



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102905755 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 09

(21) 申请号 201180011473. 6

(22) 申请日 2011. 03. 01

(30) 优先权数据

61/309422 2010. 03. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 08. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/026701 2011. 03. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/109406 EN 2011. 09. 09

(73) 专利权人 因诺维奥制药公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 K. 布罗德里克 J. 麦科伊

S. V. 坎梅雷 林峰 R. 克杰肯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李慧惠 权陆军

(51) Int. Cl.

A61N 1/32(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101370553 A, 2009. 02. 18, 说明书第

3-4, 7, 11-15, 19 页、附图 1-6, 14A-C.

US 2002/0010412 A1, 2002. 01. 24, 说明书第 [0015] 段.

US 2002/0193833 A1, 2002. 12. 19, 说明书第 [0010], [0055], [0058], [0176] 段、附图 16.

US 2006/0084938 A1, 2006. 04. 20, 全文.

US 5968006 A, 1999. 10. 19, 全文.

CN 101563132 A, 2009. 10. 21, 全文.

CN 101370553 A, 2009. 02. 18, 说明书第 3-4, 7, 11-15, 19 页、附图 1-6, 14A-C.

审查员 刘董敏

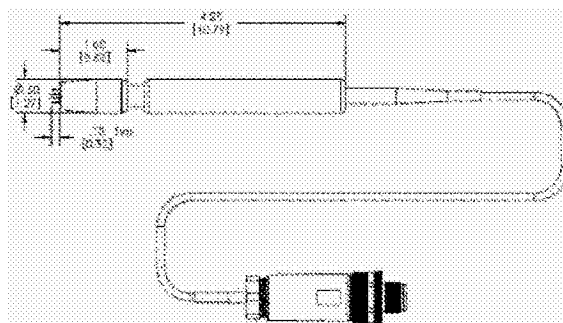
权利要求书2页 说明书14页 附图7页

(54) 发明名称

可耐受的微创性皮肤电穿孔装置

(57) 摘要

一种用于输送疫苗的新型电穿孔装置, 该装置可有效地产生保护性免疫反应和对受试者的可耐受输送(或接近无疼痛); 以及, 使用所述装置以接近无疼痛的方式针对各种传染病和癌症类型对受试者进行疫苗接种的方法。



1. 一种电穿孔装置,所述电穿孔装置包括:

电压发生器;以及

具有与所述电压发生器电连通的多个电极的阵列;其特征在于所述电穿孔装置能够将电势输送至受试者的表皮组织层的角质层与基底层之间,从而导致表皮组织层的角质层与基底层之间的细胞的电穿孔;

其中所述多个电极中的每个电极以 0.5 mm 至 2.5 mm 的距离与每个相邻的电极间隔开;

所述电压发生器通过所述电极将 0.1 伏至 50 伏的电势输送至表皮组织层的角质层与基底层之间;

其中所述电极的远端具有钝的尖端,所述尖端具有锋利的尖头从而允许所述电极穿透表皮组织层到达角质层与基底层之间,并且所述尖端将所述电势从所述电压发生器输送至表皮组织层的角质层与基底层之间;

所述电极被调适成以 0.1 mm 或更小的深度穿透表皮组织层到达角质层与基底层之间;并且

所述电极将电势输送至所述表皮组织的细胞,从而导致根据所述组织的组织病理学分析无可见的组织损伤。

2. 如权利要求 1 所述的装置,其中所述电极被调适成以 0.01 mm 至 0.04 mm 的深度穿透所述表皮组织。

3. 如权利要求 1 和 2 中任一项所述的装置,其中所述电势产生由所述受试者通过视觉类比量表测量所得到的接近无疼痛的疼痛评估。

4. 如权利要求 1 和 2 中任一项所述的装置,其中所述电势是在所述受试者的所述细胞中产生最小程度组织损伤的电势。

5. 如权利要求 3 所述的装置,其中所述电势是在所述受试者的所述细胞中产生最小程度组织损伤的电势。

6. 如权利要求 1、2 和 5 中任一项所述的装置,其中所述电极以 1.5 mm 的距离与每个相邻的电极间隔开。

7. 如权利要求 3 所述的装置,其中所述电极以 1.5 mm 的距离与每个相邻的电极间隔开。

8. 如权利要求 4 所述的装置,其中所述电极以 1.5 mm 的距离与每个相邻的电极间隔开。

9. 如权利要求 1、2、5 和 7-8 中任一项所述的装置,其中所述电压发生器将 1 伏至 15 伏的电势输送至所述表皮组织。

10. 如权利要求 3 所述的装置,其中所述电压发生器将 1 伏至 15 伏的电势输送至所述表皮组织。

11. 如权利要求 4 所述的装置,其中所述电压发生器将 1 伏至 15 伏的电势输送至所述表皮组织。

12. 如权利要求 6 所述的装置,其中所述电压发生器将 1 伏至 15 伏的电势输送至所述表皮组织。

13. 如权利要求 1、2、5、7-8 和 10-12 中任一项所述的装置,其中所述电压发生器以在 1

mA 至 50 mA 范围内变化电流将电势输送至所述表皮组织。

14. 如权利要求 3 所述的装置,其中所述电压发生器以在 1 mA 至 50 mA 范围内变化电流将电势输送至所述表皮组织。

15. 如权利要求 4 所述的装置,其中所述电压发生器以在 1 mA 至 50 mA 范围内变化电流将电势输送至所述表皮组织。

16. 如权利要求 6 所述的装置,其中所述电压发生器以在 1 mA 至 50 mA 范围内变化电流将电势输送至所述表皮组织。

17. 如权利要求 9 所述的装置,其中所述电压发生器以在 1 mA 至 50 mA 范围内变化电流将电势输送至所述表皮组织。

18. 如权利要求 1 和 2、5、7-8、10-12 和 14-17 中任一项所述的装置,其中所述电压发生器历经在 5 msec 至 250 msec 范围内变化的持续时间将电势输送至所述表皮组织。

19. 如权利要求 3 所述的装置,其中所述电压发生器历经在 5 msec 至 250 msec 范围内变化的持续时间将电势输送至所述表皮组织。

20. 如权利要求 4 所述的装置,其中所述电压发生器历经在 5 msec 至 250 msec 范围内变化的持续时间将电势输送至所述表皮组织。

21. 如权利要求 6 所述的装置,其中所述电压发生器历经在 5 msec 至 250 msec 范围内变化的持续时间将电势输送至所述表皮组织。

22. 如权利要求 9 所述的装置,其中所述电压发生器历经在 5 msec 至 250 msec 范围内变化的持续时间将电势输送至所述表皮组织。

23. 如权利要求 13 所述的装置,其中所述电压发生器历经在 5 msec 至 250 msec 范围内变化的持续时间将电势输送至所述表皮组织。

可耐受的微创性皮肤电穿孔装置

[0001] 本项研究部分地由美国陆军拨款 W23RYX-8141-N604 :#08023003 资助。

发明领域

[0002] 本发明尤其涉及电穿孔装置和其用于促进将生物分子引入哺乳动物的皮肤组织细胞中的用途。

[0003] 背景

[0004] 对 DNA 疫苗的免疫反应幅度时常可能取决于三个主要标准 – 最佳化的载体设计、使用合适的佐剂和成功地将质粒输送至目标组织并且随后在目标组织中表达质粒。已证明体内电穿孔在有效地将 DNA 免疫原输送至肌肉和皮肤方面是非常有效的,事实上一些装置已进入人临床试验中。

[0005] 出于许多原因,将药物输送至皮组织(皮内, ID)是在临床环境下的一种引人注意的方法。皮肤是人体最大的器官,最可接近、最易于监测并且具有高免疫能力。然而,皮肤的不透性屏障功能一直是有效进行透皮药物输送的主要障碍。

[0006] 人皮肤延展达到大约 2m^2 的面积并且平均厚度大约为 2.5mm,使其成为人体的最大器官。通常,皮肤具有两种广义的组织类型,表皮和真皮。表皮是不断地发生角质化的复层上皮。皮肤的最外层是角质层(SC)并且起到皮肤的主要屏障功能。SC 是无生存力但具有生化活性的角化细胞的 15-30 个细胞厚度的层。表皮的其它三个层(颗粒层(S. granulosum)、棘层(S. spinosum)、基底层(S. basale))都含有处于不同分化阶段的角质细胞(keratinocytes)以及免疫朗格汉斯细胞(Langerhans cell)以及真皮树突状细胞。

[0007] 用于透皮药物输送和基因输送的物理及化学方法已在世界范围内由诸多团体进行了详细地研究。离子电渗疗法、脂质输送以及基因枪是这些方法的实例。临时增加皮肤通透性的另一种物理方法是电穿孔。电穿孔涉及施加短暂的电脉冲,从而在哺乳动物细胞的脂质双层膜中产生含水通路。这使得包括 DNA 的大分子能够越过细胞膜传递,否则细胞膜的通透性将较低。因此,电穿孔增加了吸收,以及将药物和 DNA 输送至其目标组织的程度。为了进行电穿孔来引起孔隙的形成,需要实现阈值能量,并且由电泳效应产生的移动取决于电场和脉冲长度。

[0008] 在 DNA 疫苗的情况下,电穿孔已被证明可在数量上增强免疫反应,增大这些免疫反应的范围,以及改善剂量的效率。皮肤输送的诸多优点都是引人注意的,这些优点中最显著的是存在多种免疫相关细胞、作为免疫目标器官容易在临床上接近,以及输送的深度最小(微创);然而,一直存在关于实现高转染率以及随后出现加强免疫反应的能力的问题。

[0009] 裸 DNA 通过标准的肌肉内(IM)注射的输送在啮齿类动物模型以外进行实施是出了名地低效的。这导致了在大型哺乳动物和人类中无法实现强大的免疫反应。已开发出一些策略以便增强基于 DNA 的疫苗的表达,所述策略如密码子最佳化、RNA 最佳化、添加前导序列和开发最佳化的共有序列。

[0010] 尽管在载体设计和分子佐剂的使用方面有所改进,但是仍然对于施用 DNA 疫苗的

有效方法存在需要,所述方法引起质粒在所需组织的所需细胞类型中的高水平表达,所需组织最常见的是肌肉、肿瘤或皮肤。此外,仍然需要一种电穿孔装置和输送疫苗的方法,所述装置和方法既可有效地产生保护性免疫反应又具有可耐受性(或接近无痛)。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的一个方面是电穿孔装置,其能够将可耐受的电势输送至受试者的表皮组织层的角质层与基底层之间,从而导致所述组织中的细胞电穿孔,所述电穿孔装置包括:电压发生器;以及,具有与电压发生器电连通的多个电极的阵列。多个电极中的每个电极以大约 0.5mm 至大约 2.5mm 的距离与每个相邻的电极间隔开;电压发生器通过电极将大约 0.1 伏至大约 50 伏的电势输送至表皮组织;并且,电极的远端具有钝的尖端,所述尖端具有锋利的尖头从而允许电极穿透表皮组织层到达角质层与基底层之间,并且所述尖端将电势从电压发生器输送至表皮组织。

[0013] 本发明的另一个方面是电穿孔装置,其能够将可耐受的电势输送至受试者的表皮组织,从而导致所述表皮组织中的细胞电穿孔,所述电穿孔装置包括:电压发生器;以及,具有与电压发生器电连通的多个电极的阵列。多个电极中的每个电极以大约 0.5mm 至大约 2.5mm 的距离与每个相邻的电极间隔开;电压发生器通过电极将大约 0.1 伏至大约 50 伏的电势输送至表皮组织;并且电极被调适成以 0.1mm 或更小的深度穿透表皮组织。

[0014] 本发明的另一个方面是电穿孔装置,其能够将可耐受的电势输送至受试者的表皮组织,从而导致所述组织中的细胞电穿孔,所述电穿孔装置包括:电压发生器;以及,具有与电压发生器电连通的多个电极的阵列。多个电极中的每个电极以大约 0.5mm 至大约 2.5mm 的距离与每个相邻的电极间隔开;电压发生器将大约 0.1 伏至大约 50 伏的电场输送至所述阵列;并且,其中电极将通过视觉类比量表测量为接近无痛的可耐受的电势输送至表皮组织细胞。

[0015] 本发明的另一个方面是电穿孔装置,其能够将可耐受的电势输送至受试者的表皮组织,从而导致所述组织中的细胞电穿孔,所述电穿孔装置包括:电压发生器;以及,具有与电压发生器电连通的多个电极的阵列。多个电极中的每个电极以大约 0.5mm 至大约 2.5mm 的距离与每个相邻的电极间隔开;电压发生器将大约 0.1 伏至大约 50 伏的电场输送至所述阵列;并且,其中电极将由表皮组织细胞的最小程度损伤所证明的可耐受的电势输送至所述表皮组织细胞。

[0016] 本发明的另一个方面是通过使用本文所述的电穿孔装置的电穿孔辅助输送将生物分子输送至受试者的表皮组织细胞的可耐受方法,所述方法包括:将生物分子施用至细胞;使电极与表皮组织接触以使得电极穿透角质层并且位于基底层上方的层中;以及,通过电极将可耐受的电势从电压发生器输送至表皮层细胞。

[0017] 附图简述

[0018] 本领域技术人员参考附图可以对本发明的无数目标和优点进行更好地理解,附图中:

[0019] 图 1 示出微创 EP 装置(“MIED”)的组件的一个实施方案的工程图。

[0020] 图 2 示出 MIED 的一个实施方案的各部件的三维图。“a”示出一次性无菌阵列外壳,“b”示出耐用外壳并且“c”示出一次性阵列(2a)内的电极外壳。

[0021] 图 3 示出 MIED 的一个实施方案的三维图,其为具有可拆卸阵列(用于灭菌)的由

电池供电的手持式装置,“a”示出外部视图。“b”示出内部视图(包括电池)。

[0022] 图 4 示出微创电穿孔装置 MIED 的实施方案的图片。

[0023] (A) 由呈 4×4 阵列型式的以 1.5mm 间隔的套管镀金针状电极组成的原型微创装置的 CAD 图, (B) 所述阵列连接装置的手柄再直接连接至脉冲发生器 Elgen 1000 (在本例中)。EP 可通过启动踏板开关或屏幕上的触发按钮来触发, (C) 所建造的功能原型。

[0024] 图 5 示出使用微创装置的电穿孔产生加强的报道基因转染,即使用 MIED 来施行 GFP 表达构建体的由电穿孔促进的输送之后,用于检测 GFP 表达的豚鼠皮肤组织的荧光图像。

[0025] 在 ID 质粒施用,随后用微创装置在豚鼠皮肤中电穿孔 (EP) 之后的绿色荧光蛋白 (GFP) 表达, (A) 质粒被输送至多个部位 (14) 并且将图样的大小与阵列的大小相比较。 (B) 单一治疗部位的放大实例示出与电极接触的点发生转染

[0026] 图 6 示出微创电穿孔在广泛范围的物种中引起阳性转染,即使用 MIED 来施行 GFP 表达构建体的由电穿孔促进的输送之后,用于检测 GFP 表达的各种动物皮肤组织的荧光图像。

[0027] 在兔、小鼠和猪皮肤中、在存在或不存在用微创装置进行电穿孔 (EP) 的情况下, ID 质粒施用之后的绿色荧光蛋白 (GFP) 表达,各图面示出治疗之后 3 天将动物处死之后的皮肤组织,各图面示出单独注射有 GFP 质粒或随后立即进行 EP 的皮肤。只示,出顶面 (皮肤表面) 视图,皮肤的底面 (下方肌肉) 未示出阳性转染。

[0028] 图 7 示出展示在小鼠中针对流感激发的保护作用的免疫原性结果的图表。

[0029] 7A

[0030] 体液和细胞免疫原性在小鼠中产生针对流感激发的保护用微创装置进行的电穿孔产生加强的抗体和细胞反应,从而在致死流感激发之后为小鼠赋予保护作用, (7A) 使用 i. d. 途径 (微创装置) 或 i. m. (Elgen Twininjector), 用表达来自流感的抗原性 XP 蛋白的质粒 (3ug) 对小鼠进行免疫接种。进行抗体效价和抗原特异性 T 细胞 ELISpot 分析测量。

[0031] 7B

[0032] 体液和细胞免疫原性在小鼠中产生针对流感激发的保护用微创装置进行的电穿孔产生加强的抗体和细胞反应,从而在致死流感激发之后为小鼠赋予保护作用。 (7B) 当用流感的 VN/1203/04 (H5N1) 菌株激发时,经过免疫接种的动物受到针对发病和死亡的保护

[0033] 图 8 示出体液免疫原性在豚鼠中产生保护性 HAI 效价,即展示在豚鼠中针对流感激发的保护作用的免疫原性结果的图表。

[0034] 针对 H1N1 (墨西哥 /2009 和新如勒多尼亚)、H3N2 (布里斯班) 和 H5N1 (越南 /2005) 菌株的第三次免疫接种之后 2 周,来自个别猕猴的 HAI 效价,经由 i. d. 途径 (微创) 或 i. m. 途径 (Elgen Twininjector), 用以前描述的 SynCon 流感质粒疫苗对动物进行免疫接种。

[0035] 图 9 示出体液免疫原性在非人灵长类中产生保护性 HAI 效价,即展示在非人灵长类动物中针对流感激发的保护作用的免疫原性结果的图表。

[0036] 针对两种 H1N1 菌株 (墨西哥 /2009 和新加勒多尼亚) 的第二次免疫接种之后 2 周,来自个别猕猴的 HAI 效价。经由 i. d. 途径 (微创) 或 i. m. 途径 (Elgen Twininjector)、用之前公布的 SynCon 流感质粒疫苗对动物进行免疫接种。

[0037] 发明详述

[0038] 给出以下简略或简短的定义以便帮助了解本发明的优选实施方案。在此给出的简略定义并非详尽无遗的,也不与如在本领域或字典含义中所理解的定义相矛盾。本文给出的简略定义用来补充或更明确地界定本领域已知的定义。

[0039] 本文使用术语“恒定电流”来定义在输送至组织的电脉冲的持续时间内由同一组织或界定所述组织的细胞所接收或者经历的电流。电脉冲由本文所述的电穿孔装置来输送。因为本文提供的电穿孔装置具有优选具备即时反馈的反馈元件,所以此电流在所述组织中在电脉冲的持续时间内保持在恒定的电流强度下。反馈元件可以在整个脉冲持续时间内测量组织(或细胞)的电阻并且导致电穿孔装置改变其电能输出(例如,增加电压),以使得同一组织中的电流在整个电脉冲期间(大约几微秒)以及在不同脉冲之间保持恒定。在一些实施方案中,反馈元件包括控制器。所描述的由本文中的装置输送的电流强度值优选为恒定电流强度值。

[0040] 本文使用术语“恒定电压”来定义在输送至组织的电脉冲的持续时间内由同一组织或界定所述组织的细胞所接收或者经历的电压或电势。电脉冲由本文所述的电穿孔装置来输送。因为本文提供的电穿孔装置具有优选具备即时反馈的反馈元件,所以此电压在所述组织中在电脉冲的持续时间内保持在恒定的电压下。反馈元件可以在整个脉冲持续时间内测量组织(或细胞)的电阻并且导致电穿孔装置改变其电能输出,以使得同一组织中的电压在整个电脉冲期间(大约几微秒)以及在不同脉冲之间保持恒定。在一些实施方案中,反馈元件包括控制器。所描述的由本文中的装置输送的电压值优选为恒定电压值。

[0041] 术语“反馈”或“电流反馈”可以互换使用,并且意思是所提供皮肤 EP 装置的有源响应,该响应包括测量电极之间的组织中的电流和相应地改变 EP 装置输送的能量输出以便使电流保持在恒定水平。这一恒定水平是在启动脉冲序列或电疗之前由使用者预设的。优选地,反馈由皮肤 EP 装置的电穿孔部件(例如控制器)来完成,因为所述皮肤 EP 装置中的电路能够连续地监测电极之间的组织中的电流并且将所监测的电流(或组织内的电流)与预设电流比较并且连续地进行能量输出调整以便将所监测的电流保持在预设水平。在一些实施方案中,反馈回路是瞬时的,因为该反馈是一种模拟的闭环反馈。

[0042] 本文使用的术语“生物分子”是指核酸序列、蛋白质、脂类、微泡(如载有药物的小泡)和药品。优选地,生物分子是疫苗,更优选地,生物分子是 DNA 疫苗,甚至更优选是 DNA 质粒疫苗。

[0043] 如本文可以互换使用的术语“电穿孔”、“电通透作用”或“电动力学增强”(“EP”)是指使用跨膜电场脉冲以便在生物膜中诱导微观通路(孔隙);所述微观通路的存在允许如质粒、寡核苷酸、siRNA、药物、离子和水的生物分子从细胞膜的一侧传递到另一侧。

[0044] 本文使用术语“分散电流”来定义从本文所述的电穿孔装置的各种针状电极阵列中输送的电流的型式,其中所述型式最大限度地减少或优选消除被电穿孔的组织任何区域上的电穿孔相关的热应力的发生。

[0045] 本文使用的术语“反馈机制”是指由软件或硬件(或固件)执行的过程,这一过程接收所需组织的阻抗(在输送能量脉冲之前、期间和/或之后)并且将该阻抗与优选为电流的预设值比较,并且调整所输送的能量脉冲以便实现预设值。本文在讨论反馈机制时使用术语“阻抗”,并且阻抗可以根据欧姆定律来转换成电流值,从而使得可与预设电流进行

比较。在优选的实施方案中，“反馈机制”由模拟闭环电路执行。

[0046] 如本文使用的术语“微创”是指由所提供的电穿孔装置的针状电极所进行的有限穿透，并且可以包括非侵入性电极（或非穿透性针）。优选地，穿透达到穿过角质层的程度，优选进入到最外层的活组织层即颗粒层中，但不穿透基底层。穿透深度不超过 0.1mm，优选深度在大约 0.010mm 至大约 0.040mm 范围内变化，以便穿透角质层。优选地，这种穿透使用具有套管末端的电极来完成，所述套管末端经过研磨以便提供锋利的尖头，从而允许穿透角质层但避免深层穿透。

[0047] 术语“可耐受”或者“接近无痛”在本文中可以互换使用，并且在提及电穿孔时，术语的意思是与现有的电穿孔装置的典型情况相比，与电穿孔相关的疼痛水平大致降低。更具体地说，可耐受（或者接近无痛）的电穿孔是使用本文所述的避免对肌肉进行电穿孔的 MIED 与将较低电场输送至表皮层的角质层与基底层之间相结合的结果。优选地，电场包括低电压水平，即例如 0.01V 至 70V，优选地 1V 至 15V。在使用 VAS 测量时，经历根据本文提供的方法所进行的 MIED 电穿孔的受试者感受到的疼痛水平在从其无痛或者没有疼痛的得分算起的 20% 以内（全量表的 20% 以内），例如，在 0-10 分全量表的情况下在 2 分范围内，优选在从其无痛得分算起的 10% 以内。

[0048] 本发明的一个方面是电穿孔装置，其能够将可耐受的电势输送至受试者的表皮组织层的角质层与基底层之间，从而导致所述组织中的细胞电穿孔，所述电穿孔装置包括：电压发生器；以及，具有与电压发生器电连通的多个电极的阵列。多个电极中的每个电极以大约 0.5mm 至大约 2.5mm 的距离与每个相邻的电极间隔开；电压发生器通过电极将大约 0.1 伏至大约 50 伏的电势输送至表皮组织；并且，电极的远端具有钝的尖端，所述尖端具有锋利的尖头，从而允许电极穿透表皮组织层到达角质层与基底层之间，并且所述尖端将电势从电压发生器输送至表皮组织。在一些情况下，电极的远端具有尖端，该尖端通常是钝的，但是具有一个锋利的尖头，或者换句话说，锋利的尖头后毗邻较浅或较钝的角度。例如，电极可以具有为套管尖端的远端末端，该套管尖端具有离轴 10° 达到几乎与针轴垂直的磨针 (grind)。

[0049] 本发明的另一个方面是电穿孔装置，其能够将可耐受的电势输送至受试者的表皮组织，从而导致所述表皮组织中的细胞电穿孔，所述电穿孔装置包括：电压发生器；以及，具有与电压发生器电连通的多个电极的阵列。多个电极中的每个电极以大约 0.5mm 至大约 2.5mm 的距离与每个相邻的电极间隔开；电压发生器通过电极将大约 0.1 伏至大约 50 伏的电势输送至表皮组织；并且电极被调适成以 0.1mm 或更小的深度穿透表皮组织。

[0050] 本发明的另一个方面是电穿孔装置，其能够将可耐受的电势输送至受试者的表皮组织，从而导致所述组织的细胞电穿孔，所述电穿孔装置包括：电压发生器；以及，具有与电压发生器电连通的多个电极的阵列。多个电极中的每个电极以大约 0.5mm 至大约 2.5mm 的距离与每个相邻的电极间隔开；电压发生器将大约 0.1 伏至大约 50 伏的电场输送至阵列；并且，其中电极将通过视觉类比量表测量为接近无痛的可耐受的电势输送至表皮组织细胞。

[0051] 本发明的另一个方面是电穿孔装置，其能够将可耐受的电势输送至受试者的表皮组织，从而导致所述组织中的细胞电穿孔，所述电穿孔装置包括：电压发生器；以及，具有与电压发生器电连通的多个电极的阵列。多个电极中的每个电极以大约 0.5mm 至大约

2.5mm 的距离与每个相邻的电极间隔开；电压发生器将大约 0.1 伏至大约 50 伏的电场输送至所述阵列；并且，其中电极将由表皮组织细胞的最小程度损伤所证明的可耐受的电势输送至所述表皮组织细胞。

[0052] 在一些实施方案中，所述装置具有被调适成以 0.1mm 或更小的深度并且优选以大约 0.01mm 至大约 0.04mm 的深度穿透表皮组织的电极。优选地，电极以大约 1.5mm 的距离与每个相邻的电极间隔开。此外优选地，电压发生器将大约 1 伏至大约 15 伏，更优选大约 15 伏的电势输送至表皮组织。

[0053] 在一些实施方案中，装置输送可耐受的电势，输送所述电势历经的持续时间在在大约 5msec 至大约 250msec 范围内变化，以及历经介于所述范围之中的持续时间范围与时间。

[0054] 在一些实施方案中，装置输送的可耐受的电势产生由所述受试者通过视觉类比量表测量所得到的接近无疼痛的疼痛评估。VAS 是 100mm 长的水平线，该水平线上的 0mm 表示无疼痛，并且 100mm 表示最严重的疼痛。接近无痛是使用 VAS 方法产生的平均得分为大约 < 20mm (95% 置信区间内)，优选 < 10mm (95% 置信区间内) 的得分。

[0055] 在一些实施方案中，装置输送的可耐受的电势是在受试者的所述细胞中产生最小程度的组织损伤，并且优选根据组织的组织病理学分析是不可见的组织损伤的电势。可以利用组织学分析来评估视觉损伤。

[0056] 组织学分析表明在表皮上层中的转染

[0057] 组织病理学分析是由豚鼠皮肤组织来进行。每个图面都示出已经通过 MID 电穿孔的组织。所有载玻片均已经用苏木精和伊红染色，并且在荧光显微镜 (×20 的物镜) 下观察，以便观测 GFP 阳性。示出了治疗之后 3 天将动物处死后皮肤组织的组织病理学：分析没有发现在用微创装置电穿孔后的相关组织损伤。换句话说，经过电穿孔的组织组织病理学分析显示与未经过电穿孔的组织类似的结果。

[0058] 本发明的另一个方面是通过使用本文所述的电穿孔装置的电穿孔辅助输送将生物分子输送至受试者的表皮组织细胞的可耐受方法，所述方法包括：将生物分子施用至细胞；使电极与表皮组织接触以使得电极穿透角质层并且位于基底层上方的层中；以及通过电极将可耐受的电势从电压发生器输送至表皮层细胞。

[0059] 在一些实施方案中，所述方法包括操纵电极以便以 0.1mm 或更小的深度并且优选以大约 0.01mm 至大约 0.04mm 的深度穿透表皮组织。所述阵列可在注射部位被手动地来回调整（或摆动），以确保良好的接触并且导致电极尖端穿破角质层。优选地，输送步骤包括输送可耐受的电势，所述可耐受的电势产生由所述受试者通过视觉类比量表测量所得到的接近无疼痛的疼痛评估。此外，优选地，输送步骤包括输送可耐受的电势，所述可耐受的电势在受试者的所述细胞中产生最小程度的组织损伤。输送步骤优选地将大约 0.1 伏至大约 15 伏的电势输送至细胞。

[0060] 在一些实施方案中，所述方法包括输送步骤，该输送步骤包括历经在大约 5msec 至大约 250msec 范围内变化的持续时间，以及历经介于所述范围之中的持续时间范围与时间，并优选历经 100msec 来输送电势。

[0061] 通用的电穿孔装置

[0062] 提供电穿孔装置发生器或控制器，其可以在产生可耐受的电穿孔的低电场下将电

能脉冲输送至表皮组织的角质层与基底层之间。优选地,电穿孔主要或唯一地在颗粒层发生。装置通过所提供的 MIED,通过能够穿透角质层的针状电极来输送能量脉冲。

[0063] 在一些实施方案中,优选在所治疗的组织中保持恒定电流的本发明 MIED 的响应是通过皮肤 EP 装置中的反馈机制来完成,所述反馈机制防止组织受热、减少组织损伤、疼痛,并且有助于所提供的皮肤电穿孔技术的整体成功。在一些实施方案中,MIED 可以进一步包括控制器;与控制器电连通的波形发生器;与控制器电连通的波形记录仪;以及,电连接至波形发生器的电池。控制器可以接收使用者的输入,根据输入来指示波形发生器将能量脉冲输送至所需组织,并且根据所输送的能量脉冲将数据传送至波形记录仪;并且,其中电池将电荷发送至波形发生器,电池是锂离子、镍金属氢化物、铅酸和镍镉电池。优选地,MIED(图 3)是便携式的。便携式装置可以通过电池组来操作,并且适合于出于治疗或免疫目的的大规模免疫。

[0064] MIED 可以是所提供的电极阵列和施配器以及各种电场发生(或者电脉冲发生)部件或发生器的组合。在一些实例中,发生器可以选自己知电穿孔装置中的一种电穿孔装置,包括但不限于以下装置:在标题为“Constant Current Electrode Assembly for Electroporation”的美国专利号 7,245,963 中,以及尤其是美国专利号 5,273,525、美国专利号 6,110,161、美国专利号 6,261,281、美国专利号 6,958,060 以及美国专利号 6,939,862 中描述的电穿孔装置。在更优选的实例中,发生器是用于 CELLECTRA[®] EP 装置和 Elgen EP 装置(均来自 Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA)的发生器。上述专利参考文件通过引用整体结合在此。

[0065] 电穿孔针

[0066] 各种已知的能够输送电荷的电穿孔针可以并入 MIED 中。电穿孔针是微创的,其包括非侵入性针。优选地,所述针是锋利的,例如一些实施例使用套管磨针以使得其可以穿透角质层并且到达颗粒层。套管末端可以经过研磨以便形成锋利的尖头,该尖头允许穿透角质层但是避免深层穿透。在一些实施例中,电极的远端具有尖端,该尖端通常是钝的,但是具有一个锋利的尖头,或者换句话说,锋利的尖头后毗邻较浅或较钝的角度。例如,电极可以具有为套管尖端的远端末端,该套管尖端具有离轴 10° 达到几乎与针轴垂直的磨针。

[0067] 阵列

[0068] 多种已知的针阵列形成物可以与当前 MIED 一起使用。所涵盖的这些针阵列形成物包括呈大体平面布置的任何数量的电极、任何几何型式的电极。优选地,电极经过布置均匀地分布在电极阵列上(或在电极所连接的基座或衬底上)。更优选地,针状电极以正方形样布置形式来进行布置,其中每个相邻的针状电极以大约相同的距离间隔开(除正方形边缘上的电极以外)。

[0069] 在一些实施方案中,阵列由以三角形型式等距离间隔开的至少三个针、以圆形型式等距离间隔开的至少四个针,或者以 2×2、3×3、4×4、5×5 或更大的方形型式来布置的针。或者,所述型式可以是长方形或菱形。优选地,针状电极以 4×4 针阵列布置形式来布置。4×4 针阵列的实施例示于图 1 中。图 2 示出了 MIED 外壳、阵列外壳和电极外壳的实施例。每个针状电极都可以 150mm 或更小、100mm 至 1mm、50mm 至 1mm、40mm 至 1mm、30mm 至 1mm、20mm 至 1mm、10mm 至 1mm、5mm 至 1mm、5mm 至 2mm、5mm 至 2mm 并且优选 2mm 并且更优选地 1.5mm 的距离与每个相邻的针状电极间隔开。

[0070] 电脉冲（所输送的电势）

[0071] 与典型 EP 方法相比，所提供的装置在更低的电压和电流下操作以便增强耐受性，同时维持生物分子的成功转染（如由表达和随后免疫反应所证明的）。装置通常是与被设计来根据需要输送恒定电压、电流或两者组合的脉冲发生器一起使用。由 MIED 用于实现皮肤组织中的细胞转染的电脉冲是提供用于产生可耐受电穿孔所需低电能的任何已知的脉冲型式。在一些实施方案中，MIED 以 0.01V 至 70V、0.01V 至 50V、0.01V 至 40V、0.01V 至 30V、0.01V 至 20V、0.01V 至 15V、0.1V 至 70V、0.1V 至 50V、0.1V 至 40V、0.1V 至 30V、0.1V 至 20V、0.1V 至 15V 并且优选 1V 至 15V 的电压水平将电脉冲输送至所需组织。更优选地，当 MIED 的相邻电极间隔开大约 2mm 并且优选 1.5mm 时，电压水平为 15V。

[0072] 在一些实施方案中，MIED 输送可耐受的电能，该电能的特征为电脉冲将以下电流输送至所需组织：0.2mA 至 100mA、0.1mA 至 100mA、0.5mA 至 100mA、1mA 至 100mA、1mA 至 80mA、1mA 至 60mA、1mA 至 50mA、1mA 至 40mA、1mA 至 30mA、但是优选 1mA 至 100mA，并且更优选 1mA 至 30mA，并且更优选 10mA。

[0073] 与 MIED 相关的可耐受电脉冲的特征都是每次脉冲的短持续时间，该短持续时间包括以下脉冲长度：5msec 至 250msec、10msec 至 250msec 脉冲、20msec 至 250msec、40msec 至 250msec、60msec 至 250msec、80msec 至 250msec、100msec 至 250msec、20msec 至 200msec、40msec 至 200msec、60msec 至 200msec、80msec 至 200msec、100msec 至 200msec、20msec 至 150msec、40msec 至 150msec、60msec 至 150msec、80msec 至 150msec、100msec 至 150msec、100msec 至 140msec、100msec 至 130msec、100msec 至 120msec、100msec 至 110msec，并且更优选 100msec。

[0074] 与 MIED 相关的可耐受电脉冲的特征还有低重复脉冲。重复进行由 MIED 输送的脉冲以便针对每次疫苗接种来输送以下数量的脉冲：1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 次，并且优选 1 至 6 次脉冲，并且更优选 2 次脉冲。

[0075] 施用疫苗 +EP 的组织

[0076] MIED 用于将实现电穿孔的电能输送至皮肤组织细胞以便辅助将生物分子输送至所述组织中的细胞，并且优选地辅助用 DNA 疫苗进行的疫苗接种。优选地，电极仅仅穿透作为恰好位于角质层下方并且位于基底层上方的活组织层的皮肤组织；并且优选地仅进入颗粒层中。通常使用 Mantoux 技术将生物分子输送至目标组织。

[0077] 在手柄中具有电子元件的电池供电型式（参见图 3）

[0078] MIED 可为便携式 EP 装置。提供便携式独立 MIED 装置，其中所述装置是手持式的并且其中电脉冲的电能来源是至少一个具有 1.5V 与 12V 之间的电压电位的电池。

[0079] 便携式 MIED 可包括外壳，该外壳中含有所述电池、包括与所述电池电连通并且由所述电池供电的电路的电路板，以及至少一个能够保持 1000uF 与 100000uF（微法拉）之间的电容的电容器。在相关的实施方案中，各部件（即，电池、电路以及电容器）通常在所述外壳中以线性或并排布置形式在空间上进行放置，以使得所述外壳可具有能够握在操作装置的人的手中的大体上长方形或圆柱形形状。例如，所述外壳具有近端和远端以使得所述长方形的圆柱体或较长部分位于所述近端与所述远端之间，并且其中所述电池位于所述外壳的所述近端内并且可经由可移除的罩盖从此末端来接近。在所述外壳的远端可安置有电导管，该电导管与所述电路电连通并且充当用于连接至用以完成电路的至少一个阴极和至

少一个阳极的连接器的,所述电路包括通过所述电容器与电路由所述电池来供电的电穿孔脉冲。所述外壳的远端还可包含与所述外壳相关联或作为所述外壳一部分的用于半永久性或永久性地连接头部组件和 / 或将所述头部组件拆卸的机构,所述头部组件本身包括以下任何一个:用于容纳液体治疗剂的储槽;与所述储槽流体连通的孔口,所述液体可穿过所述孔口被引导至身体组织;将来自所述储槽的所述液体移动穿过所述孔口的能量来源;以及,至少一个电极,该至少一个电极包括至少一个阳极和一个阴极。

[0080] 在一些实施方案中,便携式 MIED 能够向哺乳动物的皮肤组织输送能够对所述组织内的细胞进行电穿孔的电脉冲,所述电脉冲具有通常介于 0.1V 与 70V 之间、优选 0.1V 至 50V、更优选 1V 至 15V 的电压。此外,装置能够输送所述场强度的电穿孔脉冲历经介于 5 毫秒与 250 毫秒之间,并且更通常介于 10 毫秒与 100 毫秒之间、更通常介于 30 毫秒与 70 毫秒之间并且更优选 50 毫秒的时间。另外,装置能够经由其微处理器来输送电穿孔电能的双极脉冲或单极脉冲,所述双极或单极脉冲可包括预定序列的多次脉冲,和 / 或电压成形脉冲,或甚至指数放电脉冲。这种可变脉冲能力提供电穿孔过程的潜在最佳化,包括电穿孔脉冲的电压、脉冲波形、持续时间以及极性的最佳化。

实施例

[0081] 本发明进一步在以下实施例中说明。应理解,这些实施例虽然指示本发明的优选实施方案,但只是为了说明而给出。从以上讨论和这些实施例,本领域技术人员可确定本发明的本质特征,并且在不背离本发明精神和范围的情况下,可作出本发明的各种变化和修改以便使其适应各种用途和条件。因此,根据以上描述,除了本文示出和描述的修改方案以外,本发明的各种修改方案对于本领域技术人员来说是显而易知的。这些修改方案也意图落入附加权利要求的范围内。

[0082] 可进行试验来评估由本文所述的电穿孔装置产生的耐受性或减少的疼痛。在施行电穿孔时,研究人员可对每位患者起动秒表。每位患者将在经过训练的研究人员的监督下执行标准疼痛评估,并且患者将这些评估记录在日记册中,记录时间为:电穿孔后 5、10、15、20、30 和 45 分钟、一小时以及一个半小时,然后在电穿孔后 12 小时内每小时记录一次,并且在电穿孔后 16 小时和 24 小时进行记录。患者使用分类量表和 VAS 来测量疼痛强度。如之前的说明,分类量表包括四个类别:

[0083] 0 = 无疼痛,1 = 轻度疼痛,2 = 中度疼痛,以及 3 = 重度疼痛。

[0084] VAS 是 100mm 长的水平线,该水平线上的 0mm 表示无疼痛,并且 100mm 表示最严重的疼痛。使用这种 100mm 量表,接近无疼痛的得分是从指示无疼痛(无疼痛感觉)的得分算起 20mm 内的得分。在一些情况下,接近无疼痛是从无疼痛得分算起 10mm 的得分。

[0085] 方法

[0086] 以下方法用于以下每个实施例中,在适当情况下进行讨论。

[0087] 微创装置设计 - 构造由以 1.5mm 间隔的直径为 0.0175 英寸的 4×4 镀金套针组成的电极阵列以便与 ELGEN1000 (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) 脉冲发生器或电池供电低压电路结合使用。

[0088] 质粒制剂 - gWizGFP 质粒购自 Aldevron (Fargo ND)。NP 质粒编码源自波多黎各 8 (H1N1) 流感菌株的全长 NP。M2 质粒编码源自新加勒多尼亚 /99 (H1N1) 流感菌株的全长

M2。构建体具有突变的核靶向信号并且通过 GeneArt (Germany) 来最佳化与合成。所有质粒在注射之前在 $1 \times \text{PBS}$ 中进行稀释。将 SYNCON™ (合成 DNA 构建体) 流感疫苗质粒混合物 (100 微克 / 质粒) 在注射之前在 $1 \times \text{PBS}$ 中进行稀释, 所述混合物含有 pGX2005 (SYNCON™ 疫苗构建体, 其编码 H1HA 的共有序列) 和 pGX2009 (SYNCON™ 疫苗构建体, 其编码猪 H1HA 的共有序列)。

[0089] 动物 - 雌性 Hartley 豚鼠 (品系代码 051)、雌性 New Zealand 兔和雌性 Balb C 小鼠购自 Charles River 实验室。雌性 Wistar 大鼠购自 Charles River 实验室。雌性约克郡猪购自 S&S Farm's (Ramona, CA)。豚鼠、大鼠、兔和小鼠豢养于 BioQuant (San Diego, CA)。雄性 (4) 和雌性 (4) 猕猴 (穆拉托猕猴 (Macaca mulatto)) 单独豢养于 BIOQUAL, Inc. (Rockville, MD), 并且自由取用食物和水。在实验之前, 使猕猴在检疫中适应新环境至少 30 天。所有动物根据机构动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC) 的标准来豢养和操作。

[0090] 动物预备 - 毛发去除之后, 对 Hartley 豚鼠观察到的 GFP 报道基因结果与先前实验中对 IAF 无毛豚鼠观察到的结果相同。由于毛发去除似乎对于所得转染没有影响并且由于成本方面的考虑, 我们选择在 Hartley 动物中进行其余部分的研究。在治疗之前 24 小时, 将 Hartley 豚鼠剃毛并且将残茬通过脱毛霜 (dilapatory cream) (VEET) 来去除。将小鼠、大鼠、兔、猪和猕猴在治疗之前剃毛。

[0091] DNA 注射 - 猕猴通过注射氯胺酮来镇静。所有其它动物通过吸入异氟醚来镇静。向所有动物皮内注射 (Mantoux 方法 - 29 号胰岛素针) $50 \mu\text{l}$ 的含有所需剂量质粒的 $1 \times \text{PBS}$ 。向小鼠肌肉内注射 $50 \mu\text{l}$ 的含有所需剂量质粒的 $1 \times \text{PBS}$ 至四头肌。向猕猴肌肉内注射 $400 \mu\text{l}$ 的含有所需剂量质粒的 $1 \times \text{PBS}$ 至四头肌。添加空载体以便维持每一组的相等 DNA 量。

[0092] 皮肤装置电穿孔 - 注射 DNA 之后立即将皮肤装置施加至皮肤注射部位。将阵列在注射部位处“摆动”以便确保良好接触并且通过来自 Elgen 1000 或低电压电池电路的脉冲发生来实现电转移。所使用的参数是 100ms 持续时间的三次 15 伏特脉冲。

[0093] 肌肉电穿孔 - IM 注射之后立即通过将具有 4mm 电极间距的 27G、2 针阵列插入被注射的肌肉部位来执行电穿孔。使用 Elgen 1000 来输送各自持续 60ms 的两次 125V/cm 脉冲。

[0094] 对皮肤进行成像 - 在终止之后, 从死后的动物中取出皮肤样品或活检并且存放在冰上直到在 480nm 下用 OV 100 成像显微镜 (AntiCancer Inc., San Diego, CA) 成像。

[0095] 组织病理学 - 在终止之后, 从死后的动物中取出皮肤样品或活检并且立即保存在 10% 中性缓冲福尔马林中并且送至 Pacific Pathology, San Diego, CA 进行处理和组织病理学分析。将适当组织予以修整、处理、包埋于石蜡中、以大约 $5 \mu\text{m}$ 进行切片, 并且用苏木精和伊红染色。所得载玻片由委员会认证的病理学家来检查。在 Burnham Institute, San Diego, CA, 使用具有 $10 \times$ 物镜的 Zeiss Axioplan 显微镜观测切片。

[0096] 检测经过免疫的小鼠血清中的 NP 抗体 - 针对 NP 的抗体反应是通过 ELISA, 使用来自经过免疫的小鼠的血清来评估。将小鼠在最后一次免疫之后两周做眼球后放血。在 4°C 下, 用 NP ($5 \mu\text{g/mL}$, Imgenex IMR-274) 涂布 Nunc Maxi-Sorp Immuno 板过夜。未结合的抗原通过使用具有 0.05% 吐温 -20 的 PBS 的自动板清洗液来从板上清洗掉。在 37°C 下, 通过添加具有 0.5% BSA 的 200 μL PBS 来针对非特异性结合将板阻断一小时。如上清洗之后, 将

血清在具有 0.2% BSA 和 0.05% 吐温-20 的 PBS 中 1 : 50 稀释并且添加至第一孔中。通过对每个孔 1 : 3 至 1 : 5 稀释来进行连续稀释。在清洗之前,在 37℃ 下将血清孵育两小时。将抗小鼠 IgG- 生物素 (B9904-5ml ;Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 1 : 10000 稀释并且将 50 μ L 添加至每个孔并且在清洗之前,在 37℃ 下孵育一小时。随后将 1 : 1000 稀释的 50 μ L 链霉抗生物素蛋白 -HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) 添加至每个孔,并且在清洗之前在 37℃ 下孵育一小时。通过添加 50 μ L HRP 底物 (P-9187, Sigma-Aldrich) 并且在室温下在黑暗中孵育 10 分钟,然后在 450nm 下读取光密度 (OD) 来完成最终步骤。如果 OD 比来自原始小鼠血清的 OD 高三倍,那么读数被认为是阳性的。结果以终点效价来表示,即 OD 大于或等于比原始血清高三倍的最后一次稀释。

[0097] ELISpot 分析 - 免疫之后两周,将来自每一组小鼠的脾细胞分离。使用 RBC 溶解缓冲液 (eBioscience) 将单一细胞混悬液中的红细胞予以清除。ELISPOT 分析试剂盒购自 R&D Systems。用抗小鼠干扰素 (IFN)- γ 单克隆抗体涂布 96 孔 ELISPOT 板 (Millipore)。在 4℃ 下孵育过夜之后,根据来自 R&D Systems 的实验方案将孔清洗并用阻断缓冲液来阻断。将来自每一组的汇集脾细胞添加至孔中并且用 1 μ g/mL NP147 (TYQRTRALV Biosynthesis Inc.) 孵育 48h。然后遵循如制造商描述的实验方案将板清洗并显影。通过 Cellular Technology Ltd 对点计数并分析。

[0098] 鼻内流感激发 - 将每组 10 只小鼠的各组中的 Balb/c 小鼠在第 0、3 和 6 周进行免疫。将小鼠免疫:在第 0 周进行初免 30+30 μ g,在第 3 周进行加强 30+30 μ g,在第 10 周进行加强 100+100 μ g。在第 12 周,使用 BSL IV 实验方案,在 The National Microbiology 实验室,PublicHealth Agency Of Canada, Winnipeg, MB, Canada 根据其伦理委员会的伦理准则进行流感激发实验。将 100 $\times$ LD50 剂量的 H5N1A/ 越南 /1203/04 菌株用于鼻腔激发。然后,在激发之后每天监测小鼠的存活和体重进行 21 天。

[0099] HAI 分析 - 将动物放血并且立即将血清样品存放于干冰上,然后装运至 BIOQUAL, Rockville, MD 以便处理。将血清用受体破坏酶通过将 1 份血清用 3 份酶稀释来进行处理,并且在 37℃ 水浴中孵育过夜。将酶在 56℃ 下孵育 30 分钟来灭活,随后添加 6 份磷酸盐缓冲盐水以便进行 1/10 的最终稀释。HAI 分析如前所述使用 4 个血凝单位的病毒和 1% 红细胞,在 V 形底部 96 孔微量滴定板中执行。用于 HAI 分析的病毒从 CDC 的流感分支获得。

[0100] 实施例 1

[0101] 使用微创装置的电穿孔产生加强的报道基因转染

[0102] 微创电极装置 (MIED) 被设计来供 DNA 疫苗输送使用。这种新型施配器由呈 4 $\times$ 4 阵列型式的以 1.5mm 间隔的具有套管研磨部分的镀金不锈钢针状电极组成 (电极的远端具有钝的尖端,所述尖端具有锋利的尖头) (图 4a 和图 4c)。四个电极的交替行可以相反极性进行发射 (fired): 阳性比阴性。电极被接纳于塑料手柄内的电插座中,以使得每个电极可被单独地定址以便实现交替的发射模式。装置被设计来只接触皮肤表面并且不直接穿透组织。在适当接触后,电极的锐度可使得装置阵列破坏角质层屏障层,确保一致的阻抗测量值,从而产生可重复的电穿孔治疗。原型装置构建有连接线绳以便连接至脉冲发生器 (图 4b)。

[0103] 研究了使用这种新型微创式针状电极装置 (MIED) 进行成功转染和免疫反应所需的电压参数的下限。使用 Mantoux 技术用 50 μ l 的 1mg/ml GFP 质粒注射豚鼠侧腹上的独

立皮肤部位,并且立即使用设定在低至 15V 的电压下的 MIED 进行脉冲处理(图 5A)。在治疗之后 8 小时,可见加强和可重现的 GFP 转染,而在第 3 天则达到最高点。在单独 GFP 质粒注射之后,可检测到最小程度的转染或检测不到 GFP 转染(数据未示出)。虽然一系列电参数和电压产生了 GFP 转染,但是 15 伏下的脉冲更具有可重现性(数据未示出)。遵循标准化条件下的荧光显微术通过正性像素计数来量化和评估可重现性。在 10-15 伏特参数下获得被界定区域内的最一致的像素计数量。实际 GFP 转染型式表现为在与每个电极进行接触的点周围的明显不同的“岛”(图 5b)。在低电压下,有效 EP 较浅并且高度定位于电极尖端周围,因此,在表皮的基底层下方不存在有意义的转染。

[0104] 为了确保加强的转染并非豚鼠特异性现象,在一系列物种中进行了 GFP 定位。小鼠、兔、大鼠和猪上的皮肤部位用 50 μ l (在小鼠中 30 μ l) 的 1mg/ml GFP 质粒注射并且立即使用 MIED 进行脉冲处理。在电穿孔之后,所有物种表明了加强的皮肤 GFP 转染,而在单独 GFP 质粒注射之后检测到最小程度的转染或检测不到转染(图 6)。在所有物种中,在所有电穿孔皮肤样品中检测到强 GFP 阳性。然而,只有兔样品表明与在豚鼠样品中观察到型式明显不同的“岛”型式(图 5)。大鼠、小鼠和猪皮肤上的 GFP 定位表现得更具有扩散性。大鼠、兔与猪之间的实际转染面积是相似的(大约 4mm²),因为该面积随着注射微泡大小而变。由于注射体积较小,因此小鼠皮肤上的转染面积稍微较小。在小鼠图中,示出小鼠的整个皮肤以使得可了解到相对大小。GFP 阳性细胞只在大鼠、兔和猪样品中的皮肤表面上被检测到。在这些样品的下方未观察到 GFP 信号。小鼠皮肤的下方似乎具有阳性 GFP 信号。然而,这似乎是与皮肤样品的薄度相关。

[0105] 此数据暗示出:MIED 可在较小和较大动物模型中有效地将质粒转移至皮肤。

[0106] 实施例 2

[0107] 使用微创装置的电穿孔-组织学分析表明在表皮上层中的转染

[0108] 为了研究通过 MIED 进行的电穿孔在细胞水平下的效果,执行组织学分析。豚鼠上的部位用 50 μ l 的 1mg/ml GFP 质粒注射并且立即使用 MIED 进行脉冲处理的。活检样品在治疗后 3 天加以取出、固定、做石蜡切片并且进行 H&E 染色(未示出载玻片)。在用微创装置进行电穿孔之后,病理学分析未显示相关的组织损伤。高功率显微术显示大部分 GFP 转染在表皮的颗粒层细胞层中发生(未示出载玻片)。还在基底层中检测到 GFP 阳性细胞。相比之下,只在接受单独 GFP 质粒注射的活检样品中检测到少许 GFP 阳性细胞。这与已经接受电穿孔的组织的活检样品中观察到的加强信号形成直接对比。基于相对于单独 DNA 的 GFP 阳性细胞的数量,表达增强的视觉估算将超过 100-1000 倍。

[0109] 实施例 3

[0110] 使用微创装置的电穿孔-在小鼠中产生加强的细胞反应并且提供针对致死激发的 100%保护

[0111] 将小鼠用编码 NP 和 M2 流感抗原的 DNA 进行免疫:在第 0 周进行初免 30+30 μ g,在第 3 周进行加强 30+30 μ g,在第 10 周进行加强 100+100 μ g。来自波多黎各 /39 菌株的匹配 NP 抗原和来自新加勒多尼亚 /99 菌株的匹配 M2 抗原最佳化,合成,然后克隆至临床认可的哺乳动物表达载体 pMB76.5 的骨架中。选择 NP 和 M2e 抗原以便主要评估细胞免疫性。这些蛋白质未能够诱导中和抗体反应。

[0112] 小鼠群组用微创皮肤装置或用 Elgen 1000 肌肉内装置(Inovio

Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) 进行电穿孔。在所有小鼠中观察到小鼠模型中的有效力的细胞和体液反应的诱导,如抗原特异性T细胞ELISPot分析和抗体效价所测量。对于 MIED, 抗原特异性 CTL 反应是针对 NP 的 200 ± 57.9 SFU/ 10^6 个脾细胞, 并且对于 IM, 抗原特异性 CTL 反应是针对 NP 的 85 ± 36.3 SFU/ 10^6 个脾细胞 (图 7A)。经过皮内电穿孔的那些动物显示较高效价和细胞反应, 但是在统计学上是不显著的。

[0113] 为了尝试确定是否诱导的免疫反应能够影响感染, 经由鼻内 (i. n.) 接种用致命剂量的流感 A/H5N1/ 越南 /1203/04 来激发小鼠 (图 7B)。流感的 VN/1203/04 (H5N1) 菌株已知可引起快速发病和死亡。虽然在第 11 天 100% 的雏期小鼠出现感染, 但是 100% 的用 MIED 免疫的小鼠受到针对发病和死亡的保护直至第 15 天 (实验结束)。同样地, 在第 15 天, 90% 的 IM 免疫的阳性对照动物存活。

[0114] 实施例 4

[0115] 使用微创装置的电穿孔产生体液免疫原性和保护性 HI 效价

[0116] 豚鼠

[0117] 由于极薄的皮肤结构和紧邻下方肌肉, 因此很难以将小鼠的真皮作为目标。出于这个原因, 通常在小鼠中诱导的免疫反应是皮肤和肌肉的组合。因此, 在具有界限更分明的皮肤结构的较大动物模型 - 豚鼠中测试 MIED。

[0118] 通过经由 MIED 的皮内电穿孔, 用之前描述的共有 SYNCON™ 流感疫苗对豚鼠进行免疫。用在 $1 \times$ PBS 中稀释的体积为 $50 \mu\text{l}$ 的疫苗质粒混合物 (100 微克 / 质粒) 对动物进行疫苗接种, 所述混合物含有 pGX2005 (SYNCON™ 疫苗构建体, 其编码 H1HA 的共有序列) 和 pGX2009 (SYNCON™ 疫苗构建体, 其编码猪 H1HA 的共有序列)。两次免疫之后两周, 每个动物显现超过 1 : 40 的针对 H1N1 大流行性墨西哥 /2009 菌株, 和针对 A/H3N2 布里斯班菌株, 以及在一定程度上针对 A/H5N1 越南 /2005 菌株的加强的 HAI 效价 (图 8)。

[0119] 猕猴

[0120] 通过皮内 (MIED) 或肌肉内电穿孔 (Elgen 1000), 用体积为 $50 \mu\text{l}$ 的之前描述的共有流感疫苗质粒混合物 (100 μg / 质粒) 对猕猴进行疫苗接种, 所述混合物含有 pGX2005 (SYNCON™ 疫苗构建体, 其编码 H1HA 的共有序列) 和 pGX2009 (SYNCON™ 疫苗构建体, 其编码猪 H1HA 的共有序列)。在用 MIED 皮内免疫时, 在两次免疫之后, 四只动物中的四只都显现超过 1 : 40 的针对 H1N1/ 墨西哥 /2009 菌株, 和针对 A/H1N1/ 新加坡多尼亚菌株的 HAI 效价 (图 9)。

[0121] 实施例 5

[0122] 微创装置的耐受性研究

[0123] 为了评估 EP 的疼痛水平, 将微创 EP 装置施加至表皮层的角质层与基底层之间。用经过麻醉的动物进行测试的视觉反应不会产生在使用较高功率脉冲或侵入性电极阵列时所观察到的肌肉抽搐, 同时表明报道基因的有效转染和抗原性质粒的免疫反应。高达 15V 的脉冲电压和高达大约 30mA 的电流只产生轻度感觉, 同时在豚鼠和恒河猴中诱导针对流感的保护性免疫反应。

[0124] 与肌肉内装置的侵入性阵列相比, 使用侵入性皮肤装置阵列来施加体内 EP 已经展示明显减少的疼痛。预期 MIED 引起疼痛的甚至更大的减少。

[0125] 在 ID 注射 0.9% 盐水至颗粒层中之后, 使用 MIED 阵列施加体内 EP。向患者的颗粒

层中注射 0.15mL 盐水,然后使用CELECTRA® 2000(适应性恒定电流装置 (Adaptive Constant Current Device) 或替代地,Elgen 1000 装置,Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) 来执行 EP。EP 参数为 15V、100msec 脉冲,总共 3 次脉冲。

[0126] 对于每个受试者,注射部位疼痛将通过使用在 EP 之后立即确定的视觉类比得分 (VAS) 来评估。

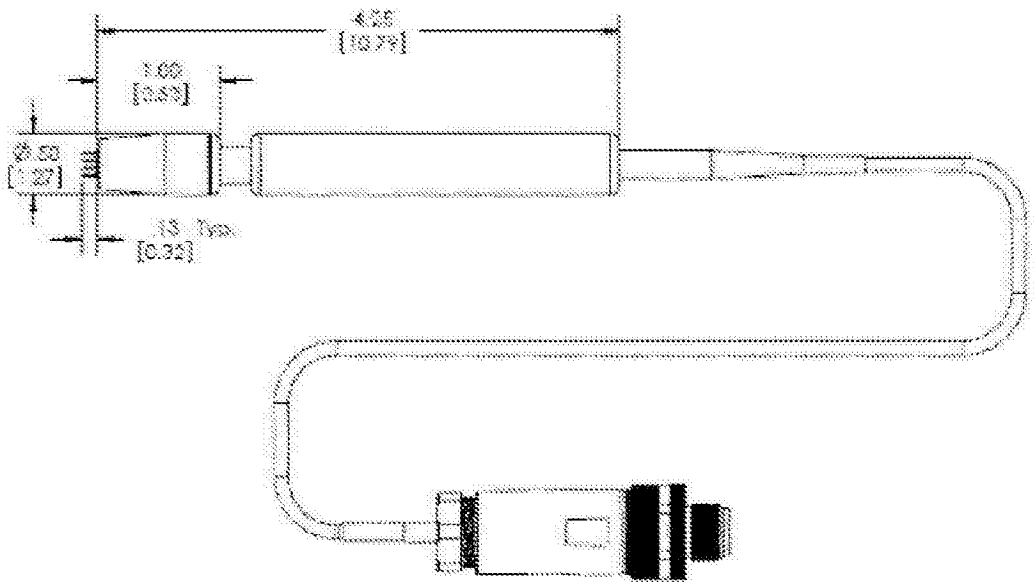


图 1

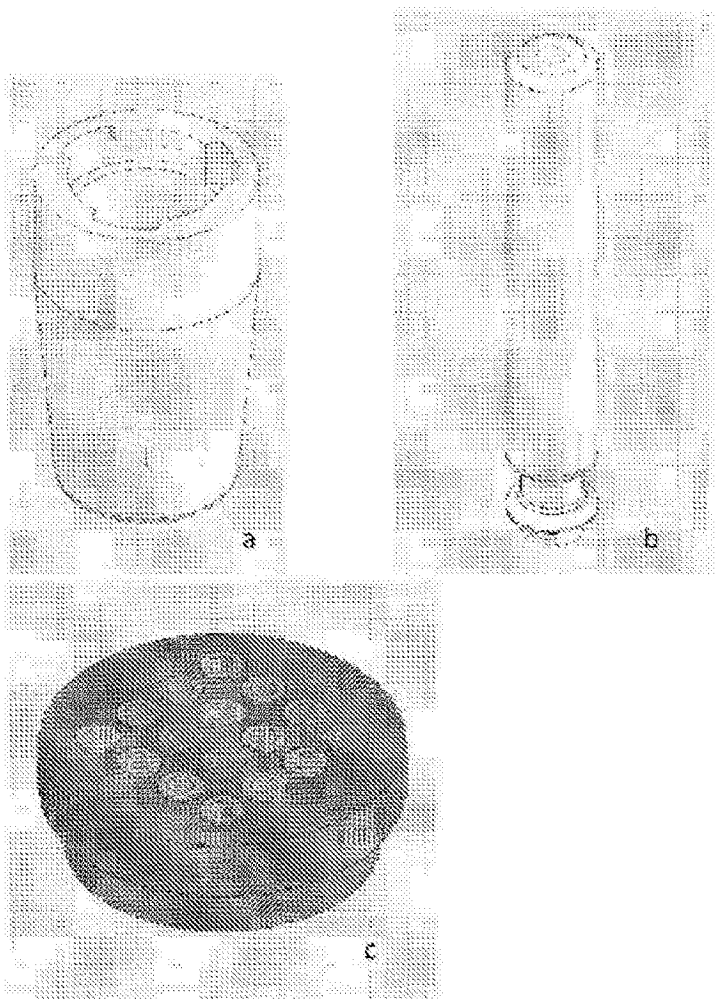


图 2

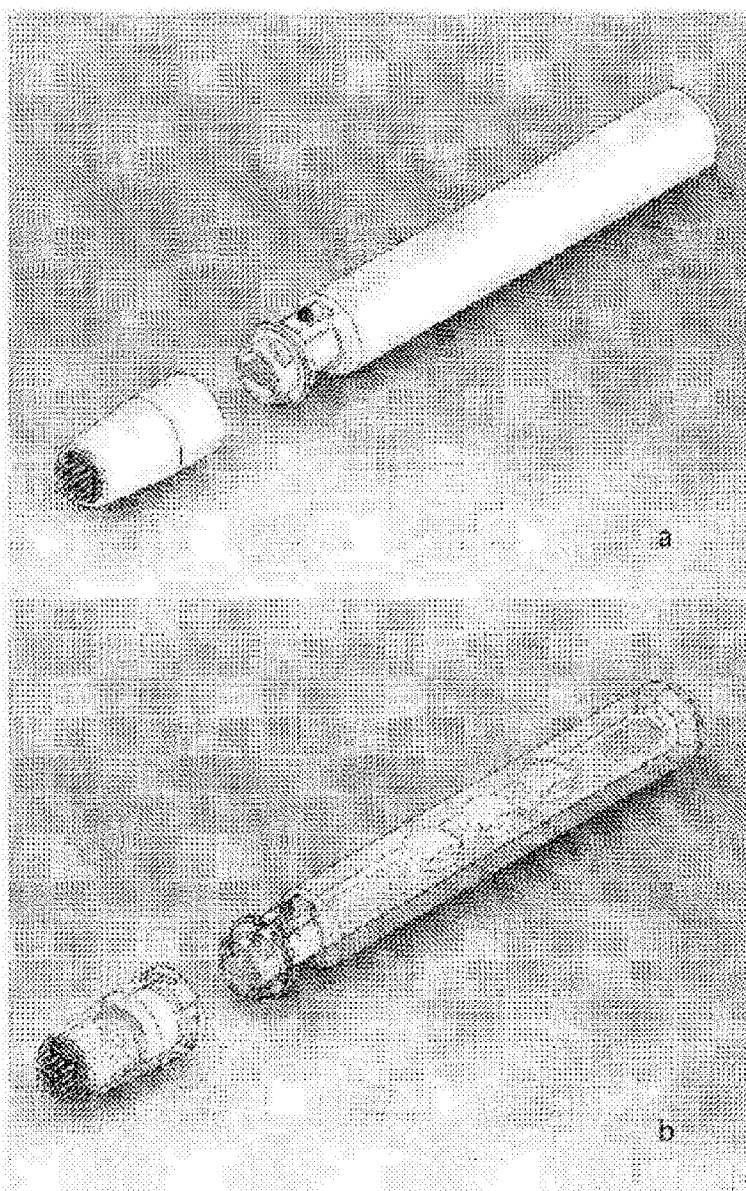


图 3

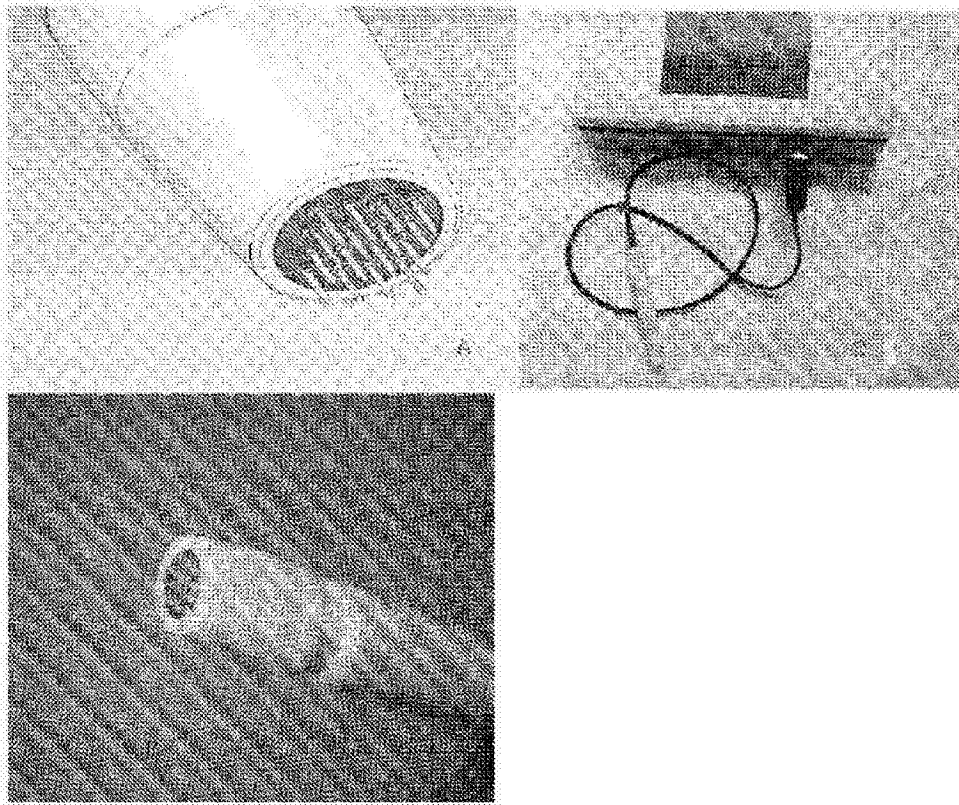


图 4

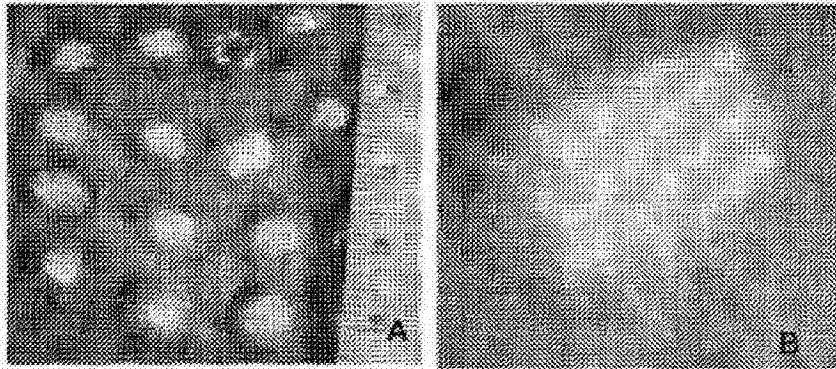


图 5

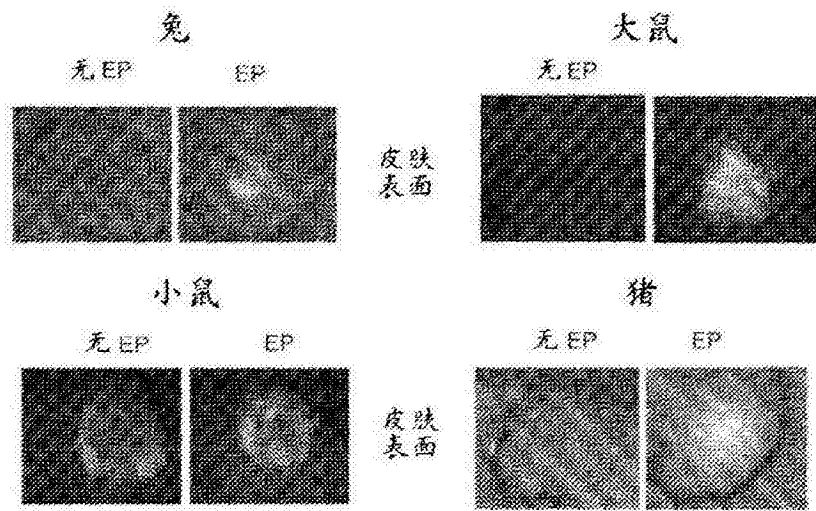


图 6

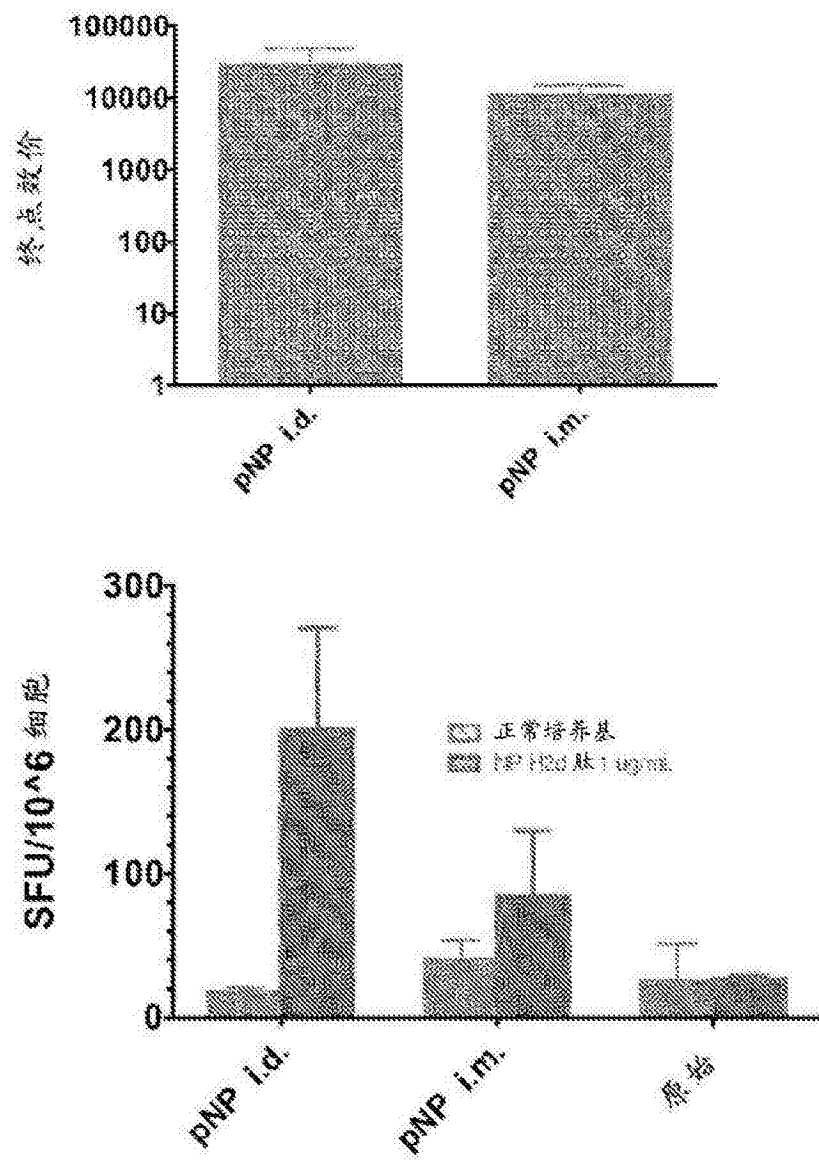


图 7A

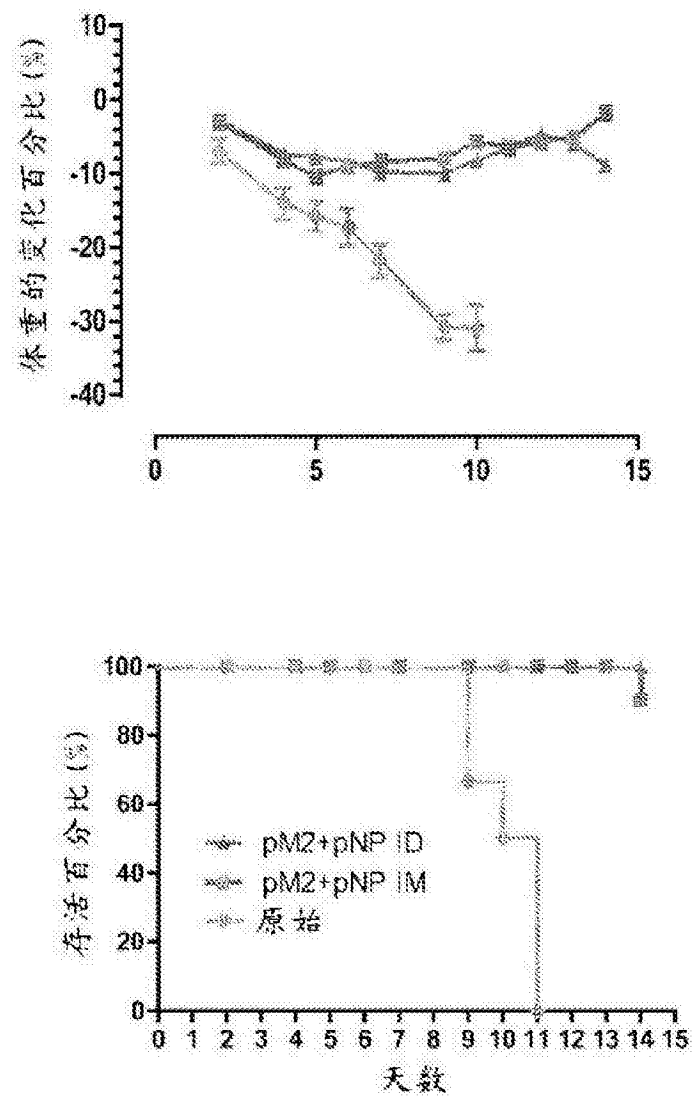


图 7B

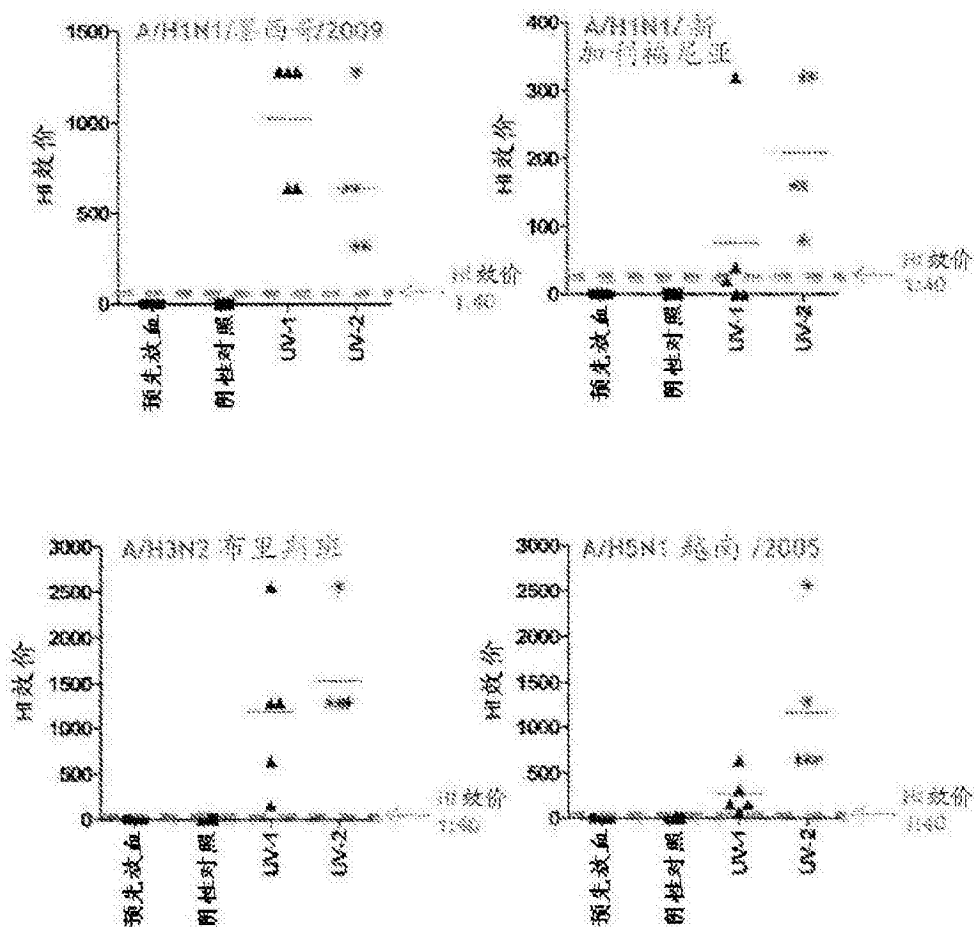


图 8

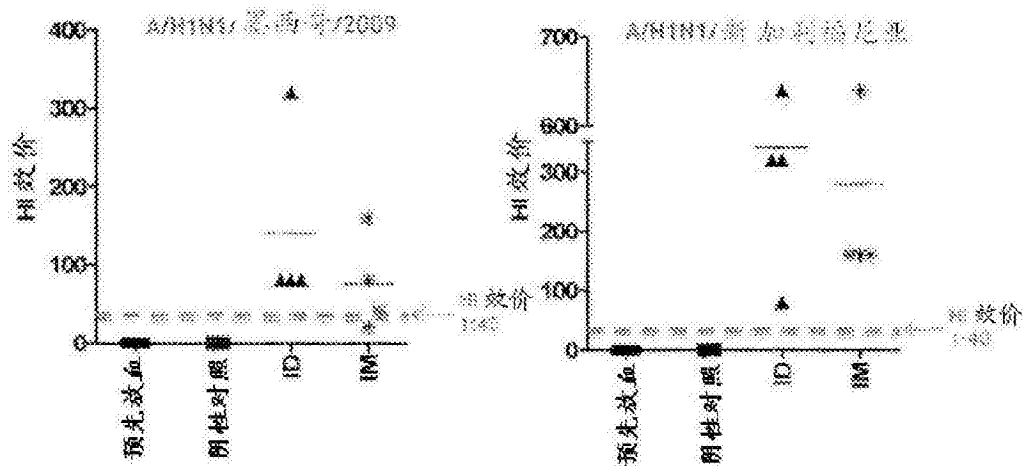


图 9