

(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2009-525829

(P2009-525829A)

(43) 公表日 平成21年7月16日(2009.7.16)

(51) Int.Cl.
A61N 1/30 (2006.01)

F I
A61N 1/30

テーマコード (参考)
4C053

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2008-554405 (P2008-554405)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月9日 (2007.2.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年10月14日 (2008.10.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/003615
 (87) 国際公開番号 W02007/095140
 (87) 国際公開日 平成19年8月23日 (2007.8.23)
 (31) 優先権主張番号 60/772, 255
 (32) 優先日 平成18年2月11日 (2006.2.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

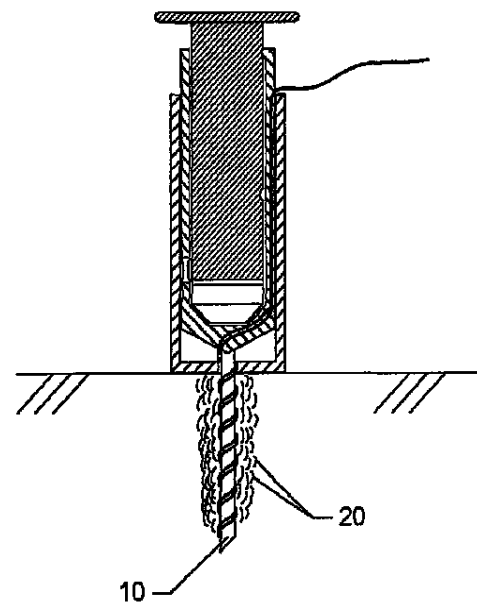
(71) 出願人 505209061
 ジェネトロニクス, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 921
 21-1318, サンディエゴ, ソレント
 バリー ロード 11494
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100092624
 弁理士 鶴田 準一
 (74) 代理人 100102819
 弁理士 島田 哲郎
 (74) 代理人 100110489
 弁理士 篠崎 正海
 (74) 代理人 100145425
 弁理士 大平 和由

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単針生体内エレクトロポレーションのための装置および方法

(57) 【要約】

様々な医療用途のために生体内の組織に分子を投与する装置および方法を記載する。装置は、単針の皮下注射針と、皮膚または筋肉といった組織に針を挿入した時、針を前記組織に挿入した時針によって形成される進路沿いまたはそのすぐ近くにある細胞の可逆性のポレーションを発生するのに十分な不均一な電界によって組織にパルスを加える能力を提供する少なくとも2つの間隔の開いた細長い電極とを備える。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織の細胞内に処置物質を送達するため生体内の前記組織をエレクトロポレーションする装置であって、

a. 互いに間隔を開け電氣的に絶縁され互いに平行に位置する、チューブの外面に露出した少なくとも2つの細長い電極を備え、体組織に穿通することができる細長い送達チューブと、

b. 前記電極を各々電気エネルギー源に接続することができる電気コンジットとを備え、

c. 前記チューブを患者の組織に挿入し前記エネルギー源によって通電する時、前記電極が、細胞による前記物質の取り込みを可能にするように前記組織への前記チューブの挿入によって形成された進路に沿ったその近くの細胞を可逆的にポレーションするのに十分な前記チューブを取り囲む処置範囲内の前記細胞に電界を発生することができることを特徴とする装置。

10

【請求項 2】

さらに伸長式または後退式の槽を備える、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記槽がシリンジを備える、請求項 2 に記載の装置。

【請求項 4】

前記槽が、0.0 ~ 0.5 ml、0.0 ~ 1 ml、0.0 ~ 3 ml、および 0.0 ~ 5 ml からなるグループから選択される可変容量を有する、請求項 3 に記載の装置。

20

【請求項 5】

前記電気エネルギー発生源がエレクトロポレーションパルス発生器である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記発生器が、平均電圧が 1 ~ 200 V の範囲内でもよい電気パルスを発生することができる、請求項 6 に記載の装置。

【請求項 7】

前記発生器が、1 ミリアンペア ~ 400 ミリアンペアの電流を有する電気パルスを発生することができる、請求項 5 に記載の装置。

30

【請求項 8】

前記電流が、10 ~ 40、25 ~ 100、50 ~ 150、125 ~ 200、175 ~ 250、225 ~ 300、250 ~ 300、および 300 ~ 400 からなるグループから選択される範囲内である、請求項 8 に記載の装置。

【請求項 9】

前記発生器が、1 ~ 10,000 Hz からなるグループから選択される周波数を有する電気パルスを生成することができる、請求項 6 に記載の装置。

【請求項 10】

前記発生器が、0.1 μ s ~ 1000 ms からなるグループから選択される時間の長さを有する電気パルスを生成することができる、請求項 6 に記載の装置。

40

【請求項 11】

前記チューブが、20 ゲージ、21 ゲージ、22 ゲージ、23 ゲージ、24 ゲージ、25 ゲージ、26 ゲージ、27 ゲージ、28 ゲージ、および 29 ゲージからなるグループから選択される注射針ゲージのサイズの皮下注射針である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 12】

前記チューブが各電極から電氣的に絶縁されている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 13】

前記組織が、皮膚、皮下組織、皮内組織、真皮下組織、骨格筋、横紋筋、平滑筋、器官、心臓、胸部、肺、膵臓、肝臓、脾臓および粘膜からなるグループから選択される何らかの種類の体組織または器官を備える、請求項 1 に記載の装置。

50

【請求項 14】

組織の細胞内に処置物質を送達する装置であって、

近端と末端とを有する細長い軸を各々備え、前記近端で1mmを越えない距離で互いに永続的な関係に固定された、体組織に穿通することができる少なくとも2つの平行な細長い電極を備え、前記装置がさらに、前記電極の長さにわたる各電極に接触する電氣的に不活性な材料、および前記電極の長さにわたる前記電極の間の電氣的に不活性でない材料からなるグループから選択される構成要素を有する装置。

【請求項 15】

治療上有用な成分によって生体内で細胞をエレクトロポレーションする方法であって、

a. チューブの少なくとも一部に沿って配置された少なくとも2つの細長い電極を備える、前記成分を注射するための前記チューブを提供するステップと、

b. 前記成分を収容する槽を提供するステップであって、前記槽と成分とが前記チューブを通る内腔と流通するステップと、

c. 前記チューブを患者の生体内の組織に挿入することによって前記患者の事前に選択された処置部位にチャンネルを形成するステップと、

d. 前記槽から前記内腔を通じて前記チャンネルを備える前記処置部位に前記成分を注射するステップと、

e. 各前記電極に、前記処置部位に細胞の可逆性のポレーションを発生させるのに十分な電気エネルギーの発生源を提供するステップと、

f. 前記電気エネルギーの発生源を起動して、電気パルスを提供し、前記成分を取り込ませるために前記細胞をエレクトロポレーションするステップとを備える方法。

【請求項 16】

前記成分が、薬剤、核酸、抗原、発現可能な抗原を符号化する核酸、発現可能な免疫変調分子を符号化する核酸の何れかを備える、請求項16に記載の方法。

【請求項 17】

前記免疫変調分子がサイトカインまたはケモカインである、請求項17に記載の方法。

【請求項 18】

前記免疫変調分子が、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、LIF、LT、TGF- β 、IFN、TNF- α 、BCGF、CD2、またはICAMからなるグループから選択される、請求項18に記載の方法。

【請求項 19】

前記細胞が、皮下細胞、皮内、真皮下細胞、骨格筋細胞、横紋筋細胞、平滑筋細胞、器官細胞、胸部組織細胞、膵臓細胞、脾臓細胞、心臓細胞、肝細胞および粘膜細胞からなるグループから選択される生きた患者の細胞を備える、請求項16に記載の方法。

【請求項 20】

前記電極が金および/またはチタンを備える、請求項16に記載の方法。

【請求項 21】

前記処置部位が、患者の大腿部、腕、または胸に位置する、請求項16に記載の方法。

【請求項 22】

前記成分が、0.01 μ l、50 μ l、100 μ l、150 μ l、200 μ l、250 μ l、300 μ l、400 μ l、および500 μ lからなるグループから選択される合計量だけ注射される、請求項16に記載の方法。

【請求項 23】

前記成分が、2ng/ml~3mg/mlからなるグループから選択される合計活性成分濃度で注射される、請求項16に記載の方法。

【請求項 24】

前記成分が、前記細胞を可逆的にポレーションするのに十分な前記エネルギー源を起動する前またはそれと同時に注射される、請求項16に記載の方法。

【請求項 25】

10

20

30

40

50

注射後の前記成分が、前記組織への前記チューブの挿入によって形成された前記チャネルの内部および周囲に存在する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記成分が前記処置部位の前記細胞にエレクトロポレーションされる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 27】

前記処置部位が、前記針によって形成され、1 mm、2 mm、3 mm、4 mm および 5 mm からなるグループから選択される距離だけ前記組織内の進路から半径方向外側に延びる、前記進路を取り囲む組織 / 細胞の範囲を備える、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 28】

前記電気エネルギー発生源がエレクトロポレーションパルス発生器である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 29】

前記発生器が、公称電圧が 1 ~ 200 V となるようなパルスを発生する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 30】

前記発生器が、1 ~ 400 ミリアンペアからなるグループから選択される定電流でパルスを発生する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 31】

前記定電流の範囲が、10 ~ 40、25 ~ 100、50 ~ 150、125 ~ 200、175 ~ 250、225 ~ 300、250 ~ 300、および 300 ~ 400 からなるグループから選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 32】

前記発生器が、1 ~ 10,000 Hz の範囲内から選択される周波数でパルスを発生する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 33】

前記発生器が、約 0.1 μ s ~ 1000 ms の時間の長さだけパルスを発生する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 34】

前記チューブが、20 ゲージ、21 ゲージ、22 ゲージ、23 ゲージ、24 ゲージ、25 ゲージ、26 ゲージ、27 ゲージ、28 ゲージ、および 29 ゲージからなるグループから選択される注射針ゲージのサイズである、請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体内の細胞、特に患者の組織の細胞のエレクトロポレーションに関する。さらに詳しく言うと、本発明は、細長い単針電極の所定の挿入進路部位、その近く、および / またはそれに隣接する細胞に分子を送達する新しい装置および方法に関する。またさらに詳しく言うと、本発明は、組織の表面から 3 ミリメートル ~ 3 cm の深さの組織への、針の進路に沿いかつその付近の細胞へのエレクトロポレーションによる物質の送達に関する、この組織は、非制限的に皮膚、横紋筋および平滑筋、粘膜、および器官を含む任意の組織を備えてよい。

【背景技術】

【0002】

以下の記載は、本発明を理解する上で有益となり得る情報を含む。このことは、何らかのこうした情報が本出願で特許請求される発明の先行技術または関連技術であること、または明確または暗黙的に参照される何らかの文献が先行技術であることを容認するものではない。

【0003】

通常組織に挿入する針電極として設計された 2 つ以上の電極のアレイといった様々な多

10

20

30

40

50

数電極設計を使用したエレクトロポレーションは、分子を表面下の前記組織に送達するために応用されてきた。一般に、こうしたアレイは、アレイの針電極の間にある処置範囲を画定する。したがって、こうした処置範囲は組織の3次元体積を備えており、そこでは、3次元体積内またはその近くにある細胞に、細胞隔膜の一時的または可逆性のポレーション、またさらに場合によっては不可逆性のポレーションを発生させるのに十分な強度の電界に処置範囲内の細胞がさらされる。

【0004】

現時点では、組織内の細胞のエレクトロポレーションの実施は、3次元処置範囲を通じて比較的均一な電界を付与するため大きな電圧の使用を含む。「比較的均一」とは、ポレーションを発生させるのに十分な電気パルスの印加に一致する電気力線が3次元処置範囲体積を通じてある程度均等に細胞全体にわたって付与されるという意味である。通常、組織に送達される1回の注射投与量は注射部位から急速に広がるので、最終的には、注射した薬剤と電界に遭遇する組織体積との間の十分な重なりを保証するため、大きな注射量および高い電界と結合した多数の電極針が必要になっている。高い電界と大きな電極アレイを使用することはいくつかの欠点を有する。例えば、多数の針と高い電界（電圧）の使用は苦痛を増大する一方、高い注射量の投与は管理困難で薬剤の浪費となる（薬剤の大部分は細胞に取り込まれず組織外に出てしまう）。また、こうした多数の針装置の使用は煩雑で、患者の立場から不安を生じる。

【0005】

多数の針を伴う装置は侵襲的な面がある他に、通常エレクトロポレーション技術は、上記で述べたように、処置範囲内の細胞の変化を生じる。1回の注射投与量の処置分子は周囲の組織に分散するので、エレクトロポレーションの施行によって処置範囲内の細胞に最終的に移入されるこうした処置分子の量に関する管理ができないという点で、これはエレクトロポレーションを医療用に使用する場合欠点となる。したがって、処置分子の「投与量」に対する管理を患者の組織内の特定の明確な送達部位に狭める、または洗練する装置および方法のためのエレクトロポレーション技術に対する必要が存在している。同様に、少ない侵襲でエレクトロポレーションし、皮膚、筋肉、粘膜および器官を含む様々な組織に治療物質を送達する際に利用される電界パルスから付与される苦痛を少なくすることができる方法論および装置に対する必要もまた、当業技術分野において存在している。

【特許文献1】米国特許出願第10/612,304号

【特許文献2】PCT国際特許出願第PCT/GB2003/002887号

【発明の開示】

【0006】

第1の実施形態では、本発明は、原位置の細胞、特に皮下、皮内、真皮内、および/または筋内（特に、骨格筋、横紋筋、および平滑筋、例えば心臓、筋肉）に位置する細胞のエレクトロポレーションを提供する。関連実施形態では、本発明は、細長い単針電極を組織に挿入することによって形成された進路の近くおよび/またはそれに隣接する細胞のエレクトロポレーションを提供する。例えば、本発明の装置を使用してエレクトロポレーションされる細胞は、新しい設計と、単針電極によって組織に付与される電界のパルスによって付与される一般に円筒形の処置範囲を備えるように、針進路から任意の方向に半径0.0~0.5mmの位置にある細胞である。

【0007】

第2の実施形態では、本発明は、単針の細長い電氣的に不活性な軸に関連して位置する少なくとも2つの対向する電極リード線（すなわち、少なくとも1つの陽極および少なくとも1つの陰極）を提供するが、この軸自体は電極と、電極間の0.05~1.5mmの間隔を埋める医療上許容可能なプラスチックまたはポリカーボネートといった電氣的に不活性な材料とを備えてもよく、また単に細長い対向する間隔の開いた電極を備えてもよい。どちらの実施形態でも、組織に穿通する単針電極または軸を含む電極は0.05mm~1.5mmの間隔の開いた寸法を有する。関連実施形態では、電極自体は、軸の穿通先端の近くといった、針の全長から針の一部分までの任意の場所で細長いシャフトに沿って露

10

20

30

40

50

出した長さを有してもよい。さらに、電極は、0.005～0.80mmの断面寸法を有してもよい。また別の構造配置の実施形態では、単針電極は、皮下注射針外部の長さの少なくとも一部に沿って間隔を開けた少なくとも2つの細長い電極を備える皮下注射針を備えてもよい。例えば、皮下注射針は、針の長さの一部に沿って通る少なくとも2つの電極（すなわち、陽極および陰極）を含んでもよい（図1A参照）。作業実施形態では、各電極は、反対の極の間に電界を発生する電気エネルギーの発生源に接続される。すなわち、一方の電極が陽極でもう一方の電極が陰極である。他の例では、多数の真っ直ぐで平行な電極を備える図3に開示したもの、また多数の電極が注射針の周囲に螺旋状をなす図2および図4に示すもののように、多数の電極を皮下注射針の外部に形成してもよい。またさらなる実施形態では、単針電極は、微細電気機械システム（MEMS）技術によるエッチングおよび成層を含む任意の数のよく理解された方法を使用して製造してもよい。こうした製造方法では、微細機械加工処理を使用して、正しい焼鈍、絶縁、および電気パルスおよび回路の導通にとって重要な物質を追加または剥離する。図13A、図13B、図13C、図13Dおよび図13Eは、電極が送達針軸上にエッチングされた実施形態の写真である。詳しく言うと、皮下注射針軸の上に形成した不活性物質（パリレン）の層の上に金の電極層をコーティングしている。細長い電極を製造する追加的な方法は、プラスチック、ポリエステル誘導体、またはポリ塩化ビニル（PVC）、または絶縁性炭素繊維といった絶縁性を有する電氣的に不活性な成分の軸の内部またはそれに沿って電極リード線を形成する押し出し成形技術を含む。図14Aおよび図14Bに示すように、例えば、中空の軸の対向する側面に沿ったもの、または図14Bに示すように螺旋状のもの、何れかのワイヤといった電極構成要素と共に、細長い中空の針を押し出し成形してもよい。またさらに、針軸は露出した電極のない部分を備えてもよい。例えば、針軸の一方の端部は、例えばシリンジのような流体の供給源に接続するためのコネクタを形成するハブに接続する。患者が知覚し得る電気刺激の感覚をさらに減らすため、軸のこうした部分の近くまたはそれに沿った絶縁を提供してもよい。本出願で説明した何らかのこうした電極構成に関するさらなる実施形態では、同時または任意の順序で、さらには、非制限的に、単極、双極、指数関数的減衰、またはそれらの何れかのパルス列の組み合わせを使用して、対になった任意の組み合わせの電極に通電してもよい。

10

20

30

40

50

【0008】

第3の実施形態では、本発明は、処置範囲内の細胞の可逆性のポレーションを発生する十分な電気エネルギーを提供するだけでなく、電気パルスを周囲の組織に印加する際被験者が経験する苦痛のレベルを低くする、比較的低電圧および/または低電流の使用を提供するが、この際前記印加は、一般に1～100V、典型的には2～50V、およびより好適には3～25Vの定格電界強度を使用する。関連する態様では、本発明の装置および方法が利用する電流は一般に1～400ミリアンペア、典型的には5～200ミリアンペア、およびより好適には20～100ミリアンペアを使用する。関連実施形態では、電流の選択は、電極の合計表面積に依存する。例えば、装置は、各電極の合計電極表面積に応じて、10～40、または25～100、または50～150、または125～200、または175～250、または225～300、または250～300、または300～400ミリアンペアの範囲を利用してよい。表面積が小さくなればなるほど、原位置の組織でエレクトロポレーション用の電界を達成するために必要な電流は低くなる。印加されるパルスは1～1000ミリ秒のものでよい。

【0009】

別の実施形態では、本発明は、好適には低い1回投与量（例えば、一般に1 μ l～1ml）での、様々な濃度（例えば、0.05 μ g～3mg/ml）の処置分子の送達を提供する。関連実施形態では、単針電極軸に関連する送達チューブを含む構造実施形態を使用すると、（針の挿入中に注入物質を送達する管理された注射のような）組織への注射直後の処置分子の量は、注射針進路の付近では驚くほど高いレベルに留まっている。処置分子は、例えば小分子、有機化合物のような治療薬、ならびに生物活性を有するかまたはエレクトロポレーションされた細胞内で一旦発現すると宿主に免疫反応を誘発するかの何れか

であるポリペプチドを符号化するタンパク質および核酸を含むものと考えられる。細胞内で一旦発現したポリペプチドは細胞の代謝機構および免疫系の経路と相互作用するために利用可能である。

【0010】

また別の実施形態では、組織にパルスを印加するために使用される電気エネルギーは、同様の組織のエレクトロポレーションのために従来使用されてきた先行技術の電界とは異なる独自の電界を提供する。詳しく言うと、先行技術の電界は意図的かつ本質的に、エレクトロポレーション技術で「均一な」電界と認識されているものを付与する。つまり、電極間の距離を広く離し、理想的には前記間隔を開けた電極の中央に目標処置範囲を配置することによって、印加される電気エネルギーは、公称電界強度と、生成される処置範囲全体にわたる比較的均一な電圧降下とを付与する十分な強度のものとなる。こうした電極アレイの設計は、組織にパルスを印加する時、主として一般に電気力線の付近の電極に接する範囲内の細胞を、3次元処置範囲に隣接しそれを取り囲んで位置するより小さな範囲でエレクトロポレーションする傾向がある。

10

【0011】

それと対照的に、本発明は、針軸の長さに沿って形成される一般に円筒形または柱状の「不均一な」領域を備える電界を使用して、細胞をポレーションする十分な強度の、電極のすぐ近くの位置の「外側」のエレクトロポレーション領域の対象となるべき中心に配置された電極に十分に近い範囲内にある前記細胞の処置範囲を形成する。こうした処置範囲は中心の針および電極の完全に外部にあってそれらを取り囲み、不均一な電界は、電極/針からの外向きの距離に比例して散逸する。一般に、単針電極からの距離が増大するにつれて電気エネルギーが散逸するのは、エネルギー、ここでは細胞を可逆的にポレーションするのに十分なエネルギー、が指数関数的な割合で散逸するのと同様と考えられる。しかし、こうした散逸率は、本発明の装置の機能または物質を画定された範囲内の細胞に送達する意図された結果に否定的な影響を与えない。すなわち、細胞のポレーションを発生するのに必要な電気エネルギーは電界発生源からの距離と共に散逸するので、エレクトロポレーションの影響を受けやすい針進路の周囲の範囲はそれ自体、針進路の長さに関連する中心に、かつ横方向には電極に付与されるパルスエネルギーに応じて変化する半径の一般に円筒形の処置範囲を形成するある半径に限定されている。さらなる関連実施形態では、パルスを印加するために使用するエネルギーが大きいほど、電極に直接接触する細胞を損傷する可能性は大きくなる。本発明のまたさらなる目的は、免疫系をさらに刺激する目的で、こうした損傷を発生させる能力を利用することである。すなわち、処置部位の周囲で免疫反応を生じるための刺激を提供するように、少しではなく多くのエネルギーを意図的に付与する処置方式を使用してもよい。

20

30

【0012】

他の実施形態では、疾病の治療、または宿主の免疫反応の調節、および/または病原菌およびウイルスおよび癌によって発生する疾患を含むがそれらに制限されない様々な疾患の治療のため薬剤、生物活性を有する天然ポリペプチドおよび処置範囲内の細胞に原位置で発現し得るポリペプチドを符号化する遺伝子を送達するために、本発明の装置を使用してもよい。

40

【0013】

本発明の他の特徴および利点は、以下の図面、詳細な説明、および添付の請求項から明らかになるだろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

第1の実施形態では、本発明は、原位置の生物組織または器官に挿入しそれを通じて流体媒体を送達することができる材料から形成され(すなわち、送達針軸)、前記軸がさらに、前記軸の外面上で少なくとも部分的に露出した少なくとも2つの電極を備え、前記電極が互いに間隔を開け前記針軸に沿って互いに平行に位置する中空の軸を備える、生体内組織のエレクトロポレーションのための装置を備える。電極に関する実施形態は様々な電

50

極の構造設計を利用してよい。例えば、陽極および陰極は、図1および図3に開示するように互いに平行に送達針の長さにならって通るか、または図2および図2に示すように互いに平行だが針軸の周囲で螺旋状をなす送達針に関連して配置してもよい。また、本発明の装置は、前記針を患者の組織に挿入する時、前記電極に個別に通電することができ、前記針を前記組織に挿入することによって形成された進路沿いおよびその近くの細胞に、可逆性のポレーションを生じ処置分子が前記細胞に入るようにする、前記電極を各々電気エネルギー源に接続する電気コンジットを含む。

【0015】

流体送達針を含むこうした電極の製造は、一般にMEM技術として理解される微細機械加工を含む任意の数の周知の方法によって実行してもよい。例えば、標準皮下注射針（20ゲージ、21ゲージ、22ゲージ、23ゲージ、24ゲージ、25ゲージ、26ゲージ、27ゲージ、28ゲージおよび29ゲージといった任意のゲージのものでよい）に電氣的に不活性な材料をコーティングし、その後金のような導電性材料を蒸着し、その後針の表面上の望ましい方向に導電性材料をエッチングにより除去してもよい。詳しく言うと、一般にこの処理は、例えば、パリレンのような表面に均一に付着する特性を有するポリマーといった不活性物質を蒸着する準備として皮下注射針軸を清掃するステップを備える。金属軸の剥離に続いて、真空蒸着によるなどしてパリレンを針に蒸着する。これをレーザーを使用してパターン化し、その後金のような導電性材料を蒸着し、その後金を選択的に除去して針軸上の所定のパターンの電極を形成する。本発明では、MEM技術を使用することによって、ミニチュアスケールで、3次元の針およびコーティングおよびエッチングを操作する能力を提供する。単針電極の製造が可能であることは、図13A～図13Eの写真によって証明されている。製造は押し出し成形技術によって実行してもよい。図14A～図14Cに示すように、この態様では、電極202および203（図14A）は、細いワイヤフィラメントとして、ポリ塩化ビニル等といった電氣的に不活性な物質と共に直線的に押し出し成形されている。針204の先端は穿通先端となるように機械加工または切断され、もう一方の端部は、電極リード線201aおよび201bと、流体媒体の供給源に取り付けるための取り付け具205とを備えるハブ200に嵌合している。図14Bは、螺旋状の電極および電極リード線210および211と共に押し出し成形した針を備える構造実施形態の例を示す。

【0016】

第2の実施形態では、本発明は、生体内細胞に分子を送達するための方法であって、前記細胞を含む患者の組織に注射針を提供するステップであって、注射針が、針軸に沿って配置した少なくとも2つの細長い電極（すなわち、陰極および陽極）と、槽と分子が前記針軸を貫通する内腔と流通する前記分子を含む少なくとも1つの槽とを備えるステップと、分子を前記組織に注射するステップと、電気エネルギーによって電極に通電し、注射部位および針進路に近接した細胞に可逆性のポレーションが生じ、前記分子を取り込むため前記細胞をエレクトロポレーションする電気パルスを提供するステップとを備える方法を備える。

【0017】

第3の実施形態では、装置は、厳密に画定した位置にある細胞、特に本発明の針によって形成された進路沿いまたはその近くの細胞のエレクトロポレーションを提供する。一般に、処置部位内にあると考えられる細胞は、針進路の周囲の半径が約5mm以内、より典型的には約3mm以内、さらに典型的には約2mm以内、もっとも特定的には約1mm以内にある細胞である。関連実施形態では、前記処置部位内の細胞のエレクトロポレーションのために十分な電界の生成は、電極からある距離を越えた組織までパルスエネルギーが届かないことによって処置部位が画定されるように、中心注射針から外向きに弱まる電界である。

【0018】

さらなる関連実施形態では、本発明は、組織内のごく局在化した1組の細胞のエレクトロポレーションを原位置で実行するための（注射針と電極とを備える）単針の細長いプロ

10

20

30

40

50

ープの新しい使用法を必要とする。

【0019】

別の実施形態では、本発明の装置は、様々な電気パルス条件のうち任意のものと共に使用してもよい。例えば、電極は、1～400ミリアンペア、典型的には5～200ミリアンペア、より好適には20～100ミリアンペアの範囲内の定電流によって帯電させてもよい。別の例では、電極は、1～100ボルトの電圧パルスによって帯電させてもよい。さらに、電気パルスは単極性または複極性何れかのパルスでもよく、前記パルスは、設定電圧降下、可変成形パルス列、定電流を利用するパルスといった様々な特性を有する単一、二重または多重パルスシーケンスでもよい。

【0020】

他の実施形態では、本装置および本方法は、患者の組織、特に皮下、皮内および真皮下の空間ならびに哺乳類身体の骨格筋、横紋筋の区画、および心臓、肺、膵臓、脾臓、肝臓、および消化管器官を含む器官に存在する細胞への、薬剤、タンパク質、DNAおよびRNAを含む核酸、および当業者に周知のそれらの合成変種の送達または移入を提供する。選択された材料を移入されると、細胞は薬品またはタンパク質または核酸の活動に直接影響される。核酸が移入される場合、通常こうした核酸は、処置部位の細胞内で発現可能なタンパク質符号化のために利用される。さらに、物質は、サイトカイン、ケモカイン、および、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、LIF、LT、TGF-、IFN、TNF-、BCGF、CD2、またはICAMからなるグループから選択した免疫変調分子といった活性分子を含む免疫関連生物活性分子を備えてもよい。

【0021】

別の実施形態では、細胞に送達すべき材料は、0.01ml～1mlの量の液体の形態で送達してもよい。1つの実施形態では、ポリペプチドを符号化する核酸は、0.9%塩化ナトリウム(NaCl)中に溶解してもよい。しかし、厳密にその溶媒が何かということは本発明にとって重要ではない。例えば、スクロースのような他の溶媒が骨格筋における核酸の取り込みを向上できることは当業技術分野で周知である。関連実施形態では、針の長さ(針軸の長さは針を通じて移送される物体の量を決定するので)と、針を通じて針進路内および周囲の組織に前記物質を搾出するために利用可能な空間の量を決定するように形成された針進路とに関連して、送達すべき量を調整してもよい。例えば、皮膚層組織に物質を送達して0.01ml～0.05mlの範囲内の量を注射するには2mm長の針を使用してもよいが、0.1ml～0.15mlの範囲内の量を注射するには5mm長の針を使用してもよく、0.3ml～0.5mlの範囲内の量を注射するには1.5～2cm長の針を使用してもよい。

【0022】

また、様々な有益な理由から、他の物質を当該分子と共に同時移入してもよい。例えば、分子P199(リー(Lee)他、PNAS, 4524-8, 10, 89(1992))は、電気透過性隔膜を封止することが知られており、移入された筋肉繊維の生存率を向上することによって移入効率に有益な影響を与え得るものである。

【0023】

図6を参照すると、皮下注射針を保持する電極を、望ましい穿通深さまで患者の組織に挿入する。取り付けられたシリンジのプランジャを作動させ、注射するために選択した材料を含むある量の液体を注射し、その直後、または代替的には材料の注射と同時に、処置範囲内の細胞の少なくとも一部に可逆性のポレーションを生じるのに十分な電気エネルギーの少なくとも1つのパルスを電極に印加する。シリンジプランジャは通常、手の使用といった作動手段を使用して作動するが、図9に開示するもの、またさらには、その全体を引用によって本出願の記載に援用する、2003年7月3日出願の米国特許出願第10/612,304号に開示されたもののような保持装置にシリンジを固定してもよい。

【0024】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、本発明は体組織の表面から様々の深さへの細胞のエレクトロポレーションに適用してもよい。例えば、組織の表面から約90度の方向の組織への材料の注射によって物質の送達が始まる、筋肉組織区画内に存在する細胞のエレクトロポレーションの他に、1つの実施形態では、本発明の装置を使用して、皮膚の皮下、皮内および真皮下の空間内の細胞をエレクトロポレーションしてもよい。また、本発明の装置を使用して、心臓および血管組織といった他の器官のリンパ節、または組織層に物質をエレクトロポレーションしてもよい。こうした局所の何れかの細胞のエレクトロポレーションに関しては、こうした組織層内の細胞をエレクトロポレーションするための装置の使用は、組織表面に約90度の角度で注射およびエレクトロポレーションするため組織層（すなわち、皮膚、真皮下等）の外部に穿通するのに十分な長さを有する短い針の使用を含んでもよく、また、送達針が3～4cmと比較的長い場合、単一針の挿入は、図9Aに示すように保持装置を使用して表面組織に対して鋭角をなして行ってもよい。これは、望ましい層内の組織のより大きな部分のエレクトロポレーションを可能にする。さらに、鋭角の挿入は、組織表面から3～25度の角度をなしてもよい。こうした組織表面は一般に、単針/電極を挿入するための部位を包含する平面を形成する平坦な表面範囲を形成するものとして記述してもよい。図9A～図9Dに示すように、組織への針の所定の望ましい挿入深さに基づいて決定した組織への設定距離Xに針を配置して、平面の案内皿100の上に設定角度でシリンジを保持するように設計した取り付け手段にシリンジを接続してもよい。針が所定の鋭角で組織に挿入されるように、針を露出させた案内皿を組織表面に接触させる。針をそのように挿入し処置物質をシリンジから排出した後、電極に通電して、皮下、皮内または真皮下の細胞への注射した材料の送達をもたらしてもよい。上記で論じたような斜めの角度での装置の使用は、器官組織の様々な層のエレクトロポレーションに適用してもよい。

【0025】

〔例〕

以下の例は、本発明によってなされた様々な実施形態を例示するために与えられる。以下の例は本発明によって用意可能な多くの種類の実施形態を包括または網羅するものではないことを理解されたい。

【0026】

〔例1〕

ここで本発明の様々な態様を参照すると、装置は、例えば（図5）に示すように、分子送達槽20および電極針10という構成要素を備えてもよい。追加実施形態は、シャープスカパー11、（シリンジ針の貫通によるなどして）槽を充填する際使用する槽20を備える構造の一部を封止する弾性隔膜12と、シャープスカパー11を開/後退（図5C）または閉/被覆（図5Aおよび図5B）の何れかの半固定位置に保持するための槽20の収容構造内のディンプル13ならびにくぼみ14および14'といった機構とを含む。さらなる実施形態は、例えばディンプル15ならびにくぼみ16および16'といった、プランジャ9を半固定の開/後退または閉/排出位置に保持するための機構を含む。シャープスカパー11およびプランジャ9の半固定位置決めを提供するために利用される方法に関わらず、こうした位置は、手の力といった作動エネルギー、または電動アクチュエータといった機械的エネルギーの何れかによって容易に変更してよいことは当業者に明らかであろう。シャープスカパー11の末端は着脱式に取り付けられた無菌カバー60を含んでもよい。電極針10はさらに、内部を通り、組織穿刺先端22と、槽20に接続するオリフィス25とを端部とする内腔を備えてもよい（図1参照）。注射針10は標準皮下注射針ゲージサイズが18～29ゲージのものでよい。好適実施形態では、送達針は図1の電極21aおよび21bのような少なくとも1対の電極を備える。電極は、電極リード線24aおよび24bと電気的に連絡する少なくとも1つの陽極と1つの陰極とを備える。本発明の何らかの特定の製品のために選択された設計に応じて、リード線はリード端子23を終端としてもよく（例えば、図3および図4参照）、また何らかの手段によって、電極からパルス発生器のような電気エネルギーの発生源に至るリード線に接続してもよい。針

構成要素 10 はさらに、針構成要素 10 を皮下注射シリンジポートに脱着式に固定する固定機構によって皮下注射シリンジ槽、またはシリンジ槽に取り付けるためのコネクタ 26 (図 3 および図 4) を含んでもよい。

【0027】

さらなる実施形態では、槽 20 は特定の症状を処置する所定の物質によって製造してもよい。代替的には、プランジャ 9 を引き抜いて当該物質を電極針 10 を通じて槽の中に引き込むことによって槽に物質を充填してもよく、また、好適には、薬剤を無菌バイアルからシリンジに取り出してそれをべつの槽に導入する際一般的に実行される手順と同様に、まずプランジャを開位置まで後退させて槽からプランジャを取り出し、次に弾性シール 12 を介して槽に薬剤を注射して物質を槽に供給してもよい。

10

【0028】

(それぞれ図 1 ~ 図 4 の、電極 21a および 21b、31a および 31b、51a および 51b、52a および 52b、または 41 および 42 といった) 電極のアレイを備えた送達針 10 は、普通組織表面に対して約 90 度、また代替的には組織表面に対して鋭角で組織に挿入してもよく、物質を針進路および局所組織に注射してもよい。電極は前記物質の注射の後パルス発生器を使用して通電してもよく、また前記物質の注射と同時に通電してもよい。図 6 に示すように、電気パルスによって通電する場合、電極は、電界 20 内の細胞に可逆性のポレーションを生じる十分なエネルギーを提供する前記電界の生成をサポートする。生成される電界は、針進路 80 (図 7) からの距離に応じて指数関数的に減少するという点で不均一である。したがって、こうした電界を提供する十分な電界は、利用されるエネルギーに応じて、針進路長さに対して画定された 3 次元体積を形成する対称横方向寸法 (a) x (b) (図 7 に示す) を有する。一般に、ポレーションを生じる十分な電界は、電極針 10 から、0 ~ 5 mm、典型的には 0 ~ 4 mm、好適には 0 ~ 3 mm、もっとも好適には 0 ~ 2 mm の半径を有する。

20

【0029】

エレクトロポレーション技術の当業者が容易に理解するように、本発明の単針電極が生成する電界は、先行技術のエレクトロポレーション装置と異なって、電界強度が針の近くで大きく、電極から外側で測定するほど減衰する不均一な電界である。この電極配置と対照的に、図 8 は、大きな体積の処置部位全体にわたる均一な電界を利用する先行技術の電極配置を示す。本発明は、「均一な」電界を利用する必要性を示唆した以前の概念とは大きく異なっている。ここでは、本発明は、送達針、すなわち針進路の位置の近くでより大きな量の細胞の可逆性のポレーションを提供する不均一な電界を利用する。このため、既知の投与量を受け取る細胞の正確な位置が決定できるという明白な利益が得られる。したがって、本発明はその実施形態を通じて、従来均一な電界と電極の外側配列を使用するエレクトロポレーションシステムによって得られる変動する分布と反対に、材料をより均一に細胞に分配し局所組織範囲に限定するように電界を注射部位に「適合」させる。

30

【0030】

電極一般に関しては、電極は任意の金属を備えてもよいが、好適にはエレクトロポレーションされる組織の細胞に入る金属イオンによる毒性を示さない金属である。こうした材料は金、タングステン、窒化チタン、プラチナ、プラチナイリジウム、および酸化イリジウムを含む。電極材料は、図 3B に示唆するように電極と送達チューブとの間に絶縁層が存在するように送達チューブ(すなわち、注射針)の上に形成してもよい。代替的には、針は、電極を注射チューブから特に絶縁する必要のないそれ自体非導電性の材料を備えてもよい。この態様では、送達チューブは、セラミック、またはポリ塩化ビニル等を含む硬化生体適合性プラスチックを含む非導電性の、原位置で組織に挿入するための何らかの適切な材料から構成してもよい。

40

【0031】

さらなる実施形態では、送達針 / 電極構成要素は、電極 90 または 101 (図 10) が、図 9A および図 10A および図 10B に示すように針の先端の近くでだけエレクトロポレーションのために露出するように設計してもよい。電極の露出しない部分 91 および 1

50

02は絶縁され、送達針の外部または内部に沿って針まで通るものでもよい。詳しく言うと、(電極アレイによって組織に付与されるエレクトロポレーション電界の寸法によって画定される)画定処置体積を特定の組織に位置決めすることが望ましい場合、他の組織のエレクトロポレーションを回避する目的で、図10に開示するような電極を使用して、例えば、深い筋肉組織をエレクトロポレーションして脂肪細胞層のような組織表面の近くにある他の組織を回避するか、また代替的には、例えば、図9Aに示唆するように、真皮下組織といった、表面近くの組織をエレクトロポレーションしてもよい。こうした実施形態は、処置体積の配置およびサイズに対する追加の管理を提供する。

【0032】

〔例2〕

この例では、本発明の単針皮下注射針電極を組織に挿入することによって形成された進路沿いおよびその近くに位置する細胞の可逆性のポレーションによる分子の送達についての結果を示す。

【0033】

図11Aおよび図11Bに示すように、1回投与量0.2ml、濃度1mg/mlのベータガラクトシダーゼを符号化するDNAをウサギの大腿四頭筋に注射した。250ミリアンペア、持続期間20ミリ秒の2パルスを使用して電極にパルスを印加した。エレクトロポレーションの後、ベータガラクトシダーゼ遺伝子はエレクトロポレーションによって影響された細胞内に発現した。エレクトロポレーションの4日後、ウサギを殺し、単針/電極を挿入した部位を通じて筋肉を厚さ3mmの切片とした。化学的固定の後、筋肉切片中のベータガラクトシダーゼを発現した細胞を酵素反応によって視覚化した。図11Aの矢印は、ウサギの筋肉への送達チューブの挿入方向を示す。図示するように、染色は主として、針送達電極の組織への挿入によって形成された進路に沿って発生している。

【0034】

〔例3〕

この例は、本発明の実施形態に係るエレクトロポレーション装置を利用して、緑色蛍光タンパク質(GFP)を符号化するDNAをウサギの大腿四頭筋に送達する実験を記述するものであって、その結果を図12に示す。

【0035】

ここでは、各体重4~5kgの数頭の雄のニュージーランド白ウサギ(ペリー・サイエンティフィック社(Perry Scientific)、カリフォルニア州サンディエゴ)に各々、透明GFP(チェン(Cheng)他(1996)、ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotechnology)、第14巻、606~9)を符号化する発現ベクター(gWizGFP、ロット番号12311、アルデヴロン社(Aldevron, LLC)、ノースダコタ州ファーゴから購入、またジーン・セラピー・システムズ社(Gene Therapy Systems, Inc.)、カリフォルニア州サンディエゴ、も参照)を注射し、その発現は改質ヒトサイトメガロウイルス最初期プロモーター/エンハンサーの制御下にあった。

【0036】

注射の前に、ウサギは各々、ケタミン/キシラジンによる処置の結果心拍が不均一になるのを防止するためグリコピロレート(0.01mg/kg)を事前に皮下投与した上で、まず鎮静剤アセプロマジン(1mg/kg)を投与し、ケタミン(35mg/kg)およびキシラジン(5mg/kg)の混合物を筋内注射して麻酔した。そしてウサギの注射を行う部位、すなわち大腿四頭筋を剃毛した。まず18ゲージの針を挿入して筋肉を覆う皮膚に穴を開け、解剖刀を使用して穴をわずかに拡大した。(図1に示すように)針の外面に互いに対向する2つの平行な電極を付着させた18ゲージの針から製作した単針エレクトロポレーション装置を、周期的に挿入を中止してDNAを注入しながら、約25mmの最終挿入深さまで数ミリメートルずつ筋肉組織にゆっくり挿入した。100μgのgWizGFPを含む合計500μlのDNA含有溶液を各注射部位に注射した。注射完了直後に、針/電極装置を最終挿入深さに挿入したまま、エレクトロポレーションを開始した

10

20

30

40

50

。詳しく言うと、E l g e n 1 0 0 0 (イノヴィオAS社 (I n o v i o A S)、ノルウェー、オスロ)の電流固定パルスを使用して、10 Hz 間隔 (すなわち、100 ms) で持続期間が各20ミリ秒 (ms) の250 mAのパルスを5回エレクトロポレーション針に印加した。

【0037】

処置の4日後動物を人為的に安楽死させた。ベクターを送達した足の範囲を覆う皮膚を注意深く除去し、その後各動物を約1時間 - 20 の温度に置いた。そして、解剖刀を使用して処置した筋肉を除去し、さらに1~2時間 - 20 の温度に置いた。そして、回転肉スライサーを使用して、冷凍した筋肉組織を厚さ約3 mmの切片に切断した。筋肉切片をプラスチック皿に配置し、紫外光とGFPフィルタを組み合わせたものに取り付けたライカ (L e i c a) M Z 1 2 解剖顕微鏡を使用してGFP発現を試験した。図12は、この分析によって得られた結果を表す写真であり、本発明に係るエレクトロポレーション装置を使用して、薬剤、例えば活性形態で発現する望ましいタンパク質を符号化する発現ベクターを細胞に成功裏に送達できることを明瞭に示している。

10

【0038】

〔例4〕

図15および図16にデータを示すこの例では、本発明の電極構成を使用して、S E A P (p S E A P # 3 3 4 8、アルデヴロン社)およびI g G (p L N O H 2 h g 3 # 1 1 7 6 5、アルデヴロン社)を符号化するプラスミドを実験動物組織にエレクトロポレーション (すなわち、動物の前脛骨筋への筋内注射) し、発現を監視して、ウサギの筋肉における発現の成功を証明すると共に、「弱」および「強」両方 (それぞれS E A PおよびI g G) の抗原に対する免疫反応を測定した。こうした実験ではS E A PおよびI g G プラスミドは1 μ g / μ lの最終濃度で投与した。

20

【0039】

使用した動物は3.5~4.5 kgの雄のニュージーランド白ウサギであった。E l g e n 1 0 0 0 (イノヴィオAS社、ノルウェー、オスロ、シリアルナンバー009)を使用してエレクトロポレーションを実行したが、このE l g e n 1 0 0 0はさらに、電流固定パルス発生器 (試作品)と、電極が注射進路と平行に約1 mm間隔で通る単針の試作品とを備えるものであった。パルス間隔250ミリ秒 (すなわち約4 Hzの周波数) で各150 mA、パルス長さ20ミリ秒のパルスを5回電極に印加した。電極は約1.0 cmの深さまで組織内に延びていた。

30

【0040】

実験は各々2段階の送達処理、すなわち、針を挿入しながら注射することで29ゲージのインスリンシリンジを使用してプラスミド溶液 (200 μ l) を注射しDNAを様々な深さに分散させる処理と、その後注射器針を除去し単針電極を挿入する処理とを備えるものであった。

【0041】

以下の表Iに示すように、I g GおよびS E A Pの各実験は、2つのグループの実験動物を有する。すなわち、1組の動物はエレクトロポレーションを受け、別の1組は受けていない (対照)。

40

【0042】

【表 1】

グループ No.	電流	処置
1	150~250 mA	100 μ l \times 2 SEAP 1mg/ml、100 μ l \times 2 左脛骨筋、1gG 1mg/ml 100 μ l \times 2 右脛骨筋
2	エレクトロポレーションなし	100 μ l \times 2 SEAP 1mg/ml、100 μ l \times 2 左脛骨筋、1gG 1mg/ml 100 μ l \times 2 右脛骨筋

10

【0043】

0日目、14日目および21日目に試料を採取した。そして、21日目に、ハイブノーム0.5ml (ハイブノーム0.1ml/kg) を皮下注射し、それに続いて耳の静脈に1ml/kgの10%ペントバルビタールを静脈内注射してウサギを殺した。

20

【0044】

図15および図16の結果から明らかなように、単針送達から惹起される抗体力価は負の対照をはるかに越えている。詳しく言うと、2つの試験抗原(IgGおよびSEAP)を互いに比較すると、予想通りIgGの方がSEAPよりはるかに強い力価を惹起している(力価の目盛り参照)。どちらの抗原もエレクトロポレーションした試料では抗体の生成を惹起したが、エレクトロポレーションしない試料ではほぼ抗体を生成していない。

【0045】

〔実験5〕

この実験では、試作品のMEMで製造した単針電極を、様々なパルスエネルギーと緑色蛍光タンパク質発現を使用してウサギの組織で試験した。表IIに示すように、(1)MEM技術によって、各針の周囲の1/16に、針の全長にわたって陽極と陰極を23ゲージの針に適用した単針電極(図13D~図13E)、(2)電極が各針軸の周囲の1/4である単針電極(図13A~図13C)、および(3)流体媒体送達チューブのない、電極が1mm間隔の単針配置、という3つの異なる電極実施形態を試験した。表IIに示すように、パルスの様々な組み合わせを実行した。

30

【0046】

この実験で各動物について使用されるプロトコルは、記載の濃度でGFPプラスミドを注射し、単針電極の実施形態を使用して組織をエレクトロポレーションし、その後動物を殺して処置した筋肉を切断することによって組織の準備を実行し、隣接する切片の蛍光を観察することを含むものであった。一般に、注射進路と平行に切片を取り出せるように切片を切断することは難しいため、図面の写真のGFP蛍光は円形または楕円形を呈することが多い。こうした蛍光パターンは、単針概念が機能的であり、組織のエレクトロポレーションのため、非常に低い電圧とそれに比例した電流を、組織内の針進路の周囲の画定された位置に提供する。

40

【0047】

【表 2】

電極の設計	組織部位	定電流	電圧 (平均V)	パルス数	pGFP DNA 濃度/量
軸周囲の1/4の電極	大腿四頭筋	0.0	0.0	0.0	0.2mg/ml
	大腿四頭筋	50mA	8	2	0.2mg/ml
軸周囲の1/16の電極	大腿四頭筋	100mA	18	2	0.2mg/ml
	大腿四頭筋	50mA	11	2	0.2mg/ml
軸周囲の1/4の電極	大腿四頭筋	100mA	15	2	0.2mg/ml
	大腿四頭筋	150mA	20	2	0.2mg/ml
	大腿四頭筋	250mA	33	2	0.2mg/ml
	脛骨筋	75mA	13	2	1.0mg/ml
1mm間隔の電極。 流体送達実施形態なし	脛骨筋	150mA	18	2	1.0mg/ml
	脛骨筋	250mA	28	2	1.0mg/ml
	大腿四頭筋	150-200	20	2	1.0mg/ml
	大腿四頭筋	200-500	40	2	1.0mg/ml
	大腿四頭筋	600-1000mA	50	2	1.0mg/ml

10

20

30

40

【0048】

図17Aおよび図17Bはどちらも、エレクトロポレーションなしでGFPを符号化するプラスミドDNAの注射後のGFP発現の、それぞれ自然光および蛍光の写真を示す。図示するように、緑色蛍光タンパク質の発現はほぼ存在しない。すなわち、エレクトロポレーションなしでは望ましい遺伝子の十分な取り込みと発現は得られないことは明らかである。

【0049】

50

1 / 16 幅電極モデルを使用した原位置でのエレクトロポレーションについて、エレクトロポレーションした G F P を発現する能力を図 18 A および図 18 B、ならびに図 19 A および図 19 B に示す。図 18 A および図 18 B は、50 mA の定電流によるエレクトロポレーションの G F P 発現結果を示し、図 19 A および図 19 B は 100 mA でのエレクトロポレーションを示す。

【0050】

1 / 4 周囲の単針電極を使用した G F P 発現について、それぞれ 50、100、および 150 mA でエレクトロポレーションを実行した結果を、図 20 A および図 20 B、図 21 A および図 21 B、ならびに図 22 A および図 22 B に提供する。

【0051】

また、単針電極が電極に関連する流体送達チューブを備えない実施形態を使用して、G F P 発現を試験した。図 23 A および図 23 B、図 24 A および図 24 B、ならびに図 25 A および図 25 B に示すように、本発明の装置の実施形態を、各々 75、150、および 250 mA の定電流で試験した。ここでは、G F P プラスミドの量は図 19 A ~ 図 22 B に示す実験の濃度の 5 倍であった。したがって、処置範囲はより明瞭に現れている。

【0052】

本出願で開示され特許請求される全ての構成および方法は、本開示に照らして過度の実験なしに製作し実行することができる。本発明の構成および方法を好適実施形態の観点から説明したが、本発明の精神および範囲から離れることなく本出願に記載の構成および方法および方法のステップまたはステップの順序に変更を加えてよいことは当業者に明らかであろう。さらに詳しく言うと、説明した実施形態は全ての態様で例示的なものに過ぎず制限的なものではないと考えるべきである。当業者に明らかな全ての同様の置換および修正は、添付の請求項が定義する本発明の精神および範囲の中にあるものと考えられる。

【0053】

本明細書中で言及した全ての特許、特許出願、および公報は、本発明に関連する技術の当業者の水準を示すものである。優先権または別の利益を主張する対象となるものを含む全ての特許、特許出願、および公報は、個々の公報が明確かつ個別に引用に寄って本出願の記載に援用されるものと明記されたのと同程度に、引用によって本出願の記載に援用する。

【0054】

本出願で例示的に説明した発明は適切には、本出願で特に開示していない要素なしに実施可能である。すなわち、例えば、本出願の各場合において、「~を備える」、「本質的に~からなる」、および「~からなる」といった用語の何れも、他の 2 つの用語の何れかによって置き換えてもよい。利用した用語および表現は、制限ではなく説明のために使用しているのであって、こうした用語および表現を使用することで図示および記載した特徴の何らかの同等物を全体または部分的に除外しようという意図はなく、特許請求される本発明の範囲内で様々な修正が可能であることが認識される。すなわち、好適実施形態および必要に応じて追加される特徴によって本発明を詳細に開示したが、本出願で開示した概念の修正および変形は当業者にゆだねてよく、こうした修正および変形は、添付の請求項によって定義される本発明の範囲内にあるものと考えられることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図 1】 内部に細長い電極を一体化した皮下注射針を示す図である。針は、内部を貫通する内腔から液剤を計量分配するポートと、流体保持槽に接続したポートとを特徴とする。

【図 2】 陽極と陰極とが針の周囲に螺旋状に形成された平面を通じて互いに平行になっている、本発明の装置の代替実施形態を示す。

【図 3 A】 図 3 A は、送達針が、送達針の長さに沿って直線状かつ平行に通る多数の陽極および陰極を備える別の代替実施形態である。また図示するように、この図は電極を電気エネルギーの発生源に接続するためのコネクタの例を含む。

【図 3 B】 図 3 B は、線 A - A に沿って見た本発明の電極の 1 つの例の断面図を示す。図

10

20

30

40

50

示するように、1つの構成では、電極は、送達チューブおよび内腔の外部で製造技術における当業者に周知の任意の数の技術によって層状に重ねてもよい。図面には、内腔54が絶縁材料55に取り囲まれその上に電極が層をなす内部の針53が示されている。

【図4】送達針の周囲に螺旋状に形成された電極を備える実施形態の別の例である。螺旋状に形成された電極は多数の陽極および陰極の対を備えてもよいが、通常は1対または2対の電極を備え、各対は陽極および陰極を備える。

【図5A】通常シリンジ型の槽である槽と、針が患者の組織に挿入されると後退することのできるシャープスカパーとを含むさらなる実施形態を備える本発明の電極を示す、本発明の1つの実施形態を示す。また、本図は、針等によって貫通され槽を充填する弾性隔膜と、シャープスカパーおよびシリンジプランジャを後退位置または伸長位置の何れかに保持する機構といった、本発明の範囲内で実施可能な他の特徴を示す。さらに、後退式のシャープスカパーも針ガイドとして機能し、止めと嵌合して深さガイドとして機能することができる。図示しないが、特許文献1および特許文献2に記載のように、単針電極はシリンジに嵌合し、自動針送達/同時流体送達エレクトロポレーション装置に取り付けてもよい。こうした実施形態では、装置は1つの針と1つのシリンジだけを有することになる。

10

【図5B】通常シリンジ型の槽である槽と、針が患者の組織に挿入されると後退することのできるシャープスカパーとを含むさらなる実施形態を備える本発明の電極を示す、本発明の1つの実施形態を示す。また、本図は、針等によって貫通され槽を充填する弾性隔膜と、シャープスカパーおよびシリンジプランジャを後退位置または伸長位置の何れかに保持する機構といった、本発明の範囲内で実施可能な他の特徴を示す。さらに、後退式のシャープスカパーも針ガイドとして機能し、止めと嵌合して深さガイドとして機能することができる。図示しないが、特許文献1および特許文献2に記載のように、単針電極はシリンジに嵌合し、自動針送達/同時流体送達エレクトロポレーション装置に取り付けてもよい。こうした実施形態では、装置は1つの針と1つのシリンジだけを有することになる。

20

【図5C】通常シリンジ型の槽である槽と、針が患者の組織に挿入されると後退することのできるシャープスカパーとを含むさらなる実施形態を備える本発明の電極を示す、本発明の1つの実施形態を示す。また、本図は、針等によって貫通され槽を充填する弾性隔膜と、シャープスカパーおよびシリンジプランジャを後退位置または伸長位置の何れかに保持する機構といった、本発明の範囲内で実施可能な他の特徴を示す。さらに、後退式のシャープスカパーも針ガイドとして機能し、止めと嵌合して深さガイドとして機能することができる。図示しないが、特許文献1および特許文献2に記載のように、単針電極はシリンジに嵌合し、自動針送達/同時流体送達エレクトロポレーション装置に取り付けてもよい。こうした実施形態では、装置は1つの針と1つのシリンジだけを有することになる。

30

【図6】挿入中または電極/送達針が組織に挿入された後、流体材料が投与され、針の進路から組織内への外向きの電界を付与するように電極に通電した、使用中の本発明の装置を示す。

【図7】架空の組織と、針進路の周囲を取り囲み横方向寸法(a)および(b)を有する組織内に本発明の装置が生成する通常電界を示す上面図を示す。

【図8A】不均一な力線とそれぞれの電界がアレイを取り囲みそこから急速に放散する本発明のアレイと対照的な、アレイの針の間の通常比較的均一な力線と対応する電界とを伴う先行技術のアレイを示す図である。例えば、図8Aは、電極間の力線が比較的均一な線形アレイにおける3つの対向する電極を示す。

40

【図8B】不均一な力線とそれぞれの電界がアレイを取り囲みそこから急速に放散する本発明のアレイと対照的な、アレイの針の間の通常比較的均一な力線と対応する電界とを伴う先行技術のアレイを示す図である。例えば、図8Bでは、処置範囲が電極を中心とし、比較的均一な力線とそれぞれの電界の元にある円形アレイを示す(図8Bでは、対向する対に個別にパルスを印加している)。

【図8C】不均一な力線とそれぞれの電界がアレイを取り囲みそこから急速に放散する本発明のアレイと対照的な、アレイの針の間の通常比較的均一な力線と対応する電界とを伴う先行技術のアレイを示す図である。例えば、図8Cでは、処置範囲が電極を中心とし、

50

比較的均一な力線とそれぞれの電界の元にある円形アレイを示す（図 8 C では、対向する電極の対の異なる方向にパルスを印加している）。

【図 9 A】組織表面近くへの処置物質の送達を含む本方法で使用するため、針および槽を処置対象の組織に穿通するため鋭角に置くガイドを備える本発明の装置のまたさらなる実施形態を示す。この角度は通常、組織表面の範囲全体によって形成される平面から 3 ~ 25 度である。

【図 9 B】組織表面近くへの処置物質の送達を含む本方法で使用するため、針および槽を処置対象の組織に穿通するため鋭角に置くガイドを備える本発明の装置の図 9 A に示した実施形態を示す。この角度は通常、組織表面の範囲全体によって形成される平面から 3 ~ 25 度である。

【図 9 C】組織表面近くへの処置物質の送達を含む本方法で使用するため、針および槽を処置対象の組織に穿通するため鋭角に置くガイドを備える本発明の装置の図 9 A に示した実施形態を示す。この角度は通常、組織表面の範囲全体によって形成される平面から 3 ~ 25 度である。

【図 9 D】組織表面近くへの処置物質の送達を含む本方法で使用するため、針および槽を処置対象の組織に穿通するため鋭角に置くガイドを備える本発明の装置の図 9 A に示した実施形態を示す。この角度は通常、組織表面の範囲全体によって形成される平面から 3 ~ 25 度である。

【図 10 A】送達針の先端近くに露出した電極を備える送達針の部分図を示す。図 10 A は真っ直ぐな電極を支持する針を示す。針の内部を通る正負の電極各々のリード線が示される。また、この図示は、細長い針の上部は電極リード線の周囲および/または上部針軸を覆う絶縁体を備えてもよいことを示すことを目的とするものでもある。

【図 10 B】送達針の先端近くに露出した電極を備える送達針の部分図を示す。図 10 B は螺旋状の電極を支持する針を示す。針の内部を通る正負の電極各々のリード線が示される。また、この図示は、細長い針の上部は電極リード線の周囲および/または上部針軸を覆う絶縁体を備えてもよいことを示すことを目的とするものでもある。

【図 11 A】主として針進路の近くの細胞がポレーションによって影響された組織の電極ポレーションの結果を示す。図 11 A は組織の隣接する切片を示す一連の写真である。

【図 11 B】主として針進路の近くの細胞がポレーションによって影響された組織の電極ポレーションの結果を示す。図 11 B は針進路のすぐ近くの中心切片のクローズアップである。

【図 12】本発明に係る電極ポレーション装置を使用した蛍光マーカータンパク質（GFP）を符号化する発現ベクターを含む核酸をウサギの大腿四頭筋に 1 回注射した結果を示す。

【図 13 A】電極が各針軸周囲の 1 / 4 を含むように注射針軸の基材の上に材料の微細な層を形成し、エッチングして再び層を形成する MEMS 技術を使用して金の細長い電極を標準注射針の上にエッチングした試作品皮下注射針の拡大写真を示す。図 13 A は、針の長さによって通る 1 つの長い電極を示す針の図である。

【図 13 B】電極が各針軸周囲の 1 / 4 を含むように注射針軸の基材の上に材料の微細な層を形成し、エッチングして再び層を形成する MEMS 技術を使用して金の細長い電極を標準注射針の上にエッチングした試作品皮下注射針の拡大写真を示す。図 13 B は、2 つの金の電極の端子部分が見えるような角度からの詳細写真を示す。

【図 13 C】電極が各針軸周囲の 1 / 4 を含むように注射針軸の基材の上に材料の微細な層を形成し、エッチングして再び層を形成する MEMS 技術を使用して金の細長い電極を標準注射針の上にエッチングした試作品皮下注射針の拡大写真を示す。図 13 C は、針軸にエッチングした電極の端子部分の細部を示す別の透視図である。

【図 13 D】電極が各針軸周囲の 1 / 4 を含むように注射針軸の基材の上に材料の微細な層を形成し、エッチングして再び層を形成する MEMS 技術を使用して金の細長い電極を標準注射針の上にエッチングした試作品皮下注射針の拡大写真を示す。図 13 D は、M E

10

20

30

40

50

Mによって作成された電極が針軸の周囲の1/16である別の実施形態を示す。

【図13E】電極が各針軸周囲の1/4を含むように注射針軸の基材の上に材料の微細な層を形成し、エッチングして再び層を形成するMEMS技術を使用して金の細長い電極を標準注射針の上にエッチングした試作品皮下注射針の拡大写真を示す。図13Eは、MEMによって作成された電極が針軸の周囲の1/16である別の実施形態を示す。

【図14A】軸が、例えば押し出し成形された皮下注射針軸に組み込まれる電極リード線と共に押し出し成形されるプラスチックといった電氣的に不活性な材料を備える、単針設計の付加的実施形態を示す図である。図14Aは、針軸と平行に通る真っ直ぐな電極を示す。

【図14B】軸が、例えば押し出し成形された皮下注射針軸に組み込まれる電極リード線と共に押し出し成形されるプラスチックといった電氣的に不活性な材料を備える、単針設計の付加的実施形態を示す図である。図14Bは、軸に沿って螺旋状をなす電極を示す。

【図14C】軸が、例えば押し出し成形された皮下注射針軸に組み込まれる電極リード線と共に押し出し成形されるプラスチックといった電氣的に不活性な材料を備える、単針設計の付加的実施形態を示す図である。図14Cは、軸の電極を針のハブに配置した電極リード線に接続することのできる1つの実施形態を示す図14AのAA-AA断面を示す。

【図15】エレクトロポレーションを使用しない場合(図中の三角のプロット)と対比して本発明の単針(図中の四角いプロット)を使用したエレクトロポレーションパルスの後生じたウサギ抗ヒトIgG抗体のレベルを示すグラフである。

【図16】エレクトロポレーションを使用しない場合(図中の三角のプロット)と対比して本発明の単針(図中の四角いプロット)を使用したエレクトロポレーションパルスの後生じたウサギ抗SEAP抗体のレベルを示すグラフである。

【図17A】GFPを符号化するプラスミドDNAの注射の後エレクトロポレーションを使用しない場合の緑色蛍光タンパク質(GFP)発現の結果を示す写真である。自然光および蛍光の組み合わせにおいて、図17Aは、注射/針進路部位に近接した組織の隣接する切片を示す。この写真は、エレクトロポレーションなく発現もない場合を示す。

【図17B】GFPを符号化するプラスミドDNAの注射の後エレクトロポレーションを使用しない場合の緑色蛍光タンパク質(GFP)発現の結果を示す写真である。

【図18A】図18Aは、GFPを符号化するプラスミドDNAの注射の後23ゲージの針と、針軸の周囲の1/16の幅を有する陽極および陰極とを備える単針電極を使用してエレクトロポレーションを実行した、自然光および緑色蛍光の組み合わせを示す写真である。この実験では、電極に50mAの定電流でパルスを印加した。

【図18B】図18Bは、GFPを符号化するプラスミドDNAの注射の後23ゲージの針と、針軸の周囲の1/16の幅を有する陽極および陰極とを備える単針電極を使用してエレクトロポレーションを実行した、蛍光単独を示す写真である。この実験では、電極に50mAの定電流でパルスを印加した。

【図19A】図19Aは、GFPを符号化するプラスミドDNAの注射の後23ゲージの針と、針軸の周囲の1/16の幅を有する陽極および陰極とを備える単針電極を使用してエレクトロポレーションを実行した、自然光および緑色蛍光の組み合わせを示す写真である。この実験では、電極に100mAの定電流でパルスを印加した。

【図19B】図19Bは、GFPを符号化するプラスミドDNAの注射の後23ゲージの針と、針軸の周囲の1/16の幅を有する陽極および陰極とを備える単針電極を使用してエレクトロポレーションを実行した、蛍光のみを示す写真である。この実験では、電極に100mAの定電流でパルスを印加した。

【図20A】図20Aは、GFPを符号化するプラスミドDNAの注射の後23ゲージの針と、針軸の周囲の1/4の幅を有する陽極および陰極とを備える単針電極を使用してエレクトロポレーションを実行した、自然光および緑色蛍光の組み合わせを示す写真である。この実験では、電極に50mAの定電流でパルスを印加した。

【図20B】図20Bは、GFPを符号化するプラスミドDNAの注射の後23ゲージの針と、針軸の周囲の1/4の幅を有する陽極および陰極とを備える単針電極を使用してエ

10

20

30

40

50

レクトロポレーションを実行した、蛍光のみを示す写真である。この実験では、電極に 50 mA の定電流でパルスを印加した。

【図 2 1 A】図 2 1 A は、GFP を符号化するプラスミド DNA の注射の後 23 ゲージの針と、針軸の周囲の 1 / 4 の幅を有する陽極および陰極とを備える単針電極を使用してレクトロポレーションを実行した、自然光および緑色蛍光の組み合わせを示す写真である。この実験では、電極に 100 mA の定電流でパルスを印加した。

【図 2 1 B】図 2 1 B は、GFP を符号化するプラスミド DNA の注射の後 23 ゲージの針と、針軸の周囲の 1 / 4 の幅を有する陽極および陰極とを備える単針電極を使用してレクトロポレーションを実行した、蛍光のみを示す写真である。この実験では、電極に 100 mA の定電流でパルスを印加した。

【図 2 2 A】図 2 2 A は、GFP を符号化するプラスミド DNA の注射の後 23 ゲージの針と、針軸の周囲の 1 / 4 の幅を有する陽極および陰極とを備える単針電極を使用してレクトロポレーションを実行した、自然光および緑色蛍光の組み合わせを示す写真である。この実験では、電極に 150 mA の定電流でパルスを印加した。

【図 2 2 B】図 2 2 B は、GFP を符号化するプラスミド DNA の注射の後 23 ゲージの針と、針軸の周囲の 1 / 4 の幅を有する陽極および陰極とを備える単針電極を使用してレクトロポレーションを実行した、蛍光のみを示す写真である。この実験では、電極に 150 mA の定電流でパルスを印加した。

【図 2 3 A】図 2 3 A は、GFP を符号化するプラスミド DNA の注射の後流体送達実施形態を伴わない 1 mm 間隔の単針電極を使用してレクトロポレーションを実行した、自然光および緑色蛍光の組み合わせを示す写真である。この実験では、電極に 75 mA の定電流でパルスを印加した。

【図 2 3 B】図 2 3 B は、GFP を符号化するプラスミド DNA の注射の後流体送達実施形態を伴わない 1 mm 間隔の単針電極を使用してレクトロポレーションを実行した、蛍光のみを示す写真である。この実験では、電極に 75 mA の定電流でパルスを印加した。

【図 2 4 A】図 2 4 A は、GFP を符号化するプラスミド DNA の注射の後流体送達実施形態を伴わない 1 mm 間隔の単針電極を使用してレクトロポレーションを実行した、自然光および緑色蛍光の組み合わせを示す写真である。この実験では、電極に 150 mA の定電流でパルスを印加した。

【図 2 4 B】図 2 4 B は、GFP を符号化するプラスミド DNA の注射の後流体送達実施形態を伴わない 1 mm 間隔の単針電極を使用してレクトロポレーションを実行した、蛍光のみを示す写真である。この実験では、電極に 150 mA の定電流でパルスを印加した。

【図 2 5 A】図 2 5 A は、GFP を符号化するプラスミド DNA の注射の後流体送達実施形態を伴わない 1 mm 間隔の単針電極を使用してレクトロポレーションを実行した、自然光および緑色蛍光の組み合わせを示す写真である。この実験では、電極に 250 mA の定電流でパルスを印加した。

【図 2 5 B】図 2 5 B は、GFP を符号化するプラスミド DNA の注射の後流体送達実施形態を伴わない 1 mm 間隔の単針電極を使用してレクトロポレーションを実行した、蛍光のみを示す写真である。この実験では、電極に 250 mA の定電流でパルスを印加した。

。

10

20

30

40

【 図 1 】

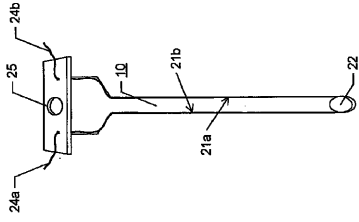


Fig. 1

【 図 2 】

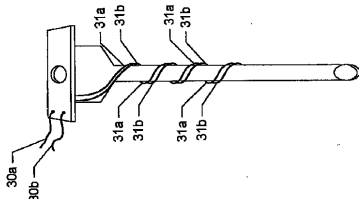


Fig. 2

【 図 3 A 】

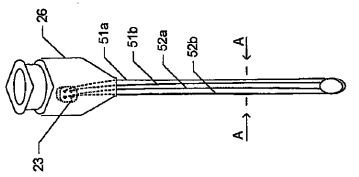


Fig. 3A

【 図 5 B 】

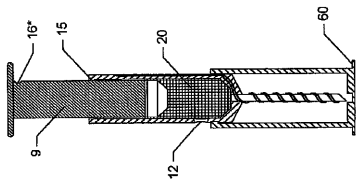


Fig. 5B

【 図 5 C 】

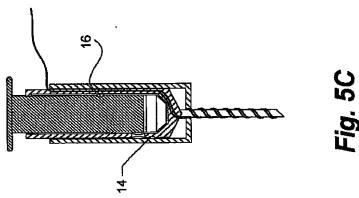


Fig. 5C

【 図 6 】

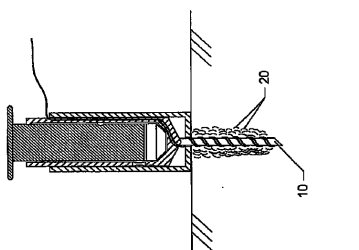


Fig. 6

【 図 3 B 】

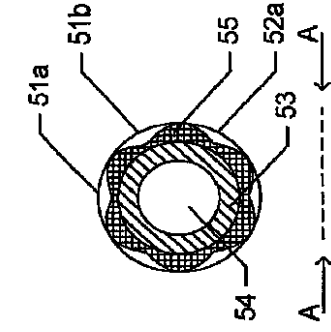


Fig. 3B

【 図 4 】

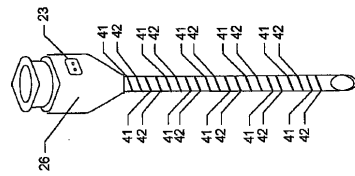


Fig. 4

【 図 5 A 】

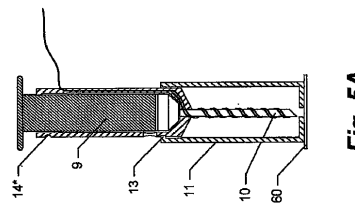


Fig. 5A

【 図 7 】

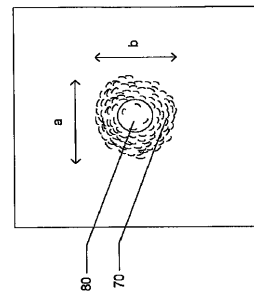


Fig. 7

【 図 8 A 】

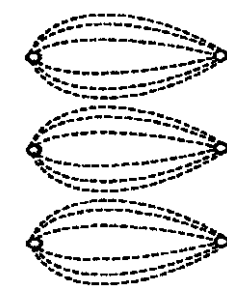


Fig. 8A

【 図 8 B 】

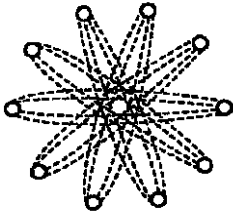


Fig. 8B

【 図 8 C 】

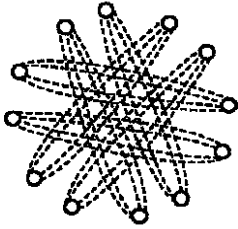


Fig. 8C

【 図 9 A 】

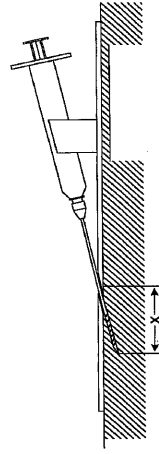


Fig. 9A

【 図 9 B 】

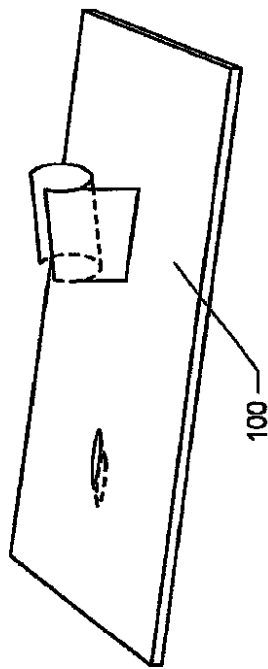


Fig. 9B

【 図 9 C 】

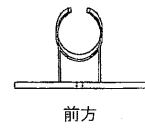


Fig. 9C

【 図 9 D 】

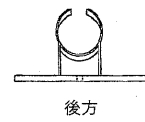


Fig. 9D

【 図 1 0 A 】

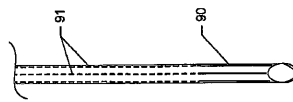


Fig. 10A

【 図 1 0 B 】

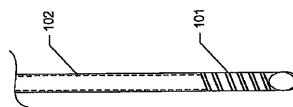


Fig. 10B

【 図 1 1 A 】



Fig. 11A

【 図 1 1 B 】



Fig. 11B

【 図 1 2 】

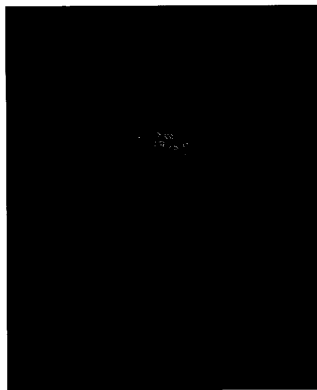


Fig. 12

【 図 1 3 B 】



Fig. 13B

【 図 1 3 A 】

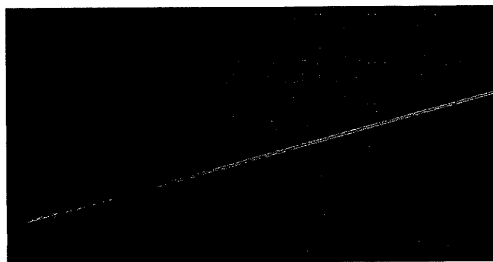


Fig. 13A

【 図 1 3 C 】

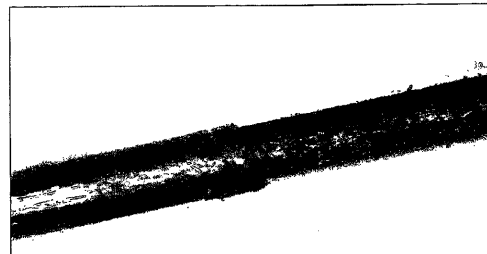


Fig. 13C

【 図 1 3 D 】

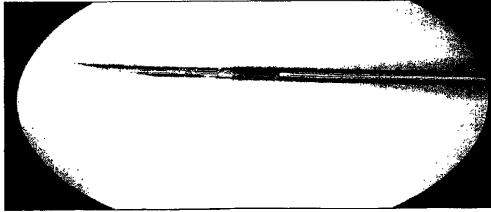


Fig. 13D

【 図 1 3 E 】

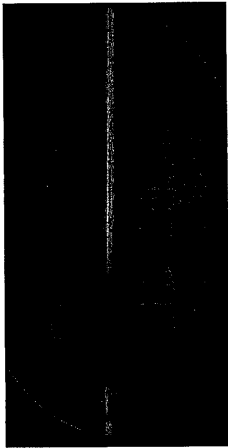


Fig. 13E

【 図 1 4 A 】

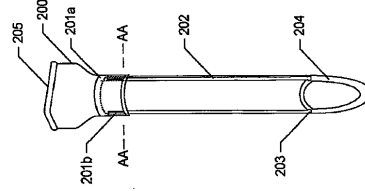


Fig. 14A

【 図 1 4 B 】

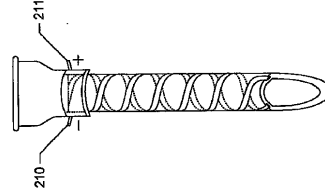


Fig. 14B

【 図 1 4 C 】

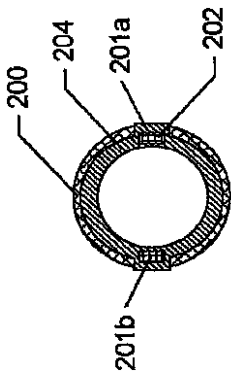


Fig. 14C

【 図 1 6 】

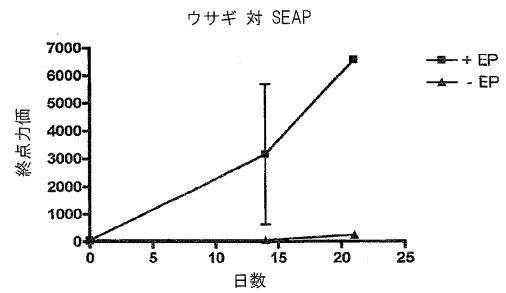


Fig. 16

【 図 1 5 】

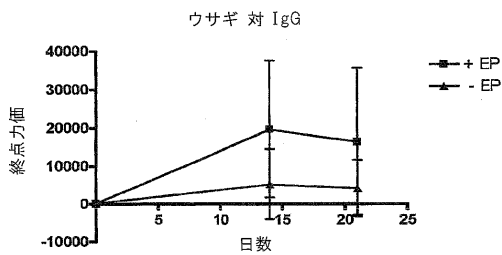


Fig. 15

【図 17 A】



Fig. 17A

【図 17 B】



Fig. 17B

【図 18 A】



Fig. 18A

【図 18 B】



Fig. 18B

【図 19 A】



Fig. 19A

【図 19 B】



Fig. 19B

【図 20 A】

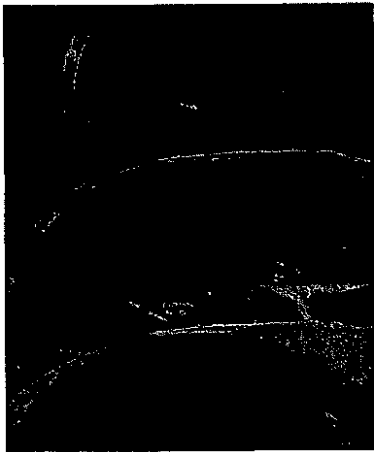


Fig. 20A

【図 20 B】

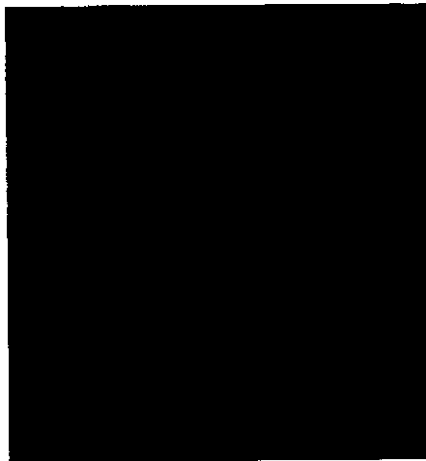


Fig. 20B

【 図 2 1 A 】

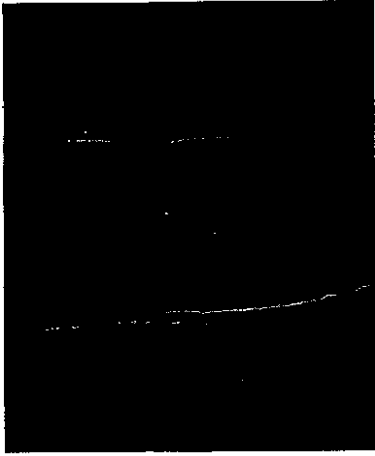


Fig. 21A

【 図 2 1 B 】



Fig. 21B

【 図 2 2 A 】

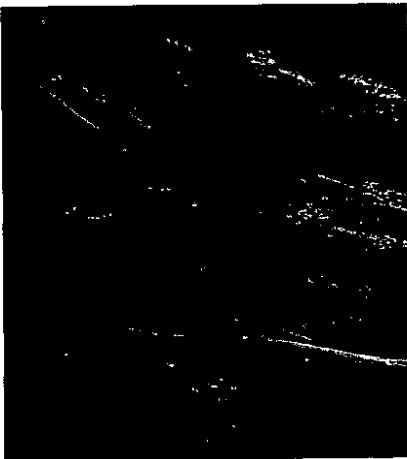


Fig. 22A

【 図 2 2 B 】



Fig. 22B

【 図 2 3 A 】



Fig. 23A

【 図 2 3 B 】

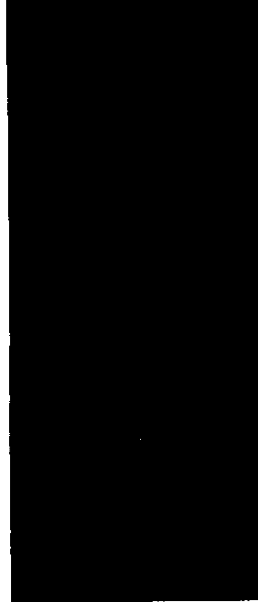


Fig. 23B

【 図 2 4 A 】



Fig. 24A

【 図 2 4 B 】

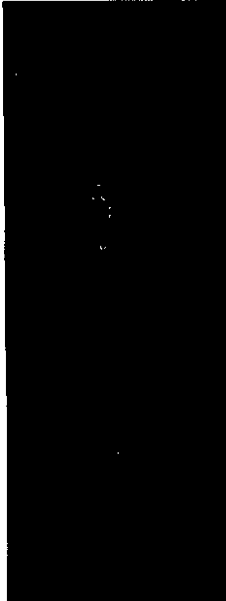


Fig. 24B

【図 25 A】

**Fig. 25A**

【図 25 B】

**Fig. 25B**

【手続補正書】

【提出日】平成20年10月16日(2008.10.16)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織の細胞内に処置物質を送達するため生体内の前記組織をエレクトロポレーションする装置であって、

a . 互いに間隔を開け電氣的に絶縁され互いに平行に位置する、チューブの外面に露出した少なくとも2つの細長い電極を備え、体組織に穿通することができる細長い送達チューブと、

b . 前記電極を各々電気エネルギー源に接続することができる電気コンジットとを備え、

c . 前記チューブを患者の組織に挿入し前記エネルギー源によって通電する時、前記電極が、細胞による前記物質の取り込みを可能にするように前記組織への前記チューブの挿入によって形成された進路に沿ったその近くの細胞を可逆的にポレーションするのに十分な前記チューブを取り囲む処置範囲内の前記細胞に電界を発生することができることを特徴とする装置。

【請求項 2】

さらに伸長式または後退式の槽を備える、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記槽がシリンジを備える、請求項 2 に記載の装置。

【請求項 4】

前記槽が、0.0～0.5 ml、0.0～1 ml、0.0～3 ml、および0.0～5 ml からなるグループから選択される可変容量を有する、請求項 3 に記載の装置。

【請求項 5】

前記電気エネルギー発生源がエレクトロポレーションパルス発生器である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記発生器が、平均電圧が1～200 Vの範囲内でもよい電気パルスを発生することができる、請求項 5 に記載の装置。

【請求項 7】

前記発生器が、1 ミリアンペア～400 ミリアンペアの電流を有する電気パルスを発生することができる、請求項 5 に記載の装置。

【請求項 8】

前記電流が、10～40、25～100、50～150、125～200、175～250、225～300、250～300、および300～400 からなるグループから選択される範囲内である、請求項 8 に記載の装置。

【請求項 9】

前記発生器が、1～10,000 Hz からなるグループから選択される周波数を有する電気パルスを生成することができる、請求項 6 に記載の装置。

【請求項 10】

前記発生器が、0.1 μs～1000 ms からなるグループから選択される時間の長さを有する電気パルスを生成することができる、請求項 6 に記載の装置。

【請求項 11】

前記チューブが、20 ゲージ、21 ゲージ、22 ゲージ、23 ゲージ、24 ゲージ、25 ゲージ、26 ゲージ、27 ゲージ、28 ゲージ、および29 ゲージからなるグループから選択される注射針ゲージのサイズの皮下注射針である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 12】

前記チューブが各電極から電氣的に絶縁されている、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 13】

前記組織が、皮膚、皮下組織、皮内組織、真皮下組織、骨格筋、横紋筋、平滑筋、器官、心臓、胸部、肺、膵臓、肝臓、脾臓および粘膜からなるグループから選択される何らかの種類の体組織または器官を備える、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 14】

組織の細胞内に処置物質を送達する装置であって、

近端と末端とを有する細長い軸を各々備え、前記近端で1 mmを越えない距離で互いに永続的な関係に固定された、体組織に穿通することができる少なくとも2つの平行な細長い電極を備え、前記装置がさらに、前記電極の長さにわたる各電極に接触する電氣的に不活性な材料、および前記電極の長さにわたる前記電極の間の電氣的に不活性でない材料からなるグループから選択される構成要素を有する装置。

【請求項 15】

治療上有益な成分によって生体内で細胞をエレクトロポレーションする方法であって、

a. チューブの少なくとも一部に沿って配置された少なくとも2つの細長い電極を備える、前記成分を注射するための前記チューブを提供するステップと、

b. 前記成分を収容する槽を提供するステップであって、前記槽と成分とが前記チューブを通る内腔と流通するステップと、

c. 前記チューブを患者の生体内の組織に挿入することによって前記患者の事前に選択された処置部位にチャンネルを形成するステップと、

d. 前記槽から前記内腔を通じて前記チャンネルを備える前記処置部位に前記成分を注射するステップと、

e. 各前記電極に、前記処置部位に細胞の可逆性のポレーションを発生させるのに十分

な電気エネルギーの発生源を提供するステップと、

f. 前記電気エネルギーの発生源を起動して、電気パルスを提供し、前記成分を取り込ませるために前記細胞をエレクトロポレーションするステップとを備える方法。

【請求項 16】

前記成分が、薬剤、核酸、抗原、発現可能な抗原を符号化する核酸、発現可能な免疫変調分子を符号化する核酸の何れかを備える、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 17】

前記免疫変調分子がサイトカインまたはケモカインである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 18】

前記免疫変調分子が、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12、GM - CSF、M - CSF、G - CSF、LIF、LT、TGF - 、IFN、TNF - 、BCGF、CD2、またはICAMからなるグループから選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 19】

前記細胞が、皮下細胞、皮内、真皮下細胞、骨格筋細胞、横紋筋細胞、平滑筋細胞、器官細胞、胸部組織細胞、膵臓細胞、脾臓細胞、心臓細胞、肝細胞および粘膜細胞からなるグループから選択される生きた患者の細胞を備える、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記電極が金および/またはチタンを備える、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記処置部位が、患者の大腿部、腕、または胸に位置する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記成分が、0.01 μ l、50 μ l、100 μ l、150 μ l、200 μ l、250 μ l、300 μ l、400 μ l、および500 μ lからなるグループから選択される合計量だけ注射される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 23】

前記成分が、2 ng/ml ~ 3 mg/ml からなるグループから選択される合計活性成分濃度で注射される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 24】

前記成分が、前記細胞を可逆的にポレーションするのに十分な前記エネルギー源を起動する前またはそれと同時に注射される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 25】

注射後の前記成分が、前記組織への前記チューブの挿入によって形成された前記チャネルの内部および周囲に存在する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記成分が前記処置部位の前記細胞にエレクトロポレーションされる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 27】

前記処置部位が、前記針によって形成され、1 mm、2 mm、3 mm、4 mm および 5 mm からなるグループから選択される距離だけ前記組織内の進路から半径方向外側に延びる、前記進路を取り囲む組織/細胞の範囲を備える、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 28】

前記電気エネルギー発生源がエレクトロポレーションパルス発生器である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 29】

前記発生器が、公称電圧が 1 ~ 200 V となるようなパルスを発生する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 30】

前記発生器が、1 ~ 400 ミリアンペアからなるグループから選択される定電流でパルスを発生する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記定電流の範囲が、10～40、25～100、50～150、125～200、175～250、225～300、250～300、および300～400からなるグループから選択される、請求項 1 5に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記発生器が、1～10,000 Hzの範囲内から選択される周波数でパルスが発生する、請求項 1 6に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記発生器が、約0.1 μs～1000 msの時間の長さだけパルスが発生する、請求項 1 5に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記チューブが、20ゲージ、21ゲージ、22ゲージ、23ゲージ、24ゲージ、25ゲージ、26ゲージ、27ゲージ、28ゲージ、および29ゲージからなるグループから選択される注射針ゲージのサイズである、請求項 1 5に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 07/03615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61N 1/32 (2007.01) USPC - 604/21 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(8) - A61N 1/32 (2007.01) USPC - 604/21 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) USPTO WEST; Google patents - electroporation, drug delivery skin, syringe and electrode, generator, electroporation pulse generator, iontophoresis, needle electrodes,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 5,702,359 A (HOFMANN et al.) 30 December 1997 (30.12.1997) See (Abstract)(col 2, ln31) (col 3,ln 13) (col 2, ln 25) (col 5, ln 17) (col 5, ln 34) (col 6,ln12) (col 6, ln 2) (col 6,ln 61) (col 2, ln 18) (col 3, ln 13)(col 6, ln 2) (col 6, ln 2) (col 6, ln 36) (col 6, ln 16)(col 1, ln 15)(col 2, ln 60) (col 3, ln 58) (col 6, ln 16) (col 2,ln 30) (col 6, ln 23) (col 9, ln 60)	1-5, 11,15 - 18, 21-24, 26, 28, 34 6-10,12 -14,19, 20, 25, 27, 29-33
Y	US 2002/0198512 A1 (SEWARD) 26 December 2002 (26.12.2002) See (para [0015]) (para [0041]) (para [0014]) (para [0009])	12 -14, 19, 25, 27
Y	US 5,019,034 A (WEAVER ET AL.) 28 May 1991 (28.05.1991) See (col 9 , ln 60) (col 8,ln 46)	6-10, 20, 29-33
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 25 September 2007 (25.09.2007)	Date of mailing of the international search report 23 NOV 2007	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100153084

弁理士 大橋 康史

(72)発明者 クイエケン, ルネ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1 - 1 3 1 8, サンディエゴ, ソレント バリー ロード 1 1 4 9 4

(72)発明者 マティエセン, イアコブ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1 - 1 3 1 8, サンディエゴ, ソレント バリー ロード 1 1 4 9 4

(72)発明者 ティエーレ, トルン エリザベート

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1 - 1 3 1 8, サンディエゴ, ソレント バリー ロード 1 1 4 9 4

(72)発明者 マッキュー, ジョージ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1 - 1 3 1 8, サンディエゴ, ソレント バリー ロード 1 1 4 9 4

Fターム(参考) 4C053 HH03