



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1616665 B

(45) 授权公告日 2010.10.06

(21) 申请号 200410082473.7

(22) 申请日 1998.11.19

(30) 优先权数据

60/066,188 1997.11.19 US

60/083,175 1998.04.27 US

(62) 分案原申请数据

98813177.3 1998.11.19

(73) 专利权人 乔治敦大学

地址 美国哥伦比亚特区华盛顿

(72) 发明人 埃斯特·H·章 徐梁

凯瑟琳·皮罗洛

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12N 15/88 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1157570 A, 8201.09.97, 说明书全文.

WO 9728817 A1, 8141.09.97, 说明书全文.

US 5635380 A, 6319.09.07, 说明书全文.

XU L..Transferrin-liposome-mediated p53 sensitization of squamouscell carcinoma of the head and neck to radiation in vitro. HUMAN GENE THERAPY8. 1997, 8467-475.

XU L..Transferrin-liposome-mediated p53 sensitization of squamouscell carcinoma of the head and neck to radiation invitro. HUMAN GENE THERAPY8. 1997, 8467-475.

WANG S..Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotides against thehuman epidermal growth factor receptor into cultured KB cellswith liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA92. 1995, 923318-3322.

CHENG P.W..Receptor ligand-facilitated gene transfer:enhancement of liposome-mediated gene transfer and expression by transferrin. HUMAN GENE THERAPY7. 1996, 7275-282.

审查员 张秀丽

权利要求书 3 页 说明书 36 页 附图 1 页

(54) 发明名称

定向脂质体基因送递

(57) 摘要

本发明涉及定向配体-脂质体-治疗分子复合物(载体),它用于将治疗分子全身性送递给各种靶细胞类型,包括癌细胞,如头颈鳞状细胞癌,乳腺癌和前列腺癌。优选的配体,叶酸和运铁蛋白,可定向脂质体复合物并有利于瞬时基因转染。含有编码野生型 p53 之 DNA 的复合物全身性送递给建立的小鼠异种移植体使肿瘤对放疗和化疗显著敏化。全身性 p53 基因治疗结合常规放疗或化疗导致肿瘤总体退化和长期抑制复发。这种细胞特异性送递系统也用于体内经静脉内用药成功送递小 DNA 分子(寡核苷酸)导致化学敏感性和异种移植体生长抑制。其它治疗分子,包括完整的病毒,可包埋于复合物中并根据本发明进行定向。

CN 1616665 B

1. 用于将治疗剂或诊断剂全身性送递给宿主动物内的靶细胞的载体,包含细胞定向的配体,脂质体和所述的治疗剂或诊断剂的复合物,其中该载体具有小于 100nm 的平均直径。
2. 根据权利要求 1 的载体,具有 30-75nm 的平均直径。
3. 根据权利要求 1 的载体,具有 50nm 的平均直径。
4. 根据权利要求 1 的载体,其中所述的治疗剂或诊断剂是核酸。
5. 根据权利要求 1 的载体,其中所述的治疗剂或诊断剂编码蛋白质或所述治疗剂或诊断剂包含反义寡核苷酸。
6. 根据权利要求 1 的载体,其中所述的治疗剂或诊断剂是编码野生型 p53 的核酸。
7. 根据权利要求 1 的载体,其中所述的配体是肿瘤细胞定向配体。
8. 根据权利要求 1 的载体,其中所述的配体是叶酸或运铁蛋白。
9. 根据权利要求 1 的载体,其中所述的配体是叶酸。
10. 根据权利要求 1 的载体,其中所述的配体是运铁蛋白。
11. 根据权利要求 1 的载体,其中脂质体是含有阳离子脂类和中性或辅助脂类的阳离子脂质体。
12. 根据权利要求 4 的载体,其中所述的脂质体和所述的核酸以每 1.0 微克核酸 0.1-50 纳摩尔脂质体的比率存在。
13. 根据权利要求 12 的载体,其中所述的比率为每 1.0 微克核酸 1.0-24 纳摩尔脂质体。
14. 根据权利要求 12 的载体,其中所述的比率为每 1.0 微克核酸 6-16 纳摩尔脂质体。
15. 根据权利要求 1 的载体,其中所述的载体具有无中心结构。
16. 根据权利要求 15 的载体,其中所述的载体具有实心核心。
17. 用于将治疗上有效的核酸分子体内送递给携带肿瘤的动物的载体,该载体包含选自叶酸和运铁蛋白的细胞定向配体、阳离子脂质体和核酸分子的复合物,其中所述的载体具有小于 100nm 的平均直径。
18. 根据权利要求 17 的载体,其中所述的核酸分子编码野生型 p53。
19. 根据权利要求 17 的载体,其中所述的脂质体和所述的核酸分子的比率为每 1.0 微克核酸 0.1-50 纳摩尔脂质体。
20. 根据权利要求 17 的载体,其中所述的脂质体和所述的核酸分子的比率为每 1.0 微克核酸 1.0-24 纳摩尔脂质体。
21. 根据权利要求 17 的载体,其中所述的脂质体和所述的核酸分子的比率为每 1.0 微克核酸 6-16 纳摩尔脂质体。
22. 根据权利要求 17 的载体,其中所述的载体具有无中心结构。
23. 根据权利要求 22 的载体,其中所述的载体具有实心核心。
24. 一种药用组合物,包含在药用上可接受的载体中的根据权利要求 17 的载体。
25. 包含细胞定向配体、阳离子脂质体和治疗剂的复合物在制备用于给需要的动物提供所述治疗剂的药物中的应用,其中所述的复合物包括病毒,且其中所述复合物具有小于 100nm 的平均直径。
26. 包含细胞定向配体、阳离子脂质体和治疗剂的复合物在制备用于给需要的动物提供所述治疗剂的药物中的应用,其中所述的复合物具有小于 100nm 的平均直径。

27. 根据权利要求 26 的应用,其中所述的治疗剂是核酸。
28. 根据权利要求 27 的应用,其中所述的脂质体和所述的核酸以每 1.0 微克核酸 0.1-50 纳摩尔脂质体的比率存在。
29. 根据权利要求 27 的应用,其中所述的脂质体和所述的核酸以每 1.0 微克核酸 1-24 纳摩尔脂质体的比率存在。
30. 根据权利要求 27 的应用,其中所述的脂质体和所述的核酸以每 1.0 微克核酸 6-16 纳摩尔脂质体的比率存在。
31. 根据权利要求 26 的应用,其中所述的复合物具有无中心结构。
32. 根据权利要求 31 的应用,其中所述的复合物具有实心核心。
33. 根据权利要求 25 或 26 的应用,其中所述的复合物经全身性施用。
34. 根据权利要求 25 或 26 的应用,其中所述的复合物经静脉内施用。
35. 根据权利要求 25 或 26 的应用,其中细胞定向配体是叶酸或运铁蛋白,脂质体是阳离子脂质体且治疗剂是编码野生型 p53 的核酸。
36. 根据权利要求 25 或 26 的应用,其中该复合物以包含药用上可接受的载体的、药用上可接受的组合物施用。
37. 含有癌细胞定向配体、脂质体和治疗性核酸的复合物在制备用于治疗或改善温血动物中的癌症的药物中的应用,其中所述的复合物包括病毒,且其中所述复合物具有小于 100nm 的平均直径。
38. 含有癌细胞定向配体、脂质体和治疗性核酸的复合物在制备用于治疗或改善温血动物中的癌症的药物中的应用,其中所述的复合物具有小于 100nm 的平均直径。
39. 根据权利要求 38 的应用,其中所述的脂质体和所述的核酸以每 1.0 微克核酸 0.1-50 纳摩尔脂质体的比率存在。
40. 根据权利要求 38 的应用,其中所述的脂质体和所述的核酸以每 1.0 微克核酸 1-24 纳摩尔脂质体的比率存在。
41. 根据权利要求 38 的应用,其中所述的脂质体和所述的核酸以每 1.0 微克核酸 6-16 纳摩尔脂质体的比率存在。
42. 根据权利要求 38 的应用,其中所述的复合物具有无中心结构。
43. 根据权利要求 42 的应用,其中所述的复合物具有实心核心。
44. 根据权利要求 37 或 38 的应用,其中所述的复合物由选自叶酸或运铁蛋白的细胞定向配体、阳离子脂质体和编码野生型 p53 的核酸组成。
45. 根据权利要求 44 的应用,其中所述的药物为将复合物全身性给予携带癌症的温血动物的药物。
46. 根据权利要求 44 的应用,其中所述的药物为将复合物静脉内给予携带癌症的温血动物的药物。
47. 根据权利要求 44 的应用,其中所述的药物为将复合物肿瘤内给予携带癌症的温血动物的药物。
48. 根据权利要求 44 的应用,其中所述的药物为与抗癌化疗剂或抗癌放疗联用的药物。
49. 制备直径小于 100nm 的复合物的方法,其中所述的复合物包括包含脂类的脂质体、

配体和核酸,所述的方法包括如下步骤:

a) 将所述配体与所述脂类混合形成脂质体:配体复合物;

b) 将所述脂质体:配体复合物与所述核酸以每 1.0 微克核酸 0.1-50 纳摩尔脂质体的比率混合,以形成脂质体:配体:核酸复合物;以及

c) 摇动所述脂质体:配体:核酸复合物,

其中所述的脂类包括至少一种选自胆固醇、二油酰基磷脂酰乙醇胺、二油酰基三甲基铵-丙烷和溴化二甲基双十八烷基铵的脂类。

50. 权利要求 49 的方法,其中所述的比率为每 1.0 微克核酸 1-24 纳摩尔脂质体。

51. 权利要求 49 的方法,其中所述的比率为每 1.0 微克核酸 6-16 纳摩尔脂质体。

52. 权利要求 49 的方法,其中所述配体是叶酸或运铁蛋白。

53. 权利要求 49 的方法,其中步骤 (a) 中所述脂质体:配体复合物在进行步骤 (b) 之前振荡保温 5-15 分钟。

54. 权利要求 49 的方法,其中步骤 (c) 进行 10-30 分钟。

定向脂质体基因送递

[0001] 本申请是申请日为 1998 年 11 月 19 日、申请号为 98813177.3、题目为“定向脂质体基因送递”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明一般涉及经过定向预选细胞类型的脂质体复合物全身性送递治疗分子。更具体地说,本发明提供了用于人癌症的细胞定向基因转移和基因治疗的组合物和方法,从而经过配体/脂质体复合物将治疗分子送递给靶癌细胞。对细胞增生疾病(例如,癌症)的治疗导致放疗和化疗干预的效力极大地提高。

背景技术

[0003] 对癌症的理想治疗剂应当是选择性地靶向负责肿瘤表型的细胞途径且对正常细胞无毒性的试剂。至今,理想的治疗剂仍然只是一种理想。尽管涉及基因治疗和反义分子的癌症治疗具有极大的前景,然而在认识这一前景前需要阐述许多问题。也许与大分子治疗癌症和其他疾病相关的问题中最重要的是将治疗分子有效送递给需要的身体部位。

[0004] 已有人评价了治疗癌症的各种核酸送递系统(“载体”),包括病毒和脂质体。用于人类癌症基因治疗的理想载体应该是能够经过全身性用药并且然后特异性和有效地靶向在身体任何一处存在的肿瘤细胞的载体。病毒载体介导的方法显示出较高的基因转移效力但在有些方面存在缺陷。病毒方法的局限涉及其缺乏定向且存在可能具有免疫原性、细胞致病性或诱重组性的残余病毒元件。

[0005] 病毒载体的主要缺陷是缺乏癌细胞特异性。由于缺乏肿瘤定向能力,病毒载体在用于指导局部送递中受到局限,该送递没有到达转移性疾病的能力,这是大多数癌症病人死亡的主要原因。

[0006] 使病毒作为基因治疗和基因转移送递载体具有吸引力的可获得的高滴度和细胞趋向性存在其一些最大缺陷。尽管在一些文献中已描述了具有新感染靶的新病毒制品,这些载体是有疑问的,因为需要将病毒生长至高滴度。因此针对送递分子治疗剂(包括用于基因转移和基因治疗)的非病毒载体已集中了大量的注意力。

[0007] 对于开发中的用于人体内治疗的非病毒的,基因的药用配制品,特别是阳离子脂质体介导的基因转移系统,已有了进展。阳离子脂质体由带正电的脂双层组成且能经过简单地混合脂类和 DNA 与带负电的裸露的 DNA 复合,以便所得的复合物具有净正电荷。该复合物容易被细胞结合和吸收,具有较高的转染效力。使阳离子脂质体对 DNA 送递具有通用性和吸引力的特征包括:制备简单,复合大量 DNA 的能力,与任何类型和大小的 DNA 或 RNA 使用的通用性,转染许多不同类型的细胞(包括不分裂的细胞)的能力以及缺乏免疫原性或生物学危害活性。对于基因送递,脂质体方法相对于病毒方法提供了许多优势。最明显的是,由于脂质体不是能自我复制的传染原,它们不具有演化成传染性人类病原体的新类型的风险。而且已表明阳离子脂质体是安全的且对体内基因送递具有一定的效力。由于脂质体不是传染原,它们可经过简单混合进行配制。而且,已表明阳离子脂质体是安全的且对

体内基因送递具有一定的效力。用于基因送递的阳离子脂质体现在正在进行临床试验,用于送递小分子治疗剂(例如,化疗剂和抗真菌剂)的脂质体已经上市。

[0008] 阳离子脂质体的一个缺点在于它们缺乏肿瘤特异性且与病毒载体相比具有相当低的转染效率。然而经过修饰脂质体使它们携带被细胞表面受体识别的配体可实现经过脂质体定向癌细胞。在真核细胞中受体介导的内吞代表了高效力的内吞途径。在脂质体中存在配体有利于通过配体被细胞表面的其受体起始结合并随后内吞结合的复合物使 DNA 进入细胞。一旦内吞,将有足够的 DNA 可摆脱内吞途径在细胞核中表达。

[0009] 对于癌细胞外表面存在的分子现在已有相当多的了解。表面分子可用于选择性地将脂质体定向肿瘤细胞,因为在肿瘤细胞外面发现的这些分子与正常细胞上的不同。例如,如果脂质体在其表面具有运铁蛋白(Tf),它可定向具有高水平的运铁蛋白受体的癌细胞。

[0010] 已检查了各种配体的脂质体定向能力,包括叶酸,DNA 合成所必需的维生素和运铁蛋白。发现在各种类型的癌细胞,包括卵巢,口腔,乳腺,前列腺和结肠癌细胞中叶酸受体和运铁蛋白受体水平均升高。这些受体的存在与肿瘤细胞的恶化或增生状态相关。已表明叶酸受体在迅速分裂的细胞,如癌细胞中在叶酸内吞期间再循环。而且已表明运铁蛋白和叶酸连接的大分子和脂质体被携带受体的肿瘤细胞经过受体介导的内吞特异性地吸收。因此认为叶酸和运铁蛋白受体可用作癌症的预后肿瘤标记和用作在恶性细胞生长治疗中药物送递的潜在靶。

[0011] 在许多类型的癌症治疗中对放疗和化疗无反应代表了不适合医学需求。通常,当癌症复发时,肿瘤获得了对辐射或对化疗剂增加的抗性。将导致对这些治疗敏感的新成分掺入癌症治疗具有巨大的临床关联性。这种化学/放射致敏的一种方式可通过定向基因治疗实现。

[0012] p53 通过调节细胞周期事件和诱导细胞程序死亡在控制细胞增殖中的重要作用已被确认。由于大多数抗癌剂似乎通过诱导细胞程序死亡发挥作用,在这一途径中的抑制或改变可导致治疗方案失败。因此已认为 p53 的异常与对细胞毒性癌治疗(化疗以及放疗两者)的抗性直接相关。还认为 p53 功能的丧失导致对在某些肿瘤细胞中观察到的抗癌剂的交叉抗性。许多研究组已确立了存在突变的 p53 与小鼠纤维肉瘤和来自乳腺癌,人胃癌和食管癌以及 B- 细胞慢性淋巴瘤细胞白血病的原代肿瘤培养物中化学抗性的正相关。另外,经过在携带突变 p53 的非小细胞肺癌小鼠异种移植中表达 wtp53 恢复了经过报道的细胞程序死亡的化学敏感性。

[0013] 肿瘤抑制基因 p53 在许多重要细胞途径中的作用,特别是在对 DNA 损伤的细胞反应中的作用已被确定。这些途径不仅包括基因转录, DNA 修复,基因组稳定性,染色体断裂和衰老,还包括细胞周期事件的调节和细胞程序死亡的调节。由于其在监控 DNA 损伤中的作用,p53 已被命名为“基因组监护人”。癌细胞的特征在于遗传不稳定性,已发现在几乎所有的人类癌症类型中 p53 突变以极高的频率出现。事实上认为 p53 基因中的定量和定性改变在超过半数的所有人恶性肿瘤中起作用。已发现在大多数常见类型的人肿瘤中 p53 突变的存在与临床预后差相联系。而且 p53 突变体(mt) 在一些较易治愈的癌症类型,例如,维尔姆斯瘤,成视网膜细胞瘤,睾丸癌,成神经细胞瘤和急性淋巴瘤细胞白血病中极少发现。

[0014] 许多研究已报道在体外和在小鼠异种移植模型中 wtp53 的表达抑制各种恶性肿瘤,例如,前列腺,头颈,结肠,颈和肺肿瘤细胞的生长。还已报道了 p53 脂质体复合物部分

抑制人成胶质细胞瘤和小鼠中的人乳腺癌异种移植体的生长。另外, Seung 等使用脂质体介导的肿瘤内导入表达 TNF- α 的辐射诱导型构建体来抑制接触电离辐射后的鼠纤维肉瘤异种移植体的生长。然而, p53 单独表达尽管能部分抑制肿瘤生长, 但不能长期消除已形成的肿瘤。

[0015] 缺乏 wtp53 的小鼠正常发育以及在表达 p53 的细胞中辐射后 G1 阻断的观察结果表明 wtp53 在 DNA 损伤或应激后细胞的调节中而不是在增生和发育期间发挥功能。由于许多常规抗癌治疗剂似乎诱导 DNA 损伤且似乎经过诱导细胞程序死亡发挥作用, 所以可以想象 p53 途径的改变可导致治疗方案失败。

[0016] 缺乏 wt p53 功能也与放射抗性增强相关。还发现 mt p53 的存在和随后不进行 G1 阻断与某些人肿瘤和细胞系中放射抗性增强相关。人肿瘤细胞系的代表包括头颈鳞状细胞癌, 淋巴瘤, 膀胱癌, 乳腺癌, 甲状腺癌, 卵巢癌和脑瘤。

[0017] 根据这些情况, 在肿瘤细胞中恢复 wtp53 功能的基因治疗应重建 p53 依赖性细胞周期关卡和细胞程序死亡途径, 从而导致化学 / 放射抗性表型逆转。与此模型一致, 经过在携带 mtp53 的非小细胞肺癌小鼠异种移植体中表达 wtp53 可恢复化学敏感性与细胞程序死亡。已证实含有无 p53 的肺肿瘤细胞系 H1299 和 T98G 成胶质细胞瘤细胞的异种移植体的化学敏感性和 WiDr 结肠癌异种移植体对顺式铂氨的敏感性。在经过腺病毒转导 wtp53 的 SK-Br-3 乳腺癌细胞中也显示阿霉素或丝裂霉素 C 的细胞杀伤力增强。然而, 一些相反的报道表明 p53 表达和化学抗性之间的关系可能具有组织或细胞类型特异性成分。也表明以腺病毒载体转染 wtp53 使卵巢和结肠直肠肿瘤细胞对放射敏感。还报道了腺病毒介导的 wtp53 递送在放射抗性的头颈鳞状细胞癌 (SCCHN) 肿瘤细胞系中确实恢复了功能性细胞程序死亡, 导致这些细胞在体外具有放射敏感性。更明显的是, 肿瘤内注射腺病毒 -wtp53 并结合放射导致已形成的 SCCHN 异种移植肿瘤的完全和长期肿瘤消退。

[0018] 本发明不同于常规使用病毒载体递送治疗分子的基因治疗, 例如, 按 Roth 等 (美国专利号 5, 747, 469) 所公开的方法。这些常规使用的载体仅具有有限的局部递送能力。已表明其对肿瘤内递送的适用能力不仅不足以到达原发性肿瘤块内的所有细胞, 而且不能到达转移性疾病位点。

发明内容

[0019] 在一个方面, 本发明提供了用于在体外或体内将治疗性分子递送给定向细胞类型的细胞定向配体 / 脂质体 / 治疗分子复合物。该复合物用作将治疗分子递送给靶细胞的递送载体。当治疗性分子是, 例如, 编码治疗蛋白的核酸时, 该复合物用作进行基因转移和基因治疗的载体。具体实施方案涉及将治疗分子递送给含有叶酸或运铁蛋白受体的动物 (包括人类) 癌细胞的叶酸和运铁蛋白定向的阳离子脂质体。

[0020] 在另一方面, 本发明提供了含有在药用上配伍的载体中的细胞定向配体 / 脂质体 / 治疗分子复合物。可配制该组合物优选用于给病人静脉内用药以经过有效递送治疗分子而受益。该复合物具有合适的大小以便在静脉内用药后它们能分布到全身。

[0021] 在另一方面, 本发明涉及含有给需要的温血动物 (包括人类) 施用治疗有效量的含有在药用上可接受的载体中的配体 / 脂质体 / 治疗性分子复合物的药用组合物。如本文的详细描述, 经过全身性 (例如, 静脉内) 施用含有包含编码 wt p53 的核酸的配体定向的

脂质体复合物的复合物进行人类癌症治疗是本发明该方面的重要实施方案。

[0022] 经过全身性施用含有定向脂质体 / 核酸复合物的药用组合物进行的人类基因治疗形成本发明的重要实施例,其中该核酸含有在合适的调节序列控制下的治疗基因。许多类型的人类癌症的基因治疗经过全身性送递含有编码 wt p53 的核酸的叶酸或运铁蛋白定向的阳离子脂质体来实现。本文提供的数据证实该复合物对于特异性定向和致敏肿瘤细胞(由于表达 wt p53 基因),包括原发性和转移性肿瘤以在体外和体内进行放疗和 / 或化疗具有优异能力。

[0023] 本发明还有一个方面涉及对脂质体制品的改进,特别是配体定向的阳离子脂质体,从而提供具有相当小的均一的直径的脂质体。这种均一的小直径脂质体在静脉内用药后表现出在血液中循环并定向原发性及转移性肿瘤的能力。

[0024] 本发明描述了以高度靶细胞特异性和高效全身性送递治疗分子的需求。当全身性用药时,本发明的复合物能够到达并特异性定向转移性及原发性疾病,其中该靶细胞是人类癌细胞。作为借助于该系统送递肿瘤抑制因子基因 p53 的正常野生型蛋白的结果,本发明人证实该肿瘤对放疗和 / 或化疗敏感。该系统的高转染效率导致这种高度致敏不仅对癌症进行生长抑制,而且在更长的时间期限内完全消除已经存在的肿瘤和转移瘤。在有些情况下这个时间期限可认为是该疾病被治愈。

[0025] 该系统的异常功效部分是由于脂质体 - 治疗分子复合物的配体定向。而且,含有脂质体复合物的具体阳离子和中性脂质体以及各自的比率可以变化和最优优化以便该治疗分子的吸收效率对于具体靶细胞类型是理想的。也可最优优化脂质体与治疗分子的比率以适应靶细胞类型。脂质体 - 治疗分子复合物的最优优化,结合定向配体的添加,当结合放疗或化疗用药时导致功效极大提高。本领域的技术人员可以最优优化该复合物用于将各种治疗分子送递给各种类型的细胞。

[0026] 本发明的重要特征在于通过静脉内,全身性用药将治疗分子送递给靶细胞的能力。静脉内用药后有效定向和转染特异性细胞的能力经过将选择合适的定向配体并最优优化阳离子与中性脂类在脂质体中的比率进行所公开的组合来实现。如果肿瘤细胞是靶细胞,配体 - 脂质体 - 治疗分子复合物的全身性送递允许将治疗分子有效并特异性送递给转移性及原发性肿瘤。

[0027] 本发明不限于使用任何具体定向配体。该配体可以是其受体在靶细胞上差别表达的任意配体。目前优选的配体是叶酸(酯化成脂质体的脂类)和运铁蛋白,这些配体各自具有有利特性。

[0028] 脂质体复合物仅能穿透肿瘤血管周围大约 20 层细胞。推测 wtp53 基因治疗部分通过“旁观者”效应控制细胞生长,其中可能涉及经过 wtp53 诱导细胞程序死亡。这种“旁观者效应”可能是本文报道的体内研究效力的原因且可能是组合治疗效力的负责因素。然而,关于在 p53 方法中涉及的机制和途径目前所知甚少。推测在小泡内可能含有某种尚不清楚的细胞程序死亡信号,该小泡由细胞程序死亡引起并且最终被邻近细胞吞噬。另外,这种细胞程序死亡信号可以通过间隙连接转移,据信与磷酸化的 9-(1,3-二羟-2-丙氧甲基)鸟嘌呤和 HSV-TK 基因的情况一样。诱导抗血管生成因子也可起到旁观者效应。

[0029] 最近已报道非定向的 p53 脂质体复合物部分抑制体内的人成胶质细胞瘤异种移植体的生长。另外,Seung 等(癌症研究,55,5561-5565(1995))使用商品非定向的脂质体

(Lipofectin) 介导肿瘤内导入含有 TNF- α 的放射诱导型构建体以便在接触 40Gy 的电离辐射后部分抑制鼠纤维肉瘤异种移植体的生长。Xu 等 (人类基因治疗 8, 177-175 (1997)) 表明导入在非定向的脂质体复合物中的 16 μ gp53DNA 能部分抑制乳腺癌异种移植小鼠肿瘤的生长。然而本发明的配体介导的脂质体 p53 复合物提供了靶细胞特异性, 高转染效率以及全身性用药的能力。本文报道的研究首次采用这种递送系统结合常规放疗和化疗用于肿瘤治疗。尽管单独的 p53 基因治疗不足以长期完全消除肿瘤, 但是这里描述的脂质体介导的 p53 基因治疗结合常规治疗 (放疗和 / 或化疗) 不仅能实现生长抑制, 而且能实现消退肿瘤, 显示出协同效应。

[0030] 本文描述的体内实验证实全身性 LipF-p53 或 LipT-p53 基因治疗结合常规放疗和 / 或化疗比单独任一治疗具有更显著的效力。在临床情况下, 在头颈癌治疗中通常采用 65 至 75Gy 的放射剂量用于大块肿瘤, 45 至 50Gy 用于微观疾病。由于已知高剂量的放疗和化疗与有害副作用相联系, 因此致敏肿瘤允许降低常规治疗的有效剂量, 这具有巨大的临床益处。而且在放疗的情况下, wtp53 功能的系统恢复导致发现有效时, 放射治疗剂量减少, 这允许对复发的肿瘤进行进一步的治疗干预。

[0031] 在使用含有 wtp53 或 mtp53 的 SCCHN 细胞系产生的异种移植肿瘤的报道中, 注意到经过肿瘤内施用腺病毒载体导入 wtp53 能抑制这些异种移植肿瘤的发育和在其中诱导细胞程序死亡而不论其内源性 p53 状况。同样, 脂质体介导的将 wtp53 导入均具有内源性 wtp53 的成胶质细胞瘤 (RT-2) 和乳腺癌 (MCF-7) 异种移植体能部分抑制这些肿瘤的生长。这些研究表明 wtp53 基因治疗不论 p53 基因状况均具有广阔的潜力。

[0032] 本发明进行的研究表明配体 - 阳离子脂质体 - 治疗分子复合物系统可将 p53 基因在体内选择性地递送给各种类型的肿瘤, 使它们对放疗和化疗敏感。因此, 以肿瘤定向介导的全身性 wtp53 基因治疗, 相当安全和有效的配体定向的阳离子脂质体系统结合常规放疗或化疗不仅对于原发性肿瘤, 而且对于那些错过了起始治疗的癌症, 可提供更有效的治疗方式。

[0033] 还已证实定向的脂质体递送系统能递送小 DNA 分子 (例如, 反义寡核苷酸), 以及与完整的病毒颗粒一样大的试剂。这些小 (反义) DNA 分子的递送也能使肿瘤细胞对化疗试剂敏感。因此, 本发明的定向脂质体广泛应用于全身性递送治疗剂。

[0034] 本发明还涉及制备配体 - 脂质体 - 治疗剂复合物的方法。在运铁蛋白 - 脂质体和病毒颗粒之间形成复合物的方法给复合物表面提供了大量的运铁蛋白分子, 从而在血液中流动时增加了该复合物的稳定性。而且, 当治疗分子是病毒颗粒时, 运铁蛋白脂质体也可用于经过封闭病毒抗原而降低病毒的免疫原性。

[0035] 使用本发明时, 本发明人已证实不仅在控制细胞生长, 特别是肿瘤细胞生长中, 而且在实现肿瘤长期消退中具有显著效力。肿瘤细胞形成和生长, 也称为转化, 可描述为丧失了控制细胞分裂能力的细胞的形成和增殖, 即, 它们是癌变的。许多不同类型的转化细胞可作用于本发明的方法和组合物中的靶, 例如: 癌症, 肉瘤, 黑色素瘤, 和各种固体瘤等。尽管具有恶性细胞生长的任何组织可以是靶, 但是优选的靶是头颈癌, 乳腺癌, 前列腺癌, 胰腺癌, 成胶质细胞瘤, 颈癌, 肺癌, 脂肪肉瘤, 横纹肌肉瘤, 绒毛膜癌, 黑色素瘤, 成视网膜细胞瘤, 卵巢癌, 胃癌和结肠直肠癌。

[0036] 还可预料本发明也可用于定向非肿瘤细胞以递送治疗分子。尽管任何正常细胞均

可以是靶,但优选的正常靶是树突细胞,血管内皮细胞,肺细胞,乳腺细胞,骨髓细胞和肝细胞。

[0037] 本文公开了当全身性送递时,配体定向的,最优化的阳离子脂质体-治疗分子复合物能特异性地定向并使肿瘤细胞对放疗和/或化疗显著敏感导致极大的生长抑制和肿瘤消退。配体-定向的,最优化的阳离子脂质体-治疗分子复合物可经过其它用药途径送递,例如肿瘤内,气溶胶,经皮肤的,内窥镜,局部,病灶内或皮下用药。

[0038] 在某些实施方案中,本发明提供了经过全身性施用配体定向的脂质体-治疗分子复合物用于高度靶细胞特异性和有效的送递的方法和组合物。治疗性分子的例子包括基因,高分子量 DNA,质粒 DNA,反义寡核苷酸,肽,核酶,肽核酸,化学剂,如化疗分子,或者任何大型分子,包括但不限于, DNA, RNA, 病毒颗粒,生长因子细胞因子,免疫调节剂和其它蛋白质,包括表达时提供刺激或抑制免疫系统的抗原的蛋白质。

[0039] 最近已描述了用于长期表达基因治疗载体的有效方法 (Cooper 等,1997 ; Westphal 等,1998 ;Calos,1996 和 1998)。这些载体可用于扩大和/或增加所公开的脂质体送递系统的表达水平。在美国专利号 5707830(Calos, M. P., 1998 年 1 月 13 日); 5674703(Woo, S. 等,1997 年 10 月 7 日)和 5624820(Cooper, M. J., 1997 年 4 月 29 日)中公开了一些自主型和游离型载体系统,每篇专利在本文中作为参考文献引用。Calos 涉及用于在哺乳动物细胞中自主复制的埃巴二氏病毒为基础的游离型表达载体。Woo 等涉及在动物细胞中复制的乳头状瘤病毒为基础的游离型表达载体。Cooper 等涉及用于在人类基因治疗中长期游离表达的含有至少一个乳多空病毒复制起点和乳多空病毒大型 T 抗原突变形式的载体。

[0040] 当治疗分子是 p53 基因或反义寡核苷酸时,经过本发明复合物的送递导致一个或多个细胞,如恶性的一个或多个细胞对放疗或化疗剂敏感使得该细胞经过组合治疗被杀死。恶性细胞定义为丧失了控制细胞分裂周期能力导致转化或癌表型的细胞。除了恶性细胞外,使用本发明方法可杀死的细胞包括,例如,不需要的但是良性的细胞,如良性前列腺肥大细胞,过度活跃的甲状腺细胞,脂瘤细胞,以及涉及自体免疫疾病的细胞,如产生在关节炎,狼疮,重症肌无力,鳞状组织转化,发育异常等中涉及的抗体的 B 细胞。

[0041] 可以在用药前合理的时间内在无菌条件下配制配体-脂质体-治疗分子复合物。如果该治疗分子是为另一种治疗提供增强敏感性的分子(如增强癌细胞对化疗或放疗的敏感性),该另一种治疗可以在施用复合物之前或之后用药,例如在 12 小时到 7 天之内用药。除了施用该组合物外可采用组合疗法,例如化疗和放疗同时进行。

[0042] 当用于细胞时术语“接触”或“暴露”在本文中用于描述治疗分子送递给细胞,或与靶细胞直接并列放置,以便其可与该细胞有效地相互作用以对该细胞或宿主动物产生所需益处的过程。

[0043] 其中本发明的复合物用作组合治疗的成分,例如用于人类癌治疗,它们可与在人类和动物癌症治疗中采用的各种疗法组合使用。该疗法包括施用化疗剂和放射治疗,例如 γ -辐射, X-射线,紫外辐射,微波,电子发射等。在根据本发明的组合疗法中可采用化疗剂,例如阿霉素,5-氟尿嘧啶(5FU),顺式铂氨(CDDP), docetaxel, 吉西他滨(gemcitabine),紫杉醇,长春花碱,表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷(VP-16),喜树碱,放线菌素 D,米托蒽醌和丝裂霉素 C。

[0044] 各种不同类型的潜在治疗分子可与本发明的细胞定向配体 / 脂质体复合物复合。它们包括但不限于, 高分子量 DNA 分子 (基因), 质粒 DNA 分子, 小寡核苷酸, RNA, 核酶, 肽, 免疫调节剂, 肽核酸, 病毒颗粒, 化学试剂, 如本身已知的化疗剂和药品, 生长因子, 细胞因子和其它蛋白, 包括表达时提供刺激或抑制免疫系统的抗原的那些蛋白。因此, 除了基因治疗外, 本发明可用于免疫治疗或用于药物的定向递送。

[0045] 诊断剂也可经过所公开的复合物递送给靶细胞。可使用在体内施用给多细胞生物体后可检测的试剂。举例性的诊断剂包括电子致密物质, 磁共振成像剂和放射性药物。用于成像的放射性核素包括铜, 镓, 铟, 铯, 钨的放射性同位素, 包括同位素 ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga 或 ^{68}Ga 。Low 等 (美国专利号 5688488) 公开的成像剂可用于本发明, 且该专利在本文中作为参考文献引用。

[0046] 与治疗性分子复合的本发明的配体 - 脂质体组合物可由配体, 阳离子脂类和中性或辅助脂类组成, 其中阳离子脂类与中性脂类的比率是大约 1 : (0.5-3), 优选 1 : (1-2) (摩尔比)。配体可经过, 例如化学偶连结合到中性脂类上并与阳离子脂类和中性脂类分别以摩尔比大约 (0.1-20) : 100, 优选 (1-10) : 100, 更优选 (2.5-5) : 100 (配体 - 脂类 : 总脂类) 混合。配体 - 脂质体可与 DNA 或其它治疗分子混合以形成复合物。DNA 与脂类的比率范围为大约 1 : (0.1-50), 优选大约 1 : (1-24), 更优选大约 1 : (6-16) $\mu\text{g}/\text{nmol}$ 。对于反义寡核苷酸, 可经过将脂质体与寡核苷酸以大约 (5-30) : 1 的脂类 : 寡核苷酸, 优选大约 (10-25) : 1, 更优选大约 10 : 1 的摩尔比混合形成复合物。

[0047] 另外, 对于运铁蛋白, 配体可与阳离子和中性脂类简单混合。在这种情况下, 阳离子脂质体以阳离子脂类与中性脂类为大约 1 : (0.5-3), 优选 1 : (1-2) 的摩尔比率制备。运铁蛋白可与阳离子脂质体和随后的 DNA 或其它治疗性分子混合。DNA / 脂类 / Tf 比率范围分别为大约 1 : (0.1-50) : (0.1-100) $\mu\text{g}/\text{nmol} / \mu\text{g}$, 优选大约 1 : (5-24) : (6-36), 和更优选大约 1 : (6-12) : (8-15)。

[0048] 根据本发明的复合物的另一个特征是其均匀分布的极小大小 (平均直径小于大约 100nm, 优选不超过大约 75nm, 更优选大约 35-75nm (平均 50nm) 的直径)。为到达靶肿瘤, 该复合物应对体内遇到的降解剂有抗性, 且还必须能够穿过血管 (毛细血管) 壁并进入靶组织。本发明的组合物对血清中存在的成分产生的降解表现出高度抗性。肿瘤毛细血管的通透大小通常是 50-75nm, 直径不超过大约 75nm 的该组合物可很容易地穿过毛细血管壁到达靶。根据透射电子显微镜, LipF-DNA 和 LipT-DNA 复合物特有的洋葱状层状结构似乎以小直径起重要作用且随后在体外和, 特别是体内观察到本发明的复合物具有较高的转染效力。

[0049] 配体可以是与靶细胞表面结合的任意分子, 但优选与在靶细胞上差别表达的受体结合的分子。两个特别优选的配体是叶酸和运铁蛋白。阳离子脂类可以是任何合适的阳离子脂类, 但优选二油酰基三甲基胺丙烷 (DOTAP) 和 DDAB。中性脂类可以是任何中性脂类, 且优选的中性脂类是二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和胆固醇。

[0050] 可使用许多体外参数来测定组合物的定向和递送效率以便最优化特定的复合物将所需治疗分子递送给选定的靶细胞类型。这些参数包括, 例如标记基因的表达, 如 β - 半乳糖苷酶或萤光素酶基因的表达, 所递送的蛋白质在靶细胞中的免疫组织化学染色, 所递送的基因的蛋白质表达产物的 Western 印迹分析, 由递送的反义或其它抑制性寡核苷酸引

起的靶基因的负调控,以及靶细胞对放疗和 / 或化疗剂的敏感性增加。

[0051] 在优选的实施方案中,可预料 p53 表达区可位于强组成型启动子,例如 RSV 或 CMV 启动子的控制下。通常,特别优选的启动子是细胞肥大病毒 (CMV) 启动子。

[0052] 本发明的方法和组合物施用于体外或体内定向特定的细胞。当靶细胞位于温血动物体内,例如头颈,乳腺,前列腺,胰腺或成胶质细胞瘤细胞时,可将配体 - 脂质体 - 治疗分子复合物以药物学上可接受的形式施用给动物。本文使用的“药物学上可接受的形式”指可施用给动物的配体 - 脂质体 - 治疗分子复合物的配制品,且也可以是与辐射一起接触动物的形式,即,在动物体受辐射区域的方式,例如用 γ - 辐射,X- 射线,紫外辐射,微波,电子发射等辐射。DNA 损伤辐射和微波的使用对于放疗领域的技术人员是已知的。

[0053] 本发明还提供了用于治疗癌症,原发性和转移性癌症的改进方法,它一般包括给需要的动物和人类病者施用治疗上有效组合的配体 - 脂质体 - 治疗分子 (例如,p53 基因) 复合物和诸如放疗或化疗之类的治疗。

[0054] 该复合物一般以药用上可接受的组合物的形式通常经过全身性施用给动物。在优选的实施方案中该组合物可通过静脉内途径进行全身性递送。然而也可采用其它的用药途径如气溶胶,肿瘤内,病灶内,皮下,内窥镜,局部或皮下用药。

[0055] 本发明的高度肿瘤细胞特异性和肿瘤定向能力经过叶酸 / 运铁蛋白 - 脂质体 - β -Gal 基因复合物全身性递送后表达受体基因来证实。在达到 70% 的各种人肿瘤细胞,包括 JSQ3,DU145 和 MDA-MB-435 的异种移植体中表现出 β -半乳糖苷酶表达,而正常组织和器官,包括高度增生的肠道和骨髓,无转染迹象。本发明高度有效的肿瘤定向能力也在经过全身递送复合物后特异性转染的转移瘤,和甚至是几个细胞大小的微观转移瘤的实验中表现出来。

[0056] 叶酸 - 脂质体 - wtp53 基因或运铁蛋白 - 脂质体 - wtp53 基因的全身性递送结合放疗或者化疗在使用裸鼠模型的研究中产生有意义的结果,这一发现证实本发明取得了令人惊异的成功。该系统的高效性导致 JSQ-3 和 DU145 人类异种移植肿瘤对放疗产生高度致敏,这不仅使癌症的生长受抑制,而且在有些实验中,以前存在的肿瘤和转移瘤在更长的时间期限内完全消除。在有些情况下,这一时间期限 (一年以上无疾病) 使该疾病可认为被治愈。人乳腺癌 MDA-MB-435 和人胰腺癌 PANC I 裸鼠异种移植肿瘤也表现出经过全身性施用叶酸 - 脂质体 - wtp53 或者运铁蛋白 - 脂质体 - wtp53 而对包括阿霉素,顺式铂氨,docetaxel 或吉西他滨的化疗剂高度敏感。

[0057] 本文所用的术语“转染”用于描述施用本发明的配体 - 脂质体复合物将治疗分子定向递送给真核细胞并以各种方法使治疗分子进入细胞,如受体介导的细胞内吞。靶细胞可用复合物的配体进行优选,使该配体结合到在靶细胞表面差别表达的受体上。

[0058] 本发明优选的药用组合物是包含在药物学上可接受的溶液或缓冲液中的,由配体,阳离子 - 中性脂质体和治疗分子组成的复合物的那些组合物。

[0059] 本发明还有一个实施方案是用于以配体 - 脂质体复合物全身性递送治疗分子的试剂盒,如可配制成治疗组合物用于全身性用药。本发明的试剂盒一般包括分别在合适的容器中的配体,脂质体和治疗性分子的药用配制品。在优选的实施方案中该配体可以是叶酸或运铁蛋白,该脂质体可由阳离子和中性脂类组成,该治疗分子可以是在 CMV 启动子控制下的携带 wtp53 的构建体,或反义寡核苷酸。可在无菌条件下混合这三种成分并在合理

的时间期限内施用给病人,一般是在配制后 30 分钟到 24 小时内。

[0060] 试剂盒的成分优选以溶液或以干粉形式提供。以溶液形式提供的成分优选在无菌注射用水中与合适的缓冲液,渗透控制剂,抗生素等一起配制。以干粉形式提供的成分经过加入合适的溶剂,如无菌注射用水重新配制。

具体实施方式

[0061] 本发明使用配体 / 阳离子脂质体递送复合物的全身性施用以经过受体介导的内吞用于治疗分子的肿瘤定向递送。在一个优选的实施方案中,配体定向脂质体用于递送包含编码野生型 (wt) p53 基因的治疗分子。该治疗基因定向并有效递送给肿瘤细胞导致许多肿瘤丧失的正常 p53 基因功能恢复。这种恢复对治疗肿瘤的能力具有有显著的影响。在另一优选的实施方案中,被递送的治疗分子是针对细胞生长途径中基因的反义寡核苷酸。这一基因的下调导致肿瘤细胞和异种移植体对放疗和化疗剂敏感。在另一实施方案中,“治疗分子”是经过配体 / 脂质体复合物递送给靶细胞的完整病毒载体 (例如,含有治疗核酸的腺病毒或逆转录病毒颗粒)。

[0062] 在一个方面,本发明提供了用于实现基因治疗以恢复肿瘤细胞中 wtp53 功能,导致化学 / 放射抗性表型逆转并因此增加经过化学和 / 或放射治疗来治疗肿瘤的能力的组合物和方法。

[0063] 本发明提供了一种新的和改进的方法,用于经过提供特异性定向肿瘤细胞,包括转移瘤的全身性递送系统 (“复合物”) 实现癌症基因治疗,并产生了一种更有效的癌症治疗模式。该方法使用了一种配体介导的阳离子脂质体系统以将治疗分子递送给肿瘤细胞。在一个优选的实施方案中,该治疗分子是 wtp53。在脂质体 -DNA 复合物中包含的细胞定向配体 (例如,叶酸或运铁蛋白配体) 利用了与配体相关的肿瘤定向方面和受体介导的内吞以便将 wtp53 有效地并特异性地导入体内和体外的肿瘤细胞。wtp53 功能恢复的结果是对常规放疗和化疗的敏感性增加,从而增强了其效力和 / 或减小了其总剂量。

[0064] 举例性的脂质体组合物以连接 (例如酯化) 到叶酸 (提供在其上的叶酸配体) 上的或与铁饱和的运铁蛋白简单混合的阳离子脂类 DOTAP 和融合剂中性脂类 DOPE 为基础。可最优化脂类本身的比率及脂类 :DNA 的比率用于体内递送及用于不同的肿瘤细胞类型,例如腺癌与鳞状细胞癌。体外研究证实加入配体与仅有脂质体相比极大地增加肿瘤细胞的转染效力,即使在高水平血清存在的条件下。以该方法转染 wtp53 导致以前的体外放射抗性 SCCHN 细胞系产生显著的放射敏感性。

[0065] 在三种不同类型的癌症 (SCCHN, 乳腺癌和前列腺癌) 使用 β -半乳糖苷酶报道基因评价了该系统的体内肿瘤定向能力。这些研究证实静脉内施用该复合物后,只有肿瘤以 50% -70% 的效力被转染,而正常器官和组织,包括高度增生的骨髓和肠隐窝细胞没有显示报道基因表达的迹象。一些配体 - 脂质体 -DNA 复合物在巨噬细胞中明显。非常明显的是,即使在肺,脾和淋巴结中的显微转移瘤也表现出明显的高效和特异性转染。

[0066] 当给携带放射抗性的人 SCCHN 异种移植体的小鼠施用全身性递送的配体 - 脂质体 wtp53 复合物并随后进行放疗时,肿瘤完全消退。对以前的肿瘤区域的组织学检查表明只有正常的和留下的瘢痕组织,没有明显的肝肿瘤细胞。这与仅用配体 - 脂质体 -p53 复合物或仅用放疗处理的动物的肿瘤相反。在这些动物中明显有些细胞死亡。然而,肝肿瘤细胞的

起源区残留,导致这些动物的肿瘤再生长。令人惊奇的是,在接受组合治疗的动物中,即使在处理结束一年后,明显没有肿瘤复发。在携带人前列腺肿瘤异种移植的小鼠中用放疗和化疗剂,以及在使用化疗剂的人乳腺癌和胰腺癌异种移植中也观察到相似的结果。因此可认为这一系统提供了更有效的癌症治疗形式。

[0067] 因此,本发明提供了对目前实验性癌治疗明显的改进,目前实验性癌治疗如局部注射携带诸如 p53 的治疗分子的腺病毒载体,它不能有效地将治疗分子施用给完整的肿瘤组织(原发性肿瘤块)。局部递送也缺乏到达远处转移瘤的能力。本发明提供的特异性定向能力由于减少了与广泛非特异性吸收治疗分子相联系的副作用而具有优势。

[0068] 当与辅助治疗结合用药,且当靶细胞是癌细胞时,靶细胞吸收配体-脂质体-治疗分子复合物不仅降低了这些细胞的增生速率,而且实际上导致肿瘤细胞死亡增加和长期的肿瘤消退。本发明的递送系统有力地预示病人存活时间延长。

[0069] 尽管本发明以一定的具体程度被描述,但显然根据本说明书许多替换,修饰和变化对于本领域的技术人员是显而易见的。因此,打算以限定的权利要求书包含落在本发明的实质和范围内的所有这些替换,修饰和变化。

[0070] 下面的实施例用于证实本发明优选的实施方案。

[0071] 实施例 1

[0072] p53 表达载体的构建

[0073] 本实施例描述了 p53 表达载体的构建。所用的方法通常是本领域的技术人员已知的。然而,本发明不限于任何具体的表达载体。

[0074] 含有有义和反义 p53cDNA 的腺病毒穿梭质粒 pRSVp53, pRSVpRo, pCMVp53 和 pCMVpRo 在图 1 中显示。经过将 1.7Kb XbaIp53cDNA 片段克隆进腺病毒穿梭载体来构建这些质粒。为公开该穿梭载体的制备本文作为参考文献引用了 Davidson 等,实验神经生物学,125,258-267(1994)。以限制性酶消化测定方向并以 DNA 循环测序证实。质粒在大肠杆菌 DH5 α 中扩增并用 Qiagen 质粒 Mega/Giga 试剂盒(Qiagen)纯化。纯化的质粒经分光光度计定量为 A_{260}/A_{280} 值大约为 1.90。琼脂糖凝胶(0.8%)电泳证实超过 95%的质粒 DNA 是超螺旋的。

[0075] 实施例 2

[0076] 配体-脂质体-DNA 复合物的合成

[0077] 本实施例描述了一种适用于生产配体-脂质体-治疗分子复合物的方法,其中该治疗分子是质粒 DNA。将 15mmol 二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)在于氯仿中与 20mmol 叶酸的 N-羟基琥珀酰亚胺酯(参见 Lee, R. J., 等,生物学化学杂志,269,3198-3204(1994),本文作为参考文献引用以公开该方法)在 20mmol 三乙基胺存在的条件下室温反应 4 小时,然后用 PBS 洗涤 3 次以获得在氯仿中的叶酸 DOPE。薄层色谱(氯仿:甲醇:乙酸,80:20:5)显示 95%以上的 DOPE($R_f = 0.65-0.70$)转变成叶酸-DOPE($R_f = 0.90-0.95$)。LipF(A)制备如下:将 5 μ mol 二油酰三甲基胺-丙烷(DOTAP)的氯仿溶液,5 μ mol DOPE 和 0.1 μ mol 叶酸-DOPE 在园底烧瓶中混合,在减压条件下蒸发氯仿。向烧瓶中加入 10ml 无菌水以悬浮脂类,然后在水浴型声处理仪中 4 $^{\circ}$ C 声处理 10 分钟。LipF(A)的终浓度为 1nmol/ μ l 总脂类。经过在无血清的 RPMI-1640 的无叶酸培养基(生命技术公司)中混合等体积的 LipF(A)和 DNA 并在室温下经常摇动培养 15-30 分钟制备体外用的 LipF(A)-DNA 复合物。DNA 滞留

分析表明比率为 $1 \mu\text{gDNA} : 8-10\text{nmol LipF(A)}$ 时,几乎所有加入的 DNA 与脂类混合。对于体内实验,质粒 DNA (根据 DNA 总量 / 小鼠在 HEPES 缓冲液, pH7.4 中稀释) 与 LipF(A) (在水中) 以 $1 \mu\text{gDNA} / 8-12\text{nmol}$ 脂类的比率混合,并在室温下经常摇动培养 15-30 分钟。加入 50% 葡萄糖溶液以达到 5% 葡萄糖终浓度,经过颠倒进行混合并检查沉淀信号 (存在颗粒物或雾状物)。在两种情况下,发现 LipF(A)-DNA 复合物在 4°C 下黑暗中稳定达 24 小时,基本上不丧失转染效率。

[0078] 按上述制备由二油酰三甲基胺 - 丙烷 (DOTAP) 和二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE) (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) 组成的阳离子脂质体。脂质体终浓度为 $2\text{nmol}/\mu\text{l}$ 。全运铁蛋白 (Tf, 铁饱和的, Sigma) 以 $5\text{mg}/\text{ml}$ 溶于纯水中。用于体外实验的 Tf-脂质体-DNA 复合物按改进的 Cheng, P. W., 人类基因治疗, 7, 275-282 (1996) (本文作为参考文献引用以说明脂质体的制备) 所述方法制备。简单地说,将 12nmol 脂质体加入在 $100 \mu\text{l}$ 无血清 EMEM 中的 18mg Tf 中并在室温下经常摇动培养 5-15 分钟。将该溶液与在 $100 \mu\text{l}$ 无血清 EMEM 中的 $1.2 \mu\text{g}$ 质粒 DNA 混合并在室温下经常摇动培养 15-30 分钟。制备的 Tf-脂质体 (命名为 LipT(A))-DNA 复合物用于在制备 1 小时内立即进行体外细胞转染,尽管发现在 24 小时内稳定且具有相同的转染效率。采用琼脂糖凝胶电泳评价 DNA 被 LipT(A) 的滞留。发现 90% 以上的 DNA 与脂质体复合。对于体内研究,混合脂质体和运铁蛋白 (在水中) 并在室温下经常摇动培养 5-15 分钟。然后溶液与 DNA (在 HERPES 缓冲液 pH7.4 中) 混合并在室温下经常摇动培养 15-30 分钟。加入 50% 的葡萄糖溶液以达到 5% 葡萄糖的终浓度,经过颠倒进行混合并检查沉淀的迹象 (存在颗粒物或雾状物)。在两种情况下,发现 LipT(A)-DNA 复合物在 4°C 下黑暗中相当稳定达 24 小时,基本上不丧失转染效率。

[0079] 实施例 3

[0080] 经 X-Gal 染色对叶酸 - 脂质体的最优化

[0081] 本实施例描述了对本发明的叶酸阳离子 - 脂质体 (LipF) 复合物的最优化用于头颈鳞状细胞癌 (SCCHN)。为了最优化 SCCHN 细胞系 JSQ-3 的转染效率,采用被质粒 pSVb 中的 SV40 启动子启动的大肠杆菌 LacZ 基因作报道基因。根据 X-Gal 染色细胞的百分数计算转染效率。如表 1 所示,复合物中叶酸配体的存在极大地增加了报道基因表达。非配体连接的阳离子脂质体 (Lip(A)) 在体外的 JSQ-3 中产生 10% -20% 的转染效率,而 LipF(A) 导致 60% -70% 的细胞表达 β -半乳糖苷酶基因。转染前向细胞中加入 1mM 的游离叶酸能封闭细胞上的叶酸受体,从而使转染效率减少到 20%,与用 LipF(A) 观察到的结果相似。这些结果证实使用叶酸作配体增强了阳离子脂质体的转染效率,且该效力由叶酸受体介导。根据最近的报道,X-gal 染色可能低估 β -半乳糖苷酶基因表达程度 20% 或更高,因此可以想象用配体定向的脂质体的转染效率实际上可能超出上述的 70%。

[0082] 表 1:

[0083] LipF(A) 在 JSQ-3 细胞中的体外转染效率:*

[0084] 转染载体	无血清	有血清
[0085] 仅含 pSVb	0%	0%
[0086] Lip(A)-pSVb	< 20%	< 10%
[0087] LipF(A)-pSVb	60% -70%	40% -50%

[0088] LipF(A)-pSVb⁺ 15% -20% 10% -20%

[0089] 1mM 叶酸**

[0090] * 在 24 孔平板上的无叶酸培养基中培养的 60% 铺满的 JSQ-3 细胞用含 1.2 μg pSVb 的 0.5ml 转染溶液转染 5 小时。再培养 2 天后,固定细胞并用 X-gal 染色。以染成兰色的细胞百分数计算转染效率。

[0091] ** 即将转染前加入叶酸。

[0092] 实施例 4

[0093] 以萤光素酶试验最优化 LipT(A) 系统

[0094] 本实施例描述了本发明用于头颈鳞状细胞癌 (SCCHN) 的运铁蛋白阳离子脂质体 (LipT) 复合物的最优化。使用萤光素酶试验最优化 LipT(A) 系统用于 JSQ-3 转染。采用被质粒 pCMVLuc 中的细胞肥大病毒 (CMV) 启动子启动的萤火虫萤光素酶基因作为报道基因 (Promega)。以 5×10^4 JSQ-3 细胞 / 孔在 24 孔平板上涂板。24 小时后用无血清的 EMEM 洗涤细胞一次,向每孔中加入 0.3ml 无血清的 EMEM 或抗生素。向细胞中加入新制备的在 0.2ml EMEM 中的含高达 1.0 μg 不同量的质粒 DNA 的 Tf-脂质体 pCMVLuc (LipT(A)-Luc) 复合物。在 37°C 和 5% CO₂ 中培养 5 小时后,向每孔中加入 0.5ml 补充了 20% 胎牛血清和 1 μg/ml 氢化可的松的 EMEM。24 小时后,用 PBS 洗涤细胞一次,用 100 μl / 孔 1X 报道裂解缓冲液 (Promega) 裂解,在发光计上用萤光素酶试验系统 (Promega) 测定表达的萤光素酶活性。在每次测量期间用重组萤火虫萤光素酶 (Promega) 标准将相对光单位 (RLU) 的发光计读数转换成表达的萤光素酶相当量。使用 Bio-Rad DC 蛋白测定试剂盒 (Bio-Rad 实验室) 测定细胞裂解产物中的蛋白质浓度。结果表示为每 mg 总蛋白的萤光素酶相当量的 μg 数。以复合物中不同的 DNA / 脂类比率用 LipT(A)-pCMVLuc (LipT(A)-Luc) 转染 JSQ-3 细胞。运铁蛋白极大地增强了阳离子脂质体的转染效率。在最佳条件下,即,1 μg / 10nmol / 12.5 μg 的 DNA / 脂质体 / Tf 比率,萤光素酶表达为 12.5 ± 1.1 μg/ml 总蛋白,或 1.25% 总蛋白,比无运铁蛋白单独用脂质体高 7-10 倍。

[0095] 实施例 5

[0096] 用 LipT(A)-pSVb 体外转染 JSQ-3 细胞

[0097] 本实施例使用按实施例 3 所述的定量 β-半乳糖苷酶比色试验证实本发明的运铁蛋白-脂质体复合物的转染效率增高。纯化的 β-半乳糖苷酶 (Boehringer) 用作标准。结果表示为每 mg 总蛋白的 β-半乳糖苷酶当量的微单位数 (mU)。为了进行 Tf-脂质体 -pSVb 转染的组织化学研究,用 1.2 μg 含或不含 LipT(A) 的 pSVb 转染在 24 孔平板上的 60% 铺满的 JSQ-3 细胞 5 小时。再培养 2 天后,固定细胞并用 X-gal 染色。转染效率计算为染成蓝色的细胞百分数。在定量的 β-半乳糖苷酶试验中,以最佳条件,用 0.5 μg DNA / 10⁵ 个 LipT(A)-pSVb 的细胞,转染的 JSQ-3 细胞表达 15.04 ± 0.60 mU/mg 总蛋白的无血清 β-半乳糖苷酶,和用血清为 10.95 ± 0.15 mU/mg。在组织化学研究中,用 LipT(A)-pSVb 转染导致 70% -80% 的细胞被转染。转染期间血清的存在略为减少转染效率,但即使使用血清,也有 40-50% 的细胞染成蓝色,而无配体的阳离子脂质体仅产生 10-20% 的效力。这些结果证实使用 Tf 作配体极大地增加了阳离子脂质体的转染效率,即使在血清存在的条件下。

[0098] 实施例 6

[0099] 体内用配体-脂质体复合物的选择性肿瘤和转移瘤定向

[0100] 本实施例证实了叶酸或运铁蛋白复合的脂质体在体内选择性地定向肿瘤组织的能力。经过皮下注射 JSQ-3, MDA-MB-435 或 DU145 细胞诱导异种移植。在 4-6 周龄雌性无胸腺裸鼠 (Ncr nu-nu) 尾上面背下侧注射 2.5×10^6 (JSQ-3) 或 5×10^6 (DU145) 个细胞。将 1×10^7 个 MDA-MB-435 细胞皮下注射进小鼠的乳房脂肪垫中。对于转移瘤模型, 将 1×10^6 个 JSQ-3 或 MDA-MB-435 细胞经尾静脉静脉内注射进动物。按实施例 2 所述制备 LipF(A)-pSVb 或 LipF(D)-pSVb。LipF-pSVb 或仅用 pSVb 质粒 (在 5% 葡萄糖中) 以 $25 \mu\text{g}$ 质粒 DNA/ $300 \mu\text{l}$ /动物经尾静脉进行静脉内注射。DNA 注射 2 天和 10 天后, 切下肿瘤及小鼠器官, 切成 1mm 切片, 用 PBS 洗涤一次, 并用 2% 甲醛-0.2% 戊二醛室温下固定 4 小时。洗涤固定的肿瘤切片 4 次, 每次 1 小时, 用 X-Gal 溶液加 0.1% NP-40 (pH8.5) 37°C 染色过夜。染色的肿瘤切片使用常规组织学方法包埋和切片并用核固红反染。每个肿瘤检查 4 个切片以评价 β -半乳糖苷酶基因表达, 由染成蓝色的细胞表示。

[0101] LipF(A)-pSVb 或仅用 pSVb 静脉内注射进携带 JSQ-3 异种移植的裸鼠中。48 小时内 LipF(A)-pSVb 注射组显示肿瘤中报道基因表达具有大约 40-50% 的体内转染效率。相反, 仅用 pSVb 质粒, β -半乳糖苷酶报道基因染色的肿瘤细胞不足 1%。静脉内施用 LipF(A)-pSVb 10 天后, 肿瘤中染成蓝色的百分数和强度极大地减小, 表明 LipF(A)-介导的全身性转染是瞬时的。LipF(A)-pSVb 注射的小鼠的活器官显示只有诸如肝巨噬细胞 (肝脏) 的巨噬细胞或尘细胞 (肺) 染成蓝色, 而肝细胞和肺泡细胞本身未被染色。如果发现肿瘤侵入肌肉也显示了肿瘤定向的选择性。LipF(A)-pSVb 仅转染肿瘤, 而肌肉细胞未被染色。更有意义的是, 高度增生的骨髓和肠隐窝细胞明显未被转染。隐窝细胞和骨髓如果有报道基因染色的迹象 ($< 1\%$), 则显示很少。在骨髓和隐窝细胞中无 LipF(A)-pSVb 转染证实定向不是非选择性的, 细胞增生效应, 而是似乎定向肿瘤细胞。这一点经过血管内皮细胞明显无染色进一步证实, 尽管它们在复合物通过血流运行时接触了最高浓度的 LipF(A)-pSVb 复合物。另外, 在脾脏的淋巴母细胞生长中心明显无染色, 即使树突细胞显示 β -半乳糖苷酶染色。

[0102] 癌症复发和治疗的主要问题是转移。为了试验 LipF(A) 复合物定向除了皮下异种移植外的肿瘤细胞的能力, 将 JSQ-3 细胞静脉内注射进裸鼠。在注射后两周末, 形成刺激的转移瘤 (多个器官中的肿瘤细胞岛)。然后用 LipF-pSVb 静脉内注射动物并检查刺激的转移瘤 β -半乳糖苷酶的表达。在胸淋巴结中发现的转移瘤中可见到广泛的 X-gal 染色。在这种切片中, 发现血管 (BV) 被转移的肿瘤细胞包围。尽管肿瘤细胞表现出强烈的 X-gal 染色从血管 20-25 层, 但是在血管内皮细胞中明显没有报道基因表达, 即使它们在复合物通过血流运行时接触了最高浓度的 LipF(A)-pSVb 复合物。这些结果证实了 LipF(A) 复合物的肿瘤选择特性且证实了转移瘤及原发性肿瘤可经过含叶酸的脂质体被定向。

[0103] 为了评价这种叶酸连接的脂质体介导的递送系统对 SCCHN 外的癌症的应用广泛性, 用其它的人类肿瘤细胞系异种移植体也进行了实验, 包括人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435, Hs578T 和入前列腺癌细胞系 DU145, 它们也携带 mt p53。同样, 单独静脉内注射 LipF(A)-pSVb 也证实了肿瘤选择性。在 MDA-MB-435 乳腺脂肪垫肿瘤中也看见高水平的 β -半乳糖苷酶表达, 而相邻的正常肌肉组织未被染色。在非肿瘤组织或包括肠隐窝细胞和肝细胞的正常器官中未检测到报道基因表达, 而皮下乳腺脂肪垫异种移植显示平均 50-70% 染成蓝色。静脉内注射 MDA-MB-435 细胞 2 周后, LipF(A)-pSVb 经过单次尾静脉注

射进行全身性递送。即使小的刺激的乳腺转移瘤在肺中表现出高水平的染色,且邻近的正常肺组织完全未被染色。

[0104] 给携带 DU145 异种移植的小鼠单次静脉内注射 LipF(B)pSVb。在这些小鼠的肿瘤中也显示报道基因表达,代表了至少 40-50% 的体内转染效率,该数值比仅用质粒获得的值高大约 50 倍。

[0105] 运铁蛋白-脂质体,脂质体-pSVb 和 pSVb DNA 复合物以 $1\ \mu\text{gDNA}/10\text{nmol}$ 脂质体/ $12.5\ \mu\text{g}$ 运铁蛋白在无菌的 5% 葡萄糖(而不是 HBSS)中制备。在 4-6 周龄雌性裸鼠肋腹皮下注射 JSQ-3 细胞建立裸鼠肿瘤模型。在 300ml 体积中的 $30\ \mu\text{g}$ 与 Tf-脂质体复合的 pSVbDNA 用 1cc 注射器和 30G 针头经尾静脉注射进每只小鼠中。在对照组中,注射脂质体-pSVb 或无脂质体的 pSVb DNA。在第二天,用 LipT(A)-pSVb 注射的小鼠中肿瘤显示出报道基因表达,代表了大约 20-40% 的体内转染效率。相反,用无脂质体的单独 pSVb 质粒表现出因报道基因表达被染色的肿瘤细胞不足 1%。静脉内施用 LipT(A)-pSVb 10 天后,肿瘤中阳性细胞的百分数和染成蓝色的强度均极大地减小,表明 LipT(A)-介导的全身性转染是瞬时的。用 LipT(A)-pSVb 注射的小鼠活器官显示出只有巨噬细胞(如肺的尘细胞和肝巨噬细胞)染色,而肝细胞和肺泡细胞未被染色。在脾淋巴母细胞生长中心明显无染色,尽管树突细胞表现出轻微的染色。总之,组织学染色表明以 LipT(A) 进行的报道基因递送具有选择性,其中人异种移植体染色最重。

[0106] 实施例 7

[0107] 外源性野生型 p53 蛋白质在 LipF(A)-p53 和 LipT(A)-p53 转染的 JSQ-3 细胞中的表达

[0108] 本实施例证实了外源性基因的表达,在该具体的实施例中,细胞中的野生型 p53 与本发明的递送系统接触并被感染。由于最优化了体内和体外的转染效率,将 LipF(A) 或 LipT(A) 与 p53 表达质粒 pCMVp53 复合,它含有 wt 人 p53(LipF(A)-p53) 或 (LipT(A)-p53) 的 1.7kb cDNA。对于 p53 基因表达的 DNA-剂量反应,将 2×10^5 个 JSQ-3 细胞涂布在 6 孔平板的各孔中。24 小时后,用无血清和抗生素的 EMEM 洗涤细胞一次,用 1ml 含有增加量的 ($0.25-8\ \mu\text{g}/10^5$ 细胞) 与 LipF(A) 复合的 pCMVp53 质粒 DNA 的 LipF(A)-p53, 或作为对照的 LipF(A)-pRo 的转染溶液转染。或者,用含有高达 $4\ \mu\text{g}$ 质粒 DNA/ 2×10^5 个细胞的 LipT(A)-p53 或 LipT(A)-pRo 以 $1\ \mu\text{g}$ DNA/ 10nmol 脂质体/ $15\ \mu\text{g}$ Tf 在 EMEM 中转染细胞。转染 5 小时后,加入 1ml 补充了 20% FBS 和 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 氢化可的松的 EMEM 并再培养 48 小时。收集转染的细胞并在 RIPA 缓冲液 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) 中裂解,使用本领域的技术人员熟悉的标准方法用泛嗜性抗-p53 单克隆抗体 Ab-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) 进行 Western 印迹分析。每泳道上样 $40\ \mu\text{g}$ 总蛋白。

[0109] 对于 p53 基因表达的时间-过程,用 $2\ \mu\text{g}$ 与 LipT(A) 复合的 pCMVp53 或 pCMVpRo 转染 2×10^5 个 JSQ-3 细胞。转染后在 5 天内每隔 24 小时收集细胞并用于 Western 印迹分析。

[0110] 为了研究对 p53 基因表达的放射影响,用 LipT(A)-p53 或 LipT(A)-pRo ($2\ \mu\text{g}$ DNA/ 2×10^5 个细胞) 转染 JSQ-3 细胞 2 天,然后胰酶消化并在 J. L. Shepard 和 Associates Mark I 辐射仪中以分级剂量的高达 6Gy 的 ^{137}Cs -射线进行辐射。辐射的细胞再涂平板并再培养 2 和 4 天,然后收集用于 Western 印迹分析。

[0111] 体外转染进 JSQ-3 细胞后, Western 印迹分析证实 LipF(A)-p53 转染导致外源性 wtp53 的 DNA 剂量和时间依赖性表达。为用作对照, LipF(A) 也于质粒 pCMVpRo 复合 (LipF(A)-pRo), 该质粒携带反向的 wt p53。在 LipF(A)-pRo 转染的 JSQ-3 细胞中 p53 表达与未转染的细胞相同。在 LipF(A)-p53 转染 24 小时后有明显的 wtp53 表达, 在 48 小时达到高峰转染 120 小时后表达可忽略不计, 再次证明该基因递送系统的瞬时性。这种暂时性表达是具有优势的, 因为它允许重复注射而不积累 wtp53。

[0112] 采用 Western 印迹分析证实了 LipT(A)-转导的 wtp53 在 JSQ-3 细胞中被表达。用增加剂量的与 LipT(A) 复合的 p53 表达质粒 pCMVp53(LipT(A)-p53) 转染导致 DNA 剂量依赖型 wtp53 表达, 而在用携带 CMV 启动子控制下的反向 wtp53cDNA 的 LipT(A)-pRo 转染的 JSQ-3 细胞中明显无外源性 p53 表达。wtp53 表达从 LipT(A)-p53 转染 24 小时后开始并在第二天达到高峰, 然后减少。转染五天后只剩下微量的外源性 p53, 这表明 LipT(A)-介导的 wtp53 表达是瞬时的。

[0113] 在 LipT(A)-p53 或 LipF(A)-p53 转染 48 小时后辐射 JSQ-3 细胞时 (wtp53 表达高峰), 外源性 wtp53 表达随 γ -辐射剂量显著增加且稳定达 4 天, 即, 转染后 6 天。这些结果证实 γ -辐射可增强和 / 或稳定外源性 wtp53, 这表明外源性 p53 以与正常内源性 wtp53 类似的方式起作用, 已知该内源性 wtp53 受辐射接触稳定。

[0114] 实施例 8

[0115] JSQ-3 对体外辐射的致敏

[0116] 已表明在一些人肿瘤和细胞系中 p53 突变形式的存在与辐射抗性的增加相关 (8, 10)。因此本实施例检查了用 LipF(A)-介导的转染取代 wtp53 对辐射存活的影响。LipF(A)-介导的 p53 转染能使 JSQ-3 细胞以 DNA 剂量依赖型方式对辐射敏感。在最佳转染条件, 即, 每 10^5 个细胞 $3 \mu\text{g}$ 质粒 DNA 时, D_{10} 值从未转染细胞中发现的高抗性水平 ($6.55 \pm 0.43\text{Gy}$) 显著减小到 $4.33 \pm 0.06\text{Gy}$ ($p < 0.01$)。这代表了对辐射杀伤大约 6-10 倍的敏感性。 4.33Gy 的 D_{10} 值 ($4 \mu\text{g}/10^5$ 个细胞) 与放射敏感性人成纤维细胞系 H500 的 D_{10} 值 ($D_{10} = 4.50 \pm 0.05\text{Gy}$) 相似且认为在此范围内是放射敏感的。单独的 pCMVp53 质粒或 LipF(A)-pRo 根据 D_{10} 值均无显著的致敏效应 ($p > 0.05$) (图 5)。至于存活性, 这种超过 2Gy 的减少代表对电离辐射杀伤效应的敏感性显著增强。临床上, 这种敏感性改变可导致用常规放射剂量可治愈抗性肿瘤。

[0117] 实施例 9

[0118] p53 转染和 γ -辐射诱导的细胞程序死亡

[0119] 本实施例证实了使用本发明最优化的运铁蛋白-脂质体复合物重新导入 wtp53 可恢复功能性 p53 依赖型细胞程序死亡途径。用 LipT(A)-p53 或 LipT(A)-pRo ($1-3 \mu\text{g}$ DNA/ 2×10^5 个细胞) 转染 JSQ-3 细胞且在 3 天内每天收集贴壁的和漂浮的细胞用于分析细胞程序死亡的细胞百分数。对于放射诱导的细胞程序死亡, 转染细胞 2 天, 然后按上面实施例 8 所述进行胰酶消化和辐射。4 天后收集重新涂板的细胞用于分析细胞程序死亡的细胞百分数。用 Annexin V-FITC 试剂盒 (Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD) 根据厂商的方案染色收集的细胞。Annexin V-FITC 特异性结合在细胞程序死亡的细胞上存在的磷脂酰丝氨酸。使用 FACStar 细胞计数器 (Becton&Dickinson) 分析染色的细胞。

[0120] 为了检查 wtp53 恢复对细胞程序死亡诱导的影响, 用 LipT(A)-p53 或 LipT(A)-pRo

转染 JSQ-3 细胞。在 LipT(A)- 介导的 wtp53 恢复中观察到以剂量依赖型方式明显诱导细胞程序死亡。细胞程序死亡的细胞百分数在转染的第 2 天达到高峰,它与以 Western 印迹揭示的细胞中的 wtp53 表达水平相关。为了检查辐射对细胞程序死亡的诱导的影响,用不同剂量的 γ - 辐射处理转染的细胞。2-4 天后,用 Annexin V-FITC 染色细胞并使用 FACStar (Becton&Dickinson) 以流式细胞计数术分析。 γ - 辐射仅在 LipT(A)-p53 转染的细胞中诱导细胞程序死亡的细胞百分数从 18.7% (0Gy) 显著增加到 38.7% (4Gy) 且在辐射后 4 天达到 46.4% (6Gy)。在未转染的 (UT) 细胞和用单独的 LipT(A) 或 LipT(A)-pRo 处理的细胞中未观察到增加。这种增加是放射剂量- 依赖型的且与在 Western 印迹数据中发现的 wtp53 表达水平相关,这表明细胞程序死亡的辐射增强与细胞中的 wtp53 水平成比例。即,表达的 wtp53 越多,诱导的细胞程序死亡越多。

[0121] 实施例 10

[0122] 经过全身性递送 LipF(A)-p53 使 JSQ-3 异种移植肿瘤对辐射敏感

[0123] 在本实施例中证实了使用全身性递送的叶酸-脂质体-治疗分子作为癌症治疗的方法。在该具体实施例中,治疗分子是正常的人野生型 p53 基因 (pCMVp53)。

[0124] 上消化道积气的鳞状细胞癌导致显著的发病率和死亡率,尽管最近在治疗上有所改进。具有早期疾病 (I 或 II 期) 的病人一般用外科手术或者放疗进行治疗,而具有恶化疾病 (III 或 IV 期) 的更常见的病人一般用外科手术随后用辐射进行治疗。尽管如此,对于恶化期疾病,治疗的病人一半或更多在原发疾病或远距离转移瘤位点复发且最终死亡。很可能这些临床失败的大部分由肿瘤细胞亚群的辐射抗性引起。因此,开发使头颈肿瘤对放疗敏感的有效方法对这些疾病的治疗具有深远的影响。

[0125] 在许多研究中已将肿瘤抑制基因 p53 的突变 (mt) 型与各种类型的恶性肿瘤的临床细胞程序死亡较差联系起来。p53 也可能涉及头颈鳞状细胞癌 (SCCHN) 的形成和恶化。经过使用各种检测方法,已在 33% -100% 的 SCCHN 组织中鉴定到 p53 基因和 / 或其表达的异常。mt p53 的存在也可能是 SCCHN 频率增加和肿瘤复发更迅速的征兆。已表明野生型 (wt) p53 在 DNA 损伤或应激后细胞周期的调节中而不是在正常增生和发育期间发挥功能。由于已发现在一些人类肿瘤和细胞系中 mt p53 的存在与辐射抗性 (RR) 相关,且由于头颈肿瘤放疗失败的高百分数,可认为在大量 SCCHN 中发现的功能性 wtp53 缺乏与这种观察到的 RR 之间存在因果关系。因此 wtp53 的取代可导致这些肿瘤对常规放疗敏感。

[0126] 将 2.5×10^6 JSQ-3 细胞皮下注射到 4-6 周龄雌性无胸腺裸鼠 (NCrnu/nu) 尾巴上的下背部。当肿瘤达到合适大小时,以 $8 \mu\text{g DNA}/400 \mu\text{l } 5\% \text{ 葡萄糖}$ / 小鼠给予每周 2 次的静脉内注射 LipF(A)-p53, pCMVp53 或 LipF(A)-pRo, 共注射 5 次。开始静脉内注射 48 小时后,将动物在颈支架中固定仅使肿瘤区接受辐射,首先施用 $2.5\text{Gy}^{137}\text{Cs}$ 电离辐射的分次剂量。此后每隔 48 小时给予动物 2.5Gy 以达到 25Gy 的总剂量。作为比较,一组未转染的以及一组接受了 LipF(A)-p53 的小鼠不接受辐射。

[0127] 携带大约 $25\text{-}40\text{mm}^3$ 的皮下 JSQ-3 肿瘤的小鼠经尾静脉每周 2 次静脉内注射 LipF(A)-p53 (共注射 5 次) 且仅肿瘤区域接受分次剂量的 γ - 辐射 (总共 25Gy)。为了测定在肿瘤中是否表达转染的 p53 蛋白质,在实验过程中从未转染的 LipF(A)-p53 和 LipF(A)-pRo 组切下一个肿瘤 (注射 3 次和 12.5Gy 后)。在 LipF(A)-p53 处理的肿瘤中证实有高水平的外源性 p53,这证实了叶酸-阳离子脂质体复合物能将 wtp53 基因全身性递送

给肿瘤。单独用辐射治疗对未转染的动物中的肿瘤仅具有有限的效力。静脉内注射 pCMVp53 质粒 DNA 或 LipF(A)-pRo 与电离辐射结合开始诱导一些肿瘤生长抑制。然而,与临床情况类似,这些肿瘤,如在未转染的动物中的那些肿瘤,在停止辐射治疗后开始重新生长。尽管单独用 LipF(A)-p53 治疗能在静脉注射结束期间和甚至在其之后抑制肿瘤生长一段时间,但在最后一次静脉内注射 2 周内这些肿瘤也开始增大。相反,接受了 LipF(A)-p53 加辐射组合的肿瘤 75% 完全消退,甚至在放射治疗后 130 天仍没有复发迹象出现。而且其余 25% 仅显示出最小残余肿瘤,在实验过程中它们是静止的,不足原始肿瘤体积的 10%。对这些残余肿瘤块的组织学检查表明它代表了成熟的斑痕,没有增生性肿瘤细胞存在。

[0128] 最近,在停止治疗超过 1 年后,所有的对照动物要么死亡,要么由于肿瘤拖累而被仁慈地安乐处死。然而在接受组合治疗的动物中仍没有肿瘤重新生长的迹象。

[0129] 从另一个独立的实验也获得了相似的结果,其中起始肿瘤体积为 25-60mm³。同样,辐射后大约一年,在接受组合治疗的动物中明显没有肿瘤重新生长。

[0130] 这首次证实了以全身性递送的脂质体 p53 复合物介导总体肿瘤消退。这些体内研究证实结合全身性 LipF(A)-p53 基因治疗和常规化疗比任一单独的治疗具有明显更高的有效性。

[0131] 实施例 11

[0132] 以全身性递送 LipT(A)-p53 使 JSQ-3 异种移植肿瘤对辐射敏感

[0133] 在本实施例中我们证实了使用全身性递送的运铁蛋白-脂质体-治疗分子作为癌症治疗的方法。在该具体实施例中,治疗性分子是正常的人野生型 p53 基因 (pCMVp53)。

[0134] 将 2.5×10^6 JSQ-3 细胞皮下注射到 4-6 周龄雌性无胸腺裸鼠 (NCrnu/nu) 尾巴上的下背部。7-10 天后,肿瘤在注射位点生长到大约 40-50mm³。每只小鼠经尾静脉每周 2 次静脉内注射在 300ml 15% 葡萄糖中新鲜制备的含 8 μ g DNA 的 LipF(A)-p53 或 LipF(A)-pRo, 共注射 5 次。开始静脉内注射 48 小时后,将动物在颈支架中固定仅使肿瘤区接受 γ -辐射,首先施用 2.5Gy ¹³⁷Cs 电离辐射的分次剂量。此后每隔 48 小时给予动物 2.5Gy 以达到 25Gy 的总剂量。作为比较,一组未转染的以及一组注射了 LipT(A)-p53 的小鼠不接受辐射用作对照。以不知情方式每周测量肿瘤大小。

[0135] 用 SCCHN(JSQ-3) 异种移植肿瘤进行的 2 个独立的实验具有相似的结果。首先,携带大约 25-40mm³ 的皮下 JSQ-3 肿瘤的小鼠经尾静脉每周 2 次注射 LipT(A)-p53 (共注射 5 次) 且仅肿瘤区域接受分次剂量的 γ -辐射 (总共 25Gy)。在使用对照 LipT(A)-CMVpRo 转染的细胞中短期辐射对肿瘤细胞生长具有明显的影响。在接受了 LipT(A)-CMVp53 而未辐射的动物中仅有最小的肿瘤生长抑制。相反,接受了 LipT(A)-CMVp53 加辐射组合的所有肿瘤表现出几乎完全消退,甚至在放射治疗后 153 天仍没有复发迹象出现。此时,在对照组中携带肿瘤的动物要么死亡,要么由于过大的肿瘤拖累而被仁慈地安乐处死。然而在接受组合治疗的组中 (p53 和辐射) 在辐射后一年时仍没有肿瘤重新生长的迹象。在用 LipF(A)-p53 和辐射组合治疗的动物中,到治疗后一个月为止,在接受组合治疗的动物的原始肿瘤位点,在残余组织中仅存在斑痕组织和一些侵入的 Langerhan's 细胞。在第二个体内实验中也观察到相似的结果。

[0136] 实施例 12

[0137] 在第二种癌症模型中组合治疗的影响

[0138] 本实施例说明了脂质体介导的,肿瘤定向的 p53 基因治疗与常规放疗的这种新组合的效力并不局限于 SCCHN,从而增加了该系统的临床适用性。评价了叶酸-定向的,脂质体-介导的 p53 基因治疗与辐射结合对体内人前列腺细胞系 DU145 的影响。这种腺癌细胞系最初从具有广泛转移的前列腺癌病人脑病灶中产生且据报道携带 mtp53。我们发现该细胞系对 γ -辐射杀伤 ($D_{10} = 5.8 \pm 0.22\text{Gy}$) 具有抗性,该治疗是辅助治疗该疾病的一种最早的形式。以前的体外实验表明用胆固醇取代中性脂类 DOPE 可导致在这一不同的肿瘤细胞类型中增加转染效率。根据萤光素酶活性,我们发现在 DU145 细胞中与 LipF(A) 相比 LipF(D) 产生的转染效率增加超过 4 倍。因此,携带大约 70mm^3 的 DU145 肿瘤的小鼠经尾静脉用 LipF(D)-p53 大约每隔 5 天静脉内注射(共注射 5 次)且肿瘤接受分次剂量的 γ -辐射(总共 25Gy)。在本实验中,非叶酸定向的脂质体-p53 组合物(LipF(D)-p53)也用作对照。这些前列腺肿瘤的结果与 SCCHN 肿瘤十分相似。仅用辐射,LipF(D)-pRo 加辐射,和非定向的 Lip(D)-p53 加辐射在治疗过程中对肿瘤生长具有一定的抑制效应。然而,一旦停止治疗这些肿瘤的大小全部迅速增大。相反,LipF(D)-p53 加辐射的组合导致肿瘤长期消退,即使是在第 84 天,即治疗后第 64 天。在第 63 天观察到的对照组中肿瘤体积下降是由于在该组中因肿瘤拖累而动物减少。用大约 100mm^3 的肿瘤进行的第二组实验显示出类似的结果,即使在停止所有治疗后第 47 天也没有观察到再生长。

[0139] 实施例 13

[0140] JSQ-3 对顺式铂氨 (CDDP) 的体外化学敏感性

[0141] 除了辐射外,化疗越来越常用于 SCCHN 的治疗。由于缺乏功能性 wtp53 与对化疗反应的失败相联系,在本实施例中我们检查了利用配体的脂质体介导的 wtp53 基因治疗对 SCCHN 细胞系 JSQ-3 对化疗剂的敏感性的影响。在 96 孔平板的每孔中涂布 1×10^4 个细胞。24 小时后,用 LipT(A)-p53 转染该细胞。转染 2 天后,以不断增加的浓度(一式三份)加入抗癌剂。4-6 天后,进行 XTT 细胞增生试验并计算 IC_{50} 值,产生 50% 生长抑制的药物浓度。用少至 $0.2 \mu\text{g}$ 与 LipT(A) 复合的 wtp53DNA 处理显示出使 JSQ-3 细胞对 CDDP 和 5-FU,两种经常用于辅助化疗的药物显著敏感。尽管单独用 LipT(A) 复合物,或以反向携带 wtp53 的 LipT(A) (LipT(A)-pRo) 转染对 CDDP 产生一定的敏感性,但在 LipT(A)-p53 转导的细胞中的敏感水平明显比未转染的细胞高 24 倍。而且,用 LipT(A)-p53 复合物转染后也观察到 JSQ-3 对化疗剂 5-FU 敏感 15.4 倍。

[0142] 实施例 14

[0143] 以增强细胞程序死亡的诱导显示 p53 介导的化学敏感性

[0144] 本实施例检查了配体-脂质体介导的 wtp53 恢复对化疗剂诱导的细胞程序死亡的影响。将 JSQ-3 细胞接种在 6 孔平板上并用 LipT(A)-p53, LipT(A)-pVec(无 p53 基因的载体)或单独的 LipT(A) 以 1 或 $2\mu\text{gDNA}/2 \times 10^5$ 个细胞进行转染。24 小时后,向各组平板中以接近各细胞系 IC_{50} 值的浓度加入化疗剂。再培养 1 天后,收集贴壁的和漂浮的细胞并使用 Annexin V-FITC 试剂盒 (Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD) 根据厂商的方案用 AnnexinV-FITC 染色,Annexin V-FITC 特异性结合在细胞程序死亡的细胞上存在的磷脂酰丝氨酸。在 FACStar 流式细胞计数器 (Becton&Dickinson) 上分析染色的细胞。

[0145] 在用本发明的 LipT-介导的 wtp53 复合物处理的细胞中观察到 p53DNA 剂量依赖型的细胞程序死亡诱导。而且以接近其 IC_{50} 值的剂量加入化疗剂 (CDDP, 紫杉醇, 5-FU) 仅

在 LipT(A)-p53 转染的细胞中而不在未转染的 (UT) 和仅用 LipT(A) 或 LipT(A)-pVec 转染的细胞中诱导群体中细胞程序死亡的细胞百分数显著增加。该增加是 p53DNA 剂量依赖型的且与在 Western 印迹上观察到的 wtp53 表达水平相关,这证实了化疗剂诱导的细胞程序死亡增强与细胞中的 wtp53 水平成比例,即,表达的 wtp53 越多,诱导越多的细胞程序死亡。LipT(A)-p53 加药物的组合处理后观察到的细胞程序死亡增加比单独的化疗剂 (UT 加药物) 加单独的 p53 转染 (有 p53 而没有药物) 之和要大得多,这表明 p53 基因治疗与化疗剂组合时具有协同效应。

[0146] 实施例 15

[0147] 用配体 - 脂质体 -p53 使 MDA-MB-435 对顺式铂氨或阿霉素体外化学致敏

[0148] 在乳腺癌的治疗中,大部分肿瘤和其转移瘤对辅助化疗无反应是主要关心的问题。在本实施例中我们检查了本发明的递送系统使乳腺癌细胞对常用的化疗剂敏感的能力。

[0149] 采用了人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435。所用的配体 - 脂质体复合物是被最优化用于头颈鳞状细胞 (在乳腺癌中发现的一种不同的组织学细胞类型) 的组合物。与未转染的细胞相比,用 LipT(A)-p53 转染使阿霉素对 MDA-MB-435 细胞的效力增加了 4 倍,使 CDDP 的效力增加了几乎 12 倍。因此,尽管还没有最优化用于乳腺癌,但是已证实了用 LipT(A)-p53 转染对乳腺癌细胞化学致敏。

[0150] 使用为腺癌 (大多数乳腺癌的组织学细胞类型) 设计的组合物 LipF(C) 获得了更加令人惊奇的结果。如上所述,以 XTT 试验测定了 IC_{50} 值。与未转染的细胞相比,用转染使阿霉素对 MDA-MB-435 细胞的效力增加了 73.6 倍,使紫杉醇的效力增加了 31.6 倍。正如用 SCCHN 细胞所见,以 LipF(C)-pRo 复合物也有一定程度的致敏。这些结果证实实用运铁蛋白 - 和叶酸 - 定向的脂质体 -p53 复合物转染可化学致敏乳腺癌细胞。

[0151] 实施例 16

[0152] 用 LipF-p53 基因治疗体内化学致敏乳腺癌细胞

[0153] 本实施例显示了本发明的全身性递送的配体 - 脂质体 - 治疗分子复合物作为体内抗肿瘤细胞的有效治疗剂的能力。经尾静脉用 LipF(C)-p53 每隔 3-4 天静脉内注射携带大约 100mm^3 的皮下乳腺脂肪垫 MDA-MB-435 肿瘤的小鼠,共注射 8 次。每周静脉内注射阿霉素 (Dxr) (10mg/kg) 共 4 周。用 LipF(C)-p53 结合 Dxr 基本上抑制了肿瘤的生长。在第二个实验中,采用了两种分开的脂质体组合物 [LipF(E) 和 LipF(C)]。均证实了与 Dxr 组合时用 LipF(C)-p53 组合物的效力优于 LipF(E)-p53。

[0154] 实施例 17

[0155] 在不同的癌细胞系中最优化配体 - 脂质体转染

[0156] 在本实施例中进一步开发了配体 - 阳离子脂质体系统,制备了一组配体 - 定向的阳离子脂质体用于最优化对各种人和啮齿类癌细胞的转染效力。

[0157] 制备了如下的阳离子脂质体:

[0158] LipA DOTAP/DOPE 1 : 1 摩尔比

[0159] LipB DDAB/DOPE 1 : 1 摩尔比

[0160] LipC DDAB/DOPE 1 : 2 摩尔比

[0161] LipD DOTAP/Chol 1 : 1 摩尔比

- [0162] LipE DDAB/Chol 1 : 1 摩尔比
- [0163] LipG DOTAP/DOPE/Chol 2 : 1 : 1 摩尔比
- [0164] LipH DDAB/DOPE/Chol 2 : 1 : 1 摩尔比
- [0165] 1. 叶酸系列 : 上述各配制品加 1% -5% 叶酸 -DOPE 或叶酸 -DSPE。
- [0166] 2. 运铁蛋白系列 : 上述各配制品与完整的运铁蛋白在培养基或缓冲液中混合, 然后与报道基因质粒 DNA 在培养基或缓冲液中混合以形成复合物。
- [0167] 在质粒 pCMVLuc 中的萤火虫萤光素酶基因或在质粒 pCMVb 中的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因用作报道基因。
- [0168] 制备 DNA-脂质体复合物 :
- [0169] 经过在聚丙烯试管中混合等量的无血清培养基和在 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 中的报道基因质粒 DNA, 和等量的无血清培养基与在无菌水中的叶酸-脂质体 (LipA-F, LipB-F, LipC-F, LipD-F, LipE-F, LipG-F, LipH-F) ($2 \mu\text{mol/ml}$ 总脂类) 制备各种 DNA-脂质体-叶酸复合物。室温下 10-15 分钟后将两溶液混合起来并在室温下经常摇动保温 15-30 分钟。DNA 与脂类的比率最优化范围为 1 : 0.1 至 1 : 50 $\mu\text{g/nmol}$ 。
- [0170] 经过向无血清培养基中加入 Tf (铁饱和的, Sigma, 4-5mg/ml 溶于水中, 用 0.22mm 滤膜过滤) 制备各种 DNA-脂质体-运铁蛋白复合物。5-15 分钟后加入阳离子脂质体 (LipA, LipB, LipC, LipD, LipE, LipG, LipH) 并混合。在室温下经常摇动保温 5-15 分钟后, 加入等量的含有报道基因质粒 DNA 的培养基并混合, 在室温下经常摇动保温 15-30 分钟。最优化的 DNA/脂类/Tf 比率范围为 1/(0.5-50)/(0.1-100) $\mu\text{g/nmol}/\mu\text{g}$ 。
- [0171] 细胞系 :
- [0172] 在下列细胞系中进行最优化 :
- [0173] 人头颈鳞状细胞癌 : JSQ-3, HN17B, HN22a, HN-38, SCC-25。
- [0174] 人乳腺癌 : MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453, MCF-7。
- [0175] 人前列腺癌 : DU145, LNCaP, Ln-30, P4-20。
- [0176] 人卵巢癌 : SKOV-3, PA-1。
- [0177] 人胰腺癌 : PANC-1。
- [0178] 人结肠癌 : SW480, LS174T, SK-CO-1。
- [0179] 人成胶质细胞瘤 : U-87。
- [0180] 人颈癌 : HTB-34, ME180。
- [0181] 人肺癌 : CALU-3。
- [0182] 人胃癌 : Hs 746T。
- [0183] 人脂肪肉瘤 : SW 872。
- [0184] 人黑色素瘤 : SK-MEL-31。
- [0185] 人绒毛膜癌 : JEG-3。
- [0186] 人横纹肌肉瘤 : Hs 729T。
- [0187] 人成视网膜细胞瘤 : Y79。
- [0188] 人正常乳腺上皮细胞 : Hs578Bst。
- [0189] 人内皮细胞 : HUV-EC-C。
- [0190] 小鼠黑色素瘤 : B16/F10。

[0191] 大鼠前列腺癌 :PA-III, AT. 61。

[0192] 大鼠脑癌 :RT-2。

[0193] 用萤光素酶试验进行最优化 :

[0194] 在 24 孔平板上涂板 5×10^4 个细胞 / 孔。24 小时后用无血清培养基洗涤细胞一次, 向每孔中加入 0.3ml 无血清培养基和抗生素。向细胞中加入新鲜制备的含不同量质粒 DNA (在 0.2ml 中达 $1.0 \mu\text{g}$ 培养基) 的 LipT-pCMVLuc 或 LipF-pCMVLuc 复合物。在 37°C 和 5% CO_2 中培养 5 小时后, 向每孔中加入 0.5ml 补充了 20% 胎牛血清的培养基。24 小时后, 用 PBS 洗涤细胞一次, 用 $100 \mu\text{l}$ / 孔 1x 报道裂解缓冲液 (Promega) 裂解, 在发光计上用萤光素酶测定系统 (Promega) 测量表达的萤光素酶活性。使用 Bio-Rad DC 蛋白测定试剂盒 (Bio-Rad 实验室) 测定细胞裂解产物中的蛋白质浓度。结果表示为每 μg 种蛋白的相对光单位 (RLU)。

[0195] 用 β -半乳糖苷酶比色测定最优化 :

[0196] 在 96-孔平板的各孔中涂板 1×10^4 个细胞或在 24 孔平板上涂板 5×10^4 个细胞 / 孔。24 小时后用无血清或抗生素的培养基洗涤细胞一次, 向每孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 含有各种量的 LipT-pCMVb, LipF-pCMVb 或单独的 pCMVb 的转染溶液。在 37°C 培养 5 小时后, 向每孔中加入等量的含有 20% 胎牛血清的培养基。48 小时后, 用 PBS 洗涤细胞一次, 在 1x 报道裂解缓冲液 (Promega) 中裂解。用 $100 \mu\text{l}$ 在含有 1mM MgCl_2 和 $450 \mu\text{M}$ β -巯基乙醇的 20mM Tris (PH7.5) 中的 $150 \mu\text{M}$ 邻-硝基苯- β -半乳糖苷糖苷在 37°C 下处理细胞裂解产物 0.5 小时。经过加入 $150 \mu\text{l}$ / 孔的 1M Na_2CO_3 终止反应。在 405nm 下测定吸光度。纯化的 β -半乳糖苷酶 (Boehringer) 用作标准。结果表示为每 μg 总蛋白的 β -半乳糖苷酶相当量的毫单位数。

[0197] 组织化学染色 :

[0198] 为进行配体-脂质体-pCMVb 转染的组织化学研究, 按上面所述转染 60% 铺满的细胞 (在 24 孔平板上) 5 小时。再培养 2 天后, 固定细胞并用 X-gal 染色。转染效率计算为染成蓝色的细胞百分数。

[0199] 不同的脂质体组合物对不同的细胞系的转染效率 :

[0200] 如表 2 所示, LipT(A) 和 LipT(D) 对 JSQ-3 细胞表现出最高的转染效率, 比其它脂质体配制品效率高 3-8 倍。LipT(D) 对 MDA-MB-435 和 DU145 具有最高的效率。以 1/12/15 的比率 (DNA μg /Lip nmol/Tf μg) 或更高时, LipT(D) 对 JSQ-3 和 LipT(A) 对 MDA-MB-435 细胞产生高效率, 但具有明显的细胞毒性。更重要的是, 当制备用于体内实验的 Tf-Lip-DNA 复合物时, 具有该比率或更高 (脂类) 的复合物易于沉淀, 复合物溶液容易变成雾状 (即, 不象以低比率制备的溶液一样清澈) 和不稳定。因此, LipT 优选的比率为 1/10/12.5 (DNA μg /Lip nmol/Tf μg)。

[0201] 表 2 :

[0202]

脂质体	比率**	DU145	MDA-MB-435	JSQ-3
LipT(A)	1/6/7.5	0.62	1.18	24.62

脂质体	比率**	DU145	MDA-MB-435	JSQ-3
	1/8/10	1.54	2.90	76.07
	1/10/12.5	3.05	2.32	117.64
	1/12/15	1.50	14.56	81.09
LipT(B)	1/6/7.5	1.06	6.35	44.11
	1/8/10	0.97	5.91	36.45
	1/10/12.5	0.78	N/A	43.00
	1/12/15	0.28	5.90	38.98
LipT(C)	1/6/7.5	0.043	0.66	2.80
	1/8/10	0.087	1.63	7.35
	1/10/12.5	0.33	2.59	16.59
	1/12/15	0.25	3.48	17.29
LipT(D)	1/6/75	0.076	4.00	1.88
	1/8/10	0.26	7.43	3.43
	1/10/12.5	0.92	9.63	42.20
	1/12/15	3.06	13.44	124.60
LipT(E)	1/6/7.5	0.54	7.56	9.46
	1/8/10	0.87	5.31	8.96
	1/10/12.5	1.12	4.52	20.91

脂质体	比率**	DU145	MDA-MB-435	JSQ-3
	1/12/15	1.33	6.21	27.95
仅用质粒		0.0001	0.0034	0.0001

[0203] *x10⁶RLU/mg 蛋白质

[0204] **DNA μ g/Lip nmol/Tf μ g 的比率

[0205] 与运铁蛋白相似, LipF(A) 和 LipF(C) 对 JSQ-3 细胞提供了最好的结果, 比其它脂质体配制品效率高 2 至 8 倍 (表 3)。令人感兴趣的是, 叶酸-脂质体与 Tf-脂质体相比在 MDA-MB-435 和 DU145 以及在其它的细胞系中产生完全不同方式的效率。LipF(C) 对 MDA-MB-435 提供了最好的结果, LipF(E) 对 DU145 提供了最好的结果 (表 3)。在用 DOTMA/DOPE 为 1 : 1 和 1 : 2 摩尔比的脂质体转染的一些癌细胞系中获得了具有较低效率的相似结果。

[0206] 表 3:

脂质体		DU145 0.25ug DNA	DUI145 0.5ug DNA	MDA-MB- 435 0.5ug DNA	JSQ-3 0.5ug DNA
LipF(A)	1/6**	0.05			
	1/8	0.31	0.58	2.16	76.90
	1/10	0.16	0.29	0.59	77.96
	1/12	0.18			
LipF(B)	1/6	0.42			
	1/8	1.27	2.68	2.26	44.80
	1/10	1.03	1.94	1.71	42.15
	1/12	1.61			
LipF(C)	1/6	0.10			
	1/8	0.44	1.14	3.58	36.27
	1/10	0.54	1.15	1.62	83.88
	1/12	0.35			
LipF(D)	1/6	0.05			
	1/8	0.05	0.53	1.07	25.95
	1/10	0.38	0.74	0.64	34.47
	1/12	0.20			
LipF(E)	1/6	2.71			
	1/8	2.08	2.23	0.98	12.12
	1/10	1.63	2.95	1.07	23.91
	1/12	1.60			
质粒		0.27×10^{-6}	0.13×10^{-3}	0	0

[0208] * $\times 10^6$ RLU/mg 蛋白质

[0209] ** 比率 :DNA μ g/Lip nmol

[0210] 表 4 显示了用于一些细胞系的优选的配体 - 脂质体配制品,我们使用本发明公开的配体脂质体系统体外试验了这些细胞系。应注意用于体外转染的最佳组合物不必是用于体内转染的最佳组合物。但很可能体外优选的组合物是产生体内优选的组合物的好起点。因此,在本发明所公开的体内全身性基因治疗之前必须使用裸鼠异种移植模型进行体内最优化。

[0211] 表 4:

[0212]

细胞系	Tf- 脂质体	叶酸 - 脂质体
JSQ-3	LipT(A), (D)	LipF(A), (C)
HN17B	LipT(B)	
HN22a	LipT(A)	
HN 38	LipT(B)	
SCC-25	LipT(A)	
SCC-25cp	LipT(A)	
MDA-MB-231	LipT(E)	
MDA-MB-435	LipT(D), (A)	LipF(C), (B)
MDA-MB-453	LipT(C)	
DU145	LipT(D), (H)	LipF(E)
P4-20	LipT(A)	
SKOV-3	LipT(D), (B)	
PA-1	LipT(A)	
PANC-1	LipT(D), (H)	LipF(D), (A)
SW480	LipT(A)	
LS 174T		LipF(D)
SK-CO-1		LipF(E)

细胞系	Tf- 脂质体	叶酸 - 脂质体
U-87	LipT(D), (A)	
HTB-34	LipT(C), (A)	LipF(C)
ME 180		LipF(E)
CALU-3		LipF(D)
HS 746T		LipF(E)
HS 578Bst		LipF(E)
HUV-EC-C		LipF(E)
B16F10	LipT(A), (C)	LipF(E)
JEG-3		LipF(B)
HS 729T		LipF(B)
Y79		LipF(D)
PA-III		LipF(C), (H)
AT6.1	LipT(H)	LipF(H)
RT-2		LipF(B)

[0213] 血清的影响或配体 - 脂质体的转染效率：

[0214] LipT(D) 对无血清的人成胶质瘤细胞系 U-87 具有高水平的转染效率。然而，在 10% 血清存在的条件下，其转染效率显著减小，而 LipT(A) 在血清存在下对该细胞系具有最高效率。对于人胰腺癌细胞系 PANC-1，血清似乎增强用一些脂质体组合物的转染，用 LipT(H) 表现出最高水平的效率。同样，我们观察到在不同的细胞系中不同的转染效率情况，和血清对转染效率的不同影响。为达到体内转染的目的，应在最优化过程中考虑血清影响。

[0215] 实施例 18

[0216] 以 Tf- 或叶酸 - 脂质体 - 介导的 Wtp53 体外基因治疗使其它细胞系化学致敏

[0217] 本实施例总结了在实施例 17 中描述了用运铁蛋白 - 偶连的或叶酸 - 偶连的脂质

体转染的细胞系中进行的部分体外 p53- 介导的化学致敏实验 (XTT 试验)。数据在下面表中提供,证实了 LipT- 和 LipF- 介导的 p53 基因转染可使这些肿瘤细胞对化疗剂敏感。化学致敏效力依赖于所用的脂质体和 p53DNA 剂量。VIN = 长春花碱 ;DXR = 阿霉素 ;CDDP = 顺式铂氨。致敏倍数从单个的 IC_{50} 值计算。DNA 剂量 = 用于每孔的 μg DNA (在 96 孔平板中大约 1×10^4 个细胞 / 孔)。

[0218]

细胞系	药物	脂质体	DNA 剂量	IC50				致敏倍数	
				P53	载体	仅有 Lip	UT	p53 与载体	P53 与 UT
MDA-MB-231	VIN	LipF(B)	0.15	0.42	1.07	1.23	1.57	2.6	3.8
	VIN	LipF(A)	0.15	0.50	1.42	1.47	1.81	2.9	3.6
	VIN	LipF(C)	0.15	0.48	1.69	1.47	1.81	3.5	3.8
	DXR	LipF(B)	0.15	0.07	0.24	0.27	0.27	3.6	4.0
	DXR	LipF(A)	0.15	0.11	0.24	0.22	0.20	2.2	1.8
	DXR	LipF(C)	0.15	0.02	0.09	0.30	0.27	4.5	13.5
	紫杉醇	LipF(C)	0.12	2.90	11.70	11.70	54.10	4.0	18.7
	紫杉醇	LipF(C)	0.08	6.10	10.00	10.00	52.00	1.6	8.5
	紫杉醇	LipT(C)	0.12	14.70	46.70	10.00	52.00	3.2	3.5
MDA-MB-435	DXR	LipF(C)	0.12	0.01	0.74	0.74	0.89	62.9	76.1
	DXR	LipF(C)	0.08	0.01	0.58	0.76	0.93	46.3	73.5
	DXR	LipT(B)	0.10	0.01	0.54	0.79	0.85	54.0	85.0
	紫杉醇	LipF(C)	0.12	1.12	10.79	34.15	39.80	9.6	35.5
	紫杉醇	LipF(C)	0.08	1.36	14.13	36.87	42.99	10.4	31.6
	Taxotere	LipF(B)	0.10	0.11	3.75	13.50	10.00	34.7	92.6
	Taxotere	LipT(B)	0.08	0.07	0.80	3.10	3.60	10.8	48.7
JSQ-3	Taxotere	LipF(A)	0.10	0.29	1.03	2.13	2.53	6.0	8.7
	Taxotere	LipF(C)	0.10	1.36	3.98	3.40	13.59	2.9	10.0
	Taxotere	LipF(C)	0.08	0.79	3.98	3.40	13.59	5.0	17.2
	Taxotere	LipF(B)	0.10	0.86	1.85	13.59	14.68	2.2	17.1
	紫杉醇	LipF(C)	0.10	1.70	3.40	6.30	15.85	2.0	9.3
	紫杉醇	LipF(C)	0.08	1.47	3.40	6.30	15.85	2.3	10.8
	紫杉醇	LipF(B)	0.10	0.86	3.16	17.11	17.11	3.7	19.9
DU145	Taxotere	LipF(C)	0.10	0.86	6.60	1.35	41.97	7.7	48.8
	Taxotere	LipF(C)	0.08	0.32			41.97		130.3
	Taxotere	LipF(B)	0.10	0.56	3.40	14.68	39.80	6.1	71.1
	紫杉醇	LipF(C)	0.10	0.71	4.20	4.90	13.20	5.9	18.6
	紫杉醇	LipF(B)	0.10	1.40	5.50	13.50	16.30	3.9	11.6
PANC-1	CDDP	LipF(B)	0.10	5.05	13.33	14.86	18.43	2.6	3.6
	Taxotere	LipF(A)	0.15	1.63			10.36	6.4	7.1
	Taxotere	LipF(B)	0.15	11.50				9.3	87.9
	Taxotere	LipF(C)	0.20	0.14	1.30		10.00	11.3	82.0
					12.30				
				0.15	1.70	1.90	12.30		
U87	Gemzar	LipF(B)	0.10	0.28	1.07	0.76	1.28	3.9	4.7
	Gemzar	LipF(C)	0.10	0.50	1.15	1.20	1.23	2.3	2.5
	Gemzar	LipT(A)	0.20	0.20	1.00	1.00	1.00	5.0	5.0

[0219] 实施例 19

[0220] 全身性递送 LipF(A)-p53 结合化疗对体内 DU145 异种移植生长的影响

[0221] 化疗越来越常用于前列腺癌的治疗。已将功能性 wtp53 的丧失与对化疗无反应联

系起来。本实施例检查了配体 - 脂质体 -p53 结合化疗对体内前列腺肿瘤异种移植生长的影响。

[0222] 经过尾静脉使用叶酸作为定向配体的配体 - 脂质体 p53 复合物 (LipF(B)-p53) 注射携带大约 100mm^3 的皮下 DU145 异种移植肿瘤的小鼠。与 $10\text{mg}/\text{kg}$ 剂量的化疗剂 docetaxel 一起每周 2 次 (总共注射 5 次) 施用该脂质体复合物。用单独的 LipF(B)-p53 复合物, 或用单独的 docetaxel 处理动物对肿瘤生长没有显著影响。然而, 用本发明的全身性递送的 LipF(B)-p53 结合 docetaxel 处理导致显著的肿瘤消退。尽管所用的复合物不是对前列腺肿瘤细胞完全最优化的, 但这些发现有力地支持了全身性递送的, 定向的 - 脂质体将 wtp53 递送给肿瘤导致其对常规治疗敏感的能力。

[0223] 实施例 20

[0224] 全身性递送的 LipF-p53 结合化疗对体内 PANC-1 异种移植生长的影响

[0225] 本实施例证实了配体 - 脂质体 -p53 结合化疗对体内胰腺癌异种移植生长的影响。经过将 1×10^7 个以上的细胞皮下接种到无胸腺的裸鼠上诱导胰腺癌细胞系 PANC-1 异种移植肿瘤。当肿瘤达到大约 $500-1000\text{mm}^3$ 时, 切下肿瘤并绞碎成小块 ($< 1\text{mm}$)。将这些新鲜制备的肿瘤块 (悬浮于 PBS 中) 皮下接种 (使用 14g 针头) 到无胸腺裸鼠的两肋。当肿瘤达到平均 100mm^3 的体积时, 开始处理。动物经静脉内注射接受 LipF(B)-p53。每周 2 次施用脂质体复合物达到总共注射 7 次。以 $60\text{mg}/\text{kg}$ 或 $120\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量每周 2 次腹腔内施用化疗剂吉西他滨。总共施用 13 次吉西他滨注射。一组动物除了静脉内施用 LipF(B)-p53 和吉西他滨外也接受每周 2 次的肿瘤内注射 LipF(B)-p53 (总共 6 次)。未接受处理, 仅接受吉西他滨, 仅接受 LipF(B)-p53, 或接受与无 p53 的 pCMV 载体复合的 LipF(B) (LipF(B)-Vec) 的对照组动物到第 54 天由于肿瘤拖累而被安乐处死。相反, 接受 LipF(B)-p53 和吉西他滨组合的三组动物即使在处理结束后 12 天还显示出对其肿瘤显著的生长抑制。这在同时接受静脉内和肿瘤内注射的动物组中特别明显。因此, 再次使用其它的肿瘤模型时, 发现全身性递送的配体 - 脂质体 - 治疗分子结合化疗剂比目前所用的疗法明显更有效。

[0226] 实施例 21

[0227] 用配体 - 定向的, 脂质体 - 介导的反义寡核苷酸体外和体内化学致敏肿瘤细胞

[0228] 本实施例证实了本发明的全身性施用的配体 - 脂质体 - 治疗分子递送系统递送作为治疗分子的小寡核苷酸的能力。而且本实施例证实了全身性施用的配体 - 脂质体 - 递送的小寡核苷酸使所接触的肿瘤细胞对化疗剂敏感的能力。

[0229] 对各种肿瘤细胞类型最优化叶酸 - 脂质体 (LipF) 组合物:

[0230] 用针对 SCCHN 细胞系产生的配体 - 脂质体复合物并按上面所述开始, 开发了最优化用于将反义 HER-2 (AS-HER-2) 寡核苷酸递送给肿瘤细胞的其它配体 - 脂质体复合物。AS-HER-2 寡核苷酸是与靠近 HER-2 基因起始密码子的序列互补的 15 聚体 (Pirolo 等, BBRC230, 1996-201 (1997))。

[0231] 以寡核苷酸饱和脂质体:

[0232] 经过变化复合物中的阳离子和中性脂类产生多种新的叶酸 - 脂质体 (LipF) 组合物。在有些组合物中也包括辅助脂类。阳离子与中性脂类的比率也是可变的。使用 ^{32}P - 标记的 AS-HER-2 寡核苷酸, 我们测定了脂质体与寡核苷酸的比率得到了寡核苷酸与各种组合物的最佳结合。这些研究的例子在下面表中显示, 其中在 LipF 组合物 B 和 C 与脂质体 A

之间进行比较,脂质体 A 是针对 SCCHN 最优化的 LipF 组合物。

比率 脂质体:寡核苷酸	脂质体 A	脂质体 B	脂质体 C
1: 10	23%	51.6%	44.25%
1: 1	87.7%	77.9%	61.97%
5: 1	90%	90.7%	72.6%
10: 1	93%	98%	86.7%
25: 1	100%	100%	100%

[0234] 在这三种组合物之间寡核苷酸的结合有明显的区别。尽管如此,以 25 : 1 的脂质体 :寡核苷酸比率所有三种组合物均达到完全饱和。然而,以该比率明显有大量的毒性。从这些数据还明显地看到对于不同的脂质体组合物,最佳比率显著不同。

[0235] 用各种 LipF 组合物时 AS-HER-2 寡核苷酸被肿瘤细胞系吸收 :

[0236] 用 LipF 组合物和人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435, SCCHN 细胞系 JSQ-3, 前列腺肿瘤细胞系 DU145 和胰腺肿瘤细胞系 PANC1 进行转染试验以测定各 LipF 组合物的转染效率。所用的是四种组合物 (命名为 B-E), 发现它们具有最大的寡核苷酸结合效力。在这些研究中开始使用的脂质体 :寡核苷酸的 2 个摩尔比率是 10 : 1 和 25 : 1, 发现它们 (见上文) 具有最高的寡核苷酸结合水平。然而发现 25 : 1 的比率对细胞具有毒性。因此使用 10 : 1 (脂质体 :寡核苷酸) 的比率进行剩余的实验。按前面对 LipF (A) -p53 及 SCCHN 所述使用 ^{32}P - 标记的 AS-HER-2 进行转染。然而,在 37°C 培养 20 小时后,去掉培养基并用 PBS 洗涤细胞 5 次。合并培养基和洗涤液并确定未掺入的标记量。经过比较细胞内的 ^{32}P 水平与未掺入的寡核苷酸测定与 ^{32}P - 标记的 AS-HER-2 寡核苷酸相联系的细胞量。在这些研究中, LipF (A) 是最初针对 SCCHN 最优化的组合物。如下表所示, LipF 组合物 B 在 MDA-MB-435 乳腺癌细胞中产生最高水平的转染效率,而 LipF 组合物 E 对 DU145 和 PANC I 均更好。因此, LipF 组合物 B [LipF (B)] 与 MDA-MB-435 用于下面的研究,如下所述。

细胞系	脂质体 A	脂质体 B	脂质体 C	脂质体 D	脂质体 E
MDA-MB-435	112	280	108	242	137
JSQ-3	184	100	8	125	205
DU145	93	158	130	403	705
PANC1	330	490	407	398	731

[0238] 寡核苷酸浓度是 2 μM

[0239] 脂质体 :寡核苷酸的摩尔比率是 10 : 1

[0240] LipF (B) -AS-HER-2 在体外和在血液中的稳定性 :

[0241] 由于这些研究的一个目的是开发用于反义寡核苷酸的全身性递送系统,因此测定 LipF (B) -AS-HER-2 复合物在血液中的稳定性是重要的。因此,将复合物加入 50% 的血清中并在 37°C 下培养。在从 0-24 小时的不同时间,取出样品,用 ^{32}P 标记寡核苷酸并以 PAGE 测定降解百分数。当与 LipF (B) 复合 24 小时时发现 AS-HER-2 寡核苷酸没有降解。相反,在

6 小时超过 50% 的游离寡核苷酸降解, 到 24 小时为止几乎全部降解。

[0242] 还在小鼠血液(一种更类似于体内状况的环境)中检查了稳定性。即使在 24 小时后, 超过 75% 的复合的寡核苷酸保持完整。因此, 可得出的结论是叶酸定向的递送系统在循环中保护寡核苷酸足够长的时间, 使其有效到达肿瘤细胞。

[0243] 用 LipF-AS-HER-2 体外化学致敏癌细胞:

[0244] 评价了 LipF(B)-递送的 AS-HER-2 使 MDA-MB-435, JSQ-3, DU145 和 U87(人成胶质瘤)细胞对化疗剂致敏的能力。使用 XTT 细胞增生试验测定敏感性。用 LipF(B)-AS-HER-2 转染显著增加 docetaxel 对 435 细胞的杀伤效力。比较用 LipF(B) 介导的 AS-HER-2 处理的细胞与用 LipF(B) 对照寡核苷酸(SC)处理的细胞表明 435 细胞对 taxotere 敏感性增加超过 30 倍。相反, 使用商品 Lipofectin(生命技术公司)用 AS-HER-2 转染后仅增加 2.5 倍水平的敏感性。用 LipF(E)-AS-HER-2 处理 JSQ-3 细胞增加几乎 25 倍的 docetaxel 效力。而且, 用与运铁蛋白-定向的脂质体 A(LipT(A)) 复合的 AS-HER-2 处理后顺式铂氨(CDDP)对 JSQ-3 细胞的效力也增加超过 17 倍。用 LipF(E)-AS-HER-2 处理后可见 DU145 细胞对 docetaxel 的敏感性增加 2 倍。用 LipF(B)-AS-HER-2 处理后人成胶质瘤细胞系 U87 显示出对药物吉西他滨的化学敏感性增加超过 8 倍。

[0245] 为了进一步说明将定向的脂质体复合物用作反义基因治疗递送的载体, 检查了携带反-RAS 寡核苷酸(AS-RAS, 与靠近该基因起始密码子的序列互补的 11 聚体序列)的 LipF(B) 使 PANC I 胰腺癌细胞对 docetaxel 敏感的能力。这里经过用 LipF(B)-AS-RAS 处理也诱导了药物敏感性增加超过 70 倍。数据显示 LipF(B)-介导的反义基因治疗可导致化疗剂在以前有抗性的人癌症细胞中的效力显著增强。

[0246] 体内研究

[0247] 经过评价肿瘤消退及肿瘤生长抑制检查了 LipF(B)-AS-HER-2 定向并使以前存在的 MDA-MB-435 异种移植肿瘤对体内化疗剂 docetaxel 敏感的能力。携带大约 70mm³ 的 MDA-MB-435 乳腺脂肪垫异种移植肿瘤的雌性无胸腺(Ncr nu/nu)小鼠经过尾静脉用 LipF(B)-AS-HER-2(以大约 0.6mM 的寡核苷酸)每隔一天静脉内注射, 总共注射 11 次。给动物也施用总共 11 次静脉内剂量的 docetaxel(大约 20mg/kg/隔日剂量)。在接受 LipF(B)-AS-HER-2 与 docetaxel 组合的动物中明显出现显著的肿瘤生长抑制。相反在仅接受 AS-HER-2 的那些小鼠中明显仅有微量的生长抑制。而且, 尽管有一些 docetaxel 效力, 但在停止治疗后这些肿瘤开始迅速增大。因此, 全身性递送的反义寡核苷酸, 在本例中是 AS-HER-2, 的定向脂质体递送能明显地使这些肿瘤对化疗剂敏感, 几乎在结束治疗后 3 周仍然强烈地抑制肿瘤生长。

[0248] 实施例 22

[0249] 以运铁蛋白-脂质体的腺病毒定向

[0250] 在开发基因治疗新方案中提高基因转移的效率和特异性仍然是重要的目的。腺病毒(Ad)是高效载体, 但它们因缺乏肿瘤定向特异性和具有极大的免疫原性而受限制。已报道阳离子脂质体可与腺病毒形成非共价复合物并增强基因转移效率。但阳离子脂质体本身仍缺乏定向特异性。

[0251] 在本实施例中我们证实了本发明的配体-脂质体载体也可与腺病毒颗粒形成复合物, 从而增强其基因转移效率且其具有更显著的定向特异性。而且, 当治疗分子是完整的

腺病毒颗粒时,使用本发明的配体-脂质体-治疗分子递送系统允许有效的肿瘤细胞定向和全身性施用治疗性腺病毒用于基因治疗,得到另一基因治疗的新方案。

[0252] 制备运铁蛋白-脂质体-腺病毒复合物

[0253] 含有在 CMV 启动子控制下的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因 LacZ 的复制-缺陷型腺病毒血清型 5, Ad5LacZ, 用于研究。在研究中使用在 PBS (pH7.4) 加 3% 蔗糖中的 1.1×10^{12} 个颗粒 (pt)/ml, 或 5.5×10^9 噬斑形成单位 (pfu)/ml 的 Ad5LacZ。完整的运铁蛋白 (Tf, 铁饱和的, Sigma) 以 4-5mg/ml 溶于水中并用 0.22mm 滤膜过滤。Tf 首先在 10mM HEPES 缓冲液 (pH7.4) 中稀释至 0.5mg/ml, 随后将不同量的 Tf 加入在微量离心管中的 50 μ l HEPES 缓冲液中并充分混合。在室温下培养 5-10 分钟后, 将 0.1nmol/ μ l 的 Lip (A) (DOTAP : DOPE 为 1 : 1 的摩尔比) 加入管中使脂类/Tf 比率范围为 1nmol/l-10ug。溶液充分混合并在室温下培养 5-10 分钟。向各管中加入 1×10^6 - 1×10^7 pt 腺病毒使阳离子脂类/腺病毒比率范围为 1×10^3 - 1×10^7 脂类分子/pt。在室温下培养样品 10-15 分钟, 然后向各样品中加入 150 μ l 无血清的 EMEM。

[0254] 体外腺病毒转导

[0255] 在 24 孔平板中涂板 5×10^4 JSQ-3 细胞/孔。24 小时后, 用无血清的 EMEM 洗涤细胞一次, 向各孔中加入 0.3ml 无血清的 EMEM 或抗生素。在 200 μ l EMEM 中的 Ad5LacZ 或以不同比率的 Tf-Ad5LacZ 复合物以一式两份加入各孔中。病毒与细胞的比率范围为 20-2000 病毒颗粒/细胞 (pt/细胞)。在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 中伴随着偶尔摇动培养 4 小时后, 加入含 20% 血清的 0.5ml EMEM。培养 2 天后, 用 PBS 洗涤细胞一次, 在 1x 报道裂解缓冲液 (Promega) 中裂解。离心细胞裂解产物并以一式两份转移到 96 孔平板上, 用 100 μ l 在含有 1mM MgCl₂ 和 450 μ M β -巯基乙醇的 20mM Tris (pH7.5) 中的 150 μ M 邻-硝基苯- β -半乳糖苷酶 37 $^{\circ}$ C 培养 30 分钟。经过加入 150 μ l/孔的 1M Na₂CO₃ 终止反应。在 ELISA 平板读数器上测定在 405nm 下的吸光率。纯化的 β -半乳糖苷酶 (Boehringer) 用于产生标准曲线。结果表示为每 mg 种蛋白的 β -半乳糖苷酶当量的微单位 (mU) 数。

[0256] 组织化学染色

[0257] 为了进行 LipT-Ad5LacZ 转导的组织化学研究, 用上述转染溶液转染在 24 孔平板中 60% 铺满的细胞 5 小时。在培养两天后, 固定细胞并用 X-gal 染色。转染效率计算为染成蓝色的细胞百分数。

[0258] 以 500pt/细胞或 2.5MOI (感染复数, 或 pfu/细胞) 的病毒剂量时, 单独的 Ad5LacZ 表达 10mU/ μ g 蛋白的报道基因产物 β -半乳糖苷酶。与病毒复合的运铁蛋白-脂质体, LipT-Ad5LacZ, 以 1×10^4 阳离子脂类分子/pt 的比率产生 23.5mU/ μ g 蛋白的报道基因表达。LipT-Ad5LacZ 以 1×10^5 脂类分子/pt 的比率产生 30.7mU/ μ g 的表达, 而 LipT-Ad5LacZ 以 1×10^6 分子/pt 的比率产生 30.8mU/ μ g 的表达。这分别代表比单独的 Ad5LacZ 在基因转导中增加 2.4, 3.07 和 3.08-倍。表现达到 1×10^5 脂类分子/pt 为饱和。

[0259] 以 1000pt/细胞 (或 5MOI) 的剂量时, 以 10^4 脂类/pt 的 LipT-Ad5LacZ 证实报道基因表达增加 2.6 倍, 而以 10^5 脂类/pt 的 LipT-Ad5LacZ 导致增加 2.8 倍, 以 10^6 脂类/pt 的 LipT-Ad5LacZ 比单独的 Ad5LacZ 使报道基因表达的水平高 3.8 倍。无运铁蛋白的脂质体复合物仅产生有限的增强。因此, LipT-Ad5LacZ 复合物的最佳比率似乎是大约 10-1000 阳离子脂类分子/Tf 分子, 和大约 10^4 - 10^7 阳离子脂类/pt, 优选大约 15-50 阳离子脂类分

子/Tf分子和大约 10^6 阳离子脂类/pt。如果脂类/pt比率过高,会出现沉淀。

[0260] 组织化学染色表明单独的Ad5LacZ产生20-30%的转导效率,而与腺病毒复合的运铁蛋白-脂质体LipT-Ad5LacZ以 10^6 脂类/pt产生70-90%的效率。

[0261] 试验了其它脂质体组合物复合腺病毒的能力。LipT(B)(DDAB/DOPE,1:1的摩尔比率)和LipT(D)(DOTAP/Chol,1:1的摩尔比率)显示腺病毒基因转导进入前列腺癌细胞系DU145增强。

[0262] 本发明的配体-脂质体递送系统也与含有1.7kb的人wtp53基因的复制-缺陷型腺病毒血清型5复合(LipT(D)-Adp53)。将LipT(D)-Adp53复合物静脉内注射进携带DU145前列腺癌异种移植肿瘤的裸鼠中。对肿瘤的Western分析(注射后72小时进行)表明存在额外的带,代表在肿瘤组织中存在的外源性人wtp53蛋白。在处理的动物的正常组织(例如,肝,肺或脾)中明显没有额外的外源性wtp53序列。这些数据表明本发明的配体-脂质体-治疗分子递送系统能在全身性用药后将腺病毒作为“治疗分子”特异性地递送给肿瘤组织。

[0263] 上述结果证实了运铁蛋白-阳离子脂质体可复合腺病毒并显著增强腺病毒基因转导。施用配体-脂质体-腺病毒复合物代表了人类基因治疗的一种新方法。

[0264] 实施例23

[0265] 运铁蛋白-脂质体-定向的逆转录病毒基因转导

[0266] 逆转录病毒载体是临床试验中最广泛使用的一种基因治疗载体。与腺病毒载体一样,逆转录病毒载体受到肿瘤特异性较差和明显的免疫原性的限制。在本实施例中我们证实了,与腺病毒一样,本发明的配体-脂质体可与逆转录病毒颗粒形成复合物从而增强其基因转移效力,且更显著的是增强其定向特异性。而且,当治疗分子是完整的逆转录病毒颗粒时,使用本发明的配体-脂质体-治疗分子递送系统允许有效地肿瘤细胞定向和全身性施用逆转录病毒载体用于基因治疗。

[0267] 含有大肠杆菌LacZ基因的复制-缺陷型逆转录病毒,RvLacZ,以 1×10^{10} 个颗粒(pt)/ml,含有 3×10^7 转化单位(TU)/ml用于本研究。完整的运铁蛋白(Tf,铁饱和的,Sigma)以4-5mg/ml溶于水中并用0.22mm滤膜过滤。与上面实施例21中所述的LipT-Ad5LacZ相似地制备LipT-RvLacZ复合物。简单地说,Tf首先在10mM HEPES缓冲液(pH7.4)中稀释至0.5mg/ml。将不同量的Tf加入在微量离心管中的50 μ l HEPES缓冲液中并充分混合。在室温下培养5-10分钟后,加入阳离子脂质体Lip(A)(DOTAP:DOPE为1:1的摩尔比)。溶液充分混合并在室温下培养5-10分钟。向各管中加入 1×10^6 - 1×10^7 pt逆转录病毒使阳离子脂类/腺病毒比率范围为 1×10^3 - 1×10^7 脂类分子/pt。在室温下培养样品10-15分钟,然后向各样品中加入150 μ l无血清的EMEM。按实施例21所述进行体外逆转录病毒转导。病毒与细胞的比率范围为100-2000病毒颗粒/细胞(pt/细胞)。

[0268] 以1000pt/细胞或3MOI(感染复数,或TU/细胞)的剂量时,以 10^5 脂类分子/pt的LipT-RvLacZ导致报道基因表达增加1.5倍。以 10^6 脂类/pt的LipT-RvLacZ与单独的RvLacZ相比导致表达水平增加2.3倍。无运铁蛋白的脂质体复合物仅产生有限的增强。因此,LipT-RvLacZ复合物的最佳比率似乎是大约10-1000阳离子脂类分子/Tf分子,和大约 10^4 - 10^7 阳离子脂类/pt,优选大约15-50阳离子脂类分子/Tf分子和大约 10^6 阳离子脂类/pt。如果脂类/pt比率过高,会出现沉淀。

[0269] 组织化学染色表明单独的 RvLacZ 产生 20-30% 的转导效率,而与逆转录病毒复合的运铁蛋白-脂质体 LipT-RvLacZ(10^6 脂类 /pt) 产生 60-80% 的效率。

[0270] 上述结果证实了运铁蛋白-阳离子脂质体可复合逆转录病毒并显著增强逆转录病毒基因转导。

[0271] 实施例 24

[0272] 配体-脂质体-DNA 复合物的电子显微镜分析

[0273] 可在电子显微镜 (EM),如负染的透射电镜 (TEM) 或扫描电镜 (SEM) 下观察脂质体。EM 可以揭示脂质体复合物的结构和大小分布。EM 也可用于脂质体制品的质量控制。

[0274] 在本实施例中,我们证实了一种新的,独特的运铁蛋白-脂质体结构,它是在本申请中描述的用本发明的配体-脂质体-治疗分子所观察到的稳定性和效力的原因。

[0275] 我们在负染的透色电镜下观察了配体-阳离子脂质体。带有 Formvar 和碳覆盖的铜网 (电子显微镜科学, Fort Washington, PA) 用于本研究。按实施例 2 和 17 所述制备配体-脂质体-pCMVp53 复合物。将 1 滴脂质体复合物放在网上。5 分钟后,用滤纸在铜网的边缘经毛细作用去掉多余的液体。然后向网上加入 1 滴 4% 的乙酸铀用于负染。5 分钟后也按上述方法去掉多余的液体。在放入 TEM 的样品箱之前铜网在室温下干燥 15 分钟。按照厂商说明书在本研究中使用 JOEL 1200EX 或 JOEL 100S。以 10-50k,60 千伏的放大倍数拍照。在铜网上制备脂质体样品,新鲜染色并在 1 小时内观察。

[0276] 许多文献显示了阳离子脂质体-DNA 复合物具有不同的结构和从 100nm-1000nm 范围的大小。在我们的研究中我们意外地观察到根据本发明制备的配体-脂质体-DNA 复合物具有更小的大小和更均匀的大小分布。具体来说, LipT(A)-p53 复合物具有直径大约 30-100nm 的大小范围,优选 35-65nm (平均大约 50nm)。由于阳离子脂质体 Lip(A) 本身具有 15-40nm,平均 25nm 的大小,当运铁蛋白与 Lip(A) 复合时,大小不发生明显的改变。然而,观察到较厚的脂质体壁或膜,表明运铁蛋白复合到脂质体膜上。从放大的照片我们观察到在 LipT(A)-DNA 复合物核心有一个不规则的或无中心的洋葱状结构。还观察到该结构形成的一个中间阶段,例如,在 LipT(A) 与 DNA 链缩合中的一个中间步骤。当混合 LipT(A) 与 DNA 的保温时间从 15 分钟缩短到 5 分钟时,观察到更多的这一中间阶段。

[0277] 根据 TEM 观察,似乎 LipT(A)-DNA 复合物的特有结构在体外和特别是在体内观察到的高基因转染效率中发挥重要作用。在形成 LipT(A)-DNA 复合物期间经过下列步骤可形成无中心的洋葱状核心结构:

[0278] 步骤 1,一些 (4-8 或更多) Tf-脂质体与各 DNA 分子接触,通过静电相互作用附着到 DNA 链上。

[0279] 步骤 2,各附着的 Tf-脂质体包裹或缩合 DNA 链以形成围绕 DNA 链的分离的层状结构。

[0280] 步骤 3,层状结构浓缩以形成一个核心层结构。该实心的核心结构大小比 4-8 个 Tf-脂质体之和更小。

[0281] 步骤 4,在最后缩合期间,可能出现从层状时期到颠倒的六方型时期的过渡时期,产生不规则的或无中心的洋葱状结构。

[0282] 据认为颠倒的六方型 (H_{II}) 时期在转染时比层状 (L_{II}) 时期明显更有效且可能与 DNA 释放和递送有关 (Koltover, I. 科学 281:78,1998)。使用冷冻断裂电镜法,Stemberg,

B. (生物化学和生物物理学学报 1998 ;1375 :23-35) 描述了一种在 DDAB/Chol 阳离子脂质体 -DNA 复合物中的“图钉”结构具有最高的体内转染活性。他相信这种体内高活性与较小 (100-300nm) 的稳定的复合物相关而体外高活性与六方型脂类沉淀相联系。在该文献中没有得到配体 - 阳离子脂质体 -DNA 复合物的超微结构分析。我们相信在运铁蛋白或其它配体存在的条件下容易发生 L_{IT} 向 H_{IT} 的过渡且形成的不规则的或无中心的洋葱状核心结构被配体所稳定。至于层状向颠倒的六方型过渡的机制,除了 Koltover 所建议的外,配体可能起重要作用。附着在脂质体表面的 Tf 或连接到脂质体表面的叶酸可帮助或加速这种过渡,产生更高效率的无中心的洋葱状核心结构。

[0283] 在本文公开的制备条件下,95%以上的 LipT(A)-DNA 复合物具有不规则的或无中心的洋葱状核心结构。如果不需要这种过渡,在步聚 3-4 中浓缩的层状结构优选形成规则的或有中心的洋葱状核心结构是稳定的。这种 L_{IT} 向 H_{IT} 的过渡和 Tf- 稳定化可能是这种极高的体内基因转染效率的原因。

[0284] 由于复合是一个四步过程,所以当制备复合物时,在各混合步骤之间保温足够的时间,使用经常的摇动以允许无中心的洋葱状核心结构完全形成是重要的。对于本文公开的制备程序,每次混合后保温时间应是大约 5-15 分钟且与 DNA 混合后是大约 10-30 分钟,优选大约 15-30 分钟。

[0285] 根据本发明的脂质体的另一专有特性是其均匀分布的较小形态(直径小于大约 100nm,优选小于大约 75nm,更优选大约 35-65nm(平均 50nm)直径)。为了到达体内靶肿瘤,脂质体必须首先对血清有抗性,然后才能通过血管(毛细血管)壁。本发明的复合物对血清降解表现出高度抗性。肿瘤中毛细血管的可通透大小通常是 50-75nm;因此,该复合物可通过毛细血管壁到达靶。

[0286] LipF(B)-DNA 复合物的 TEM 结构与 LipT(A)-DNA 相似,且该复合物的尺寸范围是 30-100nm 的直径,优选 35-75nm(平均 50nm)。还观察到独特的不规则或无中心的洋葱状核心结构。在相似的 4- 步过程中可发生层状向颠倒的六方型的相变,它是极高的体内基因转染效率的原因。

[0287] 实施例 25

[0288] 配体 - 阳离子脂质体的稳定性

[0289] 对于脂质体药物而言稳定性是一个重要问题。脂质体溶液在配制后应稳定更长的时间以允许装运和储存而基本上不损失其生物学 / 药理学活性,以使用作治疗剂。根据本发明的配体 - 脂质体 - 治疗分子复合物的未来临床应用,我们检查了配体 - 脂质体和配体 - 脂质体 -DNA 复合物的稳定性。

[0290] Lip(A) 在水中制备并在氮气中 4°C 下的黑暗中储存各种时间期限,多达 6 个月。在试验的第一天,储存的脂质体,以及新制备的 Lip(A) 用于制备 LipT(A)-pCMVb 复合物。然后使用实施例 5 所述的转染试验将该复合物用于转染 JSQ-3 细胞。在储存了不同时间的 Lip(A) 制品和新鲜制备的 Lip(A) 之间,没有观察到转基因表达水平有明显的区别。在独立的实验中,Lip(A) 制品储存 12 个月仍然保留 > 90% 的转染活性。单独制备各运铁蛋白溶液(以 5mg/ml 溶于水中)和溶于 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0 中的 pCMVb 质粒 DNA (0.5-1.0 μ g/ml)。发现叶酸 - 脂质体复合物具有相同程度的稳定性。

[0291] 脂质体, Tf, 和质粒 DNA 在储存中分别都是稳定的。但当它们混合起来形成

LipT-DNA 复合物时,复合物在更长的时间期限内不稳定。例如, LipT-DNA 复合物仅稳定几天。在第三天仅保留 50%的转染活性。对于 LipF-DNA, 24 小时后仅保留 60%的转染活性, 在制备 3 天后基本上全部丧失活性。

[0292] 根据这些观察,似乎本发明的配体 - 脂质体 - 治疗分子复合物的组分以试剂盒形式提供具有优势。该组分可在使用的当天一次混合起来,其中首先将 Tf 加入脂质体中,接着加入 DNA 溶液(每次混合之间保温 10-15 分钟),然后加葡萄糖至 5%。复合物应在其制备后尽快施用,优选在 24 小时内施用。

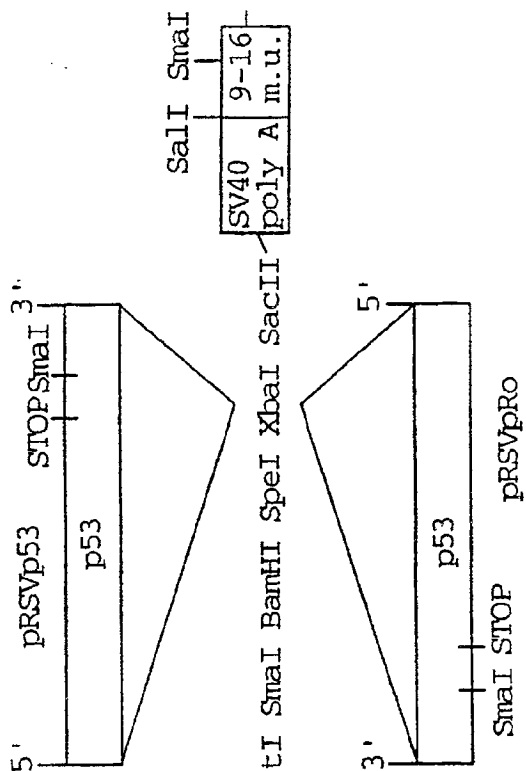


图 1A

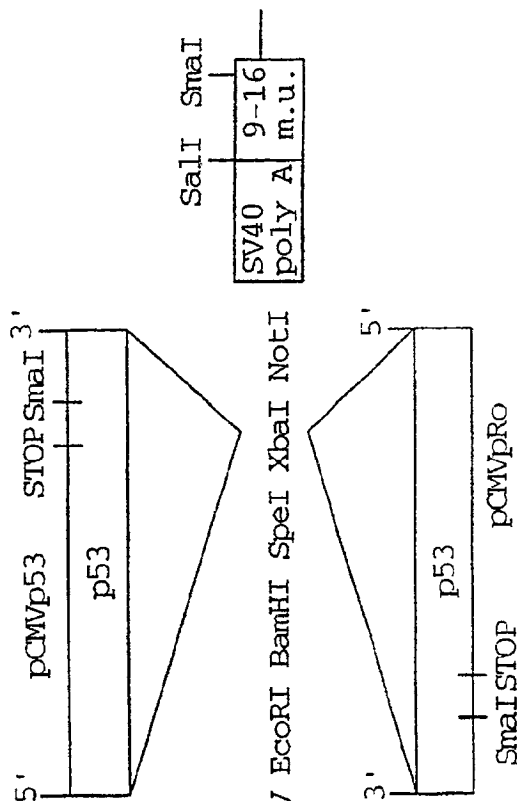


图 1B