

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01821758.3

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/863 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年5月27日

[11] 授权公告号 CN 100490902C

[51] Int. Cl. (续)

C12N 15/869 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

[22] 申请日 2001.11.29 [21] 申请号 01821758.3

[30] 优先权

[32] 2000.11.29 [33] GB [31] 0029142.7

[32] 2000.12.1 [33] GB [31] 0029405.8

[32] 2001.6.15 [33] GB [31] 0114696.8

[86] 国际申请 PCT/GB2001/005281 2001.11.29

[87] 国际公布 WO2002/044395 英 2002.6.6

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.4

[73] 专利权人 PCI 生物技术联合股份有限公司

地址 挪威奥斯陆

[72] 发明人 A·霍格西特 K·伯格

G·M·米兰德斯莫

B·O·恩格塞特

L·普拉斯密凯特

[56] 参考文献

CN1164829A 1997.11.12

High - efficiency gene transfer employing ad-neovirus - polylysine - dn Oa complexes. Curiel DT. nat immun, Vol. 13 No. 2. 3. 1994

审查员 宋智刚

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 6 页 说明书 30 页 附图 11 页

[54] 发明名称

病毒介导的分子传递进入胞质溶胶的光化学内在化

[57] 摘要

本发明提供了将分子导入细胞的胞质溶胶中的方法，其中使细胞与光敏剂接触，用能有效激活此光敏剂的波长的光照射所述细胞，并且基本上同时或照射后，使细胞与待导入的分子接触，具体用于癌症治疗、基因疗法和疫苗。

1. 一种在体外引导分子进入细胞的方法，其特征在于，所述方法包括使所述细胞与光敏剂接触，使所述细胞与结合了病毒运载体的转移分子接触，并用能有效激活光敏剂的波长的光照射所述细胞，其中所述细胞与光敏剂和结合了病毒运载体的转移分子一起接触，或所述光敏剂和病毒运载体与所述细胞依次接触；照射步骤或者在细胞摄取病毒运载体进入细胞内区室之前或者在细胞摄取后进行，只要照射前光敏剂已被摄取进入细胞内区室。

2. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述细胞是哺乳动物的细胞。

3. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述转移分子是核酸分子，该核酸分子包含全长基因或 cDNA 或编码相同物质的其它 DNA 或其功能性片段。

4. 如权利要求3所述的方法，其特征在于，所述核酸分子编码前药活化酶、蛋白质毒素、细胞凋亡诱导蛋白质、免疫刺激因子、肿瘤特异性抗原、免疫/炎症抑制剂、血管生成抑制剂、诱导血管形成的蛋白质、凝固启动蛋白、细胞内抗体或重组的免疫毒素。

5. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述转移分子是核酸分子，该核酸分子编码反义 RNA 分子、核酶、适体、寡核苷酸或三股螺旋构成的寡核苷酸。

6. 如权利要求3-5中任何一项所述的方法，其特征在于，所述核酸分子的长度为20-10000个碱基。

7. 如权利要求1-5中任何一项所述的方法，其特征在于，所述转移分子是多核苷酸，所述转移分子插入病毒构建物中，该病毒构建物含有能使该构建物包装在病毒运载体中所必需的病毒衍生元件。

8. 如权利要求1中所述的方法，其特征在于，所述病毒运载体是腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、噬菌体、流感病毒、仙台病毒、痘苗病毒或杆状病毒。

9. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，所述病毒运载体是腺病毒。

10. 如权利要求1-5、8或9中任何一项所述的方法，其特征在于，所述光敏剂定位于细胞内区室。

11. 如权利要求10所述的方法，其特征在于，所述细胞内区室是核内体或溶酶体。

12. 如权利要求 1-5、8 或 9 中任何一项所述的方法，其特征在于，所述光敏剂与病毒运载体分离。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述光敏剂和病毒运载体与所述细胞依次接触。

14. 如权利要求 1-5、8 或 9 中任何一项所述的方法，其特征在于，所述光敏剂选自 TPPS_{2a}、AlPcS_{2a} 和其它两亲性光敏剂。

15. 如权利要求 1-5、8 或 9 中任何一项所述的方法，其特征在于，所述光敏剂是 5-氨基乙酰丙酸或 5-氨基乙酰丙酸酯或它们的药学上可接受的盐的化合物。

16. 如权利要求 1-5、8 或 9 中任何一项所述的方法，其特征在于，所述病毒运载体与所述细胞接触 15 分钟到 6 小时。

17. 如权利要求 1-5、8 或 9 中任何一项所述的方法，其特征在于，照射前所述光敏剂与所述细胞接触 4-24 小时。

18. 如权利要求 1-5、8 或 9 中任何一项所述的方法，其特征在于，所述照射步骤为 1-10 分钟。

19. 如权利要求 1-5、8 或 9 中任何一项所述的方法，其特征在于，在照射前或照射后加入所述病毒运载体。

20. 如权利要求 1-5、8 或 9 中任何一项所述的方法，其特征在于，所述光敏剂和病毒运载体或其一或二者一起附着于，结合于，或偶联于一个或多个运载体分子、导向分子或载体。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述病毒运载体附着于、结合于或偶联于一运载体分子。

22. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述运载体分子包括聚阳离子或阳离子脂质。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述聚阳离子是聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸或 SuperFect®。

24. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述阳离子脂质是 DOTAP。

25. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述运载体分子是脂质体或脂类为基础的构建物。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述脂质体或脂类为基础的构建物含有至少一种阳离子脂质。

27. 一种药物学组合物，其特征在于，该组合物含有转移分子和光敏剂，所

述转移分子与病毒运载体结合。

28. 如权利要求 27 所述的组合物, 其特征在于, 所述转移分子是核酸分子, 该核酸分子包含全长基因或 cDNA 或编码相同物质的其它 DNA 或其功能性片段。

29. 如权利要求 28 所述的组合物, 其特征在于, 所述核酸分子编码前药活化酶、蛋白质毒素、细胞凋亡诱导蛋白质、免疫刺激因子、肿瘤特异性抗原、免疫/炎症抑制剂、血管生成抑制剂、诱导血管形成的蛋白质、凝固启动蛋白、细胞内抗体或重组的免疫毒素。

30. 如权利要求 27 所述的组合物, 其特征在于, 所述转移分子是核酸分子, 该核酸分子编码反义 RNA 分子、核酶、适体、寡核苷酸或三股螺旋构成的寡核苷酸。

31. 如权利要求 28-30 中任何一项所述的组合物, 其特征在于, 所述核酸分子的长度为 20-10000 个碱基。

32. 如权利要求 27-30 所述的组合物, 其特征在于, 所述转移分子是多核苷酸, 所述转移分子插入病毒构建物中, 该病毒构建物含有能使该构建物包装在病毒运载体中所必需的病毒衍生元件。

33. 如权利要求 27 所述的组合物, 其特征在于, 所述病毒运载体是腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、噬菌体、流感病毒、仙台病毒、痘苗病毒或杆状病毒。

34. 如权利要求 33 所述的组合物, 其特征在于, 所述病毒运载体是腺病毒。

35. 如权利要求 27-30、33 或 34 中任何一项所述的组合物, 其特征在于, 所述光敏剂定位于细胞内区室。

36. 如权利要求 35 所述的组合物, 其特征在于, 所述细胞内区室是核内体或溶酶体。

37. 如权利要求 27-30、33 或 34 中任何一项所述的组合物, 其特征在于, 所述光敏剂与病毒运载体分离。

38. 如权利要求 27-30、33 或 34 中任何一项所述的组合物, 其特征在于, 所述光敏剂选自 TPPS_{2a}、AlPcS_{2a} 和其它两亲性光敏剂。

39. 如权利要求 27-30、33 或 34 中任何一项所述的组合物, 其特征在于, 所述光敏剂是 5-氨基乙酰丙酸或 5-氨基乙酰丙酸酯或它们的药学上可接受的盐的化合物。

40. 如权利要求 27-30、33 或 34 中任何一项所述的组合物, 其特征在于, 所

述光敏剂和病毒运载体或其一或二者一起附着于，结合于，或偶联于一个或多个运载体分子、导向分子或载体。

41. 如权利要求 40 所述的组合物，其特征在于，所述病毒运载体附着于、结合于或偶联于一运载体分子。

42. 如权利要求 40 所述的组合物，其特征在于，所述载体分子包括聚阳离子或阳离子脂质。

43. 如权利要求 42 所述的组合物，其特征在于，所述聚阳离子是聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸或 SuperFect®。

44. 如权利要求 42 所述的组合物，其特征在于，所述阳离子脂质是 DOTAP。

45. 如权利要求 40 所述的组合物，其特征在于，所述运载体分子是脂质体或脂类为基础的构建物。

46. 如权利要求 45 所述的组合物，其特征在于，所述脂质体或脂类为基础的构建物含有至少一种阳离子脂质。

47. 权利要求 27-46 中任一项所定义的组合物的用途，其特征在于，用于制备治疗或预防患者患病、紊乱或感染的药物，所述疾病、紊乱或感染是癌症、类风湿关节炎、关节硬化、病毒或其它感染、牛皮癣、日光性角化病、创伤、骨折、疣或先天性遗传疾病。

48. 如权利要求 47 所述的用途，其特征在于，所述药物用于基因治疗，其中转移分子是核酸分子。

49. 光敏剂在制备治疗或预防患者患病、紊乱或感染的药物中的用途，其特征在于，所述药物是与结合了病毒的转移分子一起，或分别被施给病人的细胞或组织，所述疾病、紊乱或感染是癌症、类风湿关节炎、关节硬化、病毒或其它感染、牛皮癣、日光性角化病、创伤、骨折、疣或先天性遗传疾病。

50. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述药物用于基因治疗，所述转移分子是核酸分子。

51. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述光敏剂是 5-氨基乙酰丙酸或 5-氨基乙酰丙酸酯或它们的药学上可接受的盐的化合物。

52. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述转移分子是核酸分子，该核酸分子包含全长基因或 cDNA 或编码相同物质的其它 DNA 或其功能性片段。

53. 如权利要求 52 所述的用途，其特征在于，所述核酸分子编码前药活化酶、蛋白质毒素、细胞凋亡诱导蛋白质、免疫刺激因子、肿瘤特异性抗原、免疫/炎症

抑制剂、血管生成抑制剂、诱导血管形成的蛋白质、凝固启动蛋白、细胞内抗体或重组的免疫毒素。

54. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述转移分子是核酸分子，该核酸分子编码反义 RNA 分子、核酶、适体、寡核苷酸或三股螺旋构成的寡核苷酸。

55. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述病毒是腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、噬菌体、流感病毒、仙台病毒、痘苗病毒或杆状病毒。

56. 如权利要求 55 所述的用途，其特征在于，所述病毒是腺病毒。

57. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述转移分子是核酸分子，长度为 20-10000 个碱基。

58. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述转移分子是多核苷酸，所述转移分子插入病毒构建物中，该病毒构建物含有能使该构建物包装在病毒载体中所必需的病毒衍生元件。

59. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述光敏剂定位于细胞内区室。

60. 权利要求 59 的用途，其特征在于，所述细胞内区室是核内体或溶酶体。

61. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述光敏剂与病毒运载体分离。

62. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述光敏剂选自 TPPS_{2a}、AlPcS_{2a} 和其它两亲性光敏剂。

63. 如权利要求 49 所述的用途，其特征在于，所述光敏剂和病毒运载体或其一或二者一起附着于，结合于，或偶联于一个或多个运载体分子、导向分子或载体。

64. 如权利要求 63 所述的用途，其特征在于，所述病毒运载体附着于、结合于或偶联于一运载体分子。

65. 如权利要求 63 所述的用途，其特征在于，所述运载体分子包括聚阳离子或阳离子脂质。

66. 如权利要求 65 所述的用途，其特征在于，所述聚阳离子是聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸或 SuperFect®。

67. 如权利要求 65 所述的用途，其特征在于，所述阳离子脂质是 DOTAP。

68. 如权利要求 63 所述的用途，其特征在于，所述运载体分子是脂质体或脂类为基础的构建物。

69. 如权利要求 68 所述的用途，其特征在于，所述脂质体或脂类为基础的构

建物含有至少一种阳离子脂质。

病毒介导的分子传递进入胞质溶胶的光化学内在化

方法

本发明涉及采用光敏剂和用能有效激活光敏剂的波长的光照射细胞，将分子导入细胞的方法，其中将待导入的分子与一病毒载体(具体的是腺病毒)结合。本发明进一步涉及在基因疗法中本方法的用途。

基因疗法，即为了抵御疾病而对患者细胞进行遗传修饰，被认为对治疗多种疾病具有很大的治疗潜力，例如癌症、传染性疾病包括病毒或细菌感染、. 心血管疾病、遗传性疾病如囊性纤维化、免疫系统疾病和许多其它的疾病。然而基因疗法的临床发展仍面临许多尚未解决的难题，其中最重要的困难之一是寻找能有效和特异性传递治疗基因进入体内的靶细胞的方法(Verma 和 Somia, 1997, Nature, 389 卷, 239-242 和 Anderson, 1998, Nature 392 卷, 25-30)。

基因疗法可包括许多不同的可能的方法并可包括转移克隆的人基因或基因片段、双链的人类基因或基因片段、从其它基因组或生物体的基因、寡核苷酸和各种人造基因或其片段例如反义基因。

在现有方法中，已提出了许多不同的运载体用于基因疗法中来完成基因转移。例如可能提及聚阳离子化合物，阳离子脂类和病毒系统，但是到目前为止，体内基因疗法没有取得多少成功。目前方法的许多已知缺点是载体的血清稳定性低，基因递送的特异性有限，基因递送效率低等。病毒载体的使用需特别谨慎，由于病毒元件导入宿主可能引起发炎等副作用，与其它方法相比这种副作用不能通过提高转移而抵销。

大多数分子不容易穿透细胞膜。引导分子进入活细胞的胞质溶胶的方法是本领域已知的并且是操纵和研究生物过程的有用工具。其中最通常使用的方法是显微注射、红细胞血影介导的融合和脂质体融合、胞饮泡的渗透裂解、刮擦加载、电穿孔、磷酸钙和病毒介导的转染。这些技术对于操纵培养中的细胞是有用的，尽管在许多情况下它们可能不实用、耗费时间、效率低或者它们可能引起重要细胞的死亡。因此这类技术对于在生物学或医学研究、或治疗中的应用不是最适合的，它们常常不是充分有效，可能具有无法忍受的毒性作用或可能由于技术上的理由而不适用。

众所周知，卟啉和许多其它光敏化合物可引起对细胞和组织的细胞毒作用，

这些作用是基于这样的事实，即光敏化合物暴露于光时可能变成毒性或可能释放毒性物质如单线态氧或其它种类氧化的，这些毒性物质危害细胞物质或生物分子，包括细胞膜和细胞结构，这些细胞物质或膜的损坏可能最终杀死细胞。已利用这些作用来治疗各种异常或疾病，特别包括肿瘤性疾病。这种治疗称为光动力学疗法(PDT)，包括给予肌体受影响区域光敏(光化疗)剂，随后通过暴露于激活光(photoactivating light)，以激活光敏剂并将其转化为细胞毒性形式，由此杀死受影响的细胞或杀死降低其增殖能力。已知光敏剂将优先地或选择地定位于所需的靶部位，如定位于肿瘤或其它病损部位。

已知光敏剂的范围包括补骨脂素、卟啉、二氢卟吩和酞菁。当暴露于光时这些药物变成毒性。

卟啉光敏剂通过毒性种类氧的产生间接发挥作用，并被认为是 PDT 特别优选的候补物质。卟啉是血红素合成中的天然发生的前体。具体地说，当铁(Fe^{3+})通过亚铁螯合酶的作用掺入原卟啉 IX (PpIX) 时产生了血红素。PpIX 是一种极强的光敏剂，而血红素没有光敏作用。各种以卟啉为基础的或与卟啉相关的光敏剂是本领域已知的并描述于文献中。

细胞毒作用主要通过单线态氧的形成介导的。这种活性中间体在细胞中寿命非常短($<0.04 \mu s$)。这样，PDT 的主要细胞毒作用发生在光暴露期间，非常接近 1O_2 形成部位。 1O_2 与蛋白质(组氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、酪氨酸)、DNA(鸟嘌呤)、不饱和脂肪酸和胆固醇反应并氧化它们。PDT 的优点之一是不暴露于光的组织可不受影响，即可得到选择性的 PDT 作用。有很多关于使用 PDT 破坏不良细胞群体例如肿瘤细胞的文献，。专利文献描述了许多光动力化合物，单独或与靶向试剂偶联，例如靶向肿瘤细胞受体决定簇的免疫球蛋白，使该复合物更具细胞特异性。某些光化学化合物，例如血卟啉衍生物，还具有定位于恶性细胞的天生能力。这种方法和化合物的描述见挪威专利 173319 号和挪威专利申请 90 0731、176 645、176 947、180 742、176 786、301 981、30 0499 和 89 1491。这种 PDT 方法因此依赖于细胞结构的破坏导致细胞死亡。

另一方面 WO 96/07432 或待批申请 WO 00/54802 涉及利用光动力效应的方法，作为引导其它不能渗透膜的分子进入细胞的胞质溶胶的一种机制，从某种意义上说它不必产生大范围的细胞破坏或细胞死亡。在这些方法中，将待内在化的分子和光敏化合物同时或依次施加于细胞，据此光敏化合物和此分子被胞吞或以其它方式转移到核内体、溶酶体或其它胞内膜限制性区室中。

将转移的分子和光敏化合物一起或依次(优选分别和依次地)施加细胞并被细

胞一起摄入同一胞内区室(即被共-转移)中。然后在细胞内待内在化的分子通过细胞暴露于适当波长的光激活光敏化合物而释放,光敏化合物进而导致胞内区室膜的破坏和随后该分子释放进入胞质溶胶,该分子位于与光敏剂相同的区室中。这一方法称为“光化学内在化”或PCI。因此,在这些方法中,使细胞暴露于光的最后一步导致所述分子从与光敏剂相同的胞内区室释放并存在于胞质溶胶中。

据认为为了使该方法有效,当进行照射时光敏化合物待释放进入胞质溶胶的分子必须存在于同一胞内区室中。然而,由于已发现可通过类似的PCI方法将分子导入细胞的胞质溶胶,但其中细胞暴露于光不是必须的最后步骤,并且该方法不依赖于在光辐照时转移分子和光敏剂位于同一胞内区室。在这样的方法中,在待内在化分子传递进入胞质溶胶之前与细胞接触,使光敏剂与细胞接触并通过照射而激活。因此,尽管在光辐照时待内在化的分子和光敏剂不位于同一胞内区室中,该分子仍能进入细胞并递送到胞质溶胶。这些结果的详细描述见待批国际申请(以挪威镭医院研究基金会 Norwegian Radium Hospital Research Foundation)的名义申请于2001年11月29日,题名为“方法 Method”),纳入本文参考文献中。

令人吃惊的是现已发现PCI技术与病毒载体联用可大大地改进病毒介导的基因向细胞递送。由于光化学治疗已在临床中使用(Dougherty等,1998, J. Natl. Cancer Inst, 90卷, 889-905),并且通常是非常特异性的和副作用很少,因此上述技术对改进体内基因疗法的效率和特异性具有明显的潜力。

因此,本发明提供了一种导向分子进入细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与光敏剂接触,使所述细胞与待导入的、与病毒运载体结合的分子接触,和用能有效激活光敏剂的波长的光照射所述细胞。

可以任何适当的顺序进行这些步骤,只要最终的结果是细胞摄取了该病毒运载体并因此待导向分子进入了细胞和内在化。实施本发明除了病毒运载体和光敏剂外不需要其它的分子。

本文所用的术语“细胞”包括所有真核细胞,包括昆虫细胞和真菌细胞,包括体细胞和生殖细胞。因此,典型的“细胞”包括所有类型的哺乳动物和非哺乳动物的细胞、植物细胞、昆虫细胞、真菌细胞、原生动物和原生质体,优选哺乳动物的细胞如人、小鼠、大鼠、猫、狗、绵羊、马、牛和山羊的细胞。

本文所用的“内在化”指有或没有附着于病毒运载体待导入到细胞中的分子(有时本文称为“转移分子”)进入胞质溶胶的过程。因此在本发明的情况下,“内在化”包括待导入分子的释放步骤,任选地与病毒运载体的全部或部分结合,从

胞内/膜结合区室进入胞质溶胶和此后转移到细胞核中。根据本发明的方法一旦分子内在化就认为已被“导入”了细胞。

胞的膜限制区室可以是存在于细胞中的任何这样的区室。区室较佳地是膜囊，特别是核内体和溶酶体。然而胞内区室还可包括高尔基体或内质网。

如本文所用，“细胞摄取”或“转位”指内在化的步骤之一，其中细胞膜外的分子或物质被摄入细胞，因此发现它们在外层细胞膜的内部，例如来通过胞吞作用或其它适当的摄取机制，例如进入或结合于胞内膜-限制区室，如内质网、高尔基体、溶酶体、核内体等。

导入细胞中的适当的“分子”可能是与病毒运载体、病毒载体或病毒颗粒结合的任何分子，有时本文称之为“转移分子”。通常这种分子是核酸分子并可包含待导入细胞的全长基因或其功能性片段，或可以是例如包含其基因的完全编码序列或其功能片段的 cDNA 序列。或者，所述核酸分子可编码反义 RNA 分子、核酶、适体、寡核苷酸或三股螺旋构成的寡核苷酸、或包括转录因子“诱饵” DNA 等。较佳的核酸分子的长度为 10-30,000 个碱基，例如长 20-10000 个碱基。

本文使用的“与之相结合”指以某种方式掺入或结合于一病毒运载体、病毒载体或病毒颗粒的分子，例如，掺入所述的病毒分子的基因组中或与所述基因组分离但携带于该病毒颗粒中的分子。通常将待导入细胞的分子包裹或掺入病毒颗粒中，包裹或掺入病毒的衣壳中。较佳的待转运分子是多核苷酸，较佳地插入病毒构建物中，该病毒构建物含有使其能包装在病毒载体中所必需的病毒衍生元件。可待转运的分子例如克隆入病毒运载体基因组上的某克隆位点。或者，可如下文描述使用具有这种特征的两个或多个分离的分子。可以选择这种病毒颗粒如此它们可能或不能感染其同类细胞，如果它们可以感染其同类细胞，一旦它们内在化进入细胞中可以选择它们，能或不能利用内源性细胞机制复制和装配从细胞分泌的新病毒。然而，通常，当用于基因疗法或其它体内应用时，出于安全的原因通常使病毒载体残缺以致它们可以感染宿主细胞但不能复制、装配新的病毒粒子和感染新细胞，即复制不完全。可使用任何适当的方法进行这种残缺，但常规上是通过删除病毒复制所需的一些病毒基因和任选地在它们位置上插入待转移的治疗基因。然而，本申请中描述的技术还可利用复制活性和复制受限型病毒，例如 ONYX-15 (Khuri F.R.等, (2000), *Nature Med.*6, 879-885) 或例如 Wildner 及其同事描述的编码复制受限制的腺病毒的单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wildner O.等, (1999) *Gene Ther.*6, 57-62; Wildner O.等, (1999) *Cancer Res.*59, 410-413), 或例如 D.Klatzman 描述的复制性逆转录病毒 (在欧洲基因治疗协会第 8 次会议上

的口头发言和摘要, Stockholm, 2000年10月7-10日)。

待导入细胞的整个分子, 即掺入或包裹有待导入分子的病毒运载体, 有时本文称做“转移颗粒”。

使用本发明的方法待导入细胞的核酸通常是病毒基础构建物的一部分, 例如, 一种病毒质粒, 该质粒含有某些能使该构建物包装入病毒运载体/病毒衣壳/病毒载体之中所必需的病毒衍生元件。然而, 或者, 待导入的核酸可形成一种分子的一部分, 例如, 存在一种质粒和一种第二分子, 它包括含有第一分子的病毒运载体发育所必需的序列。另外, 如果细胞中的核酸作用取决于其编码蛋白质的表达或其 RNA 的产生, 该核酸通常侧接有适当的调节序列(如启动子)以保证在具体的靶细胞中高水平表达。这种调节元件可来自病毒(如巨细胞病毒的 CMV 启动子)或任何其它适当的生物和设计能使该核酸分子编码的蛋白质良好表达的适当的病毒构建物, 这是本领域技术人员所熟知的。例如, 可采用组织特异性或可调节性启动子来获得组织或疾病特异性或可调节的表达。例如可采用组织特异性启动子黑素瘤特异性酪氨酸酶启动子。可调节性启动子如四环素-调节启动子是熟知的。可在本发明中使用的更多的特异性或调节启动子的例子可在 Hart, I. R. (Semin. Oncol., 1996, 23, 154-158), Miller 和 Whelan (Hum. Gene Therapy, 1997), Nettelbeck 和 Muller (Trends Genet., 2000, 16, 174-181) 和 Spear (Anticancer Res., 1998, 18, 3223-3231) 及其参考文献中找到。

转移分子与之结合的“病毒运载体”分子可以是任何病毒系统, 只要该系统的病毒运载体能够结合、掺入或包裹待导入细胞的分子。因此通常将转移分子包装在病毒颗粒或病毒衣壳中, 术语“病毒颗粒”、“病毒衣壳”和“病毒载体”也在本文中使用, 意指“病毒运载体”。这里使用的这些术语不包括病毒为基础的质粒或 DNA, 尽管这种质粒可用于产生病毒运载体。

本发明使用的适当的病毒系统的例子是腺病毒和腺伴随病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、噬菌体、流感病毒、仙台病毒、痘苗病毒和杆状病毒, 较佳的是腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒、慢病毒和噬菌体。腺病毒是本发明方法中使用的优选病毒系统。本发明使用的病毒运载体通常形成天然发生病毒的修饰形式, 增加了所需的特性和最大程度减少了可能的致病性或其它不良副作用。因此, 病毒运载体代表常规用于基因疗法的病毒变体, 这在本领域中是熟知的, 但是保留了源病毒基本的和可鉴定的组分。

本文中使用的“光敏剂”指光激敏制剂, 当施用激活光时, 该光敏剂转变为细胞毒性形式或产生细胞毒类物质。根据本发明所用的光敏剂(它是独特的并最好

不同于转移分子)常规上是任何可定位于细胞内区室具体是核内体或溶酶体中的这类制剂。这种光敏剂的范围是本领域已知的并描述于文献中,包括 W096/07432。在这一方面本文涉及已显示定位于培养细胞的核内体和溶酶体中的二磺酸和四磺酸铝酞菁(例如 $AlPcS_{2a}$)、磺酸四苯基卟吩(TPPSn)、尼罗蓝、二氢卟吩 e^6 衍生物、尿卟啉 I、叶赤素、血卟啉和亚甲基蓝。在大多数情况下这种地位是由于内吞行为而致。因此,光敏剂优选摄取进入溶酶体或核内体的内部区室的制剂。然而,也可使用定位于内质网或高尔基体等其它胞内区室的其它光敏剂。还可设想认为可能起作用的机制是,此种光化学治疗的作用是对其它细胞区室(即除膜-限制区室外的组分)的。因此,例如一种可能性是此种光化学处理破坏了细胞内转运或囊泡融合所需的重要分子。这种分子可能不一定位于膜-限制区室中。

因此可提及的适当光敏剂的类别包括卟啉、补骨脂素、酞菁、紫红素、二氢卟吩、苯卟啉奈氰蓝 naphthalocyanine、阳离子染料、四环素和亲溶酶体的弱碱基或其衍生物或其前体(Berg 等, J. 光化学和光生物学 Photochemistry and Photobiology, 1997, 65, 403-409)。其它适合的光敏剂包括 texaphyrin、脱镁叶绿酸、porphycene、菌绿素、二氢卟吩酮(ketochlorin)、血卟啉衍生物及其它们的衍生物、5-氨基乙酰丙酸及其衍生物诱生的内源性光敏剂、光敏剂之间的二聚物或其它偶联物。

优选光敏剂是游离形式的,即不偶联于任何其它大分子。尤其优选的是光敏剂与病毒运载体分离,即是一种分立的实体。然而,光敏剂或者可结合、附着、或偶联于一个运载体或下文描述的其它分子,例如附着于靶向抗体或偶联于聚赖氨酸等运载体。或者,在某些情况下,该光敏剂可直接附着、偶联或结合于病毒运载体或其一部分(例如逆转录病毒的周围脂膜)。

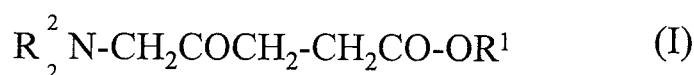
优选的光敏剂包括 $TPPS_4$ 、 $TPPS_{2a}$ 、 $AlPcS_{2a}$ 和其它两亲性光敏剂。

在一个较佳的方面,本发明提供了方法,该方法中光敏剂是 5-氨基乙酰丙酸或 5-氨基乙酰丙酸酯或其药学上可接受的盐化合物。

在这种酯中 5-氨基基团可被取代或不被取代,后一情况是 ALA 酯。

更具体地,本发明所用的 ALA 酯是具有任选取代的烷醇的 5-氨基乙酰丙酸酯,即烷酯或取代的烷酯。

方便地,可使用的 ALA 酯是具有公式 I 的化合物



(其中 R^1 可代表任选地由羟基、烷氧基、酰氧基、烷氧基碳酰基氧、氨基、芳基、

氧代或氟代基团取代的和任选地为氧、氮、硫或磷原子中断的烷基； R^2 ，其中的每一个可以是相同的或不同的，代表一个氢原子或一个基团 R^1 及其盐。

取代的烷基 R^1 基团可以是单个或多个取代。因此适合的 R^1 基团包括例如未取代的烷基、烷氧基烷基、羟基烷氧基烷基、多羟烷基、羟基聚亚烷基烷氧基等。本文使用的术语“酰基”包括羧化物和碳酸盐基团，因此酰氧基取代的烷基包括例如烷基碳酰基氧烷基。在这种基团中任何亚烷基部分较佳地具有下文定义烷基的碳原子成分。较佳的芳基包括苯基和单环 5-7 个原子的杂芳族化合物，特别是苯基和这种其自身被任选地取代的基团。

典型的取代的烷基 R^1 包括烷氧基甲基、烷氧基乙基和丙基基团或酰氧基甲基、酰氧基乙基和酰氧基丙基如新戊酰甲氧基。

本发明用作光敏剂的较佳 ALA 酯包括那些其中 R^1 代表一个未取代的烷基和/或各个 R^2 代表一个氢原子的酯。

本文所用的术语“烷基”包括长链或短链、直链或支链脂肪族饱和或不饱和烃基。不饱和的烷基可以是单-或多不饱和的包括烯基和炔基。这种基团可含有多达 40 个碳原子。然而，优选地烷基含有多达 10 个例如 8 个碳原子，更佳地含有 6 个，特别优选地含有 4 个碳原子。

具体提及的可能是 ALA-甲酯、ALA-乙酯、ALA-丙酯、ALA-己酯、ALA-庚酯和 ALA-辛酯及其盐的制备，它们代表本发明所用的优选光敏剂。

本发明的方法或通过全身或局部原位治疗，或活体外处理后给予肌体处理的细胞在体外或体内使用。

为了实施本发明的方法，使细胞与光敏剂“接触”和与病毒运载体分离的步骤可以任何便利的或需要的方式进行。因此，如果接触步骤在体外进行，细胞可方便地维持在含水培养基，例如合适的细胞培养基中，在适当的时间将光敏剂或病毒运载体简单地加入在适当条件下的培养基，例如以适当的浓度培养适当的时间。

将光敏剂以适当的浓度与细胞接触一段适当的时间不难由本领域技术人员采用常规技术而确定，并取决于所用的具体光敏剂和细胞类型。光敏剂的浓度必须是一旦被摄入细胞(例如进入或结合于一个或多个细胞内区室)并为照射激活，一个或多个细胞结构即被破坏，例如一个或多个细胞区室被裂解或破裂。例如在本发明的实施例中使用的光敏剂可以 10-50 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度使用。通常体外使用的浓度范围可以宽得多，例如 0.05-500 $\mu\text{g/ml}$ 。对于人体内治疗，当全身性给予时，光敏剂可在 0.05-20mg/kg 体重的范围内使用，或以溶剂配成 0.1-20%局部施用。

在较小动物中浓度范围可能不同，可作相应地调节。

细胞与光敏剂培育的时间(即“接触”时间)可从几分钟到几小时，例如甚至长达 48 小时或更长。培育的时间应使光敏剂为适当的细胞所吸收。

细胞与光敏剂培育，随后可任选地与无光敏剂的培养基培育一段时间，然后使细胞暴露于光或加入转移分子。

转移分子可为上述核酸分子并使之接触与适当浓度/剂量的病毒运载体结合的细胞，并接触一段适当的时间。病毒运载体的适当的浓度可根据摄取所述载体进入所述细胞的效率以及细胞中希望达到的最终浓度确定。采用与病毒运载体结合的 PCI 的令人惊奇的优越性之一，是可用较低剂量的病毒颗粒获得相同的转染效率，例如，比单用病毒颗粒少 20 倍。当然所用病毒运载体的适当剂量将取决于所用的病毒类型，对于体内应用，取决于给药方式，待治疗的疾病类型、是否使用导向配体(见下文)等。通常对于非-复制型腺病毒载体每次注射，将注射 10^3 到 10^{13} 噬斑形成单位(pfvs, 传染性颗粒)。这通常相当于 10^5 - 10^{15} 个病毒颗粒，因为在一个“通常的”病毒制剂中仅约 1%的病毒颗粒引起感染。对于复制活性病毒甚至低于上述剂量可能有效，例如可使用低至 10^3 个颗粒，例如 10^3 - 10^6 , 10^{10} 或 10^{15} 个颗粒。另一方面，采用全身性给予时可能需要增加剂量。

已观察到的进一步的优越性是大大改进了可获得的转染效能，甚至实验中所有细胞高达 100%被转染。使用已知的方法，达到这种水平以前是不可能的或需要受到禁止的高剂量病毒。因此，优选地，本发明的方法获得在所有细胞中转染超过 50%，特别优选地超过 75、85 或 95%。

病毒运载体的“转染时间”或“细胞摄取时间”，即载体与细胞的接触时间，可以是几分钟或高达几小时，例如，可采用的转染时间从 10 分钟到 10 小时或 24 小时，例如从 15 分钟到 10 小时或例如 10 或 30 分钟到 2、3、4 或 6 小时。转染时间的增加可导致所述运载体摄取的增加。

在照射前、后或同时应用病毒运载体。当在照射后应用时，病毒运载体的应用可在例如照射后 0-4 或 0-24 小时，照射后 1、2、4、8、10 或甚至 12 小时以上。任选地，细胞与病毒运载体接触后，将其转移到不含载体的培养基中，例如 5 分钟以上，诸如 15 分钟到 2 小时，例如 30 分钟，然后照射。当在照射前应用时，例如可在照射前 12 小时，例如照射前 15 分钟到 2 小时，任选地在不含病毒运载体的培养基中培育一段时间。

应理解病毒运载体与细胞接触产生转染的时间在体内应用时难以控制。然而，当进行活体外、体外或某些形式的局部给药时，接触时间可通过适当接触和洗涤

步骤控制。

如 W096/07432、W000/54802、和本文所附的待批申请(以“挪威镭医院研究基金会”的名义申请于2001年11月29日的国际专利申请,题名为“方法 Method”)所描述,光敏剂和与待导入分子结合的病毒运载体可在光处理/照射前分别或一起加入细胞,或者光敏剂先加入细胞,随后进行照射步骤,然后如本文所附待批申请描述的那样加入病毒运载体。在后一方法中,优选地在细胞摄取转移分子(这里是病毒运载体)之前进行照射,特别优选地照射后转移分子与细胞接触,例如照射后0-4小时。或者,细胞与转移分子接触的时间与照射的时间基本相同。

换言之,照射步骤或者在细胞摄取病毒运载体进入细胞内区室之前或者在细胞摄取后进行,只要照射前光敏剂已被摄取进入细胞内区室。如果在光照时光敏剂和病毒运载体已被摄入细胞的胞内区室,那么在光照时病毒运载体和光敏剂可位于相同或不同的胞内区室中。各种成分加入细胞的时间设定的进一步详述见本领域前面的文献 W096/07432 和 W000/54802 或本文所附的共待批申请中的论述,本文将其纳入参考文献中。

无论如何,使病毒运载体与细胞接触直到被细胞摄入和内在化的时间窗口,可取决于各种因素如细胞类型、所述的具体运载体、所用的具体光敏剂和光处理持续期间。对于一套具体的条件,如果需要,该时间窗口可由本领域技术人员确定并很好地掌握。

给予病毒运载体的时间将根据该方法是在体外还是在体内进行而不同。对于体外方法通常使病毒运载体同时与所有的靶细胞接触,即给予的时间与接触的时间一致,如果细胞在体外培养基中培育的话,因此在适当的时间点使载体与细胞接触相对容易。然而在体内,靶细胞与病毒运载体接触的步骤显然更加复杂并取决于给予的方式、病毒运载体的类型和靶细胞的位置。例如,可将病毒运载体直接给予靶细胞,例如通过注射,使病毒载体与靶细胞(或至少其中的一部分)相当迅速地接触,例如在给予后大约几分钟或几小时。

如果另一方面通过静脉内注射将病毒运载体给予远外靶细胞,那么这些载体可能花费长得多的时间与靶细胞接触。例如给予后它们可能要花费24-96小时到达靶细胞。相对于光敏剂处理和照射的时间,决定给予病毒载体的适合时间一定要考虑“旅程时间”。当然同样要考虑给予光敏剂的时间。然而,不与转移分子不一样,照射前充分地给予该光敏剂是很重要的,这样在照射时所述光敏剂已被摄入胞内区室中。因此适宜地使用所述光敏剂1-72小时,例如4-72小时,4-48或4-24小时后再照射。此外,如以上讨论的关于使病毒运载体(和转移分子)与细胞

接触的步骤，与照射的时间点有关的光敏剂给予的时间设定，将取决于光敏剂到达靶细胞和被靶细胞摄入的时间。该时间可能取决于该方法是在体外还是在体内进行或是直接给予靶组织或给予远外部位而不同。在所有情况下，重要的是光敏剂已被靶细胞摄入后才进行照射。可如所述光敏剂与所述细胞保持接触直到照射，例如接触 1 或 4-72 小时，较佳地 4-24 小时，例如 12-20 小时，或在照射前刻脱离接触，例如 5 分钟以上，如 10 分钟-8 小时，如在无光敏剂的培养基和/或含有转移分子的培养基中培养 1 小时到 4 或 6 小时。

因此，虽然体内情况比体外复杂得多，本发明的基本原理还是相同的，即给予时间必须是在照射前使适量的光敏剂与靶细胞接触并被靶细胞摄入，和或(i)在照射前或照射过程中转移分子(及其病毒运载体)或者被细胞所摄入，或者经充分接触后被靶细胞摄入与光敏剂相同或不同的细胞区室中，或(ii)照射后转移分子和与之结合的病毒运载体与细胞接触一段时间足以使之摄入细胞中。

任选地，光敏剂可附着、结合、或偶联于一个或多个运载体分子、导向分子或导向载体，它们可以促进或提高光敏剂的摄入或可导向或递送这些实体进入具体的细胞类型、组织或细胞内区室。运载体系统的例子包括聚赖氨酸(如聚-L-赖氨酸或聚-D-赖氨酸)、二甲亚胺或树型化合物 dendrimer(如阳离子树型化合物如 SuperFect®)或其它聚阳离子、硫酸葡聚糖、不同的阳离子脂类如 DOTAP 或脂质转染或与“辅助脂质”配制的阳离子脂类如 DOPE、脂质体、重组的 LDL-颗粒、空间排列稳定的脂质体或衍生自例如腺病毒、慢病毒和其它逆转录病毒、腺伴随病毒、噬菌体等病毒系统的不同的颗粒。这些运载体系统通常可以改善光敏剂的药物动力学和增加细胞对光敏剂的摄入还可指导光敏剂进入胞内区室，这对于获得光化学内在化特别有利，但是它们通常不能将光敏剂靶向特异性细胞(如癌细胞)或组织。

病毒运载体也可附着、结合、或偶联于一个或多个这种运载体分子、导向分子或导向载体。或者，一些病毒载体颗粒的表面修饰对于本发明中的使用可能是有利的。使用这种载体和/或表面修饰的潜在好处是：(i)通常通过增加循环时间改进了病毒载体的药物动力学和其体内分布；(ii)伪装病毒与其正常的受体结合的能力，使得可能将病毒再导向其它受体(从而导向正常情况下不被病毒感染的组织)；(iii)在病毒载体上提供阳性表面电荷，因此它将结合并感染比其天然感染机制更大范围的细胞；(iv)“隐藏”病毒逃避免疫系统。

较佳地使病毒运载体附着、结合或偶联于一个运载体分子，较佳地该运载体包含聚阳离子(如聚赖氨酸或 SuperFect®)或阳离子脂类。

可用于本发明的运载体的例子是聚阳离子(Lanuti M等,(1999),Gene Ther. 6, 1600-1610; Arcasoy S.M.等(1997), Gene Ther. 4, 32-8; Dodds E.等,(1999), J.Neurochem. 72, 2105-2122)和阳离子脂质(Clark P.R.等(1999)Cancer Gene Ther. 6, 437-446)。可用于本发明的表面修饰的例子是:聚乙二醇(Croyle M.A.等(2000)Hum. Gene Ther. 11, 1713-1722)和聚-[N-(2-羟丙基)-甲基丙烯酰胺]基的聚合物(Seymour, L.等,(2000)J. Gene Med. Suppl. 到 2(5)卷, 52页)。

为了实现特异性或选择性地导向病毒运载体分子(此处是转移的分子)和/或光敏剂进入具体的细胞类型或组织,可使这些突体结合或偶联于特异性的导向分子,这将促进特异性细胞摄入转移分子进入所需的细胞或组织。这种导向分子还可指导转移分子和/或光敏剂进入细胞内区室,这对获得光化学内在化特别有益。

可使用许多不同的导向分子,其描述见于 Curiel, D. T. (1999), Ann. New York Acad. Sci. 886, 158-171; Bilbao, G.等(1998), Gene Therapy of Cancer(Walden等编,Plenum Press, 纽约)Peng K.W.和 Russell S.J. (1999), Curr. Opin. Biotechnol. 10, 454-457, Wickham T.J. (2000), Gene Ther. 7, 110-114。

另外,注意到宁可使它们附着于特异性运载体是重要的,本领域已知一些适用于本发明方法的光敏剂显示它们对某些组织部位具有先天偏爱的定位。例如已知某些光敏剂,如血卟啉衍生物,优先地或选择性地定位于肿瘤组织或其它损伤病灶。几个其它例子描述见于 Boyle 和 Dolphin(Photochem. Photobiol. 64: 469-485(1996))。在本发明的方法中可利用这种偏爱定位。

可使导向分子可结合、粘合或偶联于病毒载体、光敏剂或它们二者,可使用相同的或不同的载体或导向分子。

对于 PCI 的利用特别有益的是上述这种导向分子或运载体还可用于引导病毒载体或光敏剂进入具体的细胞内区室,例如溶酶体和核内体。

认为在细胞的胞质溶胶中转移分子最初与病毒运载体保持结合,一旦照射步骤发生,就从胞内区室释放出转移颗粒。一旦转移颗粒内在化进入细胞的胞质溶胶,事件的发生将取决于所选择的病毒载体系统。例如,就腺病毒来说,通常腺病毒颗粒(与转移分子结合)移动进入细胞核,然后病毒 DNA(和核酸转移分子)进入细胞核。在任何情况下,光化学内在化后核酸转移分子掺入病毒颗粒或运载体中,和随后可能发生的事件取决于该病毒运载体,核酸分子应存在于正确的胞内区域,从而可产生适当的细胞内加工而允许导入的转移分子发挥其所需的功能。例如,如果转移分子编码一所需的蛋白质,那么加工步骤将导致该蛋白质所需的表达。如果转移分子是编码反义 RNA 分子的 DNA 分子,那么加工步骤将导致从 DNA 转录

为 RNA 等。

根据本领域熟知的技术和程序进行激活光敏剂的光照射步骤。例如，根据使用的光敏剂选择光的波长和强度，较佳地为 $40\text{--}200\text{ J/cm}^2$ 的剂量水平，如 100 J/cm^2 和 $300\text{--}800\text{nm}$ 波长，如 $500\text{--}700\text{nm}$ 。适合的光源在本领域是已知的。本发明方法中使用的细胞暴露于光的时间和光的剂量可能不同。一般而言，适当的照射时间和剂量可由本领域技术人员选择，以能够使含有光敏剂的胞内区室破坏并随后摄取和/或释放转移颗粒进入胞质溶胶。转移颗粒内在化进入胞质溶胶的效率似乎随暴光的增强而增加。对于照射步骤优选的时间长度取决于光敏剂、在靶细胞或组织中累积的光敏剂的量以及光敏剂的吸收光谱和光源的发射光谱之间的重叠。通常，照射步骤的时间长度是数分钟到几小时，例如，较佳地达到 60 分钟如 0.5 或 1 分到 30 分钟，例如达到 10 或 15 分钟，如从 0.5 到 3 分钟，或从 3 分钟到 10 分钟和较佳地约 7 分钟，如 6-8 分钟。适当的光剂量可由本领域技术人员选择，也取决于光敏剂和靶细胞或组织中累积的光敏剂的量。例如，用光敏剂 Photofrin 和原卟啉前体 5-氨基乙酰丙酸对癌症进行光动力治疗，使用的典型光剂量在 $50\text{--}150\text{ J/cm}^2$ 的范围内，流量范围低于 200mW/cm^2 以避免体温过高。当使用在可见光谱红光区具有较高消光系数的光敏剂时，光剂量通常较低。然而，对于用累积较少的光敏剂治疗非-癌性组织，需要的光总量可能基本上高于癌症治疗所需的量。

由于光化学处理即通过光敏剂的作用，本发明的方法将不可避免地杀死一些细胞。然而，这些细胞的死亡不要紧并且实际上对于许多应用是有利的，如癌症治疗，在有些情况下通过刺激局部免疫应答而增强了治疗效果。然而可修改本发明的方法，这样可通过选择与光敏剂浓度有关的光剂量调节存活细胞部分。这种方法也是本领域已知的。不管纯粹的光化学处理引起的细胞死亡的量，调节光剂量是重要的，因此一些显示 PCI 效果的个体细胞不会被纯粹的光化学处理杀死(尽管后来它们可能由于 PCI 作用而被杀死)。

在一些应用中，PCI 处理后保留大量的活细胞可能是适当的。例如在一些基因疗法中，允许转移的核酸分子编码的蛋白质表达的活细胞的量是重要的。在这样的应用中，细胞群，基本上所有的细胞，或绝大多数的细胞(至少细胞的 50%，较佳地至少 60、70、80 或 90%)未被杀死。当然这不总是令人满意的，特别是用 PCI 导入细胞毒性转移分子和进一步杀死细胞时，这是不利的。可是，通过使用例如基因疗法也可得到细胞毒性作用，基因疗法中治疗的基因通过本发明的方法内在化进入肿瘤细胞，例如，因此这些细胞将产生免疫活性物质，这些物质将诱导局部免疫杀死剩余的癌细胞，或诱导对肿瘤细胞的全身性免疫应答。在这种情况下

下，PCI 处理后显然需要一部分活细胞。

有关与病毒运载体结合的转移分子内在化的 PCI 方法的优越性在于：1) 只要待导入的分子可以掺入病毒运载体并且病毒运载体可被靶细胞摄取，对待导入细胞的分子的大小没有限制；2) 该方法是位点特异性的，因此只有暴露于光的区域起作用；3) 就转移分子被导入细胞的比例和/或转移分子的表达水平而言，病毒运载体的内在化比标准病毒感染更有效；4) 由于内在化效率的提高需要较低剂量和滴度的病毒；5) 它无致癌性。

实施例的特征在于在光照射步骤后将转移分子(及其病毒运载体)加入细胞具有进一步的优越性，即

a) 减少对转移分子及其病毒运载体的光化学损伤；

b) 由于可见外科手术暴露病损，随后例如作肿瘤内注射或其它局部给予病毒运载体(及其相结合的转移分子)进行光化学治疗，简化了与外科联合的内部损伤的 PCI 治疗；

c) 该方法更加不依赖于治疗的精确时间设定，即相对于光照的时间点加入待细胞摄取的分子的时间设定。这意味着有一个更大的治疗“时间窗口”。由于治疗性分子的摄取在不同的临床条件下可能有很大的不同，并且在临床条件下对于各病损这种摄取难以估计，因此重要的是获得一个更大的时间窗口是非常有益的。

d) 发生转移分子迅速转位到胞质溶胶，由此大大减少了转移分子被溶酶体降解的可能性。

本发明的方法可用于引导分子进入细胞，如上所述，可作为脂质体融合、磷酸钙转染等现有技术的一种替代方法。

在本发明一个优选的实施例中，为了基因治疗的目的将分子导入细胞。

基因治疗可通过许多策略进行，其中最适当的可由本领域技术人员依据疾病的具体发病机理进行选择。

一种方法涉及定向杀死特异性细胞。该方法在癌症治疗中很流行，并包括使基因导向靶细胞然后表达以引起细胞杀伤。这种细胞杀伤可能通过直接机制发生，例如，如果导入的基因编码一种致死毒素或编码一种前体药物，该前药能赋予细胞对随后给予的药物杀伤作用的敏感性。另外，此种细胞杀伤可能是间接的，例如采用免疫刺激基因作为导入基因以引起或增强对靶细胞的免疫应答，或采用编码与外源性加入的分子相互作用引起细胞死亡的蛋白质的基因(如编码一种能活化前体药物的酶的基因，如 HSV-tk 可活化 GCV)。适当的自杀基因、前体药物编码基因和免疫刺激基因是熟知的并记录于本领域文献中。

进一步的方法涉及靶向抑制基因表达。在 DNA、RNA 或蛋白质水平上特异性阻断基因表达的各种不同方法是本领域技术人员熟知的，并且这些方法中的任何方法都可与本发明的方法结合使用，可用于导入适当的分子手段来阻断基因进入细胞表达。因此，在本发明优选的方面中，待导入的分子是含有或能够转录或表达功能性产物的 DNA 序列，它将在某种水平上抑制靶细胞的基因表达，例如通过包含、表达或转录反义分子、核酶或胞内抗体。

另一种方法涉及基因增强疗法，由于某基因功能损失而引起疾病，并且该疾病可通过导入正常基因的额外拷贝到患者适当的细胞中而治愈时。因此在本发明的又一优选的特征中，待导入的分子是能够表达功能性产物的基因或它的一部分以补偿患者体内的缺陷。

另一方法是靶向突变的校正，其中将一核酸分子导入患者的适当的细胞中导致患者 DNA 中引起疾病的突变的直接校正。该方法是本领域所熟知的并描述于本领域的文献中。

根据本发明的方法核酸/基因转移进入细胞后，插入的基因/核酸可整合进入宿主细胞的染色体，或作为染色体外遗传元件保留(即保留为游离型)。可选择和设计适当的载体用于诱导这二种可能性之一。

导入基因整合进入染色体的优点是，随着细胞分裂该基因可通过染色体复制而永久保留。由于后代细胞也含有该导入基因，可获得导入基因的长期稳定性表达。因此，使用这种方法的基因疗法可提供治愈一些疾病的可能性。例如，在由活跃分裂细胞组成的组织中，目标是靶向干细胞(产生组织的成熟分化细胞的未分化前体细胞的少数群体)。然而，染色体整合有它的缺点，这已有很好的描述，包括例如由于偶然整合导致致癌基因的活化引起癌症发生的危险。

活体外基因疗法，其中取出患者的靶细胞，体外处置后再导入患者体内，提供了选择成功整合的细胞的机会。例如，在转移细胞回到患者体内前，通过体外扩增细胞，然后核查具有明显证据的肿瘤转化表型。因此当需要染色体整合时这种活体外疗法是优选的。

另外可设计能掺入基因/核酸的载体系统用于引导基因进入细胞，在细胞中导入基因依然作为染色体外元件存在并可高水平表达。如果细胞正在活跃分裂，导入的基因可能不能均等地分离到子细胞中，这样长期表达可能是个问题。因此，为了治愈遗传疾病可能需要重复治疗包括基因转移。然而，使用允许更高效靶向基因转移的本发明 PCI 为基础的转移方法(见下文)，进行重复治疗的可能性大大增加。另外在某些情况下可能不需要稳定的长期表达。例如，癌症基因疗法经常

涉及基因转移进入癌细胞和表达目的在于杀死细胞。在这种方法中，一旦消除了恶性肿瘤，治疗性基因就可能不需要了。

如上所述，本发明中使用的适当的病毒系统是腺病毒和腺伴随病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、仙台病毒、噬菌体、痘苗病毒和杆状病毒。

逆转录病毒具有能够整合进入染色体 DNA 的有利特性，但是仅感染活跃分裂的细胞。整合的 DNA 可稳定增殖，提供永久治愈疾病的可能性。尽管对于许多疾病的治疗其缺点是它们仅仅感染活跃分裂的细胞的特性，然而，当活跃分裂的肿瘤细胞被选择性感染并被杀死，而对正常组织的非分裂细胞没有大的危险时，有利于正常情况下具有不分裂细胞的组织的癌症的基因治疗。

腺伴随病毒需要与例如腺病毒或 HSV 等辅助病毒共感染才能发生毒性感染，即感染导致子代病毒粒子的产生。然而，在缺乏辅助病毒时，DNA 的染色体整合仍可发生。因此，可依据有关的应用选择腺伴随病毒载体的适当类型。

另一方面腺病毒还感染非分裂细胞。通过受体介导的胞吞作用进入细胞，尽管插入的核酸迁移进入细胞核但是没有出现整合，因此插入基因的表达仅可维持短时期。可以很高的滴度产生腺病毒载体，接受的典型插入片段大小高达 7-8kb，但是最近腺病毒载体技术的发展允许在特殊设计的载体中使用的插入片段大小为约 30kb (Kochanek (1999), Hum. Gene Ther., 10, 2451-2459)。因为它们能够感染许多不同类型的细胞，所以腺病毒得到广泛的应用，并且是体内基因治疗策略中使用的通用载体。实际上，腺病毒是本发明方法中使用的优选病毒载体。

然而，虽然腺病毒是体内基因递送最有效的载体之一，由于一些严重的问题使它们的使用复杂化，例如对该病毒的免疫学反应、暂短的基因表达以及在靶组织中导致低的转导效率的不良组织分布。并且，限制腺病毒递送的治疗基因的表达能力对于靶细胞是困难的，但对于避免不良副作用可能非常重要，例如由于在机体正常细胞中毒性基因产物的表达(意味着杀死癌细胞)，例如在生命器官如肝中。基因疗法中使用的其它病毒载体具有相似的缺点。

光化学内在化与本发明方法联合使用，能够改进一些问题。首先，PCI 的使用能够大大提高靶组织中转基因表达的水平 and 程度(即能够产生更大数量的高水平地表达转基因的细胞)。另外，PCI 显示能提高病毒感染的效率，因此只需要相当低的病毒剂量即可产生缺乏 PCI 时见到的相同数量的基因转导。在感染复数值(MOI)较低的情况下这种 PCI 增强病毒感染的效率将允许在具有低病毒穿透力的组织区域内的病毒转导，因此允许在接受太少的病毒颗粒以至于用常规感染方法不能有效转导的区域内进行转导。因此预期采用局部给予时，组织中病毒的浓度将

随作用位点距离的增加迅速下降，这是病毒感染技术一项非常重要的改进。

PCI 诱导病毒感染效率增加的另一优点是在保持转导效率同时可使用较低的病毒剂量，因此减少了与腺病毒和其它病毒介导的基因疗法有关的免疫学问题。最后，可使用光化学处理来提高对靶细胞感染的特异性。这首先是由于只有光照区域用于 PCI，其次由于一些光敏剂固有地在患病区域内优选积累。通过照射患病区域将治疗基因的活性引入患病部位的能力是本发明一个非常有希望的方面，这使之在较高程度上能够避免由于治疗基因在机体“错误”位置上表达所产生的不良副作用。PCI 使之能够采用低剂量的基因治疗剂也将减轻副作用。预期可获得的高特异性使腺病毒和其它病毒载体的全身性给予具有可行性。而且，如上所述 PCI 还能与靶向载体联用，可能进一步改善基因递送的特异性。

如先前讨论的 PCI 的应用，认为 PCI 对于质粒/聚赖氨酸复合物的转染增强作用以及对于其它分子如蛋白质递送的增强作用是由于光诱导的内吞小泡的破裂，并且，虽然不希望采理论所束缚，在腺病毒介导的基因转导的刺激中，应涉及相同的机制似乎是合理的。然而，与质粒/聚赖氨酸复合物和其它分子如蛋白质相反，腺病毒从核内体逃逸据认为是一种有效过程，已报导其中超过 40%的细胞结合的病毒颗粒到达细胞核(Greber, U.F. 等(1993)Cell 75, 477-486; Leopold, P.L. 等(1998), Hum. Gene Ther. 9, 367-378)。因此，从文献所描述可以预计如果 PCI 能够诱导所有细胞结合病毒颗粒的核转运, PCI 至多能够提高 2.5 倍的腺病毒基因转导效率。因此令人非常吃惊的是可观察到在基因转导中 PCI 诱导的增强作用超过 20 倍，目前，对这个出乎意料的巨大作用我们没有良好的解释。一种可能性是由于核内体不同的释放机制，受 PCI 处理的病毒颗粒可能具有比正常感染的病毒更高的“固有的转导效率”。也可能在正常的感染中核内体释放腺病毒在低 MOI(感染复数)时效率较低，此时 PCI 具有最好的效果。也可能光化学处理会影响其它过程如病毒摄取、核转运或转基因的转录。

本发明的另一个方面提供了治疗中优选使用的药物组合物，该组合物含有与病毒运载体结合的转移分子和光敏剂。组合物中的光敏剂也可任选地与病毒载体分子或如上述其它非病毒载体分子结合。病毒载体较佳地是其自身附着、结合或偶联于一个或多个载体分子(较佳地是聚阳离子或阳离子脂质)、导向分子或导向载体。任选地，病毒载体和光敏剂之一或二者可与上述相同或不同的导向分子结合。较佳地，该组合物用于基因治疗。对于基因治疗，优选的病毒运载体分子是腺病毒或从其衍生的病毒载体。具体地适用于基因治疗的条件、疾病和感染包括癌性肿瘤如基底细胞癌、发育异常或其它生长、类风湿关节炎、关节硬化、病毒

和其它感染、牛皮癣、日光性角化病、伤口愈合、骨折愈合、疣和先天性遗传疾病如囊性纤维化、格林综合征、毛细血管扩张共济失调和代谢异常。

用于基因疗法作为转移分子的优选基因是编码前药活化酶的基因，例如单纯疱疹胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶；蛋白质毒素例如白喉毒素或白树毒素、死亡诱导蛋白例如 p53 或 apopoptin；免疫刺激因子例如白细胞介素(优选 IL-2、IL-12、IL-18)、肿瘤坏死因子 α 、趋化因子；肿瘤特异抗原例如突变的 ras 蛋白或 Mart-1；免疫/炎症抑制因子例如白细胞介素-10、IL-1 受体拮抗剂或可溶性 TNF 受体；血管生成抑制因子例如内皮抑制素 endostatin；诱导血管形成的蛋白质例如血管内皮生长因子；凝固引发蛋白例如组织因子；胞内抗体；重组的免疫毒素；核酶或反义 RNA 分子等。

因此本发明的另一个方面提供了如本文所描述的与病毒动载体和光敏剂结合的转移分子的用途，用于治疗、较佳地是基因治疗所用药物的制备。对于所述用途，使光敏剂和病毒结合的转移分子通过选择的适当给予时间或者一起或者分别与患者的细胞或组织接触，用能有效激活光敏剂的波长的光如上所述照射所述细胞。

治疗方法以及优选地包括本发明方法的基因治疗方法构成本发明的各个方面。因此，本发明提供了使用基因疗法治疗或预防患者疾病、紊乱或感染的方法，该基因疗法包括根据本文前面描述的方法，将转移分子导入体外、体内或活体外的一个或多个细胞，并且当需要时(即当体外或活体外进行转染时)给予所述患者所述细胞。

如本文所定义“治疗”指相对于治疗前的症状，减少、减轻或消除被治疗的疾病、紊乱或感染的一个或多个症状。“预防”指延缓或防止疾病、紊乱或感染症状的发生。

本发明的组合物也可包含含有通过本发明方法已导入所述细胞的转移分子的一个细胞或一群细胞，，优选地用于治疗，特别是基因治疗。

因此，本发明的另一个方面提供了含有已导入所述细胞的转移分子的一个或一群细胞，该细胞通过本发明的方法获得。

本发明的另一个方面提供了这种细胞或细胞群的用途，该用途在于制备治疗、较佳地是基因治疗所用的组合物或药物。

本发明还提供了治疗患者的方法，该方法包括给予所述患者本发明的细胞或组合物。所述方法较佳地用于基因治疗，即包括如本文前面所述的将分子导入细胞并给予所述患者这样制备的所述细胞的步骤。

在体内，可使用本领域普通的或标准的任何方式给予病毒载体、光敏剂、含有转移分子的细胞、组合物等，例如肌肉内、皮下、腹膜内、肿瘤内或静脉内注射、灌注、吸入或局部给予机体内部和外部表面。对于体内使用，本发明可用于有关的任何组织，该组织含有光敏剂和病毒载体将定位的细胞，包括体液定位以及实体组织。只要光敏剂可被靶细胞摄取并且光可适当地递送，就可治疗所有的组织。关于光的递送，显然这对于人体或动物体的外部表面不存在问题。对于内部表面技术，例如光纤设备的使用可用于有效照射许多内部表面。另外，可结合能暴露需要治疗的表面的外科手术进行此治疗。

因此，本发明的组合物可根据药物学领域已知的技术和步骤以任何方便的方式配制，例如使用一种或多种药物学可接受的运载体或赋形剂(即与组合物中的其它成分相容并且受体生理上可以接受)。根据选择和给药所需的途径、治疗的目的等，可以常规方式选择组合物和载体或赋形剂材料的性质、剂量等。本发明的组合物也可含有其它适当的制剂。例如，对于一些治疗应用和一些给予途径，使用例如能够提高该病毒载体组织穿透的制剂，如蛋白酶，是有利的(Kuriyama, N. 等, 2000, Hum. Gene Ther. 11: 2219-2230)。

组合物可局部(例如通过肠、口腔、舌下、齿龈、腭、鼻、肺、阴道、直肠、或眼递送)，口服或肠胃外给予。局部给予组合物是优选的，并包括凝胶、乳脂、软膏、喷雾、洗剂、油膏、棒状物、肥皂、粉剂、片剂、薄膜、阴道栓剂、气雾剂、滴剂、溶液和本领域任何其它常规的药物形式。

软膏、凝胶和乳脂可以，例如，用添加了适当增稠剂和/或胶凝剂的水性或油性基质配制。洗剂可使用水性或油性基质配制，通常还含有一种或多种乳化、分散、悬浮、增稠或着色的试剂。粉剂可使用任何适当的粉状基质辅助配制。滴剂和溶液可使用水性的或非水性基质配制，也含有一种或多种分散、溶解或悬浮剂。通过使用适当的推进剂，可从加压包装中方便地传送气雾剂。

另外，可以适合于口服或肠胃外给予的方式提供此组合物。因此另一种药物学形式包括含有任选地加有一种或多种惰性常规运载体/或稀释剂的活性成分的平片剂或包衣片剂、胶囊、悬液和溶液，例如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、微晶纤维素、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、酒石酸、水、水/乙醇、水/甘油、水/山梨醇、水/聚乙二醇、丙二醇、十八烷醇、羧甲基纤维素或脂肪物质如固体脂肪或它们的适当混合物。

该组合物还可包含下文提及的润滑剂、湿润剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、甜味剂、调味剂、吸附增强剂、表面渗透剂等等。可采用本领域熟知的方法配制

本发明的组合物给予患者后提供快速、持续的或延迟的活性成分释放。还可采用增溶剂和/或稳定剂，例如环糊精(CD) α 、 β 、 γ 和 HP- β 环糊精。

可同样以常规方式确定剂量，剂量可能取决于所述分子的特性、治疗的目的、患者的年龄、给予的方式等。还应考虑照射时与光敏剂结合破坏膜的潜力/能力。然而通常，对于体外使用，光敏剂的浓度范围 0.05-500 μ g/ml 是适当的。对于人体内治疗，全身性给予时，可使用范围在 0.05-20mg/kg 体重的光敏剂，或以溶剂配制的 0.1-20%光敏剂局部施用。在小动物中，其浓度范围可以不同并可相应地调整。

在体内使用的最终的组合物中导入与病毒载体结合的分子，病毒颗粒的浓度可以是 1×10^{-9} 到 50%，例如 3×10^{-6} 到 50%，如 0.003 到 30%，如 0.2 到 10%(w/w)，其中 w/w 指除了待导入的分子外，病毒载体的重量相对于最终组合物的重量。如果用于 1ml 的注射液中，这相当于约 10^5 - 10^{15} 个病毒颗粒的剂量。体外使用 1 - 1×10^5 个之间的病毒颗粒，例如可使用 1×10^3 - 1×10^5 个病毒颗粒。

现在，在随后的非限制性的实施例中，通过参考如下附图将更详细地描述本发明，其中：

图 1 显示光化学转导的 WiDr 细胞的 X-gal 染色。该细胞用 AlPcS_{2a}(S)处理，以 MOI 5 的 AdHCMV-lacZ(Ad)感染并如图所示进行光处理。经过 2 天的培育使转导的 β -半乳糖苷酶基因表达，该细胞用 X-gal 染色并如上述用显微镜分析。该细胞经如下处理：A. 不处理。B. 仅用腺病毒。C. AlPcS_{2a}+8 分钟光照。D. AlPcS_{2a}+腺病毒+8 分钟光照。

图 2 显示在 HCT 116 细胞(实验组 A)和 WiDr 细胞(实验组 B)中光化学增强的转导的流式细胞仪分析。用 AlPcS_{2a}(S)处理细胞，以 MOI 5 的 AdHCMV-lacZ(Ad)感染细胞并如所述进行光照。两天后，细胞加入荧光素二- β -D-吡喃半乳糖苷，并用流式细胞仪分析。图 2A 显示 HCT 116 细胞的流式细胞术分析的斑点图。垂直线右侧的细胞视为腺病毒转导阳性，因为实际上或者对于未处理的细胞(上图)，或者对于仅接受 AlPcS_{2a}和光照(下图)的细胞，在这一区域内都没有细胞。各图中标示了不同的处理方法。图 2B 显示作为 WiDr 细胞光剂量的函数的转导效率。如图 2A 下面所描述定义了% β -半乳糖苷酶阳性细胞((\square)S-, Ad+; (\blacktriangle)S+, Ad-; (\bullet)S+, Ad+)和并记录平均荧光强度((\circ)S+, Ad+)。误差棒代表 2-5 次不同实验的平均值标准差(SEM)。

图 3 显示在不同病毒剂量时 WiDr 细胞的 PCI 增强的转导。以不同 MOI 的 AdHCMV-lacZ 感染细胞，并如所述进行光化学处理。图 3A 显示整个细胞群的平均

荧光。处理方法如下：无阴影各柱：只有 AlPcS_{2a}；斜线平行交叉阴影：MOI=1；灰色：MOI=5；水平交叉阴影：MOI=20；黑色：MOI=50。误差棒是 3 次实验的 SEM。图 3B 显示整个细胞群的 β -半乳糖苷酶活性的成倍增加。符号与图 3A 中的一致。误差棒是 3 或 4 次实验的标准误差。

图 4 显示光化学处理对 THX 细胞的腺病毒转导的作用。

图 5 显示光化学处理对用 AdHCMV-lacZ 感染的 THX 细胞中 β -半乳糖苷酶表达的作用。对于“光照前”策略，在进行 3 分钟的光照前，将经过 AlPcS_{2a} 预处理的细胞培养在不含 AlPcS_{2a} 的培养基中 4 小时。光照后，37°C 用 AdHCMV-lacZ (MOI=1) 感染细胞 30 分钟。然后加入 2ml 的培养基，细胞再培养 2 天然后分析 β -半乳糖苷酶的表达。对于“光照后”策略，将经 AlPcS_{2a} 处理的细胞培养在不含 AlPcS_{2a} 的培养基中 3 小时。然后用 AdHCMV-lacZ 进行 30 分钟感染加入 2ml 的培养基后，细胞再培养 30 分钟，进行 3 分钟的光照两天后分析 β -半乳糖苷酶的表达。

图 6 显示随着照射时间的增加，用编码 β -半乳糖苷酶的腺病毒进行 PCI 介导的转导，结果是 β -半乳糖苷酶产生增加。对于不同样品的处理(+、-代表有或没有)和光剂量(照射的时间)见图中标示。Adv：腺病毒 AdHCMV-lacZ。S：光敏剂 AlPcS_{2a}。

图 7 显示在不同的感染复数时 PCI 对 WiDr 细胞转导的效果。□-没有照射，■照射 90 秒。

图 8 显示 PCI 对 A549 细胞的腺病毒转导效果。对于不同样品的处理(+、-代表有或没有)和光剂量(分钟)见图中标示。A：腺病毒 AdHCMV-lacZ。S：光敏剂 AlPcS_{2a}。

图 9 显示 PCI 对 HeLa 和 FmexIII 细胞系的转导的 PCI 效果。无阴影条柱——未照射，实体条柱——90 秒钟照射。

图 10 显示 PCI 对腺病毒与聚-L-赖氨酸运载体联合转导 WiDr 细胞的效果。AD：腺病毒 AdHCMV-lacZ。PLL：聚-L-赖氨酸。5PLL/Ad 指复合物每个病毒颗粒平均含有 5 个 PLL 分子。○-Ad MOI 5，■-5PLL/Ad，● -500 PLL/Ad，□-250 PLL/Ad，▲- 50 PLL/Ad。

图 11 显示经不同照射时间，PCI 对使用聚-L-赖氨酸作为病毒运载体的人皮肤成纤维细胞系的腺病毒转导的效果。□- MOI 5：非组合的腺病毒 AdHCMV-lacZ。■-MOI 5/PLL：AdHCMV-lacZ 与每个病毒颗粒上 250 分子的 PLL 组合。

图 12 显示使用聚阳离子 dendrimer SuperFect®作为病毒运载体，在各种浓度下，PCI 对腺病毒转导的效果。

图 13 显示不同时间光照和给予腺病毒的影响。Y 轴左侧的时间点代表在照射前加入病毒，右侧的时间点代表照射后加入病毒。■- 1 分钟照射；□- 未照射。

图 14 显示经各种光照时间后，PCI 增强了编码单纯疱疹病毒胸苷激酶的腺病毒载体的基因治疗效果。使用编码 HSV-tk 的腺病毒载体的 PCI 诱导的基因转导后，细胞杀伤受到 9-[1,3-二羟-2-丙氧甲基]鸟嘌呤的影响。Al: AlPcS_{2a}; AdV-TK: 编码 HSV-tk 的腺病毒; GCV: 9-[1,3-二羟-2-丙氧甲基]鸟嘌呤。◆-只有 Al; □-Al+ AdV-TK; △- AL+GCV 浓度为 10 μg/ml (A)、25 μg/ml (B) 或 100 μg/ml (C); ■-AL+ AdV-TK+GCV, 浓度为 10 μg/ml (A)、25 μg/ml (B) 或 100 μg/ml (C)。

实施例 1

在初次实验中人 WiDr 腺癌细胞用光敏剂 AlPcS_{2a} (在相邻的环上具有 2 个基的酞菁铝) 处理，用含有 β-半乳糖苷酶受体基因的 AdHCMV-lacZ 腺病毒感染并如实验方法中所述进行光处理。由于 β-半乳糖苷酶的活性细胞被染色，镜检显示大部分光处理的细胞表达该转基因(图 1D)，而在未照射的腺病毒感染细胞中仅检测到几个阳性细胞(图 1B)。在未处理的样品中(图 1A)或接受了 AlPcS_{2a} 和光照但没有接受腺病毒的样品中(图 1C)没有见到阳性细胞，因此观察到的光诱导的 β-半乳糖苷酶表达增加源于腺病毒递送的转基因，而非源于内源性 β-半乳糖苷酶基因。

实施例 2

使用流式细胞仪进行定量分析，采用使 β-半乳糖苷酶表达细胞发出荧光的底物荧光素二-β-D-吡喃半乳糖苷。从图 2A 中可以看到在腺病毒感染的 HCT 116 细胞中光化学处理大大提高了 β-半乳糖苷酶的活性。因此，β-半乳糖苷酶阳性细胞的百分比从一般感染细胞(Ad+, S-, 0 分钟光照)的 6.3±0.1%(标准差, n=3)增加到接受最佳处理(Ad+, S+, 8 分钟光照)细胞的 88±17%(n=3)。同样地，对于相同的样品平均荧光强度从 52±11%(n=3)增加到 632±163%(n=3)相对荧光单位(RFU)。光化学处理在未感染的细胞中也轻微地增加了平均荧光强度(图 2A, 上图和下图)从 6 到 12RFU。然而，由于荧光和阳性细胞水平很低(在 Ad-, S+, 8 分钟光照的样品中为 0.4%)，在解释病毒感染细胞的结果时没有发生困难。

在 WiDr 结肠癌细胞中，观察到基因转导的更高的光依赖性增加(图 2B)。因此，当光照的感染病毒的细胞与未光照的细胞比较时发现 β-半乳糖苷酶阳性细胞的百分比最大增加了 22 倍，平均荧光强度增加了 44 倍。仅用光化学处理(图 2B, Ad-, S+, ▲)不显著改变阳性细胞的百分比，仅用光照的也不改变阳性细胞的百

分比(图 2B, Ad+, S-, □)。

通过使用化学发光的 β -半乳糖报道基因试剂盒(Roche, Cat.No. 1 758 241)确证了 WiDr 细胞提取物的流式细胞仪测定结果, 显示由于光化学处理 β -半乳糖苷酶活性增加了 30 倍(未显示)。

实施例 3

我们下一步研究了病毒剂量对光化学增强的转导效率的影响。如图 3 显示, 在测试的所有病毒剂量下光化学处理都增强了转导。然而, 与 MOI 分别为 20 和 50 时的 10 倍和 5 倍的增长相比, 在较低的病毒剂量时效果更加明显(MOI 感染复数为 1 和 5), 分别观察到 15 至 35 倍之间的平均荧光强度增长(图 3B)。还可看到(图 3A)在最适光剂量(7 分钟)、MOI 为 5 时获得的平均荧光强度, 约为没有光处理 MOI 为 50 时观察到的水平的 2 倍。同样的, 使用光处理在 MOI 1 时获得的水平与 MOI 20、没有光处理的水平基本相同。因此, 使用光化学处理时, 低 20 倍的病毒剂量足以获得与不用光化学处理时感染的相同水平的基因转导。

在该试验中, 与未光照的细胞的 $13 \pm 4\%$ ($n=3$) 比较, MOI 50 时获得的 β -半乳糖苷酶阳性细胞的百分比是 $90 \pm 3\%$ ($n=3$)。与上文提出的 HCT 116 细胞的结果一起表明, 使用腺病毒 PCI 可转导全部细胞群。

实验方案

细胞和腺病毒

从美国典型培养物保藏所 American Type Culture Collection 获得 HCT 116 和 WiDr 人结肠癌细胞(分别为 ATCC nos. CCL-247 和 CCL-218)。在含有 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 2mM 谷氨酰胺(购自 Gibco BRL, Paisley, UK)的 RPMI 1640 培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C、5%的 CO₂ 气体中培养细胞。

通过在 293 细胞中使用 pJM17 系统进行同源重组获得了由人巨细胞病毒启动子控制的编码大肠杆菌 lacZ 基因的重组腺病毒 AdHCMV-lacZ(Addison 等, 1997, J.Gen.Virol. 78: 1653-61)。对重组载体进行噬斑纯化, 在 293 细胞系中生长至高滴度并用 CsCl 区带纯化(Hitt 等, 1995, Methods Mol.Genet. 7: 13-30)。在含有 0.68mM CaCl₂ 和 0.5mM MgCl₂ 的 PBS 中稀释此病毒液至 MOI, 用于不同的实验中。

光化学处理

在 6-孔平板中接种每孔 50 000 个细胞(Costar), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。加入 1ml

含有 20mg/ml AlPcS_{2a} (Phorphyrin Products, Logan, UT) 的培养基, 细胞 37°C 培养 18 小时, 用培养液洗涤 3 次并 37°C 再培养 3 小时。除去培养基, 加入 200 μ l 的 AdHCMV-lacZ。37°C 培养 30 分钟后, 加入 2ml 培养基, 培养细胞 30 分钟然后暴露于红光 (Phillips TL 20 W/09, 通过 Cinemoid 35 滤器过滤, 到达细胞的光强度为 13.5W/m²)。在分析 β -半乳糖苷酶活性前, 细胞 37°C 培养 2 天。

细胞的 X-gal 染色

为了进行 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-吡喃半乳糖苷) 染色吸弃培养基, 加入 1ml 固定液 (含有 0.05% 戊二醛的 PBS), 室温培养细胞 15 分钟。吸弃固定液, 室温下细胞以 PBS 洗涤三次 (第二次洗涤 10 分钟, 第一次和第三次进行快速洗涤)。加入 1ml X-gal 溶液 (5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆, 1mM MgCl₂, 1mg/ml X-gal), 细胞 37°C 培养 4 小时或过夜, 用装有 MC100 Spot 照相机 (Zeiss) 的 Axiovert S100 显微镜 (Zeiss) 观察。

流式细胞仪分析

细胞以胰蛋白酶消化、离心、重悬于 25ml 培养基中并 37°C 培养 5 分钟。加入 25ml 的 2mM 荧光素二- β -D-吡喃半乳糖苷 (分子探针 Molecular Probes, Eugene, OR), 细胞 37°C 培育 1 分钟后加入 450ml 冰冷培养基稀释。样品在冰上保持 30-60 分钟, 通过 50mm 筛孔尼龙滤器过滤, 在 FACS-Calibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 中分析。每个样品收集 10 000 个细胞。用氩激光器 (15mW, 488nm) 激发后, 通过 510-530nm 滤光器测定荧光素-荧光。通过门控正向散射相对侧散射区分单个活细胞与死细胞。使用 CELLQuest 软件 (Becton Dicknson) 分析数据。

实施例 4

PCI 对 THX 细胞的腺病毒转导的作用

材料

荧光素二- β -D-吡喃半乳糖苷 (FDG) 购自 Molecular Probes (F-1179)。通过在以 DMSO/乙醇的 1:1 混合液溶解荧光素粉制备 20mM 的贮存液。将此混合液逐渐加入到适当体积的冰冷水中以制备 H₂O/DMSO/乙醇比例为 8:1:1 的溶液。

在人细胞系 293 中形成重组的病毒 AdCA171lacZ 并增殖, 将 Ad E1-转化的胚胎肾细胞系维持在添加有 10%FCS, 100 U/ml 青霉素 (Gibco-BRL)、0.1 mg/ml 链霉素 (Gibco-BRL) 和 2mM 谷氨酰胺的 MEMF-11 培养液中。

重组病毒的构建

通过使用 293 细胞系中的 pJM17 系统进行同源重组获得在人 CMV 启动子控制下的编码大肠杆菌 lacZ 基因的重组腺病毒 AdCA17lacZ (Addison 等, 1997, J. Gen. Virol, 78, 1653-1661)。噬斑纯化重组的载体, 在 293 细胞系中生长至高滴度并用如前所述的氯化铯区带离心进行纯化 (Hitt 等, 1995, Methods in Mol. Genetics, 7, 15-30)。

细胞的致敏

将 THX 细胞 (4×10^5 个细胞) 接种在 6cm 的培养皿中使之生长过夜。大约 60% 铺满时, 以 2ml 添加有 $20 \mu\text{g/ml}$ AlPcS_{2a} 的培养基更换进行培养, 将培养皿放回培养箱培养 16-18 小时。然后吸出含有致敏剂的培养基, 在光处理和病毒感染前, 将细胞在普通的培养基中培养至少 4 小时。

细胞的感染

用胰岛素-EDTA 用于从 3 个培养皿中分离细胞, 通过 Burcher chamber 计数计算出培养皿中的平均细胞数。根据细胞感染数以含有 0.68mM CaCl₂ 和 0.5mM MgCl₂ 的 PBS 制备腺病毒稀释液。通常, 以 m. o. i (感染复数) 为 1 和 10 感染细胞。

加入病毒前, 使细胞暴露于红光 (Philips TL 20W/09, 通过 Cinemoid 35 滤光器过滤, 到达细胞的光强为 1.35mW/cm^2) 3 分钟。随后吸出培养基, 然后在各个培养皿中加入 $200 \mu\text{l}$ 病毒悬浮液 (或对不用病毒处理的对照, 加入含 0.68mM CaCl₂ 和 0.5mM MgCl₂ 的 PBS)。37°C 培养 30 分钟后, 加入 5ml 普通培养基, 使细胞生长 48 小时。

β -半乳糖苷酶测定

细胞用胰岛素-EDTA 分离, 并重悬于 5ml 的培养液中。1000 rpm 离心 5 分钟后, 吸出培养液, 将细胞沉淀重悬于 $50 \mu\text{l}$ 的培养液中, 试管放置于 37°C 的水浴中 5 分钟。随后, 加入 $50 \mu\text{l}$ 37°C 预热的 2mM FDG-溶液, 试管放回水浴 1 分钟。最后, 加入 $900 \mu\text{l}$ 培养液, 在用如上所述的流式细胞仪分析样品前, 试管在冰上培育 30-60 分钟。

用 AlPcS_{2a} (图 4 中表示为 PS) 和腺病毒 (图 4 中表示为“病毒”) 处理 THX 细胞, 暴露于如材料和方法中描述的光 3 或 4 分钟, 并用流式细胞仪测定 β -半乳糖苷酶 (β -gal) 的活性。综合 β -gal 阳性细胞和它们的 β -gal 活性定量测定 β -gal 总

活性。通过 PCI 处理 β -gal 阳性细胞的数目和平均 β -gal 活性都得到提高。

结果显示当细胞仅用病毒培养或用病毒和光敏剂而不作光化学处理时，THX 细胞发生最小程度的感染，即对光敏剂施加光可显著地加强了细胞的转导(如 β -gal 活性增加所显示的那样)。

实施例 5

腺病毒介导的基因转导的光化学刺激

每孔接种 5×10^4 个 THX 细胞到 6-孔平板中。第二天加入 $20 \mu\text{g/ml}$ 的 AlPcS_{2a} ， 37°C 培养细胞 18 小时。加入 AlPcS_{2a} 后的所有步骤在减弱的光下进行。对于“光照前”的策略，将细胞洗去 AlPcS_{2a} 并在不含 AlPcS_{2a} 的培养基中培养 4 小时。细胞暴光 3 分钟后用腺病毒载体 AdHCMV-lacZ (在实施例 4 中也称为 AdCA17lacZ) 以感染复数 (MOI) 1 处理 30 分钟。该载体含有 β -半乳糖苷酶报道基因，其表达可用流式细胞仪分析(见下文)。

对于“光照后”策略， AlPcS_{2a} 处理和洗涤细胞后先如上文所示以相同浓度的腺病毒处理相同的时间，洗涤，加入新鲜培养基后暴露于光。未照射的细胞除照射外以相似的方式处理。

处理的细胞用培养液洗涤一次，在加入新鲜培养基后，然后作进一步分析培养 37°C 。光照后 2 天用流式细胞仪分析 β -半乳糖苷酶的表达。病毒构建(该病毒或者称为 AdHCMV-lacZ 或者称为 AdCA17lacZ)、细胞处理、光照和 β -半乳糖苷酶表达分析的详细方法描述于实施例 4 中。

结果(图 5)显示使用“光照前”策略进行的光化学处理(图 5 右手侧条柱所显示)使 β -半乳糖苷酶表达细胞的百分比提高了约 6 倍；在这些实验条件下从 2.5% 提高到 15%。还可看到使用“光照前”方法的效果与使用“光照后”方法获得的效果基本相同(图 5 左手侧条柱所显示)。

实施例 6

用编码 β -半乳糖苷酶的腺病毒进行 PCI 介导的转导增加了 β -半乳糖苷酶的产生

培养细胞，与 AlPcS_{2a} 一起培育、用病毒 AdHCMV-lacZ 感染并如实施例 3 中“实验方法”所述进行照射。为了测定 β -半乳糖苷酶蛋白质的产生，根据制造商的说明书使用了化学发光的 β -Gal 报道基因试剂盒 (Roche, Cat. No. 1 758 241)。简言之，细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次并向每孔中加入 1ml 细胞裂解试剂。室温培养 30

分钟后，将细胞提取物转移到微量离心管，以最大速度、4℃离心 2 分钟，将 50 μ l 的细胞提取物(上清液)转移到微量滴定板孔中。加入 100 μ l 的底物试剂，微量滴定板用箔覆盖室温平缓摇动培育 15 分钟到 1 小时。培育后，微量滴定板放置于照度计中(Victor2 Wallac 1420 Multilabel Counter)并自动注入 50 μ l 的初始溶液。延缓 1 秒钟后，将 5 秒内的光产物合并。从含有已知 β -半乳糖苷酶量的样品的标准曲线计算出 β -半乳糖苷酶的量。

结果

图 6 显示 β -半乳糖苷酶蛋白质产生的增加，这可在 WiDr 人结肠癌细胞的 PCI 诱导的腺病毒转导后获得。

因此，从图 6 可以看出在最大的光剂量时，可观察到在转导的细胞中 β -半乳糖苷酶蛋白质的产生增加了约 25 倍，与流式细胞仪分析获得的结果非常一致(如实施例 2 和 3)。

实施例 7

在不同的感染复数时 PCI 对 WiDr 细胞转导的效果

将 WiDr 细胞培养于添加有 10% FCS(胎牛血清)、青霉素/链霉素和 L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中。在减弱的光中，除去培养基，然后加入含有 1 μ g/ml TPPS_{2a} 的培养基。细胞(使其不受光照)37℃培养 18 小时。细胞用培养液洗涤 3 次并再培养 3 小时。除去 6-孔平板中的培养液，向各个孔中加入 200 μ l AdHCMV-lacZ 腺病毒溶液，37℃培养细胞 30 分钟(使其不受光照)。除去病毒溶液，用培养液洗涤细胞一次。加入 2ml 培养液，37℃培养细胞 30 分钟(使其不受光照)。使一些细胞暴露于蓝光 90 秒，到达细胞的光强度为 11mW/cm²。在用实施例 3 中“实验方法”所描述的流式细胞仪分析 β -半乳糖苷酶活性前，培养细胞 2 天(仍使其不受光照)。

结果

图 7 显示甚至在采用易操纵的病毒剂量进行常规感染不可能的情况下，通过使用 PCI 可获得 100%转导的细胞。因此，图 7 显示用 WiDr 细胞和 100 MOI 的病毒剂量用 PCI，获得 100%的转导，而常规感染获得不到 30%的转导。类似的，在 MOI 50 时，用 PCI 后获得大于 90%的转导，而不用 PCI 可获得少于 20%的转导。

实施例 8

PCI 对 A549 细胞系的腺病毒转导的效果

将 A549 细胞培养于添加有 10% FCS(胎牛血清)、青霉素/链霉素和 L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中。在减弱的光中, 除去培养基, 然后加入含有 20 μ g/ml 的 AlPcS_{2a} 的培养基。细胞(使其不受光照)37°C 培养 18 小时。细胞用培养液洗涤 3 次并再培养 3 小时。除去培养液, 向各个孔中加入 200 μ l 的 AdHCMV-lacZ 腺病毒溶液(MOI 为 5), 37°C 培养细胞 30 分钟(使其不受光照)。除去病毒溶液, 用培养液洗涤细胞一次。加入 2ml 的培养液, 37°C 培养细胞 30 分钟(使其不受光照)。使一些细胞如“实验方法”中所描述暴露于红光。在用实施例 3 中“实验方法”所描述的流式细胞仪分析 β -半乳糖苷酶活性前, 培养细胞 2 天(仍使其不受光照)。

结果

图 8 显示 PCI 可显著增强腺病毒介导的 A549 人肺癌细胞的基因转导。因此, 当与“正常感染”(A+S-样品, 0 分光照)相比较, 用 6 分钟照射时间的 PCI 使转导细胞的数量增加了约 11 倍, 从约 3%到约 33%的阳性细胞。

实施例 9

PCI 对 HeLa 和 FmexIII 细胞系转导的效果

HeLa 细胞系从美国典型培养物保藏所获得, 人黑素瘤 FmexIII 细胞系在挪威镭医院建立。培养细胞, 与光敏剂 TPPS_{2a}(1 μ g/ml)一起培育、用 AdHCMV-lacZ 腺病毒(MOI 5)感染, 如实施例 7 中描述进行照射和分析。

结果

图 9 显示 PCI 在 HeLa 和 FmexIII 细胞系中也提高了转导。

实施例 10

PCI 对腺病毒与聚-L-赖氨酸运载体联合转导的效果

培养 WiDr 细胞与光敏剂 TPPS_{2a}(1 μ g/ml)一起培育、如实施例 7 所描述。聚-L-赖氨酸(PLL, MW20700)购自 Sigma。根据 Mittereder 等(J. Virol. 1996 11: 7498-7509)通过测定 A260 确定病毒制剂中病毒颗粒的浓度。

制备了以下腺病毒/PLL-复合物:

5PLL/Ad: 每个病毒颗粒 5 分子 PLL。

500PLL/Ad: 每个病毒颗粒 500 分子 PLL。

250PLL/Ad: 每个病毒颗粒 250 分子 PLL。

50PLL/Ad: 每个病毒颗粒 50 分子 PLL。

将 PLL 稀释液加入到病毒颗粒稀释液中。通过倒转或用移液管尖头轻轻抽吸小心地混合样品，室温培育 30 分钟。

除去 6-孔平板中的培养基，以 MOI 5 向各个孔中加入 200 μ l 腺病毒溶液或 PLL/Ad 溶液。37 $^{\circ}$ C 培育细胞 30 分钟(使之不受光照)。未用腺病毒感染的平板仅加入 200 μ l PBS。除去该 200 μ l 溶液，细胞用培养液洗涤一次。如实施例 7 所述暴露于蓝光前，加入 2ml 的培养基然后 37 $^{\circ}$ C 培育细胞 30 分钟(使其不受光照)。培养细胞 2 天(仍使其不受光照)后，如实施例 3 中“实验方法”所述以流式细胞仪分析 β -半乳糖苷酶活性。

结果

图 10 显示在腺病毒与运载体聚-L-赖氨酸(PLL)联合情况下 PCI 也起作用。如图 10 中可以看到，在有或没有 PLL 作为载体的情况下，不用 PCI 进行的感染(即 0 分钟的光剂量)得到非常低的转导(小于 5%)。显然在用或不用 PLL 的情况下，由于 PCI-的效应，照射细胞引起转导的光剂量依赖性增加。而不用 PLL(图 10 中的○)时获得了最高转导效率 37%，当 PCI 与 PLL 合用时(●)，可获得 87%的阳性细胞，显示当与没有 PCI 的相同条件下获得的作比较，转导细胞的百分比增加了 20 倍以上，当与一般感染(不用 PLL，0 分钟光照)作比较增加了 100 倍。因此，PCI 可显著地提高用 PLL 包被的腺病毒的转导效率，并且通过使用这种组合可获得比用 PCI 与未包被的腺病毒的组合高得多的转导效率。

实施例 11

PCI 对采用聚-L-赖氨酸作为病毒的运载体的人皮肤成纤维细胞系的腺病毒转导的影响

如实施例 7 所述培养 HF-16 人皮肤成纤维细胞并用光敏剂 TPPS_{2a} 处理。如实施例 10 所述制备了 PLL 和病毒的复合物(每个病毒颗粒 250 分子的 PLL)，以 MOI 5 感染细胞，如实施例 10 所述进行光照和分析。

结果

图 11 显示采用 PCI 联合 PLL 运载体对人皮肤成纤维细胞系(HF-16)转导的影响。已知成纤维细胞对腺病毒转导具有很强的抗性，并且从图 11 中可以看到这些

细胞“正常”的转导(□, 没有 PLL, 0 秒光照)非常低, PCI 仅增强了很少的程度。当采用 PLL 作为运载体, 没有光处理时转导效率略微增加, 但可看到此时 PCI 大大增强了转导, 观察到在最适的条件下光诱导的转导细胞从 7.5%增加到 44.5%。因此, 运载体和 PCI 技术联合使用可获得有效的细胞转导, 否则对转导的抗性非常强。

实施例 12

PCI 对采用聚阳离子 dendrimer SuperFect®作为病毒运载体的腺病毒转导的影响

如实施例 7 所述培养 WiDr 细胞, 并与光敏剂 TPPS_{2a} (1 μg/ml) 一起培育。SuperFect®购自 QIAGEN (3mg/ml)。所用的腺病毒是 AdHCMV-lacZ。

向腺病毒溶液加入不同量的 SuperFect®, 并室温培养 30 分钟制备了具有不同浓度 SuperFect®的腺病毒/SuperFect®复合物。

除去 6-孔平板中的培养基, 加入腺病毒剂量为 MOI 5 的腺病毒/SuperFect®复合物 200 μl。37°C 培育细胞 30 分钟(使其不受光照)。除去 200 μl 的溶液, 用培养液洗涤细胞一次。如实施例 7 所述, 加入 2ml 的培养液, 37°C 培育细胞 30 分钟(使其不受光照)后暴露于蓝光。如“实验方法”所述以流式细胞仪分析 β-半乳糖苷酶活性前, 培养细胞 2 天(仍使其不受光照)。

结果

在实施例 12 中, 我们证明了用病毒运载体而非除 PLL 时 PCI 仍然有效。因此, 如图 12 所示, 当用 dendrimeric 聚阳离子 SuperFect®作为运载体时, 当所用载体浓度低于 50 μg/ml 时, PCI 可大大地提高腺病毒介导的基因转导。与“正常”感染(即不用 PCI 和不用 SuperFect®)得到的值相比, PCI 与 SuperFect®合用最大能够提高转导细胞的百分比近 50 倍, 而用 PCI 不用 SuperFect®最大增加 12 倍, 仅用 SuperFect®增加 10 倍。

实施例 13

光照和给予腺病毒的不同时间安排

如实施例 7 所述培养 HCT 116 细胞并用光敏剂 TPPS_{2a} 处理。在光照前或光照后不同的时间点用 Ad-HCMV-LacZ 腺病毒(MOI 5)感染细胞 30 分钟(通常是在除去光敏剂 4 小时后)。如“实验方法”所述作流式细胞仪分析 β-半乳糖苷酶活性前,

细胞再培养 2 天(仍使其不受光照)。

结果

图 13 显示了相对于病毒的递送,光照处理的时间设定对于 PCI 对腺病毒介导的基因转导作用的影响。可以看到(图 13)当光照前和光照后递送病毒时,PCI 照射在一段长时间间隔内均有效。因此,至少有一个 17 小时的时间窗口(从光照前 4 小时给予病毒到光照后 13 小时给予病毒),其间可给予病毒,可进行光照并且 PCI 对转导的正面效应仍将保持。从临床观点来看这很重要,因为它在设计治疗和协调患者可接受的其它治疗(如外科手术)上给予临床医生很大的灵活性。

实施例 14

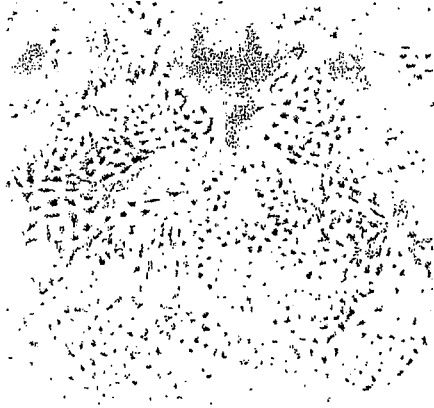
PCI 增强了编码单纯疱疹病毒胸苷激酶的腺病毒载体的基因治疗效果

HCT 116 腺癌细胞用编码 HSV-tk 基因(AdV-TK)的腺病毒基因治疗载体感染并进行 PCI 处理。感染的条件描述于“实验方法”中(MOI=5)。感染 2 天后,加入不同浓度的 ganciclovir(GCV),细胞再培养 3 天,用 MTT 方法分析细胞成活率。该方法的依据是活的、代谢活跃的细胞中线粒体脱氢酶可还原水溶性四唑盐(MTT)为紫色、不可溶性甲脒产物。将 1ml 含有 0.25 μ g MTT 的培养基加入细胞,随后培养 4 小时(37 $^{\circ}$ C, 5% v/v CO₂)。产生的甲脒结晶通过每孔加入 200 μ l 异丙醇(Sigma, MO, USA)溶解。将溶液转移到 96 孔平板,在带有 570nm 透带滤波器的 Multiskan EX 微滴板读数仪(Labsystems, Finland)上读取。

结果

从图 14 可以看到,在接受 ALPS_{2a} 光敏剂、AdV-TK 和 GCV 的细胞中对于 3 种不同剂量的 GCV,可以观察到 GCV 毒性作用的光依赖性增长。比较起来,在仅接受光敏剂处理的对照细胞中、接受光敏剂+GCV 的细胞中或接受光敏剂+AdV-TK,但不接受 GCV 的细胞中没有看到这种影响。这显示 GCV 介导细胞杀伤的光诱导增加,是由于 PCI 处理诱导了 TK 基因递送的增加,导致 GCV 前药活化的增加。HSV-tk 基因/GCV 组合广泛用于临床癌症基因治疗方案,因此该实施例显示 PCI 可用于提高癌症基因疗法中所用基因的所需细胞杀伤效果。所以,该实施例显示 PCI 的基因递送增强效应不限于报道基因,但它还可用于编码可在癌细胞中发挥治疗作用的蛋白质的基因。

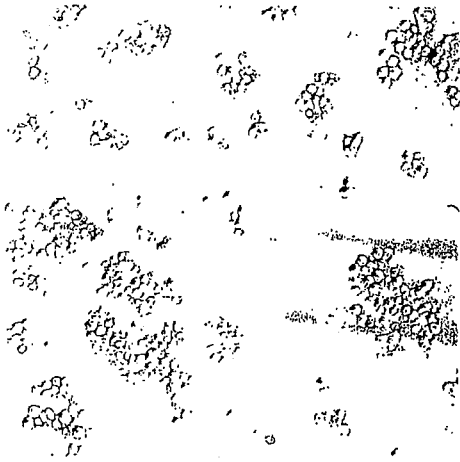
S- , Ad-, 无光照



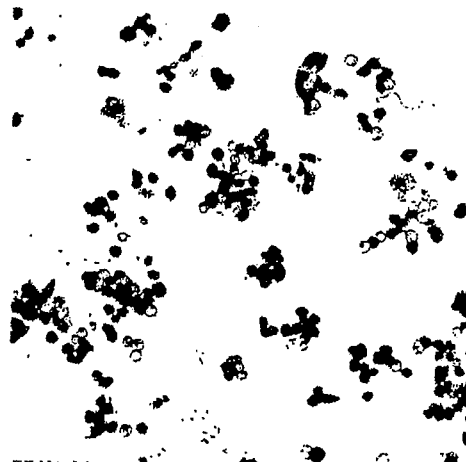
S- , Ad+, 无光照



S+, Ad-, 8分钟



S+, Ad+, 8分钟



图

1

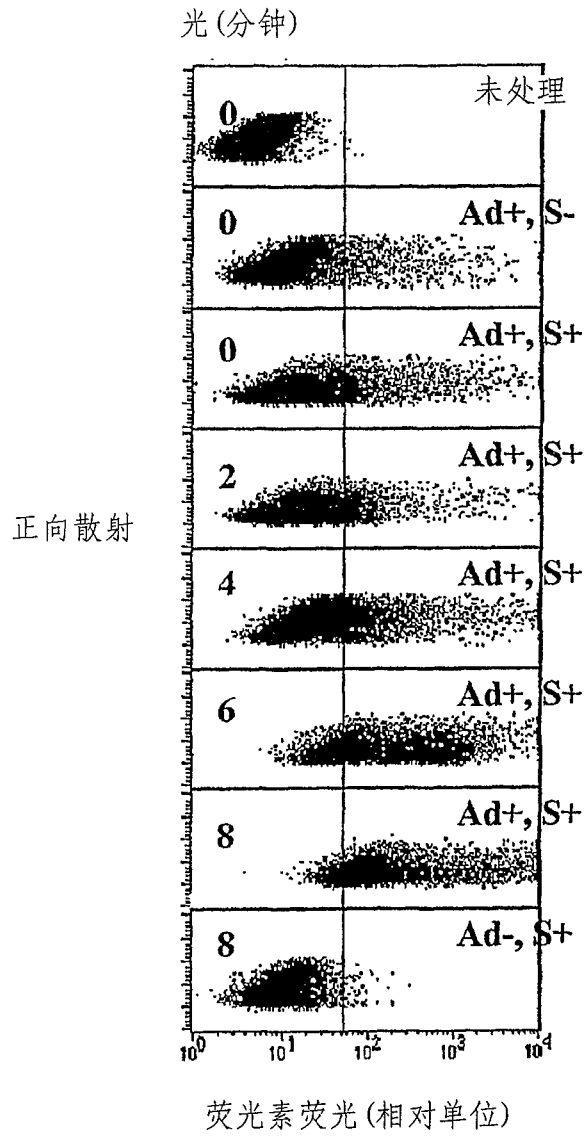


图 2A

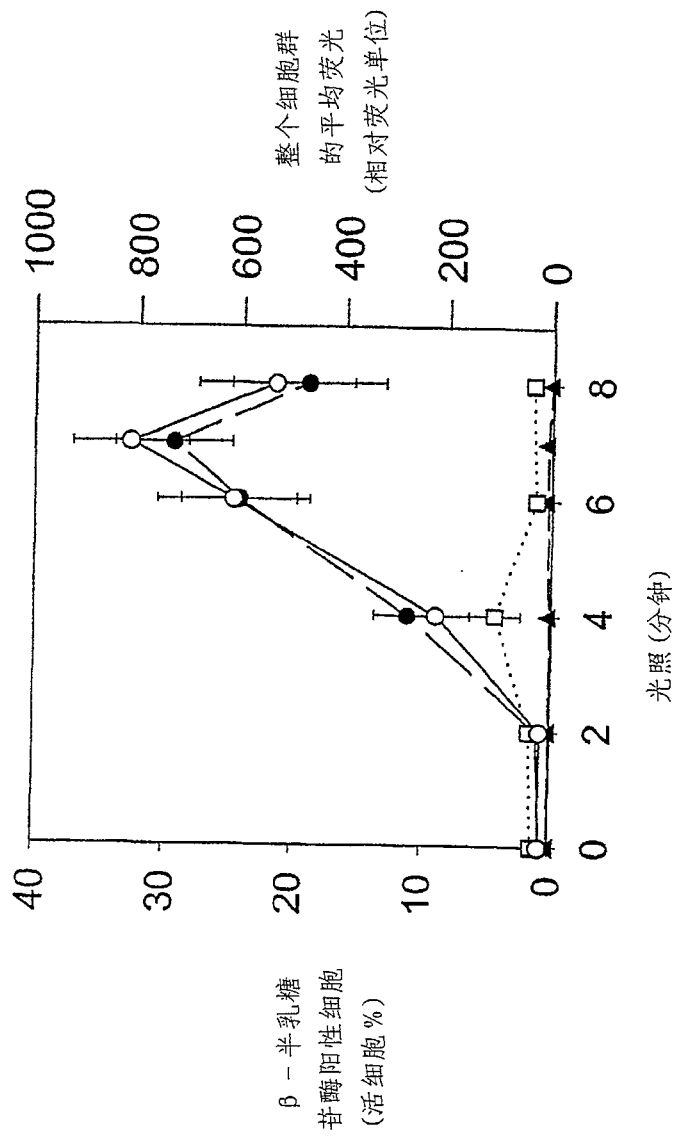


图 2B

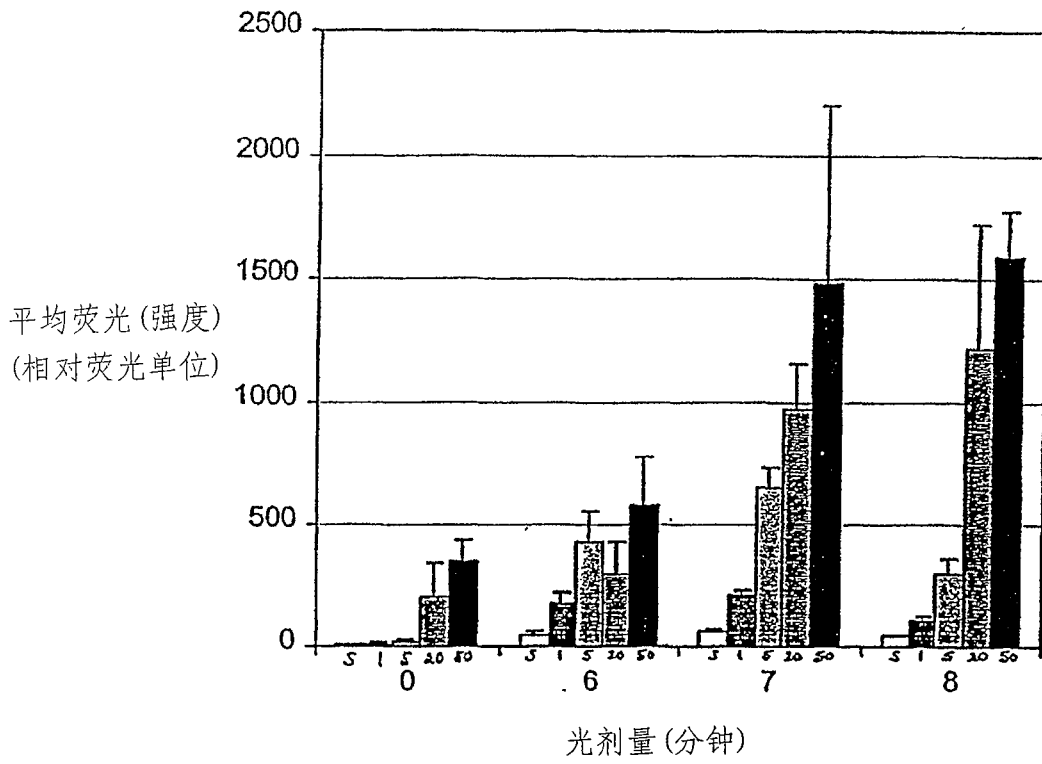


图 3A

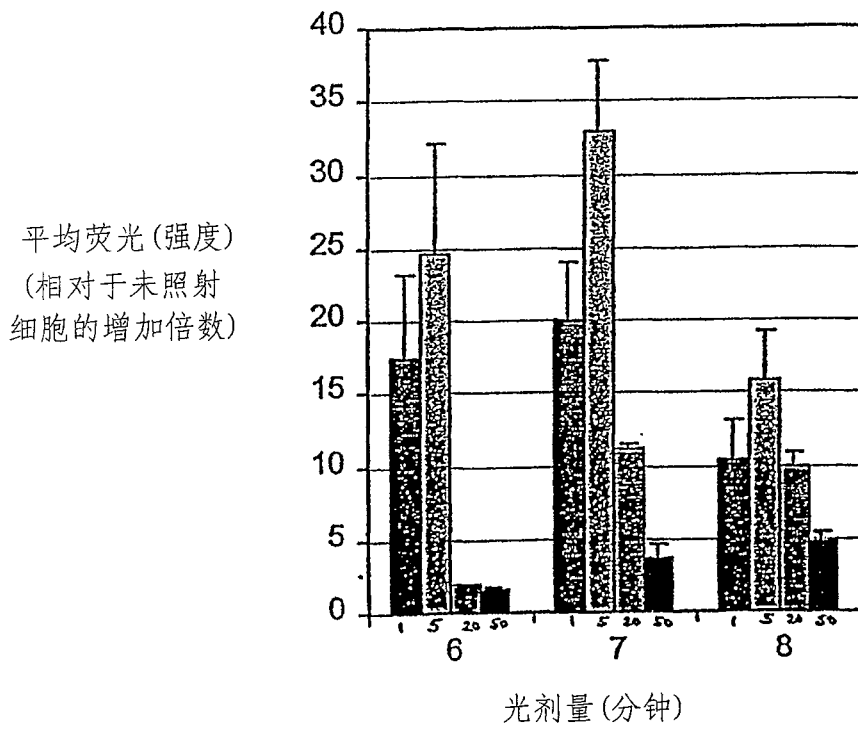


图 3B

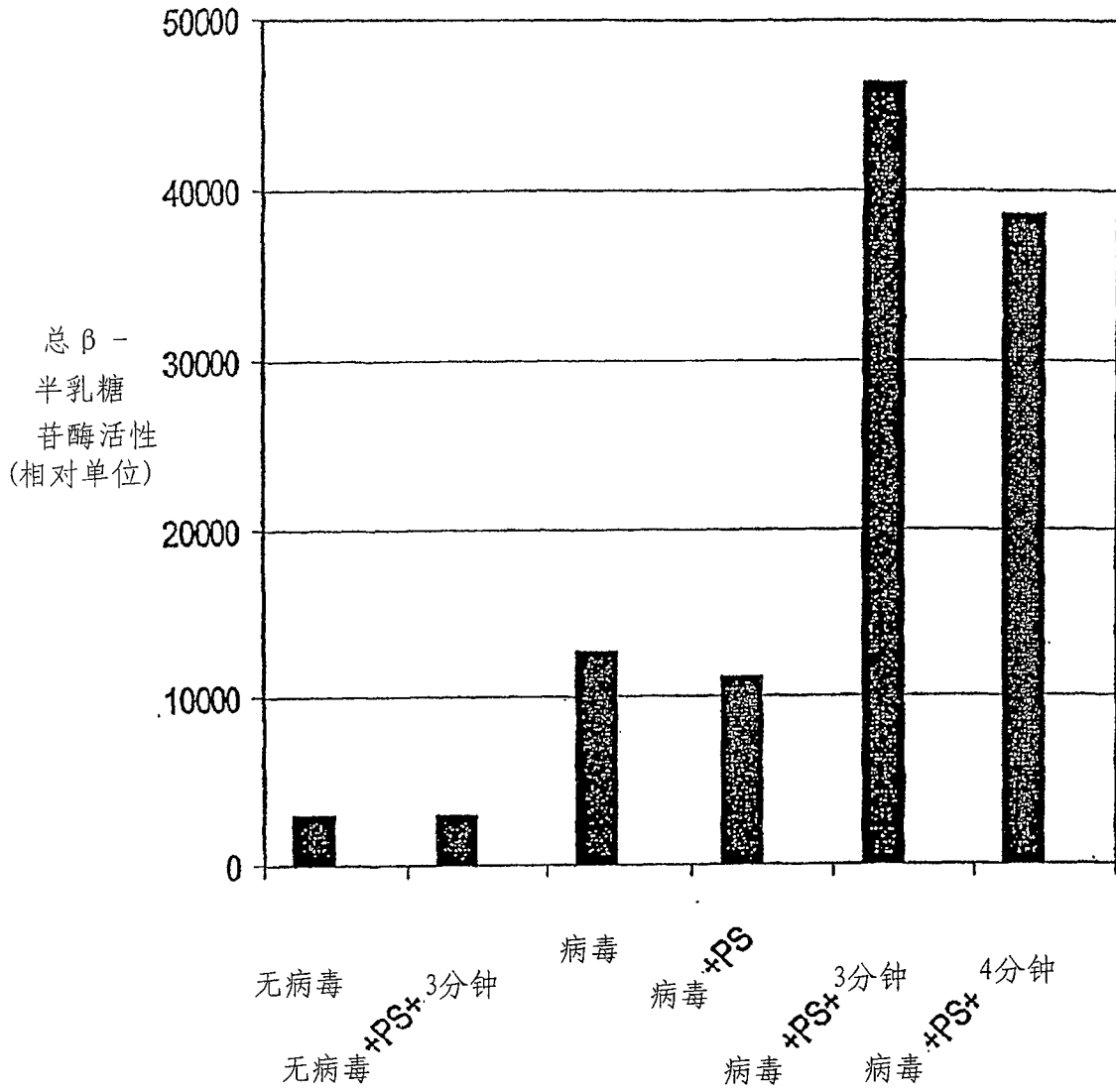


图 4

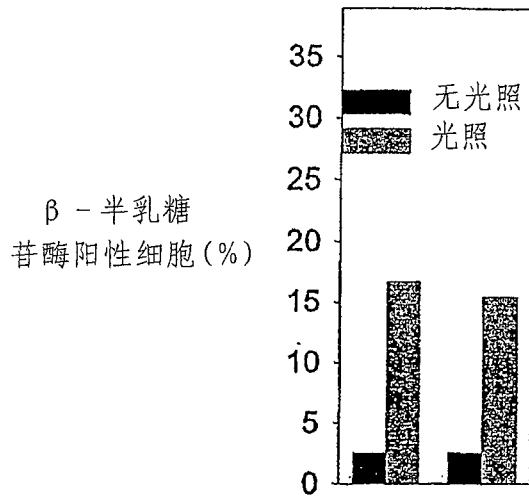


图 5

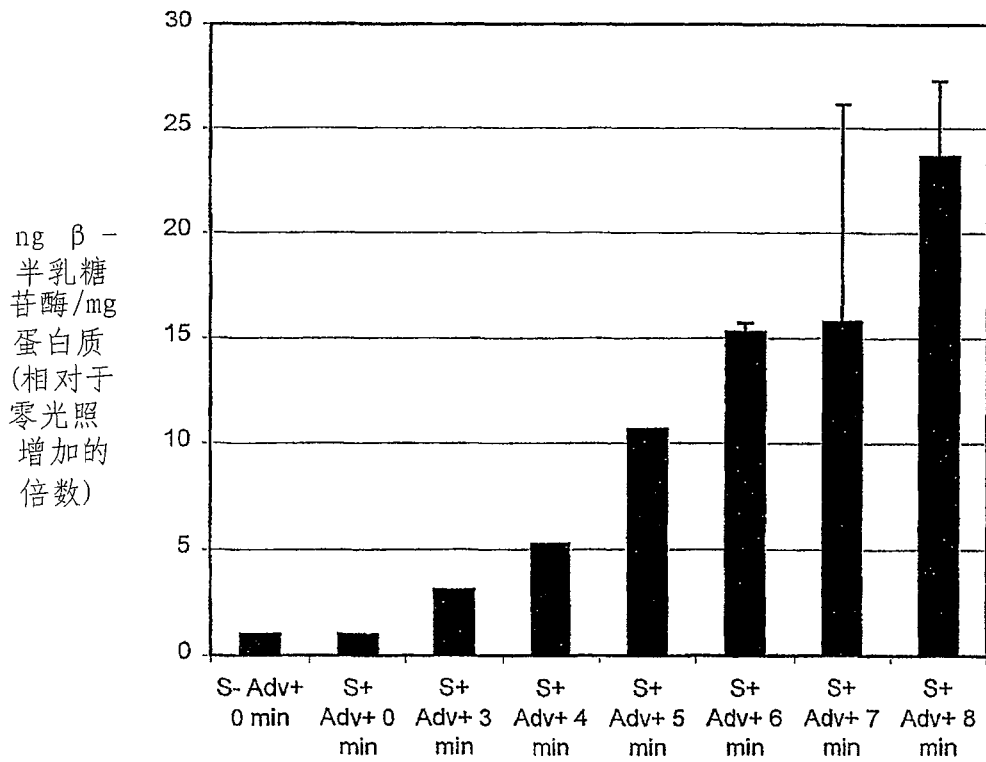


图 6

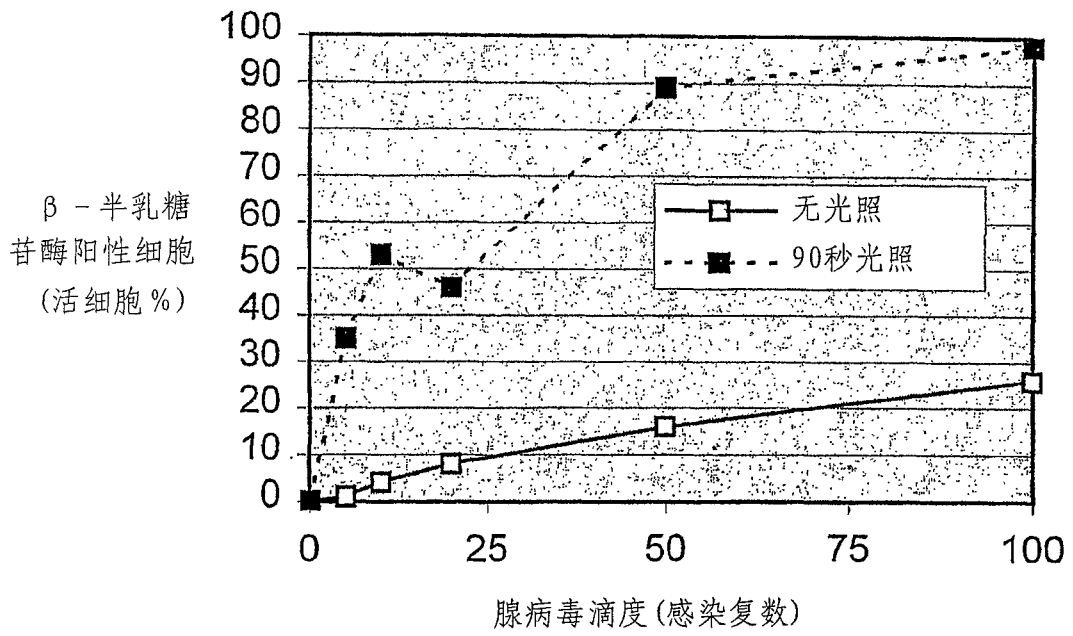


图 7

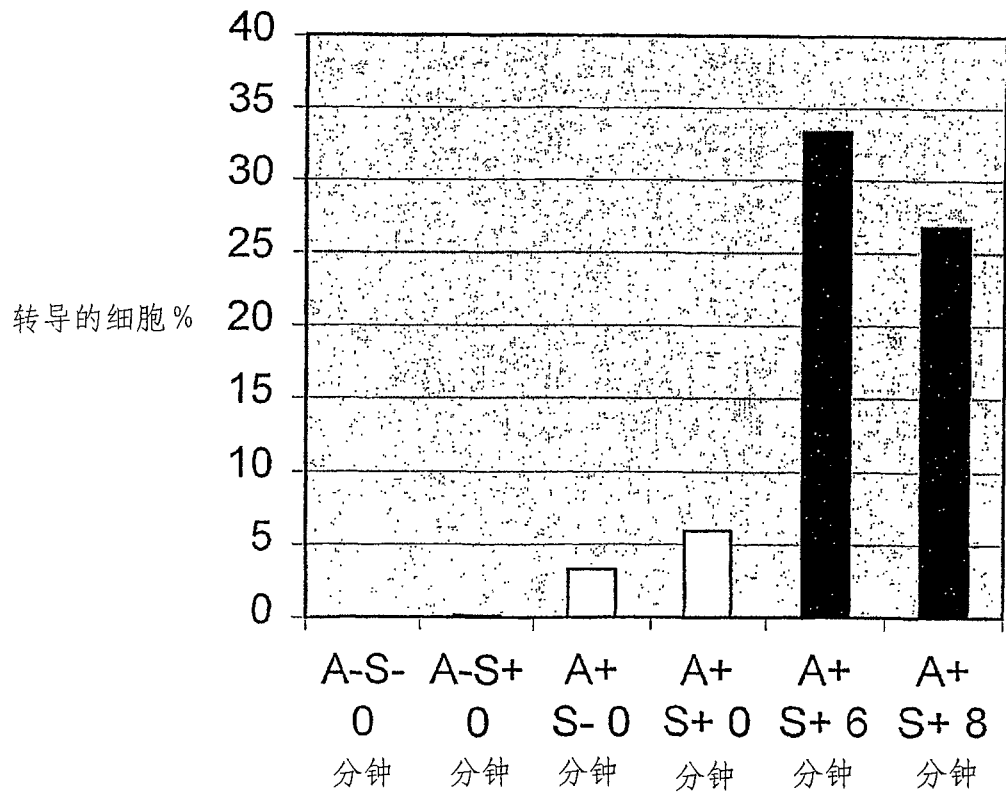


图 8

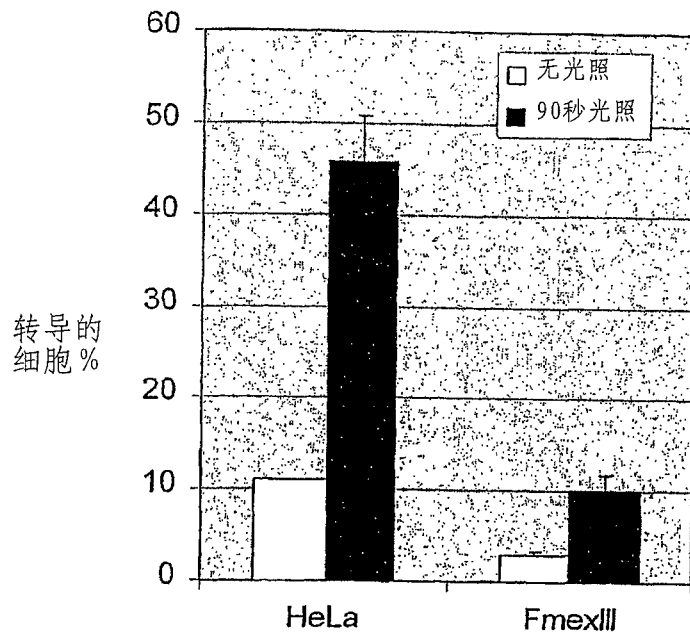


图 9

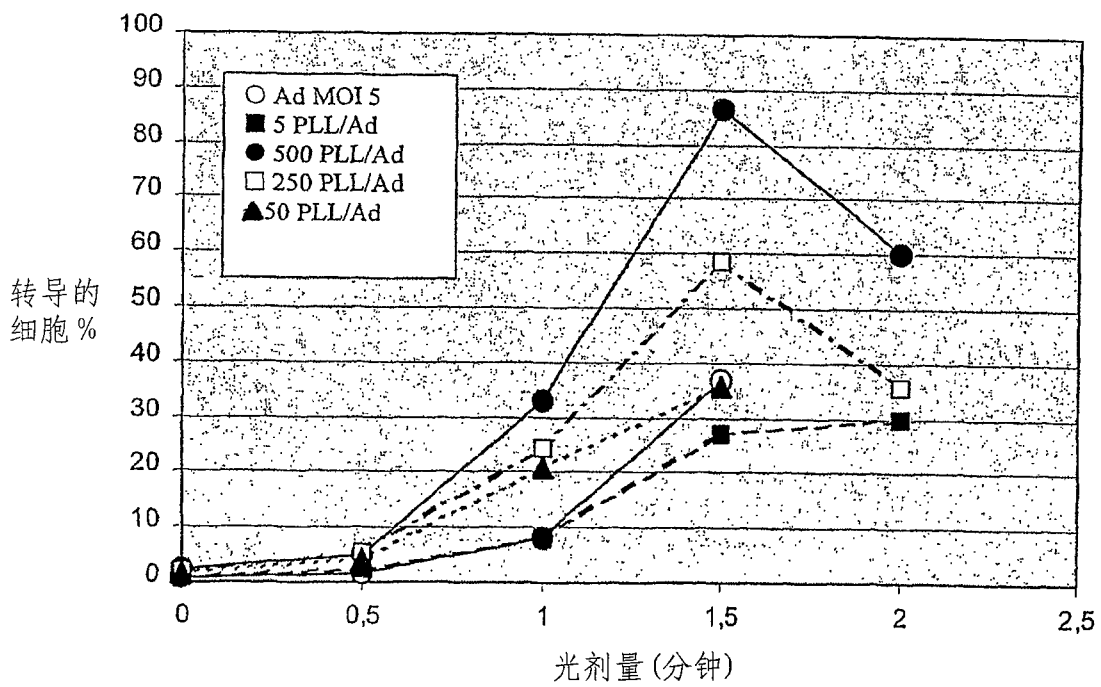


图 10

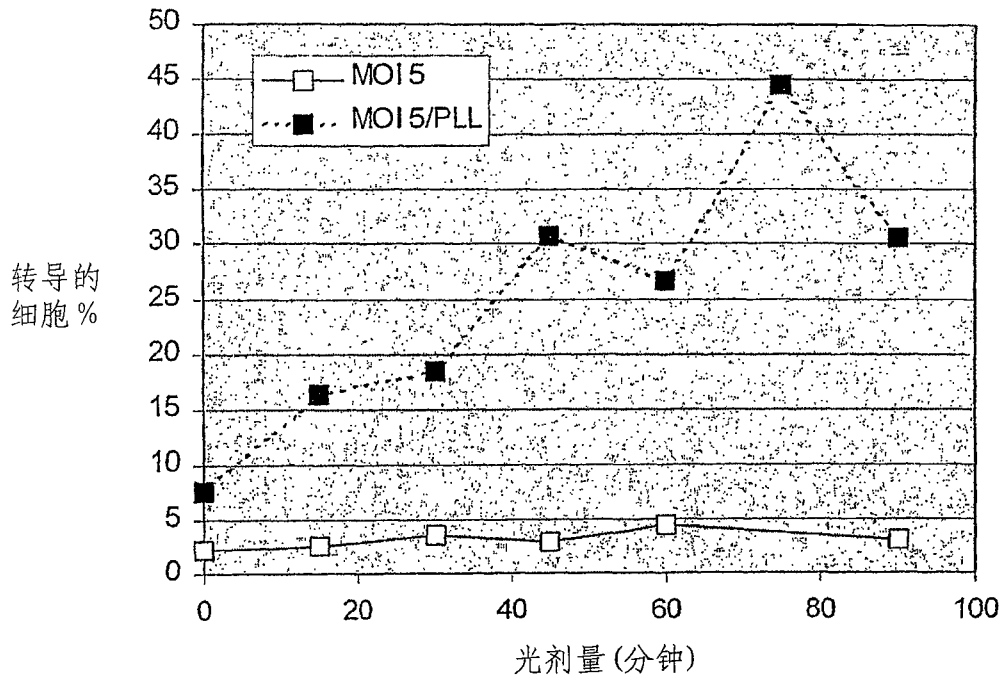


图 11

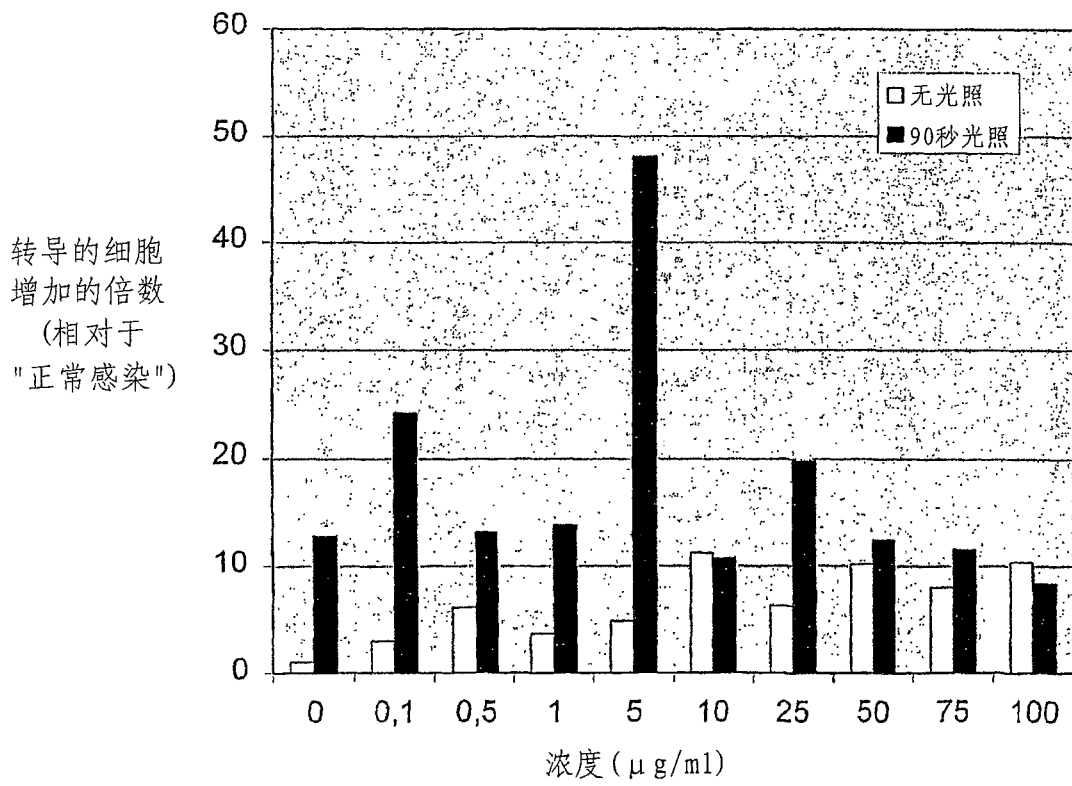


图 12

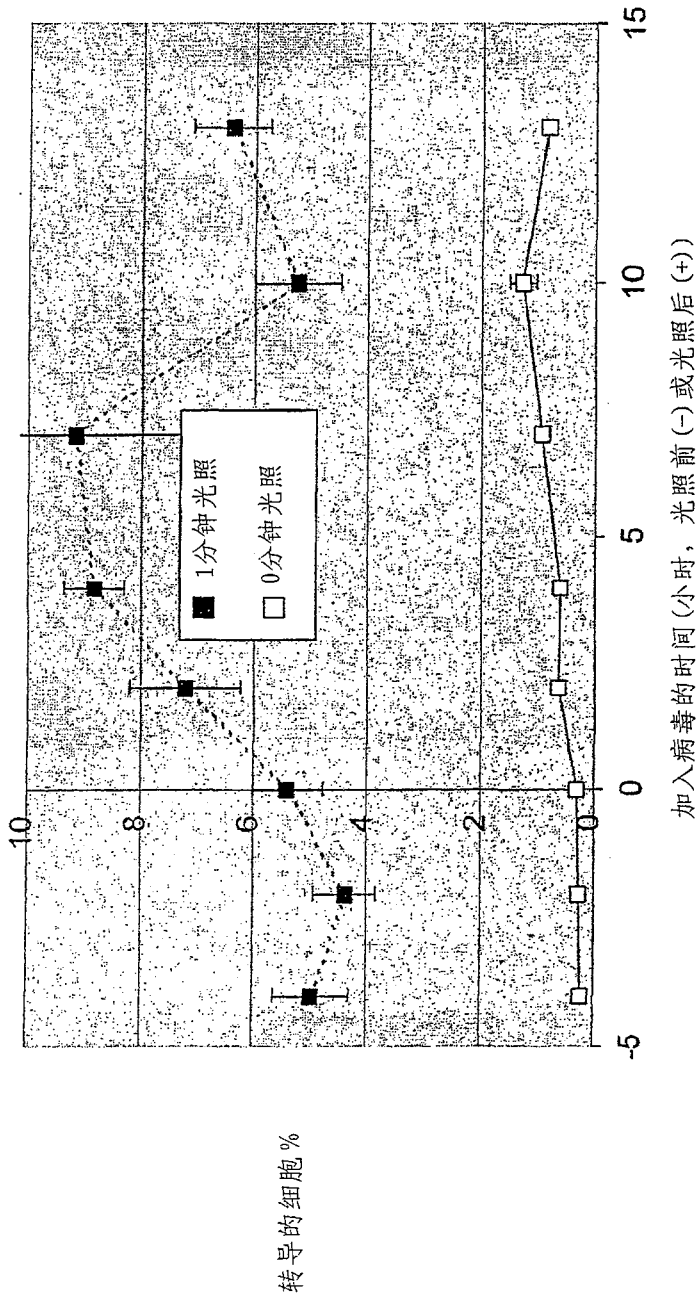


图 13

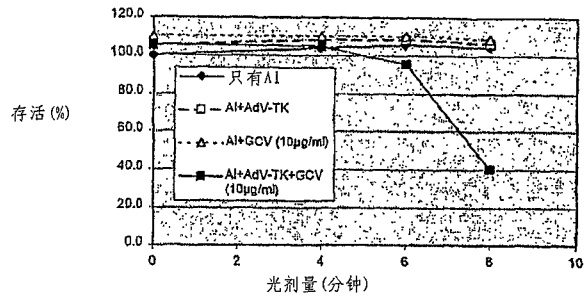


图 14A

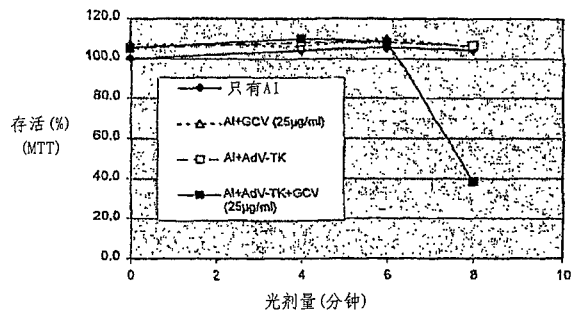


图 14B

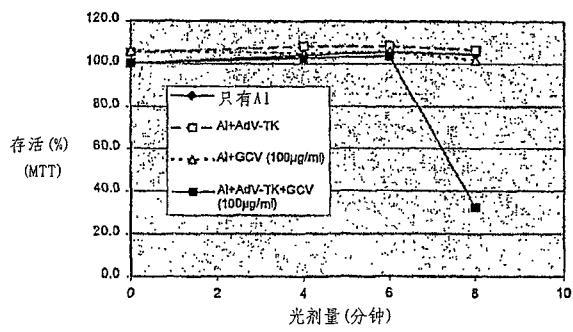


图 14C