



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101869716 B

(45) 授权公告日 2013.12.11

(21) 申请号 201010218234.5

要求 1-86.

(22) 申请日 2002.12.31

Kenji Miki, et al.. Methioninase

(30) 优先权数据

Cancer Gene Therapy with Selenomethionine
as Suicide Prodrug Substrate. 《Cancer
Research》. 2001, 第 61 卷 (第 18 期), 6805 —
6810.

60/345,699 2001.12.31 US

(62) 分案原申请数据

审查员 谢京晶

02828390.2 2002.12.31

(73) 专利权人 抗癌公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 赵明 李小明 杨萌 徐明旭

姜平 李玲娜

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 罗天乐

(51) Int. Cl.

A61K 49/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 0125399 A2, 2001.04.12, 说明书摘要, 说
明书第 5.2、5.5 和 5.6 段, 表 2, 实施例 6.9, 权利

权利要求书2页 说明书9页

(54) 发明名称

监视细菌肿瘤治疗的系统

(57) 摘要

本发明涉及监视细菌肿瘤治疗的系统, 更具
体地, 本发明涉及使用已被改进来表达荧光蛋白
的细菌跟踪受试者肿瘤治疗进展的方法。该方法
也可以监视与在治疗过程中产生治疗物质的细菌
有关的基因的表达, 可选地在由肿瘤自身产生的
荧光背景上。该方法使得活体对象的治疗进展可
视, 从而可以按照其功效改进疗法。

B

CN 101869716

1. 表达具有第一种颜色的第一荧光蛋白的细菌在制备用于监视患有实体瘤的哺乳动物对象的肿瘤治疗的过程的试剂中的用途，所述监视包括：

观察以时间为函数的所述对象的实体瘤中荧光的存在、不存在或强度，其中所述对象用所述细菌进行治疗，

其中在所述肿瘤中所述第一荧光蛋白的荧光随时间的分散指示所述治疗的进展，

其中所述监视进一步包括观察所述对象中肿瘤的退化或转移，所述肿瘤用具有与第一种颜色不同的第二种颜色的第二荧光蛋白来标记，

其中所述细菌是兼性厌氧菌。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述观察是通过对完整对象的全身荧光视觉肿瘤成像而进行的。

3. 权利要求 1 的用途，其中所述观察是通过内窥镜检查法而进行的。

4. 权利要求 1 的用途，其中所述对象是小鼠、大鼠或兔，它们已被改进来包含表达所述第二荧光蛋白的肿瘤细胞。

5. 权利要求 1 的用途，其中所述对象是人，且其中所述对象已被给予用于表达所述第二荧光蛋白的病毒载体。

6. 权利要求 5 的用途，其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。

7. 权利要求 1 的用途，其中所述细菌被修饰来包含用于治疗蛋白的表达系统。

8. 权利要求 7 的用途，其中所述治疗蛋白是作为与荧光蛋白的融合蛋白而产生，该荧光蛋白与所述第一荧光蛋白的颜色不同。

9. 权利要求 1 的用途，其中所述细菌被修饰以包含用于治疗蛋白的表达系统。

10. 权利要求 9 的用途，其中所述治疗蛋白是作为与具有第三种颜色的第三荧光蛋白的融合蛋白而产生，该第三种颜色与所述第一种和第二种颜色不同。

11. 经修饰而表达与治疗蛋白融合的具有第一种颜色的第一荧光蛋白的细菌在制备用于监视对哺乳动物对象进行肿瘤治疗的方案的试剂中的用途，所述监视包括：

随时间推移监视已用所述细菌进行治疗的对象的实体瘤中所述荧光的存在、不存在或强度；

通过在所述肿瘤中所述第一荧光蛋白的荧光随时间的存在和强度的维持确认了所述治疗蛋白的存在以治疗该肿瘤，其中所述监视进一步包括观察所述肿瘤的退化或转移，其中所述肿瘤用具有与第一种颜色不同的第二种颜色的第二荧光蛋白来标记，

其中所述细菌是兼性厌氧菌。

12. 权利要求 11 的用途，其中所述监视是通过对所述完整对象的全身荧光视觉肿瘤成像而进行的。

13. 权利要求 11 的用途，其中所述观察是通过内窥镜检查法进行的。

14. 权利要求 11 的用途，其中所述对象是小鼠、大鼠或兔，它们已被改进来包含表达所述第二荧光蛋白的肿瘤细胞。

15. 权利要求 11 的用途，其中所述对象是人，且其中已给予所述对象表达所述第二荧光蛋白的病毒载体。

16. 权利要求 11 的用途，其中所述治疗蛋白是酶，且其中该方法进一步包括能由所述酶裂解的前药。

17. 权利要求 11 的用途,其中所述治疗蛋白是蛋氨酸酶。
18. 权利要求 16 的用途,其中所述治疗蛋白是蛋氨酸酶且所述前药是硒代蛋氨酸。
19. 权利要求 11 的用途,其中进一步修饰所述细菌来表达颜色与所述第一种颜色不同的荧光蛋白。
20. 权利要求 11 的用途,其中已经修饰所述细菌来表达具有与所述第一种和第二种颜色不同的第三种颜色的第三荧光蛋白。

监视细菌肿瘤治疗的系统

[0001] 本申请是申请日为 2002 年 12 月 31 日、申请号为 02828390.2 (国际申请号为 PCT/US02/41822)、发明名称为“监视细菌肿瘤治疗的系统”的发明申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及细菌作为进行肿瘤治疗的载体的用途和监测定位 (localization) 及功效 (efficacy) 的方法。更详细地,本发明涉及在细菌中传递的荧光蛋白监测抗肿瘤药物的传递 (delivery) 和功效 (efficacy) 的用途。

背景技术

[0003] 到如今已很好地确定了绿色荧光蛋白在使癌进展 (progression) 和转移 (metastasis) 可见中的用途。例如见 Hoffman, R. M., Methods in Enzymology (1999) 302 : 20-31 (P. Michael Conn, ed., Academic Press, San Diego)。在美国专利 6,251,384 中公开了用全身成像 (whole body imaging) 来对实时 (real time) 进展 (progression) 制图并评估治疗肿瘤的建议方案的功效,其内容被引入本发明中作为参考。

[0004] 包括在绿色荧光蛋白的优点中的特征是其不需要任何底物或辅助因子来发荧光且其在活细胞中的表达不引起任何明显的生物损伤。此外,荧光发光的水平使得其成为特别灵敏的技术。除了直接的目视观察,利用简单的设备能得到全身影像,例如来自氩或汞灯的 490nm 激发 (excitation) 连同通过 CCD 彩色摄像机捕获影像。这些允许了实时研究肿瘤生长和转移。例如,见 Yang, M. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97 :1206-1211。

[0005] 美国临时申请 60/304,223,2001 年 7 月 9 日申请,其内容被引入本文中作为参考,描述了利用荧光蛋白标记大肠杆菌和其它细菌以监视感染和评价其治疗。该项技术描述的以良性方式标记细菌的能力使其能适合最近描述的用于肿瘤治疗的组合溶菌 (bacteriolytic) 疗法的方案。该标记细菌的技术在 Zhao, M. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001) 98 :9814-9818 和 Yang, M. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97 :12278-12282 中也有描述,将所述申请引入本发明中作为参考。

[0006] 利用荧光蛋白标记细菌和它们的产品的能力对新开发的治疗实体瘤 (solid tumors) 的方法提供了显著的改进,所述治疗实体瘤的方法由 Dang, L. H. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001) 98 :15155-15160 中描述。肿瘤治疗的该途径,由其开发者命名为“组合溶菌疗法”或“COBALT”,利用了特定厌氧菌在实体瘤内部缺氧环境中优先生长的性质。该文章调查了大量双歧杆菌属 (Bifidobacteria)、乳酸菌 (Lactobacilli) 和梭状芽孢杆菌 (Clostridia) 的生长性质,所有这些在肿瘤的含氧量低 (hypoxic) 的区域中选择性地增殖,并引用了大量的论文确立此事实。细菌它们自己可以在瘤内被注入,但是为了提供更方便的给予方式,作者利用了也在现有技术中确立的事实,即虽然当静脉内注入时活细菌是直接有毒的,这些细菌的芽孢能够通过静脉内注入正常小鼠中而不会引起直接的副作用。这并不完全正确;除非细菌分泌毒素的能力被削弱,静脉内给予所述芽孢是非常致命的。作者利用单个毒素基因位于噬菌体游离基因 (phage episome) 内,从而热处理的细菌显示出

噬菌体丧失的事实,成功使诺氏梭状芽胞杆菌 (*Clostridium novyi*) 丧失这种能力。因此开发了一种菌株,当静脉内给予芽孢时,该菌株是无毒的。

[0007] 遇到的另一个问题是许多厌氧菌株在含氧量低的肿瘤背景中聚集 (cluster) 成少量菌落的倾向。已发现诺氏梭菌 (*Clostridium novyi*) 和索状梭菌 (*C. sordellii*) 在含氧量低的肿瘤区域中能够以分散方式生长。因此,通过创建诺氏梭菌 (*C. novyi*) (*C. novyi*-NT) Dang 等的无毒模型 (version),能够静脉内引入芽孢来指向 (home to) 肿瘤并且因为它们在坏死区域内独特生长,能够毁坏周围的存活的肿瘤细胞。这些细菌到达含氧量低、坏死的区域 (发现其占> 1cm³ 的活组织检查的样本中 25% -75% 的肿瘤体积) 的能力是决定性的。坏死区域 (由于缺乏氧其是坏死的) 通常被存活细胞所包围。化学治疗剂不能到达这些细胞,因为那里没有输送它们的循环血,并且对放射相对免疫,因为放射需要氧来发挥致命性影响。因此,厌氧菌在含氧量低的肿瘤环境中生长旺盛的能力使得它们成为用于治疗的有价值的输送系统。所述细菌本身的生长确实能引起肿瘤退化,这由 Dang 等证明。也见 Yazawa, K. 等,Cancer Gene Therapy (2000) 17 :269-274 ;Yazawa, K. 等,Breast Cancer Res. & Dev. (2001) 66 :6665-170。

[0008] Low, K. B. 等,Nature Biotechnology (1999) 17 :37-41 更早地描述了相似的方法。在这种情况下,将沙门氏菌 (*Salmonella*) 菌株作为抗肿瘤剂开发,因为它们能在缺氧的环境中生存,并且优先在肿瘤的含氧量低的区域中增殖。也修饰 (modified) 它们来生产在肿瘤治疗中有用的蛋白,例如所述前药转化酶胸昔激酶 (thymidine kinase),Pawelek, J. 等, Cancer Res. (1997) 57 :4537-4544。然而,因脂质 A 刺激由肿瘤坏死因子 α 诱导发生的脓毒症 (sepsis) 有效地阻止了在肿瘤治疗中沙门氏菌的用途。Low 等能够分裂 (disrupt) 沙门氏菌中的 msb 基因以减少 TNF α 诱导,以便废除该细菌诱导脓毒症的能力却保持其抗肿瘤活性。这些作者显示了给予患黑瘤素的小鼠修饰的细菌 18 天后肿瘤的尺寸小于未治疗对照组中肿瘤尺寸的 8%。

[0009] 因此,本领域已证明包括兼性厌氧菌的厌氧菌能选择性地进入肿瘤的含氧量低的区域,并且缺乏通常与它们相关的毒性作用的这种细菌的修饰类型能安全用于治疗。

[0010] 用于获得荧光蛋白合适表达的物质和方法是容易可得的。包含不同的 GFP 修饰形式以提供不同颜色的载体由 Clontech 销售。用于哺乳动物细胞表达的 Clontech 载体使所述 GFP 处于细胞巨化病毒 (CMV) 启动子的控制之下;这种表达系统也可用来标记病毒感染剂 (viral infectious agents)。GFP 表达细菌先前已用于许多的研究,然而没有用于整体 (intact) 的活动物 (Wu, H. 等, Microbiol. (2000) 146 :2481-2493 ;Ling, S. H. M. 等, Microbiol. (2000) 146 :7-19 ;Badger, J. L. 等, Mol. Microbiol. (2000) 36 (1) :174-182 ;Kohler, R. 等,Mol. Gen. Genet. (2000) 262 :1060-1069 ;Valdivia, R. H. 等, Gene (1996) 173 :47-52 ;Valdivia, R. H. 等, Science (1997) 277 :2007-2011 ;Scott, K. P. 等,FEMS Microbiol. Ltrs. (2000) 182 :23-27 ;Prachaiyo, P. 等, J. Food Protect. (2000) 63 :427-433 ;Geoffroy, M-C. , Applied & Env. Microbiol. (2000) 66 :383-391))。这种研究的一个例子是通过致病的大肠杆菌 0157H GFP 使肌肉组织的体外感染可见 (Prachaiyo, P. 等,见上文)。另一个方法是通过摘除并固定胃肠道组织检验管饲法 (gavage) 感染后小鼠胃肠道 (Geoffroy, M-C. , 见上文)。在摘除它们的器官后,制作感染了 GFP 转导的迟钝爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*) 的鱼的感染影像 (Ling, S. H. M. 等,见上文)。通过与 GFP 表达连接

来评价与毒性 (virulence) 和其他感染过程相关的基因 (Ling, S. H. M. 等, 见上文 ;Badger, J. L. 等, 见上文 ;Kohler, R. 等, 见上文 ;Valdivia, R. H. 等, 见上文 (1996))。

发明内容

[0011] 本发明提供一种方法来监视能够在含氧量低的肿瘤区域中生长的细菌的靶向 (targeting) 和增殖并评价由这些细菌提供的抗肿瘤活性的成功产生。同时, 治疗的功效可以通过标记和观察肿瘤细胞自身来评价。因此, 本发明提供方法来监视, 并且如果必须的话, 修饰 (modify) 通过这些细菌介导的肿瘤治疗。

[0012] 因此, 一方面, 本发明涉及证实细菌增殖分布的方法, 此增殖限制于并分布在含氧量低的肿瘤体积内, 该方法包括在活对象体内非侵入性地 (noninvasively) 检测包含在给予所述对象的细菌内的荧光蛋白所发射的荧光。

[0013] 另一方面, 本发明涉及监视由细菌产生的抗肿瘤药物产生的方法, 所述产生定位在对象体内的肿瘤的含氧量低的体积中, 通过在活对象体内非侵入性地监测给予对象的细菌所产生的与治疗剂融合的蛋白的荧光而进行。

[0014] 第三方面, 本发明的方法涉及监测利用细菌作为治疗剂和 / 或用输送系统将治疗剂传递至实体瘤的含氧量低的体积的肿瘤治疗的有效性, 该方法包括通过评价用荧光蛋白标记的肿瘤发射出的荧光来检测肿瘤增殖或无增殖和其转移。通过使用不同波长的荧光发射, 可与如前所述的监视治疗途径相结合而进行该方法。

[0015] 本发明还涉及 :

[0016] 1. 监视患有实体瘤的对象的肿瘤治疗的过程的方法, 此方法包括 :

[0017] 观察以时间为函数的所述对象的实体瘤中荧光的存在、不存在或强度, 其中所述对象用表达具有第一种颜色的第一荧光蛋白的细菌进行治疗,

[0018] 其中在所述肿瘤中所述第一荧光蛋白的荧光随时间的分散指示所述治疗的进展。

[0019] 2. 项 1 的方法, 其中所述观察是通过对完整对象的全身荧光视觉肿瘤成像而进行的。

[0020] 3. 项 1 的方法, 其中所述观察是通过内窥镜检查法而进行的。

[0021] 4. 项 1 的方法, 其进一步包括观察所述对象中肿瘤的退化或转移, 所述肿瘤用具有与第一种颜色不同的第二种颜色的第二荧光蛋白来标记。

[0022] 5. 项 4 的方法, 其中所述对象是小鼠、大鼠或兔, 它们已被改进来包含表达所述第二荧光蛋白的肿瘤细胞。

[0023] 6. 项 4 的方法, 其中所述对象是人, 且其中所述对象已被给予用于表达所述第二荧光蛋白的病毒载体。

[0024] 7. 项 6 的方法, 其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。

[0025] 8. 项 1 的方法, 其中所述细菌被修饰来包含用于治疗蛋白的表达系统。

[0026] 9. 项 8 的方法, 其中所述治疗蛋白是作为与荧光蛋白的融合蛋白而产生, 该荧光蛋白与所述第一荧光蛋白的颜色不同。

[0027] 10. 项 4 的方法, 其中所述细菌被修饰以包含用于治疗蛋白的表达系统。

[0028] 11. 项 10 的方法, 其中所述治疗蛋白是作为与具有第三种颜色的第三荧光蛋白的融合蛋白而产生, 该第三种颜色与所述第一种和第二种颜色不同。

- [0029] 12. 监视对对象进行肿瘤治疗的方案的方法,此方法包括 :
- [0030] 随时间推移监视已用细菌进行治疗的对象的实体瘤中所述荧光的存在、不存在或强度,其中对该细菌进行修饰来表达与治疗蛋白融合的具有第一种颜色的第一荧光蛋白;
- [0031] 通过在所述肿瘤中所述第一荧光蛋白的荧光随时间的存在和强度的维持确认了所述治疗蛋白的存在以治疗该肿瘤。
- [0032] 13. 项 12 的方法,其中所述监视是通过对所述完整对象的全身荧光视觉肿瘤成像而进行的。
- [0033] 14. 项 12 的方法,其中所述观察是通过内窥镜检查法进行的。
- [0034] 15. 项 12 的方法,其进一步包括观察所述肿瘤的退化或转移,其中所述肿瘤用具有与第一种颜色不同的第二种颜色的第二荧光蛋白来标记。
- [0035] 16. 项 15 的方法,其中所述对象是小鼠、大鼠或兔,它们已被改进来包含表达所述第二荧光蛋白的肿瘤细胞。
- [0036] 17. 项 15 的方法,其中所述对象是人,且其中已给予所述对象表达所述第二荧光蛋白的病毒载体。
- [0037] 18. 项 12 的方法,其中所述治疗蛋白是酶,且其中该方法进一步包括能由所述酶裂解的前药。
- [0038] 19. 项 12 的方法,其中所述治疗蛋白是蛋氨酸酶。
- [0039] 20. 项 18 的方法,其中所述治疗蛋白是蛋氨酸酶且所述前药是硒代蛋氨酸。
- [0040] 21. 项 12 的方法,其中进一步修饰所述细菌来表达颜色与所述第一种颜色不同的荧光蛋白。
- [0041] 22. 项 15 的方法,其中已经修饰所述细菌来表达具有与所述第一种和第二种颜色不同的第三种颜色的第三荧光蛋白。
- [0042] 发明详述
- [0043] 本发明提供用于监视实体瘤的含氧量低部分的细菌感染的进展的系统。该细菌应当是那些可以在这些肿瘤中缺氧的或基本上缺氧的含氧量低的区域中存活的那些。因此,所述细菌必须是兼性的 (facultative) 或专性的 (obligate) 厌氧菌。兼性厌氧菌例如大肠杆菌是优选的,因为与大部分专性厌氧菌相比它们对与它们接触的对象的毒性较低。利用可见的标记荧光蛋白来标记细菌,以便能够跟踪实体瘤中它们的迁移和定居 (colonization),从而能够控制和评价由这些细菌的治疗剂的定位产生。
- [0044] 因为通过利用荧光蛋白来观察荧光细胞的迁移和完整 (intact) 动物中蛋白的产生能够获得足够的强度,除了测定这些方面外,在完整对象中可以观察肿瘤退化和转移或其抑制的进展,因为所述肿瘤细胞自身能用在不同波长下发荧光的蛋白来标记。
- [0045] 在本发明的各方面中使用的标记是荧光蛋白,即当用合适的波长照射时发出可见光的蛋白。编码这一纲 (class) 中的原始 (seminal) 蛋白、绿色荧光蛋白 (GFP) 的自然基因 (native gene) 克隆自生物发光水母维多利亚多管水母 (*Aequorea victoria*) (Morin, J. 等, *J. Cell Physiol* (1972) 77 :313-318)。基因可得性 (availability) 使利用 GFP 作为基因表达的标记物成为可能。原始 GFP 自身是 283 氨基酸蛋白,分子量为 27kD。为了发荧光,它不需要来自其天然来源的另外的蛋白,也不需要只在其天然来源中存在的底物或辅助因子。(Prasher, D. C. 等, *Gene* (1992) 111 :229-233 ;Yang,

F. 等, Nature Biotechnol (1996) 14 :1252-1256 ;Cody, C. W. 等, Biochemistry (1993) 32 : 1212-1218)。已发现原始 GFP 基因的突变能用来增强表达并改进产品的激发及荧光, 这样已经获得了各种颜色的“GFP”, 包括红色、黄色和蓝色。GFP-S65T(其中在 65 位的丝氨酸被苏氨酸代替) 在本发明的方法中是尤其有用的, 并且在 490nm 有单个的激发峰。(Heim, R. 等, Nature (1995) 373 :663-664) ; 美国专利 5,625,048。Delagrade, S. 等, Biotechnology (1995) 13 :151-154 ;Cormack, B. 等, Gene (1996) 173 :33-38 和 Cramer, A. 等, Nature Biotechnol (1996) 14 :315-319 也公开了其它突变体。在美国专利 5,625,048 中也公开了另外的突变体。

[0046] 通过合适的修改, 可以改变所述 GFP 发出的光的光谱。因此, 虽然由于历史习惯在本申请中经常使用术语“GFP”, 但是在此定义中包括的蛋白不是必须以绿色出现, 且应该简单地指荧光蛋白。不同形式的“GFP”呈现绿色之外的颜色, 这些也被包括在“GFP”的使用中, 并且在本发明的方法和材料中有用。另外, 发现落在本文“GFP”的定义内的绿色荧光蛋白, 已从其它生物 (organism) 分离, 例如肾海鳃 (sea pansy)、肾海鳃 (*Renilla reniformis*)。可用任何颜色的“GFP”的任何合适和方便形式来修饰天然的和突变体形式的在本发明中有用的感染剂。

[0047] 为了避免混淆, 也经常使用简单术语“荧光蛋白”;通常, 其被理解为指由各种生物体产生的荧光蛋白, 例如肾海鳃 (*Renilla*) 和多管水母 (*Aequorea*) 以及这些天然荧光蛋白的修饰形式, 它们在不同的可见颜色下可以发荧光。通常, 术语“荧光蛋白”和“GFP”有时可交换地使用;然而, 有时可以发现特定的其它颜色。该系统是严格记忆的, 从而例如, RFP 指红色荧光蛋白、YFP 指黄色荧光蛋白、BFP 指蓝色荧光蛋白等。这些蛋白发射的可见光的波长范围取决于所作的特定修饰。

[0048] 因为存在多种颜色的荧光蛋白, 可同时做出多于单一颜色的成像。例如, 可以给予所述对象两种不同的细菌剂或三种不同的细菌, 每一个表达特性荧光, 或者单一细菌可以被单一颜色和用于与基因产品产生融合的不同颜色组合 (constitutively) 标记。可将编码与用来标记细菌本身颜色不同的荧光蛋白的核苷酸序列插入将要被生产的蛋白的基因位点或与要生产的治疗蛋白作为载体中的融合蛋白。

[0049] 在本发明的上下文中颜色的多样性是尤其有利的。例如, 肿瘤自身可以用一种颜色的荧光蛋白标记, 给予的细菌用具有不同颜色的结构或细胞内蛋白标记, 从而可以确定所述细菌的定位, 并且细菌的蛋白产品用第三种颜色标记, 这样可以监视这种蛋白产生的水平。因此, 利用活动物的全身观察, 可以测定给予的细菌的定位, 同时监视该细菌产生的治疗蛋白的水平并监视对肿瘤的作用, 所有这些同时进行。

[0050] 在本发明中使用的荧光蛋白有足够的强度, 可以进行对活动物的上述现象的实时观察。这比在现有技术中描述的细菌传送的“盲”途径 (“blind” approach) 有较大的进步。因为该动物是活的, 当由这些观察指示时, 可以有利改进治疗方案来增强其功效。

[0051] 受益于本发明方法的动物对象 (animal subjects) 是一系列受实体瘤影响的动物, 但典型地是脊椎动物, 例如鱼、鸟和哺乳动物, 最典型是哺乳动物。对人类的治疗是尤其关注的, 但是对家畜的治疗, 例如猪、母牛、绵羊、山羊和小鸡、火鸡等, 如同伴侣 (companion) 动物例如狗和猫的治疗一样显然也是有益的。由于所使用的荧光蛋白所发射的荧光强度, 本发明的方法提供对任何这些动物对象提供无侵入性技术的实时观察。

[0052] 如果想对肿瘤进行标记,在美国专利 6251384 和 6235968 中本申请人已经描述了所述肿瘤细胞中荧光蛋白的产生,它们都在这里被引入作为参考。简要地,可以将用于荧光蛋白表达的病毒载体,优选逆转录病毒载体,给予已经患了实体瘤的对象。或者,就实体瘤来说,表达载体可以被瘤内注射。通过向无免疫应答的 (immunocompromised) 或同源动物 (syngeneic animal) 中植入肿瘤来得到模型系统,所述肿瘤由被修饰而含有用于荧光蛋白表达系统的细胞产生。描述了多种方法,它们导致肿瘤自身的标记。

[0053] 关于标记细菌,可以通过直接修饰来将编码荧光蛋白的核苷酸序列引入细菌中,直接修饰例如修饰基因组从而将荧光蛋白编码序列定位在与细菌内源的控制序列下的合适位置,或可以利用合适的表达载体将其引入。选择的细菌在实体瘤的含氧量低的区域中优选选择性地存活和增殖,如果不是完全特异性地的话,留下宿主动物的剩余部分优选基本无细菌 (uninhabited),即使全身给予所述细菌也是如此。优选地,与集中于小菌落相反,所述细菌培养物可以分散于含氧量低的肿瘤体积中。

[0054] 通过原位直接观察,本发明提供测定最有用的细菌宿主的直接方法。因此,通过插入基因组或通过提供表达载体来标记选择的菌株并将菌株给予动物。因此,能直接观察肿瘤中与其它组织相比的增殖方式并且选择具有理想方式的菌株。大量能够在含氧量低的肿瘤体积中增殖的候选物 (candidates) 在本领域是已知的,包括大肠杆菌、沙门氏菌、梭菌 (Clostridium)、乳酸杆菌、双歧杆菌等。在这些系统中用于表达的合适的控制序列目前在本领域也是已知的,或可以使用内源控制序列。

[0055] 在许多情况中,更理想的是修饰所述细菌使其失去产生毒性作用的任何能力。对于专性厌氧菌这是更常见的。如果所述细菌分泌毒素、可能需要缺失或失活产生该毒素的基因;如果所述细菌产生引起不希望的副作用的物质,编码这些物质的基因可以被失活或移除。修饰所述细菌以作为细胞生长和繁殖的常见性质在组成型启动子 (constitutive promoter) 的控制下表达荧光蛋白,或将所述编码序列置于基因组序列的特定理想位置,替代内源序列。

[0056] 除了发挥其自己固有的抗肿瘤作用,所述细菌也可以被修饰来生产治疗剂,例如 IL2 或蛋氨酸酶。在一个实施方案中,治疗蛋白任选作为与荧光蛋白的融合蛋白产生。如果肿瘤和 / 或细菌是被标记的,则融合中所述荧光蛋白的颜色应该是与在其它两种情况中选择的颜色不同的颜色。如上所述,带有荧光蛋白的融合物 (fusions) 的构建物 (construction) 公知为标记物。用于治疗蛋白的表达系统,单独地或是作为与荧光蛋白的融合物,可以被放置在载体上或所述细菌的基因组中,并且控制序列可以是组成型的 (constitutive) 或在许多情况下,是诱导型的 (inducible) 且取决于原位因子或外部提供的转录因子。

[0057] 一种特别优选的治疗蛋白的实施例是蛋氨酸酶,如 PCT 公开 WO00/29589 中所公开的那样,当在细胞内提供时蛋氨酸酶发挥抗肿瘤作用,将上述出版物引入本发明中作为参考,或如美国专利 5690929 和 WO94/11535 所描述,当作为药物提供时蛋氨酸酶发挥抗肿瘤作用,将上述文献引入本发明中作为参考。在这些文献中也公开了蛋氨酸酶的重组产生。

[0058] 除了其对肿瘤的固有作用,也可以使用作为酶的治疗蛋白来从前药中释放毒性的物质。例如, Miki, K. 等, Cancer Research (2001) 61 :6805-6810 描述了利用甲基硒醇 (methyl selenol) 的毒性的研究。该化合物可以通过蛋氨酸酶的作用由硒代蛋氨酸

(selenomethionine) 产生。该文章描述了试验，其中由硒代蛋氨酸产生的甲基硒醇通过重组产生的蛋氨酸酶杀死用此酶的表达系统转化的癌细胞。因此，在硒代蛋氨酸的存在下，蛋氨酸酶的重组产生能被用作癌症治疗。

[0059] 在本发明的一个仅用于说明的实施方案中，修饰细菌例如长双歧杆菌 (*B. longum*) 或诺氏梭菌使它们不能产生任何毒素。修饰该去毒 (detoxicated) 的细菌以包含与荧光蛋白融合的蛋氨酸酶的表达系统。此外，如果需要，修饰该细菌来包含标记细菌本身的荧光蛋白的表达系统。如果蛋氨酸酶基因是组成型表达的，这不是必须的，因为蛋氨酸酶自身的产生会发出细菌存在的信号。然后将修饰的细菌给予患有肿瘤的试验模型对象，例如从人类 MDA-MB-435 乳腺癌细胞形成的肿瘤，其已经用与融合蛋白所用的颜色不同的荧光标记物来标记。或者，肿瘤是固有的 (indigenous)，并用病毒表达载体来标记，如上面引用的美国专利 6,251,384 和 6,235,968 中所述。

[0060] 如果使用细菌细胞，则将细胞直接注射入乳腺癌肿瘤中；如果使用芽孢，也可以使用静脉内注射。直接肿瘤内注射芽孢也是可能的。将合适修饰的细菌以任何实用的方式给予对象。在试验肿瘤模型情况下，为提供模型所述对象可能必须与肿瘤无免疫应答或是同源的，给予所述细菌本身不需要所述对象是无免疫应答的。因此，在对象患固有肿瘤的情况下，免疫抑制不是必须的。在有完整免疫系统的动物中，在含氧量低的肿瘤中容易发生感染。然而，无免疫应答的对象也能用于研究肿瘤被人工引入处的病况的进展。

[0061] 在一个实施方案中，标记蛋氨酸酶产生的标记物发出红色荧光 (RFP)，所述细菌的特征是发出蓝色荧光 (BFP) 且所述肿瘤的特性是发出绿色荧光 (GFP)。

[0062] 此外，如果需要，将硒代蛋氨酸注射入肿瘤中或全身提供。蛋氨酸酶本身的发生和 / 或细菌本身的存在对于肿瘤是有毒性的。释放的甲基硒醇不仅对于细菌驻留的直接区域是有毒性的，而且更广泛地扩散至活肿瘤组织。此治疗的进展可以通过同时显影 RFP、GFP 和 BFP 直接监视。

[0063] 从外面对全身对象作荧光光学肿瘤成像 (FOTI) 允许对于模型系统或患有固有肿瘤的对象在连续基础上进行实时观察并监视感染的进展，并对所述方案进行评估。在被治疗的对象中，FOTI 的存在使得在改进或不改进所述方案的合理性的连续基础上对那些设计的治疗方案进行告知。模型系统用于治疗的起始设计。除了外部 (FOTI) 成像，也可以使用非侵入性内窥镜检查方法。

[0064] 用作模型的合适的对象优选是哺乳动物对象，最优先是方便的试验室动物例如兔、大鼠、小鼠等。至于与人类对象更接近的类似物，也可以使用灵长类。可以使用任何合适的对象，主要根据方便性及与最感兴趣的系统的相似性来选择。

[0065] 下面的实施例是为了说明而不是限制本发明。

[0066] 制备 A

[0067] 厌氧菌的修饰

[0068] 用从 lac 启动子表达的 GFP 将维多利亚多管水母 (*A. victoria*) 绿色荧光蛋白的变体克隆入 pUC19 衍生物 pPD 16.38 (Clontech, Palo Alto, CA) 的 BamHI 和 NotI 位点。所述载体被称作 pAV-GFP。将 pAV-GFP 通过标准方法转染入鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 感受态细胞中，并通过在琼脂板上的氨苄青霉素抗性选择转化细胞。通过荧光显微镜选择高表达的鼠伤寒沙门氏菌 -GFP 克隆。

[0069] 实施例 1

[0070] 用红色荧光蛋白 (RFP) 表达载体转染大肠杆菌，并将其注射入含有用绿色荧光蛋白 (GFP) 标记的肿瘤的裸小鼠。利用 CCD 照相机和 GFP-RFP 滤光器在光盒中通过蓝光激发可使该动物可见；通过红色和绿色光可使所述肿瘤中的细菌生长可见。已用前列腺癌、黑素瘤、肺癌、结肠癌、乳腺癌、肾癌、喉癌、脑癌和胰腺癌试验了其中肿瘤被 GFP 标记的裸小鼠肿瘤模型。

[0071] 实施例 2

[0072] 利用由与 GFP 偶联的蛋氨酸酶组成的融合蛋白的表达系统转染大肠杆菌。将经标记的细菌注射入已被 RFP 标记在裸小鼠中生长的肿瘤。然后通过肿瘤内注射给予小鼠硒代蛋氨酸。利用如实施例 1 中的两种颜色成像来使细菌对肿瘤的靶向可见并追踪所述治疗效果。

[0073] 实施例 3

[0074] 将 GFP- 标记的沙门氏菌注射入裸小鼠中的 RFP- 标记的 U-87 人类神经胶质瘤中。将含有 1×10^8 GFP- 标记的沙门氏菌的 PBS 溶液 ($10 \mu l$) 注射入 RFP- 标记的 U-87 人类神经胶质瘤。立即在注射后以及在注射后一天，如实施例 1 在 RFP- 标记的 U-87 人类神经胶质瘤中成像 GFP- 标记的沙门氏菌。在这两种情况下，可以看见在 RFP 背景上的 GFP，并且一天后其已扩散。

[0075] 实施例 4

[0076] 将 GFP- 标记的沙门氏菌注射入裸小鼠中的 RFP- 标记的 DU-145 人类前列腺肿瘤。在一只小鼠中，将 1×10^8 GFP- 标记的沙门氏菌注射入 RFP- 标记的 DU-145 人类前列腺肿瘤中，并在注射后立即成像。在第二只小鼠中，将 2×10^8 GFP- 标记的沙门氏菌注射入 RFP- 标记的 DU-145 人类前列腺肿瘤中，并如实施例 1 在注射后立即成像。在这两种情况下，可以看见在 RFP 背景上的 GFP。

[0077] 实施例 5

[0078] 将 GFP- 标记的沙门氏菌注射入裸小鼠中的 RFP- 标记的 MDA MB-435 人类乳腺肿瘤。将含有 2×10^8 GFP- 标记的沙门氏菌的缓冲液注射入 RFP- 标记的 MDA MB-435 人类乳腺肿瘤中，并如实施例 1 在注射后立即成像。可以看见在 RFP 背景上的 GFP。

[0079] 实施例 6

[0080] RFP- 标记的沙门氏菌能够在裸小鼠中的 GFP- 标记的 PC-3 人类前列腺肿瘤中生长。将含有 3×10^8 RFP- 标记的沙门氏菌的缓冲液注射入 GFP- 标记的 PC-3 人类前列腺肿瘤中，并且立即在注射后以及在注射后一天如实施例 1 成像。在所有成像中可以看见在 RFP 背景上的 GFP，并随时间扩散。

[0081] 实施例 7

[0082] 在第二个试验中，RFP- 标记的沙门氏菌能够在裸小鼠中的 GFP- 标记的 PC-3 人类前列腺肿瘤中生长。将含有 2×10^8 RFP- 标记的沙门氏菌的缓冲液注射入 GFP- 标记的 PC-3 人类前列腺肿瘤中，并且立即在注射后、在注射后一天及注射后四天如实施例 1 成像。在所有成像中可以看见在 RFP 背景上的 GFP。

[0083] 实施例 8

[0084] 通过组织学也证明了在裸小鼠中生长的 GFP- 标记的 PC-3 人类前列腺肿瘤中的

RFP- 标记的沙门氏菌的靶向和逐渐地生长。在注射后四天获得了含在 GFP- 标记的 PC-3 人类前列腺肿瘤中生长的沙门氏菌的 RFP- 标记的组织。用 10% 缓冲的福尔马林固定所述肿瘤组织且加工成石蜡切片并标准方法作 HE 染色。可以看见所述 RFP- 标记的沙门氏菌在 PC-3 肿瘤组织中逐渐生长并靶向肿瘤细胞。

[0085] 实施例 9

[0086] 在第二个试验中,通过组织学证明了在裸小鼠中 RFP- 标记的沙门氏菌在 PC-3 人类前列腺肿瘤上生长。如实施例 8 获得切片。在注射后四天可以看见 RFP- 标记的沙门氏菌在 GFP- 标记的 PC-3 人类前列腺肿瘤上生长。在未治疗对照中,肿瘤结构保持良好。在用 RFP- 标记的沙门氏菌治疗后,肿瘤组织的大部分被毁坏并且在肿瘤中有广泛的坏死。

[0087] 实施例 10

[0088] 将含有表达 RFP 的 10^9 大肠杆菌的缓冲液注射入用 GFP 标记且在裸小鼠中皮下生长两星期的 PC-3 中。如实施例 1 获得图像。在 PC-3-GFP 肿瘤中可以看见大肠杆菌 -RFP 至少 17 天。

专利名称(译)	监视细菌肿瘤治疗的系统		
公开(公告)号	CN101869716B	公开(公告)日	2013-12-11
申请号	CN201010218234.5	申请日	2002-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	抗癌公司		
申请(专利权)人(译)	抗癌公司		
当前申请(专利权)人(译)	抗癌公司		
[标]发明人	赵明 李小明 杨萌 徐明旭 姜平 李玲娜		
发明人	赵明 李小明 杨萌 徐明旭 姜平 李玲娜		
IPC分类号	A61K49/00 G01N33/68 G01N21/64 C12Q1/37 A61B A61B1/00 A61K31/198 A61K38/00 A61K38/43 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C12Q1/00 G01N21/00 G01N21/75 G01N21/76 G01N33/00 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/554 G01N33/569 G01N33/574		
CPC分类号	A61K49/0008 A61K49/0047 A61K49/0045 A61K49/0097 A61P35/00 A61P43/00		
代理人(译)	罗天乐		
优先权	60/345699 2001-12-31 US		
其他公开文献	CN101869716A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及监视细菌肿瘤治疗的系统，更具体地，本发明涉及使用已被改进来表达荧光蛋白的细菌跟踪受试者肿瘤治疗进展的方法。该方法也可以监视与在治疗过程中产生治疗物质的细菌有关的基因的表达，可选地在由肿瘤自身产生的荧光背景上。该方法使得活体对象的治疗进展可视，从而可以按照其功效改进疗法。