在肺部之间。由于信号被平均化并且老鼠具有两叶肺,可以预期,该位置将是最大的点源(point source)。因此,化合物 CNIR5 能够用于测定活体哺乳动物中结核分支杆菌的位置。Xenogen/Caliper IVIS 光谱成像系统用于捕捉该图像。

[0215] 含有 Bla 的小鼠中结核分支杆菌检测的测定阈值

[0216] 采用小鼠的实时 SREL 成像,β-内酰胺酶 CNIR 探针能够检测 100 个或以下的结核分支杆菌细菌(图 26A)。在未感染的活体小鼠(作为对照组)上(图 26B)或在感染结核分支杆菌的活体小鼠上(图 26C)进行 SREL 成像。彩条表示于 620nm 处激发后于 680nm 处的发射水平。颜色表示源自感染 Mtb 的肺部的强烈信号,表明感染的具体位置。同样可以测定用于假单胞菌、葡萄球菌和军团杆菌的检测阈值。

[0217] 含有 Bla 的豚鼠中结核分支杆菌感染的体内成像

[0218] 以与上述用于小鼠的相同方式感染六组豚鼠(每组四只),但有以下例外。首先,仅测试感染后长达 28 天的时间点,因为预期豚鼠在稍后的时间点开始显示出显著的死亡率。其次,在豚鼠中需要 20 倍以上(对于 CNIR5 而言,~100nmol)的检测剂,以获得小鼠中需要的同样的血清水平,通过横向跖骨静脉施予化合物。在 ABSL3 设施中通过气溶胶感染豚鼠并将其保持在隔室中直至成像。在 ABSL3 套件中,使用 IVIS200 成像工作站,于感染后第 24 小时、7、14 和 28 天进行成像。不感染细菌但是注射检测剂的对照组的小鼠用于成像,以控制来自于未裂解化合物的背景荧光。

[0219] 在成像之前,使用尾静脉静脉内注射 100nmol 的 CNIR5(其已被证明对于 IVI 是足够的)。在注射化合物之前和注射后第 1、2 和 4 小时获取图像。如果在任何这些时间点上观察到信号,则在比随后的信号耗散晚 24、48 和 72 小时的时候使动物成像。

[0220] 实施例 8

[0221] 采用 CNIR5 的临床样品中的结核杆菌检测

[0222] 从临床实验室直接获得 30 个临床分离体(isolate),包括如标准的临床实验室测试(抗酸直接集中涂片,抗酸培养和霉菌酸 HPLC)所测定的约一半为阳性结核病和约一半为阴性。这些临床样品主要是痰(26 个样品),但也有 4 支气管冲洗液。痰样品为未诱导(24 个样品)和诱导(2 个样本)。阳性样品内有 4 鸟分支杆菌复合体(MAC)样品。以双盲的方式在两个独立的测试中检查这些样品的每一个,所述测试获得特异性(>94%)和灵敏度(>86%)的比较的结果。

[0223] 使用 CNIR5 底物(图 27A)评价临床样品。只得到一个假阳性(sa6),但该患者显示临床疾病,但标准培养和痰液测试是阴性的。只得到一个假阴性(sa29),但通过培养该患者也是阴性的。样品 sa18,sa20 和 sa24 是鸟分支杆菌。阴性痰样品也被用于强化实验,以测定检测的阈值(~ 100 – 1000 CFU),并预先优化试验条件(图 27B)。

[0224] 在三个以上的独立实验中,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,用结核病得到的临床样品直接获得类似的检测阈值。在用已知数量的结核菌强化的痰中,产生的信号强度相对于存在的细菌数量有一个非常良好的相关性($R^2=0.9$)(图 27C)。表明此时的灵敏度为使得检测 100 个细菌的灵敏度,这是在为了产生与培养可比较的诊断测试所需的灵敏度的范围内。有趣的是,无论是否使用实验室缓冲液(PBS)和痰,使用本系统时其可靠性和定量性质之间几乎没有差异,这表明该系统是相当强劲的(图 27D)。

[0225] 此外,指示杆菌数和信号强度之间的相关性的能力提供药物敏感性方案的基础,所述敏感性方案用于在 4 至 12 小时内识别异烟肼和利福平抗性。这种潜力已经通过分析使用底物 CNIR5 的抗结核病治疗得到证实,其清楚显示治疗后 24h 以内治疗组和非治疗组之间的差异(图 27E)。这些数据表明,使用本文提供的底物,可以在 24h 内区分敏感的和耐受的细菌。可以预期,这些底物的优化变种将改善诊断测试并降低检测阈值。

[0226] 实施例 9

[0227] 采用 CNIR7 的体内成像:小鼠组织中 CNIR7 的生物分布

[0228] 在体内成像之前,评价小鼠组织中 CNIR7 的生物分布。在三只小鼠中(以 $100\ \mu\text{L}$ 生理盐水缓冲液中 10nmol 的剂量)静脉注射 CNIR7。在注射后的不同时间间隔(30 分钟、240 分钟、12 小时、24 小时、48 小时和 72 小时)通过颈椎脱臼处死麻醉小鼠(每个时间点,三只小鼠)。通过心脏穿刺收集血液样品,并且迅速获取组织(心、肾、肝、膀胱、胃、大脑、胰腺、小肠和大肠、肺和脾),以通过荧光计来测量近红外荧光。数据表示为每克组织的荧光单元(FU) $[\text{FU}/(\text{克组织})]$ 并且指示这些组织器官中水解的 CNIR7 产物的量。

[0229] 小鼠模型中采用 CNIR7 的体内成像

[0230] 对于 CNIR7 成像,在裸鼠体内使用 C6 神经胶质瘤异种移植体。通过以 1 升/分钟的低速率吸入 100% 氧气中的 2% 异氟烷来麻醉小鼠。采用 $100\ \mu\text{L}$ 的 PBS 缓冲液中 10nmol 的 CNIR7 注射横向尾静脉。采用使用 IVIS200 光学 CCD 系统(Xenogen Inc.)的小动物体内荧光成像系统使三只小鼠成像。该系统适用于生物发光和荧光活体成像,可以快速扫描一个小型啮齿动物为一个单一的投影,即尽可能短为 1 秒的荧光成像。这个系统也可使用可视化的完整的软件工具。对于采用 Cy5.5 的 NIRF 成像,使用具有激发滤波器($640\pm 25\text{nm}$)和发射滤波器(695 – 770nm)的过滤器组件。使用对于红光敏感度高的配备有 C-mount 镜头的单色 CCD 摄像头收集荧光图像。处死小鼠用于生物分布研究。使用肿瘤组织样品评价 B1a 活性。

[0231] 实施例 10

[0232] 静脉注射接种后小鼠中 CNIR800 的生物分布和药代动力学

[0233] 采用 10、20 和 $40\ \mu\text{M}$ 三种不同剂量的 $2.5\ \mu\text{L/g}$ 的 CNIR800 静脉注射接种小鼠。在施用后第 1、3、5、10、24、48 小时的不同时间间隔,通过颈椎脱臼处死麻醉的小鼠(每个时间点,三只小鼠)。通过心脏穿刺收集血液样品并迅速获取组织(肿瘤、心、肾、肝、膀胱、胃、大脑、胰、小肠和大肠、肺和脾),以通过荧光计测量近红外荧光。通过加入氢氧化钠处理这些

样本,以水解用于荧光测量的所有未活化的探针。因此,能够获得活化的和未活化的两种探针的生物分布,并且数据表示为每克组织的荧光单元(FU) [FU/(克组织)]。因此,测定底物在组织中的最佳浓度。

[0234] 含有 Bla 的小鼠中结核分支杆菌检测的测定阈值

[0235] 通过肺部途径感染 5-7 周龄的雌性 Balb/c 小鼠(每组五只伴有一只未感染的对照)。利用 50、500、5000、50000 和 500000cfu/ 肺的接种量。以每种接种量感染两组小鼠并且一组未成像,但是在第 1 天处死,并且对肺进行涂布处理,以确认针对 cfu 的接种量。在其它组的小鼠中,通过静脉注射施用 CNIR800 的最佳剂量,在施用后立即和底物递送后第 1、3、5、10、24、48 和 72 小时使小鼠成像。

[0236] 针对四个附加条件,通过在 2 倍较低底物浓度和 2 倍较高底物浓度下使用 2 倍高于所测定的检测阈值和 2 倍低于该阈值的接种量的成像实验来实现底物浓度的优化。表明信噪比改善的接种物和底物的浓度能够用于再次测定优化的检测阈值。

[0237] 感染过程中 CNIR800REF 成像与 cfu 的相关性

[0238] 小鼠为保持低叶绿素膳食(以减少自发荧光)和水的 5-7 周龄的雌性 Balb/c 小鼠。利用每组五只动物,其中一只对照是未感染的并且四只是感染的。在成像之前,所有动物接受以 $2.5 \mu\text{l/g}$ 的 $20 \mu\text{M}$ CNIR800 递送的底物。相应于(组 #x5 组的数量):1) $100\text{cfu} \times 3$, 2) $1000\text{cfu} \times 1$, 3) $10000\text{cfu} \times 6$, 4) $100000\text{cfu} \times 1$ 和 5) $106\text{cfu} \times 1$ 的剂量被沉积在肺部。组 1 的小鼠在第 7 天首先成像。如果观察到信号,将动物处死并测定 cfu。如果未观察到信号,使动物每天成像,直至观察到信号,记录该天并测定 cfu。这就是生理学相关感染通过 REF 变得可见的时间点,也是治疗能够开始的第一时间点。组 1 中其它两套动物在感染后第 28 和 60 天成像。组 2 在第 4 天成像并且以与组 1 相同的方式处理,直至观察到信号并测定 cfu。在组 3 中,一套动物在感染后第 1、3、5、7、14、28 天成像并测定 cfu。在组 4 和组 5 中,动物在第 1 天成像并测定 cfu。

[0239] 对于静脉注射接种而言,剂量相应于:1) $104\text{cfu} \times 1$, 2) $105\text{cfu} \times 2$, 3) $106\text{cfu} \times 1$, 4) $107\text{cfu} \times 1$ 。以相同的方式处理所有这些组,并在第 1、2、3、4、5、6 和 7 天成像。一旦观察到信号,就处死该组,除了组 2 中的第二组动物,其在至第 7 天的每个时间点成像,并在最后一天处死。使用 IVIS 成像系统,在整体动物和切离器官水平上可视化感染位点上的荧光掺入,并且采用荧光计和使用组织冷冻切片和荧光共焦显微镜法在组织匀浆中确认。

[0240] 通过 CNIR800REF 成像的治疗筛选

[0241] 在处理之前,使用 Madison 盒以 $100\text{--}1000\text{cfu/}$ 肺感染 5-7 周龄的雌性 Balb/c 小鼠 4 天。利用每组十只动物,其中作为对照用于成像的两只动物是未感染的并且每组五只动物用于常规 cfu 研究。在所有的实验中,一组动物是接受处理的,并且第二组是未处理的。在治疗之前,使所有动物在第 3 天成像以获得基线,治疗性治疗在第 4 天开始,并且在感染后第 5、6、7、14 和 28 天进行成像。平行地,在感染后第 4、7、14 和 28 天处死一组五只动物,用于标准治疗评价。同样,在通过尾静脉的 106cfu 的静脉注射接种模型中,每天采用 5、10、25 和 50mg/kg 的 INH、RIF 和 MOX 处理。对于常规成像和使用采用 25mg/kg 的 INH 处理的治疗技术进行比较。

[0242] 实施例 11

[0243] 荧光蛋白:针对 IVI 评价荧光蛋白的潜力

[0244] 荧光蛋白(FP)mPlum 具有 649nm 的最大波长和相当不错的 59nm 的斯托克斯位移(Stokes shift),这意味着它不仅将相当好地穿透组织,而且具有良好的信噪比。尽管它不如 EGFP 明亮,但是它具有类似的光稳定性,并且在 IVI 期间,其波长和斯托克斯位移将超过弥补这种差异,虽然它可能不会像体外所表现的。具有长波长(620nm)的第二个 FP 是 mKeima,其具有甚至比 mPlum 更好的于 180nm 处的斯托克斯位移,在 180nm 处很少关注的是背景将归因于激发波长中的重叠。然而, mKeima 具有与 mPlum 类似的亮度,这使得不确定在 IVI 期间 FP 会表现得更好。具有相对较长波长(610nm)的另一个 FP 是 mCherry,其比 mPlum 或 mKeima 明亮四倍。mCherry 的斯托克斯位移只有 23nm,所以尽管亮度更大,但信噪比可能仍然是一个问题。FP tdTomato 具有最短的波长(581nm),但也是最亮的,其比 mPlum 和 mKeima 明亮 20 倍。

[0245] 使用 Gateway PCR 克隆,将四种 FP (mPlum、mKeima、mCherry 和 tdTomato)克隆到表达载体中。这些构建体的每一种被转化到 Mtb 中,并使用 96 孔板分析来体外评价。在标准生长条件下,采用细胞内生长分析,在培养基中对它们进行评价。通过分光光度法和使用 8 孔室玻片的显微镜法对所有的构建体进行评价。分光光度法研究评价每种构建体的最佳激发波长以及最佳的发光波长。EGFP 用作在长波长下发射的阴性对照和单独的载体,以评价从来自于细菌和巨噬细胞本身的自发荧光的影响。显微镜法通过计算细菌种群中的百分比荧光允许评价在培养基中生长后各种载体的信号强度和稳定性的任何可变性。

[0246] 针对 FP 的体外评价平板

[0247] 针对培养物中的稳定性、转录和翻译的效率、检测限和异烟肼处理期间 / 之后的信号,对 FP 构建体进行评价。由于先前在单独 FP 转化中已经观察到信号强度构造稳定性的变化,最初选择具有每个 FP 构建体的至少两个转化子进行评价。然后在体内研究中选择对于每一个 FP 的单个最佳菌株。

[0248] 通过选择压力(selection)存在和不存在下每一种菌株的生长和生长 30 天后仍然保持荧光的细菌百分比的测定来评价培养稳定性。通过合适的抗生素存在和不存在下的平板稀释来确认培养稳定性以评价培养物中携带来自质粒的可选择标记的细菌的百分比。转录和翻译效率的研究提供了深入了解在每一个构建体中启动子是否是功能好的以及密码子的使用是否影响向可以影响信号强度的点的翻译。这是通过从携带每个 FP 构建体的 Mtb 的 RT-PCR 来评价的,以比较使用不同启动子和单-或多-拷贝载体的折叠诱导,以使该诱导与构建体表达的其它报告子相关。与表达的报告子无关,该比例应该是可比较的。

[0249] 分别使用分光光度法和 Western 分析测量和比较每一株的荧光强度和蛋白水平。与表达的报告子或表达的 RNA 转录水平无关,蛋白质与 RNA 与荧光信号的比例是可比较的。如果一些报告子被低效率地翻译,蛋白质与 RNA 转录的比例随着 RNA 表达水平的提高可能会减少。这样的观察被解释为对于 FP 改正密码子的使用的需要,以促进翻译效率。然而,这也可能是蛋白质不稳定或由于过表达包涵体中的隔离(sequestration)的结果。

[0250] 通过评价平行制备的培养物中有限稀释的荧光确定检测限。相对于 CFU,并通过荧光显微镜定量评价这些数据以确认通过荧光得到的数值与有活力的细菌的直接相关性。通过向培养物中添加 1 μ g/ml 的异烟肼(INH)评价异烟肼治疗的影响,所述培养物已经在 96 孔格式试验中评价了其 CFU 和荧光。将孵育室设置为 37°C,使用分光光度计并通过在添加 INH 之后立即和直至 48h 的各种时间点对于 CFU 进行等份的涂抹来测定实时的 CFU 和荧光。

这提供了深入了解对于每个构建体的抗生素治疗后的信号强度、稳定性和信号持续时间。

[0251] 选定的重组 FP 的稳定性和毒力效果

[0252] 在毒力研究中,将所有菌株与野生型平行比较。如实施例 1 所述,通过气溶胶以介于 100-1000cfu/ 肺之间的量感染二十组 Balb/c 小鼠(每组四只)。针对每一种细菌菌株(野生型、FP1、FP2、FP3、FP4),在所有时间点(第 1、14、28 和 72 天)对一组四只小鼠进行尸检,以测定 cfu,进行组织病理学检测,测定适当的构建体的存在以及肺和脾中的荧光水平。通过荧光显微镜法来测定携带构建体的细菌种群的百分比,所述荧光显微镜法在来自于 CFU 滴度板的至少 20 个单独菌落上进行。测量均质化组织的荧光水平以评价剩余 FP 的总体水平。

[0253] 通过气溶胶感染的小鼠中的荧光蛋白。

[0254] 通过气溶胶,采用介于 100-1000cfu/ 肺之间的每一种菌株来感染六组 Balb/c 小鼠中的每一只(每组四只),所述菌株携带 mPlum、mKeima、mCherry 和 tdTomato 的构建体以及单独的载体骨架(共三十组)。如实施例 1 所述,将用于气溶胶感染的菌株解冻。五组小鼠(每组四只)(一组每一个含有 FP,并且一组含有单独的载体)用于在所有时间点成像,并且在每个时间点,将另外 5 组小鼠(每组四只)处死并进行组织病理学尸检,以测定肺和脾中的 cfu。在第 24 小时、7、14、28 和 72 天,在相同的使用 Xenogen IVIS200 成像工作站的 ABSL3 套件中,使用针对每一种 FP 的最佳激发和发射过滤器进行成像。当 FP 需要在 IVIS 中使用不同组件的过滤器时,在使用相同过滤器组件的每一个动物组中同样使载体单独成像以控制自发荧光。因此,验证用于 IVI 的每个 FP 和该系统的灵敏度,因为细菌负荷(load)将在整个实验过程中感染后的稍后时间点从非常低(100cfu/ 肺)变化至非常高($>10^5$ cfu/ 肺)变化。FP 的存在导致用于自发荧光和潜在的毒力差异的单独载体对照组的使用。

[0255] 实施例 12

[0256] 用于检测培养基中的结核杆菌的叩头虫红(CBR)

[0257] 使用已经引入的 Gateway 重组位点,将 CBR 基因克隆到针对 Bla 所描述的所有四种构建体中。这些质粒允许来自于 L5 和 hsp60 启动子的表达。使用具有发冷光检测能力的多模式酶标仪中的 96-孔板和注射器,在生长介质中比较每种菌株在 D-荧光素的存在下的发光能力,以允许测量加入 D-荧光素过程中闪光发射和持续的信号衰减动力学。所有的实验都是一式四份,伴有细菌的有限稀释和 CFU 的测定,以允许使活菌数与信号相关联。通过选择压力不存在下生长 7 天评价构建的稳定性,然后进行分光光度法和荧光显微镜检查。这些数据与 CFU 相关联来测定信号/活力杆菌,并且使用显微镜计算产生阳性信号的细菌的百分比。在这些试验中,通过携带该构建体的细菌的生长对于单独携带载体的细菌的绘制评价构建体对细菌活力的作用。

[0258] 评价小鼠中的 CBR 表达、稳定性和毒力

[0259] 针对为 IVI 提供保障的两种菌株,测试了重组 CBR 的稳定性和毒力效果。在毒力研究中,使所有菌株与野生型平行比较。如实施例 1 所述,通过气溶胶以介于 100-1000cfu/ 肺之间的量感染十二组 Balb/c 小鼠(每组四只)。

[0260] 针对每一种细菌菌株(野生型、CBR1 和 CBR2),在所有时间点(第 1、14、28 和 72 天)对一组四只小鼠进行尸检,以测定 CFU,进行组织病理学检测,测定适当的构建体的存在以及肺和脾中的荧光水平。通过荧光显微镜法来测定携带构建体的细菌种群的百分比,所述

荧光显微镜法在来自于 CFU 滴度板的至少 20 个单独菌落上进行。测量均质化组织的冷光水平以评价剩余 CBR 的总体水平。

[0261] 使小鼠中 CBR 表达的结核杆菌和 BCG 菌株成像

[0262] 如实施例 1 所述,通过气溶胶,采用介于 100-1000cfu/ 肺之间的每一种菌株来感染六组 Balb/c 小鼠中的每一只(每组四只),所述菌株携带 RLuc8 和单独的载体骨架(共十二组)。两组小鼠(每组四只)(一组含有 RLuc8,并且一组含有单独的载体)用于在所有时间点成像,并且在每个时间点,将另外 2 组小鼠(每组四只)被处死并进行尸检,以测定肺和脾中的 cfu。在第 24 小时、7、14、28 和 72 天,在使用 Xenogen IVIS200 成像工作站的相同 ABSL3 套件上进行成像。在成像之前,使用尾静脉将 1-5 μ mol 的 D- 荧光素(其已被证明对于 IVI 而言是足够的)静脉注射。

[0263] 在化合物注射之前和注射后第 1、2 和 4 小时获取图像。如果在任何这些时间点观察到信号,在比随后的信号耗散晚 24、48 和 72 小时的时候使动物成像。在避光室中使用 Matrix 系统(Xenogen)采用异氟烷(100% 氧气中的 2% 异氟烷)来麻醉小鼠,并采用 10 像素组合,使用从 3 到 5 分钟的整合时间来成像。这允许针对 IVI 的 CBR 效用和该系统灵敏度的改变,因为细菌负荷将在整个实验过程中感染后的稍后时间点从非常低(100cfu/ 肺)变化至非常高(>10⁵cfu/ 肺)。CBR 基因的存在导致用于自发荧光和潜在的毒力差异的单独的载体对照组的使用。

[0264] 实施例 13

[0265] 评价针对 IVI 的其它荧光素酶系统的潜力

[0266] 使用 Gateway PCR 克隆,将 RLuc8 荧光素酶克隆到所述分支杆菌的表达系统中。将构建体引入 Mtb 中,并检查其在使用全细胞的细菌培养基中的光生产。完整的细菌应该产生可比于 CBR 的光,那么细胞内的细菌系统能够与小鼠中的 CBR 相比。革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌荧光素酶系统都具有的优点是它们产生其自身的底物。使用限制性内切酶,将这两个操纵子克隆到表达系统中,以将其从其现有载体中移除,随后是结扎至 Gateway 适配器和 Gateway 重组克隆。针对细菌培养基中来自 Mtb 的光生产来测试构建体。除了将在用于分光光度计的冷光设定下测量光生产以外,如对于 Bla 系统所描述,针对生物冷光的所有分析在 96 孔板中进行。通过有限稀释来评价灵敏度,并且对所有样品平行进行 CFU 测定,以便能够计算相对于 CFU 的光生产。

[0267] 使用荧光素酶检测巨噬细胞中的结核杆菌

[0268] 测试分泌和膜定位对巨噬细胞中荧光素酶活性的影响。通过附着来自于 Mtb BlaC (BlaSS) 的氨基末端 TAT 信号序列并将该融合置于在 Mtb 中优化表达 CBR 的相同构建体来实现来自于分支杆菌的分泌。通过分析来自于 CBR, BlaSS::CBR 和表达生长至早期对数期的 Mtb 菌株的单独载体的培养物滤液和全细胞来确认分泌。来自于该菌株的培养物滤液具有比表达菌株的 CBR 高得多的光生产,并且来自于 BlaSS::CBR 的全细胞具有与 CBRMtb 相同或比 CBRMtb 更低的光生产。将用于 Bla 的来自于 CD14 的羧基末端 GPI 锚定蛋白附着于 BlaSS::CBR 上以生产融合蛋白 BlaSS::CBR::GPI。

[0269] 对比表达 CBR 和 BlaSS::RLuc8 的菌株,使用细胞内巨噬细胞分析,针对光生产,评价表达 BlaSS::CBR::GPI 的 Mtb。在 96 孔板中使用 J774A.1 巨噬细胞,以便能够测试细菌滴定和各种浓度的化合物。如对于 Bla 所描述,以相同的方式一式四份地进行所有的分析。

在添加 D- 荧光素之前,采用 0.1% 的 Triton X-100 溶解副本孔,以评价在测量中获得的宿主细胞的穿透性作用。在所有的时间点,四个未处理孔用于测试与细胞相关的 CFU 的数量。CBR 的细胞内检测可能受到针对 D- 荧光素的真核细胞和分支杆菌液泡的穿透性的影响,因此,巨噬细胞内针对细菌的灵敏度评价将是极为重要的。然而,细菌荧光素酶系统是不太可能受到细胞内细菌生长的显着影响。

[0270] 使用细胞内分析,证实每一个细菌荧光素酶系统和 RLuc8 中的光生产。在添加腔肠素(coelenterazine)之前,采用 0.1% 的 Triton X-100 溶解副本孔,以评价在测量中针对 RLuc8 获得的宿主细胞的穿透性作用。通过证明最佳有效性的那些构建体,证实信号的定位。以类似的方式,但是使用 8- 孔室玻片来进行这些分析。显微镜法允许定位,具有阳性信号的细菌百分比的测定和定位信号强度的评价。

[0271] 实施例 14

[0272] 通过针对 IVI 的化合物的 Bgal 检测。

[0273] 通过限制性酶向 Gateway 适配器的消化和结扎,将如前所述的启动子 Bgal 基因(17)克隆到分支杆菌表达载体中。这些载体被转移到 Mtb 中,用于在如前所述的 96- 孔板中使用分支杆菌可穿透性荧光试剂 5- 乙酰氨基 - 荧光素二 - β -D- 吡喃半乳糖苷(C2FDG)的细菌培养基中的评价(18)。这种化合物直至通过 Bgal 裂解才有荧光,于 460nm 处激发并且于 520nm 处发射。产生最强荧光信号的载体用于构建另外的融合,其允许 Bgal 的分泌和宿主细胞的定位。

[0274] Bgal 分泌的重要性在于帮助测定分支杆菌穿透性在不同的化合物检测 Bgal 的能力中是否起作用。为了分泌 Bgal,来自于 Mtb BlaC (BlaSS) 的氨基末端 TAT 信号序列被附着,而且将该融合置于在 Mtb 中最佳表达 Bgal 的相同构建体中。通过分析来自于 Bgal, BlaSS::Bgal 和表达生长至早期对数期的 Mtb 菌株的单独载体的培养物滤液和全细胞来确认分泌。将用于 Bla 的来自于 CD14 的羧基末端 GPI 锚定蛋白附着于 BlaSS::Bgal 上以生产融合蛋白 BlaSS::Bgal::GPI。

[0275] 针对采用 C2FDG、5- 十二烷酰基氨基试卤灵二 - β -D- 吡喃半乳糖苷(C12RG) 和 9H-(1,3- 二氯 -9,9- 二甲基吡啶 -2- 酮 -7- 基) β -D- 半乳糖苷(DDAOG) 的荧光检测的灵敏度,评价所有 Bgal 构建体。所有的化合物购自 Molecular Probes, Invitrogen 的一部分。由于已知 C2FDG 有效地进入并检测 Mtb 中的 Bgal,该化合物提供了阳性对照,虽然对于 IVI,其发射波长是不利的。C12RG 很好地进入真核细胞并具有较长的发射波长(590nm),但类似的化合物 C12FDG,不能很好地检测 Mtb 中的 Bgal,这表明它不能很好地跨越细菌膜。

[0276] 为了证实穿透性和定位对于产生的信号的影响,针对所有的菌株和化合物,在完整细胞和全细胞溶解物中测量 Bgal 活性。已显示化合物 DDAOG 有利于 IVI,因为它很好地跨越真核细胞膜,并且在通过 Bgal 裂解后具有最长的发光波长(660nm)。可以预期,对于进一步的研究,DDAOG 将是最好的化合物,其应该很好地检测 Bgal 活性。

[0277] 小鼠中 Bgal 的表达、稳定性和毒力

[0278] 针对为 IVI 提供保障的两种重组菌株,测试了重组 Bgal 的稳定性和毒力效果。在毒力研究中,使所有菌株与野生型平行比较。如实施例 1 所述,通过气溶胶以介于 100-1000cfu/ 肺之间的量感染十二组 Balb/c 小鼠(每组四只)。针对每一种细菌菌株(野生型、Bgal1 和 Bgal2),在所有时间点(第 1、14、28 和 72 天)对一组四只小鼠进行尸检,以测

定 CFU, 进行组织病理学检测, 测定适当的构建体的存在以及采用 C2FDG 的肺和脾中的 Bga1 水平。通过 Bga1 分析来测定携带构建体的细菌种群的百分比, 所述 Bga1 分析使用在来自于 CFU 滴度板的至少 20 个单独菌落上进行的 C2FDG。测量均质化组织的 Bga1 水平以评价每个时间点剩余 Bga1 的总体水平。

[0279] 使小鼠中表达 Bga1 的结核杆菌菌株成像

[0280] 由于来自于 L2G85 小鼠的所有细胞表达来自于 ACTB 启动子的 Fluc, 用表达 Bga1 的 Mtb 菌株感染来自于 L2G85 小鼠的骨髓来源的巨噬细胞, 并与单独携带载体的相同菌株比较。以与在 J774A.1 巨噬细胞中的其它细胞内生长试验相同的方式感染来自于 L2G85 小鼠的骨髓来源的巨噬细胞进行巨噬细胞感染。在添加 Luga1 之前采用 0.1% 的 Triton X-100 溶解副本孔, 以评价获得的测量中宿主细胞的穿透性的作用。在所有时间点使用 4 个未处理孔测定与细胞相关的 CFU 的数量。通过对于那些证明是最有效的构建体的显微镜检查确认信号的定位。以类似的方式进行这些分析, 但使用 8 孔室玻片。显微镜可以定位, 测定具有阳性信号的细菌百分比和评价定位信号的强度。使用对于 CBR 所描述的相同方案, 在小鼠中进行 IVI 研究, 不同的是, 使用 Luga1 代替荧光素用于检测。

[0281] 实施例 15

[0282] 基于 β -内酰胺酶和其它蛋白质的晶体结构模型的底物探针设计; BlaC 酶口袋建模

[0283] 使用小分子对结核分支杆菌 β -内酰胺酶 (BlaC) 口袋建模, 以改善探针的设计和特异性。小分子的高通量筛选 (如在小分子库中) 用于鉴定结合 BlaC 的活性位点裂隙的化合物, 并由此获得晶体结构。合成候选探针, 并在体外测试。

[0284] β -内酰胺酶样酶和青霉素结合蛋白质

[0285] 将结核分支杆菌中的两种主要的 β -内酰胺酶样蛋白质 (BlaX) 和两种主要的青霉素结合蛋白 (PBP) 克隆、过度表达并纯化。采用头孢哌酮、青霉素、环丙沙星测定针对 BlaX 和 PBP 的 K_m 和结合常数。解析候选蛋白质的晶体结构并用于设计具有改善探针活性的特异性探针。

[0286] 结核分支杆菌酶和大肠杆菌 β -内酰胺酶 TEM-1 之间的构效关系

[0287] 来解析具有头孢哌酮的 BlaC 和 TEM-1 的晶体结构。建模、设计和合成基于头孢哌酮的探针。候选探针用于测定 BlaC 和 TEM-1 的 K_m 。

[0288] 实施例 16

[0289] 通过新型淬灭剂和染料来改善 REF 灵敏度

[0290] 用于 REF 成像的前述底物已经成功用于小鼠中结核杆菌肺部感染的成像, 表明该策略提供重要保障。然而, 由于肺中的检测阈值 >10000 个细菌, 通过增加 REF 探针的灵敏度, 将有利于改善检测。最近, LiCor 已经开发一种新型染料和淬灭基团, 其在 800nm 范围内起效, 为改善化合物提供了重大保障。该新型染料 (被称为 IRDye800CW) 比 Cy5.5 大约明亮 10 倍, 并且由于其长波长, 该新型染料穿透哺乳动物组织的能力将远远优于 Cy5.5。设计基于该染料的化合物和称为 QC-1 的匹配的淬灭剂。基于该染料和淬灭剂的化合物, 允许对当前 REF 系统显著改善。还探讨了两种 IRDye800 染料, IRDye800RS 和 IRDye800CW (图 27), 其作为活体成像应用的 FRET 供体。两者具有激发波长为 780nm, 发射波长为 820nm 的相同的荧光光谱, 但它们与 IRDye800CW 不同, 比 IRDye800RS 携带更多的磺酸盐基团。这种

差异可能导致体内生物分布不同,因此两者需要探索。一个具有针对 IRDye800 的高淬灭效率的相应染料(IRDye QC-1)用作荧光探针中的 FRET 受体(图 28)。如上所述,这些分子向探针中的掺入与采用相同的 NHS 酯和胺之间的偶联化学过程制备 CNIR5 的合成方法相同。首先,由 IRDye800 染料制成的这些 CNIR 探针的水解动力学通过 TEM-1Bla 和 Mtb BlaC 来表征,并且针对皮下和肺部感染中 Mtb 的体内成像来评价探针。

[0291] 体外首先检查基于 IRDye800CW 的化合物,然后进行细胞内研究和动物模型的工作来验证它在皮下和肺部感染。利用组织切片和在细胞水平上受感染组织的荧光共焦显微镜和活体显微镜,应用 IVIS 成像系统在整体动物水平使在感染部位的荧光掺入形象化并在组织匀浆中在荧光剂中确认该荧光掺入。这些技术的组合被应用到感染的小鼠模型中所检查的所有探针上,以允许感染的组织和在感染的宿主细胞内的探针掺入的标签的特性的详细的表征。

[0292] 通过底物的结构修饰来改善 SREL 和 REF 的灵敏度。

[0293] 虽然现有的底物探针能够检测 Mtb BlaC 活性并使其成像,其针对 Mtb BlaC 的活性是不佳的。采用 Mtb BlaC 来改善酶动力学的探针将提供用于检测和成像的更高的灵敏度。Mtb BlaC 的晶体结构显示出与其它 A 类(class A) β -内酰胺酶的主要区别,该主要区别在于 Mtb BlaC 具有较大的活性位点口袋。这种结构差异说明设计具有针对 Mtb BlaC 的改善的动力学的探针的可能性。三种主要方法用于基于头孢哌酮来改善 BlaC 探针修饰物的结构,用于筛选有限的化合物库和修饰离去基团。使用采用 Mtb、细胞内细菌和通过皮下和肺部途径的小鼠感染的体外分析进一步表征已鉴定的适当的化合物。

[0294] 基于头孢哌酮结构的合理方法。

[0295] 通过 TEM-1Bla 和 Mtb BlaC 的 CNIR5 动力学:

[0296] 对于 TEM-1Bla, $k_{cat}=0.33s^{-1}$, $K_M=1.9\mu M$, $k_{cat}/K_M=1.74\times 10^5s^{-1}M^{-1}$;

[0297] 对于 Mtb BlaC, $k_{cat}=0.07s^{-1}$, $K_M=5.9\mu M$, $k_{cat}/K_M=1.2\times 10^4s^{-1}M^{-1}$ 。

[0298] 动力学数据表明, CNIR5 是 TEM-1Bla 的优选底物,但对于 Mtb BlaC 不是优选的。为了鉴定 Mtb BlaC 的特异活性所需的结构元素,采用 TEM-1Bla 和 Mtb BlaC 来测量一些头孢菌素内酰胺抗生素(头孢哌酮、头孢噻吩、头孢唑啉、头孢他啶、头孢西丁、头孢孟多、头孢噻肟和头孢氨苄)的动力学。结果显示,与 TEM-1Bla 相比,头孢哌酮(图 28)是 Mtb BlaC 的优选底物。

[0299] 对于 TEM-1Bla, $k_{cat}=0.26s^{-1}$, $K_M=262\mu M$, $k_{cat}/K_M=1\times 10^3s^{-1}M^{-1}$;

[0300] 对于 Mtb BlaC, $k_{cat}=2.01s^{-1}$, $K_M=76\mu M$, $k_{cat}/K_M=2.6\times 10^4s^{-1}M^{-1}$ 。

[0301] Mtb BlaC 的 k_{cat}/K_M 值($2.6\times 10^4s^{-1}M^{-1}$)比 CNIR5 ($1.2\times 10^4s^{-1}M^{-1}$)好,但是 TEM-1Bla 的 k_{cat}/K_M 值($1\times 10^3s^{-1}M^{-1}$)比 CNIR5 ($1.74\times 10^5s^{-1}M^{-1}$;)小 100 倍。假设,产生该选择性的主要结构基团来自连接至头孢哌酮中 7 胺的庞大基团,这似乎通过来自于 Mtb BlaC 的 X 射线结构的发现而得到支持--BlaC 在 7 位具有大的结合底物的口袋。

[0302] 因此,将头孢哌酮 7 位上的基团掺入到 CNIR5 中,并创建将显示出改善的酶动力学的 Mtb BlaC 探针(图 29)。首先针对以下内容对该探针进行体外测试,1)其在缓冲液中和小鼠血清中的稳定性,2)其在纯化的 Mtb 和细胞内 Mtb 的存在下的动力学,和 3)其在纯化的 TEM-1Bla 的存在下的动力学。然后,比较了其 CNIR5 相比的膜穿透性特征,以评价与之前的探针所显示出的特征相比,它是否显示出可比的或改善的膜运输和保持特征。然后,

进行通过皮下和气溶胶感染的动物研究,然后进行采用 Mtb 的成像。

[0303] 为了更好地理解头孢哌酮 CNIR 探针的构效关系(SAR),进行其结合 BlaC 的计算机建模。平行地,探针与 BlaC 共结晶以解释复合结构。所得的结构信息被应用于合理设计一种改善的探针。

[0304] 快速有限结构库分析以鉴定具有改善的灵敏度的探针。

[0305] 在合成和测试头孢哌酮 CNIR 探针之后,采用通过 X 射线结构研究的 SAR 细化(refinement)尝试库方法(library approach)以平行改善选择性。

[0306] 因为与 CNIR 探针相比,制备 Bluco 要容易得多,基于 Bluco 的底物用于为酶动力学提供一种简单而快速的读出(readout)。Bluco 被用作模板来构建一个头孢哌酮类似物的小型偏倚库。为了建立该库并产生多样性,利用 8 取代的哌嗪 2,3-二酮(A)和 6 取代的苯基甘氨酸甲酯(B),其均为商购可得的。这导致产生了 48 个成员。

[0307] 然后将该库与 Bluco 前体(C)反应,以生成最终的 48 个 Bluco 类似物。在固相载体上通过 D-荧光素上的羧酸基团制备该库。在制备包括所有这些化合物的库之前,基于 BlaC 的可利用的 X-射线结构来进行每个成员的计算机建模研究,以证实所有成员均可能适合于 BlaC 的活性位点口袋。

[0308] 使用冷光酶标仪,以高通量试验进行库筛选。在动力学筛选之前,第一步是筛选缓冲液中化合物的稳定性。通过在共孵育的早期时间点比较原始 Bluco 底物和作为阳性对照的荧光素的冷光水平来评价动力学。具有有益的动力学的化合物显示出迅速的水解和荧光素释放,在加入底物后数分钟内产生高水平的冷光;而原始的 Bluco 分子在若干小时的共孵育之后显示出最大水平的冷光。这些研究提供了新型化合物,其能够用作 CNIR 和 Bluco 底物的基础,显示出采用 BlaC 的改善的动力学和用于光学成像的更高的灵敏度。

[0309] 为了改善的动力学的修饰的离去基团:3'-位的烯丙基连接

[0310] 之前已经表明,酚醚之间的双键的插入大大增加了酚性基团的释放动力学[JACS, 2003, 125, 11146-11147]。例如,对于酚性离去基团, k_{cat} 增加 5 倍至 $54s^{-1}$ 。基于该观察,将双键插入到 CNIR 探针中。例如,对于图 28 中所示的结构,相应的探针如图 31 中所示。虽然在前面的例子中,双键具有顺式构型,但是鉴于大得多的烯丙基,预期在此处其构型将是反式的。类似地,向 Bluco 中插入的双键得到 Bluco2,预期其具有比 Bluco 更好的动力学(图 30)。

[0311] 3'-位的氨基甲酸酯连接

[0312] 3' 位的第二种类型的连接提供了水解后更快的破碎乃至更好的灵敏度。该设计利用氨基甲酸酯连接和 D-荧光素的氨基类似物(氨基 D-荧光素)。氨基甲酸酯连接已被广泛用于前药设计中作为优良的离去基团。Bla 裂解释放出氨基甲酸酯,所述氨基甲酸酯随后分解成二氧化碳和游离的氨基 D-荧光素(针对荧光素酶的底物)(图 32)。类似地,该连接同样被应用于 CNIR 探针(图 32)。

[0313] 通过组织分布的评价来改善 SREL 和 REF 灵敏度。

[0314] 使用 CNIR 底物的荧光已进行组织分布的研究,以测定存在的浓度。由于裂解增加荧光,通过在 BLac 的存在下温育并测量荧光来测定未裂解底物的分布,并且通过直接荧光评价测定裂解的底物。尽管此方法近似于在组织中底物的存在,它是不明确的,因为组织样本中的自体荧光、潜在抑制剂的存在和底物的自发水解可能会影响所获得的数据。更详

细的组织分布数据,通过检查的放射性标记的探针的分布得到。用放射性碘如 I-125 标记 CNIR5,以便可以很容易地跟踪探针在体内的分布。同样使用标记蛋白质中的酪氨酸的方案碘化 CNIR5 中的芳香基团。标记的探针被注入小鼠中并进行动态 SPECT 显像。在不同的时间间隔,处死小鼠收集器官以计算放射性。平行地,直接使用 HPLC,使用尸检后得到的可溶性部分评价探针游离部分。使用冷探针和 HPLC 解析,通过荧光评价组织(总的和可溶性的)匀浆,然后闪烁检测(scintillation detection)热探针部分。当新的 Mtb 特异性探针被开发和验证后,使用它们完成相同的实验,以提供深入了解它们改善组织分布的潜力。

[0315] 通过 β -半乳糖苷酶的使用来提高 SREL 和 REF 灵敏度。

[0316] 因为归因于更好的酶动力学或可用的底物,不同的 SREL/REF 酶系统将可能具有超过 BlaC 的显著优点,所以针对采用 Mtb 的 SREL/REF,利用 β -半乳糖苷酶(lacZ)和荧光(DDAOG)或冷光底物(Lugal)。DDAOG 和 Lugal 都成功地被用于体外成像并且 Lugal 用于小鼠皮下感染的成像。尽管 DDAOG 已经显示出有希望的体外结果,但是它尚未进行体内评价。对于我们而言,重要的是测定 DDAOG 在体内是否与 Lugal 一样敏感,因为荧光底物的使用将有一定的超过冷光底物的优势,所述冷光底物需要与底物一起递送的荧光素酶。该系统具有与 Bluco 类似的问题。DDAOG 或基于 DDAOG 改善的修饰的化合物可能最终被证明是最敏感的系统之一,并且存在一些色度报告子系统(colorimetric reporter system),其已经被大量的调查人员使用,这将使该系统在结核病群体中立即变得有价值,其应该成功地用于活体动物中使结核杆菌感染成像。

[0317] 实施例 17

[0318] 使用大内酰胺来改善 SREL 和 REF 探针的特异性。

[0319] 与用于开发具有改善的灵敏度的探针的策略类似的策略用于开发探针,所述探针具有超过存在于其它细菌物种当中的 β -内酰胺酶的对于 Mtb BlaC 的选择性。这些 β -内酰胺酶的最佳特点是大肠杆菌 TEM-1,其用于一些动力学分析,并且已经在真核系统中用作有价值的报告子。与用于改善灵敏度的方法相比的方法上的主要差异在于对化合物的关注,所述化合物在 Mtb BlaC 和大肠杆菌 TEM-1 之间的动力学方面具有最大的差异。虽然大多数 β -内酰胺更好地显示出 TEM-1 酶动力学,但是已经鉴定,三种 β -内酰胺显示出比 TEM-1 更好的 Mtb BlaC 动力学。其为头孢哌酮、头孢噻肟和头孢西丁。这些化合物的动力学显著不同,但是头孢哌酮显示出比 TEM-1 酶快 10-100 倍之间的 Mtb 酶动力学,表明其为用于开发对该酶具有特异性的探针的优良候选物。基于头孢哌酮来构建 CNIR 化合物,使用 96 孔板格式中纯化的 BlaC 和 TEM-1,以荧光作为读出,通过测定其酶动力学参数来测试其特异性。

[0320] 利用有限的结构库来改善 SREL 和 REF 探针的特异性。

[0321] 在实施例 16 中已经开发的化合物库能够用于改善 SREL 和 REF 探针的特异性,但是使用关注特异性的改进的高通量筛选而不是酶动力学。基本上,如上所述,合成作为基于 Bluco 的底物的每一个化合物,并且在纯化的 BlaC 和 TEM-1 的存在下,在高通量冷光分析中评价化合物。对所有的化合物进行筛选,采用 BlaC 以鉴定苗头化合物(hit),并且采用 TEM-1Bla 以鉴定那些针对其它酶的不良底物。此外,在水中于 37℃对所有的化合物的稳定性进行预筛选,以确保只选出稳定的化合物。平行进行试验并且所有结果表示为 BlaC 与 TEM-1 的冷光比率。在开始的时候,将阈值设定在分子水平上,所述分子在反应 30 分钟

后显示出快于 10 倍以上的 BlaC 酶动力学。针对 BlaC 和 TEM-1 酶的晶体结构,对每一种化合物进行计算机建模,以建立可靠的构效关系(SAR)。这些化合物能够被翻译成用于 REF 的 CNIR 底物的假设通过比较基于 CNIR 和 Bluco 的头孢哌酮探针的活性首次得到证实。利用这些数据,将被鉴定具有良好特异性的内酰胺类进一步开发成 REF 探针,并且当在巨噬细胞内胞内生长时以及在皮下和气溶胶接种后小鼠的感染过程中,评价它们其体外检测 Mtb 整体细胞的能力。

[0322] 实施例 18

[0323] 用于活体小鼠成像的 CBR 评价

[0324] 初步研究发现,叩头虫红(CBR)荧光素酶很好地发挥了作为体外和组织培养细胞中的 Mtb 的报告子的功能。发现 CBR 在产生的信号和体外检测的阈值方面可比于萤火虫荧光素酶(FFlux)。然而,在小鼠的皮下和肺部感染过程中,CBR 的检测阈值显著优于 FFlux。该初步观察结果可能归因于接种的差异,对细菌代谢的体内影响或者归因于冷光动力学。在利用 CBR 作为针对肺部和皮下感染过程中 Mtb 活力的报告子的精细分析中,考察这些参数中的每一个。在使用在不同位点皮下接种的相同的动物中评价冷光动力学并与 FFlux 直接比较,并且联合使用生物冷光信号的光谱混合像元分解(spectral unmixing)以阐明所述报告子是可靠的。在采用可比数量的杆菌平行地感染成对小鼠中单独评价肺部感染。通过在低氧气条件下考察对体外信号强度的影响,来获悉具有内缺氧性病变的 CBR 的潜在灵敏度。考察在体内可能会遇到的其它应力,如低 pH 以及 ROS 和 RNS 的存在。

[0325] 用于治疗评价的 CBR 成像分析

[0326] 由于 CBR 的荧光素酶信号取决于 ATP 的存在,该成像系统提供独特的机会来快速评价疗法对细菌存活的影响。一些有关此系统的主要问题是快速获得信号中可测量的差异和如何准确地使用它来测定 MICs。使用该试验对于异烟肼和利福平测定对于 Mtb 的 MICs。在实验中测定的 MIC 与用 OD 和基于 CFU 的分析检测到的 MIC 相比较。使用全 Mtb 试验,在 0.5 倍、1 倍和 5 倍的抗生素的 MIC 存在下,在巨噬细胞内细胞内评价信号损失的动力学。一旦通过 CFU 体内确定动力学并与活力的不同相比较,则评价治疗后生长出细菌的能力和 CFU 和冷光之间是否存在好的相关性。一旦对于体外生长的细菌确定 CFU 和冷光之间的相关性,则考察小鼠中皮下和肺部感染过程中对于治疗上冷光影响的动力学。使用两种接种途径,因为预期在肺部和皮下两种环境中细菌接近性存在差异,这可能使得信号损失的动力学也存在差异。这些研究使得深刻理解使用 CBR 用于迅速评价小鼠中的疗法。这些实验着眼于感染的急性期,以允许快速得到结果,但是在小鼠感染的慢性期需要进行随后的实验,以确定当细菌可能不是以高速率复制时,该系统对于评价疗法是否仍然有用。

[0327] 双重 CBR-REF 的光学成像系统的开发。

[0328] CBR 系统是有利的,因为它将允许细菌活力的快速读出,但在某些情况下,这种类型的系统可能不是最佳的。在细菌代谢率不足以允许产生最大量光的情况下,基于荧光素酶的系统可能不如在最佳的代谢条件下那么敏感。使用 CBR 来评价疗法的影响并量化不同组织中的杆菌,并且使用 REF 测定其细胞位置。为了深入了解这两个系统对不同环境中细菌数量进行评价的潜在效用,在小鼠中考察肺部皮下感染后 CBR 和 REF 二者信号损失的动力学。基于抗生素的递送,冷光被立即减少,并且 REF 信号需要长达 24 小时以观察信号损失。CBR 和 REF 之间对代谢活性的灵敏度差异提供了潜力,以实时评价结合代谢状态的细菌

数量。这是一种待开发的重要系统,因为在动物中的 Mtb 感染过程中所有细菌的代谢状态仍不清楚。该成像系统提供首个方法,通过人们能够通过该方法直接地实时观察在每个信号存在或不存在下向活体动物的不同环境中的运送。很可能证明该能力对于评价疗法是特别重要的,因为它们没有在其他环境中,疗法在某些环境中能够杀菌,对于临床前研究的延续,这是一个重要的考虑因素。

[0329] 实施例 19

[0330] 比色和化学成像系统

[0331] 比色分析

[0332] 可视化检测系统能够利用着色染料作为荧光团的直接替代物。可视化染料的实例有得克萨斯红、罗丹明、溴甲酚染料(多种颜色)、花青染料等。与荧光系统不同,这些类型的染料是可视化的和可检测的,而仍然附着在底物上。因此,结合的和游离的染料的分离是必要的。游离的染料向下游行进至随后的检测区域以进行可视化。这些染料是非常小的分子,因此,所述游离的染料可能需要在下游浓缩,以便获得必要的,肉眼可见的灵敏度。

[0333] 化学试剂分析

[0334] 在可视化检测系统中同样可以利用可视化化学试剂的格式。采用特定的化学品来代替染料,如引起 pH 值变化,或其它的化学诱导的颜色变化的化学品。该化学品从共轭复合物中分离,向下游行进至另一个检测区域,至此所述化学品与另一种试剂相互作用,产生可检测的可视化信号。该格式不同于可视化染料,其可以不需要浓缩方法。通过例如颜色变化反应(如 pH 变化)的性质来获得一些放大的测量。在 β -内酰胺酶反应的下游发生第二化学反应,并且能够在例如含有干燥的第二试剂的纤维素垫中被分离。

[0335] 比色和化学试剂的可视化分析中的下游检测

[0336] 可视化系统被设计为通过,例如,将轭合物连接至胶乳颗粒或生物素来保留底物(无检测分子)和/或整个轭合物(含有结合的检测分子)。通过将轭合物连接至胶乳颗粒,所述颗粒通过过滤膜被保留,仅允许游离的染料行进至检测区。可选地,通过将生物素连接至轭合物(即,伴有染料或化学试剂的底物),游离的和结合的材料行进至第二区域,至此固定化的抗生物素蛋白结合底物和轭合物。只有游离的染料行进至检测区域。

[0337] 在这些可视化诊断分析中,胶乳颗粒能够作为其它配体被结合和固定化的固相,并且通过着色染料的使用,它们同样能够是检测器颗粒。蛋白质或其它分子能够永久地附着在通过常规化学活化的微球表面上。例如,在诊断分析中,轭合物可以直接连接至尺寸适合的胶乳微球上。然后,将该试剂与净化的痰液样本直接混合。在适合的孵育期之后,将混合物添加到设备中。通过集成的玻璃纤维过滤器来截留胶乳颗粒,仅允许游离的染料(图 33A)或其它的化学品(图 33B)向下游行进至检测区域。液体行进的机制经由通过吸水性膜如硝酸纤维素的毛细作用。通过抗体或其它的互补结合配体来捕获染料。

[0338] 在诊断性抗生物素蛋白-生物素可视化检测系统中,抗生物素蛋白被固定在膜下游,以捕捉 100% 的生物素化底物。然后,只有游离的染料或化学品进一步沿着带流动至检测区域。检测区域与上面介绍的系统是基本相同的。染料被捕获在一行当中用于可视化,或者会在吸收槽内的下游发生化学反应。在染料系统(图 33C)或化学试剂系统(图 33D)中,底物/共轭抗生物素蛋白捕获行能够隐藏于视野之外,以至于在解释测试结果时,最终用户无法看到它们。内部对照行(internal control line)为用户说明获得了有效痰液样

品,并且说明测试正确地进行。存在有针对所有人类痰液共有目标的若干选项。

[0339] 文中引用下列参考文献:

[0340] 1. Flores et al. 2005, J Bacteriol, 187:1892-1900.

[0341] 2. Jacobs et al. 1991, Methods Enzymol, 204:537-555.

[0342] 3. Gao et al. 2003, J. Am. Chem. Soc. 125:11146-11147.

[0343] 4. Cirillo et al. 1994, Molec. Microbiol., 11:629-639.

[0344] 5. Lyons et al. 2004, Tuberculosis (Edinb), 84:283-292.

[0345] 6. Fontan et al. 2008, Infect. Immun. 76:717-725.

[0346] 7. McMurray, D. N. 2001, Trends Molec. Med., 7:135-137.

[0347] 8. McMurray, D. N. 1994, Guinea pig model of tuberculosis, p. 135-147. In B. R. Bloom(ed.), Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control. American Society for Microbiology, Washington, DC

[0348] 9. Smith, D. W. and Harding, G. E. 1977, Am. J. Pathol. 89:273-276.

[0349] 10. Weigeshaus et al. 1970, Am. Rev. Respir. Dis., 102:422-429.

[0350] 11. Cao et al. 2005, Transplantation, 80:134-139.

[0351] 12. Cao et al. 2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101:221-226.

[0352] 13. Weissleder, R. 2001, nat Biotechnol, 19:316:317.

[0353] 14. Xing et al. 2005, J Am Chem Soc, 127:4158-4159.

[0354] 15. Derossi et al. 1996, J Biol Chem, 271:18188-18193.

[0355] 16. Derossi et al. 1996, J Biol Chem, 269:10444-10450.

[0356] 17. Cirillo et al. 1991, J. Bacteriol., 173:7772-7780.

[0357] 18. Rowland et al. 1999, FEMS Microbiol Lett, 179:317-325.

[0358] 本说明书中提及的任何专利或出版物表示与本发明有关的本领域技术人员的水品。以相同的程度将这些专利和出版物并入文中以供参考,正如将每一个单独的出版物具体地和单独地并入文中以供参考。

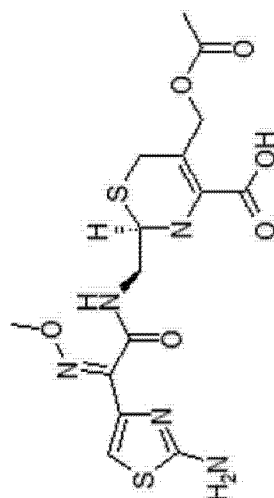
[0359] 本领域技术人员容易理解的是,本发明很好地适用于实现目标,并获得提及的以及其中固有的结果和优点。对于本领域技术人员而言,显而易见的是,在不脱离本发明的精神或范围的情况下,能够制成用于实施本发明的各种修改和变化。对于本领域技术人员而言,其中将出现变化以及其它用途,所述变化以及其它用途包含在由权利要求的范围所定义的本发明的精神范围之内。



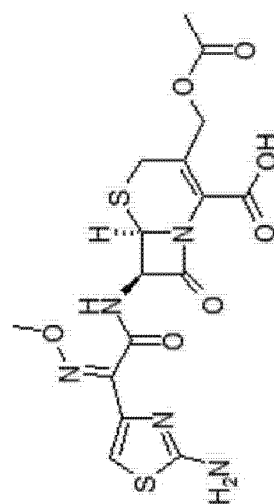
图 1A



图 1B



头孢噻肟产物



头孢噻肟

图 1B

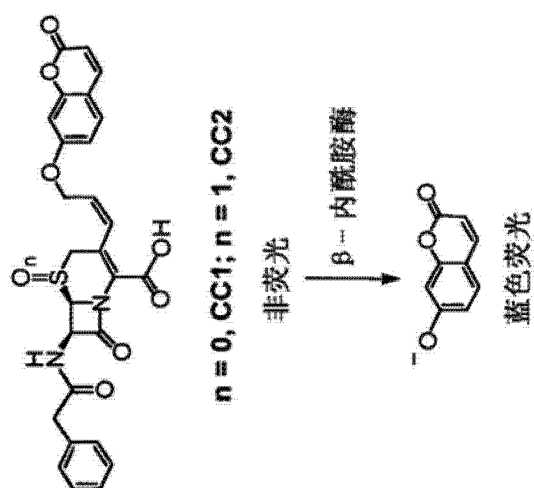


图 2A

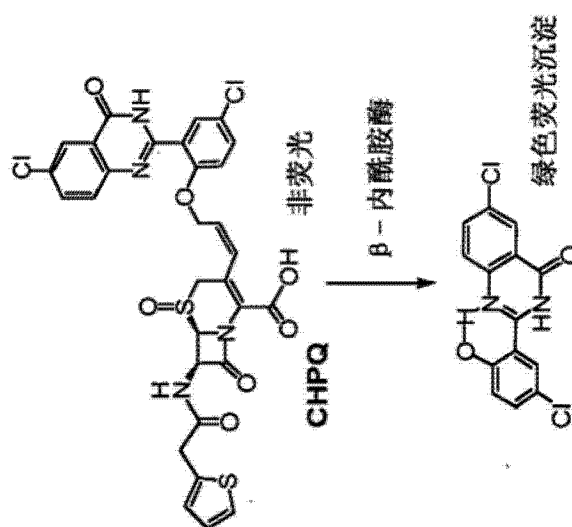


图 2B

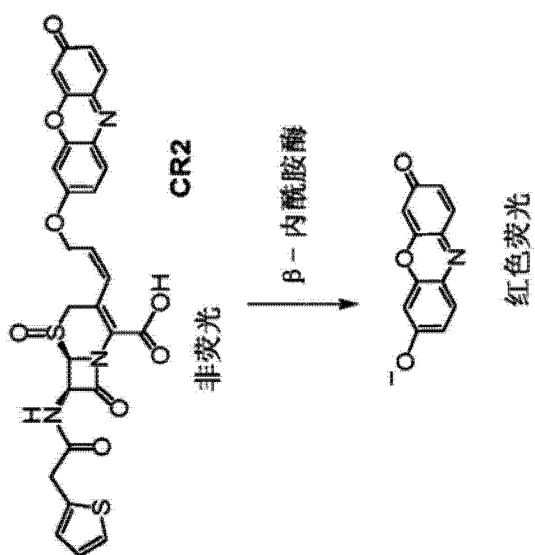


图 2C

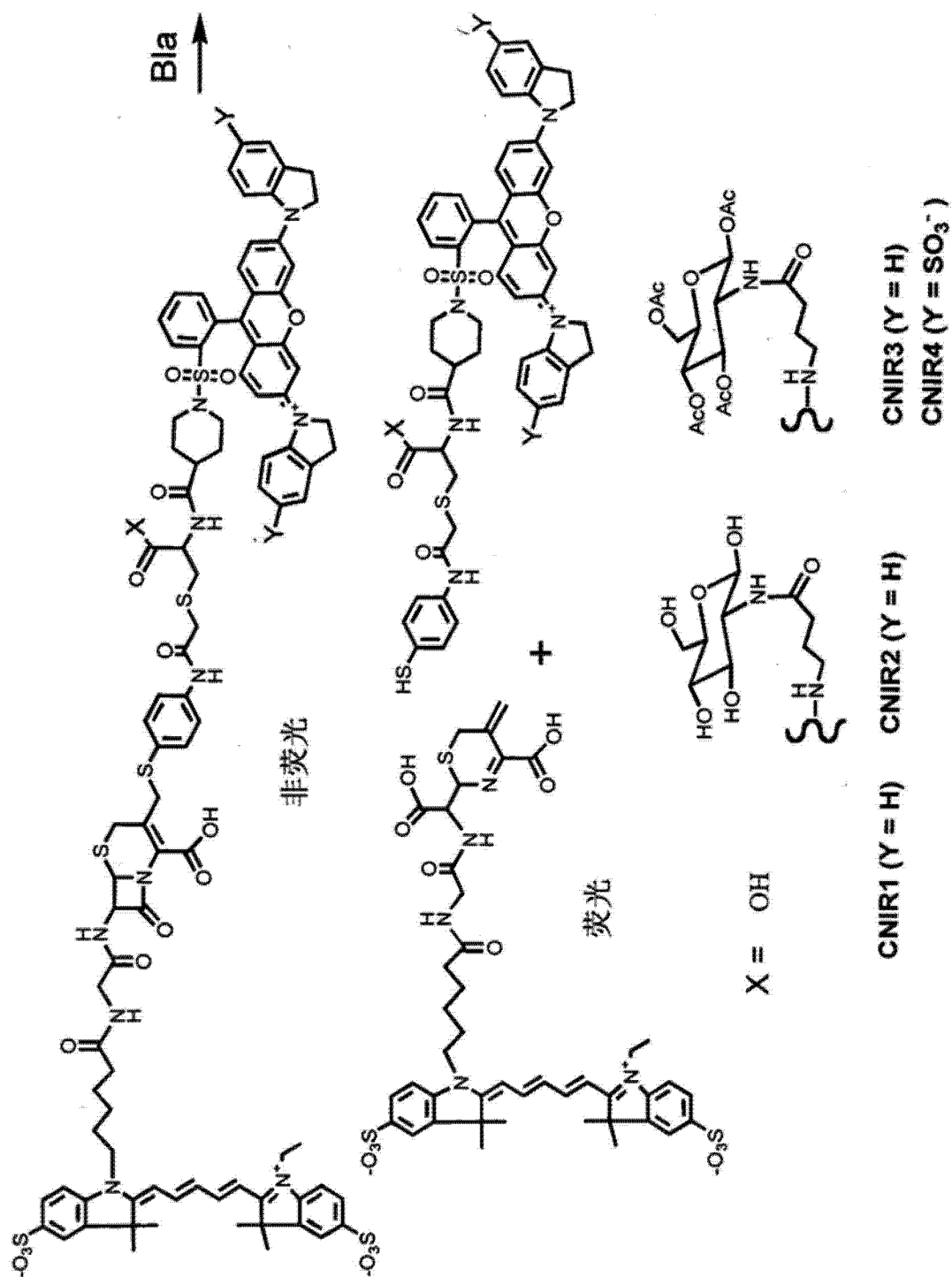


图 3

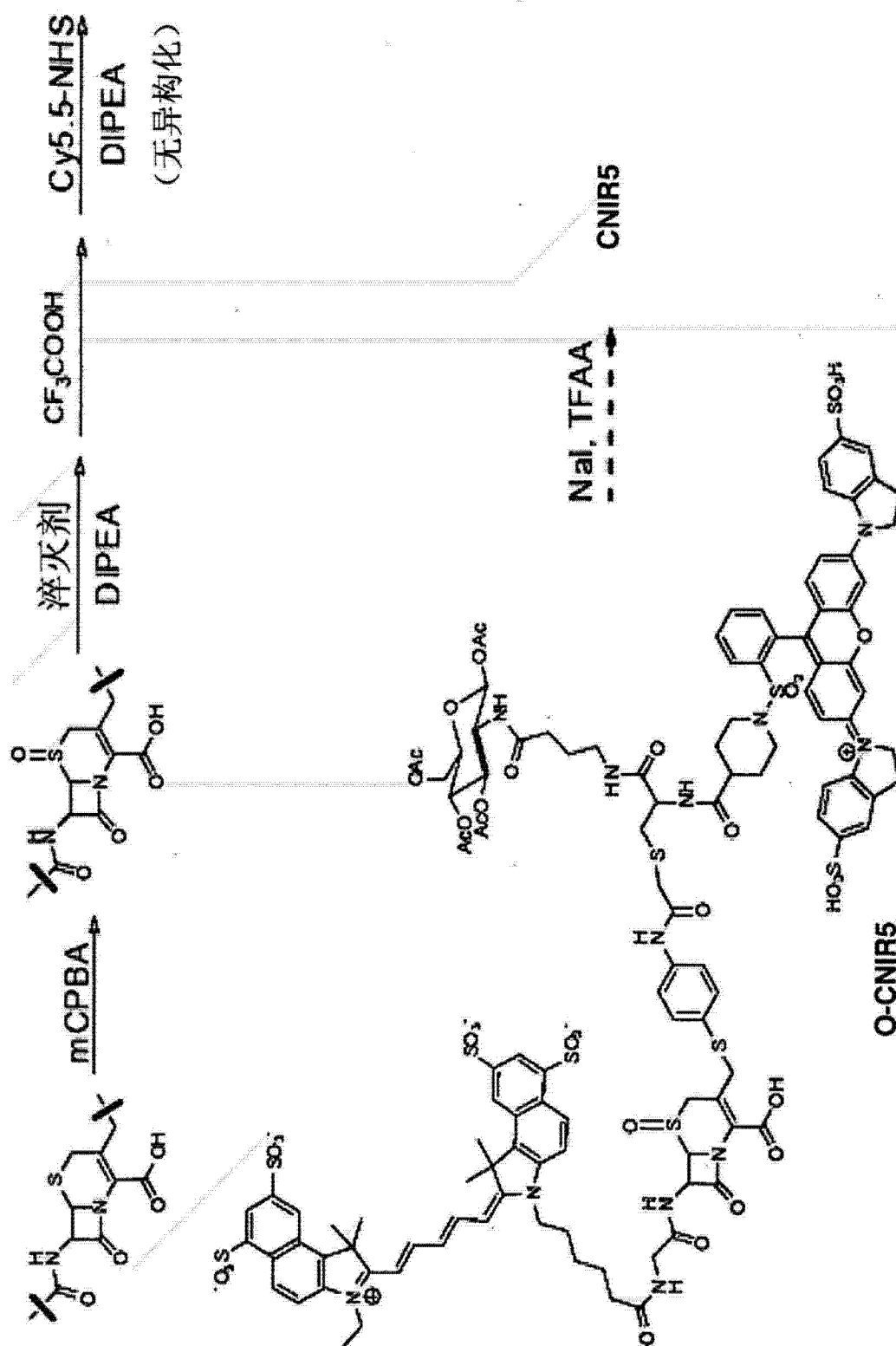


图 4B

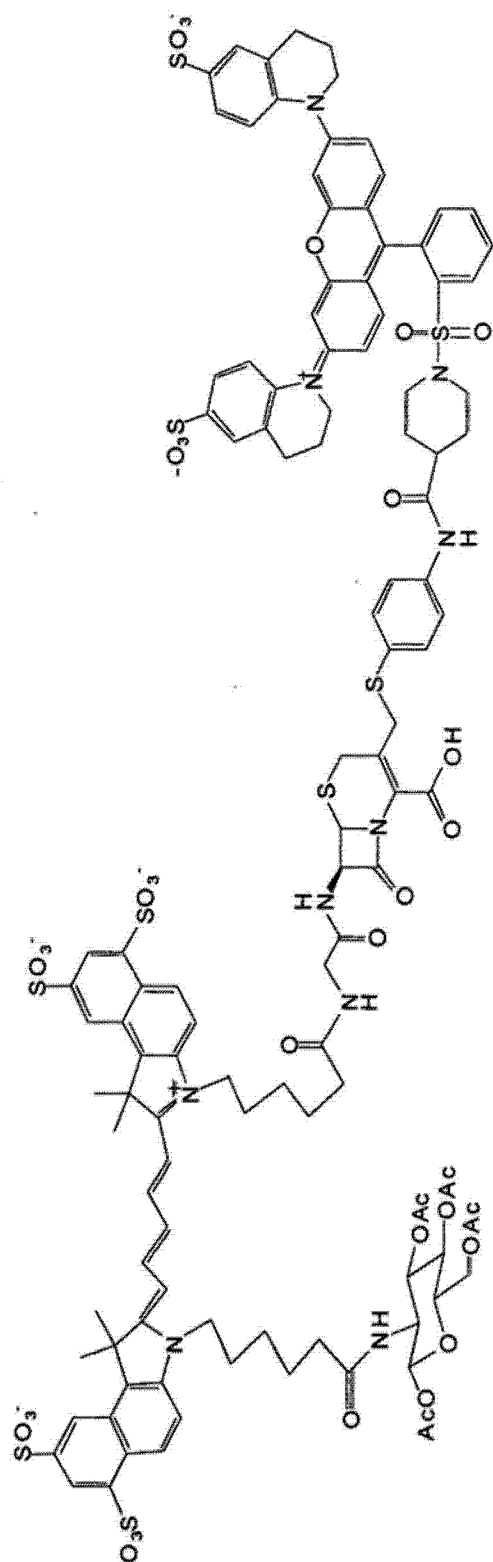


图 4C

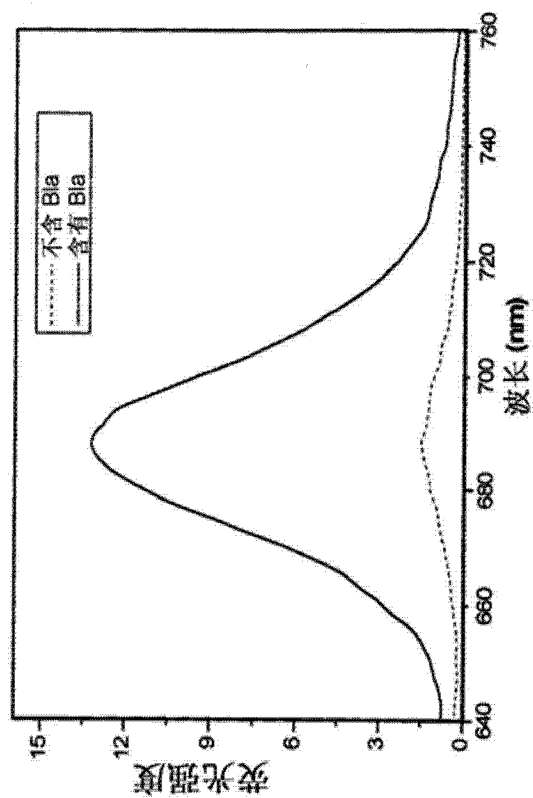


图 4D

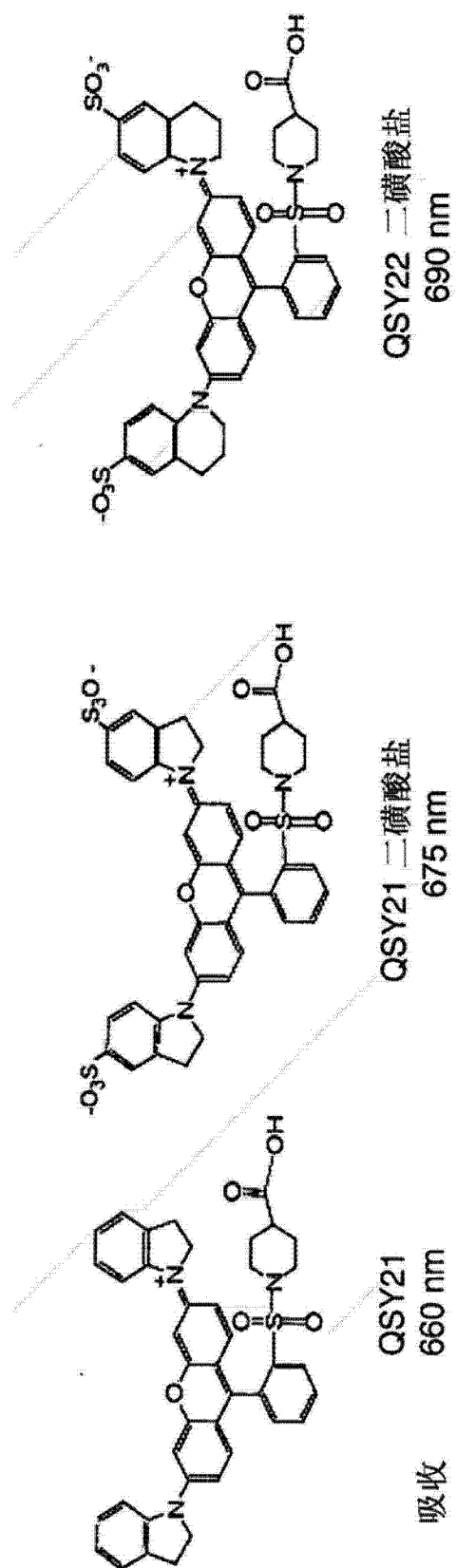


图 5A

图 5B

图 5C

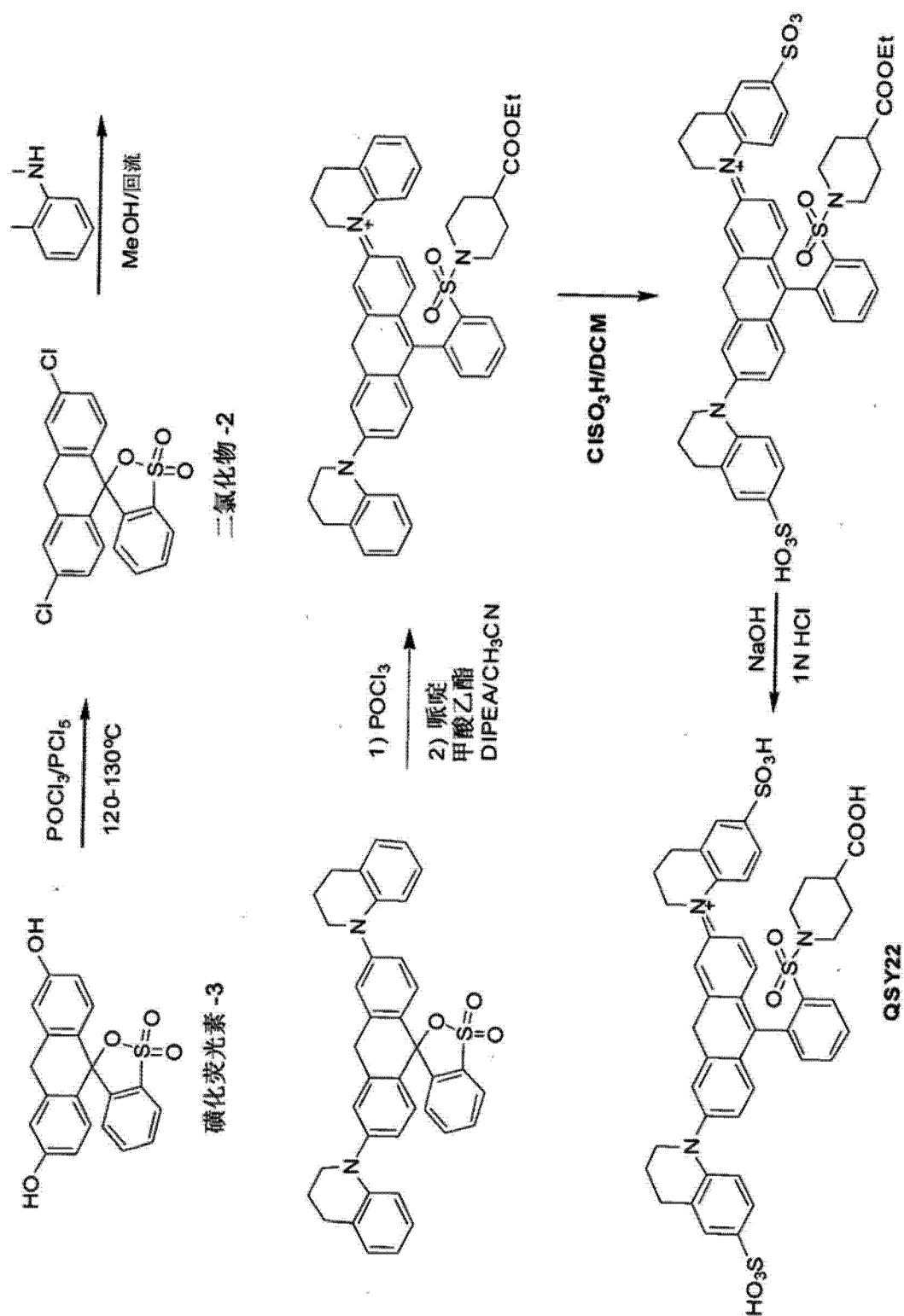


图 5D

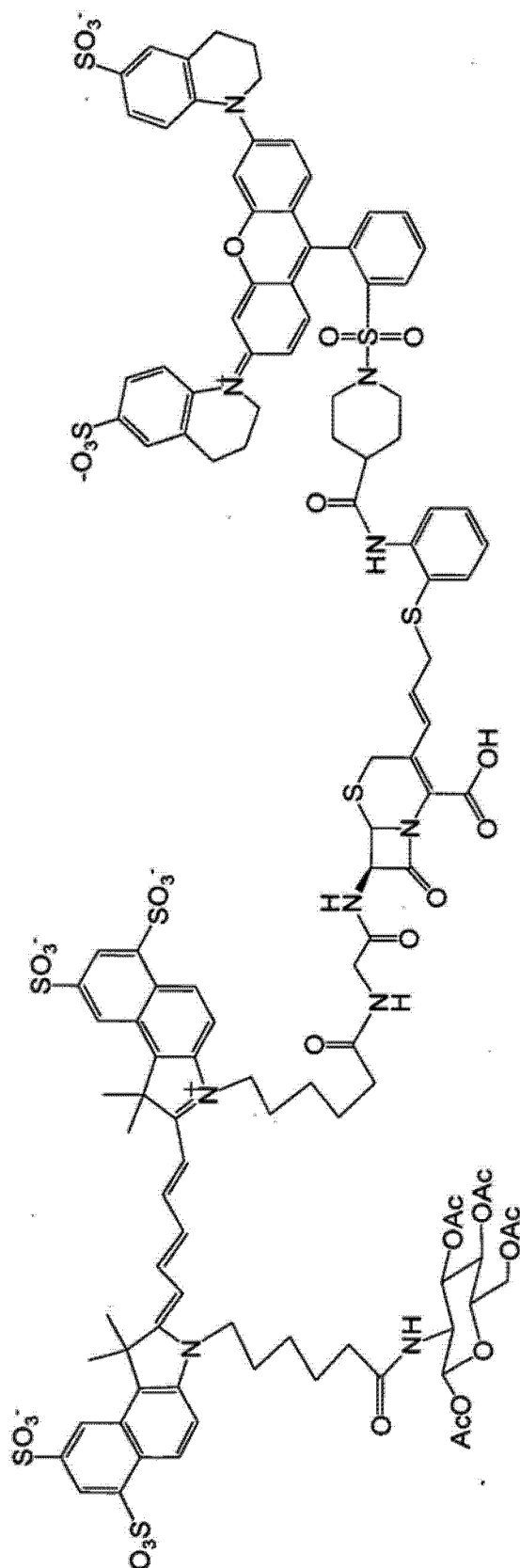


图 6A

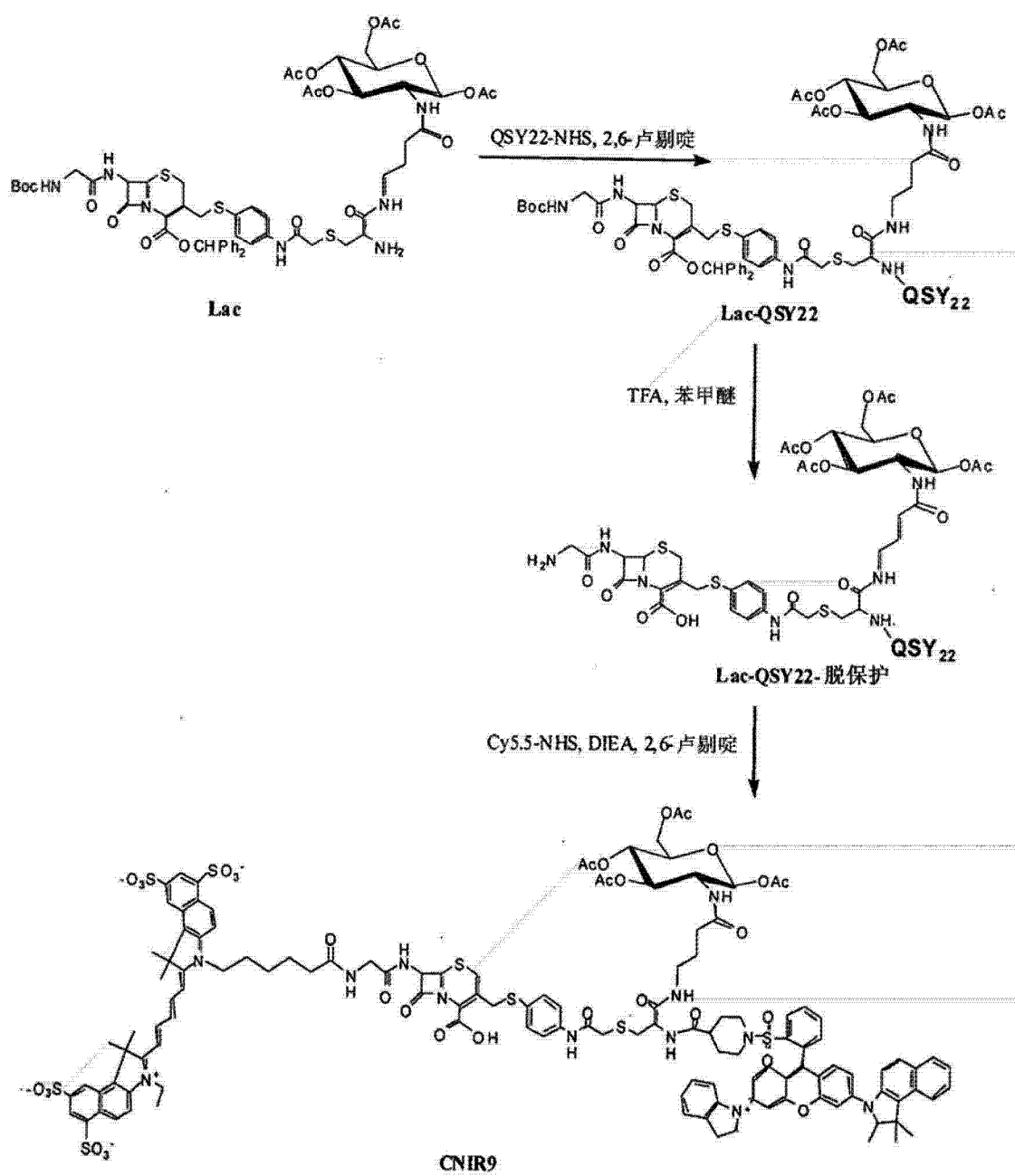


图 7A

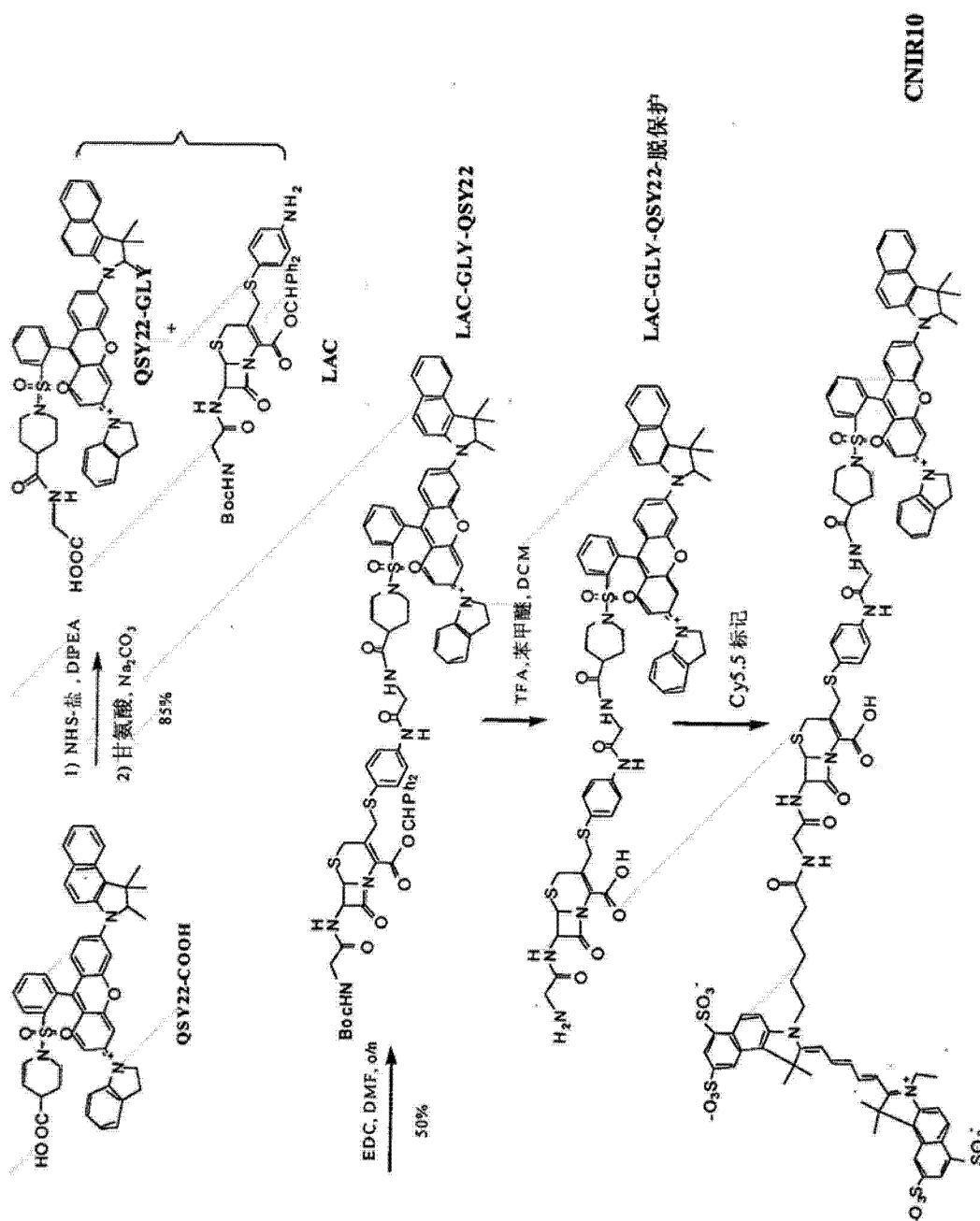


图 7B

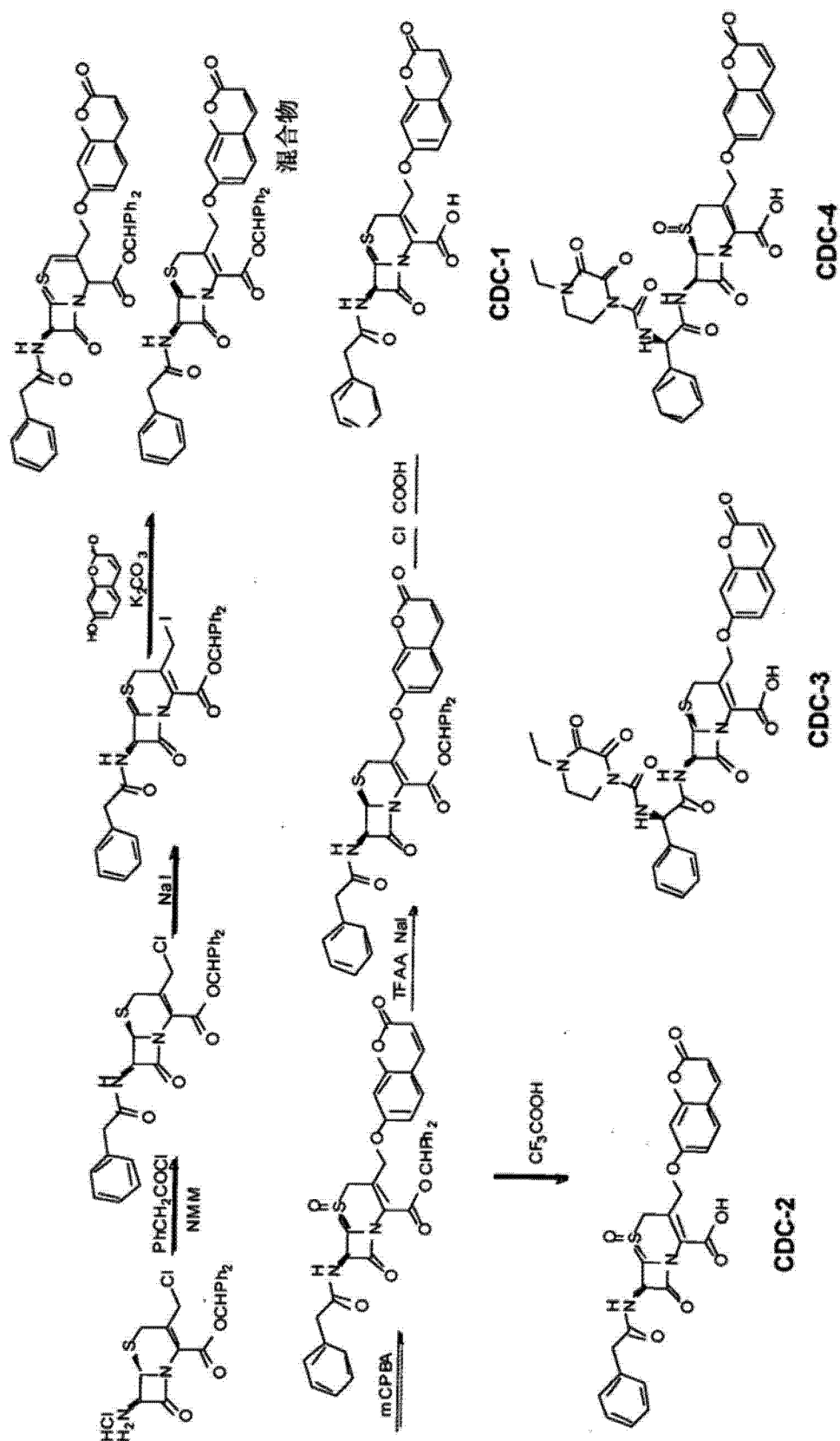


图 8A

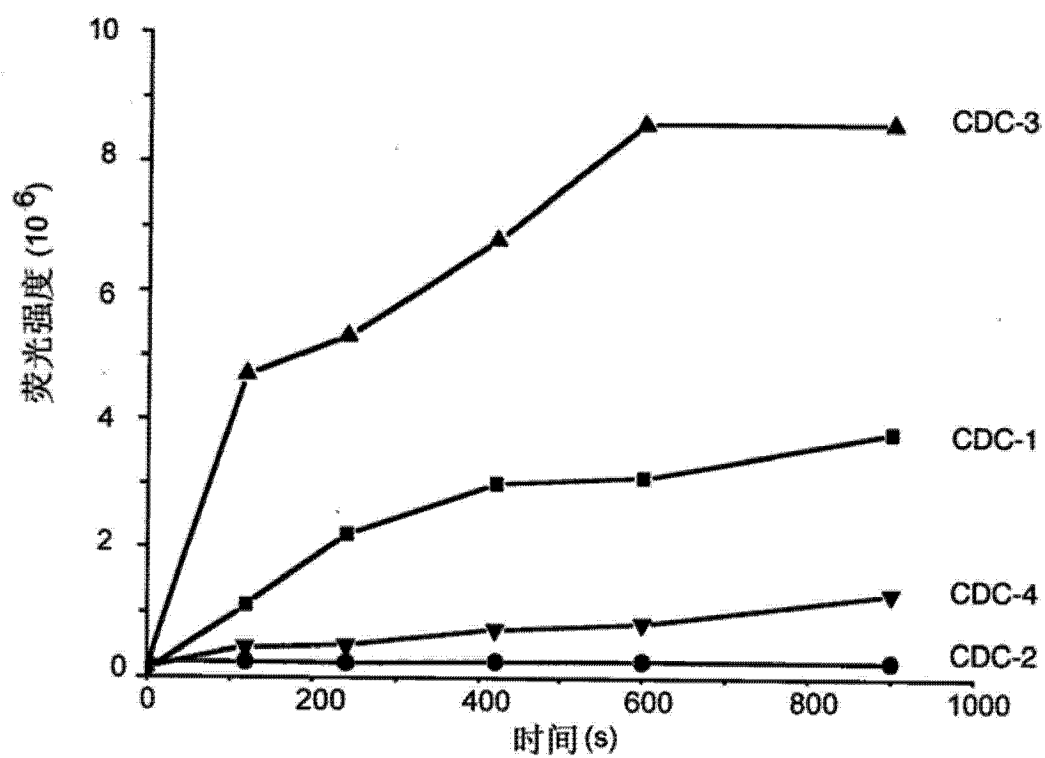


图 8B

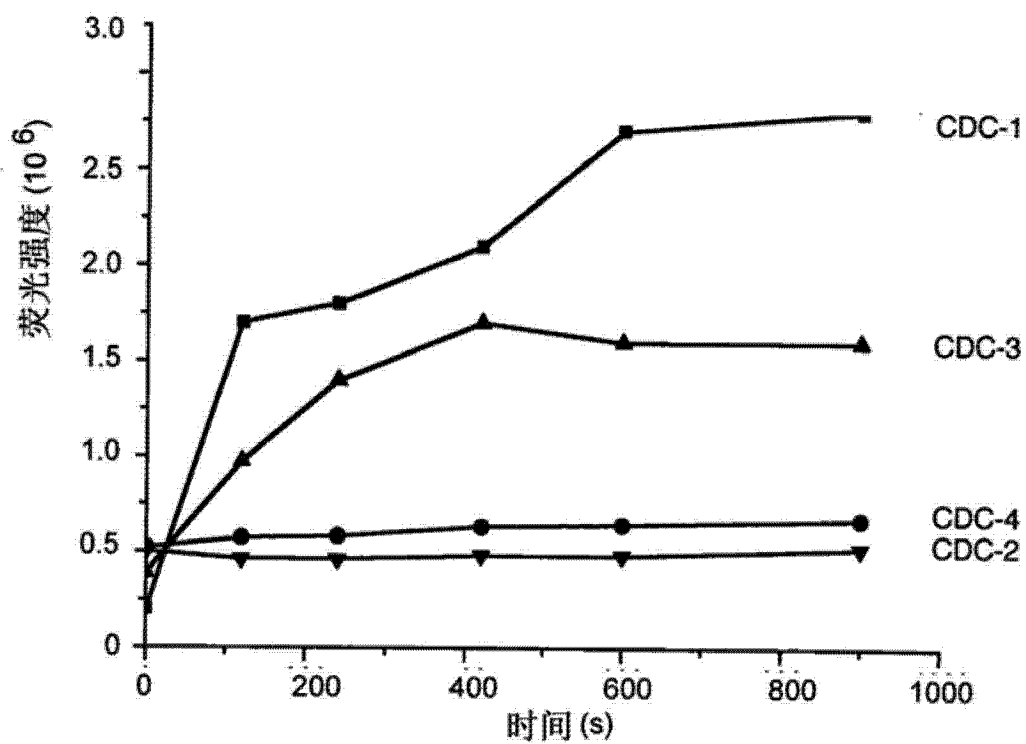


图 8C

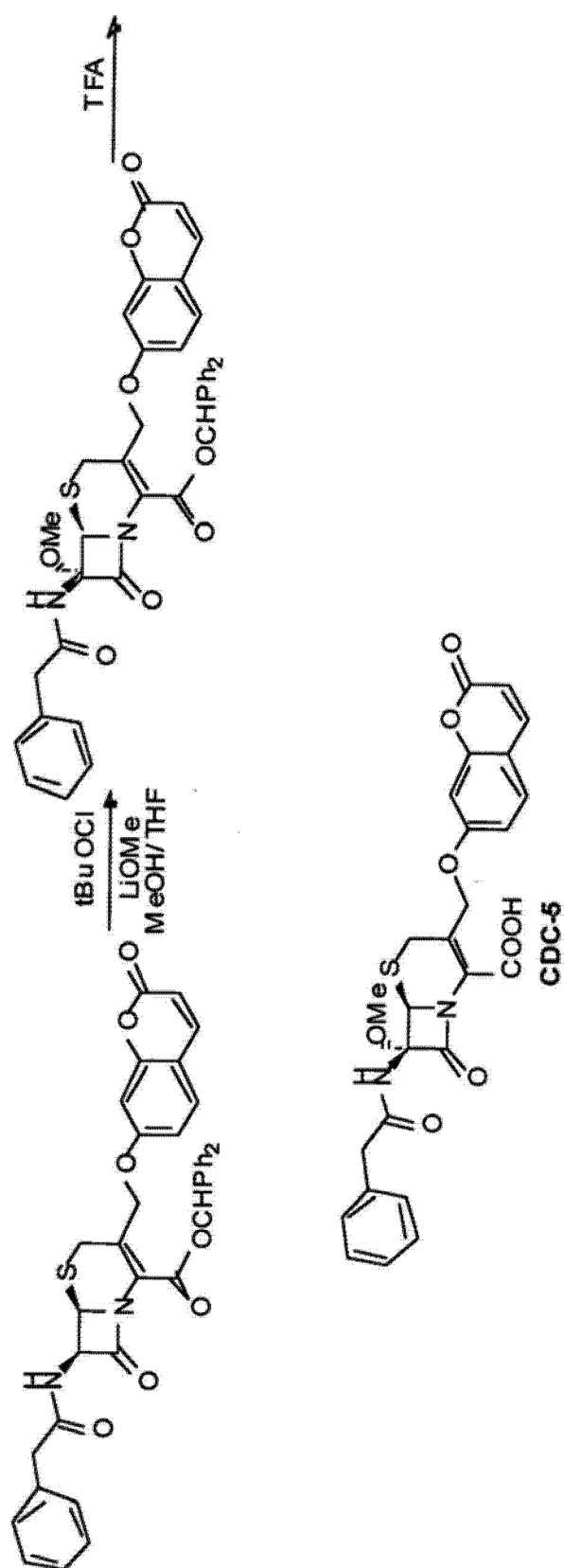


图 8D

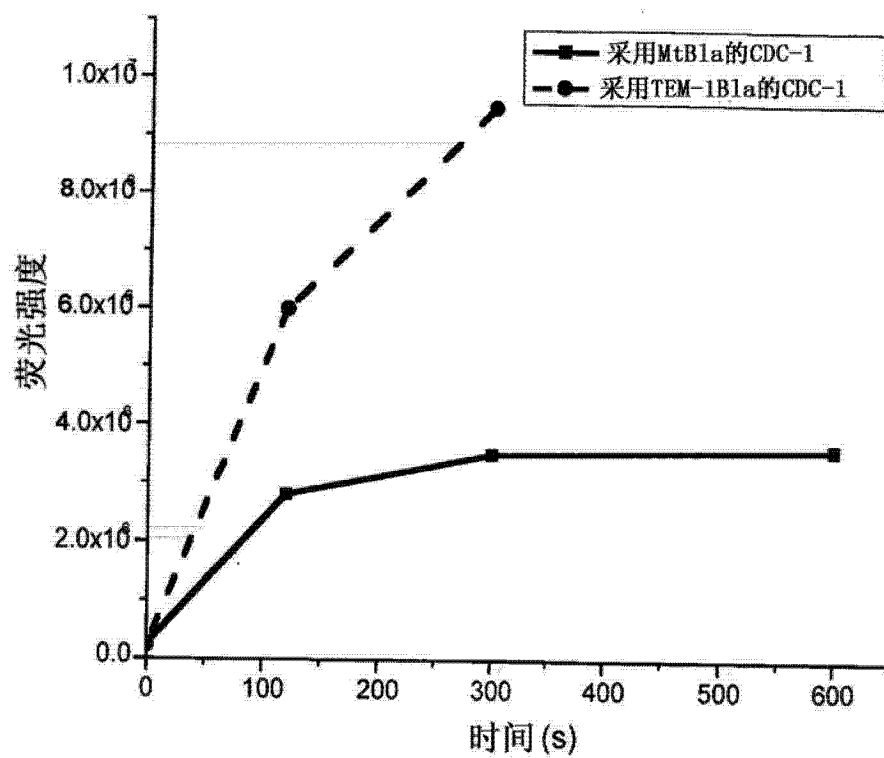


图 8E

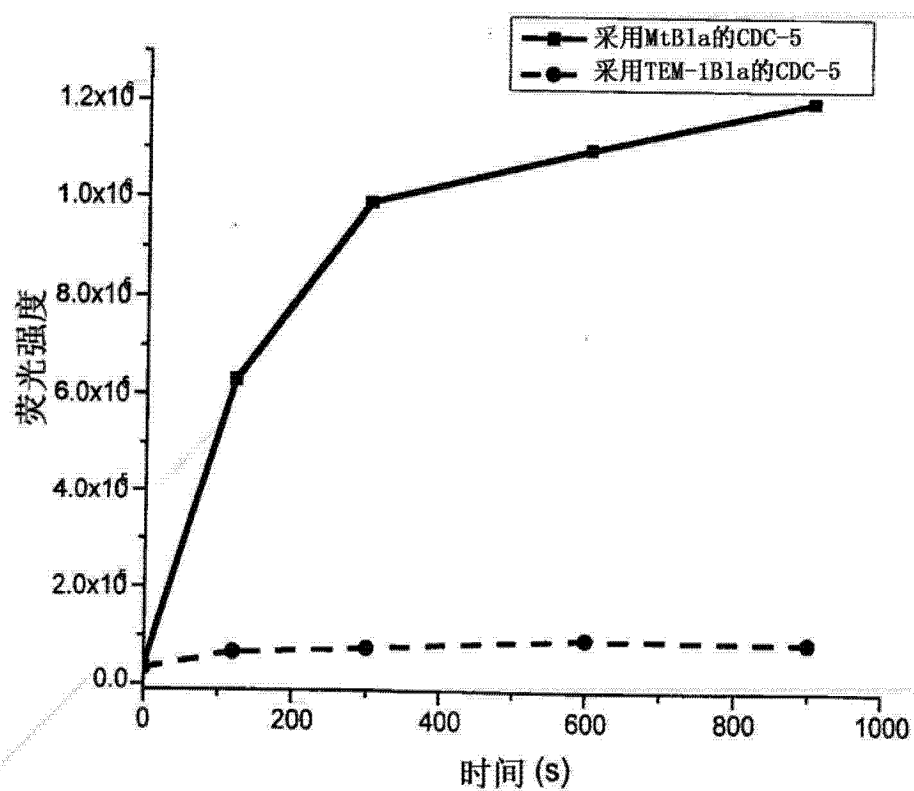


图 8F

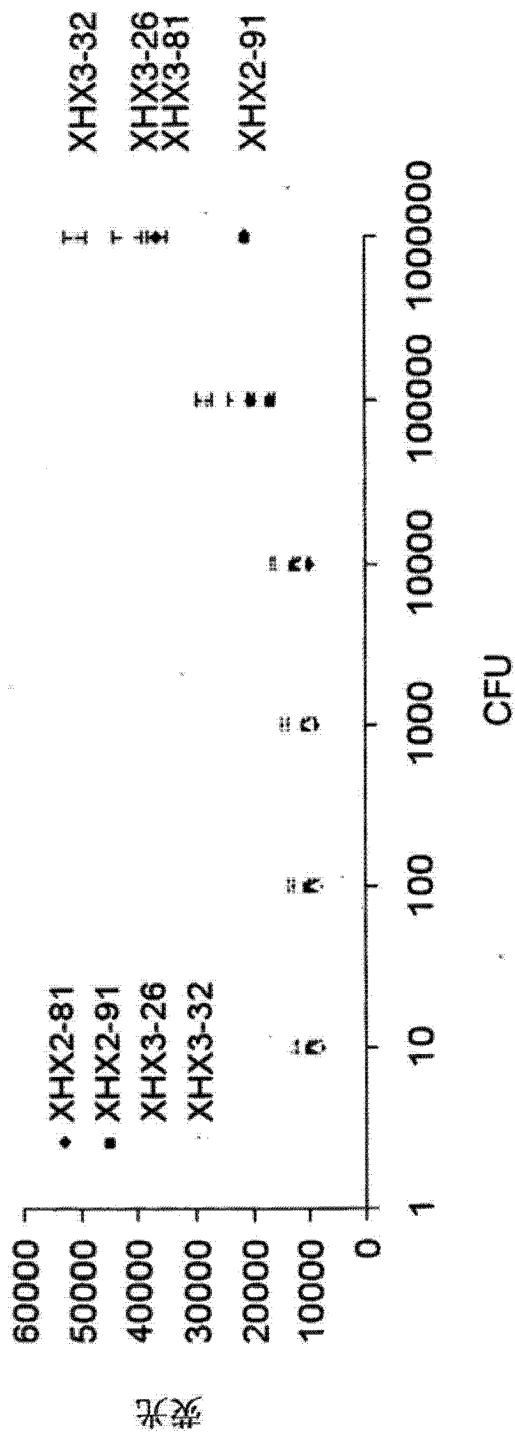


图 9F

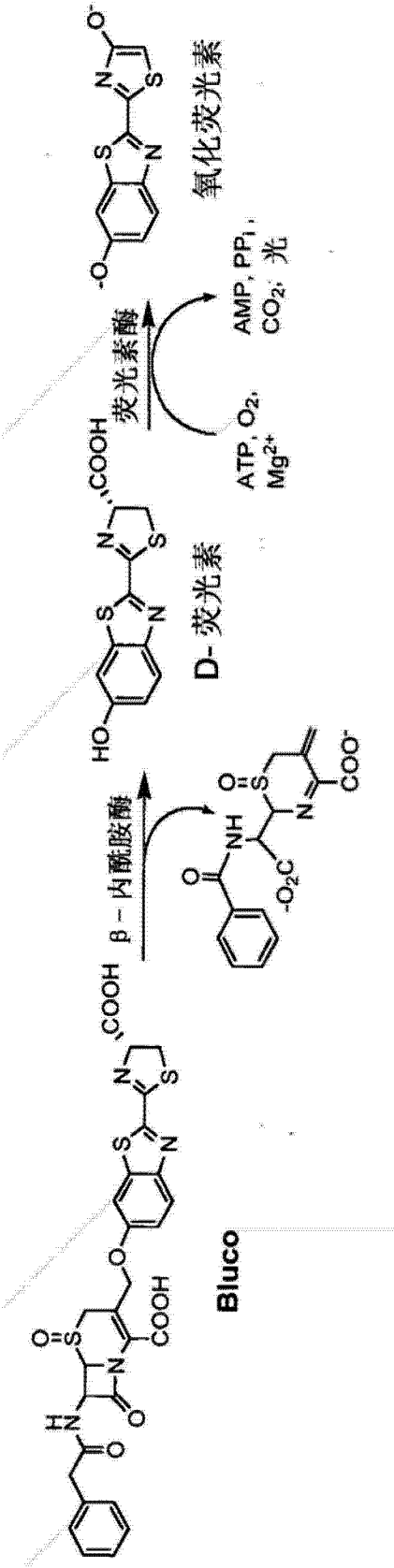


图 10A

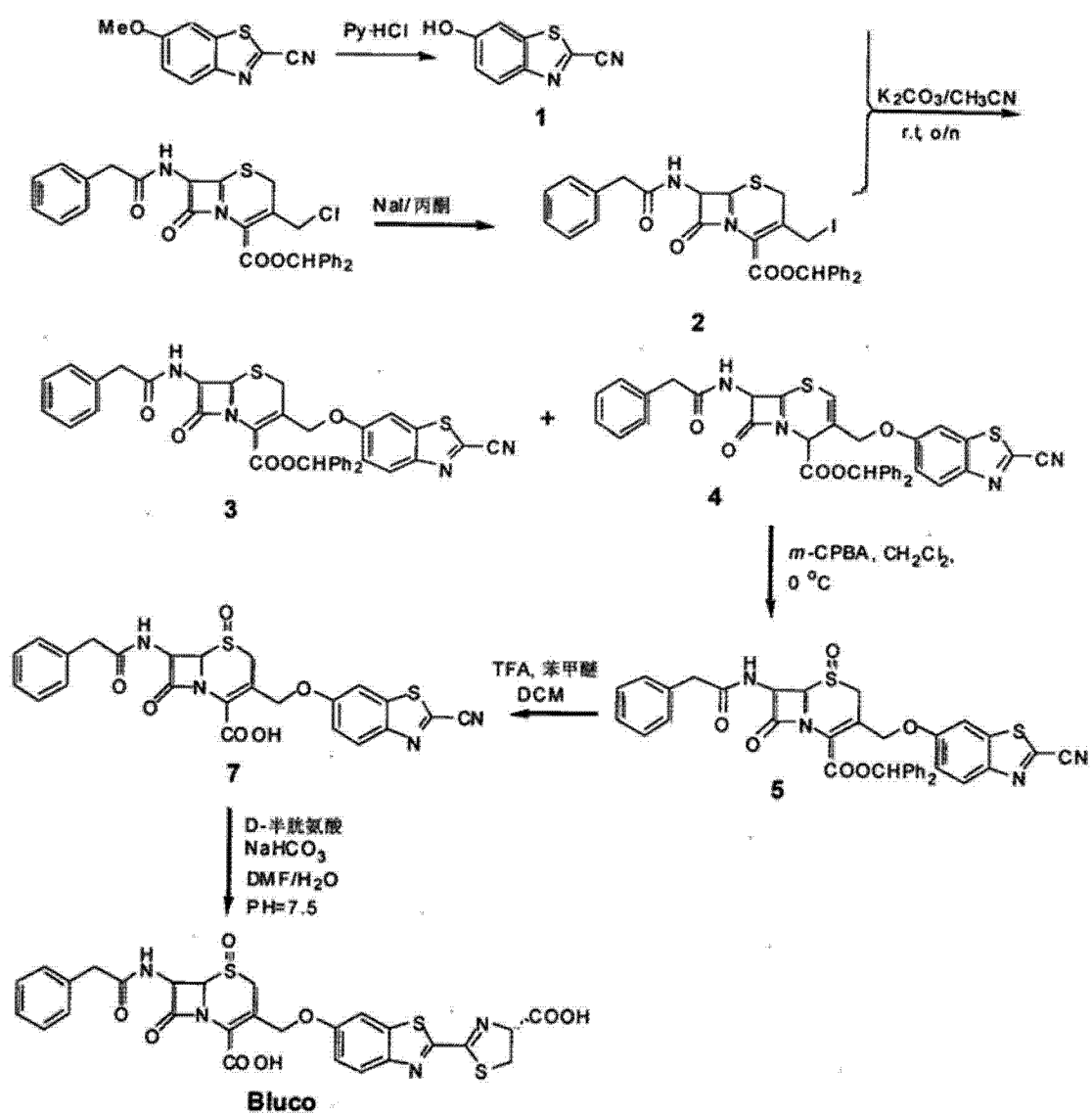


图 10B

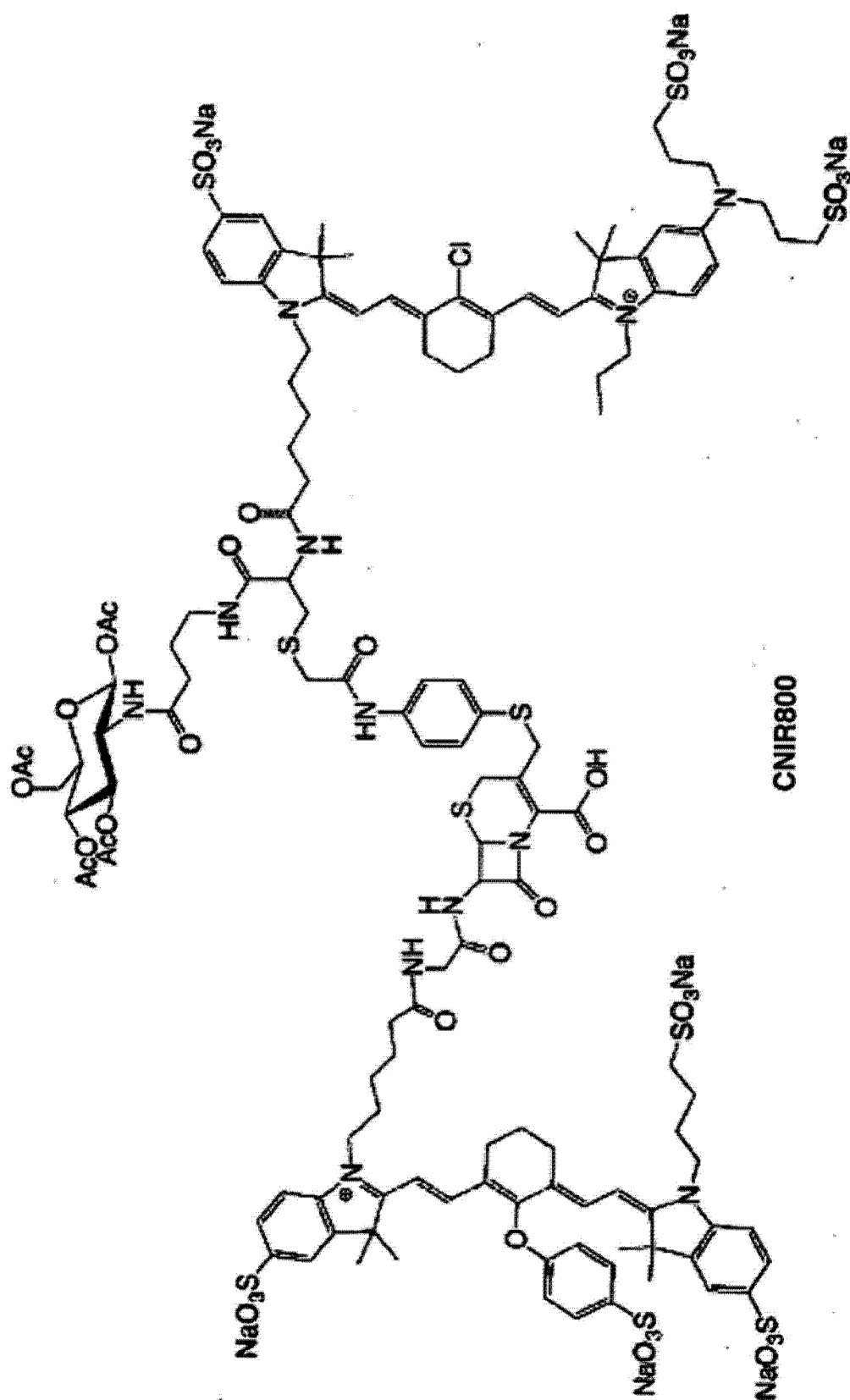


图 11A

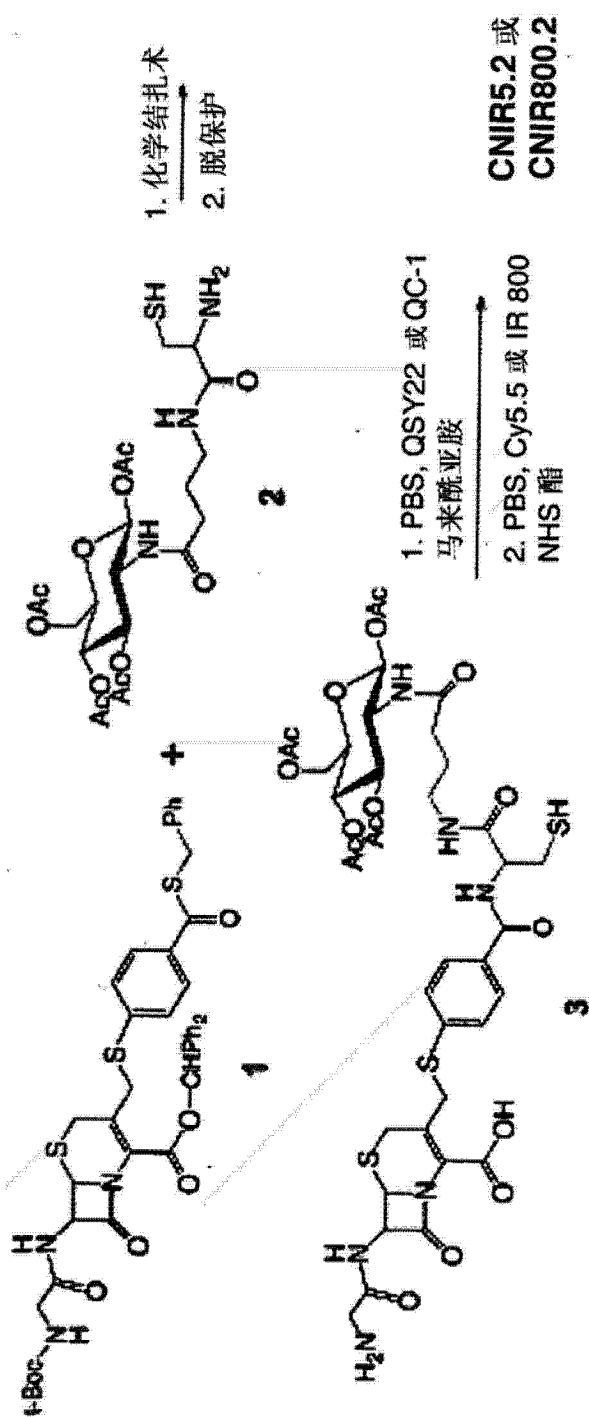


图 11B

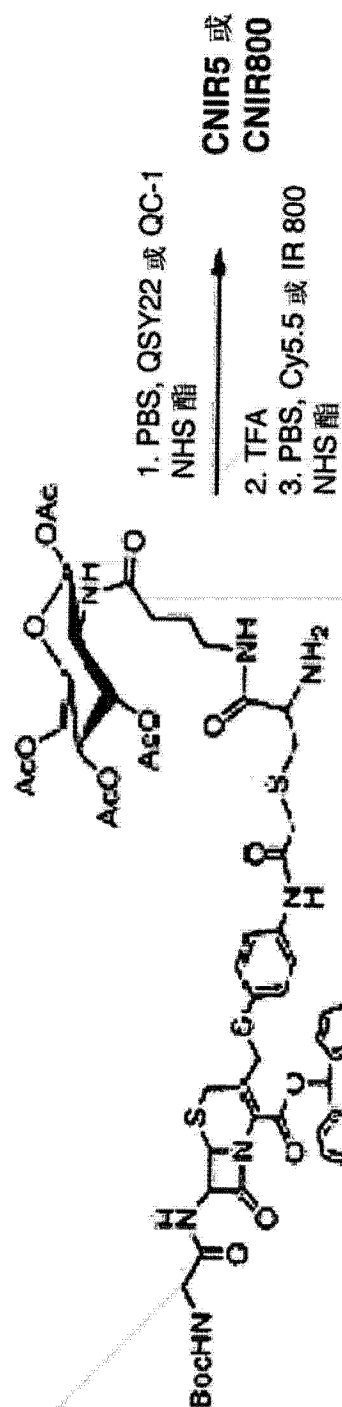


图 11C

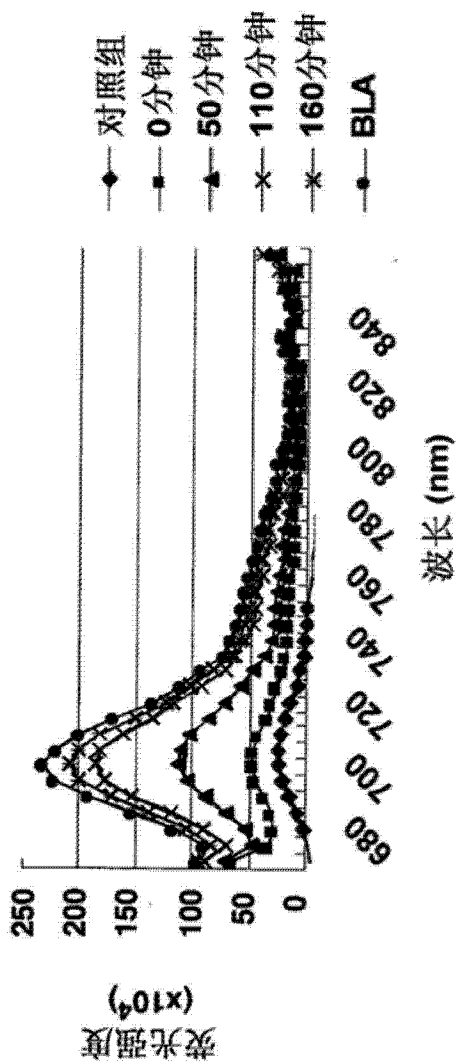


图 12A

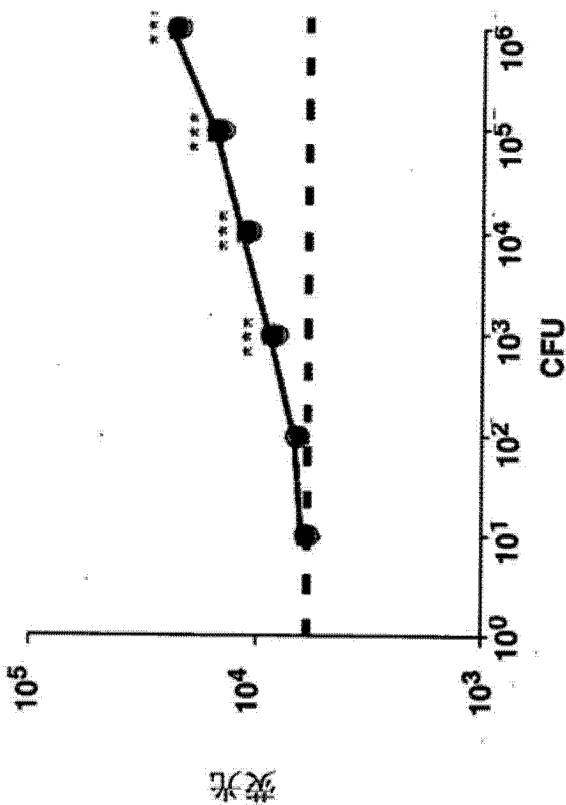


图 12B

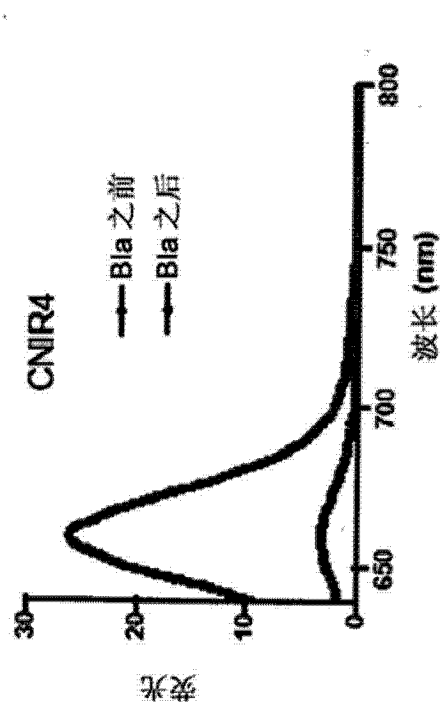


图 13A

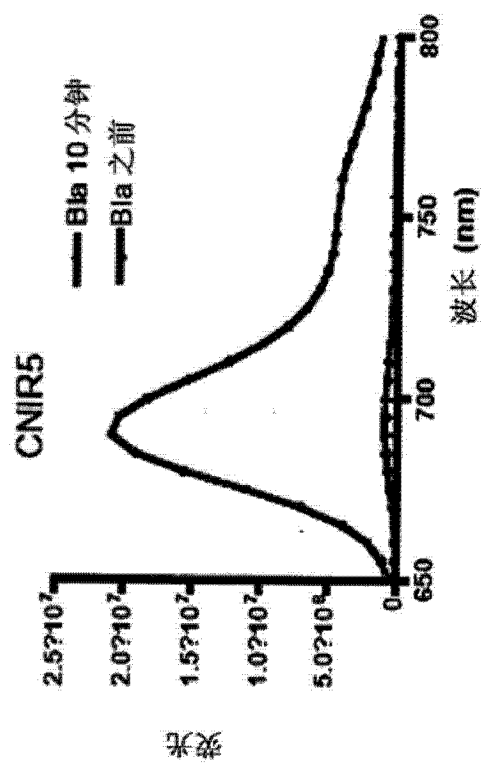


图 13B

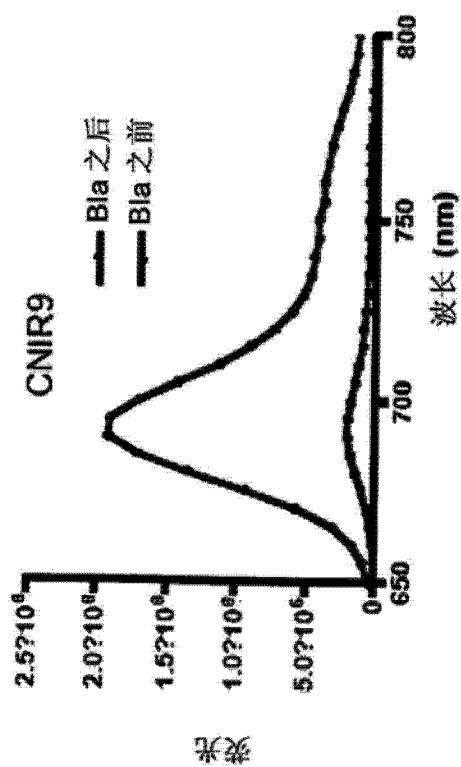


图 13C

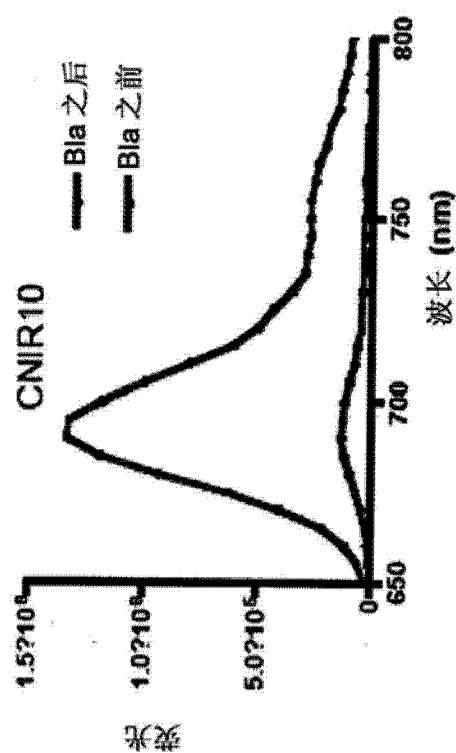


图 13D

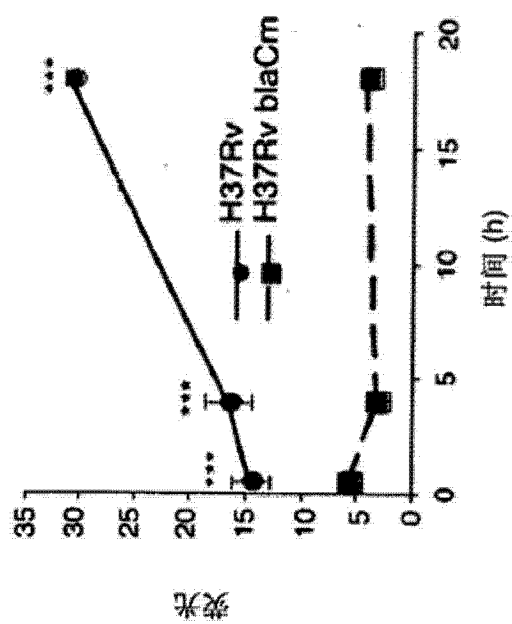


图 13E

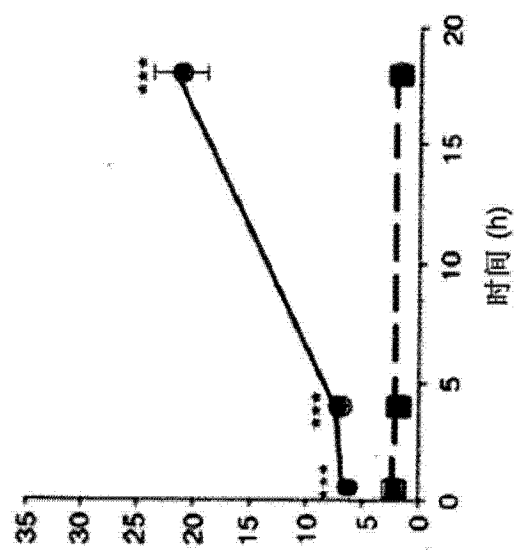


图 13F

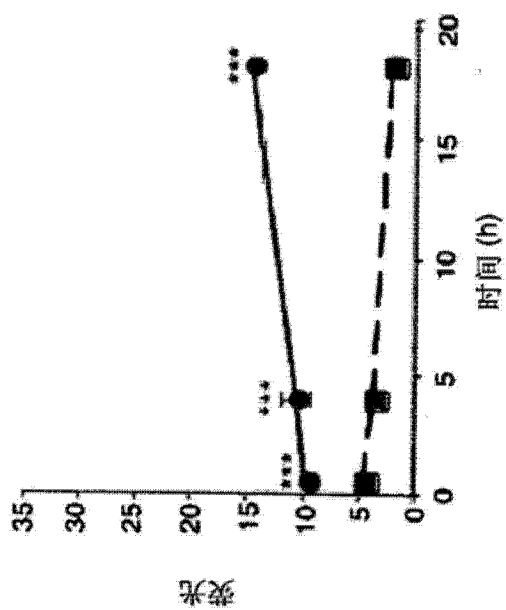


图 13G

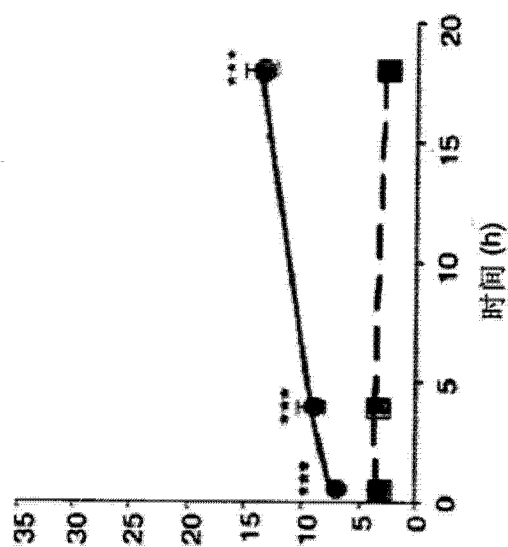


图 13H

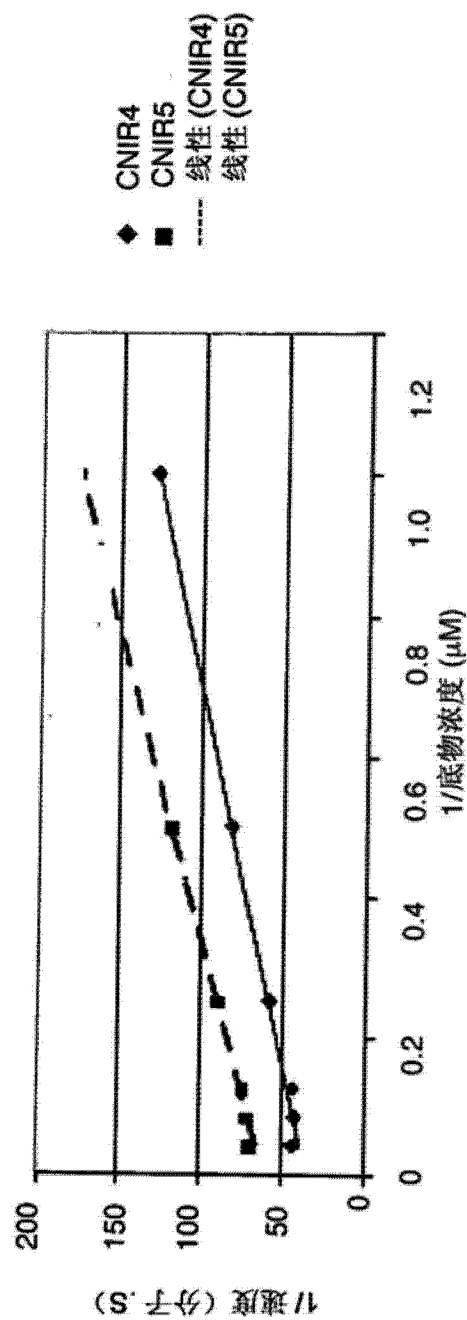


图 14A

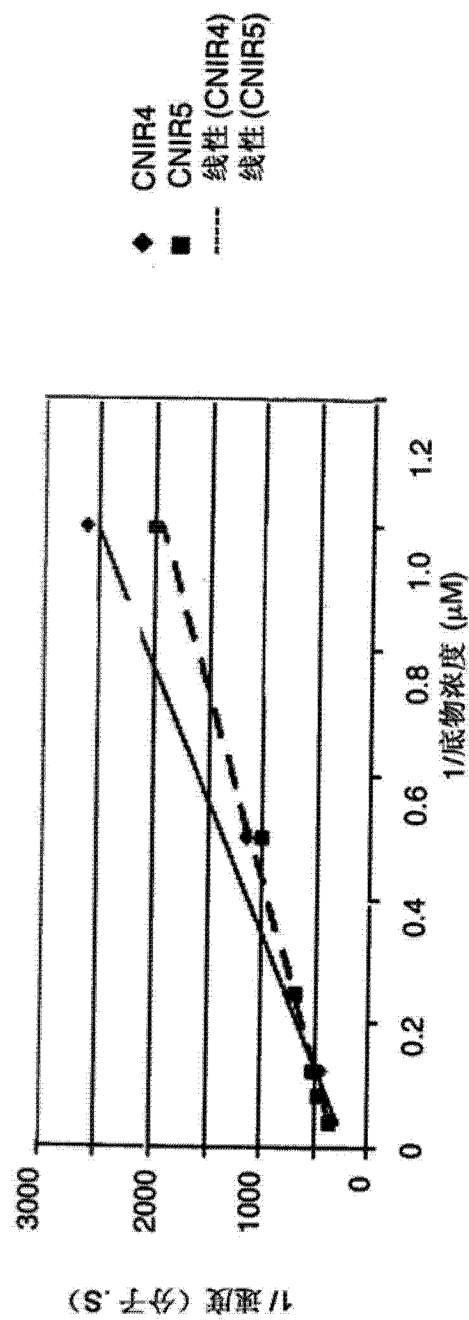


图 14B

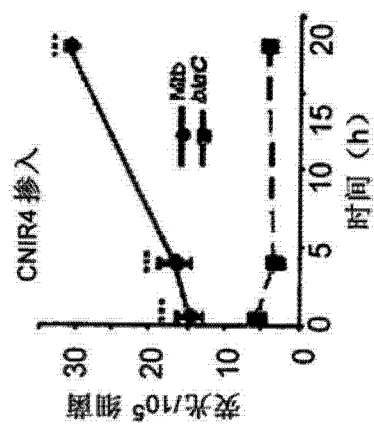


图 15A

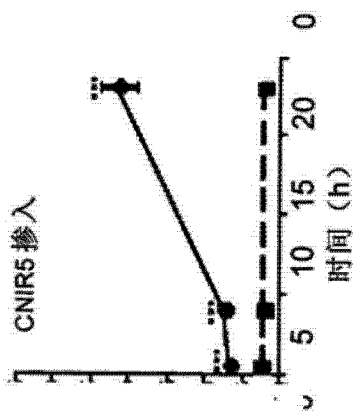


图 15B

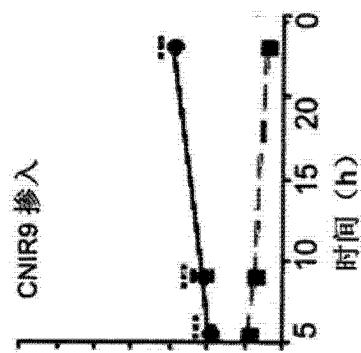


图 15C

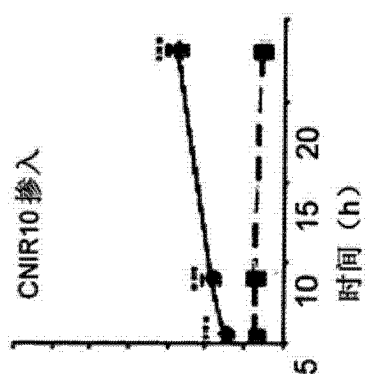


图 15D

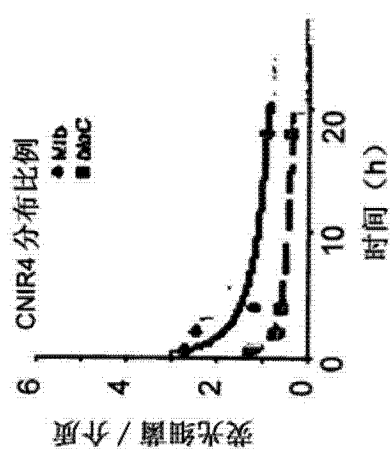


图 15E

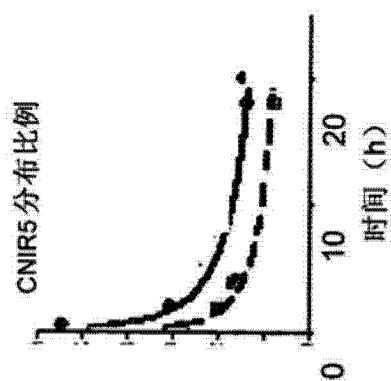


图 15F

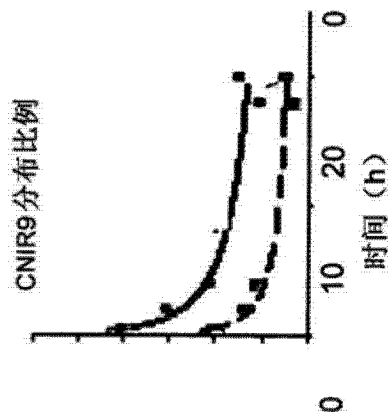


图 15G

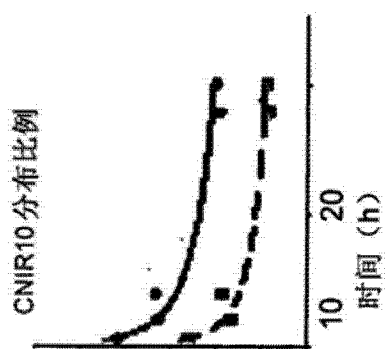


图 15H

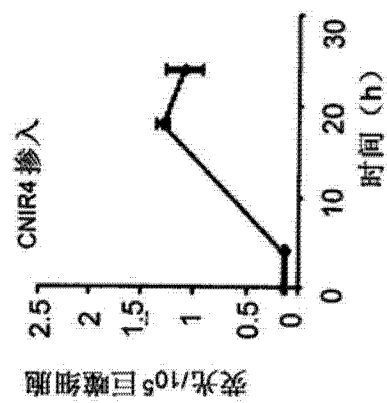


图 16A

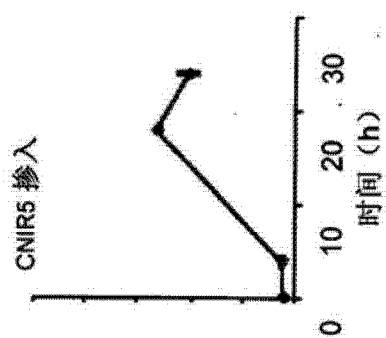


图 16B

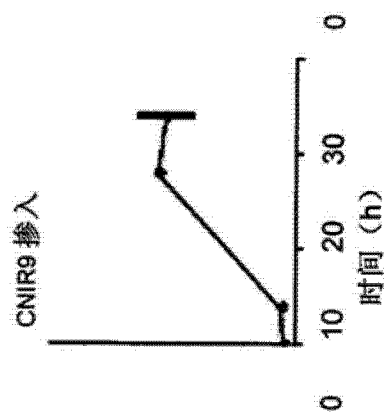


图 16C

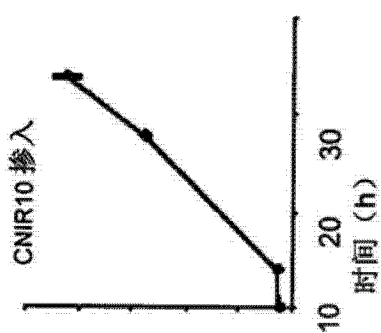


图 16D

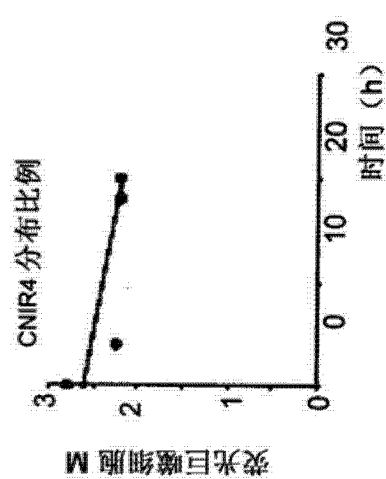


图 16E

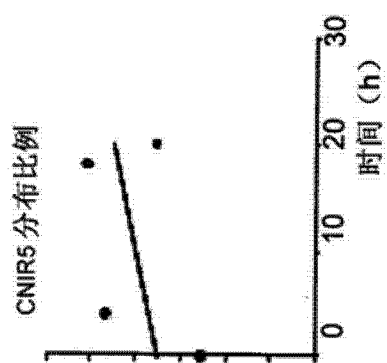


图 16F

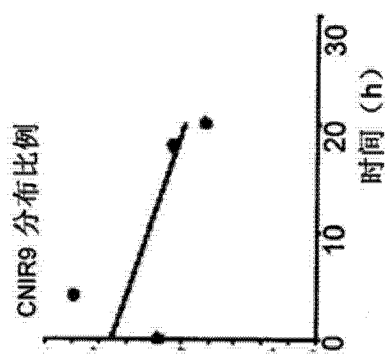


图 16G

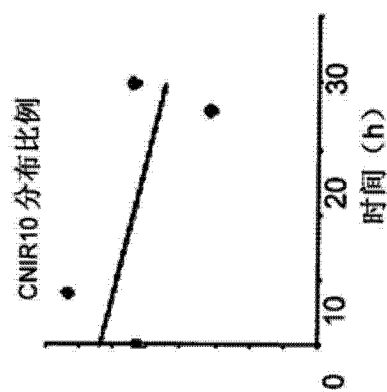


图 16H

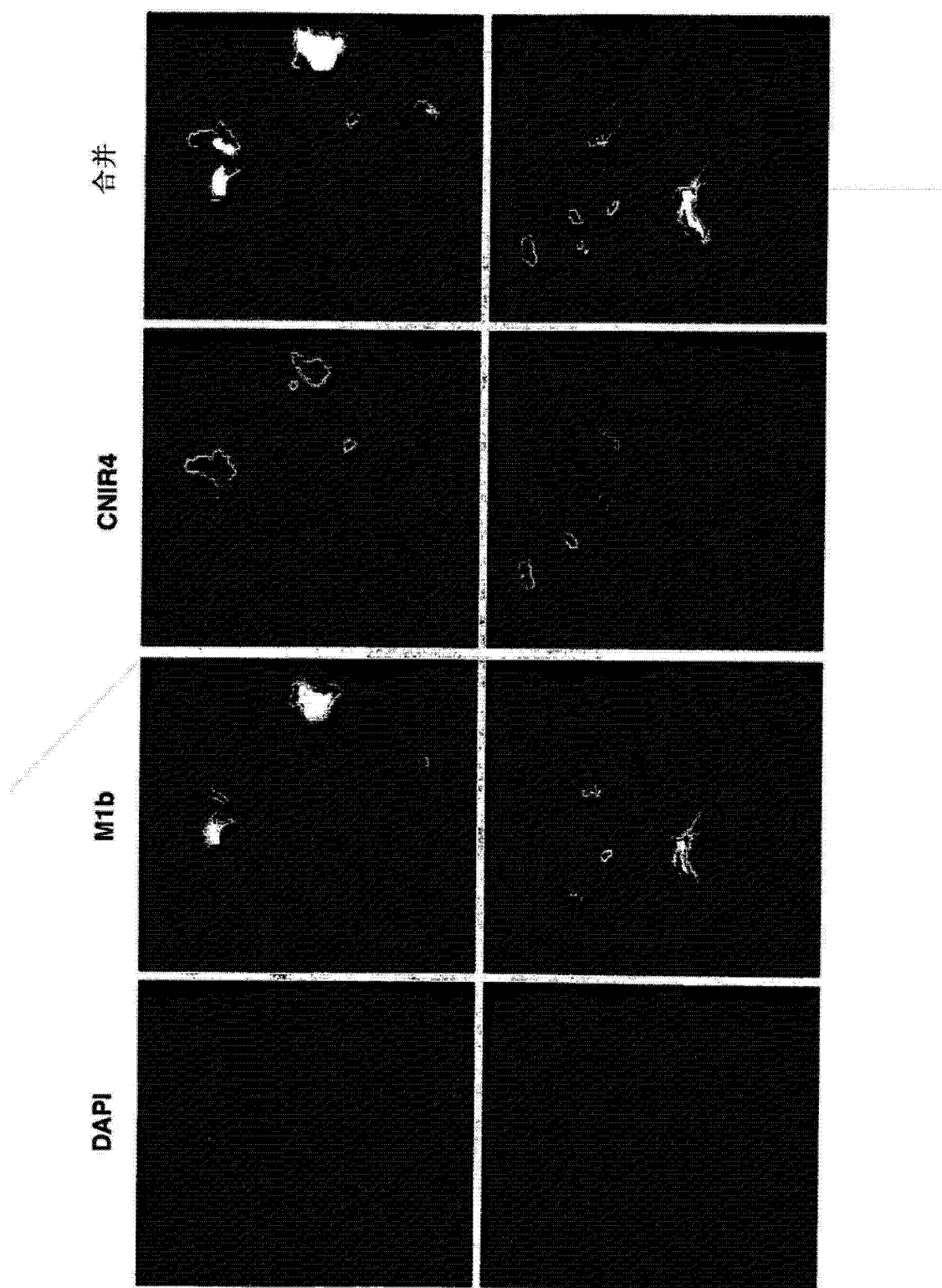


图 17

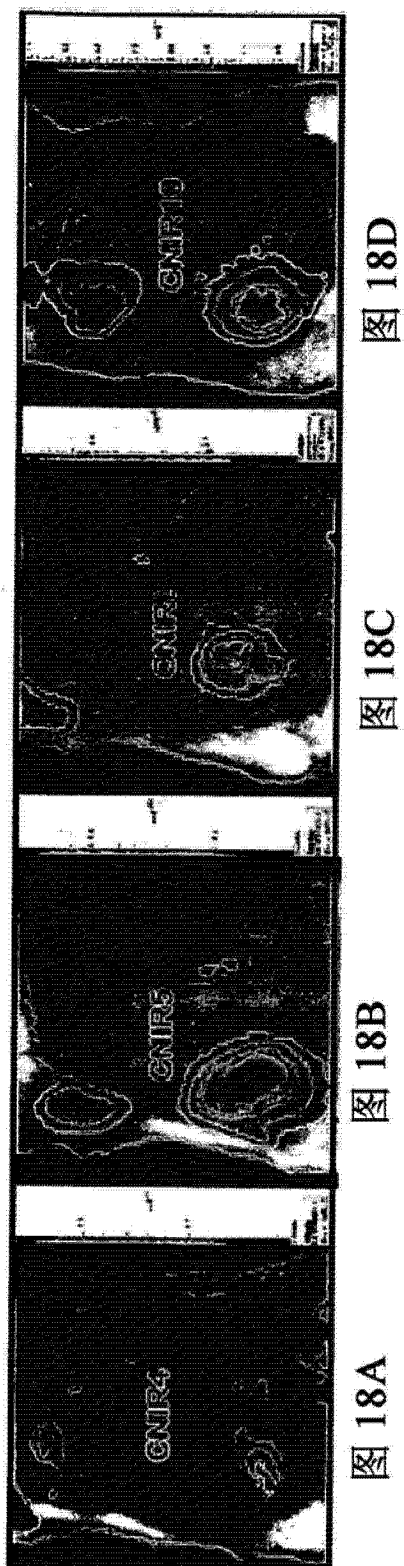


图 18D

图 18C

图 18B

图 18A

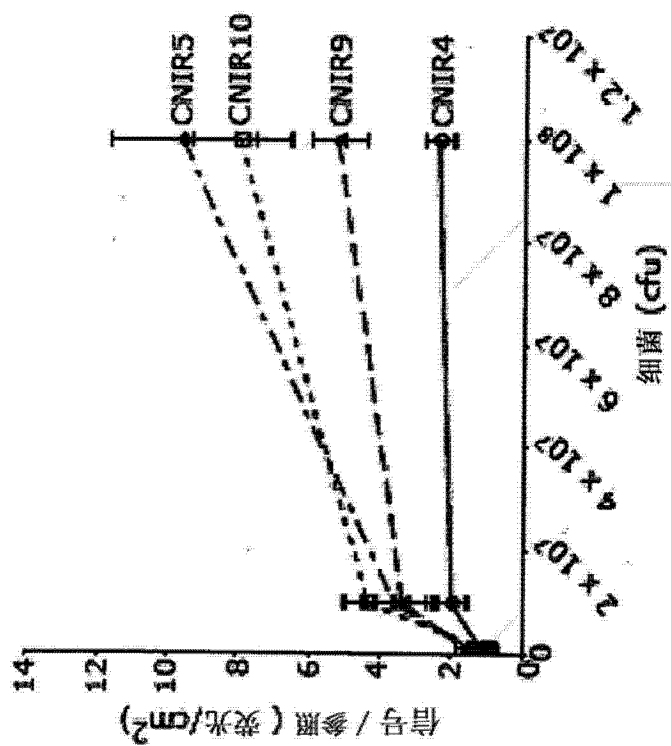
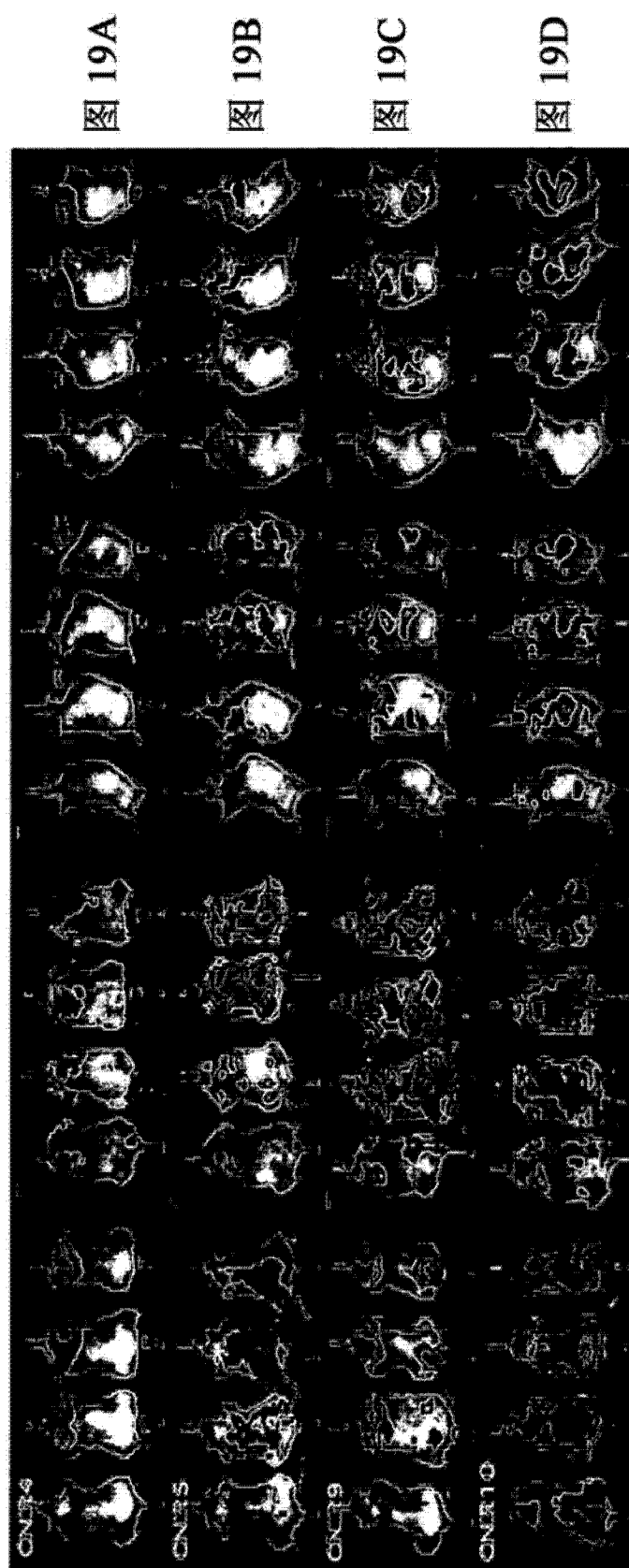


图 18E



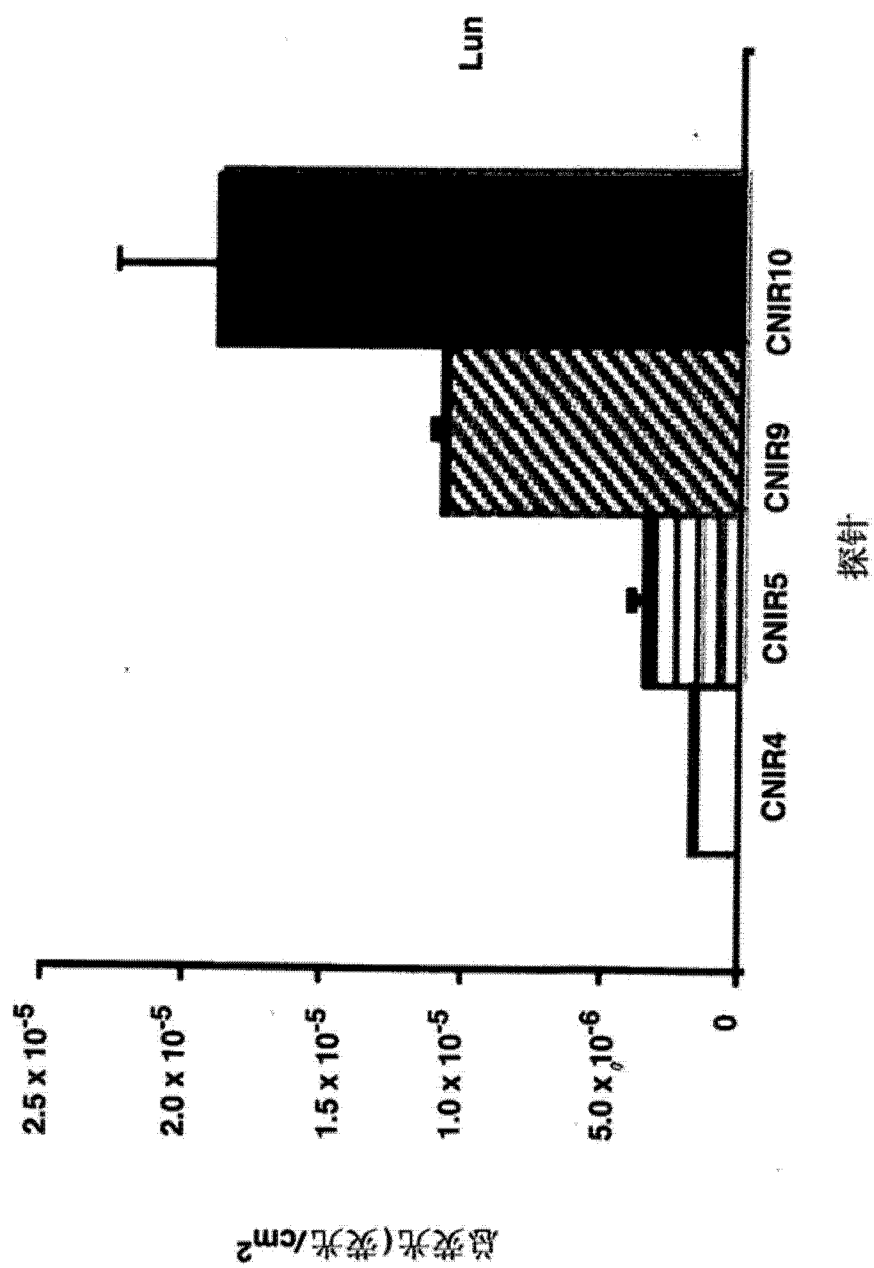
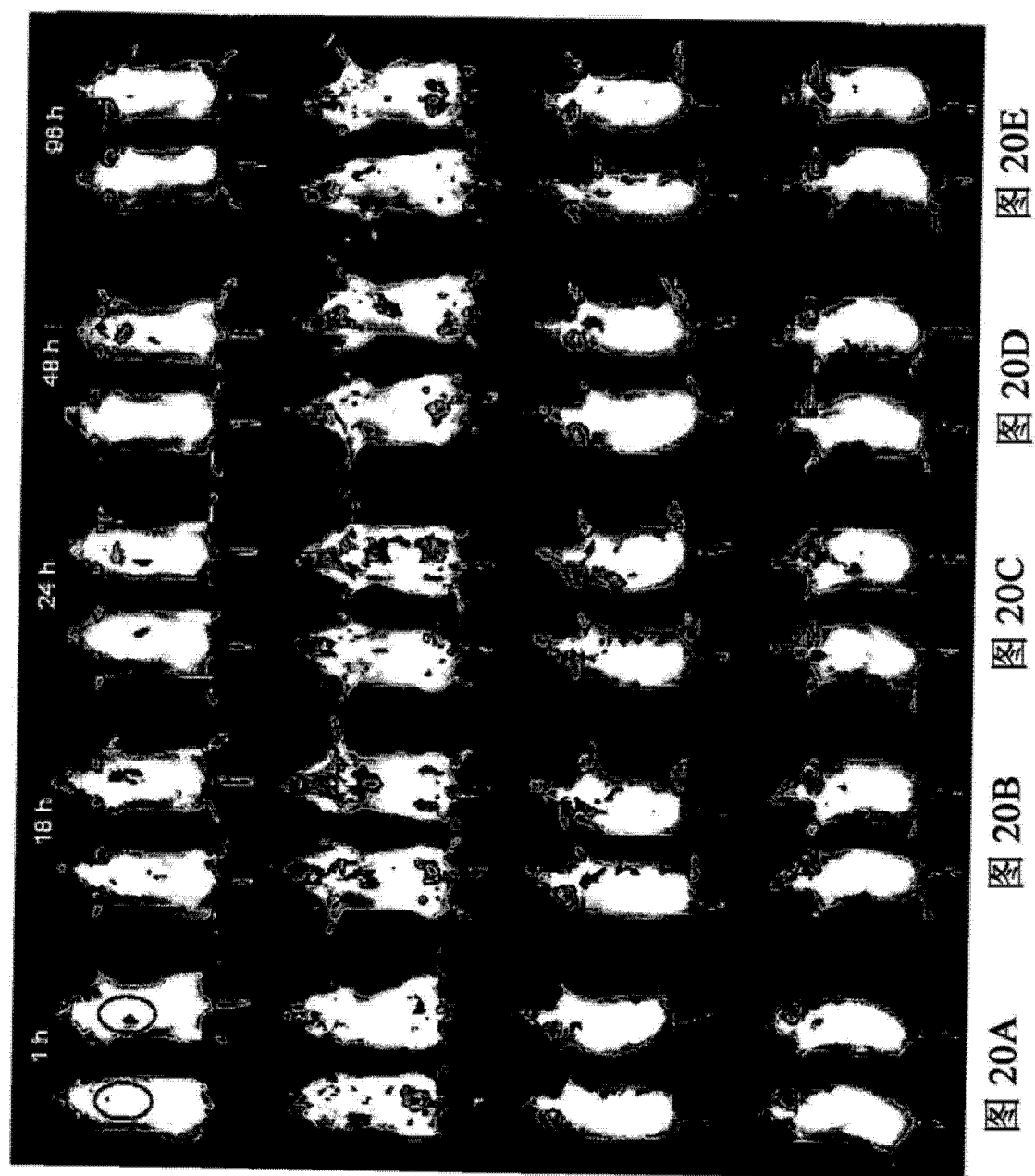


图 19E



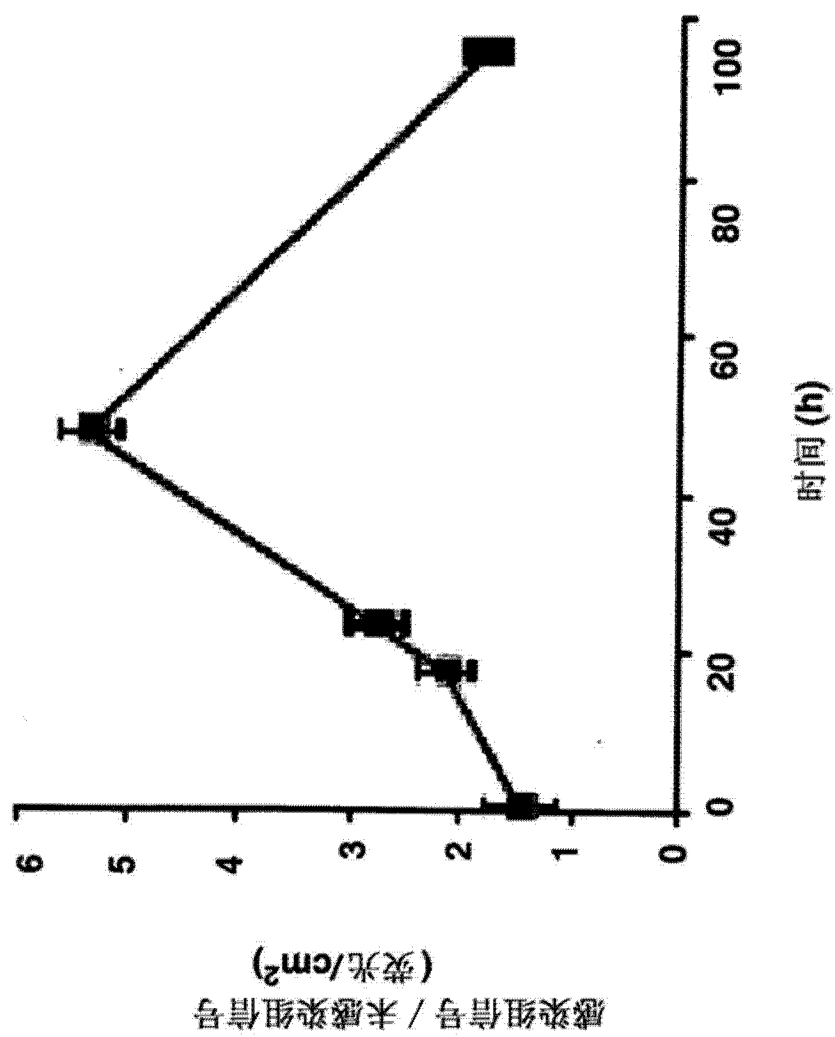


图 20F

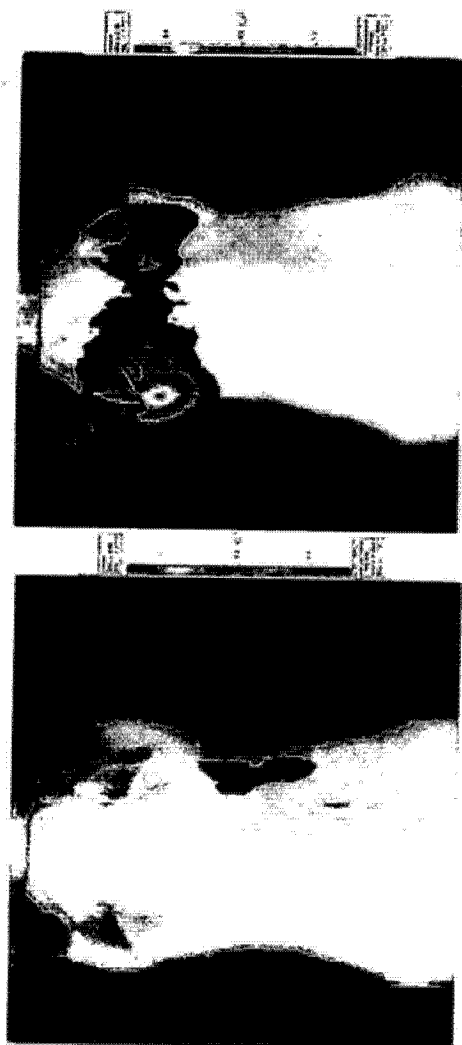


图 21B

图 21A

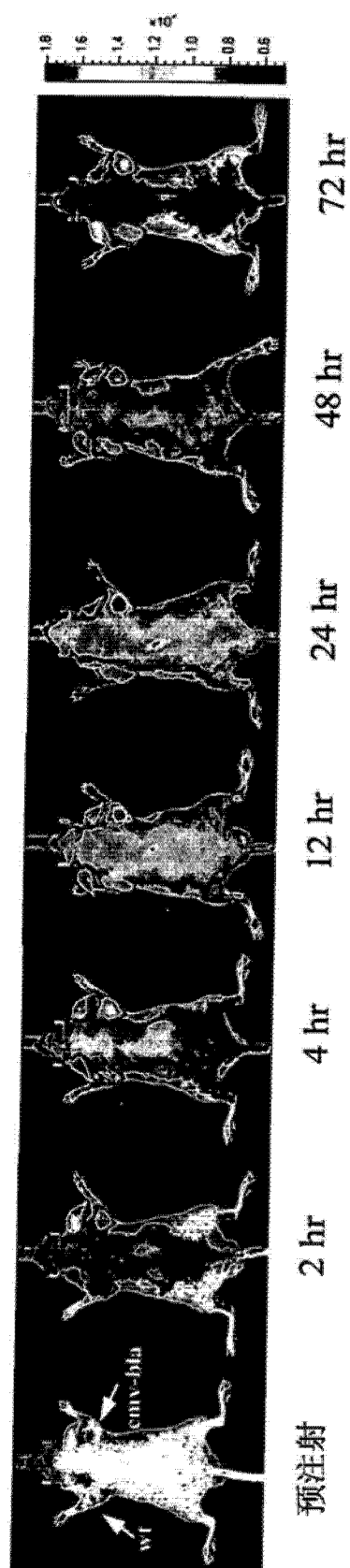


图 22A

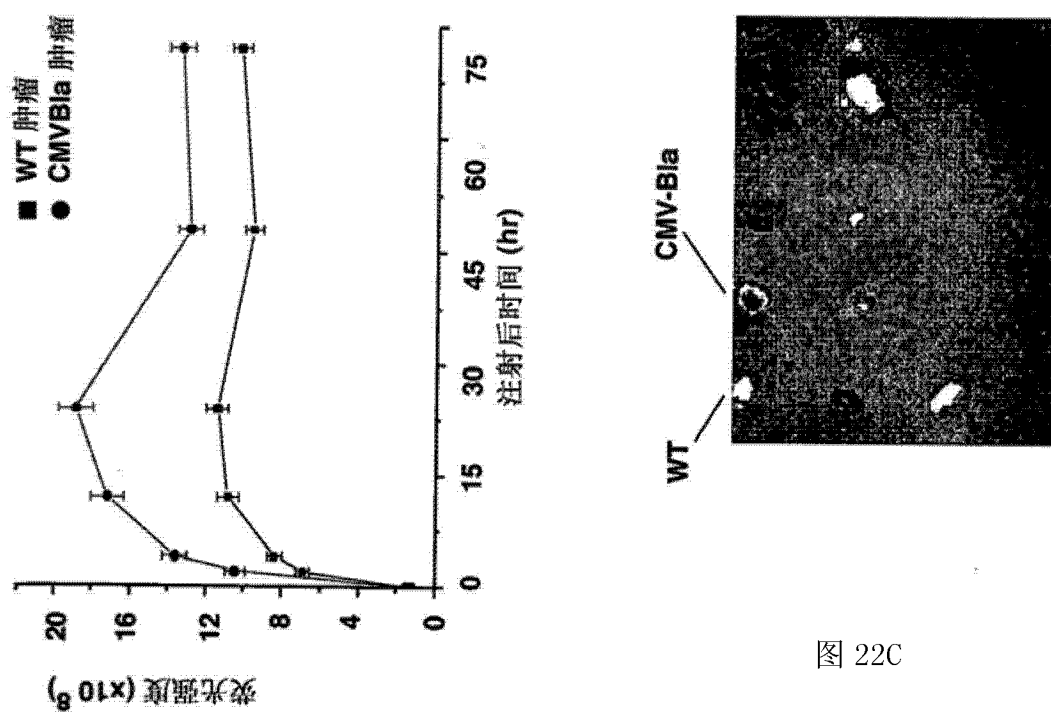


图 22C

图 22B

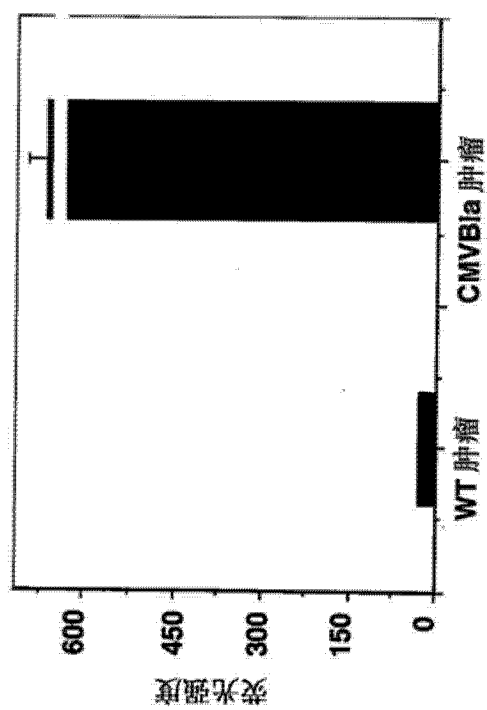


图 22D

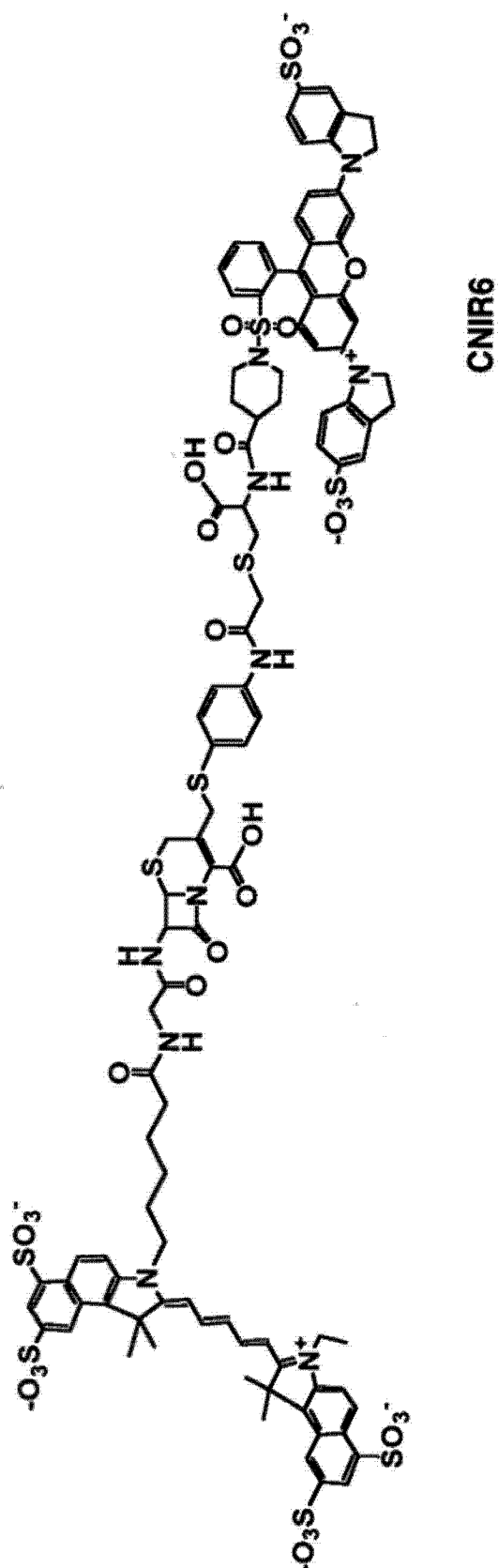


图 23A

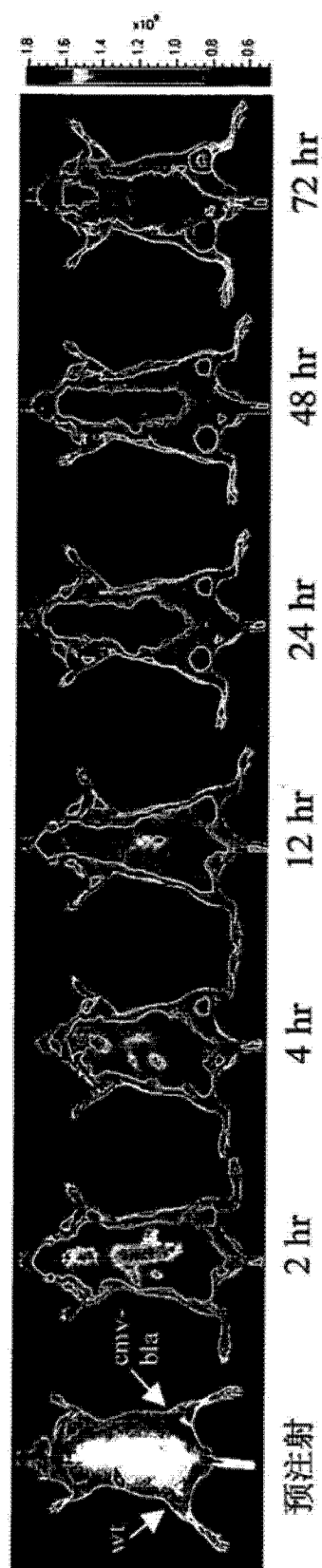


图 23B

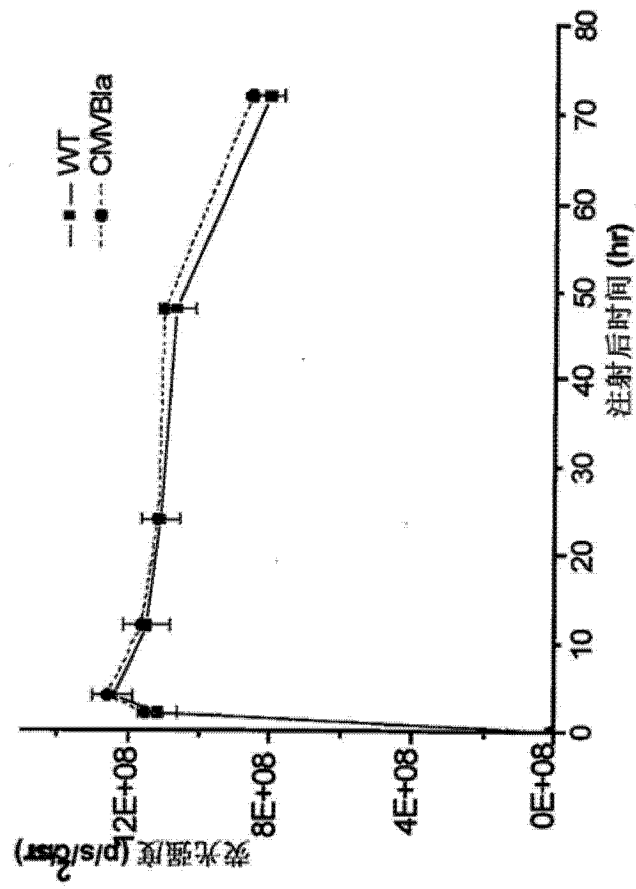


图 23C

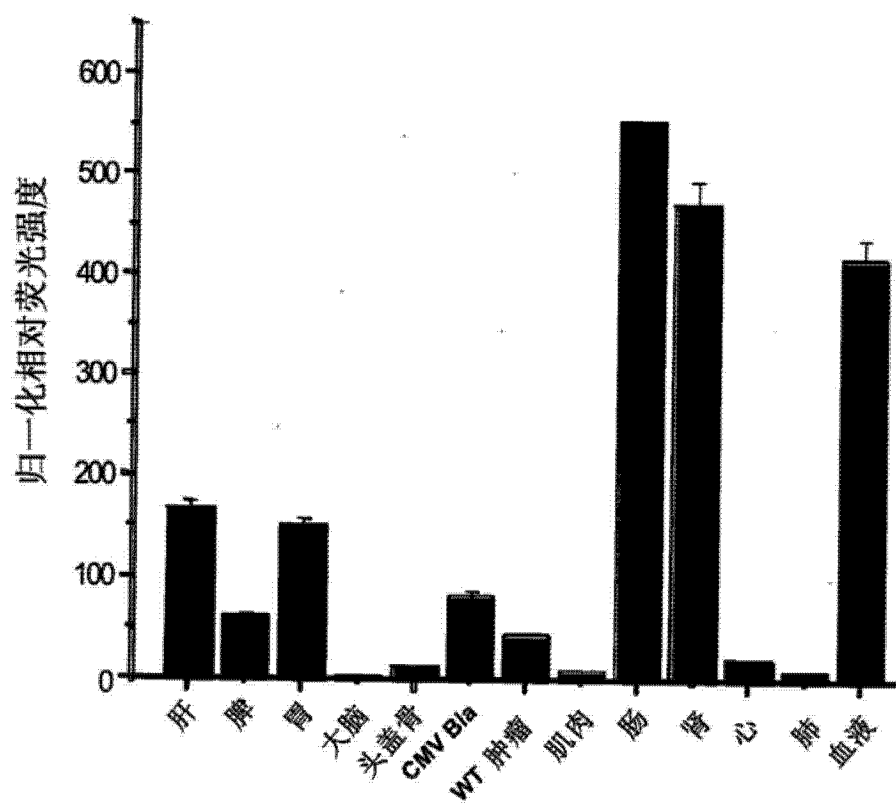


图 24A

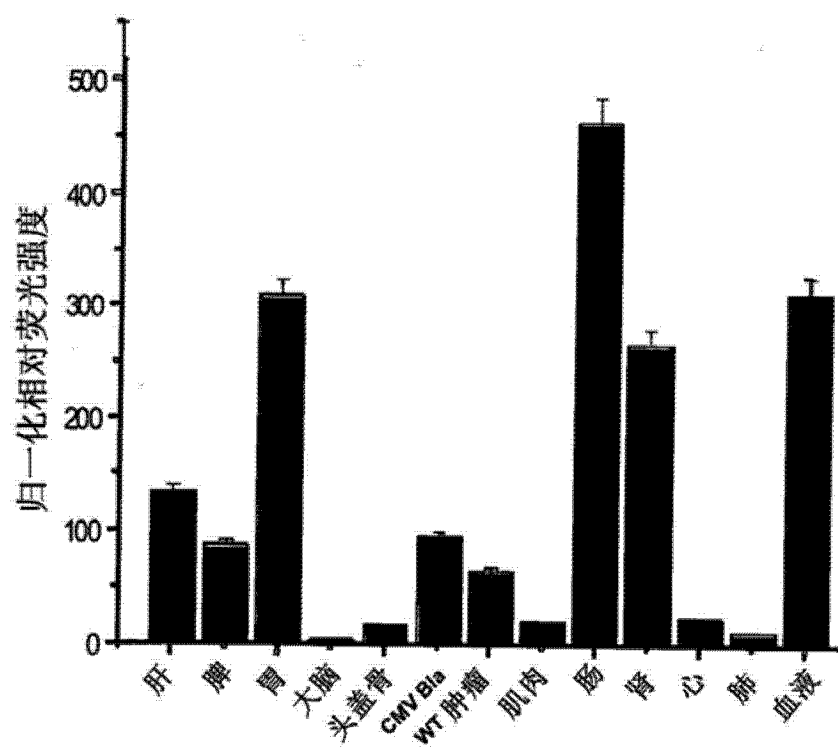


图 24B

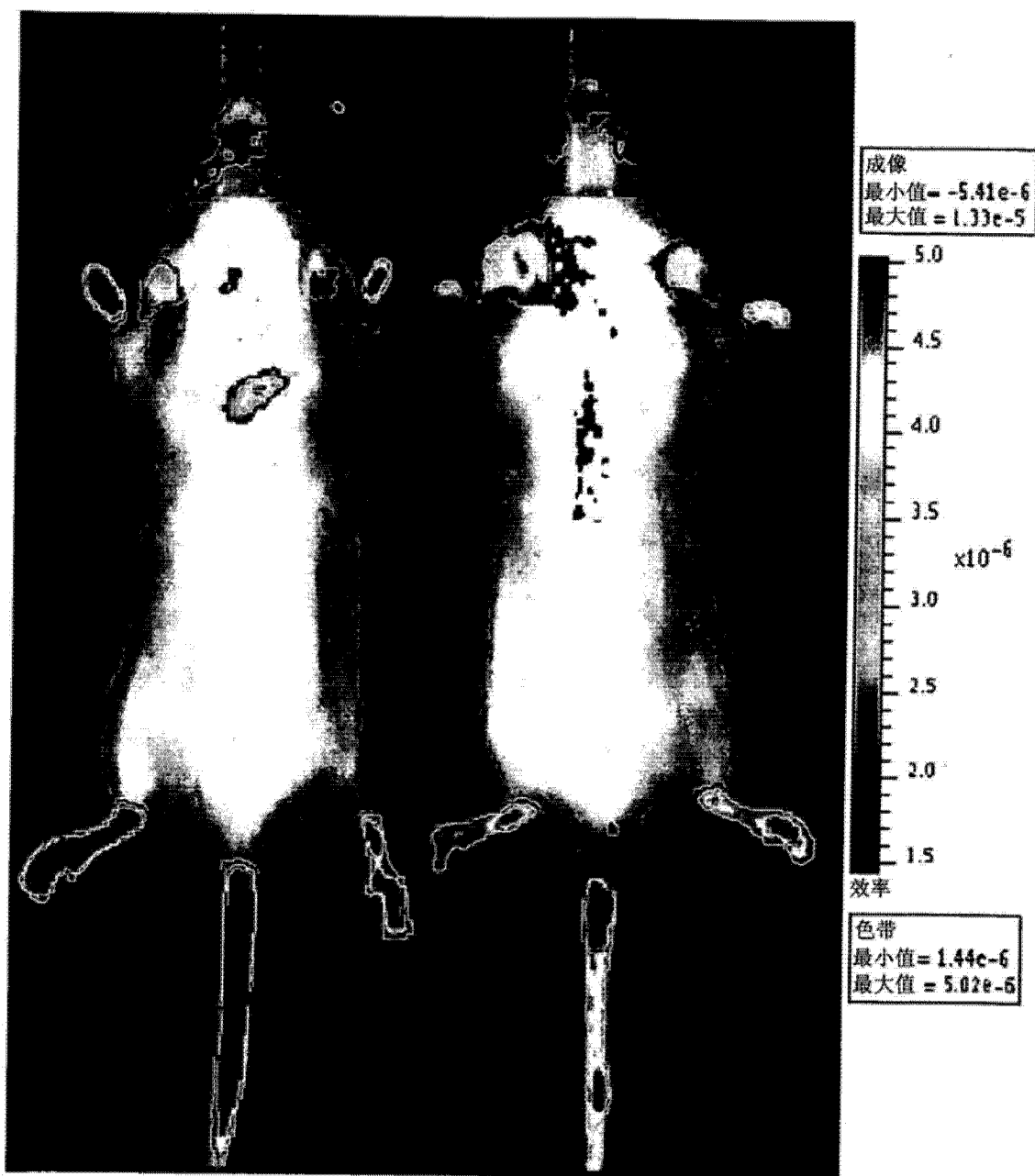


图 25A

图 25B

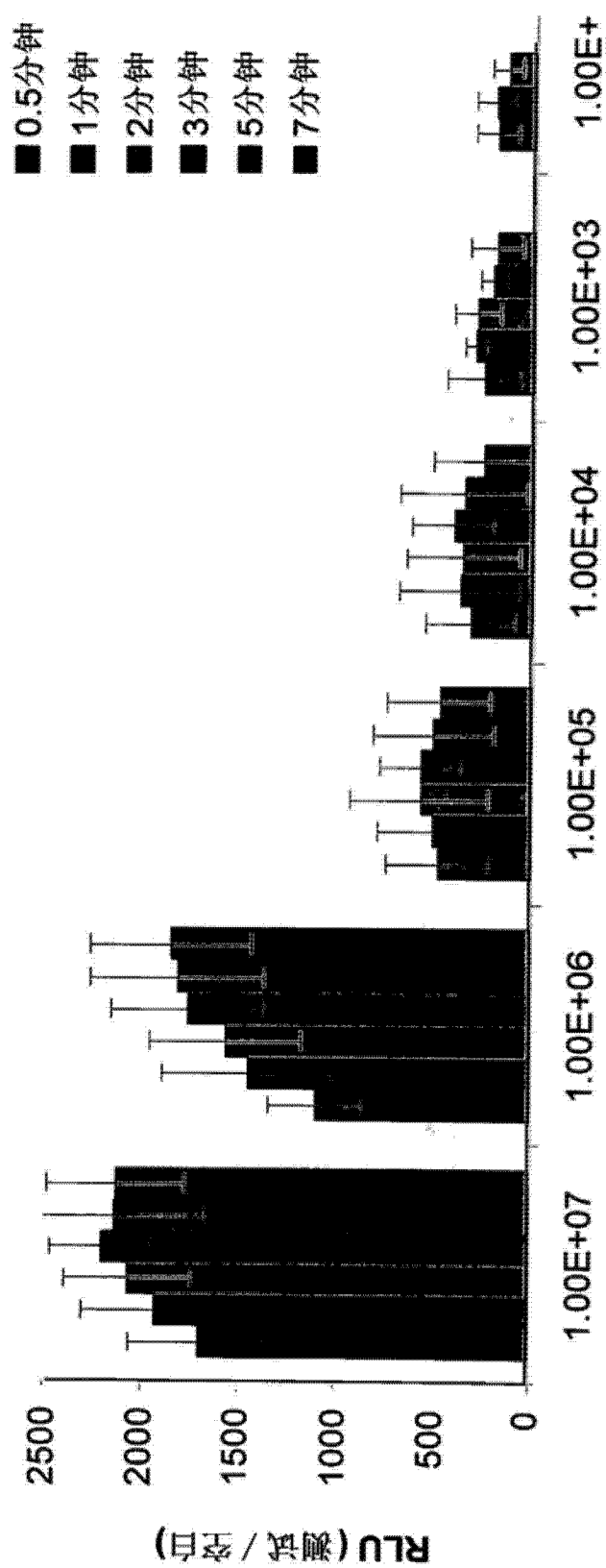


图 26A



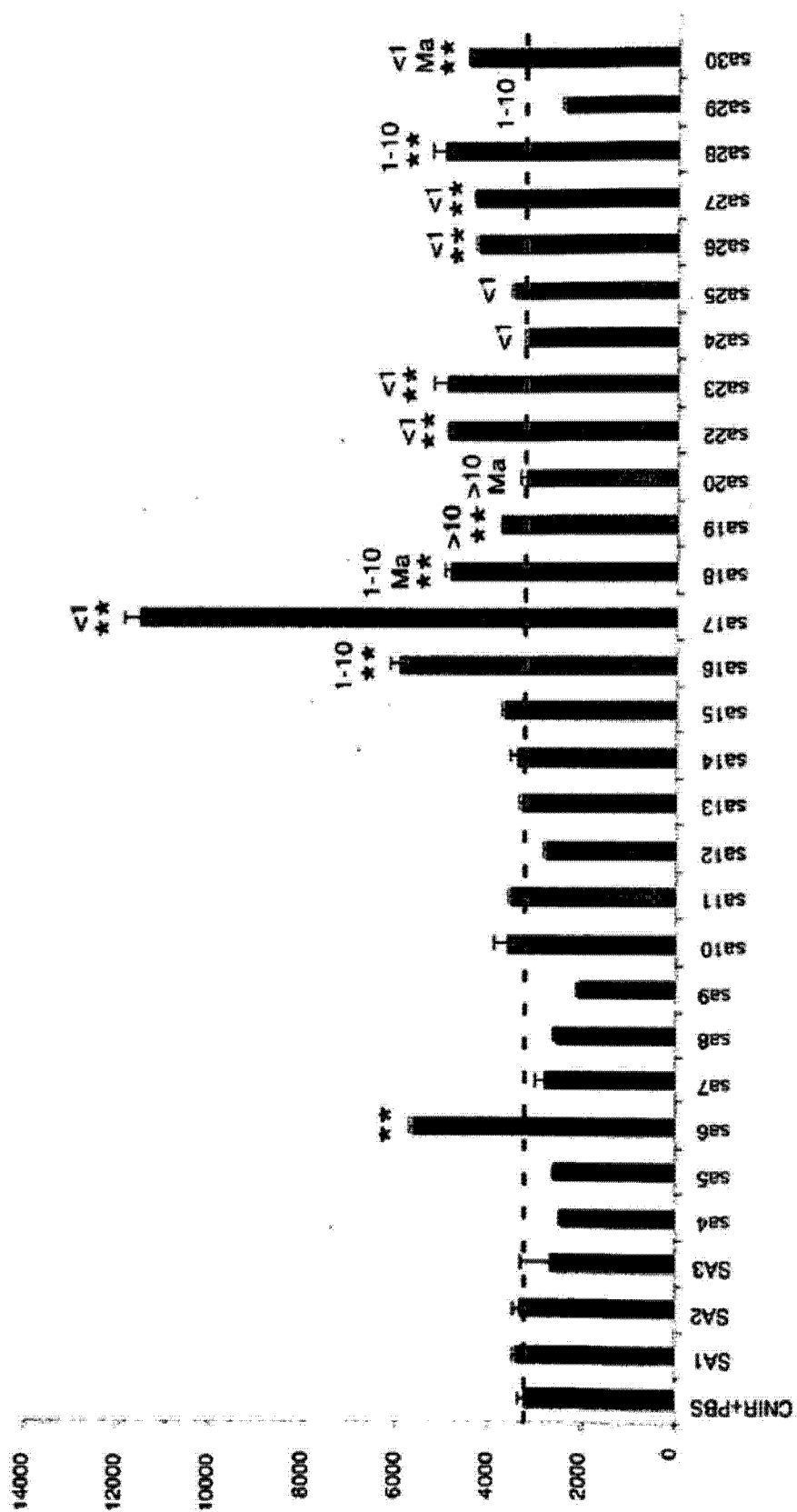


图 27A

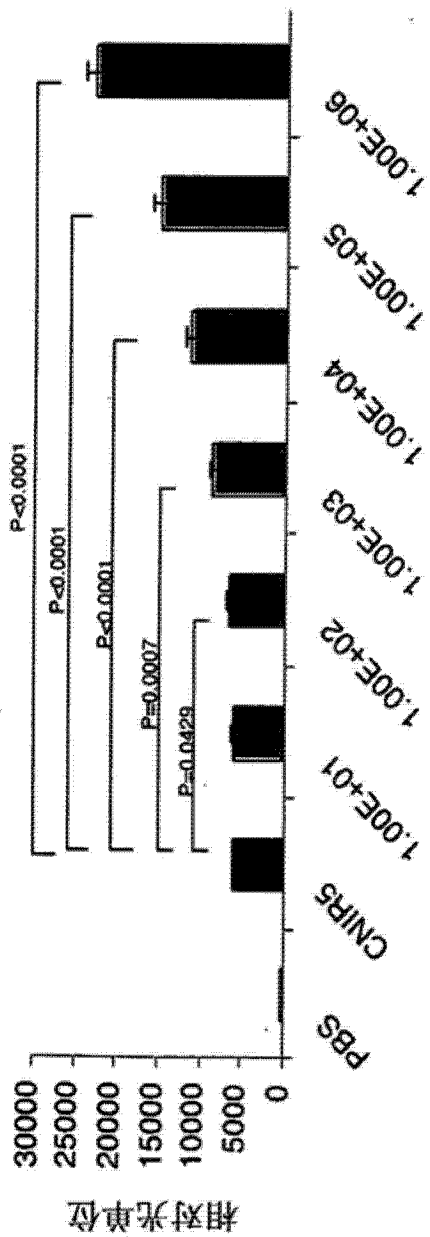


图 27B

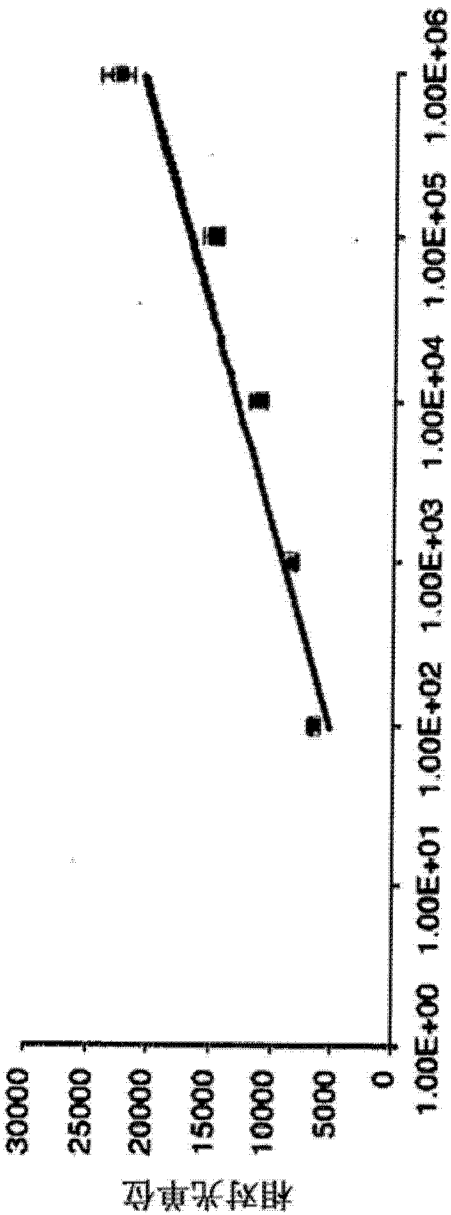


图 27C

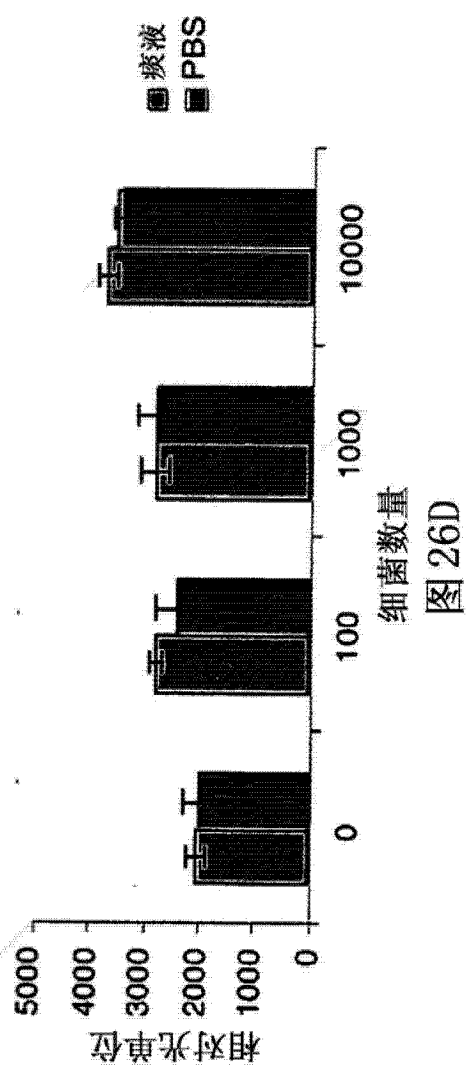


图 26D

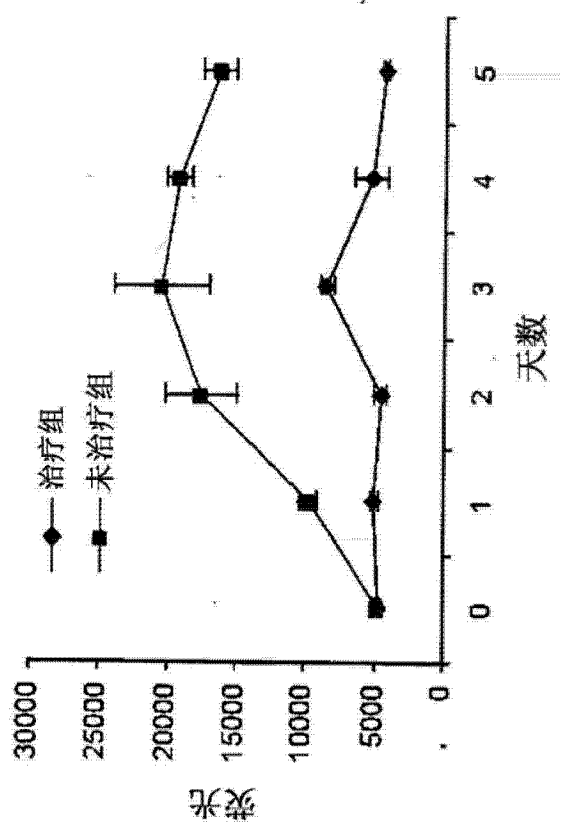


图 27E

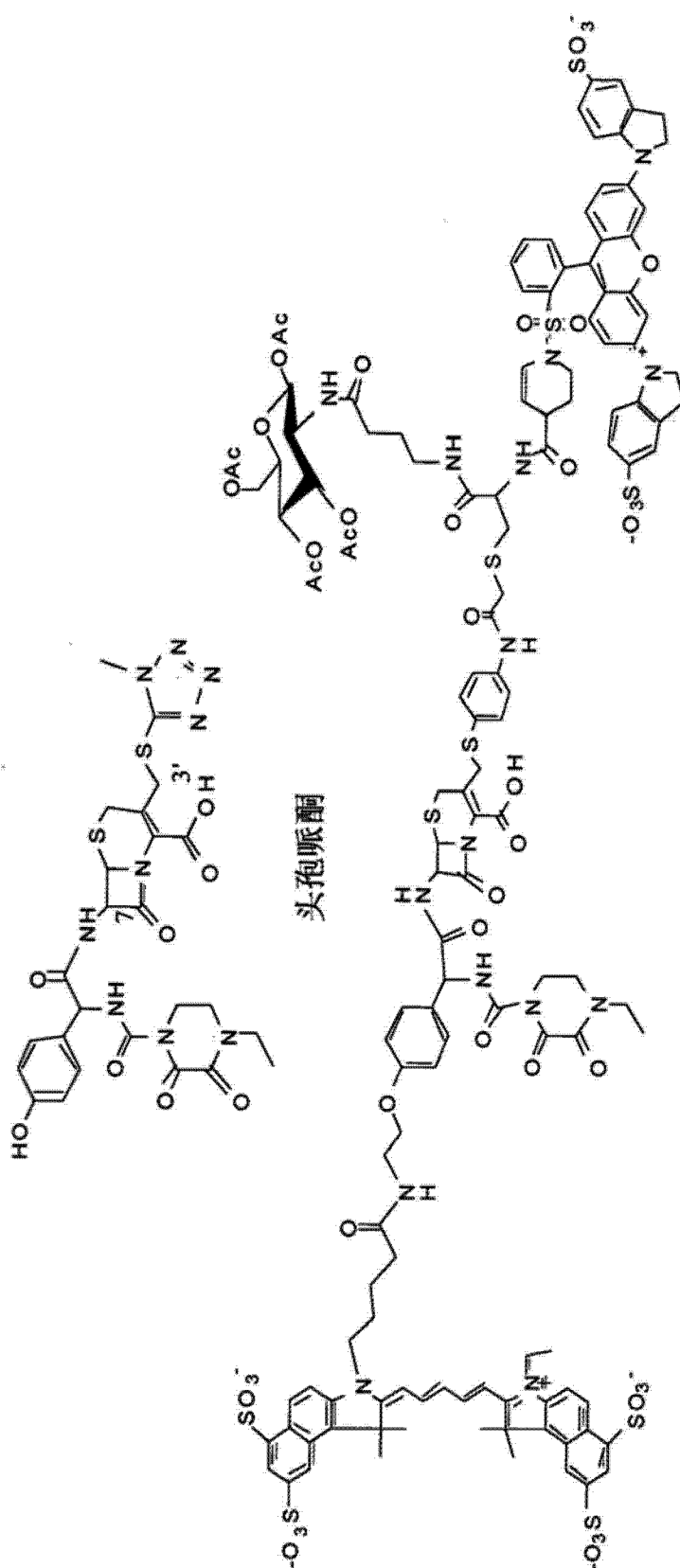


图 29

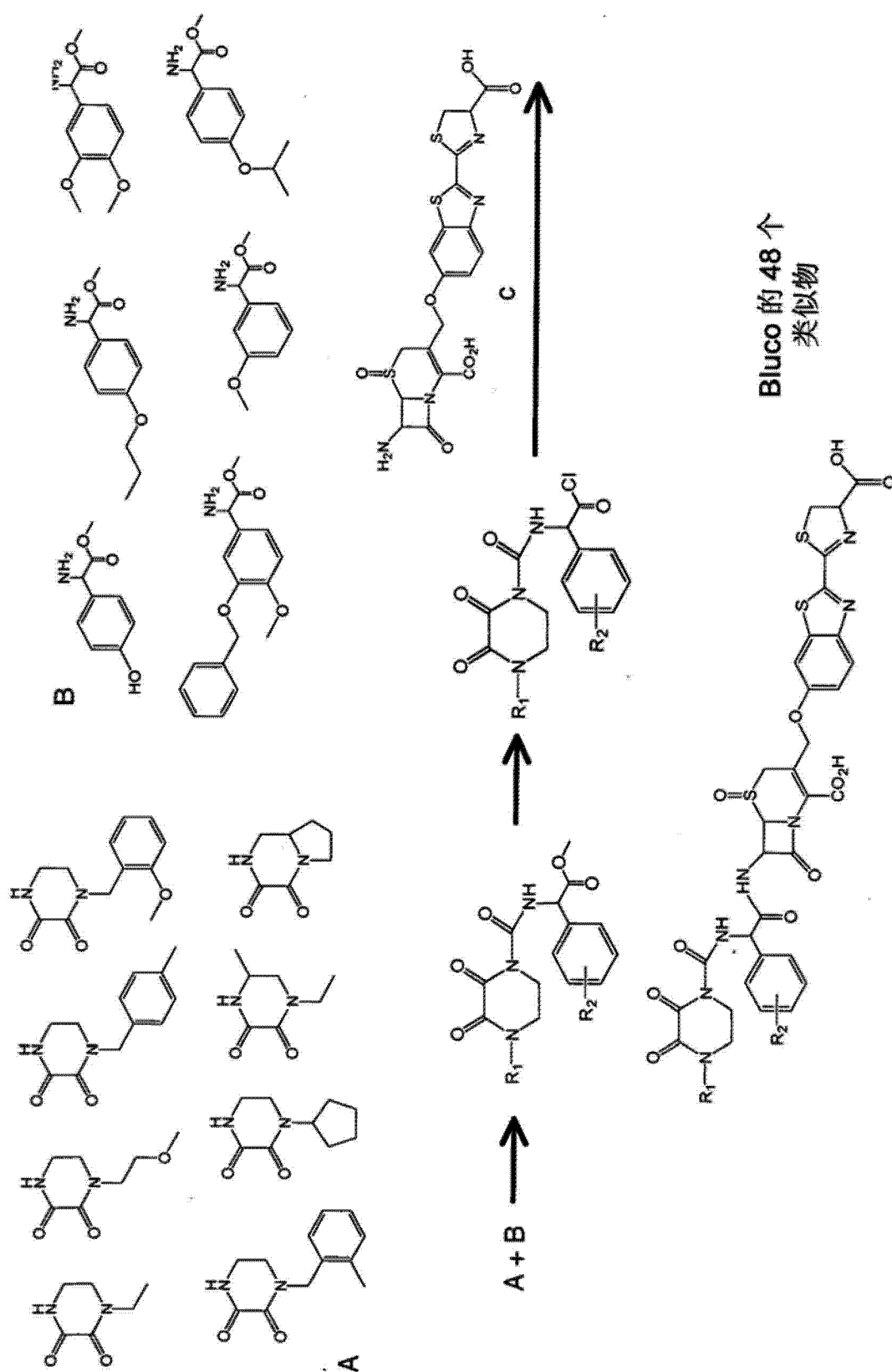


图 30

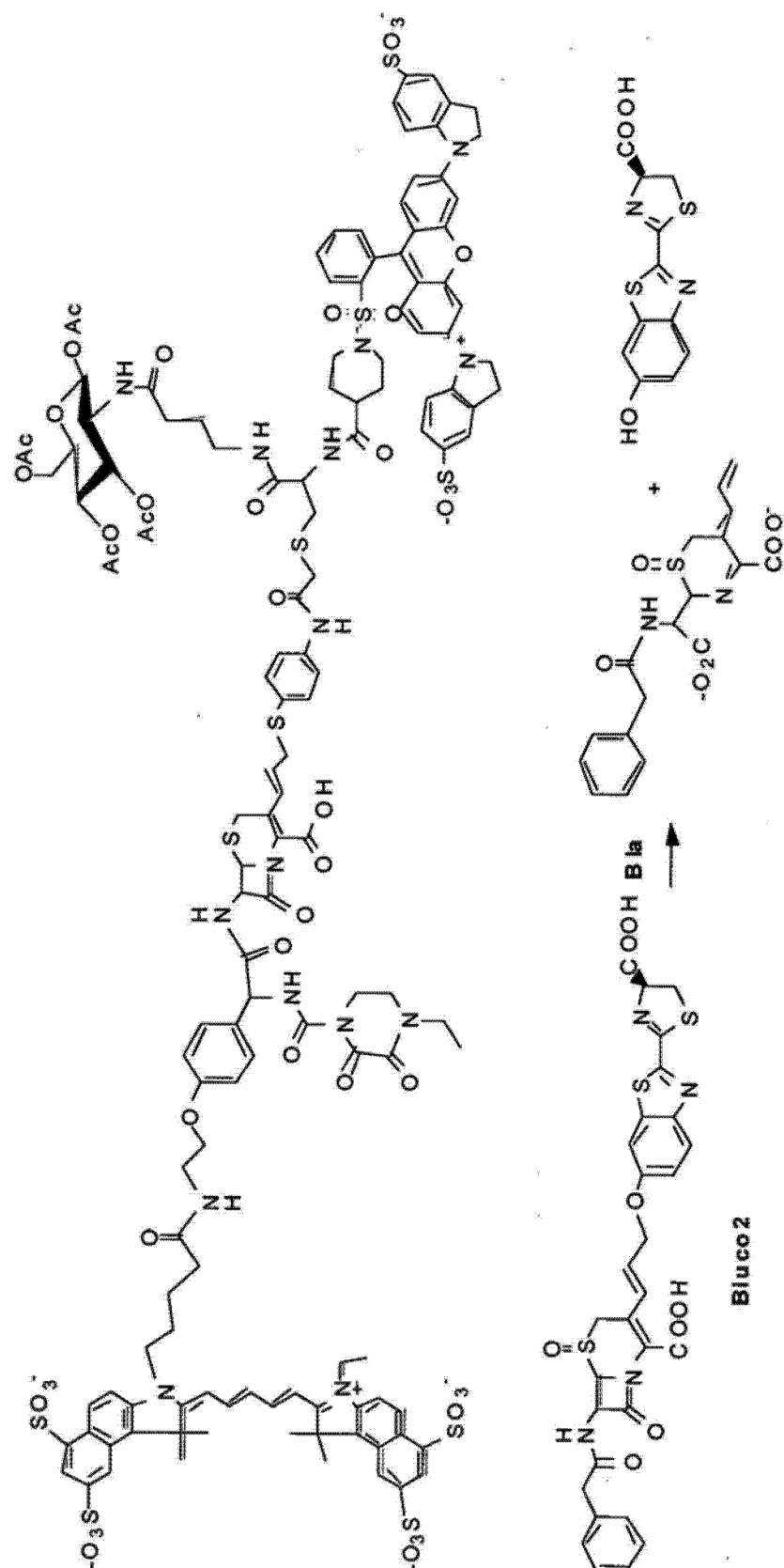


图 31

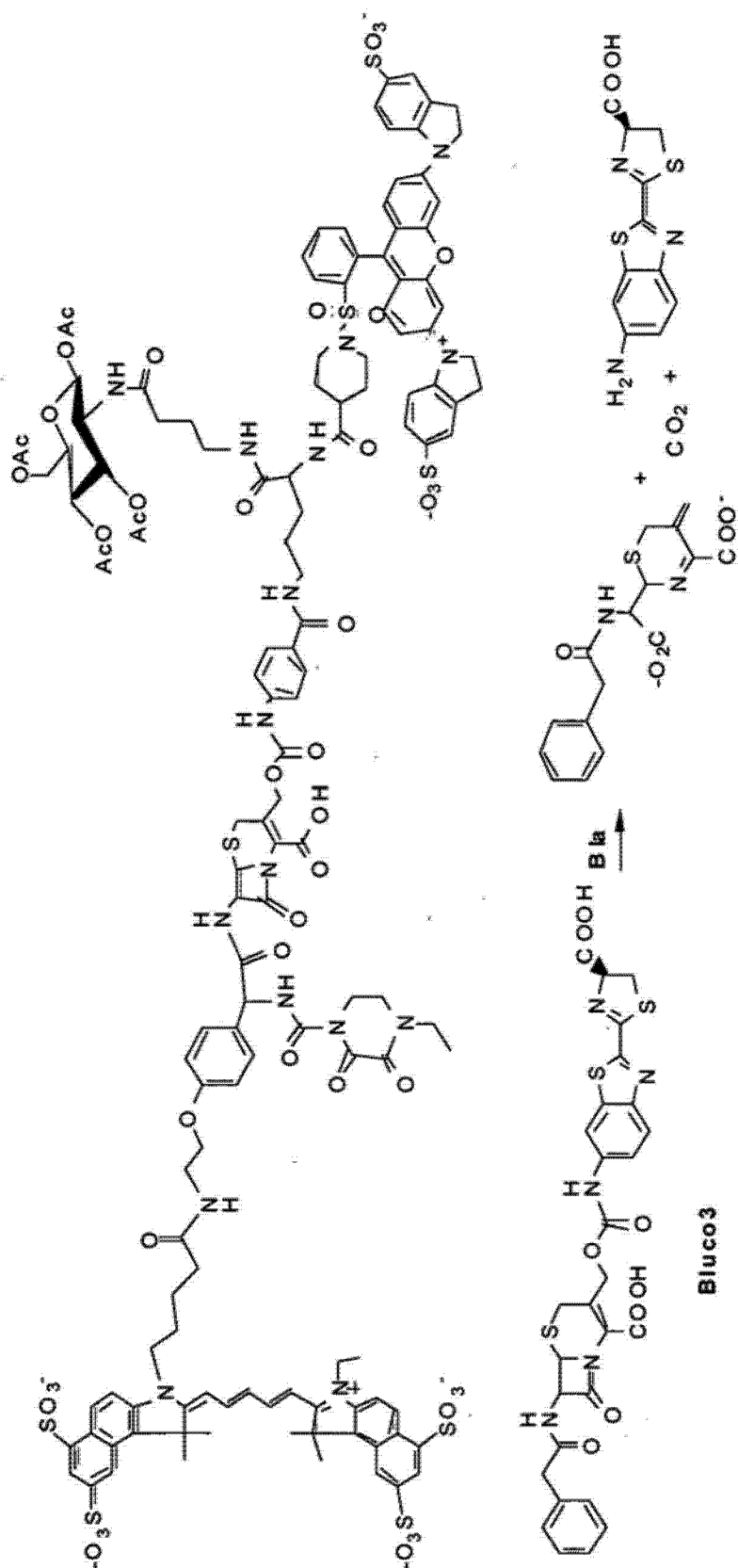


图 32

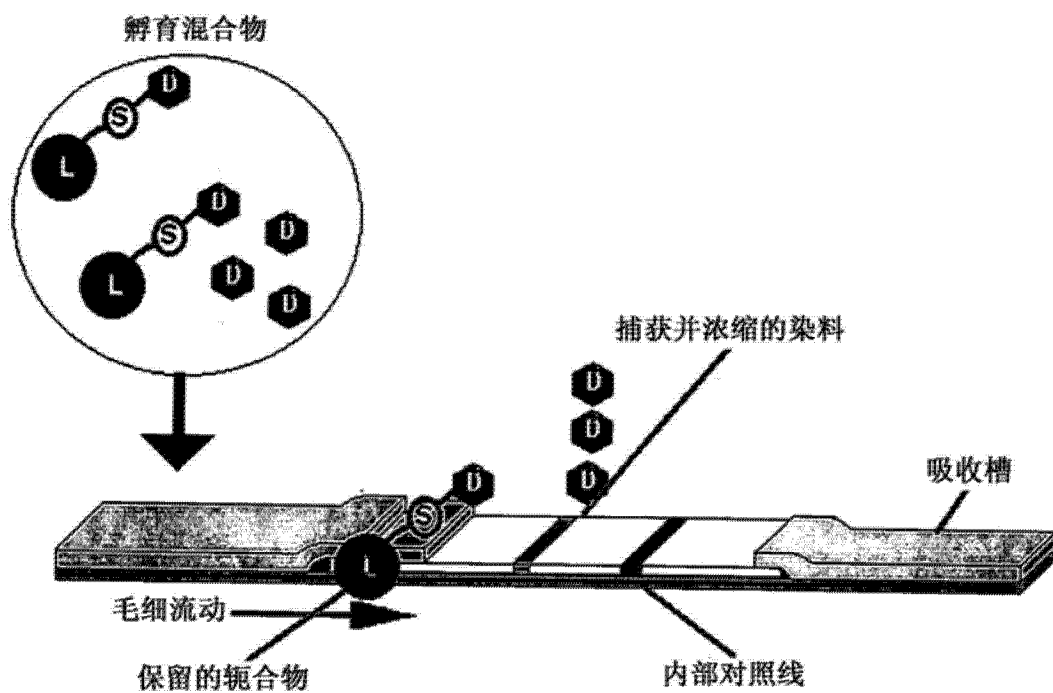


图 33A

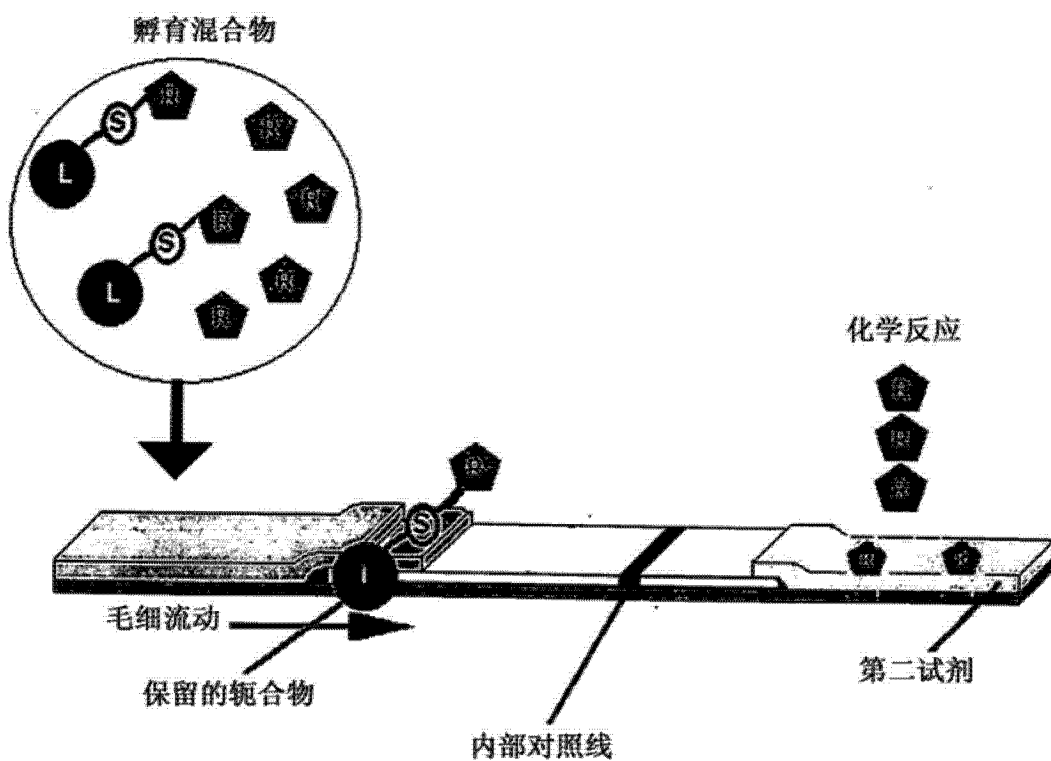


图 33B

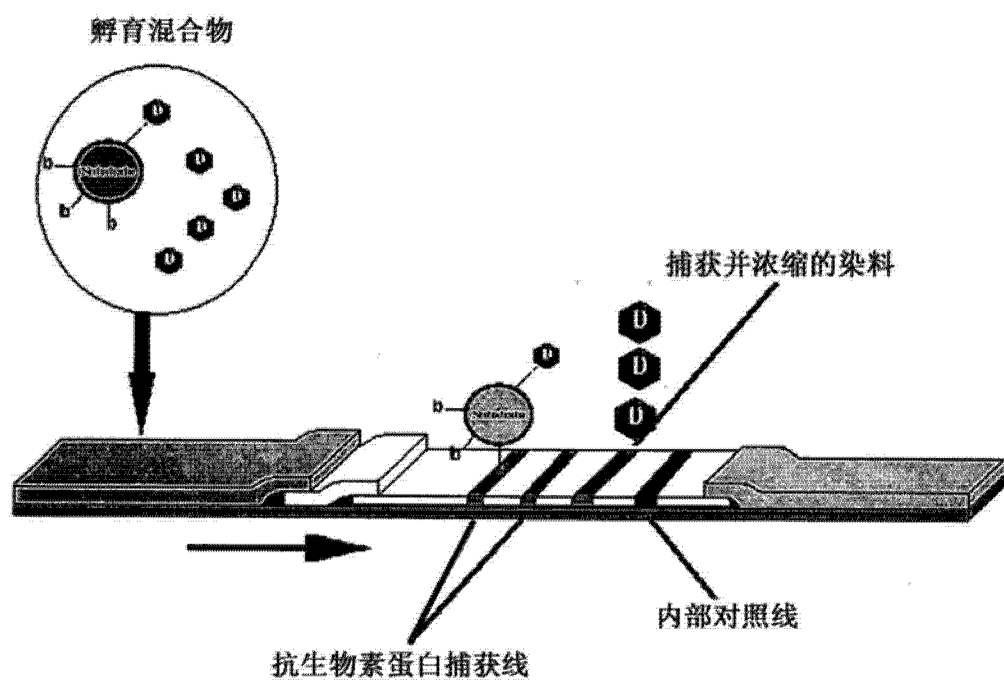


图 33C

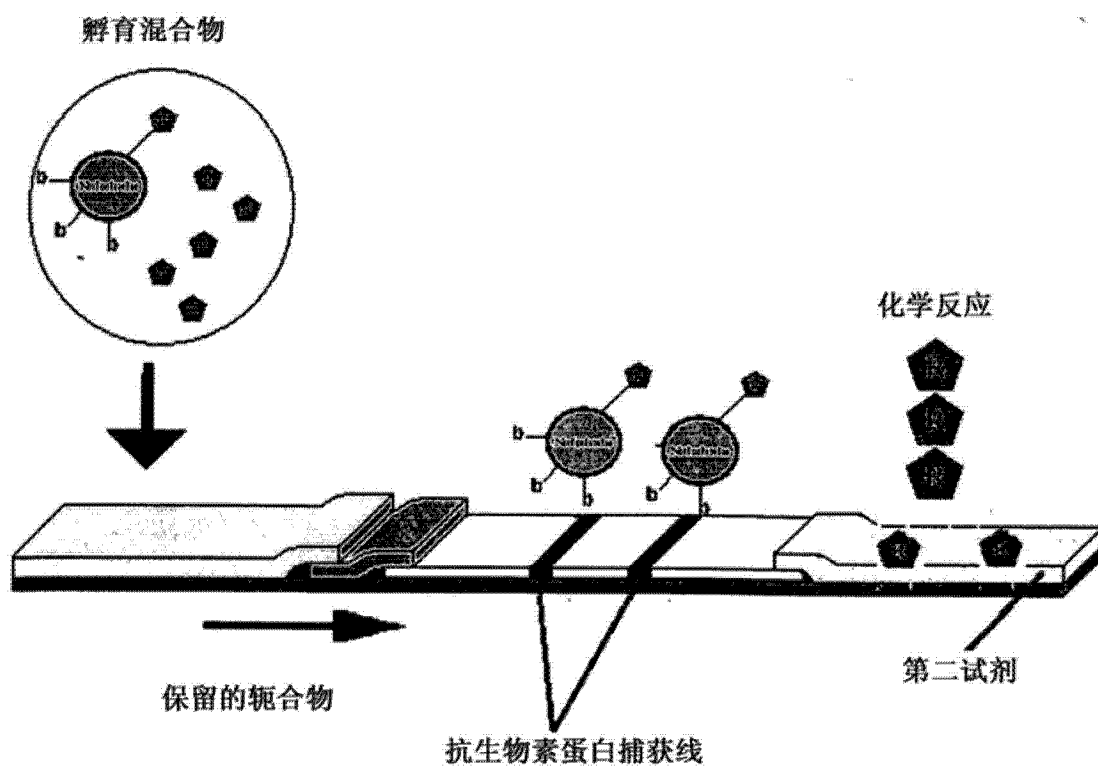


图 33D