



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105792885 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201480066524.9

(22)申请日 2014.12.04

(30)优先权数据

61/911,536 2013.12.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/068522 2014.12.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/085043 EN 2015.06.11

(71)申请人 EP科技有限公司

地址 美国俄亥俄州

(72)发明人 萨米尔·格尔格特吉

达芙妮·P·安托纳卡斯 蔡宗展

罗伯特·L·格雷

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 于磊 张福根

(51)Int.Cl.

A61N 1/32(2006.01)

C12M 1/42(2006.01)

C12N 15/87(2006.01)

H05H 1/24(2006.01)

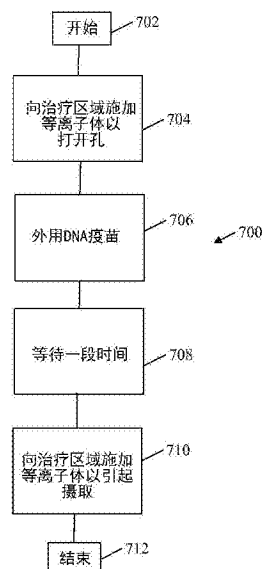
权利要求书2页 说明书13页 附图6页

(54)发明名称

使用非热等离子体经皮递送DNA疫苗

(57)摘要

本文公开了递送DNA疫苗的示例性系统和方法。递送DNA疫苗的一种示例性方法包括提供等离子体发生器,用于施加等离子体至治疗区域持续充足的一段时间以打开一个或多个孔。将外用DNA疫苗施用至所述治疗区域,并且等待一段时间以允许DNA疫苗通过所述一个或多个孔。该示例性方法还包括在足以引起DNA疫苗的细胞内摄取的设置下施加等离子体至所述治疗区域。



1. 一种递送DNA疫苗的方法,包括:

提供等离子体发生器,用于向治疗区域施加等离子体持续充足的一段时间以打开一个或多个孔;

将外用DNA疫苗施用于所述治疗区域;

等待一段时间以允许外用的DNA疫苗通过所述一个或多个孔;

在足以促进所述DNA疫苗的细胞摄取的设置下向所述治疗区域施加等离子体。

2. 权利要求1所述的方法,其中用于打开一个或多个孔的等离子体是使用环境空气在大气压下生成的。

3. 权利要求1所述的方法,其中用于打开一个或多个孔的等离子体是微秒脉冲等离子体和纳秒脉冲等离子体中的一种。

4. 权利要求3所述的方法,其中用于打开一个或多个孔的等离子体是DBD等离子体和纳秒脉冲电晕阵列中的一种。

5. 权利要求1所述的方法,其中允许DNA疫苗通过所述一个或多个孔的时间为少于约1小时。

6. 权利要求1所述的方法,其中允许DNA疫苗通过所述一个或多个孔的时间为少于约30分钟。

7. 权利要求1所述的方法,其中所述细胞摄取发生在表皮细胞中。

8. 权利要求1所述的方法,其中所述细胞摄取发生在居留于真皮中的免疫细胞中。

9. 权利要求1所述的方法,其中所述细胞摄取发生在组织细胞中。

10. 权利要求1所述的方法,其中所述细胞摄取发生在肿瘤细胞中。

11. 一种非侵入性DNA疫苗接种系统,包括:

外用DNA疫苗,用于施用于皮肤、组织或肿瘤的表面;和

等离子体发生器,用于对皮肤、组织或肿瘤提供第一等离子体处理以打开皮肤、组织或肿瘤中的一个或多个孔,以及用于对所述皮肤、组织或肿瘤提供第二等离子体处理以引起DNA疫苗被细胞摄取至皮肤、组织或肿瘤的一个或多个细胞中。

12. 权利要求11所述的非侵入性DNA疫苗接种系统,其中所述等离子体发生器是微秒脉冲DBD等离子体发生器、纳秒脉冲DBD等离子体和纳秒脉冲电晕中的一种。

13. 一种用DNA疫苗接种身体的方法,包括:

用脉冲等离子体处理一区域;

在处理过的区域上外用DNA疫苗;以及

在足以引起质粒DNA的细胞摄取的电源设置下施加等离子体至所述处理过的区域的表面。

14. 权利要求13所述的接种身体的方法,还包括在外用DNA疫苗和施加等离子体至处理区域的表面之间等待设定的一段时间。

15. 权利要求14所述的接种身体的方法,其中所述设定的一段时间为少于约1小时。

16. 权利要求14所述的接种身体的方法,其中所述设定的一段时间为少于约30分钟。

17. 一种用DNA疫苗接种身体的方法,包括:

在足以打开皮肤、组织或肿瘤中的孔并在细胞中产生孔的电源设置下施加等离子体至皮肤、组织或肿瘤的表面;

在处理过的区域上外用DNA疫苗,使其移动通过在皮肤、组织或肿瘤中产生的孔并且经由在皮肤、组织或肿瘤的细胞中产生的孔被细胞内摄取。

18.权利要求17所述的方法,其中用于打开一个或多个孔的等离子体是使用环境空气在大气压下生成的。

19.权利要求17所述的方法,其中用于打开一个或多个孔的等离子体是微秒脉冲等离子体和纳秒脉冲等离子体中的一种。

20.权利要求19所述的方法,其中用于打开一个或多个孔的等离子体是DBD等离子体和脉冲电晕等离子体中的一种。

使用非热等离子体经皮递送DNA疫苗

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2013年12月4日提交的美国临时申请序列号61/911,536,题目为“TRANSDERMAL DELIVERY OF DNA VACCINES USING NON-THERMAL PLASMA”的优先权和权益,该申请以其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明大体上涉及DNA疫苗的递送,更具体而言,涉及使用非热等离子体(冷等离子体)递送DNA疫苗来进行DNA疫苗穿过皮肤、组织或肿瘤的细胞间递送和/或促进DNA疫苗的细胞内摄取。组织是指身体的上皮组织、粘膜组织、结缔组织和肌肉组织。

背景技术

[0004] 疫苗是现代医学最重要的发现之一,并且是医生能够提供给患者的最有益的治理。然而许多疫苗可预防的疾病等待引起适当的预防性或治疗性免疫反应的技术。大多数疫苗引起抗体反应,然而,细胞介导的免疫反应(包括CD8T细胞)对于预防、控制或治疗细胞内细菌、真菌和病毒疾病以及慢性病(包括糖尿病、癌症等)和致死性疾病(如埃博拉病毒(Ebola))是必要的。

[0005] DNA疫苗接种是有利的,因为它不整合到宿主DNA中,具有生产成本效益,并容易储存,其可以对组织和/或细胞类型具有高度特异性,并且可以同时接种多个制剂(agents)。皮肤是DNA疫苗接种的理想靶点,因为其具有较大的表面积并存在特化用于诱导免疫的抗原递呈细胞,如郎格罕氏(Langerhans's)细胞和真皮树突状细胞。

[0006] DNA疫苗可以引起细胞介导的免疫反应和抗体反应。因此,DNA疫苗代表其他疫苗接种方式的一种有吸引力的替代方式。DNA疫苗由质粒(DNA环)组成,该质粒包含引起保护所必需的免疫原性蛋白质的基因,加强免疫反应的蛋白质的基因,和在哺乳动物细胞中转录成RNA,翻译成蛋白质,以及扩增细菌而非哺乳动物细胞中的质粒所必需的DNA序列。对DNA疫苗的免疫反应类似于对病毒感染的反应,但是更加安全,因为DNA不会传播或引起疾病。DNA也相对容易生产,并且对环境蛋白酶和核酸酶稳定。DNA疫苗可以用于生成对预防或治疗疾病(举例来说,如HSV、AIDS、丙型肝炎、癌症、埃博拉病毒以及由于使用更传统方式而错过了疫苗开发的疾病)所必需的免疫反应。

[0007] 接受DNA疫苗用于预防性或治疗性疫苗接种的障碍是促进有效递送和细胞摄取以及适当的细胞介导的免疫反应方面的难处。因为低表达或缺乏免疫识别,单独质粒DNA的注射对于预防性疫苗接种不会引起足够强的免疫反应。对一些递送和摄取DNA疫苗的方法包括脂质介导的递送、喷射注射、基因枪和声致穿孔(sonoporation)都进行过测试,但未获得多少成功。

[0008] 关于DNA疫苗的遗传学和使用电穿孔体内递送DNA疫苗的最新进展已经提高了表达效率至可实践的水平。电穿孔使用脉冲电流打开细胞膜中的孔(被称为透化的过程),并且允许皮内注射的DNA被皮肤细胞和居留在皮肤中的免疫细胞摄取。电穿孔需要DNA注射进

皮肤或者肌肉中,电极直接接触皮肤或者将电极插入到肌肉中,以及施加直流电流以促进DNA的细胞摄取。

[0009] 电穿孔作为药物递送方法具有一些缺点,包括疼痛,应用时肌肉收缩,而且还导致电流诱发的组织损伤。这些缺点限制了它的普遍采用。的确,与电穿孔相关的疼痛太强烈,医生或保健师不太可能推荐给小孩或老人使用。另外,电穿孔只能在约 5mm^2 到约 7mm^2 之间的面积上使用。

[0010] 南佛罗里达大学的Richard J Connolly的一项研究,题目是Plasma Mediated Molecular Delivery,表明非热等离子体也可以向皮肤递送脉冲电场,并证明这种方法可以安全地促进皮内注射的DNA疫苗的细胞摄取。实验通过皮内注射体积为 $50\mu\text{l}$ 的 $100\mu\text{g}$ JRFLgp120质粒。该推注(bolus)暴露于正极性或负极性等离子体10分钟。和电穿孔一样,这种方法要求用针将DNA注射到皮肤中,一种引起疼痛并导致产生必须谨慎处理的生物危险废弃物的施用方法。而且,所提出的这种方法涉及使用昂贵的稀有气体如氦气来生成等离子体。

[0011] 疫苗的经皮、无针递送对于不能忍受注射疼痛的个体的某些群组如小孩或老人是期望的。鼻内递送引起了很大兴趣,但是可以递送的疫苗总体积的限制是一个挑战。递送的疫苗在粘膜分泌物中稀释,受到蛋白酶和核酸酶的攻击,并且被上皮屏障排除在外。所以,需要相对大剂量的疫苗,但又不可能精确确定实际穿过粘膜的剂量。另外,由于鼻腔的限制,只能小体积给药。

[0012] 发明概述

[0013] 本文公开了递送DNA疫苗的示例性系统和方法。递送DNA疫苗的一种示例性方法包括提供等离子体发生器用于施加等离子体至(举例来说,例如皮肤、组织或肿瘤上的)治疗区域持续充足的一段时间以打开例如所述皮肤、组织或肿瘤中的一个或多个孔。将外用(topical)DNA疫苗施用于治疗区域并等待一段时间以允许DNA疫苗通过所述一个或多个孔。该示例性方法还包括在足以促进DNA疫苗的细胞摄取的设置下施加等离子体至该相同的治疗区域。

[0014] 一种示例性非侵入DNA疫苗接种系统包括用于施加至例如皮肤、组织或肿瘤上的表面的外用DNA疫苗和等离子体发生器。等离子体发生器对例如皮肤、组织或肿瘤上的表面提供第一等离子体处理以打开一个或多个孔,然后向同一表面施加第二等离子体处理以引起DNA疫苗被细胞摄取至一个或多个细胞中。

[0015] 用DNA疫苗接种身体的另一示例性方法包括使用第一参数设置向治疗区域施加微秒或纳秒脉冲等离子体或纳秒脉冲电晕,然后将DNA疫苗外用于治疗区域。所述方法还包括允许质粒DNA移动通过由第一等离子体处理产生的孔,然后在足以引起外用的质粒DNA的细胞摄取的电源设置下向所述表面施加微秒或纳秒脉冲DBD等离子体或纳秒脉冲电晕。

[0016] 用DNA疫苗接种身体的另一示例性方法包括使用参数设置施加微秒或纳秒脉冲DBD等离子体或纳秒脉冲电晕至皮肤、组织或肿瘤上的治疗区域,然后将DNA疫苗外用于所述皮肤、组织或肿瘤上的治疗区域。在该方法中使用的参数设置足以首先允许质粒DNA移动通过在皮肤、组织和肿瘤中产生的孔,并且同时经由细胞中因等离子体处理而产生的孔被皮肤、组织或肿瘤的细胞摄取。

[0017] 用DNA疫苗接种身体的另一示例性方法包括皮内注射DNA到表皮和真皮之间的皮

肤里,并且使用微秒或纳秒脉冲高压电源在注射部位上局部生成非热DBD等离子体或者使用纳秒脉冲高压电源在注射部位上生成脉冲电晕。等离子体处理导致在细胞中产生一个或多个孔,这能够实现注射的DNA的细胞内摄取。

[0018] 附图简述

[0019] 参考如下描述和附图,将更容易理解本发明的这些和其他特征和优点:

[0020] 图1是皮肤层的示例性说明;

[0021] 图2示出用于移动分子通过皮肤、组织或肿瘤的一种示例性递送系统;

[0022] 图3示出用于移动分子穿过皮肤、组织或肿瘤的另一示例性递送系统;

[0023] 图4示出用于移动分子穿过皮肤、组织或肿瘤的第三示例性递送系统;

[0024] 图5是用于移动分子穿过皮肤、组织或肿瘤的又一示例性递送系统;

[0025] 图6是图5的电极的平面图;

[0026] 图7是使用等离子体经皮递送DNA疫苗的示例性方法的示意图;

[0027] 图8示出用于移动分子穿过皮肤、组织或肿瘤的另一示例性递送系统;以及

[0028] 图9是用于用等离子体处理表面以打开孔并将DNA疫苗施用于处理过的区域的仪器的一个示例性实施方案的横截面。

[0029] 详细描述

[0030] 申请人已经开发出使用冷等离子体移动分子(包括DNA)细胞间(在细胞之间)和细胞内(进入细胞中)穿过皮肤层的技术。申请人于2014年9月29日提交了美国专利申请序列号14/500144,题目为“Method and Apparatus for Delivery of Molecules across Layers of the Tissue”,该申请以其全部内容通过引用并入本文。申请人的一些示例性方法应用等离子体提供DNA疫苗的安全、非接触式经皮递送和细胞摄取,其在本文中可以被称为等离子体穿孔(plasmaporator)。

[0031] 经皮递送要求分子通过皮肤。图1示出了皮肤100的各层。皮肤100的外层是角质层(“SC”)102。SC 102由死的扁平的富含角蛋白的细胞即角质细胞组成。这些致密的细胞被细胞间脂质——即神经酰胺类、游离脂肪酸类、胆固醇和胆固醇硫酸盐的复杂混合物包围。分子穿过SC的主要扩散途径似乎是细胞间途径。剩余的皮肤层是表皮(有活力的表层)104和真皮106。

[0032] 只有小部分的化合物可以经皮递送,因为皮肤100具有显著的屏障特性,即高亲脂性SC 102,其阻止分子渗透或扩散穿过皮肤。结果,只有分子量(MW)小于500道尔顿的相对小的分子能够经皮施用。当目的为外用皮肤病治疗、经皮全身性治疗或疫苗接种时,用于药物应用的创新性化合物的开发被局限为小于500道尔顿的MW。另外,大多数药物穿过皮肤的传送非常缓慢,而且达到稳态通量的滞后时间是按小时测量的。因此,在不使用严苛的化学渗透增强剂人工增强皮肤渗透的情况下,很难达到治疗有效的药物水平。

[0033] 等离子体穿孔使用非热等离子体或冷等离子体(物质的第四态),用于将DNA疫苗经皮递送至皮肤和免疫细胞中。非热等离子体是使用环境空气或其他气体和电力在大气压力下生成的部分电离气体。它通过两个电极之间存在的空气或其他气体在施加足够高的电压下分解而生成的,两个电极中的一个通常是绝缘的。第二个电极通常可以是电介质材料如活的皮肤、组织或肿瘤。使用脉冲电场来生成等离子体,并打开皮肤、组织或肿瘤中和细胞膜中临时的(可逆的)孔来促进大分子的经皮递送和细胞摄取。在一些实施方案中,临时

的孔保持开放约1分钟到约5分钟。可以控制用于生成非热等离子体的电参数以实现可逆的等离子体穿孔。电极不接触皮肤,不需要针头,而且与非热等离子体的接触是无痛且安全的。在一个或多个电极是绝缘的配置中,非热等离子体被描述为介质阻挡放电(“DBD”)等离子体,其即使是在绝缘电极接触皮肤、组织或肿瘤的情况下也是安全且无痛的。

[0034] 本文描述的等离子体穿孔技术是以无痛和非侵入性方式进行DNA疫苗递送的高效快速方法。在一些实施方案中,所述技术无需将DNA注射至皮肤中。提高的DNA递送效率使得每次免疫需要较少的DNA,每单位DNA的剂量数增加,DNA疫苗生产更容易且更快速,生产设备更小巧,对新疫苗的需求的反应更快速以及成本更低。大规模免疫规划可以在有电力的任何地方开展,并且对于生物危险废弃物或尖锐物(注射器针头)的处理的忧虑最小。

[0035] 本文描述的等离子体穿孔技术促进有效的外用的DNA疫苗进入活皮肤中的细胞摄取和功能。在猪体内研究中进行示例性实验,因为猪的皮肤在形状和功能上与人的皮肤非常接近。在下文描述的实验中,质粒DNA进入皮肤细胞中的细胞内摄取由来自编码标记绿色荧光蛋白(GFP)的质粒DNA基因的蛋白质的表达来表示。在一些实施方案中,编码质粒的GFP的来源和制备包括pEGFP-N1基本载体,其编码AcGFP1(墨绿多管水母(*Aequorea coerulescens*)GFP)绿色荧光蛋白(Clontech Laboratories)的一种非常稳定的形式。质粒DNA在大肠杆菌(*E. coli*)中扩增,并用商业上可获得的试剂盒(Qiagen Inc.)提纯。质粒DNA在指示的浓度下在无菌磷酸盐缓冲液中进行稀释。在一些实施方案中,编码绿色荧光蛋白的质粒DNA从Aldevron, Inc., Fargo, ND商业上获得。这种情况下的质粒DNA在不含DNase/RNase的超纯水中溶解和给药。质粒DNA的工作浓度是2mg/ml,并且外用或皮内注射的体积为100 μ l。除非完整的DNA被细胞细胞内摄取,随后表达编码的蛋白质才会获得信号。

[0036] 这些实验证明等离子体穿孔是电穿孔和其他经皮递送DNA的方法的安全且无痛的替代方案。生成非热等离子体的电参数、电极几何形状、DNA浓度、质粒DNA构建和质粒DNA施用于皮肤的方式(注射或在皮肤表面上外用)可以变化以优化过程。除了上述那些用途和很多其他用途之外,DNA疫苗的等离子体穿孔也可以用于预防病毒性感染(例如单纯性疱疹病毒、埃博拉病毒等)和治疗癌症(例如Her-2/neu乳腺癌),它们是目前正在研究中的疫苗靶点。

[0037] 在一些示例性实施方案中,等离子体穿孔涉及使用平面DBD等离子体发生器(图3和图4)或者DBD喷射等离子体发生器(图2和图5)或脉冲电晕发生器(图8)来无针经皮递送大分子。根据用于生成等离子体的参数(处理时间、施加电压、脉冲重复频率、脉冲持续时间、施加的脉冲次数、工作周期等),可以调节大分子的渗透深度以保证递送至靶层,该靶层可以是例如皮肤的表皮或真皮。这样,本文描述的非热等离子体穿孔技术可以促进在大气压和室温下递送的DNA疫苗的快速经皮递送并增强有效的细胞摄取,而无需像电穿孔和其他现有技术那样需要一次性电极或针头。

[0038] 申请人之前已证明等离子体穿孔可以增强外用的分子量多达70kDa的葡萄聚糖(dextran)分子、多达115kDa的蛋白质和直径多达50nm的纳米颗粒的经皮递送,15分钟内穿过离体猪皮,而不会引起任何皮肤损伤,如2014年9月29日提交的美国非临时申请序列号14/500144,题目为“Method and Apparatus for Delivery of Molecules Across Layers of Tissue”中所述,该申请以其全部内容通过引用并入本文。

[0039] 大气压非热等离子体可以驱动大分子通过表面并进入离体猪皮中,而不以任何方

式损害皮肤。非热等离子体能够实现的皮肤穿孔提供了一种在室温和大气压下经皮递送和细胞摄取DNA疫苗的非侵入性且安全的方法,而没有与电穿孔相关的可能的疼痛、肌肉收缩和其他副作用。因为该方法的应用不需要一次性电极或针头,消除了对处理生物危险废弃物的需要和生物危险耗材的非法滥用。使用非热等离子体的另一益处是生成的反应性物质(reactive species)可以在等离子体穿孔期间给皮肤灭菌。

[0040] 在等离子体相中,生成中性气体原子(或者分子)、电子、正/负离子和高能自由基。它们的生成和浓度部分地取决于被用于生成等离子体的气体的物理和化学性质、装置设计以及用于生成等离子体的电参数。非热等离子体对皮肤生成的电场的强度可以通过改变等离子体处理的时间;电极和皮肤、组织或肿瘤之间的间隙;施加的电压;脉冲持续时间;施加的脉冲次数、脉冲重复频率和工作周期来调节以局部化递送。这些参数允许控制大分子穿过皮肤、组织或肿瘤的深度和递送量,从而允许用最佳剂量治疗所靶向的皮肤或组织层,潜在地使每次治疗所用的昂贵的DNA疫苗的量最小化。

[0041] 等离子体运行参数可以改变,并且对于微秒脉冲等离子体应用,电源设置(对于外用和注射施用)可以包括以下范围内的设置:脉冲重复频率为50-3500Hz,脉冲持续时间在约1-10 μ s之间,电压在约11-20kV之间,工作周期在约1-100%之间,电压上升时间在约1-5V/ns之间。处理时间可以在约5秒到约180秒之间的范围内。类似地,对于纳秒脉冲等离子体应用(对于外用和注射这两种实验),电源设置可以设定为脉冲重复频率在约2-20000Hz之间,脉冲持续时间在约1ns-500ns之间,电压在约3-20kV之间,电压上升时间为约0.5-10kV/ns用于连续施加。对于不连续脉冲应用,设置可以为约1-100次脉冲,脉冲持续时间为约1ns-500ns,电压在约3-20kV之间,电压上升时间为0.5-10kV/ns。处理时间可以在约1秒到约300秒之间。脉冲可以有正或负极性。另外,对于纳秒脉冲电晕应用,电源设置可以设定为脉冲重复频率在约1-1000Hz之间,脉冲持续时间在约1ns-60ns之间,电压在约3-20kV之间,电压上升时间为约0.5-10kV/ns或者连续施加。对于电晕的不连续脉冲应用,设置可以为约1-100次脉冲,脉冲持续时间为约1ns-60ns,电压在约3-20kV之间,电压上升时间为0.5-10kV/ns。

[0042] 在一些实施方案中,使用具有优化的参数以达到安全的(对皮肤无热损伤或其他损伤)细胞DNA摄取和所编码的GFP的强烈表达的氦DBD喷射器。该装置在与电极尖端相距5-50mm的距离处在皮肤上产生聚焦等离子体束,从而允许更远程的应用。图2示出用于递送DNA质粒通过皮肤220的递送系统200的示例性实施方案。示例性递送系统200包括非热等离子体发生器201,该非热等离子体发生器201包括高压管状金属电极202和作为电介质的硼硅酸盐玻璃管204。等离子体发生器201是浮动电极介质阻挡放电(DBD)等离子体发生器,其生成等离子体“喷射流”206。

[0043] 等离子体发生器201包括气体进口215。可以用于进给等离子体喷射器的示例性气体包括He、He+O₂、N₂、He+N₂、Ar、Ar+O₂、Ar+N₂等。也可以使用来自液体溶液的蒸发的气体。汽化液体的实例可以包括水、乙醇、有机溶剂等。这些汽化液体可以与添加性药学物质化合物、渗透促进剂等混合。蒸发的液体和添加剂可以以各种浓度与上述气体一起使用或者在无气体的情况下使用。

[0044] 等离子体发生器201包括电源(未显示)。电源是高压电源并且可以具有很多不同的波形,举例来说,如恒定的、坡升的、坡降的、脉冲的、纳秒脉冲的、微秒脉冲的、方形的、正

弦的、衰减正弦的、随机的、同相的、异相的等。在一些示例性实施方案中,电源是微秒脉冲电源。在一些示例性实施方案中,电源是纳秒脉冲电源。在一些示例性实施方案中,通过施加交变极性脉冲电压生成等离子体206。在一些实施方案中,电压的脉冲宽度在约1-10 μ s(脉冲重复频率:50Hz至3.5kHz)之间,上升时间为5V/ns,幅值为约~20kV(峰间值),功率密度为0.1-10W/cm²。在操作过程中,等离子体喷射流206与皮肤220直接接触。

[0045] 等离子体允许电场到达皮肤并沉积电荷以显现跨皮肤的电压电位,其导致细胞内和细胞间穿孔。上述的等离子体穿孔是非侵入性的,因为等离子体电极没有与待治疗的组织或底物接触。

[0046] 关于细胞内穿孔,流体脂质双层膜的跨膜电压需要达到至少约0.2V。跨膜电压对脂质双层膜充电,引起快速的局部化的膜内结构重排,并且导致向充水膜结构转变,这使膜穿孔,形成“水通路”或“孔”。水通路或孔允许离子和分子传送总体增加。据信跨膜电压产生初级膜“孔”,其最小半径为约1nm。另外,施加的电场导致极化状态的快速变化,使不受约束的细胞膜(例如悬浮的囊泡和细胞)机械变形,并且引起受电解质传导性支配的离子电荷再分布。

[0047] 用于生成等离子体喷射流206的电脉冲也引起细胞间穿孔。约15-25 μ m厚的SC是皮肤最有电阻抗性的部分。用于生成等离子体喷射流206的电脉冲的施加导致经皮电压在约50V到约100V之间,这引起SC内的多层双层的穿孔。在这些施加的经皮电压水平下,也会发生汗腺管和毛囊的细胞衬层的穿孔。

[0048] 在从治疗区域移开等离子体源后,孔趋向于再次闭合,因此,该过程是可逆的。一些孔保持开放延长的一段时间,在此期间分子可以继续经由扩散穿过细胞膜。在其他一些情况下,施加的跨膜电位可能超过阈值,使得形成的孔无限期地保持开放。该过程被称为不可逆穿孔,并可以有益于癌症治疗。

[0049] 当电脉冲施加于皮肤时,吸收的能量可以引起皮肤的局部化发热和损伤。在完整皮肤上沉积大于100J/cm²的能量导致二度烧伤以及对完整皮肤下层组织的热损伤。解决这个问题的一种方法是反复施加短持续时间的脉冲,这允许以其他方式将会引起损伤的相同量的能量被转移,而不引起局部化发热和皮肤损伤。在一些实施方案中,在完整皮肤上沉积的能量小于约50J/cm²,在一些实施方案中,在完整皮肤上沉积的能量小于约25J/cm²,在一些实施方案中,在完整皮肤上沉积的能量小于约10J/cm²,在一些实施方案中,在完整皮肤上沉积的能量小于约5J/cm²,在一些实施方案中,在完整皮肤上沉积的能量小于约3J/cm²。然而,在治疗创伤时,能量可以增加例如500J/cm²,而不引起烧伤。在一些实施方案中,可以使用在500J/cm²范围内的能量来凝血。

[0050] 另外,皮肤损伤可以发生于局部等离子体微放电(也称为“菱式放电(streamers)”),该放电的发生是因为不均匀的电场,还可归因于被处理表面(如皮肤、组织或肿瘤)的不均匀性。这个问题可以通过形成均匀电场来克服。在一些实施方案中,氦气可以用作供应至等离子体发生器201的气体。已经发现使用氦气提供均匀的等离子体场并最小化菱式放电。另外,纳秒脉冲电源提供更均匀的等离子体场和对皮肤相应的潜在损伤。再者,皮肤损伤可以通过降低电源水平、处理时间、频率、工作周期和电源脉冲持续时间以及通过增加等离子体电极和待治疗的皮肤、组织或肿瘤之间的间隔来避免。

[0051] 在施加等离子体引起等离子体穿孔之后,并且一旦等离子体发生装置206被关闭,

水通路的多层系统保持开放一段时间,该时间可以最多至约几分钟到几小时。

[0052] 其他类型的等离子体发生器可以用于递送系统,举例来说,如纳秒脉冲DBD等离子体、微秒脉冲DBD等离子体、正弦DBD等离子体、电阻阻挡放电等离子体、表面DBD等离子体、2-D或3-D纳秒脉冲电晕阵列、在连续模式或在受控工作周期范围为1-100%的条件下运行的2-D或3-DDBD等离子体喷射流阵列等。不是所有的等离子体发生器都可以用于成功诱导穿孔。递送高电流或者显著升高被处理对象的温度的等离子体发生器不适合用于等离子体穿孔,包括热等离子体、滑动弧放电、等离子管等。这些等离子体发生器可能引起电击、严重的热损伤、肌肉收缩和疼痛,或者不递送足够的电荷至被处理的底物,这意味着没有或者仅有很弱的施加的电场,并因此不引发穿孔。

[0053] 合适的等离子体发生器具有主导电流,其为低功率和/或高频率下的位移电流。位移电流具有电流密度单元和相关的磁场,该磁场正如传导电流所具有的磁场,然而,位移电流不是运动电荷的电流,而是随时间变化的电场。通过不与皮肤接触的绝缘电极施加电场于皮肤。因为电极是绝缘的且不接触皮肤,所以只有最小的传导电流量进入皮肤。强传导电流会引起与电穿孔相关的电击、热损伤、肌肉收缩和疼痛。

[0054] 对于较大的治疗区域,可以使用由多个等离子体喷射器或更大面积的扁平电极(未显示)组成的电极配置。在更复杂的3D表面的情况下,受控的等离子体模块(未显示)可以围绕固定靶点移动,或者可以将待暴露于等离子体的表面放置在可移动台上。在一些实施方案中,一个或多个等离子体喷射器或可以连接到机械臂,该机械臂被编程为以使一个或多个靶区域暴露于等离子体羽流或喷射流的方式移动。

[0055] 另外,在一些实施方案中,等离子体发生器201可以与生物分子/药物递送系统连接,其中分子可以通过无针注射、施加加压气体、蒸发、喷雾和或雾化传送到治疗区域。在一些实施方案中,这可以辅助进行表面的预处理。

[0056] 在一些实施方案中,其中等离子体穿孔后降低等离子体温度并增强皮肤渗透是至关重要的,使用He、Ar、Ne、Xe等、空气或惰性气体与少量(0.1%-20%)其他气体如O₂和N₂的混合物和惰性气体与汽化液体包括水、二甲亚砜(DMSO)、乙醇、异丙醇、正丁醇的混合物,在使用或不使用添加剂等的情况下,生成非热等离子体是有益的。

[0057] 在一些实施方案中,使用非热平面DBD等离子体发生器来促进在猪皮表面上外用的质粒DNA的经皮递送和细胞摄取。图3示出示例性非热平面DBD递送系统300。递送系统300包括等离子体发生器301。等离子体发生器301包括高压线303,该高压线303在第一端与电极302连接,在第二端与高压电源(未显示)连接。合适的高压电源见上文所述。介质阻挡物304位于高压电极302下面。另外,高压电极302位于外壳305内。等离子体发生器301是非热介质阻挡放电(DBD)发生器。等离子体306由等离子体发生器301生成。图3还包括皮肤320。对于本文公开的示例性实验结果,皮肤320是活猪皮。当DBD等离子体源放置在距皮肤表面1-5mm的位置时,直接生成冷等离子体与皮肤接触。

[0058] 通过向电极302施加交变极性脉冲电压生成直接等离子体306。在一些实施方案中,施加的电压可以具有约1-10 μ s(脉冲重复频率:50Hz到30kHz)之间的脉冲宽度,幅值为约~20kV(峰间值)以及电压上升时间为约1-10V/ns。电源(未显示)可以是可变电压和可变频率电源。可以使用1mm厚的透明石英片、氧化铝或特氟龙(Teflon)作为绝缘介质阻挡物304并用于覆盖电极302。电极302可以是2.54cm直径的铜、黄铜或其他导电材料。介质阻挡

物304和猪皮320之间的放电间隙可以为约 $4\text{mm} \pm 1\text{mm}$ 。在一些实施方案中,脉冲波形可以具有约22kV(峰间值)的幅值、约 $9\mu\text{s}$ 的持续时间及约 5V/ns 的上升时间。放电功率密度可以为在约 0.1W/cm^2 至 2.08W/cm^2 之间。等离子体处理剂量(以 J/cm^2 计)可以由等离子体放电功率密度乘以等离子体处理持续时间来计算。

[0059] 另外,间接等离子体406可以用等离子体发生器401产生。等离子体发生器401与等离子体发生器301类似,除了等离子体发生器401包括过滤等离子体406的金属网330。金属网300防止带电离子和电子通过,但是允许中性物质通过并接触皮肤。中性物质可以被称为“余辉(afterglow)”。

[0060] 图5是递送系统500的另一个示例性实施方案的示意图。图6是递送系统500的电极的平面图。递送系统500包括多个DBD喷射器。示例性递送系统500具有蜂巢形状的DBD喷射器阵列;然而,可以使用许多其他配置,如,线形、三角形、正方形、五边形、六边形、八边形等。

[0061] DBD喷射器具有玻璃管504A、504B、504C、504D、504E、504F和504G。金属电极502包含多个圆柱形开口502A、502B、502C、502D、502E、502F、和502G,这些开口各自接收对应的玻璃管504A、504B、504C、504D、504E、504F和504G。任选地,可以使用多个金属电极。金属电极502可以具有绝缘覆盖物(未显示)以防止电击。如上文所述,金属电极502与高压电源连接。

[0062] DBD喷射器具有位于第一端的气体流入口,并具有从另一端出去的等离子体喷射流516A、516B、516C、516D、516E、516F和516G。如上文所述,气体可以是例如He、Ar、Ne、Xe、空气、He+空气、Ar+空气、Ne+空气、Xe+空气等。另外,每个玻璃管504A、504B、504C、504D、504E、504F和504G具有沿着玻璃管用来接收汽化液体添加剂的入口508A、508B、508C、508D、508E、508F和508G。这些入口可以位于电极502上方或者下方,示例性经皮递送系统500利用皮肤、组织或肿瘤作为接地电极。

[0063] 在图2的示例性实施方案中,皮肤、组织或肿瘤220直接暴露于含有中性和带电荷物质的等离子体206。类似地,在图3的示例性实施方案中,采用直接等离子体发生器301,在介质阻挡物304和皮肤320之间发生放电,其使皮肤直接暴露于中性反应性物质和带电粒子。

[0064] 由等离子体发生器401产生的间接等离子体使用置于高压电极和皮肤之间的接地铜网(网格大小为 16×16 ,电线直径为 $0.011''$,开口大小为 $0.052''$),所述铜网消除了带电粒子与暴露的皮肤表面的接触。

[0065] 图7是DNA疫苗的经皮递送的示例性方法700。在框702,示例性方法700开始。在框704,向治疗区域施加等离子体以打开皮肤、组织或肿瘤中的一个或多个孔。在框706,将DNA疫苗外用于皮肤、组织或肿瘤上的靶区域,然后在框708,等待一段时间。在一些实施方案中,等待时间为约3小时或者少于3小时,在一些实施方案中,等待时间为约2小时或者少于2小时。在一些实施方案中,等待时间为约1小时或者少于1小时,在一些实施方案中为约30分钟或者少于30分钟。在框710进行第二等离子体施加,以使皮肤、组织或肿瘤中的细胞穿孔,导致增强DNA疫苗的细胞内摄取,然后在框712,示例性方法结束。

[0066] 图8是等离子体系统的又一个示例性实施方案800,所述等离子体系统能够实现外用的质粒DNA的安全且有效的经皮递送,并促进皮肤、组织或肿瘤的细胞对DNA的细胞内摄取。该示例性实施方案800使用由纳秒脉冲电源(未显示)生成的脉冲电晕阵列。脉冲电晕阵

列由多个尖端802组成,在本示例性实施方案中所述尖端是不锈钢机械加工的尖端,厚0.1016mm,互相间隔1mm。尖端802形成2D脉冲电晕电极阵列。

[0067] 图9是疫苗接种仪器900的示例性实施方案的横截面,所述疫苗接种仪器900用等离子体处理表面以打开表面和/或细胞中的孔,并将DNA疫苗施用于处理过的区域。疫苗接种仪器900包括外壳902、通断开关904、表面接触环906、高压电极908、处理室910、DNA疫苗室912和活塞912。另外,疫苗接种仪器900包括电源(未显示),所述电源可以提供所需的功率,包括本文所述的所有电源设定。在一些实施方案中,表面接触环906是可拆卸的,并且可以在每次使用后进行替换。另外,在一些实施方案中,表面接触环906包括接地环(未显示)。

[0068] 疫苗接种仪器900可以以多种不同模式进行操作。在一个示例性实施方案中,在电源(未显示)上选择电源设置,操作员将表面接触环906放置在表面上,举例来说,如人的皮肤、组织、肿瘤等。操作员按下开始按钮904导致所需的电压被施加于高压电极908,在处理室910中产生等离子体。在充足的一段时间之后,将等离子体施加于皮肤表面以打开皮肤中的孔。操作员向下按压活塞914导致储存在疫苗室912中的DNA疫苗被注射到处理室910中。在过去充足的一段时间以允许DNA疫苗通过皮肤、组织、肿瘤等中的打开的孔之后,向高压电极施加期望的功率以产生等离子体以打开一个或多个细胞中的孔,从而引起DNA疫苗的细胞摄取。

[0069] 在另一个示例性实施方案中,在电源(未显示)上选择电源设置,操作员将表面接触环906放置在表面上,举例来说,如人的皮肤、组织、肿瘤等。操作员按下开始按钮904导致所选的电压被施加至高压电极908,在处理室910中产生等离子体。将等离子体施加于表面以打开皮肤、组织、肿瘤等中的孔并打开细胞中的孔。操作员向下按压活塞914导致储存在疫苗室912中的DNA疫苗被注射到处理室910中。充足的一段时间之后,允许DNA疫苗通过打开的孔并被细胞摄取。

[0070] 实验结果

[0071] 对活动物进行一些实验。在三个活动物实验中使用三只5-7个月大的尤卡坦小型猪(Yucatan minipigs)。每个研究包括对一只小型猪进行的一些实验。实验对照包括:无等离子体处理,未施用质粒DNA;无等离子体处理,皮内注射质粒DNA;皮内注射质粒DNA后电穿孔(本领域的当前状态)。实验样品包括:皮内注射后微秒脉冲等离子体;皮内注射后纳秒脉冲等离子体;微秒脉冲等离子体后外用质粒DNA施用;以及纳秒脉冲等离子体后外用质粒DNA施用。

[0072] 第一个对照不涉及质粒DNA施用,因此处理动物2天后没有观察到绿色荧光蛋白(GFP)的表达。

[0073] 在第二个对照中,皮内注射("ID")质粒DNA,这产生一些GFP表达。然而,GFP的表达主要集中于真皮中,在表皮中只有极少的表达(表皮中的表达在获取对所给药的疫苗的强烈的免疫反应方面是重要的)。基于从活组织检查获得的数据得到归一化强度。归一化强度显示在下表I中。

[0074] 表I

[0075]

小型猪	注射对照 (归一化强度)	电穿孔 (归一化强度)	等离子体处理
#1	8.57E+06		
#2	1.95E+06		

[0076]

#3	3.96E+06		
----	----------	--	--

[0077] 在第三个对照中,皮内注射质粒DNA后使用标准双针电极在以下条件下进行电穿孔:电场为200V/cm,16次脉冲,150ms持续时间,频率是1Hz,8次脉冲后电极90°旋转。电穿孔后,在表皮中观察到强的GFP表达,而在真皮中观察到很少的GFP表达。基于从活组织检查获得的数据得到归一化强度。归一化强度显示在下表II中。如上文所述,电穿孔具有包括疼痛在内的诸多副作用。另外,电穿孔需要在处理前进行质粒DNA的皮内注射,因为不像等离子体处理,电穿孔不能用于促进外用的质粒DNA穿过高阻力角质层或组织或肿瘤的细胞间递送。

[0078] 表II

[0079]

小型猪	注射对照 归一化强度	电穿孔 归一化强度	等离子体处理
#1	8.57E+06	1.78E+07	
#2	1.95E+06	4.13E+06	
#3	3.96E+06	4.29E+06	

[0080] 在第一组实验中,皮内注射质粒DNA(100μl,2mg/ml)并且在注射后使用微秒脉冲DBD等离子体进行等离子体处理,电源设置为3500Hz,脉冲持续时间为5μs,电压为15kV和100%工作周期。对该区域处理持续下表所示的时间。DBD等离子体处理两天后,在表皮和真皮中均观察到被质粒编码的蛋白质的强烈表达。基于从活组织检查获得的数据得到归一化强度。归一化强度列于下表III中。

[0081] 表III

[0082]

小型猪	注射对照 归一化强度	电穿孔 归一化强度	微秒脉冲 DBD 处理
#1	8.57E+6 ¹	1.78E+07	2.03E+07, 两个 30 秒处理 1.42E+07, 两个 60 秒处理
#2	1.95E+06	4.13E+06	5.01E+06, 一个 30 秒处理

[0083]

#3	3.96E+06	4.29E+06	7.98E+06, 一个 45 秒处理
----	----------	----------	---------------------

[0084] ¹信号强度取决于许多因素,如皮肤切片的厚度、组织学处理、DNA质量等。虽然在每个实验里强度是一致的,但是在各个实验之间强度可能不是精确相关的。

[0085] 数据证明使用微秒连续DBD等离子体处理相对于注射对照在细胞摄取方面分别得到137%、66%、166%和102%的增加。另外,数据证明对于引起细胞摄取,使用微秒连续DBD等离子体优于电穿孔。数据证明使用微秒连续DBD处理相对于电穿孔在细胞摄取和GFP表达方面分别得到14%、20%、21%和86%的增加。

[0086] 在第二组实验中,皮肤用微秒脉冲DBD等离子体处理。电源被设定为3500Hz,脉冲持续时间为5 μ s,电压为15kV。处理时间为120秒。将100 μ l质粒DNA溶液施用于用等离子体处理的区域持续下表所述的一段时间(“保持时间”)。施加第二DBD等离子体处理60秒,电源设定为3500Hz,脉冲持续时间为5 μ s,电压为15kV。

[0087] 在表皮和真皮中均观察到GFP的强烈表达。这些实验证明等离子体穿孔能够实现质粒DNA细胞间递送到正确的皮肤层,而且能够实现表皮和真皮中的细胞对质粒DNA的细胞内摄取。另外,该示例性方法消除了对针刺入的需要、相关的生物危险废弃物的处理和尖锐废弃物的非法重复使用。归一化强度列于下表IV中。

[0088] 表IV

[0089]

小型猪	注射对照 归一化强度	电穿孔 归一化强度	微秒脉冲 DBD 处理
#1	8.5736E+6	1.7801E+07	9.4004E+06, 两个 35 分钟保持时间 2.1710E+07, 两个 60 分钟保持时间
#2	1.956E+06	4.134E+06	3.341E+06, 一个 60 分钟保持时间 ²
#3	3.960E+06	4.295E+06	4.399E+06, 一个 15 分钟保持时间 ³

[0090] ²在两个组织学处理样品中不存在角质层,因为该皮肤由于以前的动物损伤而极度敏感,因此结果没有包括在数据中。

[0091] ³有一个60分钟保持时间的结果没有引起表达并且没有包括在结果中,这归因于动物与动物之间的差异。

[0092] 数据证明用微秒连续DBD等离子体处理皮肤,外用质粒DNA,并使用第二微秒连续DBD等离子体处理以引起细胞摄取相对于注射对照在细胞摄取方面分别得到10%、153%、71%和11%的提高。一些数据证明该外用方法与电穿孔一样好或比电穿孔更好,没有与电穿孔相关的疼痛和其他副反应。然而,一些实验结果表明该方法可能需要改良和/或参数可能需要调整。结果还表明结合一种或多种等离子体处理(举例来说,例如,使用微秒连续DBD等离子体来处理皮肤并打开孔,以及使用纳秒脉冲处理(在下面公开)以引起细胞内摄取)可以是有利的。

[0093] 在第三组实验中,皮内注射质粒DNA(2mg/ml, 100 μ l),随后使用纳秒脉冲电源施加若干次DBD等离子体脉冲,所述纳秒脉冲电源被设置为20kV,脉冲持续时间为500ns。等离子

体处理2天后,在表皮和真皮中均观察到GFP的强烈表达。实验证明在一些实施方案中,只需要25次脉冲,因此该示例性方法可以是极其快速、安全的,并且等离子体可以施加非常短的持续时间。另外,此方法使用较少的电力,并且使用手提式电池供电等离子体施加器就能够实施。归一化强度列于下表V中。

[0094] 表V

[0095]

小型猪	注射对照 归一化强度	电穿孔 归一化强度	纳秒脉冲DBD处理
#1	8.57E+06	1.78E+07	2.08E+07, 25次脉冲
#2	1.95E+06	4.13E+06	5.28E+06, 25次脉冲 5.30E+06, 100次脉冲 3.40E+06, 75次脉冲
#3	3.96E+06	4.29E+06	8.61E+06, 25次脉冲

[0096] 数据证明使用纳秒脉冲DBD等离子体处理相对于注射对照在细胞摄取方面分别得到143%、170%、171%、74%和117%的提高。另外,数据证明使用纳秒脉冲DBD等离子体处理对于增强细胞摄取优于电穿孔。数据证明使用纳秒脉冲DBD等离子体处理在细胞摄取方面与电穿孔相比分别得到17%、28%、28%、-18%和100%的提高。

[0097] 在第四组实验中,皮内注射质粒DNA(2mg/ml, 100 μ l),随后等离子体处理若干秒。等离子体处理是连续纳秒脉冲DBD等离子体处理,所用的电源设定为20kV, 200Hz, 脉冲持续时间为200ns。用连续纳秒DBD等离子体进行等离子体处理2天后,在表皮和真皮中均观察到GFP的强烈表达。归一化强度列于下表VI中。

[0098] 表VI

[0099]

小型猪	注射对照 归一化强度	电穿孔 归一化强度	纳秒脉冲DBD处理
#1	8.57E+6	1.78E+07	1.07E+07, 60秒 1.13E+07, 80秒
#2	1.95E+06	4.13E+06	4.8E+06, 120秒
#3	3.96E+06	4.29E+06	3.8E+06, 120秒

[0100] 数据证明使用连续纳秒脉冲DBD等离子体处理相对于注射对照在细胞摄取方面分别得到26%、33%、150%和-3.82%的提高。结果未表明这些设置优于电穿孔。

[0101] 在第五组实验中,对皮肤施加120秒连续纳秒脉冲DBD等离子体处理,所用的电源设定为200Hz, 20kV, 脉冲持续时间为200ns。将100 μ l 质粒DNA溶液外用于处理过的区域,持续30分钟或60分钟。对处理区域施加第二120秒连续纳秒DBD等离子体处理,所用的电源设

定为200Hz, 20kV, 脉冲持续时间为200ns。主要是在真皮中观察到GFP的弱表达, 在表皮层中未观察到表达。

[0102] 在第六组实验中, 皮内注射质粒DNA(2mg/ml, 100 μ l), 随后使用2D脉冲电晕阵列使用脉冲或连续施加进行等离子体处理。在一个实例中, 用在20kV施加电压下的25次脉冲持续时间为500ns的脉冲处理皮肤, 而在第二实例中, 用100Hz频率, 80ns脉冲持续时间和20kV施加电压处理皮肤30s。在这两种情况中, 用脉冲电晕阵列等离子体处理2天后, 在表皮和真皮中均观察到GFP的强烈表达。归一化强度列于下表VII中。

[0103] 表VII

[0104]

小型猪	注射对照 归一化强度	电穿孔 归一化强度	纳秒脉冲电晕处理
#3	3.96E+06	4.29E+06	8.61E+06, 25次脉冲 7.81E+06, 30秒

[0105] 数据证明使用纳秒脉冲电晕处理相对于注射对照在细胞摄取方面分别得到117%和97%的提高。另外, 数据证明对于增强细胞摄取, 使用纳秒脉冲电晕处理优于电穿孔。数据证明使用脉冲纳秒电晕与电穿孔相比在细胞摄取方面分别得到100%和82%的增加。实验证明在一些实施方案中, 只需要25次脉冲, 因此该示例性方法可以是极其快速的, 并且等离子体可以施加非常短的持续时间。另外, 此方法使用较少的电力, 并且使用手提式电池供电等离子体施加器就能够实施。

[0106] 虽然本发明已经通过描述其实施方案而得到说明, 并且已经非常详细地描述了这些实施方案, 但申请人并不意图限制或以任何方式限定附加权利要求范围至这些细节。对本领域技术人员而言另外的优点和修改将显而易见。例如, 可以开发灵活的和可穿戴的电极, 并且可以优化非热等离子体的产生用于经皮递送。本文所述方法可以用于引起除DNA疫苗以外的其他大分子(例如, 抗体、药物)的细胞摄取。因此, 本发明, 在其更广泛的方面, 不局限于所显示和描述的特定的细节、代表性仪器和例证。因此, 在不偏离申请人的总发明构思的精神或范围的情况下, 可以偏离这些细节。

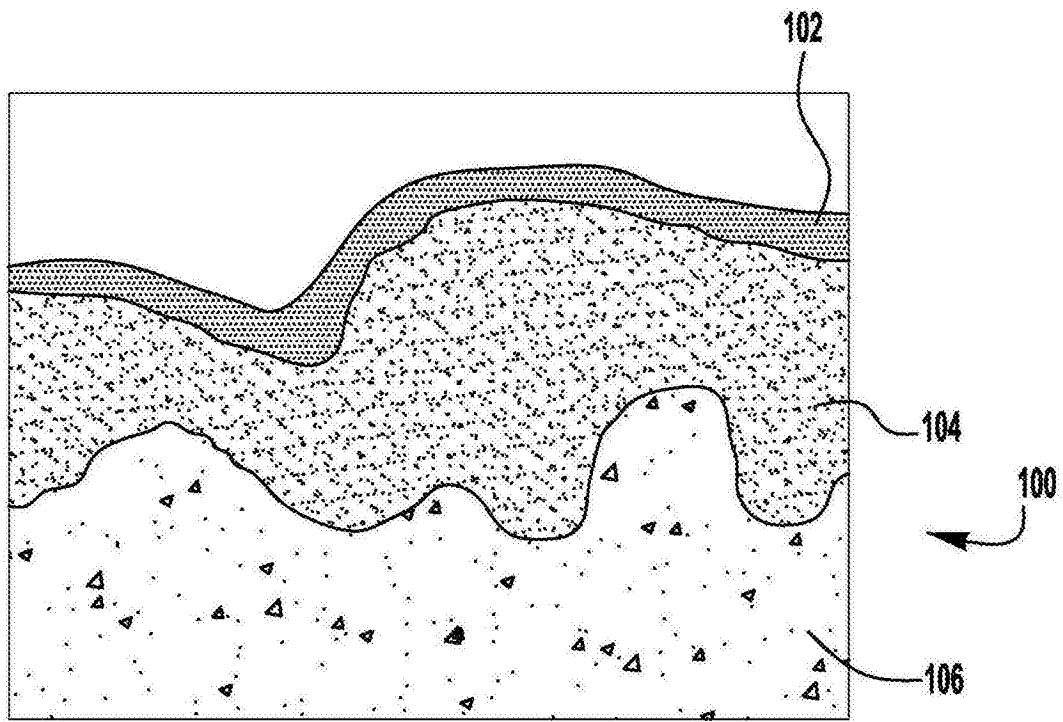


图1

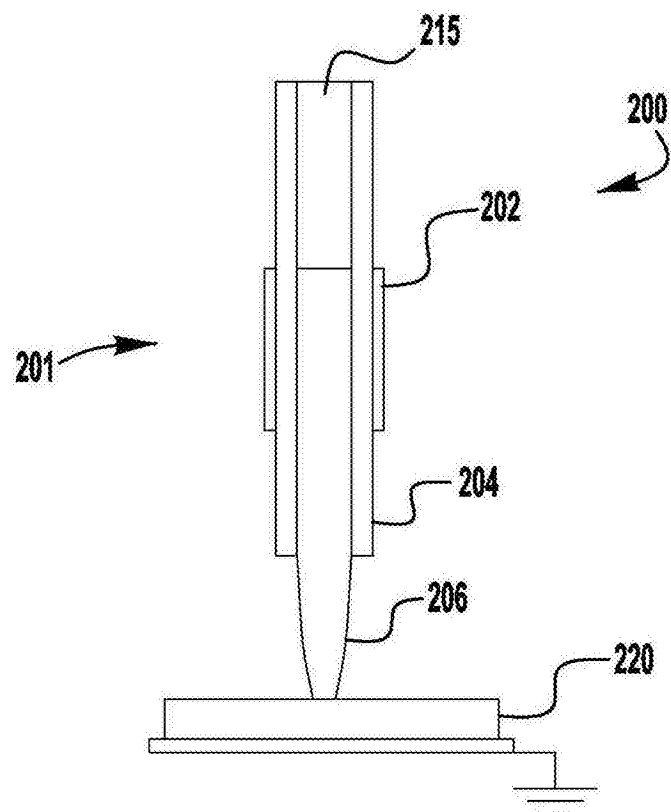


图2

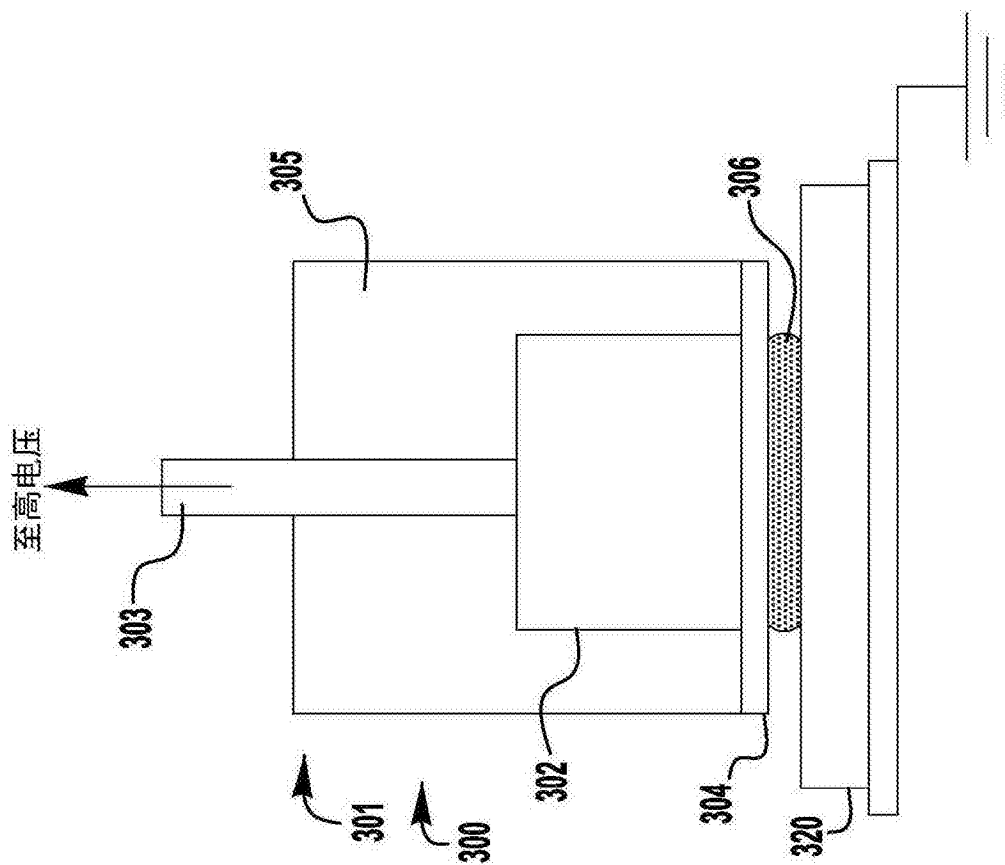


图3

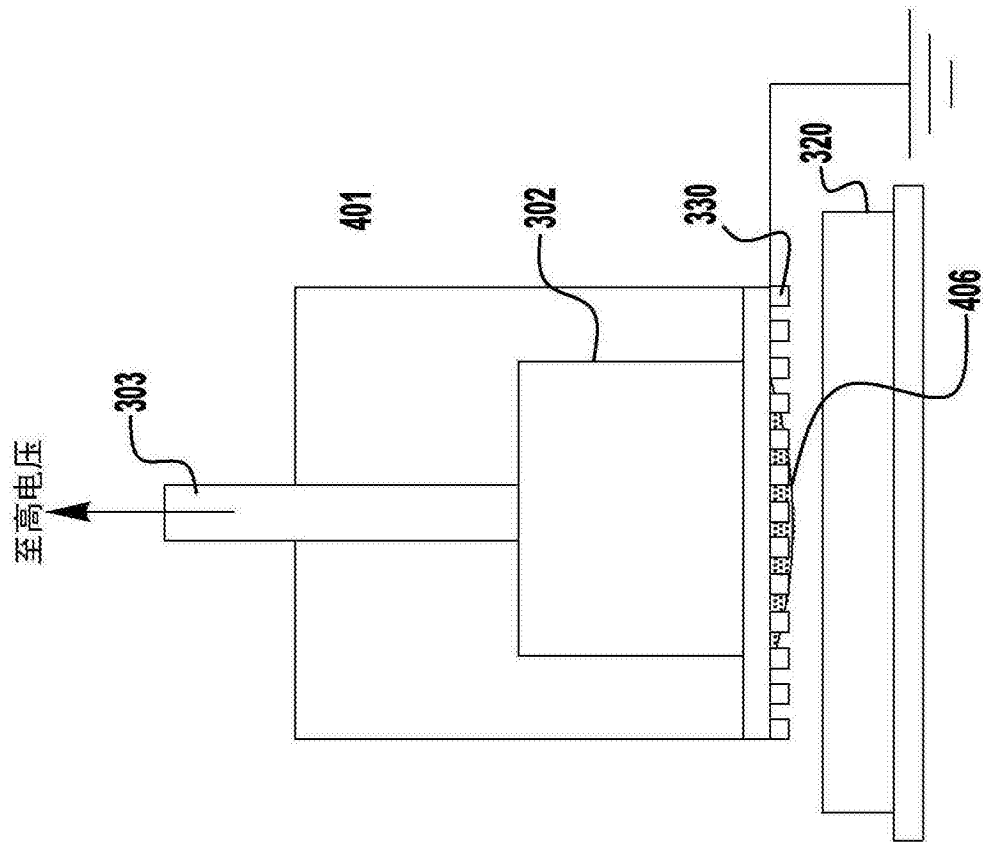
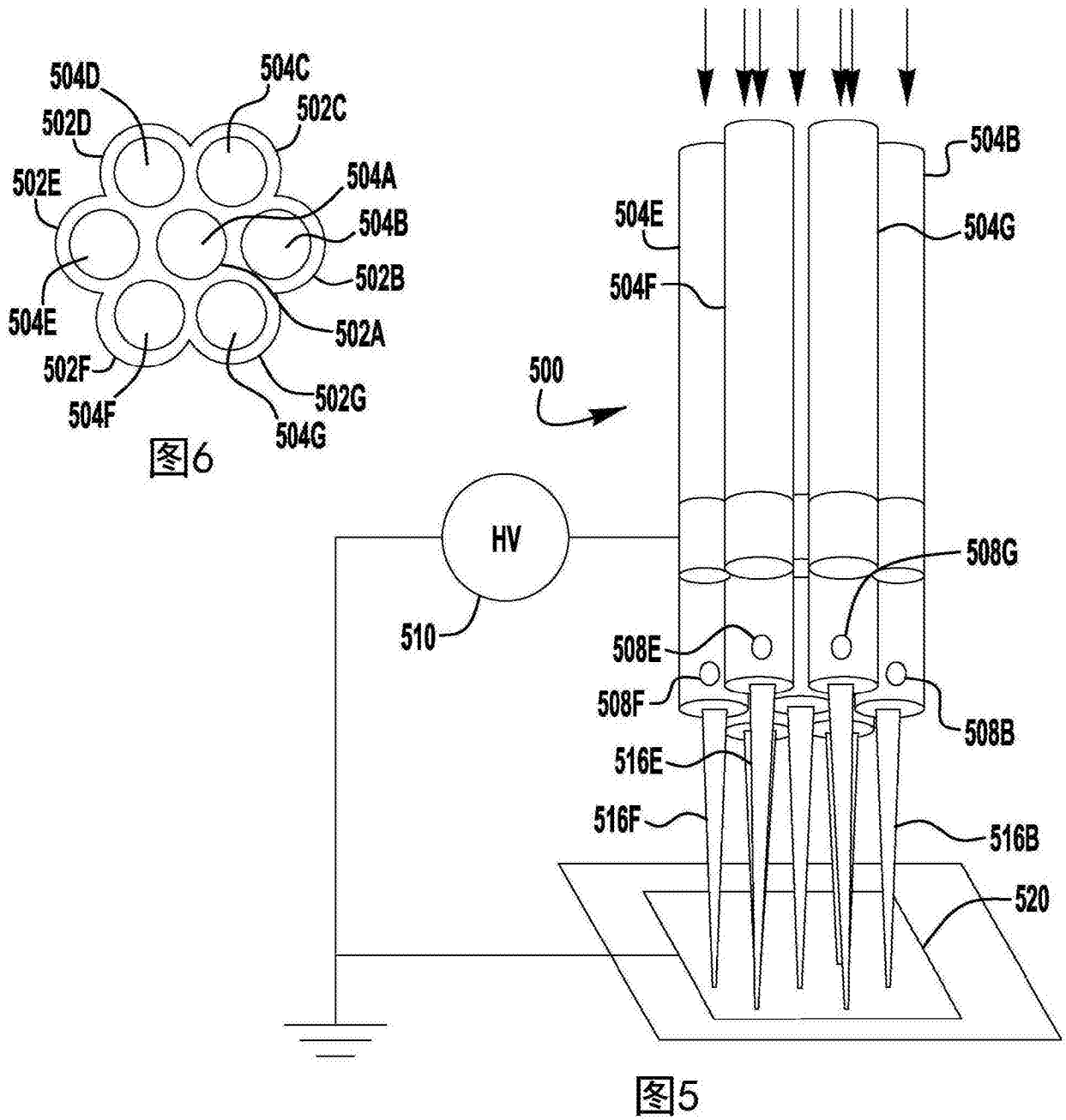


图4



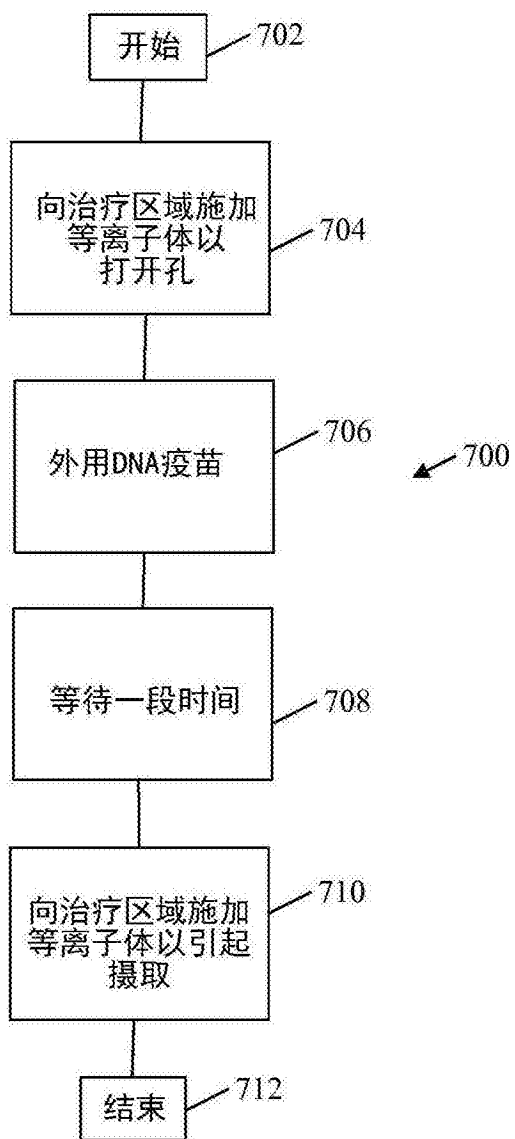


图7

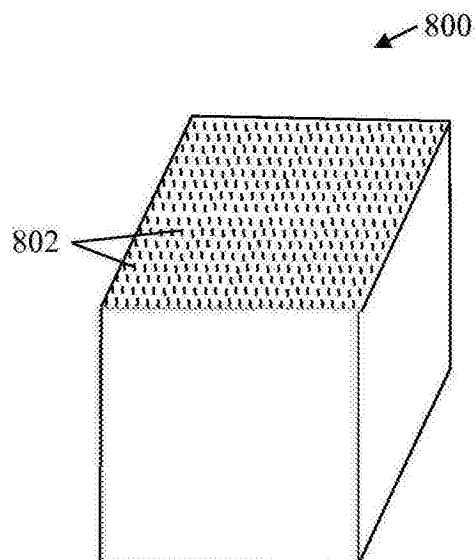


图8

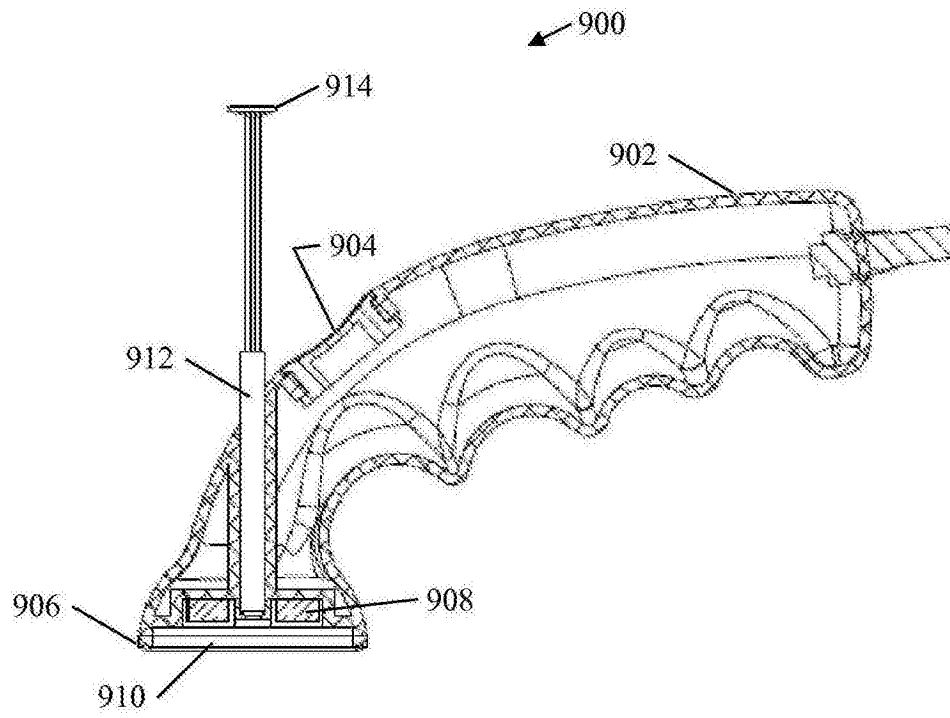


图9