

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380107620.5

[51] Int. Cl.

A01N 43/04 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 39/23 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 3 月 29 日

[11] 公开号 CN 1753618A

[22] 申请日 2003.12.24

[21] 申请号 200380107620.5

[30] 优先权

[32] 2002.12.26 [33] US [31] 10/327,869

[86] 国际申请 PCT/US2003/041379 2003.12.24

[87] 国际公布 WO2004/060303 英 2004.7.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.27

[71] 申请人 细胞基因系统有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 纳加拉贾·拉梅什 大卫·费雷

巴赫拉姆·梅马尔扎德 俞德超

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 15 页 说明书 49 页 附图 64 页

[54] 发明名称

增强膀胱上皮中病毒转导的方法和试剂

[57] 摘要

本发明公开了在膀胱上皮中增强重组病毒转导的试剂和方法。最初的方法包括将膀胱腔表面与含有转导增强试剂和肿瘤分解病毒的组合物接触。可选择地,所述膀胱腔表面可首先与含有转导增强试剂的预处理组合物接触,随后与含有肿瘤分解病毒的组合物接触。本发明还公开了含有转导增强试剂和肿瘤分解病毒的膀胱处理组合物。

1. 治疗膀胱癌的方法，其包括：

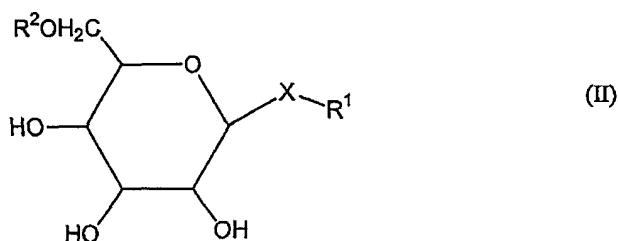
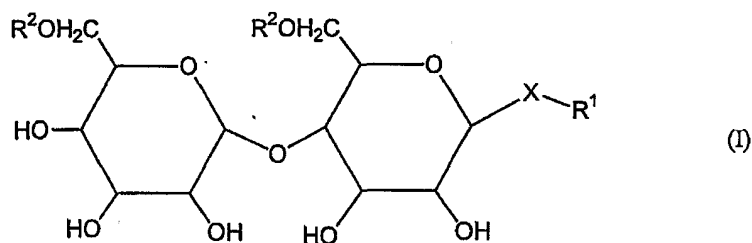
将所述的膀胱腔表面与含有转导增强试剂的预处理组合物接触；及
 5 随后将所述的膀胱腔表面与含有肿瘤分解病毒的组合物接触；
 其中所述的转导增强试剂为具有亲脂性取代基的单糖、二糖或多糖。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述转导增强试剂为具有亲脂性取代基的二糖。

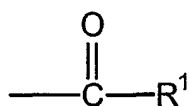
10

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述转导增强试剂为具有亲脂性取代基的二糖且其中所述二糖选自蔗糖、乳糖、麦芽糖、异麦芽糖、海藻糖和纤维二糖。

15 4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述转导增强试剂具有以下通式(I)或以下通式(II)：



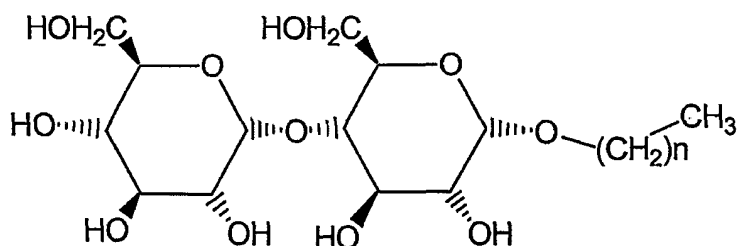
20 其中 X 为硫或氧原子，每一 R² 独立地为氢或是由以下代表的部分：



且 R^1 代表烷基或烯基。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述转导增强试剂具有化学式：

5



其中所述 n 正整数。

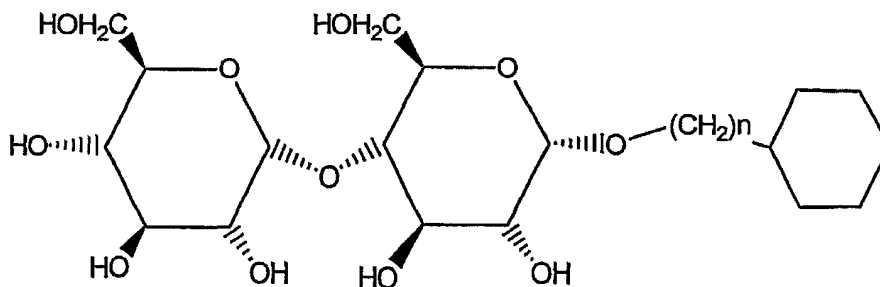
10

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中 n 为 11 或更大。

7. 如权利要求 5 所述的方法，其中 n 为 11。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其中所述预处理组合物含有约 0.02-
15 约 0.5 %重量的所述转导增强试剂。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述转导增强试剂具有化学式：



其中所述 n 正整数。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中 n 为 6 或更大。

5

11. 如权利要求 9 所述的方法，其中 n 为 6。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述预处理组合物含有约 0.1 % 重量的所述转导增强试剂。

10

13. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒为肿瘤分解腺病毒。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒为 CG8840。

15

15. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒组合物进一步包括化疗试剂。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其中所述化疗试剂为紫杉萜。

20

17. 如权利要求 1 所述的方法，其中将所述的膀胱腔表面与含有肿瘤分解病毒的组合物接触包括通过灌輸将约 50ml 至约 500ml 的所述肿瘤分解病毒组合物传输到所述的膀胱。

25

18. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒组合物包括约 1×10^{11} 至约 1×10^{14} 病毒颗粒。

19. 如权利要求 1 所述的方法，其中将所述的膀胱腔表面与预处理组合物接触包括通过灌輸将预处理组合物传输到所述的膀胱。

30

20. 如权利要求 1 所述的方法, 进一步包括在与所述预处理组合物接触后及在与所述肿瘤分解病毒组合物接触前洗涤所述的膀胱腔表面。

21. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述预处理组合物与所述膀胱腔
5 表面接触约 5 分钟。

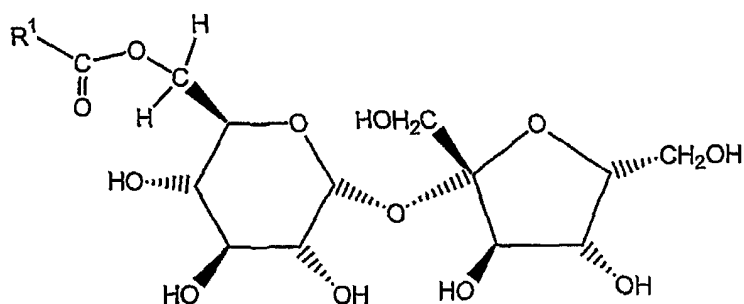
22. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述预处理组合物进一步包括氧化剂。

10 23. 如权利要求 22 所述的方法, 其中所述氧化剂选自次氯酸、过氧化氢和过氧乙酸。

24. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述亲脂性取代基包括烷基。

15 25. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述亲脂性取代基为链烷酸残基。

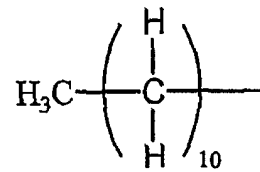
26. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述转导增强试剂具有化学式:



20 其中 R¹ 代表烷基或烯基。

27. 如权利要求 26 所述的方法, 其中所述 R¹ 由以下代表:

25



。

28. 治疗膀胱癌的方法，包括：

将所述的膀胱腔表面与预处理组合物接触，所述预处理组合物包括
5 约 0.01%至约 0.2%重量的羟氯生钠；及
随后将所述的膀胱腔表面与含有肿瘤分解病毒的组合物接触。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述预处理组合物包括约 0.01%
至约 0.1%重量的羟氯生钠。

10

30. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒为肿瘤分解
腺病毒。

31. 如权利要求 30 所述的方法，其中所述肿瘤分解腺病毒为
15 CG8840。

32. 如权利要求 30 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒组合物进一
步包括化疗试剂。

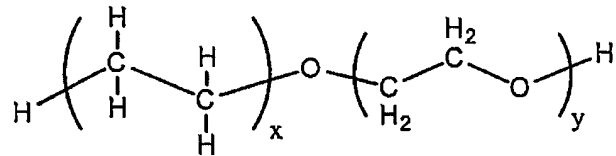
20 33. 如权利要求 32 所述的方法，其中所述化疗试剂为紫杉萜。

34. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒组合物包括
约 1×10^{11} 至约 1×10^{14} 病毒颗粒。

25 35. 如权利要求 28 所述的方法，进一步包括在与所述预处理组合物
接触后及与所述肿瘤分解病毒组合物接触前洗涤所述的膀胱腔表面。

36. 治疗膀胱癌的方法，包括：

将所述的膀胱腔表面与预处理组合物接触，所述预处理组合物包括具有以下化学式代表的结构的转导增强试剂：



5

其中 x 和 y 为正整数；及

将所述的膀胱腔表面与含有肿瘤分解病毒的组合物接触。

10 37. 如权利要求 36 所述的方法，其中 x 为 6 及 y 为 8-10。

38. 如权利要求 37 所述的方法，其中所述预处理组合物含有约 0.02 wt.%至约 0.5 wt.%的转导增强试剂。

15 39. 如权利要求 36 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒为肿瘤分解腺病毒。

40. 如权利要求 39 所述的方法，其中所述肿瘤分解腺病毒为 CG8840。

20

41. 如权利要求 39 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒进一步包括化疗试剂。

42. 如权利要求 41 所述的方法，其中所述化疗试剂为紫杉萜。

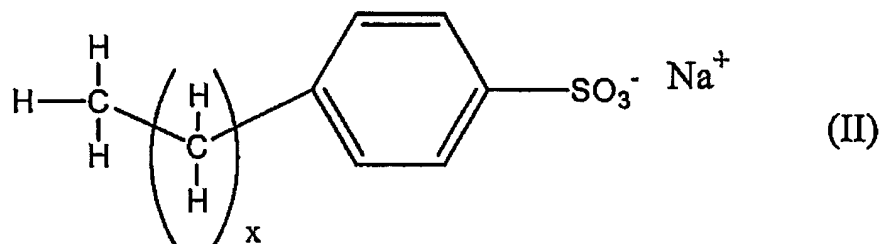
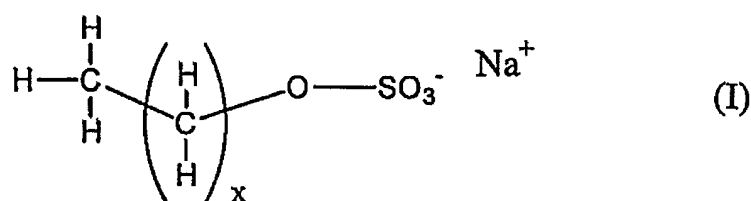
25

43. 如权利要求 36 所述的方法，其中所述预处理组合物进一步包括氧化剂。

44. 如权利要求 43 所述的方法, 其中所述氧化剂选自次氯酸、过氧化氢和过氧乙酸。

45. 治疗膀胱癌的方法, 其包括:

- 5 将所述的膀胱腔表面与预处理组合物接触, 所述预处理组合物包括具有由以下通式(I)或以下通式(II)代表的结构的转导增强试剂:



10

其中 x 为正整数; 及

其后将所述的膀胱腔表面与含有肿瘤分解病毒的组合物接触。

46. 如权利要求 45 所述的方法, 其中 x 为 11。

15

47. 如权利要求 46 所述的方法, 其中所述转导增强试剂具有由通式(I)代表的结构。

48. 如权利要求 47 所述的组合物, 其中所述预处理组合物包括约

20 0.1wt. %所述转导增强试剂。

49. 如权利要求 46 所述的方法, 其中所述转导增强试剂具有由通式

(II)所述代表的结构。

50. 如权利要求 49 所述的方法，其中所述预处理组合物含有约 0.2 wt.%的所述转导增强试剂。

5

51. 如权利要求 45 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒为肿瘤分解腺病毒。

52. 如权利要求 51 所述的方法，其中所述肿瘤分解腺病毒为
10 CG8840。

53. 如权利要求 51 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒进一步包括化疗试剂。

15 54. 如权利要求 53 所述的方法，其中所述化疗试剂为紫杉萜。

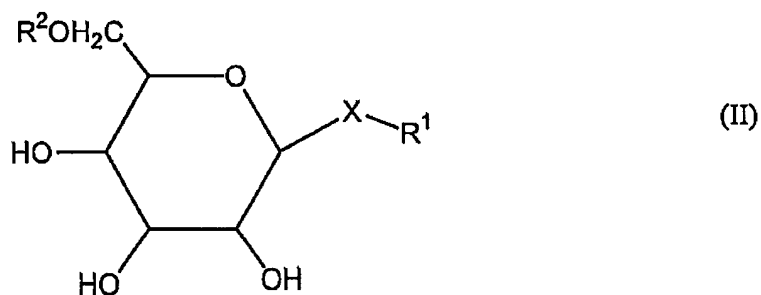
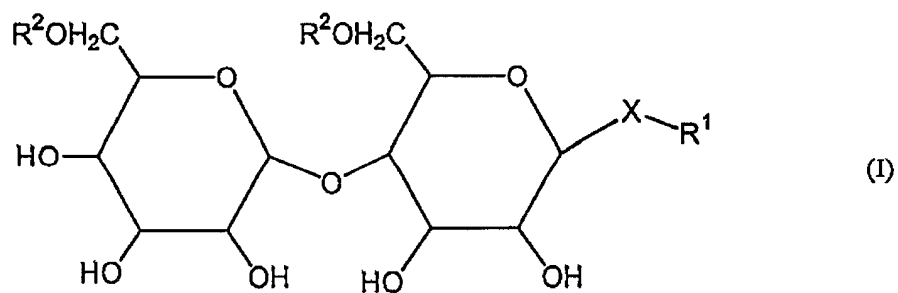
55. 如权利要求 45 所述的方法，其中所述预处理组合物进一步包括氧化剂。

20 56. 如权利要求 55 所述的方法，其中所述氧化剂选自次氯酸、过氧化氢和过氧乙酸。

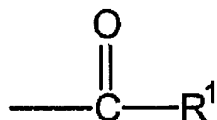
57. 组合物，其包括：转导增强试剂；及肿瘤分解病毒；
其中所述的转导增强试剂为具有亲脂性取代基的单糖、二糖或多糖。

25

58. 如权利要求 57 所述组合物，其中所述转导增强试剂为具有以下通式(I)或以下通式(II)的化合物：



其中 X 为硫或氧原子，每一 R^2 独立地为氢或为由以下代表的部分：



且 R^1 代表烷基或烯基。

59. 如权利要求 57 所述的组合物，其中所述肿瘤分解病毒为肿瘤分解腺病毒。

60. 如权利要求 57 所述的组合物，其中所述肿瘤分解腺病毒为 CG8840。

61. 如权利要求 57 所述的组合物，进一步包括化疗试剂。

62. 如权利要求 61 所述的组合物，其中所述化疗试剂为紫杉萜。

63. 治疗膀胱癌的方法，包括将所述的膀胱腔表面与权利要求 57 所述组合物接触。

64. 含有羟氯生钠和肿瘤分解病毒的组合物。

65. 如权利要求 64 所述的组合物，其中所述肿瘤分解病毒为肿瘤分解腺病毒。

66. 如权利要求 64 所述的组合物，其中所述肿瘤分解腺病毒为 CG8840。

67. 如权利要求 64 所述的组合物，进一步包括化疗试剂。

68. 如权利要求 67 所述的组合物，其中所述化疗试剂为紫杉萜。

69. 如权利要求 64 所述的组合物，其中所述组合物包括约 0.01% 至约 0.4% 重量的羟氯生钠。

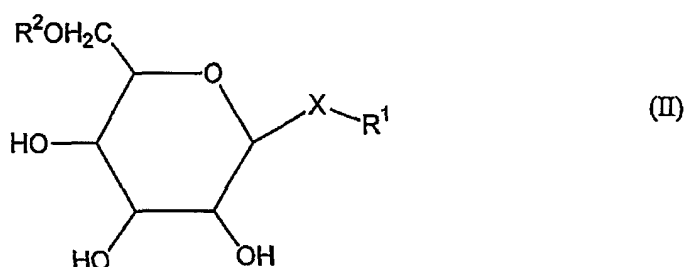
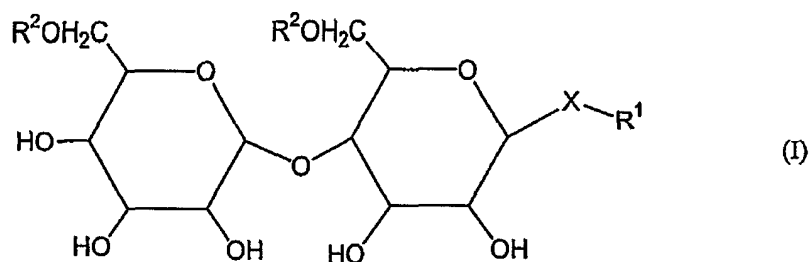
70. 如权利要求 64 所述的组合物，其中所述组合物包括约 0.01% 至约 0.2% 重量的羟氯生钠。

71. 治疗膀胱癌的方法，包括将所述的膀胱腔表面与权利要求 64 所述组合物接触。

72. 治疗膀胱癌的方法，包括：

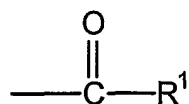
将所述的膀胱腔表面与含有转导增强试剂的预处理组合物接触；及
随后将所述的膀胱腔表面与含有肿瘤分解病毒的组合物接触；

其中所述转导增强试剂具有以下通式(I)或以下通式(II):



5

其中 X 为硫或氧原子, 每一 R^2 独立地为氢或由以下代表的部分:



10

且 R^1 代表烷基或烯基; 及

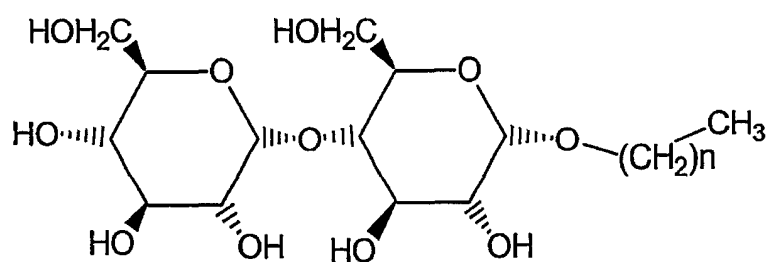
其中所述的膀胱腔表面与所述的预处理组合物接触至少 10 分钟。

73. 如权利要求 72 所述的方法, 其中 R^1 包括至少 12 个碳原子。

15

74. 如权利要求 72 所述的方法, 其中每一 R^2 为氢。

75. 如权利要求 72 所述的方法, 其中所述转导增强试剂具有以下化学式:



其中 n 为正整数。

76. 如权利要求 75 所述的方法，其中 n 为 11 或更大。

5

77. 如权利要求 75 所述的方法，其中 n 为 11。

78. 如权利要求 77 所述的方法，其中所述预处理组合物含有约 0.025-约 0.4%重量的所述转导增强试剂。

10

79. 如权利要求 72 所述的方法，其中所述膀胱腔表面与所述预处理组合物接触至少 20 分钟。

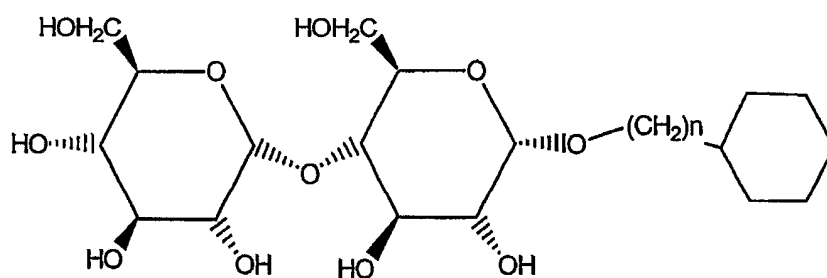
80. 如权利要求 79 所述的方法，其中所述膀胱腔表面与所述含有肿瘤分解病毒的组合物接触 15 分钟或更短的时间。

15

81. 如权利要求 79 所述的方法，其中所述膀胱腔表面与所述含有肿瘤分解病毒的组合物接触 10 分钟或更短的时间。

82. 如权利要求 72 所述的方法，其中所述转导增强试剂具有以下化学式：

20



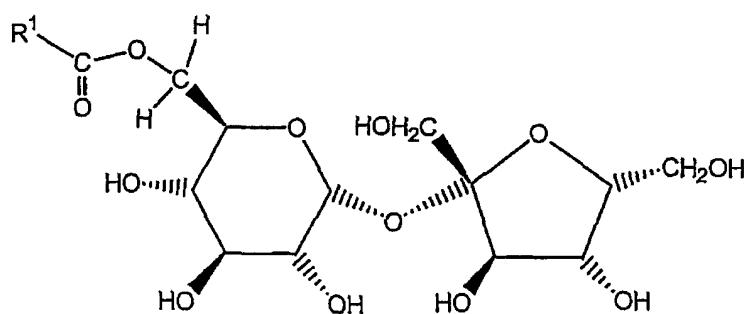
其中 n 为正整数。

83. 如权利要求 72 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒为肿瘤分解腺病毒。

84. 如权利要求 83 所述的方法，其中所述肿瘤分解腺病毒为 CG8840。

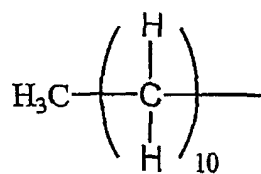
85. 如权利要求 72 所述的方法，其中所述肿瘤分解病毒组合物包括至少 4×10^{10} 病毒颗粒。

86. 如权利要求 72 所述的方法，其中所述转导增强试剂具有以下化学式：



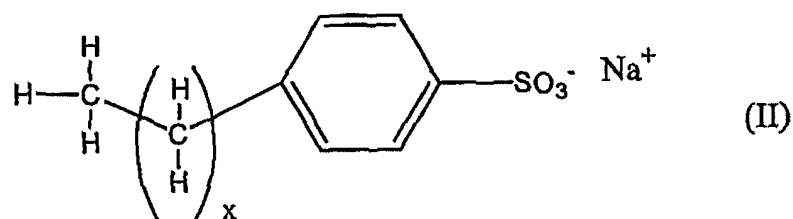
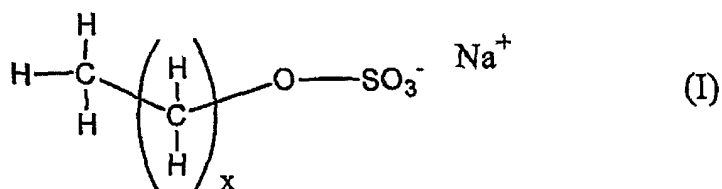
其中 R^1 代表烷基或烯基。

87. 如权利要求 86 所述的方法，其中 R^1 由以下代表：



88. 治疗膀胱癌的方法，其包括：

将所述的膀胱腔表面与含有转导增强试剂的预处理组合物接触，所述转导增强试剂具有以下通式(I)或以下通式(II)代表的结构：



其中 x 为正整数；及

随后将所述的膀胱腔表面与含有肿瘤分解病毒的组合物接触；

其中 x 至少为 11；及

其中所述肿瘤分解病毒组合物包括至少 4×10^{10} 病毒颗粒。

89. 如权利要求 88 所述的方法，其中 x 为 11。

90. 如权利要求 89 所述的方法，其中所述转导增强试剂具有由通式(I)代表的结构。

91. 如权利要求 90 所述的方法，其中所述预处理组合物包括约 0.1wt. %所述转导增强试剂。

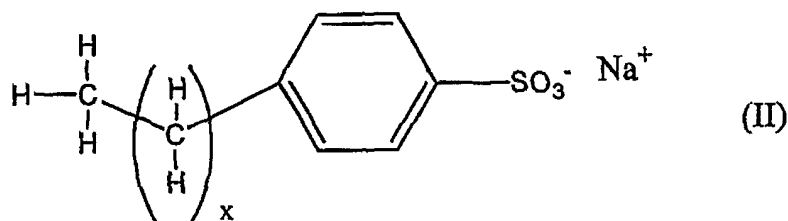
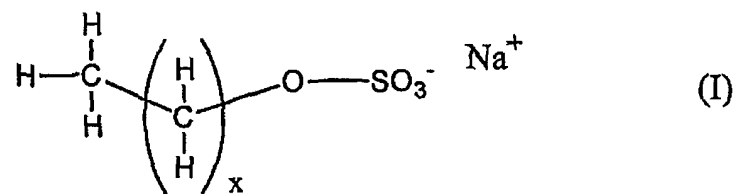
92. 如权利要求 88 所述的方法, 其中所述肿瘤分解病毒为肿瘤分解腺病毒。

5 93. 如权利要求 92 所述的方法, 其中所述肿瘤分解腺病毒为 CG8840。

94. 组合物, 其包括: 转导增强试剂; 及肿瘤分解病毒;

其中所述的转导增强试剂具有以下通式(I)或以下通式(II)代表的结

10 构:



15 其中 x 为正整数; 及其中所述转导增强试剂的浓度小于所述组合物的 0.025 wt.%。

95. 治疗膀胱癌的方法, 其包括将所述膀胱腔表面与如权利要求 94 所述组合物接触。

20

增强膀胱上皮中病毒转导的方法和试剂

5 本申请是 2002 年 12 月 26 日提交的序列号为 10/327,869 的美国专利申请的部分延续，本发明将该申请全部引用作为参考。

发明背景

发明领域

10 本发明通常涉及利用病毒治疗试剂对膀胱癌的治疗，特别涉及增强膀胱上皮的重组肿瘤分解病毒转导的试剂和方法。

技术背景

膀胱癌是常见的癌症，并每年有高于 50,000 例的新诊断病例。在大多数患者中，膀胱癌是局限于粘膜的表浅疾病。在现有的各种治疗模式中，经尿道的肿瘤切除术被认为是表浅膀胱癌处理中最有效的治疗方法。然而，内窥镜切除后 70%的这些表浅膀胱肿瘤会复发，并且在膀胱切除术后 2 年内 20%发展为威胁生命的侵袭性疾病。参见 Raghavan et al., “Biology and Management of Bladder Cancer”, N. Engl. J. Med., 322, 16, 1129-1138 (1990)。

基因治疗也已经用于膀胱癌的治疗。参见例如，Brewster, et al., Eur. Urol. 25, 177-182 (1984); Takahashi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5257-5261 (1991); 及 Rosenberg, J. Clin. Oncol., 10, 180-199 (1992)。

利用衍生自人膀胱组织的细胞株的离体研究表明，重组腺病毒感染后，可产生有效的转基因表达，参见 Bass, et al., Cancer Gene Therapy 2, 97-104 (1995)。在体试验也证明，在膀胱内给药后，啮齿动物的泌尿膀胱中有腺病毒转基因的表达，参见如上所引用的 Bass, et al.; Morris, et al., J. Urology, 152, 506-550 (1994)。野生型腺病毒的离体试验表明，病毒的附着与内在化并不被苯甲醇所影响，但却证明有增强的病毒粒子脱壳，参见 Blixt, et al., Arch. Virol., 129, 265-277 (1993)。

在体研究证明, 多种试剂(例如丙酮、DMSO、硫酸鱼精蛋白)可以破坏具有保护作用的“粘膜”层, 该粘膜层防止细菌、病毒和其它病原体对膀胱上皮的侵入, 参见例如, Monson, et al., J. Urol., 145, 842-845 (1992) 和 Parsons, et al., J. Urol., 143, 139-142 (1990)。已经公开了改变所述的膀胱表面从而增强基因转移的方法, 参见 Siemens, et al., “Evaluation of Gene Transfer Efficiency by Viral Vectors to Murine Bladder Epithelium”, J. of Urology, 165, 667-671 (2001)。

美国专利第 6,165,779 号公开了在缓冲液中组方的基因传输系统, 包括诸如乙醇或去污剂的传输增强试剂。所述的基因传输系统可以是诸如腺病毒载体的重组病毒载体。

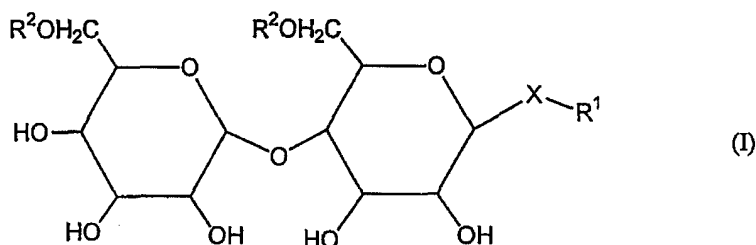
然而仍需要能够实现对膀胱上皮的直接、最佳的在体基因传输的改进基因治疗方法和试剂。

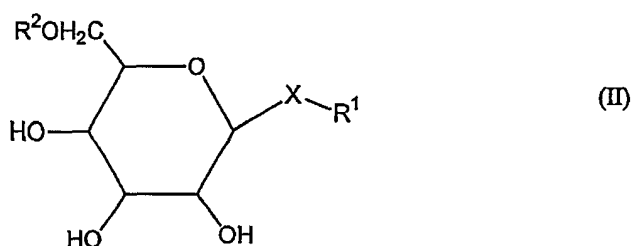
发明概述

根据第一方面, 本发明提供治疗膀胱癌的方法。根据本发明的这一方面, 所述的方法包括:

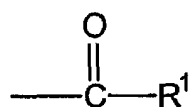
将所述的膀胱腔表面与含有转导增强试剂的预处理组合物接触; 及随后将所述的膀胱腔表面与含有肿瘤分解病毒(oncolytic virus)的组合物接触;

其中所述的转导增强试剂为具有亲脂性取代基的单糖、二糖或多糖。所述的转导增强试剂可具有以下通式(I)或以下通式(II):





其中 X 为硫或氧原子, R^1 为烷基, 且每一 R^2 独立地为氢或下式代表的部分:



5 其中 R^1 为烷基。

所述预处理组合物还可包括氧化剂。所述的肿瘤分解病毒可以是诸如 CG8840 的肿瘤分解腺病毒。所述的肿瘤分解病毒组合物还可包括诸如紫杉萜(docetaxel)的化疗试剂。

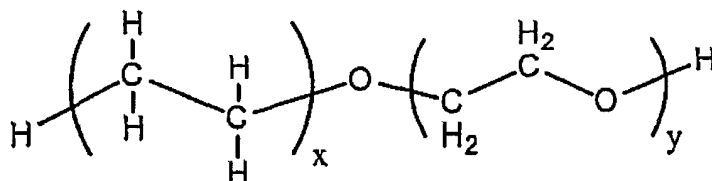
10 根据第二方面, 本发明提供治疗膀胱癌的方法。根据本发明的这一方面, 所述的方法包括

将所述的膀胱腔表面与预处理组合物接触, 所述的组合物包括约 0.01% 至约 0.2% 重量比的氧氯生钠(sodium oxychlorosene)及,

随后将所述的膀胱腔表面与含有肿瘤分解病毒的组合物接触。

15 根据第三方面, 本发明提供治疗膀胱癌的方法。根据本发明的这一方面, 所述方法包括:

将所述的膀胱腔表面与预处理组合物接触, 所述预处理组合物包括具有以下化学式表示的结构的转导增强试剂:



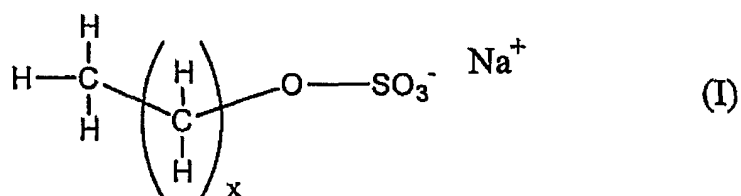
其中所述 x 和 y 为正整数；及

随后将所述的膀胱腔表面与包含有肿瘤分解病毒的组合物接触。

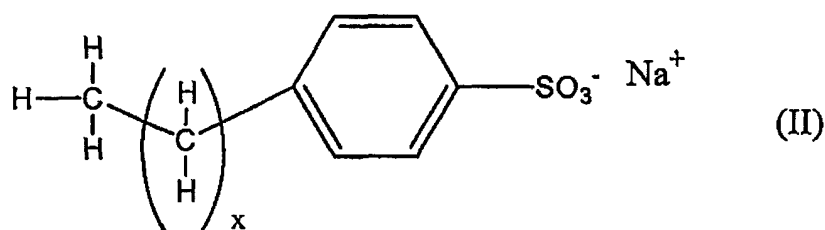
根据本发明的优选实施方案， x 为 6 且 y 为 8-10，所述预处理组合物含有约 0.02 wt.%-约 0.05 wt.% 的转导增强试剂。

- 5 根据第四方面，本发明提供治疗膀胱癌的方法。根据本发明的这一方面，所述的方法包括：

将所述的膀胱腔表面与预处理组合物接触，所述的预处理组合物包括具有以下通式(I)或以下通式(II)代表的结构的转导增强试剂，



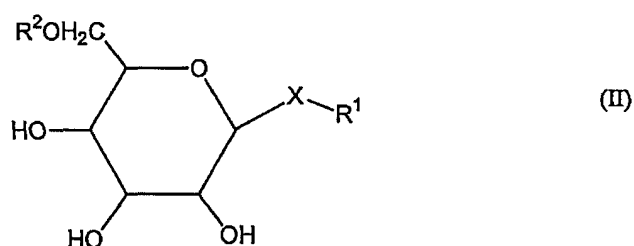
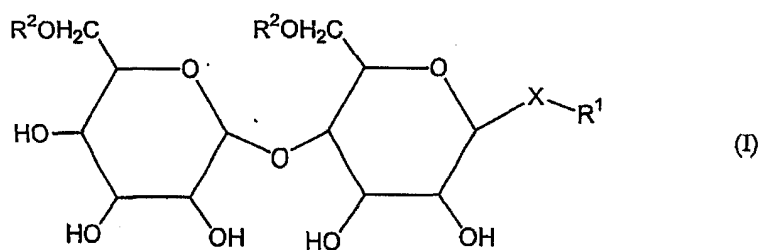
10



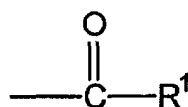
其中 x 为正整数；及

随后将所述的膀胱腔表面与含有肿瘤分解病毒的组合物接触。

- 15 根据第五方面，本发明提供包括转导增强试剂和肿瘤分解病毒的组合物。根据本发明的这一方面，所述的转导增强试剂为具有亲脂性取代基的单糖、二糖或多糖。例如，所述转导增强试剂可以是具有以下通式(I)或以下通式(II)的化合物：



其中 X 为硫或氧原子, R^1 为烷基, 且每一 R^2 独立地为氢或下式代表的部分:



5

其中 R^1 为烷基。

所述的肿瘤分解病毒可以是诸如 CG8840 的肿瘤分解腺病毒。所述的肿瘤分解病毒组合物还可包括诸如紫杉萜的化疗试剂。还提供了治疗膀胱癌的方法, 包括将膀胱腔表面与上述给出的组合物接触。

10 根据第六方面, 本发明提供包括羟氯生钠和肿瘤分解病毒的组合物。所述肿瘤分解病毒可以是诸如 CG8840 的肿瘤分解腺病毒。所述的肿瘤分解病毒组合物还可包括诸如紫杉萜的化疗试剂。还提供治疗膀胱癌的方法, 包括将膀胱腔表面与上述给出的组合物接触。

15

附图的简要描述

参照附图可更好地理解本发明, 其中:

图 1A 和 1B 为显示用 15%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的照片, 其中图 1A 显示了所述膀胱的外表面而图 1B 显示了所

述膀胱腔表面;

图 1C 和 1D 为显示用 20%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的照片, 其中图 1C 显示了所述膀胱的外表面而图 1D 显示了所述膀胱腔表面;

5 图 1E 和 1F 为显示用 25%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的照片, 其中图 1E 显示了所述膀胱的外表面而图 1F 显示了所述膀胱腔表面;

图 1G 和 1H 为显示用 30%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的照片, 其中图 1G 显示了所述膀胱的外表面而图 1H 显示了所述膀胱腔表面;

图 2A 为显示鼠膀胱对照的横切面的照片;

图 2B 和 2C 为显示用 30%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的横切面的照片;

图 3A-3F 为显示用 25%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的横切面的照片, 其中图 3A、3C 和 3E 在 40×倍拍摄, 图 3B、3D 和 3F 在 100×倍放大拍摄;

图 4A-4F 为显示用 30%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的横切面的照片, 其中图 4A、4C 和 4E 在 40×倍拍摄, 图 4B、4D 和 4F 在 100×倍放大拍摄;

20 图 5A-5D 为显示用 4% poloxomer 407 溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的两只鼠的膀胱的照片, 其中图 5A 和 5B 分别显示第一只膀胱的外表面和腔表面, 而图 5C 和 5D 分别显示第二只膀胱的外表面和腔表面;

图 6A-6D 为显示利用含有脂质体 lipofectamine 和 Ad-LacZ 的组合物感染后的两只鼠的膀胱的照片, 其中图 6A 和 6B 分别显示第一只膀胱的外表面和腔表面, 而图 6C 和 6D 分别显示第二只膀胱的外表面和腔表面;

图 7A-7D 为显示利用含有在体 geneSHUTTLE™和 Ad-LacZ 的组合物感染后的两只鼠的膀胱的照片, 其中图 7A 和 7B 分别显示第一个膀胱的外表面和腔表面, 而图 7C 和 7D 分别显示第二个膀胱的外表面和腔表面;

30 图 8A-8N 为显示用 0.2%羟氯生(oxychlorosene)溶液预处理 5 分钟后

利用 Ad-LacZ 进行感染的 7 只鼠的膀胱的照片，其中图 8A 和 8B 分别显示第一只的膀胱的外表面和腔表面，图 8C 和 8D 分别显示第二只的膀胱的外表面和腔表面，图 8E 和 8F 分别显示第三只的膀胱的外表面和腔表面，图 8G 和 8H 分别显示第四只的膀胱的外表面和腔表面，图 8I 和 8J 分别显示第五只的膀胱的外表面和腔表面，图 8K 和 8L 分别显示第六只的膀胱的外表面和腔表面，图 8M 和 8N 分别显示第七只的膀胱的外表面和腔表面；

图 9A-9N 为显示用 0.2%羟氯生溶液预处理 15 分钟后利用 Ad-LacZ 进行感染的 7 只鼠的膀胱的照片，其中图 9A 和 9B 分别显示第一只的膀胱的外表面和腔表面，图 9C 和 9D 分别显示第二只的膀胱的外表面和腔表面，图 9E 和 9F 分别显示第三只的膀胱的外表面和腔表面，图 9G 和 9H 分别显示第四只的膀胱的外表面和腔表面，图 9I 和 9J 分别显示第五只的膀胱的外表面和腔表面，图 9K 和 9L 分别显示第六只的膀胱的外表面和腔表面，图 9M 和 9N 分别显示第七只的膀胱的外表面和腔表面；

图 10A 和 10B 分别显示图 8C 和 8I 的鼠膀胱的横切面照片；

图 11A 和 11B 分别显示图 9C 和 9I 的鼠膀胱的横切面照片；

图 12A-12F 为显示用 0.2%羟氯生溶液预处理 5 分钟后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱横切面的照片，其中图 12A、12C 和 12E 在 40×倍拍摄，图 12B、12D 和 12F 在 100×倍放大拍摄；

图 13A-13F 为显示用 0.2%羟氯生溶液预处理 15 分钟后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱横切面的照片，其中图 13A、13C 和 13E 在 40×倍拍摄，图 13B、13D 和 13F 在 100×倍放大拍摄；

图 14A 为显示用 0.1%羟氯生溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱腔表面的照片；

图 14B 和 14C 为显示图 14A 的鼠膀胱横切面的照片，其中图 14B 在 40×倍拍摄，图 14C 在 100×倍放大拍摄；

图 15A 为显示用 0.2%羟氯生溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面照片；

图 15B 和 15C 为显示图 15A 的鼠膀胱横切面的照片，其中图 15B 在 40×倍拍摄，图 15C 在 100×倍放大拍摄；

图 16A 为显示用 0.2%羟氯生溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的腔表面照片;

图 16B 和 16C 为显示图 16A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 16B 在 40×倍拍摄, 图 16C 在 100×倍放大拍摄;

5 图 17A 为显示用 0.4 羟氯生溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面照片;

图 17B 和 17C 为显示图 17A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 17B 在 40×倍拍摄, 图 17C 在 100×倍放大拍摄;

10 图 18A 为显示用 0.4%羟氯生溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的腔表面照片;

图 18B 和 18C 为显示图 18A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 18B 在 40×倍拍摄, 图 18C 在 100×倍放大拍摄;

图 19A 为显示用 0.02%聚多卡醇(polidocanol)溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面照片;

15 图 19B 和 19C 为显示图 19A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 19B 在 40×倍拍摄, 图 19C 在 100×倍放大拍摄;

图 20A 为显示用 0.02%聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的腔表面照片;

20 图 20B 和 20C 为显示图 20A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 20B 在 40×倍拍摄, 图 20C 在 100×倍拍摄;

图 21A 和 21B 分别显示用 0.05%聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的外表面和腔表面的照片;

图 21C 和 21D 为显示图 21A 的鼠膀胱横切面照片, 其中图 21B 在 40×倍拍摄, 图 21C 在 100×倍拍摄;

25 图 22A 和 22B 分别显示用 0.05%聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的外表面和腔表面的照片;

图 22C 和 22D 为显示图 22A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 22B 在 40×倍拍摄, 图 22C 在 100×倍放大拍摄;

30 图 23A 为显示用 0.2%聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面的照片;

图 23B 和 23C 为显示图 23A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 23B 在 40×倍拍摄, 图 23C 在 100×倍放大拍摄;

图 24A 为显示用 0.2%聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的腔表面的照片;

5 图 24B 和 24C 为显示图 24A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 24B 在 40×倍拍摄, 图 24C 在 100×倍拍摄;

图 25A 为显示用 0.02% 正十二烷基 β -D-麦芽苷(maltoside)溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面的照片;

10 图 25B 和 25C 为显示图 25A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 25B 在 40×倍拍摄, 图 25C 在 100×倍拍摄;

图 26A 为显示用 0.02%正十二烷基 β -D-麦芽苷溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的腔表面的照片;

图 26B 和 26C 为显示图 26A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 26B 在 40×倍拍摄, 图 26C 在 100×倍放大拍摄;

15 图 27A 为显示用 0.05%正十二烷基 β -D-麦芽苷溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面的照片;

图 27B 和 27C 为显示图 27A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 27B 在 40×倍拍摄, 图 27C 在 100×倍拍摄;

20 图 28A 为显示用 0.05%正十二烷基 β -D-麦芽苷溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面的照片;

图 28B 和 28C 为显示图 28A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 28B 在 40×倍拍摄, 图 28C 在 100×倍拍摄;

图 29A 为显示用 0.2%正十二烷基 β -D-麦芽苷溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠膀胱的腔表面的照片;

25 图 29B 和 29C 为显示图 29A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 29B 在 40×倍拍摄, 图 29C 在 100×倍拍摄;

图 30A 为显示用 0.2%十二烷基苯磺酸钠溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面的照片;

30 图 30B 和 30C 为显示图 30A 的鼠膀胱横切面的照片, 其中图 30B 在 40×倍拍摄, 图 30C 在 100×倍拍摄;

图 31A-31E 为显示用具有不同长度烷基侧链的烷基麦芽苷和烷基吡喃麦芽苷(maltopyranoside)预处理试剂处理的鼠膀胱腔表面的照片; 及

图 32A-32C 为显示用具有不同长度烷基侧链的烷基硫酸钠预处理试剂处理的鼠膀胱腔表面的照片。

5

优选实施方案的详细描述

本发明涉及转导增强试剂的用途, 其可使膀胱伞状细胞层对病毒基因传输载体的感染比未处理的细胞层更加敏感。根据本发明的转导增强试剂的例子包括十二烷基表面活性剂; 十二烷基麦芽苷; 十二烷基醇聚氧化乙烯醚 (即聚多卡醇(polidocanol)); 及十二烷基苯磺酸钠/次氯酸复合物(即羟氯生(oxychlorosene)).

根据本发明, 在用病毒基因传输载体感染之前利用含有转导增强试剂的组合物来处理所述的膀胱腔表面。所述的病毒基因传输载体可以是用于治疗膀胱癌的肿瘤分解病毒。用于本发明实践中的肿瘤分解病毒包括但不限于腺病毒、单纯疱疹病毒(HSV)、呼肠孤病毒(reovirus)、水疱性口腔炎病毒(VSV)、新城疫(newcastle disease)病毒、牛痘病毒、流感病毒、西尼罗河病毒(West Nile virus)、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒和麻疹病毒。本发明实践中特别感兴趣的是表现出在特定组织类型(即在膀胱尿道上皮中)中优选表达的肿瘤分解病毒。这种类型的肿瘤分解腺病毒已在例如

20 Zhang, et al., "Identification of Human Uroplakin II Promoter and Its Use in the Construction of 8840, a Urothelium-specific Adenovirus Variant that Eliminates Established Bladder Tumors in Combination with Docetaxel", Cancer Research, 62,3743-3750 (2002) 以及共同拥有的序列号为 09/814,292 的美国专利申请中公开, 本文明确将其引入作为参考。

25 用于与肿瘤分解病毒进行联合治疗的化疗试剂已在例如共同拥有的序列号为 09/814,357 的美国专利申请中公开, 本文明确将其引入作为参考。

可选择地, 所述的病毒基因传输载体可以是任何用于基因治疗的本领域公知的基因治疗传输载体, 包括但不限于腺病毒、腺病毒相关病毒

30 (AAV)、慢病毒、逆转录病毒、疱疹病毒等等。美国专利第 6,165,779 号

公开了基因治疗腺病毒试剂的例子。本发明人发现，用不同化合物的水溶液预处理小鼠膀胱使转导一致增加到高于 60%的膀胱表面，而未处理的转导百分率不超过 10%。

除用所述转导增强试剂对所述膀胱表面进行预处理外，本发明还包括将所述病毒基因传输载体和所述转导增强试剂对所述膀胱的共给药，以及任一所述转导增强试剂与重组病毒基因传输载体的共组方。

用于增强膀胱上皮中腺病毒转导的组合物和化学试剂

为了寻找在所述膀胱中通过病毒基因传输载体增加基因转移或转导的物质，检测了一些种类的化合物、表面活性剂以及预制反应试剂。肿瘤分解腺病毒 CG884 用作示例性病毒基因治疗载体。通过其物理或化学特性和结构可对所评价的反应试剂进行分类。

首先，所述的反应试剂可归类为单一化合物或混合反应试剂(即化合物的混合物)。所评价的单一化合物包括非离子表面活性剂、醇、聚合物和离子表面活性剂。被评价的离子表面活性剂包括：4%聚羧亚烃 (poloxamer) 407 (Pluronic®127); 4%聚羧亚烃 188 (Pluronic® F68); 0.02%-0.5%聚多卡醇; 0.1%正十二烷基- β -D-吡喃葡萄糖苷(其也可归类为糖基表面活性剂); 0.02-0.5%正十二烷基- β -D-麦芽苷(其也可归类为糖基表面活性剂); 0.1%Tween® 20; 0.1% Triton® X-100; 0.1% Forlan® C-24 (PEG 胆固醇); 0.1%癸基-b-D-麦芽苷(其也可归类为糖基表面活性剂); 0.1% 6-环己基己基- β -D-麦芽苷(其也可归类为糖基表面活性剂); 及 0.1% Tromboject® (十四烷基硫酸钠)。

所评价的醇包括 0.1%-3%苯甲醇和 10%-30%乙醇。所评价的聚合物包括 0.4% HPMC 2910; 0.4% PVA; 0.4% PVP; 和 100 mg/ml 多聚赖氨酸。所评价的离子表面活性剂包括：0.1% DC-Chol [3b-N-(二甲基氨基乙基)氨基甲酸胆固醇脂]; 0.2%十二烷基苯磺酸钠; 及 0.1%十二烷基硫酸钠。所评价的混合反应试剂包括：在体 GeneSHUTTLE™ (含有 DOTAP+胆固醇的反应试剂，由 Qbiogene of Carlsbad, CA 销售)和 0.1%-0.4%羧氯生(十二烷基苯磺酸钠/次氯酸复合物)。

乙醇预处理对啮齿动物膀胱上皮中腺病毒介导的的基因转移和表达的作用

进行了评价乙醇预处理对腺病毒介导的啮齿动物膀胱上皮中的基因转移和表达的作用的研究。

5

试验材料

利用本领域公知的冷冻和腺病毒制剂的常规条件将 Ad- β gal 制成冷冻制剂。用于病毒臂的载体为 PBS 加 10%甘油。预处理试剂在 PBS-10%甘油溶液中的分别为 5%、10%、15%、20%和 30%的 GLP 级乙醇。

10

动物

本研究采用 80 只雌性 BALB/c 小鼠。因其容易进行尿道插管和膀胱内灌输，因此选择雌性动物。在试验开始当天，所述小鼠约为 10-12 周龄。

15 处理方案

如下表所示将动物分入每一组中。

20

25

30

表 1:乙醇预处理的作用

组别	每组动物数	试验物质	途径	乙醇预处理	病毒剂量(颗粒/动物)	剂量方案
1	8-10	载体	膀胱内	-	-	第一天为 100 ml PBS-10% 甘油
2	8-10	Ad- β gal	膀胱内	-	1.3×10^{11}	第一天为 Ad- β gal
3	8-10	Ad- β gal	膀胱内	5%乙醇	1.3×10^{11}	第一天为 5%乙醇预处理, 随后给予病毒
4	8-10	Ad- β gal	膀胱内	10%乙醇	1.3×10^{11}	第一天为 10%乙醇预处理, 随后给予病毒
5	8-10	Ad- β gal	膀胱内	15%乙醇	1.3×10^{11}	第一天为 15%乙醇预处理, 随后给予病毒
6	8-10	Ad- β gal	膀胱内	20%乙醇	1.3×10^{11}	第一天为 20%乙醇预处理, 随后给予病毒
7	8-10	Ad- β gal	膀胱内	25%乙醇	1.3×10^{11}	第一天为 25%乙醇预处理, 随后给予病毒
8	8-10	Ad- β gal	膀胱内	30%乙醇	1.3×10^{11}	第一天为 30%乙醇预处理, 随后给予病毒

对表 1 中的数据, 通过光密度检测的 Ad- β gal 病毒的浓度为 1.3×10^{12} vp/ml。

5 处理步骤

1. 用异氟烷(isoflurane)麻醉动物并将 24g 导尿管通过尿道导入膀胱。
2. 排空残余尿液并每次用 100-150 μ l 的 PBS 冲洗膀胱 3 次。
3. 在试验动物中, 分别用 0.1ml 的 5%、10%、15%、20%、25%或 30%乙醇溶液将膀胱预处理 20 分钟, 随后用 100-150 μ l 的 PBS 冲洗膀胱 3 次。
4. 将在 0.1 ml 的 PBS-10%甘油稀释的 Ad- β gal 病毒膀胱内给药至膀胱中并在膀胱中保留 45 分钟。尿道口附近放置扭结来防止所述病毒的漏

出并防止导尿管的脱落。

5. 通过撤出所述病毒并用 100-150 μ l 的 PBS 冲洗膀胱 3 次来终止处理。当导尿管阻塞时，避免冲洗步骤，从而使所述病毒冲洗到尿液中。然而此步骤的使用会妨碍对所述病毒在膀胱中停留时间的确定。

5

分析/测定

在处理当天定量给药前观察动物的临床状态，并且在试验阶段每天观察动物。

10 β -半乳糖苷酶活性的评价

在处理后 48 小时，处死动物。用 0.1ml 全组织固定剂：2%中性缓冲福尔马林、2%戊二醛、2mM MgCl₂、10 mM PBS，pH 7.4 来充盈膀胱。随后移出膀胱并用全组织固定剂固定 1 小时。然后，将该膀胱纵向剖开，并在 4°C 漂洗(2mM MgCl₂，0.1%脱氧胆酸盐，0.2% Triton) 24 小时，随后浸没在 X-gal 标记溶液中。试验确定在纵向剖开的膀胱腔上皮中的转基因表达。

15

组织病理学

将固定在全有机固定剂中的膀胱切片并用苏木精-伊红染色用于组织学试验。

20

结果

用不同浓度乙醇(即 15%、20%、25%和 30 wt.%)对膀胱腔表面预处理 20 分钟后可产生 10-20%的转导。图 1-4 显示在用乙醇预处理后鼠膀胱的转导。图 1A 和 1B 所示为用 15%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的照片。图 1A 显示所述膀胱的外表面而图 1B 显示膀胱腔表面。图 1C 和 1D 为显示用 20%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的照片。图 1C 显示所述膀胱的外表面而图 1D 显示膀胱腔表面。图 1E 和 1F 为显示用 25%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的照片。图 1E 显示所述膀胱的外表面而图 1F 显示膀胱腔表面。

25

30

图 1G 和 1H 为显示用 30%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的照片。图 1G 显示所述膀胱的外表面而图 1H 显示膀胱腔表面。从图 1 可见,通过标记检测,高浓度的乙醇产生高水平的转导。

图 2A 为显示鼠膀胱对照(即未处理)的横切面的照片。图 2B 和 2C 为显示用 30%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱横切面的照片。

图 3A-3F 为显示用 25%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的三只鼠的膀胱横切面的照片。图 3A 和 3B 显示第一只鼠膀胱的横切面照片,图 3C 和 3D 显示第二只鼠膀胱的横切面照片,及图 3E 和 3F 显示第三只鼠膀胱的横切面照片。图 3A、3C 和 3E 在 40×倍拍摄,图 3B、3D 和 3F 在 100×倍拍摄。

图 4A-4F 为显示用 30%乙醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的三只鼠膀胱横切面的照片。图 4A 和 4B 显示第一只鼠膀胱的横切面照片,图 4C 和 4D 显示第二只鼠膀胱的横切面照片,及图 4E 和 4F 显示第三只鼠膀胱的横切面照片。图 4A、4C 和 4E 在 40×倍拍摄,图 4B、4D 和 4F 在 100×倍放大拍摄。

化学试剂预处理对啮齿动物膀胱上皮中腺病毒介导的基因转移和表达的作用

进行了评价化学试剂预处理对啮齿动物膀胱上皮中腺病毒介导的基因转移和表达的作用的研究。

试验材料

利用本领域公知的冷冻和腺病毒制剂的常规条件在 CGI 将 Ad-βgal 病毒制成冷冻制剂。用于病毒臂的载体为 PBS 加 10%甘油。

动物

本研究采用 152 只雌性 BALB/c 小鼠。因其容易进行尿道插管和膀胱内灌输,因此选择雌性动物。在试验开始当天,所述小鼠约为 10-12 周龄。

处理方案

如下表所示,将动物分入每一组中。化学试剂和病毒的给药途径为膀胱内。

表 2: 化学试剂预处理的作用

组别	每组动物数	试验物质	化学试剂	病毒剂量(颗粒/动物)	剂量方案
1	2	载体	4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127)	-	第一天, 100 ml 含 4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127)的 PBS-10%甘油
2	6-8	Ad-βgal	4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127)	1.3×10^{11}	第一天进行 4%聚羧亚烃 407 (Pluronic 127) 预处理, 随后给予病毒
3	2	载体	4% 聚羧亚烃 188 (Pluronic F68)		第一天, 100 ml 含 4% 聚羧亚烃 188 (Pluronic F68)的 PBS-10%甘油
4	6-8	Ad-βgal	4% 聚羧亚烃 188 (Pluronic F68)	1.3×10^{11}	第一天, 4% 聚羧亚烃 188 (Pluronic F68)预处理后给予病毒
5	2	载体	Lipofectamine 2000		100ml 含 Lipofectamine 2000(20mg/ml)的 PBS-10%甘油
6	6-8	Ad-βgal	Lipofectamine 2000	0.65×10^{11}	第一天给予与病毒混合的 1.25mg 的 Lipofectamine 2000
7	2	载体	3%苯甲醇		第一天, 100μl 含 3% 苯甲醇的 PBS-10% 甘油
8	6-8	Ad-βgal	3%苯甲醇	1×10^{11}	第一天, 3%苯甲醇预处理后给予病毒
9	2	载体	0.2% 羧氯生		第一天, 含 0.2% 羧氯生的 PBS-10% 甘油

1	2	载体	4% 聚 羟 亚 烃 407 (Pluronic 127)		第一天为 100ml 的含 4% 聚 羟 亚 烃 407 (Pluronic 127) 的 PBS-10% 甘油
10	6-8	Ad- β gal	0.2% 羟 氯 生	1.3×10^{11}	第一天, 0.2% 羟 氯 生 预处理(仅洗涤)后给予病毒
11	6-8	Ad- β gal	0.2% 羟 氯 生	1.3×10^{11}	第一天, 0.2% 羟 氯 生 预处理(5 分钟)后给予病毒
12	6-8	Ad- β gal	0.2% 羟 氯 生	1.3×10^{11}	第一天, 0.2% 羟 氯 生 预处理(15 分钟)后给予病毒
13	2	载体	0.05% 聚 多 卡 醇		第一天, 含 0.05% 聚 多 卡 醇 的 PBS-10% 甘油
14	6-8	Ad- β gal	0.05% 聚 多 卡 醇	1.3×10^{11}	第一天, 0.05% 聚 多 卡 醇 预处理后给予病毒
15	2	载体	0.1% DC-Chol		第一天, 含 0.1% DC-Chol 的 PBS-10% 甘油
16	6-8	Ad- β gal	0.1% DC-Chol	1.3×10^{11}	第一天, 0.1% DC-Chol 预处理后给予病毒
17		载体	在 体 Gene Shuttle (DOTAP+胆 固 醇)		PBS 中的 4mM 溶液
18	6-8	Ad- β gal	在 体 Gene Shuttle (DOTAP+胆 固 醇)	0.65×10^{11}	第一天给予与病毒混合的 4mM 的在体 Gene Shuttle(用 90ml 水稀释 60ml 的脂质, 随后加入 150 μ l Ad- β gal)
19	2	载体	0.5% 聚 多 卡 醇		第一天, 含 0.5% 聚 多 卡 醇 的 PBS-10% 甘油

1	2	载体	4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127)		第一天为 100ml 的含 4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127) 的 PBS-10% 甘油
20	6-8	Ad-βgal	0.5% 聚多卡醇	1.3×10^{11}	第一天, 0.5% 聚多卡醇预处理后给予病毒
21	2	载体	0.4% HPMC 2910		第一天, 含 0.4% HPMC 2910 的 PBS-10%甘油
22	6-8	Ad-βgal	0.4% HPMC 2910	0.5×10^{11}	第一天将 0.8% HPMC 2910 与等体积的病毒混合随后给药
23	2	载体	100mg/ml 多聚赖氨酸		第一天, 含 100μg/ml 多聚赖氨酸的 PBS-10% 甘油
24	6-8	Ad-βgal	100 mg/ml 多聚赖氨酸	0.5×10^{11}	第一天将 200μg/ml 多聚赖氨酸与等体积的病毒混合随后给药
25	2	载体	0.1% 正十二烷基 -b-D 吡喃葡萄糖苷		第一天, 含 0.1% n-十二烷基-b-D 吡喃葡萄糖苷的 PBS-10% 甘油
26	6-8	Ad-βgal	0.1% 正十二烷基-b-D 吡喃葡萄糖苷	1×10^{11}	第一天, 0.1% n-十二烷基-b-D 吡喃葡萄糖苷预处理后给予病毒
27	2	载体	0.4% PVA		第一天, PBS-10% 甘油含 0.4% PVA
28	6-8	Ad-βgal	0.4% PVA	0.5×10^{11}	第一天将 0.8% PVA 与等体积的病毒混合随后给药
29	2	载体	0.4% PVP		第一天, PBS-10% 甘油含 0.4% PVP

1	2	载体	4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127)		第一天, 100 ml 含 4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127)的 PBS-10%甘油
30	6-8	Ad- β gal	0.4% PVP	0.5×10^{11}	第一天将 0.8% PVP 与 等体积的病毒混合随后 给药
31	2	载体	0.1% 胆固醇- 环糊精反应试 剂		第一天, 含 0.1%胆固醇- 环糊精的 PBS-10% 甘油
32	6-8	Ad- β gal	0.1% 胆固醇 - 环糊精	0.5×10^{11}	第一天将 0.2%胆固醇- 环糊精试剂与等体积 的病毒混合随后给药
33		载体	0.05% 正十二 烷基 b-D- 麦 芽苷		第一天, 含 0.05% n- 十二烷基 b-D-麦芽苷 的 PBS-10%甘油
34	6-8	Ad- β gal	0.05% 正十二 烷基 b-D- 麦 芽苷	1×10^{11}	第一天, 0.05% n-十二 烷基 b-D-麦芽苷预处 理后给予病毒
35	2	载体	0.3% 苯甲醇		第一天, 100 μ l 含 0.3% 苯甲醇的 PBS-10%甘 油
36	6-8	Ad- β gal	0.3%苯甲醇	1×10^{11}	第一天, 0.3% 苯甲醇 预处理后给予病毒
37	2	载体	0.1%苯甲醇		第一天, 100 μ l 含 0.1% 苯甲醇的 PBS-10%甘 油
38	6-8	Ad- β gal	0.1% 苯甲醇	1×10^{11}	第一天, 0.1%苯甲醇预 处理后给予病毒
39	2	载体	0.1% 羧氯生		第一天, 含 0.1% 羧氯 生的 PBS-10% 甘油

1	2	载体	4% 聚 羟 亚 烃 407 (Pluronic 127)		第一天, 100 ml 含 4% 聚羟亚烃 407 (Pluronic 127)的 PBS-10% 甘油
40	6-8	Ad-βgal	0.1% 羟氯生	1×10^{11}	第一天, 1% 羟氯生预 处理(5 min)后给予病 毒
41	2	载体	0.4% 羟氯生		第一天, 含 0.4% 羟氯 生的 PBS-10% 甘油
42	6-8	Ad-βgal	0.4% 羟氯生	1×10^{11}	第一天, 0.4% 羟氯生 预处理(5 分钟)后给予 病毒
43	2	载体	0.02% 聚多卡 醇		第一天, 含 0.02% 聚 多卡醇的 PBS-10% 甘 油
44	6-8	Ad-βgal	0.02% 聚多卡 醇	1×10^{11}	第一天, 0.02% 聚多卡 醇预处理后给予病毒
45	2	载体	0.2% 聚多卡 醇		第一天, 含 0.2% 聚多 卡醇的 PBS-10% 甘油
46	6-8	Ad-βgal	0.2% 聚多卡 醇	1×10^{11}	第一天, 0.2% 聚多卡 醇预处理后给予病毒
47	2	载体	0.02% 正十二 烷基 b-D-麦 芽苷		第一天, 含 0.02% n- 十二烷基 b-D-麦芽苷 的 PBS-10% 甘油
48	6-8	Ad-βgal	0.02% 正十二 烷基 b-D-麦芽 苷	1×10^{11}	第一天, 0.02% n-十二 烷基 b-D-麦芽苷预处 理后给予病毒
49	2	载体	0.2% 正十二 烷基 b- D-麦 芽苷		第一天, 含 0.2% n-十 二烷基 b-D-麦芽苷的 PBS-10% 甘油

1	2	载体	4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127)		第一天, 100 ml 含 4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127)的 PBS-10% 甘油
50	6-8	Ad-βgal	0.2% 正十二 烷基 b-D-麦 芽苷	1×10^{11}	第一天, 0.2% n-十二烷 基 b-D-麦芽苷预处理 后给予病毒
51	2	载体	0.2%十二烷基 苯磺酸钠盐		第一天, 含 0.2% 十二 烷基苯磺酸钠盐的 PBS-10% 甘油
52	6-8	Ad-βgal	0.2% 十二烷 基苯磺酸钠盐	1×10^{11}	第一天, 0.2%十二烷基 苯磺酸钠盐预处理后 给予病毒
53	2	载体	0.1% 十二烷 基硫酸钠		第一天, 含 0.1%十二 烷基硫酸钠的 PBS-10% 甘油
54	6-8	Ad-βgal	0.1%十二烷基 硫酸钠	1×10^{11}	第一天, 0.1%十二烷基 硫酸钠预处理后给予 病毒
55	2	载体	0.1% Tween 20		第一天, 含 0.1% Tween 20 的 PBS-10% 甘油
56	6-8	Ad-βgal	0.1% Tween 20	1×10^{11}	第一天, 0.1% Tween 20 预处理后给予病毒
57	2	载体	0.1% Triton X-100		第一天, 含 0.1% Triton X-100 的 PBS-10% 甘 油
58	6-8	Ad-βgal	0.1% Triton X-100	1×10^{11}	第一天, 0.1% Triton X-100 预处理后给予病 毒

1	2	载体	4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127)		第一天, 100 m 含 4% 聚羧亚烃 407 (Pluronic 127) 1 的 PBS-10% 甘 油
59	2	载体	0.1% Forlan C-24 (PEG 胆 固醇)		第一天, PBS-10% 甘 油含 0.1% forlan C-24
60	6-8	Ad-βgal	0.1% Forlan C-24 (PEG 胆 固醇)	1×10^{11}	第一天, 0.1 % Forlan C-24 预处理后给予病 毒
61	2	载体	0.1% 癸基 -b-D-麦芽苷		第一天, 含 0.1% 癸基 -b-D- 麦 芽 苷 的 PBS-10% 甘油
62	6-8	Ad-βgal	0.1%癸基-b-D- 麦芽苷	1×10^{11}	第一天, 0.1% 癸基 -b-D-麦芽苷预处理后 给予病毒
63	2	载体	0.1 % 6-环己 基己基-b-D-麦 芽苷		第一天, 含 0.1 % 6-环 己基己基-b-D-麦芽苷 的 PBS-10% 甘油
64	6-8	Ad-βgal	0.1 % 6-环己 基己基-b-D-麦 芽苷	1×10^{11}	第一天, 0.1% 6-环己基 己基-b-D-麦芽苷预处 理后给予病毒
65	2	载体	0.1% Tromboject (十 四烷基硫酸 钠)		第一天, 含 0.1% Tromboject 的 PBS-10% 甘油
66	6-8	Ad-βgal	0.1% Tromboject	1×10^{11}	第一天, 0.1% Tromboject 预处理后 给予病毒
67	2	载体	0. 1% 苯基 B-D-吡喃葡萄糖 苷		第一天, 含 0.1% 苯基 B-D-吡喃葡萄糖苷的 PBS-10% 甘油

1	2	载体	4% 聚 羟 亚 烃 407(Pluronic 127)		第一天, 100 ml 含 4% 聚羟亚烃 407 (Pluronic 127)的 PBS-10% 甘油
68	6-8	Ad-βgal	0.1% 苯 基 B-D-吡喃葡萄糖 苷	1×10^{11}	第一天, 0.1% 苯基 B-D-吡喃葡萄糖苷预处 理后给予病毒
69	2	载体	0.1%蔗糖单月 桂酸酯		第一天, 含 0.1%蔗糖 单 月 桂 酸 酯 的 PBS-10% 甘油
70	6-8	Ad-βgal	0.1%蔗糖单月 桂酸酯	1×10^{11}	第一天, 0. 1%蔗糖单 月桂酸酯预处理后给 予病毒
71	2	载体	0.1% 1-O-十 二烷基-rac-甘 油		第一天, 含 0.1% 1-O- 十二烷基-rac-甘油的 PBS-10% 甘油
72	6-8	Ad-βgal	0.1%的 1-O- 十二烷基-rac- 甘油	1×10^{11}	第一天, 0.1%的 1-O- 十二烷基-rac-甘油预 处理后给予病毒

对于表 2 中的数据, 通过光密度分析检测 Ad-βgal 病毒的浓度为 1.3×10^{12} vp/ml (第一次制备, 颗粒: PFU: 30)及 1×10^{12} vp/ml (第二次制备, 颗粒: PFU: 30)。

5

处理步骤

1. 用异氟烷麻醉动物并将 24 g 导尿管通过尿道导入膀胱。
2. 排空残余尿液并每次用 100μl PBS 冲洗膀胱 3 次。
3. 根据所试验的反应试剂, 依据以下来进行膀胱的预处理:

10 聚羟亚烃 407 步骤: 每次 100μl 洗涤 2 次。保留第三次洗涤液 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

聚羟亚烃 188 步骤: 每次 100μl 洗涤 2 次。保留第三次洗涤液 5 分钟

并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行3次PBS冲洗。

脂质体 Lipofectamine 2000 步骤：将 5 μ l 的 Lipofectamine 储存液(1 mg/ml)加入到 195 μ l 的 PBS-10%甘油中。与等体积的 Ad- β gal 病毒混合并孵育 15 分钟。膀胱内给予 100 μ l 的混合物并在膀胱内保留 30 分钟。

- 5 苯甲基醇步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。保留第三次洗涤液 15 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

羟氯生步骤：如剂量方案所述进行冲洗(即每次 100 μ l 洗涤 3 次，一次保留 5 分钟，一次保留 15 分钟)。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

- 10 聚多卡醇步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

DC-Cho 步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

0.4% HPMC 2910 步骤：不进行预处理。将等体积的病毒与 0.8% HPMC 2910 溶液混合并用 30 分钟将该混合液逐步灌输到所述膀胱。

- 15 100 mg/ml 多聚赖氨酸步骤：不进行预处理。将等体积的病毒与 100 mg/ml 多聚赖氨酸溶液混合并用 30 分钟将该混合液逐步灌输到所述膀胱。

0.4%聚乙烯醇(PVA)步骤：不进行预处理。将等体积的病毒与 0.8%的 PVA 溶液混合并用 30 分钟将该混合液逐步灌输到所述膀胱。

- 20 正十二烷基- β -D 吡喃葡萄糖苷步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

0.4% PVP 步骤：不进行预处理。将等体积的病毒与 0.8%的 PVP 溶液混合并用 30 分钟将该混合液逐步灌输到所述膀胱。

- 25 0.1%胆固醇-环糊精反应试剂步骤：不进行预处理。将等体积的病毒与 0.2%的胆固醇-环糊精溶液混合并用 30 分钟将该混合液逐步灌输到所述膀胱。

正十二烷基- β -D-麦芽苷步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

- 30 十二烷基苯磺酸钠溶液步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

0.1%十二烷基硫酸钠步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

0.1% Tween 20 步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

5 0.1% Triton® X-100 步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

0.1% Forlan C-24 步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

10 0.1%癸基-b-D-麦芽苷步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

0.1% 6-环己基己基-b-D-麦芽苷步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

15 0.1%十四烷基硫酸钠 (Tromboject®, Omega Laboratories Ltd.)步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

0.1%苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

0.1%蔗糖单月桂酸酯步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

20 0.1% 1-O-十二烷基-rac-甘油步骤：每次 100 μ l 洗涤 2 次。第三次洗涤保留 5 分钟并增加一次洗涤。在病毒灌输之前进行 3 次 PBS 冲洗。

在体 geneSHUTTLE™ 步骤。将 4 mM 的在体 geneSHUTTLE™ 与病毒混合。在第一天给药。用 90ml 水稀释 60 ml 的脂质。随后加入 150 μ l 的 Ad- β gal。

25 4. 通过撤出所述的病毒并用 100 μ l 的 PBS 冲洗所述膀胱 3 次来终止病毒处理(45 分钟)。

分析/测定

30 在处理当天定量给药前观察动物的临床状态并且在试验阶段每天观察动物。

β -半乳糖苷酶活性评价

在处理 48 小时后，处死动物。用 0.1ml 全组织固定剂：2%中性缓冲福尔马林、2%戊二醛、2mM MgCl_2 , 10 mM PBS, pH 7.4 来充盈膀胱。随后移出膀胱并浸入全组织固定剂中 1 小时。然后，将每一膀胱纵向剖开并在 4°C 漂洗(2 mM MgCl_2 , 0.1%脱氧胆酸盐, 0.2% Triton) 24 小时，随后浸没在 X-gal 标记溶液中。试验确定在纵向剖开的膀胱腔上皮中的转基因表达。

10 组织病理学

将固定在全有机固定剂中的膀胱切片并用苏木精-伊红染色用于组织学试验。

结果

15 上述试验的结果总结如下：

利用 4%聚羧亚烃 407 (Pluronic 127)预处理膀胱产生 < 5%的转导。

利用脂质体 lipofectamine 和病毒混合物(未进行预处理)处理膀胱产生 < 5%的转导。

20 利用在体 geneSHUTTLE™ 和病毒混合物(无膀胱预处理)处理膀胱产生 < 5%的转导。

利用 0.1%羟氯生对所述膀胱进行 5 分钟的预处理产生 >90%的尿路上皮的转导。病理学报告显示完整的上皮层伴有轻度的粘膜下水肿。

利用 0.2%羟氯生对所述膀胱进行 5 分钟的预处理产生 >90%的尿路上皮的转导。病理学报告显示很小的粘膜下水肿和血管周淋巴细胞。

25 利用 0.2%羟氯生对所述膀胱进行 15 分钟的预处理产生 >90%的尿路上皮的转导。病理学报告显示局灶性严重溃疡伴有脓性渗出、出血和粘膜下水肿。

利用 0.4%羟氯生对所述膀胱进行 5 分钟的预处理产生 >90%的尿路上皮的转导。病理学报告显示中度的粘膜下水肿伴有局灶性大溃疡。

30 利用 0.02%聚多卡醇对所述膀胱进行 5 分钟的预处理产生 10-20% 的

尿路上皮的转导。病理学报告显示完整的粘膜。

利用 0.05%聚多卡醇对所述膀胱进行 5 分钟的预处理产生 30-40%的尿路上皮的转导。病理学报告显示很小的粘膜下水肿。

利用 0.2%聚多卡醇对所述膀胱进行 5 分钟的预处理产生 50-80%的尿路上皮的转导。病理学报告显示糜烂和局灶性溃疡以及粘膜损害。

利用 0.02%正十二烷基 β -D-麦芽苷对所述膀胱进行 5 分钟的预处理产生 50-80%的尿路上皮的转导。病理学报告显示没有显著的损伤。

利用 0.05%正十二烷基 β -D-麦芽苷对所述膀胱进行 5 分钟的预处理产生 >90%的尿路上皮的转导。病理学报告显示没有显著的损伤。

10 利用 0.2%正十二烷基 β -D-麦芽苷对所述膀胱进行 5 分钟的预处理产生 >90%的尿路上皮的转导。病理学报告显示糜烂、局灶性溃疡、中度粘膜下水肿伴有粘膜损害。

利用 0.2%十二烷基苯磺酸对所述膀胱进行 5 分钟的预处理产生 20-40%的尿路上皮的转导。

15 从以上结果可以看出,当以最终蓝染(LacZ)的水平检测时,一些单一化合物和一种混合反应试剂表现出显著增加的转导作用。一些其它单一化合物显示出增强的但水平较低的转导作用。使用乙醇预处理作为对照来验证每种检测的化学物质。在乙醇浓度高达 30%时,也只观察到 10-20%的转导。所述的“强烈反应剂”是那些表现显著好于(即 70-90%标记)只表现 10-20%标记的乙醇预处理对照的转导增强试剂。与乙醇对照组比较,弱反应剂标记区显著减少。

20 用以下试剂对所述膀胱表面进行预处理后观察到最强的反应(即最高的转导水平): 0.02%-0.5%聚多卡醇; 0.02-0.5%正十二烷基-b-D-麦芽苷; 0.1% 6-环己基己基-b-D-麦芽苷; 0.1%-0.4%羟氯生; 0.2%十二烷基苯磺酸钠; 及 0.1%十二烷基硫酸钠。

所述的“弱反应剂”包括 0.1%癸基-b-D-麦芽苷和 0.1% Triton® X-100。

25 尽管不希望被理论所限制,通过分析这些成功的转导增强试剂的物理和化学特性可推测其活性机制。所述的转导增强试剂通常为表面活性剂。该表面活性剂可以是离子或非离子的。所述的表面活性剂优选具有亲水性和亲脂性部分。所述分子的亲水性部分可产生水溶性,而所述亲

脂性(即疏水性)部分辅助分子与脂质作用。所述亲水/亲脂性的平衡或HLB 比值是所述分子中各部分相对大小的指示。

糖基表面活性剂 (糖类)

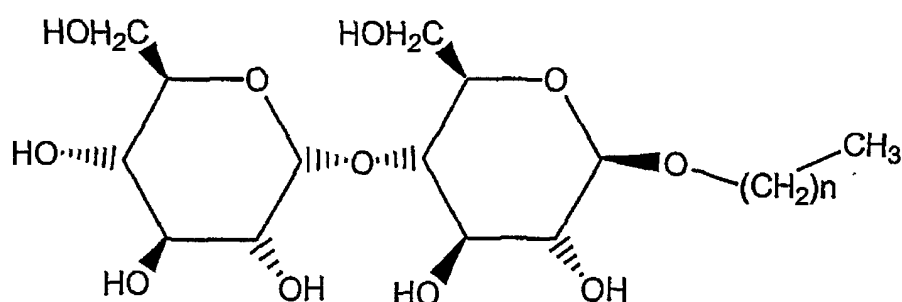
5 本发明的转导增强试剂可以是具有亲脂性取代基的糖(例如单糖、二糖或多糖)。所述的转导增强试剂可以是任何具有亲脂性取代基的单糖、二糖或多糖。根据本发明的优选实施方案,所述的转导增强试剂为具有亲脂性取代基的二糖。二糖的例子包括麦芽糖和蔗糖。然而也可使用包括乳糖、异麦芽糖、海藻糖或纤维素二糖的具有亲脂性取代基的其它二糖。

10 所述的亲脂性取代基可以是直链(例如直链正烷烃或烯烃)或非直链(例如,环或支链烷烃或烯烃)。所述的亲脂性取代基也能够是链烷酸(alkanoic acid)残基。所述亲脂性取代基的长度可以不同从而实现所希望的亲水性-亲脂性平衡。对不同的麦芽苷取代化合物的检测表明,足够的亲脂性长度可产生改善的转导效率。例如,正十二烷基- β -D-麦芽苷和 6-环己基己基- β -D-麦芽苷均能显著地增加转导,相反,正癸基- β -D-麦芽苷对转导仅具有轻微的作用。

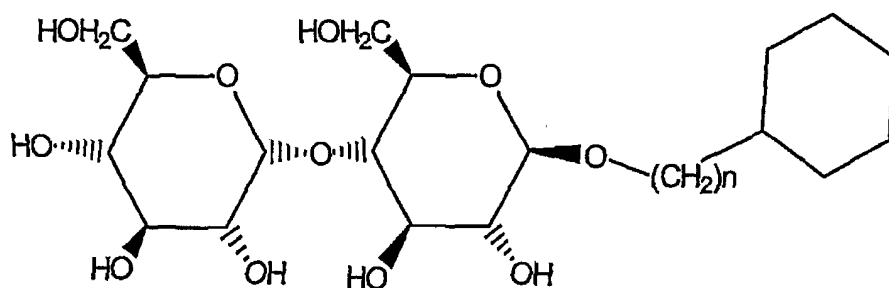
用正十二烷基- β -D-麦芽苷对所述膀胱进行预处理的结果如图 25-29 所示。图 25A 显示用 0.02 % 正十二烷基 β -D-麦芽苷溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面的照片。图 25B 和 25C 为显示图 25A 的鼠膀胱横切面照片。图 25B 在 40 $\times$ 倍拍摄,图 25C 在 100 $\times$ 倍拍摄。图 26A 为显示用 0.02%正十二烷基 β -D-麦芽苷溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠膀胱的腔表面的照片。图 26B 和 26C 为显示图 26A 的鼠膀胱横切面的照片,图 26B 在 40 $\times$ 倍拍摄,图 26C 在 100 $\times$ 倍放大拍摄。图 27A 为显示用 0.05%正十二烷基 β -D-麦芽苷溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠膀胱的腔表面的照片。图 27B 和 27C 为显示图 27A 的鼠膀胱横切面的照片,图 27B 在 40 $\times$ 倍拍摄,图 27C 在 100 $\times$ 倍放大拍摄。图 28A 为显示用 0.05%正十二烷基 β -D-麦芽苷溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠膀胱的腔表面的照片。图 28B 和 28C 为显示图 28A 的鼠膀胱横切面的照片,图 28B 在 40 $\times$ 倍拍摄,图

28C 在 100×倍拍摄。图 29A 为显示用 0.2% 正十二烷基 β -D-麦芽苷溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠膀胱的腔表面的照片。图 29B 和 29C 为显示图 29A 的鼠膀胱横切面照片,图 29 B 在 40×倍拍摄,图 29C 在 100×倍放大拍摄。

5 正十二烷基- β -D-麦芽苷和正癸基- β -D-麦芽苷的化学式如以下给出:



其中 n 分别为 11 和 9。6-环己基己基- β -D-麦芽苷的化学式为:

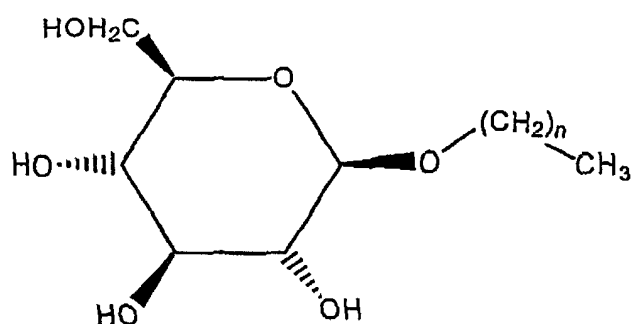


10

其中 n 为 6。

转导试验表明,所述亲脂性侧链(即 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)大小稍微降低可在较高的程度上限制所述分子增强转导的效率。重要的是所述所有上述化合物在水和 PBS 缓冲液中均具有较好的可溶性。

15 也评价了具有较短的亲水部分的这类表面活性剂。正十二烷基- β -D-吡喃葡萄糖苷的结果表明其几乎不或没有转导增强作用。正十二烷基- β -D-吡喃葡萄糖苷的化学式为:



其中 n 为 11。虽然不希望被理论所限制,所述分子的亲水性和亲脂性部分的相对大小可影响转导增强作用。因此,较短链的正烷基- β -D-吡喃葡萄糖苷(例如,正己基- β -D-吡喃葡萄糖苷)可改进转导。

5 根据本发明任何具有亲脂性取代基的单糖、二糖、多糖可用作转导增强试剂。二糖化合物的例子包括蔗糖、乳糖、麦芽糖、异麦芽糖、海藻糖和纤维素二糖。所述的亲脂性取代基优选包括烷基或烯基。根据本发明优选的实施方案,所述的亲脂性取代基为链烷酸残基。

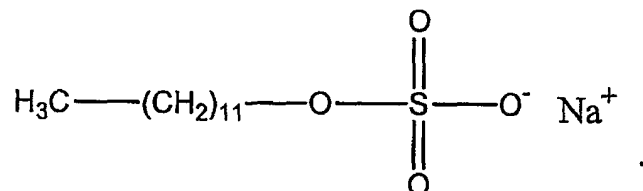
10 尽管上文描述了 β 型的单糖和二糖,但根据本发明也可使用这些糖或其它单糖、二糖或多糖的 α 型。根据本发明, α 糖转导增强试剂的例子包括正十二烷基- α -D-麦芽苷、正己基- α -D-吡喃葡萄糖苷和 6-环己基己基- α -D-麦芽苷。此外,根据本发明 D-或 L-型的单糖、二糖或多糖也可用作转导增强试剂。

15 图 31A-31E 为显示用不同烷基侧链长度的烷基麦芽苷和烷基吡喃麦芽苷预处理试剂处理的鼠膀胱的腔表面的照片。图 31A 为在 Ad-LacZ (10^9 vp)感染之前利用正十二烷基- β -D-麦芽苷(C12 烷基侧链)处理的鼠膀胱的腔表面的照片。图 31B 为感染之前利用十三烷基- β -D-吡喃麦芽苷(C13 烷基侧链)处理的鼠膀胱的腔表面的照片。图 31C 为感染之前利用正十四烷基- β -D-麦芽苷(C14 烷基侧链)处理的鼠膀胱的腔表面的照片。图 31D 为
20 感染之前利用正癸基- β -D-麦芽苷(C10 烷基侧链)处理的鼠膀胱的腔表面的照片。图 31E 为感染之前利用正辛基- β -D-吡喃麦芽苷(C8 烷基侧链)处理的鼠膀胱的腔表面的照片。

离子型烷基表面活性剂

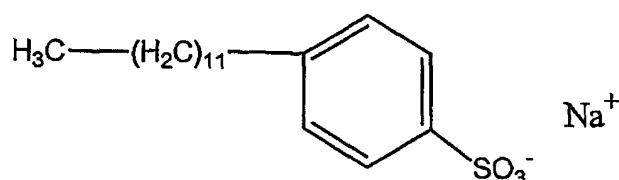
25 根据本发明离子型烷基表面活性剂也可作为转导增强化合物来使

用。离子型烷基表面活性剂的例子包括十二烷基硫酸钠，其由以下分子式表示：



5

另一种离子型表面活性剂为十二烷基苯磺酸钠盐，其由以下分子式表示：



- 10 对上述类型的表面活性剂进行了评价，并发现其与上述给出的非离子型试剂比较具有增强的转导作用。这些对于十二烷基苯磺酸钠的结果如图 30 所示。从图 30A-30C 能够看出，十二烷基苯磺酸钠在鼠膀胱中增强了 Ad-LacZ 的转导。图 30A 为显示用 0.2% 十二烷基苯磺酸钠溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面的照片。图 30B 和 30C 为显示图 30A 的鼠膀胱横切面的照片，图 30B 在 40× 倍拍摄，图 30C 在 100× 倍放大拍摄。

- 20 图 32A-32C 为显示用具有不同长度烷基侧链的烷基硫酸钠预处理试剂处理的鼠膀胱腔表面的照片。图 32A 为 Ad-LacZ (10^9 vp) 感染之前利用十二烷基硫酸钠(SDS) (C12 烷基侧链) 处理的鼠膀胱的腔表面的照片。图 32B 为感染之前利用癸基硫酸钠(C10 烷基侧链) 处理的鼠膀胱的腔表面的照片。图 31C 为感染之前利用辛基硫酸钠(C8 烷基侧链) 处理的鼠膀胱的腔表面的照片。

所述的离子型烷基表面活性剂由两个部分构成，亲水性部分和亲脂性部分。所述分子中这些部分的分布与上述糖基增强剂类似。根据本发

明，也可使用与上述给出的类似的化合物以及烷基取代基有变化的化合物。

烷基(醚)醇

- 5 同样根据本发明，烷基醚化合物也可作为转导增强化合物来使用。评价了聚多卡醇，一种具有以下化学式的烷基醚：



- 10 而且总分子式为 $\sim\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}_{10}$ 。用于评价的所述聚多卡醇以 Thesit®名称销售，其为 Desitin-Werk, Carl Klinke GmbH, Hamburg, Germany 的注册商标。聚多卡醇有多个其它的化学名，例如聚乙二醇十二烷基醚[9002-92-0]、月桂醇和聚乙二醇月桂醚。

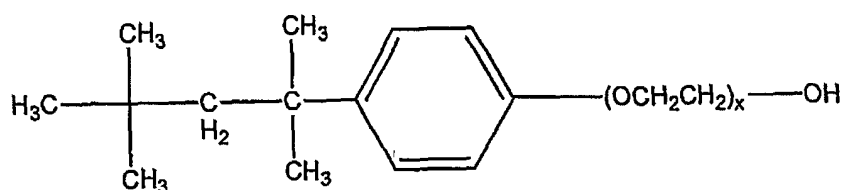
- 利用不同浓度的聚多卡醇对所述膀胱表面进行预处理的结果如图 19-24 所示。用 0.02%聚多卡醇对所述膀胱表面进行预处理的结果如图 19 和 20 所示。图 19A 为显示用 0.02%聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面照片。图 19B 和 19C 为显示图 19A 的鼠膀胱横切面的照片，图 19B 在 40×倍拍摄，图 19 在 100×倍放大拍摄。图 20A 为显示用 0.02%聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的腔表面照片。图 20B 和 20C 为显示图 20A 的鼠膀胱横切面的照片，图 20B 在 40×倍拍摄，图 20C 在 100×倍放大拍摄。

- 利用 0.05%聚多卡醇对所述膀胱表面进行预处理的结果如图 21 和 22 所示。图 21A 和 21B 分别显示用 0.05%聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的外表面和腔表面的照片。图 21C 和 21D 为显示图 21A 的鼠膀胱横切面的照片，图 21B 在 40×倍拍摄，图 21C 在 100×倍放大拍摄。图 22A 和 22B 分别为显示用 0.05%聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的外表面和腔表面的照片。图 22C 和 22D 为显示图 22A 的鼠膀胱横切面的照片，图 22B 在 40×倍拍摄，图 22C 在 100×倍放大拍摄。

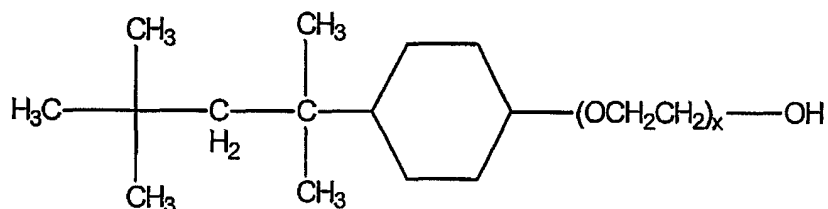
- 30 用 0.2%聚多卡醇对所述膀胱表面进行预处理的结果如图 23 和 24 所

示。图 23A 显示用 0.2% 聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面的照片。图 23B 和 23C 为显示图 23A 的鼠膀胱横切面的照片，图 23B 在 40× 倍拍摄，图 23C 在 100× 倍放大拍摄。图 24A 显示用 0.2% 聚多卡醇溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的腔表面的照片。图 24B 和 24C 为显示图 24A 的鼠膀胱横切面的照片，图 24B 在 40× 倍拍摄，图 24C 在 100× 倍放大拍摄；

Triton® X-100，具有以下通式：

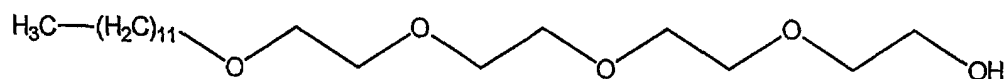


其中也对 $x=10$ 的化合物进行了评价，并发现可增强转导作用。根据本发明具有环己烷环而不是苯环的类似化合物也可作为转导增强试剂使用。此化合物具有以下化学结构：



其中 $x=10$ 。根据本发明 x 为任意正整数的上述类型的化合物也可使用。

也可从商业途径购买到具有以下一般结构式的类似烷基(醚)化合物：



这些化合物的商品名为“Brij”。上面显示的化合物为所谓的“Brij 56”。

Brij 56 的化学式为 $C_{20}H_{42}O_5$ 。另一种商业销售的化合物为“Brij 58”，其化学式为 $C_{56}H_{114}O_{21}$ 。

根据本发明上述烷基(醚)化合物可作为转导增强试剂使用。

5 羟氯生钠

评价了 pH 为约 6.5-6.9 的包括十二烷基苯磺酸钠盐和次氯酸的组合物(即羟氯生钠)。用于这些评价的羟氯生钠以 Clorpectin WCS-90 (Guardian Labs 制造并由 Cardinal Health 销售)名称销售。羟氯生钠已经被用于治疗尿道感染以及腹部和整形外科。

10 利用羟氯生钠对所述膀胱表面进行预处理的结果如图 8-18 所示。图 8A-8N 为显示用 0.2%羟氯生溶液预处理 5 分钟后利用 Ad-LacZ 进行感染的 7 只鼠的膀胱的照片。图 8A 和 8B 分别显示第一只的膀胱的外表面和腔表面，图 8C 和 8D 分别显示第二只的膀胱的外表面和腔表面，图 8E 和 8F 分别显示第三只的膀胱的外表面和腔表面，图 8G 和 8H 分别显示
15 第四只的膀胱的外表面和腔表面，图 8I 和 8J 分别显示第五只的膀胱的外表面和腔表面，图 8K 和 8L 分别显示第六只的膀胱的外表面和腔表面，图 8M 和 8N 分别显示第七只的膀胱的外表面和腔表面。

图 9A-9N 为显示用 0.2%羟氯生溶液预处理 15 分钟后利用 Ad-LacZ 进行感染的 7 只鼠的膀胱的照片。图 9A 和 9B 分别显示第一只的膀胱的
20 外表面和腔表面，图 9C 和 9D 分别显示第二只的膀胱的外表面和腔表面，图 9E 和 9F 分别显示第三只的膀胱的外表面和腔表面，图 9G 和 9H 分别显示第四只的膀胱的外表面和腔表面，图 9I 和 9J 分别显示第五只的膀胱的外表面和腔表面，图 9K 和 9L 分别显示第六只的膀胱的外表面和腔表面，图 9M 和 9N 分别显示第七只的膀胱的外表面和腔表面。

25 图 10A 和 10B 分别为显示图 8C 和 8I 的鼠膀胱的横切面的照片。图 11A 和 11B 分别为显示图 9C 和 9I 的鼠膀胱的横切面的照片。

图 12A-12F 为显示用 0.2%羟氯生溶液预处理 5 分钟后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱横切面的照片。图 12A 和 12B 分别显示第一只鼠的膀胱横切面的照片。图 12C 和 12D 分别显示第二只鼠的膀胱横切面的照片。
30 图 12E 和 12F 分别显示第三只鼠的膀胱横切面的照片。图 12A、12C 和

12E 在 40×倍拍摄, 图 12B、12D 和 12F 在 100×倍放大拍摄。

图 13A-13F 为显示用 0.2% 羧氯生溶液预处理 15 分钟后利用 Ad-LacZ 进行感染的三只鼠的膀胱横切面的照片。图 13A 和 13B 分别为显示第一只鼠的膀胱横切面的照片。图 13C 和 13D 分别为显示第二只鼠的膀胱横切面的照片。图 13E 和 13F 分别为显示第三只鼠的膀胱横切面的照片。图 13A、13C 和 13E 在 40×倍拍摄, 图 13B、13D 和 13F 在 100×倍放大拍摄。

图 14A 为显示用 0.1% 羧氯生溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的鼠膀胱的腔表面照片; 图 14B 和 14C 为显示图 14A 的鼠膀胱横切面的照片, 图 14B 在 40×倍拍摄, 图 14C 在 100×倍放大拍摄;

图 15A 为显示用 0.2% 羧氯生溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面照片。图 15B 和 15C 为显示图 15A 的鼠膀胱横切面的照片, 图 15B 在 40×倍拍摄, 图 15C 在 100×倍放大拍摄。

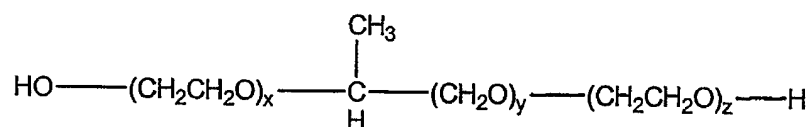
图 16A 为显示用 0.2% 羧氯生溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的腔表面照片。图 16B 和 16C 为显示图 16A 的鼠膀胱横切面的照片, 图 16B 在 40×倍拍摄, 图 16C 在 100×倍放大拍摄。

图 17A 为显示用 0.4% 羧氯生溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第一只鼠的膀胱的腔表面照片。图 17B 和 17C 为显示图 17A 的鼠膀胱横切面的照片, 图 17B 在 40×倍拍摄, 图 17C 在 100×倍放大拍摄。

图 18A 为显示用 0.4% 羧氯生溶液预处理后利用 Ad-LacZ 进行感染的第二只鼠的膀胱的腔表面照片。图 18B 和 18C 为显示图 18A 的鼠膀胱横切面的照片, 图 18B 为 40×倍拍摄, 图 18C 在 100×倍放大拍摄。

含有交替的亲水性和亲脂性单元的聚合物

对含有重复顺序的交替或一致的单体的聚合体化合物也进行了检测。这种检测的化合物之一为由以下化学式代表的聚羧亚烃 407 (Pluronic 127):



聚羧体聚合物具有较宽范围的 HLB 值。然而，所检测的这两种化合物对所述腺病毒的转导只具有微小的作用。尽管不希望被理论所限制，但相信具有分离的较长的亲水性和亲脂性链的化合物在增加所述膀胱上皮的转导中更有效。

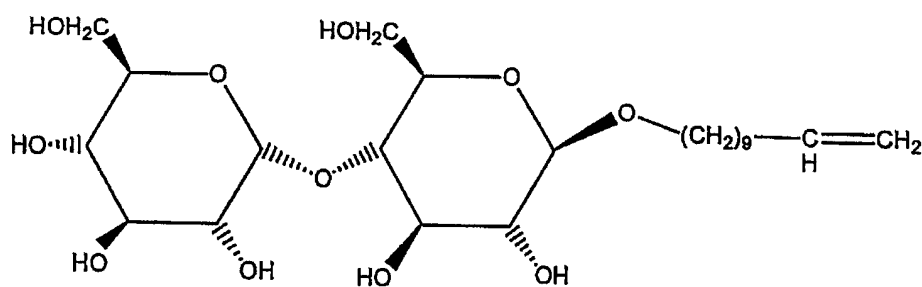
5

附加的转导增强化合物

根据本发明，附加转导化合物也可作为转导增强试剂使用。

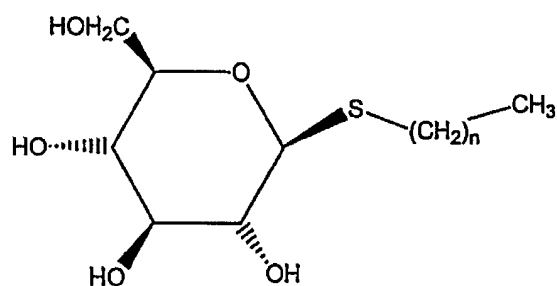
这些化合物包括 ω -十一烯基- β -D-吡喃麦芽苷，其具有以下所代表的结构：

10



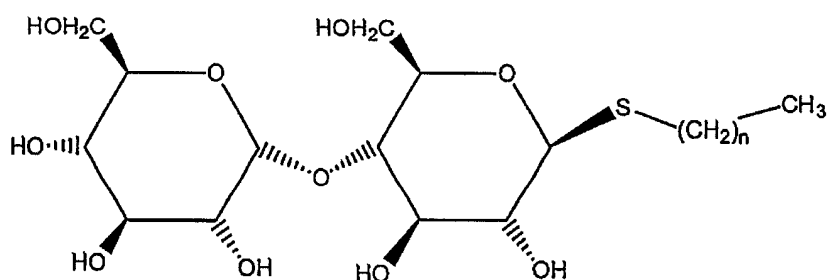
也可使用诸如具有以下所代表的通式结构的烷基- β -D-硫吡喃葡萄糖苷 (thioglucopyranosides) 的糖为基础的硫(thiolic)化合物：

15

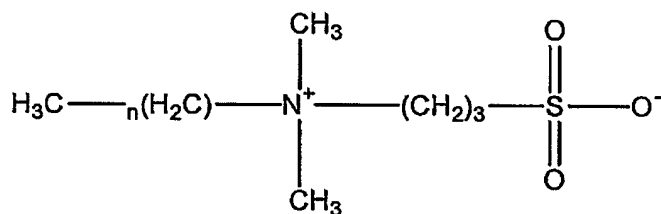


再者，根据本发明具有以下所代表的通式结构的烷基- β -D-硫吡喃麦芽苷 (thiomaltopyranosides) 也可作为转导增强化合物来使用：

20

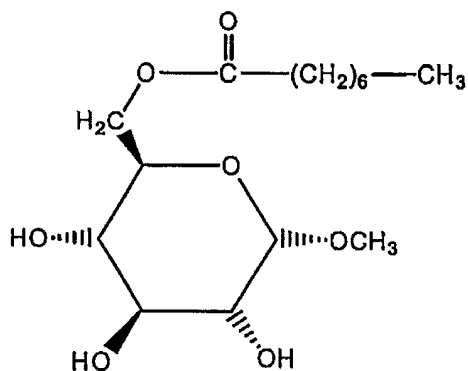


此外,也可使用具有正电的化合物,例如



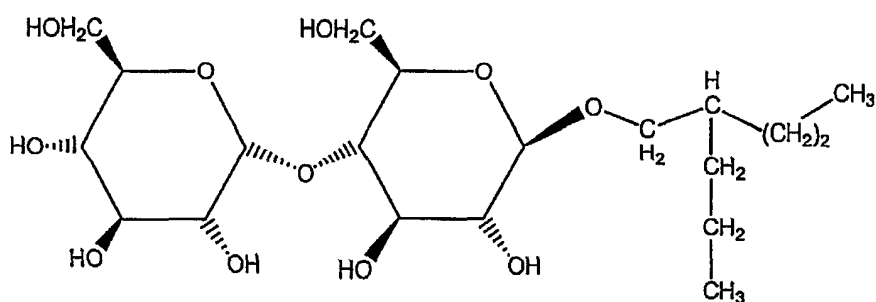
5

另外,也可使用通过羧基键连接亲脂性和亲水性部分的化合物。这种类型化合物的示例性化合物为 6-O-甲基-正庚基羧基- α -D-吡喃糖苷 (glucopyranoside):



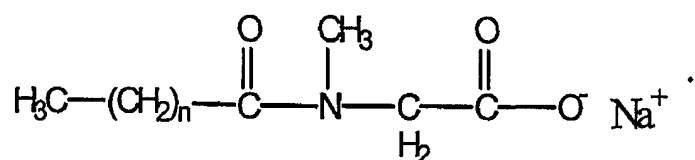
10

也可使用具有侧链或其它修饰的的烷基的糖为基础的化合物。这些类型化合物的例子包括具有以下结构的 2-丙基-1-戊基- β -D-吡喃麦芽苷:



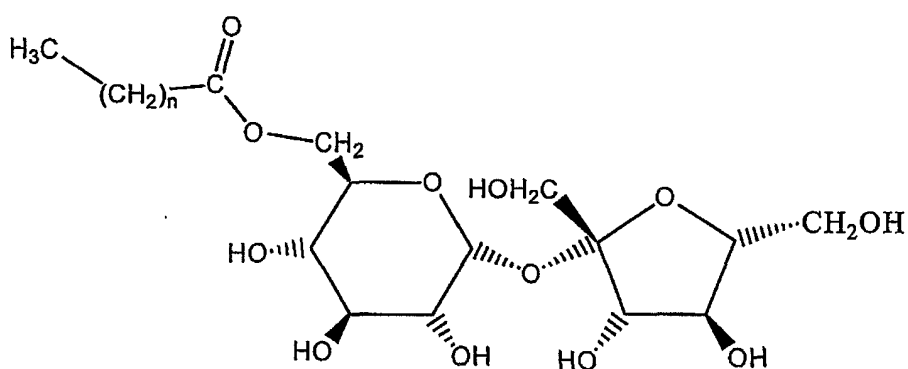
根据本发明，肌氨酸化合物也可作为转导增强试剂使用。肌氨酸化合物的例子包括具有以下结构的烷基肌氨酸钠：

5



不同取代的糖也可作为转导增强化合物来使用。可作为转导增强化合物的取代糖的例子为具有以下化学结构的蔗糖单烷基酯：

10



这种类型的化合物的例子包括其中 $n=10$ (即蔗糖单月桂酸酯) 的化合物。

根据本发明，还提供处理所述的膀胱腔表面的方法。根据本发明的
15 优选实施方案，所述的膀胱利用膀胱导管插入术通过灌输来处理。根据这一实施方案，首先去除所述膀胱中的尿液，并用缓冲液(例如 PBS)对所

述膀胱进行随意的冲洗。随后对所述的膀胱腔表面应用包括转导增强试剂的组合物(例如,通过灌输)。将所述转导增强溶液孵育一定的时间或即刻撤出。能够多次进行含有所述转导增强试剂组合物的处理。用所述转导增强试剂处理之后,可用缓冲液(例如 PBS)冲洗所述的膀胱腔表面。随后将含有腺病毒的溶液介入所述膀胱(例如通过灌输)。可即刻移去含所述腺病毒的溶液,或可选择地,也能够将所述溶液孵育一段特定的时间。用所述腺病毒处理之后,用缓冲液(例如 PBS)对所述膀胱表面再次冲洗。根据本发明优选的实施方案,每次处理中通过输注将约 50 至 500 ml 的转导增强组合物传输到所述的膀胱。

- 10 可选择地,含有所述转导增强试剂和腺病毒的组合物能够用于处理所述的膀胱腔表面。根据本发明的这一实施方案,首先去除所述膀胱中的任何尿液,并用缓冲液(例如 PBS)对所述膀胱进行随意的冲洗。随后对所述的膀胱腔表面应用包括所述转导增强试剂和腺病毒的组合物。将所述转导增强溶液孵育一定的时间或即刻撤出。处理之后,用缓冲液(例如
- 15 PBS)对所述的膀胱腔表面再次冲洗。

- 尽管磷酸缓冲盐(PBS)是优选的缓冲液,但根据本发明也能够使用其它的任何制药缓冲液。缓冲液的例子包括本领域公知的磷酸钠/硫酸钠、Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液、无菌水和其它的缓冲液,包括由 Good, et al., Biochemistry 5,467 (1966)描述的缓冲液。所述缓冲液的 pH 为 6.4 至 8.4
- 20 的范围,优选 7 至 7.5,并最优选 7.2 至 7.4。

根据本发明的含有所述转导增强试剂组合物优选还含有氧化剂。氧化剂的例子包括,但不限于亚氯酸盐化合物、次氯酸、过氧化氢、及过氧乙酸。根据本发明优选的实施方案,任何单一的化合物转导增强试剂能够与氧化剂组合作为转导增强试剂使用。

- 25 如上给出的,所述的病毒基因治疗载体能够是肿瘤分解病毒,例如,本发明示例性给出的 CG8840 的肿瘤分解腺病毒。所述的腺病毒组合物能够进一步含有诸如紫杉萜的化疗试剂。所述的腺病毒组合物优选包括约 1×10^{11} 至约 1×10^{14} 的病毒颗粒。

- 进行了多种附加的研究并如下所述。在这些研究中,除非有另外的
- 30 描述,所有百分比值均由重量百分比值来表示。

含有不同浓度十二烷基- β -D-麦芽苷的腺病毒制剂在小鼠膀胱尿道上皮感染中的作用

动物: 雌性 Balb/c 小鼠(Taconic 实验室)-2/组

- 5 **研究设计:** 检测与不同浓度十二烷基- β -D-麦芽苷组方的 Ad- β gal 病毒, 以及产生的小鼠膀胱尿道上皮的感染。

剂量/途径(病毒颗粒#/剂量):

1×10^{10} vp/剂量的 Ad. CMV. LacZ (Lot# 1351.122)

- 10 0.4%, 0.2%, 0.1% 和 0.05% 的正十二烷基 - β -D- 麦芽苷 (Lot#100K5308)。

在灌输到所述膀胱之前即刻将等体积的 2 $\times$ DDM 与 2 $\times$ Ad. CMV. LacZ 混合在一起。用 10 分钟, 20 分钟, 和 45 分钟将 100 μ l 的所述混合物灌输到所述膀胱中。

- 15 **终止点:** 利用 0.1 ml 全器官固定剂(2%中性缓冲福尔马林, 2%戊二醛, 2 mM MgCl₂, 10 mM PBS, pH 7. 4)收集病毒感染后 48 小时的膀胱。

- 结果:** 与不同浓度十二烷基- β -D-麦芽苷组方的 Ad- β gal 病毒产生线性的腺病毒转导率(0.1 % > 0.05 % > 0.025 %)。对于 20 分钟的灌输, 0.1% DDM 组方的 Ad- β gal 病毒在膀胱中产生约 80%基因表达, 而 0.05% DDM 的产生约 40%的基因表达。但在 45 分钟的灌输中, 所有用 0.05%-0.2% DDM 与 Ad- β gal 病毒灌输的动物在小鼠膀胱中具有 100%基因表达。但对于这种组方方法的 10 分钟灌输中, 没有实现可接受的转导率。还发现, 在 DDM 处理之后 10 分钟病毒灌输可实现基因转导。
- 20

此研究表明, 在小鼠膀胱模型中 DDM 能够与 Ad- β gal 病毒组方。此外, 用 DDM 预处理, 所述病毒灌输的时间能够从 45 分钟降低到 10 分钟。

25

不同的稀释剂在由腺病毒感染的小鼠膀胱尿道上皮中的作用

动物: 雌性 Balb/c 小鼠(Taconic 实验室)-2/组

- 研究设计:** 检测不同稀释剂对 DDM(QQ5minQ)预处理后小鼠尿道上皮的腺病毒感染的作用。在对小鼠膀胱进行灌输 45 分钟之前, 用所述的稀释剂对所述病毒进行 100 倍的稀释。
- 30

剂量/途径(病毒颗粒#/剂量):

1×10^9 vp/剂量的 Ad. CMV. LacZ (Lot# 1351.122)

十二烷基- β -D-麦芽苷 (Lot# 100K5308)。

稀释剂(A): 0.9%氯化钠注射液(Baxter Lot# 1A1322); (B): 2.5%右旋糖和 0.45%氯化钠注射液 (Baxter Lot# C529040); 及(C): 血浆-lyte A 注射液 pH 7.4 (Baxter Lot# C558106); 和 ARCA 缓冲液。

终止点: 利用 0.1 ml 全器官固定剂(2%中性缓冲福尔马林, 2%戊二醛, 2 mM MgCl_2 , 10 mM PBS, pH 7.4)收集病毒感染后 48 小时的膀胱。

结果: 在接受不同稀释剂稀释的病毒的小鼠膀胱 Ad- β gal 基因表达水平间没有显著差异。在小鼠膀胱中所有动物有 >90 % 的 Ad- β gal 基因表达。

利用不同化学试剂对 SD 大鼠膀胱上皮进行预处理的腺病毒剂量滴定

动物: 雌性 Sprague Dawley 大鼠(Taconic 实验室)-2/组

研究设计: 检测 SDS 或 DDM 预处理后不同剂量腺病毒对大鼠膀胱上皮的病毒感染性。此研究还观察了针对腺病毒感染性的膀胱容积和残余 SDS 或 DDM 间的关系。

剂量/途径:

4×10^9 和 4×10^{10} vp/剂量的 Ad. CMV. LacZ (Lot# 1351.122)

0.1 %十二烷基- β -D-麦芽苷 (Lot#100K5308)。

0.1% SDS (Integra Lot#836011 和 Lot#BK14J11)

将 400 μ l 的 SDS 或 DDM 灌输到膀胱中(QQ5minQ)中, 随后进行 6 次 PBS 冲洗, 然后腺病毒感染 15 分钟。

终止点: 利用 0.2ml 全器官固定剂(2%中性缓冲福尔马林, 2%戊二醛, 2 mM MgCl_2 , 10 mM PBS, pH 7.4)收集病毒感染后 48 小时的膀胱。

结果: 在接受不同量 SDS 和 DDM 预处理的大鼠膀胱 Ad- β gal 基因表达水平间没有显著差异。在用 4×10^{10} vp 腺病毒感染的大鼠膀胱中 Ad- β gal 基因表达达到 >90 %, 而用 4×10^9 vp 腺病毒感染的大鼠膀胱中 Ad- β gal 基因表达为 30%-50%。发现, 与小鼠膀胱比较, 大鼠膀胱需要高出 10 倍剂量的腺病毒才能达到相似的 Ad- β gal 基因表达水平。SDS 与 DDM 预处理同样对去除膀胱上皮的 GAG 层有效。

在小鼠膀胱尿道上皮的腺病毒感染前作为预处理剂的十二烷基- β -D-麦芽苷的效果

动物: 雌性 Balb/c 小鼠(Taconic 实验室)-2/组

- 5 **研究设计:** 检测来自两个不同供应商的预处理试剂 DDM 在较大组动物中增强所述小鼠膀胱尿道上皮腺病毒感染作用。

剂量/途径:

1×10^{10} vp/剂量的 Ad. CMV. LacZ (Lot# 1351.122)

十二烷基- β -D-麦芽苷 (Lot # 018H7250 和 Lot # P21/39/092)

- 10 将 100 μ l 的 DDM 灌输到膀胱(QQ5minQ)中, 随后进行 3 次 PBS 冲洗, 然后腺病毒感染 15 分钟。

终止点: 利用 50 μ l 全器官固定剂(2%中性缓冲福尔马林, 2%戊二醛, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM PBS, pH 7.4)收集病毒感染后 48 小时的膀胱。

- 15 **结果:** 在接受这两种不同量 DDM 预处理的小鼠膀胱间 Ad- β gal 基因表达水平没有显著差异。在每一种情况下, Ad- β gal 基因表达达到 >90 %。因此, 来自任一厂商的 DDM 都是小鼠膀胱腺病毒感染化学增强剂的较好的候选者。

在小鼠常位膀胱肿瘤模型的SW780+Luc腺病毒感染前作为化学增强剂的十二烷基- β -D-麦芽苷的效果

- 20 **动物:** 雌性 NCR nu/nu 小鼠(Taconic 实验室)-2/组

- 研究设计:** 显示 DDM 预处理增强小鼠膀胱尿道上皮中的 Ad. Lac Z 感染性。为进一步证明所述增强剂对常位肿瘤的作用, 利用或不用 DDM (QQ5minQ) 预处理患有常位 SW780 膀胱肿瘤的两只小鼠, 随后用 Ad.Lac Z 灌输 15 分钟。在 Ad. Lac Z 感染后 4 天, 检测这些肿瘤细胞中的所述 Ad. Lac Z 基因表达水平。

剂量/途径:

1×10^{10} vp/剂量的 Ad. CMV. LacZ (Lot# 1351.122)

十二烷基- β -D-麦芽苷(Lot # 018H7250)

- 30 将 100 μ l 的 DDM(QQ5minQ)灌输到膀胱中, 随后进行 3 次 PBS 冲洗,

然后腺病毒感染 15 分钟。

终止点: 利用 50 μ l 全器官固定剂(2%中性缓冲福尔马林, 2%戊二醛, 2 mM MgCl_2 , 10 mM PBS, pH 7.4)收集病毒感染后 96 小时的膀胱。

结果: 在 DDM 预处理小鼠膀胱与对照组动物间, Ad- β gal 基因表达水平具有显著差异。在上皮细胞和肿瘤细胞中, 未用 DDM 预处理的 Ad- β gal 基因表达水平较低。用 DDM 预处理, 除了死的坏死肿瘤细胞外, 在膀胱肿瘤中接近 100%的上皮细胞被转导了 Ad- β gal 基因。因此, DDM 预处理能够增强常位肿瘤细胞中的腺病毒感染。

10 在小鼠膀胱尿道上皮腺病毒感染之前对含有不同长度的烷基侧链和不同类型糖分子的 DDM 和 SDS 亚族作为预处理试剂的检测

动物: 雌性 Balb/c 小鼠(Taconic 实验室) -3-2/组

研究设计: 检测含有不同长度的烷基侧链和不同类型糖分子的十二烷基- β -D-麦芽苷(DDM)和十二烷基硫酸钠(SDS)亚族作为预处理试剂增强小鼠膀胱上皮腺病毒感染作用, 用 0.1 %的 PBS 溶解所有化合物。

剂量/途径:

1×10^{10} vp/剂量的 Ad. CMV. LacZ (Lot# 1351.122)

0.1 %十二烷基- β -D-麦芽苷 (Lot P21/39/092)及 0.1% SDS (Lot#101 K0036)用于本研究的阳性对照。

20 在不同的化合物(QQ5minQ)预处理之后, 将 100 μ l 的 Ad- β gal 病毒在 15 分钟通过膀胱内给药灌输到膀胱中。

终止点: 利用全 50 μ l 器官固定剂(2%中性缓冲福尔马林, 2%戊二醛, 2 mM MgCl_2 , 10 mM PBS, pH 7.4)收集病毒感染后 48 小时的膀胱。

结果: 对于 DDM 亚族化合物, 具有长于 C12 烷基侧链长度的化合物具有最好的增强剂活性。也评价了具有 C8, C10, C12, C13 和 C14 烷基侧链的 DDM 亚族化合物。对于 SDS 亚族化合物, 具有短于 C12 长度的烷基侧链化合物 Ad- β gal 基因表达水平较低。也评价了具有 C8, C10, C12 烷基侧链的 SDS 亚族化合物。

除蔗糖单月桂酸酯外, 糖分子类型不出现对这些作为预处理增强剂的化合物的效力的显著作用。尽管不希望被理论所限制, 但根据目前所

掌握的数据，我们相信所述的二糖链可增强腺病毒的感染能力。

引导效力研究：小鼠 SW780+Luc 常位膀胱肿瘤模型中的 CG8840 处理

动物：6/组雌性 NCR nu/nu 小鼠(Taconic 或 Simonsen 实验室)用于 CG8840

5 研究，3/组用于 CG7870 研究

研究设计：检测膀胱特异肿瘤分解病毒 CG8840 及前列腺特异肿瘤分解病毒 CG7870 的效力。对于 CG8840 使用两种处理方案： 1×10^{10} 和 1×10^8 vp/剂量。对于 CG7870 使用一种处理方案： 1×10^{10} vp/剂量。每周使用一个剂量的病毒传输到膀胱中，连续 3 周。

10 **剂量/途径：**

1 百万 SW780+Luc 细胞克隆#19 (P4)

CG8840 Lot# 1408.190; CG7870 (Lot#38.145)

0.1%十二烷基- β -D-麦芽苷(Lot#018H7250)

15 在 PBS 中制备的 15 mg/ml 荧光素(Xenogen cat# XR-1001)底物溶液并用 0.2 μ M 滤膜过滤。

将 120 μ l 的 1×10^7 细胞/ml SW780+luc 细胞等分到每个试管中并在灌输前保持在冰中。每一小鼠膀胱用一个等份。

终止点：每周进行小鼠膀胱的活体成像共 10 周。对这些提供的膀胱和肾脏样本中进行 H & E 染色和人细胞角蛋白(Cytokeratin)染色。

20 **结果：**在 CG8840 (1×10^{10} vp/剂量)处理的小鼠与对照动物(CG7870 与非病毒处理组)间肿瘤体积的减少有明显的差异。用 1×10^{10} vp/剂量 CG8840 处理的 6 只小鼠中有 3 只在第二剂量灌输后表现完全的肿瘤抑制并直至研究结束(第 10 周)不发生肿瘤。人角蛋白染色表明，在这些小鼠膀胱中没有肿瘤细胞。 1×10^8 vp/剂量的 CG8840 效果不明显，在第 5 周，5 只中的
25 1 只有不完全的肿瘤抑制，并保持隐窝中的肿瘤直至结束。转移到肾脏的肿瘤是患有肿瘤小鼠活存的显著威胁。即使其没有膀胱肿瘤，有肾脏转移的小鼠将很快死亡。

小鼠 SW780+Luc 常位膀胱肿瘤模型中的 CG8840 处理

30 **动物：**雌性 NCR nu/nu 小鼠(Taconic 或 Simonsen 实验室)-10/组

研究设计: 此研究用于观察膀胱特异肿瘤分解病毒 CG8840 处理对膀胱肿瘤模型的作用。通过膀胱内给药分别用 15 分钟和 30 分钟将 CG8840 病毒灌输到所述的膀胱中。为减少肾脏肿瘤转移, 在 SW780 肿瘤细胞抑制中检测了两种不同的 DDM 预处理步骤: (1) 0.1% DDM Q5minQ; 和
5 (2) 0.1% DDM Q10min。

剂量/途径:

1 百万 SW780+Luc 细胞克隆#19 (P4)

CG8840 Lot# 1408.190. 0.1%十二烷基- β -D-麦芽苷(Lot#018H7250)。

在 PBS 中制备的 15 mg/ml 荧光素(Xenogen cat# XR-1001)底物溶液
10 并用 0.2 μ M 滤膜过滤。

将 90 μ l 的 1.1×10^7 细胞/ml 的 SW780+luc 细胞等分到每个试管中并在灌输前保持在冰中。每一小鼠膀胱用一个等份。

终止点: 每周进行小鼠膀胱的活体成像共 8 周。对这些提供的膀胱和肾脏样本进行 H & E 染色和人细胞角蛋白(Cytokeratin)染色。

15 **结果:** 在 CG8840 (15 分钟和 30 分钟的病毒处理)处理的小鼠与对照动物间肿瘤体积的减少有明显的差异。特别是 15 分钟病毒处理的 9 只小鼠中有 7 只在第一次病毒处理后表现明显的肿瘤体积抑制。其中 5 只直至研究结束不发生肿瘤。用连续 3 周 3 个剂量的 1×10^{10} vp/剂量注射的 CG8840 处理对根除小鼠膀胱常位 SW780 肿瘤非常有效。然而, 较长的病毒灌输
20 时间(即超过 15 分钟)在肿瘤细胞中并不产生病毒拷贝数量的增加。

对于 SW780 肿瘤细胞移植, 0.1% DDM 预处理 Q10 min, 冲洗, 在常位肿瘤的小鼠中很少观察到肾脏肿瘤转移。

进行了鉴定腺病毒与各种试剂的匹配性的多种附加试验。这些研究如下所述。

25 **研究#1 Ad5-LacZ 与乙醇和尿液的相容性**

在此研究中, 在斑块分析之前, 每一样本在 37°C 孵育 1 小时, 此研究的数据如以下表 3 所示。

表 3：孵育(EtOH, 尿液)后的腺病毒稳定性

	滴度	平均	Stdev.	比值
样本名称	vp/mL	pfu/mL		vp/pfu
ARCA 中的 Ad5-Lac Z	1.30E+12	5.85E+10	1.49E+10	22.23
ARCA 40% EtOH 中的 Ad5-Lac Z	7.80E+11	6.36E+07	1.68E+07	12255.34
ARCA 5% EtOH 中的 Ad5-Lac Z	1.24E+12	5.07E+10	0.00E+00	24.47
ARCA 1:100 尿液中的 Ad5-Lac Z	1.30E+10	6.26E+08	2.55E+08	20.75
Ad5-Lac Z, -80°C	1.30E+12	5.90E+10	9.28E+09	22.04
R-06-80 保持 1 小时	6.00E+11	2.34E+10	2.76E+09	25.65
R-06-81	6.00E+11	3.12E+10	8.27E+09	19.24

这些数据表明，与尿液、5%乙醇或 ARCA 在生物温度下孵育后 Ad-LacZ 没有丧失其活性。然而，40 %乙醇使大多数的病毒失活。

5

研究#2: Ad5-LacZ 与乙醇的相容性

对于此研究，在斑块分析之前，每一样本在 37°C 孵育，此研究的数据如以下表 4 所示。

表 4：孵育(EtOH, PBS)腺病毒的稳定性

	滴度	平均	St.dev.	比值
样本名称	vp/mL	pfu/mL		vp/pfu
Ad 5 Lac Z	1.30E+12	4.34E+10	7.58E+09	30
PBS 中的 Ad 5 Lac Z	1.30E+11	5.43E+09	4.26E+08	24
PBS/10 % EtOH	1.30E+11	3.72E+09	4.26E+08	35
PBS/20 % EtOH	1.30E+11	1.81E+09	2.84E+08	72
PBS/30 % EtOH	1.30E+11	<1.1E+5pfu/mL		
1230-054	1.00E+11	9.55E+08	2.13E+08	105
R-06-80	6.00E+11	1.90E+10	6.20E+09	32

上述结果表明，较高浓度的乙醇(即≥0%)会导致部分至全部的腺病毒的失活。

5 研究#3: 腺病毒与所选择的增强剂的相容性

对于此研究，在斑块分析之前，每一样本在 37°C 或 25°C 孵育，此研究的数据如以下表 5 所示。

表 5: 与所选择的增强剂溶液孵育后腺病毒的稳定性

溶液	温度	孵育	滴度	平均	St. Dev.	比值
		时间	vp/mL	pfu/mL		vp/pfu
无	5°C	无	4.23E+11	1.95E+10	0.00E+00	22
羟氯生	37°C	1 小时	2.12E+11	8. 82E+05	1.56E+05	240287
十二烷基 麦芽苷	37°C	1 小时	2.12E+11	1.36E+10	1.38E+09	16
聚多卡醇	37°C	1 小时	2.12E+11	1.22E+10	2.07E+09	17
羟氯生	25°C	2 小时	2.12E+11	2. 18E+08	0.00E+00	974
十二烷基 麦芽苷	25°C	2 小时	2.12E+11	1.32E+10	6.89E+08	16
聚多卡醇	25°C	2 小时	2.12E+11	1.02E+10	4.82E+09	21
无	-70°C	无	6.00E+11	2.76E+09	2.13E+08	21.7

10

从以上数据可以看出，十二烷基麦芽苷和聚多卡醇与所述腺病毒在试验条件下是相容的而羟氯生在增加温度和孵育时间时可失活所述的病毒。

研究#4: 十二烷基硫酸钠 (SDS)对腺病毒的降解

在不同浓度的 SDS 中，于 37℃ 孵育所述腺病毒样本 15-30 分钟，进行了一系列试验。通过阴离子交换色谱对所产生的物质进行了检测。证明，SDS 的浓度高于或等于 0.025%SDS 会快速降解该病毒。0.0125%的 SDS 孵育 30 分钟后不降低通过方法分析的该颗粒质量和数量。

5

研究#5：十二烷基硫酸钠 (SDS)对腺病毒的降解

在此研究中，腺病毒(Ad-LacZ)制剂(1.0×10^{12} vp/ ml)与 SDS 或 DDM 溶液混合得到腺病毒混合物和每一种表面活性剂。作为混合的结果，SDS 或 DDM 的终浓度为 0.1%，所述的病毒为 5.0×10^{11} vp/ml。在冷冻之前，

10 将这些样本在 25℃ 或 37℃ 孵育 1 小时。将它们送交斑块检测分析。这一研究的结果如以下表 6 所示。

表 6 用 0.1% SDS 或 0.1%DDM 溶液孵育后腺病毒的稳定性

样本 ID 号	复制本	滴度	平均滴度 PFU/mL
Ad-LacZ 1351-122	1	3.70E+10	4.85E+10
	2	6.00E+10	
Ad-LacZ ARCA 1 小时 25 °C	1	2.05E+10	2.05E+10
Ad-LacZ ARCA 1 小时 37 °C	1	2.15E+10	2.15E+10
Ad-LacZ DDM 1 小时 25 °C	1	3.25E+10	3.25E+10
Ad-LacZ DDM 1 小时 37 °C	1	3.55E+10	3.55E+10
Ad-LacZ SDS 1 小时 25 °C	1	无活性	无活性
Ad-LacZ SDS 1 小时 37 °C	1	无活性	无活性

这一试验证明，在升高的温度下对 SDS 溶液腺病毒相对短的暴露会

15 失活所述的病毒。然而，所述 DDM 溶液对腺病毒没有副作用。

下表(表 7)总结了示例性预处理试剂的转导效力。表 7 中，转导效力定义如下：“0”指 0-10%的转导效力；“+”指 10-25%的转导效力；“++”指 25-50%的转导效力；“+++”指 50-75% 的转导效力；及“++++”指>75%的转导效力。

20

表 7: 示例性预处理试剂的转导效力

预处理试剂	转导效力
烷基二糖	
n-十二烷基- β -D-麦芽苷 (C12)	++++
n-十二烷基- α -D-麦芽苷 (C12)	++++
蔗糖单月桂酸酯(C12)	++++
6-环己基己基-b-D-麦芽苷	++++
n-十三烷基- β -D-麦芽苷 (C13)	+++
n-十四烷基- β -D-麦芽苷 (C14)	++
n-癸基- β -D-麦芽苷 (C10)	+
n-辛基-p-D-麦芽苷 (C8)	(0)
烷基硫酸盐(含离子烷基)	
十二烷基硫酸钠 (C12)	++++
癸基硫酸钠 (C10)	+
辛基硫酸钠 (C8)	(0)
十四烷基硫酸钠 (C14)	(0)
十二烷基苯磺酸钠盐	+
烷基(醚)醇	
聚多卡醇	++
聚合表面活性剂	
Triton X-100	+
聚羧亚烃 F68, F127	(0)
Tween 20, Tween 80	(0)

尽管上述说明书教导了本发明的原则，其中所提供的实施例仅是示例性说明的目的，本领域所述技术人员应理解，根据本公开在不偏离本

5 发明真实范围的条件下可作出各种形式和细节上的不同改变。

本发明所引用的所有出版物均全部引用作为本发明的参考。

15%



图 1A



图 1B

20%



图 1C



图 1D



图 1E



图 1F

25%



图 1G



图 1H

30%



图 2A

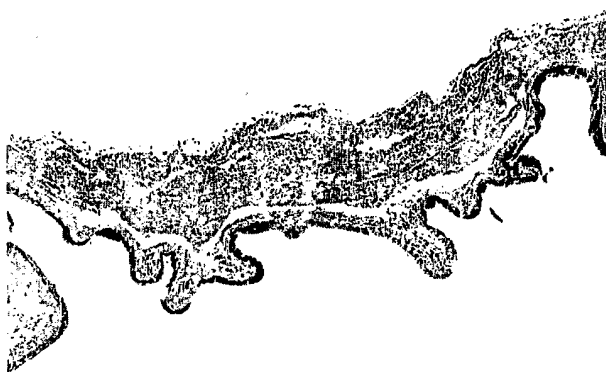


图 2B



图 2C



40X

图 3A



100X

图 3B



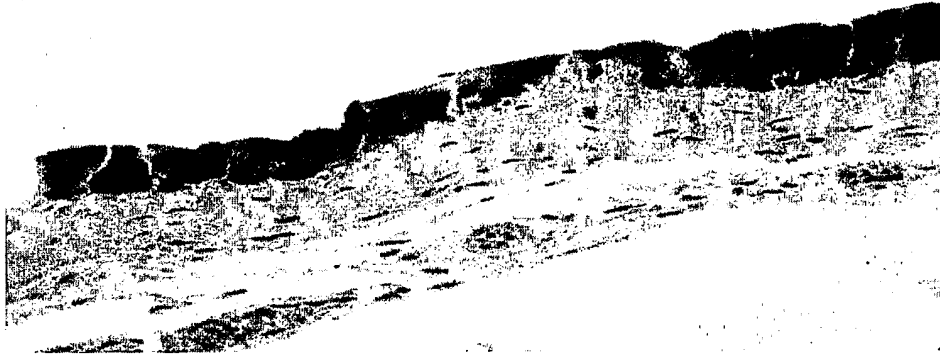
40X

图 3C



100X

图 3D



40X

图 3E



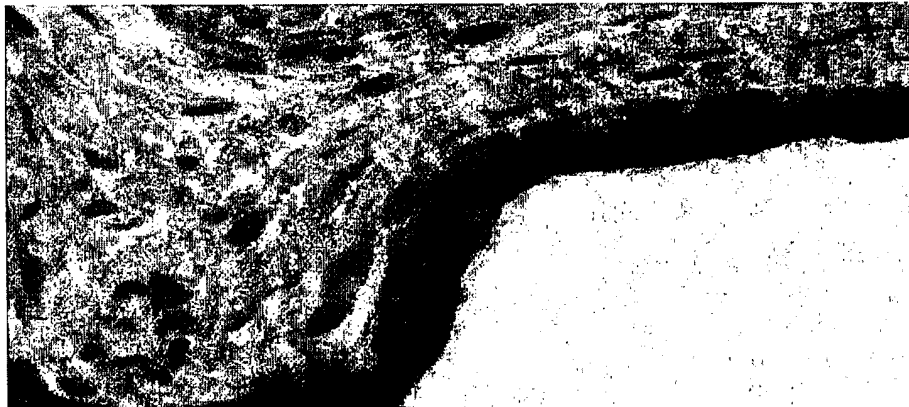
100X

图 3F



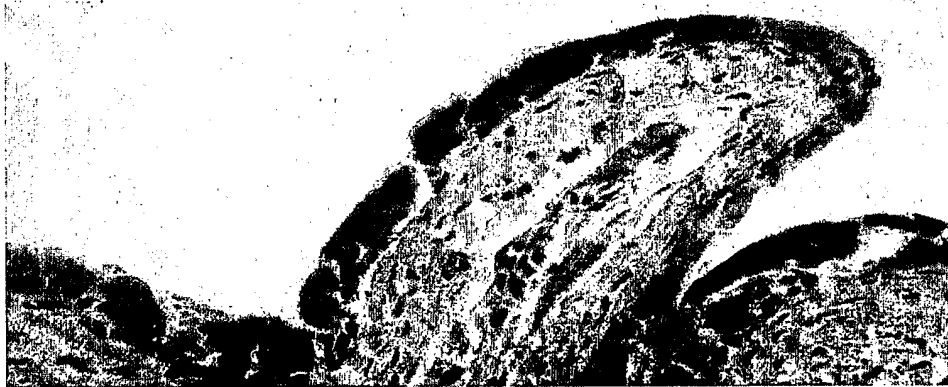
40x

图 4A



100x

图 4B



40x

图 4C



100x

图 4D



40x

图 4E



100x

图 4F

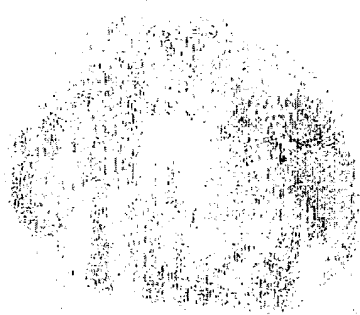


图 5A



图 5B

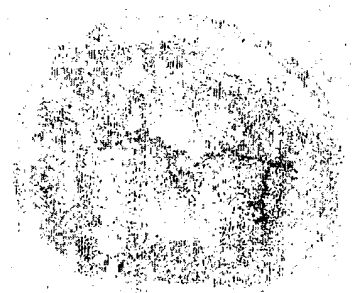


图 5C



图 5D

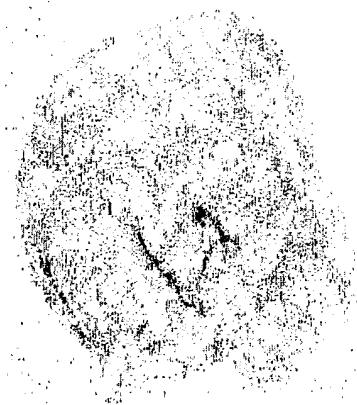


图 6A



图 6B



图 6C



图 6D

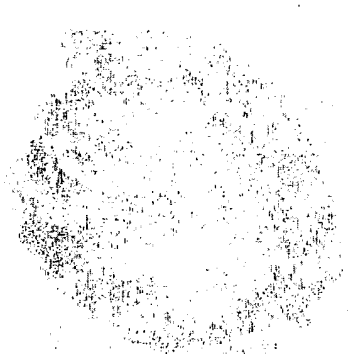


图 7A



图 7B

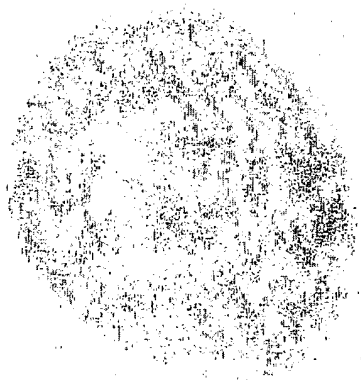


图 7C



图 7D



图 8A



图 8B

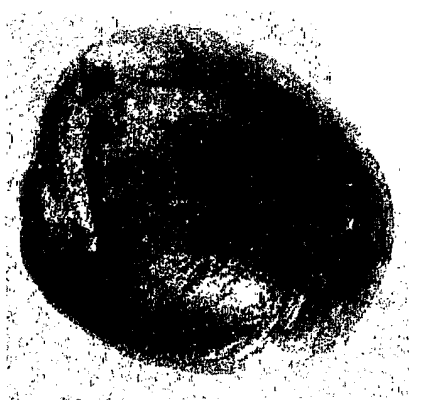


图 8C



图 8D

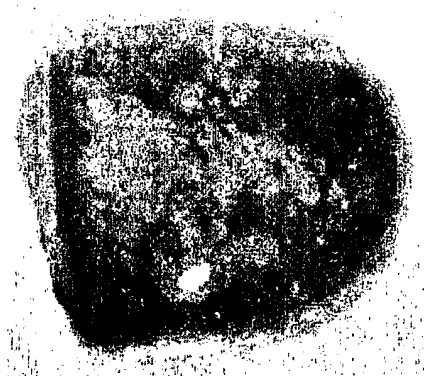


图 8E



图 8F



图 8G



图 8H

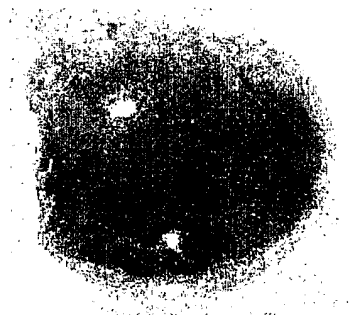


图 8I



图 8J

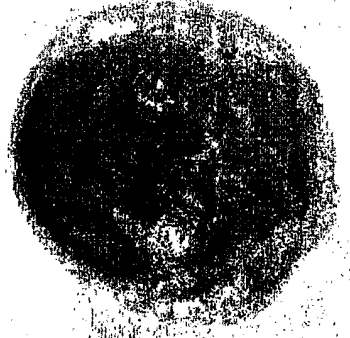


图 8K



图 8L



图 8M

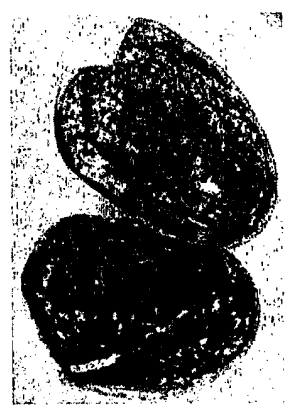


图 8N

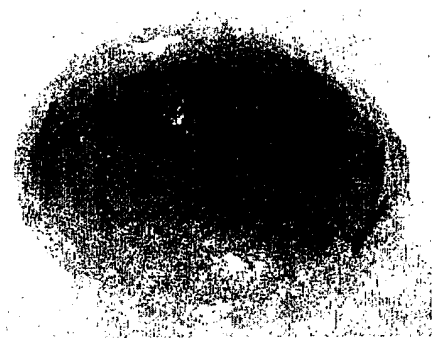


图 9A



图 9B

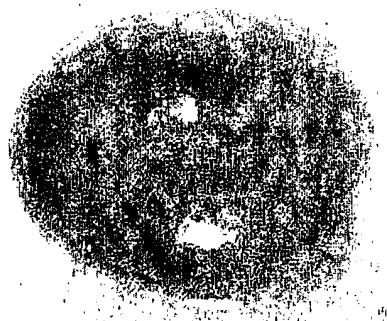


图 9C



图 9D

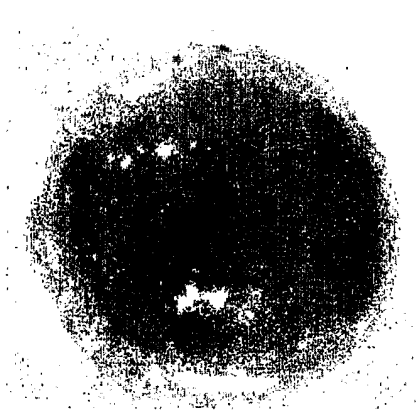


图 9E



图 9F

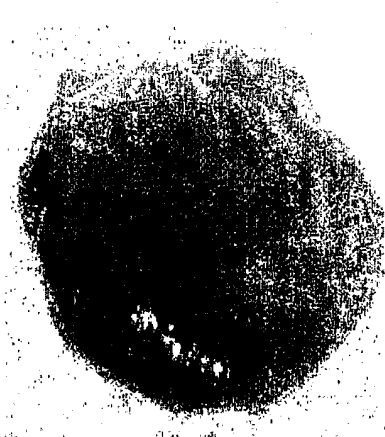


图 9G



图 9H



图 9I



图 9J

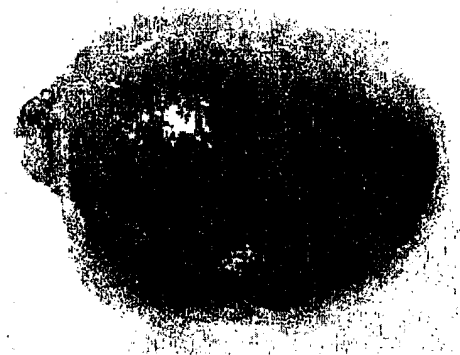


图 9K



图 9L



图 9M

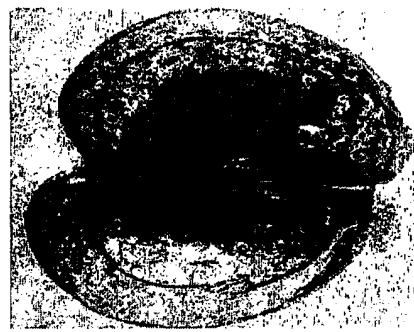


图 9N

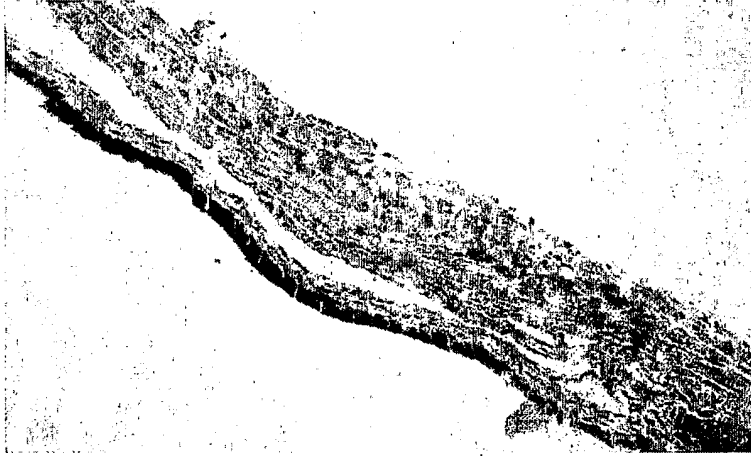


图 10A

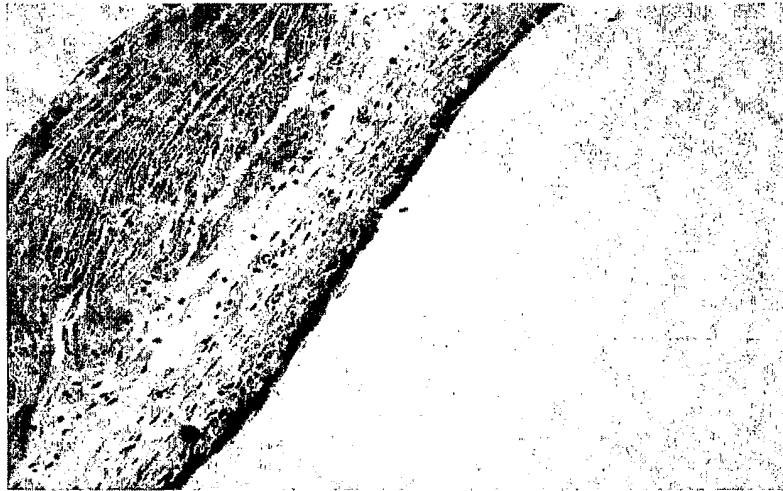


图 10B

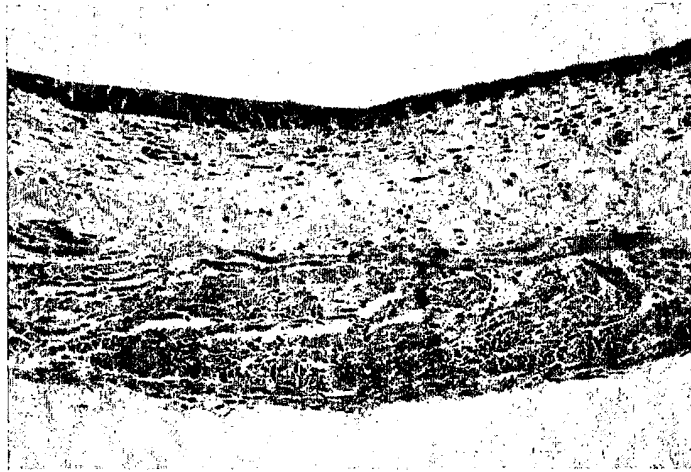


图 11A

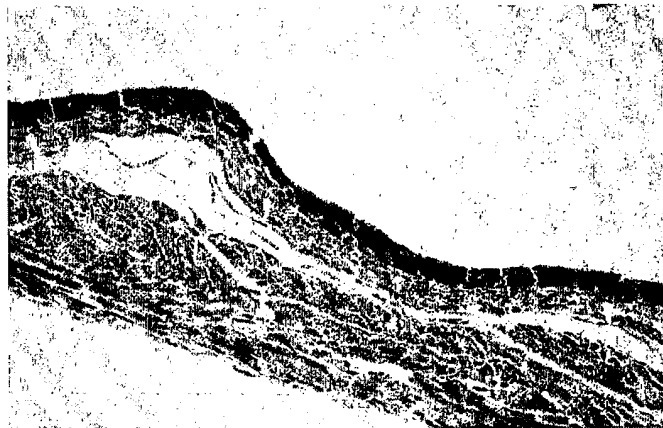
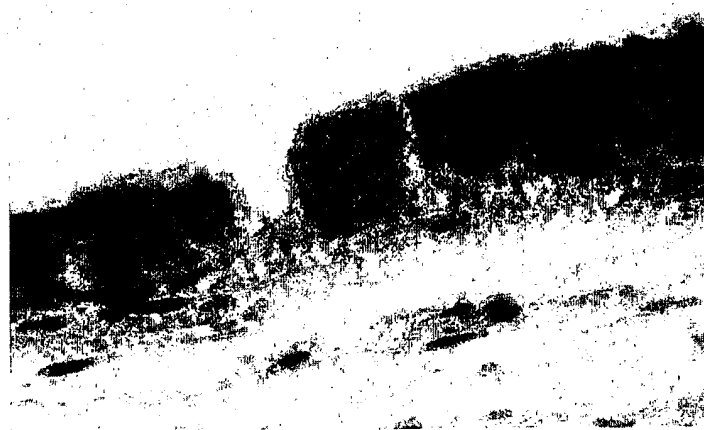


图 11B



40x

图 12A



100x

图 12B



40x

图 12C



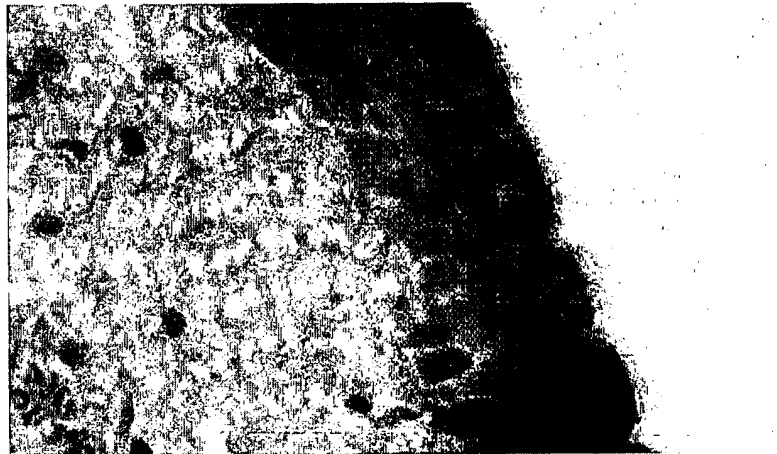
100x

图 12D



40x

图 12E



100x

图 12F



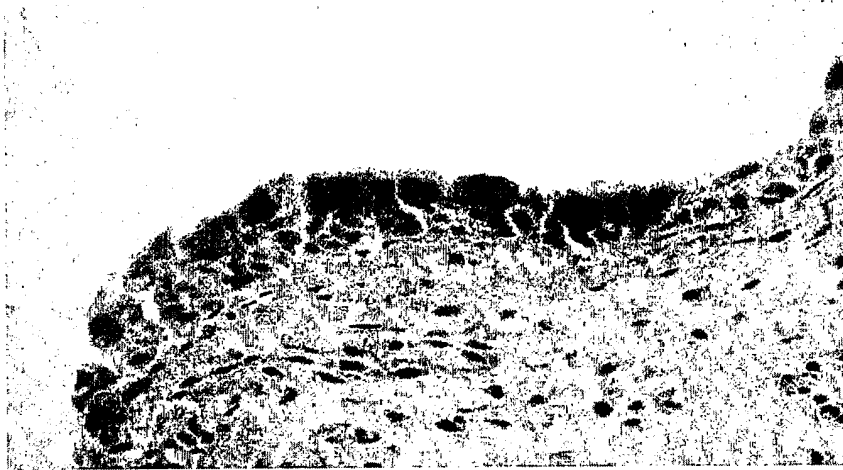
40x

图 13A



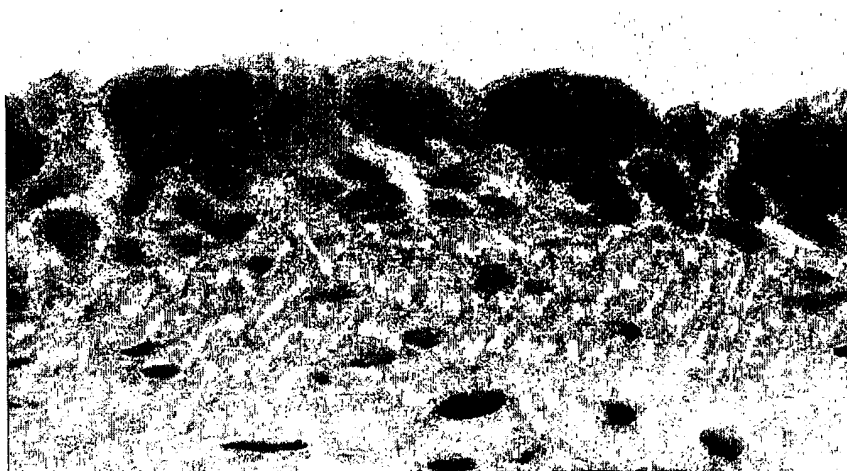
100x

图 13B



40x

图 13C



100x

图 13D



40x

图 13E



100x

图 13F

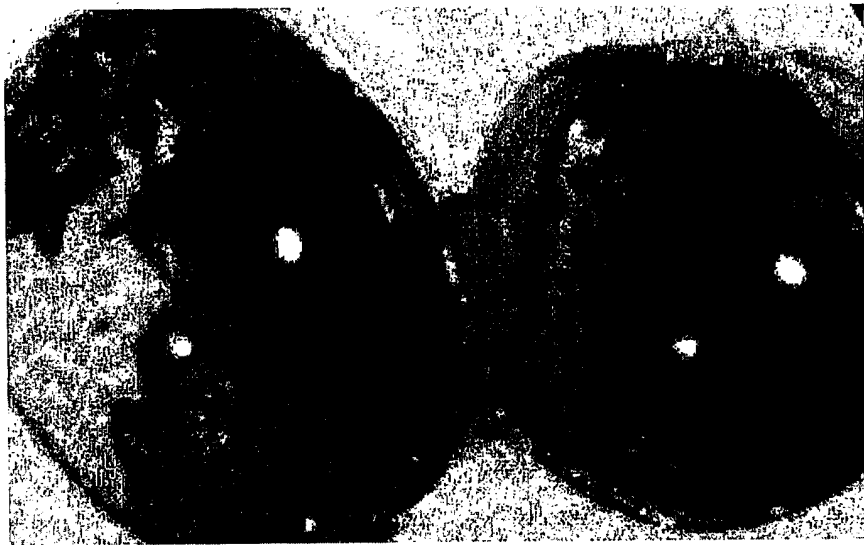
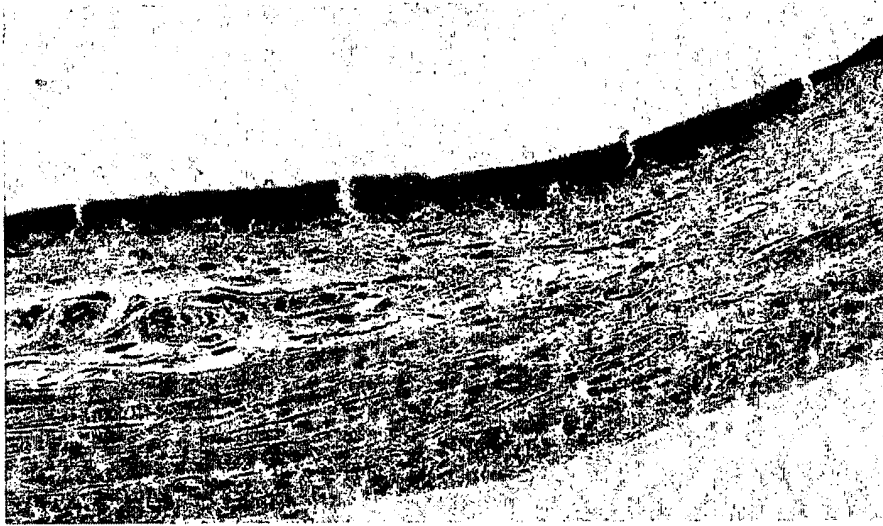
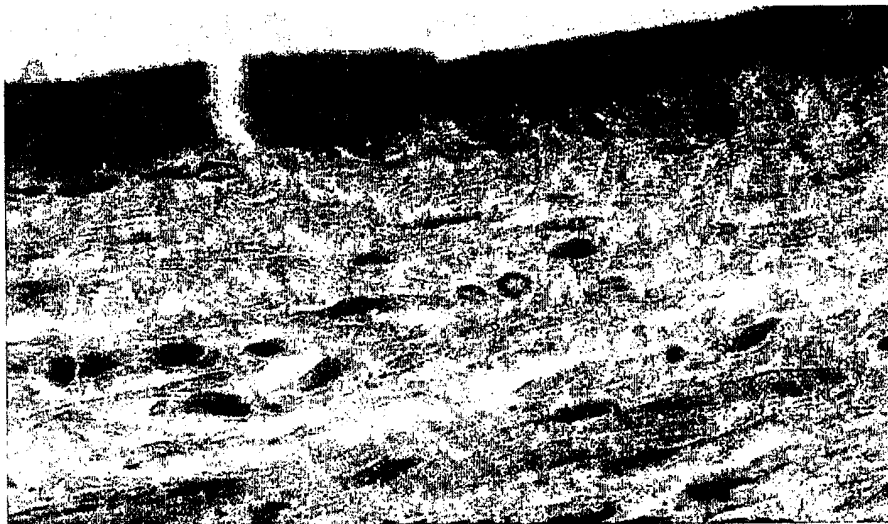


图 14A



40x

图 14B



100x

图 14C



图 15A



40x

图 15B



图 15C

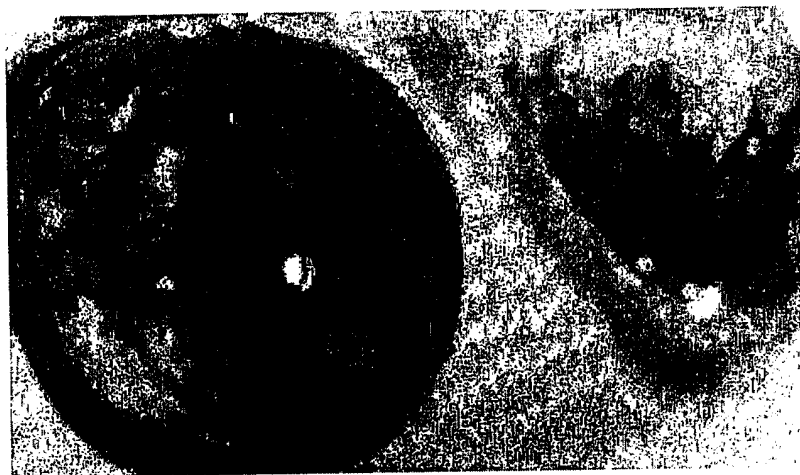
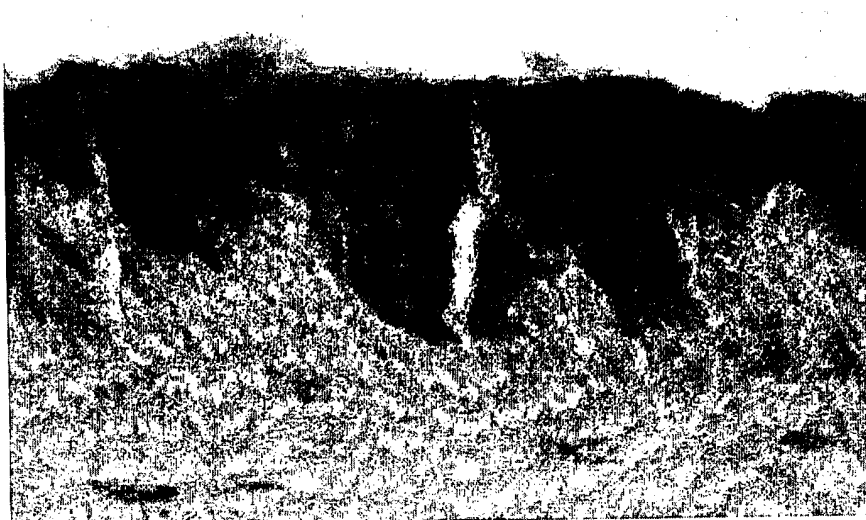
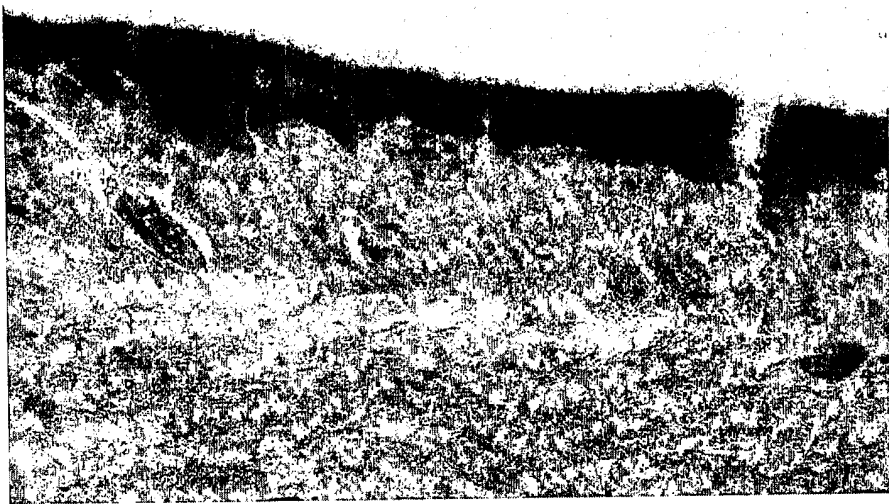


图 16A



40x

图 16B

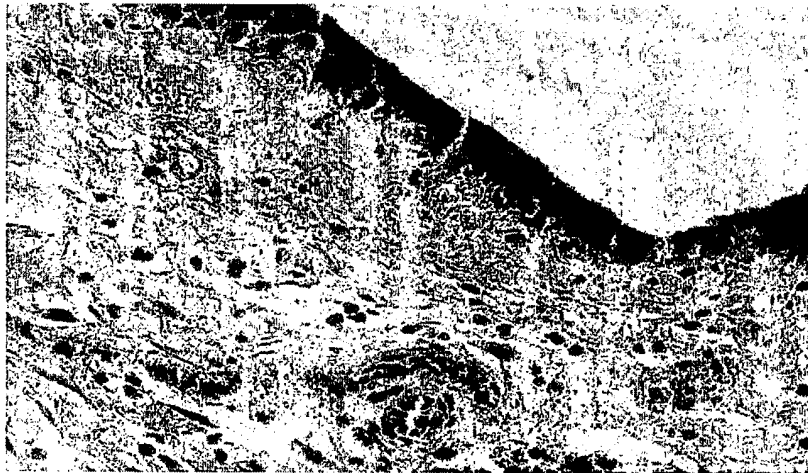


100x

图 16C

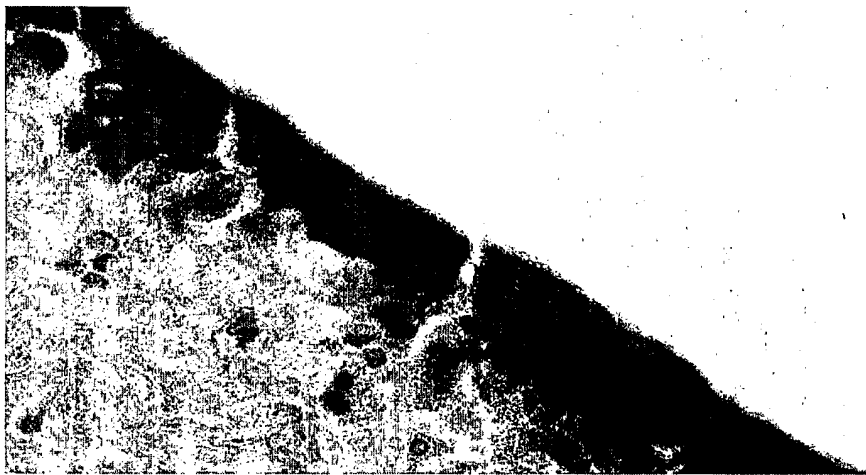


图 17A



40x

图 17B



100x

图 17C

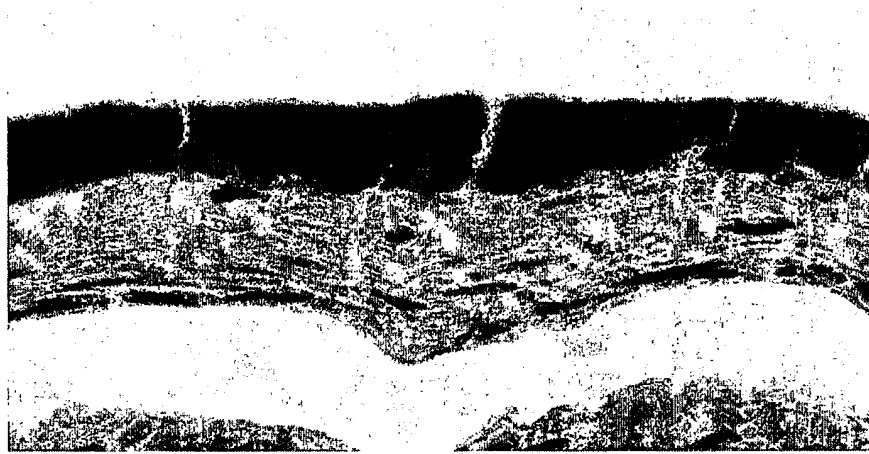


图 18A



40x

图 18B



100x

图 18C



图 19A



40x

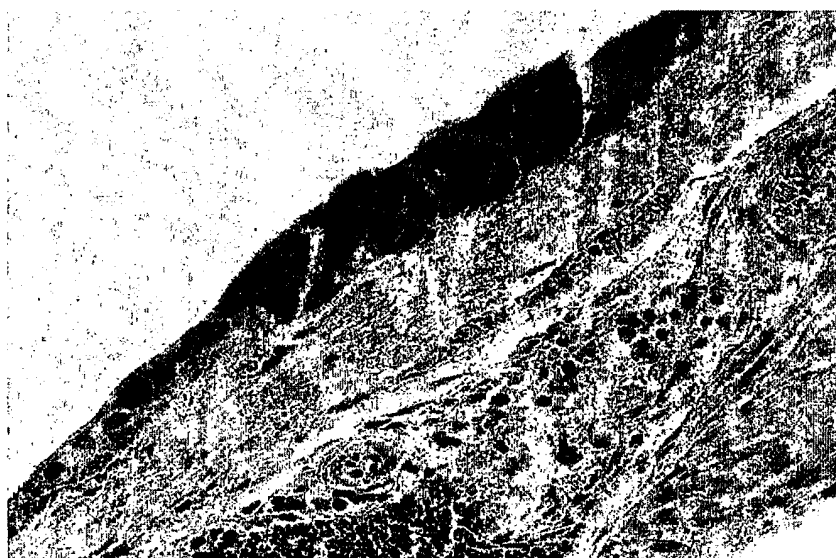
图 19B



图 19C



图 20A



40x

图 20B



100x

图 20C



图 21A

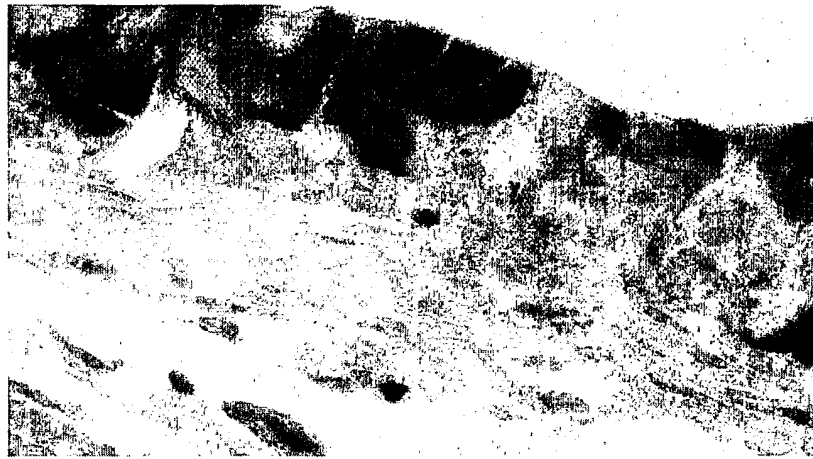


图 21B



40x

图 21C



100x

图 21D



图 22A



图 22B



40x

图 22C



100x

图 22D

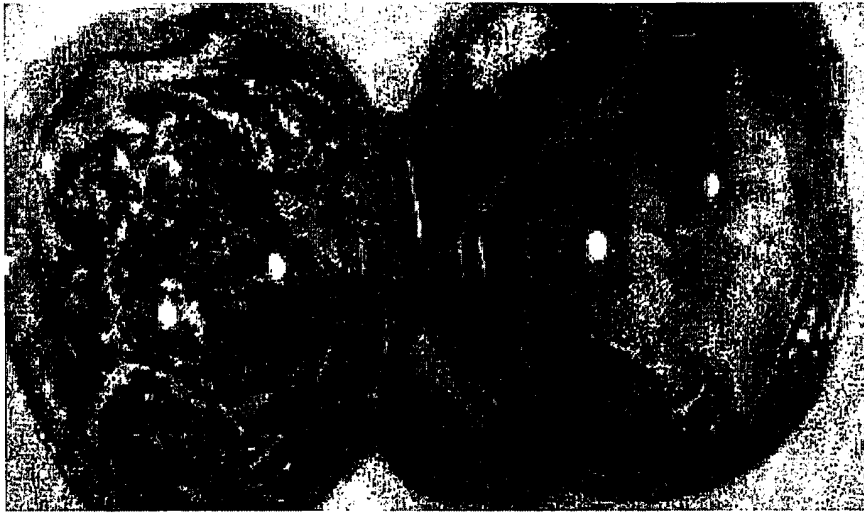
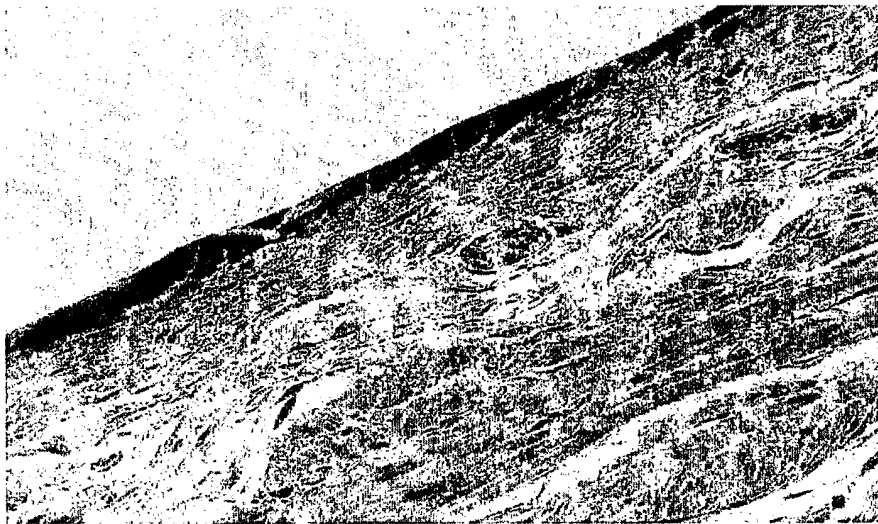


图 23A



40x

图 23B



100x

图 23C

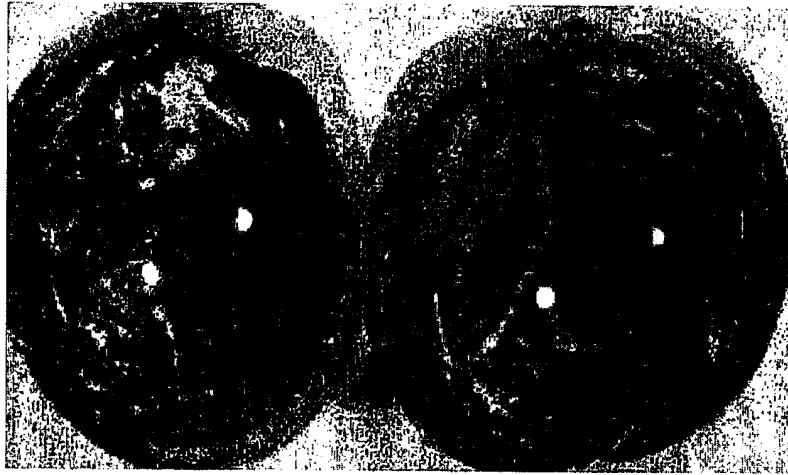
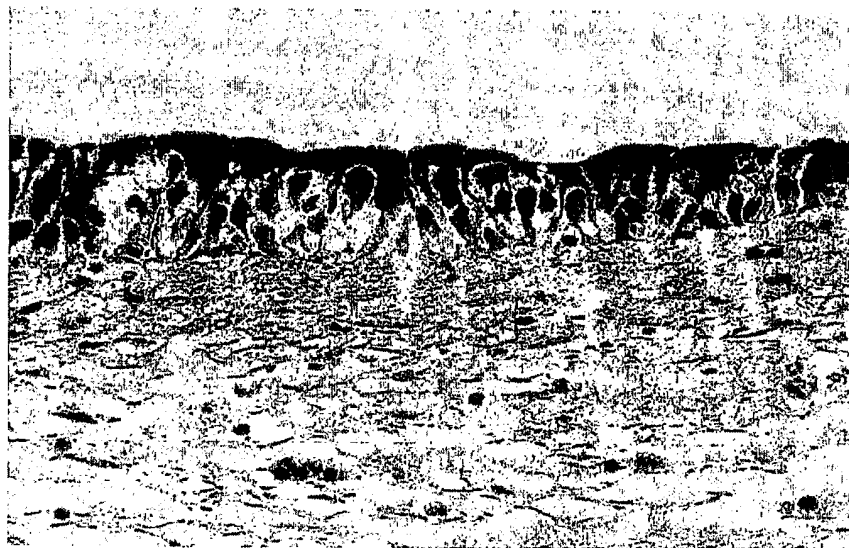


图 24A



40x

图 24B



100x

图 24C



图 25A



40x

图 25B



图 25C



图 26A



40x

图 26B



图 26C

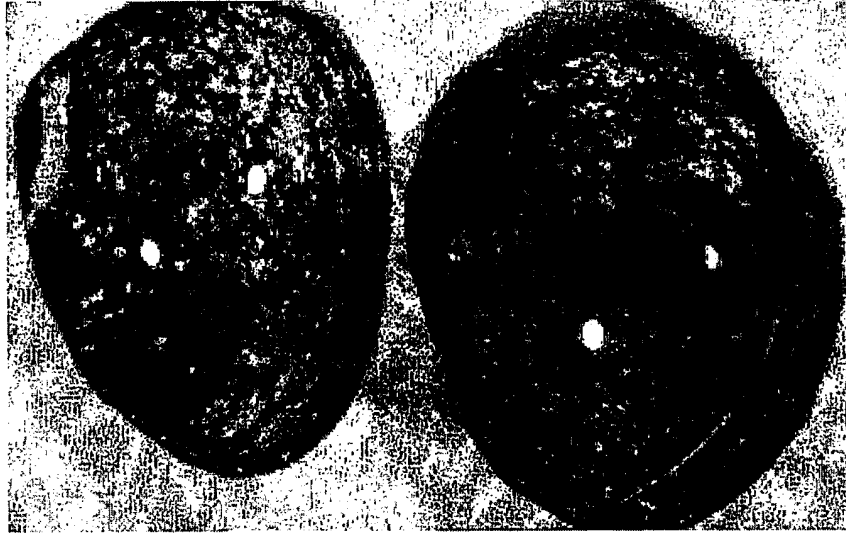
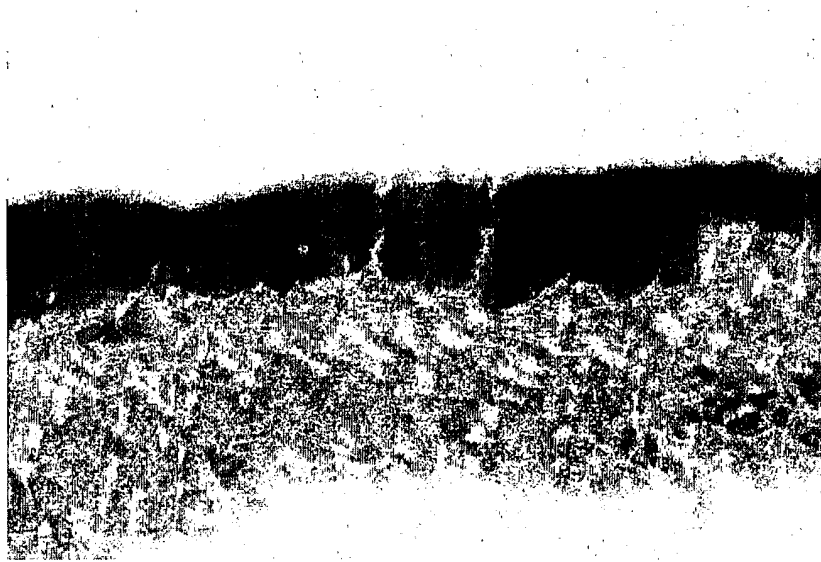


图 27A



40x

图 27B



100x

图 27C



图 28A



40x

图 28B



100x

图 28C

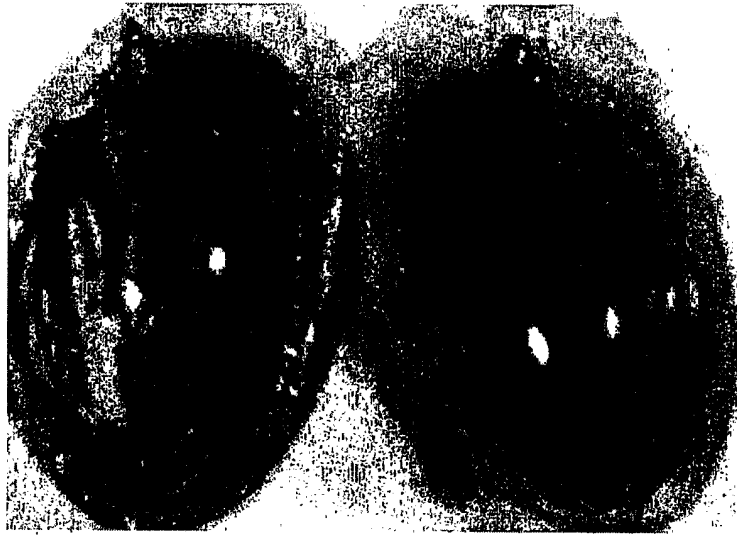
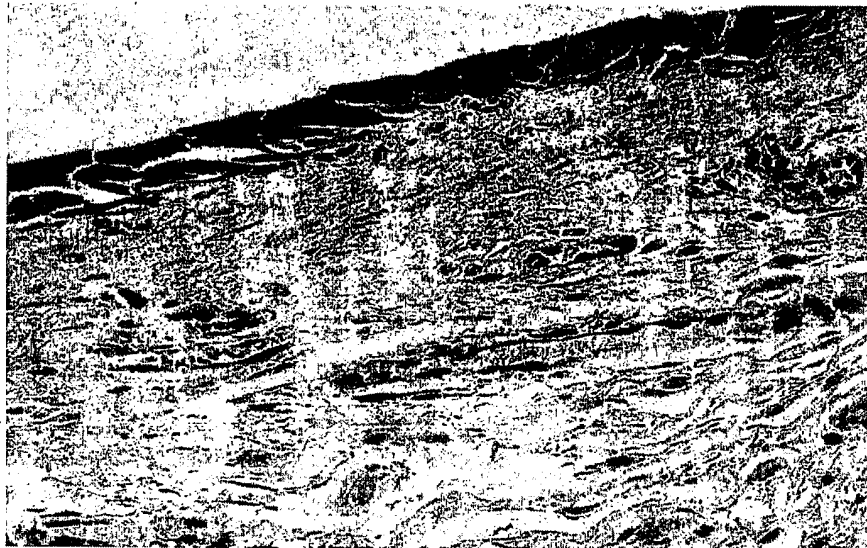


图 29A



40x

图 29B



100x

图 29C



图 30A



40x

图 30B



100x

图 30C



图 31A

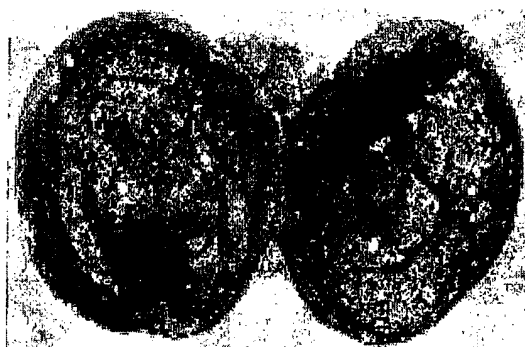


图 31B



图 31C



图 31D

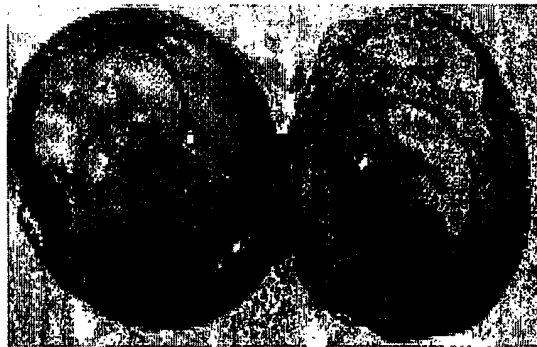


图 31E

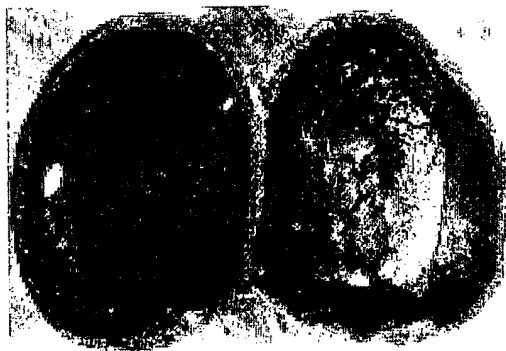


图 32A



图 32B



图 32C