

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01822357.5

C12N 15/87 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100558903C

[22] 申请日 2001.11.29 [21] 申请号 01822357.5
[30] 优先权

[32] 2000.11.29 [33] GB [31] 0029134.4

[32] 2000.12.1 [33] GB [31] 0029404.1

[32] 2001.6.15 [33] GB [31] 0114695.0

[86] 国际申请 PCT/GB2001/005299 2001.11.29

[87] 国际公布 WO2002/044396 英 2002.6.6

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.29

[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 K·伯格 L·普拉斯密凯特
A·霍格西特 P·K·塞尔博

[56] 参考文献

US5876989A 1999.1.1

Role of endosomes in gene transfection mediated by photochemical internalisation (PCI). Prasmickaite L 等. The Journal of Gene Medicine, Vol. 2 No. 6. 2000

审查员 罗 霄

[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

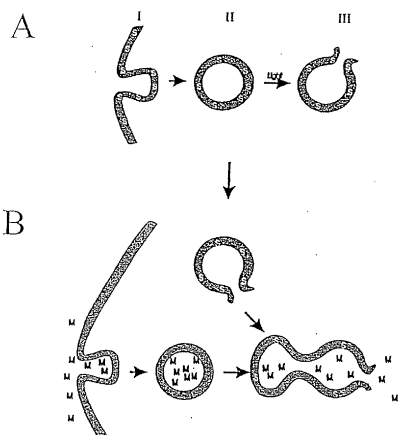
权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 17 页

[54] 发明名称

将分子输递进胞质溶胶的光化学内化法

[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，特别适用于癌症治疗、基因疗法和疫苗。



1. 一种引导分子进入细胞的胞质溶胶中的方法，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分子即转移分子接触，并用能有效激活光敏剂的波长的光照射所述细胞，其特征在于，所述照射先于细胞摄取所述分子到含所述光敏剂的胞内区进行，其中所述转移分子不能从胞内膜限制区室释放进入胞质溶胶内，和/或所述光敏剂和和转移分子之一或这两者附着于、结合于、或偶联于一个或多个运载体分子、引导分子或载体。

2. 如权利要求 1 所述的方法，所述照射先于细胞摄取所述转移分子到任何胞内区室进行。

3. 一种引导分子进入细胞的胞质溶胶中的方法，其特征在于，所述方法包括使所述细胞与光敏剂接触，用能有效激活光敏剂的波长的光照射所述细胞，并在照射同时或之后，使所述细胞与待导入分子即转移分子接触。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法，其特征在于，照射在细胞摄取转移分子前进行。

5. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的方法，其特征在于，细胞在照射发生后的时间点接触转移分子。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，细胞在照射发生后的 0 到 4 小时接触所述转移分子。

7. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的方法，其特征在于，细胞在照射同时接触转移分子。

8. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的方法，其特征在于，转移分子接触所述细胞 30 分钟到 6 小时。

9. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法在体外在细胞上进行。

10. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法在体内在细胞上进行。

11. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的方法，其特征在于，所述转移分子是蛋白质、肽、抗体或抗原。

12. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的方法，其特征在于，所述转移分子或它的部分，在细胞表面呈递或表达。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述细胞是抗原呈递细胞。

14. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述转移分子是毒害细胞的药物。

15. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述转移分子是核酸分子。

16. 如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述核酸分子结合到载体分子中。

17. 如权利要求 1 到 3 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述光敏剂选自含 TPPS₄、TPPS_{2a}、和 AlPcS_{2a} 的组。

18. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 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。

19. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述光敏剂在照射前与所述细胞接触 4 到 24 小时。

20. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述光敏剂在临照射前与所述细胞接触 4 到 24 小时。

21. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述光敏剂在照射前与所述细胞接触 1 到 4 小时, 然后去除。

22. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法, 其特征在于, 转移分子附着于、结合于、或偶联于的运载体分子、引导分子或载体是腺病毒、聚阳离子、阳离子脂类或肽或定向载体。

23. 如权利要求 22 所述的方法, 其特征在于, 所述转移分子附着于、结合于、或偶联于的载体, 所述载体附着于、结合于、或偶联于运载体分子、引导分子或载体。

24. 如权利要求 16 或 23 所述的方法, 其特征在于, 所述载体是腺病毒。

25. 如权利要求 22 或 23 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[®]。

26. 如权利要求 22 或 23 所述的方法, 其特征在于, 所述阳离子脂类是 DOTAP。

27. 如权利要求 22 或 23 所述的方法, 其特征在于, 所述运载体分子是脂质体或以脂类为基础的构建物。

28. 如权利要求 27 所述的方法, 其特征在于, 所述运载体分子含至少一种阳离子脂类。

29. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法, 其特征在于, 至少 50%所述分子导入的所述细胞没有被杀死。

30. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述照射步骤为 1-10 分钟。

31. 转移分子和/或光敏剂在制备用于治疗用途的药物中的应用, 其特征在于, 所述光敏剂和所述转移分子将会接触病人的细胞或组织, 所述细胞将会用有效激活光敏剂的波长的光照射, 并且照射将会先于细胞摄取所述转移分子到含所述光敏剂的胞内区室进行。

32. 如权利要求 31 所述的应用, 其特征在于, 所述药物用于治疗癌症。

33. 如权利要求 31 所述的应用, 其特征在于, 所述照射将会先于细胞摄取所述转移分子到任何胞内区室进行。

将分子输递进胞质溶胶的光化学内化法

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，将分子导入细胞胞质溶胶的改进的方法。

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此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的氧化物，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。

光敏药物可通过各种机制直接或间接发挥它们的作用。因此，例如，当被光激活时，某些光敏剂会直接变成有毒的，而其它光敏剂则会产生毒物，例如单线态氧之类的氧化剂或其它氧衍生的自由基，它们对多细胞物质和脂类、蛋白质和核酸等生物分子特别有破坏性。

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此领域已知的并描述于文献中。

对用于 PDT 的大多数感光剂的细胞毒作用主要是通过感光剂暴露于光时产生的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。

在 W093/14142 中描述了一种药物输递系统，它包括抗癌剂和附有光可激活的试剂(即光敏剂)的共聚运载体。用药后，这种复合物通过胞饮作用或吞噬作用进入细胞内部并定位在内体和溶酶体中。在溶酶体中，抗肿瘤剂与此聚合物之间的键被水解，且前者可通过溶酶体膜被动扩散到胞质溶胶中。因此这种方法的用途被限制在可扩散穿过溶酶体膜的小分子化合物。扩散一段时间后，施用有合适波长和能量的光源以激活光可激活的化合物。抗癌剂和光可激活试剂的联合效果破坏了细胞。因此，上述的这种 PDT 法关注的是导致细胞死亡的细胞结构的破坏。

另一方面 W0 96/07432 或待批申请 W0 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。

奇怪的是，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。这些结果非常令人吃惊，同时，这些方法显示了明显超过最后一步为光照射的方法的优点。

因此最一般地，本发明提供了将分子引入细胞胞质溶胶的方法，所述方法包括使所述细胞与光敏剂接触，使所述细胞与要被引入的分子接触，并用波长为可有效激活光敏剂的光照射所述细胞，其中所述的照射是在所述分子被细胞摄取进含有所述光敏剂的胞内区室前进行的，优选在所述分子被细胞摄取进任何胞内区室前进行。

因此，在一个变化中，所述照射可以在分子被细胞摄取进胞内区室后进行，只要所述分子将被内在化，且当光照射时所述光敏剂不定位于同一胞内区室即可。然而在一个优选的实施方案中，照射是在细胞摄取将被内在化的分子前进行的。

本文所用的“内在化”指分子的胞质溶胶输递。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。

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、内体等。

特别地，从一个优选方面而言，本发明提供了将分子引入细胞胞质溶胶的方法，所述方法包括使所述细胞与光敏剂接触，用能有效激活光敏剂的波长的光照射所述细胞，以及几乎同时或在照射后使所述细胞与待导入的分子接触。

优选在照射后使所述细胞与待导入或待内在化的分子(以后称为转移分子)接触，或者换句话说，所述细胞的光化学处理在所述分子被加到所述细胞之前发挥作用，所述处理是通过使细胞与光敏剂接触然后照射进行的。在这个实施方案中，待引入胞质溶胶的分子可与所述细胞接触，在此处理发生后的任何时间已经对所述细胞进行了光化学处理，只要所述转移分子仍然能够被摄取进所述细胞。分子

与上述细胞接触且仍可被摄取的时窗取决于各种因素，例如细胞种类、所讨论的特定分子、所用的特定光敏剂、以及光处理的时间。如果需要，时窗可对于一套具体的条件确定。然而，较佳的是在光化学处理后相对不久使待转运到胞质溶胶的分子暴露于的细胞，如光化学处理后 24 小时内，更佳的是光化学处理后头 10 小时内，如在头 5 小时内或最好是头 1 小时内。例如在体外或活体外，转移分子可施用一定时期，如 30 分钟到 24 小时，优选 1 到 2 小时，在照射后立即或不久后开始施用，例如，如果照射终点被认为是起始点，转移分子可在 0 分钟到 24 小时如 0 到 4 小时内应用。

观察到即使转移分子在照射相当时间与细胞接触，仍有可能。被内在化到细胞中因此，例如，转移分子可在照射后超过 1 小时再应用，如照射后超过 2、4、8、10 或甚至 12 小时。

因此，在优选的实施方案中，上述细胞在照射后 0 到 4 小时与上述转移分子接触 1 到 2 或 3 小时或更长，如至少 0.5 小时到 3 小时。给予转移分子的时间依赖于所述方法是在体外还是在体内进行。对于体外方法，转移分子一般可同时与所有靶细胞接触，例如，如果细胞在体外培养基中生长，则分子在适当时间点接触细胞相对容易。然而在体内，靶细胞接触转移分子的步骤显然更复杂且取决于给予方式和靶细胞位置。例如，可将转移分子直接给予靶细胞，如局部注射，随后转移分子相对较快地接触靶细胞(或至少其中一部分)，如施用后大约几分钟或几小时。另一方面，如果转移分子是通过静脉注射给予远处的目标，那么这些分子可能用长很多的时间接触靶细胞。例如它们在施用后可能要花 24 到 96 小时才能到达靶细胞。相对于使用光敏剂和照射时间，在决定给予转移分子的适当时间中要考虑“行程时间”。

本发明的另一实施方案中，与其使转移分子在照射后与细胞接触，哺乳与照射几乎同时与细胞接触。本文所用的“几乎同时”包括确实同时也就是同步，但也包括照射前不久加入分子到细胞中，如照射前多达 1 或 2 小时，只要细胞摄取转移分子在照射时没有发生且即使照射后仍可发生，或如果细胞摄取转移分子发生，随后转移分子和光敏剂在暴露于光时不定位到相同的胞内区室。

如上面提到的，为获得上述效果，加入转移分子和光敏剂的精确时机和照射时机考虑各种因素，包括待处理的细胞、使用的试剂和分子以及细胞环境，尤其是使用体外系统还是体内系统，这仍在争论中。考虑这些因素可容易地确定适当的时机。

作为一般原则确定了适当的情况，如照射步骤在细胞摄取转移分子(假定光敏

剂本身摄入胞内区室)或细胞摄取转移分子后转移分子和光敏剂在暴露于光时不位于同一胞内区室。在后一情况中,显然转移分子将在照射发生前的时间点接触细胞。这提供了本发明优选实施方案中的一个。

前面描述的光化学内在化方法,其中转移分子和光敏剂照射前加入细胞依赖于暴露于光前位于相同胞内区室的所讨论的分子因此通过光激活光敏剂破坏这些区室或导致释放分子和光敏剂到胞质溶胶。显示这方面的示意图列于图7。

在现在的方法中,显然由于转移分子仅在细胞暴露于光不久前或之后加入细胞,导入胞质溶胶的光敏剂和转移分子暴露于光时不位于相同胞内区室。

本方法的作用机制还未知且此方法起作用令人惊奇。同时不希望为理论所约束,这些令人惊讶的发现的原因也许是光化学破坏的小泡融合新形成的内吞泡,随后将新的被内吞的分子释放到胞质溶胶中。阐明此方面的示意图列于图7中。另外,对溶酶体酶或含溶酶体酶的小泡(如后内体(late endosome))的光化学破坏可降低将被内在化的分子的细胞内降解速度。这也许由于减少到含溶酶体酶的小泡的转运或到具较低水解活性的内吞泡的转运。这样,这些分子有比当溶酶体降解途径被活化时更多的时间逃出内吞区室。另一个进一步的解释是光化学处理细胞导致的细胞质膜的小损伤使大分子通过细胞膜渗透增加。然而完成的实验(见实施例7)说明这可能不是原因。

因此本发明涉及在体外(即在培养基中)或体内转运或转染分子到活细胞的胞质溶胶的方法,之后分子会在胞质溶胶中。

这些方法不仅可用于转移分子(或它的部分或片断)到细胞内部并且在某些环境下可用于在细胞表面呈递或表达它们。因而,依照本发明的方法转运和释放转移分子到胞质溶胶后,如果所讨论的细胞是特化细胞(如抗原呈递细胞),分子或片断可运送到细胞表面,它可在细胞外部即细胞表面呈递。这些方法在疫苗领域有特殊效用,疫苗成分也就是抗原或免疫原可导入细胞以在此细胞表面呈递,从而诱导、促进或增强免疫反应。能在细胞表面表达分子效用的进一步细节在 WO 00/54082 中描述。

用本发明的方法导入胞质溶胶的转移分子包括不能穿透细胞膜的分子。另外,本发明可提高细胞输递和仅能部分穿透细胞膜或胞内泡的膜的分子的活性。转移分子可是有机化合物、蛋白质或蛋白质片断(如肽)、抗体或抗原或其片断。依据本发明使用的另一类转移分子是细胞毒的药物,如蛋白质毒素或细胞毒有机化合物(如博来霉素)。还有一类适当的转移分子是核酸。

核酸可以编码如治疗蛋白质、反义 RNA 分子、核酶、RNA aptamers 或三螺旋

构成的寡核苷酸的基因的形式使用，或者核酸可以非编码分子的形式使用，如合成的 DNA 或 RNA 反义分子、核酶、aptamers、三螺旋构成寡核苷酸、肽核酸 (PNAs)、转录因子“诱饵”DNA 或嵌合寡核苷酸，以修复病人的特异突变。适当核酸分子的形式可是整基因或任意结合到载体分子或实体的核酸片断如质粒载体或病毒粒子或噬菌体。当转移分子待用于基因治疗方法时，后一种形式有特殊应用。

根据本发明所用的光敏剂是易定位到胞内区室的任何这类试剂，具体是内体或溶酶体。这种光敏剂范围是此领域已知的并在参考文献中描述，包括 WO96/07432。在这一方面本文涉及已显示定位于培养细胞的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。在大多数情况下这是由于光敏剂的内吞行为。因此，光敏剂是优选摄取进入溶酶体或内体的内部区室的试剂。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，但这些分子的光化学损伤也许不过导致转移分子的光化学内在化，如通过光化学对这些分子作用的机制减少待内在化分子的转运(即转移分子)降解囊泡如溶酶体，因而待内在化的分子可在降解前逃出胞质溶胶。这些不必要定位于膜-限制区室的分子的例子是微管转运系统的一些分子，如动力蛋白和动力蛋白激活蛋白组分；以及例如 rab5、rab7、N-乙基马来乙基马来酰亚胺敏感因子(NSF)、可溶 NSF 附着蛋白(SNAP)等等。

因此可提及的适当光敏剂的类别包括卟啉、酞菁、红紫素、二氢卟吩、苯并卟啉、奈花青(naphthalocyanines)、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.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。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。

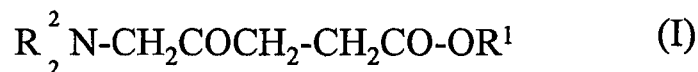
优选的光敏剂包括 $TPPS_4$ 、 $TPPS_{2a}$ 、 $AlPcS_{2a}$ 和其它两亲性光敏剂。在一个较佳的方面，本发明提供了方法，该方法中光敏剂是 5-氨基乙酰丙酸或 5-氨基乙酰丙

酸酯或其药学上可接受盐的化合物。

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 酯是使用公式 I 的化合物



(其中 R¹ 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；R²，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 R¹ 及其盐。

取代的烷基 R¹ 基团可以是单个或多个取代。因此适合的 R¹ 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 R¹ 包括烷氧基甲基、烷氧基乙基和丙基或酰氧基甲基、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 R¹ 代表一个未取代的烷基和/或各个 R² 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，更佳地多达 6 个，特别优选地多达 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。

必要地，光敏剂在照射前接触细胞。然而，不像转移分子，此试剂应在照射前充分给予，这样在照射时上述试剂被吸收进胞内区室。因此上述试剂在照射前 1 到 72 小时使用如照射前 4 到 48 如 4 到 24 小时。此外，如以上讨论的关于使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机，将取决于光敏剂到达靶细胞和被靶细胞摄入的时间。该时间可能取决于方法是在体外还是在体内进行以及直接给予靶组织还是给予远外部位而不同。在所有情况下，重要的

是光敏剂在照射前为靶细胞摄入。上述试剂可与所述细胞保持接触直到照射，例如接触 1 或 4-72 小时，较佳的是 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中培养 1 小时到 4 小时。

任选地，光敏剂或转移分子或两者都可附着或结合或偶联一个或多个运载体分子、引导分子或载体，它们可以促进或提高光敏剂或转移分子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或其它聚阳离子、硫酸葡聚糖、不同的阳离子脂类、脂质体、重组的 LDL-颗粒、空间排列稳定的脂质体或腺病毒粒子。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转移分子和/或光敏剂的摄入还可指导转移分子和/或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转移分子和/或光敏剂靶向特异性细胞(如癌细胞)或组织。然而，为了实现特异性或选择性地导向运载体分子，转移分子和/或光敏剂结合或偶联于特异性的引导分子，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。这种引导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。

可使用许多不同的引导分子，如描述于 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。

运载体分子和/或引导分子可结合、粘合或偶联于转移分子、光敏剂或它们二者，可使用相同的或不同的运载体或引导分子。例如，如果腺病毒作为运载体使用，那么转移分子结合到腺病毒粒子中。例如，如果所讨论的转移分子是编码蛋白质或 RNA 分子的 DNA 分子，那么 DNA 结合到病毒载体中并在光化学内在化后 DNA 分子会存在于正确的胞内位置从而可发生编码分子的表达。

表达这些分子可通过此领域中熟知的并记录的方法设计载体控制。例如调节元件如组织特异性或可调节性启动子可用于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), Hallahan, D. E. 等, 1995, *Nature Med.* 1, 786-791; Luna, M. C. 等. 2000, *Cancer Res.* 60, 1637-1644; Miller, N 和 Whelan J., 1997, *Hum. Gene Ther.*; Wickham T. J. 2000, *Gene Ther.* 7,

110-114; Nettelbeck D.M. 和 Muller J.V., 2000, *Trends Genet.* 16, 174-181; Clackson, T., 2000, *Gene Ther.* 7, 120-125; Freundlieb, S. 等., 1999, *J. Gene Med.* 1, 4-12; Spear M.A., 1998, *Anticancer Res.*, 18, 3223-31, Harvey, D.M. 和 Caskeky C.T., 1998, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 512-518; Clary, B.M. 和 Lysterly, H.K., 1998, *Surg. Oncol. Clin. North Am.* 7, 565-574. Luna, MC 等. *Cancer Res.* 60, 1637-1644 及其参考文献中找到。

如上面提到的, 可同时使用超过一种运载体和/或引导分子或载体。例如载体可提供在运载体中如腺病毒这样的病毒载体可在如脂质体或聚阳离子结构中使用。

优选的用于本发明的运载体和载体, 尤其是和转移分子一起使用的运载体和载体包括腺病毒、聚阳离子(如聚-L-赖氨酸或聚-D-赖氨酸)、聚乙烯亚胺或树型化合物(dendrimer)(如阳离子树型化合物如 SuperFect®); 阳离子脂类如 DOTAP 或脂质转染; 肽和靶载体如转铁蛋白聚赖氨酸或靶腺病毒载体。在本发明的一个具体优选实施方案中运载体是腺病毒。

对于 PCI 的利用特别有益的是上述这种引导分子或运载体还可用于引导转移分子进入具体的细胞内区室, 例如溶酶体和内体。

胞内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, 特别是内体和溶酶体。然而胞内区室还可包括高尔基体或内质网。

根据此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。适合的光源在此领域已熟知。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。转移分子内在化进入胞质溶胶的效率似乎随暴露于光的增加而增加。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, 如从 0.5 到 3 分钟或从 1 分钟到 5 分钟或从 1 到 10 分钟如从 3 到 7 分钟, 和较佳地约 3 分钟, 如 2.5-3.5 分钟。适当的光剂量可由此领域技术人员选择, 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 50-150 J/cm² 的范围内, 流量范围低于 200mW/cm² 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, 需要的光总量可能比癌症治疗所需的量高许多。

确定本发明方法中使用的靶分子适当剂量对此领域技术人员是常规操作。当转移分子是蛋白质或肽，转移分子体外使用剂量一般少于 5mg/ml(如 0.1-5 mg/ml)且转移分子体内使用剂量一般低于 5mg/kg(如 0.1-5 mg/kg)。当转移分子是核酸，转移分子体外使用的示范剂量约为每 10^4 细胞 0.1-50 μ g 核酸，且在人体内使用时每次注射约为 10^{-6} -1g 核酸。当转移分子与腺病毒运载体结合时，体外使用的示范剂量在 $1-1 \times 10^5$ 物理病毒粒子，如每细胞 $1 \times 10^3-1 \times 10^5$ 个粒子，且体内使用中导入结合腺病毒运载体的分子可在体内使用的最终组合物中以 1×10^{-9} 到 50% 浓度存在，如 3×10^{-6} 到 50%，例如 0.003 到 30%，；例如 0.2 到 10%(w/w) 病毒粒子，其中 w/w 指病毒运载体除了待导入分子的重量相对于最终组合物的重量。如果在 1ml 注射中使用，这对应于 10^5 到 10^{15} 物理病毒粒子。

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，这些细胞的死亡并不要紧并且实际上对于许多应用是有利的(如癌症治疗)并且本发明的方法可改进，方法是通过选择与光敏剂浓度有关的光剂量调节小部分或部分存活细胞。再次，这种方法是此领域已知的。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。例如在疫苗和一些基因疗法中，允许如抗原呈递或蛋白质表达的活细胞是重要的。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(如至少细胞的 50%，优选至少 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，PCI 处理后显然需要一部分活细胞。

本方法和处理步骤顺序，尤其是转移分子在光照射步骤后加入细胞的实施方案，与以前所述方法相比的优越性是

- a) 减少对转移分子的光化学损伤；
- b) 由于光化学治疗可在外科手术暴露病损后进行，例如作肿瘤内注射或其它局部给予转移分子，简化了与外科手术联合的内部损伤的 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入的分子的时机。这意味着有一个更大的治疗“时窗”。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，并且在临床条件下难以估计各病损的摄取，因此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。

除了与分子内在化的 PCI 方法本身相关的优点，其优越性在于：1) 只要分子可被靶细胞内吞则对待内在化和运送到胞质溶胶的分子的大小没有限制；2) 该方法不依赖于细胞增殖；3) 该方法是位点特异性的，因为只有暴露于光的区域受到影响；4) 它无致癌性。

使细胞“接触”光敏剂和转移分子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并在适当的时间点简单地将光敏剂或转移分子加入在适当条件下的培养基，如以适当的浓度和适当长度的时间。

将光敏剂以适当的浓度与细胞接触一段适当的时间，这些条件不难由熟练的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，如进入或结合于一个或多个胞内区室并为照射激活，一个或多个细胞结构即被破坏，如一个或多个细胞区室被裂解或破裂。例如在此的实施例中使用的光敏剂可以如 10-50 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度使用。体外使用的浓度范围可以宽得多，如 0.05-500 $\mu\text{g/ml}$ 。对于人体内治疗，当全身性给予时，可使用的光敏剂范围为 0.05-20mg/kg 体重，或配成 0.1-20%的溶剂局部施用。在较小动物中浓度范围可能不同，可作相应地调整。

细胞与光敏剂培养的时间(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。培养的时间应使光敏剂为适当的细胞所吸收。

细胞与光敏剂培养，随后可任选地与无光敏剂的培养基培养一段时间，然后使细胞暴露于光或加入转移分子。

转移分子可为上述任何分子并以适当的浓度与细胞接触一段适当的时间。令人惊奇地发现接触甚至可在照射后几小时开始。可根据摄取所讨论分子进入所讨论细胞的效率以及细胞中希望达到的最终浓度确定适当的浓度。因此“转染时间”或“细胞摄取时间”，即分子与细胞的接触时间，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 24 小时，例如从 30 分钟到 10 小时或例如 30 分钟到 2 或 6 小时。转染时间的增加通常导致所讨论分子摄取的增加。然而，短些的培养时间，例如 30 分钟到 1 小时似乎可导致分子摄取特异性的提高。因此，为任何方法选择转染时间，在获得足够的分子摄取和维持摄取充分的特异性之间

必须达到适当的平衡。

在体内使转移分子和光敏剂接触靶细胞的适当方法和培养时间取决于给予方式和转移分子及光敏剂的类型。例如，如果转移分子被注入待治疗的肿瘤，注射点附近的细胞会接触并因此倾向于比位于注射点更远距离的细胞更迅速地摄取转移分子，远距离的细胞可能在更迟的时间点和更低浓度与转移分子接触。此外，静脉注射给予的转移分子也需要花费一些时间以到达靶细胞，因此它需要更长的施用后时间以在靶细胞或组织中累积足够或最佳量的转移分子。同样的考虑用于摄取光敏剂到细胞中所需的施用时间。由此体内各细胞所需的施用时间可能依赖于这些和其它参数而不同。

然而，尽管体内情况比体外复杂，本发明的基本原理还是相同的，即施用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或者被摄入，或者经充分接触后会被靶细胞摄入不同的胞内区室中，或(ii)照射后转移分子与细胞接触一段足够长的时间以使之摄入细胞中。若转移分子被摄入与光敏剂不同的胞内区室中，转移分子可在照射前或之后摄取。

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)。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、真菌细胞和原生动物。

本发明的方法可在体外或体内使用，或通过原位治疗(例如使用靶向部分)或通过活体外的处理后给予肌体处理的细胞。

本发明的方法可用于例如治疗癌症。一些光敏剂优先累积于肿瘤组织中，肿瘤对周围组织的选择性通常为 2-3 的因子，但此因子在一些情况中更高，如脑组织，即达到 30。另外，特定的光敏剂可通过上述方法导向特定肿瘤。此外，治疗癌症临床上感兴趣但受限于低或无摄取入胞质溶胶的分子可通过本发明的方法引入胞质溶胶并导向特异细胞。如下面实施例，Gelolin 是这种分子的例子。可使用其它分子，它们或单独或连接其它分子，这些分子靶向待内在化到具体细胞的分子(如抗体、转铁蛋白、光敏剂、重组的 LDL-颗粒上的 apoB)。这样联合治疗的优越性在于 1)由于低剂量和亚毒性(subtoxic)剂量的光照足够破坏溶酶体和内体，更深层肿瘤组织的细胞毒效果增强；2)由于 PCI 仅给予肿瘤区域，提高了治疗的特异性。

本发明的方法也可用于治疗许多其它疾病，由选择导入细胞的分子决定，如类风湿性关节炎、关节硬化、其它心血管疾病、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、戈林综合征、

毛细血管扩张共济失调。

本发明的方法也可用于基因治疗，即治疗性地将基因转移到病人细胞中。基因治疗是有希望治疗许多疾病的方法，这些疾病如癌症、心血管疾病、病毒感染、单基因疾病如囊性纤维化和许多其它如上所述的情况。现在基因治疗的一个主要问题是必须在体内发生的基因转移的效率和特异性。在目前的方法中，许多不同的运载体或载体被用来在基因治疗中实现基因转移。如聚阳离子化合物的例子有阳离子脂类和病毒系统，但迄今为止体内基因治疗很少成功。现有方法许多已知的缺点是载体的血清稳定性低、基因输递的特异性有限、基因输递效率低等。本发明的 PCI 方法提供了可显著提高目前用于基因治疗中使用的许多基因输递方法的效率和特异性的方法，提高是通过改进内体释放步骤，该步骤对许多合成基因输递载体和一些病毒系统都是限制效率的。PCI 方法中固有的光处理使得有可能精确确定增强的基因转移会出现在身体何处，因为基因转移效率提高只会发生在照射区域。转染可在体外、体内或活体外(适当与给予病人的细胞或组织一起)进行。较佳的转染适当运载体和载体包括腺病毒、聚阳离子如聚赖氨酸(如聚-L-赖氨酸或聚-D-赖氨酸)、SuperFect®、聚乙烯亚胺或树型化合物；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；肽和定向载体如转铁蛋白聚赖氨酸或靶向腺病毒载体。在本发明的一个优选实施方案中，用于治疗基因的运载体是腺病毒。

本发明另一较佳方面是使用非病毒运载体系统例如聚合体包括肽和阳离子脂类。典型的聚合体包括如聚胺、聚氨基酸包含碱性聚氨基酸、合成和天然阳离子糖聚合体、异丁烯酸盐聚合体、树型化合物、聚亚烷基胺(polyalkylenimine)和其它此领域中已知对药物输送有用的聚合体；特别是在基因输递中有用的聚合体。根据本发明有益的典型化合物包括聚赖氨酸、聚精氨酸、聚-L-谷氨酸、聚乙烯基吡啶、脱乙酰壳多糖、聚乙烯亚胺(polyethylenimine)、聚(2-二甲胺)乙基甲基丙烯酸酯、组蛋白、鱼精蛋白、聚(L-鸟氨酸)、抗生物素蛋白、精胺、亚精胺及其衍生物。在本发明一优选方面，在此描述的聚合体可结合其它聚合体或结合其它基因输递系统。根据本发明有用的非病毒基因输递系统是，如 R. I. Mahato 等在 *Advances in Genetics* 所述(J. C. Hall 等编)(1999) 41 95-156。阳离子聚合体进一步由 M. C. Garnett 在 *Critical Reviews in Therapeutic Durg Carrier Systems*(1999), 16 147-207, K. A. Howard 等在 *Biochimica et Biophysica Acta* (2000) 1475 245-255, H. K. Nguyen 等在 *Gene Therapy* (2000) 7 126-138, A. Bragonzi 等在 *J. Controlled Release* (2000), 65 187-202, S. C. DeSmedt 等在

Pharmaceutical Research (2000), 17 113-126 和 R. I. Mahoto 在 J. Drug Targeting (1999), 7 249-268 中所述。

本发明又一方面包括使用脂质体或以脂类为基础的构建物如非病毒运载体系统。脂质体可是 pH-敏感脂质体或非 pH-敏感脂质体。pH-敏感脂质体由至少一种脂质体膜中 pH-敏感成份组成。典型的化合物包括脂肪酸如油酸、棕榈酰高半胱氨酸、胆固醇、半琥珀酸吗啉盐和二油酰琥珀酰甘油 (dioleoylsuccinylglycerol)。除了 pH-敏感组分, 脂质体可由二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) (?) 和/或其它类似磷脂组成。

脂质体或其它以脂类为基础的输送系统优选包含至少一种阳离子脂类。

以脂类为基础的输送系统可存在于不同类型的含水配方中。不同术语在参考文献中的这些配方中使用: 多片层脂质体、单片层脂质体毫微乳剂、pH 敏感的脂质体、毫微微粒子、蛋白脂质体、病毒体、嵌合体、共螯合物 (cochelate)、lipofectin[®] 和脂体 (lipoplex)。关于阳离子脂类在基因转移上使用的参考文献包括 P. L. Felgner 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), 84, 7413-7417, D. D. Lasic 等 Adv. Drug Del. Rev (1996), 20, 221-266, L. G. Barron 等在 Gene Therapy (1999), 6 1179-1183, S. Kawakami 等在 Pharmaceutical Research (2000), 17, 306-313, N. S. Templeton 等在 Molecular Biotechnology (1999), 11, 175-180, Y. Zou 等 Cancer Gene Therapy (2000), 7, 683-696, D. D. Stuart 等 Biochemistry et Biophysica Acta (2000), 1463, 219-229, R. I. Mahato 等在 Drug Deliv (1997) 4 151 和 R. J. Lee 等 Crit Rev Drug Carrier Syst (1997), 14 173。

根据本发明有用的脂类, 描述于 US 6, 120, 751、US 6, 056, 938、US 6, 093, 816、US 6, 039, 936、US 6, 034, 137、US 6, 034, 135、US 6, 020, 526、US 5, 980, 935、US 5, 958, 935、US 5, 935, 936、US 5, 877, 220、US 5, 830, 430、US 5, 777, 153、US 5, 705, 693、US 5, 459, 127、US 5, 334, 761、US 5, 264, 618 和在此的参考文献。

阳离子脂类的典型例子包括 N-[1-(2, 3-二油烯氧基) 丙基-N, N, N-三甲基-氯化铵 (DOTMA)、1, 2-二十四烷基-丙氧基-3-二甲基羟乙基溴化铵 (DMRIE)、1, 2-(油酰氧基)-3-(三甲基胺) 丙烷 (DOTAP)、3 β (N², N²-二甲氨基乙烷)-氨基甲酰-胆固醇 (DC-胆固醇)、2, 3-二油烯基-氧代-N[2-精胺羧基-氨基] 乙烷-N, N-二甲基-1-三氟乙酸丙铵盐 (DOS PA)、3 β (N⁴-亚精胺氨基甲酰)-胆固醇和二-十八烷基酰胺甘氨基精胺 (dioctadecylamidoglyl) (DOGS)。

如上所述, 本发明的一较佳方案中, 运载体是阳离子脂类。以前报道过当光照在转移分子后给予, 光化学处理对阳离子脂类调节的转染有抑制作用

(Prasmickaite 等. (2000), J. Gene Med. 6, 正在出版)。然而, 令人惊奇的是当光照在转移分子前给予, PCI 对阳离子脂类调节的转染有刺激作用(见实施例 9)。

因此, 本发明的另一方面提供了包括用于治疗转移分子和光敏剂的组合物。组合物中任选的转移分子和/或光敏剂可结合上述的运载体分子。较佳地是组合物用于癌症治疗或基因治疗。对基因治疗, 优选运载体分子是腺病毒。其它优选运载体是阳离子脂类。

所以本发明的又一方面提供了在此所述转移分子和/或光敏剂在制备用于治疗药物中的使用, 其中上述光敏剂和上述转移分子接触病人的细胞或组织, 上述细胞用具有效激活光敏剂波长的光照射且照射在细胞摄取上述转移分子到含上述光敏剂的胞内区室前进行, 优选是在细胞摄取上述转移分子到任何胞内区室前。包括这些方法的治疗方法形成本发明的其它方面。

因此, 本发明提供治疗或防治病人疾病、紊乱或感染的方法, 方法包括按照上文所述的方法, 将转移分子导入体外、体内或活体的一个或多个细胞中, 并且当需要时(即当转染在体外或活体外操作时)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。

如前面提到的, 这些方法也可应用于疫苗方法。因此本发明的另一方面提供表达或呈递抗原分子(转移分子)或它在细胞表面一部分的方法, 优选的是抗原呈递细胞, 其中上述方法包括上文中定义的步骤。

如本文所用, “表达”或“呈递”指存在分子或其在所述细胞表面的一部分, 至少部分分子暴露于并为该细胞周围环境达到。“表面”表达可获得, 其中待表达的分子接触细胞膜和/或组分, 组分存在或导致位于该膜。

此方法可体外或体内进行。然而较佳地是, 这种抗原呈递可有利地促进免疫反应, 较佳地免疫反应可抵抗后续挑战, 这些挑战由包括或包含所述抗原分子或其一部分的实体引起, 因此本发明作为疫苗方法有具体使用。所以优选的是, 本发明提供了包括上述方法的疫苗方法。

在本发明的这个方面, 本文定义的转移分子是指“抗原分子”。抗原分子可是任何分子, 其中当以适当方式呈递给免疫系统时, 该分子或它的一部分能刺激免疫反应。因此有利的是, 抗原分子是疫苗抗原或疫苗组分, 如含实体的多肽。

本领域已知许多这些抗原或抗原疫苗组分, 还知道所有细菌或病毒抗原或真正抗原或任何含原生动植物或高等生物的病原种类的抗原组分。疫苗抗原组分包括整

个生物(无论活的、死的或是减毒的)即全细胞疫苗,另外亚单位疫苗即以具体生物的抗原组分为基础的疫苗,如蛋白质或肽,或甚至碳水化合物,被广泛研究并在参考文献中报道。任何这种以“亚单位”为基础的疫苗组分可用作本发明的抗原分子。然而,本发明在肽疫苗领域有特殊用途。因此,如本发明所述的抗原分子是肽(本文定义为包括较短和更长长度的肽即肽、寡肽或多肽,蛋白分子或其片断如5-500个氨基酸的肽,例如10到250像15到75或8到25个氨基酸的肽)。抗原分子较佳呈递或表达的部分包括由细胞内的抗原加工机产生的部分。但这些部分可由其它方法产生,通过适当抗原设计(如pH敏感带)或通过其它细胞加工方法。这些部分方便地有足够大小产生免疫反应,如肽大小超过5个氨基酸的情况,如超过10个或20个氨基酸大小。

在参考文献中提到了大量肽疫苗候选物,如在治疗病毒疾病和感染如AIDS/HIV感染或流行性感冒、犬细小病毒、牛白血病病毒、肝炎等之中(参见例如Phanuphak等,Asian Pac. J. Allergy. Immunol. 1997, 15(1), 41-8; Naruse, Hokkaido Igaku Zasshi 1994, 69(4), 811-20; Casal等, J. Virol., 1995, 69(11), 7274-7; Belyakov等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(4), 1709-14; Naruse等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994 91(20), 9588-92; Kabeya等, Vaccine 1996, 14(12), 1118-22; Itoh等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83(23) 9174-8。可使用类似的细菌肽,如来自其它生物或种类的肽抗原。

除了来自病原生物的抗原,肽也用作抗癌症或其它疾病如多发性硬化的疫苗。例如,突变癌基因肽很有希望成为在刺激细胞毒T淋巴细胞中作用于抗原的癌疫苗。(Schirrmacher, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 1995, 121, 443-451; Curtis Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers., 1997, 17, 316-327)。合成肽疫苗也通过治疗转移性黑素瘤评估(Rosenberg等., Nat. Med. 1998, 4(3), 321-7)。治疗多发性硬化的T细胞受体肽疫苗描述于Wilson等, J. Neuroimmunol. 1997, 76(1-2), 15-28。任何这种肽疫苗组分可用作本发明的抗原分子,如任何在参考文献中描述或提出作为肽疫苗的肽。因此,肽可以是以合成或分离或其它方式来自于生物体。

被用于本发明这一方面的方法、应用等的细胞可以是任何细胞,这些细胞能表达或在分子表面呈递,分子被给予或转运到胞质溶胶。

由于本发明这个方面的主要利用在抗原呈递或接种疫苗中,细胞是方便的免疫效应细胞即参与免疫反应的细胞。然而,其它细胞也可呈递抗原到免疫系统,这也在本发明这个方面的范围内。因此如该方面所述的细胞是有利的抗原呈递细胞。

抗原呈递细胞可参与免疫反应的任何方面或是免疫反应的“臂(arm)”，包括体液和细胞调节免疫，例如刺激抗体生成，或刺激细胞毒或杀伤细胞，它们可识别并破坏(另外或者去除)在表面表达“外源”抗原的细胞。因此术语“刺激免疫反应”包括免疫反应和刺激它们机制的所有类型。

刺激细胞毒细胞或产生抗体细胞，需要抗原呈递给细胞，这些细胞通过抗原呈递细胞以具体方式刺激，例如 MHC I 类呈递(如激活 CD8⁺细胞毒 T 细胞需要 MHC-I 抗原呈递)。

抗原呈递细胞在此领域中已知并在参考文献中描述，包括如淋巴细胞(T 和 B 细胞)、树状细胞、巨噬细胞等。其它包括如癌细胞，像黑素瘤细胞。

抗原呈递细胞抗原呈递到细胞毒 T 细胞(CTL)，抗原分子需要进入抗原呈递细胞的胞质溶胶(Germain, Cell, 1994, 76, 287-299)。本发明提供输送抗原分子到胞质溶胶的有效方法。

一旦通过光化学内在化过程在细胞胞质溶胶释放，抗原分子可由细胞抗原加工机加工并以适当方式在细胞表面呈递如通过 I 类 MHC。此加工包括降解抗原，如降解蛋白质或多肽抗原为肽，随后肽与 MHC 分子符合以进行呈递。因此，根据本发明在细胞表面表达或呈递的抗原分子可是摄入细胞的抗原分子片断。

抗原可通过内吞作用为抗原呈递细胞摄取并在内吞泡中降解成肽。这些肽可在体内中结合 MHC II 类分子并转运到细胞表面，那里肽-MHC II 类复合体可为 CD4⁺ T 辅助细胞识别且诱导免疫反应。另外，胞质溶胶中的蛋白质可降解成部分，如通过蛋白酶体和依靠 TAP(抗原呈递相关转运蛋白)转运到内质网，在那里肽结合 MHC I 类分子并转运到细胞表面，如图 1 所示(Yewdell 和 Bennink, 1992, Adv. Immunol. 52: 1-123)。如果肽来源于外源抗原，肽-MHC I 类复合体为 CD8⁺ 细胞毒 T 细胞识别(CTLs)。CTLs 会结合肽-MHC(HLA) I 类复合体且从而被激活，开始增生并形成 CTLs 的克隆。靶细胞和其它细胞表面有相同肽-MHC I 类复合体的靶细胞可为 CTLs 克隆杀死。如果足够量的抗原可引入胞质溶胶，抗外源抗原的免疫性可建立(Yewdell 和 Bennink, 1992, supra; Rock, 1996, Immunology Today 17:131-137)。这特别是发展癌疫苗的基础。最大的应用问题之一是引入足够量的抗原(或抗原的部分)到胞质溶胶中。这可根据本发明通过 PCI 解决。

本发明的组合物也可包括含转移分子的细胞，转移分子用本发明的方法内在化到所述细胞的胞质溶胶中，用于治疗，具体是癌症治疗、基因治疗和接种疫苗。

因此，本发明的另一方面提供含转移分子的细胞或细胞群，转移分子内在化到所述细胞的胞质溶胶中，细胞通过本发明的方法得到。

而本发明的又一方面提供这种细胞或细胞群在制备用于治疗组合物或药物中的使用，较佳的是癌症治疗、基因治疗和接种疫苗。

本发明进一步提供治疗病人的方法，包括给予所述病人细胞或本发明的组合物，即包括将分子引入到上文所述细胞中并将如此制得的细胞施用于所述病人的步骤的方法。较佳的是上述方法用于治疗癌症、基因治疗或接种疫苗。

在体内，可使用在此领域普通或标准给予方式，如注射、灌输、局部用药，在内部和外部身体表面等。本发明用于体内时可与任何组织相关使用，这些组织含光敏剂和转移分子定位的细胞，包括体液定位和固体组织。只要光敏剂为靶细胞摄入且光线可适当输递，所有组织可被治疗。

因此，本发明的组合物可根据药理学领域已知的技术和过程以任何方便的方式配制，如使用一种或更多药学上可接受的运载体或赋形剂。本文所提到的“药学上可接受”是指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运载体或赋形剂材料的性质、剂量等。剂量也可以常规方式确定并取决于分子的性质、治疗的目的、病人的年龄、给药方式等。照射与光敏剂相关的破坏膜的潜能/能力，也应予以考虑。

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 显示用 pEGFP-N1 聚赖氨酸复合体光诱导转染 THX 细胞，其中如图所示细胞在暴露于光之前或之后接触 pEGFP-N1 聚赖氨酸复合体。

图 2 显示用 pEGFP-N1 聚赖氨酸复合体光诱导转染 HCT-116 细胞，其中如图所示细胞在暴露于光之前或之后接触 pEGFP-N1 聚赖氨酸复合体。

图 3 显示用 gelonin 光诱导处理 THX 细胞和因此蛋白质合成的减少，其中如图所示细胞在暴露于光之前或之后接触 gelonin。

图 4 显示光诱导转染 THX 细胞效率的效果，细胞在暴露于光后立即和稍后时间点接触 pEGFP-N1 聚赖氨酸复合体。

图 5 显示当细胞在暴露于光之前或之后不同时间点接触 pEGFP-N1 聚赖氨酸复合体时，光诱导转染 THX 细胞效率的效果。

图 6 显示当细胞光照后与 pEGFP-N1 聚赖氨酸复合体接触不同时间长度时，光诱导转染效率的效果。

图 7 显示本发明起作用的可能模式的图示。

A. I. 光敏剂 S 被内吞(I)并在胞内泡中结束(II)。这些泡暴露于光时破裂

(III)。

B. 光化学处理后, A 中所述细胞用分子 M 处理, M 被内吞并在胞内泡中结束。这些泡会与光化学损伤泡融合且分子 M 释放到胞质溶胶中。

图 8 显示在 0°C 用 pEGFP-N1 聚赖氨酸复合体处理细胞的转染的效果。

图 9 显示当 3-THPP 用作光敏剂时 pEGFP-N1 聚赖氨酸复合体的光诱导转染, 3-THPP 主要不是定位于内细胞毒泡(endocytotoxic vesicle)。

图 10 显示结合光敏剂和光预处理对转染阳离子脂类细胞的效果。

图 11 显示光化学处理对腺病毒转导 THX 细胞的效果。

图 12 显示光化学处理对 FITC-葡聚糖胞内定位的效果。THX 细胞用 20 μ g/ml AlPcS_{2a} 培养 18 小时, 随后在无 AlPcS_{2a} 的培养基培养 4 小时。然后细胞在用 5mg/ml FITC-葡聚糖培养 3 小时前或是暴露于光中 4 分钟(B, D)或是保持在黑暗中(A, C)。荧光(A, B)和相差(C, D) 显微图。

图 13 显示光化学处理对 THX 细胞和 HCT-116 细胞中 gelonin 毒性的效果。对于“光照前”策略, 如图所示, 细胞首先用 20 μ g/ml AlPcS_{2a} 培养 18 小时, 随后暴露于光前在无 AlPcS_{2a} 培养基培养 4 小时。加入 1 μ g/ml gelonin 后, 细胞培养 18 小时。对于“光照后”策略, 如图所示, 细胞用 20 μ g/ml AlPcS_{2a} 和 1 μ g/ml gelonin 在暴露于光前共培养 18 小时。对照细胞仅用 1 μ g/ml gelonin 处理 18 小时并暴露于光中; 或仅用 20 μ g/ml AlPcS_{2a} 处理 18 小时, 在无 AlPcS_{2a} 的培养基追踪 4 小时并暴露于光中。光处理后第二天测量结合到蛋白质中的 [³H]-亮氨酸并表示相对蛋白合成。数据点代表的平均数±三次实验的标准偏差(S.E.)

图 14 显示光化学处理对感染 AdHCMV-lacZ 的 THX 细胞中 β -半乳糖苷酶表达的效果。对于“光照前”策略, AlPcS_{2a}-预处理细胞 3 分钟光照前, 在无 AlPcS_{2a} 的培养基中培养 4 小时。照射后, 细胞用 AdHCMV-lacZ (MOI 为 1) 37°C 感染 30 分钟。然后加入 2ml 培养基且细胞在分析 β -半乳糖苷酶表达前培养 2 天。对于“光照后”策略, AlPcS_{2a}-处理细胞在感染 30 分钟 AdHCMV-lacZ 前在无 AlPcS_{2a} 的培养基中培养 3 小时。加入 2ml 培养基后, 细胞培养 30 分钟后照射 3 分钟, 2 天后分析 β -半乳糖苷酶表达。

图 15 显示培养时间对在 THX 细胞和 HCT-116 细胞中用 pEGFP/聚赖氨酸光诱导转染效率的效果。洗涤经 AlPcS_{2a}-预处理的细胞并在无 AlPcS_{2a} 的培养基中培养 4 小时, 然后用光照射细胞 3 分钟(THX 细胞)或 7 分钟(HCT)。照射后, 加入 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体(5 μ g/ml), 如图所示细胞培养不同的时间段。去除复合体后, 加入新鲜的无 AlPcS_{2a} 的培养基且细胞在 EGFP 表达分析前培养 2 天。

图 16 显示光第一次 PCI 策略对转染 THX 细胞的效果,转染由聚-L-赖氨酸介导,相对光照后策略用 TPPS_{2a} 作为光敏剂,使用不同照射时间。PLL-L: pEGFP-N1/ PLL 复合体后照射。L-PLL: pEGFP-N1/ PLL 复合体前照射。无阴影柱-没有照射,有阴影柱-70 秒照射,实心柱-100 秒照射。

图 17 显示光第一次 PCI 策略对转染 THX 细胞的效果,转染由聚-L-赖氨酸介导,相对光照后策略用 TPPS₄ 作为光敏剂,使用不同照射时间。PLL-L: pEGFP-N1/ PLL 复合体后照射。L-PLL: pEGFP-N1/ PLL 复合体前照射。无阴影柱-没有光,水平阴影柱-50 秒照射,垂直阴影柱-70 秒照射,实心柱-100 秒照射。

图 18 显示光第一次 PCI 策略对转染 HCT 116 细胞的效果,转染由聚-L-赖氨酸介导,相对光照后策略用 TPPS_{2a} 作为光敏剂,使用不同照射时间。PLL-L: pEGFP-N1/ PLL 复合体后照射。L-PLL: pEGFP-N1/ PLL 复合体前照射。无阴影柱-没有照射,有阴影柱-70 秒照射,实心柱-100 秒照射。

图 19 显示光第一次 PCI 策略对转染 HCT 116 细胞的效果,转染由聚-L-赖氨酸介导,用 TPPS₄ 作为光敏剂。PLL-L: pEGFP-N1/ PLL 复合体后照射。L-PLL: pEGFP-N1/ PLL 复合体前照射。无阴影柱-没有照射,水平阴影柱-1.5 分钟照射,垂直阴影柱-2 分钟照射,实心柱-3 分钟照射。

图 20 显示光第一次 PCI 策略对 DOTAP 介导的转染的效果,相对光照后策略用 TPPS₄ 作为光敏剂,使用不同照射时间。DOTAP-L: pEGFP-N1/ DOTAP 复合体后照射。L-DOTAP: pEGFP-N1/ DOTAP 复合体前照射。无阴影柱-没有光,有阴影柱-70 秒照射,实心柱-100 秒照射。

图 21 显示光第一次 PCI 策略对 SuperFect®介导的转染的效果,用 TPPS_{2a} 作为光敏剂,使用不同照射和转染时间且转染的 DNA 量不同。DOTAP-L: pEGFP-N1/ DOTAP 复合体后照射。L-DOTAP: pEGFP-N1/ DOTAP 复合体前照射。无阴影柱-没有照射,有阴影柱-70 秒照射,实心柱-100 秒照射。■-0.75 μg DNA 转染 1 小时;▲-0.75 μg DNA 转染 4 小时;○-1.5 μg DNA 转染 1 小时。

图 22 显示光第一次 PCI 策略对腺病毒介导 HCT 116 细胞基因转导的效果,用 AlPcS_{2a} 作为光敏剂,病毒在不同时间加入。当病毒在不同时间点加入时,转导细胞的百分比用如实施例所述流式细胞仪分析。加入病毒复合体的时间点在上图显示。Y-轴左侧的时间点代表照射前加入病毒,右侧的时间点代表照射后加入病毒。■-1 分钟照射;□-没有照射。

图 23 显示光第一次 PCI 策略对转染 HCT 116 细胞的效果,转染由聚-D-赖氨酸介导,用 AlPcS_{2a} 作为光敏剂和不同的照射时间。

图 24 显示光第一次 PCI 策略对细胞生长抑制剂杀死细胞的效果, 用 TPPS_{2a} 作为光敏剂, 用不同量的博来霉素、照射时间和转染时间。◇-5 TPPS⁻, 1h=5 μ M 博来霉素, 没有 TPPS_{2a}, 1h 培养; ◆-5 TPPS⁺, 1h=5 μ M 博来霉素, 有 TPPS_{2a}, 1h 培养; △-25 TPPS⁻, 1h=25 μ M 博来霉素, 没有 TPPS_{2a}, 1h 培养; ▲-25 TPPS⁺, 1h=25 μ M 博来霉素, 有 TPPS_{2a}, 1h 培养; □-100 TPPS⁻, 1h=100 μ M 博来霉素, 没有 TPPS_{2a}, 1h 培养; ■-100 TPPS⁺, 1h=100 μ M 博来霉素, 有 TPPS_{2a}, 1h 培养; ○-100 TPPS⁻, 4h=100 μ M 博来霉素, 没有 TPPS_{2a}, 4h 培养; ●-100 TPPS⁺, 4h=100 μ M 博来霉素, 有 TPPS_{2a}, 4h 培养。

图 25 显示用 gelonin 的 PCI 对体内模式治疗小鼠中肿瘤的效果。治疗组如下: (△) 只有 gelonin; (■) 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 注射结合照射的空白对照治疗; (◇) 只有光化学治疗 (即 AlPcS_{2a}+光照), 但没有 gelonin; (●) 充分 gelonin PCI 治疗 (即 AlPcS_{2a}+gelonin+光照)。

实施例

材料和方法

细胞系

人黑素瘤细胞系 THX 细胞建立自病人的肿瘤组织, 该病人在 Norwegian Radium 医院治疗转移性恶性黑素瘤 (Aamdal 等, 1986., Int. J. Cancer, 37, 579), 在添加有 10%FCS (Gibco-BRL) 和 2mM (Gibco-BRL) 的 RMPI 1640 (Gibco-BRL) 中生长。人结肠癌细胞系 HCT 116 获得自 American Type Culture Collection (ATCC no. CCL-247) 并在添加有 10%牛胎血清、100 U/ml 青霉素、100mg/ml 链霉素和 2mM 谷氨酰胺的 RMPI 1640 培养基中生长 (all Gibco-BRL, Paisley, UK)。

照射

使用两种不同光源治疗细胞, 都由一排四支荧光管构成。TPPS₄、TPPS_{2a} 和 3-THPP (Porphyrin Products, Logan, UT) 处理过的细胞暴露于蓝光中 (362 型; Appl. Photophysics, London, UK), 蓝光到达细胞的光强为 1.5mW/cm², 而 AlPcS_{2a} (Porphyrin Products, Logan, UT) 处理过的细胞暴露于红光中 (Philip TL 20W/09), 红光通过 Cinemoid 35 滤波器过滤, 到达细胞的光强为 1.35mW/cm²。

荧光显微技术

细胞用荧光显微技术分析, 如 Berg.K. 等, Biochem. Biophys. Acta., 1370:317-

324,1998 所述。为分析荧光素-标记分子,显微镜装有 450-490 nm 激发滤波器、510 nm 二色分光镜和 510-540 nm 通带发射滤波器。

制备质粒-pLys 复合体并处理细胞

质粒-pLys 复合体(配比, 1.7, 如 Berg 等(1999) *Cancer Res.*59:1180-83 所述)通过缓慢混合含 5 μ g 质粒(pEGFP-N1; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)的 75 μ l HBS 和含 5.3 μ g pLys (MW 20700; Sigma, St. Louis, MO)的 75 μ l HBS 制备。溶液在室温培育 30 分钟, 用培养液稀释并加入细胞。

THX 细胞用 20 μ g/ml AlPcS_{2a} 在 37°C 培养 18 小时, 用不含感光剂的培养液洗涤并培养 3 小时, 随后在质粒-pLys 复合体中培养 1 小时, 接着暴露于光中。或者, AlPcS_{2a} 培养后, 细胞用不含感光剂的培养液洗涤并培养 4 小时, 随后在质粒-pLys 复合体中培养 1 小时。细胞 37°C 培养 2 天, 然后用流式细胞仪分析 GFP 表达。

HCT-116 细胞用 20 μ g/ml AlPcS_{2a} 培养 18 小时, 在没有 AlPcS_{2a} 的情况下洗涤并培养 4 小时, 然后光照。细胞在光照前或后立即用 pEGFP-N1 聚赖氨酸复合体处理 4 小时。37°C 培养 2 天后, 用流式细胞仪研究 GFP 表达。

流式细胞仪分析

细胞以胰蛋白酶消化、离心、再悬浮于 400 μ l 培养液中并通过 50 μ m 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(200mW)在 488nm 激发后, 通过 510-530nm 滤波器测定荧光素-荧光(如绿色荧光蛋白(GFP))。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 1

光诱导转染作为光剂量的函数

细胞用 20 μ g/ml AlPcS_{2a} 处理 18 小时, 用不含感光剂的培养液洗涤并培养 3 小时, 随后用 5 μ g pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体培养 1 小时, 接着光照 1、2、3 或 4 分钟。或者, AlPcS_{2a} 培养后, 细胞用不含感光剂的培养液洗涤并培养 4 小时, 随后光处理 1、2、3 或 4 分钟, 接着用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体培养 1 小时, 如图 1 所示。光照后 48 小时用流式细胞仪分析 GFP 表达。pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体的配比为 1.7。

结果示于图 1, 可以看出当质粒-pLys 复合体(即 pEGFP-N1/pLys)是在光照前

而不是之后加入细胞时，GFP 转染同样有效。也可看出这两种处理后转染细胞的百分比取决于细胞暴露于光中的时间长度，百分比在约 2 分钟时达到最大值然后稳定。

实施例 2

在 HCT-116 细胞中表达 GFP

HCT-116 细胞用 $20\ \mu\text{g/ml}$ AlPcS_{2a} 培养 18 小时，然后在没有 AlPcS_{2a} 的情况下培养 4 小时，接着光照。细胞在光照前或之后立即随后用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体处理 4 小时，如图 2 所示。光照后 2 天用流式细胞仪分析表达。

结果列于图 2，可以看出与实施例 1 中 THX 细胞的转染类似，当质粒-pLys 复合体(即 pEGFP-N1/pLys)光照前而不是之后加入细胞时，GFP 转染同样有效。此外，转染细胞的百分比根据细胞暴露于光中的时间长度而不同。

实施例 3

光化学处理前和之后加入 gelonin 的协同作用

Gelonin 是植物毒素，当它存在于细胞的胞质溶胶时可有效抑制蛋白质合成。THX 细胞用 $20\ \mu\text{g/ml}$ AlPcS_{2a} 培养 18 小时，然后在不含光敏剂的培养基中培养 4 小时，接着光照。细胞或者用 AlPcS_{2a} 和 $1\ \mu\text{g/ml}$ gelonin 共处理或者 gelonin($1\ \mu\text{g/ml}$) 在光照后立即加入培养基，18 小时后 gelonin 从培养基中去除，如图 3 所示。光照后 24 小时测量蛋白质合成。

结果列于图 3，可以看出尽管缺少 gelonin 的光化学处理本身导致蛋白质合成有所减少，光化学处理前或后存在 gelonin 引起对蛋白质合成强很多的抑制。数据显示无论 gelonin 在光化学处理前或之后接触细胞，gelonin 内在化到细胞中。

实施例 4

光诱导转染追踪时间的效果

THX 细胞用 $20\ \mu\text{g/ml}$ AlPcS_{2a} 处理 18 小时，用不含感光剂的培养液洗涤并培养 4 小时，随后光处理 3 分钟。细胞在生长培养基中培养如图 4 所示的时间，然后用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体(配比 1.7)处理 1 小时。光照后 48 小时后用流式细胞仪分析 GFP 表达。

结果列于图 4，可以看出为获得最佳结果，待内在化的分子应在光化学处理后相对较短的时间内暴露于细胞，因为 pEGFP-N1 转染光照后以约为 5 小时的半衰期

下降。

实施例 5

转染效率作为转染脉冲相对于照射的函数

THX 细胞用 $20 \mu\text{g/ml AlPcS}_{2a}$ 处理 18 小时,用不含感光剂的培养液洗涤并培养。细胞给以脉冲(0.5 或 1 小时,图 5 中柱的宽度代表处理的起始和结束),3 分钟光照前(负的竖坐标值)或之后(正的横坐标值)用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体处理。光照后 48 小时后用流式细胞仪分析 GFP 表达。将在光照前或后马上进行的转染效率作为 100%,一些实验的数据被标准化。

结果列于图 5,可以看出为获得最佳转染效率,细胞应在光照前或之后不久暴露于待内在化的分子。

实施例 6

光诱导转染-取决于用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体培养的时间

THX 细胞用 $20 \mu\text{g/ml AlPcS}_{2a}$ 处理 18 小时,用不含感光剂的培养液洗涤并培养 4 小时,然后光照,接着用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体(配比 1.7)培养达 6 小时,如图 6A 所示。光照后 48 小时后用流式细胞仪分析 GFP 表达。这样处理后 GFP 表达细胞的数量显示于图 6B 中且不同处理的特异性显示于图 6C 中。

结果列于图 6,可以看出尽管转染细胞的数量随着 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体培养时间的增加而增加(图 6B),转染的最高特异性在最短培养时间后产生。

实施例 7

在 0°C 用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体处理

设计本实验是为了测试光化学处理是否会导致细胞膜的微小损伤,因此意味着在光处理后接触细胞的质粒可渗漏穿越质膜。

THX 细胞用 $20 \mu\text{g/ml AlPcS}_{2a}$ 处理 18 小时,用不含感光剂的培养液洗涤并培养 4 小时,然后光照,接着立即用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体(配比 1.7)在 0°C 培养 45 分钟。随后细胞或者 A) 用胰蛋白酶消化并接种,然后转移到 37°C ,或者 B) 未经胰蛋白酶消化转移到 37°C 。如图 8 所示,细胞暴露于光中。光照后 48 小时后用流式细胞仪分析 GFP 表达。

细胞在 0°C 用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体培养 45 分钟后,复合体会粘到细胞表面但不会内吞。然后 THX 细胞或于 37°C 在不含质粒的培养基中培养(图 8B)或用胰

蛋白酶消化(图 8A)以从表面去除质粒并在 37°C 接种于新培养皿中。这些实验表明光化学处理后质粒/聚赖氨酸复合体不会渗漏穿越质膜。

实施例 8

结合 3-THPP 和用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体的光处理

THX 细胞用 0.25 μ g/ml 3THPP 处理 18 小时, 用不含感光剂的培养液洗涤并培养 4 小时, 然后光照, 接着立即用 pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体(配比 1.7)培养 1 小时。如图 9 所示, 细胞暴露于光中并在光照后 48 小时后用流式细胞仪分析 GFP 表达。

3-THPP 是光敏剂, 其主要定位不是在内体或溶酶体中。图 9 所示结果表明与前面使用光敏剂 AlPcS_{2a} 的实施例中所示结果相比, 照射前用 3-THPP 处理细胞引起 GFP 表达的少量增加。这表明定位于内体和溶酶体的光敏剂也许有利。

实施例 9

光敏剂和光预处理的结合允许使用阳离子脂类的细胞的转染

实验前 HCT 116 细胞接种于 12 孔平板中, 每孔 75 000 个细胞。细胞用光敏剂 AlPcS_{2a} (20 μ g/ml)培养 18 小时, 然后在不含感光剂的培养基中追踪 7 小时, 暴露于红光中 7 分钟。随后细胞用质粒 pEGFP-N1 (5:1 DOTAP 质粒, 1 μ g/ml pEGFP-N1) 的 DOTAP-复合体(DOTAP 购自 Boehringer)培养 3 小时, 用生长培养基洗涤并在 37°C 培养 21 小时, 然后如材料和方法中所述用流式细胞仪测定 EFGFP 表达。

结果列于图 10, 可以看出 PCI-处理使 DOTAP/质粒复合体的转染效率提高约 4 倍。

实施例 10

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 中形成重组病毒 AdCA17lacZ 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} 的生长培养基更换生长培养基, 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 滤波器过滤, 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 普通生长培养基, 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, 并再悬浮于 5ml 的生长培养液中。1000 rpm 离心 5 分钟后, 吸出培养液, 将细胞沉淀再悬浮于 $50 \mu\text{l}$ 的生长培养液中, 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 $900 \mu\text{l}$ 生长培养液, 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 11 中表示为 PS) 和腺病毒 (图 11 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

活性增加所示)。

实施例 11

光化学处理对内吞标记分子胞内定位的效果

THX 细胞接种到 Falcon 3001 培养皿中(2.5×10^4 细胞每培养皿中)且第二天用 $20 \mu\text{g/ml}$ AlPcS_{2a} 处理 18 小时,用不含 AlPcS_{2a} 的培养液洗涤去 AlPcS_{2a} 并培养 4 小时。然后细胞光照 4 分钟,接着用 5mg/ml 内吞标记 FITC-葡聚糖培养 3 小时。未照射细胞除照射以类似方式处理。用 Zeiss Axioplan 荧光显微镜(Oberkochen,Germany)观察 FITC-葡聚糖在未固定细胞中的胞内定位,荧光显微镜使用 63x 放大倍数的物镜、450-490nm 通带激发滤光器和 510-540 nm 通带发射滤光器。荧光显微图用冷却电荷偶联装置(CDD)照相机(Photometrics Inc.,Tucson,AZ)记录。

结果显示(图 12)在荧光内吞标记 FITC-葡聚糖前,给予光的 PCI 从内吞泡(A 组未照射细胞中见到的点)转移此标记的位置到胞质溶胶(B 组照射细胞中见到的扩散荧光)。因此,当光处理在大分子内在化前给予,大分子非常迅速地移位到胞质溶胶,大大减少了大分子溶酶体降解的可能性。

实施例 12

光化学处理对 THX-和 HCT 116 细胞中 gelonin 毒性的效果

Gelonin 是植物毒素,当它存在于细胞的胞质溶胶时有效抑制蛋白质合成,但它不能自己到达胞质溶胶,因此对完整细胞完全无毒。每孔接种 25×10^3 细胞到 24-孔平板(Nunc, 丹麦)以用 gelonin 处理。第二天加入 $20 \mu\text{g/ml}$ AlPcS_{2a}, 细胞在 37°C 培养 18 小时。加入 AlPcS_{2a} 后所有步骤在减弱的光下进行。对于“光照前”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。然后细胞在用 $1 \mu\text{g/ml}$ gelonin 处理 18 小时前暴露于光中(如图所示)。对于“光照后”策略,细胞用 $20 \mu\text{g/ml}$ AlPcS_{2a} 和 $1 \mu\text{g/ml}$ gelonin 共处理 18 小时,在暴露于光前洗涤,如图所示。

未照射细胞除照射外以类似方式处理,。处理过的细胞用培养液洗涤并在加入新鲜培养液后于 37°C 培养,然后进一步分析。通过光照后 [³H]-亮氨酸结合到蛋白质中分析抑制蛋白质合成。照射通过一排 4 支光管(Philip TL 20W/09)和在 550-600nm 切断的长滤光器进行。到达细胞的光强为 13.5 W/m^2 。

实施例显示在 THX(图 13A)和 HCT 116(图 13B)细胞中,“光照前”策略比“光照后”策略作用好。因此,对最高光剂量的 THX-细胞,“光照前”抑制蛋白质合成

的能力是“光照后”约 3 倍。也可看出在两种细胞系中，未经 PCI 处理 gelonin 本身没有毒性作用，显示引起毒性作用的能力和特异性可通过光化学处理达到。

实施例 13

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。细胞暴露于光中 3 分钟后用腺病毒载体 AdHCMV-lacZ (在实施例 10 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，加入新鲜培养液后暴露于光。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，在 37°C 培养然后作进一步分析。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的详细方法描述于实施例 10 中。

结果 (图 14) 显示使用“光照前”策略进行的光化学处理 (图 14 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 14 左手侧条柱所显示)。

实施例 14

培养时间对光诱导转染效率的效果

每孔分别接种 5×10^4 个 THX 细胞或 7.5×10^4 个 HCT 116 细胞到 6-板和 12-板平板。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。将细胞洗去 AlPcS_{2a} 并在不含 AlPcS_{2a} 的培养基中培养 4 小时。然后细胞暴露于光中 (THX 细胞 3 分钟或 HCT 116 细胞 7 分钟)，接着用 pEGFP-N1/聚赖氨酸 ($5 \mu\text{g/ml}$ pEGFP-N1) 复合体处理图 15 所示的时间。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，在 37°C 培养 2 天，然后用流式细胞仪分析 EGFP 表达 (见材料和方法)。照

射通过一排 4 支光管(Philip TL 20W/09)和在 550-600nm 切断的长过滤器进行。到达细胞的光强为 13.5 W/m^2 。pEGFP-N1/聚赖氨酸复合体(配比 1.7)通过缓慢混合质粒和聚赖氨酸溶液制备,溶液分别准备: $5 \mu\text{g}$ pEGFP-N1 质粒在 $75 \mu\text{l}$ 水中稀释, $5.3 \mu\text{g}$ 聚赖氨酸在 $75 \mu\text{l}$ 水中稀释。混合溶液并在室温培养 30 分钟,用培养液稀释至 1ml 并加入细胞。

结果(图 15)显示 THX 和 HCT 116 细胞中,通过 DNA/聚赖氨酸复合体的转染可由“光照前”光化学处理强烈诱导。可以看出与 DNA 短时间培养后转染的刺激已经有效,至少少到 30 分钟。光诱导转染提高培养时间,然而,与 DNA 培养 2 小时后似乎变稳定。

实施例 15

光第一次 PCI 策略对用 TPPS_{2a} 作为光敏剂的聚-L-赖氨酸介导的 THX 细胞转染的效果

四苯基卟吩二磺酸盐(tetraphenylporphine disulfonate)(TPPS_{2a}), lot #04197, 由 Porphyrin Products(UT, USA)生产。TPPS_{2a} 溶于 DMSO。

质粒 pEGFP-N1 购自 Clontech Laboratories Inc. (CA, USA; cat.no. 6085-1)。所用的一批(lot #EGFP-N1-1002)由 ELIM Biopharmaceuticals, Inc. (CA, USA)生产,成品是在无菌水中配成 5mg/ml 的浓度。在 pH7.4(1mM Tris-HCl, 1mM EDTA)的无菌 TE-缓冲液中制成 0.5mg/ml 的贮存液, -20°C 保存。

THX 人黑素瘤细胞在添加有 10%FCS(牛胎血清)、青霉素/链霉素和 L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中培养。在减弱的光下,去除培养基并加入含 $2 \mu\text{g/ml}$ TPPS_{2a} 的培养基。细胞(避光保护)在 37°C 培养 18 小时。细胞用培养液洗三次,含 pEGFP-N1/聚-L-赖氨酸复合体的 1ml 培养基加入 PLL-L(“光照后”)样品。复合体含 $5 \mu\text{g}$ pEGFP-N1 且聚-L-赖氨酸(PLL-L)对 DNA 的配比为 1.7。在黑暗中 37°C 进一步培养 4 小时后,去除培养基,细胞用培养基洗一次。加入 1ml 培养基,细胞暴露于蓝光,如图 16 所示和材料和方法中所述。对 L-PLL(“光照前”)样品,在培养基中前 4 小时不含 pEGFP-N1/ PLL 复合体培养,照射后立即加入复合体并再培养 4 小时后去除。细胞培养 2 天(仍避光保护),用流式细胞仪分析 EGFP 表达。为进行此分析,细胞用胰蛋白酶消化(胰岛素-EDTA, Sigma,MO,USA)、再悬浮于 $400 \mu\text{l}$ RPMI 培养液中并通过 $50 \mu\text{m}$ 筛孔尼龙过滤器过滤,然后在 FACS-Calibur 流式细胞仪(Becton Dickinson, CA, USA)中分析。在 488nm 激发后通过 $510-540\text{nm}$ 滤波器测定 EGFP。碘化丙锭($1 \mu\text{g/ml}$)用于区分活细胞与死细胞,进行脉冲过程

以区分细胞双联体和单个细胞。每个样品收集 10 000 个细胞。使用 CELLQuest 软件(Becton Dicknson)分析数据。

结果

如图 16 所见, 对于聚-L-赖氨酸介导的 THX 细胞的转染, “光照前”加入转移分子的方法和用 TPPS_{2a} 光敏剂的“光照后”方法同样起作用。

实施例 16

光第一次 PCI 策略对用 TPPS₄ 作为光敏剂的聚-L-赖氨酸介导的 THX 细胞转染的效果

THX 细胞如实施例 15 所述生长和处理, 除了使用 TPPS₄ 光敏剂(75 μg/ml)而不是 TPPS_{2a}。

结果

从图 17 中, 显然对于聚-L-赖氨酸介导的 THX 细胞的转染, “光照前”方法比用 TPPS₄ 光敏剂的“光照后”方法效果好一些, 但两种方法仍能产生转染。

实施例 17

光第一次 PCI 策略对用 TPPS_{2a} 作为光敏剂的聚-L-赖氨酸介导的 HCT 116 细胞转染的效果

HCT 116 细胞如实施例 15 所述生长和处理。

结果

从图 18 中, 可看出对于聚-L-赖氨酸介导的 HCT 116 细胞的转染, “光照前”方法和用 TPPS_{2a} 光敏剂的“光照后”方法同样起作用。

实施例 18

光第一次 PCI 策略对用 TPPS₄ 作为光敏剂的聚-L-赖氨酸介导的 HCT 116 细胞转染的效果

THX 细胞如实施例 15 所述生长和处理, 除了使用 TPPS₄ 光敏剂(75 μg/ml)而不是 TPPS_{2a}。

结果

图 19 显示对于聚-L-赖氨酸介导的 THX 细胞的转染, “光照前”方法和用 TPPS₄ 光敏剂的“光照后”方法同样起作用。

实施例 19

光第一次 PCI 策略对用 TPPS₄ 作为光敏剂的 DOTAP 介导的转染的效果

HCT 116 细胞在添加有 10%FCS(牛胎血清)、青霉素/链霉素和 L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中培养。在减弱的光下, 去除培养基并加入含 75 μ g/ml TPPS₄ 的培养基。细胞(避光保护)在 37°C 培养 18 小时。细胞用培养液洗三次, 含 1 μ g pEGFP-N1 和 5 μ g DOTAP 的复合体的 1ml 培养基加入 DOTAP-L(“光照后”)样品。在黑暗中 37°C 进一步培养 4 小时后, 去除培养基, 细胞用培养基洗一次。加入 1ml 培养基, 细胞暴露于蓝光, 如图 20 所示和“材料和方法”中所述。对 L-DOTAP(“光照前”)样品, 在培养基中前 4 小时不含 pEGFP-N1/DOTAP 复合体培养, 照射后立即加入复合体并再培养 4 小时后去除。细胞培养 1 天(避光保护), 接着如实施例 15 所述用流式细胞仪分析 EGFP 表达。

结果

从图 20 观察到对于阳离子脂类 DOTAP 介导的 HCT 116 细胞的转染, “光照前”方法比用 TPPS₄ 光敏剂的“光照后”方法效果好很多。“光照前”方法似乎对阳离子脂类介导的的转染特别有利。

实施例 20

光第一次 PCI 策略对用 TPPS_{2a} 作为光敏剂的 SuperFect® 介导的转染的效果

SuperFect® 购自 QIAGEN AG。

制备质粒/ SuperFect® 复合体

质粒/ SuperFect® 复合体制备如下:

(i) pEGFP-N1 用 RPMI 1640 培养基(无血清、蛋白质和抗体)稀释。

(ii) SuperFect®

(2 μ l 每 μ g DNA) 加入质粒溶液且成分通过旋转 10 秒混合。(iii) 溶液在室温培养 10-20 分钟以使复合体形成。(iv) 400 μ l 细胞生长培养基(含血清和抗体)加入含转染复合体的试管且成分通过吸上和吸下两次混合, 总体积立即转入细胞。

处理细胞

HCT 116 细胞(75000 细胞/孔, 1ml/孔)接种到 12-孔平板(Costar Corning, NY, USA)并可附着 6 小时。加入含 0.7 μ g/ml TPPS_{2a} 的 1ml 培养基, 细胞培养 18 小时(5% v/v CO₂, 37°C)。细胞用培养液洗三次并在含血清的培养液中培养 4 小时(37°C, 5% v/v CO₂)。细胞暴露于一组 4 支荧光管中照射(Osram 18W/67), 最高能流约 420nm。光照后立即加入质粒/SuperFect® 复合体, 细胞用复合体培养 1 或 4 小

时。随后细胞在 RPMI 培养基中洗 4 次，加入 1ml 培养基后它们进一步培养 2 天。然后如实施例 15 所述用流式细胞仪分析 EGFP 表达。

结果

可看出(图 21)PCI 在所用试验情况中显著提高 SuperFect®转染。如对于 0.75 μ g DNA 和 1 小时转染时间，发现转染提高了 9 倍，而对 0.75 μ g DNA 和 4 小时转染时间，观察到转染提高 10 倍。

实施例 21

光第一次 PCI 策略对用 TPPS_{2a} 作为光敏剂的腺病毒介导的 HCT 116 细胞的基因转导的效果

HCT 116 细胞在添加有 10%FCS (牛胎血清)、青霉素/链霉素和 L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中培养。在减弱的光下，去除培养基并加入含 1 μ g/ml TPPS_{2a} 的培养基到每个孔中。细胞(避光保护)在 37°C 培养 18 小时。细胞用培养液洗三次。然后细胞在照射(总是在去除光敏剂后 4 小时)前或后不同时间点感染 Ad-HCMV-LacZ。细胞进一步培养 2 天(仍避光保护)，接着如实施例 10 所述(材料和方法)用流式细胞仪分析 β -半乳糖苷酶的活性。

结果

图 22 显示光处理相对于病毒输递的时间设定对于 PCI 对腺病毒介导的基因转导作用的效果。可看出对于“光照前”方法(Y-轴右侧)，PCI 照射至少有效 13 小时因此病毒可在照射后使用至少 13 小时，仍维持对转导的正 PCI 效果。从临床观点看这很重要因为它使临床医生在设计治疗上有更大灵活性并根据病人接受的其它治疗如外科手术进行调整。

实施例 22

光第一次 PCI 策略对用 ALPcS_{2a} 作为光敏剂的聚-D-赖氨酸介导的 HCT 116 细胞转染的效果

HCT 116 细胞如实施例 15 所述生长、处理和分析，但使用聚-D-赖氨酸而不是聚-L-赖氨酸与 pEGFP-N1 形成复合体。

结果

从图 23，可观察到当聚阳离子聚-D-赖氨酸用作转染剂时，用“光照前”操作的 PCI 也可作用良好。

实施例 23

光第一次 PCI 策略对用 TPPS_{2a} 作为光敏剂的细胞生长抑制剂博来霉素杀死细胞的效果

四苯基卟吩二磺酸盐(TPPS_{2a}), lot #04197, 由 Porphyrin Products(UT, USA) 生产。TPPS_{2a} 溶于 DMSO。

此研究使用中国仓鼠肺成纤维细胞细胞系 V-79。

MTT(3-[4, 5-二甲基噻唑-2-基]-2, 5-二苯基四唑溴)(?) 来自 Sigma(MO, USA; cat. no. M2128), 溶于 PBS 配成 5mg/ml 的浓度, 无菌过滤并在 4°C 贮存。

博来霉素(ASTA Medica)15000 IE/KY 从 Norwegian Radium 医院的药房获得。1 IE 对应于 1mg 博来霉素。博来霉素粉末溶于无菌的 0.9%NaCl 溶液达到 2mM 的终浓度。

细胞培养

V-79 细胞在添加有 10%牛胎血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素和 2mM 谷氨酰胺(all Gibco BRL, Paisley, Scotland)的 RPMI 1640 培养基(Gibco)中 37°C 和含 5% CO₂ 的潮湿环境中培养。

处理细胞

细胞(75000 细胞/孔, 1ml/孔)接种到 12-孔平板(Costar Corning, NY, USA)并可附着 6 小时。在一些孔中加入含 0.7 μg/ml TPPS_{2a} 的 1ml 培养基(见表 1), 细胞培养 18 小时(5% v/v CO₂, 37°C)。细胞用培养液洗三次。细胞随后在含血清的培养液中培养 4 小时。去除培养液, 加入新培养液, 细胞暴露于光中照射, 光来自含一组 4 支最高能流约 420nm 的荧光管(Osram 18W/67)的盒。

立即加入不同剂量的博来霉素。博来霉素培养 1 或 4 小时后, 细胞用 RPMI-培养基洗一次, 加入 1ml 培养基且培养 3 天后用 MTT 方法测定细胞成活率。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、不可溶性甲臞产物。将 1ml 含有 0.25 μg MTT 的培养基加入细胞, 随后培养 4 小时(37°C, 5% v/v CO₂)。产生的甲臞结晶通过每孔加入 200 μl 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。细胞成活率以未接受光处理的对照细胞百分比计算。

结果

图 24 显示用“光照前”方法的 PCI 也可提高低分子量、临床通过的化疗剂(博来霉素)的生物效果。因此, 可看出对于 100 μM 博来霉素剂量, 在博来霉素的细

胞毒中可观察到显著的光诱导增加(图 24 中的■和●)。缺少最低剂量的博来霉素(图 24 中的◆)的效果显示增加的细胞毒性不是光化学处理本身的结果, 因为此样品系列接受和 100 μ M 博来霉素系列相同的光化学处理, 博来霉素系列没有看得见对细胞成活率的光诱导效果。

实施例 24

用 gelonin 的 PCI 在小鼠中以体内模式治疗肿瘤

动物

Balb/c(nu/nu)无胸腺雌性小鼠在癌症研究所动物部(the Animal Department of the Institute for Cancer Research)饲养。小鼠维持在特殊无病原的条件下。随意提供水和食物。所有涉及小鼠的步骤按 Norwegian Radium 医院动物照料委员会(animal care committee)通过的操作进行, 在 National Ethical Committee 动物福利方针控制下。在实验开始时小鼠平均 20-25g(5-8 周大), 我们每实验组至少是用 5 只小鼠。本研究所用的 WiDr 人腺癌, 通过连续移植到 Balb/c(nu/nu)小鼠中传播。肿瘤用解剖刀切碎到均一, 皮下注入 20 μ l 溶液到每只小鼠的右臀。每周通过测垂直直径测量 2 或 3 次肿瘤大小。肿瘤体积用下面的公式计算:

$$V=(W^2 \times L)/2$$

其中 W 是所测肿瘤的宽度, L 是所测肿瘤直径的长度。

治疗

小鼠任意分配到不同组中, 如表 1 和图 25 所示。ALPcS_{2a} 的贮存液在 PBS 中稀释到 1.25mg/ml 并当肿瘤达到约 100mm³ 体积时, 注入腹腔使终浓度为 10mg/kg。注射 ALPcS_{2a} 48 小时后, 肿瘤暴露于红光中 16 分钟(见下)。光照后 gelonin(50 μ g 总量在 2mg/ml 溶液中, 即 25 μ l) 立即注入肿瘤内。注射 ALPcS_{2a} 后小鼠维持在黑暗中 1 周。

光处理

肿瘤用 150 W 卤素灯(Xenophot HLX64640)照射, 用长通为 580nm、短通为 700nm 的 150mW/cm² 发射滤波器过滤。动物除了肿瘤区域上部外用铝箔覆盖, 在那里铝箔上有个直径比肿瘤直径大 2mm 的洞。肿瘤暴露于 145 J/cm² 的光中。肿瘤体积如上面所述每周测 2 或 3 次。当肿瘤直径约为 20mm 时杀死小鼠。照射 30 天后记下无肿瘤小鼠的部分(表 1), 记录每个处理组的平均肿瘤体积(图 25)。

结果

表 1. 小鼠如上所述治疗并在照射 30 天后记录肿瘤发生。

组号	治疗	照射 30 天后无肿瘤小鼠的部分	照射 30 天后无肿瘤小鼠%
1	未治疗	1/8	13
2	PBS+光	0/7	0
3	Gelonin	0/8	0
4	Gelonin+ “光照前”	0/5	0
5	ALPcS _{2a}	0/10	0
6	ALPcS _{2a} +gelonin	0/7	0
7	ALPcS _{2a} +光	2/11	18
8	ALPcS _{2a} +gelonin+ “光照前”	4/5	80

从表 1 可看出 PCI 和用“光照前”方法的 gelonin(组 8)治愈 80%(五分之四)小鼠的肿瘤。相反仅用 gelonin 没有显示效果, 无论有(组 4)还是没有(组 3)另外的光处理(无 ALPcS_{2a})。gelonin 联合 ALPcS_{2a} 没有光处理时(组 6)也未显示任何效果。在未治疗动物(组 1)中看到低治愈率, 也许由于肿瘤自发消失。由于不依赖于 gelonin 存在的光学治疗(PDT)效果, 低治愈率也可在接受 ALPcS_{2a} 和光处理的动物(组 7)中观察到。然而, 此 PDT 效果(18%治愈)比用 gelonin 的 PCI 处理(80%, 组 8)中发现的低许多。因为 gelonin 本身没有效果, PCI 组的高治愈率不能用 PDT 和 gelonin 的相加效应解释, 但肯定是由于协同效果, 其中通过 PCI 处理可知 gelonin 的潜在毒性。

图 25 显示 PCI 处理对一些治疗组中平均肿瘤体积的效果。可看出在只接受 gelonin(Δ)的组中, 肿瘤生长和给予磷酸缓冲盐溶液(PBS)注射结合照射的空白对照治疗的动物(\blacksquare)一样快。只接受光化学处理但没有 gelonin 的动物(\diamond)中, 肿瘤生长延迟但肿瘤在照射约 15 天后再次生长。相反, 对接受充分 gelonin PCI 治疗的动物(\bullet), 甚至照射 33 天后未观察到平均肿瘤体积的增加。

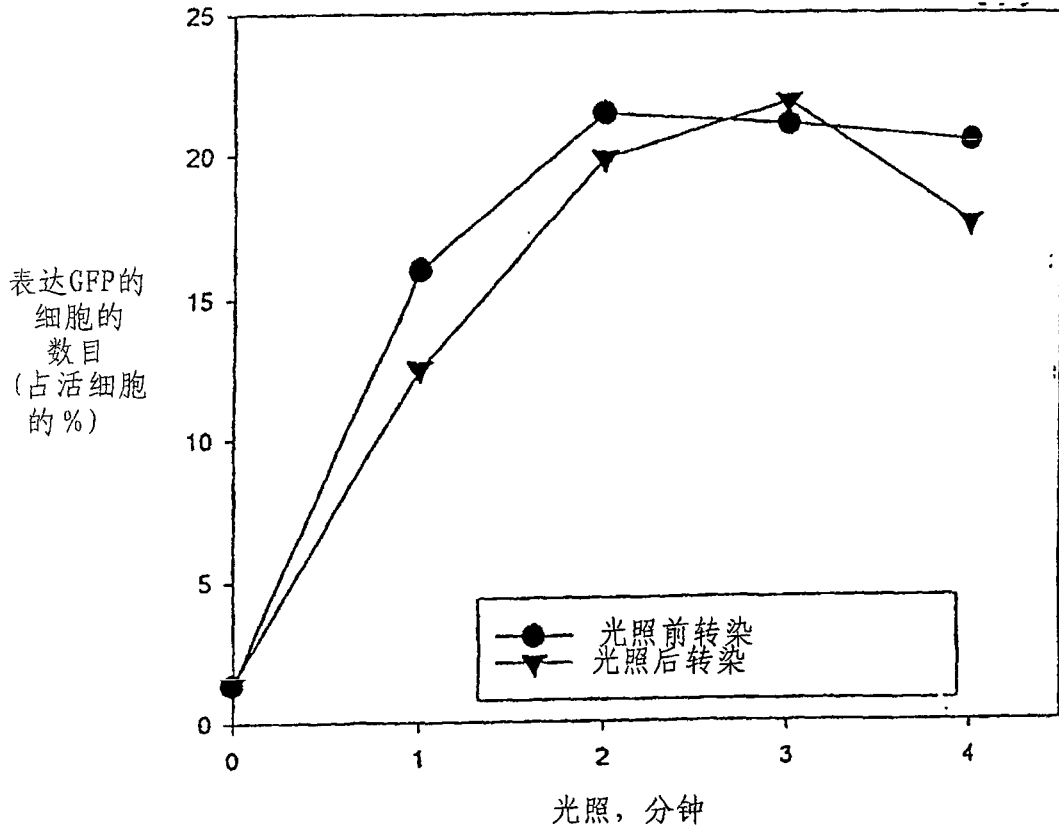


图 1

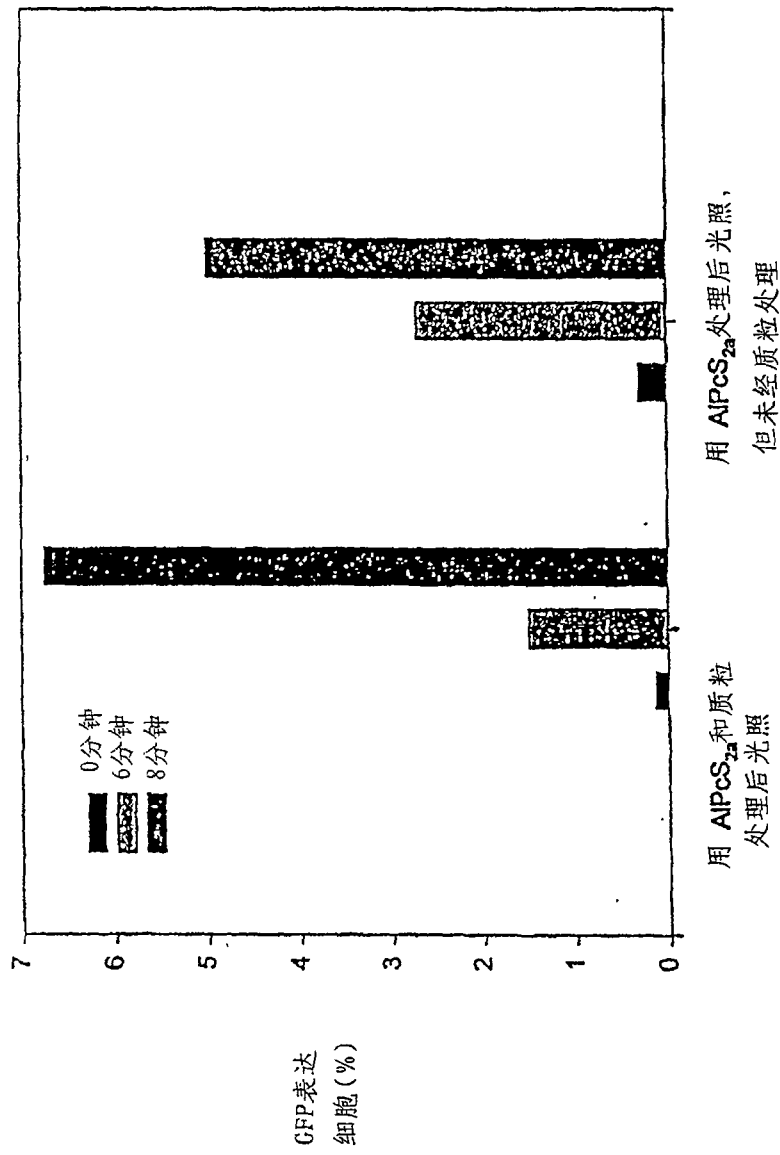


图 2

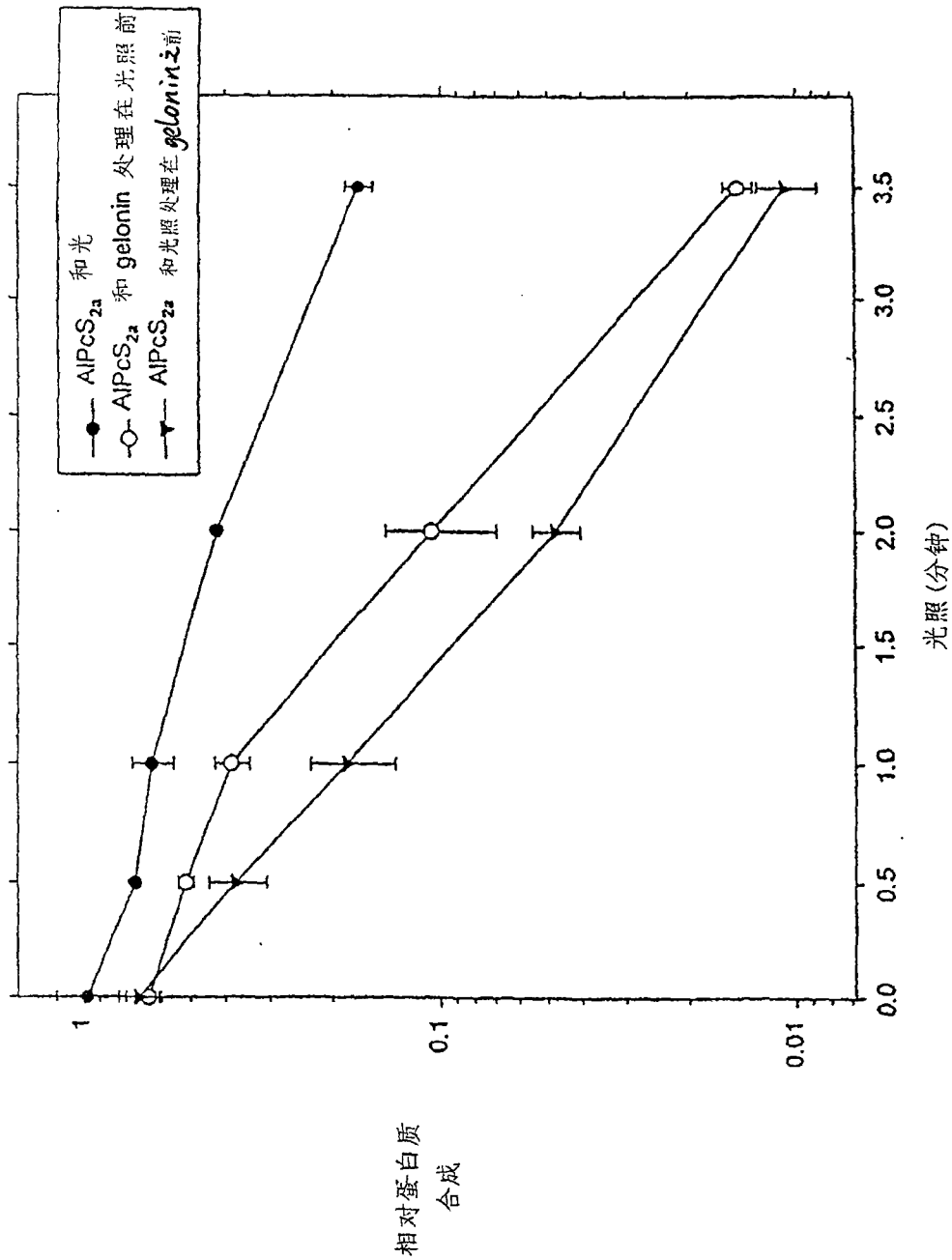


图 3

3min光照

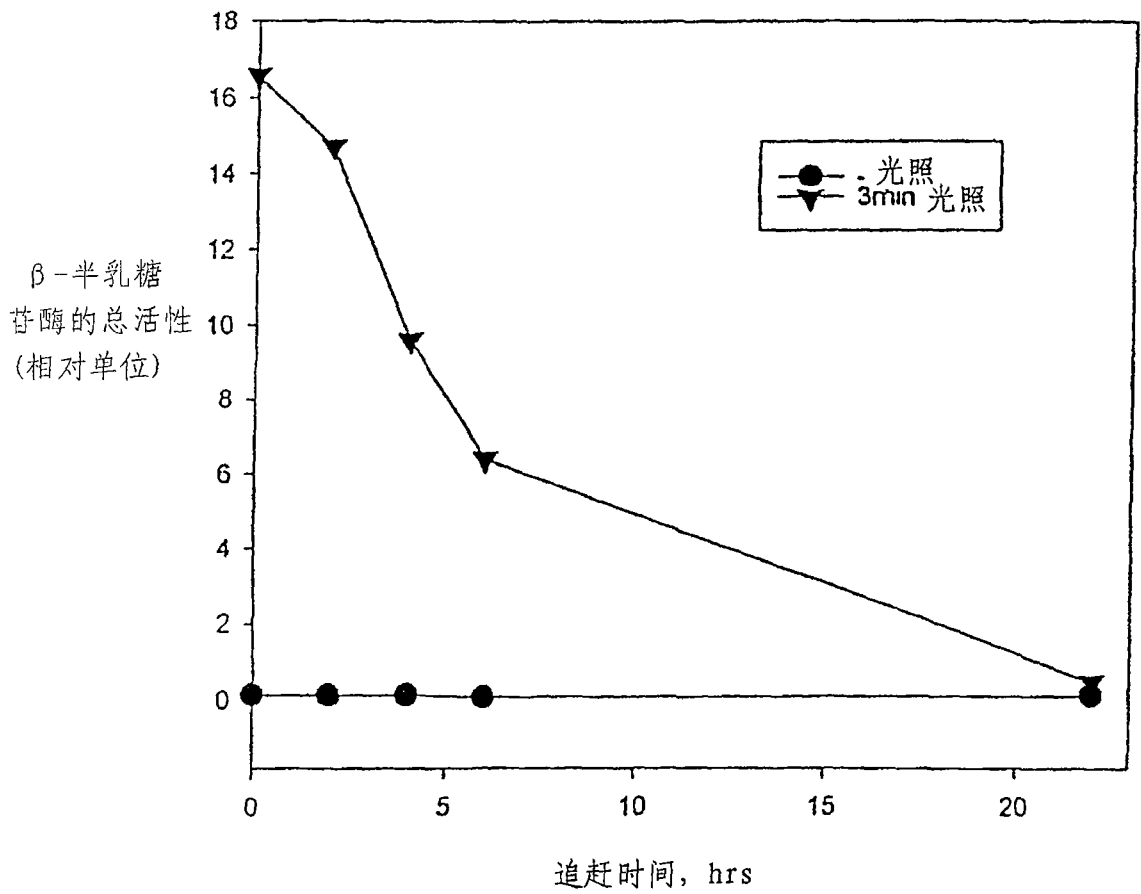
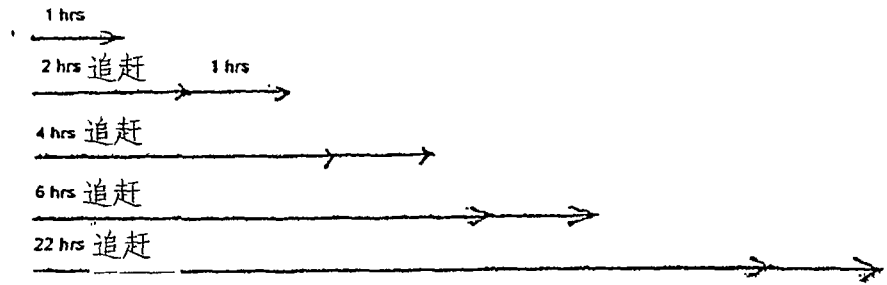


图 4

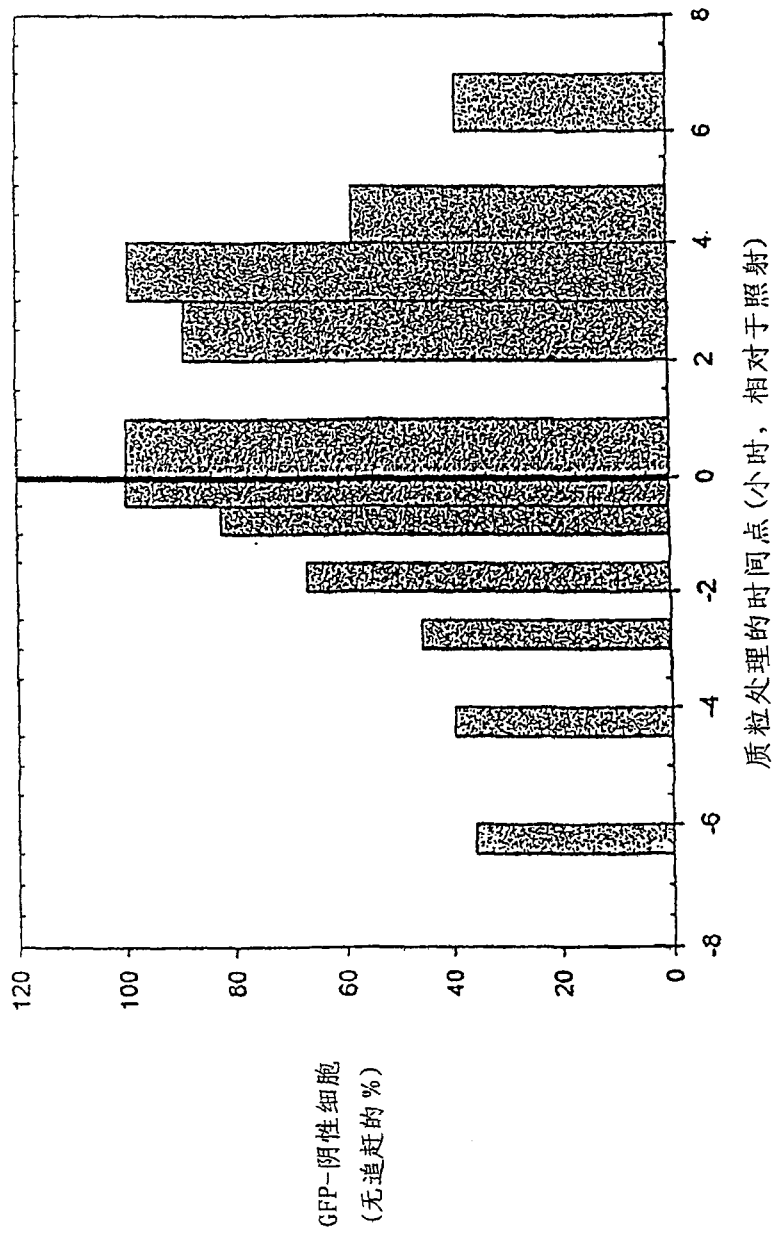
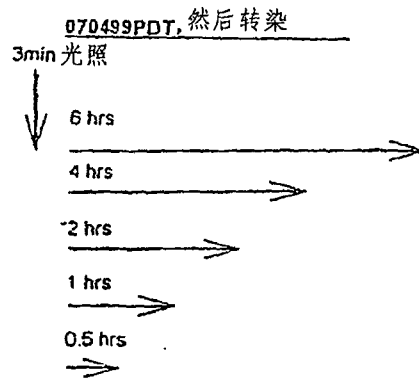
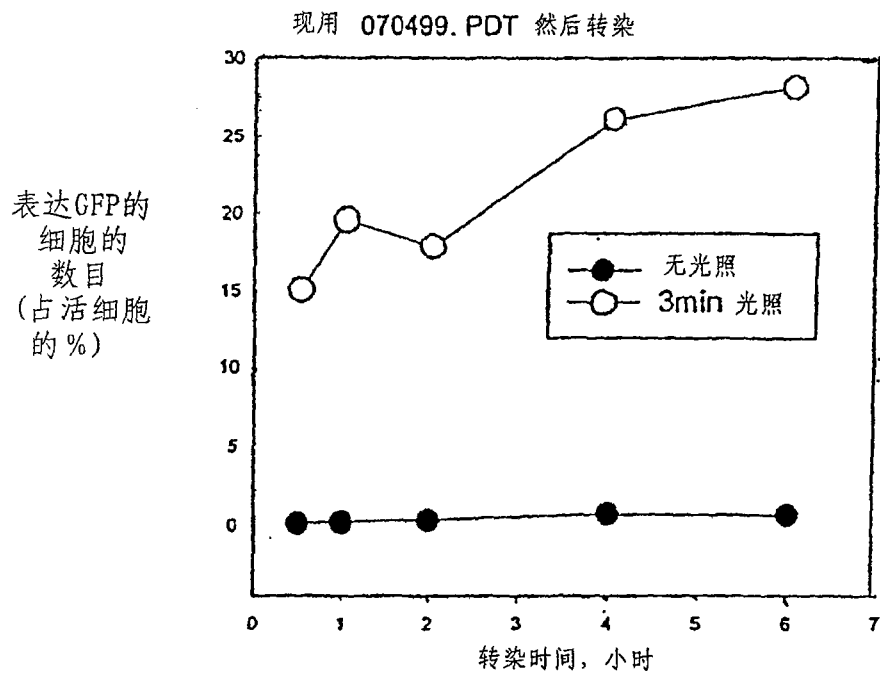


图 5

A



B



C

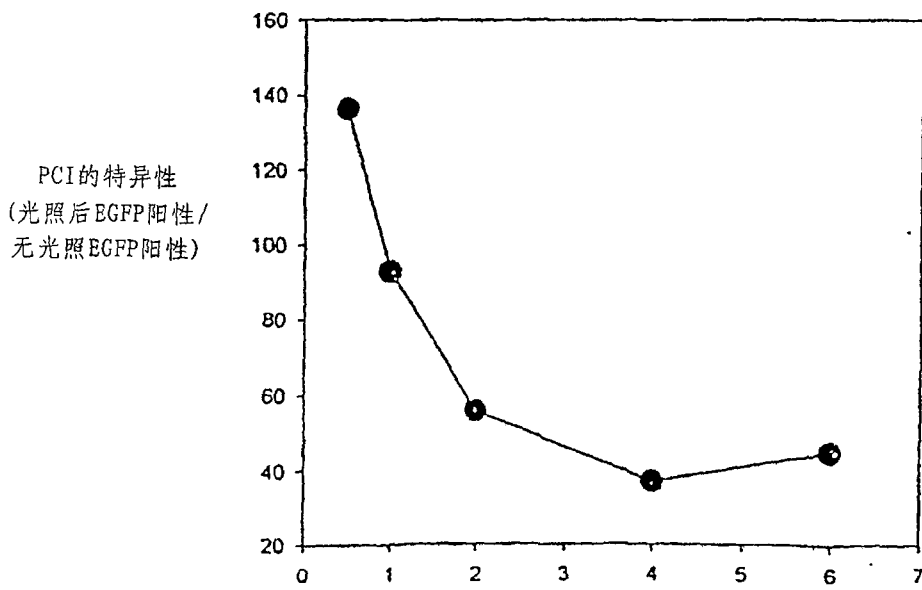


图 6

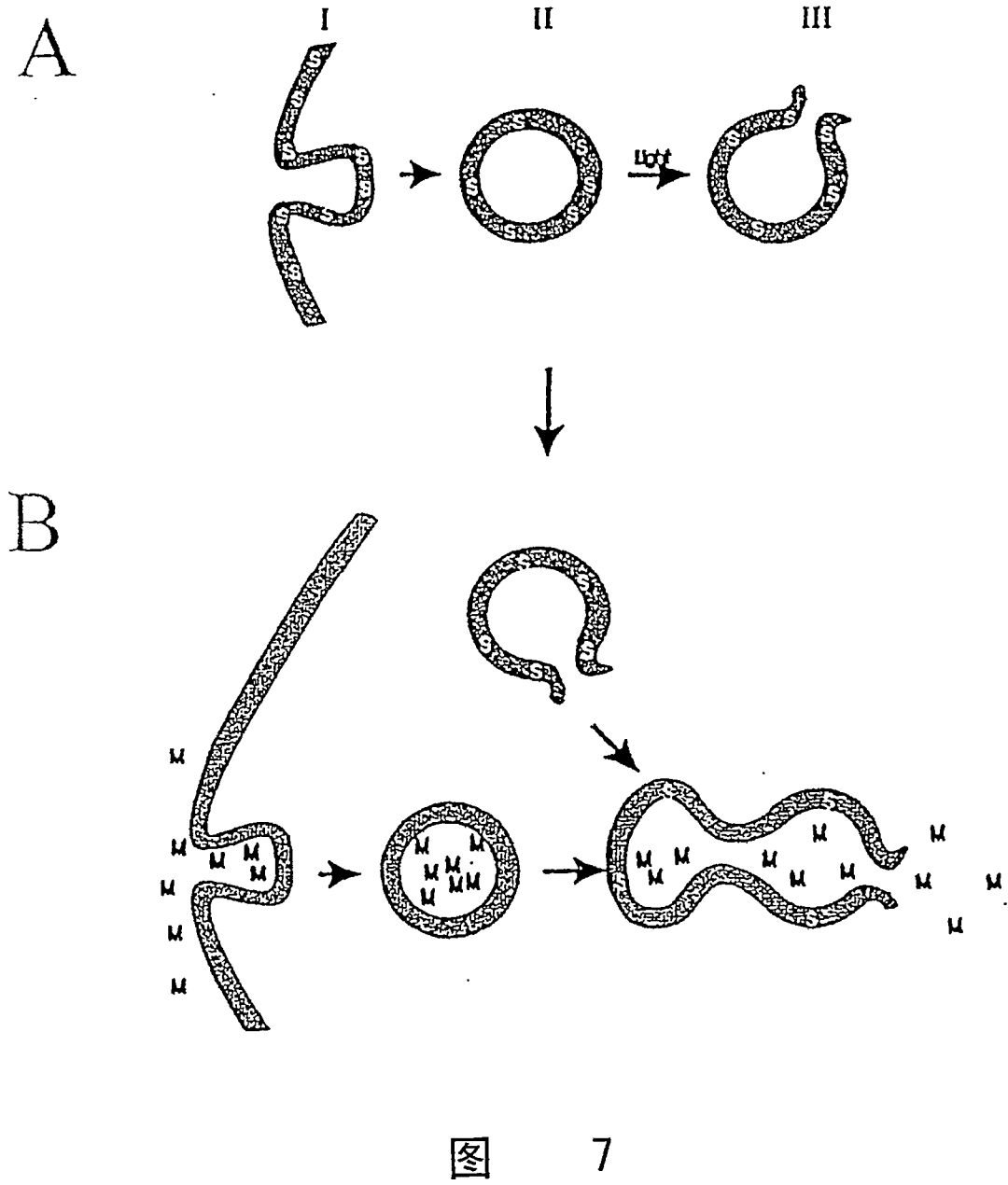
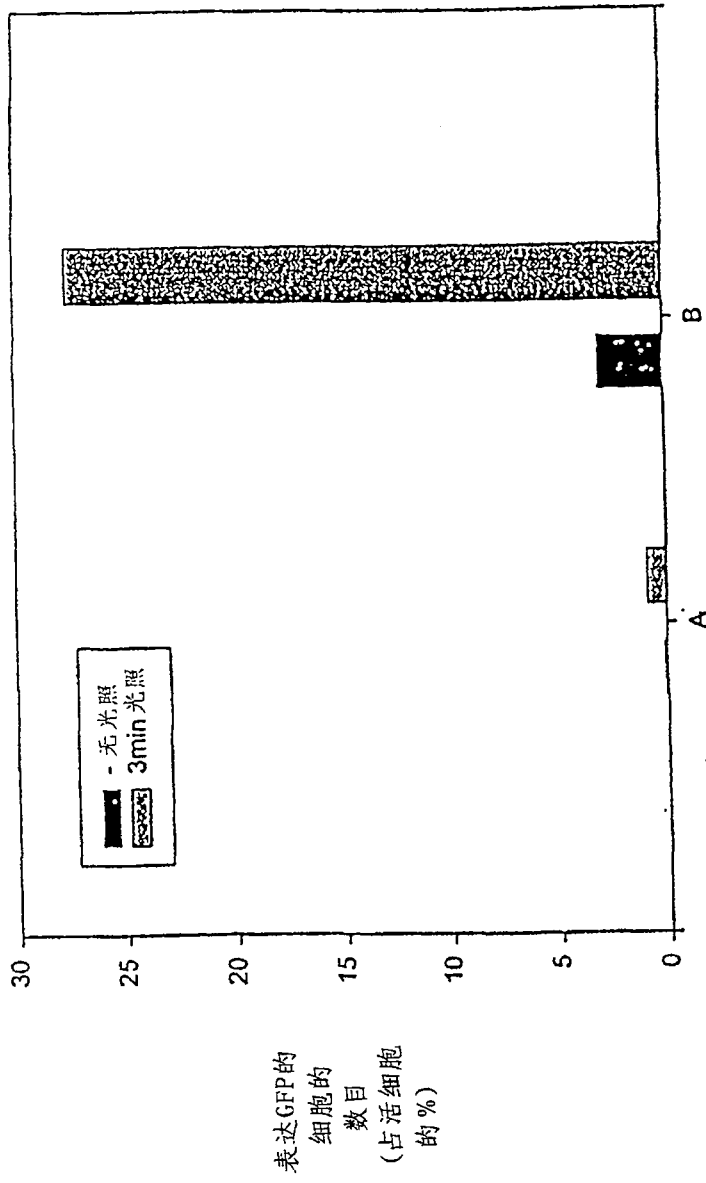


图 7



8

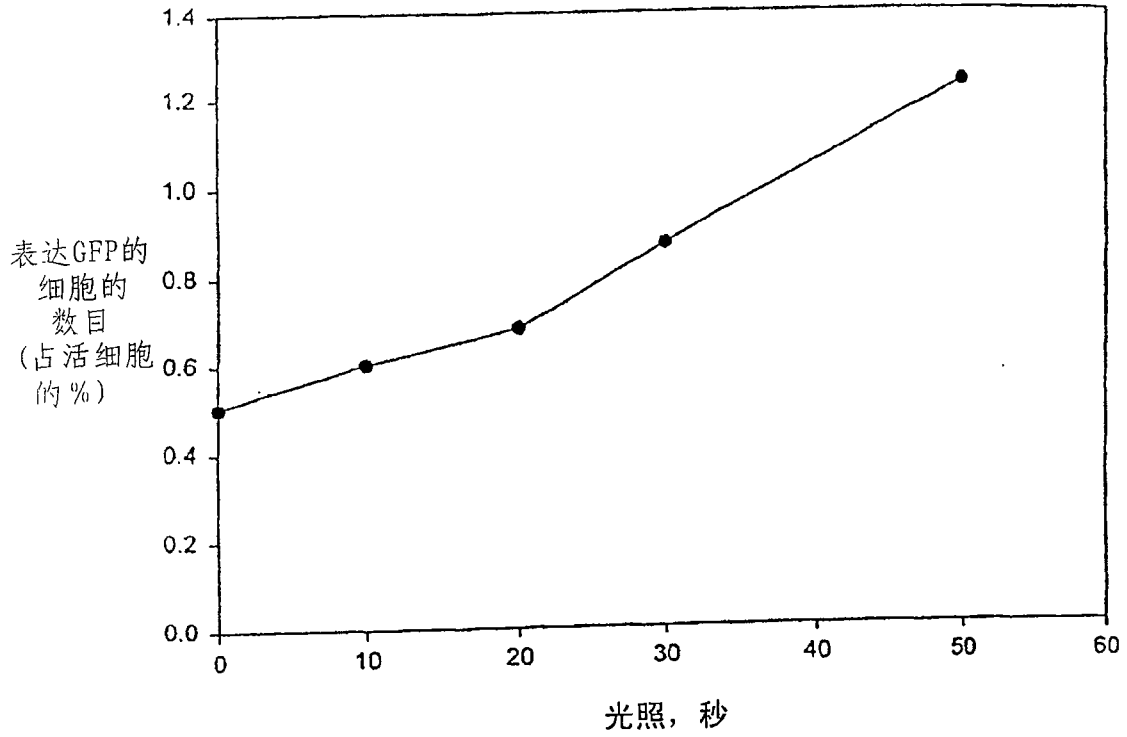


图 9

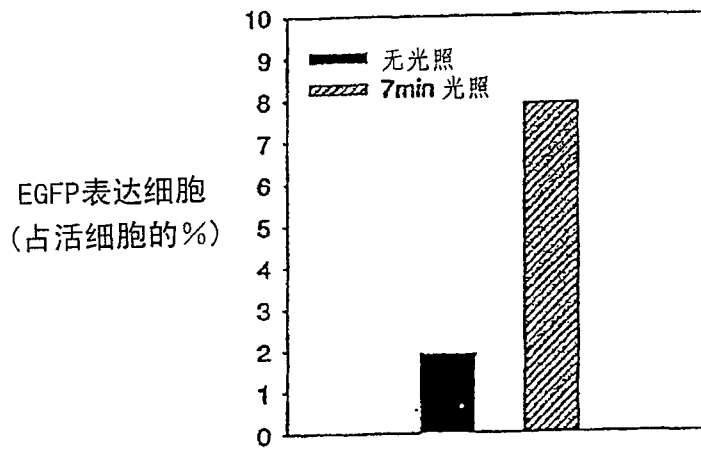


图 10

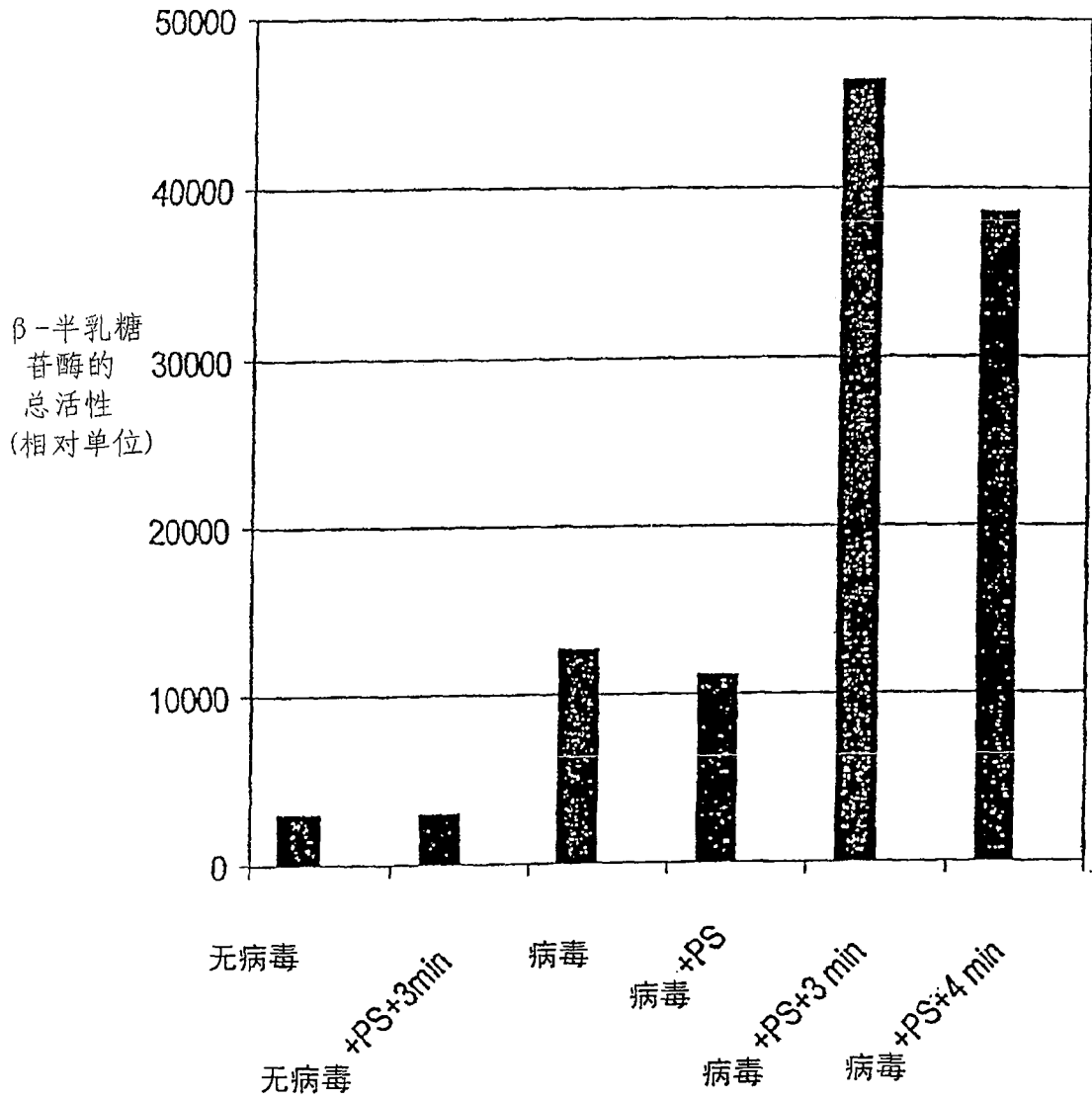


图 11

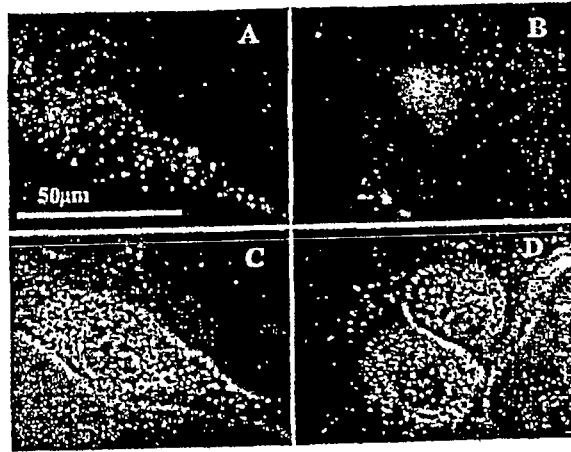


图 12

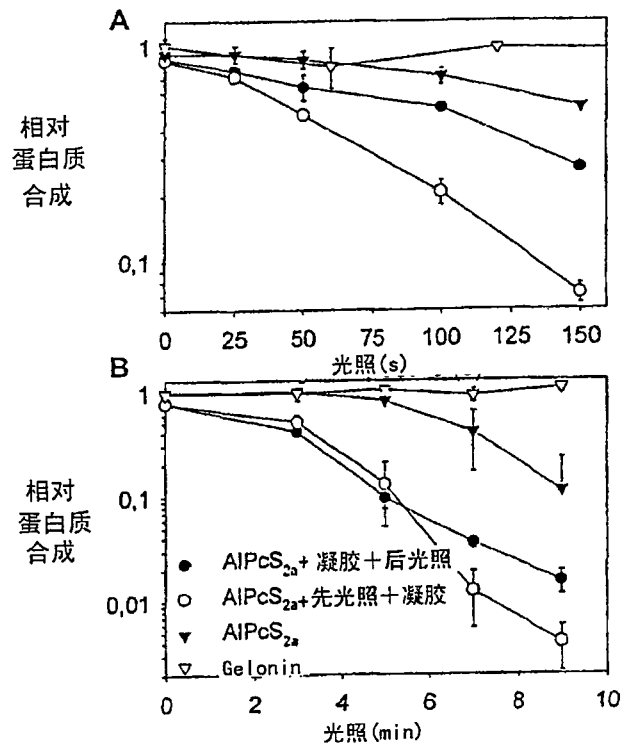


图 13

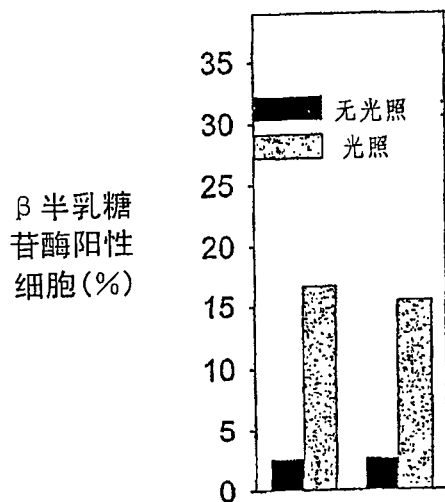


图 14

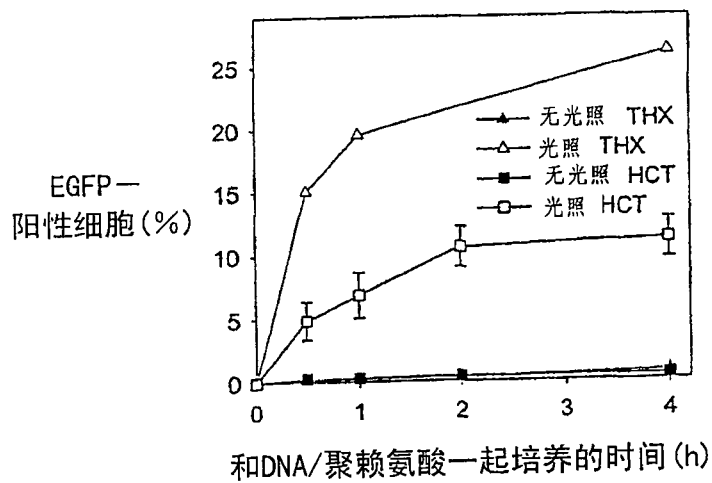


图 15

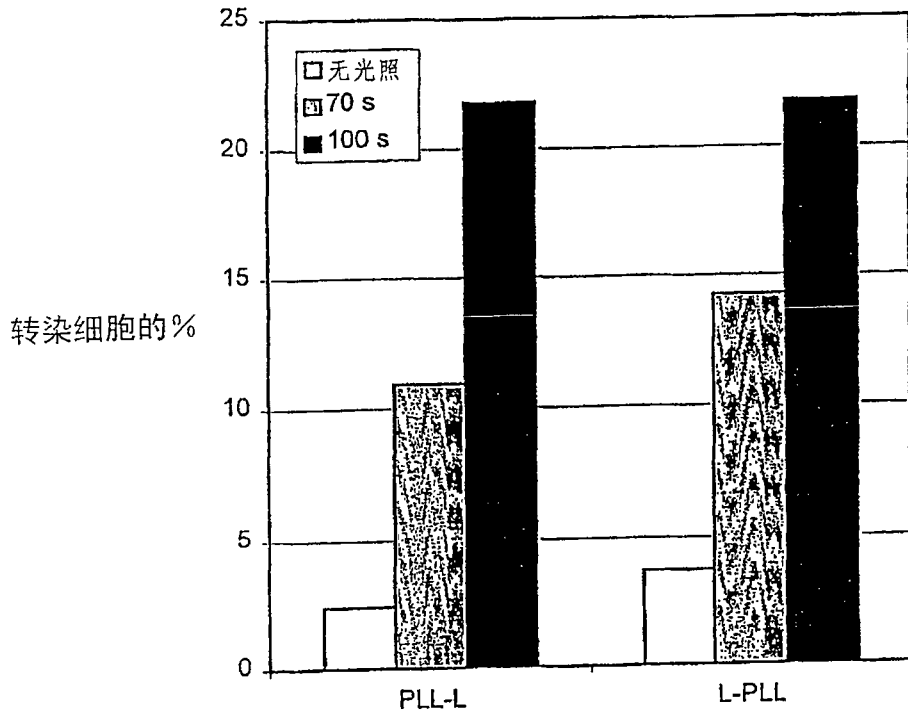


图 16

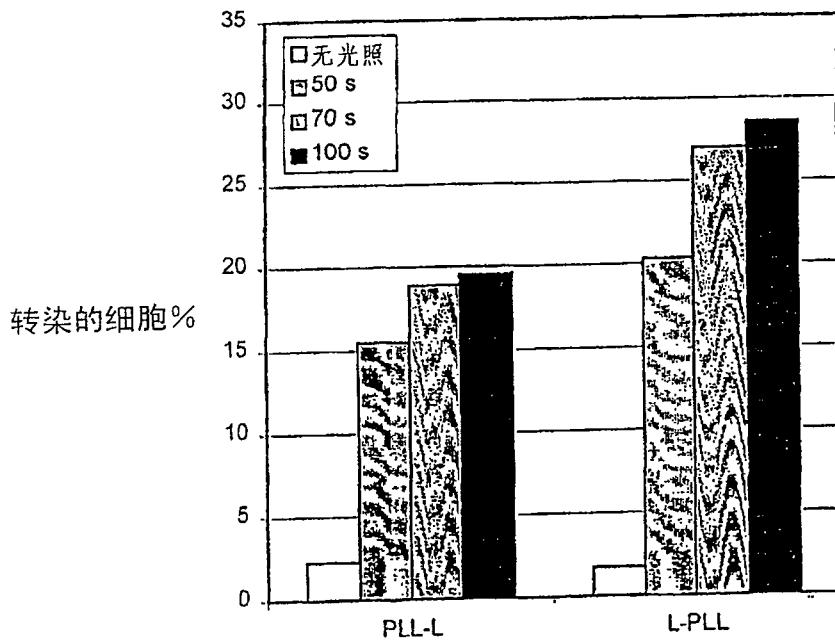


图 17

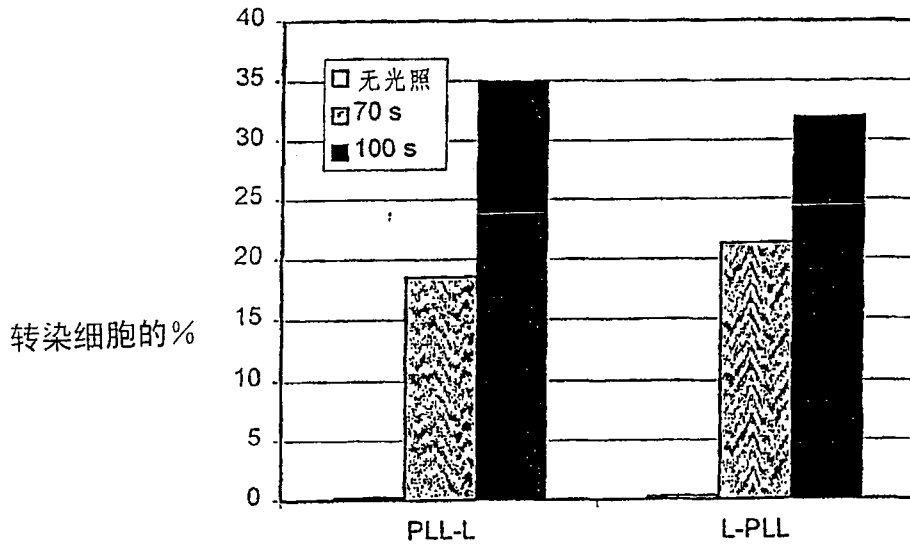


图 18

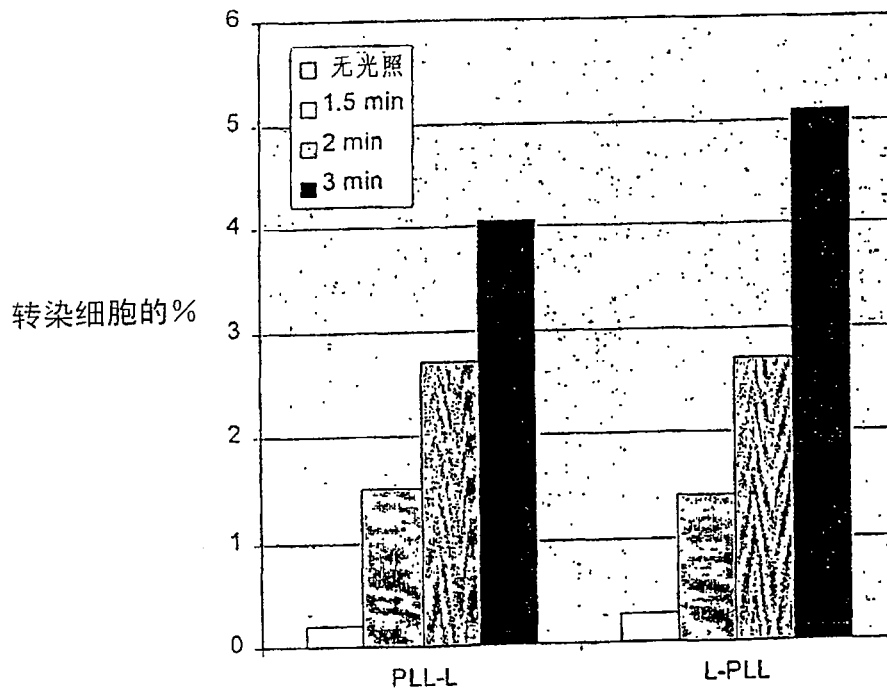


图 19

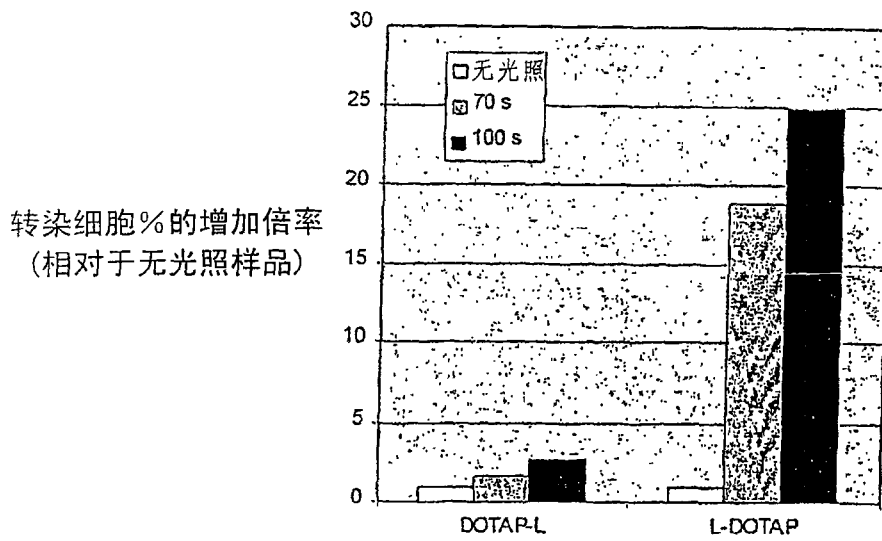


图 20

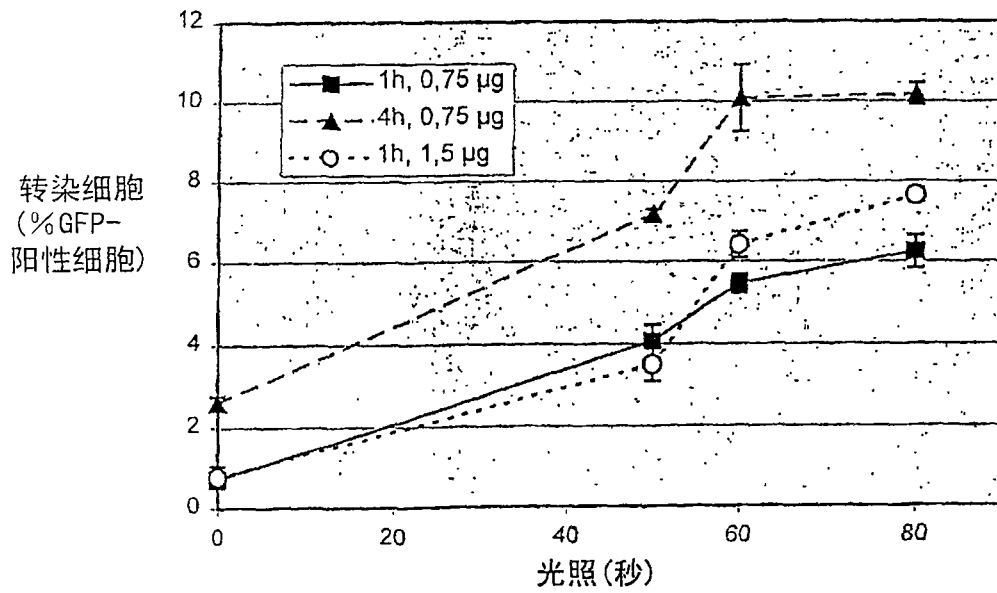


图 21

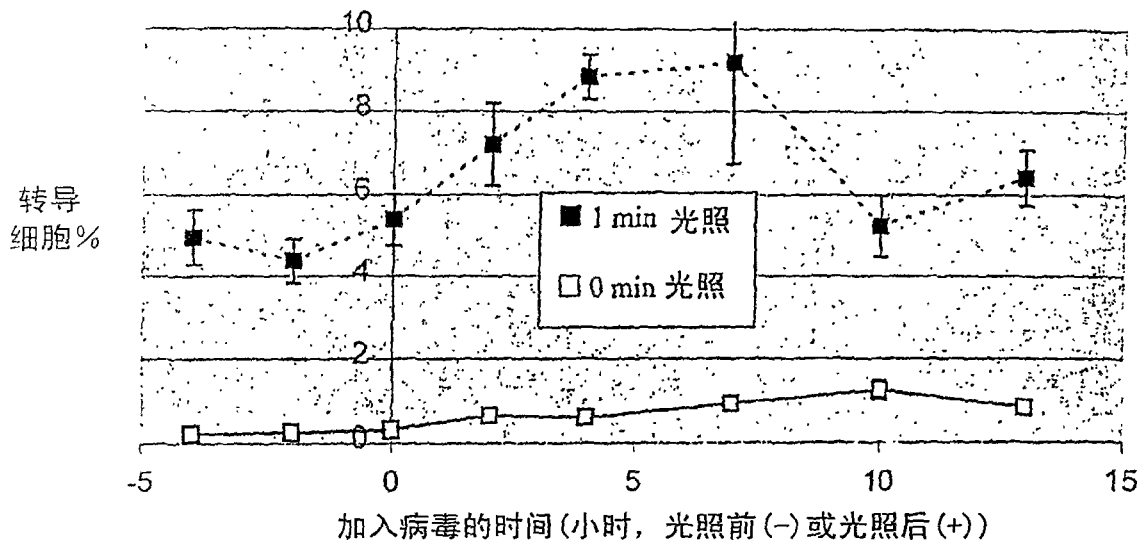


图 22

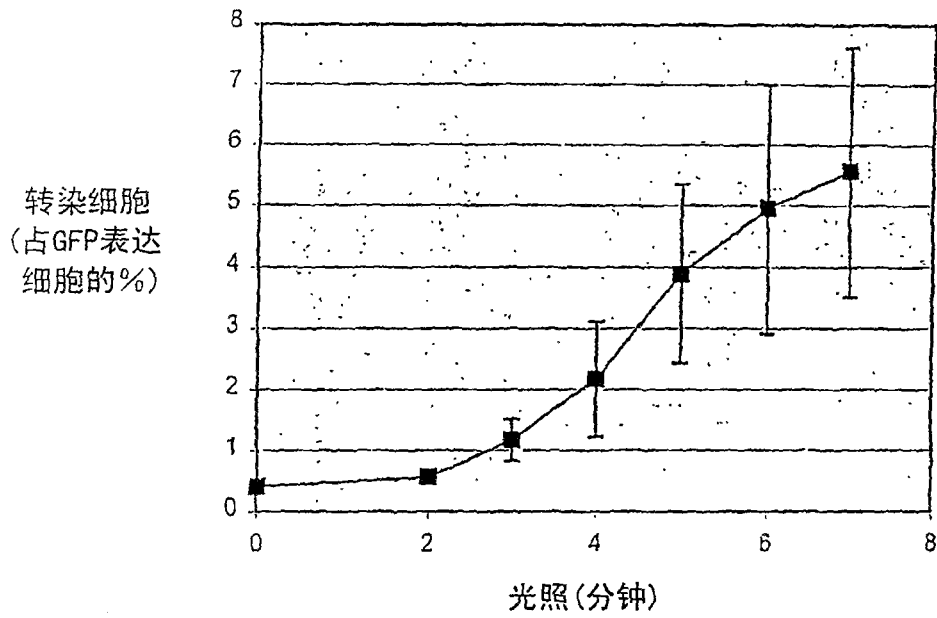


图 23

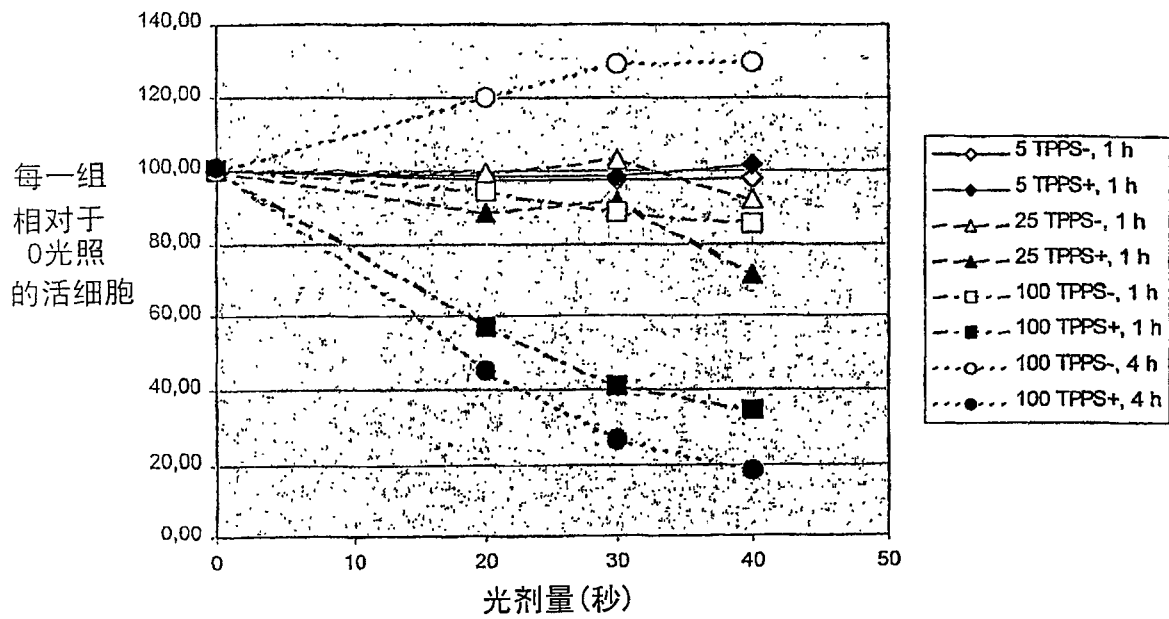


图 24

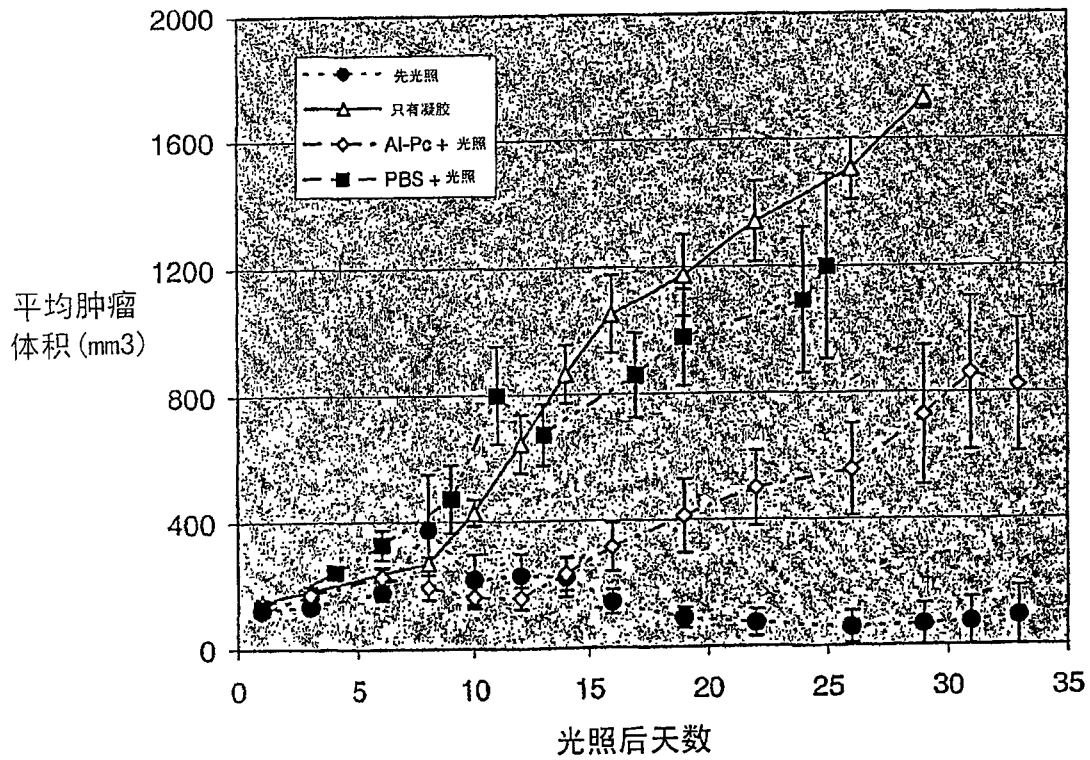


图 25