

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780031190.1

A61K 35/74 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年8月12日

[11] 公开号 CN 101505768A

[22] 申请日 2007.6.20

[21] 申请号 200780031190.1

[30] 优先权

[32] 2006.6.23 [33] US [31] 60/815,883

[32] 2007.3.30 [33] US [31] 60/909,078

[86] 国际申请 PCT/IB2007/003489 2007.6.20

[87] 国际公布 WO2008/012695 英 2008.1.31

[85] 进入国家阶段日期 2009.2.23

[71] 申请人 因詹尼克分子递送控股有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

[72] 发明人 希曼休·布兰巴特

珍妮弗·麦克迪尔米德

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

代理人 温旭 郝传鑫

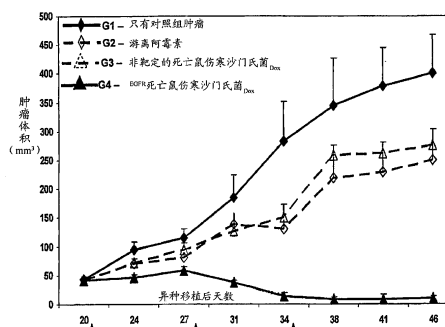
权利要求书6页 说明书63页 附图3页

[54] 发明名称

通过完整的死亡细菌细胞将药物、治疗性核酸和功能核酸靶向递送至哺乳动物细胞

[57] 摘要

一种用于靶向递送至哺乳动物细胞的组合物，其包含完整的死亡细菌细胞，所述细胞含有治疗性核酸、药物或功能性核酸。所述靶向递送任选地使用双特异性配体，该配体包含具有对死亡细菌细胞表面结构特异性的第一个臂和具有对哺乳动物细胞表面受体特异性的第二个臂，以将死亡细菌细胞靶定至特定的哺乳动物细胞，并使哺乳动物细胞内吞所述死亡细菌细胞。或者，所述递送方法使用噬菌性哺乳动物细胞的天然能力来吞噬死亡细菌细胞，而不需要使用双特异性配体。



1. 一种组合物，其包括：(i) 多个完整的死亡细菌细胞，其中的每个死亡细菌细胞包含治疗性核酸、药物或功能性核酸；和(ii) 用于所述细胞的药学上可接受的载体。

2. 根据权利要求1的组合物，其中所述死亡细菌细胞含有功能性核酸。

3. 根据权利要求2的组合物，其中所述功能性核酸不含质粒。

4. 根据权利要求3的组合物，其中所述功能性核酸是调节性RNA。

5. 根据权利要求1的组合物，其中所述组合物本质上不含内毒素。

6. 根据权利要求1的组合物，其中所述死亡细菌细胞含有药物。

7. 根据权利要求2的组合物，其中所述功能性核酸靶定有助于抗药性、凋亡抗性或瘤生成的蛋白质的转录。

8. 根据权利要求7的组合物，其中所述功能性核酸是靶定有助于抗药性的蛋白质的转录的siRNA、shRNA或miRNA。

9. 根据权利要求7的组合物，其中所述功能性核酸是靶定有助于抗药性的蛋白质的转录的反义分子。

10. 根据权利要求7的组合物，其中所述功能性核酸是靶定有助于抗药性的蛋白质的转录的核酶。

11. 根据权利要求7的组合物，其中所述功能性核酸靶定P-糖蛋白、MDR-2或MDR-3的转录。

12. 根据权利要求7的组合物，其中所述功能性核酸靶定MRP2、BCR-ABL、STI-571耐药相关蛋白、肺耐药相关蛋白、环氧合酶-2、核因子 κ 、XRCC1、ERCC1、GSTP1、突变的 β -微管蛋白或生长因子的转录。

13. 根据权利要求7的组合物，其中所述功能性核酸靶定有助于凋亡抗性的蛋白质的转录。

14. 根据权利要求13的组合物，其中所述功能性核酸靶定Bcl-2、Bcl-X_L、A1/Bfl 1、粘着斑激酶或p53蛋白的转录。

15. 根据权利要求7的组合物，其中所述功能性核酸靶定有助于瘤生成的蛋白质的转录。

16. 根据权利要求15的组合物，其中所述功能性核酸靶定 β -联蛋白、

PKC- α 、C-RAF、K-Ras、DP97 Dead盒RNA解旋酶、DNMT1、FLIP、C-Sfc、53BPI、聚梳族蛋白EZH2、ErbB1、HPV-16 E5和E7、Fortilin和MCI1P、DIP13 α 、MBD2、p21、KLF4、tpt/TCTP、SPK1和SPK2、P300、PLK1、Trp53、Ras、ErbB1、VEGF或BAG-1的转录。

17. 根据权利要求7的组合物，其还包含药物。

18. 根据权利要求17的组合物，其中所述功能性核酸靶定有助于对所述药物有抗性的蛋白质的转录。

19. 根据权利要求18的组合物，其中所述药物被包裹在死亡细菌细胞中。

20. 根据权利要求18的组合物，其中所述功能性核酸和所述药物被包裹在相同的死亡细菌细胞中。

21. 根据权利要求1的组合物，其中所述治疗性核酸序列编码自杀基因。

22. 根据权利要求1的组合物，其中所述治疗性核酸编码下述基因的正链副本，该基因表达功能异常或在所述哺乳动物细胞中以异常水平存在的蛋白质。

23. 根据权利要求1的组合物，其中所述治疗性核酸被包含在质粒上，所述质粒由多个核酸序列组成。

24. 根据权利要求23的组合物，其中所述质粒包含调节元件。

25. 根据权利要求24的组合物，其中所述质粒包含报道元件。

26. 根据权利要求1的组合物，其还包含双特异性配体。

27. 权利要求26的组合物，其中所述双特异性配体包含抗体或抗体片段。

28. 权利要求26的组合物，其中所述双特异性配体包含多肽或碳水化合物。

29. 根据权利要求26的组合物，其中所述双特异性配体包含第一个臂和第二个臂，所述第一个臂具有对细菌细胞表面结构的特异性，所述第二个臂具有对非噬菌性哺乳动物细胞表面受体的特异性。

30. 权利要求29的组合物，其中所述哺乳动物细胞表面受体能够活化所述死亡细菌细胞的受体介导的内吞作用。

31. 根据权利要求29的组合物，其中所述细菌细胞表面结构是在所述死亡细菌细胞表面上的脂多糖的O-多糖成分。

32. 权利要求29的组合物，其中所述第一个臂和所述第二个臂是单特异

性的。

33. 权利要求29的组合物,其中所述第一个臂和所述第二个臂是多价的。

34. 一种组合物,其本质上由死亡细菌细胞组成,所述死亡细菌细胞含有治疗性核酸、药物或功能性核酸。

35. 一种核酸递送方法,其包括将含有由第一种核酸序列组成的质粒的死亡细菌细胞与具有吞噬作用或内吞作用的哺乳动物细胞接触,使得所述死亡细菌细胞被所述哺乳动物细胞吞噬,因而所述哺乳动物细胞产生所述第一种核酸序列的表达产物。

36. 根据权利要求35的方法,其中所述哺乳动物细胞是在体内的,而所述第一种核酸序列编码治疗性表达产物。

37. 一种核酸递送方法,其包括将双特异性配体与(a)含有治疗性核酸序列的死亡细菌细胞和(b)非噬菌性哺乳动物细胞接触,使得(i)所述双特异性配体使所述死亡细菌细胞结合至所述哺乳动物细胞和(ii)所述死亡细菌细胞被所述哺乳动物细胞吞噬,所述哺乳动物细胞产生所述治疗性核酸序列的表达产物。

38. 根据权利要求37的方法,其中所述哺乳动物细胞在体外。

39. 根据权利要求37的方法,其中所述哺乳动物细胞在体内。

40. 一种靶向药物递送方法,其包括将双特异性配体与(a)含有药物分子的死亡细菌细胞和(b)靶标哺乳动物细胞接触,使得(i)所述双特异性配体使所述死亡细菌细胞结合至所述哺乳动物细胞,(ii)所述死亡细菌细胞被所述哺乳动物细胞吞噬,和(iii)所述药物被释放进入所述哺乳动物细胞的细胞质。

41. 根据权利要求40的方法,其中所述靶标哺乳动物细胞是非噬菌性细胞。

42. 根据权利要求40的方法,其中所述药物是化疗制剂。

43. 根据权利要求40的方法,其中所述哺乳动物细胞在体外。

44. 根据权利要求40的方法,其中所述哺乳动物细胞在体内。

45. 根据权利要求40的方法,其中所述药物被编码在所述死亡细菌细胞内的质粒上。

46. 根据权利要求45的方法,其中所述质粒包含调节元件。

47. 根据权利要求45的方法，其中所述质粒包含报道元件。

48. 一种药物递送方法，其包括将含有药物的死亡细菌细胞与具有吞噬作用或内吞作用的哺乳动物细胞接触，使得所述死亡细菌细胞被所述哺乳动物细胞吞噬，且所述药物被释放进入所述哺乳动物细胞的细胞质。

49. 根据权利要求48的方法，其中所述药物是化疗制剂。

50. 根据权利要求48的方法，其中所述哺乳动物细胞在体外。

51. 根据权利要求48的方法，其中所述哺乳动物细胞在体内。

52. 根据权利要求48的方法，其中所述药物被编码在所述死亡细菌细胞的质粒上。

53. 根据权利要求52的方法，其中所述质粒包含调节元件。

54. 根据权利要求52的方法，其中所述质粒包含报道元件。

55. 一种递送功能性核酸的方法，其包括：(a) 在药物载体中提供多个死亡细菌细胞，所述多个死亡细菌细胞中的每一个均包含(i) 功能性核酸或(ii) 包含编码功能性核酸的片段的质粒；随后，(b) 将所述多个死亡细菌细胞与靶标哺乳动物细胞接触，使得所述哺乳动物细胞吞噬所述死亡细菌细胞，因而所述功能性核酸被释放进入靶细胞的细胞质。

56. 根据权利要求55的方法，其中所述功能性核酸不含质粒。

57. 根据权利要求56的方法，其中所述功能性核酸是调节性RNA。

58. 根据权利要求55的方法，其中所述功能性核酸由所述靶细胞表达。

59. 根据权利要求55的方法，其中所述死亡细菌细胞含有包含调节元件的质粒，所述调节元件可操作地连接至所述片段。

60. 根据权利要求59的方法，其中所述调节元件是依赖于RNA聚合酶的启动子。

61. 根据权利要求60的方法，其中所述启动子是RNA III聚合酶启动子H1或U6。

62. 根据权利要求55的方法，其中所述死亡细菌细胞与所述哺乳动物细胞之间的接触发生在体外。

63. 根据权利要求55的方法，其中所述死亡细菌细胞与所述哺乳动物细胞之间的接触发生在体内。

64. 根据权利要求55的方法，其中所述质粒编码多功能核酸。

65. 根据权利要求64的方法，其中所述质粒还包含用于每个被编码的功能性核酸的启动子。

66. 根据权利要求55的方法，其还包括步骤(c)：将药物递送至所述靶哺乳动物细胞。

67. 根据权利要求66的方法，其中所述功能性核酸靶定有助于所述药物耐药性的蛋白质的转录。

68. 根据权利要求66的方法，其中所述药物被包裹在死亡细菌细胞中。

69. 根据权利要求68的方法，其中所述功能性核酸或质粒，和所述药物被包裹在相同的死亡细菌细胞内。

70. 根据权利要求55的方法，其中所述死亡细菌细胞和所述靶标哺乳动物细胞之间的接触由双特异性配体促成。

71. 一种将药物加入死亡细菌细胞的方法，其包括在含有死亡细菌细胞的胞外介质与死亡细菌细胞细胞质之间造成所述药物的浓度梯度的步骤，使得所述药物沿着所述浓度梯度移动进入所述死亡细菌细胞的细胞质。

72. 一种将药物加入死亡细菌细胞的方法，其包括以下步骤：

(a) 在使细菌细胞转录并翻译编码所述药物的治疗性核酸的条件下培养细菌细胞，使得所述药物释放进入所述细菌细胞的细胞质，随后

(b) 杀死所述细菌细胞以形成在它们的细胞质中含有所述药物的一个或多个死亡细菌细胞。

73. 死亡细菌细胞和双特异性配体在制备药物中的应用，所述死亡细菌细胞含有治疗性核酸、药物或功能性核酸，且所述双特异性配体能够结合至所述死亡细菌细胞和靶标非噬菌性哺乳动物细胞，所述药物用于通过向细胞、组织或器官给予所述药物来治疗疾病或修饰遗传特征的方法中。

74. 一种纯化完整的死亡细菌细胞的方法，其包括(i)杀死活细菌细胞，(ii)进行过滤以将死亡细菌细胞与污染物分开，和(iii)将所述死亡细菌细胞与游离的内毒素分开。

75. 根据权利要求74的方法，其中所述杀死是利用抗生素进行的。

76. 根据权利要求74的方法，其中所述过滤包括交叉流过滤。

77. 根据权利要求74的方法，其中所述过滤包括死端过滤。

78. 根据权利要求74的方法，其中所述分开包括内毒素基于抗体的整合

作用。

79. 根据权利要求78的方法，其中所述过滤使用约0.2 μm 的过滤器孔眼尺寸。

80. 一种制备权利要求3的组合物的死亡细菌细胞的方法，其包括将多个完整的死亡细菌细胞与功能性核酸在缓冲液中共培养。

81. 权利要求80的方法，其中所述共培养包括温和的摇动。

82. 权利要求80的方法，其中所述共培养持续约0.5小时。

83. 权利要求80的方法，其中所述共培养持续约1个小时。

84. 权利要求80的方法，其中所述缓冲液包含缓冲液盐。

85. 权利要求84的方法，其中所述缓冲液盐为凝胶形式。

86. 权利要求80的方法，其中所述缓冲液包含1 \times 磷酸缓冲液。

87. 权利要求80的方法，其中所述共培养在约4 $^{\circ}\text{C}$ 至约37 $^{\circ}\text{C}$ 的温度进行。

88. 权利要求80的方法，其中所述共培养在约20 $^{\circ}\text{C}$ 至约30 $^{\circ}\text{C}$ 的温度进行。

89. 权利要求80的方法，其中所述共培养在约25 $^{\circ}\text{C}$ 的温度进行。

90. 权利要求80的方法，其中所述共培养在约37 $^{\circ}\text{C}$ 的温度进行。

91. 权利要求80的方法，其中所述共培养包含约 10^{10} 个死亡细菌细胞。

92. 权利要求80的方法，其中所述共培养包含约 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 或 10^{13} 个死亡细菌细胞。

93. 权利要求80的方法，其中所述共培养包含约 10^{10} 个死亡细菌细胞。

94. 根据权利要求80的方法，其中所述功能性核酸不含质粒。

95. 根据权利要求94的方法，其中所述功能性核酸是调节性RNA。

96. 根据权利要求94的方法，其中所述功能性核酸是DNA。

97. 权利要求3的方法，其中所述功能性核酸是DNA。

98. 权利要求56的方法，其中所述功能性核酸是DNA。

通过完整的死亡细菌细胞将药物、治疗性核酸和功能性核酸 靶向递送至哺乳动物细胞

相关申请的交叉引用

本申请要求2006年6月23日提交的美国临时专利申请第60/815,883号和2007年3月30日提交的美国临时专利申请第60/909,078号的优先权利益，据此通过引用将这两件申请合并至本文中。

发明背景

本发明涉及通过完整的死亡细菌细胞将包括治疗性核酸、功能性核酸、药物、肽、蛋白质、碳水化合物、脂质的生物活性分子靶向递送至哺乳动物宿主细胞。

许多障碍不断阻碍着生物活性分子向哺乳动物细胞（例如癌细胞）的靶向递送，特别是在体内的靶向递送。这些障碍包括（a）递送载体的组成、功能特性和稳定性；（b）包裹治疗有效浓度的生物活性分子；（c）靶定所需的体内患病细胞；（d）克服一系列细胞内屏障并成功地将治疗浓度的生物活性分子递送至细胞内的靶标；（e）避开可在载体到达靶标之前将其破坏的许多宿主免疫元件，例如抗体、补体和巨噬细胞；（f）穿过血管壁的内皮屏障，特别是在瘤块位置；（g）迁移通过几层细胞到达靶标（例如，已知实体瘤是含有肿瘤细胞和正常细胞的组织结构；因此载体必须穿过几层正常细胞来到达恶性细胞）；（h）迁移通过填充细胞间空间因而阻碍载体的运输的、由糖蛋白、硫酸糖胺聚糖、乙酰透明质酸、蛋白多糖和胶原质组成的细胞外基质（ECM）；和（i）解决在肿瘤微环境中的高间质高压（血管外增加的流体静力压力）问题，高间质高压可限制生物活性分子的进入。

已经提出许多不同的载体用于核酸和药物的递送，包括病毒载体、非病毒非活载体和非病毒活载体。非病毒非活载体适合于核酸和药物的递送。其余两种载体适合于核酸的递送。非病毒活载体主要被开发出直接的肿瘤细胞杀伤能力。虽然所有这些载体都有优点，但它们也有缺点。

病毒载体已被开发用于基因递送,例如逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒和慢病毒。但是如果不感染正常组织,病毒载体就不能系统地和特异性地将基因递送至原代肿瘤细胞和/或转移的肿瘤细胞(Akporiaye和Hersh, 1999; Biederer等, 2002; Green & Seymour, 2002)。另外,病毒粒子在细胞外间隙内极有限的扩散性显著地阻碍了病毒载体的传播。而且,由于病毒具有抗原性,因而会引起宿主的免疫应答。这种免疫应答包括特异性获得性应答和非特异性先天性应答(Chen等,2003;Ferrari等,2003;Wakimoto等,2003)。后者在消除腺病毒载体(Liu和Muruve,2003)和HSV(Wakimoto等,2003)中起重要作用。

非病毒非活载体的例子有阳离子聚合物(多聚物复合物(polyplexes))、阳离子脂质(脂质体、脂质体复合物(lipoplexes))和合成纳米粒子(纳米复合物)(nanoplexes)。这些物质比病毒载体功能更多,由于它们的分子组成可被控制、制造和分析这种载体非常容易、它们可容纳许多转基因尺寸(Kreiss等,1999; de Jong等,2001)以及免疫原性较小(Whitmore等,1999,2001; Dow等,1999;Ruiz等,2001),因此能提供几种不同的优点。但是,用非病毒非活载体进行基因递送的效率显著低于病毒载体。至少需要 10^6 个质粒拷贝来转染单个细胞,其中实际上约有 10^2 - 10^4 个拷贝使基因到达细胞核从而进行转基因表达(Feigner和Ringold,1989; James和Giorgio,2000;Tachibana等,2002)。这种低效率可归因于非病毒非活载体不能克服在给药位置与靶细胞核内定位之间遇到的许多障碍,包括(a)DNA及其递送载体在细胞外间隙中的物理稳定性和化学稳定性;(b)通过内吞作用进行的细胞摄取;(c)在运输到溶酶体和胞浆运输之前脱离内体区室(endosomal compartment);以及(d)用于转录的质粒的核定位。除了这些物理和化学的障碍之外,还存在生物学障碍,例如对载体自身的免疫源性应答和由具有中间去甲基化的CpG模体的特定DNA序列引起的免疫刺激(Yew等,1999;Scheule,2000;Ruiz等,2001)。

作为非生活核酸/药物递送载体的替代物,活细菌载体也被开发用于肿瘤靶向治疗(Pawalek等,2003;Soghomonyan等,2005)。这些载体没有携带核酸或药物的负载物(payload),但是优先在肿瘤细胞中累积,在细胞内复制并杀死受感染的细胞(Pawalek等,1997)。这种现象被认为是由将细菌蛋白直接引入哺乳动物细胞的复杂的细菌系统促成的,其能够导致诱导细胞凋亡(Chen

等,1996; Monack等,1996;Zhou等,2000)。最近,正在研究将双歧杆菌(Yazawa等,2000; 2001;Li等,2003)、梭菌(Minton等,1995;Fox等,1996;Lemmon等,1997;Theys等,2001;Dang等,2001;Nuyts等,2002a;2002b;Liu等,2002)、沙门氏菌(Pawelek等,1997;Low等,1999;Platt等,2000;Luo等,2001;Rosenberg等,2002)和弧菌(Yu等,2004)作为肿瘤选择性活细菌载体。

活减毒细菌也已被开发用作递送可编码血管原性抑制因子(Lee等,2005a; 2005b;Li等,2003)、药物前体转化酶(King等,2002)或细胞因子(Yamada等,2000)的核酸的载体(Paglia等,2000;Weiss和Chakraborty 2001;Yuhua等,2001)。该方法的重大缺点包括(a)活重组细菌在体内逐渐丢失质粒DNA,这主要由于选择压力的缺失以及相关的质粒分离;(b)携带质粒DNA的细菌相比于不含质粒的细菌趋向具有较低的生长速度,并显得在较低水平累积,且在肿瘤内的停留时间较短;(c)活的革兰氏阴性细菌载体可在哺乳动物宿主内导致严重的内毒素反应,这可能是由于体内内毒素(脂多糖,LPS)的脱落造成的,并且可由于细胞侵入而引起Toll样受体反应;(d)大多数肿瘤靶向性活细菌蓄积并生长在肿瘤中坏死的和含氧量较低的病灶集中点内,而不是在成长小瘤的边缘上的含氧量较高的肿瘤内,在那里肿瘤细胞通常生长最迅速;(e)与这些细菌有可能恢复成有毒表型相关的风险是主要考虑的问题(Dunham,2002);以及(f)感染正常细胞的风险可能导致菌血症及相关的败血性休克。后者可能尤其对免疫受损病人(例如晚期癌症患者)来说是一个难题。

特别是由于各种问题不断妨碍着癌症治疗的成功,因此迫切需要一种靶向递送策略,其选择性地将生物活性剂递送至肿瘤细胞和靶器官,或者保护正常组织不被服用抗肿瘤剂。这种策略将通过增加抗癌剂的治疗指数来改善治疗功效,同时使治疗相关毒性的风险最小化。

本发明提供一种多功能递送载体,其用于改良的药物、治疗性核酸和功能性核酸递送策略,特别是但并非唯一地用于癌症化疗的情况中。

发明内容

为满足上述及其他需要,本发明一方面提供一种包含多个完整的死亡细菌细胞和药学上可接受的载体的组合物。死亡细菌细胞包含治疗性核酸、药

物或功能性核酸。对于后者，在一种实施方案中，功能性核酸不含质粒。在这点上，通过穿过细菌细胞的完整的细胞膜，功能性核酸被直接包裹进入死亡细菌细胞中，而不需要使用以质粒为基础的表达载体或宿主细胞的表达系统。这种不含质粒的功能性核酸的例子有：单链、双链或多链DNA或RNA。在一种实施方式中，死亡细菌细胞包含无质粒的功能性核酸，即调节性RNA。在优选的实施方式中，该组合物本质上不含内毒素。

本发明还提供了用于将死亡细菌细胞靶定至哺乳动物宿主细胞的双特异性配体。双特异性配体可以是多肽、碳水化合物或糖肽，且可包含抗体或抗体片段。在优选的实施方式中，所述双特异性配体具有第一个臂和第二个臂，所述第一个臂具有对细菌表面结构的特异性，所述第二个臂具有对哺乳动物细胞表面结构的特异性。此外，所述双特异性配体的第一个臂和第二个臂可以是单特异性的或多价的。所期望的用于配体结合的细菌表面结构为脂多糖（LPS）的O-多糖成分。所期望的用于配体结合的哺乳动物细胞表面结构为受体，优选为能够活化受体介导的内吞作用的受体。

根据另一方面，本发明提供一种递送方法，该方法包括将多个死亡细菌细胞与具有吞噬功能或内吞功能的哺乳动物细胞接触，使得所述死亡细菌细胞被哺乳动物细胞吞噬并在细胞内释放它们的负载物。所述负载物可包含治疗性核酸、功能性核酸或药物。

在一种实施方式中，递送功能性核酸的方法包括：（a）在药物载体中提供多个死亡细菌细胞，每个死亡细菌细胞都包含（i）功能性核酸或（ii）含有编码功能性核酸的片段的质粒，然后（b）将多个所述死亡细菌细胞与靶标哺乳动物细胞接触，使得所述哺乳动物细胞吞噬所述死亡细菌细胞，从而将所述功能性核酸释放至靶细胞的细胞质中。一方面，死亡细菌细胞不含质粒，而另一方面，功能性核酸为调节性RNA。

根据另一方面，本发明提供一种靶向递送方法，该方法包括将双特异性配体与（i）含有所需负载物的完整的死亡细菌细胞和（ii）哺乳动物细胞（优选为非噬菌性哺乳动物细胞）接触。该双特异性配体对完整的死亡细菌细胞上的表面成分和哺乳动物细胞上的表面成分（例如受体）都具有特异性。因此，所述配体使死亡细菌细胞结合至哺乳动物细胞，所述死亡细菌细胞被哺乳动物细胞吞噬，而包含在死亡细菌细胞中的负载物被释放至哺乳动物细胞

的细胞质中。所述负载物可包含治疗性核酸、功能性核酸或药物。

在又一方面，本发明提供一种克服抗药性或凋亡抗性并通过将功能性核酸递送至靶细胞来治疗体内恶性肿瘤的方法。该方法包括：将含有(i)功能性核酸分子或(ii)含有编码功能性核酸分子的片段的质粒与靶标哺乳动物细胞接触。所述哺乳动物细胞吞噬死亡细菌细胞，所述功能性核酸被释放到细胞质中、被运输至细胞核并被靶细胞表达。

在本发明中，死亡细菌细胞与哺乳动物细胞间的接触可以在体内或体外。

本发明还提供将药物加入死亡细菌细胞的方法。一种这样的方法包括在含有死亡细菌细胞的细胞外介质和死亡细菌细胞的细胞质之间形成所述药物的浓度梯度。药物沿此浓度梯度自然移动，进入死亡细菌细胞的细胞质。因为细菌细胞的代谢失活，因而防止了药物从细菌的细胞质泄漏。

另一种将药物加入死亡细菌细胞的方法包括在各种环境下培养细菌细胞，培养的细菌细胞转录并翻译编码药物的治疗性核酸，使得药物被释放进入细菌细胞的细胞质，随后杀死所述细菌细胞以形成一个或多个在其细胞质中含有所述药物的死亡细菌细胞。

根据另一方面，本发明提供用不含质粒的功能性核酸制备死亡细菌细胞的方法。该方法包括在缓冲液中将多个死亡细菌细胞与功能性核酸(例如调节性RNA)共培养，所述调节性RNA例如siRNA、miRNA或shRNA。在某些实施方式中，所述共培养可包括温和的摇动，而在其他实施方式中所述共培养是静止的。在某些方面，所述共培养持续约半小时，而在其他方面其持续约一小时。在一种实施方式中，所述缓冲液包含缓冲液盐，例如1×磷酸盐缓冲液。在另一种实施方式中，所述共培养在约4℃至约37℃、约20℃至约30℃、约25℃或约37℃的温度下进行。所述共培养可包含约 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 或 10^{13} 个死亡细菌细胞。

本发明提供完整的死亡细菌细胞和双特异性配体在制备药物中的应用，用于通过向细胞、组织或器官给予所述药物来治疗疾病或修饰遗传特征的方法中。在该药物中，死亡细菌细胞包含治疗性核酸分子、药物或功能性核酸分子，以及非必需地，能够结合至所述死亡细菌细胞和靶定非噬菌性哺乳动物细胞的双特异性配体。这种药物可用来通过增加所需蛋白质的表达或功

能，或通过抑制靶蛋白质的表达或功能来治疗各种身体不适和疾病。这种身体不适和疾病的例子有癌症和获得性疾病，例如AIDS、肺炎、肺气肿和肺结核。或者，所述治疗可影响遗传特征，例如生育能力或与过敏原或传染性病原体有关的免疫应答。

本发明还提供一种用于纯化完整的死亡细菌细胞的药学上可接受的方法。该方法包括 (i) 用抗生素杀死活细菌细胞，(ii) 通过交叉流过滤和/或死端过滤以除去游离的内毒素、细胞碎片、游离的核酸、细菌膜泡 (membrane bleb)、培养基污染物，和 (iii) 基于抗体的螯合作用以除去残留的游离内毒素。

附图说明

图1显示通过靶定有双特异性抗体的、包裹有化疗药物的完整的死亡细菌细胞产生的非常显著的抗肿瘤作用。在Balb/c无胸腺小鼠的皮下 (肩胛之间) 建立人乳腺癌 (MDA-MB-468) 异种移植物，并且当肿瘤体积达到 $\sim 70 \text{ mm}^3$ 时，使用游离阿霉素 (G2)、或包裹有阿霉素的非靶定的完整死亡鼠伤寒沙门氏菌细胞 (G3)、或包裹有阿霉素的EGFR靶定的完整死亡鼠伤寒沙门氏菌细胞 (G4)，静脉注射 (体内) 处理小鼠 (n =每组11只小鼠)。G1小鼠是对照并接受无菌生理盐水 (体内)。在x-轴上用三角形标记的那天进行所述处理，测得的肿瘤体积显示在y轴上。结果显示，当^{EGFR}死亡鼠伤寒沙门氏菌_{Dox} (G4) 被用作治疗手段时具有非常显著的抗肿瘤作用，而G2和G3小鼠未显示出抗肿瘤作用。每个测量都显示标准偏差。

图2图示了包裹有紫杉醇或siRNA的完整的死亡细菌细胞抑制人结肠癌细胞 (HCT116) 肿瘤在体内的生长。

图3显示通过使用双重治疗方案对在鼠载人结肠癌 (Caco-2) 异种移植物中的抗药性的逆转，其中第一种治疗包括包裹有EGFR的、携带抗MDR-1 shRNA的死亡鼠伤寒沙门氏菌，而第二种治疗包括包裹有EGFR的、携带伊立替康 (Irinotecan) 或5-氟尿嘧啶 (5-FU) 的死亡鼠伤寒沙门氏菌。第一种治疗和第二种治疗分别由x-轴下方的三角形和箭头显示。

具体实施方式

本发明的发明人已确定，完整的死亡细菌细胞是在体内和体外将治疗性核酸、功能性核酸和药物靶向递送至患病细胞（特别是癌细胞）的有效载体。许多惊人的发现奠定了上述确定内容的基础。

例如，发明人发现，当将包含（a）含有治疗性核酸、药物或功能性核酸负载物的完整的死亡细菌细胞（b）双特异性靶向配体，和（c）将药学上可接受的载体的组合物接触体内或体外的患病细胞，完整的死亡细菌细胞载体以高效率被内吞进入靶标非噬菌性哺乳动物细胞。此发现是惊人的，因为尽管双特异性配体已被用来将病毒递送载体和非病毒递送载体靶定至非噬菌性哺乳动物细胞（Wickham等,1996;Nettelbeck等,2001;Boucher等,2003;Ogris&Wagner,2002），但认为受体介导的内吞作用不会对与细菌细胞一样大的微粒起作用。

例如，腺病毒载体已被改用来靶定哺乳动物细胞表面受体，例如内皮细胞上的内皮糖蛋白（endoglin），并通过在哺乳动物细胞质膜中的披网格蛋白小窝被内化。Wickham等,1996;Nettelbeck等,2001;Boucher等,2003。披网格蛋白小窝类似杯子，其包住载体，但杯子的尺寸被认为是限制因素。因为网格蛋白包被的尺寸的原因，披网格蛋白小窝具有85-110 nm的有限尺寸。Swanson & Watts,1995。相反，细菌细胞的直径至少为400 nm，长度至少为1000 nm。因此，并不预期这种靶向方法也能用于死亡细菌细胞。

有关其他大载体的知识证明了死亡细菌细胞不会通过披网格蛋白小窝被内化的预期。例如，大的脂质体复合物（大至500 nm的非病毒载体）优先通过受体非依赖性和网格蛋白非依赖性内吞作用进入细胞，而较小的脂质体复合物（小于200 nm）可通过非特异性、网格蛋白依赖性方法被内化。Simoes等,1999。同样，尺寸在约350 nm×250 nm的大病毒，例如牛痘病毒，不会通过网格蛋白包被途径感染哺乳动物细胞。Essani和Dales,1979。

相似地，非噬菌性哺乳动物细胞不能吞噬大的病原体，例如细菌细胞。只有专职噬菌细胞，例如巨噬细胞，才吞噬这种病原体，且吞噬过程不依赖于网格蛋白和受体，而通过噬菌作用完成。大的病原体与细胞表面的相互作用诱导复杂的信号级联，导致肌动蛋白在质膜处重排，以形成大的噬菌杯，其吞噬细菌。Dramsai和Cossart,1998。人们对于在细菌进入时造成肌动蛋白在质膜处重排的信号级联了解得还比较少。Galan,1996;Menard等,1996;Finlay

和Cossart,1997;Dramsi和Cossart,1998。

对于粒度对受体介导的内吞作用的影响的特定研究显示,该过程具有非常强的尺寸依赖性。例如,Aoyama等,2003,研究了粒度对糖病毒基因递送的影响,并得出用于受体介导的内吞作用的最佳粒度是~25nm的结论。还参见Nakai等,2003;Osaki等,2004。Gao等,2005,证实了上述结论。

而且,即使双特异性配体据报道已被用来使病毒性载体改向,该方法在基因递送应用中也并非总是成功的。在将病毒从它们的天然受体重新靶定(retarget)至另外的受体的尝试中,许多试验已经表明,细胞表面附着物对于持续的病毒进入和基因表达是不够的。同样,当病毒包膜蛋白被修饰以用于重新靶定时,它们表现出低融合活性,导致病毒进入细胞的效率低。Zhao等,1999。在缺乏特异性靶定时,策略依赖于局部位置的直接注射。Akporiaye & Hersh, 1999。

因此,现有技术表明,双特异性配体不能使完整的死亡细菌细胞载体进入非噬菌性哺乳动物细胞。进一步证明这点的是,发明人发现,即使以延长在许多哺乳动物细胞系中的培养周期的方式重复尝试之后,未被靶定的死亡细菌细胞也不能特异性地粘附至非噬菌性哺乳动物细胞并将负载物递送至其中。特别地,未被靶定的死亡细菌细胞不被非噬菌性哺乳动物细胞内化。相反,死亡细菌细胞会轻易地被专职噬菌细胞(像巨噬细胞)吞噬。这确证了早前的发现,即大至12 μ m的微粒被专职噬菌细胞吞噬(Kanke等,1983)且当颗粒小于2 μ m时会达到进入巨噬细胞的微粒的最大吸收量(Tabata和Ikada, 1988; 1990)。因此,不同于病毒载体特异性粘附至病毒受体并引起它们的内化,死亡细菌细胞没有相似的机制以侵入非噬菌性哺乳动物细胞。

与此背景相反,发明人还发现,双特异性配体可引导完整的死亡细菌细胞在非噬菌性哺乳动物细胞中的内吞作用。初步的数据显示,细菌细胞的内化可能通过受体依赖性和大胞饮依赖性途径发生,尽管申请人不受这样的理论的约束。

发明人还发现下述内吞作用,死亡细菌在细胞内液泡内(大概是在内吞溶酶体内)被完全降解。这是令人惊讶的,因为能够降解大的生物颗粒(像细菌细胞和寄生细胞)的苛刻(harsh)降解机制被认为只在专职噬菌细胞(像巨噬细胞)进行。那种机制被认为是允许由专职噬菌细胞完成的完全的抗原

加工和呈递。因为大多数非噬菌细胞不加工和呈递抗原，所以认为它们只含有轻微的抗原呈递系统，其主要用于细胞成分的再循环。

在被受体介导的内吞作用内化后，载体被包含在内体膜或溶酶体膜内，因而与细胞质分离开。这相当大地阻碍了负载物的递送，尤其是因为内体和溶酶体可变得腐蚀性非常强，并降解超过99%的负载物（例如载体中的核酸）。成功的基因递送载体具有让核酸进入细胞质的机制，但专家们不会期望小细胞具有这种机制。

例如，病毒已经进化出了进入哺乳动物细胞的细胞质的非常复杂的方法。有包膜逆转录病毒，例如HIV-1，通过与质膜直接融合而进入细胞质。Stein等,1987。无包膜病毒在内吞后，使用各种策略穿透内体膜。例如，流感病毒诱导病毒与内体膜的融合，这是由内体的酸性环境引起的。Marsh & Helenius, 1989。在低pH时，主要的流感病毒包膜糖蛋白血凝素（HA）的构象发生改变，导致疏水性刺突伸入内体膜，这启动了膜融合。Bullough等,1994。腺病毒也被认为是通过依赖于内体的酸化的机制而进入细胞溶质的。低pH对腺病毒壳体具有几种影响。例如，壳体的五邻体蛋白质的构象发生改变，其暴露出疏水区用于内体膜相互作用。Seth等,1985。另外，腺病毒壳体的固有蛋白酶活性似乎也有助于内体脱离。Greber等, 1996。

对于脂质体载体，内体膜屏障仍限制基因递送的效率。脂质体核酸的成功释放被认为是由内吞溶酶体膜的破裂引起的。Xu & Szoka,1996; El Ouahabi等,1997;Zelphati & Szoka, 1996a;Wattiaux等,2000。内吞溶酶体膜的破裂被认为是通过脂质的跨膜翻转而发生的，导致膜不稳定和裸DNA穿透进入细胞质。Zelphati & Szoka, 1996a; 1996b; Mui等, 2000。多项研究进一步证实，脂质体内容物（liposomal content）的胞质释放包括（a）使用阴离子大分子（例如阴离子脂质和蛋白聚糖）来电荷中和阳离子络合剂，（b）阳离子脂质介导的融合，和（c）由pH敏感性脂质造成的膜不稳定。Wrobel & Collins, 1995; Meyer等, 1997; Clark & Hersh, 1999。另外的研究显示，中性脂质（DOPE）与阳离子脂质的混合物有利于膜破裂并增加释放至细胞质中的脂质体内容物的量，因为DOPE促进脂质体颗粒与内体膜的融合。Farhood等, 1995; Fasbender等,1997; Hafez等, 2001。而且，阳离子PEI和多胺树状聚体已被用来帮助破裂内吞溶酶体膜，因为它们具有引起内体膨胀和破裂的广泛的缓冲能

力。Klemm,1998; Sonawane等, 2003。可以来自单核细胞增生李斯特菌的溶内体成孔蛋白质——李斯特菌溶胞素O (LLO) 的形式赋予脂质体载体额外的功能。Lorenzi和Lee, 2005。LLO能够打破内体膜, 从而让内体内容物释放进入细胞质。Lee等,1996。

所以, 现有的教导表明, 需要复杂的机制以让某些载体负载物突破溶酶体膜。死亡细菌细胞是无生命的颗粒, 且不具有任何使溶酶体膜不稳定的功能。发明人发现, 如果死亡细菌细胞携带至少70至100个拷贝的质粒DNA, 那么某些此DNA可突破内体膜, 而不需要使内体膜不稳定或破裂。这暗示, 当大多数质粒DNA很可能在内吞溶酶体液泡中被降解时, 可能会摧毁系统从而让某些DNA完整地突破进入哺乳动物细胞的细胞质。另外, 发明人发现, 虽然非噬菌性哺乳动物细胞不被认为具有苛刻的溶酶体处理机制(可以降解像细菌细胞的复杂的多成分结构), 但这可能是错误的。当前的观点指明, 像细菌细胞这样的复杂结构的细胞内降解只限于能够进行完全抗原加工和呈递的专职噬菌细胞。

在相关的方面, 发明人发现, 由双特异性配体靶定的、包裹有药物的死亡细菌细胞携带的有效浓度的生物活性药物, 也突破内吞溶酶体膜并进入哺乳动物细胞的细胞质。另外, 他们发现, 死亡细菌细胞具有的包裹许多不同药物(例如, 亲水性、疏水性和两性药物, 例如阿霉素、紫杉醇、顺铂、卡铂、5-氟脲嘧啶和伊立替康)的能力使得其用途非常广泛, 且已发现所有药物都能容易地以治疗有效浓度被包裹在死亡细菌细胞中。

发明人进一步发现, 当双特异性抗体靶定的、包裹有药物的死亡细菌细胞(为简便起见, 也称作“治疗性的”)被静脉给药至携带人肿瘤异种移植物的裸鼠中时, 它们从包围瘤块的血管壁溢出并进入肿瘤微环境。

在癌症治疗中靶定含颗粒的系统已充分利用了渗漏肿瘤维管结构(Jain, 1998)和有效淋巴流向的缺乏(Maeda和Matsumura, 1989; Seymour, 1992; Yuan等, 1994), 这导致循环颗粒的通透性增强与滞留(EPR)效应(Maeda, 2001)(被动靶向)。肿瘤血管具有不规则的直径、异常的分支模式, 且不能适用细动脉、毛细管或小静脉的惯常分类。Warren,1979;Less等,1991,1997; Konerding等,1995。在特别重要的功能中, 肿瘤血管渗漏显著。Peterson和Appelgren,1977; Gerlowski和Jain,1986; Jain, 1987, 1997; Dvorak等, 1988。肿瘤

微血管对大分子的高通透性已在许多研究中被观察到。Gerlowski和Jain, 1986; Jain, 1987; Jain 1996。但是, 可穿过不同肿瘤血管的试剂的尺寸上限以及它是如何被调节的, 尚不清楚。一个研究测定了在免疫缺陷小鼠皮下生长的人结肠癌的孔尺寸端值 (cutoff) 为400-600 nm。Yuan等, 1995。其他报道称, 某些肿瘤只具有100 nm的孔尺寸端值。Hobbs等, (1998)。因此, 发现大于1000 μm 的完整的死亡细菌细胞能够外渗出肿瘤周围的内皮细胞壁是令人惊讶的。此发现使得完整的死亡细菌细胞能够用于体内肿瘤治疗。

另外, 之前已表明, 异常肿瘤微环境的特点是间质高压 (血管外侧的升高的流体静力压; Less等, 1992; Jain, 2001), 其限制了抗癌治疗法的使用。例如, 据报道, 当研究在SCID小鼠中原位建立的乳腺癌 (MDA-MD-231) 肿瘤时, 在静脉注射对比剂二乙烯三胺五乙酸钆后, 对比剂进入肿瘤的量减少。Dadiani等, 2004。那篇报道的作者推测, 观察到的间质高压的增加表明, 高间质压力使流体再次进入血管, 从而增加了流出量与流入量的比率。有趣的是, 发明人发现, 死亡的细菌细胞不受这种间质高压的阻碍, 但能够实现非常大的抗肿瘤效应 (图1)。

以下描述概括了与这些发现相关的发明, 而非将本发明限制在所描述的特定实施方式、方法、方案或试剂。同样, 此文所使用的术语只描述特定的实施方式, 并不限制本发明的范围。除非另有说明, 所有在此描述中使用的技术术语和科学术语具有的含义与相关领域技术人员所普遍理解的相同。另外, 除非文中明确另有表示, 单数形式“一个 (a)”、“一个 (an)”或“所述 (the)”包括复数。

包含完整的死亡细菌细胞的组合物

一方面, 本发明提供包含完整的死亡细菌细胞和用于它的药学上可接受的载体的组合物。死亡细菌细胞可含有治疗性核酸、药物、功能性核酸分子或它们的组合。

完整的死亡细菌细胞

根据本发明, 如在BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BIOLOGY的第二版中所定义的, 死亡细菌细胞是细菌、蓝细菌、真细菌和古细菌的无

生命原核细胞。如果它们具有完整的细胞壁和/或细胞膜并含有该细菌种类内源性的遗传物质（核酸），那么这样的细胞即被视为“完整的”。

治疗性核酸和治疗性表达产物

治疗性核酸分子编码的产物例如肽、多肽或蛋白质，其产物在靶细胞中是合乎需要的。例如，感兴趣的遗传物质编码激素、受体、酶或具有治疗价值的多肽。这种方法可导致未整合的（non-integrated）转移DNA的短暂表达、染色体外的复制和转移复制子（例如游离基因）的表达，或转移遗传物质整合进入宿主细胞基因组DNA。

词语“核酸分子”和术语“多核苷酸”表示任何长度的核苷酸（核糖核苷酸或脱氧糖核苷酸）的聚合形式。它们包括单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体或包含嘌呤碱基和嘧啶碱基或其他天然的、化学或生化修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。多核苷酸的骨架可包含糖和磷酸基团（通常对于RNA和DNA是这样），或修饰的或取代的糖或磷酸基团。或者，多核苷酸的骨架可包含合成亚基（例如亚磷酰胺）的聚合物，因此可以是寡脱氧核苷氨基磷酸酯或混合的氨基磷酸酯-磷酸二酯寡聚体。多核苷酸可含有修饰的核苷酸（例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物）、尿嘧啶（uracyl）、其他糖类和例如氟核糖和硫基（thioate）的连接基团，和核苷酸分支（nucleotide branches）。多核苷酸可进一步被修饰，例如通过与标记成分结合。其他类型的修饰包括加帽、用类似物取代一种或多种天然核苷酸，以及引入将多核苷酸附着至蛋白质、金属离子、标记成分、其他多核苷酸或载体的手段（means）。

在此文中可互用的“多肽”和“蛋白质”是指任何长度的氨基酸的聚合形式，其可包括翻译的、未翻译的、化学修饰的、生化修饰的和衍生的氨基酸。多肽或蛋白质可以是天然的、重组的或合成的，或任何这些的组合。而且，多肽或蛋白质可包含天然蛋白质或肽的片段。多肽或蛋白质可以是单个分子或可以是多分子复合体。另外，这种多肽或蛋白质可具有被修饰的肽骨架。这两个术语包括融合蛋白（包括具有或没有N末端蛋氨酸残基的具有异源氨基酸序列的融合蛋白、具有异源或同源前导序列的融合蛋白）、免疫标记蛋白，等等。

术语“表达”通常指多核苷酸序列进行成功的转录和翻译的过程，使得表达出可检测水平的氨基酸序列或蛋白质。在本文的特定环境下，表达是指产生mRNA。在其他环境下，表达是指产生蛋白质。

给定的治疗性核酸分子的转录或翻译可用于治疗癌症或获得性疾病，例如AIDS、肺炎、肺气肿，或用于矫正新陈代谢的先天性障碍，例如囊性纤维性变。治疗性核酸的转录或翻译也可招致避孕性绝育，其包括野生动物的避孕性绝育。过敏原介导的和传染性病原体介导的炎性疾病，也可凭借本发明，通过服用治疗性核酸分子而治疗，所述治疗性核酸分子一旦在病人体内表达就分别影响与过敏原和感染性病原体有关的免疫应答。治疗性核酸分子也可具有表达产物，或者可以有表达产物翻译后修饰的下游产物，其减少了与移植有关的免疫后遗症或其帮助组织生长和再生。

在此文中互用的术语“癌症”、“瘤”、“肿瘤”、“恶性肿瘤”和“癌”是指表现出异常生长表型的细胞或组织，其特点是细胞增殖的重大失控。本发明的方法和组合物特别适用于癌症前期细胞、癌细胞、转移前细胞、转移细胞和不转移细胞。

治疗性核酸分子可以是基因的正链副本，该基因表达功能异常的蛋白质或者在疾病状态下以异常水平存在的蛋白质，例如，在囊性纤维性变中的囊性纤维化跨膜传导调节因子（Kerem等，1989；Riordan等，1989；Rommens等，1989）、在镰刀形红细胞贫血症中的 β -球蛋白和在地中海贫血症中的任何的 α -球蛋白、 β -球蛋白和 γ -球蛋白。因此， α -球蛋白比 β -球蛋白过量产生（ β -地中海贫血症的特点），根据本发明，可通过使用被改造成含有质粒的完整的死亡细菌细胞的基因治疗来改善，所述质粒含有这样的序列，即其具有与 α -球蛋白mRNA的靶序列相对的反义RNA转录子。

在治疗癌症中，根据本发明适合使用的治疗性核酸分子可具有这样的序列，即其对应于或衍生自与肿瘤抑制有关的基因，例如p53基因、成视网膜细胞瘤基因和编码肿瘤坏死因子的基因。根据本发明，许多种实体肿瘤——癌、乳头状瘤和疣——应该可被此方法治疗。代表性的这种癌包括结肠癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、皮肤癌、肝癌、骨癌、卵巢癌、胰腺癌、脑癌、头颈癌和淋巴瘤。示例性的乳头状瘤是扁平细胞乳头状瘤、脉络丛乳头状瘤和喉乳头状瘤。疣疾病的例子有生殖器疣、脚底疣、疣状表皮发育不良和恶

性疣。

用于本发明的治疗性核酸分子也可包含编码酶的DNA片段,该编码酶将无活性前体药物转化成一种或多种细胞毒素代谢物,使得前体药物被引入体内后,有效的靶细胞(可能和相邻细胞一起)被强迫自杀。这种“自杀基因”(可以是非人源性的或人源性的)的临产前和临床应用已由Spencer(2000)、Shangara等(2000)和Yazawa等(2002)综述过。非人源性自杀基因的例子分别是编码HSV-胸苷激酶(*tk*)、胞嘧啶脱氨基酶(CDA)+尿嘧啶转磷酸核糖基酶、黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(GPT)、硝基还原酶(NTR)、嘌呤核苷磷酸化酶(PNP, DeoD)、细胞色素P450(CYP4B1)、羧肽酶G2(CPG2)和D-氨基酸氧化酶(DAAO)的基因。人源性自杀基因的例子分别是编码羧肽酶A1(CPA)、脱氧胞苷激酶(dCK)、细胞色素P450(CYP2B1,6)、LNGFR/FKBP/Fas、FKBP/胱天蛋白酶和ER/p53的基因。

自杀基因治疗可被用于治疗AIDS。此策略已经使用以下方法测试过,即被治疗哺乳动物细胞一被HIV-1感染就使用表达有毒基因产物的自杀载体测试。在被HIV-1感染后,这些载体使用HIV-1调节元件,Tat和/或Rev,来诱导毒性基因的表达,例如 α -白喉毒素、胞核嘧啶脱氨酶或干扰素- α 2。参见Curiel等,1993; Dinges等,1995; Harrison等,1992a; Harrison等,1992b; Ragheb等,1999。

本发明的治疗性核酸通常被包含在死亡细菌细胞内的质粒上。质粒也可含有额外的核酸片段作为调节元件,例如启动子、终止子、增强子或信号序列,且其可操作地连接至治疗性核酸片段。如治疗环境决定的,合适的启动子可以是组织特异性的,或者甚至是肿瘤特异性的。

治疗性核酸可编码自杀基因或表达出功能异常或以异常水平存在于哺乳动物细胞中的蛋白质的基因的正链副本。而且,治疗性核酸可被包含含有多个核酸序列的质粒上。此外,质粒可含有调节元件和/或报道元件(reporter element)。

术语“基因”是指包含产生多肽或前体所需的控制序列和编码序列的多核苷酸序列。多肽可由全长编码序列或由所述编码序列的任何部分编码。基因可以是连续的编码序列,或者其可包括一个或多个由适当的剪接点连接的内含子。而且,基因可在编码区或未翻译区含有一个或多个修饰,这可影响

表达产物的生物活性或化学结构、表达的速度或表达控制的方式。这样的修饰包括，但不限于，突变、插入、缺失，以及一个或多个核苷酸的替换。在这点上，这样修饰的基因可被称作为“天然”基因的“变体”。

术语“宿主细胞”是指可被或已被用作重组载体或其他多核苷酸转移的受体的细胞，且包括已被转染的原始细胞的后代。由于自然的、偶发的或故意的突变的原因，单个细胞的后代可不必与原始母本在形态、基因组或总DNA补体上完全相同。

调节元件

通过本发明的方法被引入的核酸分子也可具有所需的编码片段，该片段可操作地被连接至调节元件，例如启动子、终止子、增强子和/或信号序列。如治疗环境决定的，合适的启动子可以是组织特异性的，或者甚至是肿瘤特异性的。

当启动子被优先在给定的组织中被激活，因而有效地驱动被可操作地连接的结构序列在靶标组织中的表达时，启动子即是“组织特异性的”。组织特异性启动子的种类包括，例如：分别用于白蛋白和 α 1-抗胰蛋白酶的肝细胞特异性启动子；在胰腺细胞中活跃的弹性蛋白酶I基因控制区；在胰腺 β 细胞中活跃的胰岛素基因控制区；在睾丸细胞、乳腺细胞、淋巴细胞和肥大细胞中活跃的小鼠乳癌病毒控制区；在脑中的少突细胞中活跃的髓磷脂碱性蛋白基因控制区；和在下丘脑的细胞中活跃的促性腺激素释放激素基因控制区。参见Frain等(1990), Ciliberto等(1985), Pinkert等, (1987), Kelsey等(1987), Swift等(1984), MacDonald (1987), Hanahan, (1985), Leder等(1986), Readhead等(1987), 和Mason等(1986)。

也有优先在特定肿瘤细胞中表达或在肿瘤细胞本身的启动子，根据本发明这些启动子对于治疗不同的癌症是有用的。对于癌细胞特异性的启动子的种类的例子有：靶定黑素瘤的酪氨酸酶启动子；靶定乳腺癌的MUC1/Df3启动子；靶定横纹肌肉瘤(RMS)表达的杂交*myoD*增强子/SV40启动子；对于CEA-表达细胞(例如结肠癌细胞)特异性的癌胚抗原(CEA)启动子；和靶定非小细胞肺癌的己糖激酶II基因启动子。参见Hart (1996), Morton & Potter (1998), Kurane等(1998)和Katabi等(1999)。

依赖于RNA聚合酶 (pol) II或pol II的启动子对于基因转录来说是优选的启动子。用于shRNA转录的非常优选的启动子是RNA III聚合酶启动子H1和U6。

根据本发明,可使用信号序列来影响表达产物的分泌或影响表达产物定位至特定细胞区室。因此通过完整的死亡细菌细胞递送的治疗性多核苷酸分子可在合适的阅读框包含信号序列,使得所感兴趣的表达产物由吞噬细胞或其后代分泌,从而与所选择的治疗模式一致而影响周围细胞。信号序列的例子包括在美国专利第5,143,830号中描述的溶血素C末端分泌序列,在美国专利第5,037,743号中描述的BARI分泌序列,和在美国专利第6,025,197号中描述的zsig32多肽的信号序列部分。

报道元件

通过本发明的方法被引入的核酸分子可包含报道元件。报道元件通常通过编码宿主不生产的多肽而赋予其重组宿主容易被检测的表型或特性,所述多肽一旦表达即可通过组织学分析或原位分析(例如,通过体内成像技术)而被检测。例如,根据本发明通过完整的死亡细菌细胞递送报道元件,可编码在吞噬性宿主细胞中产生色度变化或荧光变化的蛋白质,所述色度或荧光变化可通过原位分析检测到并且是转录活化的定量或半定量函数。这些蛋白质的例子有酯酶、磷酸酶、蛋白酶或其他酶,它们的活性产生可检测的发色团或荧光团。

优选的例子为通过裂解靛原底物(indigogenic substrate)——吲哚- β -D-半乳糖苷——来实现颜色变化的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶,和氧化长链醛(细菌的荧光素酶)或杂环羧酸(荧光素)同时发光的荧光素酶。同样可用于本文的报道元件是,如Prasher等人(1995)所描述的,编码水母(*Aequorea victoria*)的绿色荧光蛋白(GFP)。与GFP相关技术的领域由两个公布的PCT申请,WO 095/21191(公开了编码238个氨基酸的GFP脱辅基蛋白的多核苷酸序列,其含有由第65位氨基酸到第67位氨基酸形成的发色团)和WO 095/21191(公开了对*A.victoria* GFP的脱辅基肽的cDNA的修饰,其提供具有改变的荧光性质的肽),以及Heim等(1994)关于突变GFP(特点为激发振幅(excitation amplitude)提高4至6倍)的报道阐明。

另一种报道元件与使重组死亡细菌细胞能抵抗毒素的表达产物有关。例如，*neo*基因保护宿主抵抗毒性水平的抗生素G418，而编码二氢叶酸还原酶的基因提供对氨基喋呤的抗性，且氯霉素乙酰转移酶（CAT）基因提供对氯霉素的抗性。

其它用作报道元件的基因包括可转化宿主死亡细菌细胞以表达不同的细胞表面抗原的基因，例如，病毒包膜蛋白（例如HIV gpl20或疱疹gD），它们可容易地通过免疫分析而被检测。

药物

用于本发明中的药物可以是任何生理或药理活性物质，其在动物，尤其是哺乳动物和人类体内产生想要的局部或全身效应。药物可以是无机或有机化合物，不受限制地，包括肽、蛋白质、核酸和小分子，其中任一种可被特征化或不特征化。它们可以为各种形式，例如无变化的分子、分子复合物、药理上可接受的盐，例如氯化物、溴化物、硫酸盐、月桂酸盐、棕榈酸盐、磷酸盐、亚硝酸盐、硝酸盐、硼酸盐、醋酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、油酸盐、水杨酸盐等。对于酸性药物，可使用金属盐、铵盐或有机阳离子，例如季铵盐。还可以使用药物衍生物，例如碱、酯和酰胺。不溶于水的药物能以其水溶性衍生物的形式或作为其碱性衍生物被使用，无论在任何情况下或通过其递送，该药物可通过酶被转化成、通过体内pH或其它代谢过程被水解成原始的治疗活性形式。

有用的药物包含化疗制剂、免疫抑制剂、细胞因子、细胞毒素剂、核溶解化合物（nucleolytic compound）、放射性同位素、受体和药物前体活化酶，它们可以是天然的或通过合成方法或重组方法而制备的。

受经典型多药抗药性影响的药物在本发明中具有特别的用处，例如长春花生物碱（例如，长春碱和长春新碱）、蒽环类抗生素（例如，阿霉素和柔红霉素）、RNA转录抑制剂（例如，放线菌素-D）和微管稳定药物（例如，紫杉醇）。（Ambudkar等，1999）。

通常，癌症化疗剂为优选的药物。有用的癌症化疗药物包括氮芥、亚硝基脲（nitrosoureas）、乙烯亚胺、磺酸烷酯、四嗪、铂化合物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗代谢物、叶酸类似物、蒽环类抗生素、紫杉烷类、长春花生

物碱、拓扑异构酶抑制剂和激素剂。示例性的化疗药物为放线菌素-D、左旋苯丙氨酸氮芥、阿糖胞苷 (Ara-C)、阿那曲唑、天冬酰胺酶、BiCNU、比卡鲁胺、博来霉素、白消安、卡培他滨、卡铂、碳铂、卡莫司汀、CCNU、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、CPT-11、环磷酰胺、阿糖胞苷 (Cytarabine)、阿糖胞苷 (Cytosine arabinoside)、环磷酰胺 (Cytosan)、达卡巴嗪、放线菌素 (Dactinomycin)、柔红霉素、右丙亚胺、多西他赛、阿霉素、DTIC、表柔比星、乙烯亚胺、依托泊苷、氟尿嘧啶脱氧核苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟他胺、福莫司汀、吉西他滨、赫赛汀、六甲胺、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、美法仑、巯嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、氨羟二磷酸二钠、喷司他丁、普卡霉素、丙卡巴肼、利妥昔单抗、类固醇、链佐星、STI-571、链佐星、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、四嗪、硫鸟嘌呤、塞替派、雷替曲塞、托泊替康、曲奥舒凡、三甲曲沙、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、VP-16和希罗达。

有用的癌症化疗药物还包括烷基化剂，例如塞替派和环磷酰胺；烷基磺酸盐，例如白消安、英丙舒凡、哌泊舒凡；氮丙啶，例如硫丹、卡波醌、麦吞多派 (Meturedopa) 和尤里多派 (Uredopa)；乙烯亚胺和甲基氨基吡啶，包括六甲蜜胺、曲他胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫化磷酰胺和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine)；氮芥，例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺 (Cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、氧氮芥盐酸化物、美法仑、Novembiehin、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、乌拉莫司汀；硝基脲，例如卡莫司汀 (Cannustine)、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀；抗生素，例如阿柔比星 (Aclacinomysins)、放线菌素、Authramycin、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、刺孢霉素、洋红霉素 (Carabycin)、去甲柔红霉素、嗜癌霉素、色霉素 (Chromoincins)、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、重氮氧代正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、麦考酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素 (Potfiromycin)、嘌罗霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素 (Tubercidin)、乌苯美司、净司他丁和佐柔比星；抗代谢物，例如甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶 (5-FU)；叶酸

类似物；例如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙；嘌呤类似物，例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟脲嘧啶脱氧核苷和5-FU；雄激素类，例如卡普睾酮、屈他雄酮、环硫雄醇、Rnepitiostane和睾内酯；抗肾上腺抗体（anti-adrenals），例如氨格鲁米特、米托坦、曲洛司坦；叶酸补充剂，例如亚叶酸（frolinic acid）；醋葡萄糖内酯；醛磷酰胺糖苷；氨基乙酰丙酸；安吡啶；Bestrabucil；比生群、依达曲沙、地磷酰胺、秋水仙胺、地吡醌、依氟鸟氨酸（Elformithine）；依利醋铵、依托格鲁、硝酸镓、羟基脲、磨茹多糖、氯尼达明；米托胍脲；米托蒽醌、莫哌达醇；二胺硝吡啶；喷司他丁；蛋氨酸芥；吡柔比星；足叶草酸；2-乙基胍；丙卡巴胍；PSK®；雷佐生；Sizofrran；锗螺胺；细格孢氮杂酸；三亚胺醌；三氯乙胺；乌拉坦；长春地辛；达卡巴嗪；甘露莫司汀；二溴甘露醇；二溴卫矛醇；哌泊溴烷；Gacytosine；阿糖胞苷（“Ara-C”）；环磷酰胺；塞替派；紫杉醇，例如紫杉醇（TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）和多西紫杉醇（Doxetaxel）（TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-硫鸟嘌呤；硫嘌呤；甲氨蝶呤；铂类似物例如顺铂和卡铂；长春碱；铂、依托泊苷（VP-16）；异磷酰胺；丝裂霉素C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本；能灭瘤；替尼泊苷；柔红霉素；氨喋呤；希罗达；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构抑制剂酶RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸（DMFO）；维A酸；Esperamicins；卡培他滨；以及上述任意药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。还包括用于调节或抑制肿瘤上激素作用效果的抗激素剂，例如抗雌激素类，其包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香化酶抑制剂4(5)-咪唑、4-羟泰米芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬盐酸盐（Keoxifene）、奥那司酮和托瑞米芬（法乐通）；以及抗雄激素类，例如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、醋酸亮丙瑞林和戈舍瑞林；以及上述任意药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

有用的药物还包括细胞因子。这样的细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。所述细胞因子中包括生长激素，例如人生长激素、N-甲硫氨酰基人生长激素和牛生长激素；甲状旁腺素；甲状腺素；胰岛素；

前胰岛素；松弛素；前松弛素（prorelaxin）；糖蛋白激素，例如促卵泡激素（FSH）、促甲状腺激素（TSH）和促黄体激素（LH）；肝生长因子；成纤维细胞生长因子；催乳素；胎盘催乳激素；肿瘤坏死因子- α 和- β ；苗勒氏抑制物质；小鼠促性腺激素相关肽；抑制素；激活蛋白；血管内皮生长因子；整联蛋白；血小板生成素（TPO）；神经生长因子，例如NGF- β ；血小板生长因子；转化生长因子（TGF），例如TGF- α 和TGF- β ；胰岛素样生长因子I和II；红细胞生成素（EPO）；骨诱导因子；干扰素，例如干扰素 α 、 β 和 γ ；集落刺激因子（CSF），例如巨噬细胞-CSF（M-CSF）；粒细胞-巨噬细胞-CSF（GM-CSF）；和粒细胞-CSF（G-CSF）；白细胞介素（IL），例如IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-15；肿瘤坏死因子，例如TNF- α 或TNF- β ；以及其他多肽因子，包括LIF和kit配体（KL）。如在此文中所使用的，术语细胞因子包括来源于自然资源或来源于重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物活性等价物。

所述药物可以是前体药物，之后由将类似肽基化疗剂的前体药物转化为活性抗癌药物的前体药物激活酶来激活。参见例如WO 88/07378；WO 81/01145；美国专利第4,975,278号。通常，酶成分包括任何能够以这种方式作用于前体药物从而将其转化成更有活性、更有细胞毒性形式的酶。

为本发明的目的，如果完整的死亡细菌细胞含有编码药物的核酸，那么其就含有药物。例如，质粒可编码在哺乳动物靶细胞中表达的药物。这就使药物的内源递送成为可能，其比外源递送的短暂性（transient nature）有优势。

功能性核酸

“功能性核酸”是指一种核酸分子，在引入宿主细胞后，其特异性地干扰蛋白质的表达。通常，功能性核酸分子能够通过直接与编码蛋白质的转录体相互作用而减少蛋白质的表达。功能性核酸的例子有调节性RNA，例如siRNA、shRNA、短RNA（通常长度短于400个碱基）、微RNA（miRNAs）、核酶和诱饵RNA，以及反义核酸。

“调节性RNA”表示包括通过RNA干扰、抑制基因表达或其他机制来影响表达的RNA的类型。因此，除shRNA、siRNA、miRNA和反义ssRNA之外，调节性RNA的类型还包括核酶和诱饵RNA。

功能性核酸的靶标

本发明的功能性核酸优选靶定促成抗药性、抑制凋亡、或促成瘤表型 (neoplastic phenotype) 的基因或蛋白质的转录体。虽然在本领域中已在这些文章中成功应用了功能性核酸策略, 但是不具有死亡细菌细胞载体的优点。参见, 例如, Sioud (2004), Caplen (2003), Wu等 (2003), Nieth等人 (2003), Caplen和Mousses (2003), Duxbury等 (2004), Yague等 (2004), Duan等 (2004)。

具有抗药性的蛋白质是功能性核酸的优选的靶标。这种蛋白质可能有助于获得性抗药性或固有抗药性。当患病细胞, 例如肿瘤细胞, 开始对药物有反应但对后续的治疗周期变得难以治疗时, 就获得了抗药表型。与获得性抗药性有关的有用靶标包括ATP结合盒转运体, 例如P-糖蛋白 (P-gp、P-170、PGY1、MDR1、ABCB1、MDR相关蛋白、多药抗药性蛋白1)、MDR-2和MDR-3。与获得性抗药性有关的另外的靶标有MRP2(多药抗药性相关蛋白)、BCR-ABL (断裂点簇集区-ABL原癌基因)、STI-571抗药性相关蛋白、肺抗药性相关蛋白、环氧化酶-2、核因子 κ 、XRCC1 (X线修复交叉互补基因1)、ERCC1 (切除修复交叉互补基因)、GSTP1 (谷胱甘肽S-转移酶)、突变 β -微管蛋白、以及生长因子, 例如IL-6。如果之前未被处理的细胞未能对一种或多种药物起反应时, 那么抗药表型是固有的。具有固有抗药性的蛋白质的例子是LRP (肺抗药性相关蛋白)。

具有抗药性的特别有用的靶标包括ATP结合盒转运体, 例如P-糖蛋白、MDR-2、MDR-3、BCRP、APT11a和LRP。

有用的靶标还包括具有凋亡抗性的蛋白质。其包括Bcl-2 (B细胞白血病/淋巴瘤)、Bcl-X_L、A1/Bfl 1、成簇黏附激酶、二氢二醇脱氢酶和p53突变蛋白。

有用的靶标还包括致癌性和突变性肿瘤抑制蛋白。例子包括 β -联蛋白、PKC- α (蛋白激酶C)、C-RAF、K-Ras (V12)、DP97 死盒(Dead box)RNA解旋酶、DNMT1 (DNA甲基转移酶1)、FLIP (Flice样抑制蛋白)、C-Sfc、53BP1、多梳族蛋白EZH2 (zeste基因增强子同系物)、ErbB1、HPV-16 E5和E7 (人乳头状瘤病毒early 5和early 7)、Fortilin & MCIIP (髓样细胞白血

病1蛋白)、DIP13 α (DDC相互作用蛋白13a), MBD2 (甲基CpG结合域)、p21、KLF4 (Kruppel样因子4)、tpt/TCTP (翻译控制肿瘤蛋白)、SPK1 & SPK2 (鞘氨醇激酶)、P300、PLK1 (Polo样激酶1)、Trp53、Ras、ErbB1、VEGF (血管内皮生长因子)、BAG-1 (BCL2关联抗死亡基因1)、MRP2、BCR-ABL、STI-571抗药性相关蛋白)、肺抗药性相关蛋白、环氧化酶-2、核因子 κ 、XRCC1、ERCC1、GSTP1、突变 β -微管蛋白和生长因子。

关于HIV感染,靶标包括HIV-Tat、HIV-Rev、HIV-Vif、HIV-Nef、HIV-Gag、HIV-Env、LTR、CD4、CXCR4 (趋化因子受体)和CCR5 (趋化因子受体)。

由于肿瘤细胞的异质性,许多不同的抗药性或凋亡抗性途径可在靶细胞中进行。因此,用于本发明方法中的功能性核酸可能需要随时间而改变。例如,如果活组织检查样品显示出导致获得性抗药性的新突变,则可以设计特异性的siRNA并编码在适当的表达质粒上,所述表达质粒被转化进入死亡细菌细胞制造菌株,该菌株被用来制造重组的死亡细菌细胞,其被施用以克服获得性抗药性。

siRNA分子

短干扰RNA (siRNA) 分子可用于进行RNA干扰 (RNAi) (一种转录后基因沉默机制)。根据本发明, siRNA是指长度为约10至约30个核苷酸的双链RNA分子或单链发夹RNA分子,它们以其特异性地干扰蛋白质表达的能力而得名。优选地,双链siRNA分子为12-28个核苷酸长度、更优选为15-25个核苷酸长度,还更优选为19-23个核苷酸长度,最优选为21-23个核苷酸长度。因此,优选的siRNA分子的长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个核苷酸。

单个链的长度显示了双链siRNA分子的长度。例如,被描述为21个核糖核苷酸长度 (21-mer) 的双链siRNA可包含2个RNA相对链,它们退火在一起的有19个连续的碱基对。每条链上剩余的2个核苷酸会形成“突出物”。当siRNA含有不同长度的两条链时,较长的链显示了siRNA的长度。例如,包含一条21个核苷酸长度的链和另一条20个核苷酸长度的链的dsRNA,是21-mer。

包含突出物的双链siRNA是合乎需要的。突出物可位于链的5'或3'端。优

选地，其位于RNA链的3'端。突出物的长度可变化，但是优选为约1至5个碱基长，更优选为约2个核苷酸长。优选地，本发明的siRNA将包含约2至4个碱基的3'突出物。更优选地，3'突出物为2个核糖核苷酸长度。更优选地，组成3'突出物的2个核糖核苷酸为尿嘧啶（U）。

本发明的siRNA被设计为与靶核糖核苷酸序列相互作用，意指着它们充分地、互补地与靶序列从而与靶序列杂交。在一种实施方式中，本发明提供的siRNA包含与靶核糖核苷酸序列或靶核糖核苷酸序列互补体至少70%、75%、80%、85%或90%相同的核糖核苷酸序列。优选地，siRNA分子与靶核苷酸序列或靶核苷酸序列互补体至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。最优选地，siRNA与靶核苷酸序列或靶核苷酸序列互补体100%相同。但是，相对靶标具有插入、缺失或单点突变的siRNA分子也是有效的。

辅助siRNA设计的工具对公众来说易于获得。例如，基于计算机的siRNA设计工具可在互联网www.dharmacon.com上得到。

相关地，shRNA包括形成茎-环结构的RNA单链，其中茎由互补链和包含双链siRNA的反义链组成，而环是具有变化的尺寸的接头。shRNA的茎结构通常为约10个至约30个核苷酸长。优选地，shRNA分子的茎为12-28个核苷酸长，更优选为19-23个核苷酸长，最优选为21-23个核苷酸长。因此，优选的shRNA分子包含长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 或29个核苷酸的茎。

核酶

核酶是具有酶活性的RNA分子，其可以核苷酸碱基序列特异性的方式重复切割其它RNA分子。这种酶RNA分子事实上可靶定至任何RNA转录体，且可在体外实现有效的切割。

目前已知有6种基本的天然酶RNA的变体。每种都能在生理条件下催化反式RNA磷酸二酯键的水解（因此能切割其它RNA分子）。通常，酶多核苷酸首先结合至靶RNA。这样的结合发生在整个酶多核苷酸的靶标结合部，所述酶多核苷酸靠近切割靶RNA的分子的酶部分。因此，酶多核苷酸首先识别然后通过互补的碱基配对结合靶RNA，并且一旦结合至正确的位点，即酶活切割靶RNA。这种靶RNA的策略性切割将毁坏其被编码蛋白质的直接合成能

力。在酶多核苷酸酶结合并切割其靶RNA后，其被从该RNA上释放，以寻找另一个靶标并且能重复地结合并切割新靶标。

核酶的酶活性是有利的。因为单个核酶分子能够切割许多靶RNA分子，核酶的有效浓度可以很低。

有用的核酶可包含几个模体，包括锤头状(Rossi等(1992))、发夹状(Hampel和Tritz,(1989), Hampel等(1990))、丁型肝炎病毒模体(Perrotta和Been(1992))、I型内含子(美国专利第4,987,071号)、与RNA引导序列关联的RNaseP RNA (Guerrier-Takada等(1983))，以及脉孢菌 VS RNA(Saville & Collins (1990); Saville & Collins (1991);Collins & Olive (1993))。并不限于这些特异性模体，因为所有在本发明的核酶中是重要的的模体，都有与一个或多个靶RNA区域互补的特异性底物结合位点，并且该模体具有在底物结合位点内部或周围的核苷酸序列，其赋予核酶分子RNA切割活性。

本发明的核酶可包含被修饰的寡核苷酸（例如，为改善稳定性、靶向性等而修饰）。编码核酶的核酸序列可受强组成型启动子控制，例如，RNA聚合酶II或RNA聚合酶III启动子，使得受转染的细胞将产生足够量的核酶以破坏靶向内源性信息并抑制翻译。

反义寡核苷酸

本发明的反义寡核苷酸与编码蛋白质的核酸特异性地杂交，并干扰蛋白质的转录或翻译。在一种实施方式中，反义寡核苷酸靶定DNA并干扰其复制和/或转录。在另一实施方式中，反义寡核苷酸与RNA（包括mRNA前体和mRNA）特异性地杂交。这种反义寡核苷酸可影响，例如，RNA转运至蛋白质翻译位点、由RNA翻译成蛋白质、RNA剪切产生一个或多个mRNA种类，以及可能由RNA参加或促进的催化活性。这种干扰的总体效果是调节、降低或抑制靶蛋白的表达。

“寡核苷酸”是指包含例如约10个核苷酸（nt）至约1000个nt的多核苷酸。用于本发明的寡核苷酸优选为约10个nt至约150个nt。寡核苷酸可以是天然的寡核苷酸或合成的寡核苷酸。寡核苷酸可被修饰。

“被修饰的寡核苷酸”和“被修饰的多核苷酸”是指具有一个或多个在所有或任何碱基、糖部分、核苷酸间磷酸键合的天然分子结构的分子水平的

化学修饰的寡核苷酸或多核苷酸，也指在这些位点上具有附加的取代基或多种修饰的组合的分子。核苷酸间磷酸键合可以是磷酸二酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、硅氧烷、碳酸酯、羧甲基醚、乙酰胺、氨基甲酸盐、硫醚、桥联氨基磷酸酯、桥联亚甲基磷酸酯、硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、二硫代磷酸酯、桥联硫代磷酸酯或砷核苷酸间键合，或3'-3'、5'-3'或5'-5'键合，以及这些相似键合的组合。磷酸二酯键可被替代的键合代替，如硫代磷酸酯、甲氨基、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯和胍类，且多核苷酸的核糖亚基也可被取代（例如，己糖磷酸二酯和肽核酸）。修饰可位于寡核苷酸分子的内部（单一或重复）或末端，且可包括添加至核苷酸间磷酸键合分子结构的例如脱氧核糖和磷酸修饰，所述脱氧核糖和磷酸修饰粘附或交联至相对的链或相关酶或其它蛋白质。术语“被修饰的寡核苷酸”和“被修饰的多核苷酸”还包括含有对糖部分的修饰（例如，3'-取代的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸单体）的寡核苷酸或多核苷酸，任何一个均通过5'向3'键合而结合在一起。

基因内有几个位点可被用于设计反义寡核苷酸。例如，反义寡核苷酸可结合开放阅读框的包含翻译起始密码子（也称作开始密码子）的区域。在这点上，“起始密码子”和“翻译起始密码子”通常指下述mRNA或基因的一部分，所述mRNA或基因包含从翻译起始密码子开始在任意方向上（即，5'或3'）的至少约25个到至少约50个连续的核苷酸。

另一个发生反义相互作用（antisense interaction）的位点是开放阅读框的终止密码子。术语“终止密码子区”和“翻译终止密码子区”通常指下述mRNA或基因的一部分，所述mRNA或基因包含从翻译终止密码子开始在任意方向上的至少约25个到至少约50个连续的核苷酸。

开放阅读框或编码区也可被有效靶定。开放阅读框通常被认为是指在翻译起始密码子和翻译终止密码子之间的区域。另一个靶区域是5'非翻译区域，它是mRNA从翻译起始密码子开始5'方向上的一部分。它包括mRNA的5'加帽位点和翻译起始密码子之间的核苷酸，或基因上相应的核苷酸。

相似地，3'非翻译区可被用作反义寡核苷酸的靶标。3'非翻译区是mRNA从翻译终止密码子开始3'方向上的一部分，因此包括mRNA的翻译终止密码子与3'末端之间的核苷酸，或基因上相应的核苷酸。

反义寡核苷酸还可靶定mRNA的5'加帽区。5'帽包括通过5'-5'三磷酸键连

接至mRNA的5'-最末端(5'-most)残基的N7-甲基化的鸟核苷残基。5'加帽区被认为包括5'帽结构本身以及与帽相邻的前50个核苷酸。

尽管某些真核mRNA的转录体是被直接翻译的,但许多mRNA含有一个或多个内含子区域,其在转录体被翻译前被从其中剪切掉。剩下的(因此是被翻译的)外显子区域被剪接在一起以形成连续的mRNA序列。mRNA剪接位点,即,内含子-外显子结合部代表了可能的靶区域,并且在异常剪接涉及疾病时或者特定mRNA剪接产物的过量生成涉及疾病时尤为有用。此外,由于重排或缺失产生的异常融合结合部也可能是反义寡核苷酸的靶标。

记住了这些不同的靶位点,必须选择与靶多核苷酸充分互补的反义寡核苷酸。“互补”指两个分子的相互作用表面的拓扑学相容性或者彼此匹配。必须具有足够程度的互补性或精确的配对,使得寡核苷酸和多核苷酸靶标之间具有稳定的和特异性的结合。重要的是,反义寡核苷酸的序列不必与其可特异性杂交的靶多核苷酸的序列100%互补。当反义寡核苷酸与靶多核苷酸的结合干扰靶多核苷酸的正常功能而导致丧失实用性时,反义寡核苷酸是可特异性杂交的,并且在需要特异性结合的情况下(即,如果是体内分析或治疗性处理则是在生理条件下,而如果是体外分析则是在分析所进行的条件下)有足够程度的互补性来避免反义寡核苷酸与非靶序列的非特异性结合。

反义寡核苷酸的长度可为至少约8个nt到至少约50个nt。在一个实施方式中,反义寡核苷酸的长度可为约12至约30个nt。

根据本发明使用的反义寡核苷酸可通过固相合成这一众所周知的技术方便且按常规地制备。多个商家出售用于该合成的设备,包括例如,Applied Biosystems(Foster City, CA)。可额外地或选择性地使用任何其他本领域已知的用于该合成的装置。使用类似技术制备寡核苷酸(例如硫代磷酸酯和烷基化的衍生物)是熟知的。

编码功能性核酸的核酸

为本发明的目的,如果完整的死亡细菌细胞含有编码功能性核酸的核酸,那么该细胞就含有功能性核酸。例如,质粒可编码在哺乳动物靶细胞内表达的功能性核酸。这使得功能性核酸的内源递送成为可能,其比外源递送的短暂性有优势。

因此，重组的完整死亡细菌细胞可携带编码一个或多个siRNA序列的质粒DNA，所述siRNA序列用来使抗药性基因或凋亡抗性基因沉默。通过使用编码多功能核酸的死亡细菌细胞，有可能治疗表现出多重抗药性机制的细胞。不同的siRNA序列可从不同的启动子分别表达。例如，靶定Pgp mRNA的siRNA可从U6启动子表达，靶定Bcl-2 mRNA的siRNA可从H1启动子表达。这些多个表达盒优选被携带在单个质粒上，但也可被携带在不同的质粒上。当重组质粒携带含多个siRNA-编码序列（通过非编码多核苷酸序列连接在一起）的表达盒时，不同的siRNA序列也可从单个的启动子表达。单个基因转录终止子可位于完整的表达盒的下游。

在一种策略中，质粒编码作为两个独立转录体的siRNA的正义链和反义链，在靶细胞中表达后，两个独立转录体杂交形成功能性siRNA双链体。在另一个优选的策略中，质粒编码一个或多个siRNA，每个都作为单个的形成短发卡RNA茎-环结构的转录体被表达。发卡结构可由Dicer酶加工成功能性siRNA。

药学上可接受的载体

“药学上可接受的”是指生理相容性。药学上可接受的载体或赋形剂不会消除被施用的组合物的生物活性，它是化学惰性的且对被给药的生物体没有毒性。

内毒素

“内毒素”是指游离脂多糖（LPS）。因此，“不含内毒素”的组合物缺乏与细菌细胞膜无关的LPS。“本质上不含内毒素”的组合物缺乏足够量或足够浓度的LPS来在哺乳动物（例如人类）体内产生毒性。与细菌细胞膜无关的内毒素/LPS也被称作“游离内毒素”。

通过使用0.2 μ m的过滤器来过滤，可将内毒素从组合物中除去。游离内毒素和内毒素胶粒小于0.2 μ m，因此容易从组合物中滤出，组合物保留住死亡细菌细胞（其大于0.2 μ m）。另外，抗脂质A单克隆抗体可被用来结合至游离内毒素。抗脂质A单克隆抗体可通过其Fc成分而结合至固体载体（例如亲和色谱柱或磁珠），让结合有脂质A的 Fab片段未被占用，以结合至游离的

LPS。

双特异性配体

本发明的组合物也可以包含一个或多个双特异性配体。对本发明有用的配体包括任何结合至靶细胞上的表面成分和死亡细菌细胞上的表面成分的试剂。优选地，靶细胞上的表面成分是受体，特别是能够介导内吞作用的受体。该配体可包含多肽和/或碳水化合物成分。抗体是优选的配体。例如，携带对由细菌衍生的完整死亡细菌细胞上的表面成分和靶标哺乳动物细胞上的表面成分具有双重特异性的双特异性抗体，可被有效地用来将死亡细菌细胞靶定至体外和体内的靶标哺乳动物细胞。有用的配体的类别还包括受体、酶、结合肽、融合/嵌合蛋白和小分子。

具体配体的选择基于两个主要的标准：(i) 特异性地结合至完整的死亡细菌细胞表面上的一个或多个区域，和(ii) 特异性地结合至靶细胞表面上的一个或多个区域。因此，配体优选具有携带对由细菌衍生的完整死亡细菌细胞表面结构具有特异性的第一个臂和携带对哺乳动物细胞表面结构具有特异性的第二个臂。第一个臂和第二个臂都可以是多价的。优选地，即使是多价的，每个臂也是单特异性的。

对于结合至由细菌衍生的死亡细菌细胞，理想的是，配体的其中一个臂对在母体细菌细胞上发现的脂多糖的O-多糖成分具有特异性。其它可被用于配体结合的死亡细菌细胞表面结构包括细胞表面暴露的多肽和外膜上的碳水化合物，例如菌毛(pilli)、伞毛、外膜蛋白和暴露于鞭毛细胞表面的肽片段。

对于结合至靶细胞，配体的其中一个臂对哺乳动物细胞的表面成分具有特异性。这样的成分包括细胞表面蛋白、肽和碳水化合物，不论是特征化的或未被特征化的。细胞表面受体，特别是能够激活受体介导的内吞作用的受体，是用于靶定的理想的细胞表面成分。如果在靶细胞表面过量表达，对于要被治疗的细胞的靶定，这样的受体会赋予额外的选择性，从而减少递送至非靶细胞的可能性。

例如，通过选择特异性结合在想要细胞上的细胞表面受体模体(motif)的配体，可以靶定肿瘤细胞、转移细胞、脉管系统细胞(例如上皮细胞和平

滑肌细胞)、肺细胞、肾细胞、血细胞、骨髓细胞、脑细胞、肝细胞等等,或任何被选细胞的前体。细胞表面受体的例子包括癌胚抗原(CEA),其在大多数的结肠癌、直肠癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌和胃肠道癌中过量表达(Marshall, 2003); 调蛋白受体(HER-2、*neu*或*c-erbB-2*),其常常在乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌和子宫颈癌中过量表达(Hung等,2000); 表皮生长因子受体(EGFR),其在许多实体瘤中高度表达,包括乳腺癌、头颈癌、非小细胞肺癌和前列腺癌(Salomon等,1995); 唾液酸糖蛋白受体(Stockert, 1995); 转铁蛋白受体(Singh, 1999); 丝氨酸蛋白酶抑制剂酶复合体受体,其在肝细胞中表达(Ziady等,1997); 纤维母细胞生长因子受体(FGFR),其在胰腺癌细胞中过量表达(Kleeff等,2002); 血管内皮生长因子受体(VEGFR),用于血管生成抑制基因治疗(Becker等,2002和Hoshida等,2002); 叶酸盐受体,其在90%的非粘液卵巢癌中选择性地过量表达(Gosselin和Lee, 2002); 细胞表面多糖-蛋白质复合物(Batra等,1994); 碳水化合物受体(Thurnher等,1994); 和聚免疫球蛋白受体,其可用于将基因递送至呼吸上皮细胞,且对于肺病(例如囊性纤维性变病)的治疗具有吸引力(Kaetzel等,1997)。

优选的配体包含抗体和/或抗体衍生物。此处所用“抗体”包括由在体内或体外发生的免疫源应答而获得的免疫球蛋白分子。术语“抗体”包括多克隆的、单特异性的和单克隆的抗体,以及抗体衍生物,如单链抗体片断(scFv)。用于本发明中的抗体和抗体衍生物也可通过DNA重组技术而获得。

野生型抗体有四个多肽链,两个相同的重链和两个相同的轻链。两种类型的多肽链有恒定区和可变区,恒定区在同种类的抗体中不变化或极少变化。可变区对于特定的抗体是唯一的,且包括一个识别特异性表位的抗原结合区。与抗体结合最直接相关的抗原结合区的区域即是“互补性决定区域”(CDR)。

术语“抗体”也包括抗体衍生物,例如保留了特异性结合至抗原的能力的抗体片断。这样的抗体片断包括Fab片断(含有抗原结合区并包括由二硫键桥接的轻链和部分重链的片段)、Fab'(含有单个抗原结合区的抗体片段,其包括Fab和穿过铰链区的重链的另外的部分)、F(ab')₂(由重链铰链区的链间二硫键连接的两个Fab'分子)、双特异性Fab(具有两个抗原结合

区的Fab分子，每个抗原结合区可指向不同的表位）和scFv（由氨基酸链连接在一起的、抗体的单个轻链和重链的可变抗原结合决定区）。

当抗体（包括抗体片段）构成部分或全部配体时，抗体优选是人源性的或被修饰以适合用于人类。所谓的“人源化抗体”在本领域是已知的。参见，例如Osbourn等,2003。通过遗传操作和/或体外处理来修饰抗体以减少它们在人体内的抗原性。例如，用于人源化抗体的方法已在，例如，美国专利第6,639,055号、美国专利第5,585,089号和美国专利第5,530,101号中描述。在最简单的情况下，人源化抗体通过将来自小鼠mAb的被称为互补性决定区域（CDR）的抗原结合环移植进入人IgG而形成。参见Jones等,1986; Riechmann等,1988; 和Verhoeyen等,1988。然而，高亲和力人源化抗体的产生通常需要从小鼠亲代mAb的所谓的构架区(FR)转移一个或多个额外的残基。也已开发出几个人源化技术的变体。参见Vaughan等,1998。

在本发明中也可使用人抗体（而不是“人源化抗体”）。它们对其各自的抗原具有很高的亲和力，且可从非常大的、单链可变片段(scFvs)或Fab噬菌体展示库中按常规获得。参见Griffiths等,1994; Vaughan等,1996; Sheets等,1998; de Haard等,1999; 和Knappik等,2000。

有用的配体还包括双特异性单链抗体，该抗体通常是重组多肽，该重组体多肽由可变轻链部分（通过连接分子共价地连接至相应的可变重链部分）组成。参见美国专利第5,455,030号、第5,260,203号和第4,496,778号。双特异性抗体也可通过其他方法制备。例如，化学复共轭对配合物可通过以化学方法结合具有不同特异性的完整抗体或抗体片段而制得。参见Karpovsky等,1984。但是，这种复共轭对配合物难于以可繁殖的方式制得，并且至少是正常单克隆抗体的两倍大。双特异性抗体也可通过二硫化物交换而制得，其包括酶裂解和抗体片段的重新组合。参见Glennie等,1987。

因为Fab和scFv片段是单价的，因此它们通常对靶结构具有低亲和力。因此，由这些成分制得的优选的配体被改造成二聚的、三聚的或四聚的共轭物以增强功能性亲和力。参见Tomlinson和Holliger,2000; Carter,2001、Hudson和Souriau,2001; 和Todorovska等,2001。这种共轭结构可通过化学交联和/或遗传交联而制备。

本发明的双特异性配体优选在每一端都是单特异性的，即，在一端对死

亡细菌细胞上的单个成分具有特异性，而在另一端对靶细胞上的单个成分具有特异性。配体在一端或两端可以是多价的，例如，以所谓的双抗体、三链抗体和四链抗体形式存在。参见Hudson和Souriau,2003。双抗体是通过两个scFv的非共价连接而形成的二价二聚体，其具有两个Fv结合位点。同样地，三链抗体通过形成三个scFv的三价三聚物而得到，其具有三个结合位点，而四链抗体通过形成四个scFv的四价四聚物而得到，其具有四个结合位点。

对哺乳动物细胞上的受体具有特异性的几个人源化的、人的以及小鼠的单克隆抗体和抗体片段已被批准用于人类的医疗用途，并且数量快速增多。参见Hudson和Souriau,2003。例如，这种可被用来形成对HER2具有特异性的双特异性配体的一个臂的抗体的例子是：赫赛汀TM；曲妥珠单抗。

抗体可变区也可被融合至许多蛋白质域。融合至人免疫球蛋白域，例如IgG1 CH3既增加了质量又促进了二聚化。参见Hu等,1996。融合至人Ig铰链部-Fc区可增加效应子功能。同样，融合至来自多聚体蛋白的异源蛋白域促进了多聚化。例如，将短scFv融合至短的两亲性螺旋已被用于制备微型抗体。参见Pack和Pluckthun,1992。来自形成异源二聚体（例如fos/jun）的蛋白质的域，可被用于制备双特异性分子(Kostelny等,1992)，或者，同源二聚化区域可通过工程化策略，如“凹凸配合（knobs into holes）”（Ridgway等,1996），而被改造形成异源二聚体。最后，可选择使用融合蛋白伴侣（partner），其提供多聚化作用和额外的功能，例如链霉抗生物素蛋白。参见Dubel等,1995。

额外的组合物

在一个实施方式中，所述组合物包含含有功能性核酸分子和药物的死亡细菌细胞。功能性核酸分子可以是靶定有助于抗药性的蛋白质的转录体的核酸分子。优选地，功能性核酸分子靶定有助于抗组合物中同样药物的蛋白质的转录体。药物可被包含在死亡细菌细胞中，甚至是与包含有功能性核酸分子相同的死亡细菌细胞中，但并不必须这样被包含。

递送至有吞噬或内吞能力的细胞的方法

在另一方面，本发明提供递送方法，其通过将由细菌衍生的死亡细菌细胞与有吞噬或内吞能力的哺乳动物细胞接触。这样的能够以胞内细菌性病原

体的方式吞噬亲本细菌细胞的哺乳动物细胞同样吞噬死亡细菌细胞，该死亡细菌细胞将它们的负载物释放至哺乳动物细胞的细胞质。不需要使用靶向配体即可实现这种递送方法。

在死亡细菌细胞被给定类型的细胞吞噬的过程中可能涉及许多种机制，而本发明在这点上并不依赖于任何特定机制。例如，吞噬作用是一个被众多文件记载的过程，在该过程中巨噬细胞和其它吞噬细胞（例如中性白细胞）通过在颗粒表面伸展伪足直到该颗粒被完全包裹的方式摄取该颗粒。虽然被描述为“非特异性”吞噬作用，但在该过程中已证实涉及特异性受体。参见Wright & Jong (1986); Speert等(1988)。

因此，一种形式的吞噬作用涉及表面配体与位于伪足膜上的配体受体之间的相互作用(Shaw和Griffin,1981)。这种由特异性受体介导的附着步骤被认为依赖于细菌表面粘附素。对于较不剧毒的细菌，例如非肠毒性E. coli，在缺乏噬菌细胞受体的表面配体的情况下也可发生吞噬作用。参见例如Pikaar等(1995)。因此，本发明包括但不限于利用具有或缺乏表面粘附素的死亡细菌细胞，是否具有粘附素要与它们的亲本细菌细胞的性质一致，并且该死亡细菌细胞被噬菌细胞（即“有吞噬能力的”宿主细胞）吞噬，其中中性粒细胞和巨噬细胞是哺乳动物中的主要类型。

另一个吞噬过程是内吞作用，细胞内病原体，例如沙门氏菌属、埃希氏菌属、志贺氏菌属、螺杆菌属、假单胞菌属和乳杆菌属，通过这种方式进入哺乳动物上皮细胞中并在那里复制。在这点上的两个基本机制是网格蛋白依赖型的受体介导的内吞作用，也称为“有被小窝内吞作用”(Riezman, 1993)，以及网格蛋白非依赖型的内吞作用(Sandvig & Deurs,1994)。当有吞噬能力的细胞通过内吞作用（即，“有内吞能力”的宿主细胞）吞噬根据本发明的死亡细菌细胞时可能涉及其中一个机制或两个机制。代表性的有内吞能力的细胞有乳腺上皮细胞、胃肠道中的肠上皮细胞、胃上皮细胞、肺上皮细胞以及泌尿道和膀胱上皮细胞。

当不使用靶向配体而实现向有吞噬能力的哺乳动物细胞的递送时，预期的本申请的性质将影响所使用的死亡细菌细胞的细菌来源的选择。例如，沙门氏菌种、埃希氏菌种和志贺氏菌种携带粘附素（可被胃肠道中肠上皮细胞上内吞作用介导的受体识别），且可能适合于递送对结肠癌细胞有效的药物。

类似地，由幽门螺杆菌衍生的、携带对胃上皮细胞有特异性的粘附素的死亡细菌细胞，可适合于针对胃癌细胞的递送。对于由假单胞菌种衍生的、携带由肺上皮细胞上的受体识别的粘附素的死亡细菌细胞，吸入法或吹入法可能是理想的给药方法。由乳杆菌衍生的、携带对泌尿道和膀胱上皮细胞具有特异性的粘附素的死亡细菌细胞，可非常适合于将药物尿道内递送至泌尿道癌或膀胱癌。

在一个实施方式中，递送方法是治疗性核酸递送方法，该方法包括将包含含有核酸序列的质粒的死亡细菌细胞与具有吞噬或内吞能力的哺乳动物细胞接触，使得死亡细菌细胞被哺乳动物细胞吞噬。质粒优选编码治疗性表达产物。在死亡细菌细胞与哺乳动物细胞接触后，哺乳动物细胞产生治疗性核酸序列的表达产物。治疗性核酸递送方法可在体外或体内进行。

在另一个实施方式中，递送方法是药物递送方法，该方法包括将含有药物的死亡细菌细胞与具有吞噬或内吞能力的哺乳动物细胞接触，使得死亡细菌细胞被哺乳动物细胞吞噬。药物随后被释放进入哺乳动物细胞的细胞质中。或者，死亡细菌细胞可含有编码药物的质粒，此时质粒任选地包含调节元件和/或报道元件。药物递送方法可在体外或体内进行。

在另一个实施方式中，递送方法是功能性核酸递送方法，该方法包括将包含有功能性核酸分子或编码功能性核酸分子的质粒的死亡细菌细胞与具有吞噬或内吞能力的哺乳动物细胞接触，使得死亡细菌细胞被哺乳动物细胞吞噬。功能性核酸或质粒随后被释放进入哺乳动物细胞。当死亡细菌细胞含有编码功能性核酸分子的质粒时，质粒任选地包含调节元件和/或报道元件，且哺乳动物细胞优先表达功能性核酸。功能性核酸递送方法可在体外或体内进行。

因此，在一方面，递送功能性核酸的方法包括使用包括无质粒的功能性核酸的死亡细菌细胞。在这点上，功能性核酸穿过细菌细胞的完整细胞膜被直接包裹进入死亡细菌细胞中，而不使用含质粒的表达载体或宿主细胞的表达系统。因此，在一个实施方式中，递送功能性核酸的方法包括（a）提供多个在药学上可接受的载体中的完整的死亡细菌细胞，其中每个细菌细胞包含无质粒的功能性核酸，和（b）将多个死亡细菌细胞与哺乳动物细胞接触，使得哺乳动物细胞吞噬多个死亡细菌细胞，从而将功能性核酸释放进入靶细

胞的细胞质中。

限定词“无质粒”意味着缺少用于调节性RNA的原位表达的载体，例如质粒或病毒载体。

引导死亡细菌细胞至特异性哺乳动物细胞

在另一方面，本发明提供使用双特异性配体的靶向递送方法。该配体将死亡细菌细胞与靶标哺乳动物细胞接触，使得哺乳动物细胞吞噬死亡细菌细胞，包括该死亡细菌细胞的负载物。

在一个实施方式中，该靶向递送方法是治疗性核酸递送方法，该方法包括将双特异性配体与含有治疗性核酸序列的死亡细菌细胞和非噬菌性哺乳动物细胞接触。双特异性配体导致死亡细菌细胞结合至哺乳动物细胞，且死亡细菌细胞被哺乳动物细胞吞噬。哺乳动物细胞随后可产生治疗性核酸的表达产物。

核酸递送的效率与死亡细菌细胞携带的质粒DNA的拷贝数有关。已知核酸递送的瓶颈是大于99%的内化DNA在内体或溶酶体中被降解，而没有到达靶细胞的细胞质。作为非活颗粒，预期死亡细菌细胞缺乏使靶细胞的内吞溶酶体膜不稳定或破碎的功能，且不可能具有允许内化DNA脱离内吞溶酶体膜的复杂机制。因此，根据本发明，携带质粒DNA的至少70个到100个拷贝的死亡细菌细胞是优选的。发明人已将这样的死亡细菌细胞成功地用于核酸递送。成功的结果表明，即使大多数质粒DNA在内吞溶酶体液泡中被降解，它也能摧毁系统并让一些DNA以完整形式脱离并进入哺乳动物细胞的细胞质。

在另一个实施方式中，靶向递送方法是药物递送方法，该方法包括将双特异性配体与含有药物分子的死亡细菌细胞和非噬菌性哺乳动物细胞接触。双特异性配体导致死亡细菌细胞结合至哺乳动物细胞，并且死亡细菌细胞被哺乳动物细胞吞噬。药物分子随后被释放进入哺乳动物细胞的细胞质中。

发明人已发现，双特异性配体靶定的死亡细菌细胞携带的相当大浓度的药物也脱离内吞溶酶体膜，并且进入哺乳动物细胞的细胞质。而且，死亡细菌细胞是多功能的，表现在它们能够包裹许多不同药物，如：亲水的、疏水的和两性的，例如：阿霉素、紫杉醇、顺铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、伊立替康。所有这些药物都易于以治疗显著浓度包裹在死亡细菌细胞中。

在另一种实施方式中，靶向递送方法是一种功能性核酸递送方法，该方法包括将双特异性配体与（a）含有功能性核酸分子或包含编码功能性核酸分子的片段的质粒的死亡细菌细胞，和（b）靶标哺乳动物细胞接触。双特异性配体使得死亡细菌细胞结合至哺乳动物细胞，并且所述死亡细菌细胞被哺乳动物细胞吞噬。死亡细菌细胞被吞噬后，功能性核酸分子被释放至靶细胞的细胞质中或由靶细胞表达。

这些靶向递送方法可在体内或体外进行，或者在体内和体外进行。双特异性配体、死亡细菌细胞和哺乳动物细胞之间可以以许多不同的方式接触。对于体内递送，优选给予已附着双特异性配体的死亡细菌细胞。因此，当双特异性配体靶定的死亡细菌细胞在体内到达靶细胞时，死亡细菌细胞、双特异性配体和靶细胞全都接触。或者，双特异性配体和死亡细菌细胞可在体内被分别地给予。

双特异性配体、死亡细菌细胞和哺乳动物细胞之间的接触也可发生在体外的一个或多个培养期间。在一种实施方式中，这三个元件被立刻培养在一起，或者，也可进行分步培养。在一个分步式方法的实施例中，死亡细菌细胞和双特异性配体首先被一起培养形成双特异性配体靶定的死亡细菌细胞，随后将该双特异性配体靶定的死亡细菌细胞与靶细胞一起培养。在另一个实施例中，双特异性配体先同靶细胞一起培养，随后与死亡细菌细胞一起培养。一个或多个体外培养以及体内给予的组合也可使双特异性配体、死亡细菌细胞以及哺乳动物靶细胞接触。

发明人发现靶向递送方法广泛适用于许多哺乳动物细胞，所述哺乳动物细胞包括通常耐特异性粘附以及耐死亡细菌细胞的内吞作用的细胞。例如，在一个臂上有抗O-多糖特异性和在另一个臂上有抗HER2受体、抗EGF受体或抗雄激素受体特异性的双特异性抗体配体，有效地将死亡细菌细胞结合至许多靶标非噬菌性细胞上的各个受体。这些靶标非噬菌性细胞包括：肺癌细胞、卵巢癌细胞、脑癌细胞、乳腺癌细胞、前列腺癌细胞和皮肤癌细胞。此外，所述有效的结合优先于由每个非噬菌性细胞进行的死亡细菌细胞的快速内吞作用。

本发明的靶细胞包括任何其中被引入治疗性核酸、药物或功能性核酸的细胞。理想的靶细胞的特征是，一旦结合配体，细胞表面受体的表达有利于

内吞作用。优选的靶细胞是非噬菌性的，意指该靶细胞不是诸如巨噬细胞、树突状细胞以及自然杀伤细胞（NK）之类的专业的噬菌细胞。优选的靶细胞也是哺乳动物细胞。

本发明的递送方法可被用来治疗疾病病症。术语“处理（treatment）”、“治疗（treating）”、“治疗（treat）”及相似术语是指获得期望的药理和/或生理效果。所述效果可能是预防性的，即：完全或部分地预防疾病或症状，和/或可能是治疗性的，即：部分地或完整地稳定或治疗疾病和/或由疾病引起的不利影响。“处理（Treatment）”包括哺乳动物（尤其是人）体内疾病的任何处理，其包括：（a）防止疾病或症状在受治疗者身上发生，该受治疗者可能是易于患该疾病或症状但尚未诊断出具有该疾病；（b）抑制疾病症状，即：阻止其发展；或（c）减轻疾病症状，即：使疾病或症状的退化。

使用功能性核酸来克服抗药性和治疗疾病

在另一方面，本发明提供一种通过使用功能性核酸克服抗药性和治疗患者体内的疾病（例如癌症或艾滋病）的方法。该方法包括（a）提供含有功能性核酸分子或包含编码功能性核酸分子的片段的质粒的完整死亡细菌细胞，其中功能性核酸分子靶定基因或促成抗药性的蛋白质的转录体，（b）将死亡细菌细胞与靶标哺乳动物细胞接触，使得哺乳动物细胞吞噬死亡细菌细胞，和（c）将药物递送至靶标哺乳动物细胞。优选地，步骤（c）在步骤（a）和步骤（b）之后进行，以让功能性核酸在给药前减少抗药性。药物的递送和功能性核酸的引入能以任何顺序连续地或同时地发生。

可通过任何常规方式递送药物。例如，药物可通过口服、胃肠外（包括皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内和通过注入）、局部、经皮或吸入方式递送。医药领域的技术人员可轻松确定每种药物的合适递送模式和剂量。

尽管可由常规方式进行药物递送，但是优选经死亡细菌细胞递送。就这一点而言，发明者已发现，同样的哺乳动物细胞能通过包裹有不同负载物的靶定的死亡细菌细胞被成功地重新转染。例如，包裹有编码质粒的siRNA的死亡细菌细胞可转染哺乳动物细胞，其后包裹有药物的死亡细菌细胞可将药物递送至相同的哺乳动物细胞。该发现是令人惊讶的，并且表明与死亡细菌细胞的降解、负载物的内体释放和负载物脱离进入胞内靶标相关的胞内过程

在第一轮转染和负载物递送后仍保留完全的功能。

药物可被包裹在不同于功能性核酸或编码功能性核酸的质粒的单独的死亡细菌细胞中，或者，药物可被包裹在与功能性核酸分子或编码功能性核酸分子的质粒相同的死亡细菌细胞中。某些药物可与核酸相互作用，并排斥在相同死亡细菌细胞内的药物和核酸的共同包裹（co-packaging）。例如，已知阿霉素可与DNA相互作用。

将功能性核酸包裹进入死亡细菌细胞

功能性核酸可被直接包裹进入完整的死亡细菌细胞。该过程省略了之前所需的步骤，例如，将编码调节性RNA的核酸克隆进入表达质粒中、用所述质粒转化产生小细胞的亲代细菌和产生重组的小细胞。取而代之的是，通过将多个完整的死亡细菌细胞与功能性核酸在缓冲液共培养，可将无质粒的功能性核酸直接包裹进入死亡细菌细胞中。

在某些实施方式中，共培养可包括轻微的振荡，而在其它实施方式中共培养是静止的。共培养约一个小时已经足够，但更短的时间，例如约半个小时也可能是有效的。在一种实施方式中，缓冲液包括缓冲液盐，例如1×磷酸缓冲液。所述缓冲液盐可为凝胶形式。在另一种实施方式中，共培养在约4℃至约37℃、约20℃至约30℃、约25℃或约37℃的温度进行。在其他方面，共培养可包括约 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 或 10^{13} 个死亡细菌细胞。可优化温度、时间、缓冲液、小细胞浓度等特异性参数，以得到特定的条件组合。

将药物加入死亡细菌细胞

优选地，本发明的死亡细菌细胞含有足够量的药物以在靶细胞上发挥药物生理学或药理学作用。还优选的是，包含在死亡细菌细胞内的药物为对死亡细菌细胞而言异源的或外来的，意味着死亡细菌细胞的亲代细菌细胞通常不产生药物。

通过在含有死亡细菌细胞的胞外介质与死亡细菌细胞细胞质之间造成药物的浓度梯度，可将亲水性和疏水性药物包裹在死亡细菌细胞内。当胞外介质比死亡细菌细胞细胞质含有更高的药物浓度时，药物自然沿着该浓度梯度移动进入死亡细菌细胞细胞质。然而，当浓度梯度被逆转时，药物不会从

死亡细菌细胞移出。

为将正常情况下非水溶性的药物加入死亡细菌细胞，首先将药物溶解于合适的溶剂中。例如，紫杉醇可溶解于乙醇和cremophore EL（聚氧乙烯蓖麻油）的1:1混合液中，随后在PBS中稀释以获得部分稀释在水介质中并具有最少量有机溶液的紫杉醇溶液，以确保药物仍留在溶液中。死亡细菌细胞可在此最终介质中培养以用于药物的加荷。因此，发明人发现，甚至疏水性药物可扩散进入死亡细菌细胞细胞质，以达到大量的且治疗显著的细胞质的药物加荷。这是未曾预料到的，因为死亡细菌细胞膜由疏水性磷脂双层组成，该细胞膜被认为会阻止疏水性分子扩散进入细胞质。

另一种将药物加入死亡细菌细胞的方法包括：在亲代细菌细胞转录并翻译编码药物的核酸的条件下培养重组的亲代细菌细胞，使得药物被释放进入亲代细菌细胞的细胞质。例如，编码用于所需药物的细胞生物合成途径的基因簇可被克隆，并转移进入能够产生死亡细菌细胞的亲代细菌菌株中。基因簇的基因转录和翻译导致药物在亲代细菌细胞细胞质内的生物合成，使细菌细胞质充满药物。当亲代细菌细胞分裂并形成子代死亡细菌细胞时，所述死亡细菌细胞在其细胞质中也含有药物。可通过任何本领域已知的和如上所述的死亡细菌细胞纯化方法来纯化被预先包裹的死亡细菌细胞。

相似地，另一种将药物加入死亡细菌细胞的方法包括：在使编码药物的基因在死亡细菌细胞内转录并翻译的条件下，培养含有编码药物的表达质粒的重组死亡细菌细胞。

组合物的纯度

本发明中的死亡细菌细胞基本上不含杂质亲代细菌细胞，即活细菌细胞。因此，含有本发明组合物的死亡细菌细胞优选为每 10^7 个死亡细菌细胞含有少于约1个杂质亲代细菌细胞，更优选为每 10^8 个死亡细菌细胞含有少于约1个杂质亲代细菌细胞，甚至更优选为每 10^9 个死亡细菌细胞含有少于约1个杂质亲代细菌细胞，还更优选为每 10^{10} 个死亡细菌细胞含有少于约1个杂质亲代细菌细胞，和最优选为每 10^{11} 个死亡细菌细胞含有少于约1个杂质亲代细菌细胞。

本质上由死亡细菌细胞组成，且任选地包含本发明的治疗性核酸、药物、

功能性核酸和双特异性配体的组合物（即：包含所述死亡细菌细胞和不过分干扰组合物递送质量的其它成分的制剂），可按常规方法，使用一种或多种药学上可接受载体或赋形剂来制备。

培养物中的细菌可使用许多不同的方法杀死，包括：(a)用细菌菌株敏感的抗生素处理；(b)以低于使蛋白质发生凝固的水平热处理和(c)使用不破坏细菌细胞完整性和关闭细菌膜上蛋白质通道的浓度的诸如乙醇的溶剂来处理。在生产死亡细菌疫苗的领域中，所述杀死细菌细胞的过程是熟知的。优选地，杀死细菌细胞的过程不包括使分子的立体构型大范围变性，即：该过程优选保留来自细菌细胞的大分子（如蛋白质、多糖和脂质）的三维结构。其他可用于获得上述死亡细菌细胞制备物的方法对于本领域技术人员是熟知的。

可通过本领域内任何已知的方法来证明在制备死亡细菌细胞中膜没有变性。例如，可从重组死亡细菌细胞中提取出质粒DNA，并对质粒DNA测序以确认重组DNA的完整性。通过实时PCR可确定质粒内容（plasmid content），并与相同数量的活重组细菌细胞中的质粒内容相比较。如果膜的完整性在杀死过程中没有得以保存，则预期可能发生质粒丢失。此外，如果杀死过程破坏了重组质粒，则可观察到DNA序列畸变。也可进行这样的测试，即检测相同数量的活体细菌细胞和死亡细菌细胞包裹化疗药物的能力。

通过过滤，例如通过0.2 μm 交叉流过滤，可从死亡细菌制备物中除去杂质，例如：介质、缓冲液、细胞碎片、膜泡、游离核酸和游离内毒素。优选使用约0.2 μm 的过滤器孔眼尺寸，因为污染物通常小于0.2 μm 。因此，使用这样的过滤器孔眼尺寸让污染物被滤出，而留下完整的死亡细菌细胞。这种过滤可以为死端过滤或交叉流过滤。交叉流过滤具有的优点是较少的过滤器堵塞。而且，优选进行缓冲液交换冲洗步骤，其也可使用约0.2 μm 的过滤器孔眼尺寸。

组合物的给药途径和形式

本发明的组合物可通过不同途径给药至哺乳动物体内的不同位点，以获得局部或系统的所需治疗效果。可通过以下方法完成递送，例如，通过口服给药、通过将制剂应用至体腔、通过吸入或吹入法、或者通过肠胃外、肌肉

内、静脉内、门静脉内、肝内、腹膜、皮下、肿瘤内或经皮给药。给药的模式和位点取决于靶细胞的位置。例如，通过被靶定的死亡细菌细胞的吸入递送可有效靶定囊性纤维性变细胞。类似地，通过被靶定的死亡细菌细胞的静脉递送可更加有效地治疗肿瘤转移。通过被靶定的死亡细菌细胞的腹腔内递送可治疗源发性卵巢癌。

组合物可以单位剂量的形式提供，例如可被提供在安瓿或管形瓶中，或者被提供在多次剂量容器中，其具有或不具有添加的防腐剂。组合物可为溶液、悬浮液或者在油性或水性载体中的乳状液，并可包含配方剂，例如：悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。合适的溶液与接受者血液等压，例子有生理盐溶液、林嘉氏溶液和葡萄糖溶液。或者，组合物可为冷冻干粉形式，用于使用诸如无菌、无热原水或生理盐水之类的合适载体来复原。组合物还可制备成微球的形式。这种长效组合物可通过植入（例如皮下或肌肉内）或肌肉内注射给药。

关于本发明组合物的给药，在此文中可互用的术语“个体”、“对象”、“宿主”和“患者”，是指需要诊断、处理或治疗的任何哺乳动物对象。在一个优选实施方式中，个体、对象、宿主或病人是人类。其它对象可包括但不限于牛、马、狗、猫、豚鼠、猪、兔子、大鼠、灵长类和小鼠。

给药安排

通常，此文公开的组合物可以经给药途径测试确定的适当剂量使用，以达到最佳的生理学作用，同时使任何潜在的毒性最小化。可根据不同因素进行选择摄入剂量，所述因素包括年龄、重量、性别、患者的医疗条件、要被治疗的病症的严重程度、给药途径以及患者的肾功能和肝功能。

在获得死亡细菌细胞和治疗剂的浓度在产生最大效力和最小副作用的范围内的最佳精确度时，可能需要一种基于死亡细菌细胞动力学和对靶位点及靶细胞的治疗实用性的方案。当确定治疗方案的最佳浓度时，可能考虑死亡细菌细胞或治疗剂的分散、平衡和消除。当结合使用死亡细菌细胞和治疗剂时，可调整死亡细菌细胞和治疗剂的剂量以达到所需效果。

而且，可使用药动学/药效学模型系统优化组合物的给药剂量。例如，可选择一个或多个剂量方案，并使用药动学/药效学模型来确定所述一个或多个

剂量方案的药动学/药效学曲线。随后，选择其中一个用于给药的剂量方案，该方案根据特定的药动学/药效学曲线获得所需的药动学/药效学反应。参见，例如，WO 00/67776。

具体而言，在数周的过程中，组合物至少每周给药一次。在一种实施方式中，组合物在数周至数月的过程中至少每周给药一次。

更具体地，组合物可至少每天给药一次，并且持续约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31天。或者，组合物可约每隔一天给药一次，每隔2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31天或更长时间给药一次。

或者，组合物可约每隔一周给药一次、约每隔2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周或更长时间给药一次。或者，该组合物可至少每周给药一次，并持续约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周或更长时间。

或者，组合物可每隔一月给药一次，约每隔2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更长时间给药一次。

组合物可按单个每日剂量给药，或按总每日剂量每日分成2次、3次或4次给药。

在给药前给予死亡细菌细胞的方法中，可在给予死亡细菌细胞后的数分钟到数个小时的任何时间给药。或者，可在给予死亡细菌细胞后的数个小时到数天，可能为数个星期直至到数个月的任何时间给药。

更为具体而言，可在给药前至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个小时给予死亡细菌细胞。而且，可在给药前至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31天给予死亡细菌细胞。在另一种实施方式中，可在给药前至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周或更长时间给予死亡细菌细胞。在另一种实施方式中，可在给药前至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月给予死亡细菌细胞。

在另一种实施方式中，在给药后给予死亡细菌细胞。可在给药后数分钟到数个小时的任何时间给予死亡细菌细胞。或者，可在给药后数个小时到数天，可能是数个星期直至数个月的任何时间给予死亡细菌细胞。

实施例

实施例1、死亡细菌被成功地包裹有化疗药物阿霉素。

在胰酪胨大豆肉汤（TSB）中培养鼠伤寒沙门氏菌菌株过夜。随后在100ml的TSB中对所述菌株进行继代培养(1:100)，生长到早期对数期($OD_{600}=0.406$)。通过在TSB琼脂平板上涂布连续稀释液并在过夜培养后进行菌落计数来计数细菌。结果显示，每毫升培养物含有细菌 $\sim 5 \times 10^8$ 个。为杀死细菌细胞，将10ml的培养物与500 μ g/ml的庆大霉素和500 μ g/ml的氯霉素一起培养4小时。取100 μ l样品涂布在TSB琼脂平板上以确认所述细菌细胞已被杀死。

在37 $^{\circ}$ C、1ml的1 \times BSG（缓冲盐凝胶）中将死亡细菌细胞(1×10^9)与60 μ g/ml的阿霉素一起培养2小时。通过6次重复冲洗步骤将过量的药物从细菌细胞洗去，其中所述细胞被以13200rpm离心5分钟，随后在新鲜BSG溶液中重悬。

在存在97mM盐酸-异丙醇（HCl-IPA）的情况下，振荡并超声处理5个循环后，从死亡细菌中提取出阿霉素。样品被稀释在等体积的水溶液中并重复上述5个循环。以13200rpm离心5分钟以沉淀细胞碎片后，收集上清液用于通过HPLC进行药物定量。流动相含有100mM甲酸铵+0.05%三乙胺(pH,3.5)、MQ和MeCN（乙腈），三者比例为28:42:30。固定相含有处于40 $^{\circ}$ C的Lichrosphere RP18柱(MERCK)。通过在480nm时激发并在550nm时发射、使用Shimadzu 10AVP系统、运行版本为7.2的SPL rev B软件(Shimadzu Corporation)来进行检测，所述系统包括自动上样器、溶剂脱气装置、四元泵、管柱加热器(40 $^{\circ}$ C)和荧光检测器。

峰值下方区域内插入了阿霉素的标准曲线，结果显示 $\sim 2\mu$ g的阿霉素被包裹在 1×10^9 个死亡细菌细胞。

实施例2、在携带人乳腺癌异种移植物的裸鼠体内施用EGFR-靶定的、包裹有阿霉素的死亡细菌细胞后的肿瘤退化（regression）/稳定

此实施例证实，双特异性配体靶定的、包裹有阿霉素的完整的死亡细菌细胞可实现在6周龄的无胸腺雌裸鼠上建立的人乳腺癌细胞肿瘤异种移植物的退化。

如在实施例1中所描述的，死亡的鼠伤寒沙门氏菌细胞包裹有化疗药物阿霉素并且通过重复的离心和洗去上清液来去掉游离的内毒素。

具有抗LPS特异性和抗人EGFR特异性的双特异性抗体构建如下：选择抗EGFR单克隆抗体是因为：异种移植的细胞是人乳腺癌细胞MDA-MB-468，已知这种癌细胞在细胞表面过度表达EGF受体。具有抗鼠伤寒沙门氏菌O-抗原特异性和抗EGFR特异性的BsAb如在PCT/US2004/041010中所述的那样构建。简言之，通过将抗鼠伤寒沙门氏菌O-抗原单克隆抗体(MAb) (IgG1; Biodesign)与抗靶细胞表面受体的Mab(即：鼠抗人EGFR (IgG2a; Oncogene))连接而构建双特异性抗体(BsAb)。通过使用纯化的重组蛋白A/G (Pierce Biotechnology)的Fc区将这两个抗体交联。简言之，将蛋白A/G(终浓度为100 μ g/ml)加入0.5 ml含有抗鼠伤寒沙门氏菌O-抗原和抗人EGFR-Mab各20 μ g/ml的预混合溶液中，并在4 $^{\circ}$ C培养过夜。通过与结合有蛋白质G的磁珠一起培养，并室温下轻轻混合40分钟而除去过量抗体。磁珠被磁性分离后，在室温下将蛋白质A/G-BsAb复合物与 10^9 个包裹有阿霉素的死亡细菌细胞一起培养1小时，以通过将O-抗体特异性Fab臂结合至表面LPS而使细胞覆盖有抗体。

在此实施例中使用的小鼠购自动物资源中心 (Animal Resources Centre, Perth, WA, Australia)，且所有的动物实验都遵循实验动物饲养管理及使用规范且获得动物伦理委员会批准。试验在EnGeneIC Pty Ltd (Sydney, NSW, Australia)的经NSW农业部批准的小动物设备上进行。人乳腺癌细胞(MDA-MB-468, ATCC; 人乳腺上皮细胞;非噬菌性的)在组织培养基中生长，直到在37 $^{\circ}$ C、在95%空气和5%CO₂潮湿气氛中，并在含有用5%的小牛血清(GIBCO-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)和谷氨酰胺(Invitrogen) 补给的RPMI 1640培养基的T-75烧瓶中完全汇合。使用23号针头将在50 μ L无血清培养基中的 1×10^6 个细胞与50 μ L生长因子减少的基质胶 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)一起皮下注射至每只小鼠肩胛骨之间。使用数显卡尺(Mitutoyo, Japan, 精确到0.001)每周测量肿瘤2次，

并使用公式：长度 (mm) × 宽度² (mm) × 0.5 = 体积 (mm³) 来计算平均的肿瘤体积。移植16天后，肿瘤体积达到40mm³至70mm³之间，将小鼠随机分为4个不同的小组，每组5只。

实验设计如下：组1（对照组）接受i.v.剂量的100μl的无菌生理盐水。组2（对照组）接受i.v.剂量的游离阿霉素(7 mg/kg小鼠体重)。组3（对照组）接受1×10⁸/剂量的、包裹有阿霉素的死亡细菌（死亡的鼠伤寒沙门氏菌_{DOX}）。组4（实验组）接受1×10⁸/剂量的EGFR-靶定的、包裹有阿霉素的死亡细菌（^{EGFR}死亡鼠伤寒沙门氏菌_{DOX}）。所有剂量由i.v.途径给药，且在第21天、28天和34天给药。

结果显示（图1），与三个对照组相比，^{EGFR}死亡鼠伤寒沙门氏菌_{DOX}在实现肿瘤退化/稳定方面具有非常高的效率。

实施例3、在携带人结肠癌异种移植物的裸鼠中静脉内施用EGFR-靶定的、包裹有紫杉醇或包裹有siRNA-纺锤体驱动蛋白的死亡细菌细胞后的抗肿瘤作用

此实施例考虑的是，包裹有紫杉醇或siRNA的完整的死亡细菌细胞是否可以抑制人结肠癌细胞肿瘤在体内的生长。

使用在实施例1中描述的方法，死亡的鼠伤寒沙门氏菌细胞被包裹有化疗药物紫杉醇，并通过重复离心和洗去上清液来去掉游离的内毒素。

抗纺锤体驱动蛋白（KSP）的siRNA被单独地包裹在死亡的鼠伤寒沙门氏菌菌株中。KSP，也称驱动蛋白-5或Eg5，是有丝分裂期间两级纺锤体形成和姐妹染色体正常分离的必不可少的微管驱动蛋白 (Enos 和 Morris, 1990; Blangy 等, 1995; Dagenbach 和 Endow, 2004)。抑制KSP导致形成单极有丝分裂纺锤体、激活纺锤体组装检控点，并使细胞停止在有丝分裂期，这将导致随后的细胞死亡 (Blangy 等, 1995; Mayer 等, 1999; Kapoor 等, 2000; Tao 等, 2005)。合成KSP- siRNA双链寡核苷酸序列（正义链：5'-AAC TGG ATC GTA AGA AGG CAG-3'），并通过将1×10¹⁰个细菌与1μm的siRNA-KSP一起培养而将其包裹进入死亡鼠伤寒沙门氏菌菌株中。共培养在37℃、在1×磷酸缓冲液(PBS) (Gibco)中进行12个小时，伴随温和的混合。包裹后，通过在16,200×g离心10分钟而沉淀细菌并用1×PBS冲洗2次。在1×PBS中洗涤细菌细

胞2次以除去过量的未被包裹的siRNA-KSP。

具有抗LPS特异性和抗人EGFR特异性的双特异性抗体按实施例2中所描述的那样构建。

在此实施例中使用的小鼠购自动物资源中心（Animal Resources Centre, Perth, WA, Australia），且所有的动物实验都遵循实验动物饲养管理及使用规范且获得动物伦理委员会批准。试验在EnGeneIC Pty Ltd (Sydney, NSW, Australia)的经NSW农业部批准的小动物设备上进行。人结肠癌细胞(HCT116, ATCC)在组织培养基中生长，直到在37℃、在95%空气和5%CO₂潮湿气氛中，在含有用5%小牛血清(GIBCO-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)和谷氨酰胺(Invitrogen) 补给的RPMI 1640培养基的T-75烧瓶中完全汇合。使用23号针头将在50μL无血清培养基中的1×10⁶个细胞与50μL生长因子减少的基质胶（BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)一起皮下注射至Balb/c无胸腺小鼠(n=8只小鼠每组)的肩胛骨之间。使用数显卡尺(Mitutoyo, Japan, 精确到0.001)每周测量肿瘤2次，并使用公式：长度(mm)×宽度²(mm)×0.5=体积(mm³)来计算平均的肿瘤体积。移植16天后，肿瘤体积达到~200 mm³，将小鼠随机分为4个不同的小组，每组8只。

实验设计如下：组1（对照组）接受i.v.剂量的100μL的无菌生理盐水。组2（对照组）是不携带任何治疗性负载物的EGFR靶定的死亡鼠伤寒沙门氏菌(G2; ^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌)。组3(实验组)是包裹有化疗药物紫杉醇的EGFR靶定的死亡鼠伤寒沙门氏菌(G3; ^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{紫杉醇})。组4（实验组）是包裹有抗纺锤体驱动蛋白的siRNA的EGFR靶定的死亡鼠伤寒沙门氏菌 (G4; ^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{siRNA-KSP})。每星期进行3次治疗。

结果显示（图2），与两个对照组相比，两种治疗，即^{EGFR}死亡鼠伤寒沙门氏菌_{紫杉醇}和^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{siRNA-KSP}，均显示出相当大的抗肿瘤作用。因此，数据证实了包裹有紫杉醇或siRNA的完整死亡细菌细胞抑制人结肠细胞肿瘤在体内的生长。

实施例4、双重治疗的使用，其包括受体靶定的死亡细菌介导的shRNA，随后为受体靶定的死亡细菌介导的药物递送。

为证实受体靶定的死亡细菌能够在体内逆转在癌细胞中的抗药性，我们

对Balb/c无胸腺小鼠进行了如下研究。对于异种移植细胞，我们使用人结肠癌细胞系Caco-2，该细胞系对用于结肠癌的一线化疗药物（例如伊立替康和5-氟尿嘧啶（5-FU））具有非常大的抗性。

使用在实施例1中所描述的方法，使鼠伤寒沙门氏菌死亡细菌包裹有化疗药物伊立替康或5-FU。通过在13,200 rpm将细菌细胞离心10分钟，而洗去非特异性结合至死亡细菌外表面的过量的伊立替康或5-FU，并将洗涤后的细胞在新鲜的1×PBS中重悬。重复该洗涤步骤。

如之前实施例中所描述的，包裹有伊立替康或5-FU的死亡鼠伤寒沙门氏菌细胞通过抗O-多糖/抗EGFR双特异性抗体结合至细菌细胞表面而靶定至EGFR。选择抗EGFR单克隆抗体是因为已知异种移植细胞，Caco-2，在细胞表面过量表达EGFR（Nyati等,2004）。EGFR靶定的、包裹有药物的死亡细菌被标记为^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{5-FU}和^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{伊立替康}。

携带编码抗MDR1 shRNA序列的质粒的重组鼠伤寒沙门氏菌菌株按如下方法产生。在本研究中使用的MDR-1 shRNA序列(5'-TCGAAAGAAACCAACTGTCAGTGTAgagtactgTACACTGACAGTTGGTTTCTT TTTTT-3')在Wu等,2003中有描述。合成shRNA序列并亚克隆至质粒IMG-800(Imgenex Corp., San Diego, CA, USA)中，使得该序列可从质粒U6启动子开始表达。该质粒携带复制的pUC起始位点，该起始位点使得能在细菌细胞产生高质粒拷贝数。将重组质粒测序以确保shRNA序列是正确的并确保位于从U6启动开始的表达框内。重组质粒被转化进入鼠伤寒沙门氏菌，且将重组菌株标记为鼠伤寒沙门氏菌_{shRNA-MDR1}。EGFR靶定的鼠伤寒沙门氏菌_{shRNA-MDR1}是通过将抗O-多糖/抗EGFR双特异性抗体结合至重组细菌的表面而产生^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{shRNA-MDR1}而构建的。

不同的小鼠组（每组5只小鼠）接受如下治疗：组1（对照组）为无菌生理盐水；组2（对照组）为^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{shRNA-MDR1}；组3（对照组）为EGFR靶定的、包裹有5-FU的死亡细菌（^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{5-FU}）；组4（实验组）为^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{shRNA-MDR1}及随后的^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{5-FU}；组5（对照组）为EGFR靶定的、包裹有伊立替康的死亡细菌（^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{伊立替康}）；组6（实验组）为^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{shRNA-MDR1}及随后的^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{伊立替康}。组2至组6接受 1×10^9 个细菌细胞，并且所有的治疗都是静

脉内治疗。

结果显示(图3),如预期的一样,Caco-2细胞在用^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌伊立替康、^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{5-FU}和^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{shRNA-MDR1}处理后仍具有抗性。接受了双重治疗,即^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{shRNA-MDR1}及随后的^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌伊立替康(G6小鼠)或^{EGFR}鼠伤寒沙门氏菌_{5-FU}(G4小鼠)的细胞显示了抗药性和肿瘤退化的非常大的逆转。数据证实,双重治疗方案,例如受体靶定的死亡细菌介导的shRNA递送及随后的受体靶定的死亡细菌介导的化疗药物递送,在逆转非噬菌性哺乳动物细胞内的抗药性方面具有高度有效。

参考文献

所有在本说明书中提到的出版物和专利都通过引用合并至此文中。但是,引用出版物或专利并非承认其为现有技术。

Akporiaye, E.T. & Hersh, E. Clinical aspects of intratumoral gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 443-453 (1999).

Ambudkar, et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 361 (1999).

Batra RK, Wang-Johanning F, Wagner E, Garver RI Jr, Curiel DT. Receptor-mediated gene delivery employing lectin-binding specificity. *Gene Ther.* 1994 Jul;l(4):255-60.

Becker CM, Farnebo FA, Iordanescu I, Behonick DJ, Shih MC, Dunning P, Christofferson R, Mulligan RC, Taylor GA, Kuo CJ, Zetter BR. Gene therapy of prostate cancer with the soluble vascular endothelial growth factor receptor Flk 1. *Cancer Biol Ther.* 2002 Sep-Oct;l(5):548-53.

Bergey's Manual of Systematic Bioloty, 2nd ed., Springer-Verlag, 2001.

Blangy, A., Lane, H.A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., Nigg, E.A. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83: 1159-1169 (1995).

Boucher, R.C., Pickles, R.J., Rideout, J.L., Pendergast, W. & Yerxa, B.R. Targeted gene transfer using G protein coupled receptors. *U.S. patent application.* US 2003/004123 A1 . Jan 2, 2003.

Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J., Wiley, D.C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371: 37— 43 (1994).

Caplen, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 3(4): 575-86 (2003).

Caplen and Mousses, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1002: 56-62 (2003).

Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001 Nov; 1(2): 118-29.

Ciliberto *et al.*, "Cell-specific expression of a transfected human alpha 1- antitrypsin gene," *Cell*. 41 : 531 (1985).

Chen, L.M., Kaniga, K., Galan, J.E. Salmonella spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol. Microbiol.* 21: 1101-1115 (1996).

Chen, D., Murphy, B.s Sung, R., Bromberg, J.S. Adaptive and innate immune responses to gene transfer vectors: role of cytokines and chemokines in vector function. *Gene Ther*, 10: 991-998 (2003).

Clark, P.R. & Hersh, E.M. Cationic lipid-mediated gene transfer: current concepts. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1: 158- 176 (1999).

Collins & Olive, 32 *Biochem.* 2795-99 (1993).

Curiel *et al.*, "Long-term inhibition of clinical and laboratory human immunodeficiency virus strains in human T-cell lines containing an HIV -regulated diphtheria toxin A chain gene," *Hum. Gene Ther.* 4: 741 (1993).

Dagenbach, E.M., and Endow, S.A. A new kinesin tree. *J. Cell Sci.* 117: 3-7 (2004).

Dang, L.H., Bettegowda, C, Huso, D.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 15155-15160 (2001).

de Haard, H. J. *et al.* A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol. Chem.* 274, 18218-18230 (1999).

de Jong, G., Telenius, A., Vanderbyl, S., Meitz, A., Drayer, J. Efficient *in-vitro* transfer of a 60-Mb mammalian artificial chromosome into murine and hamster cells using cationic lipids and dendrimers. *Chromosome Res.* 9: 475-485 (2001).

Dinges *et al.*, "HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene confers long-term protection against HIV type 1 infection in the human promonocytic cell line U937," *Hum. Gene Ther.* 6: 1437 (1995).

Dow, S.W., Fradkin, L.G., Liggitt, D.H., Willson, A.P., Heath, T.D., Potter, T.A. Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously. *J. Immunol.* 163: 1552—1561 (1999).

Dramsai, S. & Cossart, P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14: 137-166 (1998).

Duan *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics*, 3(7): 833-38 (2004).

Dubel S, Breitling F, Kontermann R, Schmidt T, Skerra A, Little M. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). *J. Immunol. Methods* (1995) 178, 201-209.

Dunham, S.P. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine, *Res. Vet. Sci.* 73: 9-16 (2002).

Duxbury *et al.*, *J. Am. Coll. Surg.*, 198: 953-59 (2004).

El Ouahabi, A., Thiry, M., Fuks, R., Ruyschaert, J. & Vandenbranden, M. The role of the endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett.* 414: 187- 192 (1997).

Enos, A. P., and Morris, N.R. Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. *Cell* 60: 1019-1027 (1990).

Essani, K. & Dales, S. Biogenesis of vaccinia: evidence for more than 100 polypeptides in the virion. *Virology* 95; 385-394 (1979).

Farhood, H., Serbina, N. & Huang, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1235: 289-295 (1995).

Fasbender, A., Marshall, J., Moninger, T.O., Grunst, T., Cheng, S. & Welsh, MJ. Effect of co-lipids in enhancing cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 4: 716-725 (1997).

Felgner, P.L., Ringold, G.M. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337: 387-388 (1989).

Ferrari, S., Griesenbach, U., Geddes, D.M., Alton, E. Immunological hurdles to lung gene therapy. *Clin Exp Immunol*, 132: 1-8 (2003).

Finlay, B. B. & Cossart, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276: 718-25 (1997).

Fox, M.E., Lernmon, M.J., Mauchline, M.L, *et al.* Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered Clostridia. *Gene Therapy*..3: 173—178 (1996).

Frain *et al.*, "Binding of a liver-specific factor to the human albumin gene promoter and enhancer," *Mol. Cell Biol.* 10: 991 (1990).

Galan, J.E. Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 209: 43-60 (1996).

Gao, H., Shi, W. & Freund, L.B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 9469-9474 (2005).

Gerlowski, L. & Jain, R. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc. Res.* 31: 288-305 (1986).

Glennie MJ, McBride HM, Worth AT, Stevenson GT. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J Immunol.* 1987 Oct 1;139(7):2367-75.

Gosselin MA, Lee RJ. Folate receptor-targeted liposomes as vectors for therapeutic agents. *Biotechnol Annu Rev.* 2002;8: 103-31

Greber, U.F., Webster, P., Weber, J. & Helenius, A. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells, *EMBO J.* 15: 1766— 1777 (1996).

Green, N.K. & Seymour, L.W. Adenoviral vectors: systemic delivery and tumor targeting. *Cancer Gene Ther.*: 9: 1036-1042 (2002).

Griffiths, A. D. *et al.* Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 13, 3245-3260 (1994).

Guerrier-Takada *et al.*, *Cell*, 35: 849 (1983).

Hafez, I.M., Maurer, N. & Cullis, P.R. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.* 8: 1188-1196 (2001).

Hampel and Tritz, *Biochem.*, 28: 4929 (1989).

Hampel *et al.*, *Nucleic Acids Research*: 299 (1990)

Hanahan, Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. 1985 May 9-15; 315(6015): 115-122.

Harrison *et al.*, "Inhibition of human immunodeficiency virus- 1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene," *Hum. Gene Ther.* 3: 461 (1992a).

Harrison *et al.*, "Inhibition of HIV production in cells containing an integrated, HIV- regulated diphtheria toxin A chain gene," *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 39 (1992b).

Hart, "Tissue specific promoters in targeting systematically delivered gene therapy," *Semin. Oncol.* 23: 154 (1996).

Heim *et al.*, "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein," *Proc. Nat 'I. Acad. Sci. USA* 91: 12501 (1994).

Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P. and Jain, R.K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4607-4612 (1998).

Hoshida T, Sunamura M, Duda DG, Egawa S, Miyazaki S, Shineha R, Hamada H, Ohtani H, Satomi S, Matsuno S. Gene therapy for pancreatic cancer using an adenovirus vector encoding soluble flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Pancreas.* 2002 Aug;25(2):11-21.

Hu, S, L Shively, A Raubitschek, M Sherman, LE Williams, JY Wong, JE Shively, and AM Wu. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res.* 1996 56: 3055-3061.

Hudson, PJ. & Souriau, C. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin. Biol Ther.* 1, 845-855 (2001).

Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med.* 2003 Jan;9 (1):129-34.

Hung MC, Hortobagyi GN, Ueno NT. Development of clinical trial of E 1 A gene therapy targeting HER-2/neu-overexpressing breast and ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2000;465 :171-80.

Jain, R.K. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev.* 6: 559-593 (1987).

Jain, R.K. Delivery of molecular medicine to solid tumors. *Science* 271 : 1079-1080 (1996).

Jain, R.K. The Eugene M. Landis Award Lecture 1996: Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Microcirculation* 4: 1-23 (1997).

Jain, R.K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *J. Control. Release* 53, 49-67 (1998).

Jain, R.K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46: 149-68 (2001).

James, M.B., Giorgio, T.D. Nuclear-associated plasmid, but not cell- associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. *Mol. Ther.* 1 : 339-346 (2000).

Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J-, Neuberger, M. S. & Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525 (1986).

Kaetzel CS, Blanch VJ, Hempen PM, Phillips KM, Piskurich JF, Youngman KR The polymeric immunoglobulin receptor: structure and synthesis. *Biochem Soc Trans* 25:475^80 (1997).

Kanke, M., Sniecinski, L., & DeLuca, P.P. Interaction of microspheres with blood constituents. I. Uptake of polystyrene spheres by monocytes and granulocytes and effect on immune responsiveness of lymphocytes. *J. Parenter. Sci. Technol.* 37: 210-217 (1983).

Kapoor, T.M., Mayer, T.U., Coughlin, M.L., Mitchison, T.J. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* 150: 975-988 (2000).

Karpovsky B, Titus JA, Stephany DA, Segal DM. Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J Exp Med.* 160:1686-701 (1984).

Katabi *et al.*, "Hexokinase Type II: A Novel Tumor Specific Promoter for Gene-Targeted Therapy Differentially Expressed and Regulated in Human Cancer Cells," *Human Gene Therapy* 10: 155 (1999).

Kelsey *et al.*, "Species- and tissue-specific expression of human alpha 1- antitrypsin in transgenic mice," *Genes and Devel.* 1: 161 (1987).

Kerem *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis," *Science* 245: 1073 (1989).

King, I., et al. Tumor-targeted Salmonella expressing cytosine deaminase as an anticancer agent. *Hum. Gene Ther.* 13: 1225 - 1233 (2002).

Kleeff J, Fukahi K, Lopez ME, Friess H, Buchler MW, Sosnowski BA, Korc M. Targeting of suicide gene delivery in pancreatic cancer cells via FGF receptors. *Cancer Gene Ther.* 2002 Jun;9(6):522-32.

Klemm, A.R. Effects of polyethylenimine on endocytosis and lysosome stability. *Biochem. Pharmacol.* 56: 41-6 (1998).

Knappik, A. *et al.* Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* 296, 57-86 (2000).

Konerding, M.A., Miodonski, A.J., Lametschwandtner, A. Microvascular corrosion casting in the study of tumor vascularity: a review. *Scanning Microsc.* 9: 1233-1243 (1995).

Kostelny SA, Cole MS, Tso JY. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol.* 1992 Mar 1;148(5): 1547-53.

Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., Scherman, D., Crouzet, J., Pitard, B. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res.* 27: 3792-3798 (1999).

Kurane *et al.*, "Targeted Gene Transfer for Adenocarcinoma Using a Combination of Tumor specific Antibody and Tissue-specific Promoter," *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 1212 (1998).

Leder *et al.*, "Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development, " *Cell* 45: 485 (1986).

Lee, K-D, OhY, Portnoy, D, *et al.*, Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* 271: 7249-7252 (1996).

Lee, C. H., Wu, C. L., and Shiau, A. L. (2005a). Endostatin gene therapy delivered by *Salmonella choleraesuis* in murine tumor models. *J. Gene Med.* 6: 1382 - 1393.

Lee, C. H., Wu, C. L., and Shiau, A. L. (2005b). Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* carrying thrombospondin-1 gene leads to tumor- specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model. *Cancer Gene Ther.* 12: 175 — 184.

Lemmon, M.J., van Zijl, P., Fox, M.E., *et al.*, Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. *Gene Therapy.* 8: 791-796 (1997).

Less, J.R., Skalak, T.C., Sevick, E.M., Jain, R.K. Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. *Cancer Res.* 51 : 265-273 (1991).

Less, J.R., Posner, M.C., Boucher, Y., Borochoviz, D., Wolmark, N., Jain, R.K. Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors. *Cancer Res.* 52: 6371- 6374 (1992).

Less, J.R., Posner, M.C., Skalak, T.C., Wolmark, N., Jain, R.K Geometric resistance and microvascular network architecture of human colorectal carcinoma. *Microcirculation* 4: 25-33 (1997).

Li, X., Fu, G-F., Fan, Y-R., *et al.* Bifidobacterium adolescentis as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor

growth. *Cancer Gene Ther.* 10: 105-111 (2003).

Liu, Q., Muruve, D.A. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther.* 10: 935-940 (2003).

Liu, S-C, Minton, N.P., Giaccia, A.J., Brown, J.M. Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis. *Gene Ther.* 9: 291-296 (2002).

Lorenzi, G.L., Lee, K.D. Enhanced plasmid DNA delivery using anionic LPDII by listeriolysin O incorporation. *J. Gene Med.* 7: 1077-1085 (2005).

Low KB Ittensohn M, Le T, *et al.* Lipid A mutant Salmonella with suppressed virulence and TNF induction retain tumor-targeting in vivo. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 37-41.

Luo X, Li Z, Lin S, *et al.* Antitumor effect of VNP20009, an attenuated Salmonella, in murine tumor models. *Oncol Res.* 2001 ;12:501— 508.

MacDonald *et al.*, "Expression of the pancreatic elastase I gene in transgenic mice," *Hepatology* 7: 425 (1987).

Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul* 41 : 189-207 (2001).

Maeda, H. & Matsumura, Y. Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *CnY. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6, 193-210 (1989).

Marsh, M. & A.M. Helenius, A.M. Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res.* 36: 107- 151 (1989).

Marshall. Carcinoembryonic antigen-based vaccines. *Semin. Oncol.* 2003 Jun.; 30 (3 Suppl. 8): 30-36.

Mason *et al.*, "The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy," *Science* 234: 1372 (1986).

Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L., Mitchison, T.J. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*

286: 971-974 (1999).

Menard, R., Dehio, C. & Sansonetti, P.J. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol.* 4: 220-226 (1996).

Meyer, K., Uyechi, L.S. & Szoka, F.C.J. Manipulating the intracellular trafficking of nucleic acids, in: K.L. Brigham (Ed.), *Gene Therapy for Diseases of the Lung*, Marcel Dekker Inc, New York, pp. 135-180 (1997).

Minton, N.P., Mauchline, M.L., Lemmon, M.J. et al. Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores. *FEMS Microbiol. Rev.* 17: 357-364 (1995).

Monack, D.M., Raupach, B., Hromockyj, A.E., Falkow, S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9833-9838 (1996).

Morton & Potter, "Rhabdomyosarcoma-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene confers sensitivity to ganciclovir," *J. Pharmacology & Exper. Therapeutics* 286: 1066 (1998).

Mui, B., Ahkong, Q., Chow, L. & Hope, M. Membrane perturbation and the mechanism of lipid-mediated transfer of DNA into cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1467: 281-292 (2000).

Nakai, T., Kanamori, T., Sando, S. & Aoyama, Y. Remarkably size-regulated cell invasion by artificial viruses. Saccharide-dependent self-aggregation of glycoviruses and its consequences in glycoviral gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 8465-8475 (2003).

Nettelbeck, D.M., Miller, D.W., Jerome, V., Zuzarte, M., Watkins, S.J., Hawkins, R.E., Muller, R. & Kontermann, R.E. Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD105). *Mol. Ther.* 3: 882-891 (2001).

Nieth et al., *FEBS Letters*, 545: 144-50 (2003).

Nuyts S, Mellaert IV, Theys J, Landuyt W, Lambin P, Anne J. Clostridium spores for tumor-specific drug delivery. *Anti-Cancer Drugs*. 2002a;13:115—125.

Nuyts S, Van Mellaert L, Theys J, et al. Radio-responsive recA promoter significantly increases TNF α production in recombinant Clostridia after 2 Gy irradiation. *Gene Therapy*. 2002b;8: 1197-1201.

Ogris. M. & Wagner, E. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discovery Today* 7: 479-485 (2002).

Osaki, F., Kanamori, T., Sando, S., Sera, T. & Aoyama, Y. A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 6520-6521 (2004).

Osbourn, J., Jermutus, L., Duncan, A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Drug Delivery Tech* 8: 845-851 (2003).

Pack P, Pluckthun A. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1992 Feb 18;31(6): 1579-84.

Paglia P, Terrazzini N, Schulze K, Guzman CA, Colombo MP. *In vivo* correction of genetic defects of monocyte/macrophages using attenuated *Salmonella* as oral vectors for targeted gene delivery. *Gene Ther* 2000; 7: 1725-1730.

Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res.* 1997;57:4537-4544.

Pawelek J, Low KB, Bermudes D. Bacteria as tumourtargeting vectors. *Lancet Oncol Rev.* 2003;4:548-556.

Perrotta and Been, *Biochem.*, 31: 16 (1992).

Peterson HI, Appelgren L: Tumour vessel permeability and transcapillary exchange of large molecules of different size. *Bibl Anat* 1911, 15:262—265.

Pikaar et al., *J. Infect. Dis.* 172: 481 (1995).

Pinkert *et al*, "An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice," *Genes and Devel.* 1 : 268 (1987).

Plait J, Sodi S, Kelley M, *et al*. Antitumour effects of genetically engineered *Salmonella* in combination with radiation. *Eur J Cancer.* 2000;36:2397-2402.

Prasher *et al.*, "Using GFP to see the light," *Trends in Genetics* 11: 320 (1995).

Ragheb *et al.*, "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Tat/Rev-regulated expression of cytosine deaminase, interferon alpha2, or diphtheria toxin compared with inhibition by transdominant Rev," *Hum. Gene Ther.* 10: 103 (1999).

Readhead *et al.*, "Myelin deficient mice: expression of myelin basic protein and generation of mice with varying levels of myelin," *Cell* 48: 703 (1987).

Ridgway JB, Presta LG, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* 1996 Jul; 9(7) :617-21.

Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-327 (1988).

Riezman, *Trends in Cell Biology*, 3: 330 (1993).

Riordan *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA," *Science* 245: 1066 (1989).

Rommens *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping," *Science* 245: 1059 (1989).

Rosenberg, S.A., Spiess, P.M., and Kleiner, D.E. Antitumour effects in mice of the intravenous injection of attenuated *Salmonella typhimurium*. *J. Immunother.* 25: 218-225 (2002).

Rossi *et al.*, *Aids Research and Human Retroviruses*, 8: 183 (1992)

Ruiz, F.E., Clancy, J.P., Perricone, M.A., Bebok, Z., Hong, J.S., Cheng, S.H., Meeker, D.P., Young, K.R., Schoumacher, R.A., Weatherly, M.R., Wing, L., Morris, J.E., Sindel, L., Rosenberg, M., van Ginkel, F.W., McGhee, J.R., Kelly, D., Lyrene, R.K., Sorscher, E.J. A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum. Gene Ther.* 12: 751— 761 (2001).

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanxio N. Epidermal growth factor- related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995, 19, 183-232.

Sandvig & Deurs, *Trends in Cell Biology*, 4: 275 (1994).

Saville & Collins, *Cell*, 61: 685-96 (1990).

Saville & Collins, *PNAS (USA)*, 88: 8826-30 (1991).

Scheule, R.K. The role of CpG motifs in immunostimulation and gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 44: 119-134 (2000).

Seth, P., Willingham, M.C. & Pastan, I. Binding of adenovirus and its external proteins to Triton X-114. Dependence on pH. *J. Biol. Chem.* 260: 14431— 14434 (1985).

Seymour, L.W. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9, 135-187 (1992).

Shangara *et al.*, "Suicide genes: past, present and future perspectives," *Immunology Today* 21: 48 (2000).

Shaw & Griffen, *Nature* 289: 409 (1981).

Sheets, M. D. *et al.* Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 6157-6162 (1998).

Simoes, S., Pedro, P., Duzgunes, N. & Pedrosa de Lima, M. Cationic liposomes as gene transfer vectors: barriers to successful application in gene therapy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1 : 147- 157 (1999).

Singh, Transferrin as a targeting ligand for liposomes and anticancer drugs. *Curr Pharm Des.* 1999 Jun; 5(6):443-51.

Siould, "Therapeutic siRNAs," *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(1): 22-28 (2004).

Soghomonyan, S.A., Doubrovin, M., Pike, J., Luo, X., Ittensohn, M., Runyan, J.D., Balatoni, J., Finn, R., Tjuvajev, J.G., Blasberg, R., and Bermudes, D. Positron emission tomography (PET) imaging of tumor-localized *Salmonella* expressing HSV1-TK. *Cancer Gene Ther.* 12: 101-108 (2005).

Sonawane, N., Szoka, F.J. & Verkman, A. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* 278: 44826-44831 (2003).

Speert *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 82: 872 (1988).

Spencer, "Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications," *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2: 433-440 (2000).

Stein, B.S., Gowda, S.D., Lifson, J.D., Penhallow, R.C., Bensch, K.G., Engleman, E.G. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane, *Cell* 49: 659- 668 (1987)

Stockert. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev.* 1995 Jul; 75(3):591-609.

Swanson, J. A. & Watts, C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5: 424-428 (1995).

Swift *et al.*, "Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase I gene in transgenic mice," *Cell* 38: 639 (1984).

Tabata, Y., & Ikada, Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of l-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 22: 837-858 (1988).

Tachibana, R., Harashima, H., Ide, N., Ukitsu, S., Ohta, Y., Suzuki, N., Kikuchi, H.5 Shinohara, Y., Kiwada, H. Quantitative analysis of correlation between number of nuclear plasmids and gene expression activity after transfection with cationic liposomes. *Pharm. Res.* 19: 377-381 (2002).

Tao, W., South, VJ., Zhang, Y., Davide, J.P., Farrell, L., Kohl, N.E., Sepp- Lorenzino, L., Lobell, R.B. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* 8: 49-59 (2005).

Theys, J., Landuyt, W., Nuyts, S., *et al.* Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by engineered *Clostridium acetobutylicum*. *Cancer Gene Ther.* 8: 294-297 (2001).

Thurnher M, Wagner E, Clausen H, Mechtler K, Rusconi S, Dinter A5 Birnstiel ML, Berger EG, Cotten M. Carbohydrate receptor-mediated gene transfer to human T leukaemic cells. *Glycobiology.* 1994 Aug;4(4):429-35.

Todorovska, A. *et al.* Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer

targeting. *J. Immunol. Methods* 248, 47—66 (2001).

Tomlinson, I. & Holliger, P. Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. *Methods Enzymol.* 326, 461-479 (2000).

Vaughan, T. J. et al. Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature Biotechnol.* 14, 309-314 (1996).

Vaughan, T. J., Osbourn, J. K. & Tempest, P. R. Human antibodies by design. *Nature Biotechnol.* 16, 535-539 (1998).

Verhoeyen, M., Milstein, C. & Winter, G. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* 239, 1534—1536 (1988).

Wakimoto, H., Johnson, P.R., Knipe, D.M., Chiocca, E.A. (2003) Effects of innate immunity on herpes simplex virus and its ability to kill tumor cells. *Gene Ther.* 10: 983-990 (2003).

Warren, B.A. The vascular morphology of tumors. *Tumor Blood Circulation: Angiogenesis, Vascular Morphology and Blood Flow of Experimental and Human Tumors.* Edited by Peterson H-I. Boca Raton, CRC Press, Inc., pp 1—48 (1979).

Wattiaux, R., Laurent, N., Wattiaux-De Coninck, S. & Jadot, M. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41 : 201-208 (2000).

Weiss. S. & Chakraborty, T. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 467—472 (2001).

Whitmore, M., Li, S., Huang, L. LPD lipopolyplex initiates a potent cytokine response and inhibits tumor growth. *Gene Ther.* 6: 1867-1875 (1999).

Whitmore, M.M., Li, S., FaIo5 L., Jr, Huang, L. Systemic administration of LPD prepared with CpG oligonucleotides inhibits the growth of established pulmonary metastases by stimulating innate and acquired antitumor immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 503—514 (2001).

Wickham, T.J., Segal, D.M., Roelvink, P.W., Carrion, M.E., Lizonova, A., Lee, G.M. & Kovesdi, I. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J. Virol.* 70: 6831-6838 (1996).

Wright & Jong, *Experimental Medi.*, 163: 1245 (1986).

Wrobel, I. & Collins, D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1235: 296- 304 (1995).

Wu, *et al.*, *Cancer Res.*, 63: 1515-19 (2003).

Xu, Y. & Szoka, F.C. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochem. J.* 35: 5616- 5623 (1996).

Yague *et al.*, *Gene Therapy*, 11 : 1170-74 (2004).

Yamada, H., Matsumoto, S., Matsumoto, T., Yamada, T., and Yamashita, U. Murine IL-2 secreting recombinant Bacillus Calmette-Guerin augments macrophage mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2. *J. Urol.* 164: 526 — 531 (2000).

Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: Selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther.* 2000;7:269-274.

Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, *et al.* *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;66: 165-170.

Yazawa *et al.*, "Current progress in suicide gene therapy for cancer," *World J. Surg.* 26: 783 (2002).

Yew, N.S., Wang, K.X., Przybylska, M., Bagley, R.G., Stedman, M., Marshall, J., Scheule, R.K., Cheng, S.H. Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum. Gene Ther.* 10: 223-234 (1999).

Yu, Y. A., Shabahang, S., Timiryasova, T.M., *et al.* Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light- emitting proteins. *Nat. Biotechnol.* 22: 313-320 (2004).

Yuan, F., Leunig, M., Huang, S.K., Berk, D.A., Papahadjopoulos, D. & Jain, R.K. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res.* 54, 3352-3356 (1994).

Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D., Torchillin, V. & Jain, R. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 55: 3752-3756 (1995).

Yuhua, L., Kunyuan, G., Hui, C5 et al. Oral cytokine gene therapy against murine tumor using attenuated *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Cancer* 94: 438-443 (2001).

Zelphati, O. & Szoka, F. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm. Res.* 13: 1367— 1372 (1996).

Zelphati, O. & Szoka, F. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 93: 11493- 11498 (1996).

Zhao, Y., Zhu, L., Lee, S., Li, L., Chang, E., Soong, N.W., Douer, D. & Anderson, W.F. Identification of the block in targeted retroviral-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4005-4010 (1999).

Zhou, X., Mantis, N., Zhang, X.R., Potoka, D.A., Watkins, S.C., and Ford, H.R. *Salmonella typhimurium* induces apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Microbiol Immunol.* 44: 987-995 (2000).

Ziady AG5 Perales JC, Ferkol T, Gerken T, Beegen H, Perlmutter DH, Davis PB. Gene transfer into hepatoma cell lines via the serpin enzyme complex receptor. *Am J Physiol.* 1997 Aug; 273(2 Pt 1):G545-52.

WO 81/01145

WO 88/07378

WO 95/21191

WO 00/67776

U.S. Patent No. 4,975,278

U.S. Patent No. 4,987,071

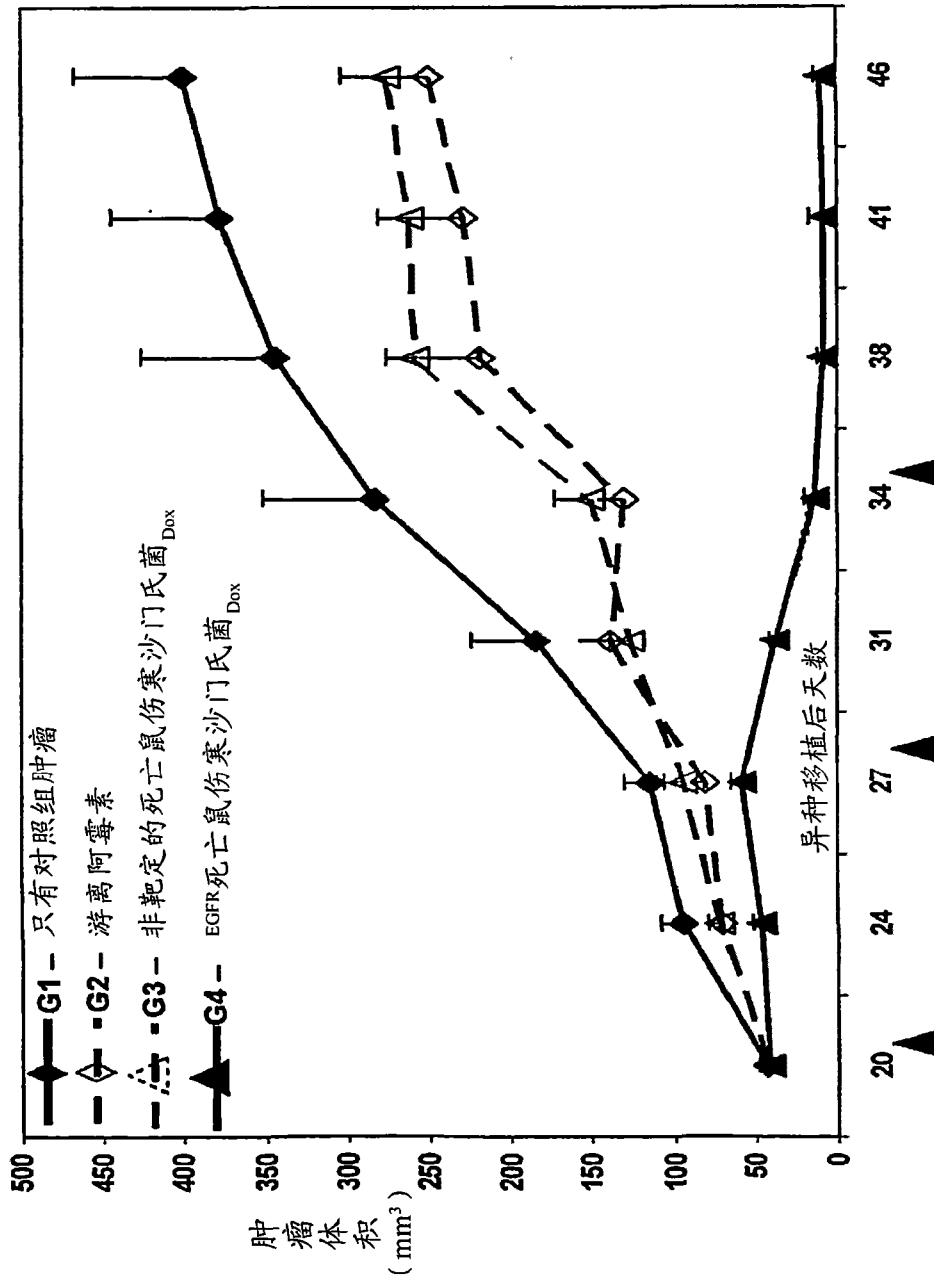


图 1

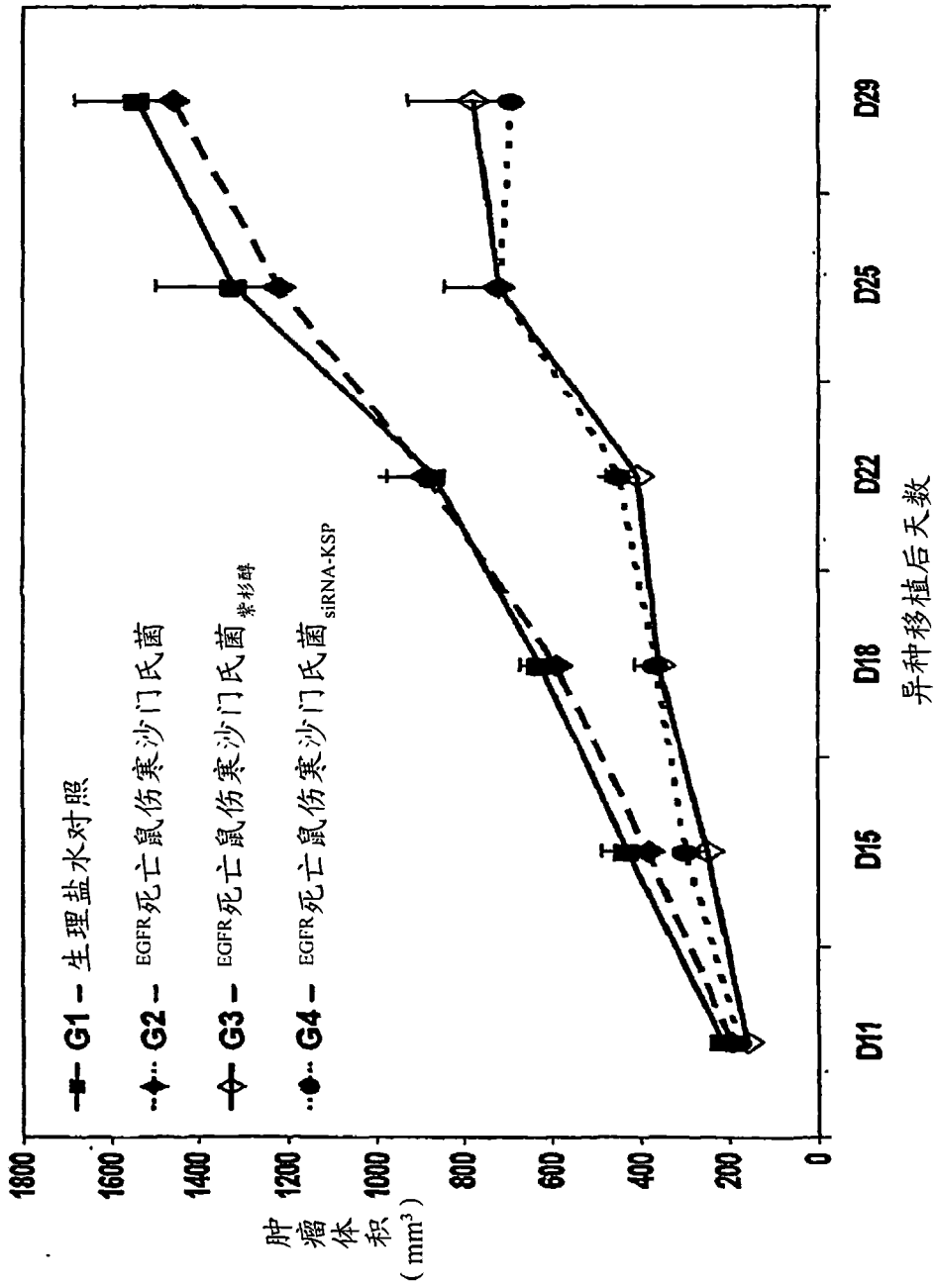


图 2

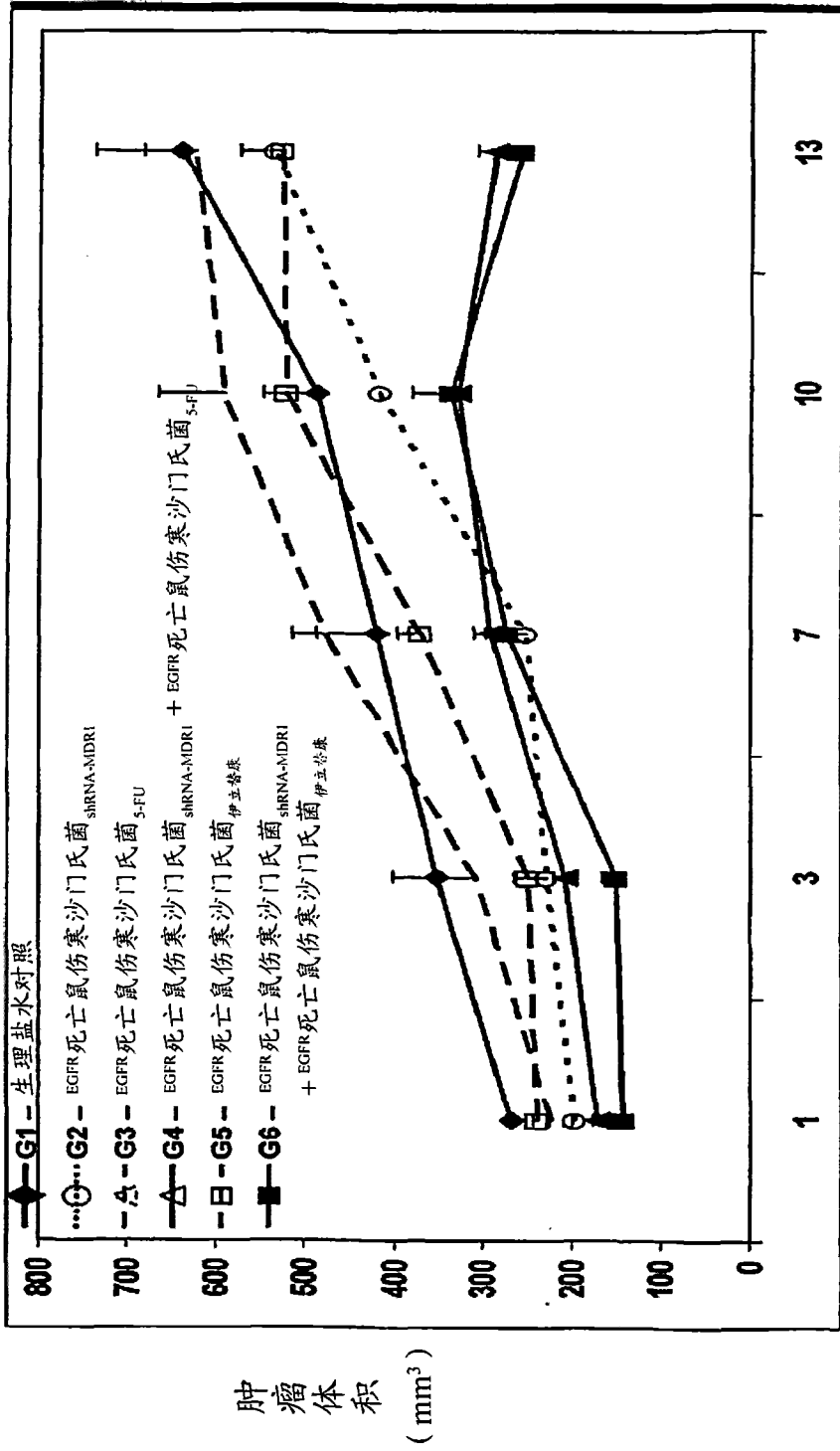


图 3