[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[6]
A61K 48/00
A61K 47/20 A61K 31/73
A61K 38/02 A61K 38/22
A61K 38/43 A61K 39/12
A61K 39/395

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98117551.1

[43]公开日 1999年4月7日

[11]公开号 CN 1212890A

[22]申请日 98.7.1 [21]申请号 98117551.1

[30]优先权

[32]97.7.1 [33]FR [31]9708267

[32]97.10.16[33]FR [31]9712950

[71]申请人 特朗斯吉恩有限公司

地址 法国斯特拉斯堡

[72]发明人 R·比绍夫 H·考伯

K·舒格哈特

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 陈文平

权利要求书4页 说明书20页 附图页数5页

[54]发明名称 用于将治疗活性物质转移到靶细胞中的组合物及其在基因治疗中的应用

[57]摘要

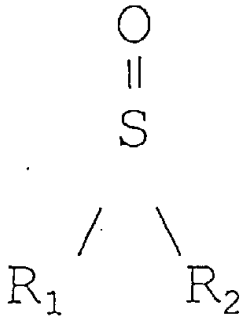
本发明涉及一种用于将至少一种治疗活性物质转移到靶细胞中的组合物,该组合物的特征是含有至少一种治疗活性物质以及至少一种极性化合物的混合物,该化合物是从特定非质子极性化合物组成的组中选出的。该治疗活性物质优选地为一种多核苷酸,而极性化合物优选地为DPSO,DPSO能够提高多核苷酸转染进入细胞内部的能力。根据本发明的组合物可用作诊断、治疗、预防或疫苗药剂并通过基因治疗来医治人或动物。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1.一种组合物，该组合物含有至少一种治疗活性物质和至少一种非质子极性化合物的混合物，极性化合物选自如下定义的化合物：

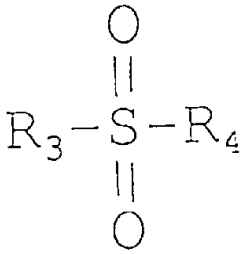
(a) 式 I:



其中 R_1 和 R_2 相同或不同并且为 1 到 8 个碳原子的芳基，烷基，环烷基，氟代烷基，链烯基，烷氧基且可被任选性地取代，

条件是当 R_1 是 1 或 2 个碳原子基团时，R_2 至少是 3 个碳原子的基团，R_2 是 1 或 2 个碳原子基团时，R_1 至少是 3 个碳原子的基团，R_1 和 R_2 可能连接形成环状分子；

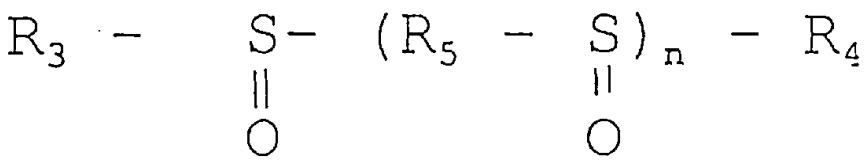
(b)式 II:



其中 R_3 和 R_4 相同或不同并且为 1 到 8 个碳原子的芳基，烷基，环烷基，氟代烷基，链烯基或烷氧基，这些基团可任选性地重复，是线性的或分支的并且可任选性地被取代，

R_3 和 R_4 可能连接形成环状分子；

(c)式 III：



其中 R_3 和 R_4 相同或不同并且为 1 到 8 个碳原子的芳基，烷基，环烷基，氟代烷基，链烯基或烷氧基，这些基团可任选性地重复，是线性的或分支的并且可任选性地被取代，

R_5 是 $(CH_2)_x$ 且在每个 $[R_5 - S]_n$ 重复单元中是彼此独立的，其中 x=1 到 50

R_3 和 R_4 可能连接形成环状分子；或

(d) 二甲基甲酰胺，二甲基乙酰胺，四甲基脲或它们的衍生物。

2. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述非质子极性化合物选自二-正丙基亚砜(DPSO)，环丁亚砜(TEMSO)，二甲砜，环丁砜，1-甲基-2吡咯烷酮及它们的衍生物。

3. 权利要求 1 和 2 所述的组合物，其中所述的治疗活性物质是一种多核苷酸。

4. 权利要求 3 所述的组合物，其中所述的多核苷酸是一种不含有任何有助于其进入靶细胞的化合物的多核苷酸。

5. 权利要求 3 所述的组合物，其中所述的多核苷酸是同至少一种病毒多肽联合的多核苷酸。

6. 权利要求 3 所述的组合物，其中所述的多核苷酸是同至少一种阳离子两亲性物，特别是脂类联合的多核苷酸。

7. 权利要求 3 所述的组合物，其中所述的多核苷酸是同至少一种阳离子或中性聚合物联合的多核苷酸。

8. 权利要求 3 到 7 任一项中所述的组合物，其中所述的多核苷酸是一种反义多核苷酸。

9. 权利要求 3 到 7 任一项中所述的组合物，其中所述的多核苷酸是一种核酶。

10. 权利要求 3 到 7 任一项中所述的组合物，其中所述的多核苷酸包括目的基因及使所述目的基因能够表达的因子。

11. 权利要求 10 所述的组合物，其中所述的多核苷酸编码多肽的全部或部分。

12. 权利要求 11 所述的组合物，其中所述的多肽显示治疗活性。

13. 权利要求 11 所述的组合物，其中所述的多肽显示预防活性，特别是致免疫活性。

14. 权利要求 11 所述的组合物，其中所述的多肽是一种酶，激素，细胞因子，膜受体，抗体，调节转录、翻译或复制并且涉及到转录稳定性的因子，结构多肽，形成膜通道的多肽，转运多肽，粘附分子或配体。

15. 权利要求 1 到 14 任一项中所述的组合物，其中所述的非质子化合物在水性溶液中。

16. 权利要求 1 到 15 任一项中所述的组合物，其中所述极性化合物的体积相当于该组合物总体积的 15 - 20 %。

17. 权利要求 1 到 16 任一项中所述的组合物，其中非质子极性化合物在水溶液中。

18. 一种药物组合物，该组合物含有权利要求 1 到 17 任一项中所述的组合物和任选性的一种药物上可接受的载体。

19.用于转移至少一种治疗活性物质进入靶细胞内的权利要求 18 中所述的药物组合物。

20. 权利要求 18 或 19 中所述的药物组合物，其被设计用来通过肌内途径或通过吸入，气管内注射，滴入或气雾剂法来给药。

21. 一种含有权利要求 1 到 17 任一项中所述组合物的疫苗。

22. 用于基因治疗的权利要求 18 到 20 任一项中所述的药物组合物或权利要求 21 中的疫苗。

23. 含有权利要求 1 到 17 任一项中所述的组合物的诊断组合物。

24.权利要求 1 到 17 任一项中所述的组合物在制备一种在体内或体外将至少一种治疗活性物质转移到靶细胞中的药物组合物中的用途。

25. 权利要求 24 中所述的用途，其中所述的靶细胞为哺乳动物细

胞。

26. 权利要求 24 或 25 中所述的用途，其中所述的靶细胞为肌细胞。

27. 权利要求 24 或 25 中所述的用途，其中所述的靶细胞为呼吸道细胞。

28. 一种用于体外将治疗活性物质转移到靶细胞中的方法，其中所述的细胞同权利要求 1 到 17 之一中的一种组合物接触。

29. 权利要求 28 中所述的方法，其中包括在将所述组合物同所述细胞相接触前，加热所述组合物的附加步骤。

说　　明　　书

用于将治疗活性物质转移到靶细胞中的组合物及其在基因治疗中的应用

本发明涉及一种能够用于将治疗活性物质转入靶细胞的组合物，特别是脊椎动物细胞，更具体说是哺乳动物细胞。更具体地说，本发明涉及用这种组合物制备一种载体，用该载体将治疗活性物质，特别是一种多聚核苷酸转移到靶细胞中。

遗传性疾病特别是由于特异基因的异常表达或非功能性突变多肽的表达。例如囊性纤维化被认为是最常见的致死性遗传疾病（1/2000）且平均寿命期望值为20到30年，且该疾病是以粘膜分泌物的大幅增稠，慢性肺病以及外分泌腺-胰脏的功能不全为特征的。所述疾病同电解质转运的紊乱有关，特别是跨跃上皮细胞膜的氯离子，这种紊乱是CFTR（囊性纤维化跨膜传导调节蛋白）基因突变的结果（Rommens，科学(Science)245（1989），1059-1066；Rosenfeld，Chest 109(1996)，241-252）。看起来对这种类型的疾病最合适的治疗方法是将编码有功能CFTR蛋白的基因转入靶细胞以纠正观察到的细胞异常。对于这种方法，也叫基因疗法，几位文章作者认为可选择呼吸道上皮细胞作为靶细胞，这特别地是由于呼吸道上皮的易接近性，尤其可通过肺内运输的方法，例如向肺中滴注。已经证明必须使靶细胞内表达水平达到正常CFTR基因表达量的约5%～7%才能使所观测的电解质转运恢复。类似地，一些出版物描述了通过将基因转入癌靶细胞的技术以消除肿瘤或延缓癌症进一步发展的可能性。已经考虑过一些方法，特别是转移能诱导或激活抗肿瘤细胞介导免疫反应的免疫刺激基因（免疫疗法），提及的可用于给药的基因可以是编码细胞因子的基因，将产毒素的细胞毒素基因转移到能表达该基因的细胞中，例如1型单纯疱疹病毒（HSV-1）的tk基因；或者转移抗致瘤基因—即肿瘤抑制基因，例如

成视网膜细胞瘤基因或 p53 基因；或者是能够抑制致癌基因活性的多核苷酸，例如反义分子或能够降解致癌基因特异信使 RNA 的核酶。

在过去的 30 年中，已建立了大量将不同异源基因引入细胞，特别是哺乳动物细胞的方法。可将这些不同的方法分为两类。第一类涉及到象微注射，电穿孔或粒子轰击一类的物理方法，这些方法虽然有效，但是在很大程度上限于体外应用，方法的实施是麻烦而棘手的。第二类涉及到分子及细胞生物学技术，将要转移的基因与可促进所述物质转移的生物或合成载体联合起来。

目前最有效的载体是病毒载体，特别是腺病毒或逆转录病毒载体。这些已经开发出的技术是以这些病毒所具有的天然特性为基础的，病毒所拥有的这些特性可使之穿过细胞膜，避免遗传物质被降解并能使其基因组穿入细胞核。这些病毒已经在大量研究中作为实验对象，而且其中有些病毒已经试验性地用作人的基因载体，并着眼于用作如疫苗，免疫治疗或为了补偿遗传性缺陷的疗法。然而，这一使用病毒的方法受到大量限制，特别是由于病毒基因组有限的克隆能力，已经生产的感染性病毒粒子在宿主生物体和环境中传播的危险性，在宿主细胞中因插入而导致人工突变的危险，以及就逆转录病毒载体而言，在体内治疗过程中诱发强烈的免疫反应及炎性反应的事实，因此实际上限制了可以设想的用药方法的数量（ McCoy，人类基因治疗(Human Gene Therapy)6（ 1995 ）， 1553-1560； Yang，免疫(Immunity)1（ 1996 ）； 433-442 ）。这许多缺陷，特别是用于人的病毒载体的情况，引导许多机构为转移多核苷酸而开发设计可替代的方式。

目前有许多非病毒方法可供选用。例如，可用象 DOTMA（ Felgner,PNAS 84(1987)， 7413-7417 ）， DOGS 或 Transfectam(Behr， PNAS 86(1989)， 6982-6986)， DMRIE 和 DORIE（ Felgner，方法(Methods)5（ 1993 ）， 67-75 ）， DC-CHOL（ Gao，BBRC 179(1991)，280-285 ）,DOTAP（ MCLachlan，基因治疗(Gene Therapy)2（ 1995 ）， 674-622 ）或 Lipofectamine 的阳离子脂同磷酸钙共沉淀；使用模拟病毒系统的受体（参见 Cotten，现代

生物技术评论(Current Opinion in Biotechnology)4（ 1993 ）， 705-710 ）；以及使用象聚酰氨基胺(Haensler，生物共轭化学(Bioconjugate Chem.)4（ 1993 ）， 372-379)。虽然是有希望的，但这些技术也受到了一些限制，特别是它们在体内低水平的效能，实际上限制了它们在基因治疗上的应用。而且，这些技术中的一部分或者限于体外应用，特别是由于所用分子的毒性的缘故（ Polybrene - 1， 5 - 二甲基 - 1， 5 - 二氮十一亚甲基聚甲溴化物 - 可作为一个例子），或者由于引入这些化合物后引起的炎性反应（就阳离子脂而言，例如： Scheule，人类基因治疗 8（ 1997 ）， 689-707 ），或者是难于控制，如就受体而言，在胞吞作用过程中，大量的核酸物质进入泡囊中，因而就不再在治疗中起作用了。最终来讲，这些技术对环境因素相当敏感而且为了使它们适用于靶细胞或所选择的给药方式，更具体地说是为了将其由体外模型转移应用到体内模型，是需要长期而细致的工作的。

Wolff(科学 2478（ 1990 ）， 1465-1468)描述了一种用于将多核苷酸引入肌细胞的引人注意的简便的系统，该系统仅包括通过肌内途径将纯化的多核苷酸注射入靶细胞，而不与任何其它能够促进多核苷酸进入靶细胞的化合物结合。最近通过气管内注射的方法（ Meyer，基因治疗 2（ 1995 ）， 450-460 ）及通过动脉内注射的方法（ Riessen，人类基因治疗 4（ 1993 ）， 749-758 ）所得结果进一步肯定了这种系统所带来的益处。尽管如此，被引入组织的基因的表达量仍然十分有限以致使这种技术不能有效地用于基因疗法，特别是用于治疗同肺病有关的疾病。一些研究提出了替代方法以促进这类多核苷酸进入细胞。例如，专利申请 WO 95/26718 是关于将遗传物质引入细胞中的方法，该方法包括将基因疫苗促进剂和一核酸分子同所述细胞接触。根据其中的一个特定的实施方案的描述，所述基因疫苗促进剂可以存在于 DMSO 中。尽管如此，在所述专利申请中没有提供试验数据并且由 Aubin（体细胞分子遗传学(Somatic Cell Mol. Genet.)14（ 1988 ）， 155-167 ）或 Rhim（致癌基因(Oneogene)4（ 1989 ）， 1403-1409 ）所做的实验强调了必须联合使用 DMSO 和象 Polybrene 样的静电桥分子。更具体地

说， Aubin 描述了一种两步法。第一步，也是必需的一步，将要转染的 DNA 同静电桥分子 Polybrene 相接触，从而使该 DNA 吸附到细胞表面，第二步，将已经吸附到细胞表面的 DNA 同 DMSO 接触以促进该 DNA 进入细胞。这些研究并没有能够提出详细草案以适应体内应用方法，即目的是将多核苷酸，更具体地说是将不含有任何转染促进化合物的多核苷酸有效地转入不同细胞类型中并且提高所述靶细胞内的核酸表达水平的方法。此外， Oudhiri(PNAS 94(1997)， 1651-1656)证明了向气管内注射不含有任何能够协助质粒进入细胞的质粒后，萤火素酶基因在肺细胞中没有表达。

因此，本发明的根本技术问题是提供有效地将治疗活性物质转入靶细胞的方法。

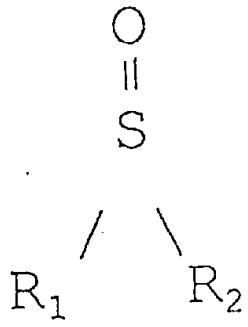
这一技术问题是通过在权利要求中表征的实施方案解决的，即申请人现在已经开发出了一种用于将治疗活性物质，优选地是一种多核苷酸，转入靶细胞内的组合物。可以设想将该组合物特别地用于体内基因治疗过程中，这特别是因为该组合物的组分是无害的。

因此，本发明首先涉及到一组合物，该组合物的特征是由至少一种治疗活性物质和至少一种选自一组特定非质子极性化合物的极性化合物组成的。

根据本发明，“非质子极性化合物”被理解为是指一种不含任何正电极化氢原子（非质子）的化合物。这样的化合物的性质在文献中作了大量描述（例如，见 Vollhardt 和 Schore， 1994， Traite de Chimie Organique[有机化学论文]，第二版， De Boeck 大学）。这样的化合物特别地可从天然或由合成获得，或者通过对本身不具备上述特性的一个化合物进行化学修饰而得到。本领域技术人员具有鉴定这种化合物所需的知识。本发明下面所描述的方法及应用中所要用到的非质子极性化合物可通过各种商业渠道获得，或按现有技术的描述制备。有大量的极性化合物可供考虑在本发明中使用。

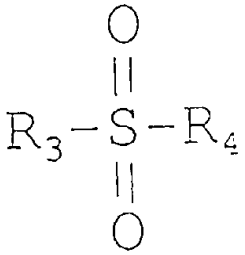
根据本发明的第一种情况，优选提到的非质子极性化合物被定义为：

（a）式Ⅰ：



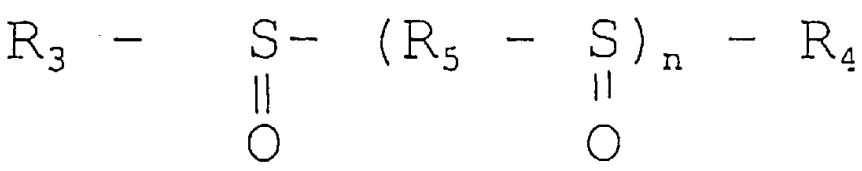
其中 R_1 和 R_2 是相同或不同的 1 到 8 个碳原子的芳基，烷基，环烷基，氟代烷基，链烯基，或烷氧基团，这些基团可任选性地重复，可以是线性的或分支的并且可被任选性地取代，条件是当 R_1 是 1 个或 2 个碳原子的基团时，R_2 是至少 3 个碳原子的基团，R_2 是 1 个或 2 个碳原子的基团时，R_1 是至少 3 个碳原子的基团，R_1 和 R_2 可能连接形成环化分子；

（b）式Ⅱ：



其中 R_3 和 R_4 是相同或不同的，是 1 到 8 个碳原子的芳基，烷基，环烷基，氟代烷基，链烯基或烷氧基，这些基团可任选性地重复，可以是线性的或分支的并且可被任选性地取代，R_3 和 R_4 可能连接形成环化分子；

（c）式Ⅲ：



其中 R_3 和 R_4 是相同或不同的 1 到 8 个碳原子的芳基，烷基，环烷基，氟代烷基，链烯基或烷氧基团。这些基团可任选性地重复的，可以是线性的或分支的并且可被任选性地取代， R_5 是（ $CH_2)_x$，在每个 $[R_5\text{-}S]_n$ 重复单元中是彼此独立的，其中 X=1 到 6，且 R_5 可被任选性地取代， n=1 到 50， R_3 和 R_4 可能连接形成环化分子，或

（ d ）二甲基甲酰胺，二甲基乙酰胺，四甲基脲及它们中的任何一个的衍生物。

所述的 R_1， R_2， R_3 和/或 R_4 基团优选地由 2 到 6 个碳原子组成，更优选的为 2 到 4 个碳原子，特别优选的为 2 到 3 个碳原子。

链烯基所表示的意思可被理解为在该碳链中可以包括一个或多个双链。

根据本发明，这些极性化合物的 R_1， R_2， R_3 和/或 R_5 基团可被取代。特别地，这样的取代可以由一个标记分子（见 US 4711955），一个细胞靶分子（配体）或一个锚定分子组成，经体内或体外给药后，标记分子能够使例如化合物或含有它的复合物的分布可以被观测到。这些已在科学出版物上做了大量描述的因子，允许特异细胞类型的靶向，促进穿透进入细胞，核内体的裂解或甚至于向核的胞内运输。这些因子可由全部或部分的下列物质组成：糖，乙二醇，肽（例如： GRP，胃泌素释放肽），寡核苷酸，脂，激素，维生素，抗原，抗体（或其片段），特异膜受体配体，能够与抗一配体反应的配体，融合剂肽，核定位肽，或所述化合物的组合，例如靶向肝细胞表面脱唾液酸糖蛋白受体的半乳糖残基，起膜融合作用的从流感病毒血凝素 HA-2 亚基中得到的 INF-7 融合剂肽（ Plank，生物化学杂志(J. Biol. Chem)， 269（ 1994），12918-12924），从 SV40 病毒 T-抗原（ Lanford，细胞(Cell)37（ 1984）， 801-813）中或者从 Epstein Barr 病毒的 EBNA-1 蛋白（ Ambinder，病毒学杂志(J. Virol.) 65（ 1991）， 1466-1478）中得到的核信号序列。

根据本发明，所述非质子极性化合物特别地选自二正丙基-亚砜

（ DPSO ），二甲基砜，环丁砜，环丁亚砜（ TEMSO ）， 1-甲基-2-吡咯烷酮，甲基-二-甲基亚砜，甲基-二-乙基亚砜及其衍生物。按照本发明的有利形式，所述非质子极性化合物选自二正丙基-亚砜（ DPSO ）及其衍生物。如所附实施例中所描述的，发现用附加有 DPSO 的 DNA 给药时， DPSO 能够显著促进细胞吸收 DNA 。所述分子的对映体也包括在发明的范围内。

为本发明的目的，前面提到的任何化合物的“衍生物”的意思是指该分子的化学结构是以上面描述的化合物为基础并且可用来将某物质转移到靶细胞中。同天然存在的非质子极性化合物以及上面所提到的化合物相比，在用这样的衍生物转染所述物质的过程中，促进细胞吸收所述物质的能力甚至可能增强。制备这样的衍生物的方法对本领域技术人员来说是公知的而且这些方法已在例如， Beilstein ，有机化学手册(Handbook of Organic Chemistry, Springer edition New York Inc. 美国纽约(10010)第 5 大街 175 号)以及有机合成(Organic Synthesis), Wiley ，纽约，美国)这些书中做了描述。根据现有技术或例如在所附实施例中所描述的方法，可将所述衍生物进行转染试验。而且，可根据现有技术中的方法，例如用计算机辅助设计出合适的衍生物和类似物。具体地说，可用 DPSO 和其他相关的非质子极性化合物的三维和/或晶体结构来设计具有促进 DNA 吸收能力的化合物（ Rose ，生物化学(Biochomistry)35（ 1996 ）， 12933-12944 ； Rutenber ，生物药物化学(Bioorg Med. Chem.)4（ 1996 ）， 1545-1558 ）。

根据本发明的另一个实施方案，所述非质子极性化合物选自二甲基甲酰胺（ DMF ），二甲基乙酰胺，四甲基脲（ TMU ）及其衍生物。

本发明组合物的活性物质包括，但不限于肽，蛋白，多核苷酸，抗体，小有机化合物配体，激素，肽模拟物，戊糖核酸（ PNA ）等等，优选的物质是能够在实验对象中诱导和/或介导生理反应的物质。根据本发明，优选的组合物的活性物质为多核苷酸，加上非质子极性化合物后就能使多核苷酸转染入细胞的能力提高。

“多核苷酸”被认为是天然分离的或合成的，线性的或环状的，双

链或单链的 DNA 和/或 RNA 片段，用这一术语来表示标记的或未标记的（例如，见 US 4711955 或 EP 302175），修饰的或未修饰（例如，见 US 5525711）的核酸的确切序列并且在不限制核酸大小的情况下可定义一个片段或一个核酸的某区域。多核苷酸被认为指的是，特别是，cDNA，染色体 DNA，质粒 DNA，不含任何能促进多核苷酸进入细胞的化合物的多核苷酸；与至少一种多肽，特别是病毒来源的多肽，更具体地说是腺病毒或逆转录病毒来源的多肽结合的，或与合成多肽结合的多核苷酸；与配体结合的多核苷酸；与至少一种阳离子两亲性物，特别是脂类结合的多核苷酸；与至少一种阳离子或中性聚合物结合的多核苷酸，信使 RNA；反义 RNA；核酶；转移 RNA；核糖体 RNA；或编码这样 RNA 的 DNA。

根据本发明的一个特定实施方案，所述多核苷酸包含一个目的基因以及使该目的基因能够表达的因子。在这一实施方案中，多核苷酸的有利形式为质粒，使表达能够发生的因子是使所述 DNA 片段能够转录为 RNA（反义 RNA 或 mRNA）以及将 mRNA 翻译为多肽的因子的总和。这些因子具体来说是在所述细胞内起作用的启动子序列和/或调节序列，在合适时，这些序列要能够使所述多肽在靶细胞表面分泌或表达。例如，可提到的有 RSV，MPSV，SV40，CMV 或 7.5k 病毒启动子，或痘苗病毒启动子，或编码肌酸激酶，肌动蛋白和肺表面活性物基因的启动子。另外有可能选择对给定细胞类型特异的或在一定条件下能够被激活的启动子序列。文献中提 供了大量关于这样的启动子的信息。而且，所述多核苷酸可包括至少两个相同或不同的具有转录启动子活性的序列和/或至少两个相同或不同的 DNA 编码序列，两者位置连续或隔开一段距离，彼此之间同向或反向，只要转录启动子的功能和所述序列的转录不受影响。类似地，在构建这类核酸时，可引入对转录没有影响的以及在翻译前被剪切的“中性”核酸序列或内含子。在文献中对这种性质的序列及其应用作了描述。所述多核苷酸可以含有胞内运输所需的，复制和/或整合所需的序列。这样的序列对技术人员是公知的。另外，按照本发明的多核苷酸也可以是被修饰后不能整合到靶细胞基因组中

的多核苷酸，或者是用象精胺一类的物质稳定化的多核苷酸。

本发明组合物还可包括一个选择标记基因，该选择标记或者连接到上述多核苷酸上或者作为一个单独的核酸分子，例如在一个重组质粒上。这一实施方案特别适用于离体处理组织，细胞和器官。在引入外源DNA后，可将工程细胞在富集培养基上培养1-2天，然后转移到选择培养基中。重组质粒中的选择性标记赋予选择物以抗性并且使那些已经将质粒稳定地整合到其染色体中的细胞能被选择出来从而生长形成转化灶，然后可以被克隆并发展成为细胞系。可以用很多选择系统，包括但不限于分别存在于tk^-，$hgprt^-$或$aprt^-$细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶（ Wigler，细胞11（ 1977），233），次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶（ Szybalska，美国科学院学报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)48（ 1962），2026），以及腺嘌呤转磷酸核糖基酶（ Lowy，细胞22（ 1980），817）。而抗代谢物抗性可作为选择赋予氨甲蝶呤抗性的二氢叶酸还原酶dhfr（ Wigler，美国科学院学报.,美国77（ 1980），3567； O'Hare，美国科学院学报.,美国78（ 1981），1527），赋予霉酚酸抗性的gpt（ Mulligan，美国科学院学报，美国,78（ 1981），2072）；赋予氨基糖苷G-418抗性的neo（ Colberre-Garapin，分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)150（ 1981），1）；赋予潮霉素抗性（ Santerre，基因(Gene)30（ 1984），147）；或嘌呤霉素抗性的hygro（ pat，嘌呤霉素N-乙酰转移酶）的基础。另外对其他选择性基因也作了描述，例如trpB使细胞能够利用吲哚以代替色氨酸； hisD使细胞能够利用组氨醇(histinol)来代替组氨酸（ Hartman，美国科学院学报 美国 85（ 1988），8047）；以及赋予鸟氨酸脱羧酶抑制剂抗性，即2-（二氟甲基）-DL-鸟氨酸，（ DFMO）抗性的ODC（鸟氨酸脱羧酶）（ McConlogue， 1987；见：现代分子生物学通讯(Current Communication in Molecular Biology)，冷泉港实验室编）。

在文献中描述了本发明中用于体外或体内基因治疗时所用组合物中的适宜的载体及质粒，这对于本领域技术人员来说是公知的；例如见： Giordano,天然药物(Nature Medicine)2（ 1996），534-539；

Schaper，循环研究(Circ. Res.)79（1996），911-919；Anderson，科学256（1992），808-813；Isner，柳叶刀(Lancet)348（1996），370-374；Muhlhauser，循环研究，77（1995），1077-1086；Wang，天然药物2（1996），714-716；WO94/29469；WO97/00957或Schaper，现代生物技术评论7（1996），635-640，及其中所引用的参考文献。优选地，所述载体为基因转移或靶向载体。本领域技术人员可用公知的方法来构建上述多核苷酸，质粒和重组载体；例如见Sambrook在《分子克隆-实验手册》(Molecular Cloning A Laboratory Manual, 纽约)，冷泉港实验室（1989）中所记载的方法以及Ausubel在《现代分子生物学方法》，(Current Protocols in Molecular Biology, Green Pubilshing Associates and Wiley Interscience , N.Y.(1989))中描述的方法。

在本发明中，多核苷酸可以与靶细胞是同源的或是异源的。选用编码全部或部分多肽的多核苷酸，特别是具有治疗或预防活性的多肽，更具体地说是细胞或体液型免疫活性的多肽是有利的。术语多肽应被理解为是对多肽大小和被修饰（例如被糖基化）程度没有限制的。例如，可提及编码酶、激素、细胞因子、膜受体、结构多肽、形成膜通道的多肽、转运多肽、粘附分子、配体、调节转录、翻译、复制或转录稳定性的因子的基因，或者编码抗体的基因，例如，象编码CFTR蛋白、营养不良蛋白、因子VIII或因子IX、HPV E6/E7、MUC1、BRAC1、干扰素、白细胞介素（IL-2，IL-4，IL-6，IL-7以及IL-12）、肿瘤坏死因子（TNF）α或GM-CSF（粒细胞巨噬细胞集落刺激因子）的基因，或单纯疱疹病毒1型（HSV-1）的tk基因，成视网膜细胞瘤基因或p53基因以及编码全部或部分免疫球蛋白的基因，例如$F(ab)_2$，Fab'以及Fab片段，或编码抗独特型免疫球蛋白的基因（US4,699,880）。应当理解，所提到的基因不是对本发明的限制，也可用其它基因。

根据本发明，可能希望得到一种含有最大可能浓度的多核苷酸的组合物，以便在需要的时候，可用最小可能量的本发明组合物给药。技术

人员有足够的知识使他能够根据溶液介质溶解多核苷酸的能力来调整其浓度。根据一个优选的实施方案，所述非质子极性化合物溶于水性溶液中，就是说该化合物被稀释在水性溶液中，后者适当时为盐水或缓冲液。技术人员有足够的知识使他们能够选出对靶细胞类型最为合适的水溶液。更具体地说，所述非质子极性化合物是溶解在水中或缓冲液中的，例如 20mM 的 Hepes 中， pH 值为 7.5 。非质子极性化合物的体积可以是组合物总体积的 0.1-100%，优选的体积为 5-50%，最优选的是从 15-20%。

本发明进一步涉及一种药物组合物，该组合物包括上面提到的本发明的组合物并且任选性地含有药物上可接受的载体或赋型剂。合适的药物载体的例子是本领域所公知的且包括磷酸缓冲盐水溶液，水，乳液，例如油/水乳液，各种类型的湿润剂，灭菌溶液等等。可用公知的常规方法来制备含有这样的载体的组合物。这些药物组合物可以以合适的剂量给受试者用药。可经不同的方式进行适宜组合物的给药，例如，静脉给药，气管内给药，肺内给药，腹膜内给药，皮下给药，肌内给药，局部或皮内给药。所用剂量方式应由临床医生及其它临床因素来确定。正如医药领域所公知的，对每个患者的用药剂量取决于很多因素，包括患者的身材，体表面积，年龄，所用药物的特性，性别，给药时间及途径，健康状况，以及同时使用的其它药物。一般地，使用本药物组合物的剂量方案为每日 1 μ g 到 10mg 的药物活性化合物。如果剂量方案为连续注入，那么应按每分钟每千克体重的用药范围为 1 μ g 到 10mg 的生物活性化合物给药。可通过定期评估来监测病情进展状况。用药剂量会不同，但对静脉内施用多核苷酸的优选剂量为，例如 DNA 应是约从 10^6 到 10^{16} 拷贝的 DNA 分子。本发明的组合物可以局部或系统给药。通常用肠胃外给药方式，例如静脉内给药；也可将 DNA 直接向目标位点给药，例如，用导管向动脉内给药。而且，在注射前，可将本发明组合物结合于微胶囊或微球体上。人们可以用体内转基因法，为此已设计出多种设备，如双气囊或其它导管，或者用上面描述的通过直接向靶组织注射的方法。另外，可以用离体方法，从体内分离组织中的细胞，然后用

上面提到的组合物转染并再注回。

本发明另一个实施方案中涉及一种含上面提到的任何一种组合物的疫苗。在这一实施方案中，优选的治疗活性物质为一种抗原或编码能够引起对某种疾病敏感的人或动物对该疾病产生保护性免疫的抗原的多核苷酸。可根据本领域的公知方法制备本发明所述疫苗。例如：通过共转染编码分泌型细胞因子或趋化因子或膜分子的 cDNA，设计 Th-1-或 Th-2-导向的免疫反应，就能够提高用于接种的抗原的免疫原性。该疫苗例如可以被或者皮内注射，皮下注射，肌内注射，或者特别是如果用作抗肿瘤免疫接种，注射到肿瘤生长部位或者注射到肿瘤生长部位的淋巴管或淋巴结引流区。

本发明的另一实施方案涉及一种诊断组合物含有上述任一组合物以及可任选的合适的检测工具。在本实施方案中，优选带有标记的治疗活性物质。有许多本领域普通技术人员知道的不同的标记及标记方法。可用于本发明的标记包括酶，放射性同位素，胶体金属，荧光化合物，化学发光化合物，以及生物发光化合物。附加的或可另选的情形是，该治疗活性物质含有编码可直接或间接被检测的蛋白的标记基因，比如β一半乳糖苷酶，绿色荧光蛋白或荧光素酶；另见后面的实施例。本发明的诊断组合物可有利地用于定向，例如，向选定区域发光，以及用于跟踪受试者体内的实物。另外，可用上面描述的组合物完成病态动物模型，对动物体内的病原体或疾病进程的定位及根踪方法，以及从推定的治疗化合物中筛选出对抑制疾病或病原体有效的化合物的方法。对哺乳动物发出的光的检测及定位已在现有技术中做了描述，比如 97/18841 以及文中引用的文献。

本发明还涉及本发明的组合物在体外、离体或体内（特别是体内）转移至少一种治疗活性物质特别是一种多核苷酸到靶细胞内的用途。

这些引入或转移方法本身是公知的。“转移”的意思是指治疗活性物质被转移到细胞中，并且在步骤最后定位在所述细胞内或细胞膜内或表面。如果该活性物质是核酸就叫作“转染”。可用各种合适的方法来鉴定转染，例如通过测定所述基因的表达或测定表达蛋白质的浓度。

按照本发明，“靶细胞”被认为是原核细胞，酵母细胞以及真核细胞，植物细胞，人或动物细胞，特别是哺乳动物细胞。另外，也应提到癌细胞。在体内，本发明可应用于组织的间质或腔内，比如肺，气管，皮肤，肌肉，脑，肝，心脏，脾，骨髓，胸腺，膀胱，淋巴，血液，血管，胰，胃，肾，卵巢，睾丸，直肠，周围或中枢神经系统，眼，淋巴器官，软骨及内皮。按本发明的有利的选择，靶细胞为肌细胞，造血干细胞或呼吸道细胞，更具体地说是气管或肺细胞，有利的是呼吸道上皮细胞。

本发明还涉及一种将治疗活性物质转移到靶细胞中的方法，该方法是将所述细胞同本发明的组合物相接触。有利的是，这一方法包括一附加步骤，该步骤是在与细胞接触前加热该组合物。

根据本发明应当理解，“组合物”指的是其中所含的治疗活性物质和极性化合物以某种方式关联或结合在一起，从而不能认为所述活性物质不含促进剂。例如，在所述活性物质为质粒 DNA 的特定情况中，申请人证明了在 DPSO 存在时 DNA 物理性质有所变化。因此，本领域技术人员可以容易地想象由所述活性物质和所述极性化合物组成的组合物可在体外获得，也可在体内得到，向靶器官或组织分别注射所述化合物，在第一种化合物仍然存在时接着注射第二种化合物以就地形成权利要求的组合物。这种独立的给药方式应当被认为是本发明的等同实施。

正如上文所提到的，根据本发明的组合物可被用作诊断·治疗、预防或接种目的的药物。因为这一缘故，本发明也涉及将本发明组合物用作治疗、预防或接种目的的药物。

特别地，本发明组合物可被用于实施治疗方法，该方法是将至少一种治疗活性物质，特别是一种多核苷酸转移到靶细胞中。优选的靶细胞为哺乳动物细胞。特别是，这些哺乳动物细胞是肺细胞、肌细胞或造血干细胞。

可将本发明的组合物通过肌内，气管内，鼻腔内，脑内，胸膜内，肿瘤内，表皮，静脉或动脉内的途径给药，使用注射器或任何其它类似的工具，包括适用于呼吸道或粘膜的系统，例如吸入，滴入，气雾化。

可提到的给药方式有通过使用乳剂形式，通过口服方式或技术人员公知的且可用于本发明的任何其他方式。

根据本发明，以及从体内基因治疗的角度，所建议的给药方式可以对病人重复施用多次，并且任一所用化合物不会引起任何明显的免疫反应。给药方式可以是单剂量或多剂量，在一定时间间隔内重复给药一次或多次。给药途径及剂量取决于不同因素，例如，接受治疗的个体或疾病，以及将要被转移的多核苷酸。

更特别地，本发明涉及本发明的组合物在制备用于诊断、治疗、预防或接种目的的药物中的应用，该药物通过基因疗法用于人或动物体。第一种可能是，可以直接在体内施用该药物（例如肌肉给药，或用气雾剂对肺给药，等等）。也可以采取离体的方法，该方法首先从患者体内提取细胞（骨髓干细胞，外周血淋巴细胞，肌细胞等等），再根据本发明转染这些细胞，然后再给患者施用这些转染了的细胞。

最后，本发明涉及到用前面定义的组合物转染过的细胞，特别是原核细胞，或酵母细胞或真核细胞，特别是动物细胞，特别是哺乳动物细胞，更特别的是癌细胞。根据本发明的优选实施方案，所述细胞是呼吸道细胞，更具体地说是气管细胞或肺细胞，有利的是呼吸道上皮细胞。就呼吸道用药而言，预先施用支气管舒张化合物（例如茶碱）是有利的。申请人证明，在把含有 DPSO 的组合物温育前 30 分钟，给小鼠口服 0.3mg 的茶碱（ Dilatrane ），同没有用这一预处理的小鼠相比，可使表达水平略有提高。

本发明的说明书和实施例公开并说清并包含了各实施方案。与本发明所用的任何方法、用途及化合物有关的文献可从公共图书馆中，或用例如电子设备得到。例如，可使用国际互联网上的公共数据库“ Medline ”，例如，在网址 http://ww.ncbi .nlm .nih . gov/PubMed/medline.html 。另外的数据库及网址，比如 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, http://www.infobiogen .fr/, http://www.fmi .ch/biology/ research...tools.html, http://www.tigr.org /,对本领域技术人员是公知的并且可通过例如网址

http://www .lycos.com 获得这方面的信息。在 Berks 著的 TIBTECH 12（ 1994 ）， 352-364 中给出了生物技术领域的专利信息概述及对用于追溯检索和更新信息的相关专利信息源的调查。

本发明的组合物、应用、方法可用于治疗各种疾病，这些疾病的治疗和/或诊断涉及或取决于治疗物质在细胞中的转移。尽管对动物的治疗也包括在本文描述的方法和应用中，但最理想的是将本发明的药物组合物、方法及应用用于人。

下面的实施例 1 到 7 参照图 1 － 5 说明了本发明。

图 1： 质粒 pTG 11033 的图谱

图 2：注射组合物后，肺中编码荧光素酶基因的表达水平（ RLU/mg 蛋白）。该组合物由溶于 pH 值为 7.5 的 20mM Hepes 缓冲液中的 50μg DNA 及 15%（ v/v ） DESO 或 DPSO 组成

图 3： 注射组合物后肺中编码荧光素酶基因的表达水平（ RLU/mg 蛋白质）。所述组合物含有溶于 pH 值为 7.5 的 20mM Hepes 缓冲液中的 50μg DNA 和适当的情况下的 10 或 15%（ v/v ）的不同的极性化合物。所示数值是由用同一组合物注射小鼠后每一观察结果的平均值计算出来的。

图 4： 注射组合物后肺中编码荧光素酶基因的表达水平（ RLU/mg 蛋白）。所述组合物含有溶于 pH 值为 7.5 的 20mM Hepes 缓冲液中的 50mg DNA 和在适当的情况下的 10 或 15%（ v/v ）的 TMU 或 DPSO 。所示数值是由用同一组合物注射 n 只小鼠后所观察每一结果的平均值计算出来的。 SEM： 平均标准误差（见： Burke， 科学数据处理 (Scientific data management)9（ 1997 ）， 32-38 ）。

图 5： 质粒 DNA 解链曲线+/－ DPSO 。将 pH 值为 7.5 的 20mM HEPES 中的 50 μ g/ml 质粒 DNA （ pTG 11033 ），或分别含有 5%， 10%， 15%或 20% DPSO 的 pH 值为 7.5 的 20mM HEPES 中的 50 μ g/ml 的质粒 DNA 加热（ 4 ℃/min ）。记录吸光度并对 35 ℃时的起始吸光度归一化。

从下面的说明性实施例，我们可以更好地理解本发明及其许多优

点。

实施例 1：制备所含极性化合物为 DESO 或 DPSO 的组合物

所选择的多核苷酸，即质粒 pTG 11033（图 1），包括在 CMV 启动子控制下的编码荧光素酶的基因，HMG 基因的内含子 1 以及 SV40 polyA 终止信号。用乙醇沉淀 250 μ l 1mg/ml 的纯化质粒（用氯化铯梯度离心所纯化的）溶液中的质粒 DNA。离心后，用 70%乙醇洗涤并干燥，将核酸沉淀溶解于给定体积的 DESO 或 DPSO 以及 20mM pH 值为 7.5 的 Hepes 缓冲液中，以制备下面表 I 所示的组合物:

	15%DESO（ v/v)	15%DPSO(v/v)
50 μ g 的 DNA/50 μ l	37.5 μ l 的 DESO 20mM Hepes,pH 7.5 足量至 250 μ l	37.5 μ l 的 DPSO，20mM 的 Hepes , pH7.5, 足量至 250 μ l

实施例 2：用气管内注射的给药方式施用该组合物

通过腹膜内注射（生理盐水，IMALGENE 1000，甲苯噻嗪/ROMPUN）麻醉 8 周龄雌鼠（B6/SJLF1，Iffa Credo）。用 70%的酒精消毒皮肤后，切开切口使气管暴露出来，用注射器向气管内注射 50 μ l 实施例 1 中的组合物。每种组合物至少给三只不同小鼠注射。将表达水平与那些用不加任何极性化合物,溶于 50 μ l 20mM pH 为 7.5 的 Hepes 中的 50 μ g DNA 注射后所得结果进行比较。本方法中还包括未经注射的小鼠作为对照。

实施例 3：测量被注射小鼠组织中的荧光素酶的活性。

注射两天后杀死小鼠。分别处理肺及气管。将组织在液氮中冷冻并在-80 ℃下贮藏。为了测量荧光素酶的活性，将组织放在置于干冰中的研钵中进行机械研磨。向从肺或气管中得到的组织碎片中分别加入 500 μ l 或 200 μ l 的裂解缓冲液（Promega），所得溶液经三步冷冻/解冻处理。离心除细胞碎片并根据供应商（Promega)的说明，通过加入 100 μ l 的试剂测量 20 μ l 上清液的发光来测量荧光素酶的活性

（ RLU/min，每分钟相对光单位）。在商业上可得的荧光素酶（ Promega ）所建立的标准尺度的帮助下，将所测量的荧光素酶的活性同蛋白质的量的关系标准化。用 bicinchoninic 酸（ BCA ）比色法（ Smith ,Anal. Biochem. 150（ 1985 ）， 76-85 ）对上清液等分试样比色从而确定蛋白质总量。这样就能用 RLU 每毫克蛋白（从组织中提取的蛋白质）来表示荧光素酶的活性。对于给定的组合物，所研究的活性相当于从三个被注射过的小鼠中得到的平均值。

实施例 4：所得结果

图 2 和图 4 图示了从肺获得的提取物所得的结果。这些结果证明当仅仅用多核苷酸（ 50 μ g ）注射肺组织时，观察不到荧光素酶基因的表达，而注射组合物中加入 DPSO 可促进表达。

这些结果还证明在将所述组合物注入气管后， DPSO 自身是一种有效促进多核苷酸转染进入细胞之能力的化合物，因为同仅注射多核苷酸相比，表达量有明显的升高。

实施例 5：被试验的其它非质子极性化合物

以相同的方式，我们证明根据了本发明可用其他非质子极性化合物。为此，根据在实施例 1 和 4 中所描述的方法制备了各种组合物。具体地说，这些组合物包括： 50 μ g 的质粒 pTG 11033/50 μ l 和可变百分比（ 10%/15% ）的下组的物质： DPSO，环丁亚砜（ TEMSO ），（见 Johnson 和 Keiser， 1973，有机合成论文集(Organic Synthesis Coll.)5（ 1973 ）， 791 ）， DMSO，四甲基脲或环丁砜，然后根据前面实施例 2 中描述的方法，将所得组合物给 8 到 12 周龄的小鼠（ C57BL/6， Iffo Credo ）注射。

所得结果（图 3 和图 4 ）证明了可用各种不同的非质子极性化合物实施本发明。发现在相同的条件下，尤其就浓度而言，同仅注射多核苷酸相比，向气管内注射试验组合物（该组合物含多核苷酸和象上面所列的非质子极性化合物的一种）可显著提高肺细胞转染。

用含有 DPSO 或 TMU 的组合物观测到了最佳结果。对于每种这些极性化合物，都证明了在测试的 DNA 量（ 50 μ g ）下，可以通过提高

所述极性化合物的百分含量来提高所测的编码荧光素酶基因的表达水平（图 4）。

实施例 7：质粒 DNA 解链曲线的记录

质粒 DNA 解链曲线是在恒温的紫外/可见 CARY/VARIAN 分光光度计记录下来的（软件版本：3.04），用两个石英比色环（L=1cm）及 Teflon 终塞子。样品总体积：1ml（50 μ g/ml 质粒 DNA（pTG 11033）溶于 pH7.5 的 20mM HEPES 中，其中含有不同百分比（0，5，10，20/%）的二正丙基-亚砜（DPSO）。温度梯度为 40 ℃/分钟且实验在 260nm、35 ℃到 100 ℃下进行(范围：0.9-1.2OD; 50 μ g ~ 1OD）。DNA 解链曲线（图 5）表明，单独的 DNA（“裸”DNA）与有 DPSO（“溶剂复合物”）存在下的 DNA 的表现不同：在有亚砜化合物存在时吸光度的变化减小并发生在较高温度下。这种情况可被解释为 DPSO 对 DNA 的稳定作用（即需要更高的温度使 DNA 双链解链）。

实施例 8：脂溶剂复合物的气雾剂化

将载体送入呼吸道上皮的最终的形式是气雾剂的形式。但是如果仅用 DNA，那么 DNA 会在气雾化的过程中迅速降解。可以通过将 DNA 复合为脂复合物来避免发生这种情况（将 DNA 同象在专利申请 n^0FR97/15805 中描述过的那些阳离子两亲性物例如 pTG90 复合）。预先已经观察到单独的脂复合物在肺中不引起表达或仅引起低水平的表达。按照本发明，试验了将溶剂复合物（本发明的复合物）和脂类复合物的有利的特性结合起来。为此，制备了脂溶剂复合物（DNA 同阳离子脂类和 DPSO）；使之气雾化，收集在冷阱槽中，然后注射到小鼠气管内。仅向气管内注射脂复合物和 pTG 90/DOPE 并不引起荧光素酶的表达，但是在有 DPSO 存在时，pTG 90/DOPE 脂溶剂复合物会导致荧光素酶的表达。一般来说，气雾化后，脂溶剂复合物试验的表达量会降低，但是对于 pTG/DOPE/DPSO 脂溶剂复合物，仍可观测到到气雾化前相同复合物 86%的活性。

实施例 9：二亚砜的合成

9.1 甲基－二－甲基亚砜(双(甲基亚磺酰基)甲烷 BiMsuM)(=CH_3 － SO － CH_2 － SO － CH_3)。

在室温下将 10.5ml 的 $CH_3SOCH_2SCH_3$（ 12.5g,100 毫摩尔; Aldrich 17.795)稀释于 125ml 甲醇中。搅拌后将该溶液贮藏于 0 ℃下。在 90 分钟内滴加 21.4 克 $NaIO_4$（ 100 毫摩尔)熔于 280ml 水中的溶液。用薄层层析（ TLC，溶剂： CH_2Cl_2/CH_3OH 95/5,用 I_2， $KMnO_4$ 检测， $CH_3SOCH_2SCH_3$， Rf=0.9； $CH_3SOCH_2SOCH_3$， Rf=0.33 ）来控制反应进程。用 Celite 过滤反应混合物，用 300ml 水， 200ml CH_2Cl_2，最后用 200ml 甲醇进行洗涤。

将富集的有机级分汇集，用 Na_2SO_4 干燥并蒸发。

纯化所得产品并将含有两个对映体的级分过柱三次，用 550ml CH_2Cl_2 250ml CH_2Cl_2/CH_3OH 97/3,1000ml CH_2Cl_2/CH_3OH 95/5,以及 1000ml CH_2Cl_2/CH_3OH 90/10 在硅胶柱（ ID 4cm， 100g 二氧化硅于 CH_2Cl_2 中）中洗脱。 BiMSuM 的两种对映体洗脱于级分 95/5 中。用高效液相色谱法对级分进行分析（ NH_2-柱，该柱可分离两对映体）。将一种或另一种对映体的富集级分汇合起来并蒸发。用 NH_2-高效液相色谱法和 ^1H 核磁共振（ 200MH_2， $CDCl_3$ ）进行分析。

对映体纯度 R,S-BiMSuM/R,R-BiMSuM 87/13:4.5g

对映体纯度 R,S-BiMSuM/R,R-BiMSuM 05/95:0.6g

9.2 甲基-二-乙基亚砜（双（乙亚磺酰基）甲烷， BiESuM ）(=CH_3CH_2 － SO － CH_2 － SO － CH_2CH_3)

在室温下将 4ml CH_3CH_2 － SO － CH_2 － S － CH_2CH_3（ 4.45g，29 毫摩尔， FluKa 02845 ）稀释于 25ml 甲醇中。搅拌后将溶液保存在 0 ℃下。滴加 7g $NaIO_4$(33 毫摩尔）溶于 50ml 水中的溶液。在搅拌下，将该反应混合物在 0 ℃下保存 5 小时。用薄层层析（ TLC，溶剂: CH_2Cl_2/CH_3OH 90/10，用 I_2， $KMnO_4$ 检测; $CH_3CH_2SOCH_2SCH_2CH_3$， Rf=0.95;CH_3CH_2SO $CH_2SOCH_2CH_3$， Rf=0.7)控制反应进程。用 Celife 过滤反应混合物，用 300ml 水， 200ml CH_2Cl_2，然后用 200ml 甲醇洗涤。用 CH_2Cl_2，然后用乙酸乙酯将液相

抽提 3 次。将有机级分汇集，用 Na_2SO_4 干燥并蒸发。

纯化所得产品并将含有两个对映体的级分用硅胶柱（ ID 2cm， 38 克二氧化硅于 CH_2Cl_2 中）过柱三次而富集，洗脱剂为 100ml CH_2Cl_2，200ml CH_2Cl_2/CH_3OH 99/1， 200ml CH_2Cl_2 /CH_3OH 97/3,200ml CH_2CI_2/CH_3OH 95/05,200ml CH_2Cl_2 /CH_3OH 92.5/7.5,200ml CH_2Cl_2/CH_3OH 90/10 。 BiESuM 的对映体被洗脱于级分 95/5 中。用高效液相色谱（硅胶柱，该柱可分离两对映体）对级分进行分析。将一种或另一种对映体的富集级分汇集起来并蒸发。用硅胶高效液相色谱和 ^1H 核磁共振（ 200MH_2， $CDCl_3$ ）分析： δ 3.89(五重峰,2H,-SO-CH_2-SO-),3.1(四重峰,4H,-CH_2-),1.40(t,6H,-CH_3)。

级分 1： 对映体纯度 R,S-BiESuM/R,R-BiESuM 84/16:1.9g

级分 2： 对映体纯度 R,S-BiESuM/R,R-BiESuM 16/84:0.075g

本发明所描述的具体实施方案仅仅是对本发明的具体方面的说明而不是要将本发明限制在这一范围中，并且任何功能相同的组合物及化合物应在本发明的范围内。实际上，根据前文的描述及附图，对本发明做除本文示及所描述之外的各种修改对于本领域技术人员来说是显而易见的。所述修改也应落入所附权利要求的范围中。因此，有了对本发明优选实施方案的详细描述，就应当清楚由所附权利要求限定的本发明不限于上面描述的具体细节，因为在不脱离本发明精神及范围的情况下，可以对本发明做出许多显而易见的改变。

说 明 书 附 图

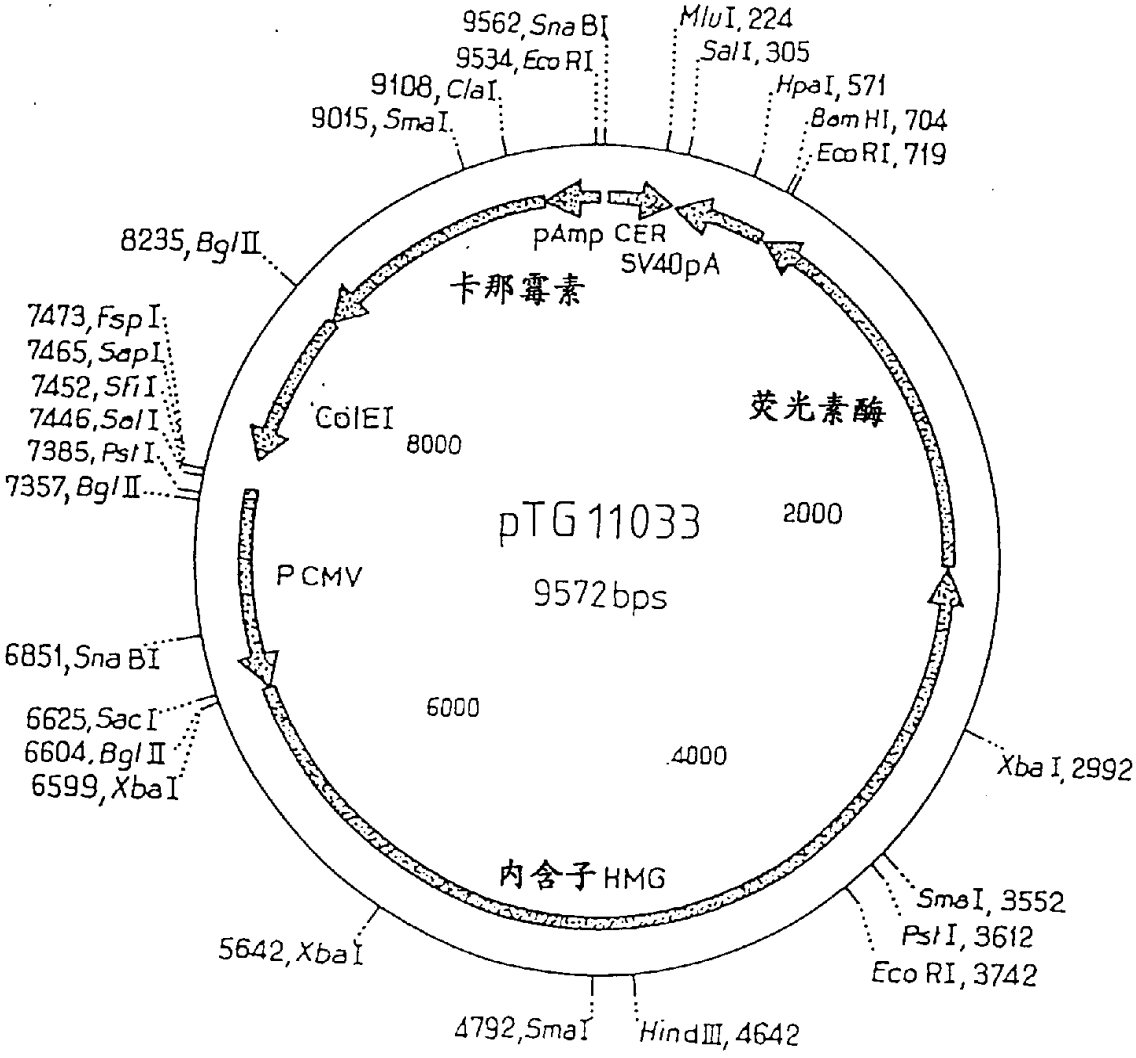

9562, Sna BI
9534, Eco RI
9108, ClaI
9015, SmaI
MluI, 224
SalI, 305
HpaI, 571
BamHI, 704
EcoRI, 719
8235, BglII
pAmp
CER
SV40pA
卡那霉素
7473, FspI
7465, SapI
7452, SfiI
7446, SalI
7385, PstI
7357, BglII
ColEI
8000
荧光素酶
2000
pTG11033
9572bps
PCMV
6851, Sna BI
6625, SacI
6604, BglII
6599, XbaI
6000
4000
Xba I, 2992
内含子HMG
SmaI, 3552
PstI, 3612
Eco RI, 3742
5642, XbaI
4792, SmaI
HindIII, 4642

图1

图 2

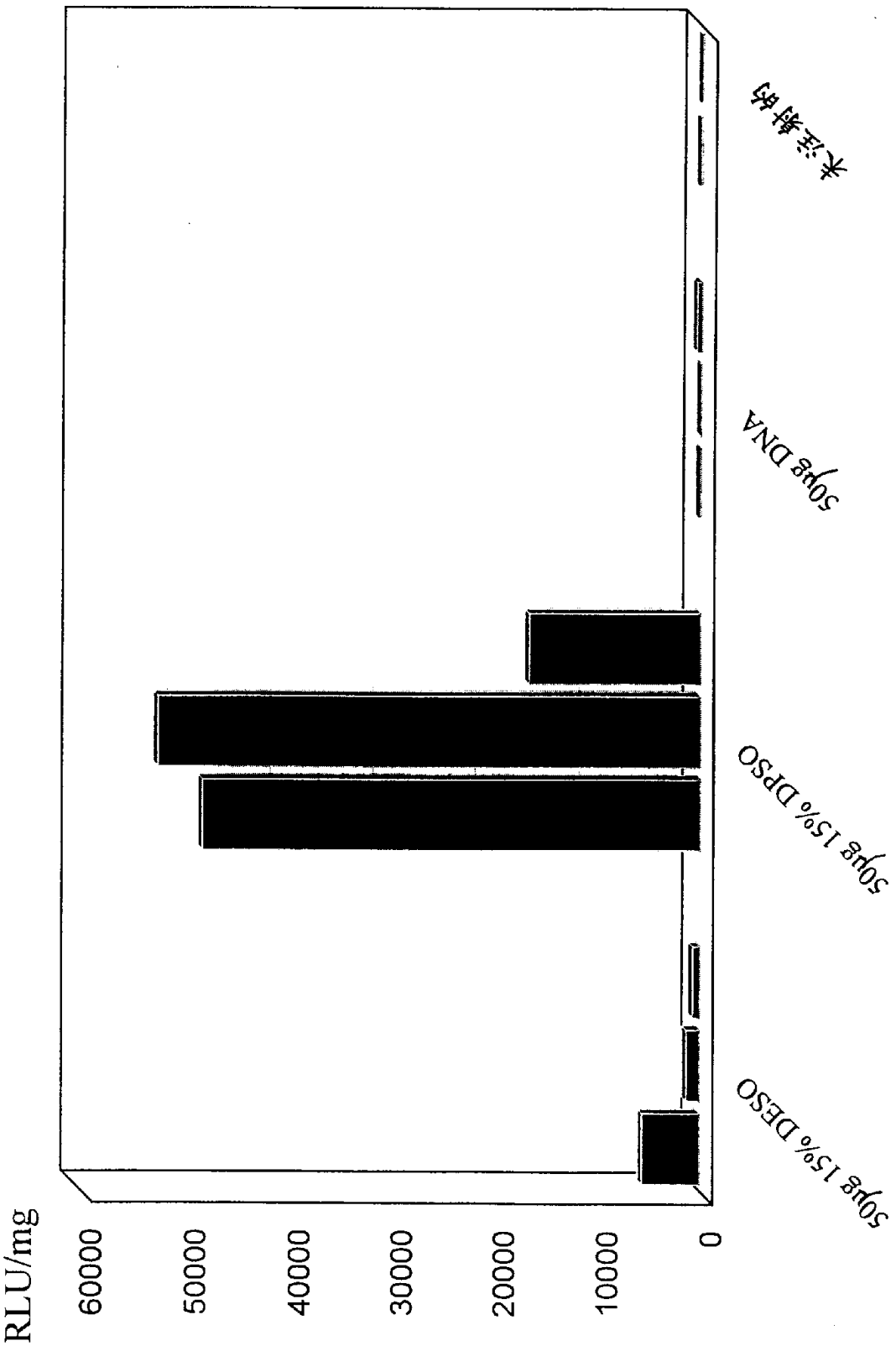

RLU/mg
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
50μg 15% DESO
50μg 15% DPSO
50μg DNA
未注射的

图 3

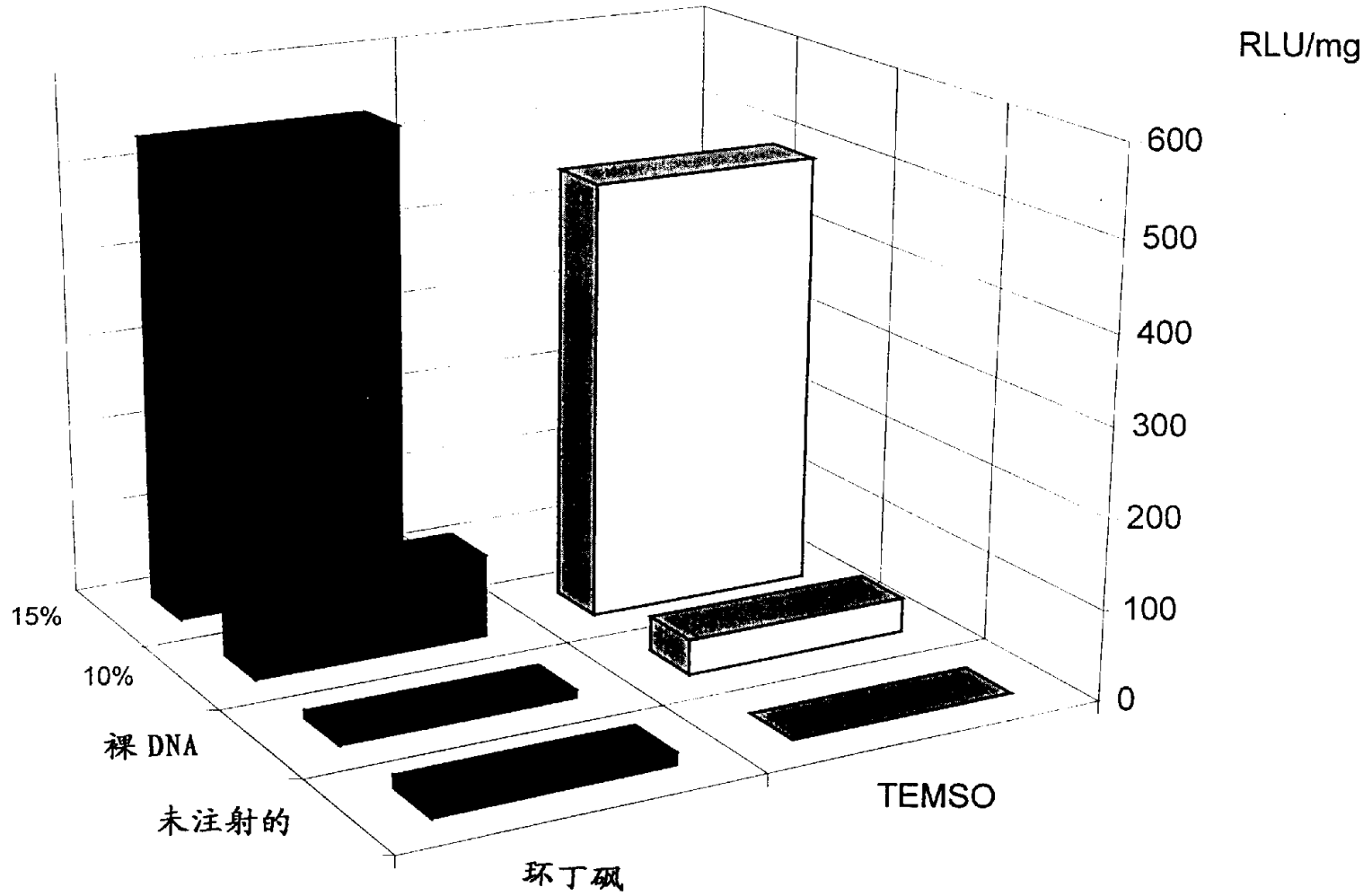


图 4

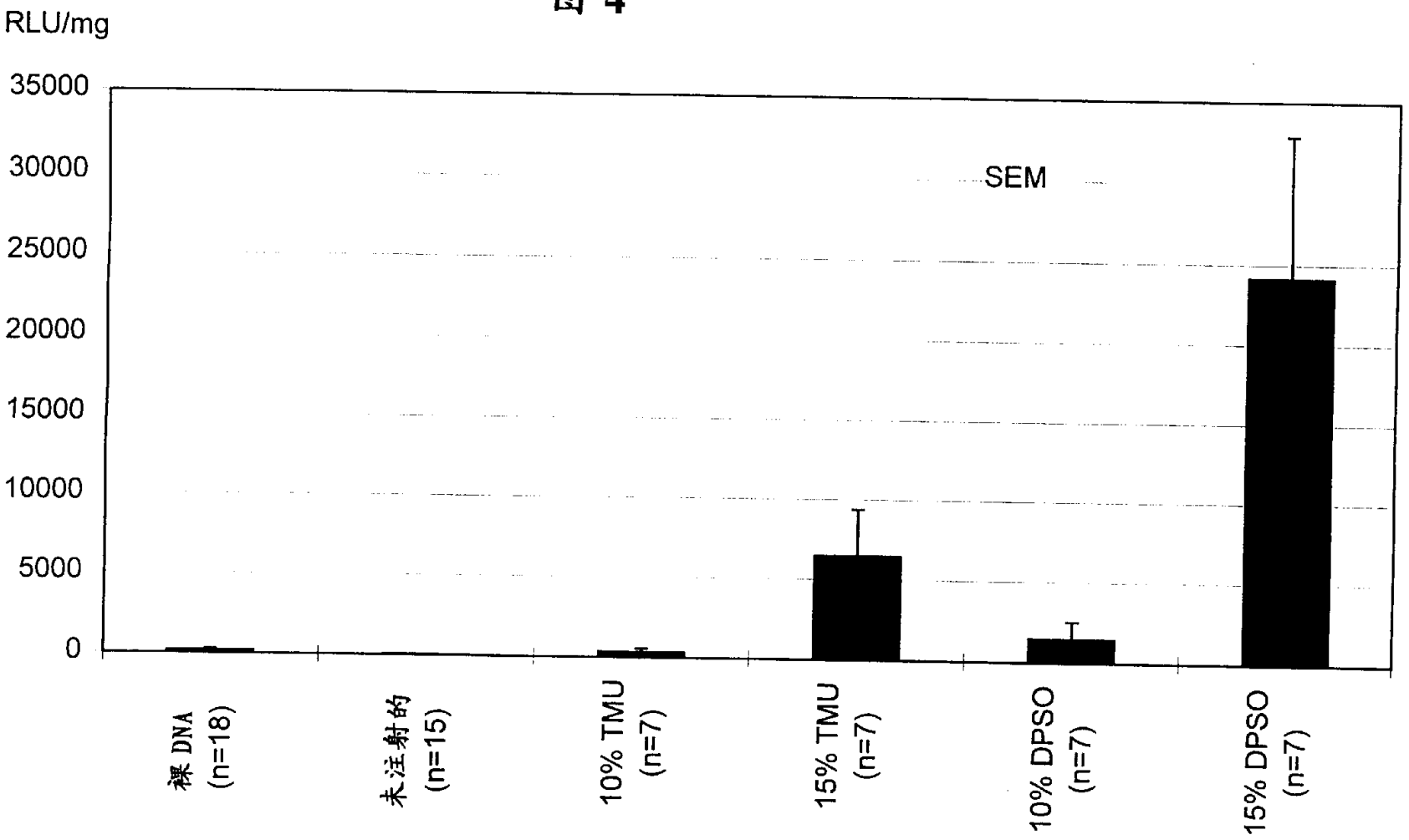
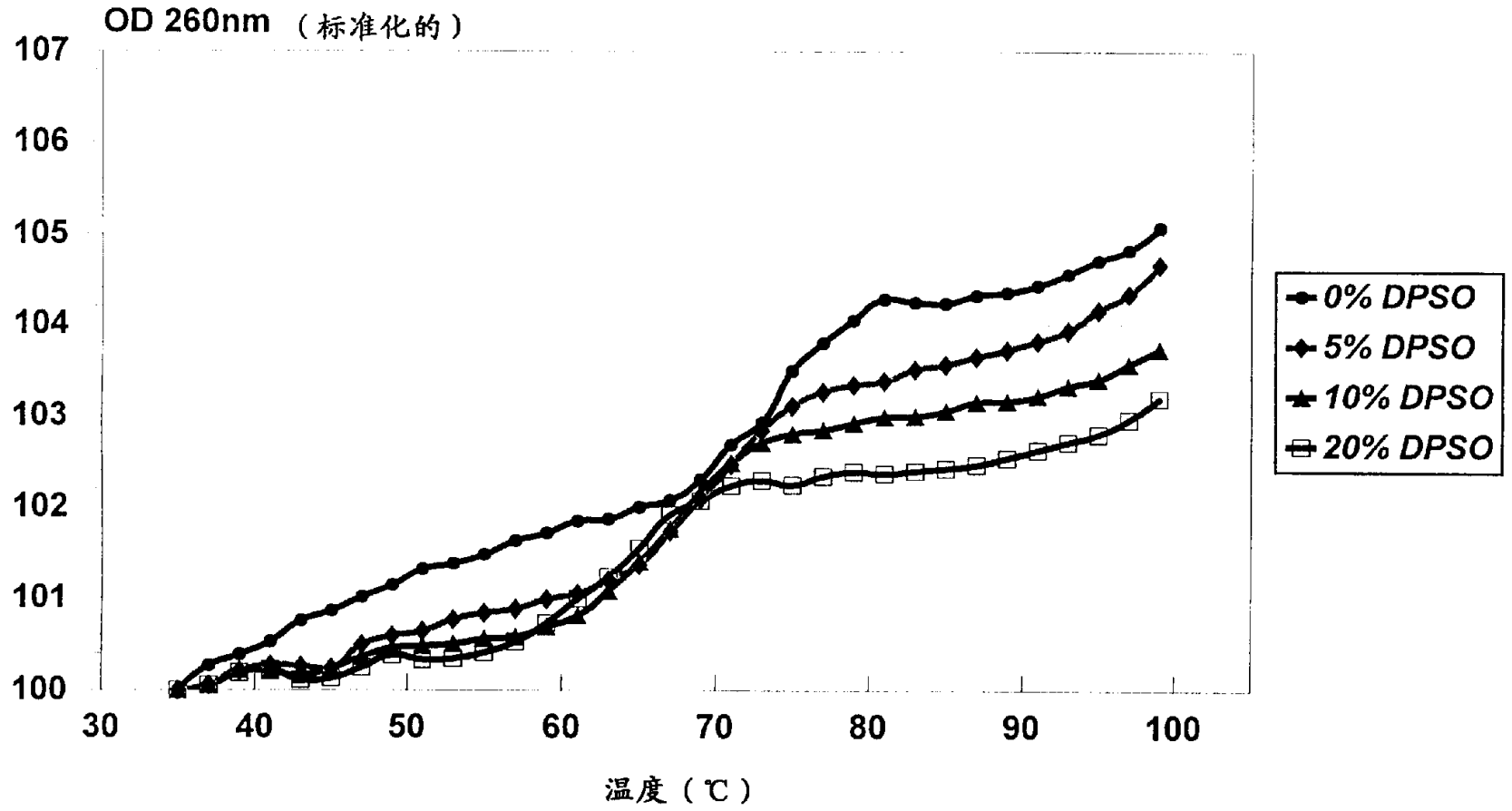

RLU/mg
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
SEM
裸 DNA (n=18)
未注射的 (n=15)
10% TMU (n=7)
15% TMU (n=7)
10% DPSO (n=7)
15% DPSO (n=7)

图 5


OD 260nm （标准化的）
107
106
105
104
103
102
101
100
30
40
50
60
70
80
90
100
温度（℃）
0% DPSO
5% DPSO
10% DPSO
20% DPSO