

(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2017-504575

(P2017-504575A)

(43) 公表日 平成29年2月9日 (2017. 2. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 5 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 F	4 C 0 8 4
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 G	4 C 0 8 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 1 6 0
A 6 1 M 37/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	4 C 1 6 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-536112 (P2016-536112)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月4日 (2014. 12. 4)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月14日 (2016. 7. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/068522
 (87) 国際公開番号 W02015/085043
 (87) 国際公開日 平成27年6月11日 (2015. 6. 11)
 (31) 優先権主張番号 61/911, 536
 (32) 優先日 平成25年12月4日 (2013. 12. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515092194
 イービー・テクノロジーズ・エルエルシー
 EP TECHNOLOGIES LLC
 アメリカ合衆国 44311 オハイオ
 アクロン スイート 2455 サウス・
 メイン・ストリート 520
 520 South Main Stre
 et Suite 2455 Akron
 , OH 44311 United St
 ates of America
 (74) 代理人 110002321
 特許業務法人永井国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非熱プラズマを用いるDNAワクチンの経皮デリバリ

(57) 【要約】

【課題】

DNAワクチンをデリバリする方法を提供する。

【解決手段】

DNAワクチンをデリバリする方法は、一又は複数の孔を開けるのに十分な時間処置エリアにプラズマ処置するプラズマジェネレータの提供を含む。外用DNAワクチンを処置エリアに塗り、暫く待ち、DNAワクチンが一又は複数の孔に移動到達可能とする。実施方法は、DNAワクチンの細胞内摂取が可能とされるに十分なセッティングでの処置エリアへのプラズマ処置をさらに含む方法である。

【選択図】 図7

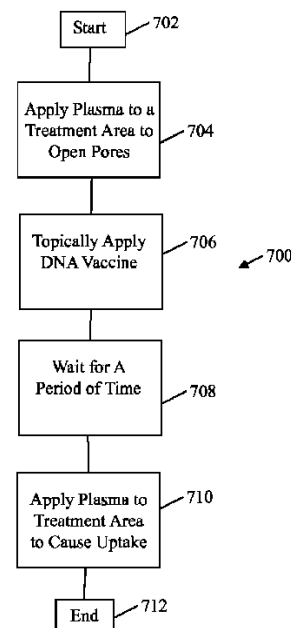


FIG. 7

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

DNA ワクチンをデリバリーする方法は、以下の：

処置エリアに対して一又は複数の孔 (pores) を開けるために十分な期間の間プラズマ処置するためのプラズマジェネレータを提供すること；、

外用 DNA ワクチンを前記処置エリアに処置すること；、

ある期間外用 DNA ワクチンを処置して前記一又は複数の孔を通じて輸送可能となるまで待つこと；、

細胞への前記 DNA ワクチン摂取を十分に促進するために前記処置エリアへプラズマ処置すること；

を含む DNA ワクチンをデリバリーする方法。

10

【請求項 2】

一又は複数の孔を開口するのに使用される前記プラズマは大気圧下で空気雰囲気を用い生成される請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

一又は複数の孔を開口するのに使用される前記プラズマはマイクロ秒パルスプラズマ及びナノ秒パルスプラズマのうちの一つである請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

一又は複数の孔を開口するのに使用される前記プラズマは DBD プラズマ及びナノ秒パルスコロナアレイ (corona array) のうちの一つである請求項 3 記載の方法。

20

【請求項 5】

前記ある期間とは前記一又は複数の孔を貫通に約 1 時間以下で前記 DNA ワクチンが移動可能である請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記ある期間とは前記一又は複数の孔を貫通に約 30 分以下で前記 DNA ワクチンが移動可能である請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞の摂取は表皮細胞で発生する請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞の摂取は真皮に生息する免疫細胞で発生する請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 9】

前記細胞の摂取は細胞組織で発生する請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞の摂取は腫瘍細胞で発生する請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

非侵襲性の DNA ワクチン接種システムは以下の：

スキン、組織又は腫瘍の表面に処置するための外用 DNA ワクチン；そして

スキン、組織又は腫瘍へ第一のプラズマ処置を提供して前記スキン、組織又は腫瘍に一又は複数の孔を開口するためのプラズマジェネレータ及びスキン、組織又は腫瘍へ第二のプラズマ処置を提供し細胞が前記 DNA ワクチンを一又は複数の前記スキン、組織又は腫瘍へ細胞摂取を起こさせるプラズマジェネレータ；

40

を含む非侵襲性 DNA ワクチン接種システム。

【請求項 12】

前記プラズマジェネレータは、マイクロ秒パルス DBD プラズマジェネレータ、ナノ秒パルス DBD プラズマ及びナノ秒パルスコロナのうちの一つである請求項 11 記載の前記非侵襲性 DNA ワクチン接種システム。

【請求項 13】

DNA ワクチンで身体にワクチン接種する方法は以下の：

パルスプラズマで領域を処置すること；、

前記処置されたエリア上に DNA ワクチンを外用処置すること；そして

50

プラズマをプラスミド (plasmid) D N A の細胞摂取を起こさせるのに十分なパワーセッティングで前記処置されたエリアの前記表面にプラズマ処置すること；
を含む D N A ワクチンで身体にワクチン接種する方法。

【請求項 1 4】

前記 D N A ワクチンを外用処置することと前記処置エリアの前記表面にプラズマ処置する間、一定の時間の間待つことをさらに含む請求項 1 3 記載の身体にワクチン接種する方法。

【請求項 1 5】

前記一定の時間の間が約 1 時間以下である請求項 1 3 記載の D N A ワクチンで身体にワクチン接種する方法。

【請求項 1 6】

前記一定の時間の間が約 3 0 分以下である請求項 1 3 記載の D N A ワクチンで身体にワクチン接種する方法。

【請求項 1 7】

D N A ワクチンで身体にワクチン接種する方法は以下の：

前記スキン、組織又は腫瘍の表面に前記スキン、組織又は腫瘍に孔を開口し細胞に孔を開けるのに十分なパワーセッティングでプラズマ処置すること；、

D N A ワクチンを前記処置エリアに外用処置しそれをスキン、組織又は腫瘍に作られた孔を通じて移動させ及び前記スキン、組織又は腫瘍の前記細胞に作られた前記複数の孔を介して細胞内に摂取されること；

を含む D N A ワクチンで身体にワクチン接種する方法。

【請求項 1 8】

一又は複数の孔を開口するのに使用される前記プラズマは大気圧下で大気を用い生成される請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

一又は複数の孔を開口するのに使用される前記プラズマはマイクロ秒パルスプラズマ及びナノ秒パルスプラズマのうちの一つである請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 2 0】

一又は複数の孔を開口するのに使用される前記プラズマは D B D プラズマ及びパルスコロナプラズマのうちの一つである請求項 1 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0 0 0 1】

本出願は 2 0 1 3 年 1 2 月 4 日に提出された米国特許仮出願第 6 1 / 9 1 1 , 5 3 6 号「非熱プラズマを用いる D N A ワクチンの経皮デリバリ」の優先権を主張し、当該米国出願の内容はその全体が本出願に組み込まれたものとする。

【技術分野】

【0 0 0 2】

本発明は、概して、D N A ワクチンのデリバリに関し、とりわけ、スキン、組織又は腫瘍を超える細胞間のデリバリのための非熱プラズマ (コールドプラズマ) を用いる D N A ワクチンをデリバリすること及び / 又は D N A ワクチンの細胞間摂取を促進することに関する。組織とは、上皮、粘膜、結合組織及び筋肉組織をいう。

【背景技術】

【0 0 0 3】

ワクチンは、近代医学で最も重要な発見であり、医師が患者へ提供できる最も有益な治療である。それでもたくさんのワクチン予防可能な疾病が治療又は防御免疫応答を引き出すテクノロジーを待っている。ほとんどのワクチンは、免疫応答を引き起すが、細胞媒介性免疫応答は、C D 8 T 細胞を含む細胞内のバクテリア性、ウィルス性疾患および真菌性疾患、慢性疾患、糖尿病を含む、がんその他と同様に死に至るエボラのような疾患を防ぎ、コントロールし、又は治療するのに必要である。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

DNAワクチン接種は、宿主細胞に統合されるわけではなく、生産及び保管に低コストであり、組織、及び/又は細胞タイプに高い特効とするのも可能であり、複数のエージェンツに同時にワクチン接種も可能とされる。大きな表面領域及び細胞をランゲルハウス及び皮膚樹状細胞のような抗原提示細胞の存在によって、スキンはDNAワクチンのターゲットに理想的であり、免疫誘導に専らとされている。

【 0 0 0 5 】

DNAワクチンは、細胞媒介性免疫応答及び抗体応答の双方を引き起し可能性である。したがって、DNAワクチンは他のワクチン接種モードに対して魅力的な代替である。DNAワクチンはプラスミド(plasmid、DNAの輪)から成り、それは保護を引き出すのに必要RNAの転写に必要なDNAの配列、哺乳類細胞でのタンパク質翻訳、及び哺乳類細胞でなくバクテリアでのプラスミドの増幅である。DNAワクチンへの免疫応答はウイルス感染への応答に似ているが、より安全である。DNAは伝染したり、病気の原因となったりはしないからである。DNAは比較的生産が容易であり、環境中のプロテアーゼ及びヌクレアーゼに対して安定である。DNAワクチンは、例えば、HSV、AIDS、C型肝炎、がん、エボラ、及び、より伝統的な手段によっては開発されていない類の疾病を予防又は治療するのに必要な免疫応答を生成するのに使用される可能性がある。

【 0 0 0 6 】

予防あるいは治療のワクチン接種のためのDNAワクチンの受け入れの障害は、効率のよいデリバリ及び細胞摂取及び細胞に関係する適切な免疫応答の促進の困難性にある。低発現あるいは免疫の認識の欠落のいずれかの理由によって、プラスミドDNAの注射だけでは、予防接種の十分に強い免疫応答を引き出さない。脂質によって媒介されるデリバリ、ジェットインジェクション、遺伝子ガン及びソノポレーション(sonoporation)を含む、DNAワクチンのデリバリ及び摂取のためのいくつかの方法が、テストされてきたが十分な成功をおさめていない。

【 0 0 0 7 】

DNAワクチンの遺伝学及びDNAワクチンの生体内デリバリを目的とするエレクトロポレーション(electroporation)の使用についての近年の発展は、実用的なレベルの発現の効能を増加してきた。エレクトロポレーションはパルス電流を使用し細胞膜に複数の孔(pores、以下単に孔と記載する)を開口し(透過処理(permeabilization)と呼ばれるプロセス)そして、皮内に注射されたDNAがスキン細胞によって摂取されスキン内の生細胞に免疫を起こさせることを可能とする。エレクトロポレーションはスキン又は筋肉内へのDNA注射を要求し、電極のスキンへの直接コンタクト又は電極の筋肉への挿入を要し、細胞のDNA摂取を促進するために直の電流処置を要求する。

【 0 0 0 8 】

ドラッグのデリバリ方法としてのエレクトロポレーションは、いくつかのマイナス点があり、処置に伴う痛み、筋肉収縮及び電流は組織のダメージを引き起こしもする。これらのマイナス点はその広い採用を限定してきた。実際、エレクトロポレーションに伴う痛みはひどいもので医師あるいはケアプロバイダはその使用を子供あるいはシニアに勧めようとしていない。加えて、エレクトロポレーションは約5 mm² と約7 mm² の間の領域に使用可能にすぎない。

【 0 0 0 9 】

リチャード J コノリー、サウスフロリダ大学の一研究、題目プラズマを介する分子デリバリは、非熱プラズマがパルス電気場もスキンヘデリバリ可能であり、この方法は安全に細胞が皮内に注射されたDNAワクチンの摂取を促進することを示した。実験では、100 µgのJRF120 容量50 µlのプラスミド皮内に注射された。ボラス(bolus)は、正負の両極性プラズマに10分間晒された。エレクトロポレーションのように、この方法はスキンへの針でのDNA注射を要求し、痛みがある処置方法であり、注意深く廃棄しなければならないバイオ有害廃棄物を生成する結果になる。しかも、この提案された方法はプラズマを生成するために高価なヘリウムのような希ガスの使用を含む。

経皮の、針を必要としないワクチンのデリバリが、あるグループの、子供やシニアのように注射の痛みには耐えられない人々に望まれる。鼻腔内のデリバリは興味を引く魅力的であるが、デリバリ可能なワクチンの総容量に限界がありチャレンジである。デリバーされたワクチンは粘膜分泌物に希釈され、プロテアーゼやヌクレアーゼに攻撃され、上皮性閉門によって除外される。したがって、相対的に大きなワクチンのドーズ (doses) が要求され、正確にどれだけのドーズが実際に粘膜を超えているのかを決定することは困難である。加えて、鼻腔内の空洞の限界のため、小容量が処置されるに過ぎない。

【発明の開示】

【0010】

DNA ワクチンをデリバーする例示システムと方法がここに開示される。DNA ワクチンをデリバーする一実施メソッドロジは、処置エリア、例えば、スキン、組織あるいは腫瘍に対して十分な期間、一又は複数の孔を開けるためにプラズマ処置用のプラズマジェネレータを提供することを含む。外用 DNA ワクチンを前記処置エリアに処置しある期間外用 DNA ワクチンが前記一又は複数の孔を通じて輸送可能となるまで待つ。実施メソッドロジはさらに、同処置エリアに細胞への前記 DNA ワクチン摂取を十分に促進する設定で前記処置エリアへプラズマ処置することを含む。

10

【0011】

一実施形態の非侵襲性の DNA ワクチン接種システムは、外用 DNA ワクチンを表面に処置する、例えば、スキン、組織又は腫瘍上に処置することを含む。プラズマジェネレータは、例えば、スキン、組織又は腫瘍上へ前記スキン、組織又は腫瘍に一又は複数の孔を開くための第一のプラズマ処置を提供し、同領域上へ第二のプラズマ処置を提供し、一又は複数の細胞へ DNA ワクチンの摂取を起こさせる。

20

【0012】

DNA ワクチンで身体にワクチン接種するメソッドロジの他の実施形態は、第一パラメータセットを用いてマイクロ秒又はナノ秒パルスプラズマあるいはナノ秒パルスコロナを処置エリアに処置すること、及び DNA ワクチンを処置エリアに外用処置することを含む。方法は、さらにプラスミド DNA が第一のプラズマ処置で作成された孔を通じて移動するのを可能とすることを含み、それからマイクロ秒あるいはナノ秒パルス DBD プラズマ又はナノ秒パルスコロナ処置を外用処置されたプラスミド DNA の細胞摂取を起こさせるに十分なパワーセッティングで処置することをさらに含む。

30

【0013】

他の DNA ワクチンで身体にワクチン接種するメソッドロジの一実施形態は、マイクロ秒又はナノ秒パルス DBD プラズマ又はナノ秒パルスコロナをあるパラメータセットで、スキン、組織又は腫瘍上の処置エリアで処置し、そして前記 DNA ワクチンを前記処置エリアのスキン、組織又は腫瘍に外用処置することを含む。この方法で使用されるパラメータセットは、プラスミド DNA がスキン、組織又は腫瘍に生成された孔を通じて移動可能に、かつ、組織又は腫瘍の細胞がプラズマ処置で細胞に生成された孔を介して摂取されるに十分なものである。

【0014】

DNA ワクチンで身体にワクチン接種するメソッドロジの他の実施形態は、DNA をスキンへ表皮と真皮の間の皮内に注射して、注射箇所上マイクロ秒又はナノ秒パルスの高電圧電源を使用し非熱 DBD プラズマを局所的に生成し又は注射箇所上にナノ秒パルス高電圧電源を使用してパルスコロナを局所的に生成することを含む。プラズマ処置は一又は複数の孔を細胞内に生成するが、注射された DNA の細胞内摂取を可能とする。

40

【図面の簡単な説明】

【0015】

これら及び他の本発明の特徴及び特長は以下の記述及び添付の図面についてより理解されるであろう。すなわち：

【0016】

図 1 は、スキン層の一例を描いた図である。

50

【 0 0 1 7 】

図 2 は、一実施形態に係るスキン、組織又は腫瘍を通して移動する分子についてのデリバリシステムを描く。

【 0 0 1 8 】

図 3 は、他のスキン、組織又は腫瘍を超えて移動する分子に関する他の実施形態を描く。

【 0 0 1 9 】

図 4 は、第三のスキン、組織又は腫瘍を超えて移動する分子に関する他の実施形態を描く。

【 0 0 2 0 】

図 5 は、スキン、組織又は腫瘍を超えて移動する分子に関するさらなる他の実施形態を描く。

【 0 0 2 1 】

図 6 は、図 5 の電極の平面図である。

【 0 0 2 2 】

図 7 は、プラズマを使用する DNA ワクチンの経皮デリバリのメソドロジの実施形態の模式図である。

【 0 0 2 3 】

図 8 は、スキン、組織又は腫瘍を超えて移動する分子の移動に関するデリバリシステムの他の実施形態を描く。

【 0 0 2 4 】

図 9 は、処置表面をプラズマで孔を開口し DNA ワクチンを処置エリアに処置する装置の一実施形態の断面図である。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 5 】

出願人は、冷プラズマを使用し DNA をスキン層、細胞間（細胞の間）も細胞内（細胞の内部へ）の双方を超えて移動する技術を開発した。出願人は、US 特許出願番号 No. 14 / 500 144 「組織層を超えた分子のデリバリのための方法及び装置」、2014 年 9 月 29 日を出願し、それはここに参照によって全体が組み込まれている。いくつかの出願人の例示の方法は、安全で非接触の経皮デリバリ及び DNA ワクチンの細胞摂取を提供するプラズマを利用しているが、ここではそれをプラズマポレーション（plasmaporation）ともいう。

【 0 0 2 6 】

経皮デリバリは分子がスキンをパススルーすることを要求する。図 1 は、スキン 100 の層を描く。スキン 100 の外層は、角質層（SC という、stratum corneum）102。SC 102 は死んだ、平坦でケラチンが豊富な細胞、角質細胞から構成されている。これらの濃密な細胞は複雑な細胞間脂質、セラミド、遊離脂肪酸、コレステロール及びコレステロール硫酸のミックスによって囲まれている。分子が SC を超える有力な拡散パスは細胞間に見える。残りのスキンの層は、表皮（生表皮）104 及び真皮 106 である。

【 0 0 2 7 】

経皮的には少量パーセントのコンパウンドがデリバリ可能であるに過ぎない、理由は、スキン 100 は非常にバリア特性を持っており、すなわち、高い親油性のある SC 102 は、分子がスキンを超えて浸透したり、拡散するのを防止するからである。その結果、相対的に小さな分子量（MW）500 ダルトン（Dalton）以下の分子が経皮投与可能である。皮膚科の外用治療、経皮全身治療あるいは、ワクチン接種が目的の場合、経皮的処置のためのイノベティブなコンパウンドの開発は、分子量 500 ダルトン以下に制限される。加えて、ほとんどのスキンを超えるドラッグの輸送は非常にゆっくりとしており、一定の流量に至るには数時間のラグタイムが測定される。治療上有効なドラッグレベルの達成には、したがって、強ケミカル浸透エンハンサーを使用する人工的なスキン浸透のエンハンスなしでは、治療的に有効なドラッグレベルの達成は難しい。

10

20

30

40

50

【0028】

プラズマポレーションは非熱プラズマ又はコールドプラズマを、経皮的なDNAワクチンのスキン及び免疫細胞へのデリバリに関して第四の状態を使用する。非熱プラズマは、部分的に大気圧下で大気空気又は他のガス及び電気を使用し生成されイオン化されたガスである。それは、二つの電極の間に現れる空気又は他のガスの分解によって生成され、しばしば、それらのうちの一つは絶縁され、十分な高電圧での処置である。第二の電極は、しばしば、生スキン、組織又は腫瘍のように誘電体も可能である。パルス電場は、プラズマ生成に並びにスキン、組織又は腫瘍及び細胞膜に経皮的なデリバリ及びマクロ分子の細胞摂を促進する一時的（リバーシブルな）孔開けに使用されている。いくつかの実施形態では、一時的な孔は約1から約5分間開いたままである。非熱プラズマを生成するのに使用される電気パラメータは、リバーシブルプラズマポレーションを達成するために制御可能である。電極は、スキンに非接触であり、針は不要で、非熱プラズマへの接触には痛みは伴わず、安全である。一又は複数の電極が絶縁されるココンフィグレーションでは、非熱プラズマは誘電体バリア放電（「DBD」）プラズマであり、例えば、絶縁電極でスキン、組織又は腫瘍に接触しても、安全無痛である。

10

【0029】

ここに記述されているプラズマポレーション技術は、無痛非侵襲法でのDNAワクチンデリバリ効率的で迅速な手段である。いくつかの実施形態では、技術はDNAのスキンへの注射は要求されない。増加されたDNAデリバリ効率は、結果として一回当たりの免疫化に要求されるDNAをより少量にし、DNA単位あたりのドーズ数を増加させ、DNAワクチンの容易で迅速な生産に寄与し、より小規模の生産設備に寄与し、新しいワクチンのニーズに対するより早い応答及び低コストに寄与する。大規模な免疫化プログラムが開発されるところではどこでも、バイオハザード廃物、鋭利物（注射針）の廃棄に関して最小のコンサーンがホットになる。

20

【0030】

ここに記述されているプラズマポレーション技術は、生スキンに外用処置されたDNAワクチン効率的な細胞摂取及び作用を促進する。ブタのスキンはヒトのスキンに形及び機能がとても近いので、実施例としてブタの生体研究実験が実行された。以下で記述される実験では、スキン細胞へのプラスミドDNA細胞間摂取がプラスミドDNAの遺伝子に緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein, GFP）マーカーにエンコードされたタンパク質表現によって示されている。いくつかの実施形態では、GFPエンコードプラスミドのソース及び準備は、非常に安定なAcGFP1(Aequorea coerulescens、オワンクラゲGFP) 緑色蛍光タンパク質(Clontech Laboratories、クローンテック ラボラトリ)の形をエンコードするpEGFP-N1ベシクベクターを含む。プラスミドDNAは、E. coli で増幅され商業上利用可能なキット(Qiagen Inc.)で精製される。プラスミドDNAは、指示濃度でリン酸緩衝食塩水に希釈されている。いくつかの実施形態では緑色蛍光タンパク質をエンコードしているプラスミドDNAが、アルデブロン社（Aldevron, Inc., Fargo, ND（ノースダコタ州））、から商業的に取得できた。このケースでプラスミドDNAはDNAase/RNaseフリーの超純水に溶解され投与された。プラスミドDNAの作業濃度は、2 mg/ml及び100 µlの容量で外用又は皮内注射処置された。エンコードされた表現の細胞によって細胞内に完全DNAが摂取されない場合を除き信号は得られない。

30

40

【0031】

これらの実験はプラズマポレーションが安全で無痛の電ロポレーション及び他のDNAの経皮的なデリバリ手段の代替であることを示す。非熱プラズマ生成の電氣的パラメータ、電極ジオメトリ、DNA濃度、プラスミドDNA構成及びスキンへのプラスミドDNA処置モード（注射あるいはスキン表面への外用処方）は、プロセス最適化に変更可能とされる。上述のこれらの用法又は他の多くの用法に加えて、DNAワクチンのプラズマポレーションは、ウィルス感染予防（例えば、単純ヘルペスウィルス、エボラ等）及びがん治療（Her-2/neu乳がん）に使用されてもよく、ワクチンターゲットは現在研究途上である。

50

【 0 0 3 2 】

いくつかの実験例では、プラズマポレーションは、平面 D B D プラズマジェネレータ (図 3 及び 4) 又は D B D ジェットプラズマジェネレータ (図 2 及び 5) 又はパルスコロナジェネレータ (図 8) が針を要しないマクロ分子の経皮デリバリのために関与している。プラズマ生成に使用されたパラメータによって (処置時間、負荷電圧、パルス繰り返し周波数、パルス時間、処置パルス回数、デューティサイクル等)、マクロ分子の浸透深さは制御されターゲット層、例えば、スキンの表皮又は真皮へのデリバリが保証される。このように、ここに記載された非熱プラズマポレーション技術は早い経皮的なデリバリを促進し、及び、大気圧下及び室温での十分な D N A ワクチンの細胞摂取をエンハンスし、エレクトロポレーション及び他の従来技術で必要とされた電極又は針の廃棄を要さない。

10

【 0 0 3 3 】

出願人は、前に、U S 特許出願番号 N o . 1 4 / 5 0 0 1 4 4、「組織複層を超えて分子のデリバリのための方法及び装置」2 0 1 4 年 9 月 2 9 日、に記載されているようにプラズマポレーションは、分子量 7 0 k D a までのデキストラン分子、タンパク質では 1 1 5 k D a まで、そして 5 0 n m 径ナノ粒子で生体ブタのスキんに 1 5 分以内の外用処方でスキんに損傷を発生させず経皮的なデリバリをエンハンス可能であることを示したが、それは、ここに参照されて取り込まれている。

【 0 0 3 4 】

大気圧下での非熱プラズマはマクロ分子を表面から生体ブタのスキン内へ、スキンを全く傷つけずに導入可能である。非熱プラズマによって可能とされたスキンポレーションは、経皮的なデリバリ及び細胞の D N A ワクチン摂取を室温大気圧下で、苦痛もなく筋肉収縮や他のエレクトロポレーションに伴う副作用もなく、非侵襲及び安全な手段で提供する。当該処方は、ディスプレイ電極や針を要求せず、バイオ廃棄物の廃棄の必要もなく、バイオ消耗品廃棄物の不正な再利用もない。非熱プラズマを使用する追加の利益としては、生成された活性種は、プラズマポレーションの間スキンを殺菌可能である。

20

【 0 0 3 5 】

プラズマのフェーズでは、中性ガス原子 (又は分子)、電子、陽 / 陰イオン、及び高エネルギーラジカルが生成される。これらの生成及び濃縮は、部分的に、プラズマ生成に使用されるガス及びケミカルの物性、プラズマ生成に使用されるエレクトロニックパラメータとデバイスデザインに依存する。スキン上に非熱プラズマによって生成される電場は、プラズマ処置時間；電極とスキンの間のギャップ；組織又は腫瘍；処置電圧；パルス期間；パルス処置回数、パルス繰り返し周波数及びデリバリを局所化するデューティサイクルを変更することによってチューン可能である。これらのパラメータは、マクロ分子のスキン、組織又は腫瘍を超えての深さ及びデリバリ量のコントロールを可能とし、ターゲットのスキン、組織又は腫瘍を最適ドーズで、高価な D N A ワクチンの各処置の量を最小化する潜在能力を有している。

30

【 0 0 3 6 】

プラズマオベレーションパラメータは変動してもよく、マイクロ秒パルスプラズマ処置。パワーサプライセッティング (外用処置でも注射処置でも双方の) はパルス繰り返し周波数 5 0 - 3 5 0 0 H z の間でパルス期間が約 1 - 1 0 μ s の間で電圧が約 11 - 2 0 k V の間でデューティサイクルが約 1 - 1 0 0 % の間で電圧上昇時間が約 1 - 5 V / n s の間の範囲に内に設定可能である。処置時間は、約 5 秒と約 1 8 0 秒の間であってよい。同様に、ナノ秒パルスプラズマ処置では (外用処置でも注射の実験でも双方)、パワーセッティングは、連続処置の間、パルス期間約 1 n s - 5 0 0 n s の間で約 2 - 2 0 0 0 0 H z のパルス繰り返し周波数及び電圧上昇時間約 0.5 - 1 0 k V / n s の間で約 3 - 2 0 k V の間の電圧というものでよい。ディスクリートパルス処置のために、セッティングは、パルス期間約 1 n s - 5 0 0 n s、電圧上昇時間 0.5 - 1 0 k V / n s の間の電圧約 3 - 2 0 k V の間で約 1 - 1 0 0 パルスの間でもよい。処置時間は、約 1 秒と約 3 0 0 秒の間でよい。パルスは正又は負極性のいずれでもよい。加えて、ナノ秒パルスコロナ処置のパワーセッティングは、パルス期間約 1 n s - 6 0 n s 及び電圧上昇時間 0.5 - 1 0 k V / n s の間の電圧約 3 - 2 0 k V の間

40

50

でパルス繰り返し周波数約 1 - 1000 Hz 又は連続処置でよい。ディスクリートパルスコロナ処置については、セッティングは、約 1 - 100 パルスを、電圧上昇時間 0.5 - 10 kV/ns の間の電圧約 3 - 20 kV でパルス期間約 1 ns - 60 ns 処置するものでよい。

【0037】

いくつかの実施形態では、安全（火傷又は他のスキンへの損傷を発生しない）な細胞 DNA 摂取及びロバストにエンコードされた GFP が実現される最適パラメータでヘリウム DBD ジェットが使用された。デバイスは、電極チップから 5 - 50 mm 離れスキン上に焦点を絞ったプラズマビームを生成し、よりリモート処置を可能とする。図 2 は、実施実験例の DNA プラスミドをスキン 220 を介してデリバリするデリバリシステム 200 を描く。デリバリシステム 200 の実施例は、高電圧チューブメタル電極 202 及び誘電体として働くホウケイ酸ガラスチューブ 204 を含む非熱プラズマジェネレータ 201 を含む。プラズマジェネレータ 201 は、プラズマジェット 206 を生成する浮き電極の誘電バリア放電（dielectric barrier discharge (DBD)）プラズマジェネレータである。

【0038】

プラズマジェネレータ 201 はガスフィード 215 を含む。実施例のガスは He, He + O₂, N₂, He + N₂, Ar, Ar + O₂, Ar + N₂ 及びその類を含むプラズマジェットをフィードするのに使用される。液体溶液の蒸発から発生するガスの使用も可能である。気化液には、水、エタノール、有機溶媒及びその類が含まれてよい。これらの気化液は、医薬物質、浸透エンハンサー等の添加剤コンパウンドとミックスされてもよい。気化液及び添加剤は、上記に示されたガスと共に様々な濃度であるいはガスなしで使用されてもよい。

【0039】

プラズマジェネレータ 201 は、図示しないパワーサプライを含む。パワーサプライは高電圧電源であり、例えば、直流、ランプアップ、ランプダウン、パルス、ナノ秒パルス、マイクロ秒パルス、矩形、SIN、減衰 SIN、ランダム、同位相、異位相及びその類の多数の異なる波形をもつことが可能である。いくつかの実施形態では、パワーサプライはマイクロ秒パルスパワーサプライであった。いくつかの実施形態では、パワーサプライはナノ秒パルスパワーサプライであった。いくつかの実施形態では、プラズマ 206 は、交番極性パルス電圧であった。いくつかの実施形態では、電圧はパルス幅約 1 - 10 µs の間（パルス繰り返し周波数：50 Hz から 3.5 kHz）の立ち上がり時間 5V/ns で振幅約 ~20 kV（ピークからピーク）のパワー密度 1 - 10 W/cm² であった。オペレーション中、プラズマジェット 206 は、スキン 220 と直接接触している。

【0040】

プラズマは電場がスキンに到達し電気チャージを貯めてスキンを超えて電圧ポテンシャルを高め、細胞内及び細胞間ポレーションをもたらす。プラズマ電極は組織又は処置物体に接触しないからプラズマポレーションは、非侵襲である。

【0041】

細胞内のポレーション（poration, 孔形成）に関して、流体脂質二分子層膜の膜貫通電圧は少なくとも 0.2 V に達する必要がある。膜貫通電圧は、脂質二分子層膜をチャージし、膜内で急速の局所的な構造再配列を起こさせ、水で満たされた膜構造へ遷移させ、膜に“水通路”又は“孔”形を穿つ。水通路又は孔はイオン及び分子の移動を総じて増加する。膜貫通電圧は、最小半径約およそ 1 nm で主膜の“孔”を作ると考えられている。加えて、負荷電場は急速な極性状態の変化に至らせメカニカルに拘束のない細胞膜変形を起こさせ（例えば、つるされた小囊と細胞）、及び電解質電導によって支配されるイオンチャージ再配布を起こさせる。

【0042】

プラズマジェット 206 を生成するのに使用される電気パルスは、細胞間ポレーションの元にもなる。SC は、約 15 - 25 µm 厚さであるが、スキンでは最も電気抵抗性がある部位である。プラズマジェット 206 を生成するのに使用される電気パルスの負荷は、約 50 V と約 100 V の間の経皮電圧を起こすが、SC 内のマルチラメラ二層のポレーションを起こす。このレベルの負荷経皮電圧では、細胞ライニングの汗腺と毛包のポレーシ

ョンも発生する可能性もある。

【0043】

処置エリアからプラズマ源を取り除くと同時に、孔は再び閉じ始め、したがって、プロセスはリバーシブルである。いくつかの孔は、ある期間、開いたままに残り、その間は分子は細胞膜間を拡散し続けることができる。いくつかの他のケースでは、負荷されている膜貫通ポテンシャルはしきい値を超え、その結果、形成された孔は永久に開いたままである。このプロセスは、不可逆のポレーションとしてがん治療で有益である。

【0044】

電気パルスがスキンに処置されるとき、吸収されたエネルギーが局所的な加熱を発生させスキンにダメージを起こし得る。エネルギー100 J/cm²以上がスキンに離れてかけられて二度の火傷と下に離れているスキンへ熱ダメージを与える結果となる。この問題に打ち勝つ一つの方法は、短時間パルスを間欠的に繰り返し負荷することであり、同量のエネルギーはその方法でなければダメージを生じさせるものが局所的な加熱もスキンドAMAGEも生じずに伝達される。いくつかの実施形態では、離れたスキンにかけられるエネルギーは約50 J/cm²であり、いくつかの実施形態では、離れたスキンにかけられるエネルギーは約25 J/cm²であり、いくつかの実施形態では、離れたスキンにかけられるエネルギーは約10 J/cm²であり、いくつかの実施形態では、離れたスキンにかけられるエネルギーは約5 J/cm²であり、そして、いくつかの実施形態では、離れたスキンにかけられるエネルギーは約3 J/cm²である。しかし、外傷を処置するときには、エネルギーは増加されてもよく、例えば、500 J/cm²にしても火傷は生じない。いくつかの実施形態では500 J/cm²のレンジのエネルギーが止血に使用される場合もある。

【0045】

加えて、ダメージはパワーレベル、処置時間、周波数、デューティサイクル及びパワーサプライのパルス期間を下げることによって避けることが可能であり、プラズマ電極とスキン、組織又は腫瘍の間のすきまを増加することによって回避可能である。

【0046】

プラズマ処置後にプラズマポレーションを起こさせ、一旦、プラズマ生成デバイス206が止められたら、水通路のマルチラメラシステムはある期間開いたままであり、それは約二、三分から二、三時間までかもしれない。

【0047】

他のタイプのプラズマジェネレータがデリバリシステムのために使用されてもよく、例えば、ナノ秒パルスDBDプラズマ、マイクロ秒パルスDBDプラズマ、SIN波DBDプラズマ、抵抗バリアディスチャージプラズマ、サーフェスDBDプラズマ、2-Dあるいは3-Dアレイナノ秒パルスコロナ、2-Dあるいは連続モードでの3-Dアレイプラズマジェットオペレーション、あるいは、コントロールされた1から100%のデューティサイクルのような類のディスペンサーシステムが使用されてもよい、すべてのプラズマジェネレータがポレーション(poration、孔を導出)するのに成功裏に使用されているわけではない。高電流をデリバリするプラズマジェネレータ、あるいは、処置対象の温度上昇が高くなるプラズマジェネレータは、熱プラズマ、グライディングアークディスチャージ、プラズマトロンも含めプラズマポレーションには向かない。このようなプラズマジェネレータは、電気ショック、重大な熱ダメージ、筋肉収縮及び痛みの原因となり、あるいは、処置される対象物に十分なチャージをデリバセせず、全くあるいは非常に弱い負荷電場を意味し、したがって、ポレーションされないのである。

【0048】

好適なプラズマジェネレータは、変位電流である支配電流を低パワー及び/又は高周波数で保つ。変位電流は、電流密度の単位を有し、ちょうど関連する電磁場は、ちょうど誘導電流が有するように、しかし、移動電荷の電流ではなく、むしろ時間依存の電場である。絶縁されてスキンに接触していない電極によって電場がスキンにかけられ、最小の伝導電流がスキンに流れる。強い伝導電流は電気ショックを起こさせ、熱ダメージ、筋肉収縮及びエレクトロポレーションに関係する痛みを起こさせる。

【0049】

より広い処置エリアについて、電極構成は複数のプラズマジェットあるいはより大きなエリアのフラットな電極（図示しない）が使用されてもよい。より複雑な3Dサーフェスのケースでは、コントロールされたプラズマモジュール（図示しない）が静止ターゲットのまわりを動いてもよく、あるいは、プラズマに晒されるサーフェスは可動ステージ上に置かれてもよい。いくつかの実施形態では、一又は複数のプラズマはあるいはロボットアームにアタッチされてもよいが一又は複数のターゲット領域をプラズマブルーム（plasma plume）又はジェットに晒されるように動くようにプログラムされている。

【0050】

加えて、いくつかの実施形態では、プラズマジェネレータ201はバイオ分子/ドラッグデリバリシステムに結合されたもので、分子は処置エリアに針のない注射、圧力ガスの負荷、気化、スプレー及び又はミスト化によって輸送されてもよい。いくつかの実施形態では、これはサーフェスの前処置でアシストしてもよい。

【0051】

いくつかの実施形態では、プラズマ温度を減少するのが本質的であり、プラズマポレーション後のスキン透過をエンハンスし、He, Ar, Ne, Xe及びその類、空気又は希ガスにO₂及びN₂のような他のガスを小パーセント(0.1% - 20%)で混合したもの及び希ガスと水、ジメチルスルホキシド(DMSO)、エタノール、イソプロピルアルコール、n-ブタノールの気化液の混合物に添加物及びその類とともにあるいは加えないものを使用して非熱プラズマを生成することは有益である。

【0052】

いくつかの実施形態では、非熱平面DBDプラズマジェネレータが経皮的なデリバリ及びブタのスキンのサーフェスに外用処置されたプラスミドDNAの細胞摂取を促進するのに使用されている。図3は、非熱平面DBDデリバリシステム300の実施例を描く。デリバリシステム300は、プラズマジェネレータ301を含む。プラズマジェネレータ301は第一の端で電極302に接続され、第二の端で高電圧パワーサプライ（図示しない）に接続されている高電圧ワイヤー303を含む。好適な高電圧サプライが上述されている。誘電バリア304は高電圧電極302の下に配置されている。加えて、高電圧電極302はハウジング305内に配置されている。プラズマジェネレータ301は非熱誘電バリアディスチャージ(DBD)ジェネレータである。プラズマ306は、プラズマジェネレータ301によって生成される。図3は、スキン320も含む。ここに開示されている実験例については、スキン320は生ブタスキンである。DBDプラズマ源がスキンのサーフェスから1 - 5 mmの距離に置かれると、コールドプラズマがスキンに直接接して生成される。

【0053】

ダイレクトプラズマ306は、交番極性パルス電圧が電極302に負荷されることによって生成される。いくつかの実施形態では、負荷電圧は、約1 - 10 μ sの間のパルス幅（パルス繰り返し周波数：50 Hzから30 kHz）で振幅約20 kV（ピークからピーク）及び電圧立ち上がり時間約1 - 10 V/nsである。パワーサプライ（図示しない）は、可変電圧かつ周波数可変のパワーサプライである。1 mm厚の透明な石英スライド、アルミナ又はテフロンが絶縁誘電バリア304として使用されてもよく、電極302をカバーする。電極302は2.54 cm径の銅、真鍮又は他の導電性材料でよい。誘電バリア304とブタのスキン320間のディスチャージギャップは、約4 mm \pm 1 mmでよい。いくつかの実施形態では、パルス波形は振幅約22 kV（ピークからピーク）、約9 μ sの期間、立ち上がり時間約5 V/nsである。ディスチャージパワー密度は約0.1 W/cm² から 2.08 W/cm² である。J/cm²でのプラズマ処置ドーズ(dose)は、プラズマディスチャージパワー密度にプラズマ処理期間を乗じて算出してもよい。

【0054】

加えて、間接プラズマ406はプラズマジェネレータ401で作られてもよい。プラズマジェネレータ401はプラズマジェネレータ301と同様であるが、プラズマジェネレ

10

20

30

40

50

ータ401はプラズマ406をフィルタするメタルメッシュ330を含む以外は同じである。メタルメッシュ300は、チャージイオン及び電子のパススルーを防止するが、中性種がパススルーしスキンとコンタクト可能とする。中性種は“残光”(“afterglow”)とも呼ばれる。

【0055】

図5は、他の実施例に係るデリバリシステム500の斜視図である。図6は、デリバリシステム500の電極の平面図である。デリバリシステム500は、複数のDBDジェットを含む。実施例のデリバリシステム500は、ハニカム形のDBDジェットのアレイを含む；しかし、多くの他のコンフィギュレーションでは、リニア、三角、矩形、ペンタゴン、ヘキサゴン、オクタゴン等のように使用されてもよい。

【0056】

DBDジェットは、ガラスチューブ504A, 504B, 504C, 504D, 504E, 504F 及び 504Gを有する。メタル電極502は複数の円筒形の開口502A, 502B, 502C, 502D, 502E, 502F, 及び502Gであって各々に対応するガラスチューブ504A, 504B, 504C, 504D, 504E, 504F, 及び504Gを受ける開口を含む。オプションとして、複数のメタル電極が使用されてもよい。メタル電極502はショックを防ぐ絶縁カバー(図示しない)を有してもよい。メタル電極502は上述の高電圧電源に接続されている。

【0057】

DBDジェットは、第一の端にガス流入口を有し、他端にプラズマジェット516A, 516B, 516C, 516D, 516E, 516F 及び 516G出口を有する。上述のように、ガスは、例えば、He, Ar, Ne, Xe, air, He+Air, Ar+Air, Ne+Air, Xe+Air,又はその類でよい。加えて、各々のガラスチューブ504A, 504B, 504C, 504D, 504E, 504F及び504Gは、気化液添加剤を受けるためにガラスチューブに沿って入口508A, 508B, 508C, 508D, 508E, 508F, 及び508Gを有する。これらの入口は、電極502の上方又は下方に配置されている。実施例の経皮的なデリバリシステム500はスキン、組織又は腫瘍を接地電極として利用している。

【0058】

図2の実施例では、スキン、組織又は腫瘍220は、中性及びチャージされている種を含むプラズマ206に直接暴露されている。同様に、図3の実施例では、直接プラズマジェネレータ301で、電気的なディスチャージが誘電バリア304とスキン320との間で起こり、スキンは中性種及びチャージされた粒子に直接暴露されている。

【0059】

プラズマジェネレータ401によって作られる間接プラズマは接地銅メッシュ(16 x 16メッシュサイズ、0.011"ワイヤー径で0.052"の開口サイズ)高電圧電極とスキンの間に置かれて、チャージ粒子を消滅させ暴露されているスキンのサーフェスに接触するのを防止した。

【0060】

図7は、DNAワクチンの経皮デリバリのためのメソドロジ700実施例である。実施例に係るメソドロジ700はブロック702から開始する。ブロック704では、プラズマはスキンに一又は複数の孔を開けるために処置エリアへ処置される。ブロック706では、DNAワクチンがスキン、組織又は腫瘍上のターゲットエリアへ外用処置され、ブロック708で待ち期間が生じる。いくつかの実施形態では、待ち期間は約3時間以下であり、いくつかの実施形態では、待ち期間は約2時間以下であり、いくつかの実施形態では、待ち期間は約1時間以下であり、いくつかの実施形態では、待ち期間は約30分以下である。第二のプラズマ処置がブロック710で発生し、スキン、組織又は腫瘍の細胞にポレートし、DNAワクチンの細胞内摂取エンハンスを主導し実施例のメソドロジはブロック712で終了する。

【0061】

図8は、安全で効率的なプラスミドDNA外用処置の経皮デリバ리를可能とし、スキン、組織又は腫瘍の細胞によってDNAの細胞内摂取を促進するプラズマシステムのさらなる他の実施例800である。この実施例800は、パルスコナノ秒パルスパワーサプライ

10

20

30

40

50

(図示しない)によるパルスコロナアレイを利用している。パルスコロナアレイは複数のシャープなチップ802で作られ、この実施例ではステンレススチールの機械加工されたチップ0.1016 mm厚及び1 mm互いに離れているものである。シャープなチップ802は、パルスコロナ電極の2Dアレイを形成している。

【0062】

図9は、プラズマでサーフェス処置しサーフェス及び/又は細胞に孔を開けDNAワクチンを処置エリアに処方するワクチン接種装置900の実施例の断面図である。ワクチン接種装置900は、ハウジング902を含み、オンオフスイッチ904、サーフェスコンタクトリング906、高電圧電極908、処置チャンバー910、DNAワクチンチャンバー912及びブランジャ912を含む。加えて、ワクチン接種装置900は、ここに識別されたすべてのパワーセッティングを含む要求パワーを供給可能であるパワーサプライ(図示しない)を含む。いくつかの実施形態では、サーフェスコンタクトリング906は取り外し可能であり、各使用後に交換可能である。加えて、いくつかの実施形態では、サーフェスコンタクトリング906は接地リング(図示しない)を含む。

【0063】

ワクチン接種装置900はいくつかの異なるモードでオペレーション可能である。一実施例では、パワーセッティングはパワーサプライ(図示しない)で選択されオペレータは、サーフェスコンタクトリング906を例えば、ヒトのスキン、組織又は腫瘍又はその類のようなサーフェスに置く。オペレータはスタートボタン904を押し、所望の電圧(複数)を高電圧電極908に適用し処置チャンバー910内にプラズマを生成する。十分な期間経過後、スキンサーフェスに処置されたプラズマはスキンに孔を開ける。オペレータはブランジャ914を下方に押し、ワクチンチャンバー912にストアされているDNAワクチンを処置チャンバー910に注入させる。十分な時間が経過後、DNAワクチンはスキン、組織又は腫瘍の類の開孔をパススルーし、所望のパワーが高電圧電極に負荷されてプラズマを生成し又は複数の細胞に孔を開けDNAワクチンの摂取を発生させる。

【0064】

もうひとつの実施例では、パワーセッティングはパワーサプライ(図示しない)で選択されてオペレータはサーフェスコンタクトリング906を例えば、ヒトのスキン、組織又は腫瘍の類のサーフェスに置く。オペレータはスタートボタン904を押し、選択された電圧(複数)が高電圧電極908へ負荷され処置チャンバー910内にプラズマを生成する。プラズマはサーフェスに処置されスキン、組織又は腫瘍の類に孔を開け細胞内に孔を開く。オペレータはブランジャ914を下方に押し、ワクチンチャンバー912にストアされている、DNAワクチンを処置チャンバー910内に注入させる。十分な時間が経過後には、DNAワクチンは開口された孔をパススルー可能であり、細胞に摂取される。

実験結果

【0065】

多数の実験が生動物で実施された。3頭の5 - 7月齢のユカタン仔ブタが3つの生動物実験に利用された。各々の研究は、一頭の仔ブタに多数の実験が含まれている。実験コントロールには、以下の：プラズマ処置なし、プラスミドDNA処置なし；プラズマ処置なしでプラスミドDNAの皮内注射付；そしてプラスミドDNAの皮内注射後にエレクトロポレーション(従来技術)を含む。実験サンプルは、以下の：皮内注射後マイクロ秒パルスプラズマ；皮内注射後ナノ秒パルスプラズマ；マイクロ秒パルスプラズマ後に外用プラスミドDNA処置；そしてナノ秒パルスプラズマ後に外用プラスミドDNA処置を含む。

【0066】

第一のコントロールはプラスミドDNAが関与せず、結果は、動物処置2経過観察では緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現は見られなかった。

【0067】

第二のコントロールでは、プラスミドDNAは皮内に(“intradermally、ID”)注

射され、その結果、いくつかの G F P が発現した。G F P 発現は、しかし、ほとんど真皮に局所化され、表皮には極めて稀にしか発現しなかった（表皮の発現は処方されたワクチンへの口バストな免疫反応を獲得するという点で重要である）。生検 から得られたデータに基づき正規化強度が導出された。正規化強度は以下のチャート I に示されている。

【表 1】

仔ブタ	注射コントロール（ 正規化強度）	エレクトロポレー ション （正規化強度）	プラズマ処置
#1	8.57E+06		
#2	1.95E+06		
#3	3.96E+06		

10

Chart I

【 0 0 6 8 】

第三のコントロールでは、プラスミド D N A の皮内注射後に、二針の電極が 200 V/cm の電場で、150 ms の期間に 16 パルス 周波数 1 Hz で、8 パルス後に電極を 90 ° 回転し、エレクトロポレーションされた。エレクトロポレーション後、G F P が表皮に強く発現したが、真皮にはほとんど発現しなかった。生検 から得られたデータに基づき正規化強度が導出された。正規化強度は以下のチャート II に示されている。上述のように、エレクトロポレーションは、痛みを含む多数の副作用がある。加えて、エレクトロポレーションは、処置前にプラスミド D N A の皮内注射を要求する。プラズマ処置と異なり、それは、角質層又は組織又は腫瘍の高い抵抗を超えて、外用処置されたプラスミド D N A の細胞内デリバリーを促進するのに使用できないからである。

20

【表 2】

仔ブタ	注射コントロール 正規化強度	エレクトロポレー ション 正規化強度	プラズマ処置
#1	8.57E+06	1.78E+07	
#2	1.95E+06	4.13E+06	
#3	3.96E+06	4.29E+06	

30

Chart II

【 0 0 6 9 】

第 1 セットの実験では、プラスミド D N A (2 mg/ml の 100 μ l) が皮内注射され、注射後にプラズマ処置がマイクロ秒パルス D B D プラズマでパワーサプライ 3500 Hz、パルス期間 5 μ s、電圧 15 kV 及び 100% デューティサイクルを使用して行われた。以下のチャートで何度も処置された領域だった。D B D プラズマ処置 2 日後、蛍光にエンコードされた口バストなタンパク質発現が表皮にも真皮下にも観察された。生検 から得られたデータに基づき正規化強度が導出された。正規化強度は以下のチャート III に示されている。

40

【表 3】

仔ブタ	注射コントロール 正規化強度	エレクトロポレーション 正規化強度	マイクロ秒パルスDBDプラズマ処置
#1	8.57E+06	1.78E+07	2.03E+07 30秒2回処置 1.42E+07 60秒2回処置
#2	1.95E+06	4.13E+06	5.01E+06 30秒1回処置
#3	3.96E+06	4.29E+06	7.98E+06 45秒1回処置

Chart III

10

【0070】

マイクロ秒パルス連続DBDプラズマ処置を用いたデータは、それぞれ、注射コントロールに対して137%, 66%, 166% 及び 102%, の細胞摂取増加を示す。加えて、マイクロ秒パルス連続DBDプラズマはエレクトロポレーションに対して細胞摂取を起こす点に関して優っていることをデータは示す。データは、マイクロ秒パルスDBDプラズマ処置は、エレクトロポレーションに対してそれぞれ14%, 20%, 21% 及び 86%の細胞摂取及びGFP発現の増加を示す。

【0071】

第二セットの実験では、スキンはマイクロ秒パルスDBDプラズマで処置された。電源は、3500 Hzにセットされパルス期間5 μ s 及び電圧 15 kVだった。処置時間は120秒間であった。チャートで識別されるようにプラズマで処置されるエリアに100 μ l プラスミドDNA容液がある期間（“保持時間”）塗られた。第二のDBDプラズマ処置は、電源セットは3500 Hzでパルス期間5 μ s 電圧15 kV、60 秒間 である。

20

【0072】

ロバストなGFP発現が表皮及び真皮に観察された。これらの実験は、プラズマポレーションが細胞間のプラスミドDNAデリバリでスキンの正層に到達可能であること及び細胞内プラスミドDNAデリバリが表皮及び真皮細胞によって摂取達成が可能であることが示された。加えて、実験のメソッドロジは、針スティックを不要とし、付随するバイオの危険性のある廃棄物及び鋭利な廃棄物の不正再使用をなくす。正規化強度は以下のチャートIVにリストされている。

30

【表 4】

仔ブタ	注射コントロール 正規化強度	エレクトロポレーション 正規化強度	マイクロ秒パルスDBDプラズマ処置
#1	8.57E+06	1.78E+07	9.4004E+06 35分保持時間 2.1710E+07 60分保持時間
#2	1.95E+06	4.13E+06	3.341E+06 60分保持時間
#3	3.96E+06	4.29E+06	4.399E+06 15分保持時間

Chart IV

40

【0073】

データは、スキンをマイクロ秒パルス連続DBDプラズマで処置し、プラスミドDNAを外用処方し第二のマイクロ秒パルス連続DBDプラズマ処置すればそれぞれ10%, 153%, 71% and 及び 11%, の細胞摂取が注射コントロールの細胞摂取に対して改善を示している。いくつかのデータでは、この外用処方メソッドロジは、エレクトロポレーションと同等か又はよりよいことを、痛みがなく他のエレクトロポレーションに伴う副作用がないことが示された。しかし、いくつかの実験では、このメソッドロジは修正が必要であって、及び/又はパラメータが調整される櫃等があることを示す。結果は、また、一又は複数のプラズマ処置を、例えば、マイクロ秒パルス連続DBDプラズマをスキンに処置し、孔を開口し、ナノ秒パルス処置（以下に開示される）を用いる。

50

【 0 0 7 4 】

第三の実験セットでは、プラスミドDNA (2 mg/ml を100 μ l) が皮内に注射され、そしてその後、多数回パルスのDBDプラズマ処置が、電圧20 kV、パルス期間500nsでナノ秒パルスパワーサプライされた。ロバストなGFP現出が上皮にも真皮にもプラズマ処置2日経過後に観察された。実験は、いくつかの実施形態では、わずか25パルスのみ必要とされ、したがって、この実験メソッドロジは極めて迅速で、安全で、そして、プラズマは非常に短期間処置されてよい。加えて、このメソッドロジはより省パワーで済み、手持ちバッテリーを用いプラズマ処置装置に給電可能である。正規化強度は以下のチャートVにリストされている。

【表 5】

10

仔ブタ	注射コントロール 正規化強度	エレクトロポレーション 正規化強度	ナノ秒パルスDBD処置
#1	8.57E+06	1.78E+07	2.08E+07 25パルス
#2	1.95E+06	4.13E+06	5.28E+06 25パルス 5.30E+06 100パルス 3.40E+06 75 パルス
#3	3.96E+06	4.29E+06	8.61E+06 for 25 pulses

Chart V

20

【 0 0 7 5 】

データは、ナノ秒パルスDBDプラズマ処置は、注射コントロールに対して細胞摂取がそれぞれ143%, 170%, 171%, 74% 及び117%向上することが示されている。加えて、データはナノ秒パルスDBDプラズマがエレクトロポレーションに対して細胞接種のエンハンスについて優れていることが示されている。データは、ナノ秒パルスDBDプラズマ処置は、17%, 28%, 28%, -18% 及び100% の各増加を示し、エレクトロポレーションに比して細胞摂取に優れている。

【 0 0 7 6 】

第4セットの実験では、プラスミドDNA (2 mg/ml で100 μ l) が皮内注射されてその後プラズマ処置を何秒間も行った。プラズマ処置は、連続ナノ秒パルスDBDプラズマでパワーサプライセット20 kV, 200 Hz 及びパルス期間 200 nsである。ロバストなGFP現出が、上皮にも真皮にも、連続ナノ秒パルスDBDプラズマ処置2日経過後に観察された。正規化強度は以下のチャートVIにリストされている。

【表 6】

30

仔ブタ	注射コントロール 正規化強度	エレクトロポレーション 正規化強度	ナノ秒パルスDBD処置
#1	8.57E+06	1.78E+07	1.07E+07 60 秒間 1.13E+07 80 秒間
#2	1.95E+06	4.13E+06	4.8E+06 120 秒間
#3	3.96E+06	4.29E+06	3.8E+06 120 秒間

40

Chart VI

【 0 0 7 7 】

データは、連続ナノ秒パルスDBDプラズマ処置の使用は、注射コントロールに対して各々26%, 33%, 150% そして -3.82%の細胞摂取改善を示す。結果は、これらのセッティングがエレクトロポレーションに優越するものではないことを示す。

【 0 0 7 8 】

第5の実験セットでは、120秒の連続ナノ秒パルスDBDプラズマ200 Hz, 20 kV パルス期間 200 nsのパワーサプライセットで処置する。100 μ l プラスミドDNA溶液が

50

処置エリアに30分又は120分間、外用処方された。第二の120秒連続ナノ秒パルスDBDプラズマ処置が200 Hz, 20 kV パルス期間 200 nsのパワーサプライセットで処置エリアに適用された。弱いGFPR現出が主に真皮で観察され、表皮層ではGFPR現出は観察されなかった。

【0079】

第6の実験では、プラスミドDNA (2 mg/mlの100 μ l) が皮内に注射されその後2Dパルスコロナアレイを用いてのパルス又は連続処置が行われた。一例では、スキンは25パルス期間500 ns適用電圧20 kVで処置され、そして、第二例では、スキンは周波数100Hz期間80ns適用電圧20 kVで処置された。双方のケースでは共に、ロバストなGFPR現出が上皮及び真皮下兵両方にパルスコロナアレイでプラズマ処置2日後に観察された。正規化強度は以下のチャートVIIにリストされている。

【表7】

仔ブタ	注射コントロール 正規化強度	エレクトロポレーション 正規化強度	ナノ秒パルスコロナ処置
#3	3.96E+06	4.29E+06	8.61E+06 25パルス 7.81E+06 30 秒間

Chart VII

【0080】

データは、ナノ秒パルスコロナ処置でそれぞれ117% 及び 97%、注射コレステロールに対して細胞摂取の改善が示されている。加えて、データはナノ秒パルスコロナ処置が細胞摂取の点でエレクトロポレーションに勝っていることが示されている。データは、パルスナノ秒コロナの使用は、それぞれ100% 及び 82%の増加、エレクトロポレーションよりも細胞摂取に優越することを示している。実験では、いくつかの実施形態では、25パルスのみ必要であり、したがって、この実験メソッドログが極めて迅速である可能性があり、そして、プラズマは、非常に短期間処置されるのでもよい。加えて、このメソッドログは、より小さな電力で済み、ハンド携帯バッテリーで給電されるプラズマ装置を使用可能であろう。

【0081】

本発明に係る実施の形態を説明したが、ここに記載された実施形態は、かなり詳細に記載されている。しかしながら、出願人は、添付する特許請求の範囲をこのような詳細な記載にいかようにも制限、限定する意図はない。追加の利点及び変形は当業者にすぐにわかるであろう。例えば、フレキシブルでウェアラブルな電極が開発されて、非熱プラズマの生成が経皮的なデリバリへの最適化も可能であろう。ここに記述された方法は、DNAワクチンに加えて、他のマクロ分子（例えば、抗体、ドラッグ等）の細胞摂取を起こすのに使用されてもよい。したがって、発明は、広い面で、特定の詳細事項、ここに開示され、記載された機器及、実施例に限定されない。こうして、出願人の一般的発明概念の精神とスコープから乖離しないで、これらの詳細から離れることもあり得る。

10

20

30

40

【図 1】

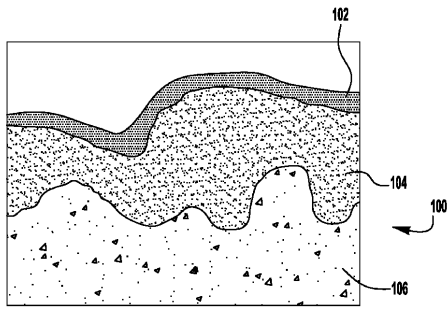


FIG. 1

【図 2】

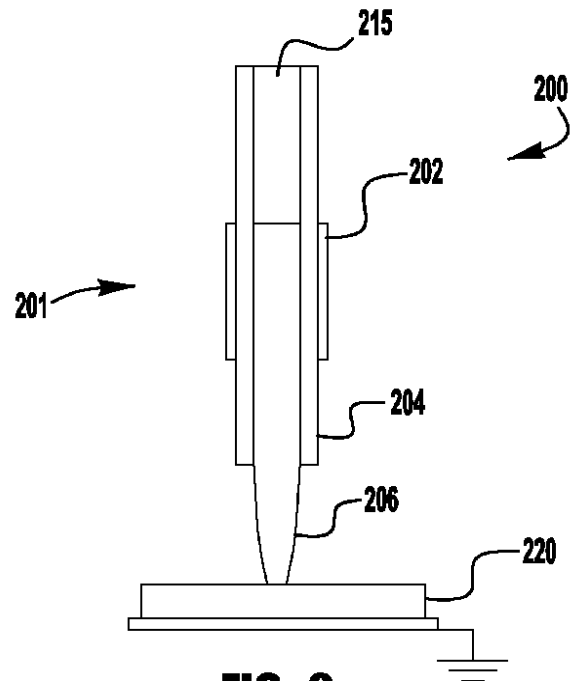
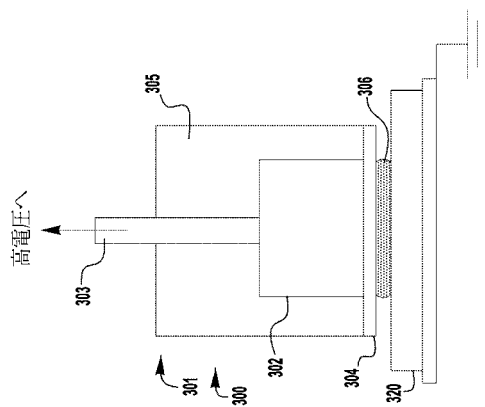
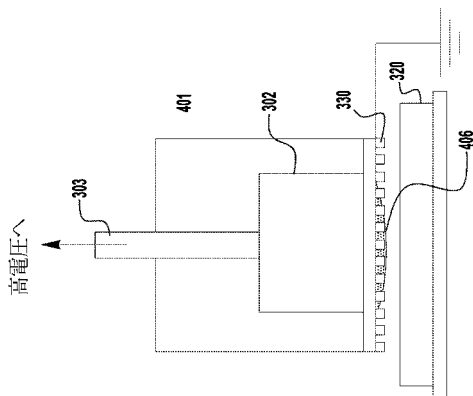


FIG. 2

【図 3】



【図 4】



【図 5】

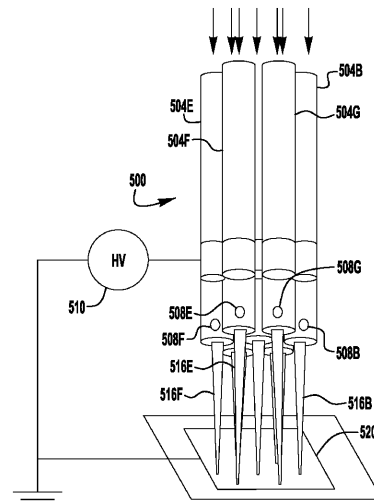
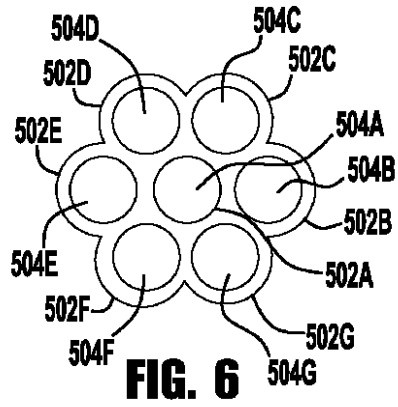
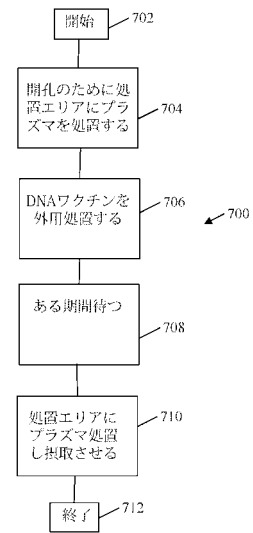


FIG. 5

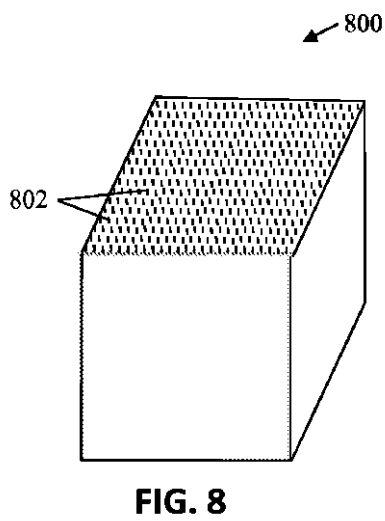
【図 6】



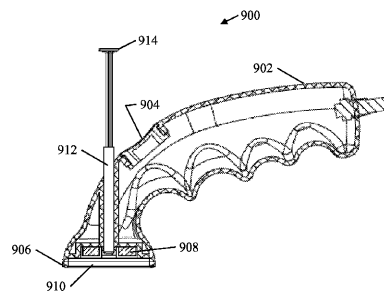
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/068522

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61N1/32 C12M1/42 C12N15/87 H05H1/24
ADD.

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)

A61N C12M C12N H05H

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RICHARD J CONNOLLY ET AL: "Enhancement of antigen specific humoral immune responses after delivery of a DNA plasmid based vaccine through a contact-independent helium plasma", VACCINE, vol. 29, no. 39, 31 December 2010 (2010-12-31), pages 6781-6784, XP028281034, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2010.12.054 [retrieved on 2010-12-21]	11
Y	page 6782, left-hand column, paragraph 3 - page 6783, left-hand column, paragraph 1; figure 4 abstract ----- -/--	1-10, 12-20

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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

23 February 2015

Date of mailing of the international search report

11/03/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loubradou, Gabriel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/068522

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/288934 A1 (WELTMANN KLAUS-DIETER [DE] ET AL) 15 November 2012 (2012-11-15) page 2, right-hand column, line 2 - line 4 page 1, right-hand column, paragraph [0014] - page 2, left-hand column, paragraph [0016] -----	1-20
Y	US 2009/004717 A1 (JAROSZESKI MARK [US] ET AL) 1 January 2009 (2009-01-01) page 3, left-hand column, paragraph [0031] page 3, left-hand column, paragraph [0033] - paragraph [0035] page 3, left-hand column, paragraph [0037]; claims; examples -----	1-20
A	RICHARD J. CONNOLLY ET AL: "Plasma facilitated delivery of DNA to skin", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 104, no. 5, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 1034-1040, XP055170037, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.22451 page 1039, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1; figure 5 -----	1-20
A	CHOI M J ET AL: "TOPICAL VACCINATION OF DNA ANTIGENS: TOPICAL DELIVERY OF DNA ANTIGENS", SKIN PHARMACOLOGY AND SKIN APPLIED PHYSIOLOGY, KARGER, BASEL, CH, vol. 16, no. 5, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 271-282, XP008069449, ISSN: 1422-2868, DOI: 10.1159/000072067 page 272, right-hand column, paragraph 1 - page 273, right-hand column, paragraph 1; tables 1,2 -----	1-20
A	YASUHIRO OGAWA ET AL: "An epoch-making application of discharge plasma phenomenon to gene-transfer", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 92, no. 7, 30 December 2005 (2005-12-30), pages 865-870, XP055170046, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.20659 abstract ----- -/--	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/068522

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SAKAI Y ET AL: "A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 121, no. 3, 10 February 2006 (2006-02-10), pages 299-308, XP024956890, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2005.08.020 [retrieved on 2006-02-10] abstract</p> <p>-----</p>	1-20
A	<p>DAESCHLEIN GEORG ET AL: "Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture.", JOURNAL DER DEUTSCHEN DERMATOLOGISCHEN GESELLSCHAFT = JOURNAL OF THE GERMAN SOCIETY OF DERMATOLOGY : JDDG JUL 2012, vol. 10, no. 7, July 2012 (2012-07), pages 509-515, XP002736165, ISSN: 1610-0387 abstract</p> <p>-----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/068522

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012288934 A1	15-11-2012	DE 102009028462 A1	24-03-2011
		EP 2465332 A2	20-06-2012
		US 2012288934 A1	15-11-2012
		WO 2011018423 A2	17-02-2011

US 2009004717 A1	01-01-2009	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 B 17/20 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 M 37/00	
A 6 1 N 1/44 (2006.01)	A 6 1 B 17/20	
	C 1 2 N 15/00	A
	A 6 1 N 1/44	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

- (72) 発明者 カルガットギ, サミーア
アメリカ合衆国 4 4 3 2 1 オハイオ コプリー クリークレッジ・レーン 1 8 4
- (72) 発明者 アントナカス, ダフネ・パパス
アメリカ合衆国 4 4 2 3 6 オハイオ ハドソン ハドソン・パーク・ドライブ 7 7 0 7
- (72) 発明者 ツァイ, ツンチャン
アメリカ合衆国 4 4 2 2 1 オハイオ クヤホガ・フォールス バッキンガム・ゲート・ブルバード 1 2 9 4
- (72) 発明者 グレイ, ロバート・エル
アメリカ合衆国 4 4 2 4 0 オハイオ ケント N・ウィロー・ストリート 1 2 7

F ターム(参考) 4C053 MM02 MM04

4C084 AA11 MA66 NA05 NA13 ZB05 ZB09 ZB26

4C085 AA03 BA69 BA78 BA87 BA88 BA89 BA90 BA91 BB01 BB23

CC07 CC08 CC21 DD62 EE01 GG01 GG05

4C160 MM01

4C167 AA71 BB41 CC01 CC05 DD10 EE07 GG16