

(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2004-531578

(P2004-531578A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/02	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	4 C 0 6 6
A 6 1 K 39/145	A 6 1 K 39/145	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/36	A 6 1 K 47/36	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/46	A 6 1 K 47/46	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-508311 (P2003-508311)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月1日 (2002.7.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年1月5日 (2004.1.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/020780
 (87) 国際公開番号 W02003/002069
 (87) 国際公開日 平成15年1月9日 (2003.1.9)
 (31) 優先権主張番号 60/301, 476
 (32) 優先日 平成13年6月29日 (2001.6.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/044, 504
 (32) 優先日 平成14年1月10日 (2002.1.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 595117091
 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
 BECTON, DICKINSON AND COMPANY
 アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 07417-1880
 フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1
 1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY 07417-1880,
 UNITED STATES OF AMERICA

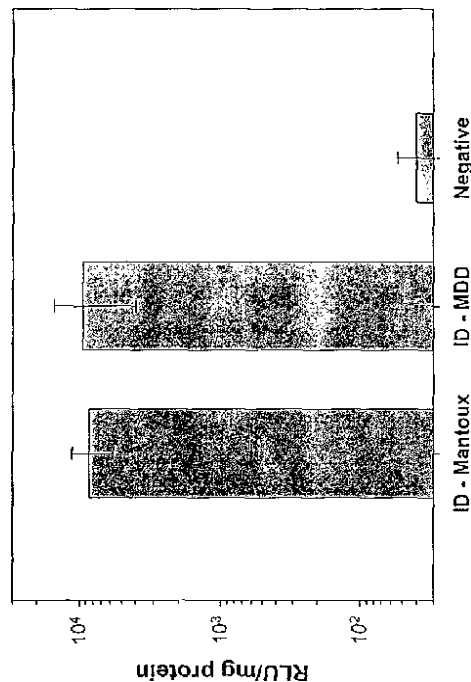
(74) 代理人 100077481
 弁理士 谷 義一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチンおよび遺伝子治療剤のマイクロカニューレによる皮内送達

(57) 【要約】

皮膚の皮内層へのワクチンおよび遺伝子治療剤を投与する方法および装置。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類にワクチンを送達する方法であって、前記方法が、0と1mmとの間の露出高さを持った出口を有する少なくとも1つの中空針を通してワクチンを皮内投与することを含み、前記出口が、皮膚に0.5mmと2mmとの間の深さに挿入される方法。

【請求項 2】

ワクチンが、

ワクチンを貯蔵する事前に充てん可能な貯蔵器に取付け可能であるハブ部分と、前記ハブ部分により支持され、前記ハブ部分から離れるように延びる前方先端部を有する少なくとも1つの中空マイクロニードルと、

10

前記1または複数のマイクロニードルを囲み、前記ハブ部分から前記1または複数のマイクロニードルの前記前方先端部に向かって離れるように延びるリミッター部分を含む装置であり、前記リミッターが、前記1または複数のマイクロニードルの軸に概ね垂直な面内に延びる、概ね平らな皮膚係合面を含み、ワクチンの皮内注射を行うために哺乳類の皮膚に対して受け入れられるように適合されており、前記1または複数のマイクロニードルの1または複数の前方先端部が前記皮膚係合面を超えて約0.5mmから2.0mmの距離延びており、前記リミッター部分が哺乳類の皮膚の真皮層内へのマイクロニードルの貫通を制限している装置で投与されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

ワクチンの送達が哺乳類の皮膚内の0.025mmと2.5mmとの間の深さで起こることを特徴とする請求項1に記載の方法。

20

【請求項 4】

送達されるワクチンが、皮下または筋肉内注射による同じ量のワクチンの送達の後の応答と等しいかまたはそれより大きい、哺乳類における免疫応答を誘発することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

送達されるワクチンが、皮下または筋肉内注射によるより多量のワクチンの送達の後の応答と等しいかまたはそれより大きい、哺乳類における免疫応答を誘発することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

針が約31から50ゲージのマイクロニードルであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

30

【請求項 7】

針が20°と90°との間の傾斜角度を有することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

針が25°と40°との間の傾斜角度を有することを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

皮膚に挿入される針の長さが約0.5mm～約1.7mmの深さまでであることを特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項 10】

マイクロニードルがマイクロニードルのアレイ中にあることを特徴とする請求項6に記載の方法。

40

【請求項 11】

ワクチンが弱毒化生ウイルスを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

ワクチンが弱毒化生細菌を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

ワクチンが不活化または殺滅ウイルスを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 14】

ワクチンがさらにアジュバントを含むことを特徴とする請求項13に記載の方法。

50

【請求項 15】

ワクチンがインフルエンザワクチンであることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

ワクチンが不活化または殺滅細菌を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

ワクチンが核酸を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

核酸によりコードされるペプチドまたはタンパク質が哺乳類において発現されることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

ワクチンがアジュバントをさらに含むことを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

ワクチンがインフルエンザワクチンであることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

ワクチンが非弱毒化生細菌またはウイルスを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

ワクチンが哺乳類細胞またはその成分を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

ワクチンが多糖または多糖複合体を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

ワクチンがタンパク質またはペプチドを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

1 または複数の針が皮膚に実質的に垂直に挿入されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

さらに第 2 のワクチンが筋肉内、皮下、粘膜、腹腔内、静脈内、局所または表皮に投与されることを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

第 2 のワクチンが前記ワクチンと同じ組成であることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

第 2 のワクチンが前記ワクチンと異なる組成であることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

第 2 のワクチンが前記ワクチンと異なるワクチンのクラスであることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記第 2 ワクチンが前記ワクチンと同時に投与されることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 2 ワクチンが前記ワクチンに対して逐次的に投与されることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

0 と 1 mm との間の露出高さを持つ出口を有する少なくとも 1 つの中空針を介して第 2 のワクチンを投与することをさらに含み、前記出口が 0.5 mm と 2 mm との間の深さまで皮膚に挿入されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】

第 2 のワクチンの送達が哺乳類の皮膚内の 0.025 mm と 2.5 mm との間の深さで起こることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 4】

第 2 のワクチンが前記ワクチンと同時に投与されることを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

第 2 のワクチンが前記ワクチンに対して逐次的に投与されることを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

第 2 のワクチンが前記ワクチンの 1 日から 6 週間後に投与されることを特徴とする請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

第 2 のワクチンが前記ワクチンと異なるワクチンのクラスであることを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

第 2 のワクチンが前記ワクチンと同じ組成であることを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 9】

第 2 のワクチンが前記ワクチンと異なる組成であることを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 4 0】

ワクチンを哺乳類に送達する方法であって、前記方法が、
 a) 0 . 0 2 5 m m と 2 . 5 m m との間の深さで皮膚の真皮空間をワクチンで正確に標的設定するための真皮アクセス手段を有する装置と哺乳類の皮膚を接触させることと、
 b) 真皮空間にワクチンを送達すること
 とを含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 4 1】

送達されるワクチンが、皮下または筋肉内注射による同じ量のワクチンの送達後の応答と等じかまたはそれより大きい、哺乳類における免疫応答を誘発することを特徴とする請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

送達されるワクチンが、皮下または筋肉内注射によるより多量のワクチンの送達後の応答と等じかまたはそれより大きい、哺乳類における免疫応答を誘発することを特徴とする請求項 4 0 に記載の方法。

30

【請求項 4 3】

遺伝子治療剤を哺乳類に送達する方法であって、前記方法が露出高さが 0 と 1 m m との間の露出高さを持つ出口を有する少なくとも 1 つの小ゲージ中空針を介して遺伝子治療剤を投与することを含み、前記出口が 0 . 5 m m と 2 m m との間の深さまで皮膚に挿入される方法。

【請求項 4 4】

治療剤の送達が哺乳類の皮膚内の 0 . 0 2 5 m m と 2 . 5 m m との間の深さで起こることを特徴とする請求項 4 3 に記載の方法。

40

【請求項 4 5】

遺伝子治療剤によりコードされるペプチドまたはタンパク質が哺乳類において発現されることを特徴とする請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

発現が哺乳類の皮膚細胞内で起こることを特徴とする請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

針が 3 1 から 5 0 ゲージのマイクロニードルであることを特徴とする請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 8】

針が 2 0 ° と 9 0 ° との間の傾斜角度を有することを特徴とする請求項 4 3 に記載の方法

50

。

【請求項 49】

針が 25° と 40° との間の傾斜角度を有することを特徴とする請求項 48 に記載の方法

。

【請求項 50】

針が約 0.5 mm から約 1.7 mm の長さを有することを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

【請求項 51】

マイクロニードルがマイクロニードルのアレイ中に含まれることを特徴とする請求項 47 に記載の方法。

10

【請求項 52】

遺伝子治療剤が核酸を含むことを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

【請求項 53】

1 または複数の針が皮膚に実質的に垂直に挿入されることを特徴とする請求項 43 に記載の方法。

【請求項 54】

物質を 0.025 mm と 2.5 mm との間の深さに皮内送達するように設計された少なくとも 1 つの中空針を有する送達装置を含むキットであって、前記送達装置は、遺伝子治療剤またはワクチンを含む貯蔵器を受け入れるのに適しており、マイクロニードルが貯蔵器と連通しているようにしているキット。

20

【請求項 55】

有効な用量のワクチンまたは遺伝子治療剤をさらに含むことを特徴とする請求項 54 に記載のキット。

【請求項 56】

用量が、送達装置の一体部分である貯蔵器内、または、送達装置に機能し得るように取り付けられることができる貯蔵器内に含まれていることを特徴とする請求項 55 に記載のキット。

【請求項 57】

中空マイクロニードルが約 31 から 50 ゲージであることを特徴とする請求項 54 に記載のキット。

30

【請求項 58】

装置がマイクロニードルのアレイを含むことを特徴とする請求項 54 に記載のキット。

【請求項 59】

装置が、

ワクチンを貯蔵する事前に充てん可能な貯蔵器に取付け可能であるハブ部分と、前記ハブ部分により支持され、前記ハブ部分から離れるように延びる前方先端部を有する少なくとも 1 つの中空マイクロニードルと、前記マイクロニードルを囲み、前記ハブ部分から前記マイクロニードルの前方先端部に向かって離れるように延びるリミッター部分を含み、前記リミッターが前記マイクロニードルの軸に概ね垂直な面内に延びる、概ね平らな皮膚係合面を含み、ワクチンの皮内注射を行うために哺乳類の皮膚に対して受け入れられるように適合されており、前記マイクロニードル前方先端部が前記皮膚係合面を超えて約 0.5 mm から 2.0 mm の距離延びており、前記リミッター部分が哺乳類の皮膚の真皮層内へのマイクロニードルの貫通を制限していることを特徴とする請求項 54 に記載のキット。

40

【請求項 60】

物質を 0.025 mm と 2.5 mm との間の深さに皮内送達するように設計された真皮アクセス手段を含むキットであって、前記真皮アクセス手段が、遺伝子治療剤またはワクチンを含む貯蔵器を受け入れるのに適しており、該真皮アクセス手段が該貯蔵器と連通しているようにしているキット。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、皮膚の皮内層へのワクチンおよび遺伝子治療剤を投与する方法および装置に関する。

【背景技術】

【0002】

予防、診断または治療の目的で薬剤物質を効果的かつ安全に投与することが重要であることは長年にわたり認識されている。通常の針の使用は、長期にわたり、ヒトおよび動物に皮膚を介して投与することにより薬剤物質を送達するための1つのアプローチを提供している。注射の容易さを改善し、通常の針に関連する患者の不安および/または疼痛を低減しつつ、皮膚を経ての再現性のある効果的な送達を実現する相当な努力がなされてきた。さらに、ある種の送達システムは、針を全く使用せず、イオン導入電流またはエレクトロポレーションまたはサーマルポレーションまたは超音波導入法のような化学メディエータまたは外的推進力に依拠して、皮膚の最外層である角質層を破り、皮膚の表面を通して物質を送達する。しかし、そのような送達システムは、再現性よく、皮膚障壁を破ることがなく、あるいは薬剤物質を皮膚の表面下のある所定の深さに送達せず、臨床的結果は定まらないものとなり得る。したがって、針を用いるような角質層を機械的に破ることは、皮膚の表面を通しての物質の最も再現性のよい投与方法を提供し、投与される物質の配置が制御され、信頼できるものとなると考えられる。

10

【0003】

皮膚の表面下に物質を送達する方法は、ほぼもっぱら経皮投与、すなわち、皮膚を通しての皮膚下部への物質の送達を含む。経皮投与としては、皮下、筋肉内または静脈内投与経路などがあり、そのうち、筋肉内(IM)および皮下(SC)注射が最も一般的に用いられてきた。

20

【0004】

解剖学的には、身体の外表面は、一緒に皮膚を構成している2つの主要な組織層、すなわち、外側の表皮と下にある真皮とからなっている(レビューについては、非特許文献1参照)。表皮は、全体の厚さが75~150 μ mである5層に分けられる。表皮の下に真皮があり、これは2つの層を含み、外側の部分は真皮乳頭と称され、より深い層は網様真皮と称される。真皮乳頭は、多くの微小循環血液とリンパ叢を含む。これに対して、網様真皮は、比較的無細胞性かつ無血管性であり、高密度のコラーゲン組織と弾性のある結合組織とからなっている。表皮および真皮の下には皮下組織があり、これは、ヒポデルミスとも称され、結合組織と脂肪組織とからなっている。筋組織が皮下組織の下にある。

30

【0005】

上記のように、皮下組織と筋組織は、両方とも、一般的に薬剤物質の投与部位として用いられてきた。しかし、真皮は物質の投与部位として標的にされたことはほとんどなく、これは、少なくとも一部は、針を皮内空間に正確に位置決めすることが困難であるためである。さらに、真皮であっても、特に、真皮乳頭は高程度の血管分布を有することが知られており、皮下投与と比べて投与した物質の改善された吸収プロファイルを得るために、この高程度の血管分布を利用することはこれまでに認識されていなかった。これは、小さい薬物分子は、真皮よりも標的に定めることができるかには容易で、予想することができた皮下組織への投与後に一般的に速やかに吸収されるためである。他方で、タンパク質のような巨大分子は一般的に血管分布の程度に無関係に毛細血管上皮を経て十分に吸収されないもので、巨大分子についても、皮内投与を実現することがより困難であることにより、皮下投与よりも有意な吸収の優位性を達成することを予想できなかったのであろう。

40

【0006】

皮膚表面下および皮内空間の領域への投与の一手法は、マントーツベルクリン試験に常用されている。この方法では、精製タンパク質誘導体を27または30ゲージ針および標準の注射器を用いて皮膚表面に対して浅い角度で注射する(非特許文献2)。マントー技法では、針を側方から皮膚に挿入し、次いで、針をさらに皮内組織内に「くねりつつ進める

50

」ことが含まれる。この手法は、実施するのがかなり困難で、特殊な訓練を必要とすることが知られている。注射の位置の不正確さの程度によっては、かなりの数の偽陰性試験結果が得られる。さらに、この試験は注射部位の反応を誘発するために局部的注射を必要とするものであり、マントー法は物質の全身投与のための皮内注射の使用につながらなかった。

【0007】

他のグループは、皮内薬物送達装置と記載されたものについて報告した（特許文献1）。注射は低速度であることが示されており、注射部位は表皮の下のある領域、すなわち、表皮と真皮との界面または真皮の内部または皮下組織であることが意図されていた。しかし、この参考文献には真皮内への選択的投与を示唆するような教示が記載されておらず、ワクチンまたは遺伝子治療剤をこの方法で送達することができることも示唆されてもいない。

10

【0008】

今日まで、多数の治療用タンパク質および低分子量化合物が皮内に送達され、薬理的に有用な反応を効果的に惹起するために使用されていた。これらの化合物の大部分（例えば、インスリン、Neupogen、hGH、カルシトニン）は、ホルモンタンパク質であって、工学技術で作成された受容体や抗体でない。今日まで、すべての投与されたタンパク質は、取り込みおよび分布のより速やかな開始（対SC）、ならびに、ある場合には生物学的利用能の増加を含めたID投与に伴ういくつかの効果を示した。

【0009】

皮膚組織は、ワクチンおよび遺伝子治療剤の送達の魅力的な標的部位の代表である。ワクチン（遺伝子および従来型）の場合、皮膚は、高濃度の抗原提示細胞（APC）およびAPC前駆体がこの組織内、特に、表皮ランゲルハンス細胞および皮膚樹状細胞に見出されるため、魅力的な標的部位である。いくつかの遺伝子治療剤が、皮膚障害、皮膚疾患および皮膚癌の治療のために設計されている。そのような場合、罹患した皮膚組織に治療剤を直接送達することが望ましい。さらに、皮膚細胞は、そのコードされる1種のタンパク質または複数のタンパク質が皮膚から離れた部位において活性である遺伝子治療剤の魅力的な標的である。そのような場合、皮膚細胞（例えば、ケラチノサイト）は、真皮乳頭を介して全身循環に速やかに吸収させることができる治療用タンパク質を産生する「バイオリクター」として機能する。他の場合として、皮膚から離れた部位の障害の治療のために、ワクチンまたは治療剤を全身循環に直接アクセスすることが望ましいこともある。このような場合、真皮乳頭層を介して全身への分配を実現することができる。

20

30

【0010】

しかし、上記のように、標準的な針と注射器を用いた皮内（ID）注射は、実施するのが技術的に非常に困難であり、疼痛性である。従来技術は、DNAベースおよび従来型のワクチンおよび治療剤のID送達に関するいくつかの参考文献を含むが、少なくとも一部は、既存の技術ではID組織に正確に標的を定めることが困難であるため、結果は一致したものではなかった。

【0011】

現在上市されている實際上すべてのヒトワクチンは、IMまたはSC経路により投与されている。4つの主要な世界的ワクチン製造業者（Aventis-Pasteur、GlaxoSmithKline、Merck、Wyeth）により2001年に製造された32種のワクチンのうち、2種のみがID用に承認された（2001年医家向け医薬品便覧）。実際、これらの32種のワクチンのうちの6種の添付文書に、ID経路を用いないことと述べられている。様々な公表前臨床および初期臨床試験が、ID送達はIMまたはSC注射よりも強い免疫応答を誘発し得ることによって、または、IMまたはSCで与えられる投与量に比べて低い用量でそれらに匹敵する免疫応答を誘発することによって、ワクチンを改善することを示唆しているにもかかわらず、このようになっている（非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8、非特許文献9）。幾つかの場合には、ID送達後のワクチンの有効性の改善が認められたが、他

40

50

の場合には、そのような利点が認められなかった（非特許文献10、非特許文献11、非特許文献12、非特許文献13、非特許文献14）。

【0012】

ID送達経路の広範な使用を阻み、上記の矛盾した結果をもたらした主要な因子は、表皮および真皮層への再現性のある送達を達成するのに適切な装置がないことである。ワクチンを注射するのに一般的に用いられている標準針は、皮膚に挿入したときに、これらの組織に正確に標的を定めるには大きすぎる。最も一般的な送達方法は、標準針および注射を用いるマントー型の注射を介するものである。この方法は、実施するのが困難で、信頼できず、対象にとって疼痛性である。したがって、皮膚の皮内層への、ワクチンおよび遺伝子治療剤の効率的で、正確かつ再現性のある送達を可能にする装置と方法が必要である。

10

【0013】

【特許文献1】

米国特許第5997501号

【特許文献2】

欧州特許出願公開第1092444 A1号

【特許文献3】

2000年6月29日出願の米国特許出願第606909号

【特許文献4】

1999年10月14日出願の米国特許出願第417671号

【特許文献5】

米国特許第5589466号

【特許文献6】

米国特許第5593972号

【特許文献7】

米国特許第5703055号

【特許文献8】

2002年5月13日出願の米国特許出願第10/142966号

【特許文献9】

米国特許第5547932号

【特許文献10】

欧州特許出願公開第1092444号

【非特許文献1】

Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin, Second Edition, L. A. Goldsmith, Ed., Oxford University Press, New York, 1991

【非特許文献2】

Flynn et al, Chest 106: 1463-5, 1994

【非特許文献3】

Playford, E. G. et al, Infect, Control Hosp. Epidemiol. 23: 87, 2002

【非特許文献4】

Kerr, C. Trends Microbiol, 9: 415, 2001

【非特許文献5】

Rahman, F. et al., Hepatology 31: 521, 2000

【非特許文献6】

Carlsson, U. et al., Scan J. Infect. Dis. 28: 435 1996

【非特許文献7】

Propst, T. et al., Amer. J. Kidney Dis. 32: 1041, 1998

【非特許文献8】

Nagafuchi, S. et al., Rev Med Virol, 8: 97, 1998

【非特許文献9】

Henderson, E. A., et al., Infect. Control Hosp Epidemiol. 21: 264, 2000

40

50

【非特許文献 10】

Crowe, Am. J. Med. Tech. 31: 387-396, 1965

【非特許文献 11】

Letter to British Medical Journal 29/10/77, p.1152

【非特許文献 12】

Brown et al., J. Infect. Dis. 136: 466-471, 1977

【非特許文献 13】

Herbert & Larke, J. Infect. Dis. 140: 234-238, 1979

【非特許文献 14】

Ropac et al. Periodicum Biologorum 103: 39-43, 2001

10

【非特許文献 15】

Immunology Today, Apr 21 (4): 163-165, 2000

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、ヒトまたは動物へのワクチンおよび遺伝子治療剤のID送達の臨床的有用性を改善する。方法は、皮内空間に直接標的を定め、物質をポラスとして、または注入により皮内空間に送達するための装置を用いるものである。物質を真皮内に入れることにより、ワクチンおよび遺伝子治療剤に対する効果的応答および/または改善された応答がもたらされることが発見された。この装置は、物質の皮膚からの漏れを防ぎ、皮内空間内の吸収または細胞による取り込みを改善するように設計されている。本発明の方法によるワクチン送達に対する免疫応答は、ワクチンの通常のIM送達と同等またはそれより改善されていることが見出され、本発明の方法によるID投与は、ID送達の他の利点に加えて、多くの場合に臨床結果の改善をもたらすことがわかった。

20

【0015】

本発明はまた、皮膚空間を直接標的とすることを基盤とした、個体にワクチンまたは遺伝物質を送達する方法および装置に関し、そのような方法によりワクチンまたは遺伝物質の送達の改善および/またはそれに対する応答の改善が可能となる。直接皮内(ID)投与手段(以後、真皮アクセス手段と称する)、例えば、マイクロニードルによる注射および注入システム、または皮内空間に正確に標的を定める他の方法を用いることにより、ワクチンおよび遺伝子治療剤を含む多くの物質の有効性を、皮下および筋肉内送達などの伝統的な非経口投与経路と比べて改善することができる。

30

【0016】

したがって、免疫および治療応答をもたらすための遺伝物質を含むワクチンまたは医薬品をID組織に正確に標的を定めて送達する方法を提供することが本発明の1つの目的である。

【0017】

ID組織に正確に標的を定めることによりワクチン(従来型のまたは遺伝子的なもの)または遺伝物質を含む医薬品に対する全身性免疫または治療応答を改善する方法を提供することが本発明のさらなる目的である。

40

【0018】

ワクチンに対する抗原特異的免疫応答を有効にするために、ID組織に正確に標的を定めることにより皮膚に存在するAPCに対するワクチン(従来型のまたは遺伝子的なもの)の利用性を改善する方法を提供することが本発明の他の目的である。これにより、多くの場合に、より少量の物質をID経路により投与することが可能となる。

【0019】

ID組織に正確に標的を定めることにより皮膚疾患、遺伝的皮膚障害または皮膚癌の治療のための遺伝物質を含む医薬品の送達を改善する方法を提供することが本発明の他の目的である。結果としての遺伝物質はその後、標的としたID組織内の細胞により発現される。

50

【0020】

I D 組織に正確に標的を定めることにより皮膚から離れた組織を冒す疾患、遺伝的障害または癌の治療のための遺伝物質を含む医薬品の送達を改善する方法を提供することが本発明の他の目的である。結果としての遺伝物質はその後、標的としたI D 組織、それから離れた組織または両方の内部の細胞により発現される。

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明のこれらおよび他の利点は、特定の治療または予防薬についての好ましい深さに物質の送達の標的を直接定めることにより実現される。本発明者らは、皮内空間に物質の送達の標的を明確に定めることにより、ワクチンおよび遺伝子治療剤に対する応答を思いがけず改善することができ、多くの状況では、得られる臨床的な利点と共に変化させることができることを見出した。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

本明細書で用いているように、「皮内」(I D)は、物質を、速やかに全身に吸収させることができるか、または、ワクチン(従来型のまたは遺伝子的なもの)若しくは遺伝子治療剤の場合には、皮膚の細胞により直接吸収する豊富に血管化された真皮乳頭に物質が容易に到達するような方法で物質を真皮内に投与することを意味する。遺伝子ワクチンの場合、所期の標的細胞は、A P C (表皮ランゲルハンス細胞および真皮樹状細胞を含む)を含む。皮膚から離れている組織を冒す疾患、遺伝的障害または癌の遺伝子治療剤の場合、所期の標的細胞は、治療用タンパク質を発現することができるケラチノサイトまたは他の皮膚細胞を含む。皮膚を冒す疾患、遺伝的障害または癌の遺伝子治療剤の場合、所期の標的細胞は、疾患、遺伝的障害または癌により冒されている皮膚細胞を含む。

20

【0023】

本明細書で用いているように、「標的送達」は、標的深さへの物質の送達を意味し、治療を受ける個体における同じ応答をもたらすが、別の受け入れられている送達手段(例えば、局所、皮下または筋肉内)と比較して、疼痛が少なく、再現性が大きく、または他の利点をもたらす送達を含む。

【0024】

本明細書で用いているように、「応答の改善」は、投与した低減された量の化合物と同等の応答、または別の送達手段により投与された同じ量の化合物に対して増加した応答、または他の治療上または免疫学的利点を含む。

30

【0025】

本明細書で用いている「針」または「複数の針」という用語は、そのようなすべての針様構造を含むことを意図するものである。マイクロカニューレまたはマイクロニードルという用語は、本明細書で用いているように、そのような構造が円筒形の場合、約31ゲージ、一般的に31~50ゲージより小さい構造を含むことを意図するものである。マイクロニードルという用語に含まれる非円筒形構造は、同等の直径のもので、角錐形、矩形、八角形、くさび形および他の幾何学的形状を含む。

【0026】

本明細書で用いているように、「ポラス」という用語は、10分未満の時間内に送達される量を意味する。「急速ポラス」は、1分未満の時間内に送達される量を意味する。「注入」は、10分間を超える時間にわたる物質の送達を意味する。

40

【0027】

「核酸」という用語は、1本鎖または2本鎖の形態の複数のヌクレオチドのポリヌクレオチド、RNA、DNAまたはRNA/DNAハイブリッド配列を含み、本発明の方法を用いて配合し、送達することができるあらゆるサイズのものであってよい。核酸は、「アンチセンス」型であってよい。「核酸由来のもの(entity)」は、全部または一部が核酸により構成されているものを意味する。

【0028】

50

「遺伝子治療剤」は、遺伝物質の取り込みおよび発現のために、治療を受ける個体の細胞に送達されるか、またはその細胞により取り込まれることができることを意図されている薬剤を意味する。遺伝子治療剤は通常、発現に必要な任意の更なる核酸配列にいつでも使えるように連絡されているベクターまたはプラスミドに任意に含まる、問題のペプチド、ポリペプチド、タンパク質または糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0029】

ワクチンまたは遺伝子治療剤の投与に言及するとき、「同時に」という語は同じ24時間以内の2回の投与を意味するのに対して、「逐次的に」または「引き続いて」は投与が24時間以上離れていることを意味する。同時投与は、同じ医療訪問時に行われる投与を指すのに対して、引き続いてまたは逐次的には、個々のワクチンまたは遺伝子療法の効果に
10

【0030】

所望の治療または免疫応答は、ID標的深さに直接に関連する。これらの結果は、真皮の上部領域、すなわち乳頭真皮、もしくは物質が容易に乳頭真皮に拡散するような比較的血管が少ない網様真皮の上の部分への物質の配置により、得ることができる。主として少なくとも約0.025mmから約2.5mmの深さでの物質の配置が好ましい。

【0031】

特にワクチンについては、送達が角質層の直下で、且つ表皮および上部真皮を含む標的深さ(約0.025mmから約2.5mm)で行われることが好ましい。皮膚の細胞を標的とする治療剤の場合には、好ましい標的深さは標的とする個々の細胞に依存する。例えば、ランゲルハンス細胞を標的とする治療剤の場合、送達は、一般的にヒトでは約0.025mmから約0.2mmの範囲の表皮組織深さを、少なくとも一部には、含む必要がある。全身循環を必要とする治療剤の場合、好ましい標的深さは、少なくとも約0.4mm、最も好ましくは少なくとも約0.5mmから約2.5mm以下、より好ましくは約2.0mm以下、最も好ましくは約1.7mm以下までの間であり、所望の真皮層への物質の送達をもたらす。主としてより大きい深さおよび/または下部網様真皮への物質の配置は、通常あまり望ましくないと考えられる。
20

【0032】

本発明によるID投与に用いる真皮アクセス手段は、物質の標的送達深さを得るのに必要な対象の皮膚への挿入深さを提供する限り、重要ではない。ほとんどの場合、装置は皮膚に約0.5~2mmの深さに貫通する。真皮アクセス手段は、単独で、または複数の針の配置で用いられるすべての既知の種類の通常の注射針、カテーテル、マイクロカニューレまたはマイクロニードルを含んでいてもよい。
30

【0033】

真皮アクセス手段により物質の送達の標的深さを変化させることにより、薬剤または物質の挙動を、個々の患者の状態に最も適切な所望の臨床適用に適応させることができる。真皮アクセス手段による物質の送達の標的深さは、専門家が手で、所望の深さに到達したときを示すインジケータ手段の補助を用い、あるいは用いずに調節することができる。しかし、装置は皮内空間内の所望の深さへの皮膚貫通を調節する手段を有することが好ましい。これは、一般には、針が取り付けられている裏打ち構造またはプラットフォームの形をとり得る真皮アクセス手段に関連する拡大部分またはハブにより達成される。真皮アクセス手段としてのマイクロニードルの長さは、製造過程中に容易に変化させることができ、日常的に製造されるマイクロニードルはまた、注射または注入時の疼痛または他の感覚をさらに少なくするために、非常に鋭利で、非常に小さいゲージサイズのものである。それらは、個別の単一内腔マイクロニードルとして本発明に用いることができ、あるいは、送達
40

の速度、すなわち、所定の時間内に送達される物質の量を増加させるために、複数のマイクロニードルの直線状アレイまたは2次元アレイを用いることができる。1つまたは複数の側穴を有するマイクロニードルも真皮アクセス手段として含まれる。マイクロニード
50

ルは、貫通の深さを制限する働きもするホルダーおよびハウジングのような様々な装置に組み込むことができる。本発明の真皮アクセス手段は、送達前の物質を含む貯蔵器もしくは圧力下の薬剤または他の物質を送達するためのポンプまたは他の手段を含んでいてもよい。あるいは、真皮アクセス手段を収納する装置にそのような追加の構成要素を外付けしてもよい。真皮アクセス手段は、偶発的損傷を予防または低減するための受動的または能動的な安全装置を含んでいてもよい。

【0034】

本発明の1つの実施形態において、皮膚表面に垂直に挿入した1つまたは複数の細いゲージのマイクロカニューレを用いてID注射を再現性よく実施することができる。この送達方法（「微小皮膚送達」すなわち「MDD」）は、標準的なマントー方式の注射よりも実施するのが容易で、皮膚への貫通の深さが制限され、制御されるため、侵襲性および疼痛性が少ない。さらに、本発明では遺伝子発現および免疫応答により測定する、標準針と比較して同様または大きい生物学的応答をMDD装置を用いて得ることができる。所与の動物種における所与の物質の最適投与深さは、当業者が過度の実験をすることなく、決定することができる。

10

【0035】

真皮アクセス手段を皮内の適切な深さに入れ、液体の送達量および速度を制御し、物質を漏洩することなく所望の位置に正確に送達することを可能にする送達装置が最も好ましい。マイクロカニューレおよびマイクロニードルを用いる方法論および装置は、特許文献2および特許文献3に記載されている。標準的な鋼製カニューレも、その内容のそれぞれが参照により本明細書に組み込まれている特許文献4に記載されている装置および方法を用いる皮内送達に用いることができる。これらの方法および装置としては、カニューレの全長または深さを制限する装備を超えて露出されているカニューレの全長により定義される貫通深さ制限付きの、より細いゲージの（約30G）「マイクロカニューレ」による物質の送達などが挙げられる。これらの方法および装置は30または31ゲージカニューレによる物質の送達のためのものであるが、本発明は、所望ならば貫通手段の深さの制限または制御を含む34Gまたはより細い「マイクロカニューレ」も用いる。物質の標的送達は、単一マイクロカニューレまたはマイクロカニューレのアレイ（または「マイクロニードル」）を介して、例えば、投与する物質が含まれている貯蔵器を含むか、あるいは貯蔵器に取り付けることができる注入装置に装着された3～6本のマイクロニードルを介して達成することができることは、本発明の範囲内である。

20

30

【0036】

本発明の方法を用いて、ワクチンおよび遺伝子治療剤をポラスとして、もしくは注入により投与することができる。ポラス投与または送達を、速度調節手段、例えば、ポンプにより、もしくは特定の速度調節手段のない、例えば、使用者の自己注射により行うことができることは理解される。上記の利点は、表皮を含む皮膚組織コンパートメントへの物質の標的を定めた正確な直接送達により最もよく認識される。これは、例えば、外径が約250ミクロン未満で、露出長が2mm未満のマイクロニードルシステムを用いて達成される。「露出長」とは、患者の皮膚に貫通させるために利用可能な細い中空カニューレまたは針の長さを意味する。そのようなシステムは、鋼鉄、ケイ素、セラミックおよび他の金属、プラスチック、ポリマー、糖、生物学的および/または生分解性材料および/またはそれらの組合せなどの様々な材料に対する既知の方法を用いて構築することができる。

40

【0037】

皮内投与方法の一定の特徴が最も効果的な結果をもたらすことが見出された。例えば、針出口を皮膚内に入れることが、ワクチンまたは遺伝子治療剤の送達に対する臨床的応答に有意に影響することが判明した。15度以下の角度で切断された傾斜角度を有する従来型または標準ゲージ針の出口は、比較的大きい「露出高さ」を有する。本明細書で用いているように、露出高さという用語は、傾斜切断に起因するカニューレの軸方向の開口部の長さを指す。標準針を皮内空間内の所望の深さに（皮膚に対して約90度で）入れるとき、これらの針の出口の露出高さが大きいため、皮膚自体によってかけられる背圧、もしくは

50

注射または注入により蓄積しつつある液体により増加した圧力により物質が通常皮膚から流出する。一般的に、本発明の露出高さは0～約1mmである。0mmの露出高さを有する針の出口は、傾斜の切断がなく（すなわち、傾斜角度90度）、この出口は針の先端にある。この場合には、出口の深さが針の貫通の深さと同じである。傾斜切断または針の側面の開口により形成された針の出口は、測定可能な露出高さを有する。傾斜を有する針では、針出口の露出高さは、針の直径と一次傾斜切断の角度（「傾斜角度」）により決定される。一般的に、20°を超える傾斜角度が好ましく、より好ましくは25°から40°の間である。単一針は皮膚空間への物質の送達に適する複数の開口部または出口を有してよいことが理解される。

【0038】

したがって、露出高さ、および側面に開口部を有するカニューレの場合には、カニューレの軸に沿うその位置は、物質が送達される深さと特定性に寄与する。送達速度および送達される液体の総容積のようなカニューレ単独またはカニューレと組み合わせて考慮される他の因子は、物質の標的送達に寄与し、結果を最適化するためにそのようなパラメーターを変化することは本発明の範囲内にある。

【0039】

注射または注入の圧力を制御することにより、ID投与中に高い背圧がかかるのを回避することができることも見出されている。液体界面に一定の圧力を直接かけることにより、吸収を最適化し、送達されるワクチンまたは治療剤の用量に対する改善された応答を得ることができる、より一定の送達速度を達成することができる。送達速度および容積は、送達部位における膨疹を防ぎ、背圧により真皮アクセス手段が皮膚から押し出されることを防ぐためにも制御することができる。選択する物質についてこれらの効果を得るための適切な送達速度および容積は、通常の技術を用い、過度の実験を行わずに実験的に決定することができる。複数の針の間隔を増加させることにより、より広い液体分布と送達速度の増加またはより大きい液体の容積が可能になる。

【0040】

一実施形態において、物質を送達するために、真皮アクセス手段を対象の皮膚に隣接させて置き、皮内空間内に直接に標的を定めたアクセスを行い、1つの物質または複数の物質を、それらが局所的に作用するか、または血流により吸収されて、全身に分布することができる皮内空間に送達または投与する。他の実施形態において、真皮アクセス手段を皮膚表面に実質的に垂直に置いて、1つまたは複数のカニューレを垂直に挿入する。真皮アクセス手段は、送達する1つの物質または複数の物質を含む貯蔵器に接続することができる。送達または投与する1つの物質または複数の物質の形態は、薬学的に許容できる希釈剤または溶媒中その溶液、乳剤、懸濁剤、ゲル、懸濁または分散されたミクロ粒子およびナノ粒子のような粒子ならびに上記の*in situ*形成ビヒクルなどである。貯蔵器から皮内空間への送達は、送達する1つの物質または複数の物質に対して外圧または他の駆動手段を加えずに受動的に、および/または圧力または他の駆動手段を加えて能動的に起こり得る。好ましい圧力発生手段の例としては、ポンプ、注射器、弾性膜、気体圧力、圧電性、起電性、電磁氣的ポンプ作用、つる巻きばねまたはさらばねまたは座金もしくはそれらの組合せなどがある。所望ならば、物質の送達の速度を圧力発生手段により様々に制御することができる。その結果、物質が皮内空間に入り、臨床的に有効な結果を得るのに十分な量および速度で吸収される。

【0041】

本発明の方法により送達させることができる物質には、担体、アジュバントおよびビヒクルを含むかまたは含まないワクチンが含まれ、これらには予防および治療用抗原が含まれ、これらには以下のものが含まれるがこれに限定されない：サブユニットタンパク質、ペプチドおよび多糖、多糖複合体、トキシイド、遺伝子ベースのワクチン、弱毒化生細菌またはウイルス、突然変異細菌またはウイルス、再構築細菌またはウイルス、不活化細菌またはウイルス、全細胞またはその成分（例えば、哺乳類細胞）、細胞ワクチン（例えば、自己由来樹状細胞）またはその成分（例えば、エキソソーム、デキソソーム、膜断片また

10

20

30

40

50

は小胞)、生ウイルス、生菌、以下のものに関連するアデノウイルス、レトロウイルス、アルファウイルス、フラビウイルスおよびワクシニアウイルスに由来するものを含むウイルスおよび菌ベクター:依存症(例えば、コカイン依存症)、悪性膿疱、関節炎、コレラ、ジフテリア、デング、破傷風、狼瘡、多発性硬化症、寄生虫症、乾癬、ライム病、髄膜炎菌症、はしか、流行性耳下腺炎、風疹、水疱、黄熱、RSウイルス、ダニ媒介日本脳炎、肺炎球菌、天然痘、レンサ球菌、ブドウ球菌、腸チフス、インフルエンザ、A、B、CおよびE型肝炎を含む肝炎、中耳炎、狂犬病、ポリオ、HIV、パラインフルエンザ、ロタウイルス、エプスタイン-バーウイルス、CMV、クラミジア、不定型ヘモフィルス、ヘモフィルスインフルエンザB(HIB)、モラキセラカタラーリス、ヒト乳頭腫ウイルス、BCGを含む結核、淋病、喘息、アテローム硬化症、マラリア、大腸菌(*E. coli*)、アルツハイマー病、ピロリ菌(*H. Pylori*)、サルモネラ、糖尿病、癌、単純ヘルペス、ヒト乳頭腫、ペスト菌(*Yersinia pestis*)、旅行者の疾患、西ナイル脳炎、カンピロバクター(*Campylobacter*)、クロストリジウムディフィシレ(*C. difficile*)。遺伝子免疫法用の適切な例としての組成物は、例えば、特許文献5、特許文献6および特許文献7に記載されている。

10

【0042】

本発明の方法により誘導することができる特に好ましい物質には、疾患の予防、診断、緩和、治療または治療薬に用いる核酸、核酸由来物質および遺伝子治療剤等が含まれる。ワクチンに含める適切なアジュバントは、当業者に知られている。本発明に用いることができる免疫応答を増強するための追加の物質は、参照により本明細書に組み込まれている特許文献8に記載されている。

20

【0043】

特に好ましい遺伝子治療剤には、メラノーマ、皮膚T細胞リンパ腫、カポシ肉腫、皮膚扁平細胞癌および基底細胞癌を含むが、これらに限定されない癌、アデノシンデアミナーゼ欠乏症、乾癬を含むがこれに限定されない過増殖性皮膚疾患、表皮剥離性角化症、表皮水疱症、層状魚鱗癬およびX染色体性魚鱗癬を含むがこれらに限定されない遺伝性皮膚疾患、血友病、のう胞性線維症、成長障害、ヒト成長ホルモン欠損症を含むがこれに限定されないホルモン欠損症、アテローム硬化症、トランスフェリン欠乏の治療に適応とされているもの、ならびに創傷治癒および組織再生に適応とされている遺伝子治療剤が含まれる。適切な遺伝子治療剤用の適切な例としての組成物は、例えば、特許文献9に記載されている。

30

【0044】

物質は、薬学的に許容できる形態で皮膚内に送達することができる。本発明の方法に用いることができるワクチンは、当業者に知られているような、特定の製剤に適したアジュバントおよび担体またはビヒクルを含んでいてよい。

【0045】

アレルゲン組成物の製剤を含む本発明用の薬学的に許容できるペプチドおよびポリペプチド製剤も当技術分野でよく知られている。本発明の方法において使用する核酸は、RNAまたはDNAもしくはその組合せであってよい。それらは、ID投与ならびに細胞による取り込みおよび発現に適するあらゆる物理的形態であってよい。DNAおよび/またはRNAは、ウイルスベクターまたはリポソームに含まれていてよく、あるいは、当技術分野で知られているプラスミドのような遊離ポリヌクレオチドとして送達してもよい。核酸は、一般的に核酸と適合性のある液剤、ゲル剤または懸濁剤のような薬学的に許容できる処方剤として調合される。

40

【0046】

一般的に、ワクチンまたは他の薬剤を投与するために専門家はセプタムで密封したバイアルから注射器を用いて適切な容量を取り出すであろう。次に、この同じ注射器を用いて患者にワクチンを投与する。しかし、一般的に長さが0.1~2mmのマイクロニードルまたはマイクロカニューレは、セプタムに完全に貫通させるのに長さがやや不適切であることに加えて、患者にその後を用いるために十分な鋭利さとまっすぐな形状を維持しつつ薬

50

剤を抽出するためにバイアルのセプトラムを穿刺するには一般的に脆弱すぎる。セプトラムを穿刺するのにそのような微小装置を用いることで、針の内腔の詰まりをきたす場合もある。さらに、細いゲージ、一般的に31~50ゲージのマイクロカニューレは、例えば、針から注射器に移すことができる容量を著しく減少させる。これは、通常の器具を用いてバイアルから液体を速やかに移すことに慣れているほとんどの専門家にとって不便であり、専門家が患者に費やす時間が著しく増加するであろう。微小装置の広範にわたる使用に際して考慮すべき追加の因子には、微小装置により使用されるかまたは送達される低減された総容積(10~100 μ l)に適應するように、ほとんどの薬剤およびワクチンを処方しなおす必要があることが含まれる。したがって、送達する物質と組み合わせた装置、またはそれに組み込むのに適した装置を含むキットを提供することが望ましいであろう。

10

【0047】

投与器具と治療用組成物を含むキット等は、当技術分野でよく知られている。しかし、薬剤およびワクチンの送達のための侵襲が最小限のID微小装置の適用は、免疫応答および治療応答を可能にするための処方剤を投与することに関して安全で、有効的かつ一貫性のある手段を提供するための、処方剤と装置の結びつけの直接的な必要性を明確に示している。

【0048】

本発明により提供されるキットは、物質を0.025~2mmの深さに皮内送達するように設計された少なくとも1つの中空マイクロニードルを有し、マイクロニードルが、ワクチンまたは遺伝子治療薬の所定用量を含むようになされた貯蔵器と流体で連通するか、または流体連結することができるように配置された送達装置を含む。好ましい実施形態において、キットは、送達装置の一体部分であるか、または、それに機能的に取り付けることができる貯蔵器に任意に含まれている、有効量のワクチンまたは遺伝子治療薬も含有する。中空マイクロニードルは、好ましくは約31~50ゲージであり、例えば、3~6本のマイクロニードルのアレイの一部であってよい。

20

【0049】

特に好ましい実施形態において、本発明のキットは、ワクチンを貯蔵する事前に充てん可能な貯蔵器に取付け可能であるハブ部分と、前記ハブ部分により支持され、前記ハブ部分から離れるように延びる前方先端部を有する少なくとも1つの中空マイクロニードルと、前記マイクロニードルを囲み、前記ハブ部分から前記マイクロニードルの前方先端部に向かって離れるように延びるリミッター部分を含み、前記リミッターが前記マイクロニードルの軸に概ね垂直な面内に延びる概ね平らな皮膚係合面を含み、ワクチンの皮内注射を行うために哺乳類の皮膚に受け入れられるのに適しており、前記1または複数のマイクロニードルの1または複数の前方先端部が前記皮膚係合面を約0.5から2.0mmの距離を超えて延びており、前記リミッター部分が哺乳類の皮膚の真皮層内へのマイクロニードルの貫通を制限している。

30

【0050】

本発明により想定されるようにキットを使用するために、専門家は、密封シールを破って、微小装置、ならびに場合によりワクチンまたは免疫原性若しくは治療用組成物へのアクセスを可能にするであろう。組成物は、ゲル、ペースト、油状、乳状、粒子、ナノ粒子、マイクロ粒子、懸濁または液状(但しこれらに限定されない)を含めた任意の形態で微小装置内にあらかじめ充てんすることができる。組成物は、キットパッケージ、例えば、貯蔵器、バイアル、チューブ、プリスター、ポーチ内等に別個に包装されていてよい。処方剤の1つまたは複数の構成成分は凍結乾燥、乾燥、噴霧乾燥されているか、または他の任意の再構成可能な形態であってよい。所望ならば、様々な再構成媒体、洗浄または消毒剤もしくは局所滅菌剤(アルコールワイプ、ヨウ素)をさらに供給することができる。専門家は、必要な場合、物質を装置に充てんまたは組み込み、次いでID注射微小装置を用いて患者に処方剤を投与するであろう。

40

【0051】

50

本発明を一般的に記述したが、以下の具体的であるが、限定的でない実施例および図を参照して、本発明を実施するために種々の例を示す。

【0052】

単一針を含む真皮アクセス微小装置（MDD装置）の代表的サンプルを34ゲージのステンレスストック（Micro Group, Inc.、Medway、MA）から調製し、単一の28°傾斜を800グリットカーボランダム研削ホイールを用いて研削した。針をアセトンおよび蒸留水中での逐次的に超音波処理により清浄にし、蒸留水を用いて流出をチェックした。マイクロニードルを紫外線硬化性エポキシ樹脂を用いて小ゲージカテーテルチューブ（Maersk Medical）に固定した。針の長さを機械的割出しプレートを用いて設定し、カテーテルチューブのハブを深さ制限調節具として機能させ、光学顕微鏡により確認した。露出した針の長さを割出しプレートを用いて1mmに調節した。注射器との接続は、カテーテルの入り口で一体型ルアーアダプターを介して行った。注射の間に、針は皮膚表面に垂直に挿入され、ボラス送達のために手で緩やかに押すことにより所定の位置に保持した。注射の直前と直後に装置の機能と液体の流れを点検した。特許文献10に記載されているように深さ制限ハブにより制御されている1.5mm露出長を有する30/31ゲージ皮内針装置もいくつかの実施例で用いた。

10

【実施例1】

【0053】

モデル遺伝子治療剤/予防剤のID送達および発現、モルモットモデル細胞による*in vivo*でのDNAの取り込みと発現は、有効な遺伝子治療および遺伝的免疫化に重要である。リポーター遺伝子ホタルルシフェラーゼをコードするプラスミドDNAをモデル遺伝子治療剤（Aldevron、Fargo、ND）として用いた。DNAをHartleyモルモット（Charles River、Raleigh、NC）に標準30G針を用いてマントー法により皮内（ID）投与（ID-マントー）するか、またはほぼ垂直に挿入した長さが1mmの34G鋼製マイクロカニューレ（MDD装置）を用いてMDDによりID送達した（ID-MDD）。剃毛した皮膚にプラスミドDNAを陰性対照として局所適用した（プラスミドの大きさが大きすぎて、皮膚への受動取り込みができない）。総投与量は動物当たり100μgであり、40μl PBSの総投与容量で1cc注射器を用いて急速ボラス注射（1分未満）として送達した。投与部位の全層皮膚生検試料を送達の24時間後に収集し、ホモジナイズし、市販のアッセイ（Promega、Madison、WI）を用いてルシフェラーゼ活性を測定するためにさらに処理した。ルシフェラーゼ活性は、BCAアッセイ（Pierce、Rockford、IL）により測定した組織試料中の総タンパク質含量に対して標準化し、総タンパク質1mg当たりの相対光単位（RLU）として表す（マントーおよび陰性対照については群当たりn=3、MDD装置についてはn=6）。

20

30

【0054】

結果（図1）は、両ID注射群における強いルシフェラーゼ発現を示している。MDDおよびマントー群における平均ルシフェラーゼ活性は、陰性対照よりそれぞれ240および220倍高かった。局所対照におけるルシフェラーゼ発現レベルは、無処置皮膚部位よりも有意に大きくなかった（データは示さず）。これらの結果は、MDD装置を用いた本発明の方法は、ID組織への遺伝物質の送達に関してマントー法と少なくとも同様に有効であり、皮膚細胞による*in vivo*での有意なレベルの局在化遺伝子発現をもたらすことを示している。

40

【実施例2】

【0055】

モデル遺伝子治療剤/予防剤のID送達および発現、ラットモデル複数の動物種にわたるこのプラットフォームの有用性を評価するために、上の実施例1に記載したのと同様の（マントー対照を用いない）実験をBrown-Norwayラット（Charles River、Raleigh、NC）において実施した。総プラスミドDNAの供給を50μlの容量のPBS中50μgに減少させたことを除いて、実施例

50

1と同じプロトコルを用いた。さらに、ID注射した(MDD装置を用いて)無関係のプラスミドDNA(b-ガラクトシダーゼをコードする)を陰性対照として用いた(群当たり動物n=4)。皮膚におけるルシフェラーゼ活性を上の実施例1に記載したように測定した。

【0056】

図2に示す結果は、MDD装置によるID送達後の非常に有意な遺伝子発現を示している。回収された皮膚部位におけるルシフェラーゼ活性は、陰性対照より3000倍を超えて大きかった。これらの結果は、皮膚による高レベルの遺伝子発現をもたらす、遺伝子ベースのものを*in vivo*で送達する際の、本発明の方法の有用性をさらに示している。

【実施例3】

【0057】

モデル遺伝子治療剤/予防剤のID送達および発現、ブタモデル

ブタは、皮膚を用いる送達試験の好ましい動物モデルとして長年にわたり認識されている。ブタ皮膚は、全層および毛嚢密度についてげっ歯類皮膚よりもヒト皮膚に類似している。したがって、ブタモデル(ヨークシャー種ブタ、Archer Farms、Belcamp、MD)をヒトにおけるこのシステムの有用性を予測する手段として用いた。実験は、異なるリポーター遺伝子系-b-ガラクトシダーゼ(Aldenvron、Fargo、ND)を用いたことを除いて、上の実施例1および2と同様に実施した。総送達用量は、50μl容量中50μgであった。DNAは次の方法を用いて注射した。すなわち、i)30G針および注射器を用いてマントー法により、ii)針貫通深さを1.5mmに制限する装備を装着した30/31G針を用いて皮膚への垂直挿入によるID送達により、iii)針貫通深さを1.0mmに制限する装備を装着した34G針を用いて皮膚への垂直挿入によるID送達(MDD装置)により注射した。陰性対照群は、ホタルルシフェラーゼをコードする無関係のプラスミドDNAのi~iiiによるID送達からなっていた。(IDマントー群の4匹のブタの皮膚部位n=11;ID、30/31G、1.5mm装置の4匹のブタの皮膚部位n=11;ID、34G、1mm装置の4匹のブタの皮膚部位n=10;陰性対照の4匹のブタの皮膚部位n=19)陰性対照については、3つの方法すべてが同等の結果をもたらしたので、3つのID送達法からのすべてのデータを併合した。

【0058】

組織中のリポーター遺伝子活性は、ルシフェラーゼアッセイの代わりにb-ガラクトシダーゼ検出アッセイ(Applied Biosystems、Foster City、CA)を用いたことを除いて、本質的に、実施例1に記載した通りに測定した。

【0059】

図3に示される結果は、3種すべてのID送達の後の皮膚における強いリポーター遺伝子発現を示している。IDマントー群における応答がバックグラウンドの100倍であったのに対して、ID、34G、1mm(MDD)群ではバックグラウンドより300倍増加し、ID、30G、1.5mm(30g、1.5mm)群ではバックグラウンドより20倍増加した。摘出した皮膚組織生検により回収したリポーター遺伝子の平均活性により測定した、皮膚細胞による総リポーター遺伝子発現は、ID、34G、1mm(MDD)群で563,523RLUと最も強かったのに対して、30Gマントー群では200,788RLU/mg、ID(30g、1.5mm)群では42,470RLU/mg、陰性対照では1,869RLU/mgであった。したがって、34G、1.0mm針(MDD)の垂直挿入によるID送達は、標準マントー方式注射、またはより長く(1.5mm)、より太い(30G)針を用いた同様の垂直針挿入および送達と比較して、皮膚細胞によるDNAの優れた取り込みおよび発現をもたらす。これらの3種の装置および方法を用いた可視色素を送達する同様の試験においても、34G、1.0mm針が、他の2つの針/方法よりもID組織への一貫性のある送達をもたらし、皮下(SC)組織への投与量の「あふれ出し」が少ないことが示されている。

【0060】

10

20

30

40

50

3種の装置および方法のすべてが理論的に同じ組織空間を標的としているので、これらの差は予想されなかった。しかし、深さ制限ハブによりカニューレの長さを制御することにより実現される実質的に垂直な挿入技法と比較して、側方挿入(マントー)法を用いて送達の深さを制御することははるかに困難である。さらに、針挿入深さおよび針出口の露出高さは、SC「あふれ出し」または皮膚表面上の漏れを伴うことのない再現性のよいID送達に関連する重要な特徴である。

【0061】

これらの結果はさらに、皮膚細胞による高いレベルの遺伝子発現ををもたらす、遺伝子ベースのものより大型哺乳類における*in vivo*送達に関する本発明の方法の有用性を示している。さらに、ブタとヒトとの皮膚組成が類似していることから、ヒトにおいて同等の臨床的改善が得られるはずである。

10

【実施例4】

【0062】

ID送達後の限局性組織損傷の間接的測定

上の実施例3に示した結果は、標準針を用いたマントー法により達成される有効性と比較してMDDを用いるID送達により達成される有効性の予想されない改善があるということを示唆する。さらに、MDDカニューレは、標準針と比べて挿入深さが浅く、マントー方式の注射のようにID組織に側方から「くねって進める」ことがないため、機械的に破壊する組織の全範囲はより小さい。組織損傷および炎症は、数種の炎症性タンパク質、ケモカイン、サイトカインおよび他の炎症メディエータの放出をもたらす。

20

【0063】

したがって、回収された皮膚部位の総タンパク質含量は、2種の送達法により引き起こされる組織損傷および限局性炎症の間接的尺度として用いることができる。総タンパク質のレベルは、上の実施例3で示したブタサンプル(30g、1.5mmを除く)からの回収皮膚生検試料についてBCAアッセイ(Pierce, Rockford, IL)を用いて測定した。図4に示すように、両送達法は無処置皮膚と比べて総タンパク質含量の増加を誘発した。しかし、IDマントー群の回収皮膚生検試料中の総タンパク質濃度は、MDD群における対応する値よりも有意に($p = 0.01$, t 検定)大きかった(2.4mg/ml対1.5mg/ml)。これらの結果は、本発明の方法による送達により引き起こされる組織の機械的損傷がマントー方式のID注射により引き起こされる対応する損傷よりも少ないことを強く示唆する間接的証拠を提供している。

30

【実施例5】

【0064】

ラットにおけるID送達後のインフルエンザDNAワクチンに対する免疫応答の誘導

上に示した実施例で、細かいゲージのマイクロカニューレを用いてモデル核酸ベースの化合物を皮膚に効果的に送達することができ、皮膚細胞による高いレベルの遺伝子発現がもたらされることが示されている。本発明の方法によるDNAワクチンの送達の有用性を検討するために、ラットをA/PR/8/34株からのインフルエンザウイルス赤血球凝集素(HA)をコードするプラスミドDNAで免疫化した(プラスミドはDr. Harriet Robinson, Emory University School of Medicine, Atlanta, GAにより提供された)。Brown-Norwayラット(群当たり $n = 3$)を、実施例2に記載するようにMDD装置を用いたIDまたは従来の30G針および1cc注射器を用いた四頭筋へのIMによりPBS溶液中のプラスミドDNA(50 μ lの容量でラット1匹当たり50 μ gが急速ボラス注射により送達される)で3回(0、21および42日目)免疫化した。陰性対照として、DNAを無処置皮膚に局所的に適用した。血清を3、5、8および11週目に収集し、インフルエンザ特異的抗体の存在についてELISAにより分析した。簡単に述べると、マイクロタイターウエル(Nalge Nunc, Rochester, NY)を0.1 μ gの全不活化ウイルス(A/PR/8/34, Charles River SPAFAS, North Franklin, CT)で4で一夜被覆した。PBS + 5%スキムミルク中37

40

50

で1時間ブロックした後、プレートを試験血清の連続希釈物と共に37℃で1時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合IgG、H+L鎖(Southern Biotech、Birmingham、AL)と共に37℃でさらに30分間インキュベートし、次いで、TMB基質(Sigma、St. Louis、MO)を用いて展開した。吸光度測定値(A₄₅₀)をTecan Sunrise(商標)プレートリーダー(Tecan、RTP、NC)で読み取った。

【0065】

結果(図5)は、添加アジュバントの非存在下での遺伝子インフルエンザワクチンの本発明の方法による送達により、強いインフルエンザ特異的血清抗体応答が誘導されることを示している。この応答の大きさは、すべての測定時点においてIM注射により誘導された応答と同等であった。局所対照では検出可能な応答は認められなかった。したがって、本発明の方法による遺伝子ワクチンの送達は、通常のIM注射経路により誘導されるものと同程度以上の強さの免疫応答を誘導する。

【0066】

アジュバント添加遺伝子ワクチンの本発明の方法による送達をさらに検討するために、上記のインフルエンザHAをコードするプラスミドDNAを製造業者の手引書に従ってMPL+TDM Ribiaアジュバントシステム(RIBI Immunochemicals、Hamilton、MT)を用いて調製した。上記のように、ラット(群当たりn=3)を免疫化し、インフルエンザ特異的血清抗体について分析した。ID送達群における力価は、1回目および2回目免疫化後においてはIMと同等であった(3~5週目、図6)。しかし、3回目の投与後には、ID誘導力価はIM注射により誘導された対応する力価よりも有意に大きかった(p=0.03、t検定による)(図6)。11週目には、平均ID誘導力価は、IM注射により達成されるわずか4,600と比較して、42,000であった。局所対照は、インフルエンザ特異的応答を示さなかった。したがって、アジュバントの存在下での遺伝子ワクチンの本発明の方法による送達は、通常のIM注射経路により誘導されるものよりも強い免疫応答を誘導する。

【実施例6】

【0067】

ラットにおけるID送達後のインフルエンザDNA/ウイルス「初回抗原刺激-追加免疫」に対する免疫応答の誘導

HIVを含む多数の疾患に対する最近開発されたワクチン接種手法は、最初の「初回抗原刺激」免疫化と2回目の「追加免疫」で異なるワクチンのクラスを用いるいわゆる「初回抗原刺激-追加免疫」手法である(非特許文献15)。例えば、プラスミドDNAワクチンで初回抗原刺激した後、サブユニットタンパク質、不活化ウイルスまたはベクター化DNA調製物で追加免疫した。これらのタイプのワクチン接種法の本発明の方法による送達を検討するために、実施例5の最初の実験をさらに6週間継続した。11週目に、DNAで初回抗原刺激したラットに全不活化インフルエンザウイルスを追加免疫した(A/PR/8/34、急速ボラス注射により50μlの容量のPBS中100μg)。ウイルスは、Charles River SPAFAS(North Franklin、CT)から入手した。インフルエンザ特異的血清抗体力価は、13および17週目に上記のようにELISAにより測定した。ID送達およびIM注射の両方により強い追加免疫効果が誘発された(図7)。17週目の平均インフルエンザ特異的抗体力価は、両送達法で同等であり(力価=540,000)、単独局所送達後に認められた非常に弱い力価(力価=3200)よりも有意に大きかった。したがって、本発明の方法による送達は、「初回抗原刺激-追加免疫」免疫法に適しており、通常のIM注射経路により誘導されたものと同程度以上の強さの免疫応答を誘導する。

【0068】

「初回抗原刺激-追加免疫」応答に対するアジュバントの効果を評価するために、実施例5に記載した第2の実験をさらに6週間継続した。11週目に、DNAで初回抗原刺激したラットに全不活化インフルエンザウイルスを追加免疫した(A/PR/8/34、上記

のように急速ボーラス注射により容量 50 μ l 中 100 μ g)。インフルエンザ特異的血清抗体力価は、13 および 17 週目に上記のように ELISA により測定した。ID 送達および IM 注射の両方により強い追加免疫効果が誘発された(図 8)。ID 送達群における平均力価は、ウイルス追加免疫後に IM 注射によるものよりも大きく、13 週目における ID - MDD (MDD) 平均力価は、IM 注射での 240, 000、単独局所適用での 3, 200 と比較して、540, 000 であった。したがって、本発明の方法による送達は、アジュバントを含めた「初回抗原刺激 - 追加免疫」免疫法に適しており、通常の IM 注射経路により誘導されたものよりも強い免疫応答を誘導する。

【実施例 7】

【0069】

ラットにおける ID 送達後のインフルエンザウイルスワクチンに対する免疫応答の誘導
本発明の方法による通常のワクチンの送達の有用性を検討するために、ラットを ID 送達、または標準針および注射器を用いた筋肉内 (IM) 注射により実施例 6 に記載したように不活化インフルエンザウイルス調製物で免疫化した。陰性対照として、ワクチン溶液を無処置皮膚に局所適用した。不活化インフルエンザウイルスの分子量が大きいため、受動局所吸収による有効な免疫化が妨げられる。上記のように、ワクチンの用量は、動物 1 匹当たり容量 50 μ l 中 100 μ g 総タンパク質であり、急速ボーラス注射 (1 分以内) により送達された。ラットを 3 回 (0、21 および 42 日目) 免疫化し、21、35、56 日目に血清を収集し、上記のように ELISA によりインフルエンザ特異的抗体について分析した。群当たり n = 4 ラット。

【0070】

図 9 に示す結果は、ID 送達が強い抗原特異的免疫応答を誘導することを示している。2 注射経路、IM と ID により同様なレベルの抗体が誘導された。ピーク幾何平均力価は、IM 注射での 102, 400 に比較して、ID - MDD (MDD) 群ではいくぶん高い 147, 200 であった。ワクチンの局所適用は、非常に弱い応答を刺激したにすぎなかった (最大平均力価 = 500)。したがって、高用量の通常のワクチンの ID 送達は、通常の IM 注射経路により誘導されたものと少なくとも同程度の強さの免疫応答を誘導する。

【実施例 8】

【0071】

ブタにおける ID 送達後のインフルエンザワクチンに対する免疫応答の誘導
上記のように、ブタはヒト皮膚に極めてよく類似した魅力的な皮膚モデルを提示している。ワクチン送達における ID 送達装置を試験するために、ヨークシャーブタを上記のように不活化インフルエンザワクチンで免疫化し、ID 送達と IM 注射とを比較した。ブタを 0、21 および 49 日目に免疫化し、14、36、49 および 60 日目に上記のように血清を収集し、ELISA によりインフルエンザ特異的抗体について分析した。ブタ特異的第 2 次抗体は、Bethyl Laboratories (Montgomery, TX) から入手した。

【0072】

結果 (図 10) は、ID 送達が、強い抗原特異的免疫応答を誘導することを示している。2 注射経路、IM と ID により同様なレベルの抗体が誘導された。ピーク幾何平均力価は、IM 注射での 667 に比較して、MDD 群でわずかに高い 1, 333 であった。したがって、高用量の通常のワクチンの ID 送達は、通常の IM 注射経路により誘導されたものと少なくとも同程度の強さの免疫応答を誘導する。

【実施例 9】

【0073】

低用量のインフルエンザワクチンの ID 送達
実施例 7 では、ラットを ID 注射、または通常の針および注射器を用いた IM により 100 μ g の不活化インフルエンザウイルスで免疫化した。そのような高い用量では、最後の時点では ID 誘導力価が IM 誘導力価よりもわずかに高かったが、両送達法は同様なレベルの血清抗体を誘導した。

10

20

30

40

50

【0074】

送達の方法と用量レベルとの間の関係をさらに試験するために、上記のIDおよびIM投与経路を用いて、ラットを動物当たり1 μ gから0.01 μ gの範囲の低くした用量の不活化インフルエンザウイルスで免疫化した。ラットを3回(0、21および42日目)免疫化し、21、35、56日目に血清を収集し、血清抗インフルエンザ抗体について分析した(群当たりn=4ラット)。21日目および35日目に同様な傾向が観測されたが、図11に示すデータは56日目の力価を反映している。ID送達(MDD)は、試験した3用量で大きさが有意には異ならない、有意な抗体応答をもたらした。すなわち、0.01 μ g(10ng)と同程度の低い用量の送達は、100倍多いワクチン(1 μ g)を用いて観測される力価に匹敵する力価を誘導した。対照的に、IM用量を1 μ gから0.1 μ gに減量したとき、用量をさらに0.01 μ gに減量したときもまた、力価の有意な低下が認められた。さらに、ID送達により誘導された力価の変動はIMと比較してかなり低かった。特に、ID投与部位に目に見える副作用(皮膚における有害効果)は観測されなかった。

10

【0075】

結果は、本発明の方法によるID送達はIM注射と比較してワクチンの用量の有意な(少なくとも100倍)減量を可能とすることを強く示している。ナノグラム量のワクチンを用いて有意な免疫応答が認められた。臨床段階で同様な利点が予想されよう。

【0076】

本明細書に記載した結果は、ワクチンおよび遺伝物質のID注射は本発明の方法を再現性よく達成することができることを示している。この送達方法は、標準マントー方式注射またはIMよりも遂行するのが容易であり、一実施形態において、皮膚への貫通深さを制限し、制御することにより、侵襲性および疼痛性が少ない。さらに、この方法は、通常の針を用いるマントー方式注射よりも再現性のよいID送達を可能にし、上記のような結果として得られる利点を伴った皮膚細胞への標的設定の改善をもたらす。

20

【0077】

さらに、この方法は、全不活化ウイルスワクチンおよびDNAプラスミドと適合性があり、ウイルス粒子またはプラスミドDNAがin vivoでのID送達に伴う比較的高い圧力でマイクロカニューレを通過するとき、ウイルス粒子またはプラスミドDNAがせん断または分解される場合に起こるような生物学的有効性における関連した任意の低下がない。本明細書に詳述した結果は、より強い免疫応答が、ID送達により、特に低いワクチン用量で誘導され、したがって、ヒトにおける有意な用量の減量および混合ワクチン(combination vaccines)を潜在的に可能にすることを示している。

30

【0078】

上に示した結果は、通常の針および注射器を用いる標準筋肉内(IM)注射と比較して、上記のような装置を用いたID送達による改善された免疫化を示している。用量減量試験(実施例9)は、ID送達がIM注射で必要とされるワクチンよりも少なくとも100倍少ないワクチンを用いてラットにおけるインフルエンザワクチンに対する血清抗体応答を誘導することを示している。臨床段階で適用可能ならば、そのような用量の減量は全世界で共通のインフルエンザワクチンの不足の問題の軽減または解消につながるであろう。さらに、そのような用量の減量の可能性は、単回投与量でより多数のワクチン抗原の送達を可能とし、したがって、混合ワクチンを可能とする。このアプローチは、防御免疫を誘導するために数種の遺伝的変異体/亜株で同時に免疫化する必要があると考えられるHIVワクチンに特に適切なものである。

40

【0079】

本発明の方法および装置を用いる免疫系の標的設定の改善により、他の種類の予防および治療ワクチン、免疫治療薬および細胞ベースのものについて同様の利点が予想される。

【0080】

他の実施形態において、免疫学的または治療応答の改善をもたらすために、本発明のID送達を、伝統的な投与方法、例えば、IP、IM、鼻腔内若しくは他の粘膜経路、または

50

SQ注射、局所、または皮膚擦過法と組み合わせることは、本発明の範囲内である。これは、同じまたは異なるクラスのワクチンおよび/または治療剤、ならびに同時または逐次投与を含むであろう。

【0081】

本明細書で引用したすべての参考文献は、参照により本明細書に組み込まれている。本明細書における参考文献の考察はそれらの著者によって行われた主張を単に要約することを意図したものであり、どの参考文献も特許性に関連する従来技術を構成することについて承認を行わない。出願者らは、引用した参考文献の正確さおよび適切性を吟味する権利を保有する。

【0082】

本明細書で例示し、考察した実施形態は、発明者らに知られている発明を行い、使用する最良の方法を当業者に教示することのみを意図したものであり、本発明の範囲を限定するものとみなすべきでない。本発明の典型的な具体例としての実施形態は、上の教示事項に照らして当業者により了解されるように、本発明から逸脱することなく、修正または変更し、要素を加えまたは省略することができる。したがって、特許請求の範囲またはそれらの同等事項の範囲内で、本発明は、具体的に記載した以外の別の方法で実施することができることを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】ホタルルシフェラーゼをコードするプラスミドDNAの送達後のモルモット皮膚におけるリポーター遺伝子活性を示す。結果は、マントー法による皮内送達、本発明の送達方法、および剃毛した皮膚にプラスミドDNAの局所適用を行った対照群について、相対光単位(RLU)/mgタンパク質として示す。

【図2】ホタルルシフェラーゼをコードするプラスミドDNAの送達後のラット皮膚におけるリポーター遺伝子活性を示す。結果は、微小皮膚送達法(本発明の一実施形態、MDD)による皮内送達、および無関係のプラスミドDNAを注射した対照群について、RLU/mgタンパク質として示す。

【図3】 - ガラクトシダーゼをコードするプラスミドDNAの送達後のブタ皮膚におけるリポーター遺伝子活性を示す。結果は、マントー法による、それぞれ1mmおよび1.5mmの深さへのMDD装置(34g)または30g針を用いた皮膚への垂直挿入によるID送達による皮内送達、および陰性対照について、RLU/mgタンパク質として示す。

【図4】リポータープラスミドDNAのマントーIDおよびMDD送達後のブタの回収された皮膚部位における総タンパク質含量を示す。対照(「陰性」)は、無処理皮膚である。

【図5】添加アジュバントの非存在下でのインフルエンザウイルスヘマグルチニンをコードするプラスミドDNAの送達後のラットにおけるインフルエンザ特異的血清抗体応答を示す。プラスミドDNAは、MDD装置を用いたID送達、または標準針および注射器を用いた筋肉内(IM)注射により投与した。「局所」は、該調製物を局所適用した対照群を示す。

【図6】アジュバントの存在下でのインフルエンザウイルスヘマグルチニンをコードするプラスミドDNAの送達後のラットにおけるインフルエンザ特異的血清抗体応答を示す。プラスミドDNAは、MDD装置を用いたID送達により、または標準針および注射器を用いた筋肉内(IM)注射により投与した。「局所」は、該調製物を局所適用した対照群を示す。

【図7】添加アジュバントの非存在下でプラスミドDNAで「初回抗原刺激」し、続いて添加アジュバントの非存在下で全不活化インフルエンザウイルスで「追加免疫」した後のラットにおけるインフルエンザ特異的血清抗体応答を示す。プラスミドDNAまたは全不活化インフルエンザウイルスは、MDD装置を用いたID送達、または標準針および注射器を用いた筋肉内(IM)注射により投与した。「局所」は、該調製物を局所適用した対

10

20

30

40

50

照群を示す。

【図8】添加アジュバントの存在下でプラスミドDNAで「初回抗原刺激」し、続いて添加アジュバントの非存在下で全不活化インフルエンザウイルスで「追加免疫」した後のラットにおけるインフルエンザ特異的血清抗体応答を示す。プラスミドDNAまたは全不活化インフルエンザウイルスは、MDD装置を用いたID送達、または標準針および注射器を用いた筋肉内(IM)注射により投与した。「局所」は、該調製物を局所適用した対照群を示す。

【図9】MDD装置を用いたID送達、または標準針および注射器を用いた筋肉内(IM)注射により投与した全不活化インフルエンザウイルスに対するラットにおけるインフルエンザ特異的血清抗体応答を示す。「局所」は、該調製物を局所適用した対照群を示す。

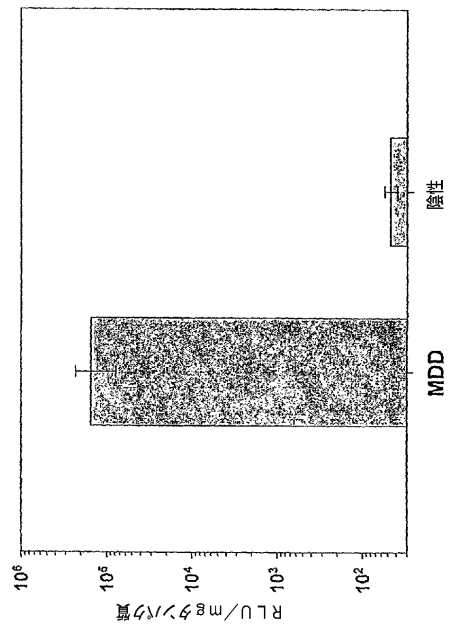
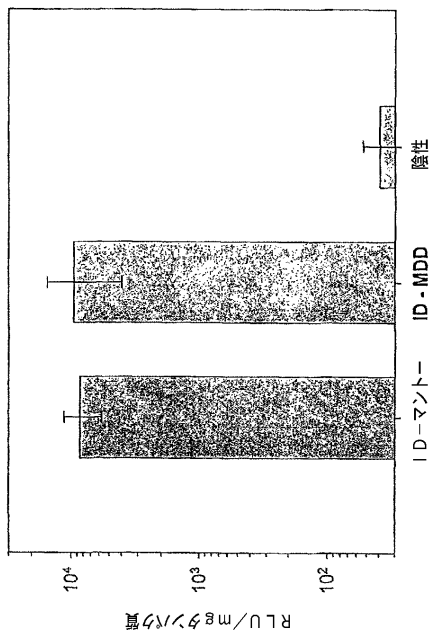
【図10】MDD装置を用いたID送達、または標準針および注射器を用いた筋肉内(IM)注射により投与した全不活化インフルエンザウイルスに対するブタにおけるインフルエンザ特異的血清抗体応答を示す。

【図11】MDD装置を用いたID送達、または標準針および注射器を用いた筋肉内(IM)注射により投与した低い用量の全不活化インフルエンザウイルスに対するラットにおけるインフルエンザ特異的血清抗体応答を示す。

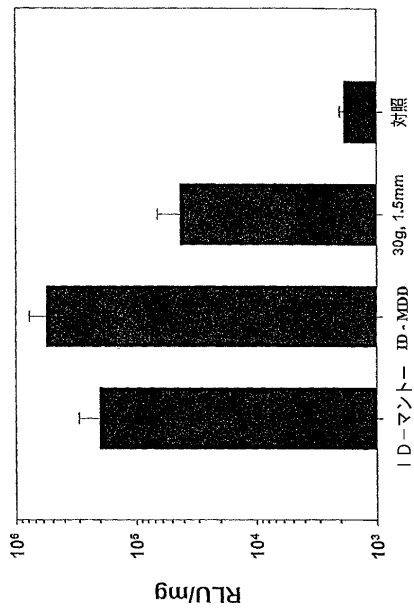
10

【図1】

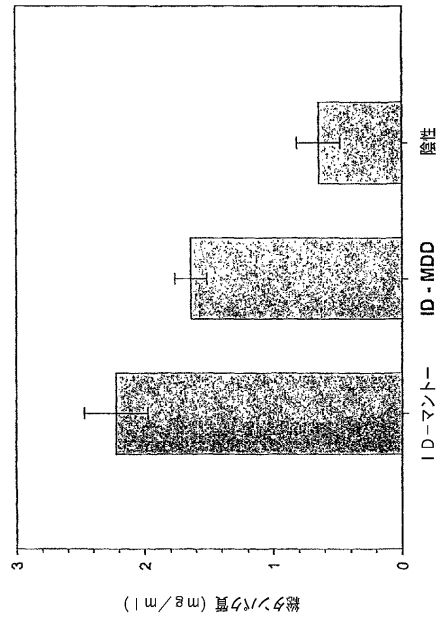
【図2】



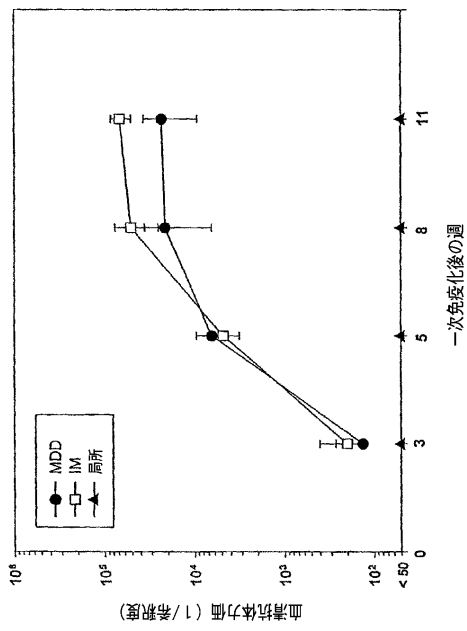
【 図 3 】



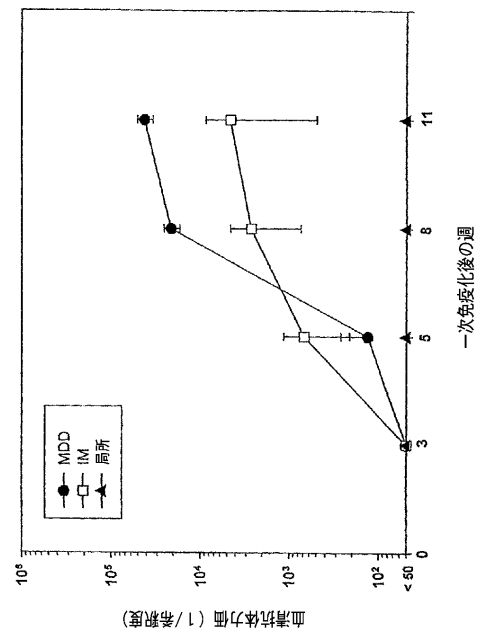
【 図 4 】



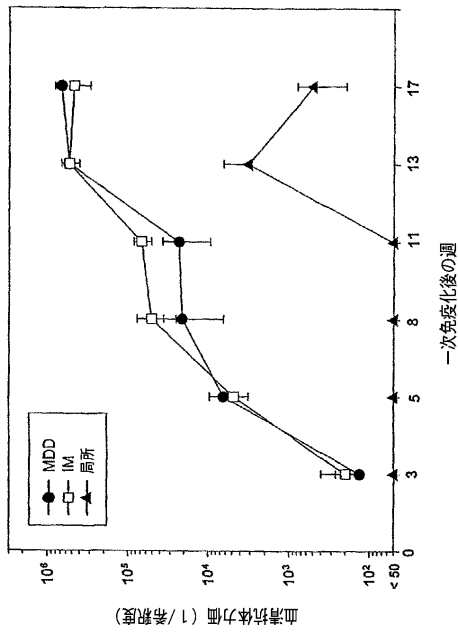
【 図 5 】



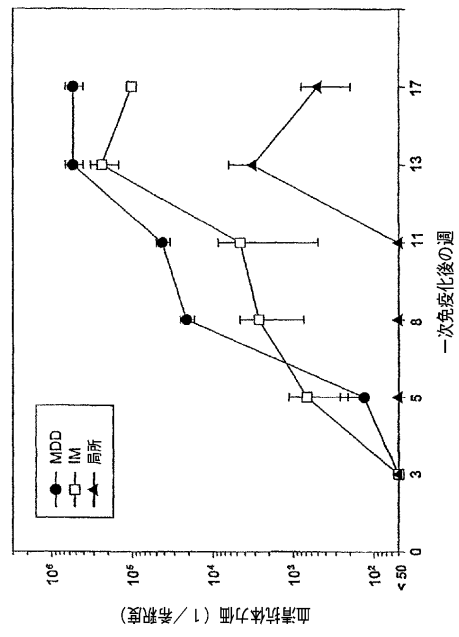
【 図 6 】



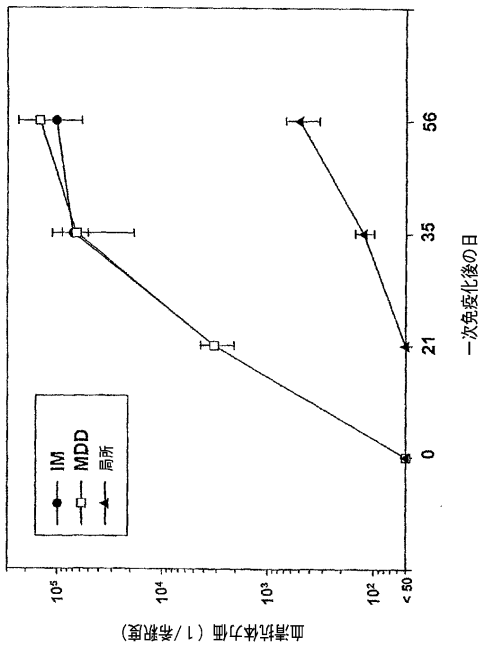
【 図 7 】



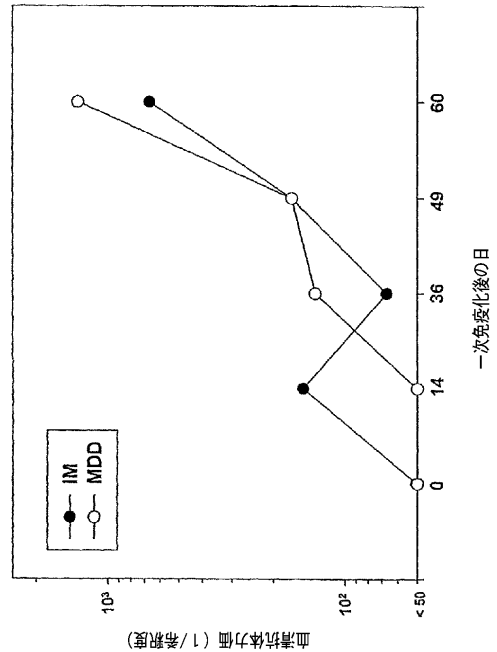
【 図 8 】



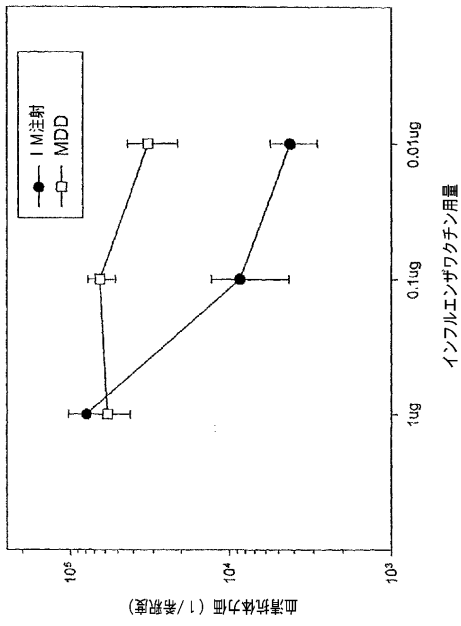
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 1 1 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 January 2003 (09.01.2003)

PCT

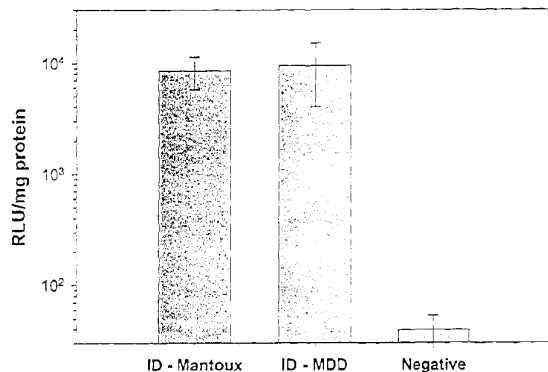
(10) International Publication Number
WO 03/002069 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K**
 - (21) International Application Number: PCT/US02/20780
 - (22) International Filing Date: 1 July 2002 (01.07.2002)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (30) Priority Data:

60/301,476	29 June 2001 (29.06.2001)	US
10/044,504	10 January 2002 (10.01.2002)	US
 - (71) Applicant (for all designated States except US): **BEC-TON, DICKINSON AND COMPANY** [US/US]; Intellectual Property Department, Mail Code 089, 1 Beacon Drive, Franklin Lakes, NJ 07417-1880 (US).
 - (72) Inventors; and
 - (75) Inventors/Applicants (for US only): **MIKSZTA, John, A.** [US/US]; 115 Wood Valley Ct., Durham, NC 27713 (US); **ALARCON, Jason** [US/US]; 5201 Trinity Village Lane, Apt. 304, Raleigh, NC 27607 (US); **ALCHAS, Paul, G.** [US/US]; 29 Ponds Circle, Wayne, NJ 07470 (US).
 - (74) Agent: **HOBBS, Ann, S.; VENABLE, BAETJER, HOWARD & CIVILITTI, LLP**, 1201 New York Avenue, NW, Suite 1000, P.O. Box 34385, Washington, DC 20043-9998 (US).
 - (81) Designated States (national): 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, GR, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 - (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:** — without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: INTRADERMAL DELIVERY OF VACCINES AND GENE THERAPEUTIC AGENTS VIA MICROCANNULA



(57) Abstract: Methods and devices for administration of vaccines and gene therapeutic agents into the intradermal layer of skin.

WO 03/002069 A2

WO 03/002069 A2 

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/002069

PCT/US02/20780

INTRADERMAL DELIVERY OF VACCINES AND
GENE THERAPEUTIC AGENTS VIA MICROCANNULA

BACKGROUND OF THE INVENTION

5

1. Field of the Invention

The present invention relates to methods and devices for administration of vaccines and gene therapeutic agents into the intradermal layer of skin.

10

2. Background Information

The importance of efficiently and safely administering pharmaceutical substances for the purpose of prophylaxis, diagnosis or treatment has long been recognized.

15

The use of conventional needles has long provided one approach for delivering pharmaceutical substances to humans and animals by administration through the skin. Considerable effort has been made to achieve reproducible and efficacious delivery through the skin while improving the ease of injection and reducing patient apprehension and/or pain associated with conventional needles. Furthermore, certain delivery systems eliminate needles entirely, and rely upon chemical mediators or external driving forces such as iontophoretic currents or electroporation or thermal poration or sonophoresis to breach the stratum corneum, the outermost layer of the skin, and deliver substances through the surface of the skin. However, such delivery systems do not reproducibly breach the skin barriers or deliver the pharmaceutical substance to a given depth below the surface of the skin and consequently, clinical results can be variable. Thus, mechanical breach of the stratum corneum such as with needles, is believed to provide the most reproducible method of administration of substances through the surface of the skin, and to provide control and reliability in placement of administered substances.

20

25

30

Approaches for delivering substances beneath the surface of the skin have almost exclusively involved transdermal administration, i.e. delivery of substances through the skin to a site beneath the skin. Transdermal delivery includes subcutaneous,

WO 03/002069

PCT/US02/20780

intramuscular or intravenous routes of administration of which, intramuscular (IM) and subcutaneous (SC) injections have been the most commonly used .

Anatomically, the outer surface of the body is made up of two major tissue layers, an
5 outer epidermis and an underlying dermis, which together constitute the skin (for review,
see *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin, Second Edition*, L.A.
Goldsmith, Ed., Oxford University Press, New York, 1991). The epidermis is subdivided
10 into five layers or strata of a total thickness of between 75 and 150 μm . Beneath the
epidermis lies the dermis, which contains two layers, an outermost portion referred to as the
papillary dermis and a deeper layer referred to as the reticular dermis. The papillary dermis
contains vast microcirculatory blood and lymphatic plexuses. In contrast, the reticular
dermis is relatively acellular and avascular and made up of dense collagenous and elastic
15 connective tissue. Beneath the epidermis and dermis is the subcutaneous tissue, also
referred to as the hypodermis, which is composed of connective tissue and fatty tissue.
Muscle tissue lies beneath the subcutaneous tissue.

As noted above, both the subcutaneous tissue and muscle tissue have been
commonly used as sites for administration of pharmaceutical substances. The dermis,
however, has rarely been targeted as a site for administration of substances, and this may be
20 due, at least in part, to the difficulty of precise needle placement into the intradermal space.
Furthermore, even though the dermis, in particular, the papillary dermis has been known to
have a high degree of vascularity, it has not heretofore been appreciated that one could take
advantage of this high degree of vascularity to obtain an improved absorption profile for
administered substances compared to subcutaneous administration. This is because small
25 drug molecules are typically rapidly absorbed after administration into the subcutaneous
tissue that has been far more easily and predictably targeted than the dermis has been. On
the other hand, large molecules such as proteins are typically not well absorbed through the
capillary epithelium regardless of the degree of vascularity so that one would not have
expected to achieve a significant absorption advantage over subcutaneous administration by
30 the more difficult to achieve intradermal administration even for large molecules.

One approach to administration beneath the surface to the skin and into the region of
the intradermal space has been routinely used in the Mantoux tuberculin test. In this

WO 03/002069

PCT/US02/20780

procedure, a purified protein derivative is injected at a shallow angle to the skin surface using a 27 or 30 gauge needle and standard syringe (Flynn et al, *Chest* 106: 1463-5, 1994). The Mantoux technique involves inserting the needle into the skin laterally, then "snaking" the needle further into the ID tissue. The technique is known to be quite difficult to perform and requires specialized training. A degree of imprecision in placement of the injection results in a significant number of false negative test results. Moreover, the test involves a localized injection to elicit a response at the site of injection and the Mantoux approach has not led to the use of intradermal injection for systemic administration of substances.

10 Another group reported on what was described as an intradermal drug delivery device (U.S. Patent No. 5,997,501). Injection was indicated to be at a slow rate and the injection site was intended to be in some region below the epidermis, i.e., the interface between the epidermis and the dermis or the interior of the dermis or subcutaneous tissue. This reference, however, provided no teachings that would suggest a selective
15 administration into the dermis nor did the reference suggest that vaccines or gene therapeutic agents might be delivered in this manner.

To date, numerous therapeutic proteins and small molecular weight compounds have been delivered intradermally and used to effectively elicit a pharmacologically beneficial
20 response. Most of these compounds (e.g. insulin, Neupogen, hGH, calcitonin) have been hormonal proteins not engineered receptors or antibodies. To date all administered proteins have exhibited several effects associated with ID administration, including more rapid onset of uptake and distribution (vs. SC) and in some case increased bioavailability.

25 Dermal tissue represents an attractive target site for delivery of vaccines and gene therapeutic agents. In the case of vaccines (both genetic and conventional), the skin is an attractive delivery site due to the high concentration of antigen presenting cells (APC) and APC precursors found within this tissue, in particular the epidermal Langerhan's cells and dermal dendritic cells. Several gene therapeutic agents are designed for the treatment of
30 skin disorders, skin diseases and skin cancer. In such cases, direct delivery of the therapeutic agent to the affected skin tissue is desirable. In addition, skin cells are an attractive target for gene therapeutic agents, of which the encoded protein or proteins are active at sites distant from the skin. In such cases, skin cells (e.g., keratinocytes) can

WO 03/002069

PCT/US02/20780

function as "bioreactors" producing a therapeutic protein that can be rapidly absorbed into the systemic circulation via the papillary dermis. In other cases, direct access of the vaccine or therapeutic agent to the systemic circulation is desirable for the treatment of disorders distant from the skin. In such cases, systemic distribution can be accomplished through the papillary dermis.

However, as discussed above, intradermal (ID) injection using standard needles and syringes is technically very difficult to perform and is painful. The prior art contains several references to ID delivery of both DNA-based and conventional vaccines and therapeutic agents, however results have been conflicting, at least in part due to difficulties in accurately targeting the ID tissue with existing techniques.

Virtually all of the human vaccines currently on the market are administered via the IM or SC routes. Of the 32 vaccines marketed by the 4 major global vaccine producers in the year 2001 (Aventis-Pasteur, GlaxoSmithKline, Merck, Wyeth), only 2 are approved for ID use (*2001 Physicians Desk Reference*). In fact, the product inserts for 6 of these 32 vaccines specifically states *not* to use the ID route. This is despite the various published pre-clinical and early clinical studies suggesting that ID delivery can improve vaccines by inducing a stronger immune response than via IM or SC injection or by inducing a comparable immune response at a reduced dose relative to that which is given IM or SC (Playford, E.G. et al, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 23:87, 2002; Kerr, C. *Trends Microbiol.* 9:415, 2001; Rahman, F. et al., *Hepatology* 31:521, 2000; Carlsson, U. et al., *Scan J. Infect. Dis.* 28:435, 1996; Propst, T. et al., *Amer. J. Kidney Dis.* 32:1041, 1998; Nagafuchi, S. et al., *Rev Med Virol.* 8:97, 1998; Henderson, E.A., et al., *Infect. Control Hosp Epidemiol.* 21:264, 2000). Although improvements in vaccine efficacy following ID delivery have been noted in some cases, others have failed to observe such advantages (Crowe, *Am. J. Med. Tech.* 31:387-396, 1965; Letter to *British Medical Journal* 29/10/77, p. 1152; Brown et al., *J. Infect. Dis.* 136:466-471, 1977; Herbert & Larke, *J. Infect. Dis.* 140:234-238, 1979; Ropac et al. *Periodicum Biologorum* 103:39-43, 2001).

A major factor that has precluded the widespread use of the ID delivery route and has contributed to the conflicting results described above is the lack of suitable devices to accomplish reproducible delivery to the epidermal and dermal skin layers. Standard needles

WO 03/002069

PCT/US02/20780

commonly used to inject vaccines are too large to accurately target these tissue layers when inserted into the skin. The most common method of delivery is through Mantoux-style injection using a standard needle and syringe. This technique is difficult to perform, unreliable and painful to the subject. Thus, there is a need for devices and methods that will enable efficient, accurate and reproducible delivery of vaccines and gene therapeutic agents to the intradermal layer of skin.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention improves the clinical utility of ID delivery of vaccines and gene therapeutic agents to humans or animals. The methods employ devices to directly target the intradermal space and to deliver substances to the intradermal space as a bolus or by infusion. It has been discovered that the placement of the substance within the dermis provides for efficacious and/or improved responsiveness to vaccines and gene therapeutic agents. The device is so designed as to prevent leakage of the substance from the skin and improve adsorption or cellular uptake within the intradermal space. The immunological response to a vaccine delivered according to the methods of the invention has been found to be equivalent to or improved over conventional IM delivery of the vaccine, indicating that ID administration according to the methods of the invention will in many cases provide improved clinical results, in addition to the other advantages of ID delivery.

The present disclosure also relates to methods and devices for delivering vaccines or genetic material to an individual based on directly targeting the dermal space whereby such method allows improved delivery and/or an improved response to the vaccine or genetic material. By the use of direct intradermal (ID) administration means (hereafter referred to as dermal-access means), for example using microneedle-based injection and infusion systems, or other means to accurately target the intradermal space, the efficacy of many substances including vaccines and gene therapy agents can be improved when compared to traditional parental administration routes of subcutaneous and intramuscular delivery.

Accordingly, it is one object of the invention to provide a method to accurately target the ID tissue to deliver a vaccine or a medicament comprising genetic material to afford an immunogenic or therapeutic response.

WO 03/002069

PCT/US02/20780

It is a further object of the invention to provide a method to improve the systemic immunogenic or therapeutic response to vaccine (conventional or genetic) or medicament comprising genetic material by accurately targeting the ID tissue.

5 Yet another object of the invention is to provide a method to improve the availability of a vaccine (conventional or genetic) to APC residing in the skin in order to effectuate an antigen-specific immune response to the vaccine by accurately targeting the ID tissue. This may, in many cases, allow for smaller doses of the substance to be administered via the ID route.

10

Yet another object of the present invention is to provide a method to improve the delivery of a medicament comprising genetic material for the treatment of skin diseases, genetic skin disorders or skin cancer by accurately targeting the ID tissue. The resultant genetic material is subsequently expressed by the cells within the targeted ID tissue.

15

Yet another object of the present invention is to provide a method to improve the delivery of a medicament comprising genetic material for the treatment of diseases, genetic disorders, or cancers affecting tissues distant from the skin by accurately targeting the ID tissue. The resultant genetic material is subsequently expressed by the cells within the targeted ID tissue, distant therefrom or both.

20

These and other benefits of the invention are achieved by directly targeting delivery of the substance to the preferred depth for the particular therapeutic or prophylactic agent. The inventors have found that by specifically targeting delivery of the substance to the intradermal space, the response to vaccines and gene therapeutic agents can be unexpectedly improved, and can in many situations be varied with resulting clinical advantage.

25

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows reporter gene activity in guinea pig skin following delivery of plasmid DNA encoding firefly luciferase. Results are shown as relative light units (RLU) per mg protein for intradermal delivery by the Mantoux method, the delivery method of the invention, and control group in which topical application of the Plasmid DNA was made to shaved skin.

30

WO 03/002069

PCT/US02/20780

Figure 2 shows reporter gene activity in rat skin following delivery of plasmid DNA encoding firefly luciferase. Results are shown as RLU/mg protein for intradermal delivery by the microdermal delivery method (one embodiment of the invention, 5 MDD), and control group in which an unrelated plasmid DNA was injected.

Figure 3 shows reporter gene activity in pig skin following delivery of plasmid DNA encoding β -galactosidase. Results are shown as RLU/mg protein for intradermal delivery by the Mantoux method, by ID delivery via perpendicular insertion into skin using MDD 10 device (34g) or 30g needle to depths of 1 mm and 1.5 mm, respectively, and negative control.

Figure 4 shows total protein content at recovered skin sites in pigs following Mantoux ID and MDD delivery of reporter plasmid DNA. Control ("Negative") 15 is untreated skin.

Figure 5 shows the influenza-specific serum antibody response in rats following delivery of plasmid DNA encoding influenza virus hemagglutinin in the absence of added adjuvant. Plasmid DNA was administered via ID delivery with the MDD device or 20 via intra-muscular (IM) injection with a standard needle and syringe. "Topical" indicates control group, where the preparation was topically applied to skin.

Figure 6 shows the influenza-specific serum antibody response in rats following delivery of plasmid DNA encoding influenza virus hemagglutinin in the presence of 25 adjuvant. Plasmid DNA was administered via ID delivery with the MDD device or via intra-muscular (IM) injection with a standard needle and syringe. "Topical" indicates control group, where the preparation was topically applied to skin.

Figure 7 shows the influenza-specific serum antibody response in rats following 30 "priming" with plasmid DNA in the absence of added adjuvant followed by "boosting" with whole inactivated influenza virus in the absence of added adjuvant. Plasmid DNA or whole inactivated influenza virus was administered via ID delivery with the MDD device or

WO 03/002069

PCT/US02/20780

via intra-muscular (IM) injection with a standard needle and syringe. "Topical" indicates control group, where the preparation was topically applied to skin.

Figure 8 shows the influenza-specific serum antibody response in rats following "priming" with plasmid DNA in the presence of added adjuvant followed by "boosting" with whole inactivated influenza virus in the absence of added adjuvant. Plasmid DNA or whole inactivated influenza virus was administered via ID delivery with the MDD device or via intra-muscular (IM) injection with a standard needle and syringe. "Topical" indicates control group, where the preparation was topically applied to skin.

10

Figure 9 shows the influenza-specific serum antibody response in rats to a whole inactivated influenza virus preparation administered via ID delivery with the MDD device or via intra-muscular (IM) injection with a standard needle and syringe. "Topical" indicates control group, where the preparation was topically applied to skin.

15

Figure 10 shows the influenza-specific serum antibody response in pigs to a whole inactivated influenza virus preparation administered via ID delivery with the MDD device or via intra-muscular (IM) injection with a standard needle and syringe.

20

Figure 11 shows the influenza-specific serum antibody response in rats to reduced doses of a whole inactivated influenza virus preparation administered via ID delivery with the MDD device or via IM injection with a standard needle and syringe.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

25

As used herein, "intra-dermal" (ID) is intended to mean administration of a substance into the dermis in such a manner that the substance readily reaches the richly vascularized papillary dermis where it can be rapidly systemically absorbed, or in the case of vaccines (conventional and genetic) or gene therapeutic agents may be taken up directly by cells in the skin. In the case of genetic vaccines, intended target cells include APC (including epidermal Langerhan's cells and dermal dendritic cells). In the case of gene therapeutic agents for diseases, genetic disorders or cancers affecting tissues distant from the skin, intended target cells include keratinocytes or other skin cells capable of expressing a therapeutic protein. In the case of gene therapeutic agents for diseases, genetic disorders

30

WO 03/002069

PCT/US02/20780

or cancers affecting the skin, the intended target cells include those skin cells which may be affected by the disease, genetic disorder or cancer.

As used herein, "targeted delivery" means delivery of the substance to the target depth, and includes delivery that may result in the same response in a treated individual, but result in less pain, more reproducibility, or other advantage compared to an alternate accepted means of delivery (e.g. topical, subcutaneous or intramuscular).

As used herein, an "improved response" includes an equivalent response to a reduced amount of compound administered or an increased response to an identical amount of compound that is administered by an alternate means of delivery or any other therapeutic or immunological benefit.

The terms "needle" and "needles" as used herein are intended to encompass all such needle-like structures. The terms microcannula or microneedles, as used herein, are intended to encompass structures smaller than about 31 gauge, typically about 31-50 gauge when such structures are cylindrical in nature. Non-cylindrical structures encompassed by the term microneedles would be of comparable diameter and include pyramidal, rectangular, octagonal, wedged, and other geometrical shapes.

As used herein, the term "bolus" is intended to mean an amount that is delivered within a time period of less than ten (10) minutes. A "rapid bolus" is intended to mean an amount that is delivered in less than one minute. "Infusion" is intended to mean the delivery of a substance over a time period greater than ten (10) minutes.

The term "nucleic acids" includes polynucleotides, RNA, DNA, or RNA/DNA hybrid sequences of more than one nucleotide in either single chain or duplex form, and may be of any size that can be formulated and delivered using the methods of the present invention. Nucleic acids may be of the "antisense" type. By "nucleic acid derived entity" is meant an entity composed of nucleic acids in whole or in part.

By "gene therapeutic agent" is meant an agent that is intended to be delivered into or be capable of uptake by cell(s) of the treated individual for incorporation and expression of

WO 03/002069

PCT/US02/20780

genetic material. The gene therapeutic agent will ordinarily include a polynucleotide that encodes a peptide, polypeptide, protein or glycoprotein of interest, optionally contained in a vector or plasmid, operationally linked to any further nucleic acid sequences necessary for expression.

5

When referring to the administration of vaccines or gene therapeutic agents, the term "simultaneously" is generally means the administration of two dosages within the same 24 hour period, whereas "sequentially" or "subsequently" is intended to mean that the dosages are separated by more than 24 hours. It will be appreciated by those of skill in the art that simultaneous administration will generally refer to dosages administered at the same medical visit, whereas subsequently or sequentially will refer to dosages that may be separated by days, weeks, months, and occasionally years, depending on the effects of a particular vaccine or gene therapeutic. In one preferred embodiment, "sequential" or "subsequent" refers to dosages that are separated by one day to six weeks.

15

The desired therapeutic or immunogenic response is directly related to the ID targeting depth. These results can be obtained by placement of the substance in the upper region of the dermis, i.e. the papillary dermis or in the upper portion of the relatively less vascular reticular dermis such that the substance readily diffuses into the papillary dermis. Placement of a substance predominately at a depth of at least about 0.025mm to about 2.5mm is preferred.

20

In particular, for vaccines, it is preferred that delivery be at a targeted depth of just under the stratum corneum and encompassing the epidermis and upper dermis (about 0.025mm to about 2.5mm). For therapeutics that target cells in the skin, the preferred target depth depends on the particular cell being targeted; for example to target the Langerhan's cells, delivery would need to encompass at least in part the epidermal tissue depth typically ranging from about 0.025mm to about 0.2mm in humans. For therapeutics and vaccines that require systemic circulation, the preferred target depth would be between, at least about 0.4 mm and most preferably at least about 0.5 mm up to a depth of no more than about 2.5 mm, more preferably, no more than about 2.0 mm and most preferably no more than about 1.7 mm will result delivery of the substance to the desired dermal layer. Placement of the

30

WO 03/002069

PCT/US02/20780

substance predominately at greater depths and/or into the lower portion of the reticular dermis is usually considered to be less desirable.

5 The dermal-access means used for ID administration according to the invention is not critical as long as it provides the insertion depth into the skin of a subject necessary to provide the targeted delivery depth of the substance. In most cases, the device will penetrate the skin and to a depth of about 0.5-2 mm. The dermal-access means may comprise conventional injection needles, catheters, microcannula or microneedles of all known types, employed singularly or in multiple needle arrays.

10

By varying the targeted depth of delivery of substances by the dermal-access means, behavior of the drug or substance can be tailored to the desired clinical application most appropriate for a particular patient's condition. The targeted depth of delivery of substances by the dermal-access means may be controlled manually by the practitioner, or with or without the assistance of indicator means to indicate when the desired depth is reached. Preferably however, the device has structural means for controlling skin penetration to the desired depth within the intradermal space. This is most typically accomplished by means of a widened area or hub associated with the dermal-access means that may take the form of a backing structure or platform to which the needles are attached. The length of microneedles as dermal-access means are easily varied during the fabrication process and are routinely produced. Microneedles are also very sharp and of a very small gauge, to further reduce pain and other sensation during the injection or infusion. They may be used in the invention as individual single-lumen microneedles or multiple microneedles may be assembled or fabricated in linear arrays or two-dimensional arrays as to increase the rate of delivery or the amount of substance delivered in a given period of time. Microneedles having one or more sideports are also included as dermal access means. Microneedles may be incorporated into a variety of devices such as holders and housings that may also serve to limit the depth of penetration. The dermal-access means of the invention may also incorporate reservoirs to contain the substance prior to delivery or pumps or other means for delivering the drug or other substance under pressure. Alternatively, the device housing the dermal-access means may be linked externally to such additional components. The dermal-access means may also include safety features, either passive or active, to prevent or reduce accidental injury.

20
25
30

WO 03/002069

PCT/US02/20780

In one embodiment of the invention, ID injection can be reproducibly accomplished using one or more narrow gauge microcannula inserted perpendicular to the skin surface. This method of delivery ("microdermal delivery" or "MDD") is easier to accomplish than standard Mantoux-style injections and, by virtue of its limited and controlled depth of penetration into the skin, is less invasive and painful. Furthermore, similar or greater biological responses, as measured here by gene expression and immune response, can be attained using the MDD devices compared to standard needles. Optimal depth for administration of a given substance in a given species can be determined by those of skill in the art without undue experimentation.

Delivery devices that place the dermal-access means at an appropriate depth in the intradermal space, control the volume and rate of fluid delivery and provide accurate delivery of the substance to the desired location without leakage are most preferred. Microcannula- and microneedle-based methodology and devices are described in EP 1 092 444 A1, and U.S. Application Serial No. 606,909, filed June 29, 2000. Standard steel cannula can also be used for intra-dermal delivery using devices and methods as described in U.S. Serial No. 417,671, filed October 14, 1999, the contents of each of which are expressly incorporated herein by reference. These methods and devices include the delivery of substances through narrow gauge (about 30G) "micro-cannula" with limited depth of penetration, as defined by the total length of the cannula or the total length of the cannula that is exposed beyond a depth-limiting feature. These methods and devices provide for the delivery of substances through 30 or 31 gauge cannula, however, the present invention also employs 34G or narrower "microcannula" including if desired, limited or controlled depth of penetration means. It is within the scope of the present invention that targeted delivery of substances can be achieved either through a single microcannula or an array of microcannula (or "microneedles"), for example 3-6 microneedles mounted on an injection device that may include or be attached to a reservoir in which the substance to be administered is contained.

Using the methods of the present invention, vaccines and gene therapeutic agents may be administered as a bolus, or by infusion. It is understood that bolus administration or delivery can be carried out with rate controlling means, for example a pump, or have no

WO 03/002069

PCT/US02/20780

specific rate controlling means, for example, user self-injection. The above-mentioned benefits are best realized by accurate direct targeted delivery of substances to the dermal tissue compartment including the epidermal tissue. This is accomplished, for example, by using microneedle systems of less than about 250 micron outer diameter, and less than 2 mm exposed length. By "exposed length" it is meant the length of the narrow hollow cannula or needle available to penetrate the skin of the patient. Such systems can be constructed using known methods for various materials including steel, silicon, ceramic, and other metals, plastic, polymers, sugars, biological and or biodegradable materials, and/or combinations thereof.

10

It has been found that certain features of the intradermal administration methods provide the most efficacious results. For example, it has been found that placement of the needle outlet within the skin significantly affects the clinical response to delivery of a vaccine or gene therapy agent. The outlet of a conventional or standard gauge needle with a bevel angle cut to 15 degrees or less has a relatively large "exposed height". As used herein the term exposed height refers to the length of the opening relative to the axis of the cannula resulting from the bevel cut. When standard needles are placed at the desired depth within the intradermal space (at about 90 degrees to the skin), the large exposed height of these needle outlets causes the substance usually to effuse out of the skin due to backpressure exerted by the skin itself and to pressure built up from accumulating fluid from the injection or infusion. Typically, the exposed height of the needle outlet of the present invention is from 0 to about 1 mm. A needle outlet with an exposed height of 0 mm has no bevel cut (or a bevel angle of 90 degrees) and is at the tip of the needle. In this case, the depth of the outlet is the same as the depth of penetration of the needle. A needle outlet that is either formed by a bevel cut or by an opening through the side of the needle has a measurable exposed height. In a needle having a bevel, the exposed height of the needle outlet is determined by the diameter of the needle and the angle of the primary bevel cut ("bevel angle"). In general, bevel angles of greater than 20° are preferred, more preferably between 25° and 40°. It is understood that a single needle may have more than one opening or outlet suitable for delivery of substances to the dermal space.

20
25
30

Thus the exposed height, and for the case of a cannula with an opening through the side, its position along the axis of the cannula contributes to the depth and specificity at which a substance is delivered. Additional factors taken alone or in combination with the

WO 03/002069

PCT/US02/20780

cannula, such as delivery rate and total fluid volume delivered, contribute to the target delivery of substances and variation of such parameters to optimize results is within the scope of the present invention.

5 It has also been found that controlling the pressure of injection or infusion may avoid the high backpressure exerted during ID administration. By placing a constant pressure directly on the liquid interface a more constant delivery rate can be achieved, which may optimize absorption and obtain an improved response for the dosage of vaccine or therapeutic agent delivered. Delivery rate and volume can also be controlled to prevent the
10 formation of wheals at the site of delivery and to prevent backpressure from pushing the dermal-access means out of the skin. The appropriate delivery rates and volumes to obtain these effects for a selected substance may be determined experimentally using only ordinary skill and without undue experimentation. Increased spacing between multiple needles allows broader fluid distribution and increased rates of delivery or larger fluid volumes.

15

In one embodiment, to deliver a substance the dermal-access means is placed adjacent to the skin of a subject providing directly targeted access within the intradermal space and the substance or substances are delivered or administered into the intradermal space where they can act locally or be absorbed by the bloodstream and be distributed
20 systemically. In another embodiment, the dermal-access means is positioned substantially perpendicular to the skin surface to provide vertical insertion of one or more cannula. The dermal-access means may be connected to a reservoir containing the substance or substances to be delivered. The form of the substance or substances to be delivered or administered include solutions thereof in pharmaceutically acceptable diluents or solvents, emulsions, suspensions, gels, particulates such as micro- and nanoparticles either suspended
25 or dispersed, as well as in-situ forming vehicles of the same. Delivery from the reservoir into the intradermal space may occur either passively, without application of the external pressure or other driving means to the substance or substances to be delivered, and/or actively, with the application of pressure or other driving means. Examples of preferred
30 pressure generating means include pumps, syringes, elastomer membranes, gas pressure, piezoelectric, electromotive, electromagnetic pumping, coil springs, or Belleville springs or washers or combinations thereof. If desired, the rate of delivery of the substance may be variably controlled by the pressure-generating means. As a result, the substance enters the

WO 03/002069

PCT/US02/20780

intradermal space and is absorbed in an amount and at a rate sufficient to produce a clinically efficacious result.

Substances that may be delivered according to the methods of the invention include

5 vaccines, with or without carriers, adjuvants and vehicles, including prophylactic and therapeutic antigens including but not limited to subunit proteins, peptides and polysaccharides, polysaccharide conjugates, toxoids, genetic based vaccines, live attenuated bacteria or viruses, mutated bacteria or viruses, reassortant bacteria or viruses, inactivated bacteria or viruses, whole cells or components thereof (e.g. mammalian cells), cellular

10 vaccines (e.g., autologous dendritic cells), or components thereof (for example, exosomes, dexosomes, membrane fragments, or vesicles), live viruses, live bacteria, viral and bacterial vectors including but not limited to those derived from adenoviruses, retroviruses alphaviruses, flaviviruses, and vaccinia viruses) in connection with addiction (e.g. cocaine addiction), anthrax, arthritis, cholera, diphtheria, dengue, tetanus, lupus, multiple sclerosis,

15 parasitic diseases, psoriasis, Lyme disease, meningococcus, measles, mumps, rubella, varicella, yellow fever, Respiratory syncytial virus, tick borne Japanese encephalitis, pneumococcus, smallpox, streptococcus, staphylococcus, typhoid, influenza, hepatitis, including hepatitis A, B, C and E, otitis media, rabies, polio, HIV, parainfluenza, rotavirus, Epstein Barr Virus, CMV, chlamydia, non-typeable haemophilus, haemophilus influenza B

20 (HIB), moraxella catarrhalis, human papilloma virus, tuberculosis including BCG, gonorrhoeae, asthma, atherosclerosis, malaria, *E. coli*, Alzheimer's Disease, *H. Pylori*, salmonella, diabetes, cancer, herpes simplex, human papilloma, *Yersinia pestis*, traveler's diseases, West Nile encephalitis, *Camplobacter*, *C. difficile*. Suitable exemplary compositions for genetic immunization are described, for example, in U.S. Pat. Nos.

25 5,589,466, 5,593,972 and 5,703,055.

Particularly preferred substances that can be delivered according to the methods of the invention include nucleic acids, nucleic acid derived entities and gene therapeutic agents and the like used in the prevention, diagnosis, alleviation, treatment, or cure of disease. Suitable adjuvants for inclusion in vaccines are known to those of skill in the art.

30 Additional agents for enhancing immune response that may be used in the present invention are disclosed in U.S. application no. 10/142,966, filed May 13, 2002, which is incorporated herein by reference.

WO 03/002069

PCT/US02/20780

Particularly preferred gene therapeutic agents include those indicated for the treatment of cancer including but not limited to melanoma, cutaneous T cell lymphoma, Kaposi's sarcoma, cutaneous squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma, adenosine deaminase deficiency, hyperproliferative skin diseases including but not limited to psoriasis, genetic skin diseases including but not limited to epidermolytic hyperkeratosis, 5 epidermolysis bullosa, lamellar ichthyosis and X-linked ichthyosis, hemophilia, cystic fibrosis, growth disorders, hormone deficiencies including but not limited to human growth hormone deficiency, atherosclerosis, transferrin deficiency, as well as gene therapeutic agents indicated for wound healing and tissue regeneration. Suitable exemplary 10 compositions for suitable genetic therapeutic agents are described, for example, in U.S. Pat. No. 5,547,932.

The substance may be delivered into the skin in any pharmaceutically acceptable form. Vaccines to be used in the methods of the invention may include adjuvants and 15 carriers or vehicles that are suitable in particular formulations, as will be familiar to those of skill in the art.

Pharmaceutically acceptable peptide and polypeptide formulations for use in the invention, including formulations for allergen compositions, are also well known in the art. 20 Nucleic acids for use in the methods of the invention may be RNA or DNA, or a combination thereof. They may be in any physical form suitable for ID administration and for uptake and expression by cells. DNA and/or RNA may be contained in a viral vector or liposome, or may be delivered as a free polynucleotide such as a plasmid as is known in the art. The nucleic acid will typically be formulated in a pharmaceutically acceptable 25 formulation such as a fluid, gel, or suspension that is compatible with the nucleic acid.

Typically, to administer vaccine or other medicament a practitioner will remove the appropriate volume from a vial sealed with a septa using a syringe. This same syringe is then used administer the vaccine to the patient. However, a microneedle or microcannula, 30 typically between 0.1 and 2 mm in length, in addition to being somewhat unsuitable in length to completely penetrate the septa, is generally too fragile to puncture a septum of a vial to extract medicament while maintaining sufficient sharpness and straightness to subsequently be used on a patient. Use of such microdevices in puncturing septa also may

WO 03/002069

PCT/US02/20780

result in clogging of the bore of the needle. In addition, the narrow gauge, typically 31 to 50 gauge, of the microcannula greatly reduces the volumetric capacity that can traverse the needle into the syringe, for example. This would be inconvenient to most practitioners who are accustomed to rapid transfer of liquids from vials using conventional devices and thus would greatly increase the amount of time the practitioner would spend with the patient. Additional factors to be considered in the widespread use of microdevices include the necessity to reformulate most drugs and vaccines to accommodate the reduced total volume (10-100 ul) used or delivered by microdevices. Thus it would be desirable to provide for a kit including the device either in combination with or adapted to integrate therewith, the substance to be delivered.

Kits and the like comprising the instrument of administration and the therapeutic composition are well known in the art. However, the application of minimally invasive, ID microdevices for the delivery of drugs and vaccines clearly present an immediate need for coupling the device with the formulation to provide safe, efficacious, and consistent means for administering formulations for enabling immunogenic and therapeutic responses.

The kit provided by the invention comprises a delivery device having at least one hollow microneedle designed to intradermally deliver a substance to a depth between .025 and 2 mm which is adapted so that the microneedle is or can be placed in fluid connection with a reservoir adapted for containing a dosage of a vaccine or gene therapeutic. In a preferred embodiment, the kit also contains an effective dosage of a vaccine or gene therapeutic, optionally contained in a reservoir that is an integral part of, or is capable of being functionally attached to, the delivery device. The hollow microneedle is preferably between about 31 to 50 gauge, and may be part of an array of, for example, 3-6 microneedles.

In a particularly preferred embodiment, the kit of the invention comprises a hub portion being attachable to the prefillable reservoir storing the vaccine;
at least one microneedle supported by said hub portion and having a forward tip extending away from said hub portion; and
a limiter portion surrounding said microneedle(s) and extending away

WO 03/002069

PCT/US02/20780

from said hub portion toward said forward tip of said microneedle(s), said limiter including a generally flat skin engaging surface extending in a plane generally perpendicular to an axis of said microneedle(s) and adapted to be received against the skin of a mammal to administer an intradermal injection of the vaccine, said microneedle(s) forward tip(s) extending beyond said skin engaging surface a distance approximately 0.5 mm to 2.0 mm wherein said limiter portion limits penetration of the microneedle(s) into the dermal layer of skin of the mammal.

To use a kit as envisioned by the instant invention the practitioner would break a hermetic seal to provide access to the microdevice and optionally, the vaccine or immunogenic or therapeutic composition. The composition may be preloaded within the microdevice in any form including but not limited to gel, paste, oil, emulsion, particle, nanoparticle, microparticle, suspension or liquid. The composition may be separately packaged within the kit package, for example, in a reservoir, vial, tube, blister, pouch or the like. One or more of the constituents of the formulation may be lyophilized, freeze-dried, spray freeze-dried, or in any other reconstitutable form. Various reconstitution media, cleansing or disinfective agents, or topical sterilants (alcohol wipes, iodine) can further be provided if desired. The practitioner would then load or integrate the substance if necessary into the device and then administer the formulation to the patient using the ID injection microdevice.

Having described the invention in general, the following specific but not limiting examples and reference to the accompanying Figures set forth various examples for practicing the invention.

A representative example of dermal-access microdevice (MDD device) comprising a single needle were prepared from 34 gauge steel stock (MicroGroup, Inc., Medway, MA) and a single 28° bevel was ground using an 800 grit carborundum grinding wheel. Needles were cleaned by sequential sonication in acetone and distilled water, and flow-checked with distilled water. Microneedles were secured into small gauge catheter tubing (Maersk Medical) using UV-cured epoxy resin. Needle length was set using a mechanical indexing plate, with the hub of the catheter tubing acting as a depth-limiting control and was confirmed by optical microscopy. The exposed needle length was adjusted to 1 mm using an

WO 03/002069

PCT/US02/20780

indexing plate. Connection to the syringe was via an integral Luer adapter at the catheter inlet. During injection, needles were inserted perpendicular to the skin surface, and were held in place by gentle hand pressure for bolus delivery. Devices were checked for function and fluid flow both immediately prior to and post injection. A 30/31 gauge intradermal
5 needle device with 1.5mm exposed length controlled by a depth limiting hub as described in EP 1 092 444 A1 was also used in some Examples.

Example 1: *ID delivery and expression of model genetic therapeutic/prophylactic agents, guinea pig model.*

10

Uptake and expression of DNA by cells *in vivo* are critical to effective gene therapy and genetic immunization. Plasmid DNA encoding the reporter gene, firefly luciferase, was used as a model gene therapeutic agent (Aldevron, Fargo, ND). DNA was administered to Hartley guinea pigs (Charles River, Raleigh, NC) intradermally (ID) via the Mantoux (ID-Mantoux) technique using a standard 30G needle or was delivered ID via MDD (ID-MDD) using a 34G steel micro-cannula of 1mm length (MDD device) inserted approximately perpendicular. Plasmid DNA was applied topically to shaved skin as a negative control (the size of the plasmid is too large to allow for passive uptake into the skin). Total dose was 100 µg per animal in total volume of 40 µl PBS delivered as a rapid bolus injection (<1 min) using a 1cc syringe. Full thickness skin biopsies of the administration sites were collected 24 hr. following delivery, were homogenized and further processed for luciferase activity using a commercial assay (Promega, Madison, WI). Luciferase activity was normalized for total protein content in the tissue specimens as determined by BCA assay (Pierce, Rockford, IL) and is expressed as Relative Light Units (RLU) per mg of total protein (n=3 animals per
25 group for Mantoux and Negative control and n=6 for MDD device).

The results (Figure 1) demonstrate strong luciferase expression in both ID injection groups. Mean luciferase activity in the MDD and Mantoux groups were 240- and 220-times above negative controls, respectively. Luciferase expression levels in topical controls were not significantly greater than in untreated skin sites (data not shown). These results
30 demonstrate that the method of the present invention using MDD devices is at least as effective as the Mantoux technique in delivering genetic materials to the ID tissue and results in significant levels of localized gene expression by skin cells *in vivo*.

WO 03/002069

PCT/US02/20780

Example 2: *ID delivery and expression of model genetic therapeutic/prophylactic agents, rat model.*

Experiments similar (without Mantoux control) to those described in Example 1 above were performed in Brown-Norway rats (Charles River, Raleigh, NC) to evaluate the utility of this platform across multiple species. The same protocol was used as in Example 1, except that the total plasmid DNA load was reduced to 50 µg in 50 µl volume of PBS. In addition, an unrelated plasmid DNA (encoding b-galactosidase) injected ID (using the MDD device) was used as negative control. (n=4 animals per group). Luciferase activity in skin was determined as described in Example 1 above.

The results, shown in Figure 2, demonstrate very significant gene expression following ID delivery via the MDD device. Luciferase activity in recovered skin sites was > 3000-fold greater than in negative controls. These results further demonstrate the utility of the method of the present invention in delivering gene based entities *in vivo*, resulting in high levels of gene expression by skin cells.

Example 3: *ID delivery and expression of model genetic therapeutic/prophylactic agents, pig model.*

The pig has long been recognized as a preferred animal model for skin based delivery studies. Swine skin is more similar to human skin in total thickness and hair follicle density than is rodent skin. Thus, the pig model (Yorkshire swine; Archer Farms, Belcamp, MD) was used as a means to predict the utility of this system in humans. Experiments were performed as above in Examples 1 and 2, except using a different reporter gene system, β-galactosidase (Aldevron, Fargo, ND). Total delivery dose was 50 µg in 50 µl volume. DNA was injected using the following methods i) via Mantoux method using a 30G needle and syringe, ii) by ID delivery via perpendicular insertion into skin using a 30/31G needle equipped with a feature to limit the needle penetration depth to 1.5mm, and iii) by ID delivery via perpendicular insertion into skin using a 34G needle equipped with a feature to limit the needle penetration depth to 1.0mm (MDD device). The negative control group consisted of ID delivery by i-iii of an unrelated plasmid DNA encoding firefly luciferase. (n=11 skin sites from 4 pigs for the ID Mantoux group; n=11

WO 03/002069

PCT/US02/20780

skin sites from 4 pigs for ID, 30/31G, 1.5mm device; n=10 skin sites from 4 pigs for ID, 34G, 1mm device; n=19 skin sites from 4 pigs for negative control.) For the negative control, data from all 3 ID delivery methods were combined since all 3 methods generated comparable results.

5

Reporter gene activity in tissue was determined essentially as described in Example 1, except substituting the b-galactosidase detection assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) in place of the luciferase assay.

10 The results, shown in Figure 3, indicate strong reporter gene expression in skin following all 3 types of ID delivery. Responses in the ID-Mantoux group were 100-fold above background, compared to a 300-fold increase above background in the ID, 34G, 1mm (MDD) group and 20-fold increase above background in the ID, 30G, 1.5mm (30 g, 1.5mm) group. Total reporter gene expression by skin cells, as measured by reporter gene mean activity recovered from excised skin tissue biopsies, was strongest in the ID, 34G, 1mm (MDD) group at 563,523 RLU/mg compared to 200,788 RLU/mg in the ID, 30G Mantoux group, 42,470 RLU/mg in the ID (30G, 1.5mm) group and 1,869 RLU/mg in the negative controls. Thus, ID delivery via perpendicular insertion of a 34G, 1.0mm needle (MDD) results in superior uptake and expression of DNA by skin cells as compared to the standard

15 Mantoux style injection or a similar perpendicular needle insertion and delivery using a longer (1.5mm), wider diameter (30G) needle. Similar studies using these 3 devices and methods to deliver visible dyes also demonstrate that the 34G, 1.0mm needle results in more consistent delivery to the ID tissue than the other 2 needles/methods and results in less "spill-over" of the administered dose into the subcutaneous (SC) tissue.

20

25 These differences were unexpected since all 3 devices and methods theoretically target the same tissue space. However, it is much more difficult to control the depth of delivery using a lateral insertion (Mantoux) technique as compared to a substantially perpendicular insertion technique that is achieved by controlling the length of the cannula via the depth-limiting hub. Further, the depth of needle insertion and exposed height of the needle outlet are important features associated with reproducible ID delivery without SC "spill-over" or leakage on the skin surface.

30

WO 03/002069

PCT/US02/20780

These results further demonstrate the utility of the methods of the present invention in delivering gene based entities in larger mammals *in vivo*, resulting in high levels of gene expression by skin cells. In addition, the similarities in skin composition between pigs and humans indicate that comparable clinical improvements should be obtained in humans.

5

Example 4: *Indirect measurement of localized tissue damage following ID delivery*

Results presented in Example 3 above suggest that there may be unexpected improvements in efficacy attained by MDD-based ID delivery compared to that attained by Mantoux-based injections using standard needles. In addition, the MDD cannula mechanically disrupt a smaller total area of tissue since they are inserted to a reduced depth compared to standard needles and are not laterally "snaked" through the ID tissue like Mantoux-style injections. Tissue damage and inflammation leads to the release of several inflammatory proteins, chemokines, cytokines and other mediators of inflammation.

15

Thus, total protein content at recovered skin sites can be used as an indirect measurement of tissue damage and localized inflammation induced by the two delivery methods. Total protein levels were measured in recovered skin biopsies from pig samples presented in Example 3 above (excluding the 30g, 1.5mm) using a BCA assay (Pierce, Rockford, IL). Both methods of delivery induced an increase in total protein content compared to untreated skin, as shown in Figure 4. However, total protein levels in recovered skin biopsies from the ID Mantoux group were significantly greater ($p=0.01$ by t-test) than the corresponding levels in the MDD group (2.4 mg/ml vs. 1.5 mg/ml). These results provide indirect evidence to strongly suggest that delivery by the methods of the present invention induces less mechanical damage to the tissue than the corresponding damage induced by Mantoux-style ID injection.

20

25

Example 5: *Induction of immune response to influenza DNA vaccine following ID delivery in rats*

30

The examples presented above demonstrate that narrow gauge microcannula can be used to effectively deliver model nucleic acid based compounds into the skin resulting in high levels of gene expression by skin cells. To investigate the utility of delivering DNA

WO 03/002069

PCT/US02/20780

vaccines by the methods of the present invention, rats were immunized with plasmid DNA encoding influenza virus hemagglutinin (HA) from strain A/PR/8/34 (plasmid provided by Dr. Harriet Robinson, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA). Brown-Norway rats (n=3 per group) were immunized three times (days 0, 21 and 42) with plasmid DNA in PBS solution (50µg per rat in 50µl volume delivered by rapid bolus injection) ID using the MDD device as described in Example 2 or IM into the quadriceps using a conventional 30G needle and 1cc syringe. As a negative control, DNA was applied topically to untreated skin. Sera were collected at weeks 3, 5, 8 and 11 and analyzed for the presence of influenza-specific antibodies by ELISA. Briefly, microtiter wells (Nalge Nunc, Rochester, NY) were coated with 0.1 µg of whole inactivated influenza virus (A/PR/8/34; Charles River SPAFAS, North Franklin, CT) overnight at 4°C. After blocking for 1hr at 37 °C in PBS plus 5% skim milk, plates were incubated with serial dilutions of test sera for 1 hr at 37 °C. Plates were then washed and further incubated with horse radish peroxidase conjugated anti-rat IgG, H+L chain (Southern Biotech, Birmingham, AL) for 30 min at 37 °C and were then developed using TMB substrate (Sigma, St. Louis, MO). Absorbance measurements (A₄₅₀) were read on a Tecan Sunrise™ plate reader (Tecan, RTP, NC).

The results (Figure 5) demonstrate that delivery by the method of the present invention of a genetic influenza vaccine in the absence of added adjuvant induces a potent influenza-specific serum antibody response. The magnitude of this response was comparable to that induced via IM injection at all measured timepoints. No detectable responses were observed in the topical controls. Thus delivery of genetic vaccine by the method of the present invention induces immune responses that are at least as strong as those induced by the conventional route of IM injection.

To further investigate delivery by the method of the present invention of adjuvanted genetic vaccines, the above described influenza HA-encoding plasmid DNA was prepared using the MPL + TDM Ribi adjuvant system (RIBI Immunochemicals, Hamilton, MT) according to the manufacturer's instructions. Rats (n=3 per group) were immunized and analyzed for influenza-specific serum antibody as described above. Titers in the ID delivery group were comparable to IM following the first and second immunization (week 3-5; Figure 6). After the third dose, however, ID-induced titers were significantly greater (p=0.03 by t-test) than the corresponding titers induced via IM injection (Figure 6). At

WO 03/002069

PCT/US02/20780

week 11, the mean ID-induced titer was 42,000 compared to only 4,600 attained by IM injection. Topical controls failed to generate an influenza-specific response. Thus, delivery by the method of the present invention of genetic vaccines in the presence of adjuvant induces immune responses that are stronger than those induced by the conventional route of IM injection.

Example 6: *Induction of immune response to influenza DNA/virus "prime-boost" following ID delivery in rats*

A recently developed vaccination approach for numerous diseases, including HIV, is the so-called "prime-boost" approach wherein the initial "priming" immunizations and secondary "boosters" employ different vaccine classes (Immunology Today, Apr 21(4): 163-165, 2000). For example, one may prime with a plasmid DNA version of the vaccine followed by a subsequent boost with a subunit protein, inactivated virus or vectored DNA preparation. To investigate delivery by the method of the present invention of these types of vaccination methods, the first experiment of Example 5 was continued for an additional 6 weeks. At week 11, DNA-primed rats were boosted with whole inactivated influenza virus (A/PR/8/34, 100 μ g in 50 μ l volume of PBS by rapid bolus injection). Virus was obtained from Charles River SPAFAS, North Franklin, CT. Influenza-specific serum antibody titers were measured at weeks 13 and 17 by ELISA as described above. Both ID delivery and IM injection induced a potent booster effect (Figure 7). Week 17 mean influenza-specific titers were equivalent (titer = 540,000) by both methods of delivery and were significantly greater than the very weak titers observed following unassisted topical delivery (titer = 3200). Thus, delivery by the method of the present invention is suitable for "prime-boost" immunization regimens, inducing immune responses that are at least as strong as those induced by the conventional route of IM injection.

To evaluate the effect of adjuvant on the "prime-boost" response, the second experiment described in Example 5 was continued for an additional 6 weeks. At week 11, DNA-primed rats were boosted with whole inactivated influenza virus (A/PR/8/34, 100 μ g in 50 μ l volume by rapid bolus injection as above). Influenza-specific serum antibody titers were measured at weeks 13 and 17 by ELISA as described above. Both ID delivery and IM injection induced a potent booster effect (Figure 8). Mean titers in the ID delivery group

WO 03/002069

PCT/US02/20780

were greater than via IM injection following the virus boost; at week 13, the ID-MDD(MDD) mean titer was 540,000 compared to 240,000 by IM injection and 3,200 by unassisted topical application. Thus, delivery by the method of the present invention is suitable for "prime-boost" immunization regimens incorporating adjuvants, inducing immune responses that are stronger than those induced by the conventional route of IM injection.

Example 7: *Induction of immune response to influenza virus vaccine following ID delivery in rats*

10

To investigate the utility of delivering conventional vaccines by the method of the present invention in rats, rats were immunized with an inactivated influenza virus preparation as described in Example 6 via ID delivery or intra-muscular (IM) injection with a standard needle and syringe. As negative control, vaccine solution was applied topically to untreated skin; the large molecular weight of the inactivated influenza virus precludes effective immunization via passive topical absorption. As above, vaccine dose was 100 µg total protein in 50 µl volume per animal delivered by rapid bolus injection (< 1 min). Rats were immunized 3 times (days 0, 21 and 42); serum was collected and analyzed for influenza-specific antibodies by ELISA as above on days 21, 35 and 56; n=4 rats per group.

20

The results, shown in Figure 9, indicate that ID delivery induces potent antigen specific immune responses. Similar levels of antibody were induced by the 2 injection routes, IM and ID. Peak geometric mean titers were somewhat higher in the ID-MDD group (MDD); 147,200 compared to 102,400 via IM injection. Topical application of the vaccine stimulated only very weak responses (peak mean titer = 500). Thus, ID delivery of conventional vaccines at high doses induces immune responses that are at least as strong as those induced by the conventional route of IM injection.

Example 8: *Induction of immune response to influenza vaccine following ID delivery via in pigs*

30

As noted above, the pig represents an attractive skin model that closely mimics human skin. To test ID delivery devices in vaccine delivery, Yorkshire swine were

WO 03/002069

PCT/US02/20780

immunized with an inactivated influenza vaccine as above, comparing ID delivery ID with IM injection. Pigs were immunized on days 0, 21 and 49; serum was collected and analyzed for influenza-specific antibodies by ELISA as above on days 14, 36, 49 and 60. Pig-specific secondary antibodies were obtained from Bethyl Laboratories, Montgomery, TX.

5

The results (Figure 10) indicate that ID delivery induces potent antigen specific immune responses. Similar levels of antibody were induced by the 2 injection routes, IM and ID. Peak geometric mean titers were slightly higher in the MDD group; 1,333 compared to 667 via IM injection. Thus, ID delivery of conventional vaccines at high doses induces immune responses that are at least as strong as those induced by the conventional route of IM injection.

10

Example 9: ID delivery of Lower doses of influenza vaccine

In Example 7, rats were immunized with 100 μ g of inactivated influenza virus via ID injection, or IM using a conventional needle and syringe. At such a high dose, both delivery methods induced similar levels of serum antibodies, although at the last time-point the ID-induced titer was slightly greater than that induced by IM.

15

To further study the relationship between method of delivery and dosage level, rats were immunized with reduced doses of inactivated influenza virus, ranging from 1 μ g to 0.01 μ g per animal, using the ID and IM routes of administration as above. Rats were given 3 immunizations (days 0, 21 and 42) and were analyzed for serum anti-influenza antibodies at days 21, 35 and 56 (n=4 rats per group). Data shown in Figure 11 reflect titers at day 56, although similar trends were observed at day 21 and day 35. ID delivery (MDD) resulted in a significant antibody response that did not differ significantly in magnitude at the 3 doses tested; i.e., delivery of as little as 0.01 μ g (10ng) induced comparable titers to those observed using 100-fold more vaccine (μ g). In contrast, a significant reduction in titer was observed when the IM dose was reduced from 1 μ g to 0.1 μ g and again when the dose was further reduced to 0.01 μ g. In addition, there was considerably less variability in the titers induced via ID delivery as compared to IM. Notably, no visible side reactions (adverse skin effects) were observed at the ID administration sites.

20

25

30

WO 03/002069

PCT/US02/20780

The results strongly indicate that ID delivery by the method of the present invention enables a significant (at least 100-fold) reduction in vaccine dose as compared to IM injection. Significant immune responses were observed using nanogram quantities of vaccine. Similar benefits would be expected in clinical settings.

5

The results described herein demonstrate that ID injection of vaccine and genetic material can be reproducibly accomplished the methods of the present invention. This method of delivery is easier to accomplish than standard Mantoux-style injections or IM and, in one embodiment, by virtue of its limited and controlled depth of penetration into the skin, is less invasive and painful. In addition, this method provides more reproducible ID delivery than via Mantoux style injections using conventional needles resulting in improved targeting of skin cells with resultant benefits as described above.

10

In addition, the method is compatible with whole-inactivated virus vaccine and with DNA plasmids without any associated reduction in biological potency as would occur if the virus particles or plasmid DNA were sheared or degraded when passed through the microcannula at the relatively high pressures associated with ID delivery in vivo. The results detailed herein demonstrate that stronger immune responses are induced via ID delivery, especially at reduced vaccine doses, thus potentially enabling significant dose reductions and combination vaccines in humans.

15

20

The results presented above show improved immunization via ID delivery using devices such as those described above as compared to standard intramuscular (IM) injection using a conventional needle and syringe. The dose reduction study (Example 9), shows that ID delivery induces serum antibody responses to an influenza vaccine in rats using at least 100-fold less vaccine than required via IM injection. If applicable in a clinical setting, such dose reduction would reduce or eliminate the problem of influenza vaccine shortages common across the world. In addition, such dose reduction capabilities may enable the delivery of a greater number of vaccine antigens in a single dose, thus enabling combination vaccines. This approach is of particular relevance to HIV vaccines where it likely will be necessary to immunize simultaneously with several genetic variants / sub-strains in order to induce protective immunity.

25

30

WO 03/002069

PCT/US02/20780

Similar benefits are expected with other types of prophylactic and therapeutic vaccines, immuno-therapeutics and cell-based entities by virtue of the improved targeting of the immune system using the methods and devices of the present invention.

5 In another embodiment, it is within the scope of the present invention to combine the ID delivery of the present invention with convention methods of administration, for example IP, IM, intranasal or other mucosal route, or SQ injection, topical, or skin abrasion methods to provide improvement in immunological or therapeutic response. This would include for example, vaccines and or therapeutics of the same or different class, and administration
10 simultaneously or sequentially.

All references cited in this specification are hereby incorporated by reference. The discussion of the references herein is intended merely to summarize the assertions made by their authors and no admission is made that any reference constitutes prior art relevant to
15 patentability. Applicants reserve the right to challenge the accuracy and pertinence of the cited references.

The embodiments illustrated and discussed in the present specification are intended only to teach those skilled in the art the best way known to the inventors to make and use
20 the invention, and should not be considered as limiting the scope of the present invention. The exemplified embodiments of the invention may be modified or varied, and elements added or omitted, without departing from the invention, as appreciated by those skilled in the art in light of the above teachings. It is therefore to be understood that, within the scope of the claims and their equivalents, the invention may be practiced otherwise than as
25 specifically described.

WO 03/002069

PCT/US02/20780

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for delivering a vaccine to a mammal, said method comprising intradermally administering the vaccine through at least one hollow needle having an outlet with an exposed height between 0 and 1 mm, said outlet being inserted into the skin to a depth of between 0.5 mm and 2 mm.
2. The method of claim 1 wherein the vaccine is administered with a device comprising a hub portion being attachable to a prefillable reservoir storing the vaccine; at least one hollow microneedle supported by said hub portion and having a forward tip extending away from said hub portion; and a limiter portion surrounding said microneedle(s) and extending away from said hub portion toward said forward tip of said microneedle(s), said limiter including a generally flat skin engaging surface extending in a plane generally perpendicular to an axis of said microneedle(s) and adapted to be received against the skin of a mammal to administer an intradermal injection of the vaccine, said microneedle(s) forward tip(s) extending beyond said skin engaging surface a distance approximately 0.5 mm to 2.0 mm wherein said limiter portion limits penetration of the microneedle(s) into the dermal layer of skin of the mammal.
3. The method of claim 1 wherein delivery of the vaccine occurs at a depth between 0.025 mm and 2.5 mm in the skin of the mammal.
4. The method of claim 1 wherein the delivered vaccine induces an immune response in the mammal that is equal to or greater than the response after delivery of the same amount of vaccine by subcutaneous or intramuscular injection.
5. The method of claim 1 wherein the delivered vaccine induces an immune response in the mammal that is equal to or greater than the response after delivery of a greater amount of vaccine by subcutaneous or intramuscular injection.
6. The method of claim 1 wherein the needle is a microneedle between about 31 to 50 gauge.
7. The method of claim 1 wherein the needle has a bevel angle between 20° and 90°.
8. The method of claim 7 wherein the needle has a bevel angle between 25° and 40°.
9. The method of claim 6 wherein the length of the needle inserted into the skin is to a depth from about 0.5 mm to about 1.7 mm.
10. The method of claim 6 wherein the microneedle is in an array of microneedles.
11. The method of claim 1 wherein the vaccine comprises a live attenuated virus.

WO 03/002069

PCT/US02/20780

12. The method of claim 1 wherein the vaccine comprises a live attenuated bacterium.
13. The method of claim 1 wherein the vaccine comprises an inactivated or killed virus.
14. The method of claim 13 wherein the vaccine additionally comprises an adjuvant.
15. The method of claim 13 wherein the vaccine is an influenza vaccine.
- 5 16. The method of claim 1 wherein the vaccine comprises an inactivated or killed bacterium.
17. The method of claim 1 wherein the vaccine comprises a nucleic acid.
18. The method of claim 17 wherein a peptide or protein encoded by the nucleic acid is expressed in the mammal.
- 10 19. The method of claim 17 wherein the vaccine additionally comprises an adjuvant.
20. The method of claim 17 wherein the vaccine is an influenza vaccine.
21. The method of claim 1 wherein the vaccine comprises a live nonattenuated bacterium or virus.
22. The method of claim 1 wherein the vaccine comprises mammalian cells or components thereof.
- 15 23. The method of claim 1 wherein the vaccine comprises a polysaccharide or polysaccharide conjugate.
24. The method of claim 1 wherein the vaccine comprises a protein or peptide.
25. The method of claim 1 wherein the needle(s) are inserted substantially perpendicularly to the skin.
- 20 26. The method of claim 1 that additionally comprises administering a second vaccine intramuscularly, subcutaneously, mucosally, intraperitoneally, intravenously, topically or epidermally.
27. The method of claim 26 wherein the second vaccine is the same composition as said vaccine.
- 25 28. The method of claim 26 wherein the second vaccine is a different composition than said vaccine.
29. The method of claim 26 wherein the second vaccine is a different vaccine class from said vaccine.
- 30 30. The method of claim 26 wherein said second vaccine is administered simultaneously with said vaccine.
31. The method of claim 26 wherein said second vaccine is administered subsequently to said vaccine.

WO 03/002069

PCT/US02/20780

32. The method of claim 1 that additionally comprises administering a second vaccine through at least one hollow needle having an outlet with an exposed height between 0 and 1 mm, said outlet being inserted into the skin to a depth of between 0.5 mm and 2 mm.
- 5 33. The method of claim 32 wherein delivery of the second vaccine occurs at a depth between 0.025 mm and 2.5 mm in the skin of the mammal.
34. The method of claim 32 wherein the second vaccine is administered simultaneously with said vaccine.
35. The method of claim 32 wherein the second vaccine is administered subsequent to said vaccine.
- 10 36. The method of claim 35 wherein the second vaccine is administered one day to six weeks after said vaccine.
37. The method of claim 32 wherein the second vaccine is a different vaccine class than said vaccine.
- 15 38. The method of claim 32 wherein the second vaccine is the same composition than said vaccine.
39. The method of claim 32 wherein the second vaccine is a different composition than said vaccine.
40. A method for delivering a vaccine to a mammal, said method comprising :
- 20 a) contacting the skin of the mammal with a device having a dermal-access means for accurately targeting a dermal space of the skin at a depth between 0.025 mm and 2.5 mm with the vaccine; and
- b) delivering the vaccine to the dermal space.
41. The method of claim 40 wherein the delivered vaccine induces an immune response in the mammal that is equal to or greater than the response after delivery of the same amount of vaccine by subcutaneous or intramuscular injection.
- 25 42. The method of claim 40 wherein the delivered vaccine induces an immune response in the mammal that is equal to or greater than the response after delivery of a greater amount of vaccine by subcutaneous or intramuscular injection.
- 30 43. A method for delivering a gene therapeutic agent to a mammal, said method comprising administering the therapeutic agent through at least one small gauge hollow needle having an outlet with an exposed height between 0 and 1 mm, said outlet being inserted into the skin to a depth of between 0.5 mm and 2 mm.

WO 03/002069

PCT/US02/20780

44. The method of claim 43, wherein delivery of the therapeutic agent occurs at a depth between 0.025 mm and 2.5 mm in the skin of the mammal.
45. The method of claim 43 wherein a peptide or protein encoded by the gene therapeutic agent is expressed in the mammal.
- 5 46. The method of claim 45 wherein expression occurs in skin cells of the mammal.
47. The method of claim 43 wherein the needle is a microneedle between 31 to 50 gauge.
48. The method of claim 43 wherein the needle has a bevel angle between 20° and 90°.
49. The method of claim 48 wherein the needle has a bevel angle between 25° and 40°.
50. The method of claim 43 wherein the needle has a length from about 0.5 mm to about
10 1.7 mm.
51. The method of claim 47 wherein the microneedle is contained in an array of microneedles.
52. The method of claim 43 wherein the gene therapeutic agent comprises a nucleic acid.
53. The method of claim 43 wherein the needle(s) are inserted substantially
15 perpendicularly to the skin.
54. A kit comprising a delivery device having at least one hollow microneedle designed to intradermally deliver a substance to a depth between 0.025 and 2.5 mm, said delivery device being adapted to receive a reservoir that contains a gene therapeutic agent or vaccine such that the microneedle is in communication therewith.
- 20 55. The kit of claim 54 that additionally comprises an effective dosage of a vaccine or gene therapeutic.
56. The kit of claim 55 wherein the dosage is contained in a reservoir that is an integral part of, or is capable of being functionally attached to, the delivery device.
57. The kit of claim 54 wherein the hollow microneedle is between about 31 to 50 gauge.
- 25 58. The kit of claim 54 wherein the device comprises an array of microneedles.
59. The kit of claim 54 wherein the device comprises
- a hub portion being attachable to a refillable reservoir storing the vaccine;
at least one microneedle supported by said hub portion and having a forward tip extending away from said hub portion; and
- 30 a limiter portion surrounding said microneedle and extending away from said hub portion toward said forward tip of said microneedle, said limiter including a generally flat skin engaging surface extending in a plane generally perpendicular to an axis of said microneedle and adapted to be received against the skin of a mammal to

WO 03/002069

PCT/US02/20780

administer an intradermal injection of the vaccine, said microneedle forward tip extending beyond said skin engaging surface a distance approximately 0.5 mm to 2.0 mm wherein said limiter portion limits penetration of the microneedle into the dermal layer of skin of the mammal.

- 5 60. A kit comprising a dermal access means designed to intradermally deliver a substance to a depth between 0.025 and 2.5 mm, said dermal access means being adapted to receive a reservoir that contains a gene therapeutic agent or vaccine such that the dermal access means is in communication therewith.

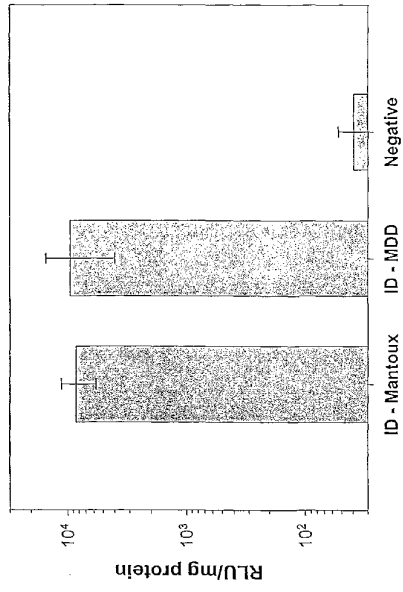


Figure 1

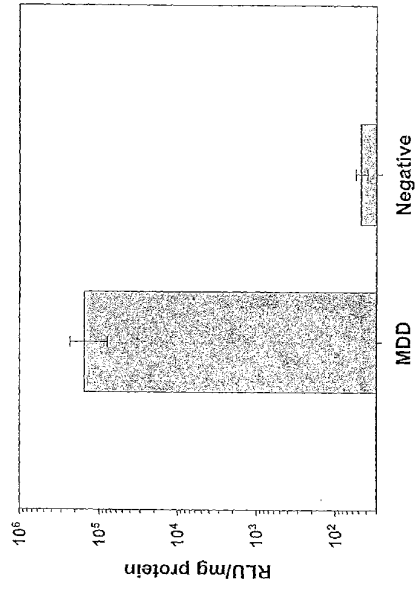


Figure 2

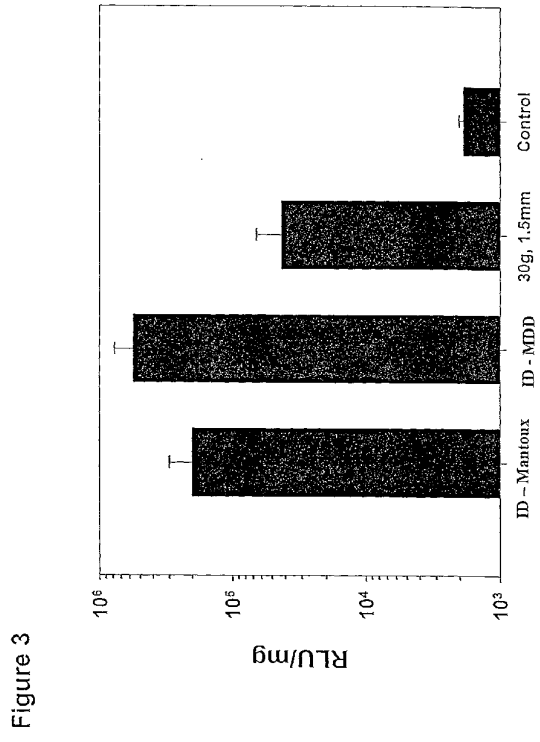


Figure 3

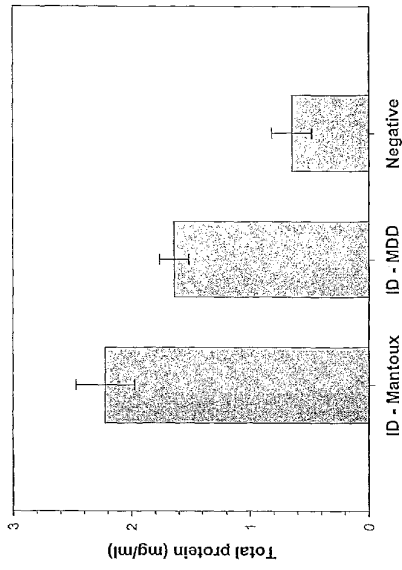


Figure 4

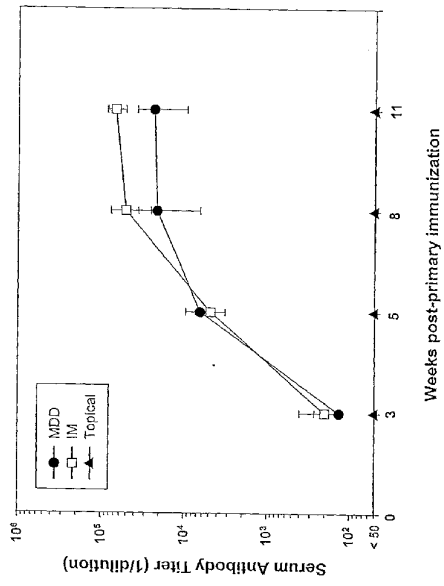


Figure 5

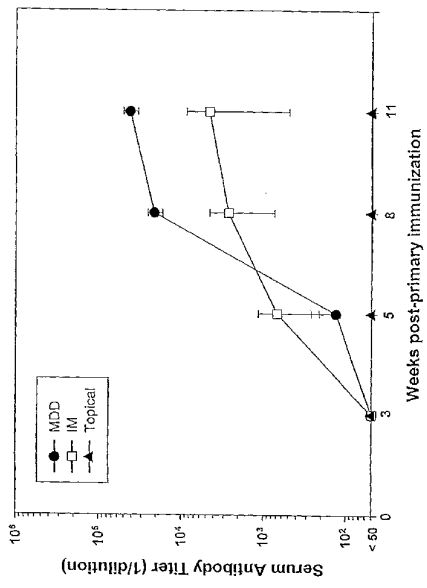


Figure 6

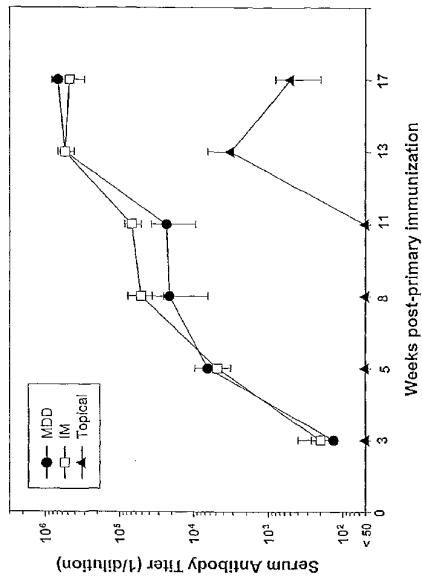


Figure 7

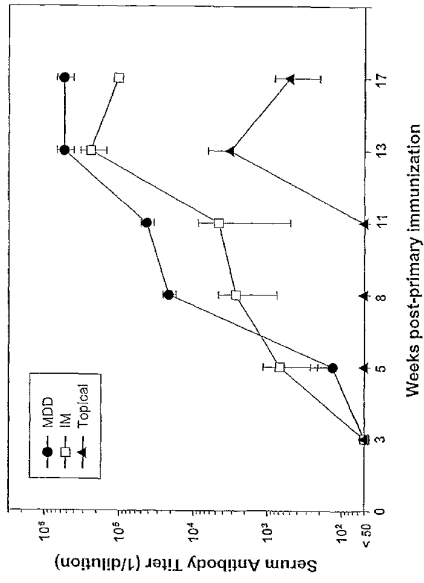


Figure 8

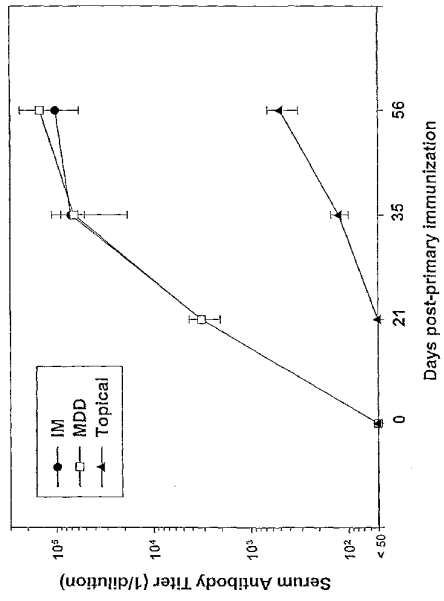


Figure 9

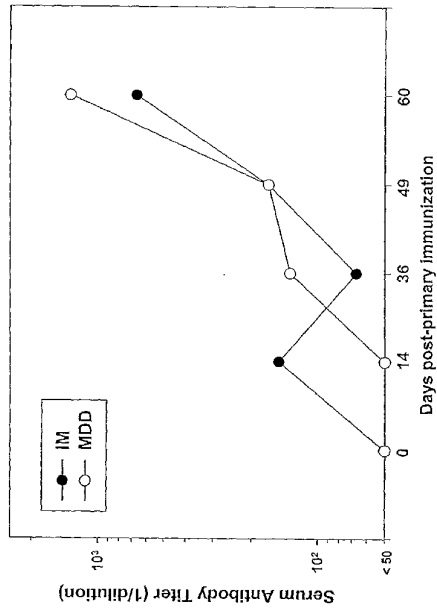


Figure 10

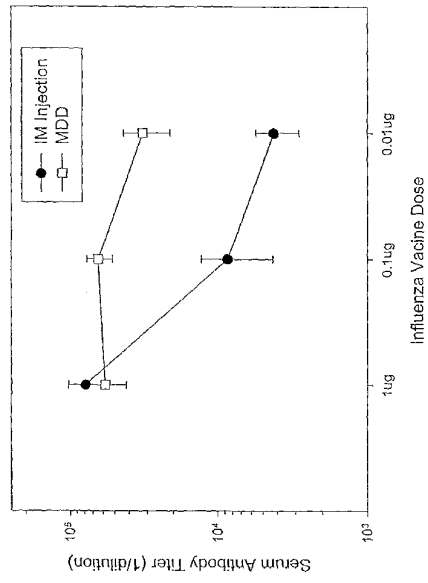


Figure 11

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 January 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/002069 A3

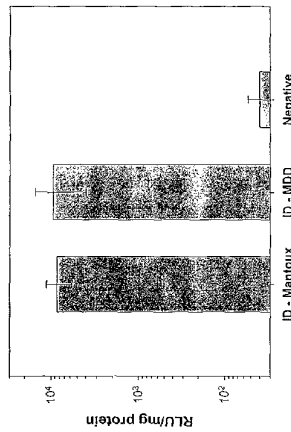
- (51) International Patent Classification⁷: A61M 5/00 [US/US]: 115 Wood Valley Ct., Durham, NC 27713 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/20780 ALARCON, Jason [US/US]: 5201 Trinity Village Lane, Apt. 304, Raleigh, NC 27607 (US). ALCHAS, Paul, G. [US/US]: 29 Ponds Circle, Wayne, NJ 07470 (US).
- (22) International Filing Date: 1 July 2002 (01.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
50/301,476 29 June 2001 (29.06.2001) US
10/044,504 10 January 2002 (10.01.2002) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BECTON, DICKINSON AND COMPANY [US/US]; Intellectual Property Department, Mail Code 089, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ 07417-1880 (US).
- (74) Agent: LEE, Eric M.; Becton, Dickinson and Company, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).

[Continued on next page]



WO 03/002069 A3

(54) Title: INTRADERMAL DELIVERY OF VACCINES AND GENE THERAPEUTIC AGENTS VIA MICROCANNULA



(57) Abstract: Methods and devices for administration of vaccines and gene therapeutic agents into the intradermal layer of skin.

WO 03/002069 A3 

European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
14 August 2003

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/20780										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(7) : A61M 5/00 US CL : 604/117												
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) U.S. : 604/117, 198, 171, 192, 197												
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)												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A	US 2,569,901 A (RICHARD) 02 October 1951 (02.10.1951), see figure 1.	1-60										
A	US 1,274,081 A (RIETHMUELLER) 30 July 1918 (30.07.1918), see entire patent.	1-60										
A	US 2,559,474 A (SON) 09 March 1951 (09.03.1951), see entire patent.	1-60										
A	US 1,436,707 A (GASCHKE) 28 November 1922 (28.11.1922), see entire patent.	1-60										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step within the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"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 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 within 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	
"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 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 within 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 13 April 2003 (13.04.2003)		Date of mailing of the international search report 16 APR 2003										
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 395-3230		Authorized officer <i>Manuel Mendez</i> Telephone No. (703) 368-2221										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

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 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 M 5/32	A 6 1 M 5/32	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/16	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

(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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100088915

弁理士 阿部 和夫

(72)発明者 ジョン エー . ミックズタ

アメリカ合衆国 2 7 7 1 3 ノースカロライナ州 ダラム ウッド バレー シーティ . 1
1 5

(72)発明者 ジェyson アラーコン

アメリカ合衆国 2 7 6 0 7 ノースカロライナ州 ローリー トリニティー ビレッジ レーン
5 2 0 1 アパートメント 3 0 4

(72)発明者 ポール ジー . アルカス

アメリカ合衆国 0 7 4 7 0 ニュージャージー州 ウェーン ポンズ サークル 2 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA02 EA04 GA11 HA17

4C066 BB01 CC01 FF05 KK19

4C076 AA12 AA95 BB15 BB16 CC07 CC31 CC35 EE30 EE57 FF68

4C084 AA13 MA66 NA05 NA13 ZB09 ZB33 ZB35

4C085 AA03 BA07 BA51 BA57 BB11 CC21 CC31 DD62 EE01 GG03

GG04