

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 9/127

A61K 39/00 A61K 48/00

C12P 25/00 C12N 15/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97199674.1

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1138533C

[22] 申请日 1997.9.15 [21] 申请号 97199674.1

[30] 优先权

[32] 1996. 9. 13 [33] GB [31] 9619172.1

[32] 1996. 12. 13 [33] GB [31] 9625917.1

[32] 1997. 7. 1 [33] GB [31] 9713994.3

[86] 国际申请 PCT/GB97/02490 1997.9.15

[87] 国际公布 WO98/10748 英 1998.3.19

[85] 进入国家阶段日期 1999.5.13

[71] 专利权人 利普森有限公司

地址 英国伦敦

[72] 发明人 G·格里克里阿德

审查员 张 伟

[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 樊卫民

权利要求书 4 页 说明书 32 页 附图 3 页

[54] 发明名称 脂质体

[57] 摘要

本发明描述了带有包封到其囊泡中的多核苷酸的阳离子脂质体。该类脂质体含有阳离子的成分，如阳离子脂类(如 DOTAP)。优选的形成脂质体的方法为在多核苷酸存在的情况下应用脱水-再水化的方法。优选地该类多核苷酸可有效地编码一种能诱发一种期望的免疫反应的抗原，也就是说该类多核苷酸是一种基因疫苗。

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

1. 一种含有脂质体和包封在脂质体囊泡中的多核苷酸的组合物，其中脂质体由选自如下成分脂质体形成成分制成：

阳离子成分，选自阳离子脂类，和硬脂酰胺；

选自天然和合成磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸的磷脂；

选自山梨聚糖的脂肪酸单酯和乙氧基脂肪酸的非离子表面活性剂；和胆固醇；

其中多核苷酸是有效编码一种能诱导受试人或动物发生期望免疫反应的免疫原性多肽；

其中脂质体通过脱水-再水化方法形成，在该方法中将多核苷酸和预制脂质体水性悬浮液脱水，然后再水化，以形成脱水-再水化囊泡，在囊泡的内部空间包封多核苷酸。

2. 权利要求1的组合物，其中的多核苷酸是双链DNA。

3. 权利要求2的组合物，其中的多核苷酸以质粒的形式存在，质粒中含有启动子且任选地含有核糖体结合序列。

4. 权利要求1的组合物，其中的多核苷酸是RNA。

5. 权利要求4的组合物，其中的多核苷酸是mRNA。

6. 权利要求1的组合物，其中的免疫原性多肽含有一种抗原或一种感染性微生物抗原的片段。

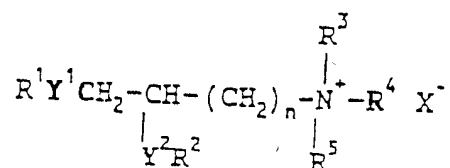
7. 权利要求1的组合物，其中的脂质体形成成分经选择以使脂质体总体上不带电荷。

8. 权利要求1的组合物，其中的脂质体形成成分包括至少一种带正电荷的脂质体形成成分，所用的量应可使脂质体形成成分总体上带正电荷。

9. 权利要求8的组合物，其中脱水-再水化囊泡经历微流态化处理或挤出处理。

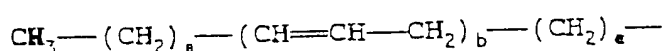
10. 权利要求8的组合物，其中的阳离子成分是一种甘油酯，其通

用分子式如下:



或者是其光学异构体,其中 Y^1 和 Y^2 可相同或不同,且它们是-0-或0-C(0)-,其中羰基碳依情况与 R^1 或 R^2 相连; R^1 和 R^2 独立地是一种含6—24个碳原子的烷基、链烯基或炔基, R^3 、 R^4 和 R^5 独立地是氢原子、含1—8个碳原子的烷基、6—11个碳原子的芳基或芳烷基;或者, R^3 、 R^4 和 R^5 中的两个或三个与带正电荷的氮原子接合而形成含有5—8个原子的环状结构,环状结构中除了带正电荷的氮原子外,结构中的原子是碳原子,且可以包括氧、氮或硫原子; n 为1—8;且 X 是一种阴离子。

11. 权利要求10的组合物,其中 R^1 和 R^2 各自有0—6个不饱和位点,结构如下:



其中, a 和 c 的总和从1—23;且 b 为0—6。

12. 权利要求8的组合物,其中的阳离子成分选自:1,2-二(油酰氧基)-3-(三甲基铵)丙烷,1,2-二(十六烷氧基)-3-三甲基氨基丙烷,3β[N-(N',N'-二甲氨基乙烷)氧甲酰基]胆固醇和硬脂酰胺。

13. 权利要求1的组合物,其中脂质体形成成分包括一种聚集性成分。

14. 根据权利要求13的组合物,其中聚集性成分是磷脂酰乙醇胺。

15. 权利要求1的组合物，其中脂质体的平均直径范围为100～1000nm。

16. 根据权利要求15的化合物，其中平均直径为200-500nm。

17. 权利要求1的组合物，其包括每毫克脂质体形成成分中含0.1—10 μ g的多核苷酸。

18. 权利要求1中定义的脂质体在制造适合于人类或动物的治疗或预防方法的组合物中的用途。

19. 权利要求18的用途，其中该方法是通过接种而产生针对感染性微生物或肿瘤细胞的免疫反应。

20. 权利要求18的用途，其中组合物通过肌肉内注射皮下注射、静脉内注射、腹膜内注射方式施用。

21. 一种药物组合物，其含有权利要求1中的脂质体制剂和药学可接受的赋形剂。

22. 一种把多核苷酸包封到脂质体中的方法，包括下述步骤：

1). 制备一种含有裸露多核苷酸和预制脂质体的水性悬浮液，其中预制脂质体由选自如下成分的脂质形成成分制成：

阳离子成分，选自阳离子脂类，和硬脂酰胺；

选自天然和合成磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸的磷脂；

选自山梨聚糖的脂肪酸单酯和乙氧基脂肪酸的非离子表面活性剂；和胆固醇；

该多核苷酸有效地编码一种能诱发受试人或动物产生期望免疫反应的免疫原性多肽，

2). 冷冻干燥该悬浮液；

3). 把步骤2的产物进行再水化处理，形成脱水-再水化囊泡，其中多核苷酸被包封到囊泡内；

4). 把步骤3的脱水再水化囊泡的水性悬浮液进行微流态化处理；
且

5). 任选地从脂质体中分离未经包封的多核苷酸。

23. 权利要求22的方法，其中脂质体为阳离子脂质体。

24. 权利要求22的方法，其中步骤1) 悬液多核苷酸的包封率范围为10—90%。

25. 权利要求22的方法，其中步骤1) 中悬液中多核苷酸的包封率范围为10—50%。

26. 权利要求22的方法，其中终产物中多核苷酸水平范围为每毫克脂质体形成成分中有0.1—20 μg 多核苷酸。

脂质体

本发明涉及了含有被包封的多核苷酸的脂质体的组合物,其中的多核苷酸可编码一种期望的多肽。该种多肽可优选地编码一种免疫原性的多肽,其可用于使受试个体产生一种期望的免疫反应,例如用于针对感染性微生物的预防性免疫法,或用于免疫治疗的治疗方案。该类脂质体优选地包含至少一种带正电荷的脂类,且优选地通过一种脱水-再水化的技术制备而成。

已知可以把遗传性物质引入受试的人体或动物以用于多种目的。在本世纪60年代中期,人们就知道把正常的基因序列引入携带缺陷的对应基因序列的病人中用于治疗一些遗传性疾病的技术。当前正在进行一些应用基因治疗来治疗多种遗传性疾病的试验。例如,已经进行了针对囊性纤维化的治疗的大量工作,这是通过引入了一种可以编码囊性纤维化(CF)跨膜传导调节剂的DNA。由于该基因产物在肺脏中是必需的,现在已经做了很多尝试把这种基因直接或通过鼻腔送入肺中。

最近基因治疗被建议用于治疗癌症。例如,人们希望通过把编码肿瘤坏死因子(TNF)或白介素-2的基因引入淋巴细胞或肿瘤细胞来诱发一种免疫反应使肿瘤破坏。另外,人们也希望把可编码人类1型主要组织相容性抗原(HLA-B7)的基因引入不能表达这种抗原的病人之肿瘤细胞,来诱发一种免疫反应使肿瘤细胞破坏。

有很多载体被建议用于基因治疗中核酸的输送和表达(Mulligan, 1993)。它们包括病毒(如逆转录病毒和腺病毒)和非病毒载体(如阳离子聚合物和囊泡)。然而,这些载体都存在着缺点,例如:整合到细胞染色体的逆转录病毒可产生副反应,增加抗病毒蛋白的免疫反应而不能用于长期治疗(Kay等, 1994);非病毒载体则可导致瞬时或低效率的转染(Legendre和Szoka, 1995)。但是DNA整合入非病毒载体时要相对简单一些,通常不用考虑DNA的大小和结构,同时这些非病毒载体

具有非病原性的特征，这就使这类载体非常具有吸引力。现在，构建体（由预制的阳离子囊泡和质粒DNA组成的复合物）在体外已经显示了高的转染指数（Felgner, 1991），而在试验动物体内则显示了中低等的转染（Alton等, 1993; Zhu等, 1993）。另一方面，由于这种复合物的潜在毒性（Raz等, 1994）和无法与其它一些可促进DNA转染效率的药物整合，所以与可整合核酸的常规脂质体相比，它们在体内的应用就没有什么前途。经过恰当的设计（在囊泡的大小、表面电荷和脂类组成等方面），这些脂质体可在血液循环中维持稳定（Scherphof等, 1983; Gregoriadis, 1995）从而使它们的核酸内容物避免受到血浆中核酸酶的作用，或者使核酸内容物维持一个有利的清除率以发挥其最理想的作用（Gregoriadis, 1995）。而且，在长效脂质体的表面联接细胞特异性的配体可引导核酸选择性地到达靶细胞（Gregoriadis, 1995）。在含有核酸的脂质体中整合其它试剂也可使它们发生聚合，从而更好地避免内容物从核内体泄露到胞浆中或促进DNA运输到细胞核中（Legendre和Szoka, 1995）。但是，把DNA包封到脂质体中的大多数技术都存在着不足（Gregoriadis, 1993），这些技术如果与DNA的大小或所使用的环境（如超声处理、有机去污剂和溶剂）不相容就可破坏DNA的完整性。

WO-A-9117424（Vical, Inc）描述了可改善细胞内运输的由带正电荷和负电荷的脂类与活性化合物所组成的多种复合物。其指出可以克服多核苷酸包封到阳离子脂质体中的低效率，方法是：把由预先形成的带正电荷的脂质体和多核苷酸（带负电荷）所组成的带净正电荷的复合物与一种过量的预制的带负电荷的脂质体结合，据说后者可包裹带正电荷的复合物。但是，由于多核苷酸没有包封在囊泡的内部，所以认为它能接触到血浆中的核酸酶。

在US-A-4, 897, 355中，Eppstein等（Syntex）描述了由阳离子脂类所制成的脂质体，其可用于活性化合物的细胞内运输。其中一种活性化合物的例子是多核苷酸，例如编码用于酶缺乏条件下的酶，用于激素替代疗法的激素、凝血因子、神经递质、抗病毒化合物和抗肿瘤化合物，或者用于可选择性抑制某些特定蛋白质表达的反义RNA的运输。首先，

活性化合物与预制的空脂质体相混合,接着所形成的结合物又任选地与下一种预制的脂质体相混合。

在1996年的靶向药物杂志(待发表)中, Gregoriadis等描述了利用脱水-再水化方法制备带有用于基因治疗的包封DNA的脂质体。

在1995年的“药物的靶位:治疗中寡核苷酸和基因输送的策略”会议上及随之由G. Gregoriadis和B McCormack编辑的本次会议的会议录(1996年出版中, Plenum出版社, 纽约)中, Davis讨论了在基因治疗中,由于对抗导入细胞内的基因产物而导致的不良免疫反应。她提出经引入细胞内的基因所诱导的免疫反应的研究对优化基因治疗方案和转移基因的DNA-接种疫苗(基于DNA的免疫法)的应用是非常重要的。她描述了与基于抗原的疫苗相比基因疫苗存在许多优点,同时她还描述了应用裸露DNA进行的基于DNA的免疫法对乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的一些实验结果。

在同一次会议上, Behr描述了用于基因治疗的多核苷酸序列的合成性载体,该载体是由缩合时据称可自装配在DNA周围的脂多胺组成。多核苷酸旨在到达细胞核。发明者认为这些自装配的颗粒不由双分子层所组成,所以它们不能被认为是脂质体。

在IPC的第二届年会(于1996年10月23日至24日在美国华盛顿召开)——“基因疫苗和免疫治疗策略”的准备会议上,有消息说Felgner将报告应用阳离子脂类以改进编码抗原的基因运输的最新研究进展。该基因通过鼻腔输送进入肺组织而激发粘膜免疫性。就在这一次准备会议上,有人肯定Ledley将报告可控制生物利用度和DNA进入粘膜细胞的含有阳离子脂类的基因输送系统。该系统被期望用于诱发一种有效的免疫反应。关于基因输送是如何进行的本次会议的公报并没有给出更多的消息。

增加多核苷酸在脂质体输送系统中的包封率是人们所期待的。而且,增加基因产物,特别是那些治疗性的产物在动物循环系统中的水平也是人们所期待的。增加基因到达靶细胞输送率也是人们所期待的,其中基因产物在此作为一种抗原。而改善可编码免疫原性多肽的多核苷酸

的输送率则更是人们所期待的,其中多肽可诱导产生一种期望的免疫反应。

本发明的第一方面提供了一种新的组合物,它含有脂质体和包封于脂质体中的可编码一种免疫原性多肽的多核苷酸,其中该多肽可诱导受试的人或动物产生一种期望的免疫反应。

在这份说明书中,术语“包封”是指多核苷酸位于囊泡内。因而脂质体应在多核苷酸存在的情况下被制成。这和现有技术中由预制脂质体和多核苷酸组成的复合物相反。

在本发明的这一方面中,基因产物应是一种可诱导产生期望免疫反应的抗原。因而,该肽类包含有一个或多个感染性微生物(如病毒、细菌或真菌)的抗原决定簇。本方法特别用于对抗细菌、真菌和病毒(特别是流感、HIV、乙型肝炎和丙型肝炎)的免疫反应。因此,该基因产物可以是HBsAg和丙型肝炎核心蛋白,或者是一种流感病毒的抗原或一种抗原性的HIV肽类或片段。本发明中其它基因产物也很有价值,它可以是一种或多种单纯疱疹病毒蛋白,一种癌症病毒(如SV40)产物,或者是一种癌症抗原,结核病抗原,甚至是多种复杂微生物(如寄生虫:疟疾)的抗原。

在本发明中吸收脂质体的靶组织可以是肌肉、皮肤、肝脏、将被破坏的脾脏癌细胞、粘膜细胞(例如鼻腔,肺部或肠道中)和特别是位于淋巴结的细胞。基因疫苗的靶细胞通常是一些抗原提呈细胞。该组合物可系统性施用,例如通过静脉注射,或者直接将其施用到靶组织,例如鼻腔内、粘膜内或皮内,甚至透皮或口腔给药。本发明首次成功地通过皮下施用脂质体而产生免疫反应。这是本发明优选的一方面,因此该组合物可皮下给药。

在这份说明书中,术语“脂质体”是指由一种双分子层环绕而成的囊泡,该双分子层通常由脂类成分和任选地非脂类成分组合而成。

使脂质体的外部表面含有一种“寻靶”成分是人们所期待的,例如含有一种抗体,这有利于脂质体识别靶组织。例如组合物被施用于循环系统中,外部表面附着细胞特异性配体的脂质体将引导核酸到达靶细胞

(Gregoriadis, 1995)。

基因应该以一种合适的形式存在从而可在靶细胞中产生期望的产物，因而优选地，包括可促进在靶细胞中表达的调节元件。因而多核苷酸应包含一种启动子，及调节核糖体结合的区域，且任选地也包括可增强基因表达的其它一些区域。

该多核苷酸可以是RNA，但是优选DNA，如双链DNA。通常是采用质粒的形式，而优选采用基本上非复制型的质粒，因为对本发明的这一方面来说，维持暂时的活力达几周或几个月通常是适合的。

在本发明的这一方面，用于制备脂质体的脂质体形成成分包括中性、两性、阴离子和/或阳离子脂类成分。通常，使用相对数量的这些成分以使脂质体的总体带电荷，或者不甚优选地使脂质体总体带电荷为零。在本发明的这一方面中，我们发现应用可使脂质体总电荷为正电荷的脂类成分能提供改进的结果，例如使用该脂质体来输送编码抗原的基因可增加免疫反应。另外，除了通常意义上的脂类成分（包括甘油酯和胆固醇），脂质体形成成分可包括一些非脂类成分（即非天然产生的脂类），如非离子或阳离子表面活性剂。

根据本发明的一个特别优选实施方案，新的组合物含有由一些脂质体形成成分制备而成的脂质体，包括至少一种带正电荷的成分，其在数量上应使脂质体显示出总体呈正电性。

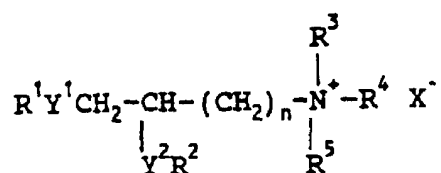
据信，这是首次把多核苷酸包封到一种阳离子脂质体中。因此本发明的第二方面，提供了一些由脂质体形成成分制备而成的脂质体，和编码一种期望多肽产物的多核苷酸，其特征不在于多核苷酸包封于脂质体内，其中脂质体形成成分中包含有至少一种带正电荷的成分。

因而，本发明在体外系统中证明了：与其它一些使用不带电荷的脂质体或带负电荷的脂质体的方法相比，编码荧光素酶标记蛋白的DNA的包封可提高荧光素酶的表达水平。而该表达水平与应用预制带正电荷的脂质体（商业上可获得的LipofectAMINE（商标））复合物时的表达水平相比则要低一些。人们期望通过包封可使该复合物原先体内表现出对核酸酶的攻击之抗性得以改进。另外，我们发现这些脂质体不能迅速

聚集，而对混合的预制脂质体-多核苷酸系统来说特别是存在血清蛋白质条件下，能够发生这样的聚集。多核苷酸的包封可提高在脂质体表面上“寻靶”配体的自由度，或可使对含有活性成分的脂质体进行其它表面处理的自由度增加。人们期望获得模式蛋白质荧光素酶的高表达水平，而这样的基因产物是一种可诱导发生一种期望免疫反应的抗原。

上述结果已经为一些实验所证实，这些实验表明利用由脂质体包封的pRc/CMV HBS（编码乙型肝炎表面抗原S区，ayw亚型）通过多种途径所接种的老鼠可产生体液和细胞介导的免疫反应，这与老鼠是近亲交配（Balb/c）还是远系繁殖（T/O）及注射的途径（肌肉注射（im），皮下注射（sc），静脉注射（iv）和腹膜内注射（ip））无关。与同等条件下应用裸露的DNA方法相比，本方法所产生的大多数免疫反应显著增强（请看下面的实施例5）。

在本发明的这个实施方案中，阳离子成分被整合到脂质体中，这些成分可以是为提高转染率而在制备脂质体时与多核苷酸复合的任何一种物质。这些成分可以是脂性或非脂性的化合物，且可以是合成或天然的。优选的阳离子脂类是：1、2-二（油酰氧基）-3-（三甲基铵）丙烷（DOTAP），1、2-二（十六烷氧基）-3-三甲基氨基丙烷（BisHOP），N-[1-（2、3-二油酰氧基）丙基]-N、N、N-三甲基氯化铵（DOTMA）和其它一些如US-A-4, 897, 355中的I型结构的脂类（此处引入作为参考）或酯类似物。其结构如下所示：



或者是上述物质的光学异构体。其中Y¹和Y²可相同也可不同，且它们是-O-或O-C(O)-，其中羰基碳依情况可与R¹或R²相连；R¹和R²可以独立地是一种含6—24个碳原子的烷基、链烯基或炔基，R³、R⁴和R⁵可以独立地是氢原子、1—8个碳原子的烷基、6—11个碳原子的芳基或

芳烷基；或者， R^3 、 R^4 和 R^5 中的两个或三个与带正电荷的氮原子接合而形成一个含有5—8个原子的环状结构；环状结构中除了带正电荷的氮原子外，还有碳原子，且还可包括氧、氮或硫原子； n 为1—8；且 X 是一种阴离子。

在优选实施方案中，组合物中 R^1 和 R^2 各自有0—6个不饱和键，结构如下：



其中， a 与 c 之和从1—23；且 b 为0—6。最优选的， R^1 和 R^2 均是油酰基。特别优选的实施方案中组合物所含的长链烷基基团为脂肪酸，即 Y^1 和 Y^2 相似，均为 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ 。

或者，我们可使用或US-A-5, 459, 127中所示的I型通式结构的或II型通式结构的阳离子脂类（此处引入作为参考）。

其它一些合适的阳离子化合物是非脂类成分硬脂酰胺（SA）和3 β [N-（N' N' -二甲基氨基乙烷）-氧甲酰基]胆固醇（DC-Chol）（一种脂性成分）。

除了含有阳离子成分外，脂质体通常也含有一些非离子和/或两性离子的成分，包括脂成分，其可以是磷脂类或其它一些不含有磷脂酰基团的脂类。优选地，这些脂类应包含有磷脂，如任何一种天然或合成的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸，任一这些磷脂的长链烷基基团（可通过酯键或醚键连接）可以是饱和或不饱和的。优选地，甘油酯的酰基基团是不饱和的。这样的成分包括一些非脂性成分，如非离子的表面活性剂[如山梨聚糖的脂肪酸单酯，和/或乙氧基脂肪酸或其它一些类似物（如乙氧基羊毛脂）]。

如果脂质体含有聚集性的脂类成分则可以获得最好的结果，该类成分通常是一些含不饱和酰基基团的磷脂酰乙醇胺。胆固醇也应属于此类成分，尽管就使多核苷酸充分输运进到靶细胞而言它看起来可使脂质体过于稳定。

阳离子成分的数量优选的占到脂质体形成成分总摩尔数的5—50

%, 优选地, 应占到10—25%摩尔数。

脂质体组合物通常为一种水性悬浮液的形式, 例如一种生理性缓冲液。或者, 它也可是一种用于再水化的干组合物。

脂质体可应用任一常规制备脂质体的技术来获得。脂质体产物可以是多层或单层囊泡, 且可以相对大一些(囊泡直径范围为300—2000nm, 优选的平均直径为500—1000nm), 或小一些(囊泡直径范围为100—400nm, 优选的平均直径为200-300nm)。优选地, 这些脂质体的平均直径不超过500nm, 且优选的基本上直径都小于2000nm。

该类脂质体优选的通过如下的方法来制备, 形成囊泡后与要被包封的核苷酸混合, 再进行脱水处理, 优选为冷冻干燥。接着, 应在水溶液组分中进行再水化以制备脱水-再水化囊泡(DRV), 然后优选地再经过微流态化或“挤出”处理以减小囊泡的平均粒径。优选地, 在进行再水化和/或微流态化处理之后, 应通过离心或分子筛色谱的方法把没有被包封的材料与脂质体分离。

本发明提出了使用DRV可增加多核苷酸的包封水平的方法。如本发明的第一方面的方法提供了一种把多核苷酸包封到脂质体中的方法, 包括步骤:

1. 制备一种水性悬浮液, 其中含有裸露的多核苷酸和预制的脂质体, 该多核苷酸有效地编码一种免疫原性多肽, 该多肽可诱发受试的人或动物产生一种期望的免疫反应,
2. 将该悬浮液冷冻干燥,
3. 将第二步的产物进行再水化,
4. 将由第三步所得的脱水-再水化囊泡的水性悬浮液进行微流态化处理; 且
5. 任选地将没有被包封的多核苷酸从脂质体中分离。

如本发明的第二方面的方法提供了一种把多核苷酸包封到脂质体中的方法, 包括步骤:

1. 制备一种水性悬浮液, 其中含有裸露的多核苷酸和预制的阳离子脂质体,

2. 将制得的悬浮液冷冻干燥,
3. 将第二步的产物进行再水化,
4. 任选地将由第三步所得的脱水-再水化囊泡的水性悬浮液进行微流态化处理; 且
5. 将没有被包封的多核苷酸从脂质体中选择性地分离。

本发明两种方法中的脱水-再水化处理基本上与1984年Kirby和Gregoriadis所报告的方法一样(该方法的内容此处引入作为参考)。因而分别地, 由步骤1中所得的是小单层脂质体(SUV), 而由步骤3中得到的多为多层脂质体(MLV)。步骤3所得的脂质体产物通常被称为脱水再水化囊泡(DRV)。DRV的微流态化处理基本上与WO-A-92/04009所报告的方法一样, 该方法于1990年由Gregoriadis等人公开(此处引入作为参考)。

通过应用DRV技术, 本发明人已经建立了能使整个溶质的包封率达到10%以上的方法。本发明人也建立了能把高达90%甚至更多的存在于水性悬浮液中的多核苷酸经过冷冻干燥处理包封到脂质体中的方法。而且, 尽管微流态化可导致被整合的多核苷酸的百分数减少, 但仍然可使多核苷酸的包封率超过10%, 例如高达50%。多核苷酸包封到脂质体组合物中的水平优选是 $0.05-5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ 脂类的范围, 更优选的为 $0.1-1.0 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$, 更优选为 $0.2-0.5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ 脂类(或者 $0.1-10 \mu\text{gDNA}/\text{mg}$ 脂类)。

本发明的这一方面可优选用来制备头两方面的脂质体。

本发明第二方面中, 作为另一种产物, 尽管多核苷酸优选编码免疫原性的多肽, 其可使受试个体产生期望的免疫反应, 但脂质体也可用来输送具有其它用途的基因, 例如可用来进行基因替代疗法、基因增加疗法、基因免疫疗法(如可用于癌症治疗)、引入编码具有治疗作用的活性多肽基因和引入编码细胞毒素的基因(即对细胞具有毒性作用的化合物, 如可用于杀死癌细胞)。

本发明也包括一些新的脂质体的使用或应用本发明的一些新方法制备的脂质体, 它们可应用于制备用于治疗或预防方法中的组合物。例

如其方法可以通过免疫法(接种疫苗)使受试的人或动物避免受到感染性微生物的感染。或者,可用于免疫治疗的基因产物所产生的免疫反应,例如用于治疗癌症。另外,多核苷酸可用于在基因增加或基因替代疗法。

本发明也提供了由第一方面或第二方面的一种新的组合物在体外的一个新用途,或是提供了本发明方法的产物在进行人或动物细胞转染时的一个新用途。这些细胞可随后在体外进行培养,且/或可随之被植入到提供这些细胞的病人体内。因而本发明包括一种离体移植方法,例如在WO-A-93/14778中所描述的方式,其内容此处引入作为参考。

本发明也提供了一种新的药物组合物和一种药物可接受的载体,该组合物包括如第一方面的脂质体组合物或第二方面的产物。该组合物可适合通过注射给药,如静脉注射(i.v.)、肌肉注射(i.m.)、腹膜内注射(i.p.)、口服或皮下注射(s.c.)。或者,该组合物适合通过吸入方式经鼻腔给药或直接输送到肺部,或者适合透皮输送。可以使用常规的适于脂质体给药的药用载体。发明人发现本发明允许使用肌肉注射的方法来注射使用cDNA,然而,对过去用作疫苗的裸露的DNA,人们必须遵守特别高度控制的注射方法以避免对肌肉组织的损害,且要注意在完全相同的部位进行注射以得到可靠的可比性结果。例如,已发现肌肉再生药物必须提前给药以增强反应。

本发明也提供了一种新的治疗方法,该方法中把新的药物组合物施用于受试的人或动物。因而该方法是一种通过多核苷酸编码的一种抗原(例如一种感染性微生物的抗原)来诱发一种免疫反应的方法。或者,该方法是一种可用于免疫治疗、用于基因替代或基因增加治疗的方法,例如用于治疗癌症或用来施用编码具有药用多肽的多核苷酸。

下面的实施例阐明了本发明。在一些实施例中,编码荧光素酶的DNA被作为一种模式多核苷酸,而荧光素酶则是一种模式基因产物。

附图则展示了一些实施例的结果:

图1是一系列直方图,显示了实施例2和图表4的结果。

图2是一系列直方图,显示了实施例3的结果。

图3是一系列直方图，显示了实施例4的结果。

图4-8是一系列直方图，显示了实施例5的结果。

实施例1——编码荧光素酶的DNA的包封和复合及细胞的体外转染材料

卵磷脂酰胆碱(PC)、硬脂酰胺(SA)和1、2-二(十六烷氧基)-3-甲基氨基丙烷(BisHOP) 的来源和级别已有描述(Tan 和 Gregoriadis, 1989)。N-[1-(2、3-二油酰氧基)丙基]-N、N、N-三甲基氯化铵(DOTMA)由GeneMedicine赠送(休斯顿,德克萨斯,美国)。磷脂酰丝氨酸(PS)和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)来自Sigma化学公司(Poole, Dorset, 英国)。用于表达由SV40启动子开始的荧光素酶报告基因的pGL2对照(约 3.99×10^6 道尔顿)的真核细胞表达载体是从Promega(南安普顿,英国)购买。使用前按15: 1(wt: st)比例,在含有GLUTAMAX 1(Gibco BRL)的OptiMEM 1减少的血清培养基中,把阳离子LipofectAMINE(获自Gibco BR, Paisly, 英国)与pGL2相混合。脱氧核糖核酸酶I(牛的胰脏, II型, 比活性: 2500Kunitz单位/mg蛋白)从Sigma化学公司购买。RQ1脱氧核糖核酸酶(1单位/ μ l)和荧光素酶检测体系试剂盒从Promega购买。pGL2质粒DNA用 35 S-dATP(37 kBq; ICN Flow, Thame, 英国)应用Wheeler和Coutelle方法(1995)进行放射性标记。所有的其它试剂均为分析纯。

方法

质粒DNA整合到脂质体中

将pGL2质粒DNA掺入到脂质体中时应用了脱水-再水化的方法(Kirby和Gregoriadis, 1984)。简而言之, 2ml小单层囊泡(SUV)分别含有PC(16μ mol)和DOPE(摩尔比为1: 1); PC(16μ mol)、DOPE和PS(摩尔比为1: 1: 0.5, 带负电荷); PC(16μ mol)、DOPE和SA或BisHOP(摩尔比为1: 1: 0.5, 带正电荷); PC(16μ mol)、DOPE和DOTMA(摩尔比为1: 1: 0.25, 带正电荷); 和DOPE(16

μmol)和DOTMA(摩尔比为1: 0.25, 带正电荷)。应用已知方法(Kirby和Gregoriadis, 1984)进行制备这些小单层囊泡, 随之与 $10-100\mu\text{g}$ ($10-100\mu\text{l}$)已预先加入了痕量 ^{35}S 标记的质粒DNA pGL2 ($6\times 10^4-7\times 10^4\text{dpm}$)的pGL2相混合, 冷冻干燥过夜。随之进行可以控制的再水化处理(Kirby和Gregoriadis, 1984), 从而得到多层脱水-再水化囊泡(DRV)(Gregoriadis等, 1993), 然后以 $40000\times g$ 离心25分钟以除去没有掺入的DNA。这些脂质体小球悬浮在含有0.9%的NaCl, pH为7.2的0.1M的磷酸钠缓冲液(PBS)中, 再次离心。把清洗过的小球再次悬浮于PBS中, 并在 4°C 储存待用。在分离实验中, 把混有游离未掺入的DNA之如上含有DNA的DRV用M110S型微流态化仪(Microfluidics, Newton, MA, 美国)进行微流态化处理, 一共进行3个循环或1、2、3、5和10个循环(仅仅针对PC: DOPE: DOTMA型脂质体)。从微流态化处理的脂质体中把掺入的DNA与游离的DNA分离可采用上述离心的方法(1、2、3和5个循环), 或者使用分子筛色谱法(10个循环)。色谱法中, 使用了Sephacrose 4B CL柱(Pharmacia)(Gregoriadis等, 1990)。在一些实验中, 预制的DRV(不含DNA)与 10 或 $50\mu\text{g}$ DNA混合, 随之将混合物在 20°C 温育20小时或进行3个循环的微流态化处理。对这两种情况, 均采用上述离心的方法把吸收的DNA从未被吸收的DNA中分离。根据从悬浮小球(非微流态化处理的DRV和进行1、2、3或5个循环微流态化处理的DRV)或色谱法中的洗脱级分(进行10个循环微流态化处理的DRV)所回收得到 ^{35}S 的放射活性可以估计DNA掺入到脂质体中或吸收到脂质体表面的数量。

光子相关色谱法

应用Malvern Autosizer IIc测量非微流态化的和微流态化处理的DRV的Z-平均粒径, 该方法在其它地方已有报道(Gregoriadis等, 1993; Gregoriadis等, 1990)。

含有脱氧核糖核酸酶的脂质体的温育

在1mlPBS中,把整合有pGL2质粒DNA(0.75—22.5 μ g)和痕量³⁵S标记的pGL2质粒DNA之经微流态化处理(3个循环)和未经微流态化处理的DRV与100个单位的脱氧核糖核酸酶I相混合,并在37℃温育10分钟。用1 μ l的0.5M的EDTA(pH8)终止反应,再采用离心的方法把经消化的脂质体DNA从未消化的脂质体DNA中分离出来。根据上清液中释放出的放射活性可以估计出消化的DNA。预实验已证明在同等条件下100 μ g的裸露pGL2可以被完全降解。在另一个实验中,含有2 μ gDNA的相似的脂质体样品用一种含50mM二硫苏糖醇和50 μ g/ml牛血清白蛋白(组分V, Sigma化学公司)的缓冲液稀释到100 μ l,再与1个单位的RQ1脱氧核糖核酸酶(Promega)相混合且在37℃温育30分钟。加入1 μ l的0.5M的EDTA(pH8)终止反应。

琼脂糖凝胶电泳

把非微流态化处理或进行微流态化处理的包封有DNA的DRV样品采用上述方法和或不和RQ1脱氧核糖核酸酶一起温育,然后用苯酚-氯仿混合物萃取两次以除去脂类物质。加入乙醇使水层中的DNA沉淀出来,把沉淀物重悬于20 μ l的TE缓冲液(10mM的Tris-Cl, pH8; 1mM的EDTA, pH=8),进行琼脂糖凝胶电泳分析以测定DNA的完整性。

转染实验

在含有200mM的FLUTAMAX I(含有10%的胎牛血清)的Dulbecco's修饰过的Eagle培养基中培养猴肾脏COS-7上皮细胞,经胰蛋白酶消化处理收获细胞,随之种植到24孔平板上(Falcon, 5×10^4 个细胞/每孔),并温育18—24小时。对含有铺满程度达70—80%的粘附细胞的小孔采用Dulbecco's磷酸缓冲盐液(不含钙或镁, pH=7.2, Gibco BRL)进行冲洗,然后与1 μ g(6—18 μ l)脂质体包封1 μ g的pGL2 DNA或复合有1 μ g的pGL2 DNA的LipofectAMINE(约24 μ g脂质)于0.5ml的含有GLUTAMAX I的OptiMEM 1减少的血清培养基中进行转染处理。在37℃温育4—6小时后,移出转染培养基。用1ml DMEM完全培养

基所取代。细胞总共温育48小时，再刮到200 μ l的细胞裂解缓冲液（Promega）中进行细胞裂解处理（用干冰进行一轮冷冻-融解处理可增强细胞的裂解），然后将该混合物于12000xg离心5分钟，获得澄清的上清液。该上清液平均分为三份后用荧光素酶检测系统试剂盒进行荧光素酶活性测定，使用LKB 1251型发光计，且记录光发射的总时间超过60秒。应用Bradford方法（1976）测定了每个细胞裂解液中蛋白质的浓度，该方法使用了Bio-Rod蛋白分析液。荧光素酶活性以每毫克蛋白所对应的相对光单位来表示（RLU/mg）。

结果

质粒DNA掺入到直径为710—843nm的中性DRV中[实施例1.1.（1—6）]，该DRV使用了一种非常好的磷脂（含有PC和DOPE，Legendre和Szoka，1995）以帮助转染；或掺入补加负电性的两性物质[590—871nm，实施例1.2.（1—5）]或正电性的两性物质[为647—899nm，实施例1.3.（1—6）、1.4.（1—4）和1.5.（1—2）]的相似的脂质体。带电囊泡的双分子层表面已知可使双分子层之间含有更多体积的液体（Bangham等，1974），因而这可溶解更多的溶质。对于带负电的DNA，由于静电相互作用可进一步改善它和带正电的脂质体（阳离子DRV）的掺入。表1显示：在中性DRV中掺入的DNA相当可观（44—55%）；在负电性DRV中，多种量的DNA（10—100 μ g）的掺入仍然可达到45—63%[实施例1.1.（1—6）和1.2.（1—5）]。而且，绝大多数DNA被吸收到脂质体表面而不是掺入到其内部的概率不大。预制DRV和裸露的DNA共同温育，经离心回收时仅仅可导致中等程度的DRV（12—13%）被回收[实施例1.1.7和1.2.（6—7）]。在存在未掺入的（游离）DNA的情况下对类似的含有DNA的DRV进行3个循环的微流态化处理可使中性DRV中较小粒径的（209—329nm）脂质体DNA的含量显著减少（达到10—20%），而对电负性的脂质体则减少得较少（达到37—51%）[实施例1.1.（1—6）和1.2.（1—5）]。另外，在存在游离DNA的情况下对预制的DRV进行微流态化处理时，只有非常少量的（6%和10%）DNA

与脂质体被回收[实施例1.1.7和1.2.(6-7)]。

和预计的一样，DNA在阳离子SA、BisHOP和DOTMA等DRV中的掺入是非常高的(62-92%)，且经微流态化处理的DRV[269-383nm，实施例1.3.(1-6)、1.4.(1-4)和1.5.(1-2)]其值仍然很高(50-83%)。但是，带有裸露的DNA的预制阳离子DRV(SA)经温育或微流态化处理后，大约40-60%的材料和脂质体一起被回收，这可能是囊泡表面的结合[实施例1.3.(7-9)]。

脂质体DNA和脱氧核糖核酸酶共同温育

表1显示了掺入中性脂质体的DNA(45-72%)、掺入负电性脂质体的DNA(58-69%)或掺入正电性脂质体的DNA(68-86%)不会被DNA酶所降解。相反，接触该酶的吸收在中性或负电性脂质体表面的DNA的回收率却较低(18%)(实施例1.1.7和1.2.6)。但是，相当量的吸收在正电性脂质体(SA)表面的DNA(41-58%)却不会被该酶所降解[实施例1.3.(7-8)]。这可能是由于阳离子囊泡可使DNA呈浓缩状态进而对DNA酶具有抵抗力(Legendre和Szoka, 1995)。根据上述发现，在掺入过程结束时DNA掺入在阳离子脂质体中的比例(与吸附在其表面相对)很困难精确估计。

通过将裸露的DNA或脂质体DNA接触RQ1脱氧核糖核酸酶及随之进行的琼脂糖凝胶电泳实验，可以证实脂质体DNA对DNA酶的脆弱性的结果。根据染色的强度和是否出现弥散现象，我们可以看到：裸露的质粒DNA可被完全消化，而包封在阳离子脂质体中的DNA却被充分保护。另一方面，通过DNA酶消化的样品的较轻区带和未被消化的样品相比所鉴定，也可发现在中性和负电性DRV中的DNA不能被很好保护。

用脂质体pGL2质粒DNA的转染

用掺入在非微流态化处理的DRV脂质体中的pGL2质粒DNA对COS-7细胞进行转染的实验中，或者用与LipofectAMINE复合的pGL2质粒DNA对COS-7细胞进行转染处理，其中LipofectAMINE是一种对照，

且对每种形式的DRV制剂都进行实验观察在背景上显示荧光素酶活性的显著水平。但是，阳离子DRV(DOPE: DOTMA、PC: DOPE: DOTMA和PC: DOPE: SA)中荧光素酶的活性大约比中性(PC: DOPE)和负电性(PC: DOPE: PS)及同为阳离子的PC: DOPE: BisHOP脂质体中该酶活性高10倍(见表2)。由于脂质体的粒径可能与转染效率有关，所以对掺入经微流态化处理(1、2、3、5或10个循环)的DRV中的DNA也进行了相关实验，进而产生了粒径持续变化的小粒径囊泡(Z-平均直径分别为386、319、262、235和123nm，结果没有显示)。表2表明PC: DOPE: DOTMA 的DRV的微流态化处理(3个循环)可提高它们的转染率约10倍。但是，经5或10个循环微流态化处理的PC: DOPE: TOTMA、DOPE: DOTMA、PC: DOPE和PE: DOPE: PS脂质体的转染实验并没有显示出显著的荧光素酶活性(结果没有显示)，这可能是由于微流态化处理可诱导DNA产生渐变的弥散。

在所有测检的DRV制剂中，正电性的SA和DOTMA DRV比其它类型的DRV更加有效，其中微流态化处理的制剂(DOTMA)显示了最高的转染率。但是，即使这种制剂的转染率与对照组的LipofectAMINE相比约小10—15倍。

表1

实施例	脂质体	包封 (E) 或 复合 (C)	使用的 DNA (μg)	掺入的DNA百分数 (剩余DNA的百分数)	
				DRV	微流态化处理的 DRV
1.1.1	PC:DOPE	E	10	40.4 (71.9)	12.5 (49.6)
1.1.2	PC:DOPE	E	20	43.8 (62.0)	17.3 (48.1)
1.1.3	PC:DOPE	E	25	41.1 (67.1)	16.9 (48.0)
1.1.4	PC:DOPE	E	30	39.5 (60.0)	20.6 (42.4)
1.1.5	PC:DOPE	E	50	41.3 (45.3)	10.1 (44.0)
1.1.6	PC:DOPE	E	100	55.4	-
1.1.7	PC:DOPE	C	10	12.1 (17.8)	6.8 (10.2)
1.2.1	PC:DOPE:PS	E	10	55.8 (69.1)	44.6 (67.8)
1.2.2	PC:DOPE:PS	E	20	61.2 (60.9)	40.9 (66.1)
1.2.3	PC:DOPE:PS	E	25	61.0 (58.2)	42.3 (62.6)
1.2.4	PC:DOPE:PS	E	50	45.5 (58.0)	37.0 (67.1)
1.2.5	PC:DOPE:PS	E	100	63.0	51.0
1.2.6	PC:DOPE:PS	C	10	12.0 (17.6)	10.2 (9.8)
1.2.7	PC:DOPE:PS	C	50	13.3	10.8
1.3.1	PC:DOPE:SA	E	10	64.1 (78.1)	50.3 (63.1)
1.3.2	PC:DOPE:SA	E	20	71.9 (75.0)	65.5 (59.9)
1.3.3	PC:DOPE:SA	E	25	82.3 (75.2)	64.7 (58.2)
1.3.4	PC:DOPE:SA	E	30	74.8 (70.1)	56.2 (58.0)
1.3.5	PC:DOPE:SA	E	50	71.2 (67.9)	50.9 (57.4)
1.3.6	PC:DOPE:SA	E	100	84.4	60.1
1.3.7	PC:DOPE:SA	C	10	59.7 (41.1)	31.6 (40.2)
1.3.8	PC:DOPE:SA	C	25	45.1 (58.5)	12.9 (41.0)
1.3.9	PC:DOPE:SA	C	50	40.3	16.3
1.4.1	PC:DOPE:BH	E	10	68.4 (75.3)	51.9 (63.1)
1.4.2	PC:DOPE:BH	E	20	70.8 (70.2)	55.5 (64.0)
1.4.3	PC:DOPE:BH	E	25	62.3 (69.9)	52.2 (78.2)
1.4.4	PC:DOPE:BH	E	50	75.6	62.1
1.5.1	PC:DOPE: DOTMA	E	50	81.0 (85.9)	76.3 (79.1)
1.5.2	PC:DOPE: DOTMA	E	100	92.6	83.2

BH = BisHOP

表2
转染细胞中荧光素酶的活性

实施例	脂质体	荧光素酶的活性 RLU/mg
1.6.1	DOPE:DOTMA	1.5×10^4
1.6.2	PC:DOPE:DOTMA	1.3×10^4
1.6.3	PC:DOPE:DOTMA Mfx3	7×10^4
1.6.4	PC:DOPE:BisHOP	2×10^3
1.6.5	PC:DOPE:SA	9×10^3
1.6.6	PC:DOPE	2×10^3
1.6.7	PC:DOPE:PS	3×10^3
1.6.8	LIPOFECTAMINE	3×10^4

Mf x 3 - 微流态化处理 3 个循环

实施例2——体内转染后的免疫反应

应用如上所述及实施例1来源的材料(及来自C Kirby博士的 3β [N-(N' N' -二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基]-胆固醇和DC-CHOL以及DOTAP (1, 2-二油酰基氧基-3-三甲基铵丙烷), 进行一些实验以测定体内转染后的免疫反应。多核苷酸是表达乙型肝炎表面抗原的质粒DNA[ayw型的pRc/CMV-HBS质粒的S区(Davis HL等)]。用16毫摩尔(12mg)的PC与多种阳离子脂类(如表所述)按照表中的比例相混合而制成相应的脂质体。通过将上述成分混合在水性悬浮液中(参照上述Eppstein所提供的现有技术), 采用实施例1所用方法可以把质粒DNA包封在脂质体中(所用数量如表所述), 或者制成预制阳离子脂质体与DNA的复合物。

随后, 把包封有DNA的脂质体、所制成的复合物和裸露的DNA施用于小鼠进行体内转染实验。以施用 μg DNA的量的制剂对分为3到4组的小鼠肌肉内注射(后腿)。质粒DNA或用实施例1的方法包封到脂质体中(用量如表所示), 或与预制的阳离子脂质体及DNA复合, 方法是与水性悬浮液中的组分混合(利用与先有技术Eppstein(见前述)相似的方法)。

随后，把包封有DNA的脂质体、制成的复合物和裸露的DNA施用于小鼠进行体内转染实验。根据表4中所示的多种DNA的水平，将上述制剂以肌肉内（后腿）注射的方式注射到分为三或四组的Balb/c小鼠体内。对每个实验来说，注射到小鼠体内的脂质体制剂中脂类的数量基本上是固定的，范围约为1~2mg的总PC脂类。

接着从小鼠取血并用ELISA技术对血清进行免疫反应测定。在这些体内实验中应用了ayw型乙型肝炎的S区抗原，按Davis等人所报道的方法进行的ELISA实验。利用实验测定了抗-HBS Ag（ayw型的S区）的IgG₁、IgG_{2a}和IgG_{2b}。获得免疫反应以血清稀释直至吸收度读数（在辣根过氧化酶ELISA实验中）为0.200的血清稀释度的常用对数（log₁₀，均值±标准差）来表示[。

这些实验的结果见表4，在第0、10、20、27和37天对小鼠进行注射并在第26、34和44天进行取血。在表5所示结果中，在第0、7、14、21和28天对小鼠进行注射并在第21和28天取血。

结果和讨论

表3
质粒DNA在脂质体中的包封率

实施例	脂质体 (摩尔比)	包封(E) 或 复合(C)	所使用的 DNA的量 (μ g)	包封/复合率 (占所用DNA的 百分数)
2.1	PC,DOPE (1:0.5)	E	100	57.3
		E	150	53.6
2.2	PC, DOPE, DC-CHOL (1:0.5:0.25)	E	100	95.4
		E	150	78.9
2.3	PC, DOPE, DOTAP (1:0.5:0.25)	E	100	82.9
		E	100	78.4
		E	150	77.1
		E	150	82.1
2.4	PC, DOPE, DOTAP (1:0.5:0.25)	C	100	93.9
		C	150	83.3

表4

应用游离或脂质体包封的DNA进行免疫的小鼠的免疫反应* (ELISA结果 $\pm$ SD)

制剂, 脂类比例 (实施例)	注射DNA的量 (ug)	26 天			34 天			44 天		
		IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}
PC, DOPE, DOTAP (2.3)	5	3.1 $\pm$ 0.2	2.2	ND	4.2 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.0	3.1 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.0
	10	3.2 $\pm$ 0.0	ND	ND	4.2 $\pm$ 0.0	3.2 $\pm$ 0.0	3.2 $\pm$ 0.0	4.8 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.3
PC:DOPE:DC-CHOL (2.2)	5	3.0 $\pm$ 0.3	2.2	ND	4.0 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.0	5.2 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.3
	10	3.0 $\pm$ 0.3	ND	ND	4.0 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.0
裸露的DNA	5	2.2 $\pm$ 0.0	ND	ND	2.2 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.0	3.2 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.0
	10	2.4 $\pm$ 0.2	ND	ND	2.2 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.0	2.9 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.0

ND意思是: 没有测定

* ELISA实验中读数约为0.200时稀释倍数的常用对数 (log10)

参见图1, 其中A表示含有DOTAP的脂质体的实验结果, B表示含有DC-CHOL的脂质体的结果, C表示含有等量硬脂酰基的脂质体的实验结果 (表中未显示), D表示应用裸露DNA所对应的结果, 每种情况下, 施用5 μ g DNA白色条对应IgG₁的值, 黑色条对应IgG_{2a}的值, 斑点条对应IgG_{2b}的值。

表5

应用裸露, 复合和包封的DNA进行免疫的小鼠的免疫反应 (ELISA结果 $\pm$ SD)

DNA 制剂 (实施例)	实验报告	注射 DNA的量 (ug)	21 天		28 天	
			IgG ₁	P	IgG ₁	P
PC, DOPE, DOTAP 1.0:0.5:0.25 (包封的) (2.3)	a	1	2.2 $\pm$ 0.0		2.5 $\pm$ 0.3	a 对 g <0.05
	b	10	3.2 $\pm$ 0.0	b 对 a, c, d, e , f, g, h <0.0001	4.0 $\pm$ 0.2	b 对 h <0.0007
PC, DOPE DOTAP 1.0:0.5:0.25 (复合的) (2.4)	c	1	2.2 $\pm$ 0.0		2.4 $\pm$ 0.2	
	d	10	2.2 $\pm$ 0.0		2.8 $\pm$ 0.2	d 对 b <0.0032
PC, DOPE (2.1) 1.0:0.5	e	1	2.2 $\pm$ 0.0		2.2 $\pm$ 0.0	
	f	10	2.2 $\pm$ 0.0		2.7 $\pm$ 0.0	f 对 b <0.001 f 对 h <0.003
裸露DNA	g	1	2.2 $\pm$ 0.0		2.2 $\pm$ 0.0	
	h	10	2.2 $\pm$ 0.0		2.2 $\pm$ 0.0	h 对 d <0.0001

上表中P列显示了所示结果与其它不同的置信水平的学生配对T-检验的结果。

表3显示了含有阳离子脂类的脂类组合物的包封百分数特别高。预制脂类与质粒DNA的复合率也是非常高的。在每种情况下, 使用100 μ g 或150 μ g的DNA对包封率百分数/复合率并没有影响。

表4和图1显示了, 与应用裸露DNA引起的免疫反应相比, 使用包封的编码HBsAg的DNA免疫小鼠所引起的免疫反应要高很多。这种作用从实验的第26天开始就一直很明显, 并且随实验的继续而更加显著。从全部血样中来看, 这一作用对于IgG₁最为显著, 与应用裸露的DNA传递相比, 这种作用也可使IgG_{2a}和IgG_{2b}的水平有增加。

表5的结果显示：对裸露的DNA来说，甚至在首次注射DNA28天以后，仍然没有观察到反应。

对于包封在中性脂质体（PC、DOPE）中的DNA，在第21天免疫反应仍没有增加，但高剂量的DNA注射28天后可使反应有轻微增加。与施用裸露的DNA后的反应相比，这样的增加十分明显。

对于由预制阳离子脂质体和DNA组成的复合物，从实验开始的第28天起，两种施用DNA的水平引起的免疫反应看起来有所发展，并且与使用裸露的DNA相比，所引起的免疫反应要更加显著。但是，免疫反应没有与用包封在阳离子脂质体中的DNA引起的免疫反应那么高。

对包封有DNA的阳离子脂质体，首次注射21天后（注射的DNA为 $10\mu\text{g}$ ），其免疫反应就高于其它任何一个实施例；但是注射 $1\mu\text{g}$ 包封在阳离子脂质体中的DNA所引起的免疫反应与其它实施例中施用 $1\mu\text{g}$ DNA的结果没有显著差异。28天后，与应用高或低水平的裸露DNA相比，这种低剂量（ $1\mu\text{g}$ ）的DNA施用可使免疫反应显著增加。但是，对于与阳离子脂质体复合的DNA和包封在中性脂质体中的DNA来说，应用这种低剂量时所产生的免疫反应并没有显著差异。对于应用了较高剂量（ $10\mu\text{g}$ ）的包封在阳离子脂质体中的DNA，28天后的免疫反应明显要高于其它任何一个实验。

实施例3——使用裸露、复合或脂质体包封的质粒DNA免疫小鼠后其脾脏中细胞因子的水平

在实验的第0、7、14、21和28天，以肌肉注射的方式分别对分为四组的Balb/c小鼠（与实施例2相同的方法和实验）给予了 $1\mu\text{g}$ （白色条）或 $10\mu\text{g}$ （黑色条）pRc/CMV HBS，pRc/CMV HBS分别为下述形式：包封在由PC、DOPE和DOTAP组成的正电性脂质体中（A）、包封在由PC和DOPE组成的不带电脂质体中（B）、与预制阳离子DOTAP脂质体所组成的复合物（C）或裸露的形式（D）。“对照组”是指正常的未进行免疫处理的小鼠中的细胞因子水平。末次注射后三周，处死小鼠，其脾脏用于细胞因子分析。应用Nakane等人的方法如已被由de

Souza等人的修改测定了脾脏中内源性IFN- γ 和IL-4的水平。将小鼠脾脏分别称重，于含有1%的3-[(胆碱酰丙基)二甲基铵]-1-丙烷磺酸酯(CHAPS, Sigma)的冰浴的RPMI中在Dounce组织匀浆器中进行匀浆处理，制得10% (wt/vol)的匀浆液。把匀浆液置于冰上放置1小时，然后以2000 $\times g$ 离心20分钟除去不溶的碎屑。澄清的上清液于-70℃保存。

细胞因子分析

联合使用了标准捕获式ELISA与单克隆抗体对及Maxisorp板(NUNC, 英国)。应用了抗IFN- γ (R46A2)和IL-4 (11B11)的初级单克隆抗体和生物素标记的抗-鼠IL-4 (BVD6-24G2)和抗-鼠IFN- γ (XMG1.2)的次级单克隆抗体，还使用了链亲和素过氧化酶(Dako, 丹麦)和邻苯二胺(Sigma)作为底物。重组的IFN- γ 和IL-4标准品来自Pharmigen。结果(均值 $\pm$ 标准误差，)以每个脾脏对应多少纳克细胞因子来表示(ng/脾脏)，这些结果至少来自4只小鼠。图2显示了上述实验结果，在图中，每条均代表了4只小鼠每组的均值 $\pm$ SE(a-d代表了上述四种脂质体)。

图2的数据显示脂质体包封的DNA要比裸露或复合的DNA对Th1和Th2亚组的活性更强。体外进行的抗HBsAg抗原的初级T细胞增殖分析也证实了上述发现。因此，用脂质体包封的质粒DNA进行的免疫接种可以诱导体液和细胞调节的免疫。

实施例4——单次注射质粒DNA后小鼠的免疫反应

大多数关于裸露DNA进行接种的报道要求采用多次注射方案，但是单次注射也可产生对编码的抗原的体液反应(Davis等，人类基因治疗，1993; Raz等，PNAS, 1994)。例如，对裸露pRc/CMV HBS的总IgG反应在注射1—2周后可以检测到，4—8周时则可到达峰值(Davis等人，1996)。

以肌肉注射的方式分别对分为四组的Balb/c小鼠给予了一次2 μg (图3中白色条)或10 μg (黑色条) pRc/CMV HBS, pRc/CMV HBS

分别以下述形式：包封在由PC、DOPE和DOTAP组成的正电性脂质体中（A）、包封在由PC和DOPE组成的非电性脂质体中（B）、与预制阳离子DOTAP脂质体所组成的复合物（C）或裸露的形式（D）。注射后，对按照时间间隔获得的血清中抗-HBsAg的IgG₁反应进行了分析（ELISA）。以注射脂质体包封DNA的全部小鼠来计量免疫反应，但是免疫反应仅在第20~27天可以检测到。其它实验细节和实施例2相同。用阳离子脂质体DNA免疫的小鼠和用裸露DNA免疫的小鼠的常用对数值（log₁₀）（上述两种剂量；所有的时间间隔）之间的差异有统计学显著性（ $P < 0.0001 - 0.002$ ）。对于用10 μg阴离子脂质体包封的（由PC、DOPE和PS组成，制备方法见实施例1）pRc/CMV HBS进行免疫处理的第五组4只小鼠，第21和29天的IgG₁反应（log₁₀）分别是 2.25 ± 0.0 和 2.73 ± 0.0 。

在应用更低剂量的pRc/CMV HBS（2和10 μg）进行的单次免疫条件下，甚至在第7周仍然不能检测到对裸露和复合DNA所产生的抗-HBsAg IgG₁反应。相反，包封在阳离子脂质体中的DNA，则可以较早地检测到显著的IgG₁反应，而中性或阴离子脂质体包封的DNA仍然可产生显著的反应，但要迟一些（图3）。

实施例5——用脂质体包封的乙型肝炎抗原注射近亲交配和远系繁殖小鼠所产生的体液和细胞调节的免疫反应

分组的小鼠（每组4—5个）在第0和7天两次注射（im、ip、iv或sc）10 μg包封在阳离子DRV脂质体中pRc/CMV HBS（ayw亚型；编码HBsAg的S区）或10 μg裸露的pRc/CMV HBS（均保存在PBS中），这种脂质体是由卵磷脂(PC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPE)和1,2,一二油酰基（三甲基铵）丙烷(DOTAP)组成（摩尔比为1: 5.5: 0.25）（采用实施例1中所描述的常规材料和技术制备而成）。按照时间间隔对动物进行取血，并应用ELISA测定血浆中的IgG₁、IgG_{2a}和IgG_{2b}。在实验结束时（首次注射后的第38天）将动物杀死，采用上述方法（参考其它实验细节请看Gregoriadis等，1997）对脾脏中的细胞因子IFN-γ和IL-4进行

测定。对对照（完整）小鼠也进行脾脏中细胞因子的测定。

结果

实验的结果显示，对这两种株系的小鼠，仅在首次注射的第21天后（IgG₁；图4）或28天后（IgG_{2a}和IgG_{2b}；分别对应图5和6）才可检测到免疫反应（均值±SD）。对脂质体DNA的反应（黑色条）通常要比对裸露DNA产生的反应（斑点条）更加显著（两种株系；所有的注射途径，尤其是im、sc和iv）。反应显著性水平（P<0.05）以下列顺序递增：+、*、**、***。

对细胞因子IFN- γ （图7）（Th1反应）和IL-4（Th2反应）（图8）的分析可以看到对脂质体DNA，通过肌肉和皮下途径注射的这两种株系的小鼠比通过静脉途径注射的T/o型小鼠所产生的免疫反应明显要高。通过腹膜内途径注射时，脂质体包封的DNA和裸露的DNA所产生的免疫反应没有差异。

实施例6——六种不同的质粒DNA的包封率

使用实施例1的方法可使³⁵S标记的质粒DNA（10—500 μ g）掺入到中性、阴离子或阳离子、脱水再水化囊泡(DRV)中或与之混合。所用的质粒DNA如下所列：

pGL2——如实施例1所述，可编码荧光素酶；

pRc/CMV HBS——如实施例2所述，乙型肝炎表面抗原的S区；

pRSVGH——编码人生长激素，一种治疗性蛋白；

pCMV4.56——微生物麻风蛋白，一种抗原；

pCMV4.EGFP——荧光绿蛋白；

VR1020——血吸虫蛋白，一种抗原。

所用的脂类包括中性的脂类PC和DOPE（如实施例1所述），阴离子脂类、PS、磷脂酰丝氨酸（如实施例1所述）或磷脂酰胆碱（PG）和阳离子化合物硬脂酰胺(SA)、BisHOP和DOTMA（如实施例1所述）及DC-Chol和DOTAP（如实施例2中所用），另外还包括1、2-二油酰基-

3-二甲基铵基丙烷 (DODAP)。

下表指出了质粒DNA是否被掺入[即包封到 (a) DRV中或与DRV混合 (b)]。该表进一步指出了脂类成分和DNA的掺入率。以前的实验已指出对多种形式的DRV制剂对使用不同数量的DNA的掺入率没有显著影响。因此, 结果如下所示, 且表中的整合率是3—5次实验结果的均值。

表6 脂质体中质粒DNA的掺入
掺入的质粒DNA (占使用DNA的百分数)

脂质体	pGL2	pRc/CMV HBS	pRSVGH	pCMV4.65	pCMV4. EGFP	VR1020
PC, DOPE ^a	44.2	55.4	45.6	28.6		
PC, DOPE ^b	12.1		11.3			
PC, DOPE, PS ^a	57.3					
PC, DOPE, PS ^b	12.6					
PC, DOPE, PG ^a			53.5			
PC, DOPE, PG ^b			10.2			
PC, DOPE, SA ^a	74.8					
PC, DOPE, SA ^b	48.3					
PC, DOPE, BisHOP ^a	69.3					
PC, DOPE, DOTMA ^a	86.8					
PC, DOPE, DC-Chol ^a		87.1	76.9			
PC, DOPE, DC-Chol ^b			77.2			
PC, DOPE, DOTAP ^a		80.1	79.8	52.7	71.9	89.6
PC, DOPE, DOTAP ^b		88.6	80.6	67.7		81.6
PC, DOPE, DODAP ^a			57.4			
PC, DOPE, DODAP ^b			64.8			

上述结果显示: 通过包封DNA, 对于带负电荷的脂类所获得的掺入率特别高。而使用带正电荷的脂类, 包封和物理混合之间的掺入率看起来没有什么显著差异, 虽然对于阳离子成分是非脂类化合物(硬脂酰胺)的包封所获得的掺入率更高些。

实施例7——阳离子脂质体的有效脂类成分对应答由包封pRc/CMV HBS编码的HBsAg抗原的免疫反应的作用

使用上述常规的技术可把质粒DNA包封到各种阳离子脂质体中。使用的脂类及摩尔比如表7所示。这些脂类如在先前的实施例中使用，且附加的PE是磷脂酰乙醇胺带有卵脂和DSPC，二硬脂酰磷脂酰胆碱（一种饱和脂类）。对5组的Balb/c小鼠通过肌肉注射给予10 μ g游离或脂质体包封的质粒DNA，注射在第0、2和5周进行。在第8、10和13周对小鼠进行取血，并用ELISA方法分析血清中抗-HBsAg（S区）IgG₁抗体。使用方法如实施例5所述。结果如表7所示。

表7

脂质体中脂类成分摩尔比	IgG ₁ 免疫反应 (log ₁₀ 终点稀释倍数 倒数 $\pm$ 标准偏差)		
	8 weeks	10 weeks	13 weeks
A. PC:DOPE:DOTAP (1:0.5:0.25)	2.99 $\pm$ 0.24	2.87 $\pm$ 0.29	2.63 $\pm$ 0.15
B. PC:PE:DOTAP (1:0.5:0.25)	2.99 $\pm$ 0.56	3.17 $\pm$ 0.64	2.75 $\pm$ 0.35
C. PC:DOTAP (1:0.25)	2.05 $\pm$ 0.66	1.98 $\pm$ 0.58	1.83 $\pm$ 0.33
D. DSPC:DOPE:DOTAP (1:0.50:0.25)	2.51 $\pm$ 0.19	2.48 $\pm$ 0.19	1.90 $\pm$ 0.00
E. PC:Chol:DOTAP (1:0.50:0.25)	2.57 $\pm$ 0.35	2.51 $\pm$ 0.27	2.14 $\pm$ 0.23
F. 游离 pRc/CMV HBS	1.30 $\pm$ 0.00	1.30 $\pm$ 0.00	1.23 $\pm$ 0.13

结果的统计分析（非成对T-检验）表明：（a）在所有的脂质体DNA制剂和游离的DNA之间（ $P<0.0001-0.0441$ ，所有的时间间隔），PC:DOPE: DOTAP和PC: DOTAP之间（ $P<0.0036-0.0357$ ，所有的时间间隔），PC: PE: DOTAP和PC: DOTAP之间（ $P<0.0095-0.0385$ ，第10和13周），PC: DOPE: DOTAP和DSPC: DOPE: DOTAP之间（ $P<0.0001-0.0138$ ，第8和13周），PC: DOPE: DOTAP和PC: CHOL:

DOTAP之间 ($P < 0.0158$, 第13周) 均存在着显著性差异。

结果表明: 就脂质体促进免疫反应效率而言, (a) PE可取代DOPE而不造成脂质体效率的损失 (DOPE和PE均为不饱和脂类); (b) 与不含有磷脂酰乙醇胺的脂类相比, 磷脂酰乙醇胺 (PE和DOPE) 更有效; (c) 饱和的DSPC取代PC可降低脂质体效率; (d) 含有磷脂酰乙醇胺的脂质体与含有胆固醇而不含磷脂酰乙醇胺的脂质体的效率几乎一样, 但这仅仅发生在第8和10周。

实施例8——pRc/CMV HBS在非磷酸脂类脂质体中的包封率

在本实施例中, 多种除了磷脂之外的脂质体形成成分用于包封前述实施例中乙型肝炎抗原。该脂质体的形成成分包括: 甘油酯、Monopal、1-单棕榈酰外消旋-甘油、非离子化的表面活性剂, Span 60 (山梨聚糖单硬脂酸酯) 和Solulan 24 (由羊毛脂醇和相关脂肪酸组成的一种24摩尔乙氧基化的复合物) (Span 60和Solulan 24均是商标)。脂质体形成成分的摩尔比如下表所示。其它一些成分可见上述实施例。

结果表明使用不含有磷脂的脂质体形成成分可以获得足够的包封率。非离子化的表面活性剂任选性地与非其它磷脂类成分 (如胆固醇) 组合使用可以获得足够的包封率。由于实施例8.4、8.5、8.6和8.8中制得的脂质体可持续沉淀, 因此它们不是好的组合物。

包封率如下述表8所示。

表8

实施例	脂质体	摩尔比 (各组分所用 μmol 数的绝对值)	包封率 (占所用DNA的百分数)
8.1	MonoPal:Chol:DOTAP	16:16:4	63.2
8.2	MonoPal:Chol:DOTAP	20:8:4	84.0
8.3	MonoPal:Chol:DOTAP	16:8:4	64.1
8.4	MonoPal:DOPE:DOTAP	16:8:4	28.1
8.5	MonoPal:Chol:DOPE:DOTAP	16:16:8:4	46.4
8.6	SPAN60:Chol:DOTAP	16:16:4	83.6
8.7	SPAN60:Solulan:Chol:DOTAP	16:0:72:16:4	66.0
8.8	SPAN60:Chol:DOTAP	20:8:4	55.8

参考文献

Alton, E.W.F.W., Middleton, P.G., Caplen, N.J., Smith, S.N., Steel, D.M., Munkonge, F.M., Jeffery, P.K., Geddes, D.M., Hart, S.L., Williamson, R., Fasold, K.I., Miller, A.D., Dickinson, P., Stevenson, B.J., McLachlan, G., Dorin, J.R. 和Porteous, D.J. (1993) 非介入性的脂质体调节的基因输送系统可校正囊纤维化突变小鼠的离子运输缺陷 自然遗传学 (Nat. Genet.) 5, 135—142;

Bangham, A.D., Hill, M.W. 和Miller, N.G.A. (1974) 作为生物膜模式的脂质体的制备和应用: Korn, E.D. (编), 膜生物学方法 (Methods in Membrane Biology) (纽约, Plenum) 1—68页;

Bradford, M.M. (1976) 一种快速灵敏的方法: 应用蛋白染料结合原理测量毫克级蛋白质. 分析生物化学 (Anal. Biochem.) 72, 248—254;

Davis, D., Davies, A. 和Gregoriadis, G. (1987) 免疫学通讯 (Immunology Letters) 14, 341—348;

Davis, H.L., Michel, M.L. 和Whalen, R.G. (1993) “基于DNA的免疫法-----”人类分子遗传学 (Human Molecular Genetics) 2, 1847—1851;

Davis, H.L., Demeneix, B.A., Quantin, B., Coulombe, J. 和Whalen, R.G. 人类基因治疗 (Human Gene Therapy) 4, 733—740 (1993);

Davis, H.L., 药物的靶向: 治疗中寡核苷酸和基因运输的策略. (Gregoriadis, G.和McCormack, B.编) 21—29页 (1996年, Plenum出版社, 纽约);

Felgner, P.L. (1991) 基因治疗学, 自然杂志 (Gene Therapeutics, Nature) 349, 351—352;

Gregoriadis, G. (1993) (编辑) 脂质体技术 (Liposome Technology), 第二版, 1—3卷, CRC出版公司, Boca Raton;

Gregoriadis, G. (1995) 脂质体工程: 进展和问题. 生物技术的趋势 (Trends in Biotechnology) (1995);

Gregoriadis, G., da Silva, H., 和 Florence, A.T. (1990) 一种有效的把药物包封于脱水-再水化脂质体 (DRV) 中的方法. 国际药理学杂志 (Int. J. Pharm.) 65, 235—242;

Gregoriadis, G. Garcon, N., da Silva, H.和 Sternberg, B. (1993) 包封溶质的脂质体和配体的独立偶联: 制备脂质体的观察. 生物化学和生物物理学学报 (Biochim. Biophys. Acta) 1147, 185—193;

Gregoriadis, G., Saffie, R. 和 Hart S.L. (1996) 靶向药物杂志 (J. Drug Targeting) 3, 467—475;

Gregoriadis, G., Saffie, R. 和 De Souza, J.B. (1997) 脂质体调节的DNA免疫法. FEBS 通讯 (FEBS Lett.) 402, 107—110;

Kay, M.A., Landen, C.N., Rothenberg, S.R., Taylor, L.A., Leland, F., Wiehle, S., Fang, B., Bellinger, D., Finegold, M., Thompson, A.R., Read, M., Brinkhous, K.M. 和 Woo, S.L.C. (1994) 体内肝炎基因治疗: B型血友病狗的IX因子缺陷的短暂但完全的校正. 美国国家科学院院报 91, 2353—2357;

Kirby, C.和 Gregoriadis, G. (1984) 脱水-再水化脂质体 (DRV): 一种增加药物在脂质体中包封率的新方法. 生物技术 (Biotechnology) 2, 979—984;

Legendre, Y.Y.和 Szoka Jr., F.C. (1995) 用于基因治疗的脂质体 (《脂质体及其应用的新系统和新趋势》; Puissieux, F., Couvreur, P., Delattre, J.和 Devissaugnet, J.P.等编辑) (巴黎, de Sante 版本), 669—692页;

Mulligan, R.C. (1993) 基因治疗的基础科学. 科学杂志 (Science) 260, 926—932;

Nakane, A., Numata, A.和 Minagawa, T., 感染和免疫 (Infect.

Immun.) 60, 523—528 (1992) ;

Raz, E., Carson, D., Rhodes, H.G., Abal, M.A., Tsai, J.Y., Wheeler, J.c., Marrow, J., Felgner, P.L.和Baird, M.S. (1994) 疫苗(Vaccines), 冷泉港实验室出版社, 冷泉港;

Raz, E. 等, 美国国家科学院院报 91, 9519—9523 (1994) ;

Scherphof. G., van Leeuwen, B., Wilschut, J.C.和Damen, J. (1983) 小单层脂质体和人血浆高密度脂蛋白之间的磷脂酰胆碱的互换仅仅涉及位于脂质体膜外部单分子层中的磷酸脂类. 生物化学和生物物理学学报 732, 595—599;

de Souza, J.B., Ling, I.T., Ogun, S.A., Holder, A.A.和Playfair, J.H.L. 感染和免疫 64, 3532—3536 (1994) ;

Tan, L.和Gregoriadis, G. (1989) 脂质体表面正电荷对脂质体从血液中的清除率的影响和正电荷与组成脂质体的脂类间的关系. Biochem. Soc. Trans. 17, 690—691;

Wheeler, V.C.和Coutelle, C. (1995) 质粒DNA在体外的非降解性标记. 分析生物化学 225, 374—376;

Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y.和Debs, R. (1993) 静脉注射的DNA进入成年小鼠后系统基因的表达. 科学杂志, 261, 209—211.

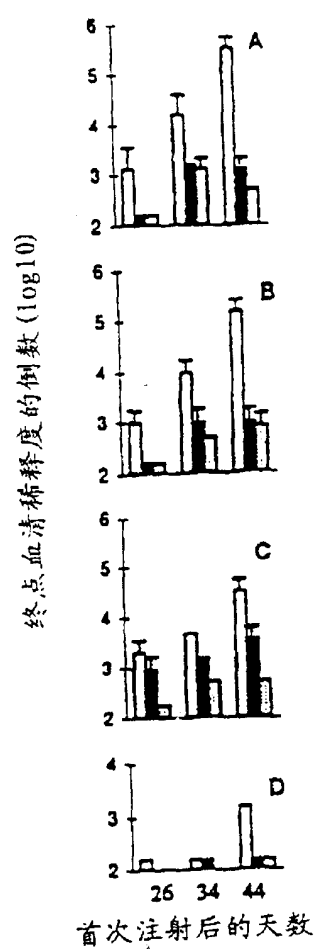


图 1

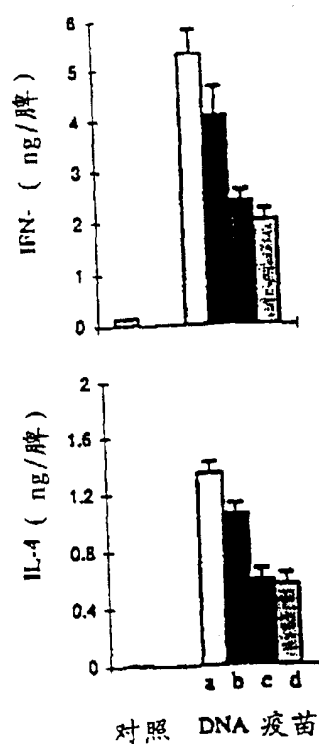


图 2

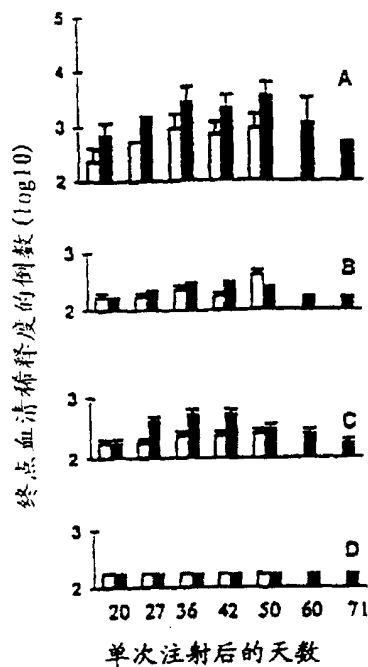


图 3

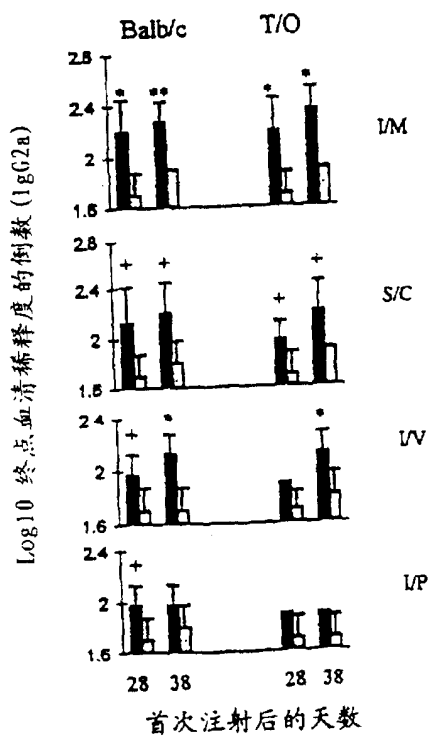


图 5

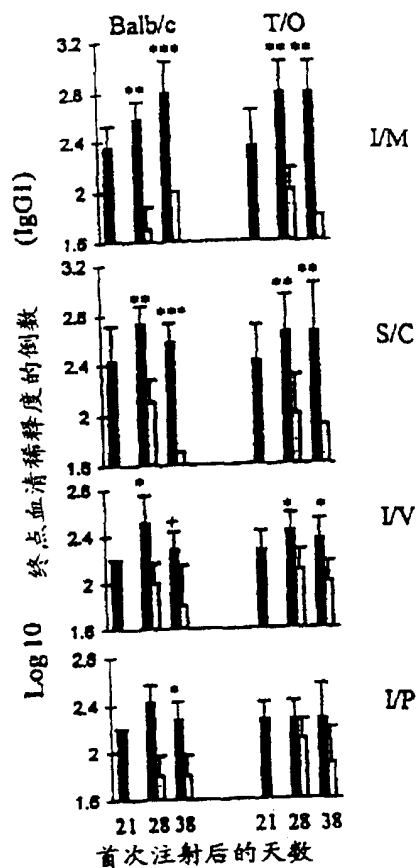


图 4

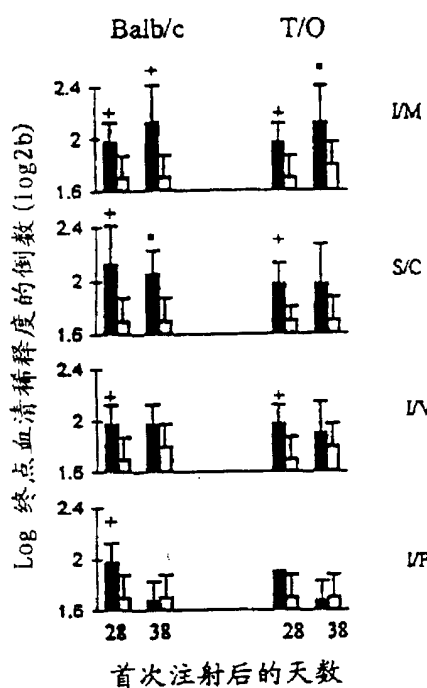


图 6

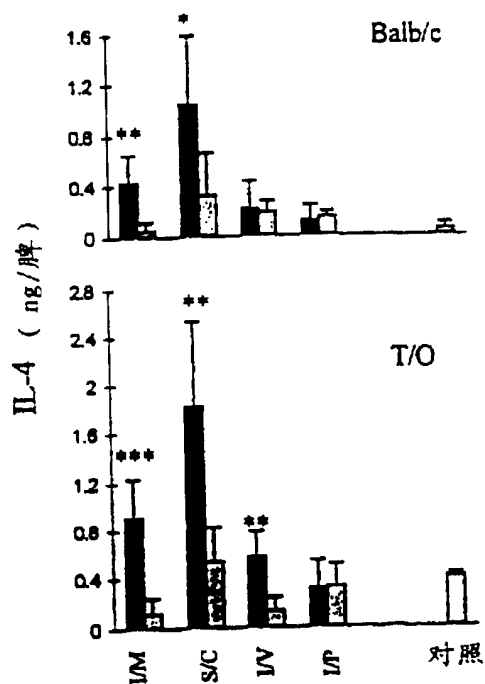


图 7

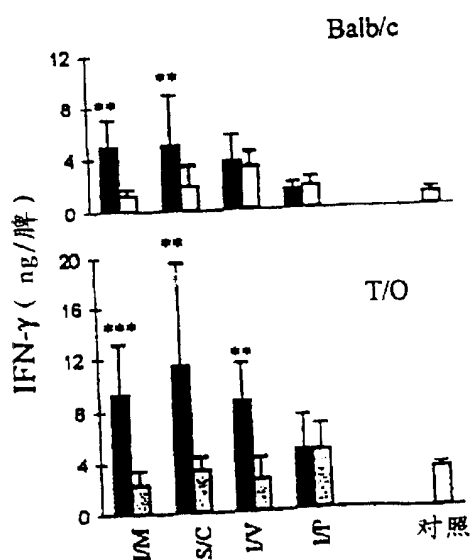


图 8