

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-526016

(P2005-526016A)

(43) 公表日 平成17年9月2日(2005.9.2)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 C O 7 6
A 6 1 K 9/70	A 6 1 K 9/70	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00 H	4 C O 8 6
A 6 1 K 47/04	A 6 1 K 47/04	4 C I 6 7
A 6 1 K 47/10	A 6 1 K 47/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-561581 (P2003-561581)	(71) 出願人	397009934
(86) (22) 出願日	平成15年1月23日 (2003.1.23)		グラクソ グループ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月16日 (2004.9.16)		GLAXO GROUP LIMITED
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/000282		イギリス ミドルセックス ユービー6
(87) 国際公開番号	W02003/061636		Oエヌエヌ グリーンフォード パークレ
(87) 国際公開日	平成15年7月31日 (2003.7.31)		ー アベニュー グラクソ ウェルカム
(31) 優先権主張番号	0201736.6		ハウス (番地なし)
(32) 優先日	平成14年1月25日 (2002.1.25)		Glaxo Wellcome Hous
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		e, Berkeley Avenue G
			reenford, Middlesex
			UB6 ONN, Great Brita
			in
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 DNAの投薬形態

(57) 【要約】

本発明は、哺乳類の皮膚へのDNA性薬剤の効果的な投与装置に関する。本発明の特に好ましい態様では、哺乳類の皮膚、好ましくはヒトの皮膚へのDNAワクチンの投与装置が提供される。本発明は、その中に固溶体または懸濁液の状態で、DNA薬剤およびフリーラジカルの分解効果を阻害する安定化剤を含有している、固形の貯蔵媒体で被覆された支持構材から成る少なくとも1つの皮膚穿通成分を有する極微針のDNA薬剤送達装置を提供する。好ましくは、このような装置を被覆する固形の薬剤貯蔵媒体はポリオールであり、好ましくは（ガラスのような）非晶性状態のポリオールである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNA薬剤とフリーラジカルの分解効果を阻害する安定化剤とを含有する固形の貯蔵媒体で被覆された支持構材を含む、少なくとも1つの皮膚穿通極微針を有するDNA薬剤送達装置。

【請求項 2】

安定化剤が金属イオンキレート剤およびフリーラジカスカベンジャーの一方または両方である、請求項 1 記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 3】

金属イオンキレート剤が、イノシトール6リン酸、トリポリリン酸塩、コハク酸、リンゴ酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (TRIS)、デスフェラル、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) およびエチレンジアミンジヒドロキシフェニル酢酸 (EDDHA) から成る群より選択される、請求項 2 記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 4】

非還元フリーラジカスカベンジャーが、エタノール、メチオニンおよびグルタチオンから成る群より選択される、請求項 2 記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 5】

フリーラジカルの分解効果を阻害する安定化剤が (a) メチオニンもしくはEDTAと組み合わされたリン酸緩衝エタノール溶液、または (b) メチオニンもしくはエタノール (またはメチオニンおよびエタノールの併用) と組み合わされたTris緩衝EDTAである、請求項 2 記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 6】

固形の貯蔵媒体が非晶性ポリオールである、請求項 1 ~ 5 のいずれか1項に記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 7】

ポリオールが安定化ポリオールである、請求項 6 記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 8】

固形の生分解性貯蔵媒体が糖である、請求項 1 ~ 7 のいずれか1項に記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 9】

糖が、ラクトース、グルコース、スクロース、ラフィノースまたはトレハロースから選択される、請求項 8 記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 10】

固形の貯蔵媒体がガラス形態である、請求項 1 ~ 9 のいずれか1項に記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 11】

固形の貯蔵媒体が糖ガラス形態である、請求項 10 記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 12】

DNAがスーパーコイルプラスミドDNAである、請求項 1 ~ 11 のいずれか1項に記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 13】

37 での4週間の保存後に50%以上のプラスミドDNAがそのスーパーコイル型の状態であるように、スーパーコイルプラスミドDNAが安定化されている、請求項 12 記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 14】

放出される際の単量体：二量体スーパーコイル型の比率が0.8：1.2の範囲内であるように、DNAが安定化されている、請求項 12 記載のDNA薬剤送達装置。

【請求項 15】

固形の生分解性貯蔵媒体が皮膚穿通極微針の皮膚内への挿入後24時間以内に薬剤を放出

10

20

30

40

50

する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の DNA 薬剤送達装置。

【請求項 16】

皮膚穿通構材が薬剤を真皮内に送達し得る大きさである、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の DNA 薬剤送達装置。

【請求項 17】

皮膚穿通構材が薬剤を表皮内に送達し得る大きさである、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の DNA 薬剤送達装置。

【請求項 18】

支持構材が固形針、マイクロカニューレまたはマイクロブレードである、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の DNA 薬剤送達装置。

10

【請求項 19】

装置がエレクトロポレーション装置である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の DNA 薬剤送達装置。

【請求項 20】

装置の被覆された支持構材がエレクトロポレーション装置の電極である、請求項 19 記載の DNA 薬剤送達装置。

【請求項 21】

薬剤がワクチンである、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の DNA 薬剤送達装置。

【請求項 22】

固形の貯蔵媒体がワクチンアジュバント、トランスフェクション促進剤、DNA 分解酵素阻害剤または結晶阻害剤を更に含有する、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の DNA 薬剤送達装置。

20

【請求項 23】

アジュバントが CpG、合成イミダゾキノリン、ツセラゾール (tucerasol)、サイトカイン、MPL、QS21、QS7 および水中油型エマルジョンから成る群より選択される、請求項 22 記載の DNA 薬剤送達装置。

【請求項 24】

DNA 薬剤、貯蔵媒体、およびフリーラジカルの分解効果を阻害する安定化剤からなる溶液を溶媒中で調製する工程、続いて、該溶液で少なくとも 1 つの支持構材を被覆する工程、ならびに、溶媒を除去して薬剤およびフリーラジカルの分解効果を阻害する薬剤を含有する固形の貯蔵媒体を形成する工程を含む、請求項 1 記載の DNA 薬剤送達装置の製造方法。

30

【請求項 25】

貯蔵媒体が糖である、請求項 24 記載の DNA 薬剤送達装置の製造方法。

【請求項 26】

支持構材上での乾燥前の糖濃度が 20 ~ 40 % w/v の範囲である、請求項 25 記載の DNA 薬剤送達装置の製造方法。

【請求項 27】

溶媒が工程の前に脱金属されている、請求項 24 記載の DNA 薬剤送達装置の調製方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳類の皮膚への DNA 薬剤の効果的な投与装置に関する。本発明の特に好ましい態様では、哺乳類の皮膚、好ましくはヒトの皮膚への DNA ワクチンの投与装置が提供される。本発明は、その中に固溶体または懸濁液の状態で、DNA 薬剤およびフリーラジカルの分解効果を阻害する安定化剤を含有している、固形の貯蔵媒体で被覆された支持構材から成る少なくとも 1 つの皮膚穿通成分を有する極微針の DNA 薬剤送達装置を提供する。好ましくは、このような装置を被覆する固形の薬剤貯蔵媒体はポリオールであり、好ましくは (ガラスのような) 非晶性状態のポリオールである。本発明において、フリーラジカル安定化剤は好ましくはフリーラジカルスカベンジャーおよび / または金属イオンキレー

50

ト剤である。最も好ましくは、本発明のDNAワクチン装置は、支持構材を被覆する、ガラス形態の糖質貯蔵媒体内に固溶体の状態で、DNAプラスミド、フリーラジカルスカベンジャーおよび金属イオンキレート剤を含有する。本発明のDNA装置は貯蔵安定性があり、皮膚内に皮膚穿通部分が侵入した後にだけ、十分にDNA薬剤を放出する。DNA薬剤送達装置は、薬剤が皮膚の特定の層に送達されるように調整され、好ましい送達装置は薬剤を上皮または真皮に送達する皮膚穿通部分を含有する。好ましい貯蔵媒体は、糖質、特に、ラクトース、ラフィノース、トレハロース、グルコースまたはスクロースのようなガラス質(glass)を形成する安定化させた糖質から成る。更に、皮膚内にワクチンを投与するためのワクチン送達装置、それらの製造方法および医学においてのそれらの使用方法を提供する。

【背景技術】

10

【0002】

皮膚は外部物質に対する有効な防壁に相当する。ヒトの皮膚の概説はDorland's Illustrated Medical Dictionary, 第28版で提供される。外層から始まり、内側で機能している皮膚は、角質層を含む上皮、生きた上皮から成り、上皮の下にあるのが真皮である。上皮は5つの層で構成される。すなわち、角質層、透明層、顆粒層、有棘層、基底層である。上皮(5つの層すべてを含む)は、皮膚の非血管性の最外層であり、厚さ0.07~0.12 mm (70~120 μ m)の間で変化する。上皮は、ケラチンを産生し専門化した上皮細胞の95%を構成する細胞、ケラチノサイトで占められている。他の5%の細胞はメラノサイトである。基底を成す真皮は通常、角質層表面の直下に0.3から約3 mmの範囲で見られ、汗腺、毛嚢、神経終末および血管を含む。

20

【0003】

角質層は皮膚の透過防壁の中心であり、いくらか半透明の角化上皮層から成る。この領域の死んだまたは死につつつあるケラチノサイトの間の狭い隙間は、結晶性の脂質多重膜で満たされている。これらは、親水性分子の侵入に対して疎水性防壁を提供することによって、効果的に皮膚または体内と外界との間隙を密封する。角質層は30~70 μ mの範囲の厚さである。

【0004】

ランゲルハンス細胞は、上皮の基底顆粒層(有棘層および顆粒層、(Small Animal Dermatology - 第3版, Muller - Kirk - Scott, 編: Saunders (1983))中全体に見られ、侵入生物に対する免疫系の初期防御に重要な役割を担うと考えられる。従って、この皮膚層はある種のワクチンにとって適切な標的領域に相当する。

30

【0005】

通常、皮下注射針および注射器による、皮膚内へのまたは皮膚を越えての従来の薬剤の投与方法は、多数の欠点を伴う。このような欠点は、痛み、薬剤を投与するための訓練を受けた専門家の必要性、およびまた、付随した血液感染性疾患への感染の危険性を伴う投与者の針刺し傷害の危険性をも含む。このように、皮膚内へのまたは皮膚を介したあらゆる種類の薬剤の投与方法を改善する必要がある。

【0006】

基底層を越えての薬剤投与の問題を克服するために、多様な皮膚パッチの設計を含む、多数の代替的アプローチが記述されている。物理的な角質層への穿通なしに皮膚を介して薬剤を送達する皮膚パッチの例は、WO 98/20734およびWO 99/43350に記載されたものを含む。皮膚を物理的に穿刺しない他のアプローチは、皮膚内に電流を適用することによって薬剤の通過を向上させる、電気輸送(electrotransport)またはイオン電気導入(iontophoretic)装置を含む。多くのそのような装置が文献に記載されている(それらの例は、米国特許第6,083,190号、米国特許第6,057,374号、米国特許第5,995,869号、米国特許第5,622,530号、WO 00/44438を含む)。これらの種類の非穿通パッチの潜在的な欠点は、著しい感作の誘導および薬剤投与中の不快感、ならびに無傷の角質層を越えての抗原の吸収が非常に低いことを含む。

40

【0007】

物理的な皮膚の破壊または穿通を伴う他のパッチが記載されている。薬剤を含む液体ま

50

たは固体の貯蔵部、および金属マイクロブレードパッチを含有する装置が記載されており、そこでは、薬剤が上皮に入ることができる経路を作るために、マイクロブレードは角質層の中を物理的に切断する。このような装置はW0 97/48440、W0 97/48442、W0 98/28037、W0 99/29298、W0 99/29364、W0 99/29365、W0 00/05339、W0 00/05166およびW0 00/16833に記載される。皮膚の穿刺を伴う他の装置は米国特許第5,279,544号、米国特許第5,250,023号および米国特許第3,964,482号を含む。

【0008】

投薬形態が粉末および套管針の形である、薬剤および糖などの安定化ポリオールを含有している固形の投薬形態はW0 96/03978に記載されている。

【0009】

薬剤中のスーパーコイルDNAは、時間とともに分解し、スーパーコイル構造の喪失および関連した開環状または直鎖状DNA構造の形成を引き起こすことが知られている (Evansら、2000, Journal of Pharmaceutical Sciences, 89 (1), 76 - 87; W0 97/40839)。この鎖の切断反応が起こる機構の1つは、DNA溶液中の溶存酸素から産生される遊離のヒドロキシルラジカルによるDNAの酸化、金属イオンによって触媒される過程である。フリーラジカル形成反応はいくつかの遷移金属イオンによって触媒されうるが、最も一般的なものは鉄および銅イオンである (Fe^{+3} , Fe^{+2} , Cu^{+2} または Cu^{+1} ; Evansら、上述)。

【0010】

金属イオンキレート剤によるスーパーコイルDNAを含む溶液からの微量金属イオンの除去、および/または、非還元フリーラジカルスカベンジャーによる溶液中のフリーラジカルの除去は、DNAをスーパーコイル型で安定させ、DNAを酸化から保護することが示されている (W0 97/40839)。

【0011】

特に免疫または遺伝子治療の目的のため、プラスミドに基づく遺伝子の送達知られている。例えば、マウスの筋肉内への注射によるむき出しのDNAの投与は、W090/11092に概説される。JohnstonらW0 91/07487は、関心の遺伝子をコードするポリヌクレオチドで被覆した微砲弾 (microprojectile) の使用によって、脊椎動物細胞に遺伝子を移送する方法、および、微粒子が標的細胞に侵入できるように微粒子を加速する方法を記載する。

【0012】

DNAワクチンは通常、その中に強力なウイルスのプロモーター、抗原ペプチドをコードする関心の遺伝子、およびポリアデニル化/転写終止配列が挿入された細菌のプラスミドベクターで構成される。関心の遺伝子は、病原体、腫瘍もしくは防御されることを目的とする他の病因に関連する、タンパク質全体または単に抗原ペプチド配列をコードしうる。プラスミドは例えばE.coliなどの細菌内で増やすことができ、その後、単離され、宿主に投与される前に、目的の投与経路に応じて適切な媒体で調製される。投与後、プラスミドは、コードされたタンパク質またはペプチドが産生される宿主細胞によって取り込まれる。哺乳動物宿主内でのプラスミドの複製および関連した動物の染色体DNAへの組み込みを防ぐために、プラスミドベクターは真核細胞で機能する複製起点を持たずに作製されることが望ましい。DNAワクチン接種に関する情報はDonnellyら、"DNA vaccines" Ann. Rev Immunol. 1997 15: 617-648で提供され、その開示は参照により本明細書に完全に組み入れられる。DNAワクチン接種はまた、異種ワクチン抗原をコードし発現するウイルスまたは細菌ベクターの投与などの技術をも網羅しうる。

【0013】

本発明は先行技術の問題を克服し、皮膚内に効果的にDNA薬剤を投与、放出でき、またその中でDNAがスーパーコイル型で放出されるように安定化された装置を提供する。

【発明の開示】

【0014】

本発明は、DNA薬剤およびフリーラジカルの分解効果を阻害する安定化剤を含有している、固形の貯蔵媒体で被覆された支持構材を含む少なくとも1つの皮膚穿通極微針を有する極微針のDNA性薬剤送達装置を提供する。代替として、皮膚穿通極微針は、支持構材を

10

20

30

40

50

含まない固形のDNA薬剤貯蔵媒体で構成されうる。

【0015】

本明細書に記載される装置のある実施例はまた、室温で保存され、従って物流コストを減らし、他の製品のために価値ある冷蔵スペースを開放するという有意な利点をも有する。

【0016】

送達されるべき薬剤を含む固形の貯蔵媒体で支持構材を被覆することによって形成される皮膚穿通極微針は、貯蔵媒体で支持構材上を被覆した後、皮膚の角質層を貫通するために十分長く、十分に鋭い。薬剤送達装置が皮膚の表面に投与され、被覆された皮膚穿通構材または極微針が角質層を貫通すると、固形の貯蔵媒体は生分解し、そこで、角質層の下

10

【0017】

DNAワクチン送達装置は、本発明の好ましい態様を形成する。このような用途において、送達される薬剤は、微生物もしくはウイルスなどの病原体から誘導できる抗原をコードするポリヌクレオチドであり、または、癌ワクチンもしくは他の自己抗原の場合は自己抗原であるかもしれない。

【0018】

支持構材は、本発明の装置の皮膚穿通極微針を形成するために貯蔵媒体によって被覆される時、角質層の穿通に耐える十分の強度があり、目的のために安全である、突起を作るために使用できるほぼすべての物質で作製されうる。例えば、突起は、薬剤グレードのステンレス鋼、金もしくはチタンなどの金属、または、人工器官に使用される他のそのような金属、これらもしくは他の金属の合金、セラミック、半導体、シリコン、ポリマー、プラスチック、ガラス、または、複合材料で作製されうる。

20

【0019】

送達装置は、単一針、套管針、または、カニユーレの形でよく、または、パッチ型の複数の皮膚穿通成分を含有してもよい。

【0020】

本発明のパッチは、通常、極微針もしくはマイクロブレードのような複数の穿通突起が依存する支持プレートまたは支持構造から成る。穿通突起はそれ自体、多様な形式をとることができ、中空ではないまたは中空であるかもしれない、それは固形針または刃の形であり得る (McAllisterら、Annu. Rev. Biomed. Eng., 2000, 2, 289-313; Henryら、Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998, 87, 8, 922-925; Kaushikら、Anesth. Analg., 2001, 92, 502-504; McAllisterら、Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 26, (1999), Controlled Release Society, Inc., 192-193; WO 99/64580; WO 97/48440; WO 97/48442; WO 98/28037; WO 99/29364; WO 99/29365; US 5,879,326に記載されたマイクロブレードの態様および設計など。これらすべての文献の記述およびマイクロブレードアレイの製造方法は参照により本明細書に組み入れられている)。代替として、穿通突起は、中空の中心孔を持つマイクロカニユーレの形であってもよい。この最後の実施形態では、中心孔は、極微針装置 (EP0796128B1) の両側に連結された (communicated) チャンネルを形成するために針を通じて拡張しうる。固形針およびマイクロブレードが好ましい。

30

40

【0021】

皮膚へのDNAの投与のための皮膚穿通極微針の長さは、パッチが投与される解剖学的位置、および、ワクチンの種類において薬剤の投与が望まれる皮膚層に応じて変化しうる。一般的に1 μ m~3 mmの間、好ましくは1 μ m~1 mmの間、好ましくは50 μ m~600 μ mの間、より好ましくは100~400 μ mの間である。皮膚穿通極微針の長さは、薬剤の標的送達のために選択された部位、すなわち、好ましくは真皮、最も好ましくは上皮、によって選択されうる。本発明の装置の支持構材は、米国特許第5,879,326号、WO 97/48440、WO 97/48442、WO 98/28037、WO 99/29298、WO 99/29364、WO 99/29365、WO 99/64580、WO 00/05339、WO 00/05166もしくはWO 00/16833; またはMcAllisterら、Annu. Rev. Biomed. Eng., 2

50

000, 2, 289-313; Henryら、Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998, 87, 8, 922-925; Kaushikら、Anesth. Analg., 2001, 92, 502-504; McAllisterら、Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 26, (1999), Controlled Release Society, Inc., 192-193に記載される形式をとり、そこに記載される方法によって製造されうる。

【0022】

本発明の装置を形成するために、薬剤貯蔵媒体で被覆される最も好ましいマイクロブレード装置は、WO 99 48440およびHenryら、Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998, 87, 8, 922-925に記載され、両内容はともに完全に本明細書に組み入れられる。

【0023】

本発明の装置は、好ましくは複数の皮膚穿通極微針、好ましくは装置あたり最高1000本以下の極微針、より好ましくは装置あたり最高500本以下の皮膚穿通極微針を含有する。

10

【0024】

穿通突起が固体である場合には、それは平面であってもよく、または、円形もしくは、多角形の横断面を持つかもしれない。突起は、まっすぐまたは先細の軸を持つことができ、横断面は平面もしくは円形、または他の多角形でありうる。例えば、マイクロブレードは湾曲した刃を持つかもしれない、または、V字型断面の溝に形成されるかもしれない。代替として、突起は、付着力および流動性を向上させるために、星形のようなより複雑な形を持ちうる。

【0025】

皮膚穿通極微針は、支持プレートと一体化される、または、そこに取り付けられるかもしれない。突起がプレートに取り付けられる場合には、穿通突起は貯蔵媒体の形を取りうる。このような装置は、細かい点に薬剤を含む融解した貯蔵媒体を引き出し、または、押し出すことによって形成され、作製されうる。例えば、融解した貯蔵媒体は多孔頭部を通して直接支持プレート上に成形することができ、そこで、熱い押出成形物が冷却され、プレートに固着する。押出成形物を引く時に、一連の鋭い尖端が形成される。

20

【0026】

任意の穿通突起の形状の一般的な特徴として、被覆後の貯蔵部の付着を向上させるため、その突起の表面は凹凸があるかもしれない。例えば、表面は、きめが粗い、波紋がある、または畝があるかもしれない。更に、貯蔵部を刃の上により嚴重に保持するため、貯蔵部がそこで乾燥し貯蔵部の結合物を作るように、固形のマイクロブレードは更に貫通孔を含有するかもしれない。ある実施形態では、非常に溶けやすくもろい凍結乾燥剤を含有するため、もろい貯蔵部は、皮膚の穿刺の間このような穴の中に完全に保持され、それによって分解から保護されることが好ましい。

30

【0027】

代替的な実施例では、極微針、支持構材または貯蔵媒体（もしくはその一部）は、DNA放出の前にパッチまたは支持プレートから物理的に分離できてよい。例えば、皮膚穿通極微針（または少なくともその先端）が貯蔵部自体から形成されている実施例では、皮膚の貫通後、穿通突起は基部の支持体から分離し、従って皮膚からパッチを取り除くことが可能となり、一方貯蔵部は皮膚内に留まる。支持プレートからの貯蔵部の分離は、物理的な剪断によって、または針の支持プレートに隣接した部分の生分解によってもよい。

40

【0028】

このある実施形態は、微小突起の先端を比較的溶解性の低い二糖類の貯蔵媒体から成形し（送達される薬剤の散布を含む）、続いて微小突起の残りの部分および支持プレートを比較的溶解性の高い物質から成形することもありうる。皮膚内に挿入されると、比較的溶解性の高い微小突起の軸は分解し、その結果、皮膚からパッチを取り除くことが可能となり、一方先端は皮膚内に留まる。皮膚内に残存する先端は、その後、より遅い生分解によって徐々に薬剤を放出できる。

【0029】

本発明の別の関連実施形態では、装置はエレクトロポレーション装置でありうる。例えば、米国特許第6261281号は、細胞内へのDNAの取り込みを促進するために、液体の筋肉DN

50

Aワクチン接種とそれに続く筋肉細胞を横切って電流を流すための電極の挿入を記載する。WO 00/44438は、金属針が電極として使用される、貯蔵媒体の非存在下でDNAで被覆した針のパッチを記載する。従って、DNA薬剤およびフリーラジカルの分解効果を阻害する安定化剤を含有している非晶性固体の貯蔵媒体で被覆された支持構材から成る、複数の皮膚穿通成分を含有するエレクトロポレーション装置が提供される。この1つの好ましい実施形態は、その針がDNAワクチンおよびフリーラジカルの分解効果を阻害する安定化剤を含有している非晶性の貯蔵媒体で被覆されたWO 00/44438記載の装置である(該文献は本明細書に参照として組込む)。

【0030】

ポリオールを生分解性薬剤貯蔵部は、本発明に必要とされる機能を果たす任意の媒体から任意に作製されうる。貯蔵部は、長期に及ぶ保存の間、貯蔵部が物理的に安定に付着し続け、また、被覆された極微針が角質層を貫通した際、投与処置の間、実質的に完全に保たれるよう十分な程度に、支持構材に付着できなくてはならない。貯蔵部はまた、貯蔵媒体の生分解の間に皮膚内に放出される、乾燥或いは部分的に乾燥した任意の形態で送達される薬剤の懸濁液もしくは溶液を保持または含有できなければならない。

【0031】

本発明においては、媒体の生分解とは、非放出状態から放出状態に変化し、それによって薬剤が皮膚内に入るように、貯蔵媒体が状態を変化させることを意味する。活性を持つ薬剤の放出は、水和、拡散、相転移、結晶化、溶解、酵素反応および/または化学反応などの、1つ以上の物理的および/または化学的過程を含むかもしれない。貯蔵媒体の選択に応じて、生分解は以下の1つ以上によって誘導できる：水、体液、湿度、体温、酵素、触媒および/または反応物質。従って、貯蔵媒体の変化は、皮膚のより高い湿度および温度に関連した、水和および温度上昇によって誘導されうる。貯蔵媒体はその後、溶解および/または膨潤および/または相変化(結晶性または非晶性)によって分解され、その結果、崩壊または単に媒体の浸透が増加しうる。

【0032】

好ましくは、媒体は溶解し、代謝または体から排出されるが、あるいは、貯蔵部は、装置を取り外した時皮膚から除かれる支持構材に付着したままでありうる。貯蔵媒体の溶解による薬剤の放出が好ましい。

【0033】

好ましくは、固形の貯蔵媒体は(WO96/03978に記載されたものなどの)ポリオールである。適切なポリオール貯蔵媒体は(糖質などの)炭水化物、多糖類、疎水性に誘導された炭水化物のような置換ポリオール、アミノ酸、生分解性高分子、または、ポリ(ヒドロキシ酸)、ポリ無水物(polyanhydride)、ポリ(オルト)エステル、ポリウレタン、ポリ(酪酸)、ポリ(吉草酸)、およびラクチド-カプロラクトン共重合体、もしくはラクチド-グリコリド共重合体などの共重合体を含む。

【0034】

固形の貯蔵部は非晶性または結晶状態であってもよく、また部分的に非晶性状態で部分的に結晶状態であってもよい。しかし、貯蔵部のすべてまたはほぼすべてが非晶性状態であることが最も好ましい。更に、非晶性の貯蔵部はガラス形態であることがより好ましい(US 5,098,893)。最も好ましくは、貯蔵部は糖ガラスである。

【0035】

特に好ましい貯蔵媒体は、貯蔵期間に渡って送達されるべき薬剤を安定させるものである。例えば、ポリオールガラスに溶解或いは分散した、もしくは単にポリオール中で乾燥された抗原または薬剤は、長期間安定に保存される(米国特許第5,098,893号、米国特許第6,071,428号、WO 98/16205、WO 96/05809、WO 96/03978、米国特許第4,891,319号、米国特許第5,621,094号、WO 96/33744)。このようなポリオールは、好ましい一連の貯蔵媒体を形成する。

【0036】

好ましいポリオールは単糖、二糖、三糖、またはオリゴ糖およびそれらに対応する糖ア

ルコールを含む糖質を含有する。本発明における使用に適切な糖質は、当技術分野においてよく知られており、トレハロース、グルコース、スクロース、ラクトース、ガラクトース、マンノース、マルチュロース、イソマルチュロースおよびラクチュロース、マルトース、またはデキストロース、ならびに、マンニトール、ラクチトールおよびマルチトールなどの前述の糖アルコールを含む。スクロース、ラクトース、ラフィノースおよびトレハロースが好まれる。最も好ましいのはグルコース、トレハロース、またはスクロースである。

【0037】

好ましくはDNAおよび安定化剤は非晶性の固溶体であり、ガラス形態の貯蔵媒体であることが好ましい。

10

【0038】

貯蔵媒体は乾燥状態で非晶性ガラスを形成することが好ましい。ガラス貯蔵部は任意のガラス転移温度を持ちうるが、保存の間は薬剤を安定させ、また皮膚内への貯蔵部の挿入後は薬剤の速やかな放出を促進するガラス転移温度を持つことが好ましい。従って、ガラス転移温度は保存室温より高いが、体温付近でありうる（例えば、限定はされないが35～50）。

【0039】

装置の皮膚穿通構材を被覆するために用いられる好ましい貯蔵媒体は、短期間に薬剤を放出するものである。好ましい貯蔵部の製剤は、1%アガロースゲル内への挿入の10分以内に、より好ましくは5分以内に、より好ましくは2分以内に、より好ましくは1分以内に、最も好ましくは30秒以内に、ほぼすべての薬剤を放出する。剤が皮膚へのDNA投与に用いられる場合、十分なDNAが24時間以内にその生物学的効果をもたらすように放出されることが好ましく、皮膚への投与の8時間以内に、最も好ましくは1時間以内に十分なDNAが放出されることが好ましい。このような速い放出の貯蔵部は、例えば、非晶性ガラス貯蔵部、特に、低いガラス転移温度を有する速く溶解/膨潤するガラス形態貯蔵部の薄い被覆によって実現される。低いガラス転移温度が、適切なガラス形成糖の選択、および/または湿度の増加、および/またはガラスのイオン強度によって実現され得ることは、当業者にとって明白であろう。更に、ガラス貯蔵部の溶解速度の増加はまた、皮膚に適用する前もしくはその間に装置を加温すること、前もって皮膚に水分補給することによって、または皮膚内への極微針の挿入と同時に液体を投与すること（乾燥した貯蔵部で被覆したマイクロカニューレの孔を通して液体を投与するなど）、または溶解時間を減少させるために製剤に付加的な薬剤を添加することによっても実現されうる。

20

30

【0040】

本発明のDNA成分は直鎖状または開環状またはスーパーコイルプラスミドDNAでありうるが、本発明の関連形態で、DNAは生きた弱毒化細菌またはウイルスベクターの形でありうる。

【0041】

DNAはスーパーコイルプラスミドの形が好ましい。これらの製剤の本発明の1つの主要な利点は、放出の際、その多くがスーパーコイル型、好ましくは単量体のスーパーコイル型のままであるように、DNAが安定化されるという事実である。

40

【0042】

プラスミドDNAの安定性は複数の方法で定義でき、pH、湿度および温度などの保存条件によって決定される相対的な事象であり得る。被覆された貯蔵部の鉄イオンの存在下での保存に関して、4 で3ヶ月間の保存では、好ましくは50%以上のプラスミドがスーパーコイル(ccc, covalently closed circular)のまま維持される。より好ましくは、記載した保存条件下で、60%以上のプラスミドがcccのまま維持され、より好ましくは、これらの保存条件下で、90%以上のプラスミドが4 で3ヶ月間cccのまま維持される。非金属イオン性の針または極微針を被覆するために、プラスミドDNAの安定性は、4 で3ヶ月間の保存後、好ましくは60%以上、より好ましくは80%、最も好ましくは90%以上cccであるとよい。より好ましくは、これらの保存条件下で、90%以上のプラスミドが4 で1年

50

間cccのまま維持され、より好ましくは、90%以上のプラスミドが4 で2年間cccのまま維持される。最も好ましくは、これらの条件下で、上記DNAの安定性は25 で同じ期間に渡って実現される。

【0043】

縫い針上に被覆した固形の貯蔵媒体中のDNAは、促進安定性試験の間、スーパーコイル(ccc)型で安定化されていることが好ましく、DNAが単量体ccc型で安定化されていることが最も好ましい。促進安定性試験の実施例は、乾燥した被覆針を37 で4週間維持し、それに続いて経時的にDNA構造の解析を行う場合である。この種の試験(実施例12に記載)では、好ましくは50%以上のDNAがccc型のまま維持され、より好ましくは60%以上がccc型のまま維持され、より好ましくは80%以上がccc型のまま維持され、最も好ましくは90%以上がccc型のまま維持される。これらの条件および好ましいcccの水準においては、単量体:二量体cccDNAの比率は(0.8~1.2の範囲内、もしくはより好ましくは0.9~1.1の範囲内、最も好ましくは0.95~1.5の範囲内のように)約1または1以上であることも好ましい。

10

【0044】

プラスミド安定性測定のための試験は当業者にとって公知であり、(Evansら、上述; WO 97/40839)に記載されている。これらは、アガロースゲル電気泳動、陰イオン交換HPLC(Ferreira, G.ら、1999, Pharm. Pharmacol. Commun., 5, pp57-59)またはキャピラリーゲル電気泳動(Schmidtら、1999, Anal. Biochem., 274, 235-240)のいずれかによって、スーパーコイル、ccc、プラスミドDNAの割合を測定および定量する技術を含む。単量体:二量体cccの比率は、(いずれのインターカレート剤も含まない)アガロースゲル電気泳動およびEtBr染色後、UVP Bioimaging systemで動作するLabworks 4.0などの市販のソフトウェアを用いた、画像強度解析によって測定できる。

20

【0045】

本発明の貯蔵媒体は、フリーラジカルの分解効果を阻害する安定化剤を含有する。好ましい安定化剤は安定化金属イオンキレート剤を含み、更に、好ましい金属イオンキレート剤は、イノシトール6リン酸、トリポリリン酸塩、コハク酸、リンゴ酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)、デスフェラル、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)およびエチレンジアミンジヒドロキシフェニル酢酸(EDDHA)を含有する。他の好ましい安定化剤は、非還元フリーラジカルスカベンジャーであり、好ましくは、このような薬剤はエタノール、メチオニンまたはグルタチオンである。他の適切なキレート剤およびスカベンジャー(ならびに適切でないもの)は、(WO 97/40839に記載されるような)通常の実験によって当業者により、容易に同定されうる。

30

【0046】

存在する成分量は当業者によって決定されうるが、一般的に金属イオンキレート剤は0.1-10mMの範囲であり、エタノールは約5%(v/v)以下の量で存在し、メチオニンは約0.1~100mMで存在し、グルタチオンは約0.1~10%(v/v)で存在する。

【0047】

安定化剤の好ましい組合せは(a)メチオニンまたはEDTAと組み合わせられたリン酸緩衝エタノール溶液、(b)メチオニンまたはエタノール(もしくはメチオニンおよびエタノールの併用)と組み合わせられたTris緩衝EDTAである。

40

【0048】

DNAおよびポリオール、すなわち、脱金属水またはリン酸もしくはTrisバッファー中のスクロースまたはトレハロースと組み合わせられ、その後、本発明の装置上で乾燥されうる、特に好ましい製剤は、

- A. 10mMメチオニンおよび2.9%エタノール
- B. 3.7%エタノールおよび1mM EDTA
- C. 100mM Tris、1mM EDTAならびに10mMメチオニンおよび2.9%エタノール
- D. 100mM Tris、1mM EDTAおよび10mMメチオニン

50

E. 100mM Tris、1mM EDTAおよび2.9%エタノールである。

【0049】

本発明の装置における好ましい固形の貯蔵媒体は、金属イオンキレート剤または非還元フリーラジカルスカベンジャーを含む。最も好ましくは、本発明の装置における好ましい固形の貯蔵媒体は、金属イオンキレート剤および非還元フリーラジカルスカベンジャーの両方を含む。

【0050】

これらの安定化剤に加えて、固形ワクチン中のDNAの安定性を向上させるために、更なる方法を取りうる。例えば、製剤は使用前に（例えばBioradのChelex 100のような市販の脱金属樹脂を使用することによって）脱金属された溶液を用いて調製されてもよく、および/または、製剤は最終的に高いpH（例えばpH 8~10）に調製されてもよい。

10

【0051】

送達されるべき薬剤および生分解性貯蔵媒体を含有する製剤は、好ましくは水溶液に混合された後、支持構材上で乾燥されるか、または、製剤は融解した後、支持構材上に塗布されることもあり得る。好ましい支持構材の被覆方法は、ワクチン抗原および水溶性ポリオール（トレハロースなど）の水溶液の調製、それに続いて、1回以上溶液に構材を浸すことによる支持構材上への溶液の被覆、それに続く、多孔性の塗膜を形成するための室温での乾燥または凍結乾燥から成る。この方法では、初期の水溶性のポリオールまたは糖の溶液が粘性を持つことが好ましく、このような粘性は40%糖で達成される。

【0052】

20

あるいはまた、バブルジェットプリンターの技術分野で一般的に使用される技術によって、わずかピコリットル量の溶液または融解した製剤が個々の支持構材上に噴霧され、続いて乾燥されうる。代替方法は、当技術分野において既知の技術（噴霧乾燥、噴霧凍結乾燥、もしくは乾燥および粉碎など）を用い、比較的低いガラス転移温度（例えば30）を実現するため含水量を制御することによって、糖などのポリオールを含む非晶性製剤の小球体、微粒子または粉末を調製し、続いて、小球体のガラス転移温度を越える温度（例えば45）に加温した支持構材に小球体、微粒子または粉末を密着させるため、噴霧または浸漬することであろう。被覆粒子はその後融解し、支持構材に接着した後、乾燥させ、または、被覆された支持構材は更に（残存する水分を除去するため）乾燥され、それによって保存に適した貯蔵媒体のガラス転移温度を増加させるであろう。

30

【0053】

あるいはまた、支持構材は凍結被覆技術を用いて被覆されうる。例えば、極微針支持構材の温度を（例えば液体窒素に浸すことによって）水の凝固点以下に低下させ、その後、貯蔵媒体および薬剤の水溶液を冷却した支持構材に噴霧してもよく、または、支持構材を薬剤の溶液に浸してもよい。この方法では、薬剤および貯蔵媒体は速やかに極微針支持構材に接着し、その後、貯蔵部塗膜を乾燥させるために、凍結乾燥によって昇華させてもよく、またはより高温で蒸着させてもよい。

【0054】

極微針支持体を被覆する別の方法は、それらを（優れた接触を確実にするために状況に応じて界面活性剤を含む）水などの溶媒に浸し、その後、溶媒に可溶性の粉末状の貯蔵媒体に湿った支持構材を浸し、続いて溶媒を除去するために乾燥させることである。

40

【0055】

本発明の好ましい実施形態では、220 nm孔隙膜を通した濾過滅菌を可能とする十分な流動性を持った貯蔵部形成媒体の粘性溶液による、支持構材の被覆方法が提供される。更に、濾過可能な粘性糖溶液製剤中に抗原を含有するワクチン製剤が提供される。このような濾過可能な粘性糖溶液の好ましい実施例は、（乾燥前の最終ワクチン製剤の容積当たりの重量で）約20から約50%の間の糖溶液である。より好ましくは、粘性の濾過可能な糖溶液は約30から約45%の糖の範囲であり、最も好ましくは、（乾燥前の最終ワクチン製剤の容積当たりの糖重量で）約40%である。この状況において、最も好ましい糖溶液は、スクロース、ラフィノース、トレハロース、グルコースまたはラクトースを含む。

50

【 0 0 5 6 】

高濃度の糖溶液（例えば20～40％）は、単量体ccc型でDNAの安定性を増加させるので好ましい。

【 0 0 5 7 】

これらの技術を用いて、各々の皮膚穿通極微針には比較的多量の薬剤を装填しうる。各々の穿通成分は、好ましくは最大500 ngのDNA薬剤を装填し、より好ましくは最大1μgのDNA薬剤を装填し、より好ましくは最大5μgのDNA薬剤を装填し、最も好ましくは最大10μgのDNA薬剤を装填している。

【 0 0 5 8 】

好ましくは、本発明のワクチン製剤は、ヒトの病原体に対する免疫応答を誘導できる抗原または抗原組成をコードするDNAを含み、その抗原または抗原組成は、HIV-1、(tat, nef, gp120もしくはgp160など)、ヒトヘルペスウイルス、gD或いはその誘導体などもしくはHSV1或いはHSV2由来のICP27のような前初期タンパク質、サイトメガロウイルス((esp Human)(gBもしくはその誘導体など)、ロタウイルス(弱毒生ウイルスを含む)、エプスタイン-バールウイルス(gp350もしくはその誘導体など)、水痘・帯状疱疹ヘルペスウイルス(gpl, 11およびIE63など)に、または、B型肝炎ウイルス(例えばB型肝炎表面抗原もしくはその誘導体)、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルスなどの肝炎ウイルスに、または、パラミクソウイルス、すなわち、呼吸器合胞体ウイルス(FおよびGタンパク質或いはその誘導体など)、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス(例えばHPV6, 11, 16, 18, ...)、フラビウイルス(例えば黄熱病ウイルス、デング熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス)もしくはインフルエンザウイルス(生きたウイルスまたは不活性化されたウイルス全体、卵或いはMDCK細胞或いはVero細胞で培養された分割インフルエンザウイルス、もしくは(R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920によって記載された)インフルエンザウイルス粒子全体、もしくはその精製もしくは組換えタンパク質)などの他のウイルス性病原体に由来し、または、N. gonorrheaおよびN. meningitidisを含むNeisseria spp(例えば莢膜多糖類およびその共役物、トランスフェリン結合タンパク質、ラクトフェリン結合タンパク質、PilC、付着因子); S. pyogenes(例えばMタンパク質もしくはその断片、C5Aプロテアーゼ、リボタイコ酸)、S. agalactiae、S. mutans; H. ducreyi; Branhamella catarrhalisとしても知られるM catarrhalisを含むMoraxella spp(例えば高分子量および低分子量付着因子およびinvasin); B. pertussis(例えばpertactin、百日咳毒素もしくはその誘導体、線維状血球凝集素、アデニル酸シクラーゼ、線毛)、B. parapertussisおよびB. bronchisepticaを含むBordetella spp; M. tuberculosis(例えばESAT6、Antigen 85A、-Bもしくは-C)、M. bovis、M. leprae、M. avium、M. paratuberculosis、M. smegmatisを含むMycobacterium spp.; L. pneumophilaを含むLegionella spp.; 腸管毒性 E. coli(例えば定着因子、易熱性毒素もしくはその誘導体、耐熱性毒素もしくはその誘導体)、腸管出血性大腸菌、腸内病原性大腸菌(例えば志賀毒素様毒素もしくはその誘導体)を含むEscherichia spp.; V. cholera(例えばコレラ毒素もしくはその誘導体)を含むVibrio spp; S. sonnei、S. dysenteriae、S. flexneriiを含むShigella spp; Y. enterocolitica(例えばYopタンパク質)、Y. pestis、Y. pseudotuberculosisを含むYersinia spp; spp C. jejuni(例えば毒素、付着因子およびinvasin)ならびにC. coliを含むCampylobacter; S. typhi、S. paratyphi、S. choleraesuis、S. enteritidisを含むSalmonella spp; L. monocytogenesを含むListeria spp.; H. pylori(例えばウレアーゼ、カタラーゼ、空胞化毒素)を含むHelicobacter spp; P. aeruginosaを含むPseudomonas spp; S. aureus、S. epidermidisを含むStaphylococcus spp.; E. faecalis、E. faeciumを含むEnterococcus spp.; C. tetani(例えば破傷風毒素およびその誘導体)、C. botulinum(例えばボツリヌス毒素およびその誘導体)、C. difficile(例えばクロストリジウム毒素AもしくはBおよびその誘導体)を含むClostridium spp.; B. anthracis(例えばボツリヌス毒素およびその誘導体)を含むBacillus spp.; C. diphtheriae(例えばジフテリア毒素およびその誘導体)を含むCorynebacterium spp.; B. burgdorferi(例えばOspA

、OspC、DbpA、DbpB)、*B. garinii*(例えばOspA、OspC、DbpA、DbpB)、*B. afzelii*(例えばOspA、OspC、DbpA、DbpB)、*B. andersonii*(例えばOspA、OspC、DbpA、DbpB)、*B. hermsii*を含む*Borrelia* spp.; *E. equi*を含む*Ehrlichia* spp.およびヒト顆粒球性エールリヒア症の薬剤;*R. rickettsii*を含む*Rickettsia* spp.; *C. trachomatis*(例えばMOMP、ヘパリン結合タンパク質)、*C. pneumoniae*(例えばMOMP、ヘパリン結合タンパク質)、*C. psittaci*を含む*Chlamydia* spp.; *L. interrogans*を含む*Leptospira* spp.; *T. pallidum*(例えば希少な外膜タンパク質)、*T. denticola*、*T. hyodysenteriae*を含む*Treponema* spp.などの細菌性病原体に由来し、または、*P. falciparum*を含む*Plasmodium* spp.; *T. gondii*(例えばSAG2、SAG3、Tg34)を含む*Toxoplasma* spp.; *E. histolytica*を含む*Entamoeba* spp.; *B. microti*を含む*Babesia* spp.; *T. cruzi*を含む*Trypanosoma* spp.; *G. lamblia*を含む*Giardia* spp.; *L. major*を含む*Leshmania* spp.; *P. carinii*を含む*Pneumocystis* spp.; *T. vaginalis*を含む*Trichomonas* spp.; *S. mansoni*を含む*Schistosoma* spp.などの寄生生物に由来し、または、*C. albicans*を含む*Candida* spp.; *C. neoformans*を含む*Cryptococcus* spp.などの酵母に由来する。他の好ましい細菌性ワクチンは、B型*H. influenzae*(例えばPRPおよびその共役物)、亜型判定不能*H. influenzae*、例えばOMP26、高分子量付着因子、P5、P6、タンパク質Dおよびリポタンパク質D、ならびにフィンブリンおよびフィンブリン誘導ペプチド(US 5,843,464)を含む*Haemophilus* spp.に由来する抗原を含有する。

10

【0059】

DNAワクチン被覆装置は予防用または治療用ワクチン接種のため、ならびに、免疫応答の刺激および/または増強のために使用されうる。

20

【0060】

本発明の利点の1つは、DNA薬剤を付加的な活性物質と共に処方できること、他の固形のDNA薬剤では制限され得ることである。例えば、DNAワクチンは更に、細胞内へのDNAの取り込みを促進する薬剤、免疫応答を向上および/または誘導するアジュバントまたは他の免疫賦活剤を含有してもよく、また更に薬学的に容認される賦形剤を含有してもよい。

【0061】

例えば、固形の薬剤貯蔵媒体は、好ましくはDNA凝縮剤、例えばスperlミジンまたはPEI(ポリエチレンジイミン)を含有しうる。製剤に含有されうる他の賦形剤は、バッファ、アミノ酸、加工もしくは保存の間塗膜の相変化を防ぐために添加されうる相変化阻害剤(結晶阻害剤)、または、アミノ酸のようなメーラード反応阻害剤などの、加工もしくは保存の間有害な化学反応を防ぐための阻害剤を含む。

30

【0062】

DNAと共に貯蔵媒体中に包括される好ましい付加的な薬剤は、DNA分解酵素阻害剤である。好ましいDNA分解酵素阻害剤の1つの例は、アウリントリカルボン酸(ATA, Glasspool-Malone, J.ら、(2000), *Molecular Therapy* 2: 140-146)である。

【0063】

更に、本発明のDNAワクチンはまた、有利にアジュバントを含有しうる。本発明のワクチンに適切なアジュバントは、IgEペプチド免疫原に対する抗体反応を増強できるアジュバントを含有する。アジュバントは当技術分野において既知である(*Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach*, 1995, *Pharmaceutical Biotechnology*, Volume 6, Powell, M.F., および Newman, M.J. 編, Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X)。本発明のワクチンに適切なアジュバントは、免疫原に対する抗体反応を増強できるアジュバントを含有する。適切な免疫活性化剤は以下を含有するが、この羅列は決して完全に網羅されたものではなく、他の薬剤を除外する意味ではない。すなわち、イミキモド(imiquimod)[S-26308, R-837]、(DockrellおよびKinghorn, 2001, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 751-755; Harrisonら、Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine', *Vaccine* 19: 1820-1826, (2001))ならびにレジキモド(resiquimod)[S-28463, R-848](Vasilakosら、'Adjuvant activities of immune response modifier R-848: Comparison with CpG O

40

50

DN', Cellular immunology 204: 64-74 (2000).) のような合成イミダゾキノリン、ツカレソール (tucaresol) (Rhodes, J.ら 'Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs', Nature 377: 71-75 (1995)) のような抗原提示細胞およびT細胞表面に常時発現するカルボニルおよびアミンのシッフ塩基、GM-CSF、IL-1 α 、IL-1 β 、TGF- β およびTGF- β などの前炎症性サイトカイン、インターフェロン γ 、IL-2、IL-12、IL-15およびIL-18などのTh1誘導因子、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10およびIL-13などのTh2誘導因子ならびにMCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、TCA-3、CD80、CD86およびCD40Lなどの他のケモカインおよび共刺激遺伝子を含むであろう、タンパク質またはペプチドのいずれかのサイトカイン、ケモカインおよび共刺激分子、CTLA-4およびL-セレクトリンなどの他の免疫活性化標的リガンド、Fas、(49) などのアポトーシス促進タンパク質およびペプチド、バクスフェクチン (vaxfectin) (Reyesら、'Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization', Vaccine 19: 3778-3786)、スクアレン、 α -トコフェロール、ポリソルベート80、DOPCおよびコレステロールなどの合成脂質性アジュバント、内毒素[LPS]、(Beutler, B., 'Endotoxin, 'Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity', Current Opinion in Microbiology 3: 23-30 (2000))、CpGオリゴ-およびジヌクレオチド (Sato, Y.ら、'Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization', Science 273 (5273): 352-354 (1996). Hemmi, H.ら、'A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA', Nature 408: 740-745, (2000)、ならびに、合成マイコバクテリアリポタンパク質、マイコバクテリアタンパク質p19、ペプチドグリカン、タイコ酸およびリピドAなどのTh1-誘導性サイトカインを産生するためToll-like receptorの引き金となる他の潜在的リガンドである。

10

20

30

40

50

【0064】

Th1型応答を優勢に誘導するためのある好ましいアジュバントは、例えば、モノホスホリルリピドAまたは好ましくは3-デオ-0-アシル化モノホスホリルリピドAのようなリピドA誘導体を含む。MPL (登録商標) アジュバントはCorixa Corporation (Seattle, WA; 例えば、米国特許第4,436,727号; 4,877,611号; 4,866,034号および4,912,094号参照) から入手可能である。CpGを含むオリゴヌクレオチド (その中でCpGジヌクレオチドはメチル化されていない) もまたTh1応答を優勢に誘導する。このようなオリゴヌクレオチドは既知であり、例えば、WO 96/02555、WO 99/33488ならびに米国特許第6,008,200号および5,856,462号に記載されている。免疫活性化DNA配列はまた、例えば、Satoら、Science 273:352, 1996にも記載されている。別の好ましいアジュバントは、Quil AもしくはQS21およびQS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA) を含有するその誘導体; エスシン (Escin); デイジトニン (Digitonin); またはGypsophilaもしくはChenopodium quinoaサポニンなどのサポニンを含む。

【0065】

本発明のこの態様において、好ましい免疫活性化剤またはアジュバントは、PCT特許出願公開番号WO 94/17043 (その内容は参照により本明細書に組み入れられる) に記載されるような、イミキモドまたは他の関連分子 (レジキモドなど) である。

【0066】

本発明のある実施形態では、例えばUlmerら、Science 259:1745-1749, 1993に記載され、Cohen, Science 259:1691-1692, 1993によって概説されるように、ポリヌクレオチドは「むき出しの」DNAとして投与/送達される。むき出しのDNAの取り込みは、細胞内に効果的に輸送される、金もしくは生分解性のビーズなどの小さいマイクロビーズ上にDNAを被覆することによって、または、リン酸カルシウムもしくはDEAEデキストランなどの他の既知のトランスフェクション促進剤を使用することによって増加されうる。

【0067】

DNAはまた、例えば、リポソームおよび貯蔵媒体に包括されるすべてのような担体と共役して投与されうる。一般的に、このようなリポソームは、例えばイミダゾリウム誘導体 (WO95/14380)、グアニジン誘導体 (WO95/14381)、ホスファチジルコリン誘導体 (WO95

/35301)、ピペラジン誘導体(W095/14651)およびピグアニド誘導体のように陽イオン性である。

【0068】

適切な薬学的に容認される賦形剤の例は、水、リン酸緩衝生理食塩水、等張バッファー溶液を含む。

【0069】

薬剤またはワクチンを皮膚内に迅速且つ多量に投与することが、本発明の意図である。これは、貯蔵媒体として可溶性の高い炭水化物の使用を含む多くの方法によって、ならびに、投与の間の極微針構材の振動および/または加熱によって更に促進されうる。

【0070】

各ワクチン用量において発現できるDNA量は、一般的なワクチンにおいて著しい不都合な副作用なしに免疫防御反応を誘導する量として選択される。このような量は、用いられる特定のDNA構築物によって異なるであろうが、各用量は一般的に1~1000 μ gのDNA、好ましくは1~500 μ g、より好ましくは1~100 μ gを含有し、最も好ましい範囲は1~50 μ gであろうと予想される。特定のワクチンに対する最適な量は、被験体における適切な免疫応答の観察を含む標準的な検討によって確定され得る。最初のワクチン接種に続いて、被験体は十分な間隔を置いて1回または数回の追加免疫を受けてもよい。

【0071】

本発明の製剤は予防および治療の両方の過程に使用されうる。従って、本発明は、感染症或いは癌、もしくはアレルギー、もしくは自己免疫疾患に感受性のまたは罹患している哺乳類の治療方法のために提供される。本発明の更なる態様では、医薬用に本明細書に記載されるようなワクチンが提供される。ワクチンの製造は、一般的にNew Trends and Developments in Vaccines, Vollerら編、University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978に記載される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0072】

本発明は以下の実施例によって例示されるが、それに限定されない。

【実施例1】

【0073】

凍結乾燥プラスミドDNAによる針の被覆の実証

1.1プラスミドの調製および製剤

この検討に使用したプラスミドはすべて図1に示される。pEGFP-C1はGFP発現ベクター(Clontech, Palo Alto, California, USA)である。pGL3CMVはpGL3 Basicを基にしたルシフェラーゼ発現ベクターであり(Promega Corporation., Madison, Wisconsin, USA)、そこではCMV前初期プロモーターがルシフェラーゼ発現を駆動する。

【0074】

pVAC1.ovaは、pUGOVAからPCR増幅されたニワトリのオボアルブミンをコードするcDNAを発現ベクターpVAC1にライゲーションすることによって構築された、ニワトリのオボアルブミン発現プラスミドである。pVAC1は哺乳類発現ベクター、pCI(Promega)の改変物であり、そこでは多重クロニング部位、EcoRIからBst ZIまでが、pGL3Basic(Promega)から増幅された、特有のNhe I、Rsr IIおよびXho Iによって5'に、特有のPac I、Asc IおよびNot I制限酵素部位によって3'に隣接したEMCV IRES配列で置換されている。スーパーコイルプラスミドDNA(低内毒素)を、アルカリSDS溶解法、限外濾過および陰イオン交換カラムクロマトグラフィーの組合せを用いて高純度に、大規模に約100mgの収量で精製した。

【0075】

プラスミドをTE(10mM TrisHCl, 1mM EDTA)、pH 8.0に1 μ g/ μ lで再懸濁し、アガロースゲル電気泳動による解析で95%以上をスーパーコイルと判定した。

【0076】

プラスミドを、通常の大規模エタノール沈殿法によって、針を被覆するために様々な溶

10

20

30

40

50

液中に製剤した。沈殿させたDNAを直ちに0.5~12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で水性製剤溶液に再懸濁した (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, J.ら、第2版、1989, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USAの1章参照)。

【0077】

1.2針および被覆方法

8号の縫い針 (A817, Miliners, Milward, Coats Crafts, UK) を John Lewis partnership, PLC (London, UK.) から入手した。皮下注射針、Microlance 3、30G、26G、25Gおよび21GはBecton and Dickinson (New Jersey, USA) から入手した。

【0078】

縫い針の1.0~1.5cmを被覆するように、1.5 mlのプラスミド剤に30~60秒間1回浸すことによって縫い針を被覆し、針を2mlの凍結乾燥ガラスバイアルのゴム栓に釣り下げた。2 mlプラスチックスクリーキャップチューブ、Sarstedt (Numbrecht, Germany) 中の1.5 mlのプラスミド剤にバランスをとるために、手で1mlシリンジに取り付けた皮下注射針を同様に被覆した。

【0079】

酸処理する針を濃塩酸 (HCl) に5秒間浸し、続いて蒸留水で洗浄し、ペーパータオル上で風乾した。その後、針は滅菌ガラスビーカーに保存され、15 psiで20分間、1回の湿式オートクレーブサイクルに供された。その後、針をドラフト内で乾燥させ、室温で保存した。

【0080】

1.3プラスミドDNAの凍結乾燥および溶出

被覆した針を、Modulyo 4K Freezer Dryer (Edwards, Crawley, UK) を用いて-45℃以下で最低1時間、真空下で凍結乾燥した。DNAで被覆し凍結乾燥した針は、直ちに使用されるかまたは、4℃で密封保存される。

【0081】

室温で、2mlプラスチックスクリーキャップチューブ、Sarstedt中の0.5mlの100mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、10mMメチオニン、2.9% エタノール中で30分間振とうすることによって、被覆した針からプラスミドDNAを溶出した。その後、標準的なエタノール沈殿 (Sambrook, J.ら、上述) によって、プラスミドDNAを回収し、アガロースゲルへの適用のために、20~30 μl の100mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、10mMメチオニン、2.9% エタノールに再懸濁した。

【0082】

1.4アガロースゲル電気泳動およびアガロースゲル「針放出アッセイ」

プラスミドDNAおよび被覆後針から溶出されたそれを、製品の使用説明書Invitrogen Corporation (Carlsbad, California, USA) に従って、エチジウムブロマイドを含む0.8%または1.2%アガロースE-ゲルのいずれかで通常通りに泳動した。

【0083】

被覆した針から直接アガロースゲル内へのプラスミドDNAの放出の程度を観察するために、2.5cm厚、1%アガロース (Ultra Pure, Life Technologies, Paisley, Scotland, UK) ゲルを流し込んだ。プラスミドDNAの針からアガロースへの放出を可能にするために、針をウェルの直背部のアガロースに挿入した。その後、エチジウムブロマイドまたは他のDNA可視化物質の非存在下、100V、100mAで1~2時間、ゲル電気泳動を行った (Sambrook, J.ら、上述の6章参照)。その後、製品の使用説明書 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA.) に従いSYBR Gold染色によって、DNAを可視化した。UVP8000 gel analysis system (UVP Life Sciences, Cambridge, UK.) のVisionworks packageを用いて、ゲル解析を行った。

【0084】

1.5安定化剤を含む水溶液中の高濃度のDNAによる縫い針の被覆

溶液からのプラスミドDNAによる鋭い被覆表面の実現可能性を調べるために、酸処理した縫い針で最初の実験を行った。8号の縫い針を、水または0.85%生理食塩水のいずれか

10

20

30

40

50

で調製した $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l} \sim 5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の範囲のプラスミドDNA溶液に2～3時間、1回浸した。針を慎重に移動させ、凍結乾燥し、その後、 $500\mu\text{l}$ のTE中で30分間激しく振とうすることによってDNAを溶出する前に60時間密封して4℃で保存した。DNAをエタノール沈殿によって濃縮し、ゲル電気泳動によって解析した。部分的に分解された 100ng 以下のDNAが $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 生理食塩水のサンプルから回収された。他のサンプルはアガロースゲルで検出される十分なDNAを示さなかった（データは示さない）。酸処理は短期間のプラスミドDNAの安定性に不利な影響を与える第一鉄および第二鉄金属イオンの組合せを生じると考えられた（Evansら、上述；WO 97/40839）。

【0085】

針の被覆方法を改善し、DNA分解を減少させるために、金属イオンの存在下でプラスミドの安定性の増加を示す多くの薬品（例えばキレート剤およびフリーラジカルスカベンジャー）の存在下で、プラスミドを水溶液に製剤した（Evansら、上述；WO 97/40839）。金属イオンの形成を減少させるために、縫い針はまたメタノールで洗浄され風乾された。プラスミドDNA溶液は、 100mM Tris、 1mM EDTA、 10mM メチオニン、 2.9% エタノールpH 8.0中で $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ または $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ と非常に高濃度に調製された（製剤2）。8号の縫い針を4で一晩溶液に1回浸すことによってDNAで被覆し、針を慎重に移動させ、凍結乾燥し、その後、DNAを直ちに溶出し、濃縮し、ゲル電気泳動によって解析した。

【0086】

このような解析のデータを図2に示し、酸処理およびメタノール洗浄した針の被覆を比較した。

【0087】

試験群は以下のレーンで泳動された。すなわち、

- 1) $1\mu\text{g}$ の 1kb DNAラダー（Promega）。2) HCl処理した縫い針に被覆した $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ストックから溶出したpEGFP-C1プラスミド。3) HCl処理した縫い針に被覆した $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ストックから溶出したpEGFP-C1プラスミド。4) メタノール洗浄した縫い針に被覆した $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ストックから溶出したpEGFP-C1プラスミド。5) メタノール洗浄した縫い針に被覆した $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ストックから溶出したpEGFP-C1プラスミド。6) pEGFP-C1プラスミド標準品 - $0.5\mu\text{g}$ 。7) pEGFP-C1プラスミド標準品 - $1.0\mu\text{g}$ 。8) pEGFP-C1プラスミド標準品 - $5.0\mu\text{g}$ 。9) pEGFP-C1プラスミド標準品 - $10.0\mu\text{g}$ 。

【0088】

酸処理によって生じた過剰な金属イオンの非存在下では、 $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ サンプルから $1 \sim 2\mu\text{g}$ の非分解DNAが回収され、一方、 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ サンプルは $10\mu\text{g}$ 以上の収量をもたらす。これは、DNAが縫い針のような鋭利な物体を被覆し凍結乾燥でき、大部分が完全に溶出できる原理を確立した。

【実施例2】

【0089】

針上に被覆した後の高濃度のプラスミドの安定性

次に、針の被覆の再現性および針上で4℃で保存した凍結乾燥プラスミドDNAの短期間の安定性を検討した。 100mM Tris、 1mM EDTA、 10mM メチオニン、 2.9% エタノールpH 8.0中 $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ または $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプラスミドDNA溶液（製剤2）を、8号の縫い針上に被覆、凍結乾燥し、DNAを直ちに溶出、または4℃で1～4日間保存した。このような解析のデータを図3に示し、各時間保存された針を二連で示した。

【0090】

(A)メタノール洗浄した縫い針に被覆した $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ストックから溶出したpEGFP-C1プラスミド。

【0091】

(B)メタノール洗浄した縫い針に被覆した $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ストックから溶出したpEGFP-C1プラスミド。

【0092】

各ゲルにおけるレーンを示す。すなわち、1) pEGFP-C1プラスミド標準品 - $5.0\mu\text{g}$ (A)、

10

20

30

40

50

10.0 μg (B)。2) 1 μg の1kb DNAラダー (Promega)。3) および4) 被覆直後の溶出。5) および6) 縫い針上で4 16時間保存後の溶出。7) および8) 縫い針上で4 40時間保存後の溶出。9) および10) 縫い針上で4 64時間保存後の溶出。11) および12) 縫い針上で4 88時間保存後の溶出。

【0093】

被覆、凍結乾燥した針上で、最大5 μg の大量のプラスミドが、大部分完全に保持でき、4 66~88時間後に溶出できる。しかし、被覆、溶出または保存は若干変化しやすさが見られ、10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ サンプルは最小の変化を示した。共有結合閉環状 (ccc) DNA (図3、下のプラスミドバンド) の開環状 (oc) (図3、上のプラスミドバンド) への変換は、保存の際に時間とともに起こると思われる。これらの問題は更なる製剤の改良で対処される。

10

【実施例3】

【0094】

針上に被覆した後の高濃度のプラスミドの短期安定性の改善

100mM Tris、1mM EDTA、10mMメチオニン、2.9%エタノールpH 8.0中のプラスミド (製剤2) であるが、付加的にトレハロースまたはスクロースのいずれかの低濃度の糖 (17.5%) 「LS」または高濃度の糖 (40%) 「HS」を含む更なる製剤を、針の被覆および凍結乾燥後の短期間の安定性について評価した。このような解析の溶出したDNAのアガロースゲル電気泳動を図4に示す。針の被覆、溶出およびDNAの完全性について、17.5%スクロース (LS) もしくはトレハロース (LT) (プラスミドDNAは5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、または40%スクロース (HS、プラスミドDNAは12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) もしくはトレハロース (HT、プラスミドDNAは5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を含む製剤が比較された。

20

【0095】

図4は、

(A) メタノール洗浄した縫い針に被覆した製剤 (HS) または製剤 (HT) から溶出したpGL3 CMVプラスミド。

【0096】

(B) メタノール洗浄した縫い針に被覆した製剤 (LS) または (LT) から溶出したpGL3CMV プラスミド。を示す。それぞれの図のレーンは以下を示す。すなわち、1) 1 μg の1kb DNAラダー (Promega)。2) 被覆直後の溶出、HS: (A)、LS: (B)。3) 縫い針上で4 16時間保存後の溶出、HS: (A)、LS: (B)。4) 縫い針上で4 40時間保存後の溶出、HS: (A)、LS: (B)。5) 縫い針上で4 64時間保存後の溶出、HS: (A)、LS: (B)。6) 被覆直後の溶出、HT: (A)、LT: (B)。7) 縫い針上で4 16時間保存後の溶出、HT: (A)、LT: (B)。8) 縫い針上で4 40時間保存後の溶出、HT: (A)、LT: (B)。9) 縫い針上で4 64時間保存後の溶出、HT: (A)、LT: (B)。

30

【0097】

低濃度および高濃度の糖の存在、特に後者 (図4a参照) は、針上を被覆した凍結乾燥DNAの再現性および安定性を改善した。糖の存在下、4 で3日間保存した際、開環状プラスミドDNAの比率に明白な増加はなく、プラスミドDNAは大部分ccc型のまま保持された。

【実施例4】

【0098】

高濃度のプラスミドの被覆針からアガロースゲルへの放出

再水和による、縫い針上を被覆した高濃度の糖製剤 (HS、実施例3) からの凍結乾燥したプラスミドDNAの放出または「送達」率を観察するために、実験を行った。針の被覆のために、ストックプラスミドDNAを12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ で付加的に40%スクロース (HS) または5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ でトレハロースを含む100mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、10mMメチオニン、2.9%エタノール (製剤2) に再懸濁した。DNA「放出」は、15秒から15分まで時間を増加させ、電気泳動を行うために、厚い1%アガロースゲルのウェルのすぐ上に、新たに凍結乾燥したプラスミドDNAで被覆した針を置くことによって達成された。その後、使用できる最も高感度のDNA染色液、SYBR goldでゲルを染色した (図5A参照)。余分のプラスミドをアガロースに「刺した」後の針から溶出し、沈殿させ、上述のようにSYBR gold染色したア

40

50

ガロースゲルで解析した（図5B参照）。図5に示されたその結果は、プラスミドDNAの大部分（90%以上）約10 μ gが1～2分で針から放出されることを実証した。

【0099】

図5は、

(A) アガロースゲルに挿入直後、時間の増加に際して、被覆した縫い針から放出されたプラスミド。

【0100】

(B) アガロースゲルに挿入直後、時間の増加に際して(A)、被覆した縫い針に保持され、溶出されたプラスミドであり、各レーンは以下を示す。すなわち、

1) 1 μ gの1kb DNAラダー（Promega）。2) 15秒間のゲル放出、（HT）。3) 60秒間のゲル放出、（HT）。4) 2分間のゲル放出、（HT）。5) 5分間のゲル放出、（HT）。6) 15分間のゲル放出、（HT）。7) 空き。8) 15秒間のゲル放出、（HS）。9) 60秒間のゲル放出、（HS）。10) 2分間のゲル放出、（HS）。11) 5分間のゲル放出、（HS）。12) 15分間のゲル放出、（HS）。13) 空き。14) pGL3CMVプラスミド標準品 - 0.5 μ g。15) pGL3CMVプラスミド標準品 - 1.0 μ g。16) pGL3CMVプラスミド標準品 - 5.0 μ g。17) pGL3CMVプラスミド標準品 - 12.0 μ g。

【実施例5】

【0101】

単一の縫い針と比較した単一の皮下注射針上に被覆したプラスミドの用量の改善

単一の針上を被覆し、凍結乾燥され得るプラスミドDNAの用量を増加させるために、中空の皮下注射針は、より大きな表面積を持ち、中空でない縫い針より多くのDNAを収容するであろうと仮定された。縫い針のための同一の被覆処理と並行して、30G皮下注射針を同様のプラスミドDNA/針被覆処理によって（HS製剤を用いた、図4b参照）被覆し、溶出されるプラスミド量をアガロースゲル電気泳動によって解析した。各々の種類で個別の5本の針を解析した。その結果を図6に示す。レーンは1) 1 μ gの1kb DNAラダー（Promega）、2)、3)、4)、5) および6) 被覆したメタノール洗浄縫い針から溶出したpGL3CMVプラスミド、7)、8)、9)、10) および11) 被覆した30G皮下注射針から溶出したpGL3CMVプラスミド。12) pGL3CMVプラスミド標準品 - 5.0 μ g。

【0102】

30G皮下注射針の使用は、縫い針を被覆するプラスミド量の少なくとも2倍の増加をもたらした。これは、中空でない針と比較して、より多くのDNAが中空の針を被覆できることを示唆する。

【実施例6】

【0103】

被覆および凍結乾燥後、縫い針および皮下注射針からのプラスミドDNA放出のために最適な製剤

針を被覆、凍結乾燥後のそれらのDNA放出能力について、完全なHS製剤（実施例3に記載）の個々の成分のいくつかが欠けている一連の異なるDNA製剤を、完全なHSおよびLS製剤と共に比較した。針の種類：本解析では10号の縫い針および21G、25G、26G、30Gまでの範囲の皮下注射針を比較した。DNA放出は「アガロースゲル放出アッセイ」によって実施例4、図5に記載されたように検定し、放出時間は約2分、続いてゲル電気泳動を行った。このようなデータを図7に示す。

【0104】

レーンには、以下の製剤で被覆した針を穿刺した。すなわち、

図7A

図7B

製剤および針の組合せ

レーン：-

1) A1

F1

2) A2

空き

3) A3

F2

50

4) A4	空 き	
5) A5	F3	
6) 空 き	空 き	
7) B1	F4	
8) B2	空 き	
9) B3	F5	
10) B4	空 き	
11) B5	G1	
12) 空 き	空 き	
13) C1	G2	10
14) C2	空 き	
15) C3	G3	
16) C4	空 き	
17) C5	G4	
18) 空 き	空 き	
19) D1	G5	
20) D2	空 き	
21) D3	H1	
22) D4	空 き	
23) D5	H2	20
24) 空 き	空 き	
25) E1	H3	
26) E2	空 き	
27) E3	H4	
28) E4	空 き	
29) E5	H5	
30) 空 き	空 き	
31) 空 き	I1	
32) 空 き	空 き	
33) 空 き	I2	30
34) 空 き	空 き	
35) 空 き	I3	
36) 空 き	空 き	
37) 空 き	I4	
38) 空 き	空 き	
39) 空 き	I5	
40 - 45) 空 き	空 き	
46) pVac1ova プラスミド標準品 - 0.5 μ g	pVac1ova プラスミド標準品 - 0.5 μ g	
47) 空 き	空 き	
48) pVac1ova プラスミド標準品 - 5.0 μ g	pVac1ova プラスミド標準品 - 5.0 μ g	40
49) 空 き	空 き	
50) 1 μ gの1kb DNAラダー (Promega)	1 μ gの1kb DNAラダー (Promega)	
製剤は以下の符号を用いて記述される。すなわち、		
A) 40%スクロース、100mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、10mMメチオニン、2.9%エタノール (HS)		
B) 17.5%スクロース、100mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、10mMメチオニン、2.9%エタノール (LS)		
C) 40%スクロース、100mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、2.9%エタノール (HS-メチオニン)		
D) 40%スクロース、100mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、10mMメチオニン (HS-エタノール)		50

ル)

E) 100mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、10mMメチオニン、2.9%エタノール (製剤 2)

F) 100mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、2.9%エタノール (製剤 2 -メチオニン)

G) 100mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、10mMメチオニン (製剤 2 -エタノール)

H) 40%スクロース水溶液

I) 10mM Tris /HCl pH 8.0、1mM EDTA、

1 - 縫い針、8号

2 - 30G 皮下注射針

3 - 26G皮下注射針

4 - 25G皮下注射針

5 - 21G皮下注射針

10

データは、このアッセイにおいて最適なDNA放出のための好ましい製剤は (17.5%もしくは40%のいずれかで) スクロースを含むもの、または、キレート剤およびフリーラジカルスカベンジャーの完全な製剤 (製剤 2)、またはより好ましくは両方の組合せであることを示唆する。データはまた、検査した製剤の大多数に対して、このアッセイにおけるDNA放出は縫い針および26Gより大きい口径の皮下注射針 (26Gが最適) の使用が最良であり、30G皮下注射針はこのアッセイにおけるDNA放出が最も乏しいことを実証する。

【実施例 7】

【0105】

針の被覆、凍結乾燥および保存後、プラスミドDNAの安定化のために最適な製剤

20

実施例 6 および図 7 に記載されたような、完全なHS製剤 (実施例 3) の個々の成分のいくつかは欠けている一連の異なるDNA製剤を、針を被覆、凍結乾燥後、短期間の保存の際のそれらのスーパーコイルプラスミドDNAを安定化させる能力について比較した。メタノール洗浄した縫い針を、被覆、凍結乾燥し、4 で7日間保存した。その後、プラスミドDNAを標準的な方法で溶出、回収し、インターカレート剤非存在下でアガロースゲル電気泳動 (100V、100mAで2時間) を行った (Sambrook, J.ら、上述)。次に、SYBR goldによる染色およびUV光の下で可視化した後、溶出したプラスミドDNAの完全性を観察した。このようなデータは図 8 に示され、これらは、実施例 6 に記載したような様々な異なる製剤、A - I中に製剤されたメタノール洗浄した縫い針から、保存後、溶出されたプラスミドDNAを示す。

30

【0106】

レーン: -

1) 1μgの1kb DNAラダー (Promega)

2) pVac10va プラスミド標準品 - 5.0μg

3) および (4) 製剤 A (サンプルが失われた -レーン 3)

5) および (6) 製剤 B

7) および (8) 製剤 C

9) および (10) 製剤 D

11) および (12) 製剤 E

13) および (14) 製剤 F

15) および (16) 製剤 G

17) および (18) 製剤 H

19) および (20) 製剤 I

40

データは、針から溶出する際、キレート剤およびフリーラジカルスカベンジャーと糖の組合せを含む製剤が最も大きく最も再現性のあるプラスミドの収率をもたらすことを確認した。そのデータは、キレート剤およびフリーラジカルスカベンジャーと糖の組合せを含む製剤でのみ、プラスミドDNAが主に単量体スーパーコイル型での放出のために維持されることを示唆する。

【実施例 8】

【0107】

50

被覆、凍結乾燥した針からの、機能的に活性のあるプラスミドDNAのin vivo送達の実証
in vivo送達およびルシフェラーゼアッセイ

被覆した針からのプラスミドDNAの送達は、メスのBalb/c x C3H F1マウスの筋肉 (IM) および皮内 (ID) の両方に行われた。IM送達のために、除去する前10~20秒間、DNAで被覆した30G皮下注射針を前もって毛を剃った大腿筋に挿入した。ID送達のために、マウスをイソフルランで麻酔し、低倍率顕微鏡下で、被覆した30G皮下注射針を前もって毛を剃った腹部に2分間挿入した。陽性対照として、生理食塩水中の10 µgのプラスミドDNAを標準的な手順によってIMおよびIDの両方に注射した。10匹の動物群または組織群を6つの陽性対照と対比して解析した。マウスを殺して、サンプルをプラスミド送達48時間後に取り出し、液体窒素で素早く凍結させた。

10

【0108】

筋肉および皮膚サンプルを室温で解凍し、IKA Labortechnik Ultra turrax T8 polytronを用いて、500 µlのpassive lysis buffer (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) で破碎した。ルシフェラーゼアッセイキット (Promega) を用いて、ルシフェラーゼ酵素活性を測定した。40 µlの溶解液を (二連で) 黒の96ウェルプレート (Nunc) で200 µlのルシフェラーゼアッセイ試薬 (Promega) と共に分析した。ルシフェラーゼ活性 (RLU) はTopCountNXT HTSシンチレーション・ルミネッセンスカウンター (Packard) で1秒当たりのカウントとして測定された。総タンパク質濃度は、製造業者のプロトコールを用いてCoomassie Plus protein assay reagent kit (Pierce) によって算出された。簡潔に述べると、5 µlの細胞溶解液を145 µlの水 (Sigma) および150 µlのcoomassie blue reagentと共に96ウェル平底プレート (Costar) で分析した。Molecular Devices Spectra Max 340で595nmの吸光度を測定した。ルシフェラーゼ活性は相対発光量 (RLU) /mg総タンパク質として表される。

20

【0109】

このような実験のデータを図9に示し、そこで、被覆針から放出されたプラスミドに由来するルシフェラーゼ活性を、標準的なIM (図9A) およびID (図9B) 注射によって送達されたプラスミドに由来するそれと比較する。データは、被覆針投与からのID DNA放出後少なくとも1/10のマウスはルシフェラーゼ活性が陽性であり、同様のIM処置後少なくとも3/10のマウスは陽性であることを示唆した。これは、コードされる遺伝子または抗原の発現を可能となるために転写活性型で針を被覆した場合、プラスミドDNAがこれらの製剤から放出され得るという原理を実証する。

30

【実施例9】

【0110】

被覆、凍結乾燥した針からの皮内 (ID) へのプラスミドDNAのin vivo送達が、液体プラスミドDNAの注射と同様の遺伝子発現効率を示し得ることの実証
in vivo送達およびルシフェラーゼアッセイ

マウスの皮膚へのID送達は、実施例8に記載したように行った。実施例8のように、特に指定のない限りin vivoでの遺伝子送達のために使用されるすべてのDNA製剤は、10mg/mlのpGL3CMVプラスミドDNAならびに40%スクロース、100mM Tris/HCl pH 8.0、1mM EDTA、10mMメチオニンおよび2.9%エタノールを含有し、前述のように凍結乾燥によって縫い針上に被覆された。

40

【0111】

実験からのデータを図10に示すが、そこでは、(30G皮下注射針または縫い針のいずれかの)「被覆針から放出された」プラスミドに由来するルシフェラーゼ活性が、標準的なID注射によって送達されたプラスミドに由来するそれと比較された。データは、少なくとも5/9のマウスは皮下注射針注入からのID DNA放出後ルシフェラーゼ活性が陽性であり、6/9のマウスは縫い針注入からのID DNA放出後ルシフェラーゼ活性が陽性であることを示唆した。個々の動物における遺伝子発現レベルは、概して、ID注射によって10 µgのプラスミドDNAが送達された動物に匹敵する、またはそれ以上である。

【実施例10】

50

【0112】

被覆、凍結乾燥した針からの機能的に活性のあるプラスミドDNAのin vivo送達がエレクトロポレーションによって促進され得ることの実証
in vivo送達およびルシフェラーゼアッセイ

IDおよびIM両送達のために、DNA放出を可能にするように2本の縫い針を同時に挿入し、両方の場合で、針を2分間組織内に留めたことを除き、マウスの皮膚へのIDおよびIM送達に関して、これは実施例8に記載されるように行われた。

【0113】

賦形剤を加えたプラスミドDNA/スクロース製剤によって同様に被覆した5 mm間隔の2本針-アレイ電極を用い、BTX 830 square wave electroporation device (BTX, California, USA) を用いて、DNA送達の2分後にエレクトロポレーションを行った。 10

【0114】

図11Aに示したID送達実験について、エレクトロポレーション条件は、125マイクロ秒のパルス間隔で、875ボルト、100マイクロ秒の3パルス、続いて極性を逆にして、100マイクロ秒の3パルス (Glasspool-Malone, J.ら、(2000), Molecular Therapy 2: 140-146) である。データは、9匹の動物の、被覆していない針の場合は3匹の平均値として、秒当たりのカウント (CPS) / mgタンパク質のルシフェラーゼ活性で表される。この実験において、ルシフェラーゼ活性が被覆電極から放出されエレクトロポレーションによって促進されたプラスミドに由来する9匹の動物すべてのように、ルシフェラーゼ活性が被覆針から放出されたプラスミドに由来する9匹の動物はすべて遺伝子発現が陽性であった (データは示さない)。データは、これらの条件下でエレクトロポレーションがID被覆針送達からの遺伝子発現レベルを平均2~3倍増強することを示唆する。 20

【0115】

図11Bに示したIM送達実験について、エレクトロポレーション条件は、1秒のパルス間隔で、900ボルト、100マイクロ秒の3パルス、続いて極性を逆にして、100マイクロ秒の3パルス (Vicat, J.ら、(2000), Human Gene Therapy 11: 909-916) である。データは、9匹の動物の、被覆していない針の場合は3匹の平均値として、相対発光量 (RLU) / mgタンパク質のルシフェラーゼ活性で表される。この実験において、ルシフェラーゼ活性が被覆針から放出されたプラスミドに由来する1/9の動物が遺伝子発現について陽性であったが、一方、ルシフェラーゼ活性が被覆電極から放出されエレクトロポレーションによって促進されたプラスミドに由来する6/9の動物が遺伝子発現について陽性であった (データは示さない)。データは、これらの条件下でエレクトロポレーションがIM被覆針送達からの遺伝子発現レベルを平均約5倍増強することを示唆する。それはまた、エレクトロポレーションが、被覆針または電極から放出されるプラスミドに由来する遺伝子発現について陽性である動物数を増加させ得ることも示唆する。 30

【実施例11】

【0116】

被覆、凍結乾燥した極微針からの機能的に活性のあるプラスミドDNAのin vivo送達およびエレクトロポレーションの実証
in vivo送達およびルシフェラーゼアッセイ

マウスの皮膚へのID送達に関して、これは実施例8に記載されるように行われたが、次のような改変を伴う。十字型で中空の、シリコンの基板から出ている、軸に開口部を持つ極微針は深反応性イオンエッチング deep reactive ion etching (DRIE) 法 (Griss, P.およびStemme, G., 'Side-Opened Out-of-Plane Microneedles for Microfluidic Transdermal Liquid Transfer', (2002), In 'Micromachined Interfaces for Medical and Biochemical Applications', PHD Thesis, Griss, P., Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden) によって製造された。極微針の条件は、10 x 10で100本の極微針の等間隔の配列を持つ5mm x 5mm平方のシリコンマイクロチップであった。個々の極微針の長さは240~250ミクロンであった。5mm x 5mm平方のシリコンマイクロチップは、マウスの皮膚への使用を可能にするために1cm平方の保持板の中心に固定された。前述のように、Gil 40 50

sonピペットを用いて極微針の表面に10 μ lのDNA/糖/賦形剤製剤を塗布し、被覆した極微針を凍結乾燥することによって、シリコンマイクロチップを被覆した。前もって毛を剃ったBalb/cマウスの尾の付け根上の下背部の皮膚に、これらを取り付けた。極微針使用部位に5 μ lのリン酸緩衝生理食塩水を塗布することによって、マウスの皮膚のこの領域を予め水和させた。

【0117】

マウスを酸素制御イソフルラン吸入マスクを用いた通常の麻酔下で維持し、麻酔下で、しかし極微針を使用する前に、鎮痛剤として5mg/Kg (20 μ l/マウスで送達)の皮下投与でリマダイル(カルプロフェン)を与えた。

【0118】

極微針が使用された毛を剃った皮膚の折り目に、1mm間隔の1cm平方カリパス電極を用い、BTX 830 square wave electroporation device (BTX, California, USA)を用いて、DNA送達の2分後にエレクトロポレーションを行った。条件は100マイクロ秒のパルス間隔で、75ボルト、20マイクロ秒の3パルス(Zhang, Lら、(2002), Biochim. Biophysic. Acta 1572: 1-9)であった。

【0119】

そこでのルシフェラーゼ活性がエレクトロポレーションによって増強された「被覆極微針から放出された」プラスミドに由来する(Micro + elec)、実験からのデータを図12に示す。この実験において、4/7の動物は遺伝子発現が陽性であり、ルシフェラーゼ活性は被覆極微針から放出された、エレクトロポレーション後のプラスミドに由来することを示し、これが皮膚への遺伝子送達システムとして機能できることを実証した。

【実施例12】

【0120】

針上に被覆、凍結乾燥および37 で保存後の、異なる糖製剤におけるプラスミドDNAの安定性

製剤中で用いられる糖の量または糖の種類のいずれかを変えた、一連の異なるDNA製剤のプラスミドDNAの安定性を比較するために、実施例7に記載されたものと同様の手順を実施した。前述のDNA安定性および放出のために最適な他のすべての賦形剤はすべての製剤中に存在した(すなわち、100mM TrisHCl pH8.0、1mM EDTA、10mM メチオニンおよび2.9%エタノール)。針を被覆および凍結乾燥後、37 で1ヶ月まで保存し、それらのスーパーコイルプラスミドDNAを安定化させる能力について、製剤を比較した(促進DNA安定性試験)。その後、標準的な手法でプラスミドDNAを溶出、回収し、インターカレート剤の非存在下でアガロースゲル電気泳動(100V、100mAで2時間)を行った(Sambrook, J.ら、上述)。エチジウムブロマイドによる染色およびUV光の下で可視化した後、溶出したプラスミドDNAの完全性を観察した。UVP Bioimaging system上のLabworks 4.0画像解析ソフトウェアを用いた画像強度として、これらのサンプルからのスーパーコイル単量体および二量体のプラスミド型ならびにまた直鎖型および開環型の比率を測定した。

【0121】

データは、縫い針を被覆、凍結乾燥し、37 で保存した後のスーパーコイルプラスミド(%ccc)、単量体(%cccmon)および二量体(%cccdim)の両プラスミド型の比率のグラフとして、図13に示された。使用したプラスミド製剤は様々な量の糖を含む。すなわち、図13A: 5%スクロース、図13B: 10%スクロース、図13C: 17.5%スクロース、図13D: 40%スクロース、図13E: 40%トレハロース、図13F: 40%グルコースである。

【0122】

データは、糖を含む製剤すべてが高度のプラスミド安定性を維持し、37 で最大1ヶ月まで保存した後も、80%以上、最大98%のプラスミドがスーパーコイル型のままであることを示した。40%(w/v)の糖レベルを含有する製剤に関して、トレハロースからスクロース、グルコースまで変化させた糖製剤では好ましい単量体型が優勢であり、単量体と二量体のプラスミド型間のバランスは相対的に一定のままである(図13D、13Eおよび

10

20

30

40

50

13F)。より低濃度のスクロースを含む製剤に関して、特に37℃での長期の保存では、二量体型が単量体を越えて優位を占める傾向がある(図13A、13Bおよび13C)。概して、データは、製剤中により高レベルの糖が存在するとプラスミドDNAのより高い安定性をもたらすことと一致している。

【実施例13】

【0123】

賦形剤を含むスクロース製剤における、プラスミドDNAの凍結乾燥後の非晶性ガラス形成の実証

示差走査熱量測定(DSC)による凍結乾燥したプラスミドDNA製剤の解析

40%スクロース中にプラスミドDNA(10mg/ml)を含む凍結乾燥DNA/スクロース製剤のサンプルを調製し、また、付加的に100mM TrisHCl pH8.0、1mM EDTA、10mMメチオニンおよび2.9%エタノールを含むサンプルを調製した。サンプルを分割し、1時間または24時間のいずれかの凍結乾燥サイクルに供した。その後、固体の状態を決定するために、サンプルを示差走査熱量測定(DSC)による解析に供した。これは、20ml/minの流速で、パージガスとして窒素を用い、25～300℃の温度範囲に渡って、TA Instruments DSC2920 machineで行われた。サンプルパンの種類はピンホールアルミニウムであり、サンプル重量は解析の当日にMettler M3 balanceで測定された。

10

【0124】

データを図14に示した。すべてのサンプルは40%スクロース中にプラスミドDNA(10mg/ml)を含む。図14AおよびBでは、製剤はまた100mM TrisHCl pH8.0、1mM EDTA、10mMメチオニンおよび2.9%エタノールを含み、図14AおよびCは24時間の凍結乾燥サイクルを表し、図14BおよびDは1時間の凍結乾燥サイクルを表す。データは、すべてのサンプルが、約78℃(図14A)、85℃(図14B)、74℃(図14C)、63℃(図14D)で観測されるスクロースガラス転移温度を持つ非晶性スクロースを含むことを示唆し、それは文献に公表されている値とよく一致する(5)。データは、短時間および長時間の凍結乾燥サイクルの両方が非晶性スクロースガラスを生成できることを示唆する。非晶性ガラスは高濃度のプラスミドDNA存在下およびまた記載したすべての賦形剤の存在下でも形成できる。しかし、結晶性物質がサンプル中に存在するか否か、またはDSC解析自体の間に形成されるか否かは不明だったので、その後更に、サンプルの非晶性/結晶性を決定するためにサンプルを偏光顕微鏡の技術によって解析した。

20

30

【0125】

偏光顕微鏡による凍結乾燥したプラスミドDNA製剤の解析

上述のDSC解析のために調製した凍結乾燥プラスミドDNA/スクロース(±賦形剤)サンプルを、偏光顕微鏡によって解析した。対照サンプルは1時間および24時間サイクルで凍結乾燥した40%スクロースのみで調製され、また、スクロースならびに主要な固体賦形剤、すなわち、メチオニン、Tris HClおよびEDTAの結晶サンプルもまた解析された。これは、比較のため、および製剤中に存在するあらゆる結晶性物質の出現に留意するためであった。解析は、液浸油で標本にされ覆われたサンプルを用いてZeiss STD16-444111偏光顕微鏡で行われた。

【0126】

データは図15に示され、そこではすべての製剤が40%スクロース中にプラスミドDNA(10mg/ml)を含む。図15Aでは、製剤はまた100mM TrisHCl pH8.0、1mM EDTA、10mMメチオニンおよび2.9%エタノールを含み、図15Cでは、40%スクロースのみを含み、図15Dは主要な固体賦形剤の結晶を示す。1AM、2AMおよび3AMは24時間凍結乾燥サイクルを表し、一方、1ST、2STおよび3STは1時間凍結乾燥サイクルを表す。

40

【0127】

図15Cから、40%スクロース単独で行われた1時間および24時間の両凍結乾燥サイクルが予想通り非晶性ガラスだけを生じることが明白である。

【0128】

図15Bから、40%スクロース製剤へのプラスミドDNA(10mg/ml)の添加は、概ね非晶

50

性ガラスの形成を可能にするが、いくつかの結晶性スクロースの部分的な形成を可能にする（2AMおよび2STサンプルは、スクロースかもしれない、いくつかの結晶粒子の痕跡を含む非晶性物質で構成される）。しかし、図15Aから、DNA/スクロース製剤への賦形剤の添加は、24時間凍結乾燥したサンプルにおいて結晶性粒子形成の量を減少させ（1AM、サンプルの大部分は非晶性物質の層で構成される。結晶性粒子はほとんど存在しない）、1時間の短い凍結乾燥サイクルに関しては、結晶性粒子の形成の痕跡はなく、非晶性ガラスのみである。これは、スクロース中のプラスミドDNAへの記載した賦形剤の添加が、DNA放出および分解からの安定性の改善を助けるだけでなく、短い凍結乾燥サイクルでは非晶性ガラス形態の保護にも役立つことを示唆する。

【実施例14】

10

【0129】

賦形剤を含む異なる糖/ポリオール製剤における、プラスミドDNAの凍結乾燥後の非晶性ガラス形成の実証

上述のような賦形剤を含むプラスミドDNA製剤中に存在するポリオール/糖の性質が、凍結乾燥で非晶性ガラスを生成するためのこのような製剤の能力に影響を与えるかを決定するために、ポリオールを変えた。存在するポリオールのみが異なる多数の同様な製剤を作成し、凍結乾燥し、偏光顕微鏡によって解析した。この場合にはOlympus BX51偏光顕微鏡を使用したこと以外、これは実施例13に記載されたものと同様の方法で行われた。

【0130】

データは図16に示され、そこではすべての製剤が、凍結乾燥したプラスミドDNA（10mg/ml）および100mM TrisHCl pH8.0、1mM EDTA、10mMメチオニンおよび2.9%エタノールを含む。図16A、サンプル1：40%w/vフィコール、サンプル2：20%w/vデキストラン、サンプル3：40%w/vスクロース、サンプル4：20%w/vマルトトリオース、図16B、サンプル5：20%w/vラクトース、サンプル6：30%w/vマルトース、サンプル7：40%w/vグルコース、サンプル8：40%w/vトレハロース。記載されたすべてのサンプルおよび解析されたすべての製剤が、結晶性物質の存在の痕跡をほとんどまたは全く持たずに非晶性ガラスを形成したことに注目せよ。20%w/vデキストランを含むサンプル2に記載の製剤は、その後、アガロースゲル電気泳動解析によって、溶液からプラスミドDNAを沈殿させることを示し（データは示さない）、従って好ましい製剤ではないと思われることに注意せよ。このデータは、凍結乾燥させた場合、記載された賦形剤を加えたプラスミドDNAが、文献（Hatley, R.およびBlair, J., (1999), Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 7: 11-19.）に記載された様々なポリオール/糖によって非晶性ガラス形態で維持され得ることを実証する。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0131】

【図1AB】図1ABは本研究で用いられるプラスミドを示す。A. pEGFP-C1、B. pGL3CMV

【図1C】図1Cは本研究で用いられるプラスミドを示す。C. pVAC1.ova

【図2】図2は、縫い針上への被覆および迅速な溶出後の、スーパーコイルプラスミドDNA、pEGFP-C1の分析のための、E-gelを用いた0.8%アガロースゲル電気泳動を示す。

40

【図3】図3は、縫い針上への被覆および溶出後の、スーパーコイルプラスミドDNA、pEGFP-C1の分析のための、E-gelを用いた1.2%アガロースゲル電気泳動を示す。

【図4】図4は、縫い針上への被覆および4で様々な時間保存された縫い針からの溶出後の、スーパーコイルプラスミドDNA、pGL3CMVの分析のための、E-gelを用いた1.2%アガロースゲル電気泳動を示す。

【図5】図5は、縫い針上への被覆後の、スーパーコイルプラスミドDNA、pGL3CMVの分析のための、エチジウムブロマイド（EtBr）非存在下での1%アガロースゲル電気泳動を示す。

【図6】図6は、縫い針または30G皮下注射針上への被覆および迅速な溶出後の、スーパーコイルプラスミドDNA、pGL3CMVの分析のための、E-gelを用いた1.2%アガロースゲル電

50

気泳動を示す。

【図 7】図 7 は、縫い針または異なるゲージの皮下注射針上への被覆およびアガロースへの「放出」後の、(5 µg/µl で様々な異なる製剤に再懸濁した)、スーパーコイルプラスミド DNA、pVac1ova の分析のための、エチジウムブロマイド (EtBr) 非存在下での 1% アガロースゲル電気泳動を示す。

【図 8】図 8 はスーパーコイルプラスミド DNA、pVac1ova の分析のためのエチジウムブロマイド (EtBr) 非存在下での 1% アガロースゲル電気泳動を示す。

【図 9】図 9 は、生理食塩水の標準的な ID および標準的な IM 送達の対照と比較して、DNA で被覆した 30 G 皮下注射針からマウスの皮内 (ID、図 9 A) または筋肉内 (IM、図 9 B) のいずれかに送達された、プラスミド pGL3CMV に由来する (トランスフェクション後 48 時間の) 比較ルシフェラーゼ活性を示す。

10

【図 10】図 10 は、生理食塩水の標準的な ID 送達の対照と比較して、DNA で被覆した 30 G 皮下注射針および DNA で被覆した縫い針からマウスの皮内 (ID) に送達された、プラスミド pGL3CMV に由来する (トランスフェクション後 48 時間の) 比較ルシフェラーゼ活性を示す。

【図 11 A】図 11 A は、エレクトロポレーションを加えた、DNA で被覆した 2 本針アレイ電極と比較して、DNA で被覆した一对の縫い針からマウスの皮内 (ID) に送達された、プラスミド pGL3CMV に由来する (トランスフェクション後 24 時間の) 比較ルシフェラーゼ活性を示す。

【図 11 B】図 11 B は、エレクトロポレーションを加えた、DNA で被覆した 2 本針アレイ電極と比較して、DNA で被覆した一对の縫い針からマウスの筋肉内 (IM) に送達された、プラスミド pGL3CMV に由来する (トランスフェクション後 24 時間の) 比較ルシフェラーゼ活性を示す。

20

【図 12】図 12 は、カリパス電極によるエレクトロポレーションを加えて DNA で被覆した極微針からマウスの皮内 (ID) に送達された、プラスミド pGL3CMV に由来する (トランスフェクション後 24 時間の) 比較ルシフェラーゼ活性を示す。

【図 13 A】図 13 は、縫い針上への被覆および凍結乾燥ならびに 37 °C での保存後の、スーパーコイルプラスミド (%ccc) の割合、単量体 (%cccmon) および二量体 (%cccdim) 両方のプラスミド形態の割合のグラフを示す。用いられたプラスミド剤は、様々な量の糖を含有する。すなわち、図 13 A は、5% スクロースを含有する。

30

【図 13 B】図 13 A と同様のグラフを示す。用いられたプラスミド剤は、10% スクロースを含有する。

【図 13 C】図 13 A と同様のグラフを示す。用いられたプラスミド剤は、様々な量の糖を含有する。すなわち、図 13 C は、17.5% スクロースを含有する。

【図 13 D】図 13 A と同様のグラフを示す。用いられたプラスミド剤は、様々な量の糖を含有する。すなわち、図 13 D は、40% スクロースを含有する。

【図 13 E】図 13 A と同様のグラフを示す。用いられたプラスミド剤は、様々な量の糖を含有する。すなわち、図 13 E は、40% トレハロースを含有する。

【図 13 F】図 13 A と同様のグラフを示す。用いられたプラスミド剤は、様々な量の糖を含有する。すなわち、図 13 F は、40% グルコースを含有する。

40

【図 14 A】図 14 は、40% スクロース中のプラスミド DNA 剤 (10 mg/ml) に対する示差走査熱量測定 (DSC) データを示す。図 14 A の製剤は 100mM TrisHCl pH8.0、1mM EDTA、10mM メチオニンおよび 2.9% エタノールも含有する。24 時間の凍結乾燥サイクルを示す。

【図 14 B】図 14 A と同様のデータを示す。図 14 B の製剤は 100mM TrisHCl pH8.0、1mM EDTA、10mM メチオニンおよび 2.9% エタノールも含有する。1 時間の凍結乾燥サイクルを示す。

【図 14 C】図 14 A と同様のデータを示す。24 時間の凍結乾燥サイクルを示す。

【図 14 D】図 14 A と同様のデータを示す。1 時間の凍結乾燥サイクルを示す。

【図 15 A】図 15 は、40% スクロース中のプラスミド DNA 剤 (10 mg/ml) に対する偏光顕微鏡データを示す。1AM、2AM および 3AM は 24 時間の凍結乾燥サイクルに相当し、一方、1

50

ST、2STと3STは1時間の凍結乾燥サイクルを示す。図15Aの製剤は100mM TrisHCl pH8.0、1mM EDTA、10mM メチオニンおよび2.9% エタノールを含有する。

【図15B】図15Aと同様のデータを示す。

【図15C】図15Aと同様のデータを示す。図15Cの製剤は40%スクロースのみを含む。

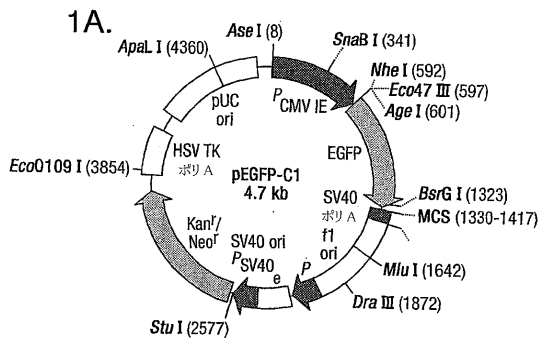
【図15D】図15Dは、図15Aで示された剤に記載される賦形剤の結晶を示す。

【図16A】図16は、糖およびポリオール中の凍結乾燥プラスミドDNA (10 mg/ml) 剤に対する偏光顕微鏡データを示し、該剤は以下を含有する： 100mM TrisHCl pH8.0、1mM EDTA、10mM メチオニンおよび2.9% エタノール。図16Aのサンプルは、サンプル1：40%w/vフィコール、サンプル2：20%w/vデキストラン、サンプル3：40%w/vスクロース、サンプル4：20%w/vマルトトリオースである。

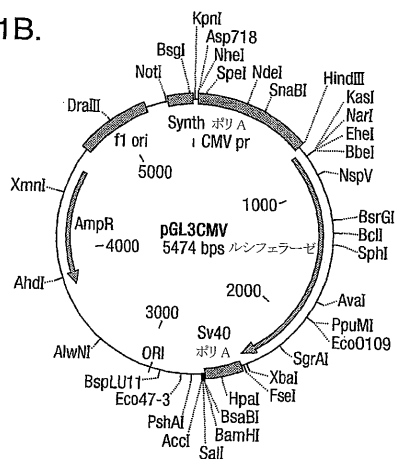
10

【図16B】図16Aと同様のデータを示す。図16Bのサンプルは、サンプル5：20%w/vラクトース、サンプル6：30%w/vマルトース、サンプル7：40%w/vグルコース、サンプル8：40%w/vトレハロースである。

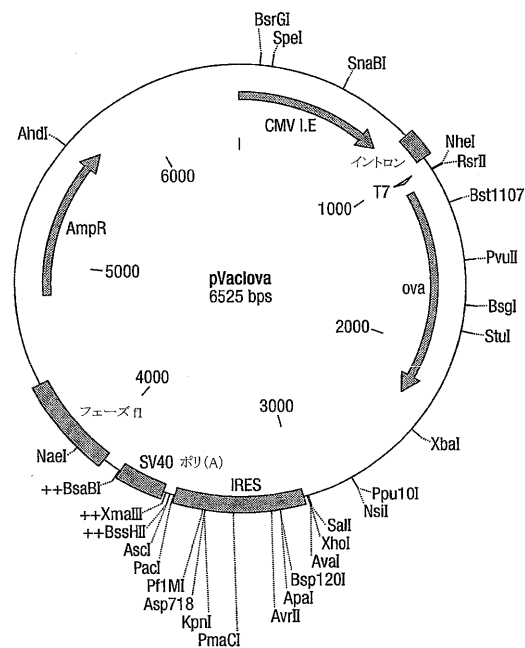
【図1AB】



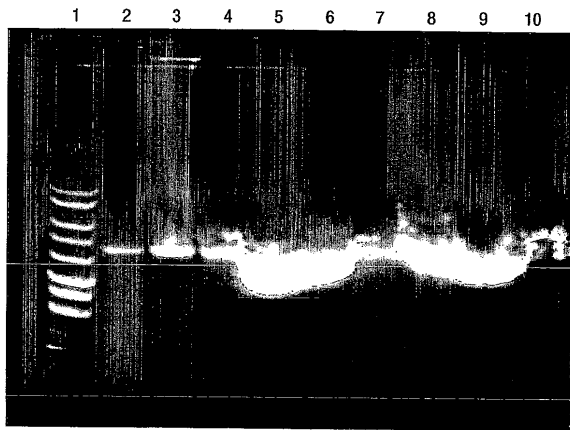
1B.



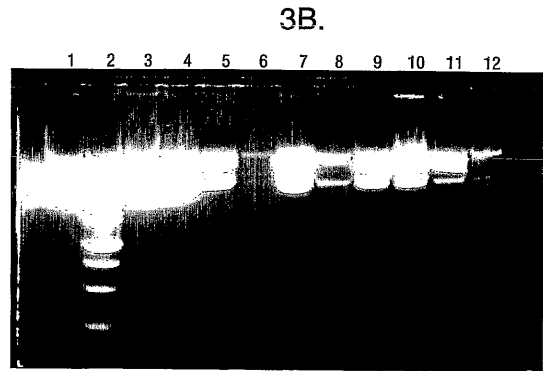
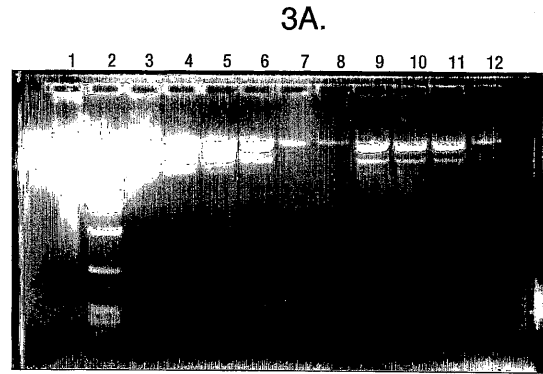
【図1C】



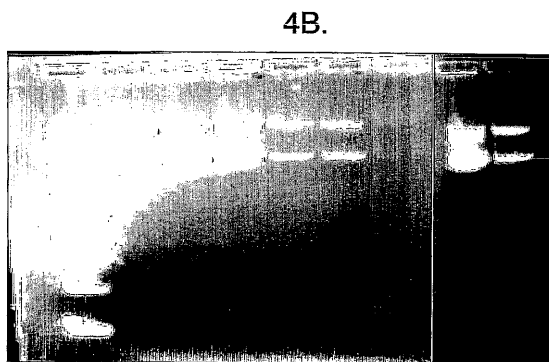
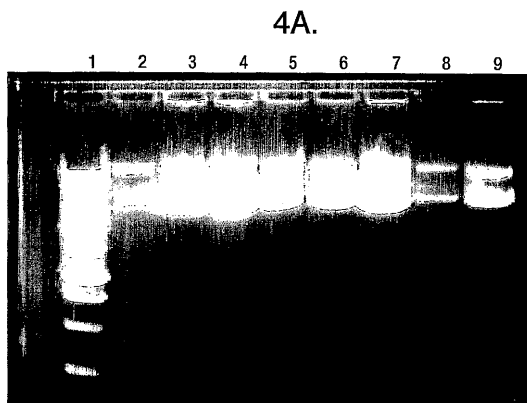
【図 2】



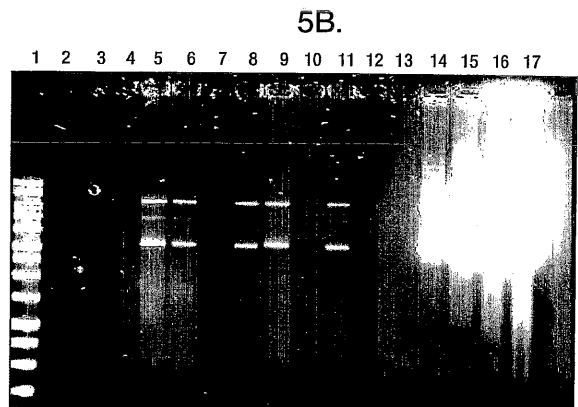
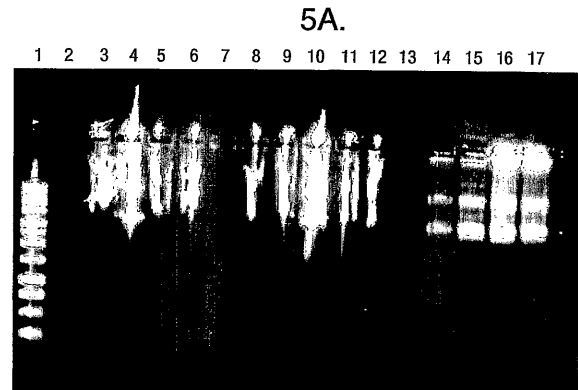
【図 3】



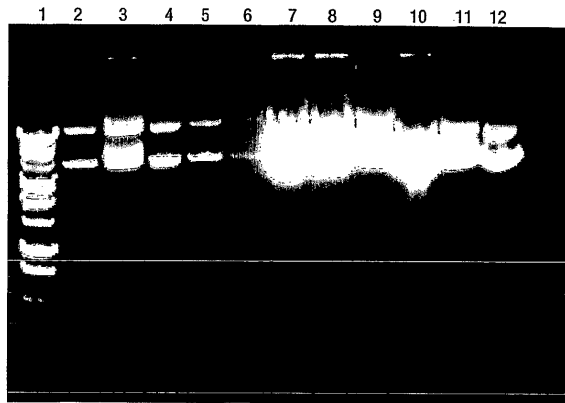
【図 4】



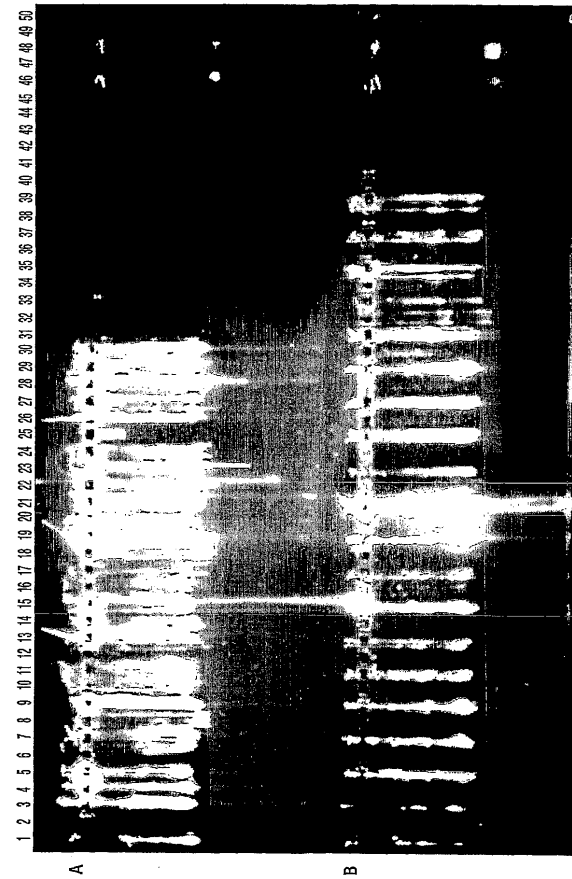
【図 5】



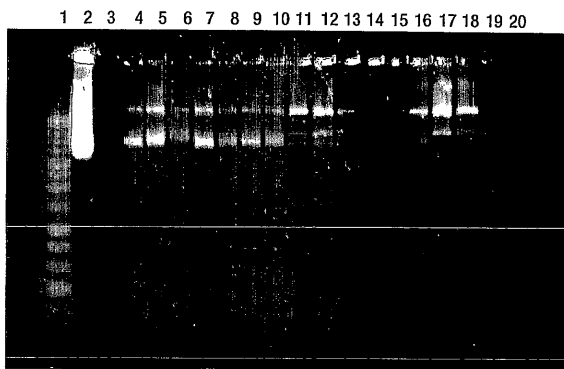
【図 6】



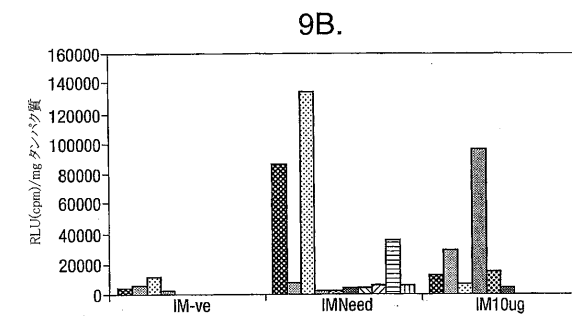
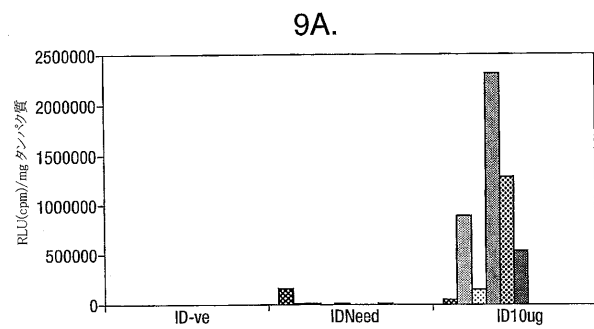
【図 7】



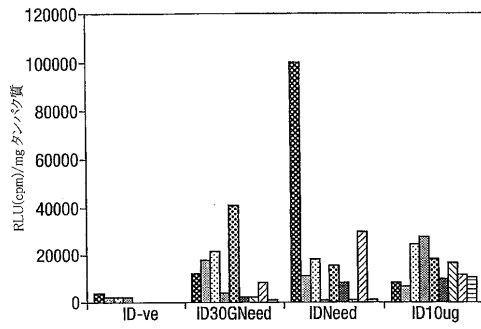
【図 8】



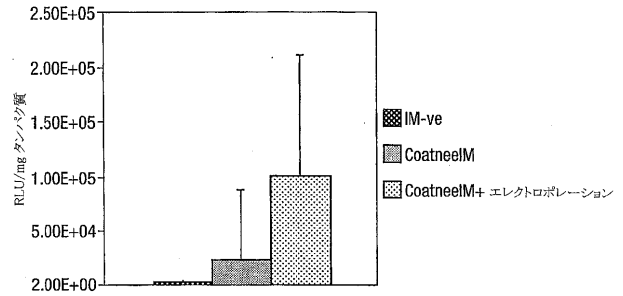
【図 9】



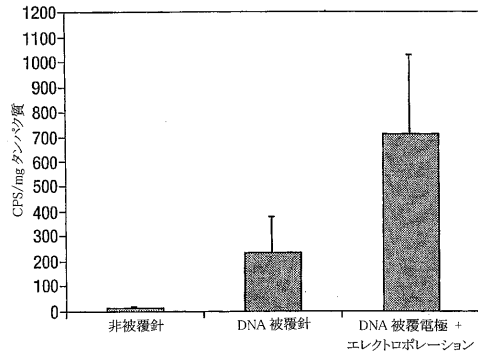
【図 10】



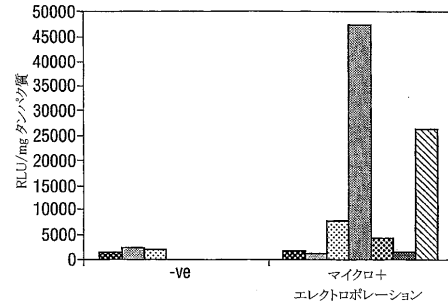
【図 11 B】



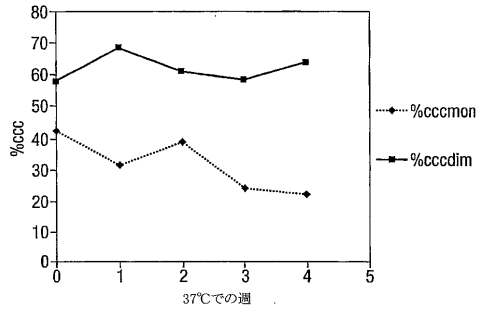
【図 11 A】



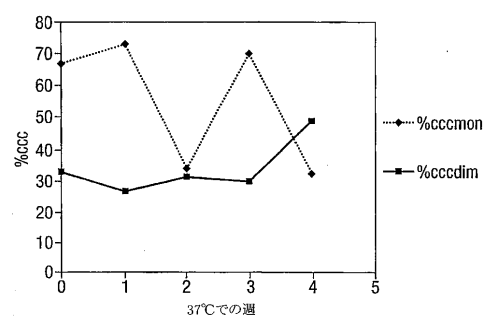
【図 12】



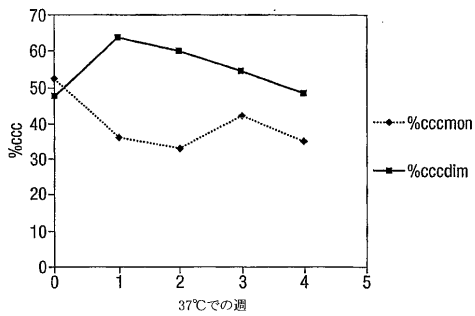
【図 13 A】



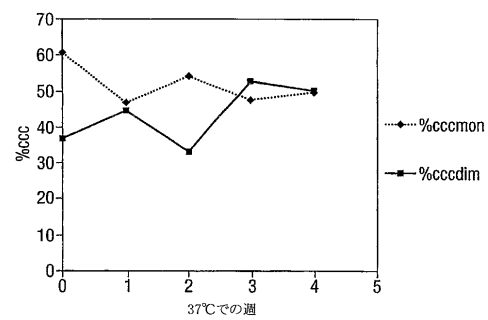
【図 13 C】



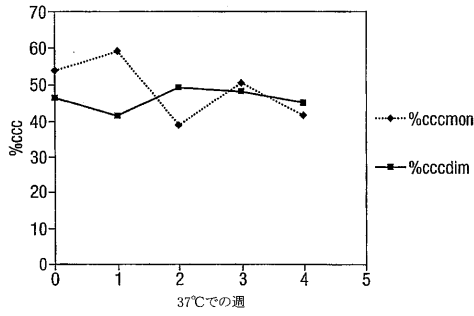
【図 13 B】



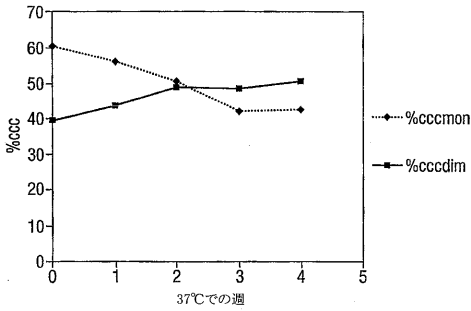
【図 13 D】



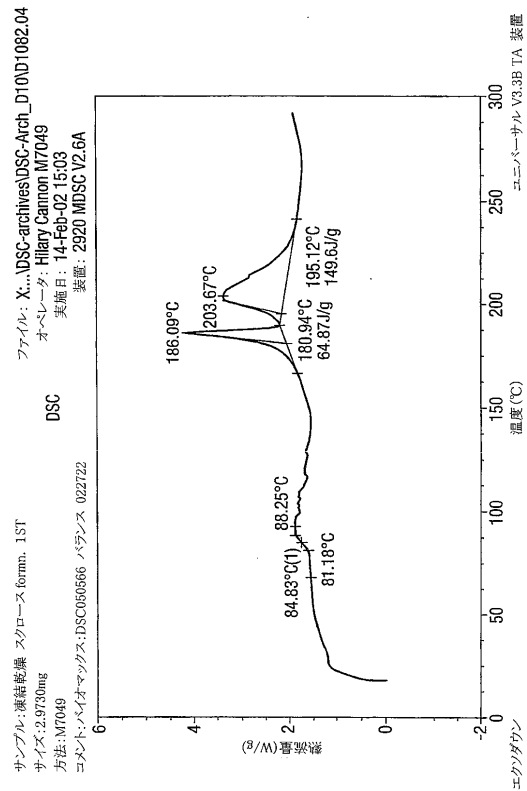
【図 13E】



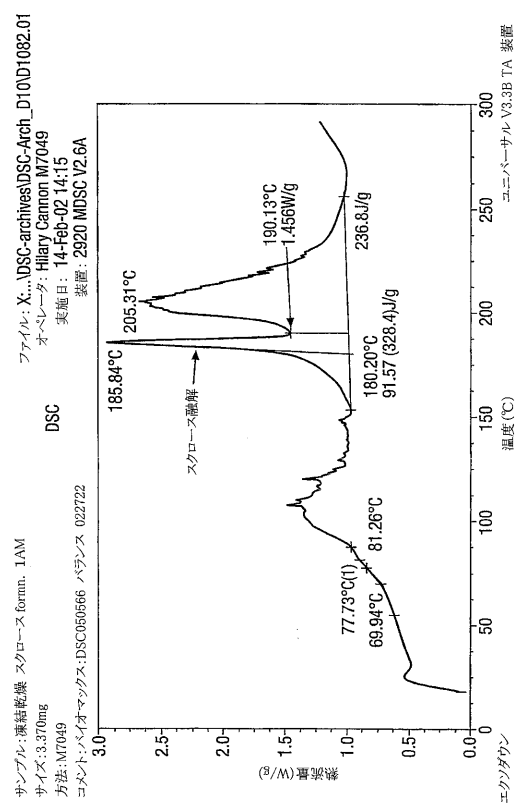
【図 13F】



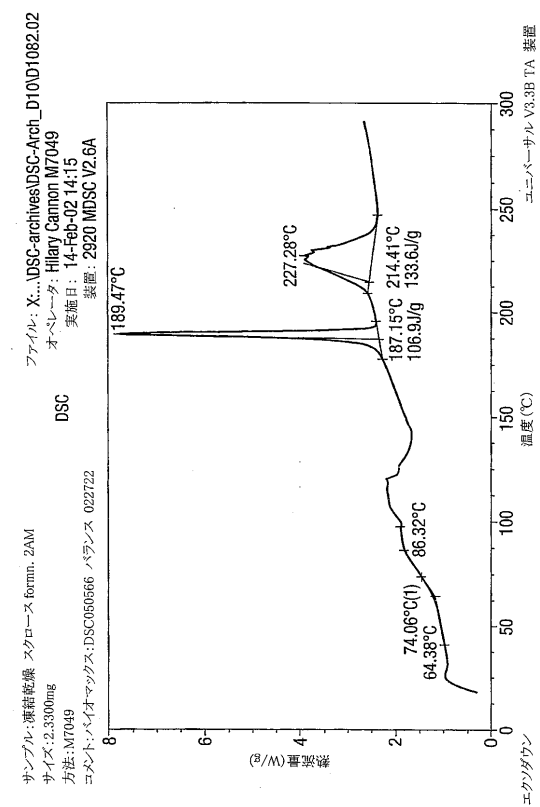
【図 14B】



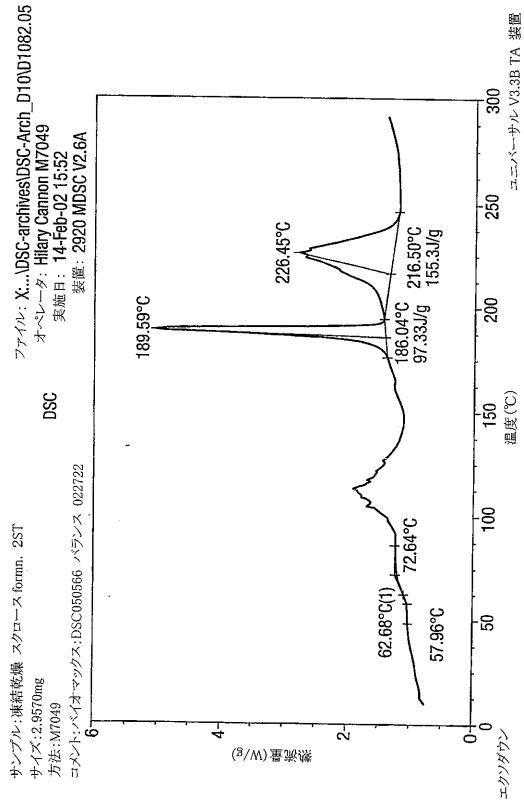
【図 14A】



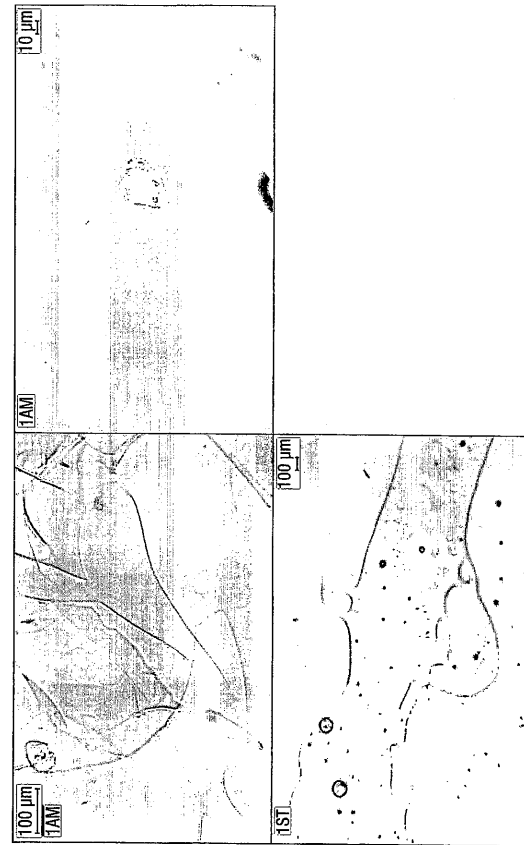
【図 14C】



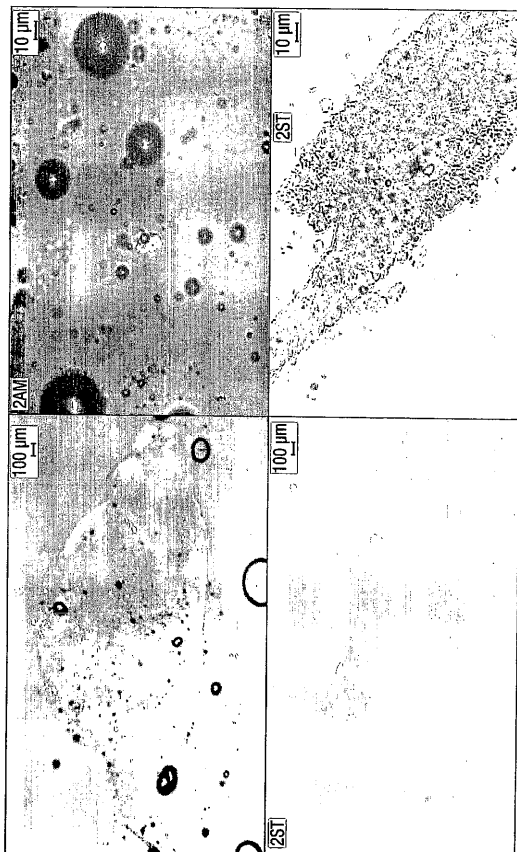
【図 14 D】



【図 15 A】



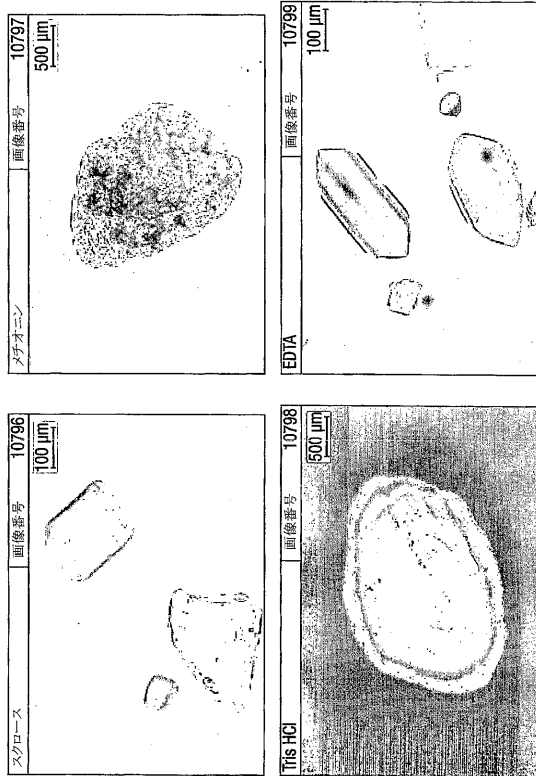
【図 15 B】



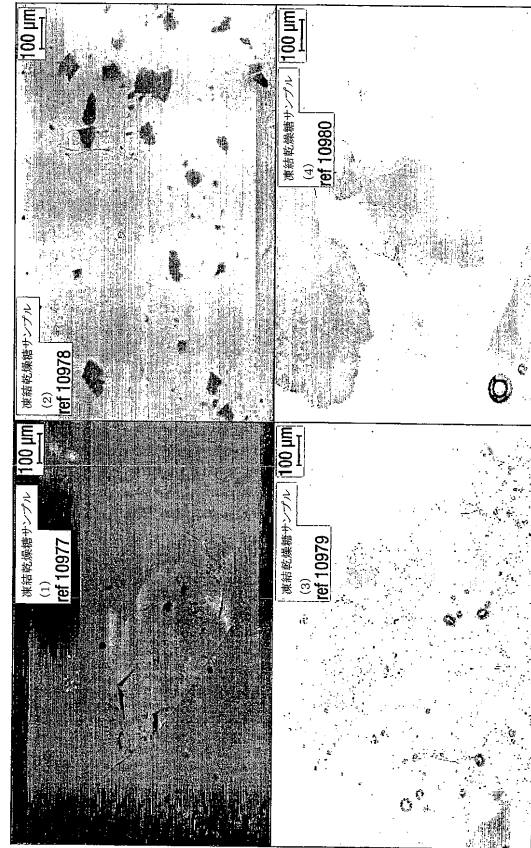
【図 15 C】



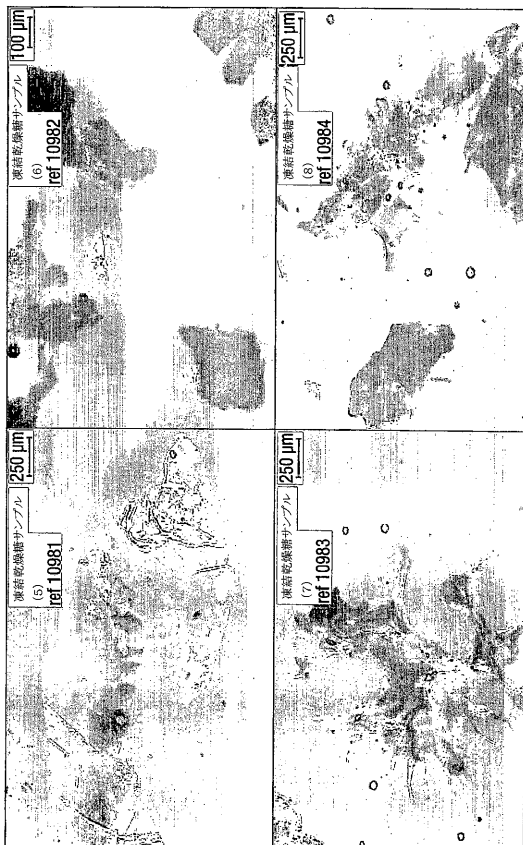
【図 15 D】



【図 16 A】



【図 16 B】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Initial Application No PCT/GB 03/00282
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K9/70 C12N15/89 A61M37/00 A61B17/20		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C12N A61M A61B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 13277 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9 May 1996 (1996-05-09) page 1, line 16 - line 20 page 31, line 13 - line 14 page 37, line 12 - line 16 page 57 -page 58; example 5 page 75; claim 19	1-27
A	WO 97 40839 A (MERCK & CO., INC.) 6 November 1997 (1997-11-06) cited in the application claims 1-43	1-27
A	EP 1 138 337 A (QUADRANT HOLDINGS CAMBRIDGE) 4 October 2001 (2001-10-04) claims 1-3,20,27,28	1-27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 August 2003		Date of mailing of the international search report 26/08/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Benz, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int ☐ ☒ 1st Application No
 PCT/GB 03/00282

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9613277	A	09-05-1996	US 5804566 A	08-09-1998
			AU 698826 B2	05-11-1998
			AU 4199496 A	23-05-1996
			CA 2204253 A1	09-05-1996
			EP 0794797 A1	17-09-1997
			JP 10509438 T	14-09-1998
			WO 9613277 A1	09-05-1996
			US 2003027782 A1	06-02-2003
			US 5849719 A	15-12-1998
WO 9740839	A	06-11-1997	AU 727306 B2	07-12-2000
			AU 2924297 A	19-11-1997
			CA 2252565 A1	06-11-1997
			EP 0906110 A1	07-04-1999
			JP 2002504085 T	05-02-2002
			WO 9740839 A1	06-11-1997
			US 2002156037 A1	24-10-2002
			ZA 9703642 A	25-11-1997
EP 1138337	A	04-10-2001	US 6290991 B1	18-09-2001
			EP 1138319 A2	04-10-2001
			EP 1138337 A2	04-10-2001
			AU 688557 B2	12-03-1998
			AU 3185195 A	04-03-1996
			AU 707605 B2	15-07-1999
			AU 7186498 A	20-08-1998
			BG 101278 A	30-12-1997
			CA 2197982 A1	15-02-1996
			CZ 9700476 A3	13-08-1997
			EE 9700062 A	15-08-1997
			EP 0773781 A1	21-05-1997
			FI 970867 A	08-04-1997
			WO 9603978 A1	15-02-1996
			HU 77777 A2	28-08-1998
			JP 10503769 T	07-04-1998
			NO 971688 A	11-04-1997
			NZ 290896 A	24-04-1997
			PL 318898 A1	21-07-1997
			RU 2177785 C2	10-01-2002
			SK 27797 A3	06-08-1997
			US 2001038858 A1	08-11-2001
			US 2003054040 A1	20-03-2003
			US 6331310 B1	18-12-2001
			US 2002012687 A1	31-01-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/12	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 47/18	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/20	A 6 1 K 47/20	
A 6 1 K 47/22	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/24	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/26	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/42	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 M 37/00	A 6 1 M 37/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

バブルジェット

(74)代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72)発明者 キャッチボール, イアン, リチャード

イギリス国 エスジー 1 2 エヌワイ ハートフォードシャー, スティーヴネイジ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン

F ターム(参考) 4C076 AA09 AA12 AA17 AA19 AA42 AA72 AA94 AA95 BB11 BB31
CC27
4C085 AA03 AA38 EE06 EE07 FF13 FF14 GG04
4C086 AA10 EA16 MA05 MA17 MA21 MA22 MA24 MA28 MA32 MA63
ZB26
4C167 AA71 CC04 DD07 GG16 GG21