(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2015-515886
(P2015-515886A)
(43)公表日　平成27年6月4日(2015.6.4)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61M 37/00	***(2006.01)***	A61M	37/00	530	4C167
		A61M	37/00	505	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 52 頁）

(21)出願番号	特願2015-510434 (P2015-510434)
(86)(22)出願日	平成25年5月1日 (2013.5.1)
(85)翻訳文提出日	平成26年12月15日 (2014.12.15)
(86)国際出願番号	PCT/US2013/039084
(87)国際公開番号	WO2013/166162
(87)国際公開日	平成25年11月7日 (2013.11.7)
(31)優先権主張番号	61/641,209
(32)優先日	平成24年5月1日 (2012.5.1)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人　506339556
ユニバーシティ　オブ　ピッツバーグ　－　オブ　ザ　コモンウェルス　システム　オブ　ハイヤー　エデュケイション
アメリカ合衆国　ペンシルバニア　１５２６０，　ピッツバーグ，　サッカレー　アンド　オハラ　ストリーツ，　ガードナー　スティール　カンファレンス　センター　２００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】経皮挿入するための先端装填型マイクロニードルアレイ

(57)【要約】
マイクロニードルアレイを形成する方法は、１種または複数種の生物活性成分を有するマイクロニードルアレイを形成するステップを含みうる。マイクロニードルアレイは、基部、および基部から延在する複数のマイクロニードルを含むことができ、１種または複数種の生物活性成分は、基部より複数のマイクロニードル内での方が高い濃度で存在する。本明細書に開示されるシステムおよび方法は、ヒト皮膚への生物学的に活性な分子の効率的で正確で再現可能な送達をもたらしうる溶解可能マイクロニードルアレイに基づく皮膚送達プラットフォームを含む。マイクロニードルアレイ送達プラットフォームは、患者に広い範囲の生物活性成分を送達するのに使用することができる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
患者に経皮挿入するための溶解可能マイクロニードルアレイであって、
１種または複数種の生物活性成分、
基部、および
前記基部から延在する複数のマイクロニードル
を含み、
前記１種または複数種の生物活性成分は、前記基部内より前記複数のマイクロニードル内での方が高い濃度で存在する、溶解可能マイクロニードルアレイ。
【請求項２】
前記１種または複数種の生物活性成分の実質的にすべてが、前記基部がいずれの生物活性成分もその中に含有せずに実質的に形成されるように、前記複数のマイクロニードル内に位置している、請求項１に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項３】
前記１種または複数種の生物活性成分が、前記１種または複数種の生物活性成分が、前記マイクロニードルアレイのそれぞれのマイクロニードルの上半分のみに一般に存在するように前記複数のマイクロニードル内に局所的に集中している、請求項２に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項４】
前記複数のマイクロニードルが、頂部に第１の断面寸法、底部に第２の断面寸法、および中間部に第３の断面寸法を含む形状を有するように事前形成されており、前記中間部が、前記頂部と前記底部の間に位置しており、前記第３の断面寸法が、前記第１および第２の断面寸法より大きい、請求項２に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項５】
前記１種または複数種の生物活性成分が、前記中間部における領域またはそれより上の領域内に実質的に集中している、請求項４に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項６】
各マイクロニードルが一般に、前記中間部より上である点へと先細になっており、各マイクロニードルが一般に、前記中間部より下でより小さい断面寸法へと先細になっている、請求項５に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項７】
各マイクロニードルが、溶解性生体適合性材料の複数の層を含む、請求項２に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項８】
前記溶解性生体適合性材料がカルボキシメチルセルロースである、請求項７に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項９】
前記１種または複数種の生物活性成分が、少なくとも２種の異なる生物活性成分を含む、請求項２に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項１０】
前記少なくとも２種の異なる生物活性成分が、化学療法剤、アジュバント、およびがん化学免疫療法適用のための化学誘引物質からなる群から選択される、請求項９に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項１１】
前記生物活性成分が、抗原、およびワクチン適用のためのアジュバントを含む、請求項９に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項１２】
前記１種または複数種の生物活性成分が、少なくとも１種のウイルスベクターを含む、請求項２に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項１３】

前記少なくとも１種のウイルスベクターがアデノベクターを含む、請求項１２に記載のマイクロニードルアレイ。
【請求項１４】
マイクロニードルアレイを製作する方法であって、
１種または複数種の生物活性成分をその中に含有する溶解性生体適合性材料の第１の溶液をマイクロニードルアレイ製造用金型に塗布するステップと、
１種または複数種の活性成分を含有しない溶解性生体適合性材料の第２の溶液を前記マイクロニードルアレイ製造用金型に塗布するステップと、
前記第１および第２の溶液を乾燥させて、基部、および前記基部から延在する複数のマイクロニードルを含む固体マイクロニードルアレイを形成するステップとを含み、
前記１種または複数種の活性成分は、前記複数のマイクロニードル内に実質的に集中している、方法。
【請求項１５】
前記１種または複数種の生物活性成分が、前記マイクロニードルアレイのそれぞれのマイクロニードルの上半分に実質的に集中している、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記第１の溶液の前記１種または複数種の生物活性成分が、少なくとも１種のウイルスベクターを含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
前記少なくとも１種のウイルスベクターがアデノベクターを含む、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
マイクロニードルアレイを形成する方法であって、
複数の層を有する材料のシートを形成するステップであって、前記複数の層の少なくとも１つが少なくとも１種の生物活性成分を含む、ステップと、
基部、および前記基部から延在する複数のマイクロニードルを有するマイクロニードルアレイが形成されるまで、前記材料のシートから諸部分を除去するステップとを含み、
前記シートアレイからの諸部分の前記除去は、前記１種または複数種の生物活性成分が、前記マイクロニードルアレイのそれぞれの前記マイクロニードル内に集中しており、かつ、前記１種または複数種の生物活性成分は、前記基部には実質的に存在しないように、前記マイクロニードルアレイを形成することを含む、方法。
【請求項１９】
前記材料のシートを形成する方法が、前記材料のシート全体にわたって前記少なくとも１種の生物活性成分を空間的に分布させることを含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記空間的に分布した生物活性成分が、前記マイクロニードルアレイを形成するために前記材料のシートから諸部分を除去する前に、溶解性生体適合性材料の後続の層で覆われる、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
第１の溶液または懸濁物の前記少なくとも１種の生物活性成分が、少なくとも１種のウイルスベクターを含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２２】
前記少なくとも１種のウイルスベクターがアデノベクターを含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
マイクロニードルアレイを形成する方法であって、
複数の層を有する材料のシートを形成するステップであって、前記複数の層の少なくとも１つは少なくとも１種の生物活性成分を含む、ステップと、
前記材料のシートをマイクロミリングして、基部、および前記基部から延在する複数のマイクロニードルを含む、マイクロニードルアレイを形成するステップとを含み、

前記少なくとも１種の生物活性成分は、前記マイクロニードルアレイのそれぞれの前記マイクロニードル内に集中しており、かつ、前記少なくとも１種の生物活性成分は、前記基部には実質的に存在しない、方法。

【請求項２４】

複数の層を有する材料のシートを形成する行為が、

実質的に均一な厚さを有するベース層を作るために、カルボキシメチルセルロースのヒドロゲルの層を準備することと、

前記ベース層が実質的に固体になるまで前記ベース層を乾燥させることと、

前記ベース層の上に１つまたは複数の活性層を設けることであって、前記１つまたは複数の活性層は、実質的に均一な厚さを有し、かつカルボキシメチルセルロースのヒドロゲルおよび生物活性成分を含む、ことと、

前記１つまたは複数の活性層が実質的に固体になるまで、前記１つまたは複数の活性層を乾燥させることと

を含む、請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

前記材料のシートをマイクロミリングする行為が、

前記材料のシートをマイクロミリングして、形状がほぼピラミッド形である複数のマイクロニードルを形成することを含む、請求項２３に記載の方法。

【請求項２６】

前記材料のシートをマイクロミリングする行為が、

各マイクロニードルが、頂部に第１の断面寸法、底部に第２の断面エリア、および中間部に第３の断面寸法を含むように、前記マイクロニードルアレイを形成することを含み、前記中間部が、前記頂部と前記底部の間に位置しており、前記第３の断面寸法が、前記第１および第２の断面寸法より大きく、前記少なくとも１種の生物活性成分が、前記中間部において、またはその上に集中している、請求項２３に記載の方法。

【請求項２７】

前記少なくとも１種の生物活性成分が、２種以上の異なる生物活性成分を含む、請求項２３に記載の方法。

【請求項２８】

前記２種以上の異なる生物活性成分が、化学療法剤、アジュバント、およびがん化学免疫療法適用のための化学誘引物質からなる群から選択される、請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】

前記２種以上の異なる生物活性成分が、少なくとも１種の抗原、および少なくとも１種のワクチン適用のためのアジュバントを含む、請求項２７に記載の方法。

【請求項３０】

前記少なくとも１種の生物活性成分が、少なくとも１種のウイルスベクターを含む、請求項２３に記載の方法。

【請求項３１】

前記少なくとも１種のウイルスベクターがアデノベクターを含む、請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

標的組織内にマイクロニードルアレイを送達するための装置であって、

前記マイクロニードルアレイの構造支持体の面にほぼ垂直である力を印加するための、マイクロニードルアレイと係合するようにサイズ決めされたアプリケーターヘッド、

電源、

前記電源に結合した電磁オシレータ、および

前記電磁オシレータに結合したオシレータエネルギー変換器

を備え、

前記オシレータエネルギー変換器は、前記電磁オシレータによって生成される電磁振動を、前記アプリケーターヘッドの機械的運動に変換するように構成されている、装置。

【請求項３３】
前記アプリケーターヘッドが、前記装置に着脱可能に結合している、請求項３２に記載の装置。
【請求項３４】
前記アプリケーターヘッドが、オートクレーブによる滅菌に耐えうる材料を含む、請求項３２に記載の装置。
【請求項３５】
前記電源が、前記装置に着脱可能に結合している、請求項３３に記載の装置。
【請求項３６】
前記電磁オシレータが、前記装置に着脱可能に結合しており、その流体滅菌を可能にするように完全に密閉されている、請求項３３に記載の装置。
【請求項３７】
前記アプリケーターヘッドが、前記マイクロニードルアレイの前記構造支持体の前記面にほぼ垂直である面内で運動し、前記マイクロニードルアレイの前記構造支持体の前記面に平行な面内での前記アプリケーターヘッドの運動が実質的に制限されている、請求項３３に記載の装置。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は、２０１２年５月１日に出願された米国仮特許出願第６１／６４１，２０９号の利益を主張し、この米国仮特許出願は、その全体が本明細書中に参考として援用される。
【０００２】
分野
本開示は、経皮薬物送達のためのシステムおよび方法、特に、溶解可能マイクロニードルアレイを作製および使用するためのシステムおよび方法に関する。
【０００３】
政府支援の承認
本発明は、国立衛生研究所により授与された認可番号ＥＢ０１２７７６、ＡＩ０７６０６０、およびＣＡ１２１９７３の下での政府支援で行われた。政府は、本発明におけるある特定の権利を有する。
【背景技術】
【０００４】
背景
皮膚の際立った物理的バリア機能は、経皮薬物送達に対する重要な課題を有する。この課題に対処するために、様々なマイクロニードルアレイベース薬物送達デバイスが開発されてきた。例えば、一従来法は、活性成分をまったく含まない固体または中空マイクロニードルアレイを使用する。このようなマイクロニードルアレイは、生物製剤担体または伝統的なパッチを局部適用する前に経皮的薬物浸透を増強するために、角質層および表皮の上層を穿孔することによって皮膚を前処理することができる。この方法は、皮膚の浸透性を著しく増大させることが示されているが、送達される薬物またはワクチンの投与量および量を制御するのに限られた能力しかもたらさない。
【０００５】
別の従来法は、薬物で表面被覆された固体マイクロニードルを使用する。この方法は、いくぶん良好な投与量制御をもたらすが、送達される薬物の量を大いに制限する。この欠点は、この手法の広範な適用を制限しており、例えば、ワクチン適用における抗原および／または補助剤の組合せの最適量の同時送達を妨げる。
【０００６】
別の従来法は、生物製剤のリザーバーに取り付けられた中空マイクロニードルを使用す

ることを含む。これらのアレイのシリンジ針型特徴は、送達の速度および精度、ならびに送達されるカーゴの量を著しく増大させることができる。しかし、複雑な製作手順および特殊な適用設定は、このようなリザーバーベースマイクロニードルアレイの適用性を制限する。

【０００７】

さらに別の従来法は、生分解性および溶解可能である固体マイクロニードルアレイを使用することを含む。溶解可能ポリマーベースマイクロニードルの現在の製作手法は一般に、マイクロキャスティングプロセスを使用する。しかし、このような従来のプロセスは、アレイ中に包埋されうる活性成分に制限され、また、活性成分がマイクロニードルおよびこれらの支持構造体に均質的に包埋されることを必要とするため無駄が多い。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

したがって、マイクロニードルアレイベースデバイスを使用する生物製剤の経皮送達は、普及している経口および針ベース薬物送達法に比べて魅力的な理論的利点を提供するが、相当な実用的な限定事項が、従来のプロセスを使用して構築されるマイクロニードルアレイに関連した設計および製作において存在する。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

要旨

本明細書に開示されるシステムおよび方法は、ヒト皮膚への生物学的に活性な分子の効率的で正確で再現可能な送達をもたらしうる溶解可能マイクロニードルアレイに基づく皮膚送達プラットフォームを含む。マイクロニードルアレイ送達プラットフォームは、患者に広い範囲の生物活性成分を送達するのに使用することができる。

【００１０】

開示される実施形態の前述および他の目的、フィーチャおよび利点は、添付の図面を参照して進行する以下の詳細な説明からより明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】図１は、例示的なマイクロニードルおよびこれらの寸法を示す図である。

【図２】図２は、例示的なマイクロニードルアレイおよびその寸法を示す図である。

【図３】図３Ａおよび図３Ｂは、活性成分が先端に装填された例示的なマイクロニードルを示す図である。

【図４】図４Ａおよび図４Ｂは、活性成分が先端に装填された例示的なマイクロニードルを示す図である。

【図５】図５Ａおよび図５Ｂは、活性成分が先端に装填された例示的なマイクロニードルを示す図である。

【図６】図６Ａおよび図６Ｂは、活性成分が先端に装填された例示的なマイクロニードルを示す図である。

【図７】図７は、マイクロニードルマスター金型を製作するのに使用されるミニチュア精密マイクロミリングシステムを示す図である。

【図８】図８は、ピラミッド針を有するマイクロミリング（ｍｉｃｒｏｍｉｌｌ）されたマスター金型のＳＥＭ画像である。

【図９】図９は、ピラミッド製造用金型（ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｍｏｌｄ）のＳＥＭ画像である。

【図１０】図１０は、画像の中心にピラミッド針成形ウェルを示す、製造用金型の拡大セグメントのＳＥＭ画像である。

【図１１】図１１Ａ～図１１Ｄは、例示的なＣＭＣ固体および包埋された活性成分を示す図である。

【図１２】図１２Ａ～図１２Ｂは、例示的なＣＭＣ固体および包埋された活性成分を示す

図である。
【図１３】図１３は、例示的な垂直多層堆積構造およびこれを製作する方法の略図である。
【図１４】図１４は、包埋される活性成分の層化および空間分布技法を使用して製作される例示的なマイクロニードルアレイの略図である。
【図１５】図１５は、空間的に制御された様式で製作される例示的なマイクロニードルアレイの略図である。
【図１６Ａ】図１６Ａは、複数のピラミッド型成形マイクロニードルのＳＥＭ画像である。
【図１６Ｂ】図１６Ｂは、単一のピラミッド型成形マイクロニードルのＳＥＭ画像である。
【図１７】図１７は、柱型成形マイクロニードルのＳＥＭ画像である。
【図１８】図１８は、ピラミッド型成形マイクロニードルの顕微鏡写真である。
【図１９】図１９は、柱型成形マイクロニードルの顕微鏡写真である。
【図２０】図２０は、マイクロミリングされたマスター金型を使用して、または材料のブロックを直接マイクロミリングすることによって形成することができる様々なマイクロニードル幾何形状を示す図である。
【図２１】図２１は、破壊試験およびピアシング試験を実施するための試験装置を示す図である。
【図２２】図２２は、柱型マイクロニードル（左）およびピラミッド型マイクロニードル（右）の力－変位曲線を示す図である。
【図２３】図２３は、柱型マイクロニードル（左）およびピラミッド型マイクロニードル（右）のマイクロニードルのたわみの有限要素モデルを示す図である。
【図２４】図２４は、皮膚外植片におけるピラミッド（Ａ、Ｃ、Ｅ）および柱（Ｂ、Ｄ、Ｆ）型マイクロニードルの貫通の様々なステレオ顕微鏡写真を示す図である。
【図２５】図２５Ａ、図２５Ｂ、および図２５Ｃは、皮膚外植片を貫通することにおけるマイクロニードルアレイの有効性を示す図である。
【図２６】図２６Ａおよび図２６Ｂは、マイクロニードルアレイ免疫化マウスの皮膚流入領域リンパ節への粒状物のｉｎ　ｖｉｖｏ送達を示す図である。
【図２７】図２７は、マイクロニードル送達されるモデル抗原の免疫原性を示す棒グラフである。
【図２８】図２８は、貯蔵におけるＣＭＣマイクロニードルアレイの活性カーゴの安定性を示す棒グラフである。
【図２９】図２９Ａおよび図２９Ｂは、マイクロニードルアレイによってＣｙｔｏｘａｎ（登録商標）（シクロホスファミド）を送達された表皮細胞内のアポトーシスの誘導を示す図である。
【図３０】図３０は、材料のブロックを直接マイクロミリングすることによって形成することができるマイクロニードルの幾何形状を示す図である。
【図３１】図３１は、直接製作された固体ＣＭＣマイクロニードルアレイのステレオ顕微鏡画像である。
【図３２】図３２は、図３１のマイクロニードルアレイの一部のステレオ顕微鏡画像である。
【図３３】図３３は、直接マイクロミリング用材料のブロックまたはシートを作るための鋳型アセンブリーの模式的な断面図である。
【図３４】図３４は、直接マイクロミリング用材料のブロックまたはシートを乾燥させるのに使用することができる乾燥装置の模式的な断面図である。
【図３５】図３５は、ＧＦＰ発現標的２９３Ｔ細胞のフローサイトメトリー分析の図である。
【図３６】図３６は、貯蔵の数日後のマイクロニードルに包埋されたウイルスの安定性を示す図である。

【図３７】図３７は、マイクロニードルアレイで送達されたアデノベクターの発現および免疫原性を示す図である。
【図３８】図３８は、標的組織内にマイクロニードルを挿入するためのアプリケーターを示す図である。
【図３９】図３９は、図３８に示したアプリケーターとともに使用するためのアプリケーターヘッドの設計を示す図である。
【図４０】図４０は、アプリケーターヘッドの次元的な移動の概略図である。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
詳細な説明
以下の記載は、性質上例示的であり、開示される実施形態の範囲、適用性または構成を限定することは何ら意図されていない。記載した実施形態に対する様々な変更を、本開示の範囲から逸脱することなく本明細書に記載のエレメントの機能および配置において行うことができる。
【００１３】
本願および特許請求の範囲で使用する場合、単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、脈絡により別段に明らかに要求されていない限り、複数形を含む。さらに、用語「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」は、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」を意味する。本明細書において、用語「生物製剤」、「活性成分」、「生物活性成分」、「生物活性材料」または「カーゴ」は、医薬活性剤、例えば、鎮痛剤、麻酔剤、抗喘息薬、抗生物質、抗うつ剤、抗糖尿病剤、抗真菌剤、降圧剤、抗炎症剤、抗新生物薬、抗不安剤、酵素的に活性な作用物質、核酸コンストラクト、免疫賦活剤、免疫抑制剤、ワクチンなどを指す。生物活性材料は、溶解性材料、不溶性であるが分散性の材料、天然のもしくは製剤化されたマクロ、ミクロおよびナノ粒状物、ならびに／または溶解性材料、分散性不溶性材料ならびに天然のおよび／もしくは製剤化されたマクロ、ミクロおよびナノ粒状物の２種以上の混合物を含みうる。
【００１４】
本明細書において、用語「事前形成された」は、構造またはエレメントが使用前に、特定の形状または構成に作製、構築および／または形成されていることを意味する。したがって、事前形成されたマイクロニードルアレイの形状または構成は、患者にマイクロニードルアレイのマイクロニードルの１つまたは複数を挿入する前のそのマイクロニードルアレイの形状または構成である。
【００１５】
開示される方法の例示的な実施形態の操作は、好都合な提示のために、特定の逐次の順序で記載される場合があるが、開示した実施形態は、開示した特定の逐次の順序以外の操作の順序を包含しうることが理解されるべきである。例えば、逐次的に記載された操作は、いくつかの場合では、再配列されるまたは同時に実施することができる。さらに、一特定の実施形態に関連して示された記載および開示は、その実施形態に限定されず、開示される任意の実施形態に適用されうる。
【００１６】
さらに、簡潔にするために、添付の図面は、開示されたシステム、方法および装置を、他のシステム、方法および装置と組み合わせて使用することができる、様々な様式（当業者によって、本開示に基づいて容易に識別できる）を示していない場合がある。さらに、本記載は、開示される方法を記載するのに「生成する」および「提供する」などの用語を時折使用する。これらの用語は、実施することができる実際の操作の高レベルの抽象化である。これらの用語に対応する実際の操作は、特定の実施に応じて変更することができ、本開示に基づいて、当業者によって容易に認識可能である。
【００１７】
先端装填マイクロニードルアレイ
溶解可能マイクロニードルアレイは、皮膚および粘膜表面への効率的で安全な薬物およ

びワクチンの送達を可能にする。しかし、従来のマイクロニードルアレイ製作の均質な性質からは、非効率な薬物送達が生じうる。患者に送達される薬物または他のカーゴは一般に、マイクロニードルアレイマトリックス全体に組み込まれているが、実際には、マイクロニードルのみが皮膚に入り、したがって、個々の針の体積内に含有されたカーゴのみが送達可能である。したがって、非針コンポーネント（例えば、アレイの支持構造）に局在している薬物または他のカーゴの大部分は、患者に決して送達されず、一般に、廃棄物として廃棄される。

【００１８】

図１および図２は、マイクロニードルおよびマイクロニードルアレイの例示的な寸法を示す。図１および図２に示した例示的なサイズに基づくと、アレイ全体にわたって均質的に分布した活性成分を含むマイクロニードルアレイは、４０パーセント超の活性成分廃棄物を呈する。例えば、アレイの全面積が６１ｍｍ^{2}であり、マイクロニードルアレイの面積が３６ｍｍ^{2}である場合、活性成分の利用率は、６０パーセント未満である。図１および図２に反映された寸法は、マイクロニードルの特定のサイズのアレイおよび形状を示すが、同様の廃棄物が、アレイのサイズまたは関与するマイクロニードルの形状にかかわらず、活性成分がアレイ全体にわたって均質的に分布した任意の他のサイズのマイクロニードルアレイに存在することが理解されるべきである。

【００１９】

本明細書に記載のシステムおよび方法は、広い範囲のタンパク質および／または小分子の医薬およびワクチンを含めた広い範囲の活性成分の有効な送達を可能にする、完全に溶解可能なマイクロニードルアレイ基板および独特のマイクロニードル幾何形状を利用する新規のマイクロニードルアレイ製作技術を提供する。

【００２０】

本明細書により詳細に記載するように、いくつかの実施形態では、本技術は、多機能性薬物送達のために複数の化学的に異なる作用物質の同時共送達もユニークに可能にすることができる。これらのデバイスの有用性の例としては、例えば、（１）感染症予防およびがん療法に関連した多価免疫応答を生じさせるための複数の抗原およびアジュバントの同時送達、（２）同時の補助剤腫瘍療法を可能にするための化学療法剤、免疫刺激剤、アジュバントおよび抗原の共送達、ならびに（３）多種多様な皮膚疾患を処置するための全身曝露を伴わない複数の治療剤の局所的皮膚送達がある。

【００２１】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示のシステムおよび方法は、様々な活性成分を針先に組み込むことを可能にする新規製作技術に関する。したがって、このようにして活性成分を局在化させることによって、マイクロニードルアレイ体積の残りを、非活性であり、一般に安全と見なされるより安価なマトリックス材料を使用して調製することができる。最終的な結果は、（１）マイクロニードルアレイの非針部分に組み込まれた送達可能でない活性成分の廃棄物の低減、および（２）皮膚を貫通する針先中のより高い薬物濃度に基づいた、薬物送達の大いに改善された効率である。この技術的進歩は、薬物カーゴのコストに比例した経済的実現可能性を劇的に改善し、これらの新規マイクロニードルアレイの針１本当たりの有効なカーゴ送達能力を増大させる。

【００２２】

図３Ａ、図３Ｂ、図４Ａおよび図４Ｂは、活性成分がそれぞれのアレイのマイクロニードル先端に集中している、マイクロニードルアレイの様々な実施形態を示す。したがって、従来のマイクロニードルアレイと対照的に、支持基本構造に活性成分がほとんど、またはまったく存在しないので、活性成分は、マイクロニードルアレイ全体にわたって一様な濃度で存在しない。さらに、いくつかの実施形態では（例えば、図３Ａ、図３Ｂ、図４Ａおよび図４Ｂに示したように）、支持構造に活性成分がほとんど、またはまったく存在しないだけでなく、活性成分の位置は、アレイの個々のマイクロニードルの上半分に集中している。

【００２３】

図５Ａおよび図５Ｂは、個々のマイクロニードルの上半分に集中した活性成分を含有するマイクロニードルアレイのマイクロニードルの例示的な画像を示す。活性成分は、マイクロニードルの先端に集中している蛍光粒子として示されており、先端は、狭小化および／または先細化の様式で基部から延在するマイクロニードルの範囲によって画定される。基部はさらには、アレイの支持構造から延在する。

【００２４】

図６Ａおよび図６Ｂは、個々のマイクロニードルの上半分に集中した活性成分を含有するマイクロニードルアレイのマイクロニードルの追加の例示的な画像を示す。図６Ａでは、活性成分は、マイクロニードルの先端に集中しており、ＢＳＡ－ＦＩＴＣである。図６Ｂでは、活性成分は、やはりマイクロニードルの先端に集中しており、ＯＶＡ－ＦＩＴＣである。

【００２５】

上述したように、いくつかの実施形態では、個々のマイクロニードルは、マイクロニードルの上半分のみに活性成分を含みうる。他の実施形態では、個々のマイクロニードルは、マイクロニードルの先端または先端付近の狭小化部分のみに活性成分を含みうる。さらに他の実施形態では、個々の針は、支持構造から延在するマイクロニードル部分全体にわたって活性成分を含みうる。

【００２６】

以下の実施形態では、それぞれのマイクロニードルアレイのマイクロニードルの上半分および／または先端に集中した１種または複数種の活性成分を含むマイクロニードルアレイを製作するための様々な例示的な方法を記載する。

【００２７】

逐次マイクロ成形法およびスピン乾燥法によって製作されるマイクロニードルアレイ

以下のステップは、逐次マイクロ成形およびスピン乾燥を使用してマイクロニードルアレイを製作する例示的な方法を記載する。活性成分／カーゴは、適合性溶媒中で、所望の有用な濃度で調製することができる。本明細書に記載するように、活性成分（複数可）の溶媒は、カーゴ特異的であり得、例えば、水、有機極性および／または無極性液体を含めた広い範囲の液体を含みうる。活性成分の例は、以下でより詳細に論じられており、様々なマイクロニードルアレイの試験された最大装填能力を含めたこれらの活性成分についての様々な情報も、以下でより詳細に論じられている。

【００２８】

必要に応じて、特定の用途に必要な場合、より高い活性カーゴ装填を実現するために、複数の装填サイクルを実施することができる。さらに、複数の活性カーゴを、個々のカーゴの特定のカーゴ適合性要件によって、複合溶液として単一装填サイクルで、または複数のサイクルにおいて（例えば、以下に記載する装填サイクルを繰り返して）単一溶液として装填することができる。また、粒状物カーゴ（ナノサイズおよびマイクロサイズの幾何形状を有するものを含む）を、所望の粒子数／体積密度で懸濁物として調製することができる。

【実施例】

【００２９】

（実施例１）

ａ）マイクロミリングの実施形態において以下でより詳細に記載するように、活性カーゴの作業用ストック溶液／懸濁物を、例えば、表面積１ｃｍ^{2}当たり約４０μｌで、マイクロニードルアレイ製造用金型の表面に塗布することができる。

【００３０】

ｂ）マイクロニードルアレイ製造用金型の針をワーキングカーゴストックで満たすために、活性カーゴ（複数可）を含むマイクロニードルアレイ製造用金型を４５００ｒｐｍで１０分間、遠心機にかけることができる。

【００３１】

ｃ）過剰のカーゴ溶液／懸濁物を除去することができ、マイクロニードルアレイ製造用

金型の表面を、金型表面積１ｃｍ^{2}当たりリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）１００μｌ、または活性カーゴの作業用ストックを調製するのに使用した溶媒で洗浄することができる。

【００３２】

ｄ）針の空洞に活性カーゴストック溶液／懸濁物を含有するマイクロニードルアレイ製造用金型を、０～５０Ｌ／分で遠心機にパージガスを連続的に流しながら要求温度で、３５００ｒｐｍで３０分間スピン乾燥させることによって針先端に乾燥中の活性カーゴ（複数可）を集中させるのを促進することができる。パージガスは、管状入口を通じて遠心機チャンバー内に導入することができる。水分含量は、要求温度に調節された除湿機を使用して低減し、遠心機チャンバー内に再循環することができる。パージガスは、特定のカーゴ（複数可）の必要に応じて、空気、窒素、二酸化炭素、または別の不活性もしくは活性ガスとすることができる。流量は、流量計によって測定され、循環ポンプデバイスによって制御される。

【００３３】

ｅ）マイクロニードルアレイ製造用金型面積１ｃｍ^{2}当たりH_2O中の２０％のＣＭＣ９０ヒドロゲル１００μｌを、マイクロニードルアレイ製造用金型の表面に添加して、マイクロニードルアレイデバイスの構造コンポーネントに装填することができる。

【００３４】

ｆ）マイクロニードルアレイ製造用金型を、遠心機チャンバー内でバージガス交換をすることなく、要求温度で、４５００ｒｐｍで１０分間遠心機にかけて、マイクロニードルアレイ製造用金型の針の空洞にＣＭＣ９０ヒドロゲルを満たすことができる。この後、３０分のインキュベーション期間を続けて、マイクロニードルアレイ先端に以前に堆積させた活性カーゴ（複数可）の再水和を可能にすることができる。

【００３５】

ｇ）マイクロニードルアレイ製造用金型を、遠心機チャンバーに０～５０Ｌ／分の一定のパージガスを流しながら要求温度で、３５００ｒｐｍで３時間以上遠心機にかけて、ＭＮＡデバイスを５％未満の水分含量にスピン乾燥させることができる。

【００３６】

ｈ）次いで乾燥したマイクロニードルアレイデバイスをマイクロニードルアレイ製造用金型から分離して、所望の条件下で貯蔵することができる。いくつかの実施形態では、ＣＭＣ９０ベースデバイスは、約５０℃～－８６℃の間で貯蔵可能でありうる。

【００３７】

製作された先端に装填された活性カーゴを担持するマイクロニードルアレイの例は、図３Ａ～図６Ｂに見ることができる。

【００３８】

マイクロミリングされたマスター金型およびスピン成形されたマイクロニードルアレイ

以下の実施形態では、マイクロミリングステップを実施して、様々な仕様のマイクロニードルアレイを作る。しかし、以下の実施形態は、先の実施例で上述したプロセスを含めて、マイクロミリングステップを伴わないマイクロニードルアレイ製作のプロセスに適用可能でありうるマイクロニードルアレイ製作のある特定の詳細を記載していることが理解されるべきである。

【００３９】

以下の実施形態では、マイクロミリング技法によって形成されたマスター金型を使用して溶解可能マイクロニードルアレイを製作するための装置および方法が記載されている。例えば、マイクロニードルアレイは、マスター金型（ポジティブ）～製造用金型（ネガティブ）～アレイ（ポジティブ）方法論に基づいて製作することができる。マイクロミリング技術は、金属、ポリマーおよびセラミックの部品を含めた実質的に任意のタイプの材料に様々なマイクロスケール幾何形状を生成するのに使用することができる。様々な形状および構成のマイクロミリングされたマスター金型は、複数の同一の雌型製造用金型を生成するのに有効に使用することができる。次いで雌型製造用金型は、様々なマイクロニード

ルアレイをマイクロキャスティングするのに使用することができる。

【００４０】

図７は、マイクロニードルマスター金型を製作するのに使用することができる精密マイクロミリングシステムの例を示す。機械的マイクロミリングは、精密コンピューター制御ミニチュア工作機械プラットフォーム内でマイクロスケール（例えば、１０μｍという小ささ）フライス工具を使用する。このシステムは、マイクロ工具によって切断されている工作物の表面を見るための顕微鏡を含みうる。マイクロ工具は、所望の形状を作るために、超高速（２００，０００ｒｐｍ）で回転させて工作物を切断することができる。上述したように、マイクロミリングプロセスは、多くの種類の材料を用いて複雑な幾何的フィーチャを作るのに使用することができる。例えば、炭化物マイクロ工具を含めた様々なタイプの成形用具を、マイクロミリングプロセスで使用することができる。しかし、好適な実施形態では、マスター金型上でマイクロニードルアレイを製作するのに、ダイヤモンド工具を使用することができる。ダイヤモンド成形用具は、炭化物などの従来の材料より硬く、工作物の表面上によりきれいなカットをもたらすことができるので、他のタイプの成形用具より好ましい場合がある。

【００４１】

マスター金型は、例えば、例示的な実施形態に記載のマスター金型材料であるＣｉｒｌｅｘ（登録商標）（ＤｕＰｏｎｔ、Ｋａｐｔｏｎ（登録商標）ポリイミド）を含めた、様々な材料からマイクロミリングすることができる。マスター金型は、以下の例示的な実施形態に記載の生産材料であるＳＹＬＧＡＲＤ（登録商標）１８４（Ｄｏｗ　Ｃｏｒｎｉｎｇ）などの適当な材料から柔軟な製造用金型を製作するのに使用することができる。マスター金型は、多数の製造用金型を製作するのに単一のマスター金型を繰り返して使用することができるように、再使用されうる材料で形成されていることが望ましい。同様に、各製造用金型は、複数のマイクロニードルアレイを製作することができるのが望ましい。

【００４２】

マスター金型は、マイクロミリング技術を使用して相対的に急速に作ることができる。例えば、１００個のマイクロニードルを伴う１０ｍｍ×１０ｍｍのアレイを含むマスター金型は、マイクロミリングするのに２時間未満、いくつかの実施形態では、約３０分未満を要しうる。したがって、短いランプアップ時間により、異なる幾何形状を急速に製作することが可能になり、それにより、マイクロニードルアレイの急速な開発が可能になり、また、様々なマイクロニードルパラメータの実験および研究が促進される。

【００４３】

マスター金型材料は、製造用金型材料からきれいに分離されうることが好ましく、好ましくは、製造用金型材料を硬化するのに必要となりうる任意の上昇した硬化温度に耐えることができる。例えば、示した実施形態では、シリコーン系化合物ＳＹＬＧＡＲＤ（登録商標）１８４（Ｄｏｗ　Ｃｏｒｎｉｎｇ）が製造用金型材料であり、その材料は一般に、セ氏約８０～９０度の硬化温度を必要とする。

【００４４】

マスター金型は、様々なサイズで作ることができる。例えば、例示的な実施形態では、マスター金型は、１．８ｍｍ厚のＣｉｒｌｅｘ（登録商標）（ＤｕＰｏｎｔ、Ｋａｐｔｏｎ（登録商標）ポリイミド）および５．０ｍｍ厚のアクリルシートで作られた。各シートをマイクロミリング工具によって最初に平らにすることができ、マイクロニードルが作られる位置を表面の残部から上昇させることができる。マイクロニードルのフィーチャ（例えば、マスター金型によって画定される）を作るために、マイクロ工具を数値制御マイクロミリングマシン（図１）と併せて使用することができる。その様式で、マイクロミリングプロセスは、マイクロニードルの寸法、鋭さおよび空間分布の完全制御をもたらすことができる。

【００４５】

図８は、複数のピラミッド針を伴うマイクロミリングされたマスター金型の構造を示す走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）からの画像である。図８に示したように、円形の溝をマスタ

ー金型のマイクロニードルアレイの周囲に形成して、製造用金型内に環状の（例えば、円形の）壁セクションを生成することができる。製造用金型の円形壁セクションは、以下で論じるスピンキャスティングプロセスを促進することができる。図９に示されている壁セクションおよび図８に示したそれぞれのマスター金型構造は、円形であるが、他の幾何形状の壁セクションまたは収容手段をもたらすことができることが理解されるべきである。例えば、どの形状がマイクロニードルアレイデバイスに望まれるかに応じて、収容手段は、例えば、正方形、矩形、台形、多角形、または様々な不ぞろいな形を含めた様々な形状で形成することができる。

【００４６】

上記に論じたように、製造用金型は、ＳＹＬＧＡＲＤ（登録商標）１８４（Ｄｏｗ Ｃｏｒｎｉｎｇ）から作製することができ、これは、ＳＹＬＧＡＲＤ（登録商標）と硬化剤との比が１０：１で混合されうる２成分透明硬化性シリコーンエラストマーである。この混合物を、約１０分間脱ガスし、マスター金型に塗布してでおよそ８ｍｍの層を形成し、引き続いて約３０分間再び脱ガスし、８５℃で４５分間硬化させることができる。室温まで冷却した後、マスター金型を硬化したシリコーンから分離することができ、シリコーン製造用金型を、アレイを囲繞する円形壁セクションの縁部までトリミングした（図９）。単一のマスター金型から、多数の製造用金型（例えば、１００以上）を生産することができ、Ｃｉｒｌｅｘ（登録商標）またはアクリルマスター金型の明らかな劣化は、もしあれば非常にわずかである。

【００４７】

図９は、上述したように作ったピラミッド製造用金型のＳＥＭ画像である。図１０は、画像の中央にピラミッド針成形ウェルを有する製造用金型の拡大セグメントを示す。成形ウェルは、成形ウェルによって画定される外側形状を有するマイクロニードルを形成するための基材（および基材に添加される任意の成分）を受け入れるように構成されている。

【００４８】

マイクロニードルアレイを構築するために、基材を使用して、生物活性成分を有する各マイクロニードルの部分およびそれを有さない部分を形成することができる。上記に論じたように、各マイクロニードルは、マイクロニードルにのみ、またはいくつかの実施形態では、マイクロニードルの上半分のみに、または他の実施形態では、先端付近で先細化するマイクロニードルの部分にのみ生物活性成分を含みうる。したがって、生物活性成分（複数可）の送達を制御し、マイクロニードルアレイのコストを制御するために、各マイクロニードルは、生物活性成分を含む部分および生物活性成分を含まない部分を有することが好ましい。本明細書に記載の実施形態では、生物活性成分を含まない部分は、マイクロニードルアレイの支持構造、およびいくつかの実施形態ではアレイの各マイクロニードルの基部（例えば、下半分）を含む。

【００４９】

様々な材料をマイクロニードルアレイの基材として使用することができる。生分解性固体マイクロニードルの構造基板は、最も一般には、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）またはカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）系配合物を含むが、他のベースも使用することができる。

【００５０】

ＣＭＣは、本明細書に記載のマイクロニードルアレイの基材としてＰＬＧＡより一般に好ましい。ＰＬＧＡ系デバイスは、製作に要求される相対的に高い温度（例えば、セ氏１３５度以上）および真空に起因して、薬物送達およびワクチン用途を制限する場合がある。対照的に、ＣＭＣ系マトリックスは、単純なスピンキャスティングおよび乾燥プロセスで、室温で形成することができ、ＣＭＣマイクロニードルアレイを、感受性の生物製剤、ペプチド、タンパク質、核酸、および他の様々な生物活性成分の組込みに関してより望ましくする。

【００５１】

ＣＭＣヒドロゲルは、滅菌したdH_2O中の、活性成分を伴うまたは伴わない（以下に

記載するように）ＣＭＣの低粘度ナトリウム塩から調製することができる。例示的な実施形態では、ＣＭＣは、約２５ｗｔ％のＣＭＣ濃度を実現するように滅菌蒸留水（ｄＨ$_2$Ｏ）および活性成分と混合することができる。得られた混合物は、均質になるまで撹拌し、セ氏約４度で２４時間平衡化することができる。この期間の間に、ＣＭＣおよび任意の他の成分は、水和され得、ヒドロゲルが形成されうる。ヒドロゲルを、真空下で約１時間脱ガスし、約２０，０００ｇで１時間、遠心機にかけて、ＣＭＣマイクロニードルアレイのスピンキャスティング／乾燥プロセスを妨害しうる、残留するマイクロサイズの気泡を除去することができる。ヒドロゲルの乾物含量は、ヒドロゲルの画分（１０ｇ）をセ氏８５度で約７２時間乾燥することによって試験することができる。すぐに使えるＣＭＣヒドロゲルは、使用するまでセ氏約４度で貯蔵されることが望ましい。

【００５２】

活性成分は、スピンキャスティングプロセスの前に、相対的に高い（２０～３０％）ＣＭＣ乾燥生物製剤重量比でＣＭＣのヒドロゲルに組み込むことができる。アレイは、室温でスピンキャスティングされ、プロセスを、構造的に広い範囲の生物活性成分の機能安定性と両立させることができる。マスター金型および製造用金型は、多数の製作サイクルに再使用可能でありうるので、製作コストは、大いに低減されうる。得られる脱水されたＣＭＣマイクロニードルアレイは、室温またはわずかにより低い温度（セ氏約４度など）で一般に安定であり、組み込まれた生物製剤の活性を保存し、容易な低コストの貯蔵および流通を促進する。

【００５３】

例示的な実施形態では、製造用金型の表面を、ＣＭＣヒドロゲル約５０μｌ（直径１１ｍｍの金型について）で覆い、２，５００ｇで約５分間、遠心法によってスピンキャスティングすることができる。初期のＣＭＣヒドロゲル層の後、別の５０μｌのＣＭＣヒドロゲルを金型に層化し、２，５００ｇで約４時間遠心機にかけることができる。乾燥プロセスの最後に、ＣＭＣマイクロニードルアレイを、金型から分離し、縁部の過剰材料からトリミングし、収集し、セ氏（Ｃｅｌｓｕｉｓ）約４度で貯蔵することができる。製造用金型は、マイクロニードルアレイのさらなるキャスティングのために浄化および再使用することができる。

【００５４】

いくつかの実施形態では、ＣＭＣ固体は、活性成分を含有しない層、および活性成分を含有する層で形成することができる。図１１Ａ～図１１Ｄは、異なる形状（図１１Ａおよび図１１Ｂ）、ならびにマイクロミリング後に活性成分を含むマイクロニードルの部分になる上層の包埋された活性カーゴを有するＣＭＣ固体を示す。図１１Ｃは、非活性成分含有層の表面に層化されたミクロンサイズの蛍光粒子を示し、図１１Ｄは、非活性成分含有層の表面に層化されたトルイジンブルーの例を示す。

【００５５】

図１２Ａおよび図１２Ｂも、異なる形状を有するＣＭＣ固体を示し、図１２Ｂは、正方形形状を示し、図１２Ｂは、矩形状を示す。両ＣＭＣ固体は、本明細書に記載するさらなる加工のための寸法にミリングすることができる。本明細書に示した幾何形状および活性カーゴは、例示的な実施形態に限定されることは意図されていないことが理解されるべきである。

【００５６】

（実施例２）

ＣＭＣ固体は、規定された幾何形状、および調製された構造の１つまたは複数の層中の活性カーゴ含量を用いて調製することができる。ＣＭＣ固体に統合された活性カーゴの例は、本明細書でより詳細に記載されている。ＣＭＣ固体の少なくとも１つの層に含有された包埋された活性カーゴを含むＣＭＣ固体を構築した後、ＣＭＣ固体を、プロジェクト固有の寸法にミリングし、マイクロミリングして本明細書に記載のマイクロニードルデバイスを製作することができる。

【００５７】

（実施例３）
別の実施形態では、活性カーゴの１つまたは複数の層を、マイクロニードルアレイを直接マイクロミリングするためにＣＭＣ固体に包埋することができる。図１３は、ＭＮＡデバイスを直接マイクロミリングするための垂直多層堆積およびＣＭＣ固体上の活性カーゴのＣＭＣ包埋の代表サンプルを示す。
【００５８】
一例示的方法では、マイクロニードルアレイは、規定された幾何形状を有し、いずれの活性カーゴも中に含有しないＣＭＣ固体を調製することによって製作することができる。次いで、ブランクＣＭＣ固体を所望の寸法にミリングすることができる。
【００５９】
図１３に示したように、マイクロミリングされたＭＮＡデバイスの先端に特異的に活性カーゴ（複数可）を含めるために、プロジェクト固有の幾何学的パターンで、活性カーゴ（複数可）をＣＭＣ固体に堆積することができる。
【００６０】
ＣＭＣ固体ブランクに活性カーゴを堆積する方法として、例えば、
１）マイクロノズル支援液滴堆積を用いた直接印刷、
２）事前印刷されたマトリックスからの移動、
３）コンピューター制御ロボットシステムを用いた液滴堆積
を挙げることができる。
【００６１】
図１４は、ＣＭＣ固体ブロック中の包埋された活性カーゴの層化および空間分布を示す。第１の層が堆積された後（Ａ）、これをＣＭＣ層で覆うことができ（Ｂ）、このＣＭＣ層は、活性カーゴを引き続いて堆積するための表面をもたらす（Ｃ）。すべての所望の層が堆積され、マイクロミリングプロセスに適した固体ＣＭＣブロック内に包まれるまで、このプロセスを繰り返すことができる（Ｄ～Ｆ）。
【００６２】
図１５は、空間的に制御された様式で活性カーゴの堆積物を包んでいるＣＭＣブロックの断面の概略図を示す（Ａ）。この方法は、ＭＮＡデバイスにおいてマイクロミリングした後、活性成分の３次元制御および配置を可能にする（Ｂ）。図１５のパネル（Ｂ）では、活性カーゴの配置が活性カーゴの幹で示されているが、ミリングプロセスの制御によって、配置は、マイクロニードルの先端からベースまで垂直に制御することができる。色は、異なる活性成分、または同じ材料の異なる量／濃度を表す。
【００６３】
したがって、互いに接触して、またはＣＭＣの層によって分離されてＣＭＣ固体の表面に逐次的に１つまたは複数の活性カーゴを堆積させることによって、マイクロニードルに活性カーゴを垂直に層化して堆積する方法が提供される。いくつかの実施形態では、活性カーゴの水平パターン堆積により、カーゴを空間的に分離することができる。活性カーゴ堆積の垂直および水平パターンを組み合わせることによって、規定された活性成分のそれぞれの３次元送達および分配を実現し、マイクロニードルアレイを製作する間の活性成分の浪費をさらに低減することができる。
【００６４】
マイクロニードル統合アデノベクター
以下の実施形態は、マイクロニードルアレイの溶解可能マトリックス中に感染性ウイルスベクターを組み込む、本明細書に記載のものなどの溶解可能マイクロニードルアレイを対象とする。この技術を使用して、初めて、生きているウイルスベクターをマイクロニードルアレイに組み込むことができる。本明細書に記載するように、開示したマイクロニードルアレイ内にウイルスベクターを組み込むと、ウイルスベクターが安定化し、その結果、これらは、組込み後および長期の貯蔵後に、その感染力を維持する。マイクロニードルアレイ統合アデノベクター（ＭＩＡ）を皮膚に適用すると、皮膚細胞がトランスフェクトされる。ワクチンの場面では、本発明者らは、ＨＩＶ抗原をコードするＭＩＡを皮膚に適

用すると、強力なＨＩＶ特異的免疫応答がもたらされることを実証した。これらの結果を、以下の実施例で詳細に記載する。

【００６５】

（実施例４）

本明細書に記載のマイクロニードル統合アデノベクターの調製法は、調製中および乾燥貯蔵中にアデノウイルス粒子の生存能を保存する。これらのステップは、ＣＭＣマイクロニードルアレイの物理的および化学的性質に基づいて特別に設計した。ＣＭＣマイクロニードルアレイ中のウイルス生存能は、

－　２．５％の最終濃度で低粘度カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ９０）を含めること（ステップ２）によって、および

－　マイクロニードルアレイデバイスの先端におけるアデノウイルス粒子の時限および温度制御スピン乾燥集中（ステップ６）、

－　針先端装填アデノウイルス粒子の制御された部分的再水和（ステップ８）によって実現した。

【００６６】

先端装填マイクロニードル統合アデノベクター（ＭＩＡ）の調製：

１）トレハロース貯蔵緩衝液（ｓｔｏｒａｇｅ　ｂｕｆｆｅｒ）（５％のトレハロース　Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　ＵＳＡ、２０ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ７．８、７５ｍＭのＮａＣｌ、２ｍＭの$MgCl_2$、０．０２５％のＴｗｅｅｎ８０）中に2×10^9粒子／ｍｌの密度でアデノウイルス粒子を再懸濁する。

２）再懸濁したウイルスストックを、トレハロース貯蔵緩衝液中に調製した等体積の５％のＣＭＣ９０と混合し、1×10^9粒子／ｍｌの密度のアデノウイルス作業用ストックをもたらす。

３）アデノウイルス作業用ストック懸濁物を、表面積１ｃｍ^{2}当たり４０μｌで、マイクロニードルアレイ製造用金型の表面に添加する（本明細書の他の実施形態で詳細に記載したように）。

４）金型を、２２℃で、４５００ｒｐｍで１０分間遠心機にかけて、針先にアデノウイルス作業用ストックを満たす。

５）過剰のウイルスストックを除去し、金型の表面を、金型表面積１ｃｍ^{2}当たりリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）溶液１００μｌで洗浄する。

６）針の空洞内にのみアデノウイルスストック溶液を含有するマイクロニードルアレイ金型を、２２℃で、３５００ｒｐｍで１０分間、部分的にスピン乾燥させる。

７）金型面積１ｃｍ^{2}当たり、H_2O中の２０％の構造的非カーゴ含有ＣＭＣ９０ヒドロゲル１００μｌをマイクロニードルアレイ金型の表面に添加して、ＭＩＡデバイスの構造を形成する。

８）２２℃で、４５００ｒｐｍで１０分間遠心機にかけて針の空洞を２０％のＣＭＣ９０で満たし、先端内で乾燥されたアデノウイルス粒子を再水和するために３０分インキュベートさせる（ステップ３～６、上記）。

９）遠心機にかけることによって、遠心機チャンバーに１０Ｌ／分の一定の空気を流しながら、２２℃で、３５００ｒｐｍで3時間、ＭＩＡデバイスを５％未満の水分含量にスピン乾燥させる。

１０）乾燥したＭＩＡデバイスをデモールドし、４℃または－８０℃で貯蔵する。

【００６７】

（実施例５）

本発明者らは、ＭＮＡ組込み組換えアデノウイルス粒子の効力および安定性を評価した。Ａｄ５．ＥＧＦＰをＣＭＣヒドロゲルＭＮＡに組み込んで、10^{10}ウイルス粒子／ＭＮＡを含有した最終製品を製作した。対照ブランクＭＮＡを、まったく同様であるが、ウイルス無しで調製した。Ａｄ５．ＥＧＦＰ　ＭＮＡおよび対照ＭＮＡのバッチをＲＴ、４℃、および－８６℃で貯蔵し、ウイルスの安定性を感染アッセイで評価した。ＭＮＡ組込みＡｄ５．ＥＧＦＰウイルスの特異的トランスダクション活性を、２９３Ｔ細胞を使用し

ｔｉｎ　ｖｉｔｒｏで評価した。６ウェルプレートに２×１０^{6}／ウェルで細胞を蒔き、指定した時間にわたってＲＴ、４℃、および－８６℃で貯蔵した希釈したウイルス懸濁物、懸濁物＋空のＭＮＡ（対照）、またはＡｄ５．ＥＧＦＰ　ＭＮＡを用いて、二通りにトランスダクションした。陰性対照として、トランスダクションしていないウェルを含めた。最初に、細胞集団を、ＧＦＰ発現についてフローサイトメトリーによって２４時間後に分析した（代表的なヒストグラムを図３５に示す）。

【００６８】

図３５に示したように、ＭＮＡにＡｄ５．ＥＧＦＰを組み込んでも、トランスダクション効率は低減されない。懸濁物中のまたはＣＭＣパッチに組み込まれた同一の力価のＡｄ５．ＥＧＦＰでトランスダクションして２４時間後のＧＦＰ発現標的２９３Ｔ細胞対トランスフェクトされていない対照細胞のフローサイトメトリー分析。図３６は、ＭＮＡ包埋Ａｄ５．ＥＧＦＰウイルスの安定性を示す。ＧＦＰ遺伝子発現を、図３７のようにフローサイトメトリーによってアッセイし、－８６℃保存Ａｄ５．ＥＧＦＰ懸濁物の感染効率に対して正規化した。

【００６９】

ＭＮＡ　Ａｄ５．ＥＧＦＰウイルスを使用する感染効率は、８７．９２±４．５％であったことが判明し、これは、伝統的な－８６℃保存Ａｄ５．ＥＧＦＰ懸濁物で観察されるものと同様であり（図３５および図３６）、製造プロセスは、Ａｄ－ＥＧＦＰウイルス粒子のトランスダクション効率に悪影響しないことを示唆する。経時的な感染力を評価するために、新たに調製した－８６℃保存Ａｄ５．ＥＧＦＰ懸濁物のトランスフェクション効率を、ＲＴ、４℃、または－８６℃で長時間貯蔵したＭＮＡ組込みＡｄ５．ＥＧＦＰの効率と比較した。最大３６５日の貯蔵期間にわたる感染力（Ａｄ５．ＥＧＦＰ懸濁物＋空のＣＭＣパッチに対して正規化した）を報告する（図３６）。これらの結果は、ＭＮＡ　Ａｄ５．ＥＧＦＰの感染性は、４℃または－８６℃のいずれにおける貯蔵でも際立って安定であり、ＲＴで最大３０日間いくぶん安定であることを示唆する。

【００７０】

これらの結果は、マイクロニードルアレイ送達Ａｄ導入遺伝子が皮膚内で発現され、強力な細胞性免疫応答を誘導することを実証する。ｉｎ　ｖｉｖｏで遺伝子発現を具体的に評価するために、本発明者らは、伝統的な皮内注射（Ｉ．Ｄ．）またはマイクロニードルアレイ媒介皮内送達の後の皮膚内のＧＦＰ発現を判定した。本発明者らは、ＩＤ注射によって、または単一マイクロニードルアレイ適用を介して局部的に１０^{8}個のＡｄ５．ＧＦＰウイルス粒子を送達した（図３７）。皮膚を４８時間後に回収し、凍結切片化し、青色蛍光性ＤＡＰＩを使用して対比染色して細胞核を同定し、次いで蛍光顕微鏡法によって画像化した。有意な細胞ＧＦＰ発現がＩ．Ｄ．およびマイクロニードルアレイ送達の両方の後に観察された。免疫原性を評価するために、本発明者らは、ブースティング無しの単一Ｉ．Ｄ．またはマイクロニードルアレイ免疫化の後に、ｉｎ　ｖｉｖｏで抗原特異的溶解活性を評価した。この目的のために、本発明者らは、コドン最適化ＳＩＶｍａｃ２３９　ｇａｇ全長、またはＳＩＶｍａｃ２３９　ｇａｇ　ｐ１７抗原（Ａｄ５．ＳＩＶ　ｇａｇ、Ａｄ５．ＳＩＶ　ｇａｇ　ｐ１７）をコードするＥ１／Ｅ３欠失Ａｄ５ベースベクターでマウスの群を免疫した。空ベクターを対照として使用した（Ａｄ５）。本発明者らは、Ａｄ５．ＳＩＶ　ｇａｇまたはＡｄ５．ＳＩＶ　ｇａｇ　ｐ１７を用いたＩ．Ｄ．またはマイクロニードルアレイ免疫化の後に、支配的なＳＩＶｇａｇ　ｐ１７由来ペプチドＫＳＬＹＮＴＶＣＶ（ＳＩＶｍａｃ２３９　ｇａｇ　７６－８４）に特異的な、強力で同様のレベルのｉｎ　ｖｉｖｏ溶解活性を観察した（図３７、ＣＴＬ）。

【００７１】

本明細書に開示のマイクロニードルアレイ技術は、臨床遺伝子療法も促進することができる。これは、例えば、従来の手法の少なくとも２つの主要な限定事項に対処する。第１に、これは、長時間にわたる組換えウイルスベクターの安定化および貯蔵を可能にする。生ウイルスベクターを、凍結液体製剤に対する証明された血清等価物（ｓｅｒｏｅｑｕｉｖａｌｅｎｃｅ）と共に、高温および低温に対して耐性にすることによって、マイクロニ

ードルアレイ安定化は、「コールドチェーン」に関係した圧力を緩和することになる。さらに、マイクロニードルアレイに統合すると、従来法によって実現可能でないウイルスベクターの正確で一貫した再現可能な投薬が可能になる。最後に、ウイルスベクターは、唯一必要な送達デバイス、皮膚の表層に正確に送達を向ける生体適合性で完全に使い捨てのマイクロニードルアレイ内に再梱包される。

【００７２】

このような遺伝子送達プラットフォームは、患者に優しい臨床遺伝子療法をもたらすことに有用である。これらのマイクロニードルアレイは、血管または神経の構造の深さまで貫通しないように操作されているので、ヒト皮膚への遺伝子送達は、無痛性および非観血的の両方となる。さらに、製作プロセスは、柔軟であり、効率的なスケールアップの潜在性とともに、単純で迅速な低コスト生産を可能にする。また、最終製品であるＭＩＡデバイスとして、これは、室温で安定であり、輸送および貯蔵するのに安価である。組み合わせると、これらの構造的利点および製造利点は、広い、迅速な臨床展開を可能にし、この遺伝子送達技術を、広い範囲のヒト疾患の予防および／または処置に容易に適用可能にすることができる。さらに、この手法を、現在同じ限定事項によって制限されている他のベクターベースワクチンプラットフォーム（例えば、ワクシニアウイルス、ＡＡＶなど）に拡張することができる。少なくともこれらの理由で、開示したマイクロニードルアレイおよびこれを使用する方法は、組換え遺伝子療法分野を著しく進歩させる。

【００７３】

マイクロニードルアレイ　－　例示的な活性成分

様々な活性成分を以下に詳細に記載する。便宜上、以下の実施例は、６．３×６．３ｍｍであるマイクロニードルアレイに基づく。このサイズ、したがってカーゴ送達は、２～１００倍増減することによって変更されうる。

【００７４】

最大活性カーゴ量についての一般的な考慮事項としては、例えば、アレイ中の総針体積、および溶媒中の活性成分（複数可）の溶解度（一般に５０％未満であると予期される）がある。

【化１】

先端装填成分:	MNAデバイスに先端装填される量 μg/デバイス (異なって示されていない限り)	最大予測装填能力
生ウイルス[1]		
Ad5.GFP (アデノウイルスGFP発現ベクター)	5×10^{8} 粒子/MNA	$2\sim5\times10^{9}$ 粒子/MNA
Ad-SIVgag (アデノウイルスgag発現ベクター)	5×10^{8} 粒子/MNA	$2\sim5\times10^{9}$ 粒子/MNA
Ad-SIVp17 (アデノウイルスgag-p17発現ベクター)	5×10^{8} 粒子/MNA	$2\sim5\times10^{9}$ 粒子/MNA
Ψ5 (非組換えAdベクター)	5×10^{8} 粒子/MNA	$2\sim5\times10^{9}$ 粒子/MNA
レンチ-GFP[2] (レンチウイルスGFP発現ベクター)	5×10^{6} 粒子/MNA	$2\sim5\times10^{7}$ 粒子/MNA

ワクシニアウイルス(免疫化)

組換えワクシニアウイルス(遺伝子療法、遺伝子操作)

季節性インフルエンザ

MMR(麻疹、流行性耳下腺炎、風疹)

【化２】

タンパク質/ペプチド		
BSA(FITC標識された)	240	400
OVA(FITC標識された)	100	400
OVA(標識なし)	240	400
流感(スプリットワクチン)	0.22	(2～5)

エピトープペプチド(3)		
TRP-2	50	200
EphA2 (a)	50	400
EphA2 (b)	50	400
DLK-1	50	200
1つの MNA 中の複数のエピトープ	200	400～600
サブスタンス-P(NK-1R リガンド)	15	

核酸		
CpG 1668	120	250
CpG 2006	120	250
ポリ(I:C)	250	250
プラスミドベクター(高分子量 DNA)	100	200

ペプチド/核酸組合せ	
OVA/CpG	250/120
OVA/CpG/ポリ(I:C)	250/120/250
エピトープペプチド/ポリ(I:C)	200/250

【化３】

有機物

ドキソルビシン	100
R848(TLR7/8 リガンド)	6
L733 (NK-1 アンタゴニスト)	2
DNCB(刺激物)	100

粒状物

ミクロ粒子(直径 1μのミクロスフェア(microsphare))	1×10^{6}粒子/MNA	$2\sim5\times10^{7}$粒子/MNA

ナノスケール粒子
PLG/PLAベース

他の生物製剤

腫瘍溶解産物/CpG	250/120
腫瘍溶解産物/CpG/ポリ(I:C)	250/120/250
腫瘍溶解産物/ポリ(I:C)	200/250

【００７５】
生アデノウイルスの先端装填は、一般に、以下の改変を含む：
ａ）先端装填用ヒドロゲル懸濁物中に５％のトレハロースおよび２．５％のＣＭＣ９０の存在。
ｂ）プロセスの温度が２２℃で維持される。
【００７６】
さらに、レンチウイルスベクターは、一般に、４℃のプロセシングおよび蒸気トラップベース湿度制御を必要とする。また、短いエピトープペプチドは一般に、ＤＭＳＯ中に可溶化されており、先端装填中の溶媒の蒸発時間は４時間である。
【００７７】
マイクロニードルの構造および形状
以下の実施形態のそれぞれについて、活性成分の１つまたは複数の層は、上述したマイクロニードルアレイのマイクロニードル中に提供されうることが理解されるべきである。したがって、例えば、いくつかの実施形態では、活性成分は、図１５に示したものなど、アレイの構造支持体内でないマイクロニードルの範囲内にのみ提供される。さらに、他の実施形態では、活性成分は、図３Ａ～図４Ｂに示したマイクロニードルの先端など、マイクロニードルの上半分に集中している。
【００７８】
図１６Ａおよび図１６Ｂは、複数のピラミッドの突起（すなわち、マイクロニードル）

で形成されたＣＭＣマイクロニードルアレイのＳＥＭ画像である。図１６Ａに示したピラミッド針の平均先端直径は、約５～１０μｍである。図１６Ｂに示したように、ピラミッド針の側部は、皮膚に挿入するのを促進することができる曲面および／または弓状面で形成することができる。

【００７９】

図１７は、マイクロニードルアレイの単一の針の別のＳＥＭ画像である。図１７に示したマイクロニードルは、ベース延在柱型成形ＣＭＣマイクロニードルである。ベース延在柱型マイクロニードルは、断面が一般に多角形（ｐｏｌｙａｇｏｎａｌ）（例えば矩形）である基部、および基部から延在する突起部を含む。突起部は、実質的に矩形である下部、および一般にある点へと先細りする先端部を有する。先端部は一般に、形状がピラミッドであり、ピラミッドの露出面は、平らまたは弓状でありうる。突起部は、針の全長の半分以上でありうる。

【００８０】

図１８および図１９は、ピラミッド（図１８）および柱型（図１９）成形ＣＭＣマイクロニードルの顕微鏡写真を示す。ピラミッド針は、針先から針ベースまで連続して増大する断面プロファイル（寸法）を有するので、針が皮膚に入る際、皮膚内にピラミッド針を押し続けるのに必要とされる力が増大する。対照的に、柱型針は、突出部の一般に矩形部分に到達すると、一般に連続的な断面プロファイル（寸法）を有する。したがって、柱型針は、より小さい力で皮膚内への針の導入を可能にしうるので、ピラミッド型針より好ましい場合がある。

【００８１】

図２０は、マイクロミリングによって形成されるマスター金型に材料をスピンキャスティングすることによる製作に一般に適しているマイクロニードルの形状および構造の略図を示す。図２０に示した形状および構造は、いずれのアンダーカットも含有しないので、これらは一般に、成形／デモールディングプロセスを妨害しない。図２０の構造は、（ａ）ほぼピラミッド形のマイクロニードル、（ｂ）「鋭い」柱型マイクロニードル（図８のベースメンバーを含まない）、（ｃ）「広い」柱型マイクロニードル、（ｄ）「短い」柱型マイクロニードル（短い柱セクションおよびより長い尖ったセクションを有する）、および（ｅ）「フィレットされた」柱型マイクロニードルを含む。

【００８２】

ピラミッドマイクロニードルの体積は、柱型マイクロニードルの体積より大きい場合があるが、これらの漸増断面プロファイル（寸法）は、漸増挿入力を必要とする。したがって、ピラミッドマイクロニードルの幾何形状は、挿入深度を低減し、有効送達体積を低減することができる。一方、柱マイクロニードルのより小さい断面積およびより大きいアスペクト比は、破壊力限界をより低くさせうる。頂角αが小さいほど、マイクロニードルの先端は、「鋭い」。しかし、頂角を小さくしすぎると（例えば、約３０度未満）、得られるマイクロニードル体積および機械的強度は、望ましくないレベルに低減されうる。

【００８３】

マイクロニードルの貫通力は、マイクロニードルの鋭さに反比例し、これは、マイクロニードルの含まれる（頂）角だけでなく、マイクロニードル先端の半径によっても特徴付けられる。頂角は、マスター金型幾何形状によって定められるが、先端の鋭さは、金型の信頼性にも依存する。本明細書に記載のマスター金型をマイクロリミングすると、金型幾何形状の精度を増大させることが可能になり、それによりひいては、得られる製造用金型、および製造用金型によって形成されるマイクロニードルアレイの精度および信頼性が増大する。

【００８４】

マイクロミリングの精度が増大すると、より正確で緻密なエレメントを金型設計に含めることが可能になる。例えば、以下の次セクションで論じるように、柱型マイクロニードルのベースにフィレットを形成すると、マイクロニードルの構造的完全性を著しく増大させることができ、それにより、マイクロニードルが、皮膚に衝突する際、破壊または破損

する可能性が低減される。これらのフィレットは、マイクロニードルの強度を著しく増大させることができるが、マイクロニードルの機能的要件（例えば、貫通深度および生物製剤の体積）を妨害しない。このようなフィレットは、従来の技法によって形成されるマスター金型で作ることが困難でありうる非常に小さいフィーチャである。しかし、上述したマイクロミリング技法は、ほとんど、またはまったく困難を伴うことなく、このような小さいフィーチャを含めることを可能にする。

【００８５】

機械的完全性および貫通能力

マイクロニードルアレイは、そのカーゴ（例えば、生物製剤または生物活性成分）を表皮および／または真皮に送達するために角質層を貫通する一方、神経終末および血管を含有しうるより深い層への貫通を防止することによって痛みおよび出血を最小限にするように構成されていることが好ましい。製作したマイクロニードルアレイの機械的バイアビリティーを評価するために、アレイ幾何形状の代表的な変形としてピラミッドおよび柱型マイクロニードルアレイ（例えば、図７Ｂおよび図８に示した）に対して試験を実施した。第１のセットの試験は、マイクロニードルの破壊限界を示し、一定の接近速度で固体アクリル表面に対してマイクロニードルアレイを押し、一方、破壊が起こるまでの力および変位を同時に測定することを含む。第２のセットの試験は、ヒト皮膚外植片に対するマイクロニードルの穿孔能力を示す。

【００８６】

図２１は、機能試験のために設計された試験装置を示す。試料（すなわち、マイクロニードルアレイ）を治具に取り付け、これを、コンピューター制御移動ステージ（ＥＳ１４２８３－５２　Ａｅｒｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．）を使用して約１０ｍｍ／秒の速度の一定速度で固定されたアクリル人工物（ＰＭＭＡ表面）に向かって進めた。アクリル人工物を受容した３軸ダイナモメーター（９２５６Ｃ１、Ｋｉｓｔｌｅｒ，Ｉｎｃ．）が、力の高感度測定を可能にした。

【００８７】

図２２は、破壊試験中に測定されたデータの力－変位曲線を示す。左の曲線は、柱マイクロニードル試料の試験から得たデータを表し、右の曲線は、ピラミッドマイクロニードルの試験から得たデータを表す。図２２に見られるように、マイクロニードルのこれらの２種類の破壊は、著しく異なり、ピラミッドアレイは、塑性変形する（曲がる）一方、柱型アレイは、そのベースでの柱の破損を呈する。この異なる破壊挙動は、相当に異なる変位－力データと結びつく。破壊（破損）イベントは、図に示したように、変位－力データから容易に識別することができる。得られたデータに基づいて、柱型マイクロニードルの破壊点は、平均で１００ｍＮであると分かった。わずか約４０ｍＮの力が角質層を貫通するのに必要とされるので、マイクロニードルは、破壊することなくヒト皮膚を貫通するのに十分強い。さらに、マイクロニードル先端とアクリル人工物との間の類似は、完全に確立することはできないので、実際の破壊限界は、１００ｍＮよりおそらくかなり高いであろう（すなわち、マイクロニードルは、ほとんど／すべてのマイクロニードルの同時破損ではなく、連続的な様式で破損した）。

【００８８】

ピラミッドマイクロニードルは、破壊点の明らかな徴候をまったく伴わない連続的に増大する力シグネチャー（ｆｏｒｃｅ　ｓｉｇｎａｔｕｒｅ）を提示した。ピラミッドマイクロニードルの破壊限界を同定するために、中断試験を行い、そこで、マイクロニードルをある特定の量によって、人工物中に進め、後退させ、光学顕微鏡画像によって検査した。このプロセスを、破壊が観察されるまで継続した。この目的のために、破壊を、１５度を超えるピラミッドマイクロニードルの屈曲として定義した。

【００８９】

マイクロニードルの破壊をさらに分析するために、図２３に示したマイクロニードルアレイの有限要素モデル（ＦＥＭ）を開発した。ＣＭＣ材料の機械的性質（弾性係数および強度限界）を得るために、一連のナノインデンテーション試験（Ｈｙｓｉｔｒｏｎナノイ

ンデンターを使用）。ＣＭＣ材料（調製されたままの）の平均弾性係数および降伏強度は、それぞれ１０．８ＧＰａおよび１７３ＭＰａであった。これは、調製したＣＭＣ材料が、ＰＭＭＡ（弾性係数：３．１ＧＰａ、降伏強度：１０３ＭＰａ）およびポリカーボネート（弾性係数：２．２ＧＰａ、降伏強度：７５ＭＰａ）の両方より高い弾性係数および降伏強度を有し、他のポリマーに対してＣＭＣ材料の優れた強度および剛性を示すことを示す。

【００９０】

このデータを使用して、一連のＦＥＭシミュレーションを行った。高さ６００μｍ、頂角３０度、フィレット半径２０μｍを有するピラミッドおよび鋭い柱（幅＝１３４μｍ）のマイクロニードルの破壊限界は、非対称装填（５度の装填方位差）について、４００ｍＮ（ピラミッド）および２９０ｍＮ（鋭い柱）であることがＦＥＭモデルから予測された。最小穿孔力要件が、約４０ｍＮであることを考慮すると、ピラミッドおよび鋭い柱マイクロニードルは、それぞれ約１０および７．２５の安全性の係数を有するはずである。

【００９１】

フィレット半径が４０μｍに倍増される場合、柱の破壊荷重は、３５０ｍＮに増大し、フィレット半径が５μｍに低減される場合、破壊荷重は、１６０ｍＮに低減した。これは、実験的に判定された破壊負荷に近い。柱の高さおよび幅は、破壊荷重に対して有意な効果を有した。例えば、幅１００μｍの柱について、高さを５００μｍから１０００μｍに増大させると、破壊荷重が２３０ｍＮから１５０ｍＮに低減した。高さ７５０μｍの柱について幅を７５μｍに低減すると、破壊荷重は、８７ｍＮであると分かった。

【００９２】

貫通能力を評価するために、ピラミッドおよび鋭い柱マイクロニードルアレイを、水ベースモデル弾性基板および全層ヒト皮膚に対する穿孔について試験した。図２４は、モデル弾性材に曝露して４分後のピラミッド（パネルＡ、ＣおよびＥ）ならびに柱型マイクロニードルアレイ（Ｂ、ＤおよびＦ）のステレオ顕微鏡写真を示す。特に、ピラミッドまたは柱型マイクロニードルアレイを適用した後のモデル弾性基板（パネルＣおよびＤ）または新たに切り取った全層ヒト皮膚外植片（パネルＥおよびＦ）にトルエンブルートレーサー色素を堆積させた。

【００９３】

モデル弾性基板は、セ氏約４度で約２４時間以上ゲル化したＰＢＳ中に約１０％のＣＭＣおよび約１０％のブタゼラチンを含んでいた。弾性材の表面を、厚さ約１００μｍのパラフィルムで覆うことによって、針先端およびパッチ材料の水ベースモデル弾性材との即時の接触を防止した。ステレオ顕微鏡イメージングを可能にするために、トリパンブルートレーサー色素（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍ．、カタログ番号Ｔ６１４６）を、０．１％の濃度でＣＭＣヒドロゲル中に組み込んだ。パッチを、バネ仕掛けのアプリケーターを使用して適用し、約４分の曝露後に分析した。標的基板中の色素の物理的知見に基づくと、２つの異なる幾何形状のマイクロニードルの溶解は、著しく異なっていた。

【００９４】

モデル弾性基板に適用された鋭い柱針は、ピラミッド設計で観察されたものより実質的に多いトレーサー色素をゲルマトリックスに放出した（図２４、Ｃ対Ｄ）。回収したパッチの画像（図２４、Ａ対Ｂ）は、この知見と一致し、その理由は、鋭い柱針の分解は、ピラミッド針の分解より進んでいたためである。より臨床的に関連するモデルにこの分析を外挿するために、ピラミッドおよび柱型マイクロニードルアレイを、バネ仕掛けのアプリケーターからの同じ力を使用して、新たに切り取った全層ヒト皮膚外植片に適用した。弾性モデルからの結果と一致して、ピラミッドマイクロニードルアレイは、鋭い柱マイクロニードルアレイより明白に少ないトレーサー色素を堆積させた（図２４、Ｅ対Ｆ）。

【００９５】

貫通をさらに評価し、ヒト皮膚への送達有効性を評価するために、ＣＭＣマイクロニードルアレイを、ＢｉｏＭａｇ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．、カタログ番号８４１００）ビーズまたは蛍光粒状物トレーサー（Ｆｌｕｏｒｅｓｂｒｉｔｅ　ＹＧ　１μｍ

、Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｉｎｃ．、カタログ番号１５７０２）を用いて製作した。蛍光粒状物または固体粒状物を含有するピラミッドＣＭＣマイクロニードルアレイを、以前に記載した、生きているヒト皮膚外植片に適用した。適用して５分後に、表面残留物を除去し、皮膚試料を凍結切片化し、次いで光学顕微鏡（図２５Ａおよび図２５Ｂ）、または蛍光顕微鏡法（図２５Ｃ）によるイメージングのためにトルエンブルーで対比染色した。

【００９６】

ピラミッドＣＭＣマイクロニードルは、個々の針の挿入点に対応する貫通空洞に並ぶＢｉｏｍａｇビーズの堆積によって立証されるように、生きているヒト皮膚外植片の角質層、表皮および真皮を有効に貫通した（図２５Ａおよび図２５Ｂに示した代表的な切片）。特に、秩序立った空洞（図２５Ａ、１～４の番号が付いた空洞、トルエンブルー対比染色、１０×）、および貫通空洞に並ぶＢｉｏＭａｇ粒子（褐色）の堆積は明白であり（図２５Ｂ、４０×）、マイクロニードルがヒト皮膚を貫通したことを示した。さらに、細胞核を同定するためのＤＡＰＩおよびＭＨＣクラスＩＩ＋抗原提示細胞を同定するための抗ＨＬＡ－ＤＲで染色した、生きているヒト外植片からの切片を分析すると、クラスＩＩ＋抗原提示細胞と共局在化したいくつかの粒子を含めて、表在性表皮および真皮に堆積した高密度蛍光粒状物が明らかになった（図２５Ｃ、ＤＡＰＩ（青色）、ＨＬＡ－ＤＲ＋（赤色）、および蛍光粒子（緑色）、４０×）。

【００９７】

これらの結果は、本明細書に記載のＣＭＣマイクロニードルアレイが、ヒト皮膚を有効に貫通し、不溶性粒状物を含めた、統合されているカーゴ（生物活性成分）を送達することができることをさらに実証する。これらは、合理的なワクチン設計の現在の主要目的である、ヒト皮膚における粒子状抗原の抗原提示細胞への有効な送達と一致する。

【００９８】

ｉｎ　ｖｉｖｏでのマイクロニードルアレイ送達にさらに対処するために、ｉｎ　ｖｉｖｏでの粒子状抗原の皮膚送達を、麻酔したマウスの耳の背側面に蛍光粒子含有アレイを同様に適用することによってモデル化した。５分後、パッチを除去し、マウスは、その正常な活動を再開した。３時間または３日、耳の皮膚および流入領域リンパ節を、蛍光粒子の存在について分析した。ヒト皮膚の知見と一致して、粒状物がアレイ適用部位から切り取った皮膚において明白であった（データを示さず）。さらに、３日の時点で、相当な数の粒子が、流入領域リンパ節内で明白であった。図２６Ａおよび図２６Ｂは、粒状物が内部移行したリンパ節常在抗原提示細胞の存在を示唆する、クラスＩＩ＋細胞に密接に付随した粒状物のクラスターを含めて（図２６Ｂ、６０×）、流入領域リンパ節内で明白であった相当な数の粒子（図２６Ａ、１０×）を示す。

【００９９】

マイクロニードルアレイを使用するカーゴ送達に対する針の幾何形状の効果を定量的に評価するために、^{3}Ｈトレーサー標識ＣＭＣマイクロニードルアレイを構築した。ＣＭＣヒドロゲルを、５％ｗｔのオボアルブミンを用いて、２５ｗｔ％の最終乾燥重量含量（５ｇ／９５ｇのＯＶＡ／ＣＭＣ）のモデル活性成分として調製し、０．１ｗｔ％のトリパンブルー、および^{3}Ｈ－チミジン（ＩＣＮ　Ｉｎｃ．、カタログ番号２４０６００５）の形態での０．５×１０^{6}ｄｐｍ／乾燥重量１ｍｇの^{3}Ｈトレーサーで微量標識した。標識ＣＭＣヒドロゲル調製の単一バッチから、ピラミッドおよび鋭い柱の針の幾何形状のいくつかの個々のパッチを含有する、４つのバッチの^{3}Ｈ－ＣＭＣマイクロニードルアレイを製作した。パッチをヒト皮膚外植片に上述したように適用し、３０分曝露した後除去した。パッチ処置範囲をテープストリップして表面残屑を除去し、１０ｍｍの生検パンチを使用して切断した。切り取ったヒト皮膚外植片ディスクの^{3}Ｈ含量を、シンチレーション計数によって判定した。^{3}Ｈ－ＣＭＣマイクロニードルパッチ材料の比活性を判定し、７２，３７２ｃｐｍ／乾燥重量１ｍｇであると計算された。この比活性を使用して、皮膚に到達され、保持されたオボアルブミンの量を間接的に判定した。得られたデータを、以下の表１に要約する。

【０１００】
試験したタイプのパッチは、マイクロニードルアレイ間（平均標準偏差２４～３５％）およびバッチ間（平均標準偏差７～１９％）で一貫していた。両針幾何形状のバッチ内ばらつきは、インバッチ値（ｉｎ－ｂａｔｃｈ　ｖａｌｕｅ）未満であり、挿入プロセスおよび標的の特徴が、順調な経皮材料送達および保持において主要な役割をおそらく果たすことを示した。パッチ材料保持データは、経皮カーゴ送達におけるマイクロニードル幾何形状が第１に重要であることを明らかに実証する。柱型針幾何形状は、ピラミッド針のものより、全体的に３．８９倍大きい^{3}Ｈ標識針材料の堆積をもたらした。堆積した放射性材料に基づくと、ピラミッド針は、深さ約２００μｍ挿入され、一方、柱型は、約４００μｍ以上挿入されたと推定される。

【０１０１】
表４．２．５．ピラミッドおよび柱型針によるヒト皮膚外植片への^{3}Ｈ標識ＣＭＣマイクロニードル材料の移動
【表１】

アレイのバッチ	ピラミッド針（cpm／パッチ）	標準偏差（%）	ピラミッド針の移動したOVA（μg／パッチ）	柱型針（cpm/パッチ）	標準偏差（%）	柱型針の移動したOVA（μg／パッチ）	柱とピラミッドの比
バッチ A	2459.00	17.56	1.70	11700.50	31.52	8.08	4.76
バッチ B	3273.50	57.39	2.26	12816.50	21.45	8.85	3.92
バッチ C	2757.75	46.13	1.90	12240.00	26.77	8.46	**4.44**
バッチ D	3782.00	36.27	2.61	10921.50	9.32	7.55	2.89
バッチ内平均	3068.06	19.00	2.12	11919.63	6.77	8.24	3.89

【０１０２】
望ましくは、本明細書に記載のマイクロニードルアレイは、皮膚免疫化に使用することができる。抗原およびアジュバントを有効に送達するためのストラテジーの開発は、ワクチン設計の主要な目的であり、皮膚樹状細胞を標的にする免疫化ストラテジーは、伝統的なワクチンに対して様々な利点を有する。

【０１０３】
本明細書に記載のマイクロニードルアレイは、化学療法および免疫化学療法用途にも有効でありうる。皮膚腫瘍を含めた腫瘍への化学療法剤の有効で特異的な送達は、最新の腫瘍療法の主要な目的である。しかし、化学療法剤の全身送達は、複数の十分に確立した毒性によって制限される。皮膚由来腫瘍（基底細胞、扁平細胞、メルケル細胞および黒色腫など）、ならびに皮膚に転移性の腫瘍（乳がん、黒色腫など）を含めた皮膚腫瘍の場合では、局部送達が有効でありうる。局部送達の現在の方法は一般に、クリームの塗布または局所注射の繰り返しを必要とする。これらの手法の有効性は、現在、皮膚内への活性剤の限定された浸透、非特異性、および望まれない副作用によって制限されている。

【０１０４】
本開示のマイクロニードルアレイは、伝統的な局部的な化学療法手法の代替として、またはそれに加えて使用することができる。本開示のマイクロニードルアレイは、皮膚の外層を貫通し、真皮および表皮中の生細胞に活性生物製剤を有効に送達することができる。化学療法剤が送達されると、皮膚細胞のアポトーシスおよび死がもたらされる。

【０１０５】
さらに、複数の生物活性剤を、単一のマイクロニードルアレイ（パッチ）で送達することができる。これは、細胞傷害性剤の免疫刺激剤（アジュバント）との共送達に基づく免疫化学療法手法を可能にする。アジュバントによって作られる免疫原性環境では、死にかけている腫瘍細胞からの腫瘍抗原放出が免疫系に提示され、処置の部位における、かつ体全体にわたる腫瘍細胞を拒絶することができる局所的および全身性の抗腫瘍免疫応答を誘導する。

【０１０６】

例示的な実施形態では、生物学的に活性な小分子の送達を試験した。特に、ＣＭＣマイクロニードルアレイで皮膚に送達された化学療法剤Ｃｙｔｏｘａｎ（登録商標）の活性を試験した。Ｃｙｔｏｘａｎ（登録商標）を使用すると、皮膚悪性腫瘍の範囲の局所処置に潜在的な臨床的有用性を有する作用物質のクラスを代表して、生物活性（皮膚におけるＣｙｔｏｘａｎ（登録商標）誘導アポトーシス）の直接測定が可能になる。

【０１０７】

ＣＭＣマイクロニードルアレイ組込み抗原の免疫原性を直接評価するために、十分に特徴付けられたモデル抗原オボアルブミンを使用した。ピラミッドアレイを、可溶性オボアルブミン（ｓＯＶＡ）、粒状オボアルブミン（ｐＯＶＡ）を組み込んで製作し、またはＣｐＧとともにｐＯＶＡを両方含有するアレイを製作した。ＣｐＧのアジュバント効果は、動物モデルで十分に特徴付けられており、ヒトにおけるこれらのアジュバント活性は、臨床試験で現在評価中である。

【０１０８】

免疫化は、上述したように、バネ仕掛けのアプリケーターを使用して麻酔したマウスの耳に抗原含有ＣＭＣマイクロニードルアレイを適用し、その後、適用して５分後にアレイを除去することによって実現した。これらのピラミッドマイクロニードルアレイは、ＣＭＣ中の約５ｗｔ％のＯＶＡ、および約０．０７５ｗｔ％（２０μＭ）のＣｐＧを含有していた。陽性対照として、ＯＶＡをコードするプラスミドＤＮＡを使用する遺伝子銃ベース遺伝子免疫化ストラテジーを使用した。遺伝子銃免疫化は、マウスモデルにおいてＣＴＬ媒介免疫応答を誘導するための最も強力で再現可能な方法の１つであり、その使用をこれらのアッセイにおける比較のための「ゴールドスタンダード」として示唆している。

【０１０９】

マウスを免疫し、１週間後にブーストし、次いでｉｎ　ｖｉｖｏでＯＶＡ特異的ＣＴＬ活性についてアッセイした。特に、少量のＯＶＡおよびＣｐＧを含有するアレイを用いた免疫化は、遺伝子銃免疫化によって観察されたものと同様に、高レベルのＣＴＬ活性を誘導した（図２７）。有意なＯＶＡ特異的ＣＴＬ活性が、粒状および可溶性アレイ送達ＯＶＡ抗原の両方で、アジュバントの非存在下でさえ誘発された。伝統的な針注射によって送達される場合、同様の応答には、実質的により高い用量の抗原が必要となることが十分に確立されている。

【０１１０】

製作したアレイの安定性を評価するために、アレイのバッチを製作し、貯蔵し、次いで長時間にわたって使用した。図２８に示したように、最大８０日（評価した最長の時点）に及ぶ貯蔵期間にわたって、免疫原性の有意な劣化はまったく観察されなかった。したがって、ＣＭＣマイクロニードルアレイおよびこの送達技術は、抗原特異的免疫を誘発するための抗原およびアジュバントの有効な皮膚送達を可能にすることができる。

【０１１１】

生物学的活性小分子の送達を評価するために、低分子量化学療法剤Ｃｙｔｏｘａｎ（登録商標）（シクロホスファミド）、または対照としてＦｌｕｏｒｅｓＢｒｉｔｅ緑色蛍光粒子を含むピラミッドＣＭＣマイクロニードルアレイを製作した。Ｃｙｔｏｘａｎ（登録商標）を、５ｍｇ／ＣＭＣ１ｇの濃度で統合し、アレイ１つ当たりおよそ約１４０μｇの送達を可能にした。これは、標的にされる皮膚の面積に基づいて治療的に妥当な濃度であるが、全身性毒性に関連したレベルの十分下である。生きているヒト皮膚の器官培養を使用して、Ｃｙｔｏｘａｎ（登録商標）の細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｔｙ）を評価した。Ｃｙｔｏｘａｎ（登録商標）は、本発明者らが以前に記載したように、皮膚外植片にアレイを適用することによって送達した。適用して５分後、および７２時間の曝露後に、アレイおよび残留材料を除去し、培養した生きている皮膚外植片を凍結切片化し、固定した。緑色蛍光ＴＵＮＥＬアッセイ（Ｉｎ　Ｓｉｔｕ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ、ＴＭＲ　Ｇｒｅｅｎ、Ｒｏｃｈｅ、カタログ番号：１１－６８４－７９５－９１０）を使用してアポトーシスを評価した。図２９Ａに示したように、ヒト皮膚切片の蛍光顕微鏡画像解析により、Ｃｙｔｏｘａｎ（登録商標）で処置した皮膚において

表皮細胞の広範なアポトーシスが明らかになった。図２９Ｂに示したように、蛍光粒子で処置した皮膚において目に見えるアポトーシスはまったく観察されなかったが、これらの粒子は、明白であり、観察された範囲がマイクロニードルアレイによって正確に標的にされたことをバリデートした。

【０１１２】

直接製作したマイクロニードルアレイ

上述したマスター金型のマイクロミリングは、様々な幾何形状を有するマイクロニードルアレイの生産を可能にする。別の実施形態では、乾燥ＣＭＣシートなどの様々な材料を直接マイクロミリングすることによってマイクロニードルアレイを製作するためのシステムおよび方法が提供される。マスター金型のマイクロミリングに関して上述した同じ一般的な成形用具を、マイクロニードルアレイを直接マイクロミリングするのに使用することができる。

【０１１３】

マイクロニードルアレイの直接マイクロミリングは、成形ステップの必要性を排除し、大規模臨床用途に適合性となる単純化された、スケーラブルな、かつ正確に再現可能な生産ストラテジーを可能にする。さらに、マイクロミリングによってマイクロニードルアレイを直接製作することにより、マイクロニードル幾何形状のより優れた制御が可能になる。例えば、マイクロミリングは、成形プロセスを使用して実現することができない、アンダーカットおよび／またはベベルなどのフィーチャを保持するマイクロニードルを含めることを可能にする。

【０１１４】

マイクロニードルアレイの直接ミリングの再現性は、特に有益である。すなわち、直接マイクロミリングでは、マイクロニードルのすべてがミリング製作プロセスの結果として同一である。成形操作では、いくつかの針が、金型からこれらを物理的に分離するプロセスの結果として、所与のパッチから欠損または破損することは、珍しくない。ある特定の医療用途で使用するために、アレイ中の生物活性成分の量の再現性は、プロセスにわたる適切なレベルの「品質管理」をもたらすのに非常に重要であり、その理由は、パッチ間の針の変則性は、送達される薬物／ワクチンの用量のばらつきをおそらくもたらすためである。もちろん、再現性はまた、ＦＤＡ認可を必要とする任意の用途に重要な利点となる。スピンキャスティング／成形されたパッチは、一貫した薬物送達のために許容される均一性を保証するために、特別なプロセスを必要とするはずである。この品質管理はまたおそらく、この放出試験に「不合格になる」ある特定のパーセンテージのパッチをもたらし、生産プロセスに廃棄物を導入することにもなる。直接マイクロミリングは、これらの潜在的な問題を排除し、または少なくとも有意に低減する。

【０１１５】

成形プロセスはまた、ウェルまたは凹面を満たし、そのウェルまたは凹面から硬化した成形部品を取り出すことができる必要性のために固有の限定事項を有する。すなわち、金型の幾何形状のために、アンダーカットは、部品を成形するとき一般に回避されなければならず、さもなければ部品は、金型から取り出し可能でなくなる。すなわち、成形されるマイクロニードルアレイなどの成形部品の幾何学的限定事項は、頂点により近く位置した任意のフィーチャが、ベースに向かって位置した任意のフィーチャより狭くなければならないことである。

【０１１６】

したがって、これらの限定事項を考慮して、図２０は、成形による製作に一般に適したマイクロニードルの形状および構造の略図を示す。すなわち、図２０に示した形状および構造は、部品（すなわちマイクロニードル）が製造用金型から取り出されるのを妨げるいずれのアンダーカットも含有しない。対照的に、図３０は、本明細書に記載の様式で成形することができない斜めのアンダーカットされたマイクロニードル形状を示す。

【０１１７】

この幾何形状は、提案したマイクロミリング技術を使用して、直接製作によってのみ作

ることができる。負の（ベベル）角度は、組織内のマイクロニードルのより良好な保持を促進する。さらに、図３０のマイクロニードルは、下部（より小さい断面寸法を伴う）の上により広い中間部（より大きい断面寸法を伴う）を有するので、皮膚内に保持されるように構成されているより広いセクションに生物活性材料を保有または貯蔵するようにマイクロニードルを構成することによって、より多い量の生物活性材料を送達することができる。したがって、中間部のより大きい断面寸法は、生物活性成分のバルクを「担持する」ことができる。下部は、より狭い断面寸法に向かって先細になるので、より広い中間部は、皮膚層内に生物活性成分を送達するための良好な貫通を得ることになる。中間部の上の部分は、皮膚層内へのマイクロニードルの侵入を促進するために、先に行くほど細くなることが望ましい。

【０１１８】

成形部品の別の限定事項は、金型の非常に小さいセクションを正確に満たすことが困難でありうることである。マイクロニードルアレイ用製造用金型は、多数の非常に小さいセクションを含むので、各ウェルを正確に満たすことが困難でありうる。これは、金型が異なる材料、例えば、生物活性成分を含有する材料、および生物活性成分を含有しない材料などで満たされなければならないとき、特に問題となりうる。したがって、製造用金型が層で満たされる場合、各マイクロニードルに関連したとても小さいウェルを正確に満たすことが困難でありうる。マイクロニードルは、１種または複数種の生物活性成分を送達するように意図されているので、このような再現性は、特に重要である。したがって、製造用金型を満たすのに使用される生物活性成分の量のわずかな変動でさえ、非常に望ましくない場合がある。

【０１１９】

また、マイクロミリングされうるシートまたはブロックを形成するために積層構造を使用することによって、様々な活性成分を、垂直層化によって単一マイクロニードル内に統合することができる。例えば、例示的な実施形態では、ＣＭＣヒドロゲルおよびＣＭＣ－ｓＯＶＡヒドロゲル（８０％のＣＭＣ／２０ｗｔ％のＯＶＡ）を層化してシートまたはブロックの形態にした。この複合材シートは、本明細書に記載の直接マイクロミリング技法を使用して微細機械切削することができる。

【０１２０】

図３１は、マイクロニードルアレイ全体のステレオ顕微鏡画像解析である。マイクロニードルは、１０×１０アレイのマイクロニードルを含む。図３２は、図３１のマイクロニードルアレイの拡大セグメントである。２種の成分の層化が図３２に示されており、これは、先端部のマイクロニードルのより暗い範囲および基部のマイクロニードルのより明るい範囲を示す。先端におけるより暗い層は、生物活性成分、この場合、ＣＭＣ層に含有された可溶性オボアルブミンを含む層を表す。

【０１２１】

活性材料（例えば、抗原）を含有する層の形成、ならびにこの層（および任意の他の隣接する層）の後続のマイクロミリングは、相対的に大量の活性材料の使用を必要としうるが、材料は、取り出し（例えば、チップの形態で）、回収し、再利用することができる。直接機械切削技術は、成形／デモールディング手法から生じる幾何学的束縛によって制限されず、したがって、より画期的な針設計（例えば、図３０）を作ることができ、それは、皮膚内での保持される針の体積および針の保持時間を著しく改善することができる。

【０１２２】

複数の層を形成することによってシートまたはブロックを生産すると、マイクロ機械切削することができ、生物活性成分を有する１つまたは複数の層を含みうる固体材料をもたらすことができる。例えば、十分に画定された、制御された寸法を有する溶解性固体カルボキシメチルセルロースポリマー系ブロックまたはシートを、積層プロセスによって製作することができる。得られるシートまたはブロックは、プラスチックまたは金属シートまたはブロックの機械切削と同様に、完全に機械切削可能である。本明細書に記載するように、この製作プロセスは、マトリックス内に生物活性成分を、これらの活性レベルを著し

く低減することなく組み込むことに適している場合がある。

【０１２３】

以下に記載するように、材料（ＣＭＣベース材料など）の製作されたシートは、皮膚を通じて活性構成要素を送達するのに適した１つまたは複数のマイクロニードルアレイを生産するために、直接マイクロ機械切削／マイクロミリングすることができる。この溶解性生体適合性ＣＭＣブロック材料は、体表に適用するために持続放出様式で可溶性または不溶性および粒状作用物質を送達するのに使用することができる。

【０１２４】

生体適合性材料は、足場材料の溶解が必要とされ、有用である場合、より深い軟組織または硬組織内のインプラントに適している場合がある。

【０１２５】

以下の方法は、１２．５％の濃度にカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）ポリマー低粘度ヒドロゲルを調製するのに使用することができる。１２．５％のカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）低粘度ヒドロゲルは、水または（それだけに限らないが）ＰＢＳもしくはＨＢＳなどの他の生体適合性緩衝液中で調製することができる。ポリマー溶液を調製する間に、可溶性作用物質（核酸、ペプチド、タンパク質、脂質、または他の有機および無機の生物学的活性成分など）、ならびに粒状物を添加することができる（例えば、オボアルブミン、可溶性作用物質）。ＣＭＣの２０ｗ／ｗ％で活性構成要素を担持する第一鉄粒状物を使用することができる。

【０１２６】

活性成分をまったく含まない滅菌した１２．５％のＣＭＣヒドロゲル１０００ｇの調製は、以下の通り実現することができる：

１）ＣＭＣ　１２５ｇを測定し、水または他の水ベース溶媒８７５ｇを添加する。

２）オーバーヘッドミキサーで均質になるまで撹拌する。

３）ホモジネートをセ氏１２１度で１時間オートクレーブして滅菌する（オートクレーブステップにより粘度を低減して層化を改善することができる）。

４）セ氏２２度に冷却する。

５）得られた材料を１０トルおよびセ氏２２度で１時間真空処理して、捕捉されたマイクロバブルを除去する。

６）真空チャンバー付き遠心機で生成物を２５，０００ｇで１時間遠心機にかける（残留するマイクロバブルを浮かせ、さらに除去するため）。

７）ＣＭＣヒドロゲル生成物をセ氏４度で貯蔵する。

【０１２７】

滅菌した１２．５ｗ／ｗ％の乾燥含量の２０／８０％のオボアルブミン／ＣＭＣヒドロゲル１０００ｇの調製は、以下の通り実現することができる：

１）ＣＭＣ１００ｇを測定し、水または他の水ベース溶媒６５０ｇを添加する。

２）オーバーヘッドミキサーで均質になるまで撹拌する。

３）ホモジネートをセ氏１２１度で１時間オートクレーブして滅菌する（このオートクレーブステップにより粘度を低減して層化を改善することができる）。

４）セ氏２２度に冷却する。

５ａ）オボアルブミン２５ｇを水２２５ｇに溶解させる。

５ｂ）０．２２μｍの孔サイズのフィルターでオボアルブミン溶液を滅菌濾過する。

６）ＣＭＣヒドロゲル７５０ｇを滅菌したオボアルブミン溶液２５０ｇと滅菌条件下で均質になるまで混合する。

７）得られた材料を１０トルおよびセ氏２２度で１時間真空処理して、捕捉されたマイクロバブルを除去する。

８）真空チャンバー付き遠心機で生成物を２５，０００ｇで１時間遠心機にかける（残留するマイクロバブルを浮かせ、さらに除去するため）。

９）セ氏４度でＣＭＣヒドロゲル生成物を貯蔵する。

【０１２８】

滅菌した１２．５ｗ／ｗ％の乾燥含量の２０／８０％の粒状オボアルブミン／ＣＭＣヒドロゲル１００ｇの調製は、以下の通り実現することができる：
１）ＣＭＣ１０ｇを測定し、水または他の水ベース溶媒８７．５ｇを添加する。
２）オーバーヘッドミキサーで均質になるまで撹拌する。
３）ホモジネートをセ氏１２１度で１時間オートクレーブして滅菌する（このオートクレーブステップにより粘度を低減して層化を改善することができる）。
４）セ氏２２度に冷却する。
５）粒状オボアルブミン２．５ｇをセ氏２２度のＣＭＣヒドロゲル９７．５ｇ中に分散させ、滅菌条件下で均質になるまで混合する。
６）得られた材料を１０トルおよびセ氏２２度で２時間真空処理して、捕捉されたマイクロバブルを除去する。
７）真空チャンバー付き遠心機で生成物を３，０００ｇで１時間遠心機にかける（残留するマイクロバブルを浮かせ、さらに除去するため）。
８）セ氏４度でＣＭＣヒドロゲル生成物を貯蔵する。

【０１２９】
本実施例では、粒状オボアルブミンは、オボアルブミンへの活性化した鉄ビーズの反応から調製されることに留意されたい。しかし、上記記載は、例示的な実施形態であるだけであり、他の化合物および活性構成要素も使用されうることに留意されるべきである。

【０１３０】
固体ブロック／シートのカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）は、上述した低粘度ＣＭＣヒドロゲルを使用して、以下の様式で製作することができる。

【０１３１】
この製作プロセスは、規定された厚さでポリマーを層状拡散させること、およびポリマー層の表面に滅菌乾燥空気流を使用して約５％未満の含水量まで層化ポリマーを乾燥させることを含みうる。上記２つの行為は、所望のブロック厚が実現されるまで繰り返すことができる。

【０１３２】
鋳型アセンブリーに規定された厚さの層状ＣＭＣヒドロゲル層化を実現する方法を、図３３を参照して説明する。図３３は、（ａ）キャスティングベッド；（ｂ）調節可能なキャスティングベッド壁；（ｃ）キャスティングベッド深度調整アセンブリー；および（ｄ）アクリル散布機を含む鋳型アセンブリーの断面図を示す。図３３は、一定の縮尺で描かれておらず、または他の方法で適切な比率でのエレメントで示されていないことに留意されるべきである。

【０１３３】
鋳型アセンブリーは、アクリル（プレキシグラス）から構築することができ、キャスティングベッドベースユニット、垂直に調節可能な疎水性キャスティングベッド壁、およびキャスティングベッド調整機構を含みうる。キャスティングベッドベースユニット（ａ１）は、セルロース層（ａ３）が取り付けられた着脱可能／交換式キャスティングベッドトッププレート（ａ２）を含みうる。セルロース層は、厚さ約０．５ｍｍとすることができる。垂直に調節可能な疎水性キャスティングベッド壁（ｂ）は、リードスクリュー（ｃ１）およびレベル調整つまみ（ｃ２）から成り立ちうるキャスティングベッド深度調整機構を使用して調整することができる。示した実施形態では、このつまみを４分の１回転させると、ベッド壁を０．５ｍｍ持ち上げることができる。

【０１３４】
最初に、調節可能なキャスティングベッド壁は、アクリル散布機とベッドのセルロース層との間の距離が、散布機が適切な位置にあるとき約１ｍｍである高さに設定することができる。既定の体積（例えば、約０．１ｍｌ／ｃｍ^2）の１２．５％のＣＭＣヒドロゲルを添加し、層化することができる。調節可能なキャスティング壁の上面でアクリル散布機（ｄ）をスライドさせることによって層をならし、または平坦化して、ＣＭＣヒドロゲルの約１ｍｍのならされた層を得ることができる。層化ＣＭＣヒドロゲルは、図３４に示し

、以下でより詳細に記載される乾燥装置で乾燥させて固相にすることができる。

【０１３５】

層化および乾燥ステップは、所望の層状構造（シート）が実現されるまで繰り返すことができる。キャスティングベッド壁は、各層を添加する間に適切な量によって上昇させることができる。例えば、各層を添加した後、ベッド壁を、約０．５ｍｍ上昇させ、または持ち上げることができる。したがって、上述したサイクルは、約０．５ｍｍの固体ＣＭＣ層を堆積することができる。このプロセス（例えば、材料の層化、ベッド壁の上昇など）は、所望のブロック厚が実現されるまで繰り返すことができる。

【０１３６】

層化ＣＭＣヒドロゲルポリマーは、様々な様式で乾燥させることができる。例えば、図３４は、シート材料の様々な堆積層を乾燥させるのに使用されうる乾燥装置を示す。図３４は、一定の縮尺で描かれておらず、または他の方法で適切な比率でのエレメントで示されていないことに留意されるべきである。ファンは、鋳型アセンブリー内で層化したＣＭＣヒドロゲル上に連続的なガス流（例えば、空気または窒素などの他の不活性ガス）をもたらすことができる。ガス流は、ＣＭＣヒドロゲル層を穏やかに脱水する。固体ＣＭＣ製品中のガス封入（例えば、気泡）を防止または低減するのに、乾燥速度を調整することができる。層上の高湿度の空気は、乾燥剤（例えば、空気乾燥機または除湿機）で乾燥させ、温度を調整し、速度制御されたファンによってヒドロゲル上に再び戻すことができる。乾燥プロセスの状態を表示するために、湿度計をチャンバーの高湿度側に適所配置することができる。湿度計によって示される場合、所定の乾燥が実現された後、乾燥プロセスを終えることができる。

【０１３７】

乾燥速度に影響を与えるように気流を調整することができる。例示的な実施形態では、気流は、約０．１～２．０ｍ／秒の間に制御され、温度は、周囲温度とセ氏約５０度の間である。これらの構成を使用して、単層ＣＭＣヒドロゲルの乾燥時間は、気流および設定温度に応じて約０．５～４時間とすることができる。

【０１３８】

純粋なＣＭＣベース製品は、透明、淡オフホワイト、または琥珀色でありうる。その比重は、約１．５５～１．５８ｇ／ｍｌでありうる。製品は、マイクロバブルを含まず、さもなければミクロンスケール物体を製作するのに適していることが望ましい。最終的なブロック／シート製品の物理的特徴付け（硬度、引張強度など）は様々となりうるが、一般に、マイクロミリングに関連した物理的ストレスに耐えることができるべきである。

【０１３９】

上述したように、本明細書に開示のマイクロニードルアレイは、様々な生物活性成分の信頼できる、正確な送達法を提供することができる。上述したマイクロニードルアレイに特徴的な構造、製造および流通の利点は、ワクチンの送達に使用するのに特に適用可能でありうる。これらのマイクロニードルアレイの利点としては、（１）ワクチン送達のための針または生きているベクターの使用を不要にする安全性、（２）安価な生産、製品の安定性および流通の容易さに起因する経済性、ならびに３）多様な抗原およびアジュバント製剤と適合性の送達プラットフォームを介した多様性がある。

【０１４０】

さらに、マイクロニードルアレイによる皮膚の免疫化は、免疫原性における重要な利点を有する。皮膚は、容易にアクセス可能な樹状細胞（ＤＣ）に富み、ワクチン送達の高度に免疫原性の標的として長い間見なされている。これらの樹状細胞集団は、これまで同定された最も強力な抗原提示細胞（ＡＰＣ）の構成要素となる。例えば、皮膚を遺伝子免疫化すると、マウスおよびヒト皮膚の樹状細胞がトランスフェクトおよび活性化され、これらのトランスフェクトされた樹状細胞は、トランスジェニック抗原を合成し、皮膚流入領域リンパ節に遊走し、ＭＨＣクラスＩ拘束性経路によってこれらの抗原を効率的に提示してＣＤ８＋Ｔ細胞を刺激する。皮膚由来ＤＣによって誘導される免疫応答は、他の免疫化手法によって誘導されるものと比較して、際立って強力で持続性である。最近の臨床試験

では、従来のワクチンでさえ、標準的な筋肉内針注射よってではなく、皮内に送達されるとき著しくより強力であることが実証されている。したがって、マイクロニードルアレイは、抗原およびアジュバントの両方を効率的および同時に送達することができ、同じ送達プラットフォームを使用して、ＤＣのターゲティングおよび免疫応答のアジュバントエンジニアリングの両方を可能にする。

【０１４１】

高周波数電磁振動アプリケーター

マイクロニードルアレイデバイスは、ヒトの圧力による（例えば、指もしくは親指で押すこと）またはバネ仕掛けのデバイスを用いた自己適用または支援適用を含めた様々な方法によってヒト皮膚に適用することができる。先端装填マイクロニードルアレイを含めたマイクロニードルアレイデバイスの送達の容易さおよび再現性を促進するために、アプリケーターデバイスを本明細書に記載する。アプリケーターデバイスは、高周波数電磁振動をアクティブヘッドの単方向機械的共振に変換するように構成されている。これはひいては、複数の再現可能な低振幅および高周波数圧力ストロークを可能にし、このストロークは、ヒト皮膚を含めた組織内へのマイクロニードルアレイのマイクロニードルの挿入を促進する。

【０１４２】

図３８に示したように、アプリケーターは、アプリケーターヘッド、オシレーターエネルギー変換器、電磁オシレータおよび電源を備えることができる。必要に応じて、これらの４つのエレメントの１つまたはすべては、アプリケーターデバイスから分離可能でありうる。

【０１４３】

アプリケーターヘッドは、異なるサイズおよび形状の組織表面積に適応し、作用するように互換性とすることができる。図３９に示したように、様々なアプリケーターヘッドの幾何形状を、本明細書に記載のアプリケーターと組み合わせて利用することができる。アプリケーターヘッドは、ステンレス鋼または他の化学的および物理的耐性の材料で互換可能に作製されている。必要に応じて、アプリケーターヘッドは、滅菌性のためにオートクレーブし、かつ／またはアルコールもしくは他の化学物質によって滅菌することができる。代替としてまたは追加的に、ガス滅菌（エチレンオキシド）が可能である。

【０１４４】

適用特異的幾何形状は、迅速に設計し、製作することができる。例えば、この実施例における単一適用の面積は、アクティブヘッドの幾何形状に応じて５ｍｍ^2～２５０ｍｍ^{2}の範囲となりうる。ヘッドの幾何形状の単純な構造的バリエーションによって広い範囲を実現することができる。

【０１４５】

オシレータエネルギー変換器ユニットは、電磁振動をアプリケーターヘッドの機械的運動に変換するように構成することができる。方向Ｚのアプリケーターヘッドの振幅は、０．５～２．５ｍｍの間に制御されうる（図４０；Ａ）。いくつかの実施形態では、方向Ｘ－Ｙのヘッドの運動は、無視できる、すなわち０．２ｍｍ未満であるように構成することができる（図４０；Ｂ）。方向Ｚのエネルギー変換から生じる機械的運動の周波数は、５００～２５０００ｒｐｍの間に制御されうる。必要に応じて、オシレータエネルギー変換器ユニットは、分離可能であり得、必要な場合処分または滅菌することができる。

【０１４６】

電磁（ＥＭ）オシレータは、３つのサブユニットからできている場合がある。これらのサブユニットは、（１）制御装置および高周波数ＥＭオシレータ用の電圧および電力を生成する調整電源、（２）ＥＭオシレータ用高周波数信号および要求電流を生成する制御装置－レギュレーター、ならびに（３）ＥＭオシレータを含むことができる。出力周波数は、ユーザーによって制御することができる（例えば、１００～５００Ｈｚなどの範囲内で）。いくつかの実施形態では、ＥＭオシレータは、完全に密閉されている場合があり、アルコール溶液または他の化学剤によって滅菌することができる。

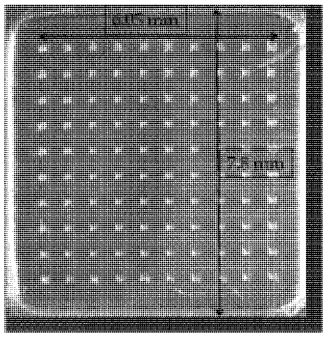
【０１４７】
電源ユニットも、異なる取り付け可能な電源、例えば：
ａ．通常の使い捨てのアルカリまたは任意の他のタイプの電池、
ｂ．内蔵の誘導充電器を有する充電式ＮｉＣａｄまたはＬｉ酸化物電池、
ｃ．１００～２４０Ｖの電子電源アダプター
などに適応するように分離可能でありうる。

【０１４８】
アプリケーターは、マイクロニードルアレイ適用とともに、いくつかの利益をもたらすことができる。例えば、アプリケーターは、組織内へのマイクロニードルアレイ挿入に必要な機械的力を最小限にすることができる。アプリケーターは、既存のバネ仕掛けのアプリケーターと比較して痛みの効果を低減することもできる。さらに、アプリケーターは、携帯型とすることができ、アプリケーターのコンポーネントは、分離可能および互換性でありうる。最後に、アプリケーターは、これが無菌使用のために滅菌されうるように構成することができる。

【０１４９】
開示した実施形態の原理が適用されうる多くの可能な実施形態を考慮すると、示した実施形態は、好適な例にすぎず、保護の範囲を限定するものとして解釈されるべきでないことが認識されるべきである。むしろ、保護の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって本発明者らは、これらの特許請求の範囲および趣旨に入るすべてについて、特許請求する。

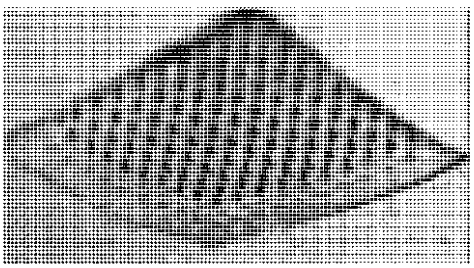
【図２】

FIG. 2



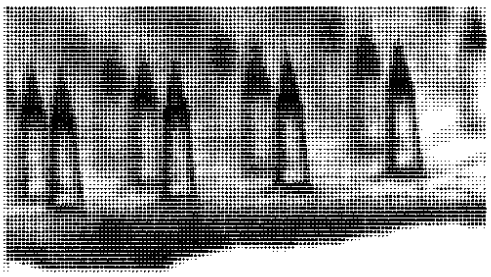
【図３Ａ】

FIG. 3A



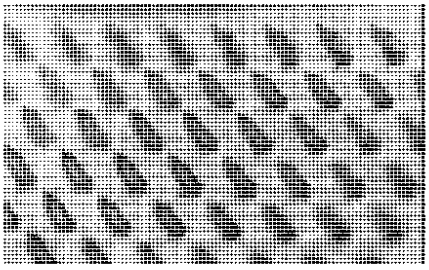
【図３Ｂ】

FIG. 3B



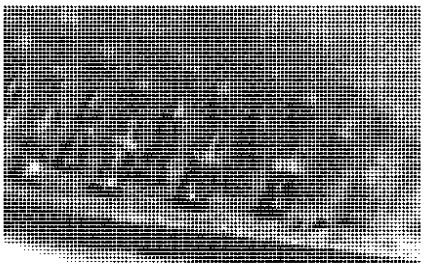
【図４Ａ】

FIG. 4A



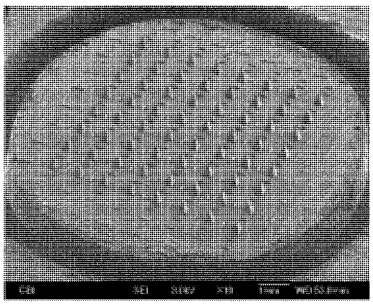
【図４Ｂ】

FIG. 4B



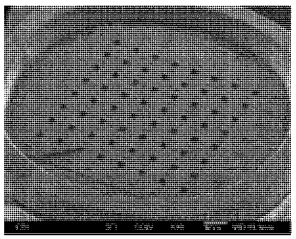
【図８】

FIG. 8



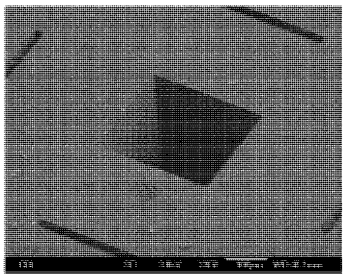
【図９】

FIG. 9



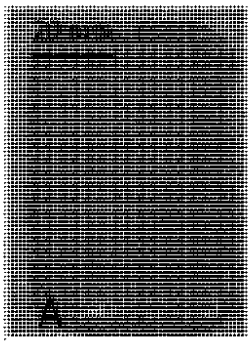
【図１０】

FIG. 10



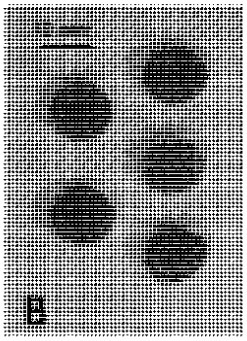
【図１１Ａ】

FIG. 11A



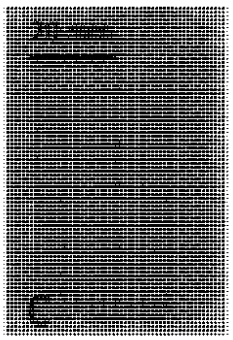
【図１１Ｂ】

FIG. 11B



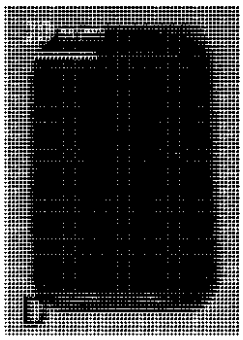
【図１１Ｃ】

FIG. 11C



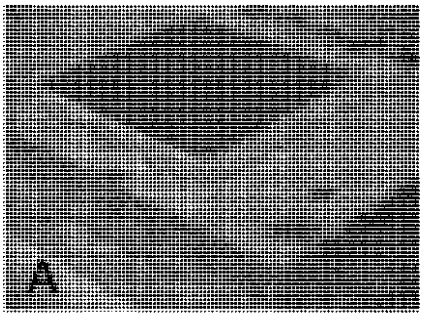
【図１１Ｄ】

FIG. 11D



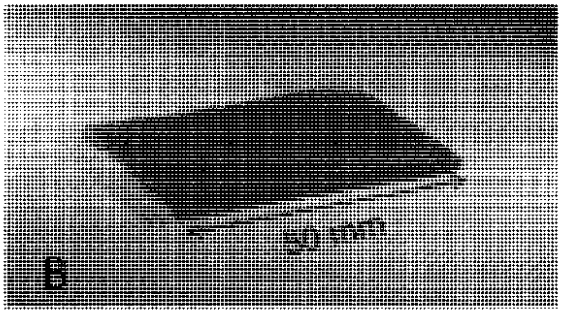
【図１２Ａ】

FIG. 12A



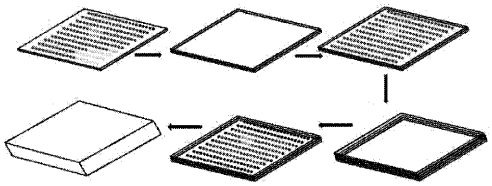
【図１２Ｂ】

FIG. 12B



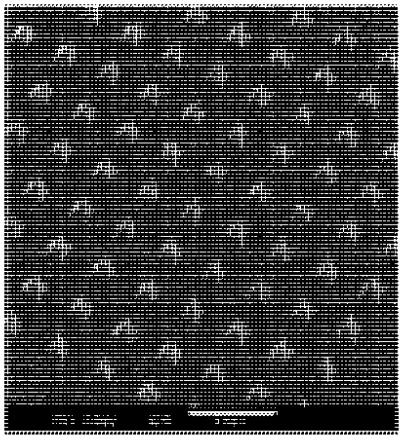
【図１４】

FIG. 14



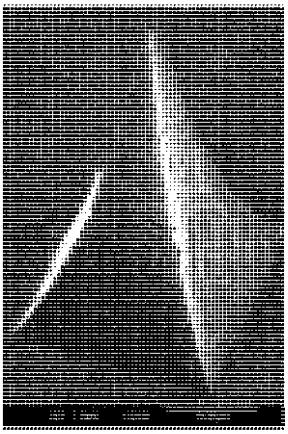
【図１６Ａ】

FIG. 16A



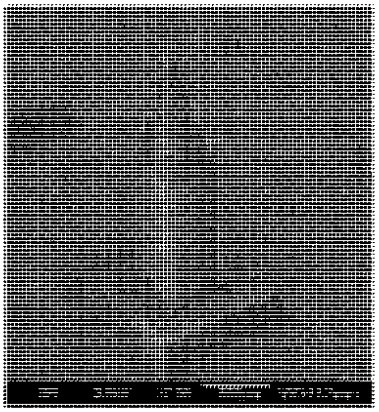
【図１６Ｂ】

FIG. 16B



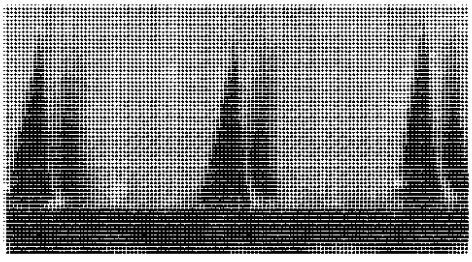
【図１７】

FIG. 17



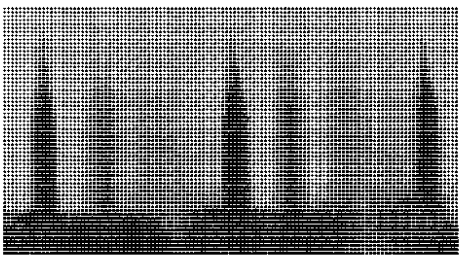
【図１８】

FIG. 18



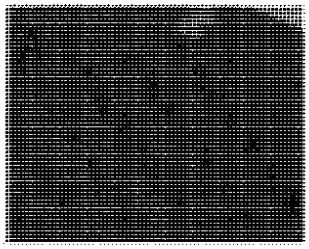
【図１９】

FIG. 19



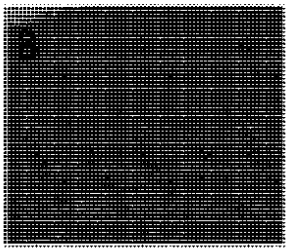
【図２４Ａ】

FIG. 24A



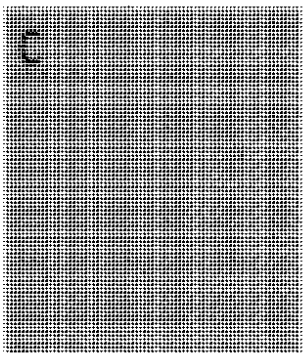
【図２４Ｂ】

FIG. 24B



【図２４Ｃ】

FIG. 24C



【図２４Ｄ】

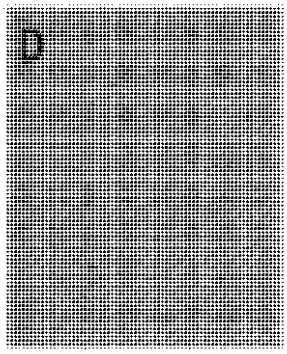


FIG. 24D

【図２４Ｅ】

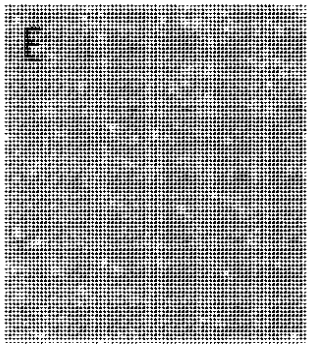


FIG. 24E

【図２４Ｆ】

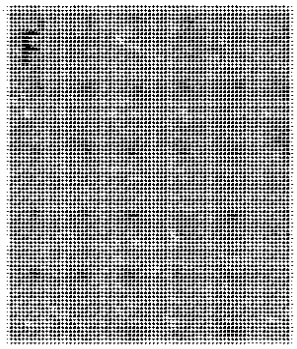
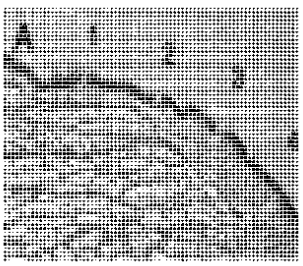


FIG. 24F

【図２５Ａ】

FIG. 25A



【図２５Ｂ】

FIG. 25B



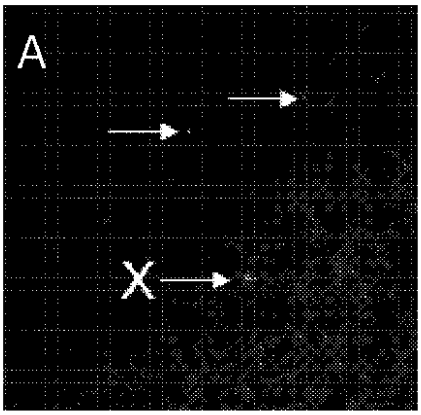
【図２５Ｃ】

FIG. 25C



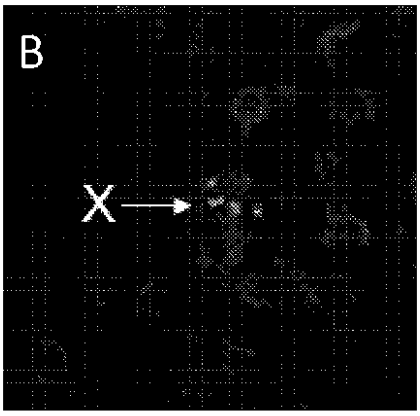
【図２６Ａ】

FIG. 26A



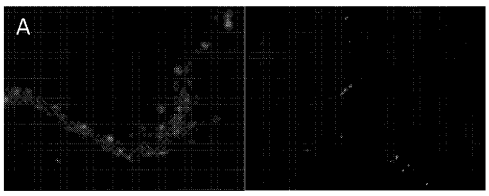
【図２６Ｂ】

FIG. 26B



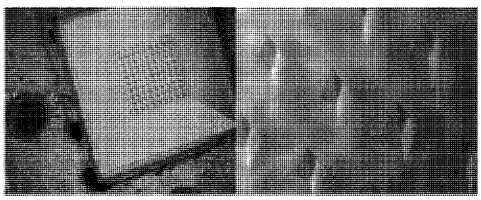
【図２９Ａ－２９Ｂ】

FIG. 29A FIG. 29B



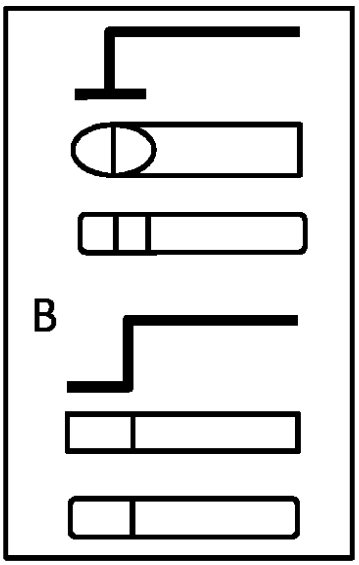
【図３１－３２】

FIG. 31 FIG. 32



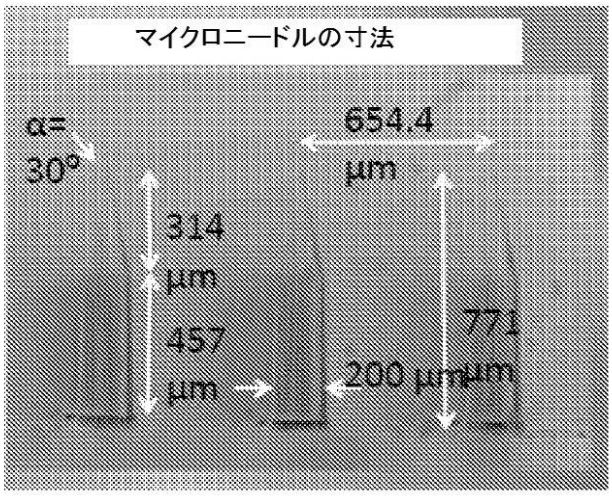
【図３９】

FIG. 39



【図１】

FIG. 1



【図５】

FIG. 5A

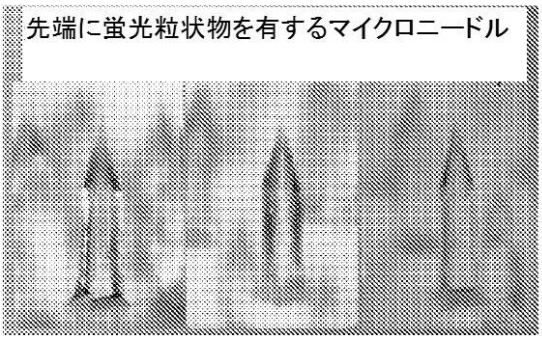
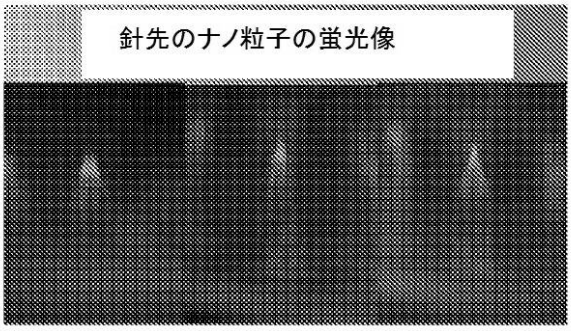


FIG. 5B



【図６】

FIG. 6A

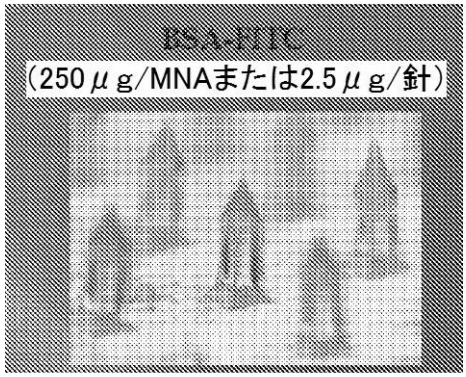
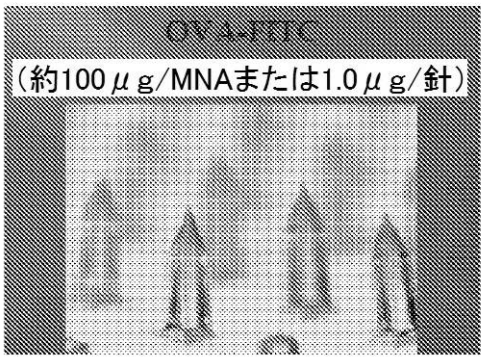
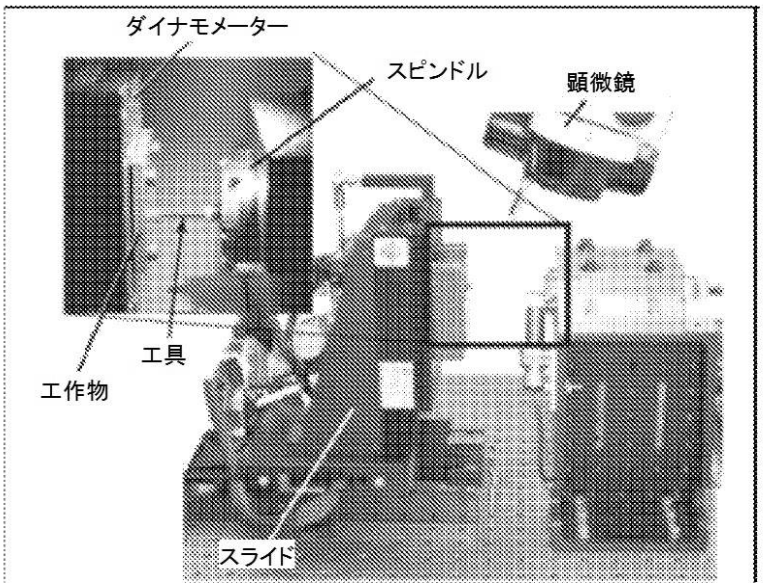


FIG. 6B



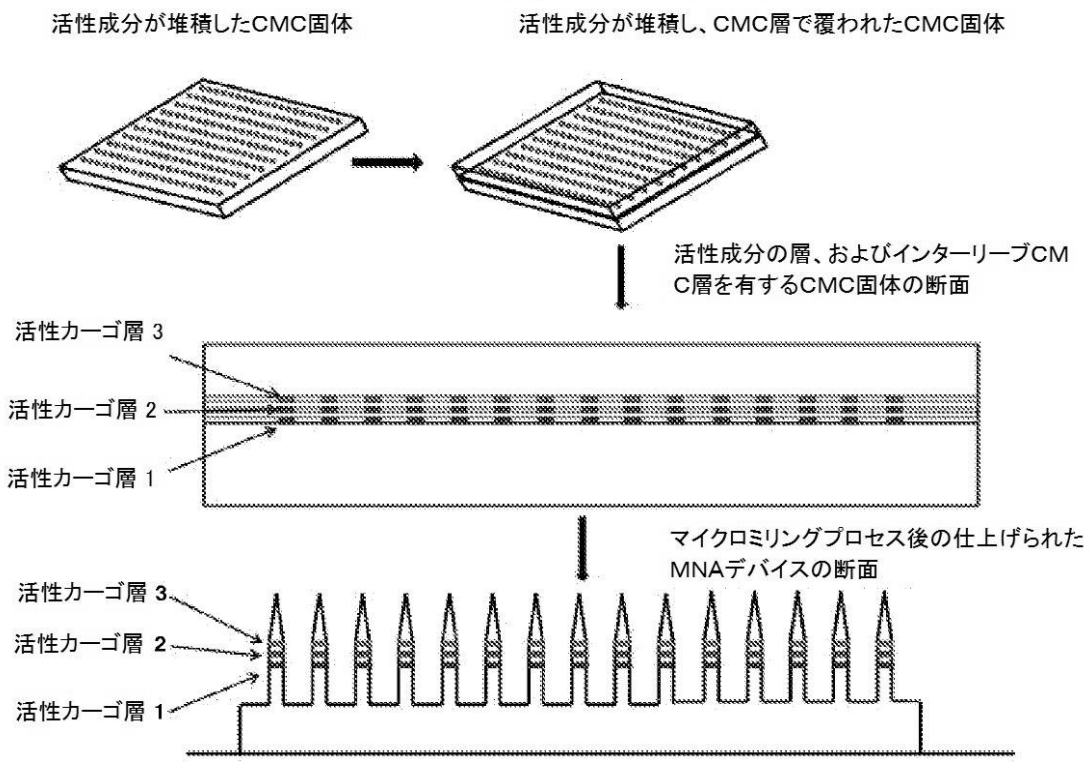
【図７】

FIG. 7



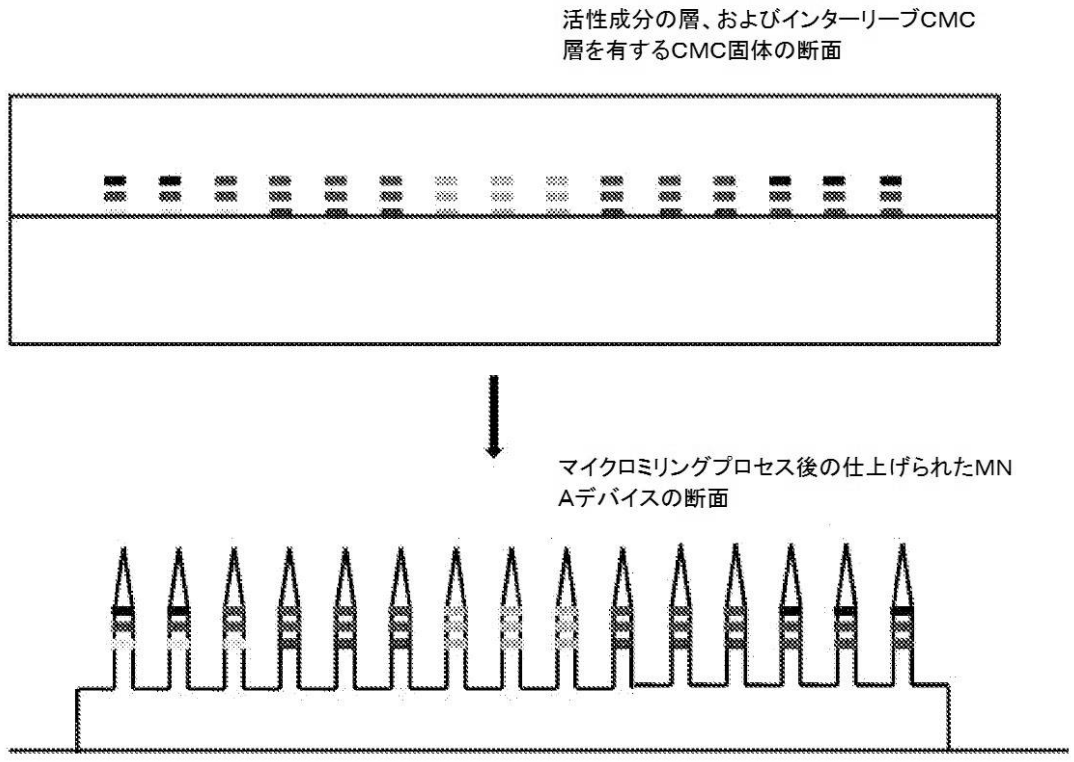
【図１３】

FIG. 13



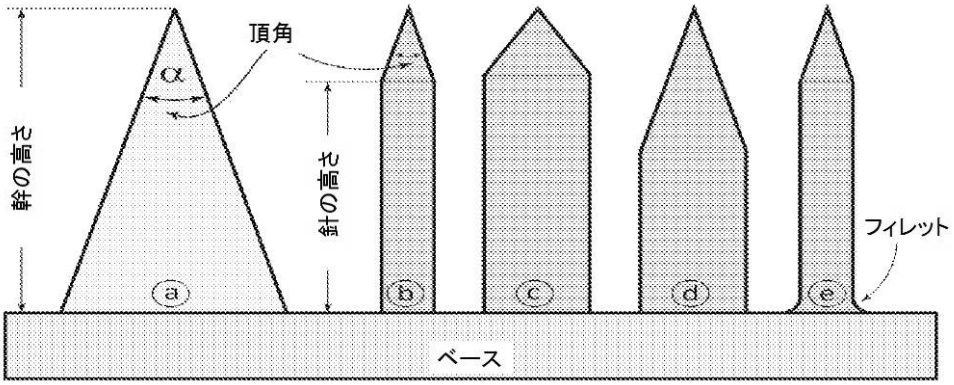
【図１５】

FIG. 15



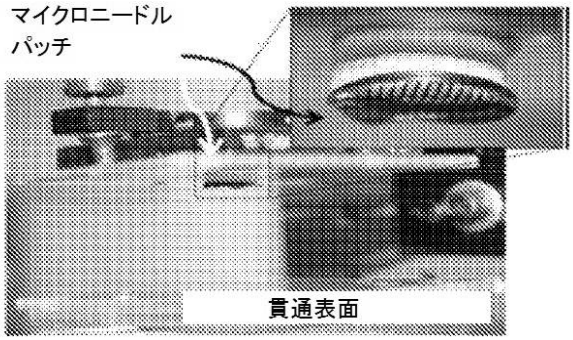
【図２０】

FIG. 20



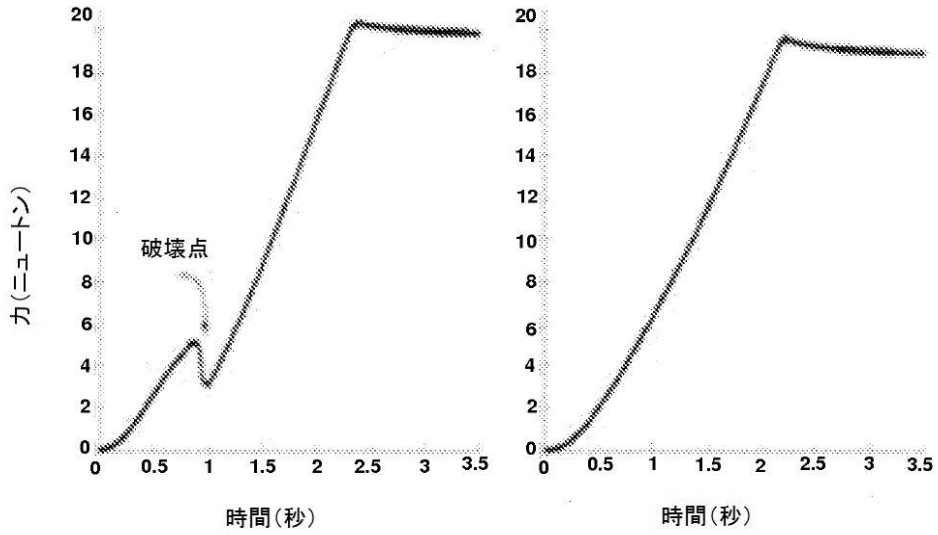
【図２１】

FIG. 21



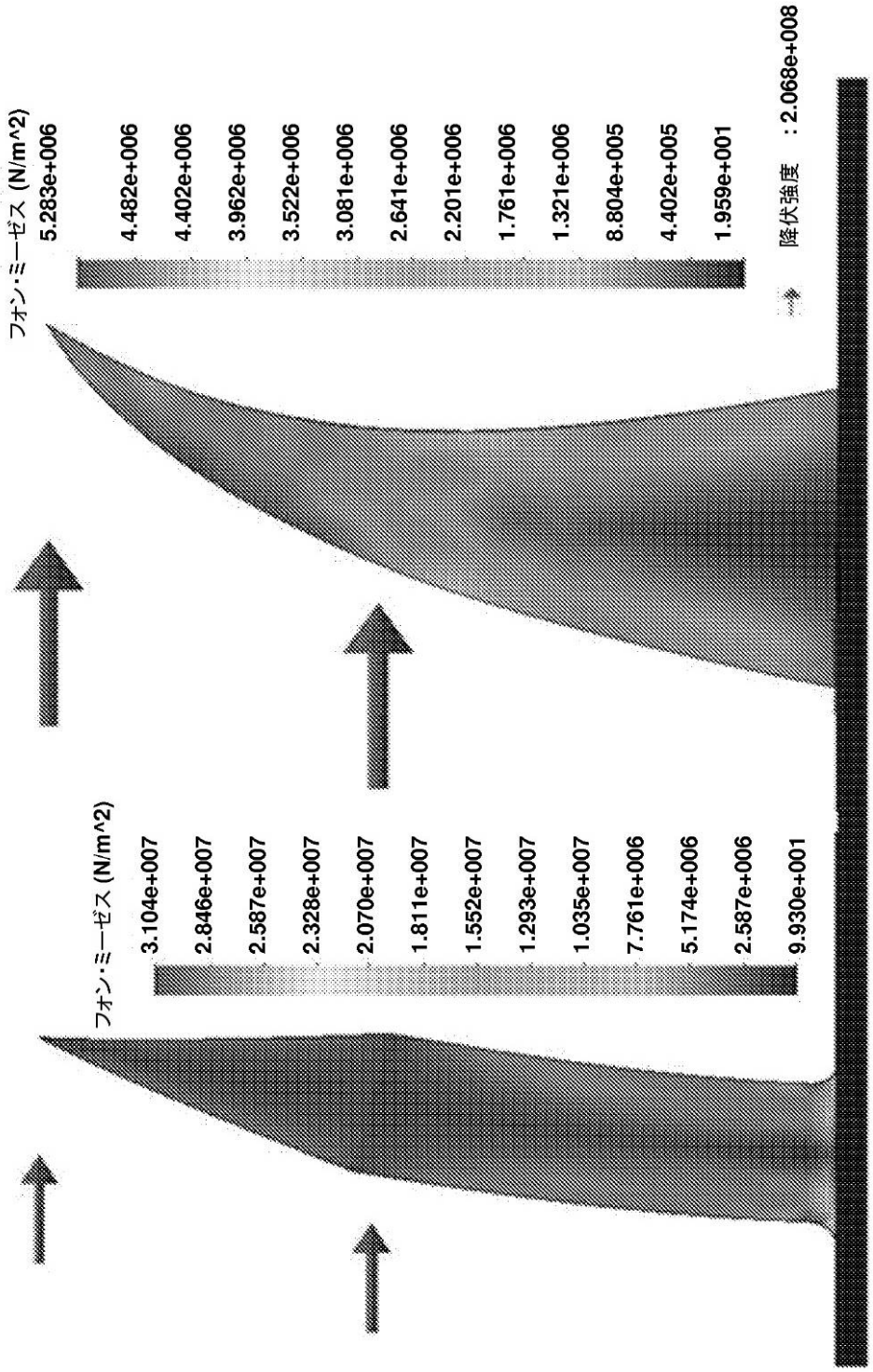
【図２２】

FIG. 22



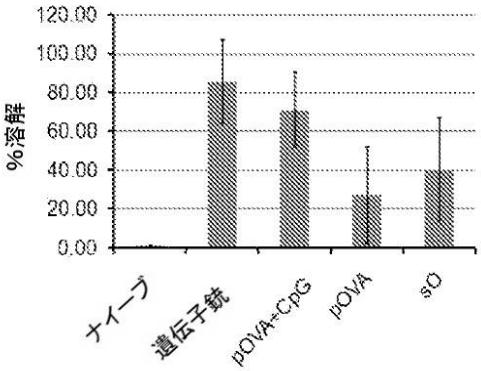
【図２３】

FIG. 23


フォン・ミーゼス (N/m^2)
5.283e+006
4.482e+006
4.402e+006
3.962e+006
3.522e+006
3.081e+006
2.641e+006
2.201e+006
1.761e+006
1.321e+006
8.804e+005
4.402e+005
1.959e+001
降伏強度 : 2.068e+008
フォン・ミーゼス (N/m^2)
3.104e+007
2.846e+007
2.587e+007
2.328e+007
2.070e+007
1.811e+007
1.552e+007
1.293e+007
1.035e+007
7.761e+006
5.174e+006
2.587e+006
9.930e+001

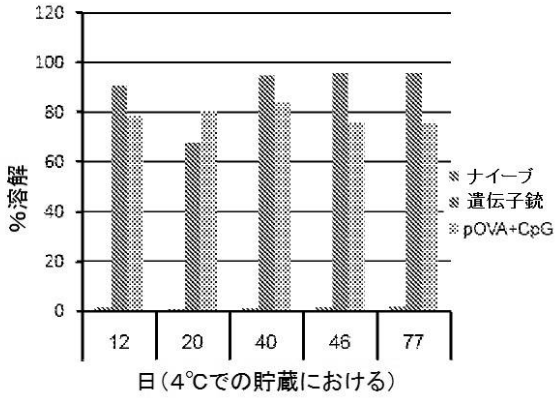
【図２７】

FIG. 27



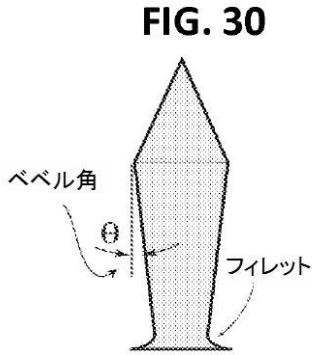
【図２８】

FIG. 28



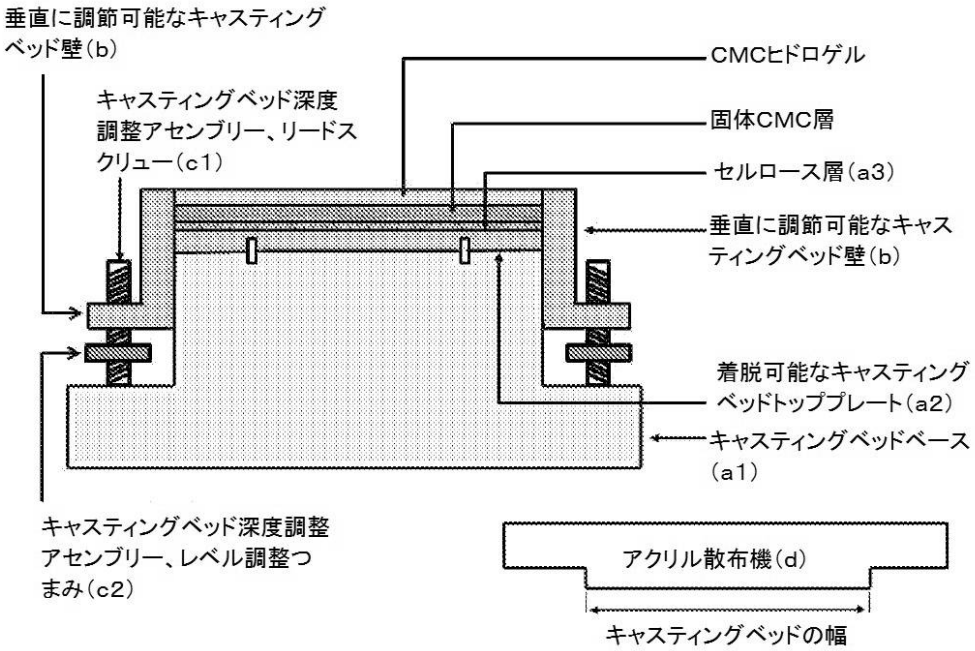
【図３０】

FIG. 30



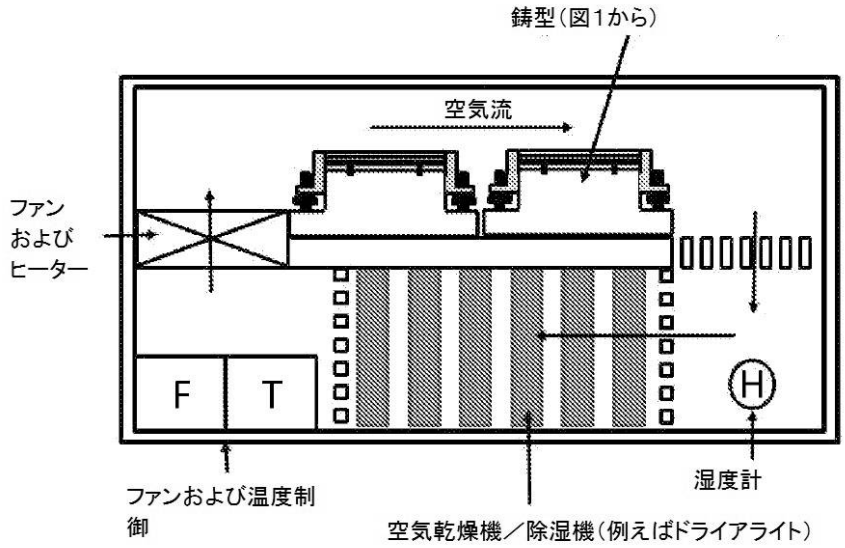
【図３３】

FIG. 33



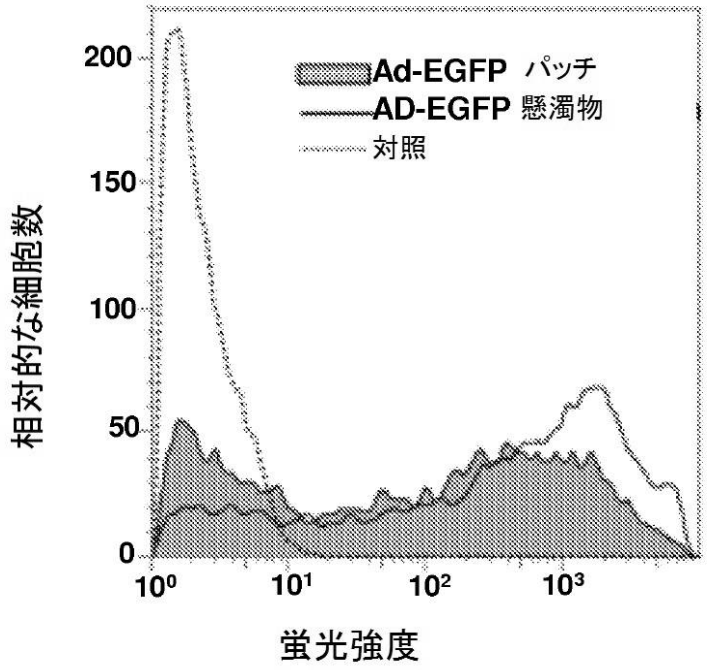
【図３４】

FIG. 34



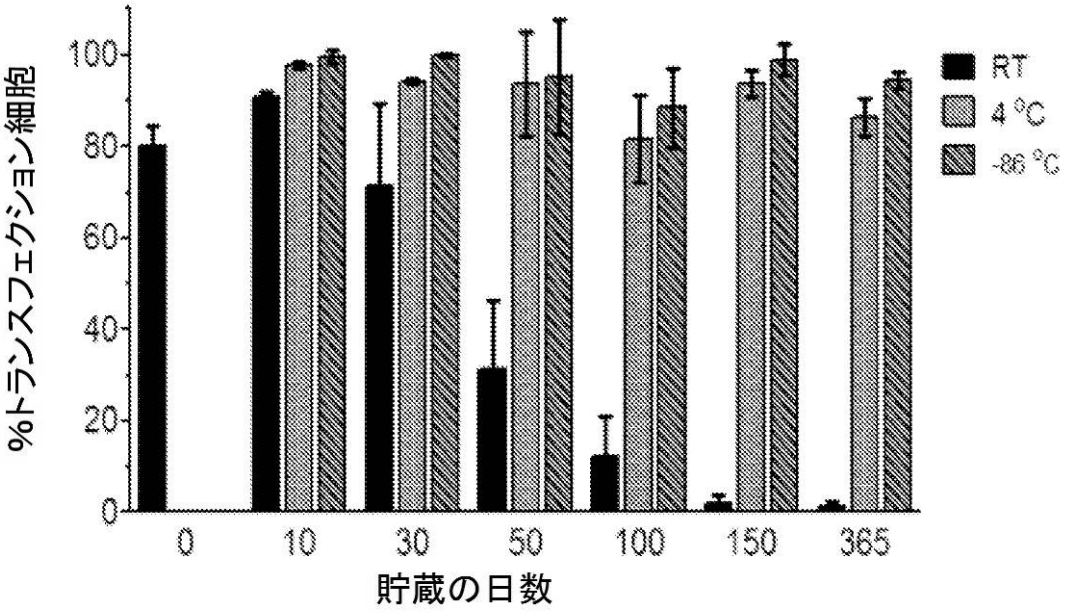
【図３５】

FIG. 35



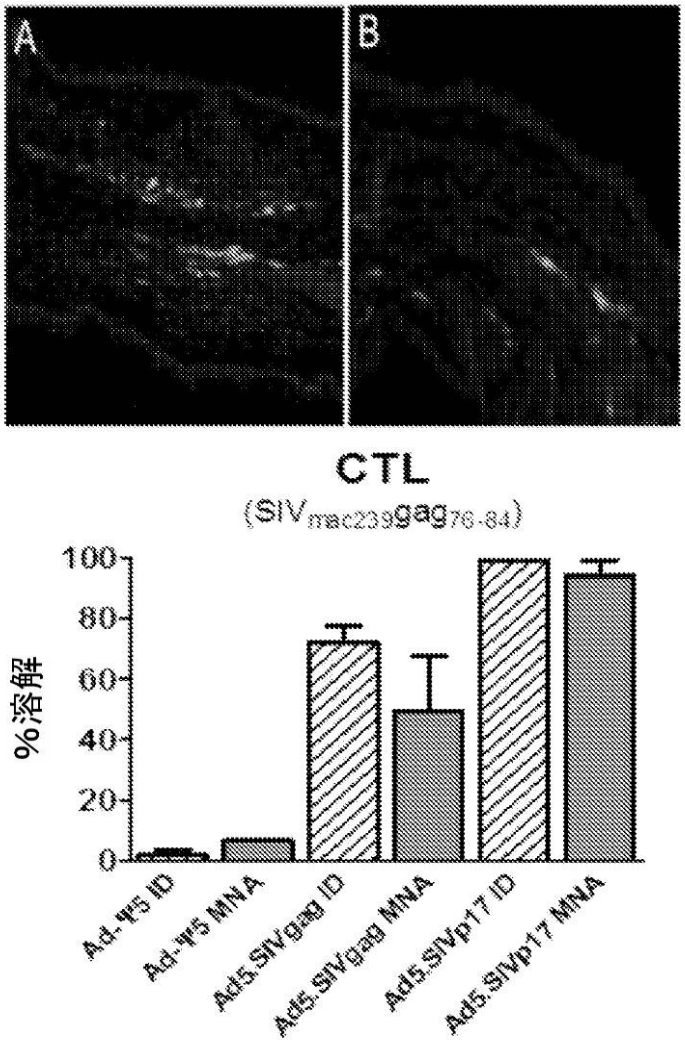
【図３６】

FIG. 36



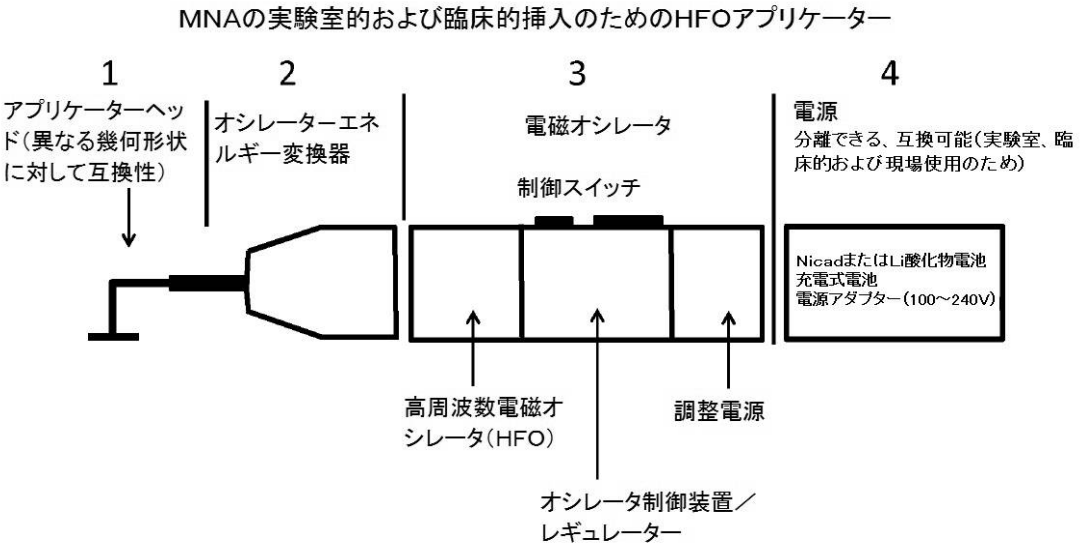
【図３７】

FIG. 37


A
B
CTL
(SIVmac239gag76-84)
%溶解
100
80
60
40
20
0
Ad-Y5 ID
Ad-Y5 MNA
Ad5.SIVgag ID
Ad5.SIVgag MNA
Ad5.SIVp17 ID
Ad5.SIVp17 MNA

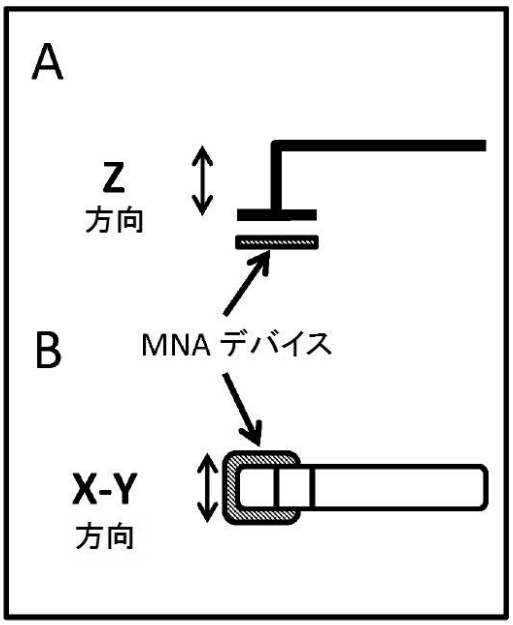
【図３８】

FIG. 38



【図４０】

FIG. 40



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/039084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61M 37/00(2006.01)i, A61M 5/158(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61M 37/00; A61M 5/32; A61B 17/20; A61M 31/00; B05D 5/00; A61M 5/00; A61K 48/00; B29C 37/00; A61M 5/158

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: dissolvable microneedle array, bioactive component, base portion, microneedle, applicator, power source, oscillator, converter

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011-0098651 A1 (FALO, JR. L. D. et al.) 28 April 2011 See abstract, claims 1-5, 8, 12-14, 16-20 and paragraphs [0010], [0011], [0016], [0019], [0020], [0052], [0065], [0101]-[0103].	1-13,18-31
A		14-17,32-37
X	US 2005-0065463 A1 (TOBINAGA, Y. et al.) 24 March 2005 See abstract, claims 1, 2, 4, 7-10, 15, 16 and paragraphs [0001], [0005]-[0009], [0031]-[0038].	32-37
A		1-31
A	US 2004-0058882 A1 (ERIKSSON, E. et al.) 25 March 2004 See abstract, claim 1 and paragraphs [0009]-[0011], [0040]-[0042], [0114], [0115], [0119].	1-37
A	US 2008-0213461 A1 (GILL, H. S. et al.) 04 September 2008 See abstract, claims 1, 8-10, 63-65 and paragraphs [0041], [0042], [0045]-[0047], [0054]-[0057], [0066]-[0069].	1-37
A	US 2007-0161964 A1 (YUZHAKOV, V. V.) 12 July 2007 See abstract, claims 1-4, 17, 18, 20, 34, 36 and paragraphs [0008]-[0010], [0015], [0016].	1-37

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 September 2013 (16.09.2013)	**16 September 2013 (16.09.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-472-7140

Authorized officer
HAN In Ho
Telephone No. +82-42-481-3362

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2013/039084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011-0098651 A1	28/04/2011	None	
US 2005-0065463 A1	24/03/2005	DE 202004003389 U1	06/05/2004
		US 8353861 B2	15/01/2013
US 2004-0058882 A1	25/03/2004	EP 0505478 A1	30/09/1992
		EP 0505478 B1	27/11/1996
		EP 0644929 A1	21/04/1999
		EP 0644929 B1	16/08/2000
		EP 0955359 A1	10/11/1999
		EP 0955359 B1	07/01/2009
		JP 08-509356 A	08/10/1996
		US 05152757 A	06/10/1992
		US 05423778 A	13/06/1995
		US 05661132 A	26/08/1997
		US 05697901 A	16/12/1997
		US 06090790 A	18/07/2000
		US 6525030 B1	25/02/2003
		US 7422574 B2	09/09/2008
		WO 2004-075971 A1	10/09/2004
		WO 91-08793 A1	27/06/1991
		WO 93-25660 A1	23/12/1993
US 2008-0213461 A1	04/09/2008	CA 2612005 A1	28/12/2006
		EP 1893130 A2	05/03/2008
		WO 2006-138719 A2	28/12/2006
		WO 2006-138719 A3	24/05/2007
US 2007-0161964 A1	12/07/2007	EP 1973479 A2	01/10/2008
		EP 1973479 A4	29/05/2013
		US 2010-0130940 A1	27/05/2010
		US 7658728 B2	09/02/2010
		US 8414548 B2	09/04/2013
		WO 2007-081430 A2	19/07/2007
		WO 2007-081430 A3	03/01/2008

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(71)出願人 502064461
カーネギーメロン ユニバーシティ
Ｃａｒｎｅｇｉｅ Ｍｅｌｌｏｎ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ
アメリカ合衆国 １５２１３ ペンシルヴァニア州 ピッツバーグ フォーブス アヴェニュー ４６１５ スイート ３０２
(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 ファロ, ルイス ディー. ジュニア
アメリカ合衆国 ペンシルベニア １５０９０, ウエックスフォード, ティンバーグレン ドライブ ２６９８
(72)発明者 エルドス, ゲーザ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア １５０９０, ウエックスフォード, ウッドベリー ドライブ １０１７０
(72)発明者 オズドガンラー, オー. ブラック
アメリカ合衆国 ペンシルベニア １５２１３, ピッツバーグ, フォーブズ アベニュー ４６１５, スイート ３０２

Ｆターム(参考) 4C167 AA71 CC01 FF10 GG42 GG43