

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98810484.9

[45]授权公告日 2002 年 10 月 9 日

[11]授权公告号 CN 1092045C

[22]申请日 1998.4.30 [21]申请号 98810484.9
[30]优先权
[32]1997.4.30 [33]US [31]60/045,122
[86]国际申请 PCT/US98/08799 1998.4.30
[87]国际公布 WO98/48780 英 1998.11.5
[85]进入国家阶段日期 1999.10.25
[73]专利权人 美国家庭用品有限公司
地址 美国新泽西州
[72]发明人 R·B·西卡雷利 C·萨蒂什钱德拉
C·J·帕丘克
[56]参考文献
US5514788A 1996. 5. 7 C12N1500
审查员 张 伟

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 陈文青

权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图 0 页

[54]发明名称 泡状复合物及其制备和应用方法

[57]摘要

公开了包含层状泡囊的组合物,该层状泡囊包含局部麻醉药和核酸分子。公开了制备这种组合物的方法。公开了向个体的细胞递送蛋白质的方法。公开了在个体内诱导免疫应答的方法。公开了向个体的细胞递送核酸分子的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种组合物, 该组合物包含层状泡囊, 该层状泡囊包含局部麻醉药和核酸分子, 该局部麻醉药含有阳离子氮、疏水性基团, 其 pKa 为 7-9。
- 5 2. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中局部麻醉药与核酸之比为 0.01-2.5% w/v 的局部麻醉药比 1 μ g/ml-10mg/ml 核酸。
3. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中局部麻醉药与核酸之比为 0.05-1.25% w/v 的局部麻醉药比 100 μ g/ml-1mg/ml 核酸。
4. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中局部麻醉药与核酸之比为 0.1-0.5% w/v 的局部麻醉药比 500 μ g/ml-1500 μ g/ml 核酸。
- 10 5. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述层状泡囊的直径为 50-150nm。
6. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中超过 50% 的所述层状泡囊的直径大于 300nm。
7. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中超过 50% 的所述层状泡囊的直径小
- 15 于 400nm。
8. 根据权利要求 8 所述的组合物, 其中所述局部麻醉药是布比卡因。
9. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述核酸是 DNA。
10. 根据权利要求 9 所述的组合物, 其中所述核酸是质粒 DNA。
11. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述层状泡囊还包含一种或多种选
- 20 自阳离子型脂质、中性脂质、阴离子型脂质、阳离子型表面活性剂、中性表面活性剂、阴离子型表面活性剂、阳离子型洗涤剂、中性洗涤剂和阴离子型洗涤剂的化合物。
12. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述层状泡囊还包含一种或多种选自蛋白质、多肽、肽和非蛋白类化合物的化合物。
- 25 13. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述层状泡囊还包含一种免疫原性蛋白或肽。
14. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述层状泡囊还包含一种有生物活性的蛋白, 该蛋白选自细胞因子、共同刺激因子、转录因子、激素和生长因子。
15. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述层状泡囊还包含一种非蛋白类的化合物。
- 30 16. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述核酸是 DNA, DNA 包含的 DNA 序列编码了病原体抗原。

17. 根据权利要求 17 所述的组合物, 其中所述核酸是 DNA, 该 DNA 包含的 DNA 序列编码病毒抗原。

18. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述核酸是 DNA, 该 DNA 包含的 DNA 序列编码过度增殖疾病相关蛋白。

5 19. 根据权利要求 18 所述的组合物, 其中所述核酸是 DNA, 该 DNA 包含的 DNA 序列编码过度增殖疾病相关蛋白, 其中所述过度增殖疾病是癌。

20. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述核酸是 DNA, 该 DNA 包含的 DNA 序列编码自身免疫疾病相关蛋白。

21. 一种制备权利要求 1 所述的组合物的方法, 该方法包括下列步骤: 在
10 0-2M 盐存在下、在 pH 低于局部麻醉药 pKa 且 pH 为 4-8.5 下混合 0.01-2.5%w/v 局部麻醉药和 1 μ g/ml-10mg/ml 核酸, 形成层状泡囊, 其中所述局部麻醉药含有阳离子氮、疏水性基团, 其 pKa 为 7-9。

22. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中在 0-500mM 盐存在下、pH6-7.5 下混合 0.05-1.25%w/v 局部麻醉药和 100 μ g/ml-1mg/ml 核酸, 形成层状泡囊。

15 23. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中在 0-500mM 盐存在下、pH6-7.5 下混合 0.1-0.5%w/v 局部麻醉药和 500 μ g/ml-1500 μ g/ml 核酸, 形成层状泡囊。

24. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中在高于 2M 盐存在下、pH6-7.5 下混合 0.1-0.5%w/v 局部麻醉药和 500 μ g/ml-1500 μ g/ml 核酸, 然后除去盐使其低于 500mM, 形成层状泡囊。

20 25. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中层状泡囊还包含蛋白质、多肽、肽或非蛋白类药物/治疗性化合物, 层状泡囊这样来形成: 在高于 2M 盐存在下、pH6-7.5 下混合 0.1-0.5%w/v 局部麻醉药和 500 μ g/ml-1500 μ g/ml 核酸以及所述蛋白质、多肽、肽或非蛋白类药物/治疗性化合物, 然后除去盐使其低于 500mM。

26. 权利要求 1 所述的组合物在制备将所选蛋白输递给个体的药物中的应用, 其中所述组合物的层状泡囊中的核酸分子包含编码所述所选蛋白、与指导所述蛋白表达的调控序列操作性相连的核苷酸序列。

27. 权利要求 1 所述的组合物在制备将所选蛋白、多肽、肽和/或非蛋白类药物/治疗性化合物输递给个体的药物中的应用, 其中所述组合物的层状泡囊还包含所述蛋白质、多肽、肽、和/或非蛋白类药物/治疗性化合物。

30 28. 权利要求 1 所述的组合物在制备诱导个体对所选免疫原的免疫应答的药物中的应用, 其中所述组合物的层状泡囊包含编码所述所选免疫原、与指导所述免疫原在个体体内表达的调控序列操作性相连的核苷酸序列。

29. 根据权利要求 28 所述的应用, 其中所述层状泡囊还包含免疫原性蛋白或肽。

30. 根据权利要求 28 所述的应用, 其中所述层状泡囊还包含有生理活性的蛋白。

5 31. 权利要求 1 所述的组合物在制备将所选核酸分子输递给个体的药物中的应用, 其中所述组合物的层状泡囊包含具有选自下列的核酸序列的核酸分子: 反义寡核苷酸、核酶和形成三联体的核酸分子。

32. 一种药物组合物, 它包含权利要求 1 所述的组合物以及药学上可接受的载体或稀释剂。

10 33. 根据权利要求 32 所述的药物组合物, 其中所述药物组合物是可注射的药物组合物。

泡状复合物及其制备和应用方法

5

发明领域

本发明涉及包含局部麻醉药的分子复合物、含有该复合物的药物组合物及其制备和应用方法。

10

发明背景

局部麻醉药一个大类的化合物，它包括几类化合物。生理上有活性的天然或合成的化学物质或生物物质及其衍生物在体内或体外作用于细胞膜和/或细胞膜 shang huo 中的特异性受体分子。De-Paula, E 和 S. Schreier(1996) Braz. J. Med. Res. 29:877-894 以及 Ritchie, J.M.和 N.M. Greene 的“局部麻醉药”第 15 章 15 302-321，中描述了局部麻醉药，这两篇文献均描述了局部麻醉药及其用途，它们均被纳入本文作为参考。

另外，美国专利 No. 5,593,972(1997 年 1 月 14 日授予 Weiner 等人)和 PCT 申请 PCT/US94/00899 中描述了局部麻醉药与用于体内转基因的核酸分子的组合应用，这通常且特别用于保护性和治疗性接种方法以及基因治疗和反义方法，这两 20 篇文献均纳入本文作参考。本申请要求了 1997 年 4 月 30 日提交的美国临时申请 60/045,122 的优先权，该申请被纳入本文作参考。

发明概述

本发明涉及包含层状泡囊(lamellar vesicle)的组合物，该层状泡囊包含局部麻 25 醉药和核酸分子。在一些实例中，泡囊中的局部麻醉药与核酸的比例为 0.01-2.5%(重量/体积, w/v)局部麻醉药比 1 μ g/ml-10mg/ml 核酸。在一些实例中，泡囊中的局部麻醉药与核酸的比例为 0.05-1.25%(w/v)局部麻醉药比 100 μ g/ml-1mg/ml 核酸。在一些实例中，泡囊中的局部麻醉药与核酸的比例为 0.1-0.5%(w/v)局部麻 30 醉药比 500 μ g/ml-1500 μ g/ml 核酸。在一些实例中，层状泡囊的直径经扫描电子显微术测定达约 200nm。在一些实例中，层状泡囊的直径经扫描电镜测得为 50-150nm。在一些实例中，经扫描电镜测得，50%以上的所述泡囊的直径高于 300nm。在一些实例中，经扫描电镜测得，50%以上的所述泡囊的直径小于

400nm。在一些实例中，局部麻醉药是布比卡因、依替卡因、丁卡因、普鲁卡因酰胺、氯普鲁卡因、罗哌卡因、丙胺卡因、甲哌卡因、利多卡因、普鲁卡因、卡波卡因、甲基布比卡因或可卡因。在一些实例中，核酸是 DNA。在一些实例中，核酸是质粒 DNA。在一些实例中，层状泡囊还包含一种或多种选自阳离子脂质、中性脂质、阴离子脂质、阳离子型表面活性剂、中性表面活性剂、阴离子型表面活性剂、阳离子型洗涤剂、中性洗涤剂和阴离子型洗涤剂的化合物。在一些实例中，层状泡囊还包含一种或多种选自蛋白质、多肽、肽和非蛋白类药物/治疗性化合物的化合物。在一些实例中，核酸是包含编码免疫原的 DNA 序列的 DNA。

本发明还涉及制备包含层状泡囊的组合物的方法。该方法包括通过在存在 0-2M 盐、pH4-8.5 下混合 0.01-2.5%(w/v)局部麻醉药与 1 μ g/ml-10mg/ml 核酸来形成层状泡囊的步骤。在一些实例中，通过在 0-500mM 盐、pH6-7.5 下混合 0.05-1.25%(w/v)局部麻醉药和 100 μ g/ml-1mg/ml 核酸来形成层状泡囊。在一些实例中，通过在 0-500mM 盐、pH6-7.5 下混合 0.1-0.5%(w/v)局部麻醉药和 500 μ g/ml-1500 μ g/ml 核酸来形成层状泡囊。在一些实例中，通过在高于 2M 的盐、pH6-7.5 下混合 0.1-0.5%(w/v)局部麻醉药和 500 μ g/ml-1500 μ g/ml 核酸、然后除去盐使盐浓度低于 500mM 来形成层状泡囊。在一些实例中，蛋白、多肽、肽或非蛋白类药物/治疗性化合物也可与局部麻醉药及核酸混合，以产生包括蛋白、多肽、肽或非蛋白类药物/治疗性化合物的层状泡囊。

本发明还涉及一种将蛋白(包括多肽和肽)输送给个体的细胞的方法。该方法包括下列步骤：给予该个体一种组合物，该组合物包含含有局部麻醉药和核酸分子的层状泡囊。层状泡囊包含核酸分子，该核酸分子包含的核苷酸序列编码了与调控序列操作性相连的蛋白。核酸分子被个体的细胞摄取并表达产生蛋白。

本发明还涉及向个体的细胞输递蛋白、多肽、肽、非蛋白类药物/治疗性化合物、完整的病毒颗粒或其片段或微生物的方法。该方法包括下列步骤：给予个体一种组合物，该组合物包含的层状泡囊含有局部麻醉药、核酸分子以及蛋白、多肽、肽、或非蛋白类药物/治疗性化合物。

本发明还涉及一种在个体内诱导免疫应答的方法。该方法包括下列步骤：给予个体一种组合物，该组合物包含的层状泡囊含有局部麻醉药和核酸分子。层状泡囊所含核酸分子含有编码免疫原、与调控序列操作性相连的核苷酸序列。核酸被个体的细胞摄取，表达产生该免疫原，个体对该免疫原产生免疫应答。在一些实例中，层状泡囊还包含一种免疫原性蛋白或肽。在一些实例中，层状泡囊还包含一种有生理活性的蛋白。

本发明还涉及向个体的细胞递送核酸分子的方法。该方法包括下列步骤：给予个体一种组合物，该组合物包含的层状泡囊含有局部麻醉药和核酸分子。层状泡囊含有的核酸分子包括：编码所述蛋白、与调控序列操作性相连的核苷酸序列，反义寡核苷酸、核酶或形成三联体的核酸分子。

5

发明详述

本发明提供包含局部麻醉药和核酸分子的层状泡囊。该层状泡囊是局部麻醉药和核酸分子在特定化学条件下按特定比例混合时自发形成的。泡囊可包括已知用于其膜形成性质的其它化合物，如脂质、表面活性剂和洗涤剂。而且，其它化

10 合物如蛋白质、多肽、肽或非蛋白类药物/治疗性化合物可包封在泡囊内。

本发明的层状泡囊可用来在体外和体内向细胞输递物质。这些物质包括核酸分子以及蛋白质、多肽、肽、和非蛋白类药物/治疗性化合物。根据一些实例，本发明提供了向个体的细胞输递核酸和/或蛋白质、多肽、肽、和/或非蛋白类药物/治疗性化合物的方法。

15 根据一些实例，本发明提供了向个体的细胞递送编码蛋白的核酸分子的方法，其中该核酸分子中编码该蛋白的核酸序列被表达，以便将该蛋白体内输递到这些细胞中。

根据一些实例，本发明提供了向个体的细胞递送编码免疫原性蛋白的核酸分子的方法，其中该核酸分子中编码该免疫原性蛋白的核酸序列被表达，以便将免疫原性蛋白输递到这些细胞，其中个体体内诱导产生抵抗该免疫原性蛋白的免疫应答。在一些实例中，核酸分子还编码了免疫调节蛋白，其中编码该免疫调节蛋白的核酸序列被表达，以便将免疫调节蛋白递送给个体，并影响、增强或调节所诱导的针对免疫原性蛋白的免疫应答。在一些实例中，层状泡囊还包含一种或多种免疫调节蛋白、多肽、肽、或非蛋白类药物/治疗性化合物，以便将免疫调节蛋白、多肽、肽或非蛋白类药物/治疗性化合物输递给个体，从而影响、增强或调节所诱导的针对免疫原性蛋白的免疫应答。在一些实例中，层状泡囊还包含一种或多种免疫原性蛋白和/或肽，以便将免疫原性蛋白或肽输递给个体，以提供附加的靶，针对该靶可诱导出免疫应答。在一些实例中，免疫原性蛋白或肽与核酸分子编码的免疫原性蛋白相同或相关。

20

25

30 根据一些实例，本发明提供了向个体的细胞递送核酸分子的方法，该核酸分子可编码非免疫原性的在治疗上有效的蛋白，其中核酸分子中编码非免疫原性、在治疗上有效的蛋白的核酸序列被表达，以便向这些细胞输递非免疫原性、在治

疗上有效的蛋白，其中该非免疫原性、在治疗上有效的蛋白在个体内提供了所需的生理效应。在一些实例中，核酸分子编码了上述免疫调节蛋白。在一些实例中，层状泡囊还包含了一种或多种蛋白、多肽、肽、或非蛋白类药物/治疗性化合物，以便与核酸分子上核酸序列所编码的蛋白的输递相结合将蛋白、多肽、肽或非蛋白类药物/治疗性化合物输送给个体。

根据一些实例，本发明提供了输递核酸分子的方法，该核酸分子是反义、核酶或形成三联体的核酸分子。

根据一些实例，本发明提供了向个体的细胞递送蛋白、多肽、肽、和/或非蛋白类药物/治疗性化合物的方法，其中层状泡囊用作一种载体/运载体，以促进这些蛋白、多肽、肽、和/或非蛋白类药物/治疗性化合物的输递并保护它们在输递过程中免受降解。

根据本发明，用包含局部麻醉药和核酸分子的泡囊组合物对局部麻醉药在转基因方法中的应用(如美国专利 No. 5,593,972 和 PCT/US94/00899 中描述的那些)加以改进。当局部麻醉药和核酸分子在有利于形成泡囊结构的条件下混合时，会形成泡囊组合物。泡囊组合物提供了改进的基因转移方法，因此改善了免疫接种、基因治疗和反义和核酶给药的方法。而且，泡囊可用于并适合于同时输递蛋白、多肽、肽和/或非蛋白类药物/治疗性化合物以及编码待转移基因的核酸分子。或者，核酸分子可以只用作载体核酸分子，即核酸分子不被转录或翻译，以形成包封蛋白、多肽、肽和/或非蛋白类药物/治疗性化合物的泡囊，该泡囊可作为这些物质的改进的输递载体。因此，根据本发明还可制备包含局部麻醉药、核酸分子以及其它类型的治疗性或免疫原性物质(如药物、激素和免疫原)的泡囊组合物。

局部麻醉药是高度亲脂性/疏水性分子，它们在分子的一端通常(但不总是)含有叔氮原子，它能携带正电荷作为质子化的物质。这在等于或低于氮的 pK_a (对于大多数局部麻醉药来说 pK_a 通常在 7-9 的范围内)的水溶液中发生。因此，局部麻醉药具有这样的性能，它可作为中性物质(高于 pK_a)而有非常高的疏水性，而在等于或低于 pK_a 下时是电荷极化的(即有一个带正电荷末端和一个疏水端)。本文所用的术语“局部麻醉药”指可用来制备本发明的层状泡囊的那些局部麻醉药。因此，本文所用的术语“局部麻醉药”指含有带阳离子氮、 pK_a 约为 7-9、与 DNA 结合并含有疏水性基团的那些局部麻醉药。

局部麻醉药通常含有内部酰胺键(酰胺类局部麻醉药)或内部酯键(酯类局部麻醉药)。酰胺类局部麻醉药的例子包括布比卡因、利多卡因和依替卡因；酯类局

部麻醉药包括普鲁卡因和丁卡因。苯佐卡因是不具有叔氮原子末端的一例酯类局部麻醉药。在 PCT/US94/00899; De-Paula, E.和 S.Schreier,同上; Ritchie, J.M.和 N.M. Greene, 同上; 和 Strichartz 等人(1990), *Anesth. Analg.*, 71:158-170 中提到了局部麻醉药结构的例子, 这些文献均纳入本文作参考。

5 局部麻醉药具有作为中性或带电荷物质从水溶液分配入有机相中的性能 (Strichartz 等人, 同上和 Schlieper P.和 Steiner, R.(1983) "脂质的化学和物理学" 34:81-92, 这些文献均纳入本文作参考)。布比卡因是能以带电荷及中性物质分配到正辛醇中的一例局部麻醉药。已经报道, 局部麻醉药可分配到脂质、脂质混合物以及脂质体中。

10 在体内, 酰胺类局部麻醉药具有更长的生物半衰期, 因为它们不会象酯类局部麻醉药那样在血液内迅速降解, 并且通常会与血清蛋白(尤其是 α -1-糖蛋白)缔合, 产生贮存效应。酰胺类局部麻醉药由肝脏缓慢降解。酯类局部麻醉药在血液或组织中被血清酯酶迅速降解。

在低于酰胺 pKa 的 pH 下(例如在生理 pH 下), 局部麻醉药带阳离子电荷的末端与核酸分子上的阴离子基团结合。在这些条件下, 局部麻醉药-核酸复合物变得更具电荷中性、疏水性和亲脂性, 并且能分配进入/通过细胞脂质膜, 将核酸输送给细胞。已经显示局部麻醉药具有更高的脂质分配系数作为中性种类。

15 本发明一些实例的层状泡囊包含一种或多种局部麻醉药, 它们选自布比卡因、依替卡因、丁卡因、普鲁卡因酰胺、氯普鲁卡因、罗哌卡因、丙胺卡因、甲哌卡因、利多卡因、普鲁卡因、卡波卡因、甲基布比卡因和可卡因。在一些实例中, 层状泡囊包含一种局部麻醉药, 包括外消旋混合物及其纯的异构体。在一些实例中, 层状泡囊包含两种或多种不同种类的局部麻醉药。

在本发明的一些较佳的实例中, 一种或多种不同的阳离子型疏水性局部麻醉药通过与核酸分子复合形成了泡囊结构。一种或数种局部麻醉药形成的泡囊膜可能包括“辅助剂(co-agent)”脂肪、洗涤剂 and/或表面活性剂两亲性分子。在一些实例中, 泡囊可进一步包裹与形成泡囊复合物的化合物结合的“其它制剂”或“活性剂”, 这些其它活性剂包括蛋白质、多肽、肽、或非蛋白类药物/治疗性化合物。由于阳离子型两亲性局部麻醉药的高度无极性特征, 当局部麻醉药与核酸分子结合时, 它能单独或与其它化合物(如脂质、两亲性物质、亲脂性/疏水性化合物、
25 表面活性剂、洗涤剂 and/或脂溶性维生素如维生素 A、D 和 K(本文称为“辅助剂”))混合形成自身装配的结构(包括薄层和泡囊)。Radler, J.O.等人 1997 年在 *Science* 275,810-814(该文纳入本文作参考)中讨论了脂质自装配结构。这些结构可通过强

烈的分子内疏水堆积型相互作用(例如芳族基团之间的相互作用)来进一步稳定化。在本发明的一些实例中,局部麻醉药和一种或多种脂质、两亲性物质、亲脂性/疏水性化合物、表面活性剂、和/或洗涤剂、尤其是阳离子型或中性脂质、阳离子型或中性两亲性物质、阳离子型或中性亲脂性/疏水性化合物、阳离子型或中性表面活性剂、和/或阳离子型或中性洗涤剂一起使用,以形成包括核酸分子的层状泡囊。

由于阳离子型局部麻醉药种类的无极性特征,用局部麻醉药的和辅助剂的混合物来形成结合核酸分子的较大的自装配结构,使单种或数种局部麻醉药的混合物与阳离子型、中性或阴离子型脂质以及核酸分子混合,以形成类似于脂质体的结构。泡囊可用多种局部麻醉药与一种或多种化合物的混合来形成,这些化合物选自阳离子型、中性或阴离子型脂质;阳离子型、中性或阴离子型两亲性物质;阳离子型、中性或阴离子型亲脂性/疏水性化合物;阳离子型、中性或阴离子型表面活性剂;和/或阳离子型、中性或阴离子型洗涤剂。在一个实例中,一种阳离子型局部麻醉药(如布比卡因)与一种不同的阳离子型两亲性物质(如合成的化合物如 DOTMA)组合;或与一种中性的合成化合物(如 DOPE)和/或中性脂质(如胆固醇)混合。在另一个实例中,一种阳离子型局部麻醉药与阴离子型和/或中性脂质混合。

本发明的层状泡囊可用来包封活性剂以便输递至组织和细胞。治疗性和/或免疫原性和/或显影剂(在本文称为“活性剂”)(包括蛋白类和非蛋白类化合物)可以与这些薄层结构缔合或包封到这些结构中,以便在体外或体内输送至组织和细胞。活性剂分子包括治疗性和/或免疫原性蛋白质、多肽和肽以及非蛋白类药物/治疗性化合物。其它分子也可与这些结构缔合,以减少它们的免疫原性(如 PEG 的免疫原性)、改进它们与细胞融合的能力或在细胞摄取后破坏细胞内的核内体(融合的脂质、肽、聚合物)。

在本发明的一些实例中,核酸分子可以是质粒 DNA 基因构建物,它是编码免疫原或编码有生物活性的、治疗上需要的蛋白质的 DNA 疫苗或基因治疗构建物,其中编码序列与序列在给予泡囊复合物的个体内细胞中表达所需的调控元件操作性相连(即 DNA 可操作性编码待表达的蛋白)。DNA 构建物在美国专利 No. 5,593,972(1997 年 1 月 14 日授予 Weiner 等人)和 PCT 申请 PCT/US94/00899 中有所描述。重要的是,如果编码序列有待转录和翻译,则它必须与能在 DNA 分子所递送的细胞内起作用的调控元件操作性相连。

本发明的一些方面涉及将遗传物质导入个体的细胞内以便诱导出针对该遗

遗传物质编码的蛋白质或肽的免疫应答的方法。该方法包括下列步骤：将层状泡囊给予所述个体的组织，该层状泡囊包括局部麻醉药以及一种核酸分子，该核酸分子包含编码一种或多种所需肽或蛋白(包括至少一种免疫原性肽或蛋白)的核苷酸序列。另外，在一些实例中，提供了这样一种核酸分子，它包含编码一种或多种免疫调节蛋白的核苷酸序列。核酸分子可以质粒 DNA 的形式提供。在一些实例中，层状泡囊进一步还包含一种或多种免疫调节蛋白、多肽、肽或非蛋白类药物/治疗性化合物和/或一种或多种免疫原性蛋白或肽。

根据本发明的一些方面，提供了预防性和/或治疗性免疫个体以抗变应原、致病原或异常的疾病相关细胞的组合物和方法。遗传物质编码的免疫原可在个体内诱导出抗变应原、病原或异常细胞的免疫应答。

遗传物质由个体的细胞表达，并作为免疫原性靶引发针对其的免疫应答。产生的免疫应答是非常广泛的：除了体液免疫应答外，还引发了两种细胞免疫应答。本发明的方法可用来提供预防性和治疗性免疫力。因此，免疫接种方法包括两种方法：针对免疫原的免疫接种从而(例如)保护个体免受病原攻击，或阻止特异性细胞产生或增殖的方法；以及治疗患有病原感染、过度增殖疾病或自身免疫疾病的个体的方法。

本文所用的术语“免疫原”和“靶蛋白”指本发明中的基因构建物所编码的、作为免疫应答的靶蛋白的肽和蛋白。术语“靶蛋白”和“免疫原”可以互换使用，指可以引发针对该蛋白的免疫应答的蛋白。靶蛋白是一种免疫原性蛋白，它具有来自病原体或不希望的细胞类型(例如癌细胞或涉及自身免疫疾病的需要对其免疫的细胞)的变应原或蛋白的至少一个表位。针对靶蛋白的免疫应答将保护个体并抵御治疗个体的特异性感染或与靶蛋白有关的疾病。

本发明可用来引发针对靶蛋白(即与病原体、变应原或个体自身的“异常”细胞特异性相关的蛋白)的广泛的免疫应答。本发明可用来免疫个体抵抗病原性因子和生物体，这样，针对病原体蛋白的免疫应答反应就提供了抵抗病原体的免疫力。通过引发针对与过度增殖细胞特异性相关的靶蛋白的免疫应答，本发明可用来抵抗过度增殖疾病和失调(如癌症)。通过引发针对与涉及自身免疫疾病的细胞特异性相关的靶蛋白的免疫应答，本发明可用来抵抗自身免疫疾病和失调。

本发明的一些方面涉及将遗传物质导入个体的细胞内、以便将该遗传物质编码的非免疫原性蛋白和肽输递至个体中的方法。该方法包括下列步骤：将层状泡囊给予所述个体的组织，该层状泡囊包含局部麻醉药以及一种核酸分子，该核酸分子包含的核苷酸序列编码了一种或多种所需的无免疫原性、有生物活性的肽、

多肽或蛋白(对个体有非免疫原性的生理效应)。本文所用的术语“有生理活性的蛋白”指有生物活性的肽、多肽或蛋白,它们对于个体有非免疫原性的生理效应。在一些实例中,提供的核酸分子所包含的核苷酸序列编码了选自下列的一种或多种蛋白:细胞因子、凝血因子、趋化因子、共同刺激因子、转录因子、激素、生长因子和替换基因。细胞因子的例子包括 IL-12、GM-CSF 和促红细胞生成素。凝血因子的例子包括因子 XIII 和因子 IX。替换基因的例子包括肌营养不良蛋白(用来治疗肌肉营养不良)和 CFPR(用来治疗囊性纤维化)。激素的例子包括 leptin。核酸分子可以质粒 DNA 形式提供。在一些实例中,层状泡囊还包含一种或多种蛋白、多肽、肽或非蛋白类药物/治疗性化合物。

10 根据本发明,将编码免疫原或有生理活性的蛋白的 DNA 或 RNA 导入个体的组织细胞内在其中表达,从而产生了免疫原或有生理活性的蛋白。编码免疫原或有生理活性的蛋白的 DNA 或 RNA 序列与其在个体细胞内表达所需的调控元件相连接。DNA 表达的调控元件包括启动子和聚腺苷酸化信号。另外,基因构建物中还可包含其它元件,如 Kozak 区。

15 本文所用的术语“基因构建物”指 DNA 或 RNA 分子,其包含的核苷酸序列编码了免疫原或有生理活性的蛋白,并且还包括与调控元件操作性相连的启动和终止信号(包括能指导在个体细胞内表达的启动子和聚腺苷酸化信号)。在一些实例中,在递送给个体的相同核酸分子上发现了编码一种或多种免疫原和/或一种或多种有生理活性的蛋白的可表达形式的序列。在一些实例中,层状泡囊包括两种或多种不同的核酸分子,它包括编码一种或多种不同免疫原和/或一种或多种不同的有生理活性的、待输递给个体的蛋白的可表达形式的序列。

本文所用的术语“可表达形式”指含有所需调控元件的基因构建物,该调控元件与编码免疫原或有生理活性的蛋白的序列操作性相连,这样当其存在于个体的细胞中时,该编码序列会表达。

25 基因构建物可包含编码免疫原或有生理活性的蛋白的核苷酸序列,该序列与基因表达所需的调控元件操作性相连。当其被细胞摄取时,基因构建物可保留在细胞内作为功能性的染色体外分子和/或整合到细胞染色体 DNA 内。DNA 可导入细胞中,并在其中以—一个或数个质粒的形式保留,成为分离的遗传物质。另外,可将能整合入染色体中的线性 DNA 导入细胞内。当将 DNA 导入细胞内时,可能要加入促进 DNA 整合到染色体上的试剂。DNA 分子中也可包括用来促进整合的 DNA 序列。另外,可将 RNA 给予细胞。还可考虑提供基因构建物作为包括着丝点、端粒和复制起点的线性微型染色体。基因构建物可保留减毒活微生物或生长

在细胞内的重组微生物载体的一部分遗传物质。基因构建物可以是重组病毒疫苗的基因组的一部分，其中遗传物质或整合到细胞染色体中或保留在染色体外。

5 基因构建物包括核酸分子基因表达所需的调控元件。这些元件包括：启动子、起始密码子、终止密码子和聚腺苷酸化信号。另外，编码靶蛋白或免疫调节蛋白的序列的基因表达通常还需要增强子。这些元件必需和编码所需蛋白的序列操作性相连，且调控元件在所给予的个体中可以操作。

起始密码子和终止密码子通常被认为是编码所需蛋白的核苷酸序列的一部分。然而，这些元件需在给予基因构建物的个体内有功能。起始密码子和终止密码子必需位于编码序列的读框中。

10 所用的启动子和聚腺苷酸化信号必须在个体的细胞内有功能。

用来实施本发明、尤其是用来生产人用基因疫苗的启动子例子包括(但不局限于)：人启动子、病毒启动子(如来自疱疹病毒、痘病毒、乳头瘤、细小病毒或肝炎病毒)、来自猿病毒 40(SV40)的启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)(如 HIV 长末端重复序列)启动子、Moloney 病毒、ALV、巨细胞病毒(CMV)如 CMV 立即早期启动子、EB 病毒(EBV)、Rous 肉瘤病毒(RSV)以及人基因(如人延伸因子 1A、人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌酸和人金属硫蛋白)的启动子。

20 用来实施本发明、尤其是用来生产人用基因疫苗的聚腺苷酸化信号的例子包括(但不局限于)牛生长激素聚腺苷酸化信号、SV40 聚腺苷酸化信号和 LTR 聚腺苷酸化信号。特别是，采用在 pCEP4 质粒(Invitrogen, San Diego CA)中的 SV40 聚腺苷酸化信号(称为 SV40 聚腺苷酸化信号)。

除了 DNA 表达所需的调控元件外，DNA 分子中还可包括其它元件。这些附加的元件包括来自 Mason-Pfizer 猴病毒的组成型转运元件和/或增强。增强子可选自(但不局限于)：人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌酸和病毒增强子如来自 CMV、RSV 和 EBV 的增强子。

为了使蛋白生产最大化，可以选择非常适合基因在给予了构建物的细胞中表达的调控序列。而且，可以选择在细胞中最有效地转录的密码子。本领域技术人员能制得在细胞中起作用的 DNA 构建物。

30 本发明可用来对个体进行免疫以抵抗所有的病原体如病毒、原核和致病真核生物(如单细胞病原生物和多细胞寄生虫)。本发明特别适用于免疫个体以抵抗感染细胞的那些病原体(如病毒、原核生物如淋病菌属、李斯特菌属和志贺氏菌属)。另外，本发明还可用来免疫个体以抵抗原生动物病原体，它们在生命周期内有一

个阶段是细胞内病原体。本文所用的术语“胞内病原体”指在其至少复制部分或生命周期中存在于宿主细胞内并在其中产生或导致产生病原体蛋白的病毒或病原性生物。表 1 提供了根据本发明可以制备疫苗的一些病毒家族和病毒属的清单。以下 DNA 构建物可用于疫苗：该 DNA 构建物包含的 DNA 序列所编码的肽包含至少一个与病原体抗原(例如表 1 中列出的那些抗原)上显示的相同或基本相似的表位。而且，本发明还可用来免疫个体以抵抗其它病原体(包括原核和真核原生动物病原体以及多细胞寄生虫(例如表 2 所列出的那些))。

为了产生基因疫苗以抵抗病原体感染，基因构建物中必须包括编码免疫原性蛋白(针对该蛋白可以产生保护性免疫应答)的遗传物质作为靶的编码序列。无论病原体在细胞内(本发明对此是特别有用的)还是在细胞外感染，不可能所有的病原体抗原都能引发保护性应答。本发明允许用多种病原体抗原进行接种。用于基因疫苗的基因构建物可包括编码许多病原体抗原的遗传物质。例如，一个构建物中可包括几种病毒基因，以提供多个靶。或者，含有一种或多种病原体基因的多个构建物可包括在不同的 DNA 分子上，然后组合 DNA 分子用于制备泡囊复合物。这些泡囊含有两种或多种不同的 DNA 分子，在一个泡囊结构中可以有不同的基因构建物。

表 1 和 2 包括一些病原性因子以及病原生物体的清单，它们可用来制备基因疫苗以保护个体免受它们的感染。在一些较佳的实例中，免疫个体抵抗病原体的方法针对的是人免疫缺陷病毒 HIV、人 T 细胞白血病病毒 HTLV、流感病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人乳头瘤病毒 HPV、单纯疱疹病毒 1 型 HSV1、单纯疱疹病毒 2 型 HSV2、巨细胞病毒 CMV、EB 病毒 EBR、鼻病毒、冠状病毒、轮状病毒和呼吸道合胞病毒。

本发明的另一方面提供了赋予广泛的保护性免疫应答以抵抗过度增殖细胞(是过度增殖疾病中特征性的)的方法，以及治疗患有过度增殖疾病的个体的方法。本文所用的术语“过度增殖疾病”指特征为细胞过度增殖的那些疾病和紊乱。过度增殖疾病的例子包括所有形式的癌，如淋巴瘤或黑色素瘤和牛皮癣。

已经发现，将包括核酸序列(该序列编码免疫原性的与“过度增殖的”细胞相关的蛋白)的基因构建物导入个体的细胞内会导致在个体被接种细胞内产生那些蛋白。本文所用的术语“过度增殖相关的蛋白”指与过度增殖疾病有关的蛋白。为了免疫抵抗过度增殖疾病，将一基因构建物给予个体，该构建物包括的核苷酸序列所编码的蛋白与过度增殖疾病有关。

尽管本发明可用来免疫个体以抵抗一种或多种数种形式的癌症，但是本发明

特别适用于对易发生特定癌症或已患过癌症因而易复发的个体进行预防性免疫。遗传学和技术以及流行病学的发展使得能够对个体内发生癌症进行可能性和危险性评价测定。利用基因筛查和/或家族健康史，就可能对特定个体产生数种癌症中任何一种的可能性的进行预测。

- 5 同样，已经产生癌症和已经治疗除去癌症或癌症正在缓解的那些个体特别容易复发和重新发生。作为治疗方案的一部分，可对已经诊断出患有癌症的这些个体进行抗癌症免疫，以战胜复发。因此，一旦知道某个体曾患一种癌并有复发的危险，就可对他们免疫以使它们的免疫系统作好准备以防止癌症再出现。

- 10 本发明提供了治疗患过度增殖疾病的个体的方法。在这些方法中，导入基因构建物作为免疫治疗剂，指导并促进个体的免疫系统抵抗产生靶蛋白的过度增殖细胞。

本发明提供了治疗患自身免疫疾病和紊乱的个体的方法，该方法是赋予广泛的保护性免疫应答以抵抗与自身免疫力有关的靶（包括细胞受体和产生“自身”靶向抗体的细胞）。

- 15 T 细胞介导的自身免疫疾病包括类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、Sjogren's 综合征、肉样瘤病、胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、自身免疫甲状腺炎、反应性关节炎、强直性脊柱炎、硬皮病、多肌炎、皮肌炎、牛皮癣、脉管炎、Wegener's 肉芽肿病、Crohn's 疾病和溃疡性结肠炎。这些疾病每一种的特征均是 T 细胞受体与内源性抗原结合，并引发了与自身免疫疾病有关的炎性级联反应。
- 20 针对 T 细胞可变区的接种会引发包括 CTL 的免疫应答从而清除那些 T 细胞。为了治疗患 T 细胞介导的自身免疫疾病(尤其是 TCR 的可变区还未经特性分析的那些)的患者，可以进行滑液活检。可以取出存在 T 细胞的样品并用标准技术鉴定那些 TCR 的可变区。用该信息可制备基因疫苗。

- 25 B 细胞介导的自身免疫疾病包括狼疮(SLE)、Grave's 疾病、重症肌无力、自身免疫溶血性贫血、自身免疫血小板减少、哮喘、冷球蛋白血症、原发性胆硬化和恶性贫血。这些疾病每一个的特征均为抗体与内源性抗原结合并启动了与自身免疫疾病有关的炎性级联反应。针对抗体可变区的接种会引发包括 CTL 的免疫应答反应，从而消除产生这些抗体的那些 B 细胞。为了治疗患 B 细胞介导的自身免疫疾病的患者，必须鉴定涉及自身免疫活性的那些抗体的可变区。可以进行活检
- 30 并取出发炎部位存在的抗体样品。那些抗体的可变区可用标准技术来鉴定。用此信息可以制得基因疫苗。

根据一些较佳的实例，泡囊是疫苗制剂，DNA 是操作性编码免疫原的质粒

DNA，可以诱导出针对该免疫原的抗病原体免疫应答。较佳实例包括的质粒编码了诱导抗表 1 和 2 所列出的病原体的免疫应答反应的免疫原。根据一些较佳的实例，免疫原是病原体抗原。在一些实例中，泡囊中可包括免疫调节蛋白，和/或由质粒编码免疫调节蛋白。在一些较佳的实例中，泡囊中可包括免疫原性蛋白和肽，特别是与质粒编码的免疫原有关的那些蛋白和肽。

根据一些较佳的实例，质粒是可操作编码有治疗活性的蛋白(如免疫调节蛋白)或有生理活性的蛋白的质粒 DNA，将此 DNA 输递至个体会导致这些蛋白表达，并在个体内有活性。

在本发明的一个实例中，核酸分子可以是用来形成泡囊复合物的载体 DNA，以携带其它活性剂，但不编码在给予泡囊复合物的个体的细胞中表达的蛋白。载体 DNA 的例子包括质粒 DNA、鲑精 DNA、人 DNA、细菌 DNA 和噬菌体 DNA。在本发明的一些实例中，核酸分子可以是 RNA。

在本发明的一些实例中，其它活性剂可以是蛋白多肽、肽、RNA 或其它非蛋白类分子如治疗性化合物/药物。蛋白的例子包括作为所需免疫应答反应靶的抗原/免疫原、细胞因子(如 IL-2)、GM-CSF、共同刺激因子、趋化因子(如 MCP-1 和 RANTES)、转录因子、聚合酶、激素和生长因子。RNA 的例子包括反义 RNA、核酶和形成三联体的 RNA。蛋白、多肽和肽的例子包括作为所需免疫应答反应靶子的抗原/免疫原性蛋白、多肽和肽，以及有生物活性的肽如促生长素抑制素(somatostatin)和 IGF-1。非蛋白类分子(例如治疗性化合物/药物)的例子包括：抗肿瘤化合物如三苯氧胺、阿霉素、紫衫醇、顺-铂(platin)；抗病毒化合物如 ddI 和 ddA、抗炎化合物如 NSAID 和类固醇；抗生素化合物如抗真菌和抗细菌化合物，以及降低胆固醇的药物。

局部麻醉药/核酸复合物由局部麻醉药产生了层状结构。核酸分子与局部麻醉药的亲水性部分相互作用，而其亲脂性部分形成一个膜结构。复合物在特定的条件下形成，这些条件包括局部麻醉药与核酸的特定摩尔比、特定的盐浓度以及特定 pH。另外，取决于加工的步骤，不同大小的泡囊会产生不同的巨大分子结构。

关于 pH，pH 应高于局部麻醉药的 pKa 以确保胺基带正电荷。在较佳的实例中，pH 为 4-8.5，更佳的为 6-7.5。

关于盐浓度，盐浓度应足够低，以允许局部麻醉药的正电荷与核酸磷酸基团的负电荷复合。在一些实例中，局部麻醉药/核酸泡囊配方的盐浓度在形成复合物后有所增加。在较佳的实例中，盐浓度为 0-2M，更佳的为 0-500mM。

给药途径包括肠胃外以及外用或粘膜途径。在一些实例中，泡囊通过肌内、

静脉内、动脉内、肿瘤内、真皮内、皮下、经皮肤、腹膜内、外用、鼻内、口服(包括肠衣保护的口服输药)、吸入、或外用或灌洗粘膜组织(选自阴道、直肠、尿道、颊和舌下)来给药。本发明的组合物的给药装置包括(但不限于)传统的注射器、无针注射装置或“微粒(miroparticle)轰击基因枪”。微粒轰击过程由 Sanford 等人在美国专利 4,945,050(1990 年 7 月 31 日授权)中有所描述, 该专利纳入本文作参考, 可对其作改进用于将本发明的组合物给予个体。

本文所用的术语“药物组合物”和“可注射药物组合物”指具有通常的、完全了解和接受的含义, 这些含义是本领域普通技术人员所完全认同的。作为药物组合物给予患者的组合物通常是无菌的无热原的组合物。适用于注射的药物组合物(即可注射的药物组合物)是无菌、无热原的, 基本上没有外来物质并且调节到适宜的等渗性和 pH, 能安全有效地注射到个体内。

关于局部麻醉药/核酸之比, 颗粒复合物的大小取决于比例。因此, 通过调节局部麻醉药/核酸之比可以确定颗粒大小。根据转基因所靶向的细胞类型, 可能希望有不同的颗粒大小。

局部麻醉药/核酸泡囊的大小或高级结构可由几个因素来控制, 它们包括: 如果使用长链脂肪酸类脂质, 脂质和局部麻醉药组分的疏水链的长度, 以及局部麻醉药与脂质相互的确切比例。另外, 对用于输递核酸的泡囊来说, 局部麻醉药的浓度或局部麻醉药以及阳离子型脂质的浓度与核酸的浓度之比对于颗粒的大小和结构是很重要的。改变颗粒大小(直径从 10nm 变为 100 μ m, 通过扫描电镜测得)将导致不同的组织分布和分布动力学, 这也可能会受颗粒注射或输递的方式/方法影响。例如, 直径为 50-200nm(经扫描电镜测得)的颗粒静脉内注射可能会被肝细胞优先摄取。0.1-10 μ m 的颗粒静脉内、肌内、皮下或真皮内注射可能会被吞噬细胞(如 Kupfer 细胞)和/或免疫系统细胞(如不同类型的树突细胞, 包括 Langerhahn 细胞和巨噬细胞)优先摄取。不同大小(直径为 50nm-100 μ m, 经扫描电子显微术测得)的颗粒可通过经皮肤输送技术、或通过局部施用于皮肤或粘膜表面、或通过单独口服或其它片剂、胶囊等中的其它组分联合被吸收。

在一些较佳的实例中, 局部麻醉药提供以最终浓度为 0.01-2.5%(w/v), 更佳的为 0.05-1.25%(w/v)。在一些较佳的实例中, 最终浓度为 0.25%(w/v)。

在一些较佳的实例中, 核酸提供以最终浓度为 1 μ g/ml-10mg/ml, 更佳的为 100 μ g/ml-3mg/ml。在一些较佳的实例中, 最终浓度为 1mg/ml。

在一些较佳的实例中, 核酸与局部麻醉药的浓度比为 [1 μ g/ml-10mg/ml]:[0.01-2.5%(w/v)], 较佳的为 [100 μ g/ml-3mg/ml]:[0.05-1.25%(w/v)]。在一

些较佳的实例中，核酸与局部麻醉药浓度比为 $[800\mu\text{g/ml}-1000\mu\text{g/ml}]:[0.1-0.25\%(\text{w/v})]$ 。

局部麻醉药在与核酸分子混合时自发形成泡囊。局部麻醉药的电荷可通过选择有利于形成电荷的条件来确定。在一些较佳的实例中，局部麻醉药带正电荷，并与带负电荷的核酸(在一些较佳的实例中为 DNA)混合。将带正电荷的局部麻醉药与 DNA 混合导致形成泡囊结构。单个泡囊结构可聚集成较大的较高级结构。一些聚集物呈棒状结构，它呈现出单个泡囊结构象豆荚中的豌豆那样排列，即泡囊被包封在较大的层状泡囊结构中。

如果局部麻醉药(如布比卡因)直接与核酸(如 DNA)混合(例如迅速混合)，则形成的直径为 100-150nm(经扫描电镜测得)的泡囊结构可聚集成较大的泡囊，在一些情况下，可聚集成直径大于 300nm(经扫描电镜测得)的不规则形状的结构。放慢混合速度可用透析来获得；或将局部麻醉药透析到核酸分子溶液中，或混合局部麻醉药、核酸分子和盐并透析除去盐。通过缓速混合(例如用相对于局部麻醉药的低浓度的 DNA 透析)混合局部麻醉药和核酸有利于形成直径为 50-150nm(经扫描电镜测得)的更小的结构。用相对于局部麻醉药浓度而言更高浓度的 DNA 混合局部麻醉药和核酸有利于形成直径高达 1 微米或更高(经扫描电子显微术测得)的更大的结构。一种较佳的缓慢混合方法是在高盐存在下混合组分然后透析数小时除去高盐。在除盐时，条件向自身装配和形成泡囊结构的条件移动。

如上所述，可用透析来控制泡囊形成速度。在一些方法中，在高盐浓度的溶液中进行透析膜中混合局部麻醉药和核酸分子。然后将膜置于一个含有低盐浓度(通常是含泡囊溶液最终所需的浓度)的容器内。膜中溶液内的盐迁移通过和离开膜进入周围溶液中，因此膜内的盐浓度减少。随着盐浓度的降低，膜内的溶液逐渐有利于泡囊的形成。当待包封到泡囊内的附加试剂是疏水性时，该方法是特别适用的。

在一些方法中，核酸分子放在透析膜内的溶液中。然后将膜置于一个容器中，该容器内含有用于形成泡囊浓度的局部麻醉药(通常是含泡囊溶液的最终浓度)。周围溶液内的局部麻醉药迁移通过膜进入膜内溶液中。随着膜内溶液中的局部麻醉药的浓度逐渐增加，膜内的溶液逐渐有利于形成泡囊。通常，采用截留值为 10,000-100,000kD 的透析膜，膜内局部麻醉药浓度变成与膜外局部麻醉药浓度相等的平衡时间约为 2-3 小时。采用截留值为 3,000kD 的透析膜，膜内局部麻醉药浓度变成与膜外局部麻醉药浓度相等所需的平衡时间约为 5 小时。待包封在泡囊内的附加试剂可包含在膜内核酸溶液中，只要这些试剂可溶于溶液中。

在一个实例中，通过直接混合在水溶液中混合布比卡因(最终浓度为 0.25%(w/v))和 100-1000 μ g/ml DNA，pH 低于 8，较佳的为 6.5-7。盐浓度低于 200mM，形成直径约为 100-150nm(经扫描电子显微术测得)的泡囊结构，这些泡囊的聚集物形成了直径大于 300nm(经扫描电子显微术测得)的更大的结构。

5 在一个实例中，布比卡因以最终浓度为 0.25%(w/v)与一种有机溶剂(如氯仿)混合，然后蒸发干燥。将水溶液配的 100-1000 μ g/ml 的 DNA 与蒸发物混合，pH 低于 8，较佳的为 6.5-7。盐浓度低于 500mM，形成直径约为 100-150nm(经扫描电子显微术测得)的泡囊结构，这些泡囊的聚集物形成了直径大于 300nm(经扫描电子显微术测得)的更大的结构。

10 在一个实例中，布比卡因以最终浓度为 0.25%(w/v)在水溶液中与低于 100 μ g/ml DNA 的混合，pH 低于 8，较佳的为 6.5-7。盐浓度低于 500mM，形成直径约为 50-150nm(经扫描电子显微术测得)的泡囊结构。

在一个实例中，布比卡因以最终浓度为 0.25%(w/v)在水溶液中与高达 1000 μ g/ml DNA 的水溶液混合，透析 1 小时以上，使两种物质缓慢混合，pH 低
15 于 8，较佳的为 6.5-7。盐浓度高于 2M，将盐萃取出溶液，在除去盐时泡囊发生自身装配，形成直径约为 50-150nm(经扫描电子显微术测得)的泡囊结构。可用阳离子(如 Ca^{++})或阴离子(如 PO_4^-)来使最终结构稳定化。

在另一个实例中，局部麻醉药、脂质和核酸的混合物在高盐浓度下在透析时缓慢自身装配成泡囊。

20 在一个实例中，局部麻醉药以及任选的脂质如上所述混合在有机溶剂中，溶剂用标准技术来蒸发。在干燥的物质中加入含有核酸分子的缓冲水溶液，混合中泡囊自身装配。为了输递疏水性活性剂，活性剂可在干燥前加入脂质中。含有核酸分子的缓冲液中可以包含蛋白质、多肽、肽和非蛋白类亲水性化合物，随后可包封活性剂。

25 在另一个实例中，可如上所述制得阳离子型泡囊，只是它们形成时没有核酸分子，该核酸分子是后来加入的。例如，如上所述将局部麻醉药和任选地脂质混合在有机溶剂中，用标准技术蒸发溶剂。在干燥的物质中加入不含核酸分子的缓冲水溶液，混合时“空”泡囊自装配。重建后的第二步是将含有核酸分子的缓冲液加入溶液中，这对于核酸来说是特别适用的，可能会产生更大的更高级的颗粒
30 多层结构。

在另一个实例中，上调 pH 至局部麻醉药的 pKa，在混合物中产生作为颗粒或晶体沉淀的与核酸结合的固体泡囊。

在一些实例中，局部麻醉药：核酸泡囊还包含蛋白质，如细胞因子和/或免疫原性蛋白或肽。因此免疫调节蛋白可作为局部麻醉药：核酸复合物的一部分给予，其中核酸编码一种免疫调节蛋白和/或一种免疫原性蛋白。在一些实例中，核酸是基因疫苗，辅助剂蛋白质是免疫调节蛋白如细胞因子，例如 GMCSF 或 IL-12。在一些实例中，核酸是基因疫苗，辅助剂蛋白质是免疫原性蛋白或肽。根据这些实例，输递的疫苗同时是引物/强化剂。

泡囊可以混合形成更大的结构/复合物，包括 1-5 微米结构。

在一些实例中，经扫描电子显微术测得，泡囊的直径大于 400nm。当这些泡囊给予个体(例如通过静脉内给药)时，它们可用来将物质输递到肺。

本发明的组合物和方法适用于人和兽医领域。因此，本发明的组合物和方法可用来治疗性和预防性治疗个别哺乳动物、鸟类或鱼。本发明的组合物和方法特别可用作治疗哺乳动物个体的组合物和方法，这些哺乳动物包括人、牛、山羊、猪、马、犬和猫。

本发明不想受任何特定理论的限制。下面给出的实施例涉及本发明方面的某些实例。这些实施例并不意味着限制了本发明的范围，而只是起列举作用。本领域技术人员很容易理解本发明的其它方面和实例。

实施例

根据本发明的一些较佳的实例，当将局部麻醉药和 DNA 组合并作为含有 DNA 的局部麻醉药泡囊进行输递时，受局部麻醉药促进的 DNA 疫苗所诱导的免疫应答可得到改善。在一些较佳的实例中，局部麻醉药是布比卡因。

根据本发明，当局部麻醉药与辅助剂以及 DNA 组合形成泡囊时，局部麻醉药易化的 DNA 疫苗所诱导的免疫应答可以得到改善。

阴离子型分子(如 DNA)与自装配结构的带正电荷的亲水性部分结合。该复合物与细胞结合，其高亲脂性的性质使得其容易被细胞摄取。用途包括基因治疗和基因免疫。

在一些实例中，产生了较大的泡囊，它们的大小足以被细胞通过胞饮或吞噬机制作为颗粒而摄取。这些大的颗粒泡囊用于免疫或免疫治疗的疫苗领域、或用于基因治疗领域，以靶向免疫系统内的细胞(如表达 MHC-II 的抗原呈递细胞，如树突细胞或巨噬细胞)。这种大复合物的附加优点是局部麻醉药还促使细胞内的核内体和溶酶体释放。

在一些实例中，冻干/脱水的局部麻醉药/DNA 泡囊可用于基因输送和基因免

疫。一个例子是，它们单独或与其它固体成分混合用于制备 DNA 口服输药用片剂，或制备用来输递 DNA 的纳颗粒或微颗粒。局部麻醉药复合物或颗粒用于经口递送疫苗或基因治疗，因为它们保护有关的活性分子以免在胃中降解，并促使肠相关淋巴组织吸收。

- 5 在另一个实施例中，将疏水性、可溶性差的药物包封在泡囊核心的疏水性环境中，而该结构的表面带正电荷，从而改善了药物的溶解度。带正电荷的物质对富含磷脂的带负电荷的细胞表面有天然的吸引力。在吸引后，结构的高亲脂性特征使得其容易输送通过细胞膜。用途包括输送溶解度差的或全身毒性癌症药物(如将紫衫醇或长春花新碱输送至乳房癌细胞/肿瘤)。

- 10 在另一个实例中，泡囊保护相关的生物分子免受血液中的酶促降解，或不与血液成分产生相互作用，或不产生免疫应答。这些复合物中所用的酰胺类局部麻醉药可能比酯类局部麻醉药有更特别的优点，因为它们在血液内不会降解。

在另一个实例中，泡囊被配制成乳膏、冻胶、洗液、油膏用于局部输送药物、DNA 等到粘膜部位和通过皮肤。

15

表 1

小 RNA 病毒家族

属：鼻病毒：(医学)导致大约 50%普通感冒病例。
 肠道病毒：(医学)包括脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、艾可病毒、和人肠道病毒如甲型肝炎病毒。
 Apho 病毒：(兽医)这些是口蹄疫病病毒。
 靶抗原：VP1、VP2、VP3、VP4、VPG

Calci 病毒家族

属：病毒 Norwalk 组：(医学)这些病毒是流行肠胃炎的重要的致病因子。

披膜病毒家族

属： α 病毒：(医学和兽医)例子包括 Sindbis 病毒，RossRiver 病毒和 Eastern & Western 马脑炎
 Rubi 病毒：(医学)Rubella 病毒

黄病毒家族

例子包括：(医学)登革热、黄热病、日本脑炎、St. Louis 脑炎和蜱携带脑炎病毒。



丙型肝炎病毒: (医学)这些病毒还未归在一个家族内,但是认为是披膜病毒或黄病毒。大多数与披膜病毒家族相似。

冠状病毒: (医学和兽医)

感染性支气管炎病毒(家禽)

猪可传播性肠胃炎病毒(猪)

猪凝血性脑脊髓炎病毒(猪)

猫感染性腹膜炎病毒(猫)

猫肠道冠状病毒(猫)

犬冠状病毒(狗)

人呼吸道冠状病毒引起大约 40 例普通感冒 EX.224E,0C43

注意-冠状病毒可能会引起非甲、非乙型或丙型肝炎

靶抗原: E1-也称为 M 或基质蛋白

E2-也称为 S 或刺突蛋白

E3-也称为 HE 或血凝素-eterose 糖蛋白(不存在于全部冠状病毒中)

N-核衣壳

棒状病毒家族:

属: 水泡性病毒: 水泡口炎病毒

狂犬病毒: (医学和兽医)狂犬病

靶抗原: G 蛋白

N 蛋白

纤丝病毒家族: (医学)

出血热病毒如马尔堡和埃博拉病毒

副粘病毒家族:

属: 1 型副流感病毒

3 型副流感病毒

牛 3 型副流感病毒

Rubula 病毒: (医学和兽医)

腮腺炎病毒, 2 型副流感病毒, 4 型副流感病毒, 新城堡病病毒(小鸡中重要的病原体)

麻疹病毒: (医学和兽医)

麻疹, 犬热病

- 肺病毒: (医学和兽医)
- 呼吸道合胞病毒
- 正粘病毒家族 (医学)
- 流感病毒
- 布尼亚病毒家族
- 属: 布尼亚病毒: (医学)加利福尼亚脑炎, La Crosse
- 白岭热病毒: (医学)裂谷热病毒
- 汉坦病毒: Puremala 是 hemahagin 热病毒
- 纳伊罗病毒: (兽医)内罗毕绵羊病
- 还有许多未归类的布尼亚病毒
- 沙粒病毒家族 (医学)
- LCM, 拉沙热病毒
- 呼肠病毒家族
- 属: 呼肠病毒: 一种可能的人病原体
- 轮状病毒: 儿童的急性肠胃炎
- 环状病毒: (医学和兽医)
- Culti 病毒: 科罗拉多婢热病毒、Lebombo(人)马器质性脑病、蓝舌头
- 逆转录病毒家族
- 亚家族: 肿瘤病毒(兽医)(医学)猫白血病病毒、HTLVI 和 HTVLII
- 慢病毒: (医学和兽医)HIV、猫免疫缺陷病毒、马感染病毒、贫血病毒
- 泡沫病毒
- 乳多空病毒家族
- 亚家族: 多瘤病毒: (医学)BKU 和 JCU 病毒
- 亚家族: 乳头瘤病毒: (医学)许多病毒类型与癌症或乳头瘤恶性进展有关
- 腺病毒(医学)
- EX AD7, ARD., O.B.-引起呼吸道疾病-一些腺病毒如 275 引起肠炎
- 细小病毒家族 (兽医)
- 猫细小病毒: 引起猫肠炎

猫瘟病毒

犬细小病毒

猪细小病毒

疱疹病毒家族

亚家族: α 疱疹病毒

属: 单纯疱疹病毒(医学)

HSV1, HSV2

水痘病毒: (医学-兽医)假性狂犬病毒-

水痘-带状疱疹病毒

亚家族- β 疱疹病毒

属: 巨细胞病毒(医学)

HCMV

鼠巨细胞病毒(muromegalovirus)

亚家族: γ 疱疹病毒

属: 淋巴腺病毒(医学)

EBV-(伯基特淋巴病毒)

Rhadinovirus 病毒

痘病毒家族

亚家族: 脊索动物痘病毒亚科(医学-兽医)

属: 正痘病毒

天花病毒

牛痘病毒

副痘病毒-兽医

Avipox 病毒-兽医

山羊痘病毒

野兔痘病毒

猪痘病毒

亚家族: 内阿米巴痘病毒

肝 DNA 病毒家族: 乙型肝炎病毒

未分类 δ 肝炎病毒

表 2

细菌病原体

病原性革兰阳性球菌包括：肺炎球菌、葡萄球菌和链球菌。病原性革兰阴性球菌包括：脑膜炎球菌和淋球菌。

- 5 病原性肠革兰阴性杆菌包括：肠杆菌、假单胞菌、不动细菌和 *eikenella*、类鼻疽、沙门氏菌、志贺氏菌、嗜血杆菌、莫拉杆菌、软下疳、布鲁氏菌、土拉菌、耶尔森(巴斯德菌)、念珠状链杆菌和螺菌、李斯特单细胞基因(*monocytogene*)、丹毒丝 *rhusiopathiae*、白喉毒素、霍乱、炭疽、杜诺万氏菌(性病性肉芽肿)和巴尔通氏体。

- 10 病原性厌氧菌包括：破伤风、肉毒中毒、其它梭菌、结核、麻风和其它分枝杆菌。病原性螺旋体疾病包括：梅毒、密螺旋体、雅司病、品他病和地方性梅毒、和钩端螺旋体病。

- 15 由高等病原性细菌和病原性真菌引起的其它感染包括：放线菌病、诺卡菌病、隐球菌病、酵母病、组织胞浆菌病和球孢子菌病、念珠菌病、曲霉病、和毛霉病、孢子丝菌病、副球孢子病、*petriellidiosis*、球拟酵母菌病、足分枝菌病和着丝芽生菌病、和皮肤真菌病。

立克次体感染包括立克次体和立克次体病。

支原体和衣原体感染的例子包括：支原体肺炎、性病淋巴肉芽肿、鹦鹉热和围生期衣原体感染。

- 20 病原性真核细胞

病原性原生动物和蠕虫及其感染包括：阿米巴病、疟疾、利什曼病、锥虫病、弓形体病、肺囊虫病(*carinii*)、巴倍虫病、贾第虫病、旋毛虫病、丝虫病、血吸虫病、线虫病、吸虫病、和绦虫感染。