

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5439183号  
(P5439183)

(45) 発行日 平成26年3月12日 (2014. 3. 12)

(24) 登録日 平成25年12月20日 (2013. 12. 20)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 N 1/32 (2006.01)

A 6 1 N 1/32

請求項の数 20 (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2009-533358 (P2009-533358)	(73) 特許権者	509108951
(86) (22) 出願日	平成19年10月17日 (2007. 10. 17)		ヴィージーエックス ファーマシューティ
(65) 公表番号	特表2010-506660 (P2010-506660A)		カルズ, インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成22年3月4日 (2010. 3. 4)		アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/022139		4 2 2, ブルー ベル, セントリー パー
(87) 国際公開番号	W02008/048632		クウェイ 4 5 0
(87) 国際公開日	平成20年4月24日 (2008. 4. 24)	(74) 代理人	100092783
審査請求日	平成22年10月15日 (2010. 10. 15)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	60/852, 149	(74) 代理人	100095360
(32) 優先日	平成18年10月17日 (2006. 10. 17)		弁理士 片山 英二
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100120134
(31) 優先権主張番号	60/978, 982		弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成19年10月10日 (2007. 10. 10)	(74) 代理人	100141025
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 阿久津 勝久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物の細胞の電気穿孔のための電気穿孔装置および該電気穿孔装置を使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ユーザによって入力される予め設定された電流と同程度の定電流を生み出すエネルギーのパルス哺乳動物の所望の組織に対して供給するように構成された電気穿孔装置であって、

前記所望の組織中に前記定電流を生み出すエネルギーのパルスを供給できるとともに、フィードバック機構を有する電気穿孔要素と、

空間的配置を成す複数の皮膚電極を有する電極配列を含む皮膚電極アセンブリであって、当該皮膚電極アセンブリは、前記電気穿孔要素からの前記エネルギーのパルスを受けて、該パルスを前記皮膚電極を介して前記所望の組織へ供給し、前記皮膚電極はニードル電極である、皮膚電極アセンブリと、を備え、

前記複数の皮膚電極のうちの少なくとも1つは、前記エネルギーのパルスの供給中に中性であり、前記所望の組織のインピーダンスを測定するとともに、前記インピーダンスを前記電気穿孔要素に対して通信し、

前記フィードバック機構は、測定されたインピーダンスを受けることができるとともに、前記定電流が前記所望の組織中で前記エネルギーのパルスの継続期間にわたって一定に維持されるように、前記電気穿孔要素によって供給される前記エネルギーのパルスを調整することにより、前記定電流を維持することができる、電気穿孔装置。

【請求項 2】

前記ニードル電極が、筋肉組織を実質的に貫通することなく皮内組織または皮下組織と

10

20

接触できる、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記皮膚電極アセンブリが、  
起動スイッチと、  
前記皮膚電極アセンブリの起動を報告するための状態インジケータと、  
を更に備える、請求項 1 又は 2 に記載の装置。

【請求項 4】

前記電極配列が少なくとも 3 つの皮膚電極を備える、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 5】

前記 3 つの皮膚電極が二等辺三角形の空間的配置を有する、請求項 4 に記載の装置。

【請求項 6】

前記複数の皮膚電極が、プログラムシーケンス下において皮膚電極の制御によりエネルギーのパルスを分散パターンで供給することができ、プログラムシーケンスがユーザによって前記電気穿孔要素へ入力される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 7】

プログラムシーケンスが順次に供給される複数のパルスを備え、複数のパルスの各パルスは、インピーダンスを測定する 1 つの中性皮膚電極を伴う少なくとも 2 つの活性皮膚電極によって供給され、複数のパルスに続くパルスは、インピーダンスを測定する 1 つの中性皮膚電極を伴う少なくとも 2 つの活性皮膚電極のうちの異なる電極によって供給される、請求項 6 に記載の装置。

【請求項 8】

前記フィードバック機構がアナログ閉ループ回路によって実行される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 9】

前記中性皮膚電極が、前記所望の組織のインピーダンスを測定して該インピーダンスを前記フィードバック機構に対して通信し、前記フィードバック機構は、前記インピーダンスに応答して、前記エネルギーのパルスを調整し、予め設定された電流と同程度の値の定電流を維持する、請求項 7 に記載の装置。

【請求項 10】

ユーザから入力を受けるとともに、該入力にしたがってエネルギーのパルスを供給するために前記電気穿孔要素を制御するコントローラを更に備える、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 11】

前記コントローラがシングルチップマイクロコントローラである、請求項 10 に記載の装置。

【請求項 12】

前記電気穿孔要素と通信するとともに、前記皮膚電極アセンブリと電氣的に通信する電流波形生成器を更に備え、ユーザが、プログラムシーケンスを前記電流波形生成器へ通信する前記電気穿孔要素に対してプログラムシーケンスを入力し、前記電流波形生成器が、与えられたプログラムシーケンスにしたがって電流パルス列波形を生成する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 13】

前記電流波形生成器がパワートランジスタアナログ回路である、請求項 12 に記載の装置。

【請求項 14】

前記皮膚電極と所望の組織との間の電氣的接続の確立を検査できるインピーダンステストを更に備える、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 15】

前記電気穿孔要素と通信する波形ロガーを更に備え、該波形ロガーが、エネルギーのパ

10

20

30

40

50

ルスの供給中に電気穿孔電圧および電流波形を連続的に記録できる、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 16】

ユーザおよび前記電気穿孔要素と直接に通信する入力装置を更に備え、該入力装置が、入力コマンドを受けて該入力コマンドを前記電気穿孔要素へ通信することができ、該入力装置がテンキーまたはタッチスクリーンである、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 17】

前記電気穿孔要素と通信する状態報告要素を更に備える、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の装置。

10

【請求項 18】

前記電気穿孔要素と通信する通信ポート、前記電気穿孔要素と通信するメモリ要素、前記電気穿孔要素と通信する電源、又はこれらの組み合わせを更に備える、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 19】

前記電極配列が、使い捨て可能であるとともに、前記皮膚電極アセンブリに対して取り外し可能に接続され、該使い捨て可能である電極配列が皮膚電極ディスクである、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 20】

前記電気穿孔要素が、  
コントローラと、  
前記コントローラと電子通信する波形生成器と、  
前記コントローラと電子通信する波形ロガーと、  
前記波形生成器へ電氣的に接続されるバッテリーと、  
を備え、

20

前記コントローラは、ユーザから入力を受けて、該入力にしたがって前記所望の組織に対して前記エネルギーのパルスを供給するように前記波形生成器に指示するとともに、供給された前記エネルギーのパルスにしたがって前記波形ロガーへデータを通信し、

前記バッテリーが前記波形生成器に対して電荷を送り、前記バッテリーは、リチウムイオン電池、ニッケル水素電池、鉛酸蓄電池、または、ニッケルカドミウム電池である、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の装置。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

本出願は、2006年10月17日に出願された米国仮出願第60/852149号および2007年10月10日に出願された米国仮出願第60/978,982号に基づく優先権を主張する。

【0002】

本発明は、特に、哺乳動物の選択された組織、好ましくは皮膚の細胞中への生体分子の導入を容易にするための電気穿孔装置および電気穿孔装置の使用に関する。

40

【背景技術】

【0003】

哺乳動物の皮膚または皮膚組織は、特定の領域に分割される細胞の層によって特徴付けられる(図1参照)。最外表面領域が表皮(1.1)であり、この表皮は、5つの副層、すなわち、角質層(1.1.1)と、有棘層(1.1.2)と、透明層(1.1.3)と、顆粒層(1.1.4)と、基底層(1.1.5)とに分けることができる。真皮(1.2)は、表皮の真下に位置されており、血管が非常に良好に新生する領域である。また、この層内には毛根および汗腺も位置される。真皮の真下には皮下層が位置される。

【0004】

50

皮膚は、物理的障壁として作用することによってだけでなく、免疫機構におけるその役割によっても保護するように進化してきた。病原体に対する宿主の防御の最前線として、皮膚は、免疫モニタのために良好に備えられている。例えば、多くの他の組織と比較して、皮膚の表皮は、非常に強力な未熟樹状細胞（「DC」）である多数のランゲルハンス細胞を含んでいる。したがって、皮膚の表皮を標的とする抗原は、強い免疫反応を効率的に引き起こすことができない。しかしながら、表皮（1.1）の角質層（1.1.1）（図1参照）によってもたらされる障壁は、表皮中への抗原の効果的な侵入を妨げる傾向がある。樹状細胞は、皮膚における主要な抗原提示細胞である。皮膚中の多数のDCは、皮内（「ID」）免疫を魅力的な経路にする。

#### 【0005】

In vivo プラスミド導入技術は、特にそれが皮内（「ID」）または皮下（「SQ」）組織あるいは細胞に対するプラスミドの導入に関連するときには、従来から範囲が限られてきた。これは、裸のDNA（プラスミド）導入に起因する生体内発現レベルが低く、それらの一部だけがウイルス遺伝子導入によって達成されるからである。IDまたはSQのために適合される用量で供給され得るプラスミドの1回分投与量は、筋肉注入（「IM」）で使用され得る1回分投与量と比べると少ない。多数の研究者は、DNAベクトルのようなウイルスを動物および人間に注入することに対する安全懸念および毒性懸念について概説してきた（非特許文献1）。その結果、プラスミドDNAの直接的な導入が望ましい供給技術になってきたが、細胞中への効率的な供給およびタンパク質発現レベルが難関となってきた。骨格筋細胞は、DNAワクチンおよび他の用途のための直接的なプラスミド導入の主要な標的を与えてきた（非特許文献2）。

#### 【0006】

プラスミド生体内供給における近年の進歩は電気穿孔（「EP」）の進歩であった。EPは、イオンから薬剤、色素、トレーサ、抗体、および、オリゴヌクレオチド、RNAおよびDNAに至る多種多様の分子の供給のために使用される（非特許文献3）。このプロセスは、対象組織を、一時的で且つ可逆的な細孔を細胞膜中に生じさせる短い電界パルスに対して晒す。膜不安定化の期間中に、プラスミドなどの分子が細胞内アクセスを得る場合がある。以前の報告により、EPプロセスの向上が、導入の効果を高め且つ定電流装置を使用することによって目標レベルの抗原を生体内に生成するのに必要なプラスミドの量を低下させることが分かった（非特許文献4）。EPを使用するプラスミド供給の向上により、注入された組織を、血流中へのタンパク質の高い生成および分泌および/または抗原付与のためのバイオリアクタとして使用することができる。発現レベルは、アデノウイルス介在性遺伝子供給の発現レベルと比べて、プラスミド注入だけの場合よりも2~3オーダーの大きさだけ増大され、一部のケースでは、生理学的な範囲に達する場合がある。

#### 【0007】

電気穿孔は、遺伝子導入およびDNAワクチン接種の分野の用途に関し、基本的な研究に役立つツールとなってきた。電気穿孔は、プラスミドの注入後に腫瘍細胞を移入するため、または、抗癌剤ブレオマイシンを人間の皮膚腫瘍または皮下腫瘍に対して供給するために好適に使用されてきた。電気穿孔は、様々なホルモン、サイトカイン、酵素、または、抗原をコードする治療遺伝子を送達するためにマウス、ラット、イヌ、および、ブタに対して使用されてきた。標的とされてきた多数の組織および器官としては、肝臓、眼、精巣、心筋、平滑筋、様々な場所の腫瘍、および、骨格筋が挙げられる。

#### 【0008】

大型哺乳動物およびヒトにおける皮膚EPの課題のうちの1つは、皮膚厚の個々の変動、および、異なる解剖学的部位間の皮膚厚の変動である。例えば、人間の三角筋レベルでの皮膚厚は約2ミリメートル（「mm」）であるが、一方、肩甲上レベルは約2.6mmであり、腰ではそれが約1.7~1.9mmであり、大腿ではそれが約1.6~1.7mmである。皮膚は敏感であり、したがって、電極は、不快感を最小にするためにゲージおよび形態も適合されなければならない。治療目的で特定の度合いの不快感を時として患者が治療中に受け入れることができるが、比較的痛みがない方法だけを予防ワクチン接種の

10

20

30

40

50

ために使用できることが提案されてきた。電極配列形態および特徴、並びに、装置パルスパターンは、この課題に適合されなければならない。電極の先端を約 2 mm 越えるポイントから、電極先端から電極の 1 / 3 のポイントまで、電気穿孔中に最大の均一な電界が生成されることは知られている。

#### 【 0 0 0 9 】

特許文献 1 は、身体または植物の選択された組織の細胞中への生体分子の導入を容易にするためのモジュール電極システムおよびそれらの使用について記載している。モジュール電極システムは、複数のニードル電極と、皮下注射針と、プログラム可能定電流パルスコントローラから複数のニードル電極への導電リンクを形成する電気コネクタと、電源とを備える。オペレータは、支持構造体に装着される複数のニードル電極を把持することができるとともに、これらのニードル電極を身体または植物の選択された組織中へ確実に挿入することができる。その後、皮下注射器によって生体分子が選択された組織へと供給される。プログラム可能定電流パルスコントローラが作動され、定電流電気パルスが複数のニードル電極に対して印加される。印加された定電流電気パルスは、複数の電極間の細胞中への生体分子の導入を容易にする。特許文献 1 の全体の内容は、参照により本明細書の記載に組み込まれる。

10

#### 【 0 0 1 0 】

特許文献 2 は、身体または植物の選択された組織の細胞中への生体分子の導入を効果的に容易にするために使用可能な電気穿孔装置について記載している。電気穿孔装置は、その動作がソフトウェアまたはファームウェアによって定められる動電装置（「 E K D 」装置）を備える。 E K D 装置は、パルスパラメータの入力およびユーザ制御に基づいて、一連のプログラム可能な定電流パルスパターンを配列中の電極間に生成するとともに、電流波形データの記憶および取得を可能にする。また、電気穿孔装置は、ニードル電極の配列と、注入ニードルのための中央注入チャンネルと、取り外し可能なガイドディスクとを有する交換可能な電極ディスクも備える。特許文献 2 の全体の内容は、参照により本明細書の記載に組み込まれる。

20

#### 【 0 0 1 1 】

特許文献 1 および特許文献 2 に記載された電極配列および方法は、筋肉などの組織だけでなく他の組織や器官への深部透過に適合化されている。電極配列の構成により、（選択された生体分子を供給するための）注射針も対象器官へと完全に挿入され、また、電極によって予め輪郭付けられた領域で、注入物が対象組織に対して垂直に投与される。特許文献 1 および特許文献 2 に記載された電極は、 2 0 mm の長さおよび 2 1 ゲージであることが好ましい。

30

#### 【 0 0 1 2 】

広義に、電気穿孔は、生体膜中に微小通路（孔）を生じさせるための膜貫通電界パルスの使用である。これらの孔は一般に「電気穿孔」と呼ばれている。それらの存在により、生体分子、イオン、および、水は、膜の一方側から他方側へと通過できる。したがって、電気穿孔は、薬剤、 D N A、または、他の分子を多細胞組織中へ導入するために使用されてきており、特定の病気の治療に有効であることが判明するであろう。しかしながら、生体における E P の使用は、生成された熱に起因する細胞死および電気穿孔を再び密閉することができないことを含む幾つかの問題を有する。薬剤または生体分子の有利な効果は、過度な細胞加熱および細胞死が起こることから、 E P 方法では極めて制限される。

40

#### 【 0 0 1 3 】

電気穿孔のプロセスを更に良く理解するためには、幾つかの簡単な方程式を見ることが重要である。組織中に埋め込まれた電極の両端間に電位差（電圧）が印加されると、その電位差は、印加電圧（「 V 」）を電極間の距離（「 d 」）で割って得られる電界（「 E 」）を生成する。

$$E = V / d$$

#### 【 0 0 1 4 】

電界強度 E は、被検者の細胞中へ薬剤または生体分子を送達するための電気穿孔プロト

50

コルを編成するときには非常に重要な値である。電界強度は、電圧が与えられると電極間の距離が減少されるにつれて電界強度が増大するという点で、電極間の距離に反比例する。しかしながら、絶縁電極を用いて組織中に電界を形成できる（すなわち、電界を形成するためにイオンの流れは不要である）ことに留意されたい。理論への束縛を望むものではないが、イオンの流れが電極を開放し且つ電気穿孔中に被検者の細胞中への分子の移動を可能にすると考えられている。電位差を有する２つのポイント間での導体または媒体中の電荷の流れは、電流と呼ばれる。電極間の電流は、組織中のイオンまたは荷電粒子によって達成され、これは組織間および患者間で変動し得る。また、組織中の導電イオンの流れは、電気パルスの開始から電気パルスの終了まで、電極間で変動し得る。

【 0 0 1 5 】

10

組織の導電イオンの含有率が低い場合には、抵抗が増大され、熱が生成されて、細胞が殺される。オームの法則は、電流（「 I 」）、電圧（「 V 」）、および、抵抗（「 R 」）の関係を表わしている。

$$R = V / I$$

【 0 0 1 6 】

２つの電極間の組織の抵抗は、組織中に存在する荷電粒子に応じて変化する。したがって、組織の抵抗は、電気パルスの開始から電気パルスの終了まで変化する。

【 0 0 1 7 】

加熱は、電極間インピーダンス（すなわち、抵抗とリアクタンスとの組み合わせであり、オームで測定される）の積であり、電流、電圧、および、パルス継続時間の積に比例する。また、加熱は、電流の平方およびパルス継続時間（「 t 」、時間）として表わすこともできる。例えば、電気穿孔中、支持組織中に生成される加熱または電力（「 W 」、ワット）は、以下の方程式によって表わすことができる。

20

$$W = I^2 R t$$

【 0 0 1 8 】

広義には、金属電極または誘電電極が組織と接触した状態で配置され、また、所定の電圧の短いパルスが電極に課され、膜孔を一時的に開放するように細胞が促される。電気穿孔に関して現在説明されるプロトコルは、電極間の距離に比例する電圧の短いパルスに依存し且つ電流または組織抵抗に関係ない結果的な電界強度 E に関して規定される。したがって、異なるパルス電圧電気穿孔プロトコルを用いて様々な成功をもたらす抵抗または加熱を電気穿孔組織に関して決定することができない。確かに、効果的な電気穿孔を容易にする電気穿孔プロトコルと細胞を死なせる電気穿孔プロトコルとの間の電圧パルスの上限振幅の違いは非常に小さい。また、短い電圧パルスの上限振幅によって引き起こされる細胞の加熱と細胞の死との間で明確な相関関係が観察された。したがって、電極間の細胞の過熱は、任意の所与の電気穿孔電圧パルスプロトコルの無効果性の主な原因としての役割を果たす。更に、電極間の電流は、電極両端間の電圧ではなく、任意の所与のパルスプロトコルの有効性の主な決定因子としての役目を果たす。

30

【 0 0 1 9 】

被検者の細胞へ電気が供給されると、以下の式にしたがって、電流（「 I 」）および時間（「 t 」）である電荷（「 Q 」）に関して所定用量の電気を正確に表わすことができる。

40

$$Q = I t$$

【 0 0 2 0 】

電流が一定でない場合、Q は I の時間積分を表わす。この点で、荷電粒子は、それらがイオンまたは分子である場合、同様の方法で反応する。例えば、電荷の標準単位（クーロン）を規定するために銀イオンが電極上に堆積されると、先に規定された電荷だけが重要である。電流を生成するためには、特定の最小電圧が存在しなければならないが、堆積されるイオンの量を所定の電圧から決定することができない。それに対応して、電気穿孔器において細胞へ供給される荷電粒子の量を、電極に課される電圧から得ることができない。

50

## 【 0 0 2 1 】

電気穿孔の有効性は、パルス強度に関して閾値が存在し、この閾値を下回ると電気穿孔が起こらず、また、上限が存在し、この上限を上回ると細胞が破壊されるという事実によって制限される。実験的証拠は、上限と下限との間の差が非常に小さく、そのため、必要以上の実験をすることなく有効なパルスプロトコルを設計することが非常に難しいことを示している。これは、大抵、皮膚 - 層の厚さおよび数が異なる表皮および真皮の細胞、脂肪、筋膜、毛細血管から小血管までの寸法が異なる血管などの不均質な細胞組成を本質的に有する組織を対象とするときに、技術の使用を困難にする。個体間および各個体の皮膚表面上の場所間で変動し得る瞬間の状態を即座に解析することができ且つ出力を特定の状態に適合させることができる真のソフトウェア駆動装置だけがこれらの要件を満たす。また、電極は、皮膚形態に適合されなければならないとともに、組織損傷および出血を防止しなければならない。

10

## 【 0 0 2 2 】

電気穿孔装置へと向けられた文献は、電極装置および電気穿孔の生体内方法の両方の有用性について説明している。それに対応して、特定の電極または電気穿孔のための方法を特許請求する多くの米国特許が存在する。例えば、特許文献 3 は、化粧品用途における物質の電氣的に支援される局所供給のための方法および装置について記載している。特許文献 4 は、患者の生体血液細胞中へ生体分子を注入するための電気穿孔装置を通じた流れを教示する。特許文献 5 および特許文献 6 は、薬剤および遺伝子の電気穿孔媒介供給のための方法および装置について記載している。より具体的には、これらの特許は、電気穿孔と化学療法薬との組み合わせを用いて腫瘍を治療して生体内で腫瘍の退縮を引き起こすための電気穿孔治療（「EPT」）のための方法および装置について記載している。特許文献 7 は、組織の電気穿孔治療のためにニードル電極の配列をプログラムする方法について記載している。特許文献 8 は、結合電極テンプレートを有する電気穿孔装置について記載している。特許文献 9 は、トランス表面分子供給の装置および方法のための電極アセンブリについて記載している。特許文献 10 は、薬剤および遺伝子を組織中へ電気穿孔するための低侵襲な装置および方法について記載している。特許文献 11 は、ユーザ指定のパルスプロファイルスキームにしたがって電界を形成して印加することによってプロセス中に温度を制御するための電気穿孔装置について記載している。特許文献 12 は、電界電気穿孔装置を利用する治療剤の導入のための方法について記載している。特許文献 13 は、ユーザ指定のパルススキームにしたがって電界を形成して印加するための電気穿孔方法および装置について記載している。特許文献 14 は、生体内電気穿孔治療のためのニードル配列形態を選択的に適用する方法について記載しており、また、特許文献 15 は、電極間の距離を検出して前記電極間の距離に比例する距離信号を生成する検出素子と、前記電極間の距離に比例して高振幅電気信号のパルスを電極に対して印加するための前記距離信号に応答する手段とを用いて患者の身体の一部に対して電気穿孔を適用するための電極装置について記載している。特許文献 16 は電気穿孔装置および注入装置を開示している。これらの引用特許の全ては、参照により本明細書の記載に組み込まれる。本明細書中で与えられる新規な皮膚電極と組み合わせて使用され且つ本明細書中に記載される実験で使用される装置は、特許文献 17 および特許文献 2（参照により本明細書の記載に組み込まれる）の特許請求の範囲に記載されている。

20

30

40

## 【 0 0 2 3 】

生体内でのプラスミド発現の向上の進展および分泌タンパク質の生理的レベルの達成は、最近、電気穿孔を使用して報告された（非特許文献 5）。研究により、成長ホルモン放出ホルモン（「GHRH」）を発現するプラスミドの注射後の電気穿孔が、大型哺乳動物にスケールアップ可能であり、大型哺乳動物を治療する分泌タンパク質を安定して生成するためのアプローチを示すことが分かっている（非特許文献 6 および非特許文献 7）。依然として、特にワクチン接種目的および遺伝子治療のための効率的な皮膚電気穿孔において、並びに、侵襲性および痛みの減少を伴う電気穿孔において、電気穿孔技術の更なる向上が必要とされる。

50

## 【 0 0 2 4 】

以前の研究者は、概念的には電極間で所定の電圧を利用する定電圧システムに基づくプラスミドDNA導入のための電気穿孔装置を利用してきた。組織中に埋め込まれる電極間のインピーダンスがケース毎にあるいは組織毎に変わることができるため、所定の電圧が所定の電流を生み出さない。所定の電圧パルスは、完全な方形波機能の損失に加えて、パルスの継続期間中に筋肉組織を通じて流れる電流の不規則な増大を引き起こす。それに対して、定電流源は、実際には、筋肉組織を通じた方形波機能定電流を維持する。しかしながら、既存の市販の電気穿孔装置は、細胞が晒される電流の正確な大きさの測定を可能にするように設計されているファームウェアを有していない。従来の電気穿孔装置を用いて生成される不規則な電流は、容易に細胞を殺すことができる量の熱を組織中に生成する場合がある。例えば、25オーム（「 $\Omega$ 」）の典型的な負荷インピーダンスにおける5アンペア（「A」または「Amp」）の平均電流を伴う典型的な電子の50ミリ秒（ms）のパルスは、理論的に、組織の温度を7.5 $^{\circ}\text{C}$ 上昇させる可能性があり、これは細胞を殺すのに十分である。感電によって引き起こされる組織損傷の物理的過程はLee等によって検討されている（非特許文献8）。したがって、細胞に対して供給される電気量を効果的に制御することにより細胞の破壊を制限しつつ熟練した電気穿孔を達成する手段を設けることによって定電圧電気穿孔に関連する技術的問題を避ける必要がある。

10

## 【 0 0 2 5 】

多くの電極に存在する困難は、トランスフェクトされる材料が堆積されるポイントである配列の中心にパルスエネルギーが集中されるという事実から生じる。結果として、エネルギー供給の空間的な分布は、非常に不均一な特徴を成す。それ故、電極アセンブリにより包囲される容量の細胞の1部のみが電気穿孔される。したがって、一部の用途においては、細胞膜の管路に衝突するイオン流動を正確に制御することにより電極間空間内の細胞に対して供給される電気の量を効果的に制御する手段を設ける必要性もある。また、大型動物用途および人間のための商業的に存在する電極は、一般に、それらが一般に非常に長く不適切なゲージおよび不適切な斜め方向を成しているため、樹状細胞のIDまたはSQターゲティングを行なうことができない。したがって、皮膚電気穿孔器のための特定の用途においては、皮膚組織中への、例えば動物におけるID空間またはSQ空間へのプラスミドなどの生体分子の生体内供給を容易にする必要がある。

20

## 【 0 0 2 6 】

更に、市販の電気穿孔装置およびニードル配列は、一般に、組織の抵抗、厚さ、および、局部状態の個々の変動間および変動内の制御を行なうことができない。これらの器具を用いると、個々の組織抵抗または厚さに関係なく、電極を通じて所定の電圧が供給される。したがって、パルス前およびパルス中の個々の変動を考慮した適合された電気穿孔を可能にする電気穿孔装置および皮膚電極の必要性もある。

30

## 【 0 0 2 7 】

また、電流を供給するために皮膚・筋肉侵襲的な交換可能なニードル配列を電極として使用する電気穿孔装置は、ニードル配列交換が行なわれるときに滅菌状態のメンテナンスを必要とする。これは、医療行為および規制順守の両方の観点から必要である。同時に、治療および予防の両方の目的の集団ワクチン接種での使用および低い製造コストを可能にするために、使い捨て可能な皮膚電極が必要とされる。したがって、ニードル皮膚配列の容易な交換を可能にする皮膚電極ディスクを提供する必要もある。

40

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 2 8 】

【 特許文献 1 】 Draghia-Akliらによる米国特許第 7, 245, 963 号

【 特許文献 2 】 Smithらによって提出された米国特許出願公開公報第 2005 / 0052630 号

【 特許文献 3 】 Zhangの米国特許第 6, 302, 874 号

【 特許文献 4 】 Hofmannらの米国特許第 5, 676, 646 号

50



- 【特許文献 5】Hofmannらの米国特許第 6, 2 4 1, 7 0 1 号
- 【特許文献 6】Hofmannらの米国特許第 6, 2 3 3, 4 8 2 号
- 【特許文献 7】Hofmannらの米国特許第 6, 2 1 6, 0 3 4 号
- 【特許文献 8】Hofmannらの米国特許第 6, 2 0 8, 8 9 3 号
- 【特許文献 9】Hofmannらの米国特許第 6, 1 9 2, 2 7 0 号
- 【特許文献 1 0】Hofmannらの米国特許第 6, 1 8 1, 9 6 4 号
- 【特許文献 1 1】Nandaらの米国特許第 6, 1 5 0, 1 4 8 号
- 【特許文献 1 2】Hofmannらの米国特許第 6, 1 2 0, 4 9 3 号
- 【特許文献 1 3】Hofmannらの米国特許第 6, 0 9 6, 0 2 0 号
- 【特許文献 1 4】Hofmannらの米国特許第 6, 0 6 8, 6 5 0 号 10
- 【特許文献 1 5】Hofmannらの米国特許第 5, 7 0 2, 3 5 9 号
- 【特許文献 1 6】Mathiesenらによる米国特許出願公開公報第 2 0 0 5 / 0 0 7 0 8 4 1 号
- 【特許文献 1 7】米国特許出願公開公報第 2 0 0 4 / 0 1 6 7 4 5 8 号
- 【非特許文献】
- 【0 0 2 9】
- 【非特許文献 1】Fredericksonら、Mol. Ther. 8:8-10 (2003)
- 【非特許文献 2】Prud'hommeら、Curr. Gene Ther. 6:243-273 (2006)
- 【非特許文献 3】Gehl, Acta Physiol Scand. 177:437-447 (2003)
- 【非特許文献 4】Draghia-Akli and Smith, Page245 in Gene Therapy-Therapeutic Mechanism and Strategies, N. S. Templeton and D. D. Lasic, eds. Marcel Dekker, Inc., New York. (2003) 20
- 【非特許文献 5】Draghia-Akliら、Technology in Cancer Research & Treatment 1:365-371(2002)
- 【非特許文献 6】Draghia-Akliら、動物サイエンス 8 1 の機関紙 : 2301-2310(2003)
- 【非特許文献 7】Draghia-Akliら、FASEB J 17 : 526-528(2003)
- 【非特許文献 8】Lee et al., Annu. Rev. Biomed. Eng 2 ; 477-509. : 477-509(2000)
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0 0 3 0】 30
- 【課題を解決するための手段】
- 【0 0 3 1】
- 本発明の 1 つの態様では、定電流を哺乳動物の組織に対して供給することにより該組織で電気穿孔を行なう電気穿孔装置が提供される。前記組織は皮膚組織であることが好ましい。幾つかの実施形態において、電気穿孔装置は、ユーザによって入力される予め設定された電流と同程度の定電流を生み出すエネルギーのパルスをも哺乳類の所望の組織に対して供給するように構成される。電気穿孔装置は、電気穿孔要素と皮膚電極アセンブリとを備える。電気穿孔要素は、所望の組織中に定電流を生み出すエネルギーのパルスを供給できるとともに、フィードバック機構を含んでいる。皮膚電極アセンブリは、空間的配置を成す複数の皮膚電極を有する電極配列を含んでいる。この場合、皮膚電極アセンブリは、電気穿孔要素からのエネルギーのパルスを受けて、該パルスを皮膚電極を介して所望の組織へ供給する。複数の皮膚電極のうちの少なくとも 1 つは、エネルギーのパルスの供給中に中性であり、所望の組織のインピーダンスを測定するとともに、該インピーダンスを電気穿孔要素に対して通信する。フィードバック機構は、測定されたインピーダンスを受けることができるとともに、定電流を維持するために電気穿孔要素によって供給されるエネルギーのパルスを調整することができる。
- 【0 0 3 2】 40
- 本発明の 1 つの態様では、ユーザによって入力される予め設定された電流と同程度の定電流を哺乳動物の所望の組織で生み出すためにエネルギーのパルスを該所望の組織に対して供給するように構成された電気穿孔ハンドルアセンブリが提供される。ハンドルアセン 50

ブリは、空間的配置を成す複数の皮膚電極を有し、皮膚電極のうちの少なくとも1つがエネルギーのパルスの供給中に中性であり且つ所望の組織のインピーダンスを測定する、皮膚電極配列と、皮膚電極配列と通信し、皮膚電極を通じたエネルギーのパルスの供給を制御するコントローラと、フィードバック機能を実行するための手段であって、フィードバック機構が、測定されたインピーダンスを中性皮膚電極から受け且つ定電流を維持するために供給されるエネルギーのパルスを必要に応じて調整するソフトウェアまたはハードウェアによって実行される手段と、を備える。

#### 【0033】

本発明の1つの態様では、哺乳類の組織の細胞に対して生体分子を供給するために本発明の電気穿孔装置を使用する方法が提供される。幾つかの実施形態において、前記方法は、所望の皮膚組織に対してエネルギーのパルスを供給して、ユーザによって入力される予め設定された電流と同程度の定電流を生み出すために、本明細書中に記載される皮膚電気穿孔装置を使用することを含む。この方法は、筋肉組織を実質的に貫通することなく、複数のニードル皮膚電極を皮膚組織中へ挿入することと、複数のニードル皮膚電極に対してエネルギーのパルスを印加して、予め設定された電流に等しい電流を皮膚組織中に供給することと、複数のニードル皮膚電極のうちの中性電極を用いて皮膚組織のインピーダンスを測定するとともに、電気穿孔装置のフィードバック機構を使用して、測定されたインピーダンスに応じて、印加されるエネルギーのパルスを調整することにより、皮膚組織に対して供給される電流を一定に維持することを含む。

#### 【0034】

本発明の幾つかの実施形態では、複数のニードル皮膚電極を有し且つ電流波形生成器と電氣的に通信する皮膚電極アセンブリを設ける工程と、哺乳類の筋肉組織を実質的に貫通することなく哺乳動物の皮膚組織と複数のニードル皮膚電極とを接触させる工程と、接触された皮膚組織を実質的に一定の電流に暴露するのに有効な条件下で且つある時間にわたって、電流波形生成器からのエネルギーの電気パルスを複数のニードル皮膚電極に対して印加する工程とを備える方法が提供される。

#### 【0035】

本発明の多くの目的および利点は、添付図面を参照することによって当業者により更によく理解され得る。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0036】

【図1】皮膚の構造図を示している。最外表面領域が表皮(1.1)であり、この表皮は、5つの副層、すなわち、角質層(1.1.1)と、有棘層(1.1.2)と、透明層(1.1.3)と、顆粒層(1.1.4)と、基底層(1.1.5)とに分けることができる。真皮(1.2)は、表皮の直下に位置されており、血管が非常に良好に新生する領域である。また、この層内には毛根および汗腺も位置する。真皮の直下には皮下層が位置する。

【図2A】本明細書中に記載されるEP装置の好ましい実施形態のシステム図を示している。

【図2B】本明細書中に記載されるEP装置の一部であってもよいコントローラの一例を示している。

【図2C】25kgのブタの皮膚のID層およびSQ層中へのプラスミド製剤注入後に電気パルスを供給するためにパルス生成器としての皮膚EP装置および前記皮膚電極配列を使用したパルスシーケンスの終了時にダウンロードされる実際のパルスシーケンス記録の一例を示している。(「2.1」)は、赤外線ポートを介してパーソナルコンピュータまたは携帯型装置へダウンロードされたファイル名を示し、(「2.2」)は、EPプロセスが開始できる前の必須条件として数値パッドにより皮膚EP装置へ直接に入力される被験体数を示し、(「2.3」)は、パルスシーケンスにおけるパルス数、パルス前およびパルス間の待ち時間(秒「s」)、パルス幅(ミリ秒「ms」)、パルス電流振幅(アンペア「A」)を含むオペレータにより選択される電気パルスの特性を示し、(「2.4」

）は、皮膚電極 1、2、3 のそれぞれに関して各パルス中の各電極の電荷を示しており、各電極は、以下の位置、すなわち、プラス「pos」、マイナス「neg」、または、オフ「off」のうちのいずれかが可能であり、「off」電極は、各パルスの前、最中および後において装置へのバック情報（「フィードバック」）を送信し、（「2.5」）は、パルスシーケンスの各パルス中の注入領域での実際のアンペア数（「A」）、電圧（「V」）、および、皮膚組織抵抗 Z（「オーム」）を示している。0.1 ~ 0.2 ms 毎にフィードバックが起こるため（このケースでは、パルスの長さが 52 s であった）、例示目的のため、フィードバックファイルの僅かな割合だけが含められた。

【図 3】皮膚 E P 装置による皮膚電極供給を使用した電気パルス供給の際にダウンロードされたデータのグラフィック表示の一例を示している。グラフは、パルス 1（「3.1」）における皮膚 E P 装置により測定される電圧（「3.1.1」）並びに電流（「3.1.2」）、および、パルス 2（「3.2」）における皮膚 E P 装置により測定される電圧（「3.2.1」）および電流（「3.2.2」）の両方を示している。パルス 1（「3.3」）およびパルス 2（「3.4」）に関して組織抵抗（電気パルス中に測定される）も表示されている。

10

【図 4】皮膚 E P 装置において、大きい皮膚電極配列を用いた皮膚に対する電気パルスの供給を行った際にダウンロードされたデータのグラフィック表示の一例を示している。グラフは、パルス 1（「4.1」）における皮膚 E P 装置により測定される電圧（「4.1.1」）および電流（「4.1.2」）の両方、パルス 2（「4.2」）における皮膚 E P 装置により測定される電圧（「4.2.1」）および電流（「4.2.2」）、および、パルス 3（「4.3」）における皮膚 E P 装置により測定される電圧（「4.3.1」）および電流（「4.3.2」）を示している。パルス 1（「4.4」）、パルス 2（「4.5」）、および、パルス 3（「4.6」）に関して組織抵抗（電気パルス中に測定される）も表示されている。

20

【図 5】詳細な特性を含む皮膚電極配列の概略表示を示している。すなわち、（「5.1」）単一のニードル電極の挿入端の長さおよび角度を示す側面図；（「5.2」）逆トラカールポイントにおける角度および度数を示す正面図；（「5.3」）ニードル電極仕様を示す注記。

【図 6】皮膚電極ハンドルの視覚表示（「6.1」）および概略図（「6.2」）を示している。（「6.1.1」）インピーダンスチェックを起動させ、その後、電気穿孔シーケンスを起動させるために使用されるトリガ；（「6.1.2」）「LED」は、皮膚 E P 装置が処置できる状態又はエラー時にそれぞれ緑または赤を表示する；（「6.1.3」）皮膚電極配列が所定の位置にロックされる；（「6.1.4」）皮膚電気穿孔ハンドルと皮膚 E P 装置ユニットとの間の個々のワイヤおよび信号を収容するコード；（「6.1.5」）その詳細が図 8 の電気配線図に描かれる個々のワイヤ；（「6.2.1」）トリガ概略図；（「6.2.2」）LED 概略図；（「6.2.3」）電気穿孔パルスシーケンスの完了後における皮膚電極ハンドルからの抜き出しを容易にするために使用される皮膚電極配列上の隆起部を示す概略図；（「6.2.4」）皮膚電極配列のニードル電極の概略図；（「6.2.5」）ハンドル上の所定位置にロックされた皮膚電極配列の概略側面図；（「6.2.6」）（ハンドル上の）ロッキングアームおよび戻り止めの概略図；（「6.2.7」）回路接続のための接続部を受けて形成するために使用される皮膚電極ハンドル内のソケットを示す概略図；（「6.2.8」）その詳細が図 8 に示される個々のワイヤを収容するコードを示す概略図である。

30

40

【図 7】ハンドル上に装着された皮膚電極配列を示している。すなわち、（「7.1」）皮膚電極配列中の個々のニードル電極と皮膚電極ハンドルとの間の電氣的な接続部を受けて形成するための個々のソケットの概略側面図。

【図 8】配列・ハンドルアセンブリのための電気配線図を示している。

【図 9】処置対象間でのハンドルの滅菌ローディングを可能にするマルチ皮膚電極配列二つ折り型パッケージ容器の概略図を示している。（「9.1」）蓋、（「9.2」）配列を収容するように特別に設計された個々のウェルを含むベース、（「9.3」）ウェルの

50

側面図。

【図10】骨格筋（LA）に対するプラスミド供給のために一般に使用される電極および条件と比較した、皮膚電極配列および皮膚固有EP条件（MA）を使用する皮膚EP装置を用いて、異なる量のプラスミドpSP5-12-GFPが注射され且つ電気穿孔された動物内のGFPの平均発現レベルを示している。

【図11】距離 $L = k \times n$ である3電極ニードル配列を示している。この場合、 $n$ は電極の数を表わし、 $k$ は比例定数を表わしている。

【図12】個々のSEAP発現プラスミドを使用した電気穿孔時から11日にわたるSEAP発現レベル（ $pg/mL/kg$ ）のグラフを示している。

【図13】様々なサンプルにおける11日目のSEAP発現レベルのグラフを関連するELISA結果（平均抗体希釈状態）と共に示している。

【図14】個々のIGF-I発現プラスミドを使用した電気穿孔時ときから11日にわたるIGF-I発現レベル（ $mg/mL$ ）のグラフを示している。

【図15】ブタの皮膚でのID/SQプラスミド投与およびその後の電気穿孔（EP）の後における緑色蛍光タンパク質発現を表わす蛍光画像を示している。プラスミドは、IM+EP（A）のために使用される通例の大きなEP配列または皮膚EP（B）を用いて異なる投与量および体積で送達された。

【図16】pSEAP投与後の4～11日目においてブタ血清で検出される分泌型胎性アルカリホスファターゼ（SEAP）のレベルを示すグラフを表わしている。動物は、濃縮製剤（ $10mg/mL$ ）または通常の製剤（ $2mg/mL$ ）において同投与量のプラスミド（ $1mg$ ）を摂取させた（ $n = 5/グループ$ ）。データはグループ平均反応 $\pm SEM$ として示されている。

【図17】非ヒト霊長類研究計画を示している。図17Aは、0週目および4週目において低投与量（抗原毎に $0.2mg$ ）のHIV-1イムノゲンおよびプラスミドにコードされたアカゲザルIL-12を用いてアカゲザルを2回免疫し、その後、8週目および12週目において更に高い投与量（抗原毎に $1.0mg$ ）で2回免疫したことを示している。免疫アッセイのため、血液サンプルをほぼ2週間毎に採取した。各免疫の2週間後に、ELISpotを行い、また、ELISAを0、4、8、12、18週目に行なった。図17Bは、皮膚電極配列およびハンドルの図を示している。皮膚EPは、長さが3～5mmでステンレススチール製の26ゲージ電極を3つ有する使い捨て配列から成る。配列は、装置のハンドルアプリケーションに対して取り付けられる。EP処置は、ハンドルアプリケーション上のトリガボタンを押すことによって始めることができる。

【図18】プラスミドにコードされたIL-12のID/SQ共注射およびその後のEPを伴う、HIV-1イムノゲンに対する高い細胞性免疫反応を示すグラフを表わしている。IFN ELISpotは、各免疫の2週間後に行なった。envに対する反応が白色のバーとして描かれており、また、gagが黒色のバーとして描かれている。この場合、データは、積層グループ平均反応 $\pm SEM$ として示されている。

【図19】ID/SQ EPを用いたHIV-1イムノゲンに対する高いメモリ応答を示すグラフを表わしている。最後の免疫の10週間後に、ID/SQグループおよびID/SQ+EPグループにおけるgagおよびenvに対する抗原特異的メモリ応答を測定するためにELISpotアッセイを行った。データは、グループ平均反応 $\pm SEM$ として示されている。

【図20】HIV-1 gag、env、および、プラスミドrhIL-12のID/SQ免疫後の $T_H2$ ではなく、 $T_H1$ 媒介性の細胞反応の誘導を示すグラフを表わしている。Gagまたはenv特異的な $T_H2$ 反応の誘導を評価するためにIL-4 ELISpotを10週目に行なった。envに対する反応が白色のバーとして描かれており、また、gagが黒色のバーとして描かれ、データは、積層グループ平均反応 $\pm SEM$ として示されている。

【図21】p24抗体（図21A）およびgp160抗体（図21B）の誘導を示すグラフを表わしている。血清は、0、4、8、12、18週目に採取した。ID/SQ免疫グ

10

20

30

40

50

ループおよび I D / S Q + E P 免疫グループにおいて、g a g 抗体力価および e n v 抗体力価を、p 2 4 および g p 1 6 0 E L I S A によってそれぞれ測定した。データは、グループ平均反応  $\pm$  S E M として示されている。

【図 2 2】マウスの異なる筋肉で測定した S E A P 発現を示す棒グラフを示している。マウスには、前脛骨筋 ( T A ) または腓腹筋 ( G ) 中に、1 0  $\mu$  g の C 5 - 1 2 - S E A P プラスミドを注射し、4 s または 8 0 s の遅延後に E P を行った。また、マウスには、E P を伴うことなく ( E P 無し ) 1 0  $\mu$  g の p f C 5 - 1 2 - S E A P プラスミドも注射した。血清 S E A P レベルは、E P を伴うことなくプラスミドを受けたコントロールマウスと比べて、T A 筋および G 筋注射したマウスの方が高かった ( \* P < 1 . 3 E - 2 1 ) 。プラスミドバックボーンを有しない発現カセット ( N B ) を注射した後に電気穿孔したマウスは、E P を伴わない N B グループよりも高い S E A P レベルを有していた。しかしながら、N B グループでは、同じ筋肉に C 5 - 1 2 - S E A P を投与したマウスよりも有意に低かった ( T A 4 s と比べた N B 4 s \* \* P < 0 . 0 0 8 ; T A 8 0 s と比べた N B 8 0 s \* \* \* P < 0 . 0 0 4 ) 。T A 筋中に注射したマウスは、G 筋中に注射した動物よりも高い発現を生じ、また、T A 筋における注射と E P との間の遅延を 8 0 s から 4 s へと短くしても発現に影響は無かった。

【図 2 3】それぞれ 2 5  $\mu$  L または 5  $\mu$  L の総量にて 2 m g / m L または 1 0 m g / m L の濃度で 5 0  $\mu$  g の C M V - E G F P プラスミドを筋内 ( I M ) または皮内 ( I D ) に注射した後にマウス内で定量化した平均 G F P 発現量を示す棒グラフを表わしている。G F P 発現は、2 m g / m L 濃度で投与した動物と比べて、1 0 m g / m L 濃度で投与したグループの方が最も高かった ( I D および I M 、 \* P = 0 . 0 1 ) が、I D 注射および I M 注射部位は、互いに比べると、同程度の全体的スコアをもたらした。

【図 2 4】様々な電流設定下においてマウスの異なる筋肉で測定した、遍在性 C M V プロモータによって駆動された S E A P 発現を示す棒グラフを表わしている。プラスミド製剤、すなわち、生理食塩水、生理食塩水 + L G S 、水、または、水 + L G S を検査した。T A 筋中の 0 . 1 A での生理食塩水 + L G S 製剤が最も高い発現をもたらした。水中に配合されたプラスミドを摂取させ、0 . 2 A での電気穿孔を行った動物は、同じ筋肉において 0 . 1 A で行った動物よりも有意に低い S E A P レベルをもたらした。 ( T A に関しては \* P < 0 . 0 5 、および、G に関しては \* \* P < 0 . 0 0 1 ) 。水 + L G S がプラスミド製剤として使用された場合、血清 S E A P レベルの差異は、T A 筋においては有意性を示さないが、G 筋においては有意性を示した ( \* \* \* P < 0 . 0 4 ) 。

【図 2 5】処置後 1 4 日目に測定した抗 S E A P 抗体における力価を示しており、この力価は、プラスミドが ( A ) 生理食塩水 + L G S 中で配合されたときには G 筋中で且つプラスミドが ( B ) 水 + L G S 中で配合されたときには T A 筋中で 0 . 1 A の電流を用いて処置したマウスにおいて最も高かった。

【図 2 6】リレー接点マトリックスの 1 つの実施形態の概略図を示している。

【図 2 7 A】電気穿孔機能フローのフローチャートの第 1 の部分を示している。

【図 2 7 B】電気穿孔機能フローのフローチャートの第 2 の部分を示している。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 7 】

以下の簡略化されたあるいは短縮された定義は、本発明の好ましい実施形態の理解を助けるために与えられている。本明細書中で与えられる簡略化された定義は、決して網羅的ではなく、また、当分野で理解される定義あるいは辞書の意味に矛盾するものでもない。簡略化された定義は、本明細書中では、当分野において知られる定義を補いあるいはより明確に定めるために与えられる。

【 0 0 3 8 】

用語「定電流」は、本明細書中では、組織または前記組織を画定する細胞により、この組織に供給される電気パルスの継続期間にわたって受けられるあるいは経験される、電流を規定するために使用される。電気パルスは、本明細書に記載される電気穿孔装置から供給される。この電流は、前記組織においては、電気パルスの継続期間にわたって一定のア

10

20

30

40

50

ンペア数で維持される。これは、本明細書に提示される電気穿孔装置は好ましくは瞬時的フィードバックであるフィードバック要素を有しているからである。フィードバック要素は、パルスの継続期間の全体にわたって組織（または細胞）の抵抗を測定することができ、このフィードバック要素によって、電気穿孔装置は、その電気エネルギー出力を変える（例えば、電圧を増大させる）ことができ、そのため、同組織中の電流は、電気パルスの全体にわたって且つ各パルス間で一定に維持される。幾つかの実施形態において、フィードバック要素はコントローラを備えている。

【 0 0 3 9 】

用語「フィードバック」または「電流フィードバック」は、互換性をもって使用され、電極間における組織の電流を測定し且つそれに応じて電流を一定レベルに維持するために E P 装置により供給されるエネルギー出力を変えることを含む、提示される皮膚 E P 装置の能動的な応答を意味している。この一定レベルは、パルスシーケンスまたは電気処置の開始前にユーザによって予め設定される。好ましくは、フィードバックは、皮膚 E P 装置の電気穿孔要素、例えばコントローラによって実行される。この場合、装置の電気回路は、電極間にある組織の電流を連続的にモニタして、そのモニタされた電流（または、組織中の電流）を予め設定された電流と比較するとともに、エネルギー出力調整を連続的に行なって、モニタされた電流を予め設定されたレベルに維持することができる。幾つかの実施形態において、フィードバックループは、それがアナログ閉ループフィードバックであるため瞬間的である。

【 0 0 4 0 】

本明細書中で使用される用語「生体分子」とは、核酸配列、タンパク質、脂質、マイクロバブル（例えば、薬物担持小胞）、および、製薬のことである。

【 0 0 4 1 】

本明細書中で互換性をもって使用される用語「電気穿孔」、「電気透過化」または「動電エンハンスメント（electro-kinetic enhancement）」（「E P」）とは、生体膜に微小経路（孔）を生じさせるための膜貫通電界パルスの使用のことであり、それらの微小経路の存在により、プラスミド、オリゴヌクレオチド、s i R N A、薬剤、イオン、および、水などの生体分子は、細胞膜の一方側から他方側へと通過できる。

【 0 0 4 2 】

用語「分散電流」は、本明細書中では、本明細書中に記載される電気穿孔装置の様々なニードル電極配列から供給される電流のパターンを規定するために使用される。この場合、該パターンは、電気穿孔されている組織の任意の領域に作用する電気穿孔関連の熱応力の発生を最小限に抑える、好ましくは排除する。

【 0 0 4 3 】

本明細書中で使用される用語「皮膚領域」（または、「皮膚組織」）とは、皮膚組織、真皮、真皮下層、および、皮内（「I D」）、皮内（i n t r a c u t a n e o u s）、皮下（「S Q」）の層または空間のことである。皮膚領域は筋肉組織を含まない。

【 0 0 4 4 】

本明細書中で使用される用語「実質的に貫通することなく」とは、対象の物体（例えば、ニードル）による貫通が約 1 m m ~ 2 m m 以下であり、好ましくは約 5 m m 以下であることを意味する。

【 0 0 4 5 】

本明細書中で使用される用語「フィードバック機構」とは、ソフトウェアまたはハードウェア（または、ファームウェア）のいずれかによって実行されるプロセスを意味し、このプロセスは、所望の組織のインピーダンスを受けて、設定値、好ましくは電流と比較し（エネルギーのパルスの供給前、供給中、および／または、供給後）、供給されるエネルギーのパルスを調整して設定値を達成する。用語「インピーダンス」は、本明細書中では、フィードバック機構について論じる際に使用され、オームの法則にしたがって電流値へと変換することができ、したがって、予め設定された電流との比較が可能である。好ましい実施形態では、「フィードバック機構」がアナログ閉ループ回路によって実行される。

## 【 0 0 4 6 】

この発明の 1 つの態様は、本発明の電気穿孔装置、および、エネルギーのパルスを哺乳動物の所望の組織に対して供給して該組織において定電流を維持できる電気穿孔装置の能力に関するものである。この場合、組織は、皮内組織または皮下組織であることが好ましい。電気穿孔装置は皮膚電気穿孔装置（「皮膚 E P 装置」）であることが好ましい。皮膚 E P 装置は、E P 中に筋肉組織を実質的に貫通することなく皮膚組織を貫通できることが好ましい。装置は、皮膚組織、例えば皮内組織および皮下組織を貫通できる皮膚ニードル電極を介してエネルギーのパルスを供給するとともに、エネルギーのパルスを供給して、エネルギーのパルスの継続期間および電気穿孔プロセス全体にわたって組織中で一定の電流を維持する。処置組織中で一定の電流を維持する本明細書に記載の皮膚 E P 装置の応答性は、組織の加熱を防止して組織損傷及び痛みを減少させるとともに提示される皮膚電気穿孔技術の成功の全体に寄与する皮膚 E P 装置のフィードバック機構によって達成される。フィードバック機構は、本明細書中に記載される特定のソフトウェアまたはハードウェア（または、ファームウェア）の機能であり、ハードウェアの機能であることが好ましい。フィードバック機構がソフトウェアの一部である実施形態において、そのようなソフトウェアは、皮膚 E P 装置の動作を制御し且つ中性皮膚電極からインピーダンスを受けてこのインピーダンスを予め設定された電流と比較するとともに所望の組織へ供給されるエネルギーのパルスを調整することにより組織において一定の電流を維持する処理を行なうコントローラとデジタル通信する。

10

## 【 0 0 4 7 】

20

本発明の 1 つの実施形態では、ユーザにより入力される予め設定された電流と同様の定電流を生み出すエネルギーのパルスを哺乳動物の所望の組織に対して供給するように構成される電気穿孔装置が提供される。電気穿孔装置は、電気穿孔要素と皮膚電極アセンブリとを備える。電気穿孔要素は、コントローラ、電流波形生成器、インピーダンステスト、波形ロガー、入力要素、状態報告要素、通信ポート、メモリ要素、電源、パワースイッチを含む皮膚 E P 装置の様々な要素のうちの 1 つ以上を含んで組み入れることができる。幾つかの実施形態において、電気穿孔要素は、皮膚 E P 装置の 1 つの要素として機能することができ、また、他の要素は、電気穿孔要素と通信する別個の要素（または、部品）である。幾つかの実施形態において、電気穿孔要素は、皮膚 E P 装置の複数の要素として機能することができる電気穿孔要素とは別個の皮膚 E P 装置の更なる他の要素と通信できる。本発明は、1 つの電気機械装置または機械装置の一部として存在する皮膚 E P 装置の要素によって限定されない。これは、該要素が、1 つの装置としてあるいは互いに通信する別個の要素として機能できるからである。電気穿孔要素は、所望の組織において一定の電流を生み出すエネルギーのパルスを供給することができ、また、フィードバック機構を含む。皮膚電極アセンブリは、空間的な配置を成す複数の皮膚電極を有する電極配列を含む。この場合、皮膚電極アセンブリは、電気穿孔要素からエネルギーのパルスを受けるとともに、このパルスを皮膚電極を介して所望の組織へ供給する。複数の皮膚電極のうちの少なくとも 1 つは、エネルギーのパルスの供給中に中性であり、所望の組織のインピーダンスを測定するとともに、該インピーダンスを電気穿孔要素に対して通信する。フィードバック機構は、測定されたインピーダンスを受信できるとともに、定電流を維持するために電気穿孔要素によって供給されるエネルギーのパルスを調整することができる。ある実施形態では、所望の組織は皮膚組織であり、好ましくは、皮下組織又は皮内組織である。

30

40

## 【 0 0 4 8 】

図 2 A は、本明細書中に提示される E P 装置の 1 つの好ましい実施形態のシステム図を示している。E P 装置の主要な機能要素は、図示されているが、全ての実施形態において必ずしも全ての機能要素が必要とは限らないため単なる例示的なものである。各要素は、各要素のハードウェア機能に関して記載される。ハードウェアによって可能にされる事象のシーケンスは、本明細書中に記載されるように、ソフトウェアによって制御され得る。この例では、装置の中心要素がコントローラである。コントローラの 1 つの例を図 2 B に示される概略図において見ることができる。このコントローラは、幾つかの実施形態では

50

Texas Instruments msp430F149またはMotorola 68HC908AZ60Aであるマイクロコントローラである。他の代替コントローラは、電気工学の当業者に知られており、先の例示と直ちに置き換えることができる。

#### 【0049】

幾つかの実施形態において、皮膚電極は、ニードル電極、導電ロッド、または、導電膜領域であり、好ましくはニードル電極である。ニードル電極は、筋肉組織を実質的に貫通することなく皮内組織または皮下組織と接触できることが好ましい。幾つかの実施形態において、皮膚電極は、プラスチック材料から成ることができるベース上に装着することができ、これにより、本明細書中に記載される皮膚EP装置と関連して使用され得る皮膚電極の配列（または、皮膚配列あるいは皮膚ニードル配列）を有する置き換え可能なあるいは互換性を有する皮膚電極ディスクが形成される。幾つかの実施形態において、皮膚電極は、長さが約1mm~20mm；1mm~12mm；2mm~10mm；2mm~7mm；または約5mmであってもよい。幾つかの実施形態において、皮膚電極は、22~28ゲージ；23~27ゲージ；24~27ゲージ；または、約26ゲージであってもよい。好ましくは、皮膚電極は、長さが約5mmで26ゲージである。幾つかの実施形態において、皮膚電極は、患者の皮膚と実際に接触する皮膚EP装置の唯一の部分である（二次汚染を防止するため）。ワクチン製剤を選択された領域へ供給することができ、該領域を皮膚配列によって取り囲むことができ、また、皮膚電極を皮膚内へ挿入することができる。皮膚配列は、皮膚内へ挿入される皮膚電極の周囲に均一な圧力を生み出すことが好ましく、これにより、EPプロセス中に対象領域で均一な電界を生成するのに役立つ。

#### 【0050】

幾つかの実施形態において、皮膚電極アセンブリは、起動スイッチと、皮膚電極アセンブリの起動を報告するための状態インジケータとを更に備える。幾つかの実施形態では、電極配列が少なくとも3つの皮膚電極を備え、また、好ましくは、3つの皮膚電極が三角形の空間的配置を有する。三角形は二等辺三角形であることが好ましい。幾つかの実施形態において、電極配列は、5mmの長さの辺と3mmの長さの底辺とを有する二等辺三角形として空間的に配置される3つの皮膚電極を備える。幾つかの実施形態において、電極配列は、使い捨てでき、皮膚電極アセンブリに対して取り外し可能に接続される。好ましくは、使い捨て可能な電極配列は皮膚電極ディスクであり、より好ましくは、皮膚電極ディスクが滅菌可能なものである。

#### 【0051】

幾つかの実施形態において、複数の皮膚電極は、エネルギーのパルスを分散パターンで供給できる。幾つかの実施形態において、複数の皮膚電極は、プログラムシーケンス下で皮膚電極の制御を通じてエネルギーのパルスを分散パターンで供給することができ、プログラムシーケンスはユーザによって電気穿孔要素へ入力される。幾つかの実施形態では、プログラムシーケンスが順次に供給される複数のパルスを備える。この場合、複数のパルスの各パルスは、インピーダンスを測定する1つの中性皮膚電極を伴う少なくとも2つの活性皮膚電極によって供給され、また、複数のパルスに続くパルスは、インピーダンスを測定する1つの中性皮膚電極を伴う少なくとも2つの活性皮膚電極のうちの異なる電極によって供給される。

#### 【0052】

幾つかの実施形態では、フィードバック機構がハードウェアまたはソフトウェアのいずれかによって実行される。好ましくは、フィードバック機構はアナログ閉ループ回路によって実行される。好ましくは、このフィードバックは、50μs毎に、20μs毎に、10μs毎に、又は1μs毎に起こるが、リアルタイムフィードバックまたは瞬時的（すなわち、応答時間の測定に利用可能な技術による測定において実質的に瞬時的）であることが好ましい。幾つかの実施形態において、中性電極は、所望の組織のインピーダンスを測定して該インピーダンスをフィードバック機構に対して通信し、フィードバック機構は、インピーダンスにตอบสนองして、エネルギーのパルスを調整し、予め設定された電流と同様の値の定電流を維持する。幾つかの実施形態において、フィードバック機構は、エネルギー



のパルスの供給中に定電流を連続的に且つ瞬間的に維持する。

【 0 0 5 3 】

幾つかの実施形態において、皮膚電気穿孔装置は、ユーザから入力を受けるとともに、該入力にしたがってエネルギーのパルスを供給するために電気穿孔要素を制御するコントローラも含む。幾つかの実施形態において、コントローラは、ユーザからの入力を受信できるとともに、該入力にしたがってエネルギーのパルスを供給するために電気穿孔要素を制御することができる。好ましくは、コントローラはシングルチップマイクロコントローラである。

【 0 0 5 4 】

幾つかの実施形態において、皮膚EP装置の1つの要素は、これに接続されあるいはこれと関連付けられる様々な周辺装置を制御する役目を担うことができるコントローラである。コントローラは、(1)電流波形生成器を制御することによって電極アセンブリのための電気穿孔ファイヤリングシーケンスまたは定電流パルスパターンを生成し、(2)電気穿孔が行なわれるべきかどうかを決定するためにインピーダンス検査を行ない、(3)ユーザコマンドを検出して処理し、(4)ユーザに対して状態情報を提供し、(5)通信ポートを介して電気穿孔データを外部電子装置へ送信し、(6)電気穿孔データ(例えば、電圧曲線および電流曲線)をメモリに保存し且つメモリから検索する、などの操作を含む電気穿孔処理を管理する役目を担う。コントローラは、ユーザが所望のパルスパラメータおよびプログラムシーケンス(電極ファイヤリングシーケンスを含む)を入力して皮膚EP装置の動作を制御できるようにするソフトウェアまたはファームウェアアプリケーションを介して操作することができる。

【 0 0 5 5 】

幾つかの実施形態において、コントローラは、皮膚EPを受けている組織およびユーザの両方からの情報を効率的に処理し且つ組織に対して定電流を供給するために電気エネルギー出力を制御するソフトウェアを含むか、又は該ソフトウェアを使用してプログラムされる。プログラムされるものとしては、予め設定された電流、(電極ファイヤリングシーケンスの)プログラムシーケンス、パルス継続期間、(パルス列中の)パルス数、予め設定された電流前後の許容エラーを含む、電気穿孔前に予め選択される多くのパルスパラメータのうちの任意の1つを挙げることができる。入力を受けて処理するとともに電気出力を決定するために該入力をファクタリングするこのプロセスは、電気パルスの継続時間内で起こり得るとともに、好ましくは1ミリ秒(ms)内、より好ましくは100マイクロ秒( $\mu$ s)内、更に好ましくは10 $\mu$ s内、より更に好ましくは1 $\mu$ s内で起こり得る。幾つかの実施形態では、この処理がリアルタイムであるいは瞬時的に起こる。

【 0 0 5 6 】

本明細書中に記載される皮膚EP装置の動作の一例において、コントローラは、少なくとも所望の定電流を予め設定された電流に設定することによりプログラムシーケンスにしたがってエネルギーのパルスを供給することができる。1つの実施形態において、アナログ閉ループフィードバック回路は、対象組織、好ましくは皮膚の抵抗が変化するにつれて電極の両端間に印加される電圧を調整することによって所望の定電流を連続的に維持する。コントローラは、所望の出力電流をゼロに設定することによりパルス時間長が満たされたときにパルスを終了させることができる。パルスのシーケンスが終了すると、コントローラは、波形データを見直し、電気穿孔シーケンス中に所望の組織中の電流が予め設定された電流の前後のエラーの範囲から外れていた場合にユーザに警告することができる。

【 0 0 5 7 】

コントローラは、シングルチップマイクロコントローラであって、好ましくは、以下の特性、すなわち、豊富なI/O、オンボード周辺機器、低電力消費量、および、大きな記憶容量のうちの1つ以上を有するプロセッサであり得る。幾つかの実施形態において、コントローラは、テキサス・インスツルメンツプロセッサmsp430F149を備える。ソフトウェアは、電気穿孔手順の工程を制御することができ、ハードウェアと関連して工程を制御できるとともに、好ましくはファームウェアである。それがシングル

チップマイクロコントローラ内に永久的に存在してシングルチップマイクロコントローラから実行するからである。幾つかの実施形態において、ソフトウェアは、装置ユーザの入力を受信し、パルス受信組織の抵抗または該組織中の電流に関する情報をニードル電極から受けるとともに、各電気パルスの継続期間内に受信入力に基づいて電気出力を調整することを含むアルゴリズムを実行する。

#### 【0058】

幾つかの実施形態において、皮膚電気穿孔装置は、電気穿孔要素と通信するとともに、皮膚電極アセンブリと電氣的に通信する電流波形生成器も含んでおり、該電流波形生成器は、皮膚電極アセンブリを通じた供給のために電流パルス列波形を生成する。幾つかの実施形態において、ユーザは、プログラムシーケンスを電流波形生成器へ通信する電気穿孔要素にプログラムシーケンスを入力し、電流波形生成器は、与えられたプログラムシーケンスにしたがって電流パルス列波形を生成することができる。好ましくは、電流波形生成器はパワートランジスタアナログ回路である。電流波形生成器は、プログラムシーケンスにしたがって電極配列の電極を通過する電流パルス列波形を生成することができる。パルス列は正形状であることが好ましく、また、パルスの数は、ソフトウェアまたはファームウェアによって制限され、好ましくは1～10パルスであり、より好ましくは2～5パルスであり、より好ましくは2～3パルスである。1つのパルスは各電極セットに対して印加される。幾つかの実施形態において、パルスは、継続時間が20ms～52msであり、1Hzの頻度で起こる。パルス列の振幅は、オペレータによってプログラム可能であり、0.1Aの増分で0.1アンペア(AまたはAmp)～1.5Aの範囲で変動する。本発明における1つの実施形態において、パルス振幅は、0.4A未満であり、好ましくは0.1～0.2A(図2および図3参照)である。パルス列の振幅は、個体間および個体の対象となる異なる身体領域、好ましくは皮膚組織の両方の個々の組織抵抗の関数として適合させることができる。電流波形生成器は、コントローラの支配下で機能できる一般のパワートランジスタアナログ回路を備えることができる。

#### 【0059】

幾つかの実施形態において、皮膚電気穿孔装置は、皮膚電極と所望の組織との間の電氣的接続の確立を検査できるインピーダンステストも含む。インピーダンステストは、皮膚EP装置の回路が組織に対する適切な電氣的接続を確立したかどうかを決定するために使用することもできる。この検査は、挿入された皮膚電極がハンドルに対する良好な接続を確立したことを検証するとともに、皮膚電極が組織に対しても良好な接続を有することを検証する。EP処置は、インピーダンス検査によって先行され得る。インピーダンス測定値のうちのいずれかが(オーム、で測定された)抵抗のプログラム可能範囲から外れている場合には、インピーダンス検査が不合格となり、電気穿孔シーケンスが開始されない。これについては、図27Aの電気穿孔機能フロー、特に、インピーダンスが使用不可能な場合(すなわち、電極と所望の組織との間で電氣的接触がなされない場合)にファイヤリングの遅延をもたらすことができる決定ボックス27A.10を参照されたい。

#### 【0060】

インピーダンス検査は、動作中に無効にされ得るソフトウェアまたはファームウェアによって制御されるオペレータプログラマブル機能である。インピーダンステストは、コントローラの命令に従って機能する一般のオペアンプアナログ回路から成っていてもよい。

#### 【0061】

インピーダンステストは、皮膚EP装置における安全機能としての役割を担うことができる。インピーダンステストは、例えば、電極の全てが同じ組織を貫通したかどうか、また、回路を確立できるかどうかを示すことができる。空気、特に乾燥空気と接触する電極は極めて高い抵抗を有する。電気穿孔が開始して1つ以上の電極が組織を貫通しなかった場合(皮膚電極処置および皮膚EP処理を扱うときには現実に起こり得る)には、結果として得られる電極電圧が数千ボルトになる可能性があり、患者にとって致命的なあるいは損傷を与える結果となる場合があると同時に、皮膚EP装置を損傷する場合がある。このため、電極における過度な電圧を防止するために過負荷電圧保護が実施されてもよい。幾

つかの実施形態では、電気穿孔装置が電圧キャップである安全機能を含んでおり、電圧キャップは、エネルギーのパルスに対する調整が電圧キャップを越える電圧を生じるときに、装置がエネルギーのパルスを組織へ供給するのを防止する。電力負荷（例えば、空気、皮膚、または、筋肉組織）に関係なく、1 ms 以下の時間にわたって $V_{ij}$ が200 Vを越える場合には、過電圧保護が関与してもよい（または、安全キャップがトリガされてもよい）。 $V_{ij}$ は電極*i*及び*j*の間の電圧である（ $i, j = 1 \sim 5$ ）。過電圧保護が関与する（または、安全キャップがトリガされる）場合、 $V_{ij}$ は、次の電気穿孔パルスが発せられるまで、ほぼ0になる。皮膚EP装置がオフ状態にある間、任意の電極対の間の電圧が10 Vを越えないことが好ましい。

#### 【0062】

幾つかの実施形態において、皮膚電気穿孔装置は、電気穿孔要素と通信する波形ロガーも含んでいる。好ましくは、波形ロガーは、エネルギーのパルスの供給中に電気穿孔電圧および電流波形を連続的に記録できる。より好ましくは、波形ロガーは、2000 サンプル/秒の速度で電気穿孔電圧および電流波形を記録できる。波形ロガーは、電気穿孔処置のパラメータをサンプリングしてモニタすることにより、ユーザが想定し得る問題を受けて処理できるようにするとともに、電気穿孔処置が失敗しあるいは所望の結果を達成しない場合にユーザが設定を調整できるようにする。典型的なサンプリング速度は2000 サンプル/秒であり、52 ミリ秒 (ms) の2～3の電流パルスあたりは約104 サンプルである。典型的な全体のサンプリング時間は2208 msであり、その場合、サンプリングは、最初のパルスが発せられる前約50 msで始まり、2パルスパターンの最後のパルス後約50 msで停止する。電圧波形および電流波形は、±1 最下位ビット（「LSB」）線形性を伴う12ビットデジタル表示へと定量化されてもよい。電流波形分解能は好ましくは少なくとも10 ミリアンペア (mA) となるべきであり、また、電圧波形分解能は好ましくは少なくとも1.0 Vとなるべきである。波形ロガーは、コントローラと共に使用するのに適したアナログ-デジタル（「A/D」）変換器と一般的なオペアンプアナログ回路とから構成されていてもよい。DNA製剤の皮膚供給に特徴的な波形ロガーの一例が図2Cにおいて表に示されている。（「2.5」を参照されたい）。

#### 【0063】

幾つかの実施形態において、皮膚電気穿孔装置は、ユーザおよび電気穿孔要素と直接的に通信する入力装置も含んでおり、該入力装置は、入力コマンドを受けて該入力コマンドを電気穿孔要素へ通信することができる。好ましくは、入力装置がテンキーまたはタッチスクリーンである。1つの例において、皮膚EP装置動作パラメータは、テンキー（Grayhill 88AB2など）を介してオペレータによって入力されてもよい。好ましい実施形態では、キーパッドに入力される数字が液晶ディスプレイ（「LCD」）に表示される。プログラムされ得る典型的なパラメータは、電気穿孔パルス電流、インピーダンス検査有効/無効、電気穿孔ファイヤリング遅延である。キーパッドに関連する機能をコントローラによって命令することもできる。前述した皮膚EP装置のうちの1つを使用する電気穿孔に有用な情報の一例としては、被検者識別番号、シーケンスのパルス数、事前待ち時間（秒、s、sec）、パルス幅（ms）、パルス電流（アンペア）、および、皮膚電極配列のニードル電極の切り換えパターンが挙げられる（被検者識別番号および電気穿孔条件は、自動的に記録されるとともに、解析のために利用できる）。前述した皮膚EP装置のうちの1つを使用する電気穿孔において有用な情報の1つの例が図2Cに提示されている（被検者識別番号および電気穿孔条件が自動的に記録されて解析のために利用できることに留意されたい）。

#### 【0064】

幾つかの実施形態において、皮膚EP装置は、システムの状態についてオペレータに表示するあるいは知らせるための状態報告要素を更にも含むことができる。幾つかの実施形態において、皮膚電気穿孔装置は、電気穿孔要素と通信する状態報告要素も含む。好ましくは、状態報告要素は、情報表示パネル、可聴通知、発光ダイオード、または、これらの組み合わせである。状態報告要素は、エネルギーのパルスの生成および定電流の供給の確認を

10

20

30

40

50

報告することができる。これらの状態報告要素は、液晶ディスプレイ（「LCD」）（例えば Lumex LCM-S02004DFS）などの情報表示パネルを含んでいてもよい。LCDは、文字表示タイプのものであることが好ましく、それぞれが20文字から成る4つの行を表示できることが好ましい。また、LCDには、トグルスイッチによってON/OFF切り換えされ得るバックライトも設けられることが好ましい。状態情報は、様々なピッチで発するブザーなどの可聴通知（CUI CEP-2202ASなど）によって提示されていてもよい。各ピッチは、ソフトウェアまたはファームウェアによって制御され、異なる意味を有することが好ましい。例えば、ブザーの音量は、3つのプログラム可能な設定を有し、ブザーから1mの距離で約60～80dBの範囲で変化するものであってもよい。音圧レベル範囲は単なる参照として提示される。音レベルは、その最大レベルに設定される場合にはそれが騒々しい環境（例えば、農場、または、軍事基地）で聞き取ることができ、かつ、その最小レベルに設定される場合に静かな環境（例えば、オフィス）であまり騒々しくなければ許容範囲にあるといえる。また、ユニットがONされているかあるいはOFFされているかどうかを示すために、SKIN EP DEVICEには発光ダイオード（「LED」）（例えば、Lumex SSI-LXR1612ID、または、任意のパネル装着型赤色LED）が設けられてもよい。

#### 【0065】

好ましくは、状態報告要素は、電気パルスシーケンスの完了後にLCDに電界生成の成功を示す視覚的確認手段を含む。1つの実施形態では、各電気穿孔プロセス（または、電気穿孔シーケンス）後に、LCDは、電気穿孔シーケンスの核パルスについて1つずつ、「1」または「0」のいずれかの3つあるいは5つの数値のリストを表示する。「0」は、パルスが正常であったことを示し、また、「1」は、パルスが異常であったことを示す。より具体的には、各パルスは、予め設定された電流の少なくとも90%を達成し他場合に正常であるとして表示されるか、又は「0」がLCDに表示される。特定のパルスが予め設定された電流の90%未満を達成する場合には、パルスが異常であり、「1」が表示される。また、異常パルスの最低電流及び平均電流が表示される。例えば、0.5アンペアの電流に設定された5つのパルスからなる電気穿孔シーケンスにおいて、パルス3およびパルス5が0.4アンペアおよび0.3アンペアしか達成できない場合には、「00101」および「低：60%平均80%」が表示される。

#### 【0066】

幾つかの実施形態において、皮膚電気穿孔装置は、電気穿孔要素と通信する通信ポートも含んでいる。幾つかの実施形態において、通信ポートは、観察目的のため、電気穿孔波形データを携帯パソコン（例えば、「Pocket PC」）、携帯端末（「PDA」）、または、パーソナルコンピュータ（「PC」）などの外部電子装置へアップロードするために使用できる。好ましくは、通信ポートは、赤外線（「IR」）ポート（トランシーバ：ACTiSYS ACT-IR220LN115、またはZilog ZHX1201；Encoder：Microchip MCP2120またはTI TIR1000など）などの光学シリアル通信ポートである。

#### 【0067】

幾つかの実施形態において、皮膚電気穿孔装置は、電気穿孔要素と通信するメモリ要素も含む。メモリ要素は、電気穿孔波形データおよび操作パラメータを記憶することができる。好ましくは、メモリ要素（Atmel AT45DB321BまたはAT45DB321C-TUなど）は不揮発性であり、このことは、皮膚EP装置がOFFの場合でもメモリ要素がそのデータを保持することを意味する。メモリを保護するため、電気穿孔パルス列のアクティブ期間中は、電気穿孔波形データだけをメモリに保存することができる。非アクティブ期間中は、波形のうちのいずれか1つが特定の閾値を越える場合にサンプリングされたデータだけをメモリに記憶することができる。例えば、これらの閾値は、2Vの電圧閾値および10mAの電流閾値であってもよい。電流パルス列の非アクティブ期間中にメモリに記憶されたデータは、波形が再構成されるとデータの時間インデックスが知られるようにタイムスタンプされてもよい。パルス列の非アクティブ期間中に生じる最

10

20

30

40

50

大40サンプル(20ms)のデータを終了する記憶容量が備えられてもよい。ソフトウェアは、20msを越える累積期間において閾値のどれか1つを越えた場合には電気穿孔シーケンスの残りの部分について中断するように定めることができるため、記憶を20msに制限してもよい。前記圧縮技術が実施される場合には、電気穿孔波形データセットは約2kBのメモリを必要とする。皮膚EP装置のメモリ要素は、少なくとも8000パルスを保存するために十分なメモリを含むことが好ましい(各パルスは個別に記憶される)。

#### 【0068】

幾つかの実施形態では、皮膚電気穿孔装置が電気穿孔要素と通信する電源も含んでいる。電源は、バッテリーであることが好ましく、より好ましくは、リチウムイオン電池、ニッケル水素電池、鉛酸蓄電池、または、ニッケルカドミウム電池などの電池である。幾つかの実施形態において、電源は、好ましくはバッテリー(2つの6V Panasonic LC-R064R5P 4.5Ah、2つの6V Genesis NP7-6 6V7.0Ahなど)であり、皮膚EP装置の回路のそれぞれに対して電力を供給する役目を担う。これらの回路は、コントローラおよびその周辺機器のための低電圧/低電力容量電源と、インピーダンステストのための低電圧・低電力容量電源と、電流波形生成器のための高電力容量電源とを含んでいる。パワースイッチ(E-Switch R5CBLKBLKEF0または任意のDPDT 10Aパネル装着型ロッカースイッチなど)は、皮膚EP装置への電力を制御するとともに、ONまたはOFFのいずれかとなり得る。OFF位置では、電極アセンブリに対する全ての電氣的な接続は、電源がOFFになった後5秒内に電氣的に中性になる。

#### 【0069】

本発明の1つの態様では、ユーザによって入力される予め設定された電流と同程度の定電流を哺乳動物の所望の組織で生み出すためにエネルギーのパルスを該所望の組織に対して供給するように構成される電気穿孔ハンドルアセンブリ(または、「ハンドルアセンブリ」)が提供される。ハンドルアセンブリは、空間的配置を成す複数の皮膚電極を有し、皮膚電極のうちの少なくとも1つがエネルギーのパルスの供給中に中性であり且つ所望の組織のインピーダンスを測定する、皮膚電極配列と、皮膚電極配列と通信し、皮膚電極を通じたエネルギーのパルスの供給を制御するコントローラと、フィードバック機能を実行するための手段であって、フィードバック機構が、測定されたインピーダンスを中性皮膚電極から受信し、且つ定電流を維持するために供給されるエネルギーのパルスを必要に応じて調整するソフトウェアまたはハードウェアによって実行される、手段とを備える。

#### 【0070】

幾つかの実施形態では、皮膚EP装置が皮膚電極ハンドルアセンブリも含む。好ましくは、ハンドルアセンブリは、3つの要素、すなわち、皮膚電極配列(好ましくは、皮膚ニードル電極配列)と、皮膚EP装置の状態を報告するための状態インジケータと、起動スイッチとを含む。配列は、1つ以上の異なる空間的配置を成す任意の数のニードル電極を含むことができ、好ましくは奇数の電極を含むことができ、また好ましくは低級の数電極を含むことができ、好ましくは7個以下の電極を含むことができる。好ましい実施形態において、ニードル皮膚電極配列は、円形であり、5mmの長い辺と3mmの短い底辺とを有する二等辺形態で配置される3つのニードル皮膚電極を備える。この配置は、パルスパターンおよび電界生成にとって重要であると考えられ、その結果、皮膚EPの質にとっても同様に重要であると考えられている。皮膚EP装置の状態は、電極ファイヤリングシーケンスの様々な工程を示すために様々な色で断続的に点滅するようにプログラムされ得る1つ以上のLEDなどの状態インジケータの使用によってハンドルアセンブリ上に表示されることが好ましい。ハンドルアセンブリ起動スイッチを使用して、電極ファイヤリングシーケンスの様々な工程を開始することが好ましい(「6.1.1」)。

#### 【0071】

幾つかの実施形態において、ハンドルアセンブリは、無線であり、電気穿孔要素(または、コントローラ)から遠隔操作できる。無線ハンドルアセンブリは、プログラムされた

シーケンスおよびパルスパラメータを含む情報を電気穿孔要素（または、コントローラ）から受信することができるとともに、エネルギーのパルスを所望の組織に対して供給して、同組織で定電流を維持することができる。無線ハンドルアセンブリは、その動作のための電荷を保持する内部バッテリーまたはキャパシタを含むことができる。好ましくは、無線ハンドルアセンブリは、フィードバック機構、好ましくはアナログ閉ループ回路を含む。無線ハンドルアセンブリは、電気穿孔要素とドッキングできるとともに、情報を交換して、本明細書中に記載の皮膚EP装置の機能のうちの1つ以上を提供することができる。

【0072】

幾つかの実施形態において、電極配列は、使い捨てであるとともに、皮膚電極アセンブリに対して取り外し可能に接続される。好ましくは、使い捨て電極配列は、皮膚電極ディスクであり、より好ましくは、皮膚電極ディスクは、滅菌可能である。

10

【0073】

本発明の1つの実施形態において、皮膚EP装置は、ハンドルアセンブリに取り外し可能に装着できる交換可能な皮膚電極ディスクを含んでいる。好ましい実施形態において、交換可能な皮膚電極ディスクは、皮膚EP装置のハンドルアセンブリに装着される。図6.1および図6.2は電極配列の側面図を示している（「6.2.3」および「6.2.5」）。図6.1および図6.2において、電極ディスクは、選択された組織、特に皮膚を貫通するための空間的な配列で支持構造体に装着された複数のニードル皮膚電極を有する。好ましい実施形態では、空間的配列が円形皮膚配列である。皮膚電極ディスクのハンドル側のニードル配列における個々の皮膚電極は、ハンドルの相補的な電気接属具内への挿入のために末端が平滑であり面取りされている。ハンドルは、ニードル皮膚電極からパルス生成器または皮膚EP装置への電気コネクタを収容することが好ましい。

20

【0074】

好ましい実施形態では、皮膚EP装置の皮膚電極アセンブリおよび交換可能な皮膚電極ディスクにおけるニードル皮膚電極が円形配列を成している。更なる好ましい実施形態では、複数のニードル皮膚電極が3つのニードル皮膚電極から成る。更に好ましい実施形態において、3つのニードル皮膚電極の中心は、5mmの2つの辺と3mmの短い底辺とによって内接される形状で円形配列内に収まる。

【0075】

好ましい実施形態において、ニードル皮膚電極は、各皮膚電極配列の滅菌状態を維持しつつ処置する被検者間での皮膚電極配列の迅速な交換を可能にする特定のパッケージシステム（図9）内に滅菌状態で保管される。

30

【0076】

幾つかの実施形態では、皮膚ニードル配列の各電極がプラス電極として、マイナス電極として、あるいは、中性電極として機能することを制御するプログラムシーケンスが皮膚EP装置の操作のために提供される。例えば、図2Cに示されるように、プログラムシーケンスでは、各電極がプラス状態、マイナス状態、または、OFF状態として機能できる。図2Cにはシーケンス全体が描かれており、図中、電極1~3が連続的にプラス電極になる。この場合、2つのマイナスに帯電された電極が皮膚配列の反対側の頂点にあり（「2.4」-2番目の縦列）、あるいは、1つの電極がOFFであり、1つの電極がプラスであり、そして1つの電極がマイナスである（「2.4」-4番目の縦列）。

40

【0077】

幾つかの実施形態において、電気穿孔要素は、コントローラと、コントローラと電子通信する波形生成器と、コントローラと電子通信する波形ロガーと、波形生成器に対して電氣的に接続されるバッテリーとを備える。コントローラは、ユーザから入力を受信し、該入力にしたがって所望の組織に対してエネルギーのパルスを供給するように波形生成器に指示するとともに、供給されたエネルギーのパルスにしたがって波形ロガーヘデータを通信することができ、この場合、バッテリーが波形生成器に対して電荷を送り、バッテリーは、リチウムイオン電池、ニッケル水素電池、鉛酸蓄電池、または、ニッケルカドミウム電池である。装置は携帯型であることが好ましい。携帯型装置は、バッテリーパックによって作動し、

50

治療目的またはワクチン接種目的での集団予防接種に適している。

【 0 0 7 8 】

本発明の幾つかの実施形態では、本明細書中に記載された皮膚電気穿孔装置を使用してエネルギーのパルスをもとに皮膚組織に対して供給することによりユーザによって入力される予め設定された電流と同程度の定電流を生み出す方法が提供される。該方法は、筋肉組織を実質的に貫通することなく、複数のニードル皮膚電極を皮膚組織中へ挿入し、複数のニードル皮膚電極に対してエネルギーのパルスを印加して、予め設定された電流に等しい電流を皮膚組織中に供給し、複数のニードル皮膚電極のうちの中性電極を用いて皮膚組織のインピーダンスを測定するとともに、電気穿孔装置のフィードバック機構を使用して、測定されたインピーダンスに応じて、印加されるエネルギーのパルスを調整することにより、皮膚組織に対して供給される電流を一定に維持することを含む。好ましい実施形態の1つの例では、皮膚EP装置を使用する方法は、図27Aおよび図27Bに提示されるフローチャートに記載されるような電気穿孔機能シーケンスによって進行することを含む。特に、図27Bの27B.10は、「電流パルスの生成」工程のブローアップ(blow-up)を示しているとともに、好ましくはアナログ閉ループ回路によって実行され且つリアルタイムで(あるいは、瞬時的に)作動するフィードバック機構を表わしている。

10

【 0 0 7 9 】

幾つかの実施形態において、前記方法は、所望の皮膚組織とニードル皮膚電極との間で電氣的な接触が成されるかどうかを決定するために、エネルギーのパルスを印加する前にインピーダンスを測定することを更に含む。幾つかの実施形態において、本発明の方法は、少なくとも1つのDNAワクチンを前記皮内組織または皮下組織と接触させるために使用される。

20

【 0 0 8 0 】

幾つかの実施形態において、本発明の方法は、所望の皮膚組織に対するエネルギーのパルスの供給から電気穿孔装置によってコンパイルされるデータを記録することを含む。

【 0 0 8 1 】

本発明の幾つかの実施形態では、複数のニードル皮膚電極を有し且つ電流波形生成器と電氣的に通信する皮膚電極アセンブリを設ける工程と、哺乳動物の筋肉組織を実質的に貫通することなく哺乳動物の皮膚組織と複数のニードル皮膚電極とを接触させる工程と、接触された皮膚組織を実質的に一定の電流に暴露するのに有効な条件下で且つある時間にわたって、電流波形生成器からのエネルギーの電気パルスを複数のニードル皮膚電極に対して印加する工程とを備える方法が提供される。

30

【 0 0 8 2 】

幾つかの実施形態において、エネルギーの電気パルスを印加する前記工程は、複数のニードル皮膚電極のうちの中性電極を用いて、接触された皮膚組織のインピーダンスを測定し、測定されたインピーダンスを、電流波形生成器と電氣的に通信するフィードバック機構へ通信することを備え、フィードバック機構は、測定されたインピーダンスに応じて、電流波形生成器から供給されるエネルギーのパルスを調整して、実質的に一定の電流を維持する。幾つかの実施形態において、フィードバック機構は、電気穿孔装置の一部であるアナログ閉ループ回路によって実行され、前記測定工程および前記通信工程は、エネルギーのパルスの継続時間の全体にわたって瞬時的に行なわれる。

40

【 0 0 8 3 】

本発明の1つの態様は、所望の皮膚組織または皮膚細胞中への生体分子、例えばDNAプラスミド等の*in vivo*電気穿孔を可能にする皮膚EP装置に関する。幾つかの実施形態において、皮膚EP装置は、皮膚電極ニードル配列によって対象の皮膚組織に対して定電流電界を与えると同時に、選択された皮膚組織、好ましくは皮下(SQ)および/または皮内(ID)組織の細胞内への生体分子の導入を容易にする。皮膚EP装置は、プログラムシーケンスにしたがって皮膚電極ニードル配列の電極を通過し且つ処置中にモニタされて記録され得る電流パルス列波形を生成する。ニードル電極は、筋肉組織を実質的に貫通することなくSQまたはID組織などの皮膚組織と接触することができる。皮膚E

50

P装置は、プログラムシーケンスにしたがって皮膚配列の皮膚電極を通過し且つ処置中にモニタされて記録され得る電流パルス列波形を生成する(図2C参照)。ニードル皮膚電極は、筋肉組織を実質的に貫通することなく皮内組織または皮下組織と接触することができる。

#### 【0084】

米国特許第7,245,963号および米国特許出願公開公報2005/0052630は、本発明にしたがって使用され得る特定の電気穿孔要素のシステム図を開示している。この場合、これらの電気穿孔要素は皮膚EP装置に適合できあるいは皮膚EP装置の一部として適合できる。該特許において、各要素は、そのような要素のハードウェア機能に関して記載されている。これら文献のそれぞれの内容全体は、公報全体を参照することにより本願に組み込まれる。ハードウェアによって可能になる一連の事象は、本明細書中に記載されるように、ソフトウェアまたはファームウェアまたはこれらの両方の組み合わせによって制御される。

#### 【0085】

幾つかの実施形態において、皮膚EP装置の電気穿孔要素は、プログラムシーケンスを簡略化でき且つ皮膚電極アセンブリの電極のファイヤリングを操作できる電極接続リレーマトリクスを備える。リレーマトリクスは各電極、好ましくはニードル電極を制御することができ、それにより、各電極は、5つの状態、すなわち、OFF、プラス低電圧、インピーダンス測定入力、プラス高電圧、および、マイナス(調整)高電圧の状態のうちの1つを成す。1つの実施形態において、リレーマトリクスは、スイッチマトリクスを形成する11個の2極双投(DPDT)リレーを含んでいる。これらのリレーのうちの10個は、SPI-並列ポート(SPI-to-parallel port)としてシリアル周辺インタフェース(SPI)ポートに接続された一組のシフトレジスタを使用して駆動される。SPIスレーブ・イン・マスター・アウト(SIMO)は、両方の74VHC595(または、認可された同等物)シフトレジスタのData-Inピンに対して接続される。74VHC595は2つのクロック入力を有する。ユニバーサルシリアル同期/非同期通信インタフェースクロック(UCLK)信号は、データをレジスタへシフトするために使用されるレジスタのシフトレジスタクロック入力(SCK)ピンに対して接続される。別個の汎用入力/出力(GPIO)ピンは、データをシフトレジスタから出力レジスタへと平行にクロックするために使用される記憶レジスタクロック(RCK)クロック入力へ行く。その結果、同じシリアルデータが両方のシフトレジスタへシフトされるが、このとき、データは、変更するために、レジスタのうちの出力レジスタへとクロックされるだけである。

#### 【0086】

実際のリレーコイルを駆動させるため、SPIポート回路の出力は、2つのULN2003A(または、認可された同等物)8チャンネルリレーコイルドライバを与える。このチップは基本的にオープンコレクタバイポーラ接合トランジスタ(BJT)の配列である。また、各チャンネル出力は、その向かい側に内部キックバックダイオードを有している。これにより、外部ダイオードが不要になる。リレーコイルのプラス側は15ボルトに結合され、一方、コイルのマイナス側はULN2003A部品を介してグランドに引き付けられている。

#### 【0087】

接点マトリクス(contact matrix)には3組のリレーがある。リレーの一例を図26において見ることができる。第1の組は実際には1 DPDTリレーである。接点の1つの組は、プラスレールを、低電圧、インピーダンス測定電圧から200V電源の出力へと切り換える。同じリレーにおける接点の他の組は、マイナスレールをインピーダンス測定回路とパルス電流調整経路との間で切り換える。したがって、このリレーの位置は、電流パルスを生じるためあるいはインピーダンス測定を行なうようにプラスレールおよびマイナスレールの両方を設定する。リレーの次の組は、極性リレーの5-リレー組である。これらのリレーは、各電極毎に1つずつあり、その電極における極性をプラスレールまたはマイナスレールへと切り換える。リレーの最後の組は、各接点をプラスでもマイナスでもな



いように分離させることができるようにする単なる接点のインラインの組である。リレー接点の寿命を向上させるため、マトリクスは、所望の方向に負荷を適切な電極に対して接続するようになっているだけである。この場合、パルスまたはインピーダンス回路は、電圧または電流を負荷へ送る。その後、電圧または電流は、任意の接点が開放される前に除去される。電流が印加されるときには実際には接点の切り換わらないため、接点の寿命を大きく延ばすことができる。

#### 【0088】

皮膚EP装置によって生成される電流パルスの1つの例が図3.1および図3.2に示されている。図3.1および図3.2は各電流パルスの波形を示している。波形パラメータは以下の通りである。

周期 ( $t_p$ ) :  $1000\text{ ms} \pm 250\text{ }\mu\text{s}$

立ち上がり時間 ( $t_r$ ) : 最大  $20\text{ }\mu\text{s}$

整定時間 ( $t_s$ ) : 最大  $20\text{ }\mu\text{s}$

パルス幅 ( $t_w$ ) :  $52\text{ ms} \pm 100\text{ }\mu\text{s}$

立ち下がり時間 ( $t_f$ ) : 最大  $20\text{ }\mu\text{s}$

公称電流 ( $I_n$ ) :  $R_i$  100、 $t_h$  期間中における、 $I_n$  ( $0.1\text{ A} \cdot 0.2\text{ A}$ ,  $0.3\text{ A} \dots 1.5\text{ A}$ )  $\pm I_n$  の10%

$R_1$  は、図3.3および図3.4に示される3つの電極組のうちのいずれか同士の間、負荷抵抗である。図3.1および図3.2では電流波形だけが示される。電圧波形の形状は、電流パルスが発している間 ( $t_h$  中) に電極によって確認されるインピーダンスによって決まる。電圧波形は  $t_h$  において定められない。これは、この期間中、インピーダンスが未知だからである。 $t_1$  中における任意の電極組の両端間の電圧は0Vである。

#### 【0089】

理論への束縛を望むものではないが、電気穿孔が同じ構造を利用し且つこれらの構造に高いイオン流動を生じさせ、そして管路を開放または拡大すると考えられている。金属電極または誘電電極は組織と接触した状態で配置され、また、電極間の距離に比例する所定の電圧がこれらの電極に対して印加される。電気穿孔のために使用されるプロトコルは、式  $E = V/d$  にしたがって生じる電界強度として定義される。ここで、(「E」) は電界であり、(「V」) は課された電圧であり、また、(「d」) は電極間の距離である。

#### 【0090】

電界強度Eは、被検体の細胞中への薬剤または生体分子の供給のための電気穿孔プロトコルを編成するとき重要な値である。したがって、電極間の距離に比例する所定の電圧のパルスを印加することによって、様々なプロトコル用に電界強度を計算することができる。しかしながら、絶縁電極を用いて組織中に電界を生成できる(すなわち、電界を形成するためにイオンの流れは不要である)ことに留意されたい。理論への束縛を望むものではないが、EPの成功のために必要なものは、電界それ自体ではなく、電流である。皮膚EP装置の電流波形生成器の起動により、定電流電気パルスを複数のニードル皮膚電極へ分配し、それにより、領域において分散されたEP現象が生じ、その領域で一致したEP重合点が現れない。分散EPの領域で細胞の透過性が高まり、また、細胞または組織を過熱または損傷させることなく、被検者の細胞中へ生体分子が送達される。

#### 【0091】

本発明の1つの態様は、IDまたはSQワクチン接種目的で動物細胞、特に皮膚の1つ以上の細胞中へと生体分子を導入するための皮膚EP装置に関する。好ましくは、皮膚EP装置は、供給される電気パルスの継続時間にわたってSQまたはID組織などの皮膚組織に定電流を供給して維持することによって、同組織中へ生体分子を導入する。幾つかの実施形態において、皮膚電極ハンドルアセンブリのハンドルは、非導電性であり、選択された組織、特に皮膚にニードル皮膚電極アセンブリを埋め込むための容易な手段をユーザに提供するように設計されている。ハンドル上にスナップ方式で装着される使い捨て可能なニードル皮膚電極ディスクを利用することにより、ユーザは、ニードル皮膚電極ディスクを素早く取り付けおよび取り外すことができ、それにより、処置される被検者間での迅

10

20

30

40

50

速な（および、滅菌状態での）交換が可能になる。皮膚EP装置の電源は、例えばバイオテロの攻撃中における集団ワクチン接種の場合のように電気コンセントまたは他の電源のアクセスおよび使用が危険または不都合な現場で用いるバッテリーパックを利用することができる。

#### 【0092】

SQ組織およびID組織などの皮膚組織の細胞中へ送達するための生体分子としては、DNAプラスミド、DNAワクチン（DNAワクチンおよびDNAプラスミドは互いに排他的ではない）、遺伝子、治療薬剤、または、他の物質が挙げられ、これらは相補的な物質であっても促進物質であってもよい。好ましくは、生体分子は、対象の皮膚組織の細胞中で発現可能なDNAプラスミドであり、また、皮膚EP送達用の生体分子は複数種類の生体分子を含むことができる。幾つかの実施形態では、生体分子がDNAプラスミドである。

10

#### 【0093】

本発明と共に使用されるDNAプラスミドは、遺伝子治療、すなわち、負傷状態または疾病状態を予防し、改善し、あるいは、治療する目的での宿主への目的の遺伝子の導入に役立つDNAプラスミドであってもよい。DNAプラスミドは、皮膚EP装置の使用により、哺乳動物の対象の遺伝子を発現することができ、これによって病気の症状を改善するため、病気の病原を減らすため、病気の根本的原因を排除するため、または、病気の発症を予防することができる。DNAプラスミド中のコーディング遺伝子は、外因性供給源から得られる異種遺伝子であってもよい。遺伝子治療は、嚢胞性線維症や筋ジストロフィーなどの遺伝子的に引き起こされる病気のために行なうことができる。また、遺伝子治療は、腫瘍の治療のために適用することができる。好ましくは、DNAプラスミドの遺伝子は、成長ホルモン放出ホルモン、または、インスリン成長因子Iをコードするものであり、合成または天然型であっても完全長または機能断片であってもよい。

20

#### 【0094】

幾つかの実施形態において、本発明と共に使用されるDNAプラスミドは、例えば、ワクチン接種の目的で、または、肝炎、インフルエンザ、デング熱、日本脳炎、および、HIVなどの感染病に対する予防注射のため、哺乳動物の細胞に対して導入することができる。幾つかの例では、DNAプラスミドは、ウイルスタンパク質の免疫原性断片であるポリペプチドを発現できる。

30

#### 【0095】

皮膚EPによって皮膚組織へ送達するための生体分子として使用され得る薬剤の例としては、プレオマイシン、ネオカルチノスタチン、スラミン、ドキソルビシン、カルボプラチン、タキソール、マイトマイシンC、および、シスプラチンを含む抗腫瘍作用または細胞毒性作用を有する化学療法薬が挙げられる。他の化学療法薬は、当業者に知られており、Merck Indexを含む参考文献において見出すことができる。また、膜貫通送達を助ける物質（「送達剤」）も送達用の生体分子として予期され、そのような物質としては、N-アルキルメラアミドおよびパラクロロ水銀ベンゾエートが挙げられる。生体分子がDNAプラスミドまたはDNAワクチンである実施形態において、このDNAプラスミドまたはDNAワクチンと共に、先に、または、後に送達するための更なる生体分子は、別の1つ以上のDNAプラスミドまたはDNAワクチンである。生体分子が免疫反応を引き出す標的タンパク質を発現するように設計されたDNAプラスミドまたはDNAワクチンである実施形態において、DNAプラスミドまたはDNAワクチンと共に、先に、または、後に送達するための更なる生体分子は、そのような標的タンパク質に対する免疫反応を更に促進する1種類以上のタンパク質の遺伝子である。そのような遺伝子の例は、-インターフェロン、-インターフェロン、血小板由来増殖因子(PDGF)、TNF、TNF、GM-CSF、上皮成長因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、MHC、CD80、CD86及びIL-15（信号シーケンスが削除され且つ随意的にIgEからの信号ペプチドを含むIL-15を含む）などの他のサイトカインおよびリンフォカインをコードする遺伝

40

50

子である。他の有用であろう遺伝子としては、MCP-1、MIP-1、MIP-1p、IL-8、RANTES、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、突然変異型IL-18、CD40、CD40L、血管増殖因子、IL-7、神経成長因子、血管内皮細胞増殖因子、Fas、TNF受容体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、Caspase、ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I $\kappa$ B、不活性化型NIK、SAPK、SAP-1、JNK、インターフェロン応答性遺伝子、NF $\kappa$ B、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANKリガンド、Ox40、Ox40リガンド、NKGD2D、MICA、MICB、NKGD2A、NKGD2B、NKGD2C、NKGD2E、NKGD2F、TAP1、TAP2、および、これらの機能断片をコードする遺伝子が挙げられる。

#### 【0096】

当業者であれば分かるように、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、皮膚EP装置の多くの変更および改良を成すことができる。皮膚EP装置は、図11において見ることができる異なるパターンで配置される3-電極配列などの任意の数の電極を含むことができる。距離Lは、ポイントBでのエネルギー強度がポイントAでのエネルギー強度の1/3となるように選択される。3パルス後(1から2へ、2から3へ、および、3から1へ)には、ポイントBは、ポイントAに等しい累積用量を受信している。配列中の電極の数が増加すると、それに比例して、均一なエネルギー分布をもたらすために必要な距離Lが長くなるので、 $L = k \times n$ となる(ここで、nは電極の数であり、kは比例定数である)。したがって、より多くの電極を選択することにより、より大きな体積の組織を取り囲むことができる。選択される皮膚電極の最適な数は、トランスフェクトすべきマテリアルの体積、および、注入と電気穿孔との間隔に依存するであろう。

#### 【実施例】

#### 【0097】

以下実施例において本発明を更に説明する。言うまでもなく、これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、単なる例示として与えられていることを理解されたい。先の議論およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の必須の特徴を確認することができるとともに、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明を様々な使用および状態に適合させるために本発明の様々な変更および改良を成すことができる。したがって、図示され且つ本明細書中に記載される発明に追加される様々な改良は、前述した説明から当業者に明らかである。そのような改良も添付の各請求項の範囲内に入るものである。

#### 【0098】

好ましくは、本明細書中で説明される皮膚EP装置と共に使用するためのDNA製剤は、高いDNA濃度、好ましくは、皮膚への供給に最適な僅かな体積中に、好ましくは僅かな注入量中、理想的には25~200マイクロリットル( $\mu$ L)中に数グラム量のDNAを含む濃度を有している。幾つかの実施形態では、DNA製剤が1mg/ml(mg DNA/製剤の体積)以上などの高いDNA濃度を有している。より好ましくは、DNA製剤は、200 $\mu$ Lの製剤中にグラム量のDNA、より好ましくは100 $\mu$ Lの製剤中にグラム量のDNAを与えるDNA濃度を有している。

#### 【0099】

本発明の皮膚EP装置と共に使用するためのDNAプラスミドは、既知の装置と技術との組み合わせを使用して調製または製造することができるが、好ましくは、2007年5月23日に出願された本発明者らの同時係属中の米国仮出願第US60/939,792

10

20

30

40

50

号に記載される最適化されたプラスミド製造技術を使用して製造される。幾つかの例において、これらの研究で使用されるDNAプラスミドは、10mg/mL以上の濃度で配合することができる。また、製造技術は、2007年7月3日に発行された共有特許である米国特許第7,238,522号に記載されるものを含む、米国特許出願第60/939792号に記載されるものに加えて、当業者に一般に知られる様々な装置およびプロトコルも含みあるいは組み込む。本明細書中に記載される皮膚EP装置および送達技術と共に使用される高濃度のプラスミドは、適度に低い量でのID/SC空間中へのプラスミドの投与を可能にするとともに、発現効果および免疫効果を高めるのに役立つ。本発明者らの出願および特許である米国特許出願第60/939,792号および米国特許第7,238,522号はそれぞれ、その全体が本願により組み込まれる。

10

#### 【0100】

実施例1．皮膚電気穿孔のための動電装置（「皮膚EP装置」）の動作

最初に、皮膚EP装置の電源がONされる。ファームウェアは、ユーザから入力を受けられるまでアイドル状態のままである。電気穿孔シーケンスを開始するため、パスワードが入力され、それにより、LCD上で導入プロンプトが得られる。この時点で、ハンドルアセンブリ起動スイッチが押される。その後、ユーザは、番号、好ましくは被検者識別番号を入力し、この番号は、以後のダウンロードのために記憶される全てのパルスのデータと共に記録される。該番号は、テンキーを使用して入力されることが好ましい。その後、生体分子製剤が、ID注入またはSQ注入として、適度に少ない注入量で、理想的には25~200皮膚リットルで投与され、また、皮膚電極配列が皮膚中に挿入され、注入領域を完全に取り囲むが、これは容易に視認される。その後、ユーザは、ブザーからの「ピーッ」の音により、起動スイッチを押して電気穿孔シーケンスを続けるように促される。起動スイッチが押された後、ファームウェアは、インピーダンステストが使用可能か否かを定める。インピーダンステストが使用可能である場合には、ソフトウェアが一連のインピーダンス測定を直ちに行なう。ファームウェアは、低いDC電圧を用いて電極間のインピーダンスを検査する。

20

#### 【0101】

電極が対象組織中へ挿入された後、インピーダンスチェック中に、プロセッサは、組織の導電率を電極レベルでチェックする。これは、電極が患者の対象組織と電気接触しているのを確認するために行なわれる。これらの測定は、正確な読み取りを達成できる十分な時間をもって数秒足らずで、多くの場合、2秒未満で行なわれる。インピーダンス検査中、ハンドルアセンブリ上の赤色LEDが点灯される。インピーダンス測定値のいずれかが不合格であると、長いエラー「ピーッ」音が鳴り、ハンドルLEDが赤色のままになるとともに、LCDがエラーを表示し、ファームウェアがアイドル状態に戻る。

30

#### 【0102】

全ての測定値が合格すると、短い「ピーッ」音が発せられる。ハンドルアセンブリ上の緑色LEDが点灯され、また、ディスプレイは、起動スイッチを押して続行するようにユーザに促す。ファームウェアは、ハンドル起動スイッチが再び押されるのを待ってからシーケンスを続ける。この時点でキーボード上の任意のキーが押されると、長い「ピーッ」というエラー音が鳴り、ユニットがアイドル状態へ戻る。

40

#### 【0103】

ファームウェアは、選択されたパルスングプログラムによって禁止されるファイヤリングシーケンスを実施する。各電気パルスまたはエネルギーのパルスの供給中に、EP装置は、対象組織、例えば皮膚で測定された抵抗に基づいてその出力を連続的に調整して、所望の電流を維持する。要するに、プロセッサは、所望の出力電流レベルをユーザによって入力される予め設定された電流値のレベルに設定することによって、パルスシーケンスを開始する。ハードウェアフィードバックループ（すなわち、アナログ閉ループ回路）は、対象組織抵抗の変化に伴って電極の両端間に印加される電圧を調整することによって、所望の出力電流を連続的に維持する。エネルギーのパルスの供給中、プロセッサがパルス波形を記録する。プロセッサは、パルス時間長がそのような時間に所望の出力電流をゼロに

50

設定することによって満たされたとき、パルスを終わらせる。パルスのシーケンスが終わると、プロセッサは、波形データを見直して、電気穿孔シーケンス中に電流が設定パラメータの範囲内になかった場合にはオペレータに警告し、それにより、電気穿孔シーケンスまたは処理が不完全であったか否かについてユーザに知らせる。

#### 【0104】

EPシーケンスが良好に完了すると、皮膚EP装置がアイドル状態に戻る。電気パルスシーケンスの完了後に、電界生成の成功の更なる視覚的確認がLCD上でなされる。各シーケンス後、LCDは、電気穿孔シーケンスの各パルスごとに1つずつ、「1」または「0」のいずれかによって、3つあるいは5つの数値のリストを示す。「0」は、パルスが正常であったことを示し、また、「1」は、パルスが異常であったことを示す。より具体的には、各パルスは、正常であるとして表わされるように、すなわち、「0」がLCDで表示されるように、予め設定された電流の少なくとも90%を達成しなければならない。特定のパルスが予め設定された電流の90%未満しか達成しない場合には、パルスが異常であり、「1」が表示される。更に、異常パルスの最低電流および平均電流が表示される。例えば、0.5アンペアの電流で設定された5パルス電気穿孔シーケンスの場合、パルス3およびパルス5が、それぞれ0.4アンペアおよび0.3アンペアしか達成しない場合、「00101」が表示されるとともに、「低：60%平均80%」が表示される。この制御機構は、治療用途または予防用途のためのワクチンを送達するときには不可欠である。ワクチン送達が不十分な場合には、治療または予防のために必要とされる抗体反応または細胞反応が得られない確率が高く、被検者が病気を発症する危険がある(Rothら、2005)。

10

20

#### 【0105】

##### 実施例2．データ取得および記憶

皮膚EP装置ソフトウェアまたはファームウェアは、リアルタイムのデータ取得および不揮発性メモリ内への記憶を可能にする。図2Cは、電気穿孔プロセス中に採取され得るデータの第1の部分を示している。ファイルヘッダの第1のセクションはファイル名(「2.1」)および動物名(「2.2」)を含む。縦欄のデータ(「2.3」)は、シーケンスのパルス、パルス前の待ち時間、パルス幅、および、3つの各電極のパルス電流を記述している。図2.4は、任意のパルスシーケンス中の各電極の配置を特定するデータの第2の部分を示している。図2.5は、同じ電気穿孔における未加工データの第3の部分のフォーマット化バージョンを示している。ファイルは、皮膚EP装置からMicrosoft Excel CSVファイルとしてダウンロードされる。データは、テンプレートMicrosoft Excel Spreadsheetファイルへとコピー&ペーストされる。スプレッドシート中の縦列は、電気穿孔パルス中に測定された電圧(V)および電流(アンペア)並びに組織抵抗(オーム)の計算値を表わしている。小さい方の電極をブタの皮膚で使用した後にダウンロードされたデータは、大きい方の電極を使用した後と比べて約2倍の皮膚抵抗(700 ~ 2200)を生じた。

30

#### 【0106】

##### 実施例3．プラスミド設計、送達方法、および、ブタにおける実験的研究

40

プラスミドコンストラクト．本明細書中に記載される実験で使用されるpEGFP-N1(カリフォルニア州のマウンテンビューにあるClontech)は、哺乳動物細胞内でより強い蛍光とより高い発現が得られるように最適化された野生型GFPのレッドシフト(red-shifted)変異体をコードする(最大励起波長=488nm;最大放出波長=507nm)。pEGFP-N1は、Phe-64 LeuおよびSer-65 Thrの二重アミノ酸置換を含むGFPmut1変異体をコードする。EGFP遺伝子のコード配列は、ヒトコドン使用選択に対応する190を超えるサイレント塩基変異を含む。EGFPのフランキング配列は、真核細胞における翻訳効率を更に高めるためにKozakコンセンサス翻訳開始部位へと変換し。EGFP遺伝子の下流側のSV40ポリアデニル化シグナルは、EGFP mRNAの3'末端の適切な処理が調節される。また、ベクターバッ

50

クボーンは、SV40 T-抗原を発現する哺乳動物細胞における複製のためのSV40複製開始点も含む。SV40初期プロモータと、Tn5のネオマイシン/カナマイシン耐性遺伝子と、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子由来のポリアデニル化シグナルとから成るネオマイシン耐性カセット(neor)により、G418を用いた安定にトランスフェクトされた真核細胞のセクションが可能になる。このカセットの上流側の細菌由来プロモータは、大腸菌においてカナマイシン耐性を発現する。また、pEGFP-N1バックボーンは、大腸菌としての増殖用pUC19複製開始点と、一本鎖DNA生成のためのf1複製開始点とを提供する。(2009・6・9)

#### 【0107】

電気穿孔条件 .

10

全ての実験で方形波パルスを使用した。電気穿孔条件は各実験毎に個別に提示される。全てのケースにおいて、0.1~0.4アンペアの定電流を20または52ミリ秒/パルスにわたる2個または3個のパルスとして使用した。この場合、パルス間は1秒である。(生体分子を骨格筋へ送達するために先に使用した)制御皮膚EP装置電気穿孔装置は、非導電材料上に装着される5つの等間隔に配置された21-ゲージ純ステンレススチール製ニードル電極の円形配列(1cm直径)を含んでいた。皮膚電気穿孔皮膚電極は、非導電材料上に装着される二等辺三角形構成(2つの長辺の長さは5mmであり、短辺の長さは3mmである)の3つの26-ゲージ純ステンレススチール製ニードル電極から成る。

#### 【0108】

ブタにおけるプラスミドDNAの筋肉注射 .

20

GFP実験では、体重が15~40kgの生後3~6週目の性別混合の若いハイブリッドブタが使用された。動物は、食料および水を自由に摂取可能な状態で個々の檻に収容された。エンドトキシンフリーのプラスミドの調製物を滅菌水で希釈し、HPLC精製した低分子量ポリ-L-グルタミン酸塩(平均MW10,900)と1%重量/重量で配合した。実験の0日目には、動物を手作業で拘束し、前述したようにGFPプラスミド溶液をIDおよび/またはSQで直接注射した。正方形の左上隅の中心から2cmの場所に入れ墨が付けられ、正方形の中心部に注入部位が位置された。これにより、各注入部位を容易に特定して切り取ることができる。適切な注射部位を見つける際に全ての主要な表面血管を避けた。

#### 【0109】

30

皮膚採取 .

ブタを放血させ、注射部位を特定した。各注射部位で2.5平方cmの皮膚、皮下組織、および、少量の下層筋肉を直ちに切り取った。切り取られた領域は、365nm波長のUV光を使用して暗室内で観察した。

#### 【0110】

発現領域の写真解析 .

十分な蛍光発光を示したサンプルをデジタルカメラで撮影した。蛍光を発しないあるいは非常に僅かな蛍光量のサンプルは撮影しなかった。蛍光は、処理情報を与えられていない3人の観察者によって0~5のスケールでスコア付けされた。蛍光を発していないサンプルに対して0が割り当てられ、非常に僅かな蛍光が観察されたが撮影しなかったサンプルに対しては1が割り当てられ、3~5は、撮影した蛍光について決定した。サンプルは組織学試験のために保存した。

40

#### 【0111】

実施例4 . 比較研究

全ての検査状態からのデータを表にした。図10は、平均スコアが2以上であった状態のみを示しているが、最大可能スコアは5である(スコア付け説明に関しては、段落[0099]を参照されたい)。データが示すように、皮膚特異的な皮膚配列(1番目の横列、図10)を使用して最良の全体的結果が得られた。次のグループ(2番目の横列、図10)は同じ数値スコアを有するが、皮膚配列(「MA」)に関しては、50µL中に配合

50

された50 µgのプラスミドだけが使用され、一方、大きな配列（「LA」）に関しては、倍の量、すなわち、100 µL中に配合された100 µgのプラスミドが使用されたことに留意すべきである。更に、皮膚電極配列について最適化した状態を使用すると、時間がかかり減少した。すなわち、MAを使用すると、観察される注射とEPとの間の処置時間は4秒であり（4番目の縦列を参照、図10）、LAを使用すると80秒である。プラスミド投与量、配合量、タイムラグ、電流振幅、および、パルス長に関する多くの他の条件を評価し、これを図10に示す。一般に、より少ない体積で適切なプラスミド投与量を含む場合（より濃縮された溶液）により良好な結果が得られることが分かった。

#### 【0112】

10

実施例5．ブタにおける皮内送達と筋内送達との比較

ブタに皮内（ID）送達又は筋内（IM）送達した濃縮用量のCMV-GHRHおよびCMV-SEAPプラスミドの送達量および発現量を比較した。結果は、分泌性タンパク質（SEAP、GHRH）並びにブタのSEAP免疫原性の両方を用いた場合、どの送達方法がブタにおいて最も高い発現量をもたらすのかを初めて明らかにするものである。

#### 【0113】

動物は、個別に収容して、7日間かけて順応させた。研究の0日目に、動物は、体重を量り、採血し、その後麻酔した。ブタ（n=4/グループ）には、1mgのCMV-SEAPおよびCMV-GHRH+0.1%ポリ-L-グルタミン酸ナトリウム塩を様々な濃度および電流強度で注射した（表1）。4秒後、様々な電流（0.1～0.5アンペア）を用いてCELLLECTRA（商標）電気穿孔装置（ペンシルベニア州のブルーベル19422にあるVGX Pharmaceuticals, Inc）（5個のニードル、52ミリ秒パルス、パルス間が1秒、全体で3つのパルス）によって動物を電気穿孔した。ブタを麻酔から回復させ、ブタが24時間にわたってモニタして十分な回復を確認した。処置後2～3時間以内に完全に回復しなかった動物を全て記録した。ブタは、2、4、7、9、11日目に体重を量って採血した。実験期間にわたって食料および水は自由に摂取できた。SEAP、SEAP抗体ELISA、GHRH、および、IGF-I用に血液を採取した。

20

#### 【表1】

表1．実験グループの概要

30

グループ	プラスミド	投与量	注射体積	IM又はID	EP電流	n=
1	CMV-SEAP CMV-GHRH	10 mg/mL	100 µL	ID	0.2 アンペア	4
2	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 µL	ID	0.2 アンペア	4
3	CMV-SEAP CMV-GHRH	10 mg/mL	100 µL	IM	0.5 アンペア	4
4	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 µL	IM	0.5 アンペア	4
5	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 µL	IM	0.4 アンペア	4
6	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 µL	IM	0.3 アンペア	4
7	CMV-SEAP CMV-GHRH	10 mg/mL	100 µL	IM	0.1 アンペア	4

40

#### 【0114】

図12に示されるように、製造メーカー使用説明書に従って化学発光キットPhosph

50

a - L i g h t C h e m i l u m i n e s c e n t R e p o r t e r A s s a y K i t ( マサチューセッツ州のベッドフォードにある A p p l i e d B i o s y s t e m s ) を使用して血清サンプル中の S E A P 発現量を測定した。分析のための検出の下限は 3 p g / m L である。I M 注射して 0 . 5 アンペアで電気穿孔した動物では、濃縮プラスミドと比べて、希釈プラスミドを投与しグループの方が S E A P レベルが高かった ( 4 3 % 高い、\* P = 0 . 0 2 4 ) 。非常に低いレベルの検出可能な S E A P タンパク質が、I D 注射した動物の血清中に認められた。

#### 【 0 1 1 5 】

この研究で使用される S E A P は、ヒトタンパク質であり、したがって、ブタ体内で免疫反応を引き起こさせる。E L I S A を使用した抗体反応の測定を行い、その結果は図 1 3 に示されるグラフで見ることができる。1 1 日目の血清サンプルにおける抗体反応を、1 1 日目の血清 S E A P 結果と共にグラフ化した。その中で、濃縮プラスミドサンプルが最も高い平均抗体力価をもたらした。

10

#### 【 0 1 1 6 】

G H R H 軸の下流側ホルモン、インスリン様成長因子 I すなわち I G F - I を使用して G H R H 発現量を測定した。その結果は図 1 4 に示されるグラフで見ることができる。I G F - I は、血清中で比較的安定なタンパク質であり、I G F - I R I A キットを用いて容易に測定できる。注射後 1 1 日目の血清 I G F - I レベルは、濃縮プラスミドを I M 投与 ( C - I M - 0 . 5 A ) したグループと比べて、非濃縮プラスミドを I M 投与 ( D - I M - 0 . 5 A ) したグループの方が高かった。

20

#### 【 0 1 1 7 】

結果は、発現及び分泌されるタンパク質の発現並びにこれらのタンパク質に対する免疫原性に関して注射の体積および経路が非常に重要な役割を果たすことを示している。発現対免疫原性に関する限り、濃縮 D N A と非濃縮 D N A との間には有意差が認められた。

#### 【 0 1 1 8 】

I G F - I 発現は、I M 注射して 0 . 5 アンペア電流強度で電気穿孔した動物においてより高かった。より低い電流強度では低い発現レベルが生じ、動物が小数であったため、その差異は非統計的なものであった。

#### 【 0 1 1 9 】

実施例 6 . ブタにおける皮膚 E P 研究

30

材料および方法

動物

予備実験では、体重が 2 5 ~ 4 0 k g の生後 3 ~ 6 週目の性別混合の若いハイブリッドブタを使用した ( n = 5 / グループ ) 。動物は、米国実験動物介護認定協会の基準にしたがって、テキサス州のシュガーランドにある S t i l l m e a d o w 社に収容した。動物は、食料および水に自由に摂取可能な檻の中にグループで収容した。動物は、実験開始前に 5 日間かけて順応させた。

#### 【 0 1 2 0 】

プラスミド

実験 1、2 のそれぞれでは、p E G F P - N 1 または p S E A P - 2 B a s i c V e c t o r ( カリフォルニア州のパロ・アルトにある C l o n t e c h L a b o r a t o r i e s 社 ) を使用した。実験 1 ( E x p . 1 ) で使用した p E G F P - N 1 は、哺乳動物細胞内でより強い蛍光とより高い発現が得られるように最適化された野生型 G F P のレッドシフト ( red-shifted ) 変異体をコードする ( 最大励起波長 = 4 8 8 n m ; 最大放出波長 = 5 0 7 n m ) 。遍在性サイトメガロウイルスプロモータ ( C M V ) が p S E A P - 2 B a s i c V e c t o r 中の分泌型胎性アルカリホスファターゼ ( S E A P ) の発現を駆動させた。このプラスミドをブタ実験 2 ( E x p . 2 ) で使用した。プラスミドは市販のキット ( 米国、カリフォルニア州のチャッツワースにある Q i a g e n 社 ) を使用して得た。エンドトキシンレベルは、K i n e t i c C h r o m a g e n i c L A L ( E n d o s a f e , C h a r l e s t o n , S C ) によって測定したところ、0 . 0

40

50



1 E U /  $\mu$  g 未満であった。プラスミド調製物は、滅菌水で希釈して、ポリ - L - グルタミン酸塩 (MW = 10 . 5 k D a 平均) (ミズーリ州のセントルイスにある S i g m a ) と 1 % 重量 / 重量で配合し、V G X P h a r m a c e u t i c a l s , I m m u n e T h e r a p e u t i c s D i v i s i o n (テキサス州のウッドランド) にて更に H P L C 精製した。

#### 【 0 1 2 1 】

皮下 / 皮下 ( I D / S Q ) プラスミド投与および電気穿孔 ( E P )

実験 1 の 0 日目に、動物は、体重を量り、イソフルレン ( 5 % で誘起、2 ~ 3 % で維持 ) を用いて麻酔した。各横腹の 2 つの 3 "  $\times$  3 " 部位の体毛を剃り、該部位を注意深く洗  
10  
浄した。後の識別のために、入れ墨インクを使用して、1 インチブロックのマークを付けた。各プラスミド注射物はブロックの中心に送達された。動物には、様々な E P 条件 ( 以下を参照 ) 、注射体積および投与量、すなわち、プラスミド投与量、注入体積 ( 5 0  $\mu$  g / 5 0  $\mu$  L 、5 0  $\mu$  g / 1 0 0  $\mu$  L 、1 0 0  $\mu$  g / 1 0 0  $\mu$  L 、および、2 0 0  $\mu$  g / 1 0 0  $\mu$  L ) で I D / S Q 注射し、電流振幅およびパルス長を変え、また、処置領域の生検  
20  
について、処置グループの識別情報を与えられていない個別の観察者によるスコア付けを行った。切り取られた皮膚領域の写真を撮影し、また、注射後 5 日目に蛍光を測定した。最も発現量の高いサンプルとの比較において、分布領域および蛍光強度に基づいて数値スコアを計算した ( 0 = 蛍光無し、分布無し ; 5 = 最も明るい蛍光、最も大きい分布 ) 。全ての実験で方形波パルスを使用し、適応定電流 ( 下層の組織によって受けられる定電流 )  
20  
を供給可能な皮膚 E P 装置、C E L L E C T R A ( 商標 ) 装置 ( V G X P h a r m a c e u t i c a l s , I m m u n e T h e r a p e u t i c s D i v i s i o n 、テキサス州のウッドランド) を使用して投与した。全てのケースにおいて、2 個または 3 個のパルスを用いて、2 0 ミリ秒 / パルスまたは 5 2 ミリ秒 / パルスにわたって、適応定電流パラメータが 0 . 1 ~ 0 . 4 アンペアであった。この場合、パルス間は 1 秒であった。

#### 【 0 1 2 2 】

実験 1 では、2 つのタイプの配列を使用した。すなわち、筋肉 ( I M ) E P のために先に使用した非導電材料上に装着される 5 つの等間隔に配置された 2 1 - ゲージ純ステンレススチール製ニードル電極の円形配列 ( 1 c m 直径 ) である電極配列及び非導電材料上に  
30  
装着され且つ二等辺三角形構成 ( 2 つの長辺の長さは 5 m m であり、短辺の長さは 3 m m である ) で配置された長さが 3 m m の 3 つの 2 6 - ゲージ純ステンレススチール製ニードル電極から成る I D / S C 皮膚ニードル電極 ( 図 1 7 B も参照 ) を使用した。

#### 【 0 1 2 3 】

実験 2 において、動物には、2 m g / m L ( I M 注入と同様の 5 0 0  $\mu$  L ) の標準的なプラスミド調製物又は 1 0 m g / m L ( 1 0 0  $\mu$  L ) の濃縮されたプラスミド調製物として、1 m g の p S E A P を I D / S Q 注射および皮膚 E P を行った。また、プラスミド投  
30  
与後 1 1 日目まで S E A P 発現を測定した。

#### 【 0 1 2 4 】

血液採取および S E A P 分析

実験 2 の 0 、 4 、 7 、 1 1 日目には、8 : 3 0 A M に動物の体重を量り、頸静脈穿刺によ  
40  
って M I C R O T A I N E R 血清セパレータチューブ内へと血液を採取した。血液を室温で 1 0 ~ 1 5 分間かけて凝固させた。その後、血液を 3 0 0 0  $\times$  g で 1 0 分間遠心し、血清を - 8 0  $^{\circ}$  C で更なる分析まで保存した。

#### 【 0 1 2 5 】

血清サンプルを解凍させ、そのうち 5 0  $\mu$  L について、製造メーカー使用説明書に従って P h o s p h a - L i g h t C h e m i l u m i n e s c e n t R e p o r t e r A s s a y K i t ( マサチューセッツ州のベッドフォードにある A p p l i e d B i o s y s t e m s ) を使用して、S E A P 活性を分析した。分析のための検出の下限は 3 p g / m L である。S E A P 活性に関する分析前に、より高濃度の血清サンプルをマウス  
50  
血清で 1 : 1 0 に希釈した。全てのサンプルは、L U M I s t a r G a l a x y 照度計

(ドイツ、オッフエンブルクにあるBMG Lab technologies)を使用して測定した。

#### 【0126】

結果

#### 実験1

最も高いGFPスコアは、皮膚ニードル電極配列およびIM電極の両方を使用した場合に得られた。しかしながら、IM電極を用いて最適な結果を得るにはは、皮膚ニードル電極配列での50  $\mu$ L中に配合される50  $\mu$ gのプラスミドの場合と比べ、同じ濃度で2倍のプラスミド投与量、すなわち、100  $\mu$ L中に配合される100  $\mu$ gのプラスミドを必要とした(図15)。また、本発明者らが皮膚EPにとって最適な条件であると決定した0.2アンペア、2つのパルス、52ms/パルス、パルス間1秒を使用すると、処理時間が顕著に減少した。すなわち、皮膚EP装置を使用すると、処置時間がたったの4~5秒であり、IM配列を使用すると80秒である。一般に、適切なプラスミド1回分量をもって用量(より濃縮された溶液)を更に少なくすると、良好な結果をもたらすことが分かった。

#### 【0127】

#### 実験2

ブタは、皮膚EPとの関連でID/SQプラスミド送達にとって最適となるように先の実験で決定された条件、すなわち、0.2アンペア、2パルス、52ms/パルス、パルス間1秒を使用して処置した。動物には、少用量の製剤、または、IM+EP注入に通常用いられる用量で、同じプラスミド量、すなわち、1mgのpSEAPを投与した。濃縮プラスミド調製物を使用して注射体積をより少量に抑えた場合により高いSEAP値が得られた(図16)( $P < 0.05$ )。これらの条件は、非ヒト霊長類の実験で更に確認された。

#### 【0128】

#### 実施例7. 霊長類実験

アカゲザルは、ID/SQ注射およびその後の皮膚EPにより、低投与量のDNA(0.2mg/抗原)を用いて2回免疫し、その後、高投与量のDNA(1.0mg/抗原)を用いて3回免疫した。2回の低投与量免疫により、ID/SQのみのグループ並びにID/SQ注射及びその後の皮膚EP(ID/SQ+EP)のグループの両方は、IFNELISpotの測定において弱い細胞性免疫反応しか示さなかった。しかしながら、DNA投与量を増大させた3回の免疫によって、ID/SQグループにおいて1,000 SFU/ $10^6$  PBMCにまで反応が上昇した。ID+EPグループは、ID/SQグループよりも50%多くのIFN生成細胞を有していた。ID/SQ+EPグループにおける免疫原性の高まりは、ID/SQ+EPグループのメモリT細胞反応においても見られ、ID/SQグループよりも2倍多い抗原特異的IFN生成細胞を有していた。ID/SQ免疫のみでは、gagまたはenv抗体力価の有意な生成をもたらさなかった(<50終点力価)。しかしながら、EPを用いたプラスミド送達は、8800のピークgag終点力価および1600のenv終点力価をもたらした。最後に、プラスミドにコードされたrhIL-12の同時免疫は、IL-4ELISpot分析による測定で、決定される $T_H1$ 極性免疫反応を生じさせた。

#### 【0129】

材料および方法

動物

動物は、実験前に隔離した状態で少なくとも30日かけて順応させた。

#### 【0130】

プラスミド

この実験では、pGag4Y、pEY2E1-B、および、WLV104プラスミドを使用した。pGag4Yは、HIVのgagタンパク質をコードする発現カセットを含む

。pGag4Y遺伝子は、更なる実験のため、発現ベクターpVax（米国カリフォルニア州のカールズバッドにあるInvitrogen）へとサブクローニングした。pEY2E1-Bは、HIVクレードBのエンベロープをコードする発現カセットを含む。WLV104Mは、rhIL-12遺伝子をコードするプラスミドである。プラスミドは、市販のキット（米国カリフォルニア州のチャッツワースにあるQiagen社）を使用して得た。エンドトキシンレベルは、Kinetic Chromagenic LAL（Endosafe, Charleston, SC）によって測定すると、0.01 EU/μg未満であった。プラスミド調製物は、滅菌水で希釈し、ポリ-L-グルタミン酸塩（MW = 10.5 kDa平均）（ミズーリ州のセントルイスにあるSigma）と1%重量/重量で配合し、VGX Pharmaceuticals, Immune Therapeutics Division（テキサス州のウッドランド）で更にHPLC精製した。

#### 【0131】

##### 免疫

HIV DNAワクチンは、CELLECTRA（商標）適応定電流EP装置（前述した実施例3の場合と同様）および皮膚ニードル電極配列を使用したEPを用いて（n = 3 / グループ）およびEPを用いることなく（n = 3 / グループ）、非ヒト霊長類にID / SQ送達した。免疫を4週間置いて行い、また、抗体反応およびT細胞反応を測定するために、動物は2週間毎に採血した。最初の2回の免疫では、0.2 mgの2種類のHIV抗原（gagおよびenv）をそれぞれ送達し、また、アジュバントとしてのIL-12発現プラスミドは、200 μLの量で、動物毎に2つのID / SQ注射部位へと分けて投与した。その後の2回の免疫は、1 mgの各のHIVワクチンおよび更に高いプラスミド濃度（10 mg / mL）のIL-12プラスミド（全体で3 mg）を使用して行い、それにより、先の2回の免疫と同じ体積でより多くのプラスミド投与量を達成した。電気穿孔条件は、0.2 アンペア定電流、2 パルス、パルス間が1秒の52 msのパルス長であった。

#### 【0132】

##### 血液採取

動物は、実験期間中に2週間毎に採血した。EDTAチューブ内に10 mLの血液を採取した。PBMCは、標準的なFicoll-hypaque遠心分離器を用いて分離し、その後、完全培養媒地（10%の熱不活性化ウシ胎仔血清、100 IU / mLのペニシリン、100 μg / mLのストレプトマイシン、および、55 μM / Lのβ-メルカプトエタノールを添加した2 mM / LのL-グルタミン含有RPMI 1640）中に再懸濁した。RBCは、ACK溶解バッファ（ニュージャージー州のイーストラザフォードにあるCambrex Bio Science）で溶解した。

#### 【0133】

##### 酵素結合免疫吸着剤分析（ELISA）

100 ng / ウェルの組み換えHIV-1 III B p24またはgp120（マサチューセッツ州のウォバーンにあるImmunoDiagnostics）を用いて96ウェルプレートを一晩かけてコーティングし、HIVのgag反応およびenv反応をそれぞれ測定した。100 ng / ウェルのウシ血清アルブミンでコーティングしたプレートは、ネガティブコントロールとして用いた。プレートは、37 °Cにおいて1時間にわたり3% BSA-PBSTでブロックした。その後、プレートは、37 °Cで1時間にわたって4倍連続血清希釈を用いてインキュベートした。その後、ヤギ由来抗サルIgGホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ結合抗体を、プレートに1:10,000の希釈率で添加し（オハイオ州のオーロラにあるMP Biomedicals）、37 °Cで1時間にわたってインキュベートした。テトラメチルベンジジン（ミネソタ州のミネアポリスにあるR&Dシステム）を用いてプレートをデベロップし、2 NのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いて反応を止めた。その後、光学濃度（OD）を測定した。

#### 【0134】

I g G 終点力価は、B S A ウェルの平均 O D 値の 2 倍を超える O D 値をもたらす血清希釈率の逆数として規定された。

#### 【0135】

酵素結合免疫スポット分析 (E L I S p o t)

E L I S p o t は、I F N または I L - 4 捕獲・検出抗体 (スウェーデンの M a b T e c h) を用いて行なった。抗原特異的応答は、ペプチドを含有するウェルからネガティブコントロールウェル中のスポットの数を差し引くことによって測定した。その結果は、3 重複ウェルについて得られた平均値 (スポット / 100 万の脾細胞) として表示される。

#### 【0136】

統計的解析

データは、P r i s m G r a p h p a d ソフトウェアを使用して解析し、平均  $\pm$  S E M として表わす。

#### 【0137】

非ヒト霊長類の実験計画

アカゲザルは、最適化された H I V - 1 g a g および e n v コンストラクトおよびプラスミドにコードされる r h I L - 12 を用いて、図 17 A に示す設計に従って免疫した。非ヒト霊長類においても、ブタ実験で使用した装置 (図 17 B) を用いた。I D / S Q 注射によって 3 体の動物を免疫し、I D / S Q 注射とその後の皮膚電気穿孔 (I D / S Q + E P) を用いて 3 体の動物を免疫した。動物は、0、4、8、12、16 週目に 5 回免疫した。2 週間毎に血液を採取し、各免疫後 2 週目に E L I S p o t 分析を行なった。一方、E L I S A 分析は、各免疫後 4 週目に行なった。

#### 【0138】

E L I S p o t 解析

各免疫後の細胞性免疫応答の誘起は、I F N E L I S p o t によって測定した (図 18)。0.2 mg / 抗原の 1 回の低用量免疫後、I D / S Q グループおよび I D / S Q + E P グループの両方が非常に弱い反応を示した (それぞれ、 $72 \pm 11$  S F U /  $10^6$  P B M C および  $85 \pm 34$  S F U /  $10^6$  P B M C)。第 2 の低用量免疫では、I D / S Q グループ内の I F N 生成細胞の数が倍増し ( $173 \pm 77$  S F U /  $10^6$  P B M C)、I D / S Q + E P グループの反応が 3 倍に増加した ( $287 \pm 34$  S F U /  $10^6$  P B M C)。2 回の低用量免疫後に非常に弱い細胞性応答が観察されたため、本発明者らは、次の 3 回の免疫ではより多くの DNA 投与量 (1 mg / 抗原) を使用した。免疫応答は、I D / S Q グループでは、3 回目の免疫によっても有意に増大しなかった ( $176 \pm 72$  S F U /  $10^6$  P B M C)。しかしながら、I D / S Q + E P グループは、より多くの用量によってブーストされ、それにより、抗原特異的 I F N 生成細胞の量が倍増した ( $383 \pm 162$  S F U /  $10^6$  P B M C)。1 mg 投与量の DNA を用いて動物に 4 回目の免疫を行った。I D / S Q グループでは、前回の免疫と比べて I F N 応答の 3 倍の増加が観察された ( $376 \pm 210$  S F U /  $10^6$  P B M C)。第 3 の免疫と同様、皮膚 E P を用いた高投与量での DNA の送達では、I F N 応答が倍増した ( $1466 \pm 762$  S F U /  $10^6$  P B M C)。これらの高いレベルの抗原特異的応答は、最後の免疫を通じて維持された ( $1453 \pm 873$  S F U /  $10^6$  P B M C)。最後の免疫により、I D / S Q グループでは I F N 生成細胞の量が更に倍増した ( $927 \pm 191$  S F U /  $10^6$  P B M C)。

#### 【0139】

メモリ T 細胞応答

ロバスタなメモリ T 細胞応答の誘導は、ワクチンの成功の重要な局面である。I D / S Q DNA 免疫によって誘起されるメモリ T 細胞群を評価するために、最後の DNA ワクチン接種後 10 週目に E L I S p o t 解析を行なった (図 19)。I D / S Q + E P グループは、I D / S Q グループの 2 倍の強度のメモリ I F N 応答を示した (それぞれ、 $998 \pm 290$  および  $449 \pm 108$  S F U /  $10^6$  P B M C)。

## 【0140】

T<sub>H</sub>2細胞応答

皮膚免疫のための遺伝子銃を使用した実験により、T<sub>H</sub>2バイアスT細胞応答の誘導が実証された。しかしながら、IL-12タンパク質も送達した場合には、このバイアスをT<sub>H</sub>1応答側に反転できることが分かった。ID DNA免疫におけるrhIL-12の同時送達を行い、その同時送達がT<sub>H</sub>1バイアス応答を誘導するかどうかを決定した(図20)。抗原特異的T<sub>H</sub>2応答の誘導は、最後の免疫後10週間目にIL-4 ELISpot分析によって測定した。ID/SQのみのグループの全ての動物がIL-4応答陰性(>50 SFU/10<sup>6</sup> PBMC)を示し、ID/SQ+EPグループの1体の動物だけがIL-4応答陽性(136 SFU/10<sup>6</sup> PBMC)を示した。このことは、T<sub>H</sub>1

10

## 【0141】

## 体液性応答

DNA免疫の脆弱性は、それが非ヒト霊長類研究およびヒト臨床研究で抗体応答を引き起こすことができないことにある。組み換えp24抗原およびgp160抗原に対するHIV-1 gagおよびenv特異的抗体力価の両方を誘起する各グループの能力は、ELISA分析によって測定した(図21)。両方の抗原において、ID/SQグループは有意な抗体力価を示さなかった(<50 終点力価)。ID/SQ+EPグループは、第2の低用量免疫後に低レベルの抗体を生成した(終点力価: 100 ± 50)。しかしながら、抗体のより大きな誘起は、高用量のDNA(2220 ± 1000)を用いた第3の免疫において送達されるDNAの投与量が増大された後に認められた。抗体力価は第4の免疫を通じて増大した(8800 ± 4000)。また、env抗体応答は、低い力価を示すID/SQグループ(<50 終点力価)及び1600 ± 800の最大終点力価に達するID/SQ+EPグループについても、gag抗原に関して本発明者らが観察した結果を反映していた。

20

## 【0142】

## IM対ID/SQ電気穿孔

アカゲザルは、IM免疫により、1.0 mg/mLで(前述したものと)同じHIV gag、env、および、rhIL-12コンストラクトを用いて3回免疫した。細胞性免疫応答の誘起を比較したところ、IMルートおよびID/SQルートはいずれも、最初の2回の免疫後に同様のレベルのIFN 生成細胞を有していた。一方、ID/SQ+EPによる免疫は、IM+EPと比べて、1回の高用量免疫後に高いレベルのHIV gag抗体力価をもたらした。2回の免疫後、ID/SQ+EPグループは、IM+EPグループの2倍のHIV gag 終点力価を示した。

30

## 【0143】

これらの実験において、本発明者らは、ID/SQ区画室内への送達のために皮膚ニードル電極を使用するとともに、その結果として得られる免疫応答とIM+EP後に得られる免疫応答とを比較した(表1参照)。

【表 2】

表 1. IM又はID/SQ経路の電気穿孔により誘起された免疫応答の比較。3回の高用量免疫（1.0 mg/抗原）の後に得たIFN $\gamma$ のELISpot及びHIV gagのELISAの結果を示す。

	IM	ID	IM+EP	ID+EP
<b>ELISpot</b>				
全体的なgag及びenv応答 (SFU/10 <sup>6</sup> PBMCs)				
1	136 $\pm$ 51	95 $\pm$ 38	482 $\pm$ 181	635 $\pm$ 171
2	223 $\pm$ 76	376 $\pm$ 210	1924 $\pm$ 417	1466 $\pm$ 762
3	2042 $\pm$ 311	927 $\pm$ 191	5300 $\pm$ 378	1465 $\pm$ 762
<b>ELISA</b>				
Gag終点力価				
1	<50	<50	150	2200
2	<50	<50	4800	8800
3	<50	<50	12800	2150

10

20

## 【0144】

実施例 8. 皮膚EPを使用するマウスにおけるDNAワクチン接種

## A. プラスミドコンストラクト

遍在性サイトメガロ・ウイルス (CMV) プロモータまたは筋肉特異的な合成プロモータ (SPc5-12) は、マウス実験 1、3 (Exp. 1 および Exp. 3) で使用した pSEAP-2 Basic Vector におけるヒト分泌型胎性アルカリホスファターゼ (SEAP) の発現を促進する。哺乳動物細胞でより強い蛍光とより高い発現量が得られるように最適化された野生型緑色蛍光タンパク質 (GFP) - プラスミド、pEGFP-N1 を発現するレッドシフト変異体 (最大励起波長 = 488 nm; 最大放出波長 = 507 nm) を、レポータ遺伝子実験 (実験 2) で使用した。プラスミドは市販のキット (カリフォルニア州のチャッツワースにある Qiagen 社) を使用して得た。エンドトキシンレベルは、Kinetic Chromagenic LAL (Endosafe, Charleston, SC) によって測定したところ、0.01 EU/ $\mu$ g 未満であった。コンセンサス HA および NA 構造は、近年においてヒトに致命的であることが分かった 16 H5 ウイルスおよび 40 種類を越える ヒト N1 ウイルスの一次ウイルス配列を解析することによって作製した。これらの配列は、ロスアラモス国立研究所のインフルエンザ配列データベースからダウンロードした。コンセンサス配列を作製した後、コントラストは、Kozak 配列の付加、コドン最適化、RNA 最適化を含めて、哺乳動物での発現用に最適化した。これらのコンストラクトは、その後、pVax ベクター (カリフォルニア州のカールズバッドにある Invitrogen) へとサブクローニングした。他に表示がない限り、プラスミド調製物は、滅菌水中で希釈されて、ポリ-L-グルタミン酸塩 (LGS) と 1% 重量/重量で配合され (MW = 10.5 kDa 平均) (ミズーリ州のセントルイスにある Sigma)、VGX Pharmaceuticals, Immune Therapeutics Division (テキサス州のウッドランド) で更に HPLC 精製した。

30

40

## 【0145】

## B. マウスにおけるレポータ遺伝子実験

この研究は、いずれの電気穿孔パラメータ (最低有効電流)、タイムラグ (注射と電気穿孔の開始との間の時間)、配合、および、対象筋肉が、発現レベルおよび抗体レベルに

50

影響を与えるのかを決定するために、SEAPまたはEGFP発現プラスミドの送達および発現を試験した。動物は、様々な電流でのCELLLECTRA（商標）皮膚EP装置（3×26ゲージ電極の使用を含む）の使用と、IMまたはID注射との様々なタイムラグの条件で電気穿孔した。

#### 【0146】

第1の実験（Exp. 1）において、C57/B16マウス（n = 10 / グループ）のグループには、筋肉特異的合成プロモータ（pSPc5-12-SEAP）の制御下においてSEAPを発現するプラスミド10 μgを、4秒または80秒のタイムラグおよび0.1 Aの定電流で、前脛骨筋（TA）または腓腹筋（G）内へと注射した。コントロールグループは、EPを伴わずに（EP無し）TA内にプラスミドを摂取させた。別の動物グループは、プラスミドバックボーン有しないが（NB）同一のプロモータ、トランス遺伝子、および、3' ポリアデニル化シグナルを有する発現カセットを等モル濃度で、EPを伴っておよびEPを伴わずにTA筋肉およびG筋肉中に摂取させた。

10

#### 【0147】

第2の実験（Exp. 2）において、グループは、マウス（n = 4）であり、IMまたはIDのいずれかによって10 mg / mLまたは2 mg / mLの最終プラスミド濃度で、それぞれ5 μLまたは25 μLの体積にて、50 μgのpCMV-EGFPを注射した。切り取った皮膚および筋肉領域の写真を撮影し、注射後5日目に蛍光を測定した。処置領域は、処置グループの識別情報を与えられていない個別の観察者によってスコア付けした。最も発現量の高いサンプル（0 = 蛍光無し、分布無し；5 = 最も明るい蛍光、最も大きい分布）と野比較において、分布領域および蛍光強度に基づいて数値スコアを計算した。

20

#### 【0148】

第3のマウス実験（Exp. 3）では、16グループ×5匹のマウス / グループ、全部で80匹のマウスを使用した（表2）。マウス（n = 5 / グループ）には、様々な配合（生理食塩水、生理食塩水 + 1% LGS、水、水 + 1% LGS）および電流強度で50 μgのCMV-SEAP（10 mg / mL）を注射した。動物は、TA筋肉またはG筋肉中へのIM注射のため、4秒のタイムラグで様々な電流（0.1 A ~ 0.2 A）を用いて電気穿孔した。

【表 3】

表 2. マウスを用いたCMV-SEAP製剤実験用のグループ (実験 3)

グループ	配合	濃度 (mg/mL)	総投与量 ( $\mu$ g/動物)	EP	n
1	生理食塩水	10	50	0.2	5
2	生理食塩水	10	50	0.1	5
3	生理食塩水	10	50	0.2	5
4	生理食塩水	10	50	0.1	5
5	生理食塩水+LGS	10	50	0.2	5
6	生理食塩水+LGS	10	50	0.1	5
7	生理食塩水+LGS	10	50	0.2	5
8	生理食塩水+LSG	10	50	0.1	5
9	水	10	50	0.2	5
10	水	10	50	0.1	5
11	水	10	50	0.2	5
12	水	10	50	0.1	5
13	水+LSG	10	50	0.2	5
14	水+LSG	10	50	0.1	5
15	水+LSG	10	50	0.2	5
16	水+LSG	10	50	0.1	5

10

20

30

## 【0149】

全てのケースにおいて、動物は、3日間かけて順応させ、体重を量り、耳にタグを付けた。実験期間中、食料および水は自由に摂取可能な状態にした。実験0日目において、動物は、体重を量り、採血し、齧歯動物用の配合麻酔剤 - キシラジン (37.5 mg/mL ; 0.05 mL / 30 グラム体重)、ケタミン (1.9 mg/mL ; 0.016 mL / 10 グラム体重)、アセプロマジン (0.37 mg/mL ; 0.025 mL / 15 グラム体重) を使用して麻酔し、設計に従ってプラスミドを投与し、電気穿孔した。実験1、3において、血液をレトロオービタルブリードを使用して採取し、凝固させた。採取し全ての血液は、血清および血漿を分離するために遠心分離し、その後、先に行なった態様にわずかな修正を加えたSEAP分析および抗SEAP ELISAのために氷上のチューブへと分注した。14日後、全ての動物は、麻酔の外科的状态で採取した。

40

## 【0150】

50



## C. 解析

## 血液採取

0、4、7、11日目に、マウスの体重を量り、レトロオービタルブリードによってマイクロチューブに採血した。血液は、室温で10～15分間かけて凝固させ、その後、10分間にわたって3000×gで遠心分離し、更なる分析まで血清を-80℃で保存した。

## 【0151】

## SEAPアッセイ

血清サンプルを解凍し、そのうち50μLについて、製造メーカー使用説明書に従ってPhospho-Light Chemiluminescent Reporter Assay Kit (マサチューセッツ州のベッドフォードにあるApplied Biosystems) を使用して、先と同様にSEAP活性のアッセイをおこなった。アッセイの検出下限は3pg/mLである。SEAP活性のアッセイ前に、より高濃度の血清サンプルをコントロール種特異的な血清で1:10に希釈した。全てのサンプルは、LUMIstar Galaxy照度計(ドイツ、オッフエンブルクにあるBMG Lab technologies) を使用して測定した。

## 【0152】

## SEAP間接ELISA

ヒトSEAPタンパク質に対する免疫原性を、以下の変更された手順によってマウスで測定した。Nunc Maxisorb (ニューヨーク州のロチェスター) プレートを、4℃で一晩かけて、PBS中の精製ヒト胎性アルカリホスファターゼ(100ナノグラム/ウェルのヒト胎性アルカリホスファターゼを含む100μL (Sigma)) でコーティングした。プレートは、3回デカント洗浄した。プレートは、PBS中に0.05% Tween 20を含む1% BSA (Sigma) 溶液(ブロッキング溶液) を使用してブロッキングし、室温で2時間インキュベートした。血清サンプルを1:100で希釈した後、別個の希釈プレートにおいてPBSの0.05% Tween 20における1% BSA (Sigma) で1:4の連続希釈を行った。ブロッキング溶液はプレートからデカントした。100μLの希釈検査血清を各ウェルに加え、室温で2時間インキュベートした。血清希釈液をデカントして3回洗浄した。二次抗体(ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼと結合したウサギ由来抗マウス抗体) をPBS中に0.05% Tween 20を含む1% BSA 溶液で1:1000に希釈し、室温で1時間インキュベートした。プレートをデカント洗浄した。1ウェル当たり100μLのo-フェニレンジアミン(OPD) 基質を0.1Mクエン酸バッファ中に添加し(0.67mg/mL)、8分間インキュベートした。また、100μLの1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加して反応を停止させた。Spectramax Plus 384 プレートリーダー(カリフォルニア州のサニーベールにあるMolecular Devices) によって490nmで吸光度を測定した。

## 【0153】

## D. マウスの結果

## SEAP発現は対象マウスに依存する

発現は、SEAP発現プラスミド注射が、G筋肉よりもTA(図22)へ投与される場合に増大した。両方の筋肉への投与において、注射と皮膚EP装置によるEPとの間のタイムラグは80秒および4秒であった。SPC5-12-SEAPプラスミドをTA筋肉へ注射した場合、血清SEAPレベルは、EP無しでプラスミドを摂取させたコントロール動物の場合よりも285倍高かった(P<1.3E-21)。TA筋肉においては、80秒のタイムラグと4秒のタイムラグとの間で違いが観察されなかった(357±6対357±6.2pg/mL/g)。同じ条件下でのG筋肉中への注射では、コントロール動物よりも90～182倍高いSEAPレベルが得られ(80s対EP無しコントロール、P<0.003; G4s対EP無しコントロール、P<7.7E-06)。発現カセットだけを含むプラスミド断片が等モル配合でTAおよびG(バックボーンは無い(NB)) が、同じプロモータ、トランス遺伝子、および、3'ポリアデニル化シグナルを含む

10

20

30

40

50

に注射した場合、発現レベルは、IM + EPを受けなかった対照よりも210 ~ 250倍高かった(80s対EP無し、 $P < 1.8 \times 10^{-8}$ ; 4s対EP無し、 $P < 3.8 \times 10^{-5}$ )。TA80sにおけるSEAP発現はNB80sグループよりも24%高かった( $P < 0.008$ )。一方、TA4sはNB4sグループよりも37%高かった( $P < 0.004$ )。EPなしでC5-12-SEAPとNBを投与した両グループは、無視し得るSEAP発現量を示した。

#### 【0154】

##### GFP発現

GFP発現は、注射部位を注意深く剥離した後に視覚化し、処置グループが分からない観察者によってスコア付けされた。GFPスコアは、ID( $4.63 \pm 0.24$ 対 $3.25 \pm 0.14$ 、 $P = 0.01$ )およびIM( $4.75 \pm 0.14$ 対 $3 \pm 0.54$ 、 $P = 0.01$ )の両方に濃縮プラスミドを投与注入した動物のグループの方が、非濃縮プラスミドを投与したグループに対して高かった(図23)。これらの研究では、濃縮製剤(最大 $10 \text{ mg/mL}$ )が更に高い全発現と関連付けられた。この実験からの結果に基づいて、実験3では、プラスミドが $10 \text{ mg/mL}$ の濃度で使用された。

#### 【0155】

##### SEAP発現は配合および電流強度に依存する

SEAPレベルの違いは、SEAPトランス遺伝子が遍在性プロモータの制御下にあるときに評価した(実験1で使用される筋肉特異的プロモータに対して)。先の実験と同様に、発現は、プラスミド注射 - EP操作をG筋肉( $P = 0.05$ )に行った場合よりもTA(図24)で行った場合に増大した。この特定の試験において、生理食塩水 + LGS製剤は、生理食塩水製剤と比べて高い血清SEAPレベルをもたらしたが(それぞれ、 $41.1 \pm 7.9 \text{ pg/mL/g}$ 対 $31.0 \pm 5.9 \text{ pg/mL/g}$ )、これは、グループ内での変動がおおきかったため統計的有意性を示すものではなかった。一般に、0.1A電流設定で電気穿孔された動物は、0.2A定電流で送達される同一のLGSプラスミド製剤を摂取させた動物よりも僅かに高いSEAP発現量を示した。それにもかかわらず、水中に配合された0.2Aプラスミド製剤を摂取させた動物は、同じ筋肉において0.1Aで摂取させた動物よりも有意に低いSEAPレベルを示した(TAに対して $P < 0.05$ 、および、Gに対して $P < 0.001$ )。LGSを水製剤に添加した場合には、TA筋肉に対する差異は有意なものではなかったが、G筋肉に対しては有意性を保持していた( $P < 0.04$ )。

#### 【0156】

##### 抗SEAP抗体の発現誘導

生理食塩水 + LGSを含むSEAPプラスミドの製剤は高いタンパク質発現量をもたらしたが、抗SEAP抗体の力価は、水 + LGSに配合されたSEAPプラスミドを注射した動物と比較すると低かった(図25)。しかし、これは、グループ内での変動がおおきかったため統計的有意性を示すものではなかった。

#### 【0157】

##### 実施例9．霊長類における皮内送達と筋内送達との比較

【表 4】

## 霊長類の血清

1%ウマRBCに対するA/Vietnam/2003/4 HI力価

グループ	霊長類ID	実験グループ	6週目でのHI力価
	4497	C	80
H5 + M2	4498	C	80
IM CELLECTRA <sup>(商標)</sup>	4499	C	40
各プラスミド 1 mg	4500	C	80
	4501	C	<20
	4520	D	160
H5 + M2	4521	D	80
ID CELLECTRA <sup>(商標)</sup>	4522	D	160
各プラスミド 1 mg	4523	D	40
	4534	D	160
	4508	G	160
H5 + env + 2 HPV	4510	G	<20
IMのみ	4511	G	<20
各プラスミド 1 mg	4512	G	<20
	4513	G	<20
	4529	H	<20
ネガティブコントロール	4530	H	<20
	4531	H	<20
	4532	H	<20
	4533	H	<20
	H5 基準 血清		1,600

10

20

30

【表 5】

## DNAコンストラクト

1	HIV Env Clade A
2	HIV Env Clade C
3	HIV Env Clade D
4	HIV Gag
5	HIV Pol
6	Flu H5
7	Flu NA
8	Flu M2 NP
9	HPV 16 E6/E7
10	HPV 18 E6/E7
11	IL12

10

20

【表 6】

実験 グループ	DNAコンストラクト	動物番号	投与経路	投与量	全DNA量 (mg) /動物
A	DNA 1+2+3+4+5+11	5	IM CELLECTRA <sup>(商標)</sup>	1 mg/コンストラクト	6
B	DNA 1+2+3+4+5+11	5	ID CELLECTRA <sup>(商標)</sup>	1 mg/コンストラクト	6
C	DNA 6+9	5	IM CELLECTRA <sup>(商標)</sup>	1 mg/コンストラクト	2
D	DNA 6+9	5	ID CELLECTRA <sup>(商標)</sup>	1 mg/コンストラクト	2
E	DNA 7+8+10	5	IM CELLECTRA <sup>(商標)</sup>	1 mg/コンストラクト	3
F	DNA 7+8+10	5	ID CELLECTRA <sup>(商標)</sup>	1 mg/コンストラクト	3
G	DNA 1+6+9+10	5	IM シリンジ	1 mg/コンストラクト	4
H	ネガティブコントロール	5	N/A		0
	合計	40			

30

## 【0158】

これらの実験では、アカゲザルを免疫した。動物は、実験開始前に2ヶ月かけて順応させた。研究は以下のように進めた。0週目は最初の免疫（プラスミド1回分量を投与）およびベースライン採血を行なった；2週目は採血を行なった；3週目は2回目の免疫を行なった（プラスミド1回分量を投与）；5週目は採血を行なった；6週目は3回目の免疫（プラスミド1回分量を投与）および採血を行なった；8週目は採血を行なった。

40

## 【0159】

全てのプラスミドは、先の実施例に記載されるように、+1% LGS注射物用に水中に10 mg/mLで配合させ、各実験グループ（前記表中のグループA-H）ごとに1つの溶液として混合した。IM CELLECTRA（商標） ID CELLECTRA（商標）およびIM Syringeに指定される各グループ用の正確な注射量を計算した。ID投与において、必要な注射量が1部位当たり100 µLを超えた場合には、製剤を複数個所（全部で何mgのワクチンが投与されたかに応じて2、3または6箇所）に分けて注射した。IM注射した動物には、1箇所にて全製剤を投与した。

50

## 【0160】

前記実施例で説明したブタ実験および非ヒト実験で使用し C E L L E C T R A ( 商 標 ) 適応定電流装置は、本非ヒト霊長類実験においても使用した。電気穿孔条件は以下の通りであった。すなわち、I M 注入および電気穿孔グループに関して、条件は、0.5 アンペア、52 ms / パルス、3 パルス、プラスミド注射と電気穿孔との間の遅延 4 s であった。I D 注入および電気穿孔グループに関して、条件は、0.2 アンペア、52 ms / パルス、3 パルス、プラスミド注射と電気穿孔との間の遅延 4 s であった。

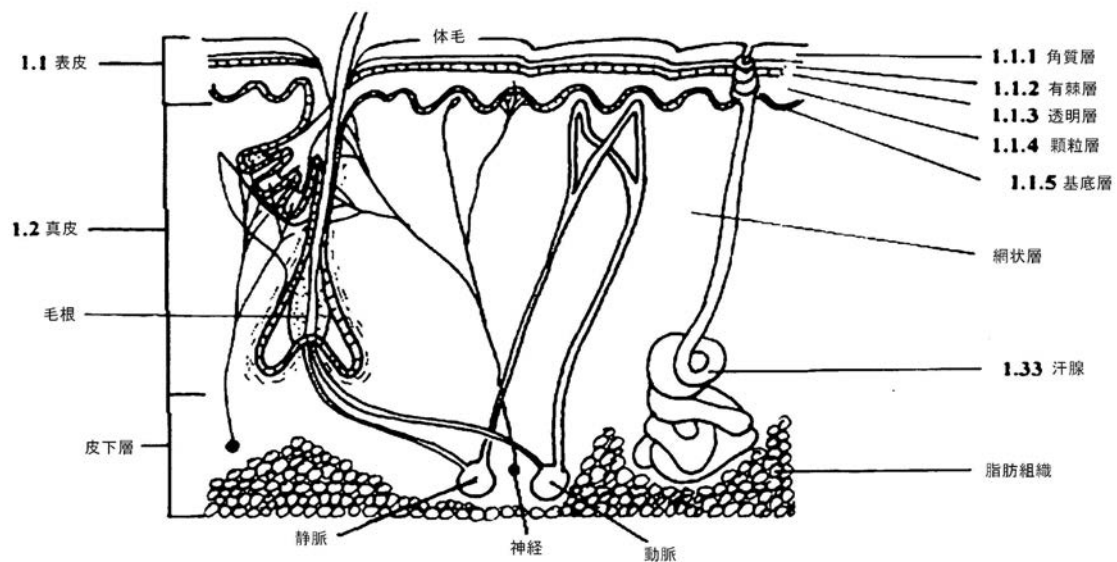
## 【0161】

## 血球凝集阻害 ( H I ) アッセイ

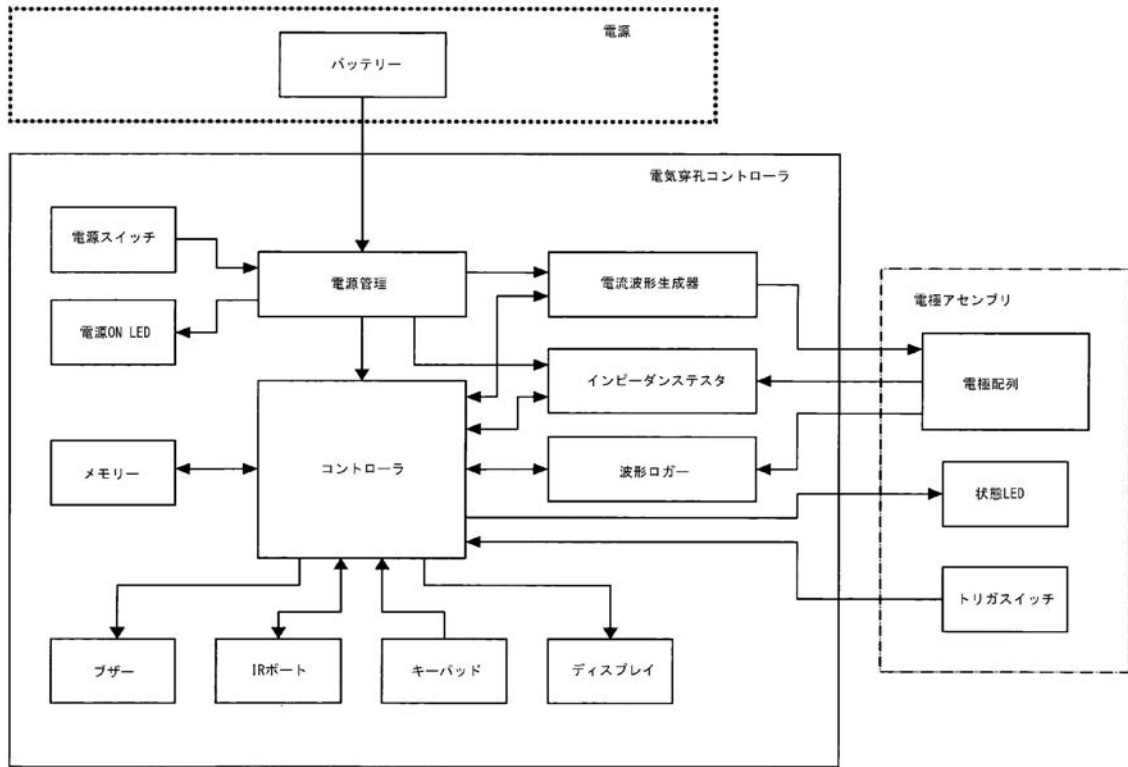
1 部の血清を 3 部の酵素で希釈することによりサル血清をレセプター破壊酵素 ( R D E ) で処理し、37 のウォーターバスで一晩インキュベートした。酵素を 56 で 30 分間のインキュベートによって不活性化させ、その後、6 部の P B S を添加して 1 / 10 の最終希釈を行った。H I 分析は、4 H A ユニットのウィルスおよび 1 % ウマ赤血球を使用して、V 字ボトム 96 ウェルマイクロタイタープレートで行なった。ここに示されるデータは、2 回目の免疫後の結果である ( 3 回目の免疫前に採取された血液 )。

10

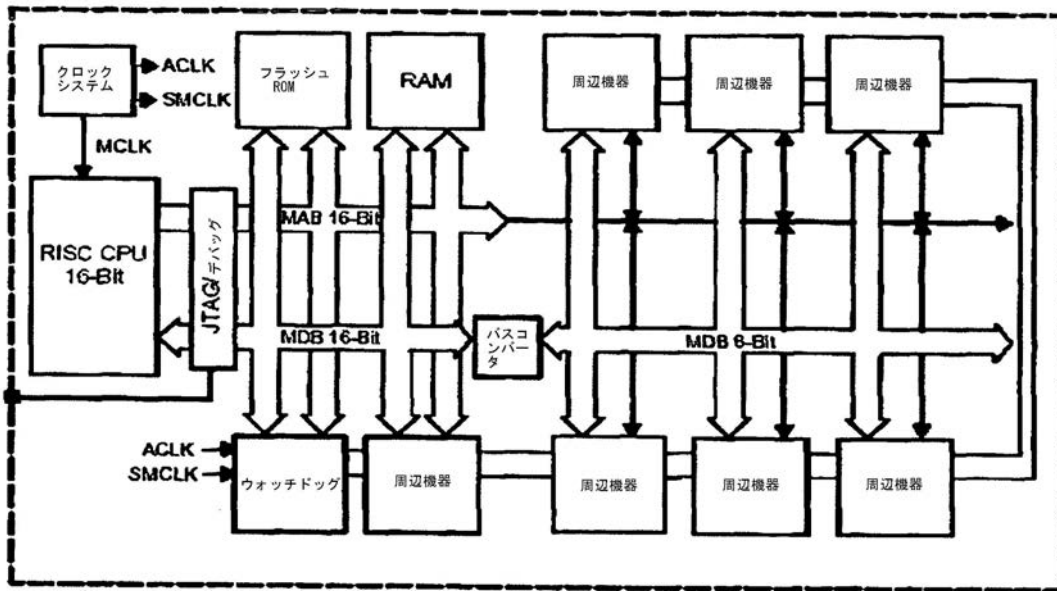
## 【図 1】



【 図 2 A 】



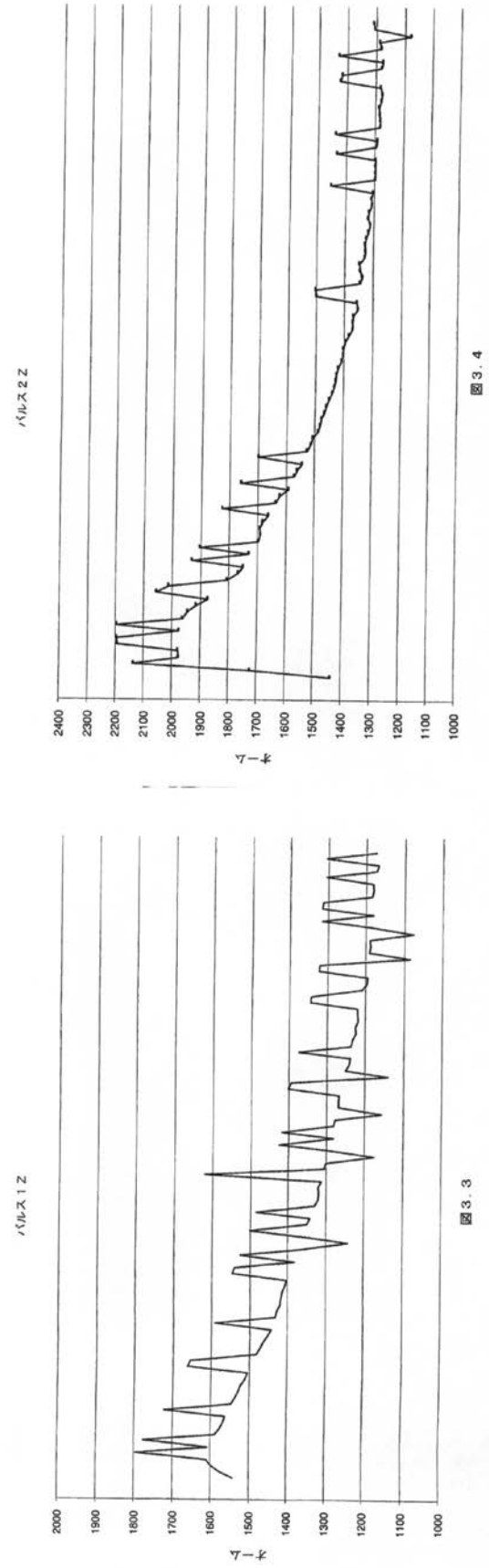
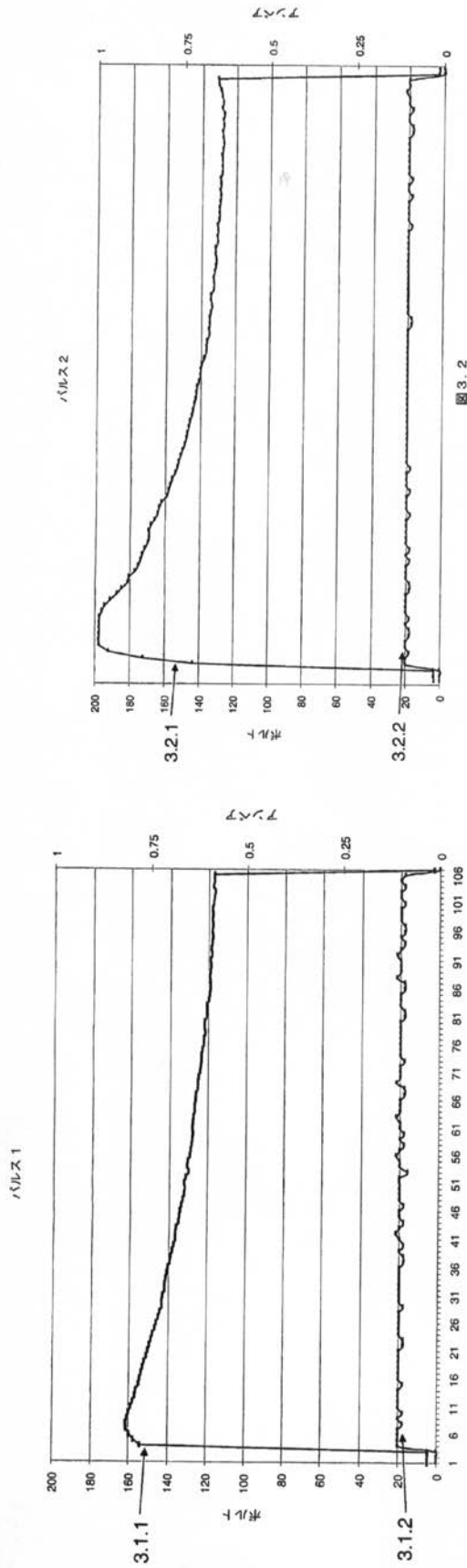
【 図 2 B 】



【図 2 C】

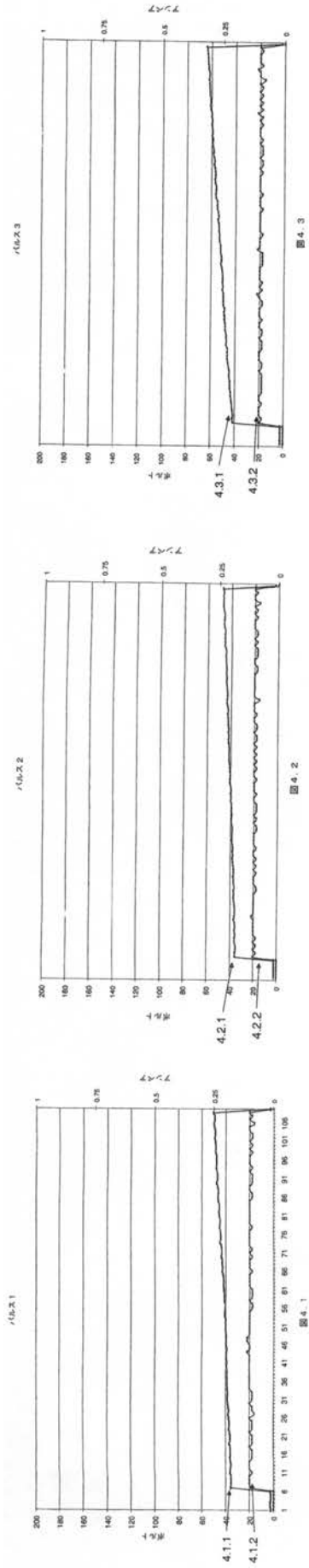
2.1	ファイル名:	00032210_06_06_28_15_26_43.csv				
2.2	動物番号:	32210				
2.3	シーケンス中のパルス:	1		2		
	事前待ち時間 (s):	4		1		
	パルス幅 (ms):	52		52		
	パルス電流:	0.1		0.1		
2.4	電極1:	プラス		オフ		
	電流2:	マイナス		プラス		
	電流3:	マイナス		マイナス		
2.5	電圧 (V)	電流 (A)	電圧 (V)	電流 (A)	Z1 (オーム)	Z2 (オーム)
	4.54	0	3.37	0		
	4.49	0	3.42	0		
	4.59	0	3.42	0		
	154.08	0.1	143.53	0.1	1540.6459	1435.1565
	157.6	0.1	172.35	0.1	1575.8424	1723.3277
	159.84	0.1	192.23	0.09	1598.2402	2135.6516
	161.06	0.1	197.36	0.1	1610.439	1973.4027
	161.65	0.09	197.7	0.1	1795.9116	1976.8023
	160.82	0.1	197.51	0.09	1608.0392	2194.3117
	159.99	0.09	197.61	0.09	1777.4692	2195.4227
	159.01	0.1	197.36	0.1	1589.941	1973.4027
	157.69	0.1	197.61	0.09	1576.7423	2195.4227
	156.86	0.1	196.09	0.1	1568.4432	1960.7039
	156.23	0.1	194.43	0.1	1562.1438	1944.1056
	155.01	0.09	191.45	0.1	1722.142	1914.3086
	154.57	0.1	187.35	0.1	1545.5454	1873.3127

【図 3】

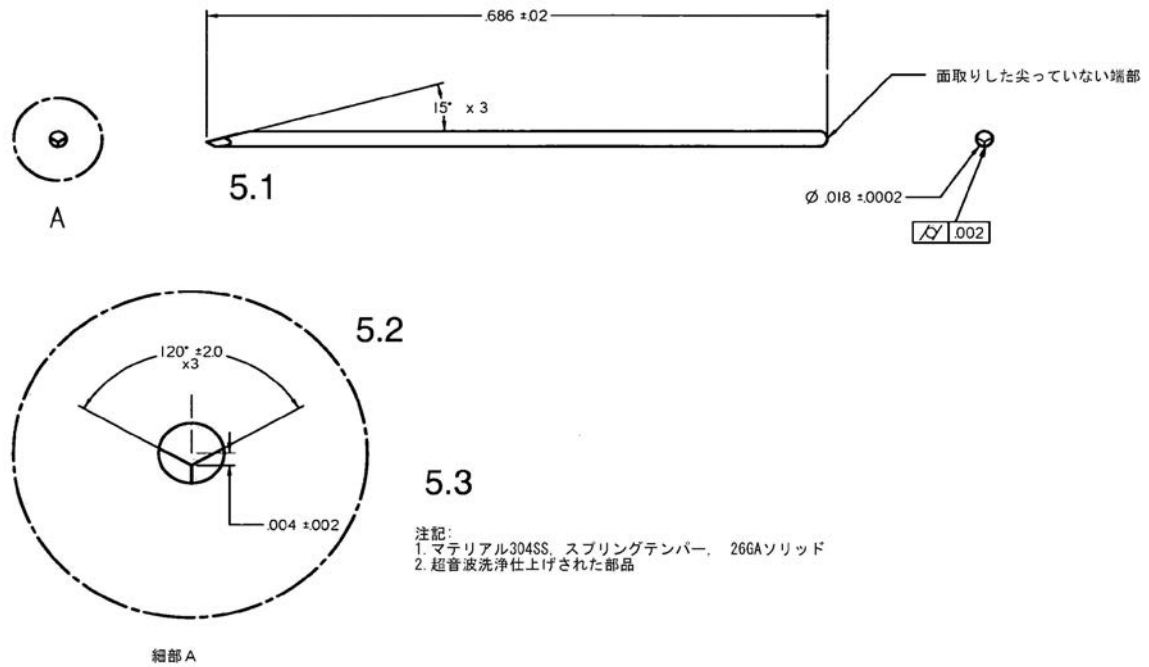




【図 4】



## 【図 5】



【図 6】

ハンドルアセンブリ

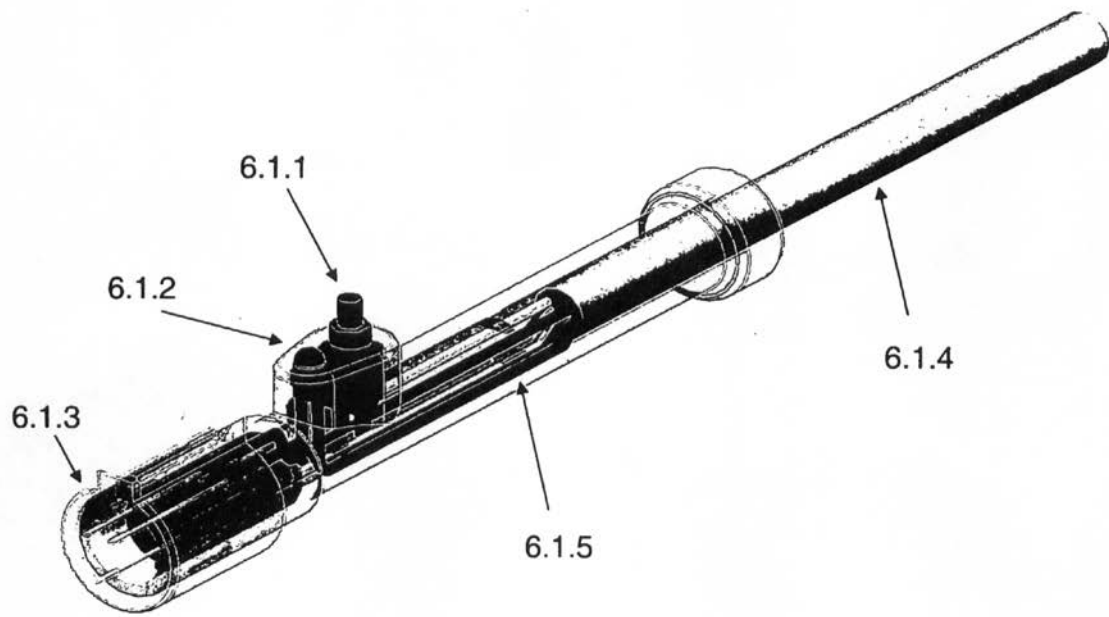


図 6. 1

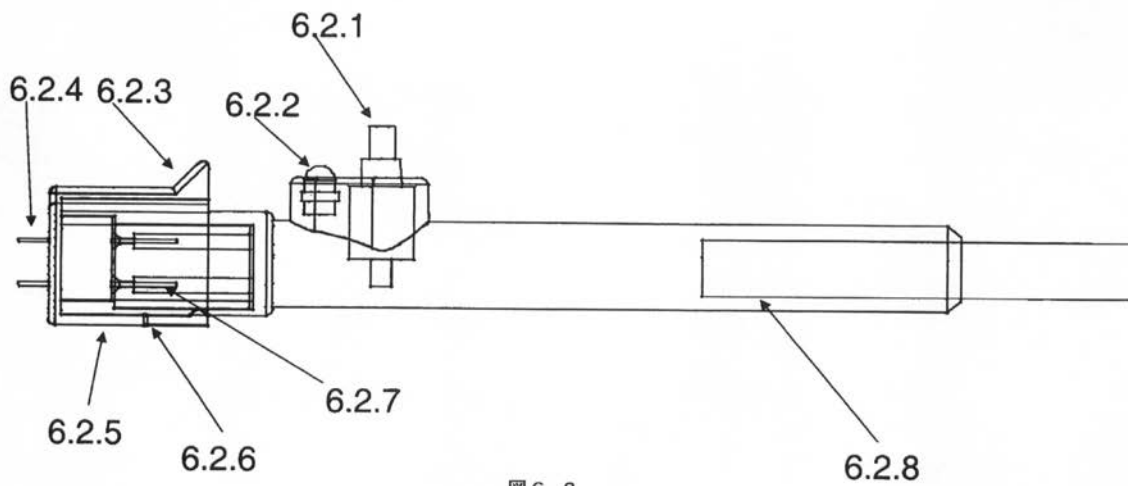
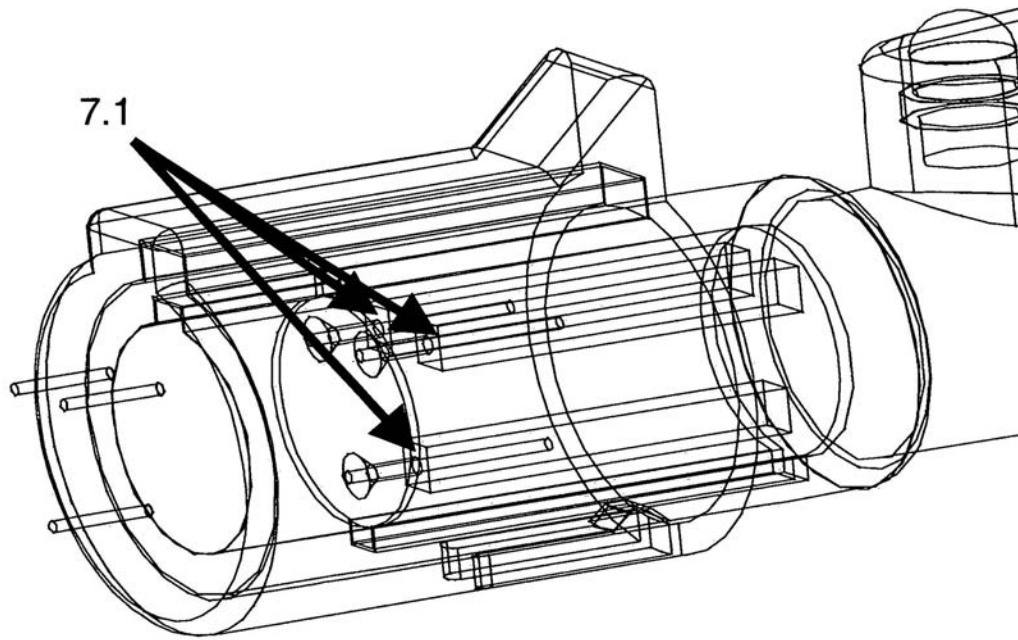
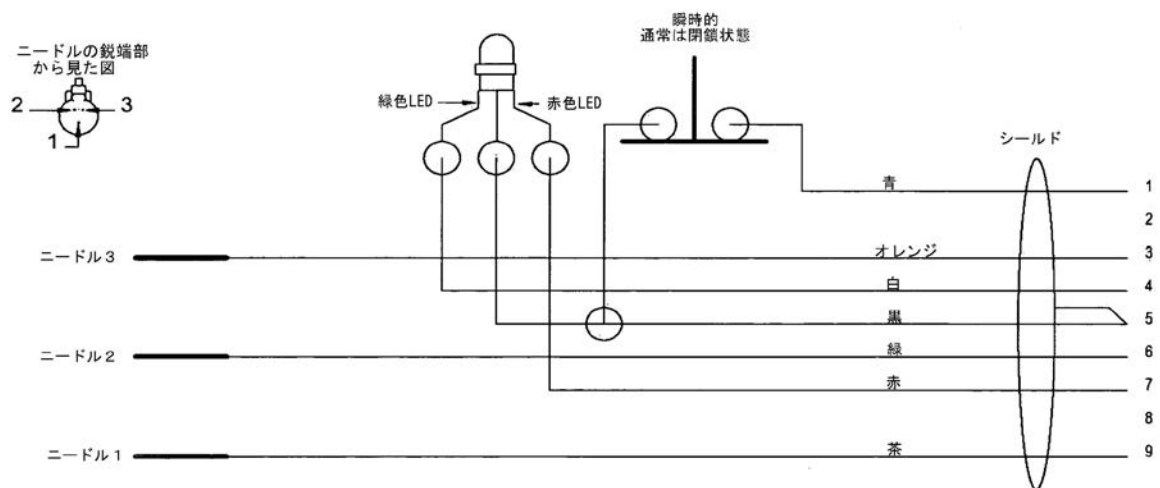


図 6. 2

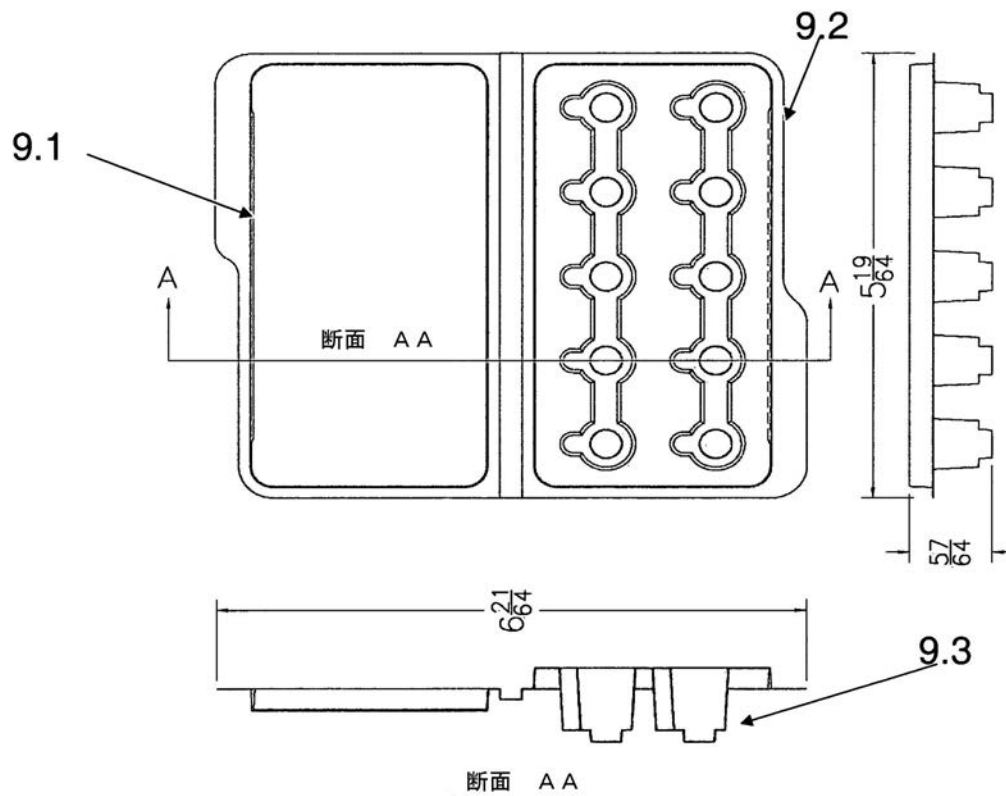
【図 7】



【図 8】



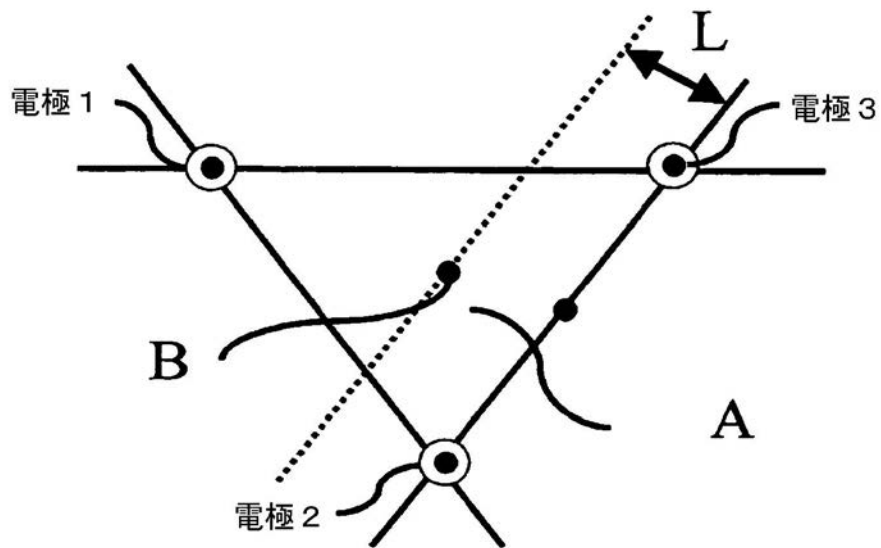
【図 9】



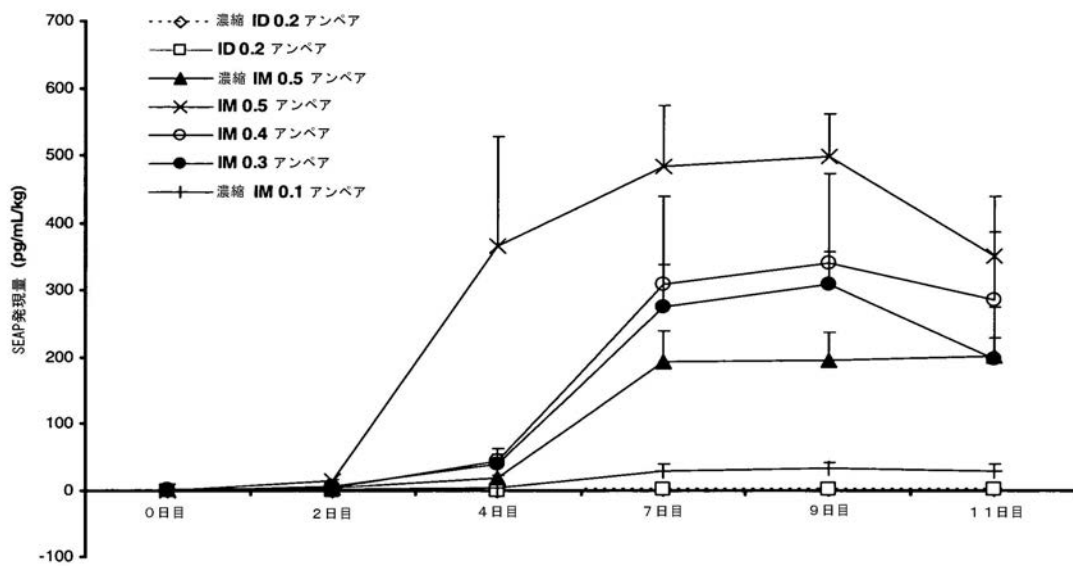
【図 10】

投与量( $\mu$ B)	体積( $\mu$ L)	電流	タイムラグ	ハンドル	パルス	スコア	標準誤差
50	50	0.2A	4	MA	20ms	5.00	0.00
100	100	0.2A	80	LA	20ms	5.00	0.00
100	100	0.2A	4	LA	20ms	4.33	0.24
200	100	0.1A	4	LA	52ms	4.17	0.17
100	100	0.1A	4	LA	20ms	4.00	0.00
200	100	0.4A	80	LA	52ms	3.67	0.33
100	50	0.2A	4	LA	52ms	3.33	0.33
50	50	0.2A	4	MA	52ms	3.00	0.00
100	100	0.1A	80	LA	52ms	2.83	0.17
200	100	0.4A	80	LA	20ms	2.83	0.17
50	50	0.2A	80	MA	20ms	2.67	0.17
100	200	0.1A	80	LA	20ms	2.33	0.33
200	100	0.6A	80	LA	52ms	2.17	0.17
100	50	0.1A	80	MA	52ms	2.00	0.00
50	50	0.6A	80	MA	52ms	2.00	0.00
50	50	0.2A	80	MA	20ms	2.00	0.00
100	200	0.2A	80	LA	20ms	2.00	0.00
100	100	0.1A	4	LA	20ms	2.00	0.00
200	100	0.1A	4	LA	20ms	2.00	0.00
200	100	0.2A	4	LA	52ms	2.00	0.00

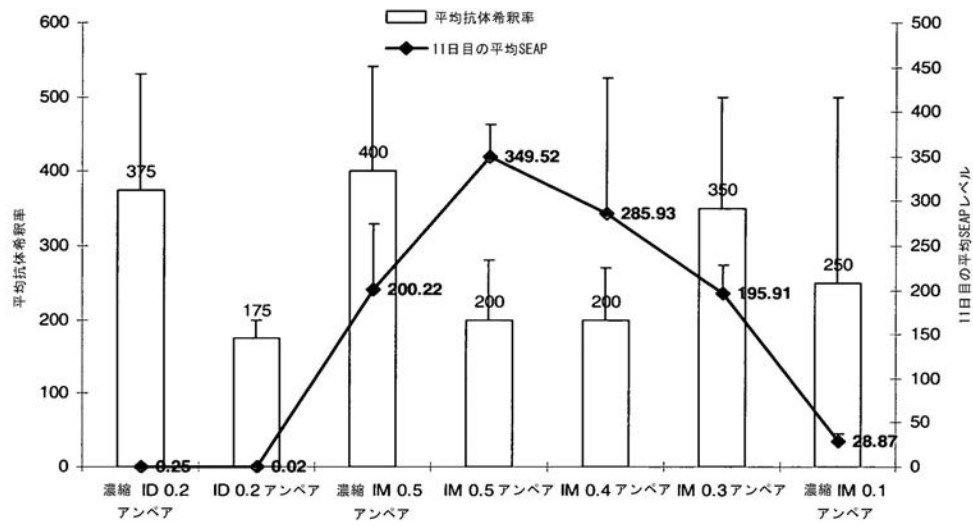
【図 1 1】



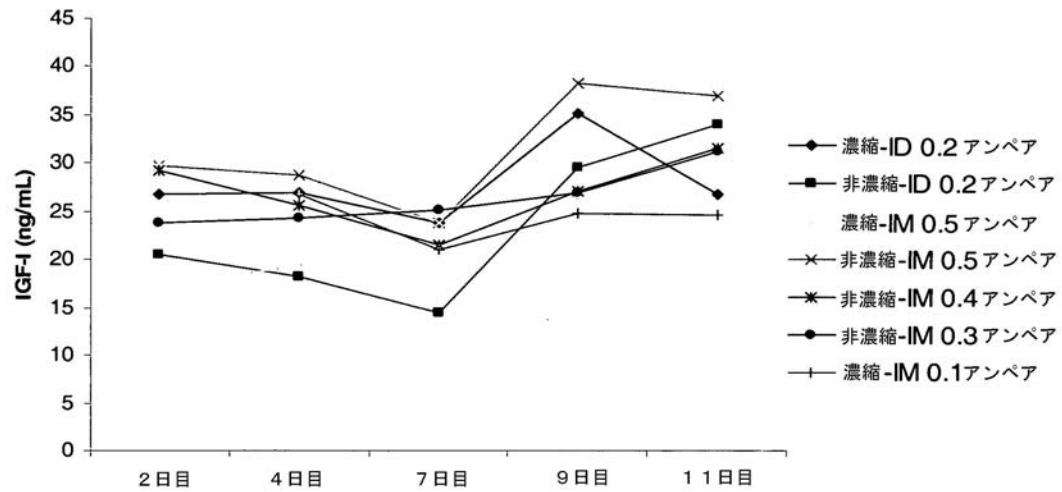
【図 1 2】



【図 13】



【図 14】



【図 15】

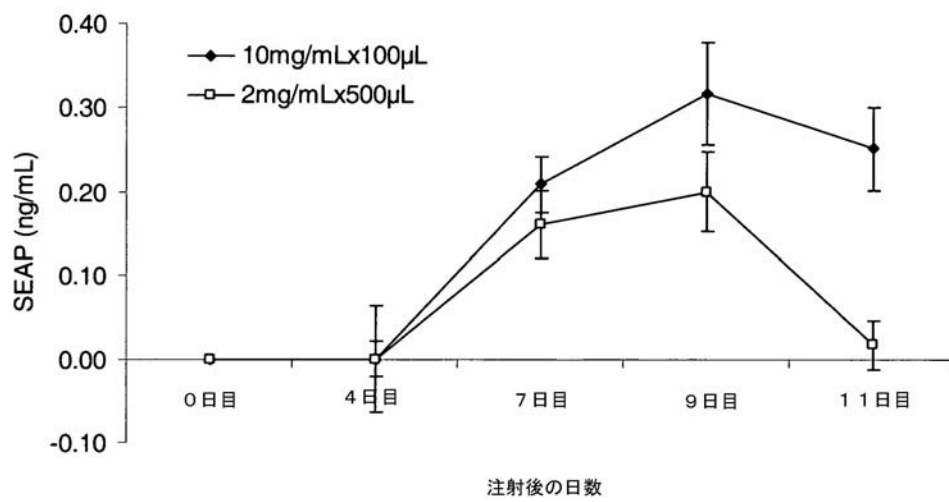


100µg/100µL, IM EP



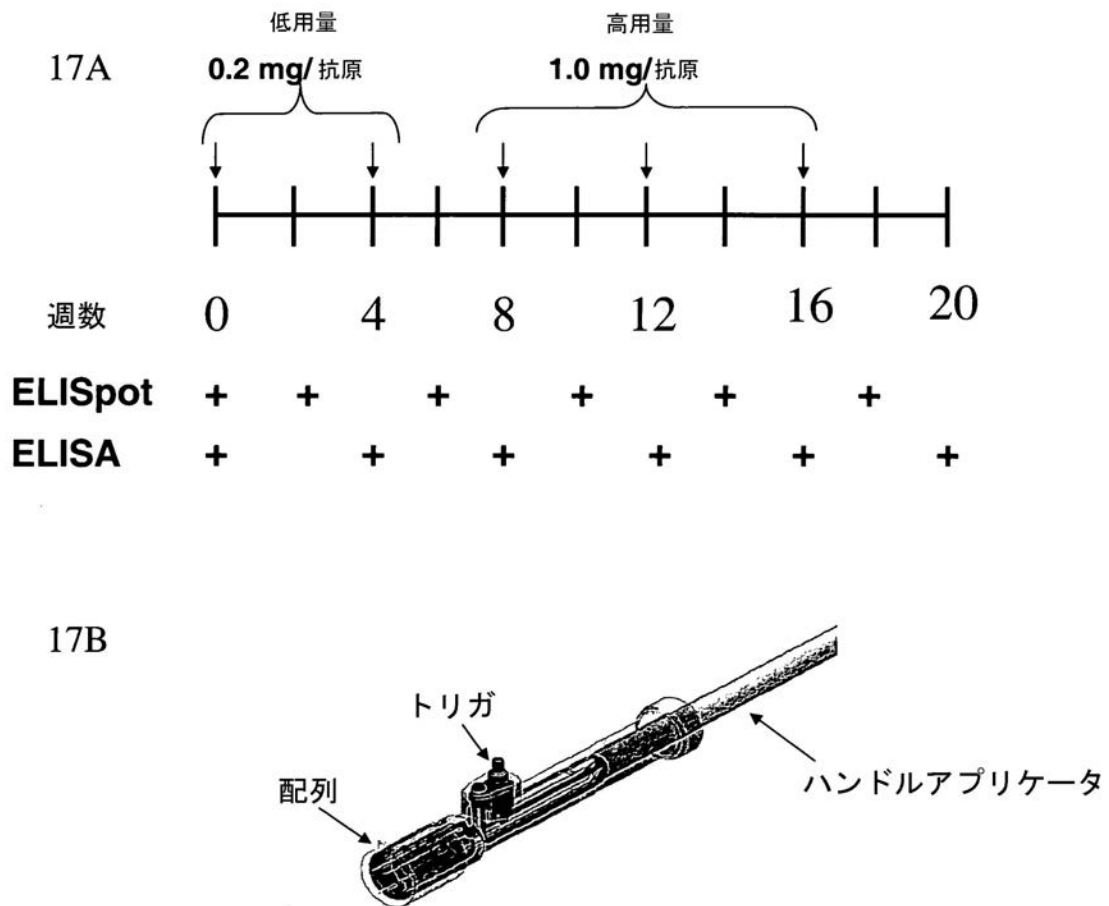
50µg/50µL, 皮膚 EP

【図 16】

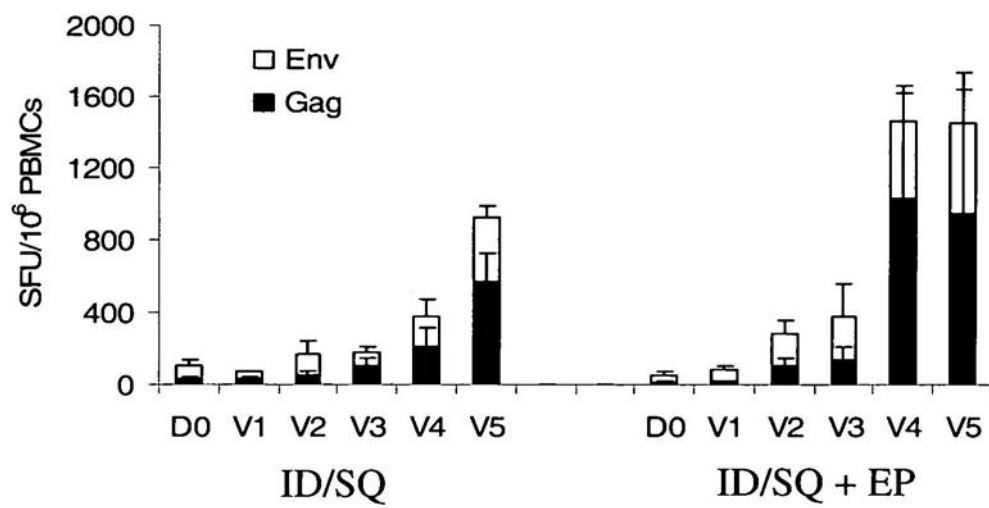




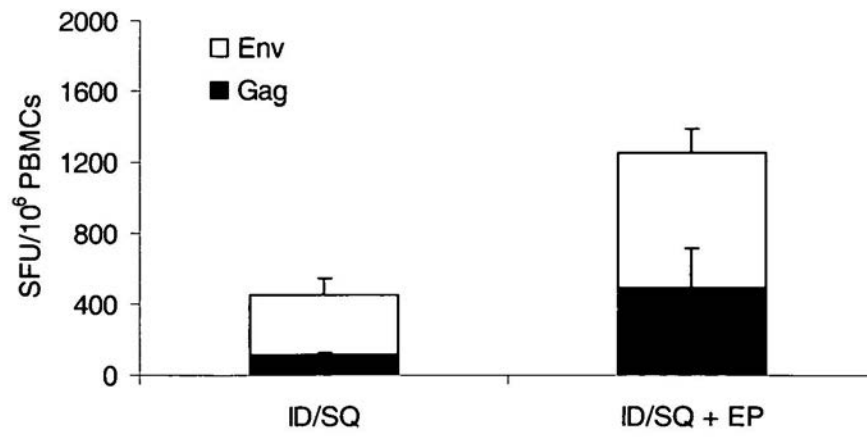
【図 17】



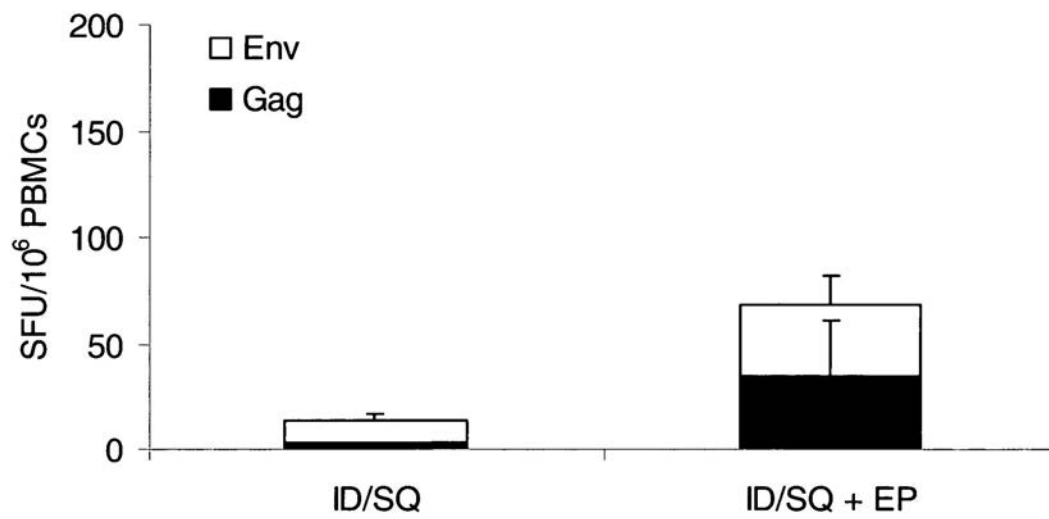
【図 18】



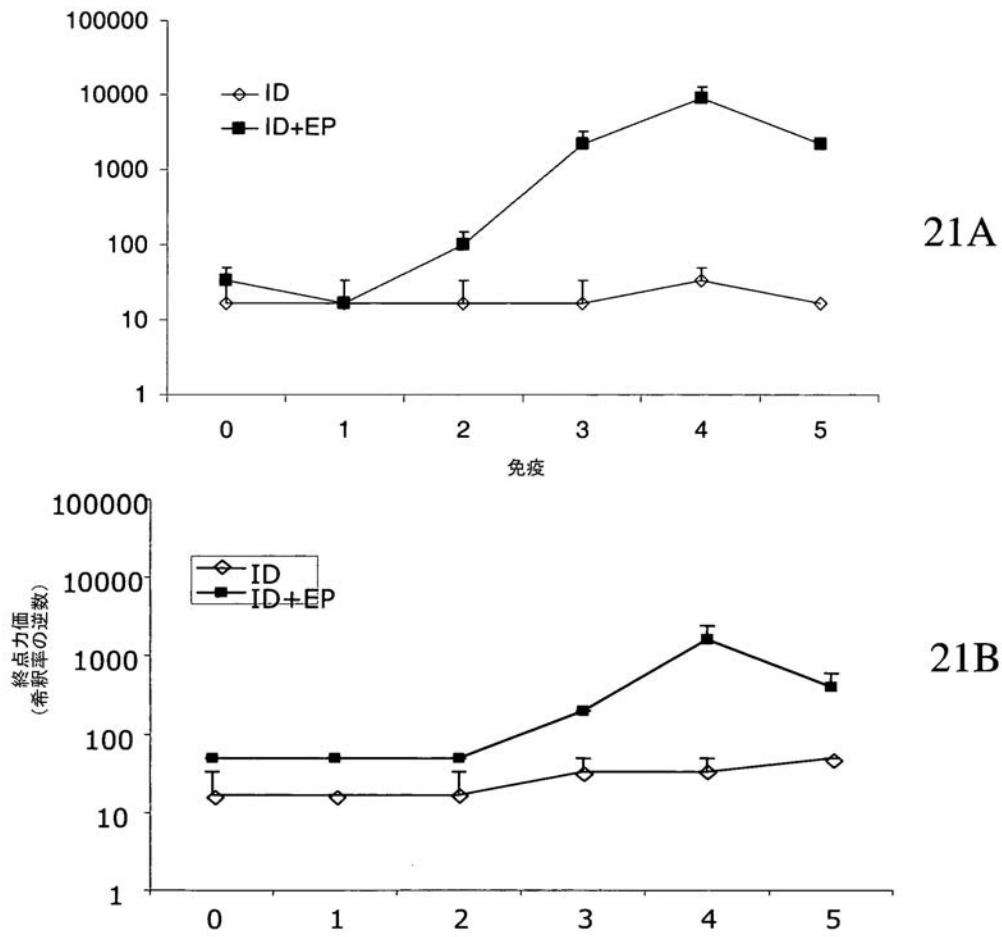
【 図 19 】



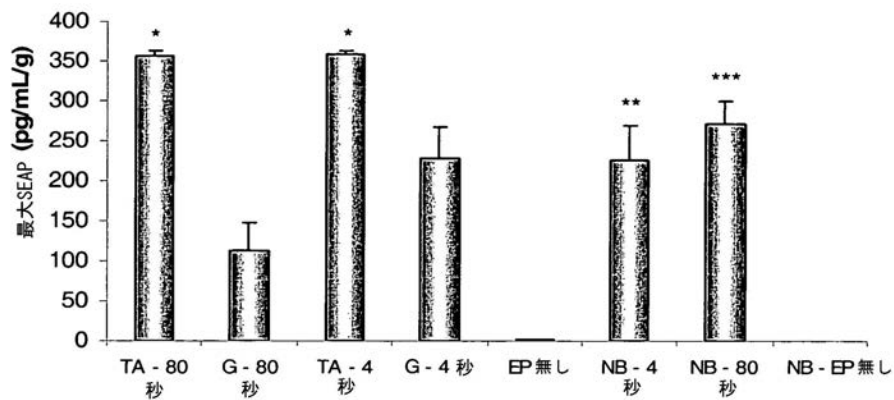
【 図 20 】



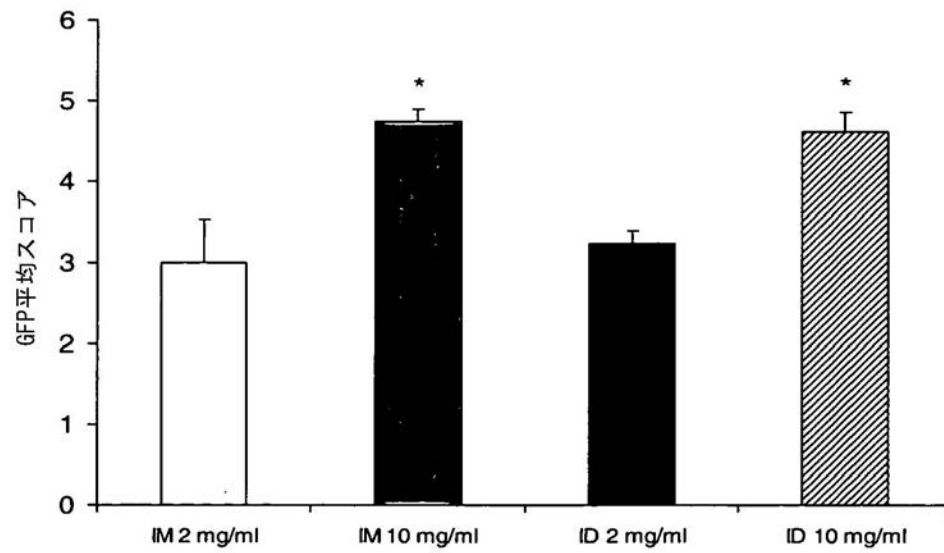
【図 2 1】



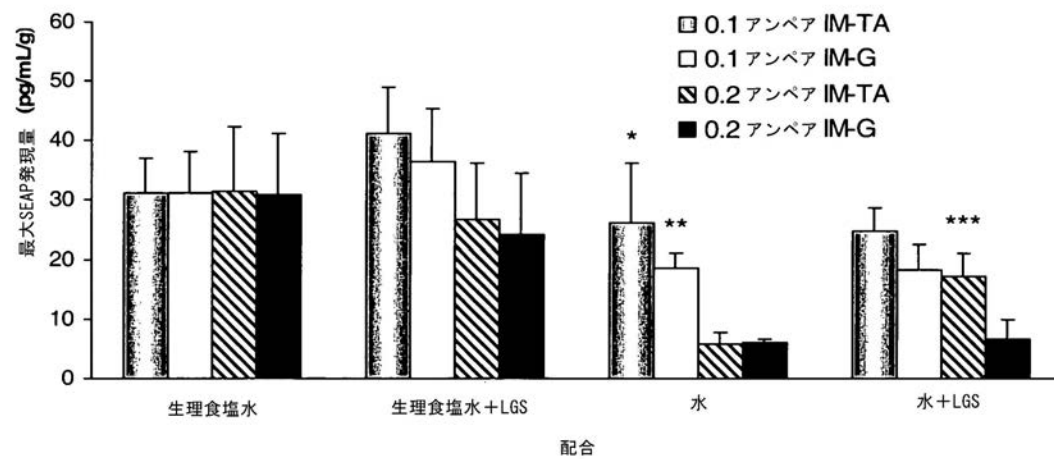
【図 2 2】



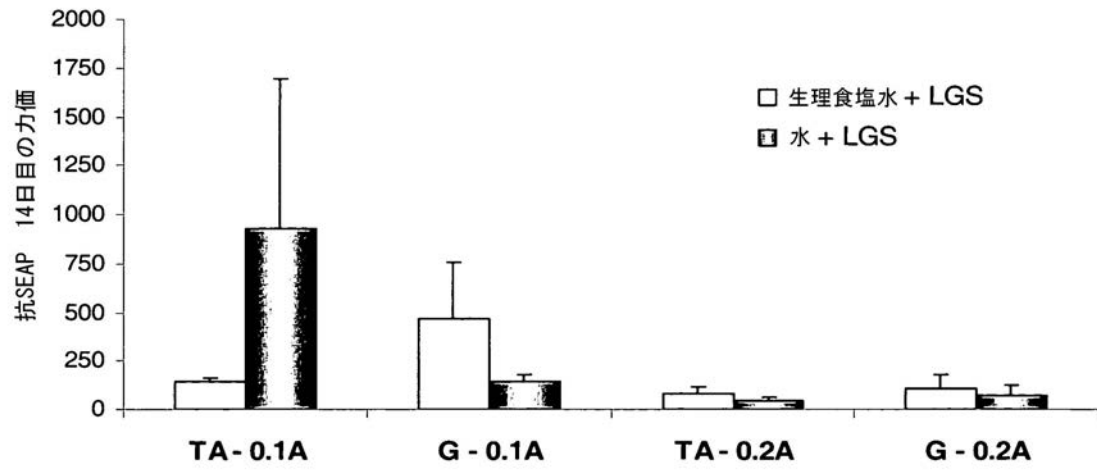
【図 2 3】



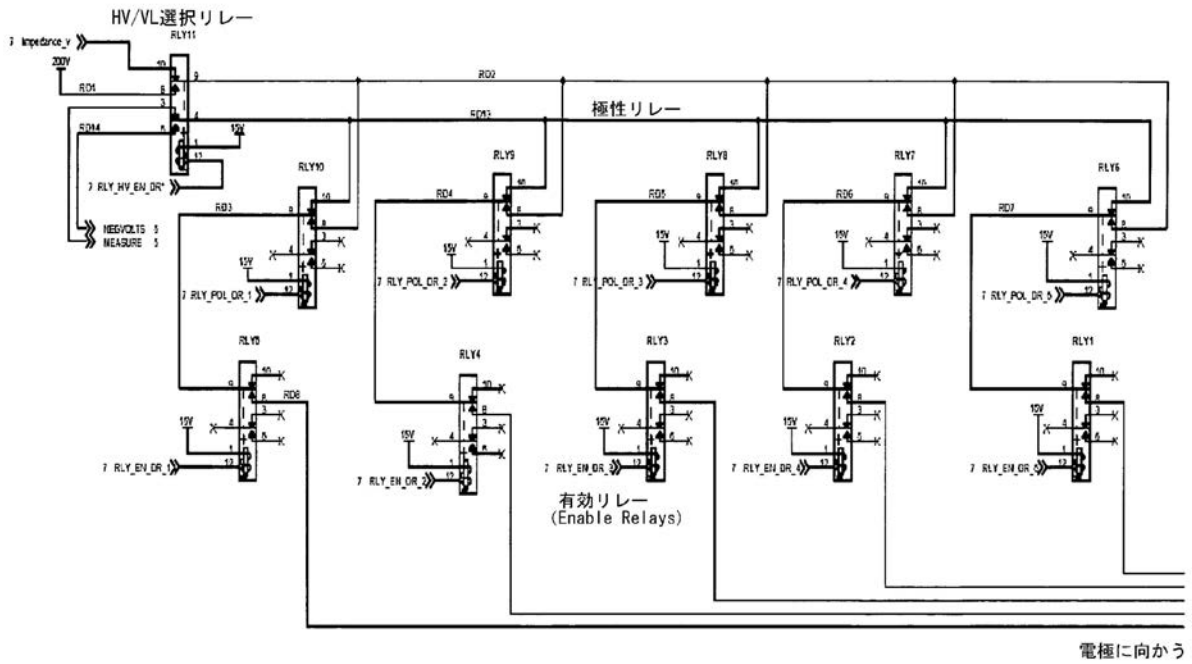
【図 2 4】



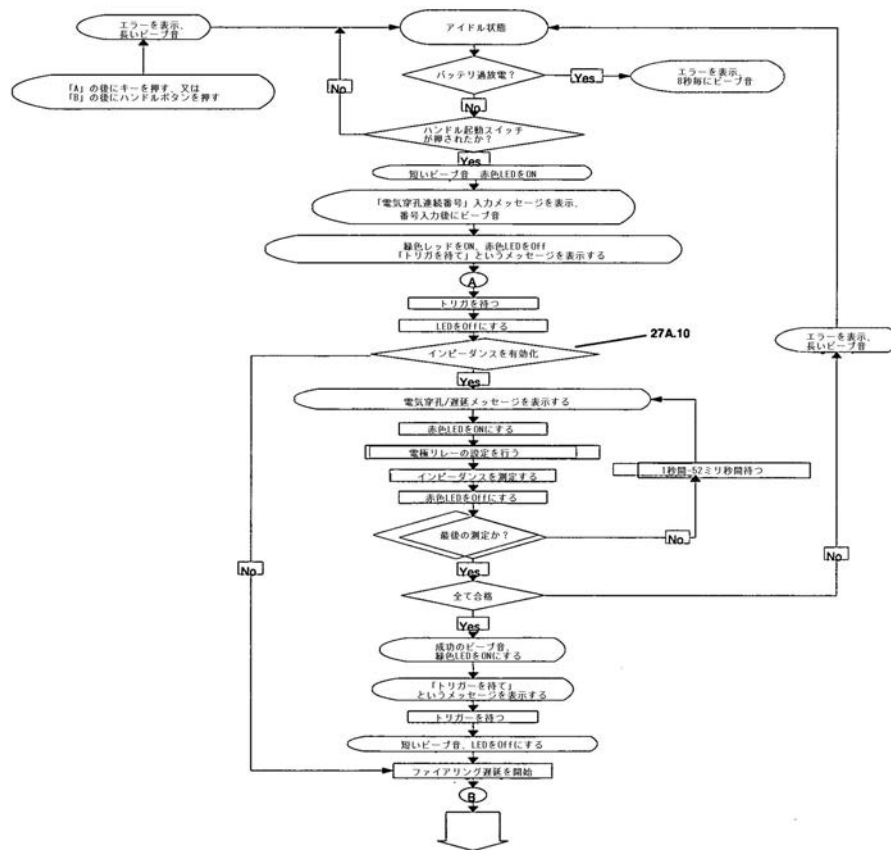
【図 25】



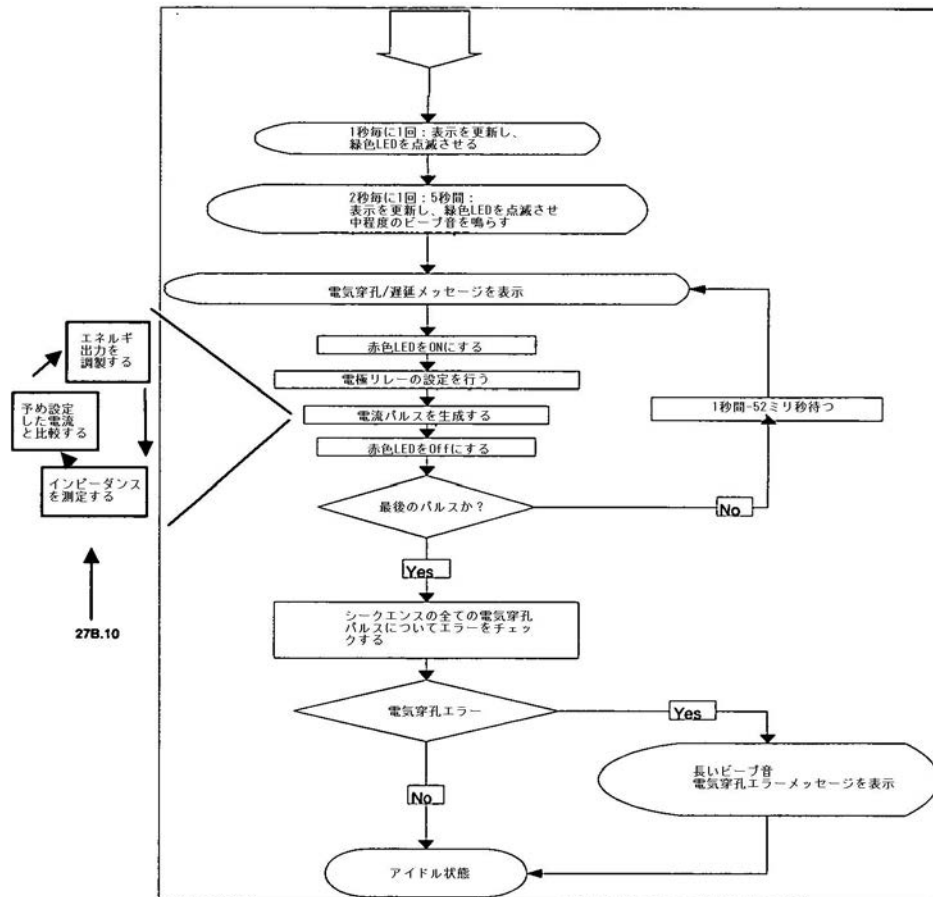
【図 26】



【図27A】



【図27B】



## フロントページの続き

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ドラギア - アクリ, ルクサンドラ

アメリカ合衆国 テキサス州 77035, ヒューストン, スタークリッジ ドライブ 5215

(72)発明者 カン, アミール, エス.

アメリカ合衆国 テキサス州 77381, ザ ウッドランズ, リサーチ パーク ドライブ #  
1704 8900

(72)発明者 ポープ, メリッサ, エー.

アメリカ合衆国 テキサス州 77381, ザ ウッドランズ, タンダークリーク プレース 5  
5

(72)発明者 ブラウン, パトリシア, エー.

アメリカ合衆国 テキサス州 77354, マグノリア, キャトル ドライブ 1826

審査官 宮崎 敏長

(56)参考文献 特表平03 - 502416 (JP, A)

特表2003 - 505114 (JP, A)

特表2005 - 531383 (JP, A)

特表2002 - 529159 (JP, A)

特表2004 - 532654 (JP, A)

特表2003 - 505072 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61N 1/32 - A61N 1/44