(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116615268 A
(43)申请公布日 2023.08.18

(21)申请号 202180086830.9
(22)申请日 2021.12.22
(30)优先权数据
63/130449 2020.12.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.06.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2021/062198 2021.12.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/137171 EN 2022.06.30
(71)申请人 诺沃库勒有限责任公司
地址 瑞士卢塞恩
(72)发明人 T·沃洛申-塞拉 L·阿维格多 Y·珀拉特 H·玛姆布拉特
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李进 彭昶
(51)Int.Cl.
A61N 1/36(2006.01)

权利要求书4页 说明书22页 附图2页

(54)发明名称

在基因疗法中用于使用交变电场的方法和组合物

(57)摘要

公开了用于运输载体、治疗剂、可检测物或其组合穿过细胞的细胞膜的方法的组合物。还公开了单独地或与施加交变电场组合地使用载体、治疗剂、可检测物或其组合检测和/或治疗肿瘤或癌细胞的方法。

CN 116615268 A

1.一种用于将载体运输穿过细胞的细胞膜的方法,所述方法包含:

给所述细胞施加交变电场一段时间,其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性;和

将所述载体引导至所述细胞,其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜。

2.权利要求1所述的方法,其中所述载体包含能够编码目标序列的核酸序列。

3.权利要求2所述的方法,其中所述目标序列是可选择标志物或治疗剂。

4.权利要求2所述的方法,其中所述载体包含两个目标序列,其中一个目标序列能够编码可选择标志物,且第二目标序列能够编码治疗剂。

5.权利要求3-4中的任一项所述的方法,其中所述治疗剂是cDNA、DNA、mRNA、微RNA、shRNA、siRNA、核酶、指导RNA分子(gRNA)、RNA-指导的内切核酸酶蛋白或Cas9蛋白或Cpf1蛋白CRISPR-Cas。

6.权利要求3-4中的任一项所述的方法,其中所述可选择标志物是二氢叶酸还原酶(DHFR)、胸苷激酶、新霉素、新霉素类似物G418、湿霉素、嘌呤霉素、绿色荧光蛋白(GFP)、潮霉素抗性(Hyg)、新霉素抗性(Neo)或β-半乳糖苷酶(β-gal)。

7.前述权利要求中的任一项所述的方法,其中所述载体是质粒、粘粒、噬菌粒或病毒载体。

8.权利要求7所述的方法,其中所述载体是病毒载体。

9.权利要求8所述的方法,其中所述病毒载体是腺病毒、腺相关病毒、慢病毒或疱疹病毒。

10.前述权利要求中的任一项所述的方法,其中所述细胞是癌细胞或肿瘤细胞。

11.权利要求10所述的方法,其中所述癌细胞是胶质母细胞瘤细胞、子宫肉瘤细胞、乳腺腺癌细胞、胰腺癌细胞、非小细胞肺癌、肝细胞、胃癌细胞或脑癌细胞。

12.权利要求1-11中的任一项所述的方法,其中以250kHz至350kHz之间的频率施加所述交变电场。

13.权利要求1-11中的任一项所述的方法,其中以50至190kHz之间的频率施加所述交变电场。

14.权利要求1-11中的任一项所述的方法,其中以210至400kHz之间的频率施加所述交变电场。

15.权利要求1-11中的任一项所述的方法,其中所述交变电场具有至少1V/cm RMS的场强度。

16.权利要求1-11中的任一项所述的方法,其中所述交变电场具有50至190kHz之间的频率。

17.权利要求1-11中的任一项所述的方法,其中所述交变电场具有210至400kHz之间的频率。

18.权利要求1-11中的任一项所述的方法,其中所述交变电场具有至少1V/cm RMS的场强度。

19.权利要求1-11中的任一项所述的方法,其中所述交变电场具有1至4V/cm RMS之间的场强度。

20.权利要求1-19中的任一项所述的方法,其中所述引导载体的步骤在给定时间开始,且其中所述施加交变电场的步骤在给定时间之后至少12小时结束。

21.权利要求1-20中的任一项所述的方法,其中所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1小时开始。

22.权利要求11所述的方法,其中所述癌细胞包含胶质母细胞瘤细胞,并且所述交变电场具有在250kHz至350kHz之间的频率。

23.权利要求11所述的方法,其中所述癌细胞包含子宫肉瘤细胞,并且所述交变电场具有在125kHz至175kHz之间的频率。

24.权利要求11所述的方法,其中所述癌细胞包含乳腺腺癌细胞,并且所述交变电场具有在75kHz至175kHz之间的频率。

25.前述权利要求中的任一项所述的方法,其中肿瘤内地、颅内地、心室内地、鞘内地、硬膜外地、硬膜内地、血管内地、静脉内地(靶向或非靶向)、动脉内地、肌肉内地、皮下地、腹膜内地、口服地、鼻内地、经由肿瘤内注射(例如计算机断层摄影术指导的,在外科手术或活组织检查过程中)或经由吸入引导所述载体。

26.前述权利要求中的任一项所述的方法,其中以靶向或非靶向方式将所述载体引导至细胞。

27.前述权利要求中的任一项所述的方法,其中引导所述载体1次、2次、3次或更多次。

28.前述权利要求中的任一项所述的方法,其中将所述载体提供在药物组合物中。

29.前述权利要求中的任一项所述的方法,其中所述药物组合物进一步包含化学治疗剂。

30.前述权利要求中的任一项所述的方法,其中所述载体进一步包含一个或多个靶向部分。

31.权利要求30所述的方法,其中所述一个或多个靶向部分对所述细胞具有特异性。

32.权利要求30-31中的任一项所述的方法,其中所述一个或多个靶向部分是肽、抗体、抗体片段或治疗剂。

33.一种用于降低细胞的生存力的方法,所述方法包含:给所述细胞施加第一频率的第一交变电场第一时间段,其中所述第一频率的第一交变电场给所述细胞施加第一时间段增加所述细胞的细胞膜的渗透性;将载体引导至所述细胞,其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜;和给所述细胞施加第二频率的第二交变电场第二时间段,其中所述第二频率不同于所述第一频率,且其中所述第二频率的第二交变电场降低所述细胞的生存力。

34.权利要求33所述的方法,其中所述细胞中对交流电的电流密度和/或功率损耗密度被改变。

35.权利要求33-34所述的方法,其中所述细胞是癌细胞或肿瘤细胞。

36.权利要求33-35中的任一项所述的方法,其中所述第二交变电场是肿瘤治疗场。

37.权利要求33-36中的任一项所述的方法,其中所述癌细胞是胶质母细胞瘤细胞、子宫肉瘤细胞、乳腺腺癌细胞、胰腺癌细胞、非小细胞肺癌、肝细胞、胃癌细胞或脑癌细胞。

38.权利要求37所述的方法,其中所述癌细胞包含胶质母细胞瘤细胞,所述第一频率是在250kHz至350kHz之间,并且所述第二频率是在150kHz至250kHz之间。

39.权利要求37所述的方法，其中所述癌细胞包含子宫肉瘤细胞，所述第一频率是在125kHz至175kHz之间，并且所述第二频率是在75kHz至125kHz之间。

40.权利要求37所述的方法，其中所述癌细胞包含乳腺腺癌细胞，所述第一频率是在75kHz至175kHz之间，并且所述第二频率是在100kHz至300kHz之间。

41.权利要求33-40中的任一项所述的方法，其中所述引导载体的步骤在给定时间开始，且其中所述施加第一交变电场的步骤在给定时间之后至少12小时结束。

42.权利要求33-40中的任一项所述的方法，其中所述施加第一交变电场的步骤在给定时间之前至少1小时开始。

43.权利要求33-42中的任一项所述的方法，其中所述第二时间段包含多个非连续时间区间，在所述区间中将所述第二频率的第二交变电场施加于所述癌细胞，其中所述多个非连续时间区间总共加起来达至少1周。

44.权利要求33-43中的任一项所述的方法，其中所述癌细胞存在于活受试者的身体中，其中通过将第一交变电场施加于所述受试者的身体而将所述第一交变电场施加于所述癌细胞，通过将第二交变电场施加于所述受试者的身体而将所述第二交变电场施加于所述癌细胞，且其中所述引导包含将所述载体施用给所述受试者。

45.权利要求33-44中的任一项所述的方法，其中所述第一交变电场具有至少1V/cm RMS的场强度。

46.一种降低肿瘤或癌细胞的生存力的方法，所述方法包含：

给所述肿瘤或癌细胞施加第一频率的第一交变电场一段时间，其中所述第一交变电场的施加增加所述肿瘤或癌细胞膜的渗透性；

将载体引导至所述肿瘤或癌细胞，其中所述增加的肿瘤或癌细胞膜的渗透性使得所述载体能够穿过所述肿瘤或癌细胞膜，

其中所述载体包含能够编码能够编码治疗剂的核酸序列，且其中，一旦所述载体穿过所述肿瘤或癌细胞膜，所述载体编码所述治疗剂，其中所述治疗剂的存在会降低所述肿瘤或癌细胞的生存力。

47.权利要求49中的任一项所述的方法，所述方法进一步包含施加第二频率的第二交变电场。

48.权利要求49-47中的任一项所述的方法，其中所述第二交变电场是肿瘤治疗场。

49.一种检测肿瘤或癌细胞的方法，所述方法包含

给所述肿瘤或癌细胞施加第一频率的第一交变电场一段时间，其中所述第一交变电场的施加增加所述肿瘤或癌细胞膜的渗透性；

将载体引导至所述肿瘤或癌细胞，其中所述增加的肿瘤或癌细胞膜的渗透性使得所述载体能够穿过所述肿瘤或癌细胞膜，

其中所述载体包含能够编码可选择标志物的核酸序列，且其中，一旦所述载体穿过所述肿瘤或癌细胞膜，所述载体编码所述可选择标志物；和

检测所述可选择标志物，其中所述可选择标志物的存在指示肿瘤或癌细胞的存在。

50.权利要求49所述的方法，所述方法进一步包含治疗所述肿瘤或癌细胞。

51.权利要求49-50中的任一项所述的方法，所述方法进一步包含施加第二频率的第二交变电场。

52.权利要求49-51中的任一项所述的方法,其中所述第二交变电场是肿瘤治疗场。

53.权利要求49-52中的任一项所述的方法,其中所述癌细胞是胶质母细胞瘤细胞、子宫肉瘤细胞、乳腺腺癌细胞、胰腺癌细胞、非小细胞肺癌、肝细胞、胃癌细胞或脑癌细胞。

54.权利要求53所述的方法,其中所述癌细胞包含胶质母细胞瘤细胞,所述第一频率是在250kHz至350kHz之间。

55.权利要求53所述的方法,其中所述癌细胞包含子宫肉瘤细胞,所述第一频率是在125kHz至175kHz之间,并且所述第二频率是在75kHz至125kHz之间。

56.权利要求53所述的方法,其中所述癌细胞包含乳腺腺癌细胞,所述第一频率是在75kHz至175kHz之间。

57.权利要求49-56中的任一项所述的方法,其中所述引导载体的步骤在给定时间开始,且其中所述施加第一交变电场的步骤在给定时间之后至少12小时结束。

58.权利要求49-57中的任一项所述的方法,其中所述施加第一交变电场的步骤在给定时间之前至少1小时开始。

59.权利要求49-58中的任一项所述的方法,其中所述癌细胞存在于活受试者的身体中,其中通过将第一交变电场施加于所述受试者的身体而将所述第一交变电场施加于所述癌细胞,通过将第二交变电场施加于所述受试者的身体而将所述第二交变电场施加于所述癌细胞,且其中所述引导包含将所述载体施用给所述受试者。

60.权利要求49-59中的任一项所述的方法,其中所述第一交变电场具有至少1V/cm RMS的场强度。

61.权利要求49-60所述的方法,所述方法进一步包含施用治疗剂。

62.一种检测和治疗肿瘤或癌细胞的方法,所述方法包含:

给所述肿瘤或癌细胞施加第一频率的第一交变电场一段时间,其中所述交变电场的施加增加所述肿瘤或癌细胞膜的渗透性;

将载体引导至所述肿瘤或癌细胞,其中所述增加的肿瘤或癌细胞膜的渗透性使得所述载体能够穿过所述肿瘤或癌细胞膜,

其中所述载体包含能够编码治疗剂和可选择标志物的核酸序列,且其中,一旦所述载体进入所述细胞,所述载体编码所述治疗剂和所述可选择标志物;和

检测所述可选择标志物,其中所述可选择标志物的存在指示肿瘤或癌细胞的存在,且其中由所述载体编码的治疗剂诱导所述肿瘤或癌细胞的细胞凋亡。

63.权利要求62中的任一项所述的方法,所述方法进一步包含施加第二频率的第二交变电场。

在基因疗法中用于使用交变电场的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年12月24日提交的美国临时专利申请号63/130,449的权益,其通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 以前已经证实,在细胞进行有丝分裂时如果将细胞暴露于特定频率范围内的交变电场(AEF),所述AEF可以破坏有丝分裂过程并导致细胞凋亡。这种现象已经被成功用于治疗肿瘤(例如胶质母细胞瘤、间皮瘤等),如美国专利号7,016,725和7,565,205中所述,它们中的每一篇通过引用整体并入本文。并且在治疗肿瘤的上下文中,这些交变电场被称作“TTFields”(或“肿瘤治疗场”)。TTFields疗法非常适合用于治疗肿瘤的原因之一是,TTFields选择性地破坏处于有丝分裂期间的分裂细胞,并且明显对不分裂的细胞没有影响。并且因为肿瘤细胞比人体内的其它细胞更频繁地分裂,因此将TTFields应用于受试者将选择性地攻击肿瘤细胞,而不会伤害其它细胞。同样的现象也已经被成功地证明可用于破坏细菌,如美国专利号9,750,934中所述,其通过引用整体并入本文。并且在这里同样,这种方案非常适合用于破坏细菌的原因之一是,细菌细胞比人体内的其它细胞快得多地分裂。

[0004] 交变电场还已经被证明增加细胞膜的渗透性。在病毒基因疗法方面已经做了很多工作,并且已经用基于病毒的癌症疗法进行了许多在进行中的临床试验。目前没有有效的和特异性的病毒疗法用于癌症患者。需要使用交变电场来帮助将治疗剂递送进细胞中以治疗受试者中的癌症的组合。

发明内容

[0005] 与健康组织或循环细胞相比,将基于病毒的疗法或病毒过表达蛋白(其用于癌细胞相对于正常组织的治疗诊断描绘)与TTFields组合在癌细胞中既具有特异性又具有增强作用。

[0006] 与健康细胞相比TTFields在癌细胞病毒载量中的应用效果差异指示,病毒基因疗法和/或携带可检测标记以相对于正常组织来描绘癌细胞的病毒可以与TTFields组合使用,以允许在癌细胞中的特异性的和增强的作用,并且在健康细胞中没有作用。

[0007] 增强癌细胞中的病毒载量同时降低健康细胞中的病毒载量可以影响使用病毒基因疗法的治疗,并且还可以提供更好的工具来可视化已经被表达可检测标志物的载体感染的癌组织或转移细胞。

[0008] 公开了将组合物运输穿过细胞的细胞膜的方法,所述方法包含给所述细胞施加交变电场一段时间,其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性;和将所述组合物引导至所述细胞,其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述组合物能够穿过所述细胞膜。在某些方面,所述组合物可以是载体、治疗剂、可检测标记或其组合。

[0009] 公开了将载体运输穿过细胞的细胞膜的方法,所述方法包含给所述细胞施加交变

电场一段时间，其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；和将所述载体引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜。

[0010] 公开了降低细胞的生存力的方法，所述方法包含：给所述细胞施加第一频率的第一交变电场第一时间段，其中所述第一频率的第一交变电场给所述细胞施加第一时间段增加所述细胞的细胞膜的渗透性；将组合物引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述组合物能够穿过所述细胞膜；和给所述细胞施加第二频率的第二交变电场第二时间段，其中所述第二频率不同于所述第一频率，且其中所述第二频率的第二交变电场会降低所述细胞的生存力。在某些方面，所述组合物可以是载体、治疗剂、可检测标记或其组合。在某些方面，所述细胞是肿瘤或癌细胞。

[0011] 公开了降低细胞的生存力的方法，所述方法包含给所述细胞施加第一频率的第一交变电场一段时间，其中所述第一交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；将载体引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜，其中所述载体包含能够编码治疗剂的核酸序列，且其中，一旦所述载体穿过所述细胞膜，所述载体编码所述治疗剂，其中所述治疗剂的存在会降低所述细胞的生存力。在某些方面，所述细胞是肿瘤或癌细胞。

[0012] 公开了检测肿瘤或癌细胞的方法，所述方法包含给所述肿瘤或癌细胞施加第一频率的第一交变电场一段时间，其中所述第一交变电场的施加增加所述肿瘤或癌细胞膜的渗透性；将载体引导至所述肿瘤或癌细胞，其中所述增加的肿瘤或癌细胞膜的渗透性使得所述载体能够穿过所述肿瘤或癌细胞膜，其中所述载体包含能够编码可选择标志物的核酸序列，且其中，一旦所述载体穿过所述肿瘤或癌细胞膜，所述载体编码所述可选择标志物；和检测所述可选择标志物，其中所述可选择标志物的存在指示肿瘤或癌细胞的存在。

[0013] 公开了检测和治疗肿瘤或癌细胞的方法，所述方法包含：给所述肿瘤或癌细胞施加第一频率的第一交变电场一段时间，其中所述交变电场的施加增加所述肿瘤或癌细胞膜的渗透性；将载体引导至所述肿瘤或癌细胞，其中所述增加的肿瘤或癌细胞膜的渗透性使得所述载体能够穿过所述肿瘤或癌细胞膜，其中所述载体包含能够编码治疗剂和可选择标志物的核酸序列，且其中，一旦所述载体进入所述细胞，所述载体编码所述治疗剂和所述可选择标志物；和检测所述可选择标志物，其中所述可选择标志物的存在指示肿瘤或癌细胞的存在，且其中由所述载体编码的治疗剂诱导所述肿瘤或癌细胞的细胞凋亡。

[0014] 所公开的方法和组合物的另外优点将在随后的描述中部分地阐述，并且将从所述描述中部分地理解，或者可以通过所公开的方法和组合物的实践而获知。借助于在所附权利要求书中特别指出的要素和组合，将实现和获得所公开的方法和组合物的优点。应当理解，前述一般描述和下述详细描述两者仅仅是示例性的和解释性的，且不限制要求保护的发明。

附图说明

[0015] 被包含在本说明书中并构成本说明书的一部分的附图解释了所公开的方法和组合物的几个实施方案，并与描述一起用于解释所公开的方法和组合物的原理。

[0016] 图1显示了在病毒感染和增殖期间向被PR8病毒感染的A549细胞施加TTFields 24小时的效果。

[0017] 图2显示了在病毒感染和增殖期间向被PR8病毒感染的A549细胞施加TTFields 48小时的效果。

具体实施方式

[0018] 通过参考特定实施方案和其中包括的实施例的以下详细描述以及附图及其之前和之后的描述,可以更容易地理解所公开的方法和组合物。

[0019] 应当理解,除非另外指出,否则所公开的方法和组合物不限于具体合成方法、具体分析技术或特定试剂,并且这些可以变化。还应当理解,本文中使用的术语仅仅是为了描述特定实施方案的目的,无意成为限制性的。

[0020] 公开了材料、组合物和组分,它们可以用于所公开的方法和组合物,可以与所公开的方法和组合物结合使用,可以用于制备所公开的方法和组合物,或者是所公开的方法和组合物的产物。在本文中公开了这些和其它材料,并且应当理解,当这些材料的组合、子集、相互作用、组等被公开时,虽然可能没有明确公开这些化合物的每个不同个体和集体组合以及排列的具体参考,但是每一个都在本文中特别考虑和描述。因此,如果公开了一类分子A、B和C,以及公开了一类分子D、E和F以及组合分子的实例A-D,那么即使没有单独列举每一个,每一个被单独地和共同地考虑。因此,在这个实例中,组合A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F中的每一个都被特别考虑,并且应该被认为从A、B和C、D、E和F、以及实例组合A-D的公开内容中公开。同样,这些的任何子集或组合也被特别考虑和公开。因此,例如,A-E、B-F和C-E的子集被特别考虑,并且应该被认为从A、B和C、D、E和F、以及实例组合A-D的公开内容中公开。该概念适用于本申请的所有方面,包括、但不限于制备和使用所公开的组合物的方法中的步骤。因此,如果存在可以执行的多种另外步骤,应当理解,这些另外步骤中的每一个可以用所公开的方法的任何具体实施方案或实施方案的组合来执行,并且每个这样的组合被特别考虑并且应该视为公开。

[0021] A.定义

[0022] 应当理解,所公开的方法和组合物不限于所描述的特定方法学、方案和试剂,因为这些可以变化。还应当理解,本文使用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,无意限制本发明的范围,所述范围仅由所附的权利要求书来限定。

[0023] 必须指出,在本文中和在所附权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数形式,除非上下文另外清楚地指明。因此,例如,对“一种载体”的提及包括单个或多个这样的载体,对“所述载体”的提及是对一个或多个载体和本领域技术人员已知的其等同物等的提及。

[0024] 本文中使用的“靶位点”是在受试者或患者体内或存在于受试者或患者上的特定位点或位置。例如,“靶位点”可以表示、但不限于细胞(例如癌细胞)、细胞群、器官、组织或肿瘤。因此,短语“靶细胞”可以用于表示靶位点,其中所述靶位点是细胞。在某些方面,可以是靶位点的器官包括、但不限于肺、脑、胰腺、腹部器官(例如胃、肠)、卵巢、乳房、子宫、前列腺、膀胱、肝、结肠或肾。在某些方面,可以是靶位点或靶细胞的细胞或细胞群包括、但不限于肺细胞、脑细胞、胰腺细胞、腹部细胞、卵巢细胞、肝细胞、结肠细胞或肾细胞。在某些方面,“靶位点”可以是肿瘤靶位点。在某些方面,“靶位点”可以是病毒感染的细胞。在某些方面,“靶细胞”可以是癌症。在某些方面,“靶细胞”可以是病毒感染的细胞。

[0025] “肿瘤靶位点”是在受试者或患者体内或存在于受试者或患者上的位点或位置，其包含或邻近一个或多个癌细胞，先前包含的一个或多个肿瘤细胞，或被怀疑包含一个或多个肿瘤细胞。例如，肿瘤靶位点可以表示在受试者或患者体内或存在于受试者或患者上的易于转移的位点或位置。另外，靶位点或肿瘤靶位点可以表示在受试者或患者体内或存在于受试者或患者上的原发性肿瘤切除的位点或位置。另外，靶位点或肿瘤靶位点可以表示邻近在受试者或患者体内或存在于受试者或患者上的原发性肿瘤切除的位点或位置。

[0026] 本文中使用的“交变电场”表示递送至受试者、从受试者获得的样品或递送至受试者或患者体内的特定位置(例如靶位点诸如细胞)的非常低强度的、定向的、中频交变电场。在某些方面，交变电场可以是单向或多向的。在某些方面，交变电场可以通过两对转换器阵列递送，所述阵列在靶位点内产生垂直场。例如，对于Optune™系统(一种交变电场递送系统)，一对电极位于靶位点的左侧和右侧(LR)，且另一对电极位于靶位点的前侧和后侧(AP)。在这两个方向(即，LR和AP)之间循环场会确保以最大范围的细胞取向为目标。

[0027] 如本文中使用的，施加于肿瘤靶位点的“交变电场”可以被称作“肿瘤治疗场”或“TTField”。TTFields已经被确立为一种抗有丝分裂的癌症治疗方式，因为它们在分裂中期干扰适当的微管组装，并最终在分裂末期、胞质分裂或随后的分裂间期中破坏细胞。TTFields以实体瘤为目标，并描述于美国专利号7,565,205中，其关于TTFields的教导通过引用整体并入本文。

[0028] 体内和体外研究表明，TTFields疗法的效力随着电场强度的增加而增加。因此，优化在受试者上的阵列放置以增加在靶位点或靶细胞中的强度是Optune系统的标准实践。阵列放置优化可以通过“经验法则”(例如，将阵列尽可能靠近靶位点或靶细胞地放置在受试者上)、描述患者身体的几何形状的测量值、靶位点尺寸和/或靶位点或细胞位置完成。用作输入的测量值可以源自成像数据。成像数据意图包括任何类型的视觉数据，例如单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)图像数据、x-射线计算机断层摄影术(x-射线CT)数据、磁共振成像(MRI)数据、正电子发射断层摄影术(PET)数据、可以被光学仪器(例如，照相机、电荷耦合器件(CCD)照相机、红外照相机等)捕获的数据等。在某些实现中，图像数据可以包括从3D扫描仪获得或生成的3D数据(例如，点云数据)。优化可以依赖于理解电场如何作为阵列位置的函数在靶位点或靶细胞内分布，并且在某些方面，考虑了不同患者头部内电性质分布的变化。

[0029] 术语“受试者”表示施用的靶标，例如一只动物。因此，所公开的方法的受试者可以是脊椎动物，诸如哺乳动物。例如，所述受试者可以是人。该术语不表示特定年龄或性别。受试者可以与“个体”或“患者”互换使用。例如，施用的受试者可以是指交变电场的接受者。

[0030] “治疗”是指对具有感染(例如病毒感染)或疾病(例如癌症)或具有增加的发生感染或疾病的易感性的受试者诸如人或其它哺乳动物(例如，动物模型)施用或施加治疗剂诸如交变电场和载体，以防止或延迟疾病或感染的影响的恶化，或部分地或完全地逆转感染或疾病的影响。例如，治疗患有癌症的受试者可以包括将治疗剂递送至受试者体内的细胞。

[0031] “预防”是指最小化或减少受试者发生感染或疾病的机会。

[0032] 本文中使用的术语“施用”表示向靶位点或受试者提供治疗剂诸如抗病毒剂或抗癌治疗剂的任何方法。这样的方法是本领域技术人员众所周知的，且包括、但不限于：口服施用、透皮施用、通过吸入施用、鼻施用、局部施用、阴道内施用、眼部施用、耳内施用、大脑

内施用、直肠施用、舌下施用、含服施用和胃肠外施用，包括可注射诸如静脉内施用、动脉内施用、肌肉内施用和皮下施用。施用可以为连续的或间歇的。在不同的方面，可以治疗性地施用制剂；即施用以治疗现有疾病或病症。在进一步的各个方面，可以预防性地施用制剂；即施用以预防疾病或病症。在一个方面，技术人员可以确定有效剂量、有效时间表或有效施用途径从而治疗受试者。在某些方面，施用包含暴露或施加。因此，在某些方面，将靶位点或受试者暴露于交变电场或将交变电场施加于靶位点或受试者是指对靶位点或受试者施加交变电场。

[0033] “任选的”或“任选地”是指，随后描述的事件、情况或材料可能发生或存在，或可能不发生或不存在，并且该描述包括其中事件、情况或材料发生或存在的情形以及其中事件、情况或材料不发生或不存在的情形。

[0034] 范围在本文中可以表述为从“约”一个特定值和/或至“约”另一个特定值。当表达这样的范围时，除非上下文另外明确指示，否则也具体预期和考虑公开了从一个特定值和/或至另一个特定值的范围。类似地，当通过使用先行词“约”将值表述为近似值时，应当理解，除非上下文另外明确指示，否则该特定值形成另一个具体预期的实施方案，其应被认为是公开的。进一步理解，除非上下文另外明确指示，否则每个范围的端点在与另一个端点相关和独立于另一个端点时两者都是有意义的。最后，应当理解，也具体预期在明确公开的范围内包含的所有单个值和值的子范围，并且应当被认为是公开的，除非上下文另外明确指示。无论在特定情况下是否明确公开了这些实施方案中的一些或全部，前述内容都适用。

[0035] 除非另外定义，否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与所公开的方法和组合物所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料都可以用于实践或试验本发明的方法和组合物，但特别有用的方法、装置和材料如所述。本文引用的出版物和它们所引用的材料特此特别通过引用并入。本文中没有任何内容应当被解释为承认本发明由于在先发明而丧失先于这样的公开的资格。不承认任何参考文献构成现有技术。参考文献的讨论陈述其作者所声称的内容，并且申请人保留质疑所引用文献的准确性和相关性的权利。应当清楚地理解，尽管本文提及了许多出版物，但这样的参考并不构成承认这些文献中的任一篇形成本领域的普通一般知识的一部分。

[0036] 贯穿本说明书的描述和权利要求，词语“包含”和该词语的变体(诸如“含有”和“包括”)是指“包括、但不限于”，并且不旨在排除例如其它添加物、组分、整数或步骤。具体地，在陈述为包含一个或多个步骤或操作的方法中，特别考虑每个步骤包含所列出的内容(除非该步骤包括限制性术语诸如“由……组成”)，这意味着，每个步骤不旨在排除例如在该步骤中没有列出的其它添加物、组分、整数或步骤。

[0037] B.载体

[0038] 公开了包含能够编码目标序列的核酸序列的载体。公开的方法可以包含施用本文描述的一种或多种载体。

[0039] 在某些方面，用于本文公开的方法中的载体可以是表达载体。术语“表达载体”包括任何载体(例如，质粒、粘粒、噬菌粒、噬菌体、病毒)，其含有适合于细胞表达的形式的基因构建体(例如，连接到转录控制元件)。

[0040] 用于本文公开的方法中的载体可以是非病毒载体或病毒载体。在某些方面，所述载体可以是病毒载体。例如，所述病毒载体可以是腺相关病毒载体、腺相关病毒、慢病毒或

疱疹病毒。在某些方面，所述载体可以是非病毒载体，诸如基于DNA的载体(例如质粒、粘粒、噬菌粒)。

[0041] 1.病毒和非病毒载体

[0042] 有许多载体和方法可以用于在体外或在体内递送公开的载体。这些方法和组合物可以大致分为两类：基于病毒的递送系统和非基于病毒的递送系统。例如，可以将能够编码目标序列的核酸递送穿过细胞的细胞膜，所述方法包含：给所述细胞施加交变电场一段时间，其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；和将所述载体引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜。这样的载体可以是质粒、病毒载体、病毒核酸、噬菌体核酸、噬菌体、粘粒或阳离子脂质体的形式。在某些情况下，可以修改所述方法以专门用于大DNA分子。此外，这些方法可以用于通过使用运载体的靶向特征来靶向某些疾病和细胞群体。

[0043] 表达载体可以是用于将基因或基因片段递送到细胞中的任何核苷酸构建体(例如，质粒)，或作为递送基因或基因片段的一般策略的一部分，例如，作为重组逆转录病毒或腺病毒的一部分(Ram等人.Cancer Res.53:83-88,(1993))。例如，本文中公开了包含能够编码目标序列(诸如癌症治疗剂)的核酸序列的表达载体。

[0044] 在某些方面，公开的载体包含控制元件。在表达载体中存在的“控制元件”是载体的那些非翻译区(增强子、启动子、5’和3’非翻译区)，它们与宿主细胞蛋白相互作用以进行转录和翻译。这样的元件在其强度和特异性方面可能有所不同。取决于所用的载体系统和宿主，可以使用任何数目的合适的转录和翻译元件，包括组成型和诱导型启动子。例如，当在细菌系统中克隆时，可以使用诱导型启动子诸如pBLUESCRIPT噬菌粒(Stratagene,La Jolla,Calif.)或pSPORT1质粒(Gibco BRL,Gaithersburg,Md.)的杂合lacZ启动子等。如果需要生成含有编码目标序列的序列的多个拷贝的细胞系，则可以有利地使用基于SV40或EBV的载体以及适当的可选择标志物。

[0045] “增强子”通常表示这样的DNA序列：其在到转录起始位点没有固定距离处发挥作用，并且可以是在转录单元的5’(Laimins,L.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.78:993(1981))或3’(Lusky,M.L.,等人,Mol.Cell Bio.3:1108(1983))。此外，增强子可以是在内含子中(Banerji,J.L.等人,Cell 33:729(1983))以及在编码序列本身中(Osborne,T.F.,等人,Mol.Cell Bio.4:1293(1984))。它们的长度通常在10至300bp之间，并且它们以顺式起作用。增强子的功能是增加从附近启动子的转录。增强子还经常含有介导转录调节的应答元件。启动子还可以含有介导转录调节的应答元件。增强子经常决定基因表达的调节。虽然许多增强子序列现在已经知道来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)，但通常人们会使用来自真核细胞病毒的增强子进行一般表达。优选的实例是在复制起点后侧的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起点后侧的多形瘤增强子和腺病毒增强子。

[0046] 所述启动子或增强子可以被光或触发其功能的特定化学事件特异性地活化。可以通过试剂诸如四环素和地塞米松来调节系统。还有方法通过暴露于辐照(诸如γ辐照)或烷基化化疗药物来增强病毒载体基因表达。

[0047] 在某些方面，所述启动子或增强子区域可以充当组成型启动子或增强子以使本发明的多核苷酸的表达最大化。在某些构建体中，所述启动子或增强子区域在所有真核细胞

类型中具有活性,即使它仅在特定时间在特定类型的细胞中表达。

[0048] 用于在真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或有核细胞)中公开的方法中使用的表达载体还可以含有转录终止所必需的序列,其可能影响mRNA表达。这些区域被转录为编码组织因子蛋白的mRNA的非翻译部分中的聚腺苷酸化区段。3'非翻译区也包括转录终止位点。优选的是,转录单元也含有聚腺苷酸化区域。该区域的一个好处是它增加了转录单元像mRNA一样被处理和运输的可能性。表达构建体中聚腺苷酸化信号的鉴定和使用被充分确立。优选的是,在转基因构建体中使用同源聚腺苷酸化信号。在某些转录单元中,聚腺苷酸化区域源自SV40早期聚腺苷酸化信号,并且由约400个碱基组成。

[0049] 用于公开的方法中的表达载体可以包括编码标志物产物的核酸序列。该标志物产物可以用于确定所述基因是否已经递送至细胞以及在递送后是否正在被表达。标志物基因可以包括、但不限于编码β-半乳糖苷酶的大肠杆菌lacZ基因和编码绿色荧光蛋白的基因。

[0050] 在某些实施方案中,所述标志物可以是可选择标志物。哺乳动物细胞的合适可选择标志物的实例是二氢叶酸还原酶(DHFR)、胸苷激酶、新霉素、新霉素类似物G418、湿霉素和嘌呤霉素。对于体外使用,在使用本文描述的方法后可以分离包含所述载体的细胞。当这样的可选择标志物成功转移进哺乳动物宿主细胞中时,如果置于选择压力下,被转化的哺乳动物宿主细胞可以存活。有两种广泛使用的不同类别的选择性方案。第一类是基于细胞的新陈代谢和缺乏独立于补充培养基而生长的能力的突变细胞系的使用。两个实例是CHO DHFR-细胞和小鼠LTK-细胞。在不添加诸如胸苷或次黄嘌呤等营养物质的情况下,这些细胞缺乏生长能力。因为这些细胞缺乏完整核苷酸合成途径所必需的某些基因,所以除非在补充培养基中提供缺失的核苷酸,否则它们无法存活。补充培养基的一种替代方案是将完整的DHFR或TK基因引入缺乏相应基因的细胞中,从而改变它们的生长需求。未用DHFR或TK基因转化的单个细胞将不能在未补充的培养基中存活。

[0051] 可以与本文公开的组合物和方法一起使用的另一种类型的选择是显性选择,其表示用于任何细胞类型的选择方案并且不需要使用突变细胞系。这些方案通常使用药物来阻止宿主细胞的生长。那些具有新基因的细胞会表达一种传递抗药性的蛋白并会在选择中存活下来。这种显性选择的实例使用药物新霉素(Southern P.和Berg,P.,J.Molec.Appl.Genet.1:327(1982))、霉酚酸(Mulligan,R.C.和Berg,P.Science 209:1422(1980))或潮霉素(Sugden,B.等人,Mol.Cell.Biol.5:410-413(1985))。这三个实例采用在真核生物控制下的细菌基因来分别传递对适当的药物G418或新霉素(遗传霉素)、xgpt(霉酚酸)或潮霉素的抗性。其它包括新霉素类似物G418和嘌呤霉素。

[0052] 本文中使用的质粒或病毒载体是这样的试剂:其运输核酸序列(诸如能够编码目标序列(例如一种或多种感兴趣的蛋白或肽)的核酸序列)进入细胞而不降解,并且包括启动子,所述启动子产生所述基因在它被递送进的细胞中的表达。在某些实施方案中,所述载体是病毒载体。病毒载体是例如腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘苗病毒、脊髓灰质炎病毒、慢病毒(AIDS病毒)、神经元营养病毒、Sindbis和其它RNA病毒,包括具有HIV主链的这些病毒。还优选的是具有这些病毒的性能的任何病毒家族,所述性能使它们适合用作载体。逆转录病毒包括鼠Maloney白血病病毒、MMLV和表达MMLV作为载体的理想性能的逆转录病毒。与其它病毒载体相比,逆转录病毒载体能够携带更大的遗传有效负载(即,转基因或标志物基因),并因此是一种常用的载体。但是,它们在非增殖细胞中并非那么有用。腺病毒载体相

对稳定且易于使用,具有高滴度,并且可以以气雾剂形式递送,并且可以转染非分裂细胞。痘病毒载体较大,并具有几个用于插入基因的位点,它们是热稳定的,并且可以在室温储存。一个优选的实施方案是这样的病毒载体:其已经被工程改造从而抑制由病毒抗原引起的宿主生物体的免疫应答。这种类型的优选载体将携带白介素8或10的编码区。

[0053] 与将基因引入细胞中的化学或物理方法相比,病毒载体可以具有更高的处理能力(即引入基因的能力)。通常,病毒载体含有非结构性早期基因、结构性晚期基因、RNA聚合酶III转录物、复制和衣壳化所必需的反向末端重复序列、以及控制病毒基因组的转录和复制的启动子。当被工程改造为载体时,病毒通常会被除去一个或多个早期基因,并将基因或基因/启动子盒插入病毒基因组中以替代被除去的病毒DNA。这种类型的构建体可以携带多达约8kb的外来遗传物质。被除去的早期基因的必要功能通常由细胞系提供,所述细胞系已经被工程改造成以反式表达早期基因的基因产物。

[0054] 一般而言,逆转录病毒载体由以下文献描述:Verma,I.M.,Retroviral vectors for gene transfer.见Microbiology,Amer.Soc.for Microbiology,第229-232页,Washington,(1985),其特此通过引用整体并入。使用逆转录病毒载体进行基因治疗的方法的实例描述于美国专利号4,868,116和4,980,286;PCT申请WO 90/02806和WO 89/07136;和Mulligan,(Science260:926-932(1993));它们关于使用逆转录病毒载体进行基因治疗的方法的教导通过引用整体并入本文。

[0055] 逆转录病毒基本上是一个在其里面已经填充了核酸货物的包裹。核酸货物携带伴随它的包装信号,其确保被复制的子代分子将被高效地包装在包裹外壳内。除了包装信号外,存在许多顺式、复制和被复制的病毒的包装所需要的分子。通常,逆转录病毒基因组含有参与形成蛋白外壳的gag、pol和env基因。它是通常被要转移到靶细胞的外来DNA替换的gag、pol和env基因。逆转录病毒载体通常含有用于掺入包裹外壳的包装信号、发出gag转录单元起始信号的序列、逆转录必需的元件,包括结合逆转录的tRNA引物的引物结合位点、末端重复序列(其在DNA合成过程中引导RNA链的转换)、5'到3'LTR的富含嘌呤序列(作为DNA合成的第二条链合成的起始位点)、以及靠近LTR末端的特定序列(其能够实现逆转录病毒的DNA插入状态以插入宿主基因组中)。该核酸量足以用于一对多基因的递送,取决于每个转录物的大小。优选的是,在插入物中包括阳性或阴性可选择标志物以及其它基因。

[0056] 由于大多数逆转录病毒载体中的复制机制和包装蛋白已经被移除(gag、pol和env),因此通常通过将它们放入包装细胞系中来生成载体。包装细胞系是已经用逆转录病毒转染或转化的细胞系,所述逆转录病毒含有复制和包装机制但缺乏任何包装信号。当携带目标序列的载体被转染到这些细胞系中时,含有目标序列的载体通过辅助细胞顺式提供的机制被复制并包装到新的逆转录病毒颗粒中。所述机制的基因组没有被包装,因为它们缺乏必要的信号。

[0057] 已经描述了复制缺陷型腺病毒的构建(Berkner等人,J.Virology61:1213-1220(1987);Massie等人,Mol.Cell.Biol.6:2872-2883(1986);Haj-Ahmad等人,J.Virology57:267-274(1986);Davidson等人,J.Virology61:1226-1239(1987);Zhang"Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis"BioTechniques15:868-872(1993))。使用这些病毒作为载体的好处是,它们在可以传播到其它细胞类型的程度上是有限的,因为它们可以在最初

感染的细胞内复制,但不能形成新的感染性病毒颗粒。已经证实重组腺病毒在体内直接递送至气道上皮细胞、肝细胞、血管内皮细胞、CNS实质和许多其它组织部位后会实现高效基因转移(Morsy,J.Clin.Invest.92:1580-1586(1993);Kirshenbaum,J.Clin.Invest.92:381-387(1993);Roessler,J.Clin.Invest.92:1085-1092(1993);Moullier,Nature Genetics 4:154-159(1993);La Salle,Science 259:988-990(1993);Gomez-Foix,J.Biol.Chem.267:25129-25134(1992);Rich,Human Gene Therapy 4:461-476(1993);Zabner,Nature Genetics 6:75-83(1994);Guzman,Circulation Research 73:1201-1207(1993);Bout,Human Gene Therapy 5:3-10(1994);Zabner,Cell 75:207-216(1993);Caillaud,Eur.J.Neuroscience 5:1287-1291(1993);和Ragot,J.Gen.Virology 74:501-507(1993)),它们关于使用逆转录病毒载体进行基因治疗的方法的教导通过引用整体并入本文。重组腺病毒通过与特定细胞表面受体结合实现基因转导,此后所述病毒通过受体介导的胞吞作用被内化,内化方式与野生型或复制缺陷型腺病毒相同(Chardonnet和Dales,Virology 40:462-477(1970);Brown和Burlingham,J.Virology 12:386-396(1973);Svensson和Persson,J.Virology55:442-449(1985);Seth,等人,J.Virol.51:650-655(1984);Seth,等人,Mol.Cell.Biol.,4:1528-1533(1984);Varga等人,J.Virology 65:6061-6070(1991);Wickham等人,Cell 73:309-319(1993))。

[0058] 用于公开的方法中的病毒载体可以是基于已经被除去E1基因的腺病毒的载体,并且这些病毒体在细胞系诸如人293细胞系中产生。任选地,E1和E3基因都从腺病毒基因组中除去。

[0059] 用于所公开方法(其可以用于将本发明的多核苷酸引入细胞中)中的另一种类型的病毒载体是基于腺相关病毒(AAV)。这种有缺陷的细小病毒是优选的载体,因为它可以感染多种细胞类型并且对人类无致病性。AAV型载体可以运输约4至5kb,并且已知野生型AAV稳定插入染色体19中。含有该位点特异性的整合性质的载体是优选的。这种类型的载体的一个特别优选的实施方案是由Avigen,San Francisco,CA生产的P4.1 C载体,其可以含有单纯疱疹病毒胸苷激酶基因HSV-tk或标志物基因,诸如编码绿色荧光蛋白GFP的基因。

[0060] 在用于公开的方法中的另一种类型的AAV病毒中,所述AAV含有一对反向末端重复序列(ITR),其侧接至少一个盒,该盒含有可操作地连接至异源基因的指导细胞特异性表达的启动子。异源在该背景下表示对于AAV或B19细小病毒而言非天然的任何核苷酸序列或基因。通常AAV和B19编码区已经被删除,从而产生安全的、非细胞毒性的载体。AAV ITR或其修饰赋予感染性和位点特异性整合,但不赋予细胞毒性,并且启动子指导细胞特异性表达。关于与AAV载体相关的材料,美国专利号6,261,834通过引用整体并入本文。

[0061] 其它有用的系统包括,例如,复制型和宿主限制型非复制型痘苗病毒载体。另外,所公开的核酸序列可以在非基于核酸的系统中递送至靶细胞。例如,通过电穿孔、或通过脂转染、或通过磷酸钙沉淀,可以递送所公开的多核苷酸。所选择的递送机制将部分取决于靶向的细胞的类型以及递送是发生在例如体内还是体外。

[0062] 在某些方面,用于所公开方法的载体可以进一步包含靶向部分。在某些方面,载体可以包含能够编码靶向部分的核酸序列。可以使用任何一种或多种已知的靶向部分。例如,靶向部分可以将载体导向特定细胞类型诸如癌细胞。在某些方面,一个或多个靶向部分可以是、但不限于核酸序列、肽、抗体、抗体片段或治疗剂。

[0063] 2.核酸序列和目标序列

[0064] 用于所公开方法的所公开载体包含核酸序列。在某些方面,所述核酸序列能够编码目标序列。

[0065] 在某些方面,所述核酸序列是目标基因。术语“目标基因”可以指核酸序列(例如,治疗基因),其对于它被引入的细胞而言是部分地或完全地异源的,即,外来的。

[0066] 术语“目标基因”还可以指与它被引入的细胞的内源基因部分地或完全地互补的核酸序列。在某些方面,术语“目标基因”不包含完整基因序列。

[0067] 在某些方面,核酸序列可以是本身具有治疗性能的核酸序列。例如,核酸序列可以是微RNA、shRNA或siRNA,其中所述微RNA、shRNA或siRNA是治疗剂。

[0068] 在某些方面,用于本文公开的方法的所公开的载体中的核酸序列还可以包括一个或多个转录调节序列和任何其它核酸,诸如内含子,其可能是所选核酸的最佳表达所必需的。

[0069] 在某些方面,用于本文公开的方法的所公开的载体中的目标核酸序列或基因能够编码目标序列。“目标序列”是指从核酸序列表达的肽或多肽序列(例如,治疗性蛋白)。

[0070] 在某些方面,所述目标序列是可选择标志物、可检测标志物或治疗剂。在某些方面,所公开的载体包含可选择标志物或可检测标志物,其与能够编码目标序列的核酸序列或与作为治疗剂本身的核酸序列分开。

[0071] 如上所述,当讨论载体时,合适的可选择标志物的实例可以是、但不限于二氢叶酸还原酶(DHFR)、胸苷激酶、新霉素、新霉素类似物G418、湿霉素、嘌呤霉素、潮霉素抗性、新霉素抗性或β-半乳糖苷酶(β-gal)。可选择标志物可以存在于载体主链中或者是目标序列。

[0072] 可检测标志物可以用于追踪或可视化表达可检测标志物的载体的位置的目的。示例性的可检测标志物包括、但不限于:各种荧光实体,诸如绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白、蓝绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白及其各种衍生物;其它荧光蛋白,诸如(但不限于)dsRed、eqFP611、Dronpa、TagRFPs、KFP、EosFP、Dendra、IrisFP;本领域已知的其它类似分子,包括、但不限于量子点和其它荧光染料;及其任何衍生物或组合。可检测标志物可以存在于载体主链中或者是目标序列。在某些方面,可检测标志物也可以是可选择标志物。

[0073] 在某些方面,治疗剂可以是、但不限于cDNA、DNA、mRNA、微RNA、shRNA、siRNA、核酶、指导RNA分子(gRNA)、RNA-指导的内切核酸酶蛋白或Cas9蛋白或Cpf1蛋白CRISPR-Cas。在某些方面,所述治疗剂可以是化学治疗剂、抗病毒剂、抗细菌剂、免疫抑制剂或免疫活化剂。

[0074] 在某些方面,化学治疗剂可以是、但不限于烷化剂、抗代谢剂、抗肿瘤抗生素剂、和有丝分裂抑制剂。

[0075] 在另一个方面,所述抗肿瘤抗生素剂选自多柔比星、米托蒽醌、博来霉素、柔红霉素、更生霉素、表柔比星、伊达比星、普卡霉素、丝裂霉素、喷司他丁和戊柔比星或其药学上可接受的盐。

[0076] 在另一个方面,所述抗代谢剂选自吉西他滨、5-氟尿嘧啶、卡培他滨、羟基脲、巯基嘌呤、培美曲塞、氟达拉滨、奈拉滨、克拉屈滨、氯法拉滨、阿糖胞苷、地西他滨、普拉曲沙、氟尿苷、甲氨蝶呤和硫鸟嘌呤或其药学上可接受的盐。

[0077] 在另一个方面,所述烷化剂选自卡铂、顺铂、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀、白消安、洛莫司汀、达卡巴嗪、奥沙利铂、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、替莫唑胺、塞

替派、苯达莫司汀和链佐星或其药学上可接受的盐。

[0078] 在另一个方面，所述有丝分裂抑制剂选自伊立替康、托泊替康、卢比替康、卡巴他赛、多西他赛、紫杉醇、依托泊苷、长春新碱、伊沙匹隆、长春瑞滨、长春碱和替尼泊苷或其药学上可接受的盐。

[0079] 在某些方面，公开的载体可以包含两个核酸序列，其中一个核酸序列能够编码目标序列，其中所述目标序列是可选择标志物或可检测标志物，并且第二核酸序列能够编码目标序列，其中所述目标序列是治疗剂。因此，在某些方面，公开的载体可以包含两个目标序列，其中一个目标序列是可选择标志物或可检测标志物，并且第二目标序列是治疗剂。

[0080] 在某些方面，公开的载体可以包含两个核酸序列，其中一个核酸序列能够编码目标序列，其中所述目标序列是可选择标志物或可检测标志物，并且第二核酸序列是治疗剂。因此，在某些方面，两个核酸序列之一不编码治疗剂，而是该核酸序列是治疗剂。

[0081] 3.药物组合物和递送

[0082] 本文中公开了药物组合物，其包含本文描述的一种或多种载体。在某些方面，本文描述的载体可以提供在药物组合物中。例如，本文描述的载体可以与药学上可接受的运载体一起配制。

[0083] 在某些方面，药物组合物可以包含治疗剂。在某些方面，药物组合物可以包含治疗剂和本文描述的一种或多种载体。例如，本文中公开了药物组合物，其包含本文描述的一种或多种载体和治疗剂诸如化疗剂。在某些方面，所述化疗剂可以是、但不限于抗癌药物、细胞毒性药物、疼痛管理药物、假单胞菌外毒素A、非放射性同位素(例如用于硼中子俘获疗法的硼-10)和/或光敏剂(例如光福啉、foscan、5-氨基酮戊酸、单-L-天冬氨酰基二氢卟酚e6、酞菁、间-四(羟基苯基)卟啉、替沙林、Tin ethyl etipurpurin)。在某些方面，化学治疗剂可以是、但不限于烷化剂、抗代谢剂、抗肿瘤抗生素剂、有丝分裂抑制剂、检验点抑制剂和激酶抑制剂。上面作为目标序列的实例列出的任何治疗剂还可以作为药物组合物的一部分与载体分开提供。

[0084] 本文中公开了包含本文描述的一种或多种载体的组合物，其进一步包含运载体诸如药学上可接受的运载体。例如，公开了药物组合物，其包含本文公开的载体和药学上可接受的运载体。

[0085] 例如，包含本文描述的载体的药物组合物可以包含药学上可接受的运载体。“药学上可接受的”是指这样的材料或运载体：其将被选择以最小化活性成分的任何降解并最小化受试者中的任何不利副作用，如本领域技术人员众所周知的。运载体的实例包括二肉豆蔻酰基磷脂酰(DMPC)、磷酸盐缓冲盐水或多囊脂质体。例如，PG:PC:胆固醇:肽或PC:肽可以用作本发明中的运载体。其它合适的药学上可接受的运载体和它们的制剂描述于Remington:The Science and Practice of Pharmacy(第19版)A.R.Gennaro编，Mack Publishing Company,Easton,PA 1995。通常，在制剂中使用适当量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的运载体的其它实例包括、但不限于盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。溶液的pH可以为约5至约8，或约7至约7.5。其它运载体包括缓释制品，诸如含有所述组合物的固体疏水聚合物的半透性基质，所述基质呈成型制品的形式，例如，薄膜、支架(在血管成形术手术过程中植入血管中)、脂质体或微米颗粒。本领域技术人员将显而易见，某些运载体可能是更优选的，取决于例如施用途径和施用的载体的浓度。这些最典型地是用

于对人类施用药物的标准运载体，包括溶液诸如无菌水、盐水和在生理pH的缓冲溶液。

[0086] 药物组合物还可以包括运载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂等，只要不损害本发明的多肽、肽、核酸、载体的预期活性即可。药物组合物还可以包括一种或多种活性成分(除了本发明的组合物之外)，诸如抗微生物剂、抗炎剂、麻醉剂等。可以以多种方式施用药物组合物，取决于需要局部治疗还是全身治疗以及待治疗的区域。

[0087] 胃肠外施用的制品包括无菌水性或非水性溶液、混悬液和乳剂。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油(诸如橄榄油)和可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。水性运载体包括水、醇/水溶液、乳剂或混悬液，包括盐水和缓冲介质。胃肠外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、含乳酸盐的林格氏溶液或不挥发性油。静脉内媒介物包括流体和营养物补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏右旋糖的那些)等。也可以存在防腐剂和其它添加剂，例如，抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0088] 用于光学施用的制剂可以包括软膏剂、洗剂、乳膏剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉剂。常规的药物运载体、水性、粉末或油性基质、增稠剂等可能是必需的或需要的。

[0089] 用于口服施用的组合物包括粉剂或颗粒剂、在水或非水性介质中的混悬液或溶液、胶囊剂、药囊或片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可能是合乎需要的。某些组合物可能作为药学上可接受的酸或碱加成盐施用，通过与无机酸(诸如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸)和有机酸(诸如甲酸、乙酸、丙酸、羟乙酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和富马酸)反应而形成，或通过与无机碱(诸如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾)和有机碱(诸如单-、二-、三-烷基胺和芳基胺以及被取代的乙醇胺)反应而形成。

[0090] 在本文所述的方法中，可以通过多种机制将本文公开的载体或药物组合物递送(或施用或引导)至受试者。

[0091] 所公开的方法包含将载体引导至细胞。在某些方面，所述方法包含将载体引导至靶位点。在某些方面，所述方法包含将载体引导至受试者。因此，受试者包含作为所公开的载体的靶位点的细胞。在某些方面，所有公开的包含将载体引导至细胞的方法也包含将载体引导至受试者。

[0092] C.交变电场

[0093] 本文公开的方法包含交变电场。在某些方面，在本文公开的方法中使用的交变电场是肿瘤治疗场。在某些方面，所述交变电场可以根据细胞类型或施加交变电场的条件而变化。在某些方面，可以通过放置在受试者的身体上的一个或多个电极来施加交变电场。在某些方面，可以有两对或更多对电极。例如，阵列可以放置在患者的正面/背面和侧面，并且可以与本文公开的系统和方法一起使用。在某些方面，在使用两对电极的情况下，交变电场可以在电极对之间交替。例如，第一对电极可以放置在受试者的正面和背面，且第二对电极可以放置在受试者的任一侧，然后可以施加交变电场并且可以在正面电极和背面电极之间交替，并然后是侧电极到侧电极。

[0094] 在某些方面，所述交变电场的频率是在50kHz至1MHz之间。在某些方面，所述交变电场的频率是在100至500kHz之间。所述交变电场的频率还可以是、但不限于在50至500kHz之间、在100至500kHz之间、在25kHz和1MHz之间、在50至190kHz之间、在25至190kHz之间、在180至220kHz之间或在210至400kHz之间。在某些方面，所述交变电场的频率可以是在

50kHz、100kHz、150kHz、200kHz、250kHz、300kHz、350kHz、400kHz、450kHz、500kHz、600kHz、700kHz、800kHz、900kHz、1MHz或之间任何频率的电场。在某些方面，所述交变电场的频率是约200kHz至约400kHz，约250kHz至约350kHz，并且可以是约300kHz。

[0095] 在某些方面，交变电场的场强度可以是在1至4V/cm RMS之间。在某些方面，可以使用不同的场强度(例如，在0.1至10V/cm之间)。在某些方面，所述场强度可以是1.75V/cm RMS。在某些实施方案中，所述场强度是至少1V/cm RMS。在其它实施方案中，应用场强度的组合，例如同时组合两种或更多种频率，和/或在不同时间应用两种或更多种频率。

[0096] 在某些方面，可以施加交变电场在从0.5小时至72小时范围内的各种不同区间。在某些方面，可以使用不同的持续时间(例如，0.5小时至14天)。在某些方面，可以周期性地重复交变电场的施加。例如，可以每天施加交变电场2小时持续时间。

[0097] 在某些方面，所述暴露可以持续至少6小时、至少12小时、至少24小时、至少36小时、至少48小时或至少72小时或更久。

[0098] 公开的方法包含将一个或多个交变电场施加于细胞或受试者。在某些方面，将交变电场施加于靶位点或肿瘤靶位点。当将交变电场施加于细胞时，这经常可以表示将交变电场施加于包含细胞的受试者。因此，将交变电场施加于受试者的靶位点会导致将交变电场施加于细胞。

[0099] D.运输方法

[0100] 公开了运输组合物穿过细胞的细胞膜的方法，所述方法包含给所述细胞施加交变电场一段时间，其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；和将所述组合物引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述组合物能够穿过所述细胞膜。在某些方面，所述组合物是载体，包含载体，或者是包含载体的药物组合物。

[0101] 在某些方面，本文公开的载体或药物组合物中的任一种可以用在公开的运输组合物(例如载体)穿过细胞的细胞膜的方法中。

[0102] 公开了将载体运输穿过细胞的细胞膜的方法，所述方法包含给所述细胞施加交变电场一段时间，其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；和将所述载体引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜。

[0103] 也公开了改善载体穿过细胞的细胞膜运输的方法，所述方法包含给所述细胞施加交变电场一段时间，其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；和将所述载体引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜。

[0104] 在某些方面，所述细胞是靶细胞。在某些方面，所述细胞是癌细胞或肿瘤细胞。在某些方面，所述细胞不是癌细胞或肿瘤细胞。在某些方面，所述细胞是病毒感染的细胞。在某些方面，所述癌细胞可以是、但不限于胶质母细胞瘤细胞、子宫肉瘤细胞、乳腺腺癌细胞、胰腺癌细胞、非小细胞肺癌、肝细胞、胃癌细胞或脑癌细胞。在某些方面，所述细胞可以是需要基因疗法的任何细胞。例如，缺乏特定蛋白的细胞可以被交变电场靶向，从而可以使用载体将缺乏的蛋白递送至细胞。在某些方面，所述细胞可以是病毒感染的细胞，其中所述细胞被选自、但不限于流感病毒、腺病毒、冠状病毒和慢病毒的病毒感染。

[0105] 在某些方面，运输组合物或载体穿过细胞的细胞膜的方法部分地包含给所述细胞施加交变电场一段时间。在某些方面，交变电场可以用于仅将载体引入癌细胞。在某些方面，可以在约200kHz的频率施加交变电场。在某些方面，可以在50至190kHz之间的频率施加

交变电场。在某些方面，可以在210至400kHz之间的频率施加交变电场。在某些方面，可以在250至350kHz之间的频率施加交变电场。在某些方面，所述交变电场具有至少1V/cm RMS的场强度。在某些方面，所述交变电场具有50至1MHz之间的频率。在某些方面，所述交变电场具有50至190kHz之间的频率。在某些方面，所述交变电场具有210至400kHz之间的频率。在某些方面，所述交变电场具有250至350kHz之间的频率。在某些方面，所述交变电场具有至少1V/cm RMS的场强度。在某些方面，所述交变电场具有1至4V/cm RMS之间的场强度。

[0106] 在某些方面，所述引导组合物或载体的步骤在给定时间开始，且其中所述施加交变电场的步骤在给定时间之后至少12小时结束。在某些方面，所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1小时开始。在某些方面，所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1至约24小时开始。

[0107] 在某些方面，施加交变电场和引入组合物或载体同时发生。在某些方面，施加交变电场和引入组合物或载体连续发生。在某些方面，施加交变电场发生在引入组合物或载体之前。

[0108] 在某些方面，所述细胞是癌细胞，其中所述癌细胞包含胶质母细胞瘤细胞，并且所述交变电场具有在250kHz至350kHz之间的频率。

[0109] 在某些方面，所述细胞是癌细胞，其中所述癌细胞包含子宫肉瘤细胞，并且所述交变电场具有在125kHz至175kHz之间的频率。

[0110] 在某些方面，所述细胞是癌细胞，其中所述癌细胞包含乳腺腺癌细胞，并且所述交变电场具有在75kHz至175kHz之间的频率。

[0111] 在某些方面，肿瘤内地、颅内地、心室内地、鞘内地、硬膜外地、硬膜内地、血管内地、静脉内地(靶向或非靶向)、动脉内地、肌肉内地、皮下地、腹膜内地、口服地、鼻内地、经由肿瘤内注射(例如计算机断层摄影术指导的，在外科手术或活组织检查过程中)或经由吸入，引入所述组合物或载体。

[0112] 在某些方面，以靶向或非靶向方式将组合物或载体引导至细胞。

[0113] 在某些方面，将所述组合物或载体引导1次、2次、3次或更多次。施用之间的时间可以是数小时、数天、数周、数月或数年。

[0114] 在某些方面，所述组合物或载体包含能够编码目标序列的核酸序列。在某些方面，所述目标序列是可选择标志物、可检测标志物或治疗剂。在某些方面，所述载体包含核酸序列，其中所述核酸序列是治疗剂。例如，所述核酸序列可以是微RNA、shRNA或siRNA，其中所述微RNA、shRNA或siRNA是治疗剂。

[0115] 在某些方面，所述可选择标志物或可检测标志物可以是、但不限于二氢叶酸还原酶(DHFR)、胸苷激酶、新霉素、新霉素类似物G418、湿霉素、嘌呤霉素、潮霉素抗性、新霉素抗性、β-半乳糖苷酶(β-gal)、荧光蛋白(例如绿色、蓝色、红色荧光蛋白)。

[0116] 在某些方面，公开的组合物或载体可以包含两个核酸序列，其中一个核酸序列能够编码目标序列，其中所述目标序列是可选择标志物或可检测标志物，并且第二核酸序列能够编码目标序列，其中所述目标序列是治疗剂。因此，在某些方面，公开的组合物或载体可以包含两个目标序列，其中一个目标序列是可选择标志物或可检测标志物，并且第二目标序列是治疗剂。

[0117] 在某些方面，公开的组合物或载体可以包含两个核酸序列，其中一个核酸序列能

够编码目标序列，其中所述目标序列是可选择标志物或可检测标志物，并且第二核酸序列是治疗剂。因此，在某些方面，所述两个核酸序列之一不编码治疗剂，而是所述核酸序列是治疗剂。

[0118] 在某些方面，所述载体是质粒、粘粒、噬菌粒或病毒载体。在某些方面，所述载体是病毒载体。例如，所述病毒载体可以是、但不限于腺病毒、腺相关病毒、慢病毒或疱疹病毒。在某些方面，所述载体可以是本文描述的载体中的任一种。

[0119] 在某些方面，将所述组合物或载体提供在药物组合物中。在某些方面，所述药物组合物可以是本文公开的药物组合物中的一种或多种。在某些方面，所述药物组合物可以进一步包含治疗剂，诸如化学治疗剂。

[0120] 在某些方面，组合物或载体可以进一步包含靶向部分。在某些方面，载体可以包含能够编码靶向部分的核酸序列。可以使用已知靶向部分中的任何一种或多种。例如，靶向部分可以将组合物或载体导向特定细胞类型诸如癌细胞。在某些方面，一个或多个靶向部分可以是、但不限于核酸序列、肽、抗体、抗体片段或治疗剂。

[0121] 在某些方面，于2019年7月3日提交的PCT/US19/40479的方法可以用在本文公开的方法中。例如，于2019年7月3日提交的PCT/US19/40479描述了递送物质穿过细胞的细胞膜的方法和工艺，其关于这方面的教导特此通过引用并入。例如，于2019年7月3日提交的PCT/US19/40479描述了方法和工艺，其包含给所述细胞施加交变电场一段时间，其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；和将所述物质引导至所述细胞附近，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述物质能够穿过所述细胞膜。

[0122] 在某些方面，可以将组合物在体内或在体外运输穿过细胞膜。在某些方面，可以将组合物施用给包含细胞的受试者并且一旦进入受试者体内，就可以与交变电场的施加组合地将组合物运输穿过细胞膜。在某些方面，除了交变电场的施加以外，还可以将组合物施用给细胞培养物中的一个或多个细胞。在某些方面，一旦已经与交变电场的施加组合地运输组合物穿过细胞膜，就可以将所述细胞引入或重新引入受试者。

[0123] E.治疗方法

[0124] 上述将载体运输进细胞中的方法可以用于治疗有此需要的受试者。在某些方面，交变电场的应用允许或增加组合物或载体穿过细胞膜的运输，其中一旦进入细胞内，所述组合物或载体可以提供治疗剂，从而治疗有此需要的受试者。

[0125] 公开的治疗方法可以包括在体内或在体外施加交变电场。因此，在某些方面，向细胞施加交变电场包含将交变电场施加于包含细胞的受试者。在某些方面，向细胞施加交变电场包含向培养的细胞施加交变电场，并然后可以将所述细胞引入正在治疗的受试者。在某些方面，一旦所述组合物已经与交变电场的施加组合地运输穿过细胞膜，就可以将所述细胞引入或重新引入受试者。

[0126] 在某些方面，在将所述组合物(例如载体)运输进受试者的细胞中之前、同时或之后，可以将另外的治疗剂或治疗方案(例如化学疗法或放射疗法)施用给受试者。

[0127] 1.用载体治疗

[0128] 公开了用于治疗有此需要的受试者的方法，所述方法包含给所述细胞施加交变电场一段时间，其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；和将所述组合物引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述组合物能够穿过所述细胞膜，其中一旦进入

细胞内，所述组合物就给所述受试者提供治疗效果。在某些方面，所述组合物是载体或包含载体的药物组合物。

[0129] 在某些方面，本文公开的载体或药物组合物中的任一种可以用在公开的运输载体穿过细胞的细胞膜的方法中。

[0130] 公开了用于治疗有此需要的受试者的方法，所述方法包含给所述细胞施加交变电场一段时间，其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；和将所述载体引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜，其中一旦进入细胞内，所述载体就给所述受试者提供治疗效果。

[0131] 在某些方面，有此需要的受试者可以是具有任何诊断出的医学病症的受试者，所述医学病症可以用携带治疗剂的载体治疗。例如，可以受益于基因疗法的受试者将是有此需要的受试者。在某些方面，需要将一种或多种基因敲除或敲低的受试者将是有此需要的受试者。在某些方面，所述受试者可以是被诊断患有癌症的受试者。在某些方面，所述受试者可以是被诊断患有自身免疫障碍的受试者。在某些方面，所述受试者可以是被诊断患有蛋白缺乏的受试者。

[0132] 在某些方面，治疗剂可以是、但不限于cDNA、DNA、mRNA、微RNA、shRNA、siRNA、核酶、指导RNA分子(gRNA)、RNA-指导的内切核酸酶蛋白或Cas9蛋白或Cpf1蛋白CRISPR-Cas。在某些方面，所述治疗剂可以是化学治疗剂、抗病毒剂、抗细菌剂、免疫抑制剂或免疫活化剂。

[0133] 在某些方面，治疗剂是受试者可能缺乏的特定蛋白。在某些方面，治疗剂可以是CRISPR-Cas9系统的一种或多种元件。例如，在某些方面，治疗剂可以是靶向待切割的特定基因的gRNA或在gRNA靶位点处切割的内切核酸酶。在一个实施例中，载体可以包含靶向PD-1的gRNA。使用CRISPR减少或消除在T细胞上的PD-1表达可以允许更好地杀死癌细胞。在某些方面，在T细胞上的PD-1会与癌细胞上的PD-L1结合，向T细胞发出该细胞是健康细胞的信号，并因此T细胞不会杀死癌细胞。使用公开的方法引入包含靶向PD-1的gRNA的载体将有助于切割PD-1基因和减少表达的过程，从而导致更多地杀死表达PD-L1的癌细胞。

[0134] 在某些方面，在将所述组合物(例如载体)运输进受试者的细胞中之前、同时或之后，可以将另外的治疗剂或治疗方案(例如化学疗法或放射疗法)施用给受试者。

[0135] 2.用载体+第二交变电场治疗

[0136] 公开了用于治疗有此需要的受试者的方法，所述方法包含给所述细胞施加第一频率的第一交变电场第一时间段，其中所述第一频率的第一交变电场给所述细胞施加第一时间段增加所述细胞的细胞膜的渗透性；将载体引导至所述细胞，其中所述增加的细胞的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜，其中所述载体包含能够编码治疗剂的核酸序列；和给所述细胞施加第二频率的第二交变电场第二时间段，其中所述第二频率不同于所述第一频率。

[0137] 在某些方面，所述细胞可以是病毒感染的细胞。在某些方面，所述载体包含核酸序列，所述核酸序列是治疗剂或能够编码治疗剂。例如，所述载体可以包含能够编码抗病毒剂或免疫调节剂的核酸序列。

[0138] 在某些方面，所述第二交变电场阻止病毒复制和/或感染。因此，所述治疗是由所述载体提供的治疗剂和抑制病毒复制和/或感染的交变电场的双重治疗。

[0139] 在某些方面，所述第一和第二交变电场是不同的。所述第一和第二交变电场可以

是本文公开的那些中的一种或多种。在某些方面，所述第一或第二交变电场或二者可以具有50kHz至1MHz之间的频率。所述交变电场可以基于细胞类型而变化。例如，所述第一交变电场可以具有250kHz至350kHz之间的第一频率，并且所述第二交变电场可以具有150kHz至250kHz之间的频率；所述第一交变电场可以具有125kHz至175kHz之间的第一频率，并且所述第二交变电场可以具有75kHz至125kHz之间的频率；或所述第一交变电场可以具有75kHz至175kHz之间的第一频率，并且所述第二交变电场可以具有100kHz至300kHz之间的频率。在某些方面，所述交变电场具有至少1V/cm RMS的场强度。在某些方面，所述交变电场具有1至4V/cm RMS之间的场强度

[0140] 在某些方面，所述第二时间段包含多个非连续时间区间，在所述区间中将所述第二频率的第二交变电场施加于所述细胞，其中所述多个非连续时间区间总共加起来达至少1周。

[0141] 在某些方面，所述第一交变电场和第二交变电场可以在体内发生。在某些方面，所述第一交变电场和第二交变电场可以在体外发生。在某些方面，所述第一交变电场在体外发生，且所述第二交变电场在体内发生。在某些方面，一旦已经与交变电场的施加组合地将所述组合物运输穿过细胞膜，就可以将所述细胞引入或重新引入受试者中。

[0142] 在某些方面，在将所述组合物(例如载体)运输进受试者的细胞中之前、同时或之后，可以将另外的治疗剂或治疗方案(例如化学疗法或放射疗法)施用给受试者。

[0143] F.杀死细胞的方法

[0144] 上述将载体运输进细胞中的方法可以用于杀死细胞。在某些方面，交变电场的应用允许或增加载体穿过细胞膜的运输，其中一旦进入细胞内，所述载体就可以提供治疗剂，其中所述治疗剂导致细胞死亡。

[0145] 上述将载体运输进细胞中的方法可以用于诱导细胞的细胞凋亡。在某些方面，交变电场的应用允许或增加载体穿过细胞膜的运输，其中一旦进入细胞内，所述载体就可以提供治疗剂，其中所述治疗剂导致所述细胞的细胞凋亡。

[0146] 在某些方面，在将所述组合物(例如载体)运输进所述受试者的细胞中之前、同时或之后，可以将另外的治疗剂或治疗方案(例如化学疗法或放射疗法)施用给所述受试者。

[0147] 1.用载体治疗剂降低细胞的生存力

[0148] 公开了降低细胞的生存力的方法，所述方法包含给所述细胞施加第一频率的第一交变电场一段时间，其中所述第一交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；将载体引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜，其中所述载体包含能够编码治疗剂的核酸序列，且其中，一旦所述载体穿过所述细胞膜，所述载体编码所述治疗剂，其中所述治疗剂的存在会降低所述细胞的生存力。在某些方面，所述细胞是肿瘤或癌细胞。在某些方面，所述癌细胞是胶质母细胞瘤细胞、子宫肉瘤细胞、乳腺腺癌细胞、胰腺癌细胞、非小细胞肺癌、肝细胞、胃癌细胞或脑癌细胞。

[0149] 在某些方面，所述治疗剂可以是促细胞凋亡因子。在某些方面，所述治疗剂可以是、但不限于细胞因子、p53、自杀基因(例如胞嘧啶脱氨酶/5-氟胞嘧啶和单纯疱疹病毒/更昔洛韦)或已知细胞凋亡基因的活化剂。

[0150] 在某些方面，所述交变电场可以是关于将载体运输进细胞中所描述的那些中的任一种。

[0151] 在某些方面,所述细胞是肿瘤或癌细胞。在某些方面,所述癌细胞是胶质母细胞瘤细胞、子宫肉瘤细胞、乳腺腺癌细胞、胰腺癌细胞、非小细胞肺癌、肝细胞、胃癌细胞或脑癌细胞。

[0152] 在某些方面,所述引导载体的步骤在给定时间开始,且其中所述施加交变电场的步骤在给定时间之后至少12小时结束。在某些方面,所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1小时开始。在某些方面,所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1至约24小时开始。

[0153] 在某些方面,在将所述组合物(例如载体)运输进所述受试者的细胞中之前、同时或之后,可以将另外的治疗剂或治疗方案(例如化学疗法或放射疗法)施用给所述受试者。

[0154] 2.用载体治疗剂+第二交变电场降低细胞的生存力

[0155] 在某些方面,公开的降低细胞的生存力的方法可以进一步包含施加第二频率的第二交变电场。

[0156] 公开了降低细胞的生存力的方法,所述方法包含:给所述细胞施加第一频率的第一交变电场第一时间段,其中所述第一频率的第一交变电场给所述细胞施加第一时间段增加癌细胞的细胞膜的渗透性;将载体引导至所述细胞,其中所述增加的细胞的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜;和给所述细胞施加第二频率的第二交变电场第二时间段,其中所述第二频率不同于所述第一频率,且其中所述第二频率的第二交变电场降低所述细胞的生存力。

[0157] 因此,在某些方面,所述第二交变电场是肿瘤治疗场。在某些方面,所述第一和第二交变电场是不同的。所述第一和第二交变电场可以是本文公开的那些中的一种或多种。在某些方面,所述第一或第二交变电场或二者可以具有50kHz至1MHz之间的频率。例如,在某些方面,所述癌细胞包含胶质母细胞瘤细胞,并且所述第一交变电场可以具有250kHz至350kHz之间的第一频率,并且所述第二交变电场可以具有150kHz至250kHz之间的频率。在某些方面,所述癌细胞包含子宫肉瘤细胞,并且所述第一交变电场可以具有125kHz至175kHz之间的第一频率,并且所述第二交变电场可以具有75kHz至125kHz之间的频率。在某些方面,所述癌细胞包含乳腺腺癌细胞,并且所述第一交变电场可以具有75kHz至175kHz之间的第一频率,并且所述第二交变电场可以具有100kHz至300kHz之间的频率。所述交变电场可以基于细胞类型而变化。

[0158] 在某些方面,所述第一交变电场具有至少1V/cm RMS的场强度。

[0159] 在某些方面,所述第二交变电场是所述治疗。在某些方面,第二交变电场可以杀死细胞,诸如癌细胞。

[0160] 为了更有效的应答(增加的细胞生存力的下降或增加的细胞凋亡),公开的使用交变电场将载体运输到细胞内来降低细胞的生存力的方法可以与交变电场的应用相组合。

[0161] 公开了降低细胞的生存力的方法,所述方法包含:给所述细胞施加第一频率的第一交变电场第一时间段,其中所述第一频率的第一交变电场给所述细胞施加第一时间段增加所述细胞的细胞膜的渗透性;将载体引导至所述细胞,其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜;和给所述细胞施加第二频率的第二交变电场第二时间段,其中所述第二频率不同于所述第一频率,且其中所述第二频率的第二交变电场降低所述细胞的生存力。

[0162] 在某些方面，所述细胞是肿瘤或癌细胞。在某些方面，所述癌细胞是胶质母细胞瘤细胞、子宫肉瘤细胞、乳腺腺癌细胞、胰腺癌细胞、非小细胞肺癌、肝细胞、胃癌细胞或脑癌细胞。

[0163] 在某些方面，所述第二交变电场是肿瘤治疗场。在某些方面，所述第一和第二交变电场是不同的。所述第一和第二交变电场可以是本文公开的那些中的一种或多种。在某些方面，所述第一或第二交变电场或二者可以具有50kHz至1MHz之间的频率。所述交变电场可以基于细胞类型而变化。例如，不论细胞类型如何，所述第一交变电场可以具有250kHz至350kHz之间的第一频率，并且所述第二交变电场可以具有150kHz至250kHz之间的频率；所述第一交变电场可以具有125kHz至175kHz之间的第一频率，并且所述第二交变电场可以具有75kHz至125kHz之间的频率；或所述第一交变电场可以具有75kHz至175kHz之间的第一频率，并且所述第二交变电场可以具有100kHz至300kHz之间的频率。在某些方面，所述交变电场具有至少1V/cm RMS的场强度。在某些方面，所述交变电场具有1至4V/cm RMS之间的场强度。

[0164] 在某些方面，所述引导载体的步骤在给定时间开始，且其中所述施加交变电场的步骤在给定时间之后至少12小时结束。在某些方面，所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1小时开始。在某些方面，所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1至约24小时开始。

[0165] 在某些方面，所述第二时间段包含多个非连续时间区间，在所述区间中将所述第二频率的第二交变电场施加于所述细胞，其中所述多个非连续时间区间总共加起来达至少1周。

[0166] 在某些方面，所述细胞存在于活受试者的身体中，其中通过将第一交变电场施加于所述受试者的身体而将所述第一交变电场施加于所述细胞，通过将第二交变电场施加于所述受试者的身体而将所述第二交变电场施加于所述细胞，且其中所述引导包含将所述载体施用给所述受试者。

[0167] 在某些方面，在将所述组合物(例如载体)运输进所述受试者的细胞中之前、同时或之后，可以将另外的治疗剂或治疗方案(例如化学疗法或放射疗法)施用给所述受试者。

[0168] G.检测方法

[0169] 1.检测

[0170] 上述将载体运输进细胞中的方法可以用于检测细胞。在某些方面，交变电场的应用允许或增加载体穿过细胞膜的运输，其中一旦进入细胞内，所述载体就可以编码可检测标志物，其中所述可检测标志物允许所述细胞的检测。

[0171] 公开了检测特定细胞类型的方法，所述方法包含将第一频率的第一交变电场施加于构成特定细胞类型的一个或多个细胞一段时间，其中所述第一交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；将载体引导至所述一个或多个细胞，其中所述增加的一个或多个细胞膜的渗透性使得所述载体能够穿过所述一个或多个细胞膜，其中所述载体包含能够编码可检测标志物或可选择标志物的核酸序列，且其中，一旦所述载体穿过所述一个或多个细胞膜，所述载体编码所述可检测标志物或可选择标志物；和检测所述可检测标志物或可选择标志物，其中所述可检测标志物或可选择标志物的存在指示一个或多个特定细胞的存在。

[0172] 在某些方面，所述细胞是肿瘤或癌细胞。在某些方面，所述癌细胞是胶质母细胞瘤

细胞、子宫肉瘤细胞、乳腺腺癌细胞、胰腺癌细胞、非小细胞肺癌、肝细胞、胃癌细胞或脑癌细胞。

[0173] 在某些方面，所述特定细胞类型是患病的细胞。例如，在某些方面，所述特定细胞类型是癌细胞。在某些方面，患病的细胞可以被鉴定为这样的细胞：其表达在健康细胞上不存在的特定细胞表面标志物。因此，在某些方面，所述载体靶向特定细胞类型。将靶向分子加入载体中是本领域已知的，例如，靶向特定配体的分子可以掺入病毒表面中和/或改变病毒包膜蛋白。在某些方面，癌症特异性抗体(例如CD20抗体)可以掺入病毒载体中，以便CD20抗体将载体引导至CD20阳性细胞，从而允许病毒转导CD20阳性细胞。一旦病毒进入所述细胞中，就可以检测可检测标志物，从而将所述细胞鉴定为CD20阳性细胞。

[0174] 在某些方面，所述交变电场可以是关于将载体运输进细胞中所描述的那些中的任一种。

[0175] 在某些方面，所述引导载体的步骤在给定时间开始，且其中所述施加交变电场的步骤在给定时间之后至少12小时结束。在某些方面，所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1小时开始。在某些方面，所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1至约24小时开始。

[0176] 2.检测和治疗

[0177] 在某些方面，所述检测特定细胞类型的方法可以进一步包含治疗所述细胞。在某些方面，所述载体进一步包含治疗剂。在某些方面，在能够编码治疗剂的核酸序列可以是可活化的方面，所述治疗剂可以被“开启”。在某些方面，一旦检测到特定细胞类型(例如癌细胞)，然后就可以施用治疗剂。因此，所述治疗剂可以作为载体的一部分施用或在检测已经得到确认后单独施用。在某些方面，使用其中施用所述载体的任何技术，可以施用治疗剂。

[0178] 公开了检测和治疗有此需要的细胞的方法，所述方法包含将第一频率的第一交变电场施加于细胞一段时间，其中所述交变电场的施加增加细胞膜的渗透性；将载体引导至所述细胞，其中所述增加的细胞膜渗透性使得所述载体能够穿过所述细胞膜，其中所述载体包含能够编码治疗剂和可检测标志物/可选择标志物的核酸序列，且其中，一旦所述载体进入所述细胞，所述载体编码所述治疗剂和所述可检测标志物/可选择标志物；和检测所述可检测标志物/可选择标志物，其中所述可检测标志物/可选择标志物的存在指示需要治疗的细胞的存在，且其中由所述载体编码的治疗剂治疗所述细胞。在某些方面，“治疗所述细胞”可以是指诱导所述细胞的细胞凋亡。

[0179] 在某些方面，所述细胞是肿瘤或癌细胞。在某些方面，所述癌细胞是胶质母细胞瘤细胞、子宫肉瘤细胞、乳腺腺癌细胞、胰腺癌细胞、非小细胞肺癌、肝细胞、胃癌细胞或脑癌细胞。

[0180] 在某些方面，公开的检测细胞的方法可以进一步包含施加第二频率的第二交变电场。因此，在某些方面，所述第二交变电场是肿瘤治疗场。在某些方面，所述第一和第二交变电场是不同的。在某些方面，所述第一或第二交变电场或二者可以具有50kHz至1MHz之间的频率。所述第一和第二交变电场可以是本文公开的那些中的一种或多种。例如，在某些方面，所述癌细胞包含胶质母细胞瘤细胞，并且所述第一交变电场可以具有250kHz至350kHz之间的第一频率，并且所述第二交变电场可以具有150kHz至250kHz之间的频率。在某些方面，所述癌细胞包含子宫肉瘤细胞，并且所述第一交变电场可以具有125kHz至175kHz之间

的第一频率，并且所述第二交变电场可以具有75kHz至125kHz之间的频率。在某些方面，所述癌细胞包含乳腺腺癌细胞，并且所述第一交变电场可以具有75kHz至175kHz之间的第一频率，并且所述第二交变电场可以具有100kHz至300kHz之间的频率。所述交变电场可以基于细胞类型而变化。在某些方面，所述交变电场具有至少1V/cm RMS的场强度。在某些方面，所述交变电场具有1至4V/cm RMS之间的场强度。

[0181] 在某些方面，所述第二交变电场是所述治疗。在某些方面，第二交变电场可以杀死细胞，诸如癌细胞。

[0182] 在某些方面，所述引导载体的步骤在给定时间开始，且其中所述施加交变电场的步骤在给定时间之后至少12小时结束。在某些方面，所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1小时开始。在某些方面，所述施加交变电场的步骤在给定时间之前至少1至约24小时开始。

[0183] 在某些方面，所述细胞存在于活受试者的身体中，其中通过将第一交变电场施加于所述受试者的身体而将所述第一交变电场施加于所述细胞，通过将第二交变电场施加于所述受试者的身体而将所述第二交变电场施加于所述细胞，且其中所述引导包含将所述载体施用给所述受试者。

[0184] 在某些方面，在将所述组合物(例如载体)运输进所述受试者的细胞中之前、同时或之后，可以将另外的治疗剂或治疗方案(例如化学疗法或放射疗法)施用给所述受试者。

[0185] H.试剂盒

[0186] 上述材料以及其它材料可以以任何合适的组合包装在一起作为可用于实施或帮助实施所公开的方法的试剂盒。如果给定试剂盒中的试剂盒组分被设计并适于在所公开的方法中一起使用，则它是有用的。例如，公开了用于成像和/或治疗的试剂盒。在某些方面，所述试剂盒可以包含一种或多种公开的载体。所述试剂盒也可以含有用于施加交变电场的设备。

[0187] 本文中公开了试剂盒，其包含本文描述的一种或多种载体和能够施加交变电场的装置。例如，本文中公开了试剂盒，其包含本文描述的一种或多种载体和TTFields装置(例如Optune®,Novocure Ltd.)。

[0188] I.实施例

[0189] 使用A549(ATCC®CCL-185™)研究了运输病毒穿过细胞膜的能力，并评估了流感病毒(PR8)。

[0190] 使用了A549(ATCC®CCL-185™)和流感病毒(PR8)。使所述细胞在补充了10％胎牛血清(FBS)(Biological Industries,04-007-1A)的DMEM(Biological Industries,01-055-1A)中生长。

[0191] 将A549细胞以1.5×10^5个细胞/盖玻片的密度接种在玻璃盖玻片(22mm直径)上。培养24小时后，将细胞转移进含有2ml DMEM(补充了2％ FBS)的inovitro培养皿中。用在1％或0.01％浓度的流感病毒(PR8)感染细胞6小时。感染后，将细胞用PBS洗涤并在补充了2％ FBS的DMEM中维持另外18小时或42小时。在感染和增殖阶段中施加TTFields。在感染后24小时或48小时，收集生长培养基，将细胞用胰蛋白酶消化，重新悬浮并使用Scepter™2.0细胞计数器(Merck,Millipore)计数。重新悬浮以后，将细胞用PBS洗涤。将上清液和沉淀物

在-80℃冷冻并转移至Sheba用于病毒基因组提取和qRT-PCR。

[0192] 使用经过以下修改的inovitro™系统(Novocure Ltd)施加TTFields(150kHz,1.5V/cm RMS):将inovitro平板用石蜡膜覆盖,并且在细胞培养过程中不更换培养基。

[0193] 数据来自一个实验。将数据表示为平均值±标准差。通过Student's t-检验分析统计显著性。

[0194] 与未处理的培养物相比,在24小时TTFields处理后,在0.01%病毒中存在细胞数目减少的趋势,并在1%病毒中存在细胞数目的显著减少(图1)。在48小时TTFields处理后,在0.01%病毒和1%病毒中都存在细胞数目的显著减少(图2)。在两种病毒浓度,在24小时TTFields处理后,病毒拷贝数/细胞、RQ和SN都有增加的趋势(图1)。在48小时TTFields处理后,在两种病毒浓度的SN中的病毒拷贝数和在1%病毒的病毒拷贝数/细胞均显著增加,此外,在0.01%病毒的病毒拷贝数/细胞和在两种浓度的RQ均有增加趋势(图2)。

[0195] 本领域技术人员会认识到,或仅仅使用例行实验就能够确定,本文描述的方法和组合物的具体实施方案的许多等同方案。这样的等同方案意图由下述权利要求涵盖。

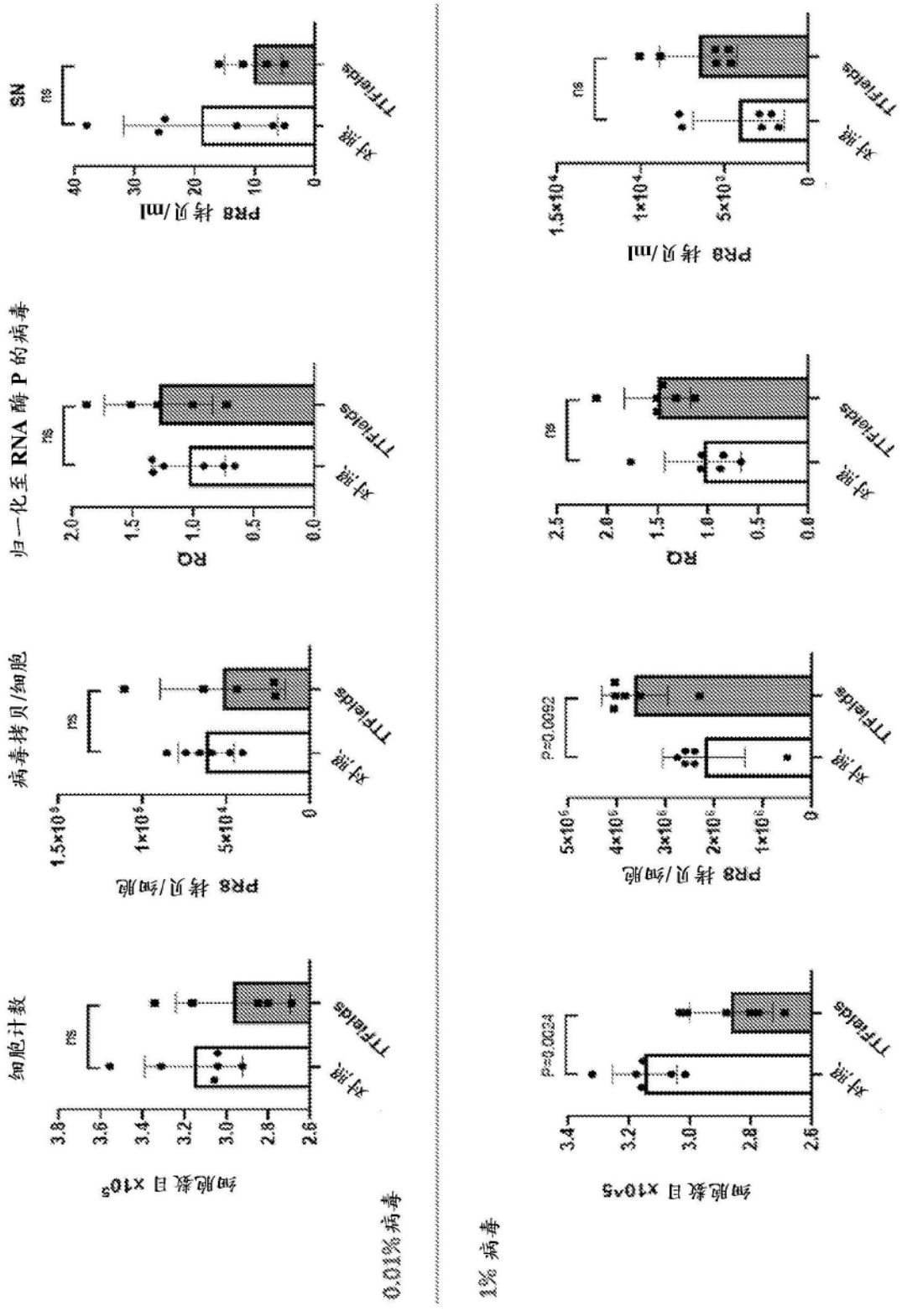

细胞计数
细胞数目 x10^5
病毒拷贝/细胞
PR8 拷贝/细胞
归一化至 RNA 酶 P 的病毒
RQ
SN
PR8 拷贝/ml
对照
TTFields
ns
P=0.0092
P=0.0024
0.01%病毒
1%病毒

图1

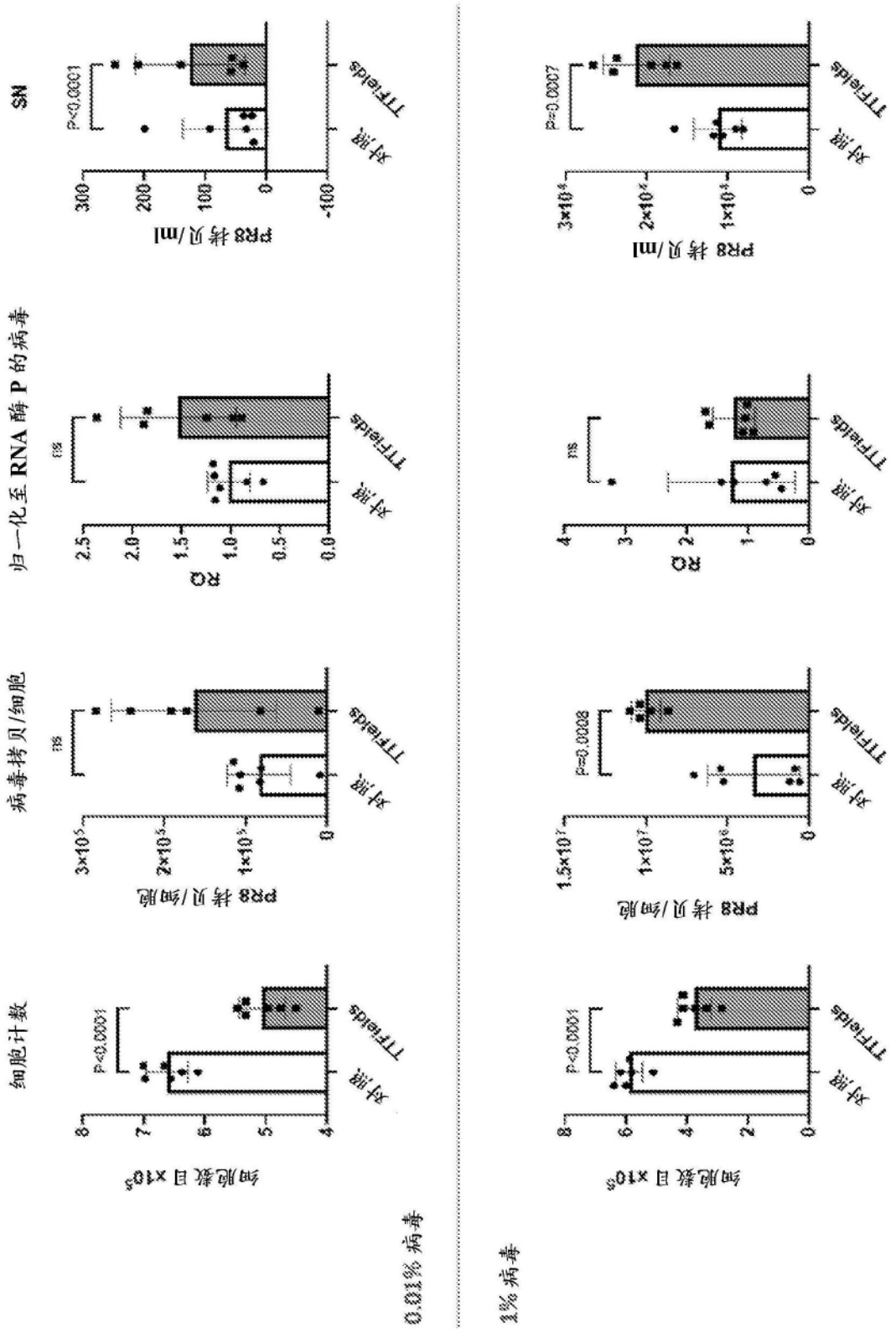

细胞计数
病毒拷贝/细胞
归一化至 RNA 酶 P 的病毒
SN
细胞数目 x10⁵
PR8 拷贝/细胞
RQ
PR8 拷贝/ml
P<0.0001
P=0.0028
P=0.0007
ns
对照
TTFields
0.01% 病毒
1% 病毒

图2