

# 海洋微生物中抗肿瘤肽活性的分离鉴定

---

## 海洋微生物中抗肿瘤肽活性的分离鉴定

### 1. 工程菌改造在肿瘤治疗上的应用

#### 1.1 活性肿瘤靶向细菌

##### 1.1.1 内源性肿瘤靶向性

##### 1.1.2 活细菌抑制肿瘤

#### 1.2 工程菌的抗肿瘤应用

##### 1.2.1 提升工程菌安全性

##### 1.2.2 增加工程菌对肿瘤的靶向性

##### 1.2.3 载体菌株的效应系统

###### 1.2.3.1 不同的有效载荷投放策略

###### 1.2.3.2 细胞毒剂

###### 1.2.3.3 前药转化酶

###### 1.2.3.4 免疫调节剂

###### 1.2.3.5 靶向肿瘤间质

###### 1.2.3.6 合成基因网络

#### 1.3 临床应用面临的挑战

##### 1.3.1 化学制造和控制 (CMC)

##### 1.3.2 药代动力学和剂量反应

##### 1.3.3 安全问题

##### 1.3.4 FDA相关指导文件

### 2. 微生物多肽物质纯化与临床应用

#### 2.1 海洋微生物多肽物质的分离和提取

#### 2.2 对海洋二甲基硫降解菌中二甲基硫生长诱导多肽的鉴定

#### 2.3 海洋生物中活性多肽的提取和纯化

##### 2.3.1 多肽的提取

###### 2.3.1.1 溶剂提取法

###### 2.3.1.2 微生物发酵提取法

###### 2.3.1.3 酶水解提取法

###### 2.3.1.4 超声辅助提取法

##### 2.3.2 海洋生物群中多肽的分离和纯化

###### 2.3.2.1 色谱技术

###### 2.3.2.2 膜分离法

###### 2.3.2.3 超临界流体萃取

###### 2.3.2.4 毛细管电泳

### 3. 海洋微生物产品与肿瘤治疗

#### 3.1 来自海洋微生物的L-天冬酰胺酶与肿瘤治疗

##### 3.1.1 海洋微生物产品的优势

##### 3.1.2 抗癌药物L-天冬酰胺酶

##### 3.1.3 来自海洋微生物的L-天冬酰胺酶

#### 3.2 一些新型海洋微生物天然化合物的抗癌活性

#### 3.3 来自海洋微生物的生物表面活性剂及其抗癌应用

##### 3.3.1 脂肽 Lipopeptides

##### 3.3.2 糖脂 Glycolipids

# 1. 工程菌改造在肿瘤治疗上的应用

## [Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer](#)

长期以来的观察表明，天然细菌感染可导致对恶性肿瘤的抗肿瘤作用。1813 年，Vautier 报告说，患有气性坏疽的癌症患者的肿瘤已经消退。其他历史记载包括 Busch (1866) 的观察结果，这导致 Fehleisen (1883) 和随后的 William B. Coley 用丹毒的活传染原（后来称为链球菌“A 组”或化脓性链球菌）作为治疗方法 癌症。使用细菌治疗癌症的进一步探索后来被缩减，因为注意力的焦点转移到了当时的新型放射疗法上。然而，在 1990 年代中期，当科学界对 TME 有了更好的了解并且重组 DNA 技术能够产生更有效、毒性更低的细菌菌株时，使用活细菌进行癌症治疗的热情又得到了恢复。

Mowday, Alexandra M., et al. "Advancing clostridia to clinical trial: past lessons and recent progress." *Cancers* 8.7 (2016): 63.

Coley, William B. "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. 1." *The American Journal of the Medical Sciences* (1827-1924) 105.6 (1893): 487.

Forbes, Neil S. "Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy." *Nature Reviews Cancer* 10.11 (2010): 785-794.

许多细菌菌株已经在动物模型中进行了测试，并显示出优先靶向实体瘤，其中一些已经进入临床试验。一个成功的例子是使用卡介苗 (BCG) 治疗膀胱癌。BCG 是结核分枝杆菌变种牛的减毒活株，最初是作为结核病疫苗产生的。通过膀胱内给药的 BCG 治疗在 1970 年代首次被记录，此后成为膀胱原位移行细胞癌的重要治疗选择。人们认为 BCG 的治疗效果主要是由于其免疫调节活性。然而，由于潜在的感染相关性，活细菌作为治疗剂的临床开发面临重大障碍。在这篇综述中，我们讨论了活的肿瘤靶向细菌作为治疗剂的独特方面，重点关注一些研究最多的沙门氏菌属、梭菌属。和李斯特菌。作为例子。随着越来越多的治疗性细菌菌株进入临床阶段，我们还强调了与其临床转化相关的问题。

Hoffman, Robert M. "Tumor-seeking Salmonella amino acid auxotrophs." *Current opinion in biotechnology* 22.6 (2011): 917-923.

Kasinskas, Rachel W., and Neil S. Forbes. "Salmonella typhimurium lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis." *Cancer research* 67.7 (2007): 3201-3209.

## 1.1 活性肿瘤靶向细菌

### 1.1.1 内源性肿瘤靶向性

活细菌使用独特的机制靶向实体瘤。当全身给药时，治疗性细菌会传播到肿瘤和健康组织。尽管沙门氏菌已被证明优先归巢或保留在富含某些代谢物的 TME 中，但递送至肿瘤的初始细菌量通常不大于递送至正常组织的细菌量。然而，循环系统和其他正常组织中的细菌分别在数小时和数天内被清除，而肿瘤中的细菌继续增殖，数量通常大大超过最初施用的菌落形成单位。这种选择性定植可能是由与实体瘤相关的病理变化引起的免疫抑制和生化独特微环境的结果。重要的是，厌氧菌不会定植于与瘤形成无关的缺氧或炎症病变，如专性厌氧菌和兼性厌氧菌的实验所示。

李斯特菌的肿瘤靶向涉及一个额外的机制。李斯特菌属已知不仅会感染专职抗原呈递细胞 (APC)，例如单核细胞或巨噬细胞和树突细胞，还会感染髓源性抑制细胞 (MDSC)，这些细胞可以选择性地将细菌递送至 TME，并通过独特的机制从那里传播 MDSCs 进入肿瘤细胞。李斯特菌属肿瘤浸润性免疫抑制 MDSC 内部的 MDSC 被保护免于免疫清除，但会迅速从缺乏免疫抑制的正常组织中清除。专性厌氧菌，如梭状芽孢杆菌。无法在富氧环境中生存，从而进一步增强了它们的肿瘤靶向特异性。有趣的是，发芽的梭菌属。在坏死不明显的微创病变中以及在大鼠神经胶质瘤模型中的肿瘤血管附近也观察到了，这增加了这些肿瘤结构为细菌定植提供足够缺氧、生化独特和免疫特权微环境的可能性。如下文更详细讨论的，可以对兼性厌氧细菌进行工程改造，从而进一步削弱它们在正常组织中的生存能力。

Weibel, Stephanie, et al. "Colonization of experimental murine breast tumours by *Escherichia coli* K-12 significantly alters the tumour microenvironment." *Cellular microbiology* 10.6 (2008): 1235-1248.

Quispe-Tintaya, Wilber, et al. "Nontoxic radioactive *Listeria* is a highly effective therapy against metastatic pancreatic cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.21 (2013): 8668-8673.

Chandra, Dinesh, et al. "Myeloid-derived suppressor cells have a central role in attenuated *Listeria monocytogenes*-based immunotherapy against metastatic breast cancer in young and old mice." *British journal of cancer* 108.11 (2013): 2281-2290.

Chandra, Dinesh, et al. "<sup>32</sup>-Phosphorus selectively delivered by *Listeria* to pancreatic cancer demonstrates a strong therapeutic effect." *Oncotarget* 8.13 (2017): 20729.

Staedtke, Verena, et al. "*Clostridium novyi*-NT can cause regression of orthotopically implanted glioblastomas in rats." *Oncotarget* 6.8 (2015): 5536.

Roberts, Nicholas J., et al. "Intratumoral injection of *Clostridium novyi*-NT spores induces antitumor responses." *Science translational medicine* 6.249 (2014): 249ra111-249ra111.

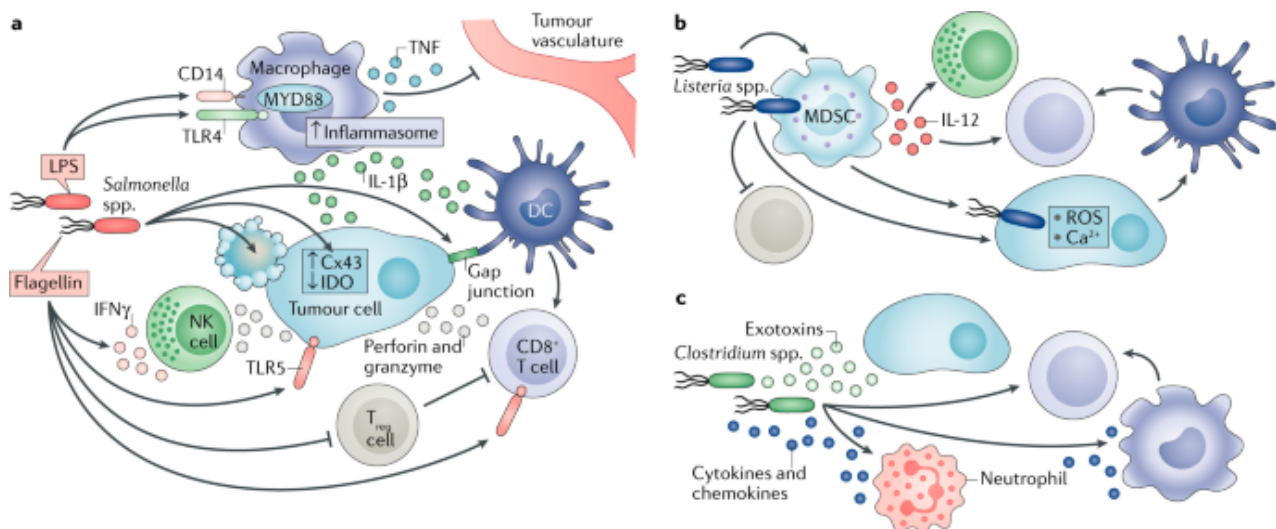
### 1.1.2 活细菌抑制肿瘤

局部细菌感染通过各种机制导致肿瘤消退（如下图所示）。细菌具有内在的抗肿瘤活性，但不同的细菌菌株或不同微环境中的细菌可能会采用不同的机制来破坏实体瘤。除了内在的抗肿瘤作用外，细菌感染还会诱导针对肿瘤定植细菌和肿瘤细胞的先天性和适应性免疫反应。宿主免疫反应对于沙门氏菌等细菌的抗肿瘤作用更为关键。对肿瘤细胞没有足够的细胞毒性。主要机制可能因治疗中使用的细菌种类、所治疗的肿瘤类型甚至细菌-宿主相互作用的阶段而异。重要的是，可以对细菌进行基因工程，以各种不同的方式进一步提高它们的抗肿瘤活性，使它们成为一个多功能平台，可以根据临床需求提供治疗有效载荷。

Kaimala, Suneesh, et al. "Salmonella-mediated tumor regression involves targeting of tumor myeloid suppressor cells causing a shift to M1-like phenotype and reduction in suppressive capacity." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 63.6 (2014): 587-599.

Jahangir, Arthee, et al. "Immunotherapy with *Listeria* reduces metastatic breast cancer in young and old mice through different mechanisms." *Oncoimmunology* 6.9 (2017): e1342025.

Jahangir, Arthee, et al. "Immunotherapy with *Listeria* reduces metastatic breast cancer in young and old mice through different mechanisms." *Oncoimmunology* 6.9 (2017): e1342025.



### 【肿瘤靶向细菌杀伤肿瘤细胞的机制】

不同的细菌物种采用共享和独特的内在机制来消除癌症。

a. 沙门氏菌不受控制的细胞内增殖。可导致侵入的肿瘤细胞破裂。或者，细胞内细菌可以通过诱导细胞凋亡或自噬来杀死肿瘤细胞。沙门氏菌定植肿瘤中的巨噬细胞和树突细胞 (DC) 分泌负责抗肿瘤活性的白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )。升高的 IL-1 $\beta$  分泌需要脂多糖 (LPS) 诱导的 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号传导和吞噬沙门氏菌属损伤的肿瘤细胞后巨噬细胞中的炎性体激活<sup>207</sup>。LPS 还通过 CD14 (LPS 的共同受体)、TLR4 和骨髓分化初级反应 (MYD88) 引起肿瘤坏死因子 (TNF) 表达，从而导致肿瘤血管系统的破坏。鞭毛蛋白是细菌鞭毛的一种亚基蛋白，通过在基于肽疫苗的免疫治疗环境中激活 TLR5 来改善 CD8<sup>+</sup> T 细胞依赖性抗肿瘤反应，并降低 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T (Treg) 细胞的频率。鞭毛蛋白还可以通过 TLR5 信号直接抑制肿瘤细胞增殖。此外，来自沙门氏菌属的优化的 TLR5 激动剂。鞭毛蛋白已被证明可诱导自然杀伤 (NK) 细胞介导的抗肿瘤反应，这取决于穿孔素和沙门氏菌属。鞭毛蛋白还可以激活 NK 细胞以产生干扰素- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )，这是一种通过涉及 IL-18 和 MYD88 的 TLR 独立途径对先天免疫和适应性免疫的关键细胞因子。沙门氏菌属诱导连接蛋白 43 (Cx43) 的上调，导致肿瘤细胞和 DC 之间形成间隙连接，从而促进加工的肿瘤抗原肽的转移和交叉呈递。肿瘤细胞中 Cx43 的上调也会降低免疫抑制酶吲哚胺 2,3-双加氧酶 (IDO)<sup>217</sup> 的表达。DCs 的肿瘤抗原交叉呈递和减少的 IDO 都进一步激活了 CD8<sup>+</sup> T 细胞。

b. 李斯特菌属可以直接感染肿瘤细胞或在免疫抑制性髓源性抑制细胞 (MDSCs) 的帮助下感染。MDSC 的感染改变了这些细胞的亚群，使其具有免疫刺激表型，其特征是 IL-12 的产生增加，这与 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 NK 细胞反应的改善有关。李斯特菌属可以通过 NADPH 氧化酶介导的活性氧 (ROS) 产生和细胞内钙动员直接杀死肿瘤细胞。由高水平 ROS 引起的免疫原性肿瘤细胞死亡会激活负责消除原发肿瘤和转移瘤的 CD8<sup>+</sup> T 细胞。李斯特菌属疫苗株还抑制 MDSC 和 Treg 细胞。

c. 梭菌属可以通过定植细菌分泌的多种外毒素杀死肿瘤细胞，其中一些（例如，磷脂酶、溶血素和脂肪酶）可以破坏膜结构，而另一些则被内化并干扰关键的细胞功能。与其他细菌种类的感染相似，梭菌感染导致粒细胞和巨噬细胞在感染部位的初始积累。这第一道防线可防止定植细菌侵入周围的正常组织以及充分灌注和氧化的肿瘤区域。细胞反应导致细胞因子和趋化因子升高，从而协调一致的免疫反应。梭菌属还可以触发中性粒细胞释放 TNF 相关的凋亡诱导配体 (TRAIL)，通过激活细胞凋亡杀死癌细胞。在稍后的时间点，包括 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞在内的适应性免疫细胞被招募来帮助消除肿瘤。

## 1.2 工程菌的抗肿瘤应用

出于安全性的考虑，细菌可以被减毒，也可以被设计为获得更好的抗肿瘤活性。世界各地的实验室已经为各种目的生成了大量工程细菌菌株，所有这些都旨在提高细菌单独使用或与其他癌症治疗方法结合使用时的治疗指数。

### 1.2.1 提升工程菌安全性

治疗性细菌的安全性可以通过不同的方法来改善。对于已知的人类病原体，通常需要删除主要毒力基因以将其致病性降至最低。通过删除致死外毒素的基因，将毒性极大的新梭菌菌株转化为相当安全的菌株（新梭菌-NT）。革兰氏阴性菌外膜中的脂多糖 (LPS) 是表达肿瘤坏死因子 (TNF) 的最有效刺激剂之一，也是革兰氏阴性菌脓毒症中休克的主要诱导剂。从沙门氏菌中删除 *msbB* 基因。导致脂质 A 的肉豆蔻酰化 (LPS 的关键成分) 丧失，并使 TNF 表达降至最低。这种修改降低了沙门氏菌的毒性，这种修饰使沙门氏菌的毒性降低了10,000倍。一株名为 np20009的鼠伤寒沙门菌减毒株携带此缺失，同时携带嘌呤营养缺陷型突变，在临床试验中显示出了安全性。应该指出的是，一些毒力因子也可能是活细菌固有的抗肿瘤活性的原因。只要有可能，应在不显著损害抗肿瘤活性的情况下实现减毒，除非该菌株仅用于疫苗接种的目的。在这方面，原型 *msbB* 缺陷型沙门氏菌菌株和 VNP20009 菌株在测试的小鼠模型中保留了肿瘤靶向特异性和抗肿瘤活性。S. Typhimurium 在 ppGpp 的合成中也有缺陷，ppGpp 是诱导表达许多毒力基因所需的信号分子。ΔppGpp 菌株具有显着提高的安全性。有趣的是，该菌株在进入宿主细胞并在其中复制的能力方面也存在缺陷，有效地将其转变为细胞外细菌，同时保留了其肿瘤靶向能力。

Nguyen, Vu H., et al. "Genetically engineered *Salmonella typhimurium* as an imageable therapeutic probe for cancer." *Cancer research* 70.1 (2010): 18-23.

李斯特菌属也可以作为肿瘤靶向载体来提供治疗有效载荷，但主要用作表达肿瘤抗原的疫苗株。通过删除主要毒力调节基因 *prfA*，使单核细胞增生李斯特菌变得更安全。然而，*prfA* 缺陷的李斯特菌属。不能从吞噬体逃逸到受感染细胞的细胞质中，这将阻止疫苗株表达的肿瘤抗原进入细胞质进行加工和细胞表面呈递。为了保持足够的减毒状态，同时允许肿瘤抗原的细胞溶质传递，*prfA* 缺陷菌株被设计为表达低水平的 PrfA 和截短的免疫原性李斯特菌溶血素 O (LLO)，可以与选择的抗原融合以提高免疫原性。这些菌株被称为 Lm-LLO，不仅用作疫苗菌株，还用于非疫苗治疗有效载荷的肿瘤靶向递送。单核细胞增生李斯特菌的减毒也可以通过删除毒力基因 *actA* 和 *inlB* 来实现，这些基因负责细菌传播，产生称为活减毒双缺失 (LADD) 的菌株。

Paterson, Yvonne, Patrick D. Guirnalda, and Laurence M. Wood. "Listeria and Salmonella bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy." *Seminars in immunology*. Vol. 22. No. 3. Academic Press, 2010.

Toussaint, Bertrand, et al. "Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector." *Expert review of vaccines* 12.10 (2013): 1139-1154.

Wood, Laurence M., and Yvonne Paterson. "Attenuated *Listeria monocytogenes*: a powerful and versatile vector for the future of tumor immunotherapy." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4 (2014): 51.

Singh, M., et al. "Direct incorporation of the NKT-cell activator  $\alpha$ -galactosylceramide into a recombinant *Listeria monocytogenes* improves breast cancer vaccine efficacy." *British journal of cancer* 111.10 (2014): 1945-1954.



Deng, Weiwen, et al. "Recombinant *Listeria* promotes tumor rejection by CD8+ T cell-dependent remodeling of the tumor microenvironment." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.32 (2018): 8179-8184.

提高安全性的另一种方法是产生营养缺陷型突变体，这些突变体在突变菌株所需的特定营养素稀缺的环境中无法有效复制。沙门氏菌 A1-R 代表这样一种菌株，并且对可能在肿瘤中富集但在正常组织中不富集的亮氨酸和精氨酸是营养缺陷的。该菌株未经进一步工程化，已在多种小鼠肿瘤模型中显示出选择性肿瘤定植以及有效的抗肿瘤活性。单核细胞增生李斯特菌的营养缺陷型菌株也是通过插入灭活 D-丙氨酸（细菌细胞壁中的关键成分）所需的 *dal* 和 *dat* 基因而产生的。当提供外源 D-丙氨酸时，这些减毒的李斯特菌菌株可以在体外生长，但与沙门氏菌 A1-R 菌株不同，它们不能在体内复制和传播。因此，它们作为疫苗载体是可取的，但对于非疫苗抗肿瘤有效载荷的肿瘤靶向递送可能不是最佳的。

Zhao, Ming, et al. "Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.3 (2005): 755-760.

Thompson, Robert J., et al. "Pathogenicity and Immunogenicity of a *Listeria Monocytogenes* Strain That Requires Alanine for Growth." *Infection and immunity* 66.8 (1998): 3552-3561.

### 1.2.2 增加工程菌对肿瘤的靶向性

非致病性或减毒的专性厌氧菌具有中等高度的肿瘤特异性，因此对正常组织的直接细胞毒性最小。相比之下，兼性厌氧菌，如沙门氏菌属和李斯特菌。能在含氧环境中存活甚至增殖，对正常组织造成损害。对于兼性厌氧菌，改进的肿瘤靶向可以降低其毒性或增加其功效而不增加毒性。 $\alpha\beta 3$  整合蛋白在多种癌症类型中过表达。在其外膜蛋白 A (OmpA) 上显示整合素结合 Arg-Gly-Asp (RGD) 肽的鼠伤寒沙门氏菌 ( $\Delta ppGpp$ ) 菌株在表达  $\alpha\beta 3$  整合素的神经胶质瘤 U87MG 和黑色素瘤 M21 异种移植瘤中富集 > 1,000 倍小鼠与对照品系相比，在  $\alpha\beta 3$  阳性乳腺癌 MDA-MB-231 和黑色素瘤 MDA-MB-435 异种移植瘤模型中的抗肿瘤活性显著提高。细菌也被设计为靶向 TAA。针对结直肠癌相关癌胚抗原 (CEA) 或淋巴瘤相关抗原 CD20 的抗体片段的表面展示使工程化的鼠伤寒沙门氏菌菌株在抑制表达这些抗原的实验性肿瘤方面更有效。重要的是，抗 CD20 菌株在治疗小鼠的肝脏和脾脏中显示出显著减少的细胞内积累，同时保持肿瘤积累。细菌还可以作为展示模块化合成粘附素的平台，其中可以选择不同的粘附素来靶向表达其特定配体的肿瘤。

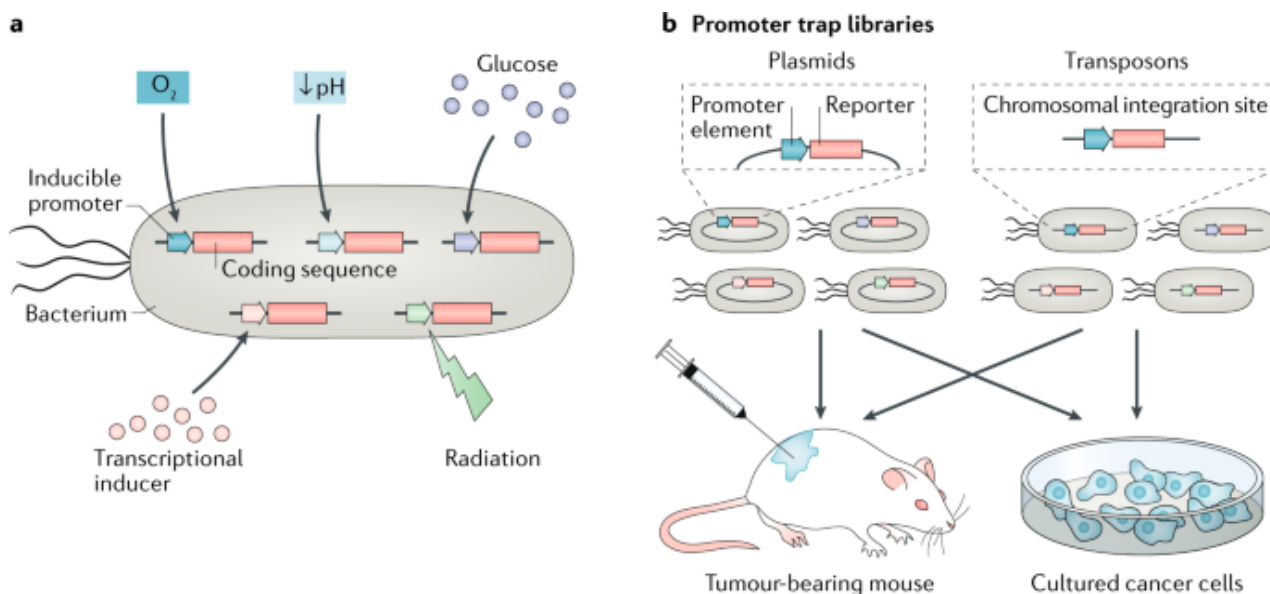
Park, Seung-Hwan, et al. "RGD peptide cell-surface display enhances the targeting and therapeutic efficacy of attenuated *Salmonella*-mediated cancer therapy." *Theranostics* 6.10 (2016): 1672.

Bereta, Michal, et al. "Improving tumor targeting and therapeutic potential of *Salmonella* VNP20009 by displaying cell surface CEA-specific antibodies." *Vaccine* 25.21 (2007): 4183-4192.

Massa, Paul E., et al. "*Salmonella* engineered to express CD20-targeting antibodies and a drug-converting enzyme can eradicate human lymphomas." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 122.5 (2013): 705-714.

Piñero-Lambea, Carlos, et al. "Programming controlled adhesion of *E. coli* to target surfaces, cells, and tumors with synthetic adhesins." *ACS synthetic biology* 4.4 (2015): 463-473.

由肿瘤相关信号（如缺氧）诱导的表达系统也已被用于靶向定植和有效载荷表达（见下图）。除了已知由肿瘤相关因子诱导的启动子之外，在 TME 中激活的新启动子元件可以使用无偏见的大规模筛选方法（例如使用启动子陷阱的方法）进行鉴定（下图b）。由外源应用的化学转录触发或离子辐射严格调控的启动子代表了另一种控制效应基因表达的手段（下图a）。虽然化学触发器的全身给药可以实现时间控制，但聚焦辐射可以提供时间和空间控制。还应注意的，异源蛋白质的高水平组成型表达可能是细菌载体的代谢负担，导致适应性降低和定植效率低下。一旦建立了有效的定植，时间控制的有效载荷表达可能是解决这个问题的好方法。



#### 【用于靶向定植和有效载荷表达的诱导系统】

a. 各种诱导型启动子可用于肿瘤选择性表达或时间或空间控制的表达。沙门氏菌菌株经过工程改造，将必需基因置于缺氧诱导启动子的控制之下，而针对该基因的抑制性反义 RNA 的表达由氧诱导启动子激活，以最大限度地减少含氧正常组织中的基础表达。该菌株显示出强大的肿瘤定植，并大大增加了与正常组织的清除率，因此与亲本菌株相比，安全性得到了显著改善。缺氧诱导型启动子也被用于指导效应基因的表达，例如那些编码细胞毒性蛋白的基因，出于安全原因需要更严格的控制。在使用启动子陷阱（见下文）的研究中，对低 pH 有反应的启动子元件被确定为在肿瘤微环境 (TME) 中具有活性。可以由实体肿瘤中经常存在的葡萄糖梯度触发的遗传回路也被用于设计细菌，可能使它们能够在代谢更活跃的肿瘤区域表达抗肿瘤蛋白。外源性应用的转录诱导剂，如 L-阿拉伯糖、乙酰水杨酸和四环素，可以严格调节引入细菌的相关诱导型启动子，提供一种以时间方式控制定植或效应基因表达的手段。低至 2 Gy 的离子辐射也已被证明可以激活转染到梭菌属中的质粒上的 *recA* 启动子，从而提高了通过临床相关剂量的聚焦辐射治疗调节效应基因表达的可能性（2 Gy 类似于放疗中用于实体瘤辅助治疗的典型分次剂量）。

b. 启动子陷阱已被用于识别在 TME 中活跃的启动子元件。启动子陷阱文库可以通过用含有克隆在无启动子报告基因上游的随机基因组 DNA 片段的质粒或含有随机整合到细菌基因组中的无启动子报告基因的转座子转化细菌来构建。这些启动子陷阱文库可以注入实验肿瘤或与癌细胞共培养。然后回收细菌并分析报告分子的活性。具有高报告活性的克隆可能包含在 TME 中活跃的启动子元件。

Camacho, Eva María, et al. "Engineering Salmonella as intracellular factory for effective killing of tumour cells." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-12.

Jeong, Jae-Ho, et al. "Anti-tumoral effect of the mitochondrial target domain of Noxa delivered by an engineered Salmonella typhimurium." *PloS one* 9.1 (2014): e80050.

Ryan, R. M., et al. "Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors." *Gene therapy* 16.3 (2009): 329-339.

Panteli, Jan T., and Neil S. Forbes. "Engineered bacteria detect spatial profiles in glucose concentration within solid tumor cell masses." *Biotechnology and bioengineering* 113.11 (2016): 2474-2484.

Flentie, Kelly, et al. "A bioluminescent transposon reporter-trap identifies tumor-specific microenvironment-induced promoters in *Salmonella* for conditional bacterial-based tumor therapy." *Cancer discovery* 2.7 (2012): 624-637.

Leschner, Sara, et al. "Identification of tumor-specific *Salmonella* Typhimurium promoters and their regulatory logic." *Nucleic acids research* 40.7 (2012): 2984-2994.

### 1.2.3 载体菌株的效应系统

单独的减毒细菌通常不能根除实体瘤。1990 年代中期首次描述了通过肿瘤靶向细菌递送治疗有效载荷以增强其功效。此后已经探索了各种效应器系统（见下表）。以下简要描述了基于抗肿瘤机制分类的有效载荷传递和效应器系统的不同策略。

Effector classes	Effectors or targets
Cytotoxic	Bacterial toxins and immunotoxins <sup>a</sup> (for example, cytolysin A, <i>Staphylococcus aureus</i> $\alpha$ -haemolysin, PE, TGF $\alpha$ -PE and TGF $\alpha$ -PE38)
	Apoptosis-inducing ligands (for example, TNF, FASL, TRAIL, azurin, Cp53, apoptin and Noxa MTD)
	Agents loaded into or onto bacteria (for example, 188-rhenium, 32-phosphorus, doxorubicin and C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> )
Prodrug-converting enzymes	Thymidine kinase, cytosine deaminase, nitroreductase, purine nucleoside phosphorylase, carboxypeptidase G2 and chromate reductase YieF
Immunomodulators	Tumour antigens
	Cytokines and chemokines (for example, IL-2, IL-4, IL-12, IL-18, IFN $\gamma$ , GM-CSF, FLT3L, LIGHT and CCL21)
	Others (for example, heterologous flagellin, $\alpha$ -galactosylceramide and immunodominant recall antigens)
Tumour stroma targeting	Legumain, VEGFR2, endoglin, thrombospondin 1, TEM8 and PDGFR $\beta$
Gene silencing	Silenced targets: IDO, STAT3, BCL-2, MDM2, survivin and MDR1
Synthetic gene circuit	Quorum-sensing gene circuit for controlled payload production

Minton, Nigel P., et al. "Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores." *FEMS microbiology reviews* 17.3 (1995): 357-364.

Fox, M. E., et al. "Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia." *Gene therapy* 3.2 (1996): 173-178.

Saltzman, Daniel A., et al. "Attenuated *Salmonella* typhimurium containing interleukin-2 decreases MC-38 hepatic metastases: a novel anti-tumor agent." *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 11.2 (1996): 145-153.



### 1.2.3.1 不同的有效载荷投放策略

根据其预期用途和递送细菌的类型，治疗有效载荷可以以 DNA、RNA 或蛋白质的形式递送。在大多数情况下，细菌是用携带基因表达盒的质粒转化的，这些基因表达盒可指导治疗性蛋白质在细菌中的表达。然后需要从细菌中分泌蛋白质以实现其生物学效应。或者，可以对载体菌株进行工程设计，以便一旦建立了强大的肿瘤定植，就会诱导细菌裂解以释放治疗有效载荷。

除了治疗性蛋白质，DNA 和 RNA 分子也可以被递送到靶细胞。细胞内细菌可以用 DNA 盒进行工程设计，在哺乳动物启动子的控制下表达治疗性蛋白质。哺乳动物蛋白质的生物活性通常取决于正确折叠和翻译后修饰，而细菌产生的蛋白质中可能不存在这些修饰。因此，递送 DNA 的优势之一是宿主细胞产生最佳活性蛋白质。在一项使用鼠伤寒沙门氏菌作为递送载体的研究中，真核盒表达的  $\beta$ -半乳糖苷酶诱导的免疫反应比原核盒表达的免疫反应强得多。还应注意，细胞内细菌产生的蛋白质和宿主细胞产生的蛋白质可能靶向不同的细胞区室。一类特殊的治疗细菌是 DNA 疫苗株，旨在将 DNA 传递到 APCs。提供 DNA 或蛋白质的疫苗菌株在别处详细讨论。最后，短发夹 RNA (shRNA) 和小干扰 RNA (siRNA) 是用于基因沉默的流行 RNA 形式，多项研究探索了它们通过细胞内细菌的传递（见上表）。

Rüssmann, Holger, et al. "Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development." *Science* 281.5376 (1998): 565-568.

Walker, Barnabas James, Guy-Bart V. Stan, and Karen Marie Polizzi. "Intracellular delivery of biologic therapeutics by bacterial secretion systems." *Expert reviews in molecular medicine* 19 (2017).

Camacho, Eva María, et al. "Engineering Salmonella as intracellular factory for effective killing of tumour cells." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-12.

Din, M. Omar, et al. "Synchronized cycles of bacterial lysis for in vivo delivery." *Nature* 536.7614 (2016): 81-85.

Jeong, Jae-Ho, et al. "Anti-tumoral effect of the mitochondrial target domain of Noxa delivered by an engineered Salmonella typhimurium." *PloS one* 9.1 (2014): e80050.

Hense, Marc, et al. "Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells." *Cellular microbiology* 3.9 (2001): 599-609.

Lee, Che-Hsin, Chao-Liang Wu, and Ai-Li Shiau. "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 therapy* 12.2 (2005): 175-184.

Fu, W., et al. "Synergistic antitumor efficacy of suicide/ePNP gene and 6-methylpurine 2'-deoxyriboside via *Salmonella* against murine tumors." *Cancer Gene Therapy* 15.7 (2008): 474-484.

Ryan, R. M., et al. "Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors." *Gene therapy* 16.3 (2009): 329-339.

### 1.2.3.2 细胞毒剂

提高抗肿瘤活性最直接的方法是设计表达细胞毒性剂的细菌载体。该策略需要细菌载体以足够的特异性靶向肿瘤或使用诱导型启动子来更好地控制基因表达以避免对正常组织的毒性。几种细菌菌株已被设计为在由缺氧、L-阿拉伯糖或四环素激活的启动子控制下表达有效的成孔细菌毒素溶细胞素 A 或金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素，以确保安全。另一种提高安全性的方法涉及选择性靶向肿瘤细胞的嵌合毒性蛋白的表达。例如，鼠伤寒沙门氏菌菌株已被设计为表达包含肿瘤生长因子- $\alpha$  (TGF $\alpha$ )、表皮生长因子受体 (EGFR) 配体和截短形式的假单胞菌属的嵌合蛋白。外毒素 A (PE) 缺乏天然膜结合域。从细菌中释放后，嵌合蛋白选择性地杀死 EGFR 阳性癌细胞，并在多个小鼠肿瘤模型中延缓了 EGFR 表达肿瘤的生长。

诱导肿瘤细胞凋亡是一种有吸引力的治疗方法，但全身给药诱导细胞凋亡的配体，如 TNF、FAS 配体 (FASL；也称为 TNFSF6) 和 TNF 相关的凋亡诱导配体 (TRAIL；也称为 TNFSF10) 是不可行，因为它们具有毒性或循环半衰期短。为了在 TME 中实现这些蛋白质的持续高水平，同时避免全身毒性，几个小组设计了用于肿瘤靶向递送的细菌菌株。表达 FASL 的减毒鼠伤寒沙门氏菌菌株以 FAS 依赖性方式对皮下和转移性同源小鼠肿瘤模型显示出显著的抗肿瘤活性。在另一个优雅的例子中，两个独立的诱导系统被用来驱动源自 p53 蛋白的促凋亡 Cp53 肽的表达和鼠伤寒沙门氏菌菌株的裂解，以释放 Cp53 以实现最大杀伤。

除了用于表达细胞毒性蛋白的基因工程外，靶向肿瘤的细菌已被用于递送细胞毒性剂，对周围未感染的肿瘤细胞产生更大的旁观者效应。在一项研究中，高能  $\beta$  发射体 188-铼与抗李斯特菌属的多克隆抗体结合。然后将放射性标记的抗体与减毒的单核细胞增生李斯特菌菌株一起孵育。由此产生的放射性李斯特菌。全身给药后在转移灶中积累，并在同基因 Panc02 小鼠肿瘤模型中将转移灶数量减少了 90%。减毒的单核细胞增生李斯特菌也被 32-磷代谢标记，并在胰腺导管腺癌 (PDAC) 的转基因 KPC 小鼠模型中显示出肿瘤抑制活性（由致癌 Kras 和突变体 Trp53 的条件表达驱动）。另一种创新方法利用了一些细菌从 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 产生细胞毒性一氧化氮 (NO) 的能力。在光照射下，碳点掺杂的氮化碳 (C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) 被加载到大肠杆菌表面的光电子被激发并转移到大肠杆菌中产生 NO 的酶中，从而显著增加 NO 的产生并抑制小鼠的肿瘤同系皮下肿瘤模型。重要的是，聚焦光照射能够有针对性地生成 NO。

Jean, Adam T. St, et al. "Bacterial delivery of Staphylococcus aureus  $\alpha$ -hemolysin causes regression and necrosis in murine tumors." *Molecular Therapy* 22.7 (2014): 1266-1274.

Hong, Hyun, et al. "Targeted deletion of the ara operon of Salmonella typhimurium enhances L-arabinose accumulation and drives PBAD-promoted expression of anti-cancer toxins and imaging agents." *Cell Cycle* 13.19 (2014): 3112-3120.

Jiang, Sheng-Nan, et al. "Engineering of bacteria for the visualization of targeted delivery of a cytolytic anticancer agent." *Molecular Therapy* 21.11 (2013): 1985-1995.

Quintero, David, et al. "EGFR-targeted Chimeras of Pseudomonas ToxA released into the extracellular milieu by attenuated Salmonella selectively kill tumor cells." *Biotechnology and bioengineering* 113.12 (2016): 2698-2711.

Lim, Daejin, et al. "Anti-tumor activity of an immunotoxin (TGF $\alpha$ -PE38) delivered by attenuated Salmonella typhimurium." *Oncotarget* 8.23 (2017): 37550.

Lim, Daejin, et al. "Anti-tumor activity of an immunotoxin (TGF $\alpha$ -PE38) delivered by attenuated Salmonella typhimurium." *Oncotarget* 8.23 (2017): 37550.

Loeffler, Markus, et al. "Inhibition of tumor growth using salmonella expressing Fas ligand." *Journal of the National Cancer Institute* 100.15 (2008): 1113-1116.

Ganai, S., R. B. Arenas, and N. S. Forbes. "Tumour-targeted delivery of TRAIL using *Salmonella typhimurium* enhances breast cancer survival in mice." *British journal of cancer* 101.10 (2009): 1683-1691.

Chen, Jianxiang, et al. "Salmonella-mediated tumor-targeting TRAIL gene therapy significantly suppresses melanoma growth in mouse model." *Cancer science* 103.2 (2012): 325-333.

Zoaby, Nour, et al. "Autonomous bacterial nanoswimmers target cancer." *Journal of Controlled Release* 257 (2017): 68-75.

Zheng, Di-Wei, et al. "Optically-controlled bacterial metabolite for cancer therapy." *Nature communications* 9.1 (2018): 1-12.

### 1.2.3.3 前药转化酶

前药转化酶是最早被设计到肿瘤靶向细菌中的效应系统之一。一旦被肿瘤定位的细菌表达，这些酶就可以代谢其全身给药的无害底物（前药）并将它们转化为细胞毒性产物。使用前药转化酶的主要优点是细胞毒性产物是小分子，能够在实体肿瘤内部扩散到更远的地方并穿过细胞膜，从而产生有效的旁观者效应。肿瘤靶向细菌已被设计为表达几种前药转化酶（见上表）。胞嘧啶脱氨酶将无毒的 5-氟胞嘧啶 (5-FC) 转化为 5-氟尿嘧啶 (5-FU)，这是转移性结直肠癌的一线化疗药物。在小鼠同基因和人类异种移植结直肠肿瘤模型中，当与 5-FC 结合使用时，经工程改造以表达大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶的鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 菌株显示出明显改善的抗肿瘤活性。

同样，表达流感嗜血杆菌硝基还原酶的产孢梭菌菌株 also 具有良好的抗肿瘤作用。硝基还原酶催化弱单功能 DNA 烷基化剂 CB1954 转化为双功能 DNA 烷基化衍生物，可诱导 DNA 交联和细胞凋亡。在皮下人类 HCT116 结肠癌异种移植模型中，重复施用表达硝基还原酶的菌株和 CB1954 实现了持续的肿瘤控制。该效应系统的功效取决于传递细菌载体的稳健和持续的肿瘤定植，这确保了前药转化酶的持续高水平表达。值得注意的是，细菌还携带能够代谢激活多种前药的内源性酶。

Austin, ELIZABETH A., and BRIAN E. Huber. "A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing, and expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase." *Molecular pharmacology* 43.3 (1993): 380-387.

King, Ivan, et al. "Tumor-targeted *Salmonella* expressing cytosine deaminase as an anticancer agent." *Human gene therapy* 13.10 (2002): 1225-1233.

Theys, J., et al. "Repeated cycles of *Clostridium*-directed enzyme prodrug therapy result in sustained antitumour effects in vivo." *British journal of cancer* 95.9 (2006): 1212-1219.

Knox, Richard J., Frank Friedlos, and Marion P. Boland. "The bioactivation of CB 1954 and its use as a prodrug in antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)." *Cancer and Metastasis Reviews* 12.2 (1993): 195-212.

Palmer, D. H., et al. "Mechanism of cell death induced by the novel enzyme-prodrug combination, nitroreductase/CB1954, and identification of synergism with 5-fluorouracil." *British journal of cancer* 89.5 (2003): 944-950.

Lehouritis, Panos, et al. "Activation of multiple chemotherapeutic prodrugs by the natural enzymolome of tumour-localised probiotic bacteria." *Journal of Controlled Release* 222 (2016): 9-17.

Chen, Guo, et al. "Tumor-targeting *Salmonella typhimurium*, a natural tool for activation of prodrug 6MePdR and their combination therapy in murine melanoma model." *Applied microbiology and biotechnology* 97.10 (2013): 4393-4401.

#### 1.2.3.4 免疫调节剂

为了进一步刺激抗肿瘤免疫，已经对肿瘤靶向细菌进行了改造，以表达肿瘤抗原或免疫调节因子。除了用表达肿瘤抗原的活细菌接种疫苗，另一种增强肿瘤免疫原性的方法可能包括将来自破伤风类毒素、脊髓灰质炎病毒或麻疹病毒的免疫显性 T 细胞抗原呈递到被细胞内感染的肿瘤细胞表面。携带这些抗原表达盒的肿瘤靶向细菌。大多数人的免疫系统会在儿童接种疫苗时更早地看到这些抗原，因此会产生记忆 T 细胞。这些 T 细胞可以在再次遇到这些抗原时重新激活，从而杀死受感染的肿瘤细胞。从垂死的肿瘤细胞扩散的抗原也可能发生以诱导针对未感染肿瘤细胞的免疫反应。

工程化的肿瘤靶向细菌能够将免疫调节蛋白带到 TME 以增强抗肿瘤免疫力。例如，在 20 年前生成的表达生物活性白细胞介素 2 (IL-2) 的鼠伤寒沙门氏菌菌株比使用 MC-38 结肠腺癌细胞系。这种抗肿瘤活性被证明依赖于自然杀伤 (NK) 细胞和 CD8+ T 细胞。表达 IL-2 的沙门氏菌菌株也已在犬类和人类临床试验中进行了测试。还产生了表达其他细胞因子的细菌菌株。

除了经典的细胞因子和趋化因子外，其他具有免疫调节活性的蛋白质也被证明在由靶向肿瘤的细菌递送时具有良好的治疗效果。例如，一种减毒的鼠伤寒沙门氏菌菌株被设计为表达 LIGHT（也称为 TNFSF14），它是 TNF 超家族的成员，在皮下和转移性小鼠肿瘤模型中显示出相当大的抗肿瘤活性。这些抗肿瘤活性需要 CD4+ 和 CD8+ T 细胞。自然杀伤 T 细胞（NKT 细胞）的动员也可以提高细菌的抗肿瘤活性。在对同基因乳腺肿瘤小鼠模型进行的一项有趣研究中， $\alpha$ -半乳糖神经酰胺（一种可以激活 NKT 细胞的糖脂）被代谢整合到单核细胞增生李斯特菌中，并被证明有助于消除转移并提高存活率。在最近的一项研究中，异源鞭毛蛋白被用作有效的免疫调节剂；*S. Typhimurium*  $\Delta$ ppGpp 菌株被设计为分泌创伤弧菌鞭毛蛋白 B，与亲本菌株相比，其控制肿瘤生长的能力显著提高。解决该机制的进一步实验表明，沙门氏菌菌株的感染激活了 Toll 样受体 4 (TLR4) -髓样分化初级反应 88 (MYD88) 途径，可能是通过存在于革兰氏阴性菌外膜中的 LPS，导致巨噬细胞和中性粒细胞的大量肿瘤浸润。分泌的异源鞭毛蛋白触发 TLR5 通路，并进一步将肿瘤浸润巨噬细胞转变为 M1 表型，与不表达异源鞭毛蛋白的姊妹菌株相比，这与包括 IL-1 $\beta$ 、TNF 和 NO 在内的杀瘤介质水平增加有关。

最近免疫检查点阻断的临床成功引发了一波将免疫检查点抑制抗体与治疗性细菌或病毒相结合的临床前和临床研究。这些研究验证了以下假设：活微生物的肿瘤内感染可以建立更具免疫原性的微环境，从而使肿瘤对免疫检查点封锁敏感。一种更直接的方法是产生分泌免疫检查点抑制剂的菌株，例如程序性细胞死亡蛋白 1 (PD1) 中和抗体或可溶性 PD1 胞外域，以结合和中和 T 细胞抑制性 PD1 配体 1 (PDL1) 表达通过肿瘤细胞。这种方法在技术上是可行的，因为已经从靶向肿瘤的细菌菌株中产生了功能性单链抗体。当使用携带带有哺乳动物基因启动子和分泌信号的表达盒的细胞内细菌时，这些抑制剂也可以由受感染的肿瘤细胞表达。由于免疫检查点抑制剂的表达针对肿瘤，因此该策略不会激活正常组织中的 T 细胞，从而可能最大限度地减少与全身免疫检查点阻断相关的毒性。

Paterson, Yvonne, Patrick D. Guirnalda, and Laurence M. Wood. "Listeria and Salmonella bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy." *Seminars in immunology*. Vol. 22. No. 3. Academic Press, 2010.

Toussaint, Bertrand, et al. "Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector." *Expert review of vaccines* 12.10 (2013): 1139-1154.

Wood, Laurence M., and Yvonne Paterson. "Attenuated *Listeria monocytogenes*: a powerful and versatile vector for the future of tumor immunotherapy." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4 (2014): 51.



Loeffler, Markus, et al. "Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.31 (2007): 12879-12883.

Loeffler, Markus, et al. "Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.31 (2007): 12879-12883.

#### 1.2.3.5 靶向肿瘤间质

肿瘤细胞可以通过下调肿瘤抗原以及参与抗原加工和细胞表面呈递的蛋白质的表达来逃避免疫系统。为了避免这个问题，肿瘤生长所需的肿瘤脉管系统的替代靶向可能对细菌治疗特别有益。如前所述，细菌优先定植于坏死和/或缺氧的肿瘤区域。用微管去稳定剂破坏肿瘤血管系统会导致灌注良好的肿瘤区域中的肿瘤细胞死亡，并扩大细菌定植。此外，可以设计细菌本身以诱导肿瘤血管系统的破坏。已经在预防和治疗环境中生成并测试了几种针对血管生成肿瘤血管关键成分的疫苗株。例如，一种针对血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2；也称为 FLK-1) 的减毒鼠伤寒沙门氏菌 DNA 疫苗株能够打破外周免疫耐受，并引发针对这种自身抗原的细胞毒性 T 细胞介导的免疫。增殖内皮细胞，导致有效保护免受肿瘤挑战。另一项针对单核细胞增生李斯特菌疫苗株的研究进一步表明，由基于 VEGFR2 的疫苗诱导的抗肿瘤活性取决于表位扩散至肿瘤抗原。其他基质成分也可以作为目标。例如，静脉注射重组透明质酸酶可改善表达吡哆胺 2,3-双加氧酶 (IDO) 靶向 shRNA156 的鼠伤寒沙门氏菌菌株的定植和抗肿瘤作用。因此，对于某些不能在实体瘤内扩散的细菌菌株，表达能够降解细胞外基质的异源酶可能有助于提高它们的定植和功效。然而，这目前只是一个假设。

Drake, Charles G., Elizabeth Jaffee, and Drew M. Pardoll. "Mechanisms of immune evasion by tumors." *Advances in immunology* 90 (2006): 51-81.

Theys, Jan, et al. "Improvement of Clostridium tumour targeting vectors evaluated in rat rhabdomyosarcomas." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 30.1 (2001): 37-41.

Dang, Long H., et al. "Targeting vascular and avascular compartments of tumors with C. novyi-NT and anti-microtubule agents." *Cancer biology & therapy* 3.3 (2004): 326-337.

Drees, Jeremy J., et al. "Vasculature disruption enhances bacterial targeting of autochthonous tumors." *Journal of Cancer* 6.9 (2015): 843.

Wood, Laurence M., et al. "Targeting tumor vasculature with novel Listeria-based vaccines directed against CD105." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60.7 (2011): 931.

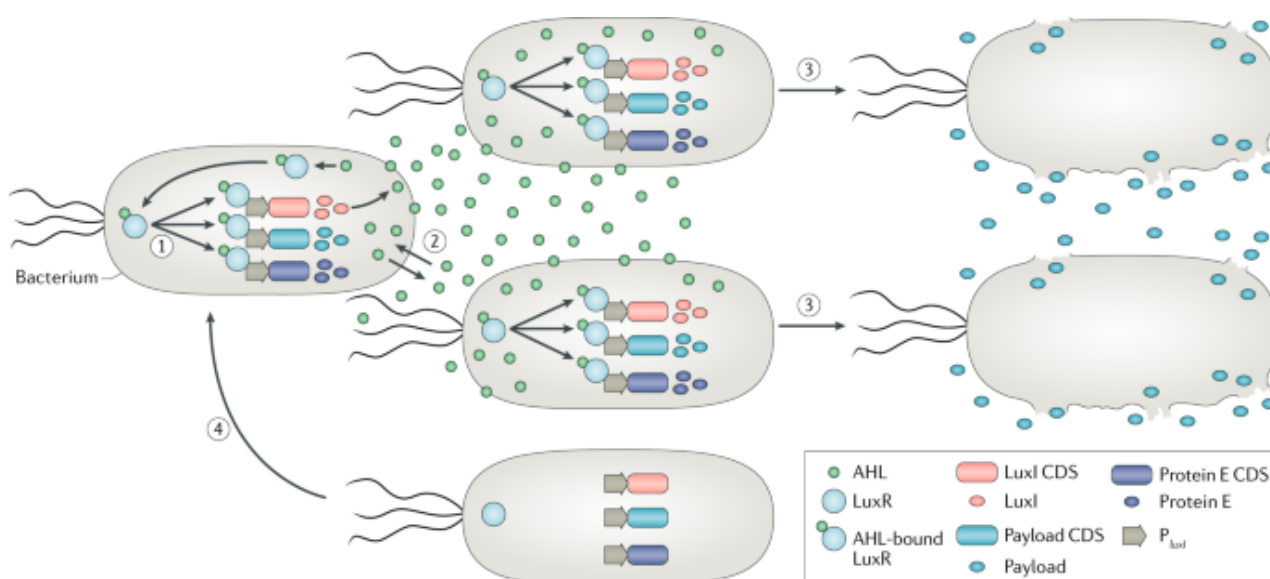
Seavey, Matthew M., et al. "An anti-vascular endothelial growth factor receptor 2/fetal liver kinase-1 Listeria monocytogenes anti-angiogenesis cancer vaccine for the treatment of primary and metastatic Her-2/neu+ breast tumors in a mouse model." *The Journal of Immunology* 182.9 (2009): 5537-5546.

Manuel, Edwin R., et al. "Salmonella-based therapy targeting indoleamine 2, 3-dioxygenase coupled with enzymatic depletion of tumor hyaluronan induces complete regression of aggressive pancreatic tumors." *Cancer immunology research* 3.9 (2015): 1096-1107.



### 1.2.3.6 合成基因网络

病毒和细菌都可以通过基因工程进行重编程，但细菌可以携带相当大的异源 DNA，从而可以进行更复杂的重编程。强大的重组 DNA 和合成生物学技术甚至可以通过将整个化学合成基因组移植到受体细胞中来重建活细菌细胞。因此，细菌被称为微观尺度的“可编程机器人工厂”。应用工程概念，研究人员在细菌中组装了生物分子模块，以构建可以执行逻辑操作的遗传网络。典型的顺式（例如，启动子和增强子）和反式（例如，转录因子和阻遏物）基因调控元件被采用并以独特的方式排列以形成反馈和前馈回路，电子设备的生物等效物例如拨动开关、可以制造振荡器和其他复杂的设备。一个优雅的设计使用来自费氏鱼和苏云金芽孢杆菌的群体感应元件排列形成负反馈基序，使基因表达在不断增长的细菌细胞群中同步振荡。在随后的研究中，该群体感应基因回路被修改以产生同步的循环细菌种群控制和抗癌药物递送作为输出（如下图）。更具体地说，一旦进入肿瘤，具有该基因回路的靶向肿瘤的鼠伤寒沙门氏菌就会根据细菌细胞的密度通过细菌裂解经历重复的种群扩张和消退循环。细胞的裂解直接释放了细菌产生的抗癌药物。因此，该基因回路通过同步细胞裂解提供治疗有效载荷的最大释放，并通过将肿瘤内细菌群维持在规定的尺寸来增加安全性，从而最大限度地降低潜在致命全身炎症反应的风险。这个例子说明了基因网络在群体水平上协调细菌行为以响应特定环境线索以增加治疗指数的潜力。



#### 【在种群水平调节细菌活动的转录程序的基因回路】

图示是一个复杂的群体感应基因电路的例子，用于转录程序，使细菌种群控制和治疗有效载荷在重复循环中同步释放。

(1) 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 结合转录因子 LuxR 与启动子  $P_{luxI}$  相互作用并激活该启动子，该启动子驱动 AHL 合酶 LuxI 的表达以建立正反馈回路、治疗有效载荷和噬菌体  $\phi X174$  蛋白 E 进行裂解细菌。

(2) AHL 信号分子可以在细菌细胞膜上自由扩散（用箭头表示），使种群内的相邻细菌同步以协同行动。在细菌种群的低密度下，AHL 分子主要从细菌中扩散出来，使基因回路不活跃。增加的细菌种群密度使大多数细菌细胞内的 AHL 分子能够积累并达到激活基因回路所需的阈值浓度。

(3) 转录程序的同步激活导致种群内细菌被蛋白质 E 同时裂解以及治疗有效载荷释放的爆发。

(4) 在裂解过程中幸存下来的少数细菌重新繁殖并开始另一个裂解和有效载荷释放循环（CDS，编码序列）。

Gibson, Daniel G., et al. "Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome." *science* 329.5987 (2010): 52-56.

Hutchison, Clyde A., et al. "Design and synthesis of a minimal bacterial genome." *Science* 351.6280 (2016).

Nemunaitis, John, et al. "Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients." *Cancer gene therapy* 10.10 (2003): 737-744.

Heap, John T., et al. "Spores of Clostridium engineered for clinical efficacy and safety cause regression and cure of tumors in vivo." *Oncotarget* 5.7 (2014): 1761.

## 1.3 临床应用面临的挑战

### 1.3.1 化学制造和控制 (CMC)

制造活治疗细菌的过程比小分子的过程复杂得多，必须考虑几个方面：最优化的细菌种子库和银行系统以及所用的试剂；生产、纯化和收获活菌的程序；以及最终产品的配方类型以及身份、纯度和效力的测试，这些都是作为最终产品的活细菌面临的独特挑战。

### 1.3.2 药代动力学和剂量反应

活细菌产品不遵循常规小分子的典型药代动力学模式和剂量反应，因此在确定最佳起始剂量和给药时间表方面面临挑战

### 1.3.3 安全问题

由于产品的传染性以及伴随的药物和管理这些产品的程序，安全性是主要问题。活细菌产品具有临床相关感染或败血症的风险，尤其是在免疫功能低下的宿主中。可能需要在治疗后使用抗生素，在某些情况下延长抗生素使用时间，以降低这种风险。对于某些产品，可能需要遵循某些程序来管理这些产品。这些程序存在相关风险。因此，早期的临床试验设计需要考虑适当的计划来减轻这些担忧。

### 1.3.4 FDA相关指导文件

用于基因治疗的微生物载体的指导文件建议（2016 年 9 月）199 侧重于研究新药申请 (IND) 申办者应在 MVGT IND 中提交的 CMC 信息，并概述了这些产品的临床前和临床考虑因素。本指南中描述的许多原则也适用于未经过基因改造的基于微生物的癌症疗法。另一份指导文件，研究性细胞和基因治疗产品的临床前评估（2013 年 11 月）200，提供了关于选择合适的动物物种和疾病动物模型以及临床前概念验证和毒理学的总体设计的综合建议 研究产品的研究，包括活细菌产品。

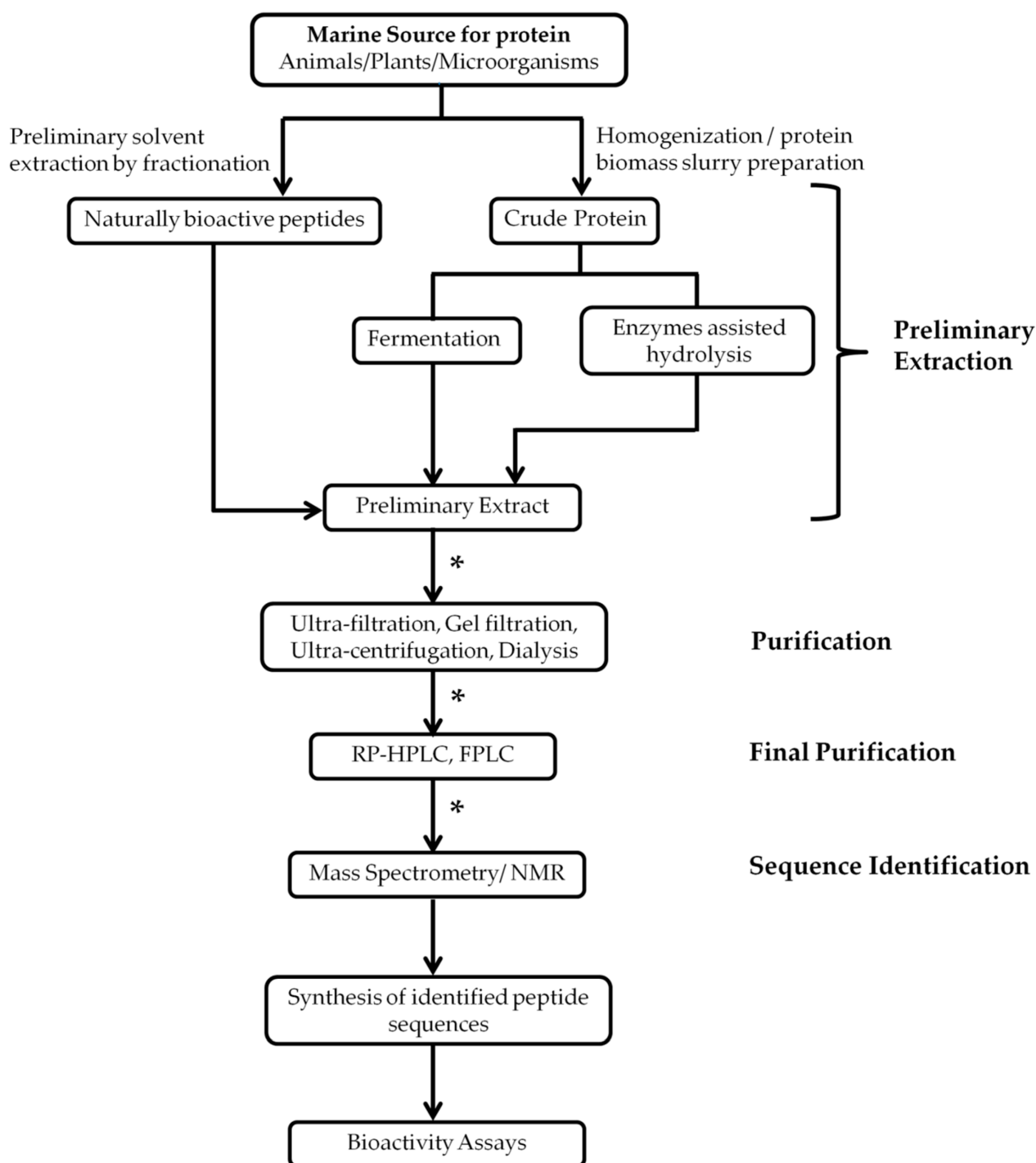
U.S. Department of Health and Human Services. Recommendations for microbial vectors used for gene therapy. FDA <https://www.fda.gov/downloads/Guidances/UCM466625.pdf> (2016).

U.S. Department of Health and Human Services. Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products. FDA <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/UCM376521.pdf> (2013).

## 2. 微生物多肽物质纯化与临床应用

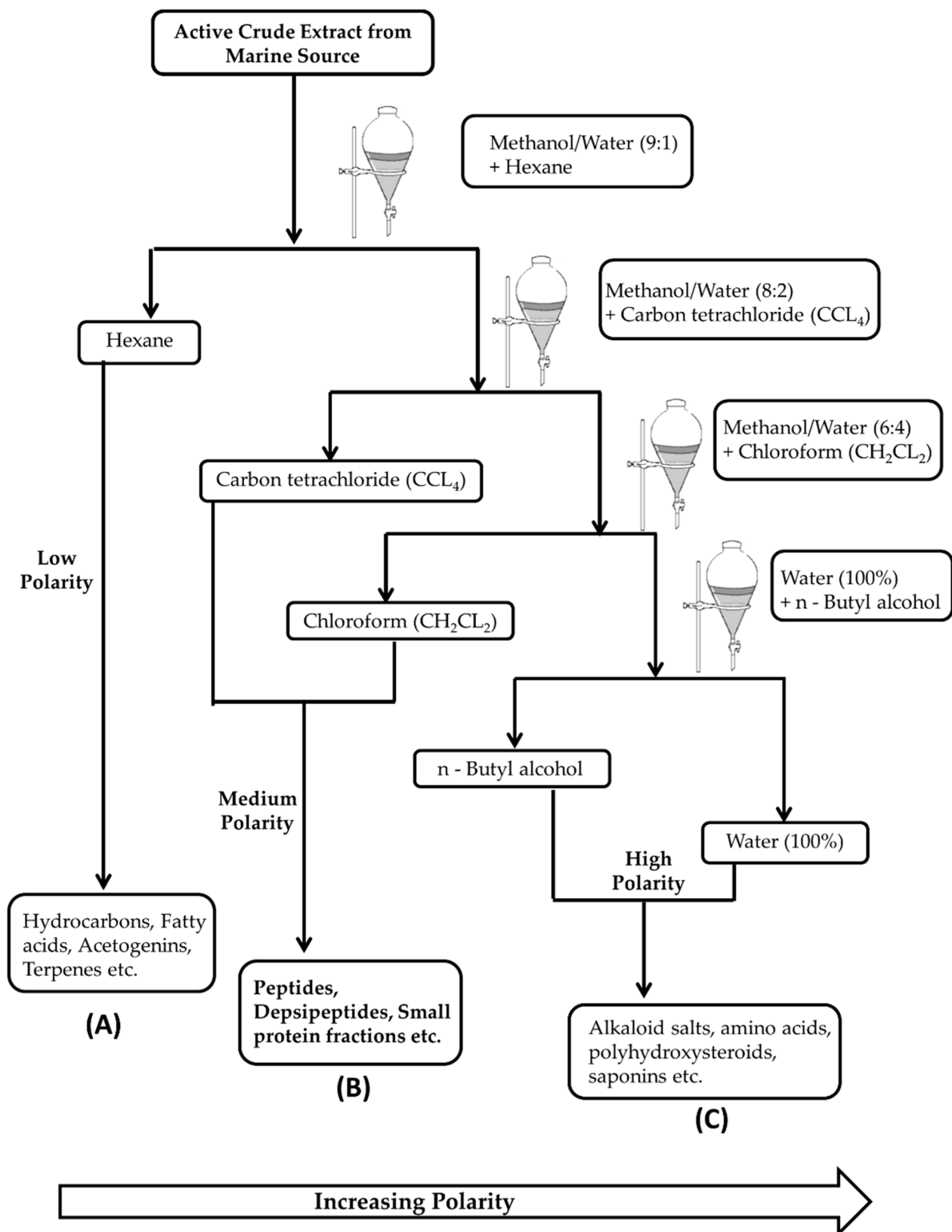
## 2.1 海洋微生物多肽物质的分离和提取

[Peptides, Peptidomimetics, and Polypeptides from Marine Sources: A Wealth of Natural Sources for Pharmaceutical Applications](#)



上图，海洋多肽的一般提取过程示意图。

海洋中的生物活性肽大致可分为：(A)可直接从海洋来源中提取的天然活性肽；(B)可通过使用各种酶对海洋来源的母体蛋白进行水解产生的肽；以及(C)可从微生物的发酵产物中获得的肽。这些不同类别的生物活性肽的提取程序在初步提取阶段有所不同（如上图）。初步提取的目的是将大的蛋白质从其余的颗粒物质中分离出来。许多不同的技术，如超滤、微滤、反渗透、纳滤、凝胶过滤和超速离心也被用于净化的第一步。在初步提取和分离多肽后，各种纯化技术包括离子交换色谱、凝胶渗透和反相高效色谱可用于下一步，以获得纯的多肽。



上图，从天然海洋来源的不同组分的溶剂梯度萃取过程的示意图

此外，生物活性肽可以用适当的溶剂系统直接从生物质中提取；最常用的溶剂是甲醇和丙酮。在这种初步的直接提取之后，可以分几个步骤进行分离。在分馏步骤中，粗提物被依次暴露在不同的梯度系统中，从低极性到极性溶剂（如上图）。通常，中等极性的梯度（如二氯甲烷、四氢呋喃、乙酸乙酯等）将多肽和去脂肽留在溶液中，如上图所示。

## 2.2 对海洋二甲基硫降解菌中二甲基硫生长诱导多肽的鉴定

[Isolation of \*Methylophaga\* spp. from Marine Dimethylsulfide-Degrading Enrichment Cultures and Identification of Polypeptides Induced during Growth on Dimethylsulfide](#)

这项研究研究的目的是：（1）确定海洋DMS降解富集培养物中的细菌种群；（2）确定能够在DMS上生长的分离物；（3）确定参与DMS代谢的多肽。

（1）和（2）是通过变性梯度凝胶电泳分析富集培养物，对分离物的16S rRNA基因进行测序，测试分离物在DMS上生长的能力，以及通过BOX-PCR来描述降解DMS的Methylophaga分离物的遗传多样性实现。

对于（3），这项研究通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析来自Methylophaga分离物生物质的细胞提取物，发现在DMS上生长过程中诱导的多肽，这些多肽通过质谱技术和N端测序得到鉴定。

多肽的鉴定步骤如下：【利用 SDS-PAGE、质谱法和 n 端测序分析多肽】

Methylophaga sp. strain DMS010在甲醇（25 mM）和DMS（1 mM）上生长，并在贝克曼离心机中使用JA-10转子以17,700×g离心20分钟，收获生物质。使用不同比例的丙烯酰胺/双丙烯酰胺对甲醇和DMS生长的Methylophaga sp.菌株DMS010的生物质进行SDS-PAGE分析。从凝胶中切除多肽条带，使用基质辅助激光解吸电离质谱法和在线电喷雾电离串联质谱法进行质谱分析。对于N端测序，使用Novex Xcell印迹模块（Invitrogen）按照制造商的说明将SDS-PAGE凝胶电印到聚偏二氟乙烯膜（Amersham，英国）。用Ponceau S（0.1% [wt/vol] in 1% [vol/vol] acetic acid）对印迹进行染色，在无菌去离子水中短暂冲洗，并在Alta Bioscience（英国伯明翰）切出目标条带进行N端序列分析之前进行风干。

## 2.3 海洋生物中活性多肽的提取和纯化

[Advances in extracting and understanding the bioactivities of marine organism peptides: A review](#)

### 2.3.1 多肽的提取

目前有四种方法用于从海洋生物中提取多肽。它们是溶剂提取、微生物发酵、酶水解和超声波辅助提取。

#### 2.3.1.1 溶剂提取法

根据相容性原则选择适当的溶剂，用于从原料中提取多肽。溶剂穿透细胞膜并溶解溶质（使细胞内外的溶质浓度不同），然后溶质从细胞中排出。当使用水溶液提取肽时，需要控制盐的浓度、pH值和温度，以避免肽的降解发生。一些与脂质紧密结合且具有非极性侧链的多肽不容易溶于水、稀盐溶液、稀酸或稀碱，因此需要用含有不同比例的有机溶剂的溶液进行提取。经常用于此的溶剂包括丙酮、氨水、稀醋酸和乙醇。用于提取多肽的有机溶剂可以得到高产率，但会对人类健康和环境产生负面影响，所以主要用于工业加工。



### 2.3.1.2 微生物发酵提取法

微生物发酵是指使用适当的细菌菌种对生物体样本进行发酵。细菌产生蛋白酶，水解底物蛋白质，然后将发酵产物分离和纯化，得到感兴趣的生物活性肽。微生物发酵大多用于加工花生、大豆和其他农产品。该过程包括发酵、离心、浓缩和制备干产品。近年来，发酵法越来越多地被用来从海洋生物中提取生物活性肽。肽可以通过不同微生物的组合从海洋细菌和鱼肠中提取。与酶法水解相比，通过发酵可以获得更高的肽产量和具有更强功能的肽。Ma等人使用微生物发酵法从鳕鱼皮中提取胶原蛋白肽，鳕鱼皮已被清洗并去除杂质。然后采用八株BNIV-7、JQIDF1、BNIV-1、JFOY3、JFADF3、DCI-1、JQIIDF5、H-2等蛋白酶效果较好的菌株在相同条件下对鳕鱼皮进行发酵，即挑选出最佳菌株，指标为水解程度。

### 2.3.1.3 酶水解提取法

通过体外蛋白质水解制备多肽的方法主要有三种，酸水解、碱水解和酶法水解。在一定条件下，酶可以使蛋白质局部水解，得到肽，而且酶不容易引起蛋白质变性。因为不同的蛋白质可以被相应的酶水解，所以酶水解很容易控制，也很有针对性。因此，酶法水解被广泛用于生产多肽和使用多肽的实验中。近年来，许多涉及水生动物蛋白水解的研究已经进行。所选择的蛋白酶是水解蛋白质以产生活性肽的关键。适合的蛋白酶包括动物蛋白酶（如胃蛋白酶和胰蛋白酶）和植物蛋白酶（如木瓜蛋白酶和无花果蛋白酶）。各种微生物蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶和嗜热菌蛋白酶）也已被使用。具有不同特性的酶能以不同方式水解相同的蛋白质。在多肽实验和多肽的工业生产中，经常同时使用多种酶，以获得比使用单个酶更高的水解率和更好的酶水解效果。酶水解所用的温度、时间和pH值也会影响产品。酶水解过程中应保持酶水解液和肽的活性。肽被水解的程度随着酶水解程度的增加而增加。增加水解程度会降低多肽的分子量和活性。然而，一旦发生了一定量的酶水解，随着更多的酶水解发生，产品的活性将下降。这是因为随着酶解程度的增加，酶解过程中产生的活性肽会被分解成氨基酸或肽中的活性基团被破坏。这些过程会降低产品的活性。因此，有必要严格控制用酶水解法制备多肽时发生的酶水解程度，以确保蛋白质能够充分溶解，并确保产生的多肽具有高活性。

### 2.3.1.4 超声辅助提取法

超声被用来辅助多肽的提取，并经常与酶水解相结合。超声辅助提取的发生主要是由于所应用的超声波的机械效应。超声波振动可以引起细胞内物质的移动。超声波的超细按摩会使细胞质流动，整个细胞会发生微震和旋转，因此会引起摩擦发生。细胞将变得柔软，超声处理适当的时间将使植物细胞壁破裂，导致内容物释放到溶剂中。这些变化是物理性的，不会对成分产生化学变化。超声处理可以明显缩短提取时间，提高提取效率，而不使用可能改变肽的高温，所以被广泛使用。Zhou和Yang等人利用超声辅助酶水解法制备抗氧化肽，鲑鱼肉的蛋白质含量很高。采用生物测定法测定肽的含量，并以1,1-二庚基-2-三硝基苯胍自由基清除率为指标，研究从青鱼肉中制备抗氧化肽的情况。

## 2.3.2 海洋生物群中多肽的分离和纯化

需要使用不同的分离方法来适应提取的具有不同特性的活性多肽。常用的分离方法包括色谱法、膜分离法、超临界流体萃取法和电泳法。

### 2.3.2.1 色谱技术

#### 高效液相色谱法

高效液相色谱法（HPLC）是一种传统的分离和分析技术，发展于20世纪60年代末。高效液相色谱法依赖于混合物中每种成分在流动相和固定相之间的不同分配系数。HPLC应用广泛，具有分离效果好、分离速度快、样品量大、回收率高等特点。HPLC是用于分离和纯化多肽的主要方法之一，并可与其他仪器结合使用来鉴定多肽。Kuipers和Gruppen（2007）报告说，在214纳米的乙腈和甲酸的存在下，测量了20个氨基酸和肽键的摩尔消光系数，从而能够定量比较从反相HPLC中洗脱出来的肽。此外，HPLC和质

谱 (MS) 的结合可以用来分离和鉴定肽。Jones等人 (1996年) 利用MS的敏感性和HPLC的分离能力研究了单一锥壳的毒液。该分析显示, 锥壳毒液含有复杂的多肽混合物, 这些多肽在物种之间和物种内部的数量和质量都有所不同。

### 离子交换色谱法

离子交换色谱法是由Thompson等人 (1986) 首次开发的。离子交换色谱法涉及使用离子交换器作为固定相。该相含有固定的离子基团和可交换的离子, 与流动相中的离子保持平衡。流动相携带成分离子通过离子交换柱, 成分离子和可交换离子进行可逆交换。离子交换色谱法的分辨率高, 耐酸碱, 操作简单, 所以已经成为分离多肽的重要方法。Wang, Zhao, 等人 (2011年) 使用DEAE Sepharose Fast Flow离子交换柱纯化了兔和豚鼠血清中的免疫球蛋白G, 使用pH值为7.0和8.5的Tris-HCl缓冲液作为流动相, 研究pH值对免疫球蛋白G回收率和纯度的影响, 发现使用Tris-HCl缓冲液的结果更好。Alpert等人证明, 在离子交换色谱中, 具有相同净电荷和一个碱性残基的蛋白水解肽的分离受其对固定相的特定取向影响 (Alpert等人, 2010) 。

### 凝胶色谱法

凝胶色谱法是一种快速和简单的分离和分析技术, 于20世纪60年代初开发。凝胶色谱法也被称为尺寸排除色谱法、分子筛色谱法和凝胶过滤色谱法。在凝胶色谱法中, 一个具有孔隙网络的结构被流动相不断洗脱。溶质按照分子大小的顺序, 从大到小被洗脱。凝胶色谱设备简单易行, 不需要有机溶剂, 能有效分离高分子量物质。缺点是只能分离有限分子量范围内的多肽, 含有多肽的流动相需要保持特定的粘度, 以保证流动相有效地通过色谱柱。Wang, Zhang等人 (2011年) 用SP-Sephadex C-25柱、Sephadex G-50柱和C18反相HPLC柱分离鲨鱼皮水解物, 分离出分子量为906 Da、氨基酸序列为GAIG-PAGPLGP的亲水性三肽。

### 反相(RP)-HPLC

RP-HPLC是一种涉及非极性固定相和极性流动相的液相色谱方法。RP-HPLC具有良好的分离度、高分辨率和高回收率。RP-HPLC是分离、纯化和制备多肽的一个重要方法。研究发现, 在流动相中加入10%-16%的三氟乙醇可以明显改善多肽的分离效果 (Murata, 2015) 。Ennaas等人使用 (2015) RP-HPLC从蛋白酶水解物 (一种鲭鱼副产品) 中分离出四种抗菌肽。

### 高速逆流色谱法 (CC)

逆流色谱法是一种无载体的液-液分配色谱技术。CC是从传统的液-液萃取法发展而来的。逆流色谱法的回收率高, 能适应大负荷, 不受载体的干扰, 但分离效率差。CC需要大量的设备和时间, 不应该被推广。Li等人 (2008) 用复杂的蛋白酶混合物酶解南极磷虾, 得到虾粉多肽, 通过超滤和高速CC分离纯化, 然后在体外评估多肽的抗氧化活性。

#### 2.3.2.2 膜分离法

膜分离是通过使用由外部提供的能量或化学势驱动的天然或合成聚合物薄膜来分离、分馏、提纯和浓缩两种或多种溶质的过程。膜分离可用于在环境或接近环境的温度下分离物质, 并且不会引起相变或化学变化。膜分离是一种有效的、节能的、无污染的分离技术, 可以保持原材料的特性。近年来, 微滤、超滤、纳滤和亲和膜过滤等膜分离技术已经得到发展。Zhang等人 (2016年) 使用超滤膜分离相对分子量为10、5和3kDa的化合物, 分离微黄羊角面包的蛋白质水解物。使用其他分离技术进一步纯化具有最高抗氧化活性的成分, 得到两种类型的抗氧化肽, 一种是氨基酸序列为Ser-ArgCys-His-Val, 另一种是Pro-Glu-His-Trp。

### 微滤

微滤是一种精密过滤技术。涉及的基本原理是筛分。有两种类型的微滤膜，有机的和无机的。有机聚合物包括醋酸纤维素、聚酰胺、聚碳酸酯和聚丙烯。无机膜包括陶瓷和金属。微孔膜的特点意味着主要用于从气体和液体中去除颗粒、细菌和其他污染物，以分离、净化和浓缩感兴趣的物质。用于微过滤的膜的保留特性将由膜的孔径大小决定。大多数微滤膜的孔径在0.1到1微米之间。因此，微滤膜可以用来分离大直径的细菌和悬浮固体。微过滤可用于澄清、过滤和消毒液体（Welderufael等人，2012）。Szymczak等人（2018）通过微滤过滤鲑鱼的盐水，以分离盐水中的蛋白质和肽。他们证明，盐水的再利用可以使蛋白质水解产物（PHP）从肉到盐水的损失减少一半，并使PHP和肽酶反向扩散到肉。

## 超滤

超滤是介于微滤和纳滤之间的一种膜过滤过程。使用的膜的孔径在1纳米和0.5微米之间。超滤可用于净化、分离和浓缩溶液的成分。超滤过程一般可以理解为由膜的孔径控制的筛分过程。该过程由膜的两边的压力差驱动，超滤膜是过滤介质。水溶液流过膜表面，在特定的压力下，只有水和小于膜的孔径的分子会通过膜。通过超滤进行分离的典型分子量范围是10,000-300,000 Da。超滤膜可用于分离胶体、大分子有机化合物和悬浮固体，并广泛用于澄清进料液体，分离和净化大分子有机化合物，以及去除热源。Cho等人（2018年）报告说，微滤/超滤和反渗透膜上的生物膜群落结构在属级上发生了明显的转变。Campos等人（2010）研究了豇豆蛋白提取物水解物的超滤肽，结果表明，水解物和超滤肽可用于制备具有抗高血压和抗氧化活性的生理功能食品。

## Nanofiltration

纳滤膜是在1980年代末开发的。纳滤膜拦截分子量在反渗透和超滤技术所拦截的化合物之间。用于纳滤的膜最近才开始被称为纳滤膜。纳滤膜包含纳米级的孔隙。在拦截率>95%的情况下，纳滤膜拦截的最小分子的直径是~1纳米。一些国家生产的纳滤膜已经实现了商业化。像其他膜分离过程一样，如反渗透和超滤，纳滤涉及驱动通过膜分离成分的压力差。分离机制可以用各种模型来描述，如电荷、孔隙、静电排斥和三维阻隔模型。活性肽可以用纳滤膜进行分离。肽分子含有自由的羧基和氨基，在等电点上会呈电中性。一些纳滤膜有静电功能团。调整溶液的pH值可以使这种纳滤膜捕获离子而不捕获电中性分子。具有相似分子量但不同等电点的肽可以用这种膜进行分离（Saidi等人，2018）。Mosser等人（2015年）通过纳滤工艺研究酵母提取物的分馏，以评估参与CHO细胞培养改进的关键化合物，短肽在渗透物部分被一起分离。

## 亲和膜过滤

亲和-膜过滤是一种新的耦合分离技术，结合了亲和-膜相互作用和膜分离技术。因此，亲和膜过滤可用于分离和浓缩化合物。亲和膜过滤具有亲和层析的选择性的优势，并给出了高度的分离精度。

### 2.3.2.3 超临界流体萃取

超临界流体萃取通常使用二氧化碳作为萃取剂（而不是传统的有毒、易燃和挥发性有机溶剂）。超临界流体萃取是分离海洋多肽成分的重要方法，也可用于从海洋基质中分离其他活性物质（如精油、海洋生物毒素、天然色素和稀有氨基酸）。Goetz等人（2014）通过超临界流体色谱法改善了肽的渗透性。通过评估多肽暴露的极性，这项技术可以用来替代渗透性

### 2.3.2.4 毛细管电泳

毛细管电泳是一种液相分离技术，以毛细管为分离通道，以高压直流电场为驱动力。毛细管电泳有各种分离模式。在毛细管区域电泳中，分离是基于不同成分的不同电荷影响电泳发生的速度。在毛细管等电聚焦电泳中，分离是基于不同蛋白质和肽的不同等电点。毛细管等电聚焦电泳主要用于分离不同来源的肽的异构体。在毛细管凝胶电泳中，分离是基于分子筛的。用十二烷基磺酸钠处理的蛋白质或多肽因其分子形状和重量不同而被分离。这种方法适用于分离具有许多疏水侧链的肽和蛋白质。Ghafouri等人（2010）通过二维凝胶电泳绘制唾液中的蛋白质，并通过使用胰蛋白酶裂解和基质辅助激光解吸/电离-

飞行时间-质谱分析的肽质量指纹识别丰富的蛋白质。

## 3. 海洋微生物产品与肿瘤治疗

### 3.1 来自海洋微生物的L-天冬酰胺酶与肿瘤治疗

[Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry](#)

#### 3.1.1 海洋微生物产品的优势

陆地生物一直是典型的酶源，然而在过去的几十年里，海洋生物的巨大多样性已经被挖掘出具有新的或改进的特性的酶。鉴于海洋习性的特点，由海洋生物（如藻类、细菌、真菌和海绵）产生的酶表现出独特的生理特性，如超温稳定性、嗜热性、耐盐和耐酸碱性、对极端寒冷条件的适应性，以及新颖的化学和立体化学特性。此外，经常在海洋生物中发现的大多数卤菌酶具有相当强的耐热性，并在室温下长期保持稳定。这些特征使海洋酶能够在极端条件下催化化学反应，这被证明对它们的大多数陆地对应物是有害的，并赋予海洋酶在相关生物技术应用方面的独特潜力，无论是在商业产品的制造还是在健康领域。

#### 3.1.2 抗癌药物L-天冬酰胺酶

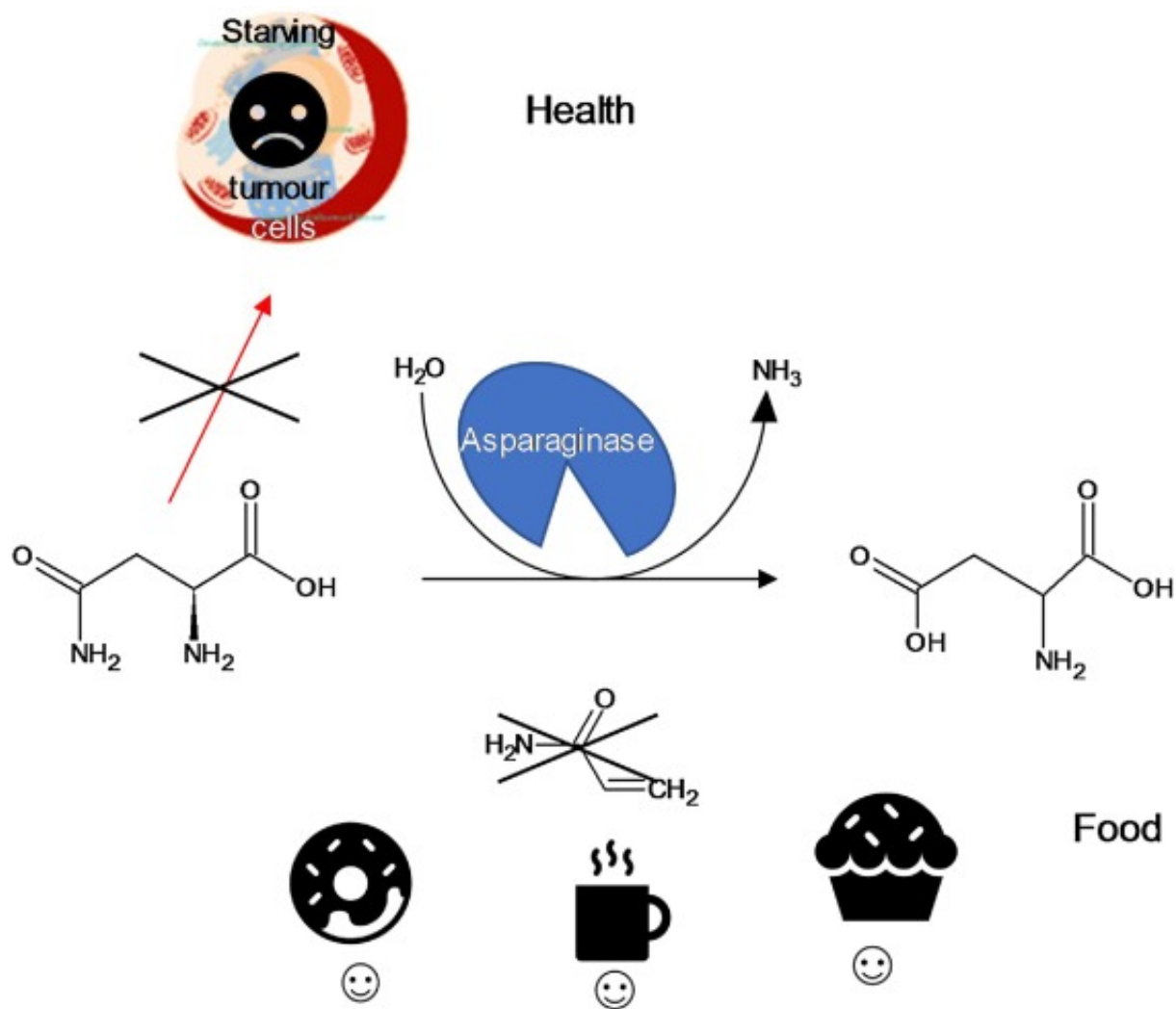
L-天冬酰胺酶（L-天冬氨酸氨基水解酶，E.C. 3.5.1.1）是一种水解酶，主要催化L-天冬氨酸向L-天冬氨酸和氨的转化。这种酶也有一些L-谷氨酰胺酶的活性。用于生物医学应用的微生物L-天门冬酰胺酶制剂目前占全球抗白血病/抗淋巴瘤药物需求的三分之一。这远远超过了其他治疗性酶，L-天冬酰胺酶已被广泛用于急性淋巴细胞白血病（ALL）疾病的抗白血病化疗，尤其是儿童。由于L-天冬酰胺酶在治疗急性淋巴细胞白血病中发挥了有效的抗肿瘤作用，它已被应用于非何杰金氏淋巴瘤、胰腺癌、牛淋巴瘤等的抗肿瘤剂。和牛淋巴瘤肉瘤、急性粒细胞白血病、急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、网状肉瘤、淋巴瘤肉瘤和黑色素瘤肉瘤。

Broome, J.D., 1961. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature*, 191(4793), pp.1114-1115.

Ghasemi, Y., Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S., Zarrini, G., Ghoshoon, M., Raei, M.J., Morowvat, M.H., Kafizadeh, F. and Kazemi, A., 2008. An optimized medium for screening of L-asparaginase production by *Escherichia coli*. *Am J Biochem Biotechnol*, 4(4), pp.422-424.

Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S., Ghoshoon, M.B. and Ghasemi, Y., 2014. *Chlorella vulgaris*, a novel microalgal source for L-asparaginase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), pp.214-217.

Abd El Baky, H.H. and El Baroty, G.S., 2016. Optimization of growth conditions for purification and production of L-asparaginase by *Spirulina maxima*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.



上图，L-天冬酰胺酶将天冬酰胺水解为天冬氨酸，从而防止天冬酰胺喂养肿瘤细胞和在热加工食品中形成丙烯酰胺。

此外，L-天冬酰胺酶也被用来减少熟食中丙烯酰胺的形成。虽然他的应用属于食品安全范围，但仍与癌症有关，因为丙烯酰胺是人类的可疑致癌物。

### 3.1.3 来自海洋微生物的L-天冬酰胺酶

临床结果表明，目前使用的来自陆地微生物的L-天门冬酰胺酶会引起毒性和免疫抑制，而且还会产生抗药性。最近，来自海洋细菌的L-天冬酰胺酶由于具有新颖的结构、较低的分子量、低毒性和较高的底物特异性等特点，被认为是在临床和食品领域应用的有希望的候选者。

## 3.2 一些新型海洋微生物天然化合物的抗癌活性

[Metabolites from Marine Microorganisms, Micro, and Macroalgae: Immense Scope for Pharmacology](#)



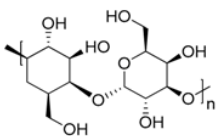
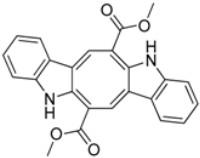
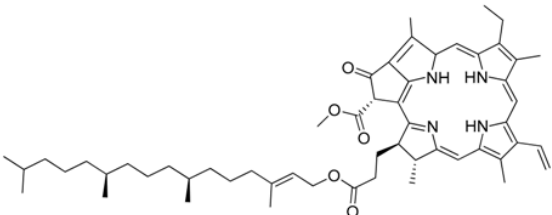
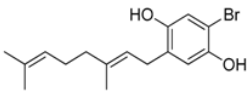
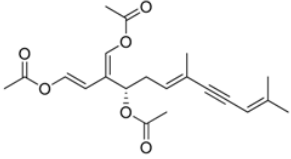
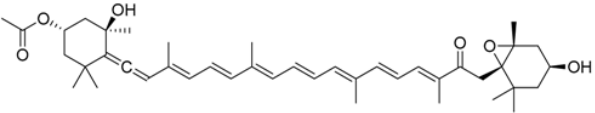
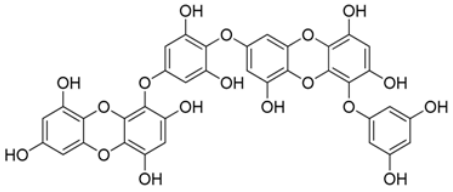
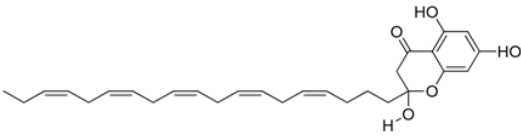
```
#bibtex ref
@article{barzkar2019metabolites,
title={Metabolites from marine microorganisms, micro, and macroalgae: Immense scope for pharmacology},
author={Barzkar, Noora and Jahromi, Saeid Tamadoni and Poorsaheli, Hadi Bolooki and Vianello, Fabio},
journal={Marine drugs},
volume={17},
number={8},
pages={464},
year={2019},
publisher={Multidisciplinary Digital Publishing Institute}
}
```

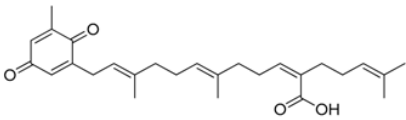
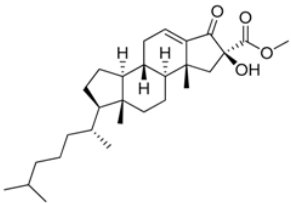
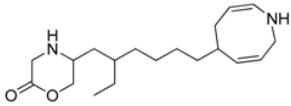
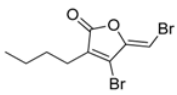
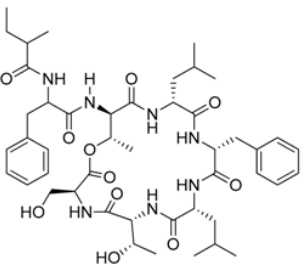
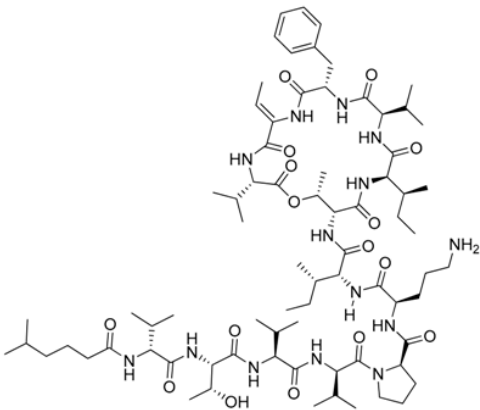
细菌Micromonospora sp.产生硫考拉林 (thiocoraline)，一种抑制细胞DNA聚合酶- $\alpha$ 的去脂肽 (depsipeptide)。这种物质已经在临床前研究中被应用于治疗癌症。Pleosporales目中的一种身份不明的真菌 (菌株CRIF2) 产生了几种化合物，对肿瘤细胞系显示出微弱的细胞毒性活性。从Rhizophora mucronata的叶子中分离出的一种Pestalotiopsis sp.真菌产生一种色酮，即pestalotiopsone F，它对L5178Y小鼠癌细胞显示出细胞毒性活性。

Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of natural products*, 67(8), pp.1216-1238.

Prachyawarakorn, V., Mahidol, C., Sureram, S., Sangpetsiripan, S., Wiyakrutta, S., Ruchirawat, S. and Kittakoop, P., 2008. Diketopiperazines and phthalides from a marine derived fungus of the order Pleosporales. *Planta medica*, 74(01), pp.69-72.

Xu, J., Kjer, J., Sendker, J., Wray, V., Guan, H., Edrada, R., Lin, W., Wu, J. and Proksch, P., 2009. Chromones from the endophytic fungus Pestalotiopsis sp. isolated from the Chinese mangrove plant Rhizophora mucronata. *Journal of natural products*, 72(4), pp.662-665.

Natural Compound	Chemical Structure	Species	Biological Activity	Mechanism of action	References
Sulfated galactan		Green alga/ <i>Codium fragile</i>	Immunostimulating effects via activation of macrophages	Stimulates the production of nitric oxide by inducing iNOS at mRNA and protein levels and induces the expression of several cytokine mRNA, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$	[71]
Caulerpin		Green alga/ <i>Caulerpa racemosa</i>	Anti-inflammatory and antinociceptive	Inhibits capsaicin-induced ear edema model and significantly reduces the number of recruited cells	[72]
Pheophytin A		Green alga/ <i>Enteromorpha prolifera</i>	Anti-inflammatory	Exhibits significant suppression of TPA-induced inflammatory reaction, such as edema formation in BALB/c mouse ear	[73]
Cymopols		Green alga/ <i>Cymopolia barbata</i>	Antimutagenic	Inhibits the mutagenicity of 2-aminoanthracene in T-98 strain. Behaves as a metabolic activator	[74]
Caulerpenyne		Green alga/ <i>Caulerpa taxifolia</i>	Anticancer	Shows cytotoxicity in cultured cell lines, such as KB cells and hamster fibroblasts	[75,76]
Fucoxanthin		Brown algae	Antidiabetic and antiobesity	Suppresses McP-1, promotes adrb3 and gluT4 expression, and induces uncoupling protein 1 expression in white adipose tissue (WAT) mitochondria, leading to oxidation of fatty acids and heat production in WAT	[77]
Dieckol		Brown alga/ <i>Ecklonia cava</i>	Anti-inflammatory and neuroprotective agent	Suppresses LPS-induced production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in murine BV2 microglia	[78]
Spiralisone A		Brown alga/ <i>Zonaria spiralis</i>	Kinase inhibitor and antibacterial	Shows inhibitory activity against neurodegenerative diseases targeting CDK5/p25, CK1 $\delta$ , and GSK3 $\beta$ kinases. Inhibits the Gram-positive bacteria <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6051 and 6633)	[79]

Sargaquinoic acid		Brown alga/ <i>Sargassum sagamianum</i>	AChE inhibitor	Inhibits acetylcholinesterase activity	[80]
Phorbasterone B		Red seaweed	Antimicrobial	Exhibits antimicrobial activity against <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , and <i>Candida albicans</i>	[81]
Azocinyl-morpholinone		Red seaweed/ <i>Gracilaria opuntia</i>	Antioxidant, anti-inflammatory by inhibiting cyclooxygenase and lipoxygenase	Azocinyl morpholinone significantly mitigated the carrageenan-induced paw edema	[82]
(5Z)-4-bromo-5-(bromo-methylene)-3-butyl-2(5H)-furanone		Red seaweed/ <i>Delisea pulchra</i>	Antifouling agent	Inhibits microbial-induced corrosion related to Gram-positive bacteria	[83]
Kahalalide A		Red seaweed/ <i>Bryopsis</i> sp.	Antibacterial agent	Shows in vitro activity against <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[84,85]
Kahalalide F		Red seaweed/ <i>Bryopsis</i> sp.	Antibacterial and anti-HIV agent	Shows antibacterial activity against <i>M. tuberculosis</i> and proposed for the treatment of lung cancer	[84,85]

上图，一些新型海洋藻类产生的天然化合物的结构和生物活性。

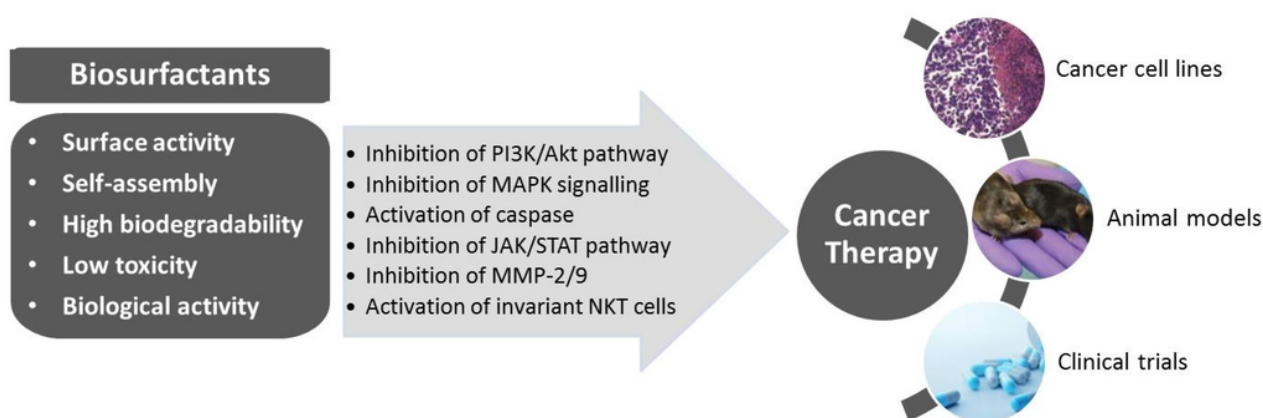
### 3.3 来自海洋微生物的生物表面活性剂及其抗癌应用

[Biosurfactants Produced by Marine Microorganisms with Therapeutic Applications](#)

```
#bibtex ref
@article{gudina2016biosurfactants,
title={Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications},
author={Gudi{\~n}a, Eduardo J and Teixeira, Jos{\'}{e} A and Rodrigues, L{\'}{i}gia R},
journal={Marine drugs},
volume={14},
number={2},
pages={38},
year={2016},
publisher={Multidisciplinary Digital Publishing Institute}
}
```

近年来，生物表面活性剂引起了广泛的关注；它们是由微生物合成的表面活性化合物，表现出不同的化学结构，包括糖脂、脂肽、多糖-蛋白质复合物、磷脂、脂肪酸和中性脂质。由于其两亲性，生物表面活性剂显示出各种表面活性，这使得它们可以应用于与乳化、发泡、去污、润湿、分散和增溶疏水化合物有关的几个领域。据报道，许多生物表面活性剂与合成表面活性剂相比，具有类似或更好的性能，此外，它们的低毒性、高生物降解性和在极端温度、盐度和pH值下的有效性，使它们在不同的应用中，包括农业、食品、化妆品或石油工业以及生物修复中，成为其化学对应物的绿色替代品。此外，一些生物表面活性剂表现出抗菌、抗真菌、抗病毒或抗肿瘤活性，使它们在许多生物医学应用中成为传统治疗剂的潜在替代品。而由于其独特的环境条件，海洋环境是分离新的生物表面活性剂生产微生物的良好来源。目前已经报道了相当数量的能够生产不同结构的生物表面活性剂的海洋微生物。

生物表面活性剂——特别是脂肽和糖脂——已被强调其作为抗癌剂干扰癌症进展过程的潜力（如下图）。这些化合物已被牵涉到几个细胞间分子识别步骤，包括信号转导、细胞分化和细胞免疫反应等。此外，它们还表现出低毒性、高疗效和易生物降解性，这些都是任何抗癌剂的相关特征。已经提出了生物表面活性剂抗癌活性的不同机制，包括延迟细胞周期进展；抑制关键的信号通路，如Akt、细胞外信号调节激酶/Jun N-末端激酶（ERK/JNK）和Janus激酶/信号转导剂和转录激活剂（JAK/STAT）；减少血管生成；激活自然杀手T（NKT）细胞；以及通过癌细胞的死亡受体诱导细胞凋亡。此外，生物表面活性剂破坏细胞膜的能力，导致一系列事件，包括裂解、膜渗透性增加和代谢物泄漏，也被指出是抗癌活性的一个可能机制。



上图，生物表面活性剂的特性和抗癌效应对新型癌症疗法的设计。

### 3.3.1 脂肽 Lipopeptides

脂肽——特别是表面活性剂类型的脂肽——因其对一些癌细胞系的潜在抗癌活性而被广泛研究。表面活性剂的抗癌活性与脂肪酸分子的疏水性质有关，它与膜结合的磷脂的酰基链相互作用。同时，它的肽基与癌细胞中膜脂的极性头有强烈的相互作用。持有较长脂肪酸链的Surfactin能更有效地渗透到癌细胞膜中[56]。根据所评估的癌症模型（乳腺癌、结肠癌、白血病、肝癌、黑色素瘤），已经提出了其抗癌活性的不同机制，包括抑制基质金属蛋白酶（参与入侵和转移过程的蛋白酶）；PI3/Akt和MAPK信号通路；细胞周期停滞在G2/M；以及通过ROS/JNK介导的线粒体/caspase通路诱导凋亡。这种环状脂肽由7个氨基酸和一个脂质基团（包含13至15个碳）组成，由从不同来源（包括海洋环境）获取的几株杆菌产生。海洋细菌*B. circulans* DMS-2被发现产生脂肽，即表面活性剂和fengycin异构体，对人类结肠癌细胞系HCT-15 (IC<sub>50</sub> 80 µg·mL<sup>-1</sup>) 和HT-29 (IC<sub>50</sub> 120 µg·mL<sup>-1</sup>) 显示出显著和选择性的抗增殖活性。

此外，不同的杆菌菌株产生iturins（杆菌素、iturin A/C和霉菌素）。这些脂肽是两栖分子，含有一个与β-氨基脂肪酸（含有13至17个碳原子）共轭的环状肽链。研究发现，由海洋中的巨型芽孢杆菌菌株产生的Iturin A能显著损害乳腺癌细胞（MDA-MB-231和MCF-7）的增殖并抑制Akt信号网络，从而诱导细胞凋亡。值得注意的是，能够抑制表现出异常Akt活性的乳腺癌类型的治疗方法是最重要的。此外，这种生物表面活性剂抑制了EGF诱导的Akt磷酸化及其下游目标GSK3β和FoxO3a。Iturin A还被发现可以抑制乳腺癌异种移植模型中的肿瘤生长。其他由海洋微生物产生的生物表面活性剂也被报道在iturin类中，如hallobacillin和mixirins。哈洛巴西林是由瓜伊马斯盆地（墨西哥）附近的海洋沉积物中分离出的一种芽孢杆菌产生的，对人类结肠癌细胞株HCT-116具有细胞毒性 (IC<sub>50</sub> 0.98 µg·mL<sup>-1</sup>)。Mixirins (A、B和C) 也是从一个海洋芽孢杆菌菌株中分离出来的，是由L-和D-氨基酸与一个不寻常的β-氨基烷酸的混合物组成的环状八肽。同样，这些脂肽对结肠癌细胞具有细胞毒性，其中变体A的毒性最强。

显然，海洋环境代表了新型增值化合物的一个有希望的来源。在这些化合物中，已报道了一些新的生物表面活性剂结构，即somocystinamide A, fellutamides, rakicidin 和 apratoxin。

Wrasidlo及其合作者从蓝藻*Lyngbya majuscula*中获得脂肽somocystinamide A。这种生物表面活性剂对白血病、肺癌、乳腺癌和前列腺癌细胞表现出明显的细胞毒性，根据癌症模型，IC<sub>50</sub>值从1.3 µM到970 nM不等。它被认为是一种血管生成和肿瘤细胞增殖的多能抑制剂。此外，它通过caspase-8的激活和PARP的裂解诱导Jurkat和白血病细胞的凋亡。还发现Somocystinamide A能有效地阻止体外内皮细胞管的形成和斑马鱼模型中的血管生长，从而表明它具有抗血管生成的特性。

Suyama, Takashi L., and William H. Gerwick. "Stereospecific total synthesis of somocystinamide A." *Organic letters* 10.20 (2008): 4449.

Wrasidlo, Wolf, et al. "The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase 8." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.7 (2008): 2313-2318.

Fellutamides A和B是从鱼源性真菌*Penicillium fellutanum*中分离出来的线性脂肽。这些生物表面活性剂被发现对P388、L1210小鼠白血病细胞和KB人类表皮癌细胞具有细胞毒性。从海绵衍生的真菌*Aspergillus versicolor*中分离出的Fellutamides C和F对SK-MEL-2皮肤癌、XF498数癌、HCT-15结肠癌、A549肺癌和SK-OV-3卵巢癌细胞系显示出细胞毒性作用，Fellutamide C的IC<sub>50</sub>值在3.1至33.1 µM之间，Fellutamide F在0.2至3.1 µM之间。

Lee, Yoon-Mi, et al. "A cytotoxic lipopeptide from the sponge-derived fungus *Aspergillus versicolor*." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 31.1 (2010): 205-208.

Lee, Yoon-Mi, et al. "A cytotoxic fellutamide analogue from the sponge-derived fungus *Aspergillus versicolor*." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 32.10 (2011): 3817-3820.



Shigemori, Hideyuki, et al. "Fellutamides A and B, cytotoxic peptides from a marine fish-possessing fungus *Penicillium fellutanum*." *Tetrahedron* 47.40 (1991): 8529-8534.

Rakicidins是由海洋细菌*Micromonospora*产生的抗癌脂肽。在这些脂肽中，Rakicidin A对几种癌症细胞系，如HCT-8和PANC-1，表现出独特的缺氧选择性细胞毒性。低氧主要存在于实体瘤中，并与不良预后和临床结果有关，因为它引发了侵袭性、血管生成、转移和凋亡逃避。据报道，Rakicidin B对食道鳞癌细胞（EC109）、肺癌细胞（A549和95D）、胃癌细胞（SGC7901）、子宫颈癌细胞（HeLa）和肝癌细胞（HepG2）也具有活性。这种拉基丁衍生物通过激活caspase-3、-7和-9诱导细胞凋亡，并阻断MAPK和JNK/p38信号传导途径。含有短脂质链的Rakicidin衍生物C和D没有细胞毒性，尽管衍生物D被发现干扰了侵袭性乳腺癌细胞的侵入性。

Poulsen, Thomas B. "A concise route to the macrocyclic core of the rakicidins." *Chemical Communications* 47.48 (2011): 12837-12839.

Takeuchi, Miki, et al. "Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells." *Cancer science* 102.3 (2011): 591-596.

Xie, Jian-Jun, et al. "FW523-3, a novel lipopeptide compound, induces apoptosis in cancer cells." *Molecular medicine reports* 4.4 (2011): 759-763.

Yamazaki, Yohko, Setsuko Kunimoto, and Daishiro Ikeda. "Rakicidin A: a hypoxia-selective cytotoxin." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30.2 (2007): 261-265.

Wilson, William R., and Michael P. Hay. "Targeting hypoxia in cancer therapy." *Nature Reviews Cancer* 11.6 (2011): 393-410.

杏毒素Apratoxins（衍生物A至G）是一组新的环状脂肽，从海洋蓝藻中分离出来，对一些癌细胞表现出明显的细胞毒性。杏毒素A通过激活caspases诱导细胞凋亡，并抑制了人骨肉瘤U2OS细胞的IL-6信号通路。从蓝藻*Moorea producens*中分离出的两种杏毒素类似物（杏毒素A亚砷和杏毒素H）对人类NCI-H460肺癌细胞显示出极大的细胞毒性。其他研究小组也报道了使用其他杏毒素衍生物（D、F和G）对该细胞系的强烈细胞毒性。杏毒素E、F和G对HCT-116结肠癌细胞和小鼠模型也有活性。

Chen, Qi-Yin, Yanxia Liu, and Hendrik Luesch. "Systematic chemical mutagenesis identifies a potent novel apratoxin A/E hybrid with improved in vivo antitumor activity." *ACS medicinal chemistry letters* 2.11 (2011): 861-865.

Nunnery, Joshawna K., Emily Mevers, and William H. Gerwick. "Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria." *Current Opinion in Biotechnology* 21.6 (2010): 787-793.

Robertson, Bradley D., Sarah E. Wengryniuk, and Don M. Coltart. "Asymmetric total synthesis of apratoxin D." *Organic letters* 14.20 (2012): 5192-5195.

Thornburg, Christopher C., et al. "Apratoxin H and apratoxin A sulfoxide from the Red Sea cyanobacterium *Moorea producens*." *Journal of natural products* 76.9 (2013): 1781-1788.

Tidgewell, Kevin, et al. "Evolved diversification of a modular natural product pathway: apratoxins F and G, two cytotoxic cyclic depsipeptides from a Palmyra collection of *Lyngbya bouillonii*." *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 11.10 (2010): 1458.

### 3.3.2 糖脂 Glycolipids

糖脂也已被证明参与了一些癌细胞的生长停滞和凋亡。已经报道了一些从海洋海绵中获得的糖脂，如 $\alpha$ -半乳糖甘油酰胺（KRN7000）、肉豆蔻糖苷myrmekioside或三叉戟糖苷trikentoside。KRN7000是一种糖脂，含有一个与脂肪酸链相连的糖基和一个鞘氨醇基，对肝脏、肺部、EL-4淋巴瘤、结肠26腺癌、EL-4T细胞淋巴瘤和肉瘤表现出抗癌活性。KRN7000被证明可以激活不变的自然杀伤性T细胞，并随后以剂量依赖的方式产生干扰素（IFN）- $\gamma$ 、IL-4和其他细胞因子。此外，这种糖脂被发现对有乙型或丙型肝炎感染的晚期癌症患者有抑制作用[83]。肉豆蔻糖苷是一种由海洋海绵Myrmekioderma dendyi产生的糖脂。其衍生物（E-1、E-2和E-3）对两种人类非小细胞肺癌细胞（NSCLC-N6和A549）表现出抗癌活性。从海绵Trikentrion中分离出来的相关糖脂，trikentoside，也抑制了人类非小肺癌A549细胞的增殖。

Fuji, Nobuaki, et al. "Antitumor effect of  $\alpha$ -galactosylceramide (KRN7000) on spontaneous hepatic metastases requires endogenous interleukin 12 in the liver." *Clinical Cancer Research* 6.8 (2000): 3380-3387.

Hayakawa, Yoshihiro, et al. "Critical contribution of IFN- $\gamma$  and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of  $\alpha$ -galactosylceramide." *European journal of immunology* 31.6 (2001): 1720-1727.

Nakui, Minoru, et al. "Potentiation of antitumor effect of NKT cell ligand,  $\alpha$ -galactosylceramide by combination with IL-12 on lung metastasis of malignant melanoma cells1." *Clinical & experimental metastasis* 18.2 (2000): 147-153.

Schneiders, Famke L., et al. "Clinical experience with  $\alpha$ -galactosylceramide (KRN7000) in patients with advanced cancer and chronic hepatitis B/C infection." *Clinical immunology* 140.2 (2011): 130-141.

Farokhi, Fereshteh, et al. "Antiproliferative activity against human non-small cell lung cancer of two O-alkyl-diglycosylglycerols from the marine sponges Myrmekioderma dendyi and Trikentrion laeve." *European journal of medicinal chemistry* 49 (2012): 406-410.