

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043519**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.30

(21) Номер заявки
202091517

(22) Дата подачи заявки
2018.12.18

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61N 1/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) СПОСОБ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ДОСТАВКИ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV)

(31) PCT/US2017/067269; 62/607,430

(32) 2017.12.19

(33) US

(43) 2020.11.03

(86) PCT/US2018/066157

(87) WO 2019/126120 2019.06.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН САЙЕНСИЗ АЙРЛЭНД
АНЛИМИТЕД КОМПАНИ (IE);
АЙКОР МЕДИКАЛ СИСТЕМЗ, ИНК.
(US)**

(56) WO-A1-2017172838
WO-A1-2016020538
WO-A1-2013007772
WO-A2-2011015656
WO-A1-2008093976
WO-A1-2012109668
WO-A1-2016054003
WO-A1-2005087311

(72) Изобретатель:
**Бодан Даниель, Хортон Хелен, Нефс
Жан-Марк Эдмон Фернан Мари
(BE), Рой Соумитра (NL), Ханнаман
Эндрю У., Бернард Роберт М., Морс
Стефен А., Рак Оливер, Хартман
Адам, Кокс Томас Дэвид (US), Де
Потер Дорин (BE)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(57) Описаны способы и устройства для воспроизводимой, согласованной и эффективной доставки вакцины против HBV индивидууму. В настоящем изобретении раскрывается устройство для регулируемого введения индивидууму вакцины против HBV через отверстие посредством множества проникающих электродов, расположенных в предварительно заданной пространственной взаимосвязи по отношению к отверстию, и генератора электрических сигналов, функционально связанного с электродами.

043519 B1

043519 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет Международной патентной заявки No. PCT/US2017/067269, поданной 19 декабря 2017 г., и предварительной заявки на патент США No. 62/607430, поданной 19 декабря 2017 г., раскрытие которых в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки.

Ссылка на список последовательностей, поданный в электронной форме

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронной форме посредством EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII под названием файла "688097-331WO Sequence Listing", созданного 10 декабря, 2018 г. и имеющего размер 46,6 килобайт. Этот список последовательностей, представленный в EFS-Web, является частью настоящей заявки и включен в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к введению профилактических и/или терапевтических вакцин против вируса гепатита В (HBV) индивидуумам, нуждающимся в этом, а в частности, к воспроизводимой, согласованной и эффективной доставке профилактических и/или терапевтических вакцин против HBV, таких как нуклеиновые кислоты, кодирующие антигены HBV, в определенные области в выбранном представляющем интерес участке ткани, где указанная доставка облегчается благодаря локальной подаче электрических полей безопасным, эффективным и согласованным способом для гетерогенных групп реципиентов с минимальной подготовкой пользователя.

Предпосылки создания изобретения

Вирус гепатита В (HBV) представляет собой небольшой гепатотропный ДНК-вирус размером 3,2 т.п.о., который кодирует четыре открытые рамки считывания и семь белков. Около двух миллиардов человек инфицированы HBV, и приблизительно 240 миллионов человек имеют хроническую инфекцию гепатита В (хроническую HBV-инфекцию), характеризующуюся постоянным присутствием в крови вирусных и субвирусных частиц в течение более 6 месяцев (Cohen et al. J Viral Hepat. (2011) 18 (6), 377-83). Персистентная HBV-инфекция приводит к истощению Т-клеток в кровотоке и к истощению внутрипеченочных HBV-специфических CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток посредством хронической стимуляции HBV-специфических Т-клеточных рецепторов вирусными пептидами и циркулирующими антигенами. В результате этого, полифункциональность Т-клеток снижается (то есть снижаются уровни IL-2, фактора некроза опухоли (TNF)- α , IFN- γ , и наблюдается отсутствие пролиферации и дегрануляции). Терапевтическая вакцинация позволяет элиминировать HBV у хронически инфицированных индивидуумов (Michel et al. J. Hepatol. (2011) 54 (6), 1286-1296). Иммуногенные композиции, содержащие одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих один или более антигенов HBV, могут быть использованы для вырабатывания терапевтического иммунитета у индивидуума, нуждающегося в этом, такого как человек, имеющий хроническую HBV-инфекцию.

Хотя "оголенная" ДНК может доставляться в клетки *in vivo* и приводить к экспрессии генов, однако, эффективность переноса генов является относительно низкой и вариабельной. Было показано, что локальная подача электрических сигналов улучшает распределение и поглощение макромолекул в живой ткани. Подача таких электрических сигналов в ткань в сочетании с введением профилактической или терапевтической вакцины против HBV может оказывать желаемое воздействие на ткань и/или доставляемый агент. В частности, такие методы, как электропорация и ионтофорез, были применены для значительного улучшения распределения и/или поглощения нуклеиновых кислот, включая последовательности ДНК и РНК. Потенциальные клинические применения таких методов включают доставку последовательностей нуклеиновых кислот для профилактической и терапевтической иммунизации, и доставку последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих терапевтические белки или пептиды.

Процедуры такой доставки включают введение представляющего интерес агента в участок ткани-мишени в комбинации с подачей электрических полей, магнитуда и длительность которых является достаточными для достижения желаемых эффектов в отношении доставки, распределения и/или активности агента. Электрические поля распространяются двумя или более электродами посредством электропроводящей связи с тканью. Electrodes с конфигурацией, подходящей для использования в этих способах, представляют собой проникающие в ткань электроды, поверхностные контактные электроды и электроды с воздушным зазором. Electrodes с конкретной конфигурацией являются, но не ограничиваются ими, удлиненные игольчатые или стержневые электроды, точечные электроды, извилистые электроды (то есть электроды в форме проволоки), плоские электроды и их комбинации. Конкретный тип и расположение электродов выбирают в зависимости от типа ткани-мишени и целей проведения данной процедуры. Желаемый результат лучше всего достигается в том случае, если электрические поля распространяются в ткани-мишени в присутствии представляющего интерес агента.

Был описан широкий спектр способов и устройств для подачи электрических полей в ткань в присутствии представляющего интерес агента в целях улучшения доставки агента в кожу и мышечную ткань. В этих устройствах применяются системы электродов, проникающих как через поверхность, так и через ткань, а также их комбинации. Несмотря на обнадеживающие перспективы, связанные с электрически опосредованной доставкой агентов и возможным клиническим применением этих методов, все еще

существует потребность в надежной и согласованной доставке индивидуумам представляющих интерес нуклеиновых кислот. Существенными причинами такой вариабельности являются различия в технике и уровне квалификации оператора. Другими причинами вариабельности, которые не относятся к современным системам, являются различия физиологических особенностей индивидуумов, которые могут влиять на применение данной процедуры. Другими соображениями при разработке подходящих устройств являются простота их применения и реализация проектов, которые снижают частоту и значимость потенциальных ошибок пользователя.

Учитывая тот факт, что безопасное, надежное, точное и согласованное применение клинической терапии является крайне желательным, то разработка усовершенствованных систем такого применения вполне оправдана. Такая разработка должна включать средства для минимизации вариабельности, связанной с действием операторов, и в то же время предоставлять средства для учета различий в особенностях индивидуумов, которые могут иметь место во время широкого клинического применения электрически опосредованной доставки агента. Другими словами, конкретные области для такого усовершенствования включают возможность постоянно поддерживать эффективность такой системы для гетерогенных групп реципиентов и снижение требований к уровню подготовки и навыков, необходимых для ее эффективного применения пользователем. Кроме того, устройство, система или способ должны быть спроектированы так, чтобы это помогло предотвратить ошибки пользователя или устройства и минимизировать их влияние в случае их возникновения.

Этот раздел "Предпосылки создания изобретения" приводится для краткого изложения материала, представленного ниже в разделах "Сущность" и "Подробное описание изобретения". Этот раздел не рассматривается как помощь в определении объема заявленного предмета изобретения и не должен рассматриваться как ограничение заявленного предмета изобретения, относящегося к способам осуществления изобретения, которые позволяют устранить любые или все недостатки или решить любые или все проблемы, описанные выше.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к устройствам, наборам и способам для воспроизводимой, согласованной и эффективной доставки вакцины против HBV, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген HBV, индивидууму, нуждающемуся в этом, с применением электрически опосредованной доставки терапевтического агента (EMTAD). В описанных здесь вариантах осуществления изобретения, терапевтический агент представляет собой вакцину против HBV.

В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к устройству для доставки вакцины против HBV в предварительно определенный участок у индивидуума, содержащему блок для регулируемого введения вакцины против HBV индивидууму, включающий резервуар, содержащий вакцину против HBV, по меньшей мере одно отверстие, через которое вводится агент, и регулируемый источник энергии, достаточный для переноса заранее определенного количества вакцины против HBV с заранее определенной скоростью из резервуара через отверстие в заранее определенный участок у индивидуума. Кроме того, устройство может включать множество проникающих электродов, расположенных в заданной пространственной взаимосвязи по отношению к отверстию, и генератор электрических сигналов, функционально соединенный с электродами.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к набору для доставки вакцины против HBV в заранее определенный участок у индивидуума, где указанный набор включает вакцину против HBV и устройство, содержащее блок для регулируемого введения вакцины против HBV индивидууму, где указанное устройство включает резервуар для вакцины против HBV, по меньшей мере одно отверстие, через которое вводится вакцина против HBV, и регулируемый источник энергии, достаточный для переноса заранее определенного количества вакцины против HBV с заранее определенной скоростью из резервуара через отверстие в заранее определенный участок у индивидуума. Кроме того, устройство может включать множество проникающих электродов, расположенных в предварительно определенной пространственной взаимосвязи по отношению к отверстию, и генератор электрических сигналов, функционально соединенный с электродами.

Вакцина против HBV, включенная в устройство или набор согласно изобретению, может содержать:

первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, где антиген полимеразы HBV не обладает обратной транскриптазной активностью и активностью РНКазы Н;

вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую второй полинуклеотид, кодирующий усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и

фармацевтически приемлемый носитель,

где первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты или в двух различных молекулах нуклеиновой кислоты.

Другие аспекты раскрытия изобретения включают способы, включающие введение вакцины против

HBV в регулируемой пространственной и временной взаимосвязи с подачей электрических сигналов (ESA).

Благоприятные эффекты и преимущества некоторых способов осуществления изобретения в соответствии с принципами согласно изобретению достаточно многообразны. Некоторые способы осуществления изобретения позволяют выбирать глубину введения иглы и электрода и вводить их в нужные ткани различных типов (например, в дерму, мышцы и т.п.) для всех гетерогенных групп индивидуумов с различными массами тела и телосложением. Такая реализация также облегчает адаптацию способов для их применения для конкретных целевых групп, например, но не ограничиваясь ими, для пациентов, имеющих хроническую HBV-инфекцию и/или заболевание, вызываемое HBV. Настоящее изобретение относится к системам и способам, включающим конструктивные особенности, которые сообщают этим системам и способам резистентность к случайной разрядке или потенциально неправильному использованию устройства, например, из-за его падения, вибрации и/или поломки. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к устройствам с конфигурацией, имеющей множество отверстий для инъекций. Системы и способы согласно принципам настоящего изобретения допускают многочисленные защитные блокировки для уменьшения частоты и/или негативного влияния ошибок пользователя. Эти меры облегчают правильное приготовление и расчет вводимой дозы, что будет обеспечивать приложение требуемой силы к ткани реципиента и будет гарантировать удаление защитной крышки и т.п. Системы, устройства, наборы и способы согласно принципам настоящего изобретения позволяют осуществлять в высокой степени согласованную терапию независимо от квалификации специалиста, осуществляющего введение, или типа реципиента. Описанные здесь системы, устройства, наборы и способы могут обеспечивать, например, постоянный профиль силы, который может быть достигнут до и во время введения терапевтического средства, так, чтобы эти дозы можно было вводить реципиентам с различными особенностями кожи и мышц.

Это краткое описание сущности изобретения представлено для выбора концепции в упрощенной форме. Эти концепции также описаны в разделе "Подробное описание изобретения". При этом возможно использование элементов или стадий, отличающихся от элементов или стадий, описанных в разделе "Сущность изобретения", но эти элементы или стадии не являются необходимыми. Это описание сущности изобретения не предназначено для идентификации ключевых признаков или важных признаков заявленного предмета изобретения, а также не рассматривается как помощь в определении объема заявленного предмета изобретения. Заявленный предмет изобретения не ограничивается способами осуществления изобретения, которые позволяют устранить любые или все недостатки, описанные в любой части настоящей заявки.

Другие аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из нижеследующего раскрытия, включая подробное описание изобретения и предпочтительные варианты его осуществления и прилагаемая формула изобретения.

Краткое описание чертежей

Особенности раскрытия изобретения точно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Для лучшего понимания особенностей и преимуществ раскрытия изобретения приводятся ссылки на нижеследующее подробное описание, где представлены иллюстративные варианты осуществления изобретения согласно принципам раскрытия настоящего изобретения и прилагаемые чертежи, где:

на фиг. 1 проиллюстрированы потенциальные источники пространственной вариативности, ассоциированной с инъекцией стандартным шприцем с иглой;

на фиг. 2 представлен общий вид системы согласно принципам настоящего изобретения, включая кассетный блок 100, аппликатор 400 и систему регуляторов 700;

на фиг. 3А-3В даны изображения описанного здесь устройства в различных видах. На фиг. 3А показан вид сбоку кассетного блока 100 согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 3В показан вид сбоку резервуара для вакцины против HBV 101, изготовленного в виде шприца согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 4 показаны различные репрезентативные компоненты кассетного блока 100 согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 5А-5Е даны изображения внутренней кассеты и задней части кассеты в описанном здесь устройстве. На фиг. 5А показан вид сверху внутренней кассеты 103 согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 5В показан вид снизу внутренней кассеты 103 и задней части кассеты согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 5С показан вид сбоку в перспективе детального изображения внутренней кассеты 103 согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 5Д показан вид сбоку задней части кассеты 112 согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 5Е показана блокировка 120 резервуара с улучшенными функциями блокировки, предотвращающими непроизвольное перемещение задней части кассеты 112 вперед;

на фиг. 6 детально представлен кассетный блок, где показаны рейка 154, сигнал инициации 172 и сигнал продолжения 174 согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 7А-7В показаны изображения электродов и/или электродных контактов описанного здесь устройства в различных видах. На фиг. 7А детально показаны электродные контакты 130 и различные

части электродных контактов согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 7В детально показаны электроды 122 и различные части электродных контактов согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 8А-8В показаны системы блокировки силового контакта в описанном здесь устройстве в различных видах. На фиг. 8А показан вид сверху системы блокировки силового контакта согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 8В показаны детали системы блокировки силового контакта согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 9А-9Д дано изображение описанного здесь устройства в различных видах. На 9А показана игла 105 и дистальные внутренние кассетные электроды 137 для введения в ткань согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 9В показаны детали защитного экрана 134 согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 9С проиллюстрирована выравнивающая панель 108 и боковой экран 168 согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 9Д показаны опоры защитного экрана, встроенные во внешнюю крышку кассеты 106;

на фиг. 10А-10Д дано изображение внешней кассетной крышки в описанном здесь устройстве в различных видах. На 10А показана внешняя кассетная крышка 110 согласно принципам настоящего изобретения. На 10В показан вид сбоку внешней кассетной крышки 110 согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 10С показана внешняя кассетная крышка 110, используемая в выравнивающей панели 108 и в боковом экране согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 10Д показана внешняя кассетная крышка 110 с удлинительными элементами, предназначенными для удерживания внутренней кассеты 103 в определенном положении во время транспортировки и погрузки;

на фиг. 11А-11С показаны детали защитных экранов описанного здесь устройства в различных видах. На фиг. 11А показан крюк 182 для удерживания защитного экрана 134 согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 11В показаны детали защитного экрана 134 согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 11С показаны опоры защитного экрана 132, удерживающие защитный экран 134 в определенном положении согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 12 показаны детали опоры электрода 124 согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 13А-13В показаны изображения аппликатора в описанном здесь устройстве. На фиг. 13А показан вид сбоку аппликатора 400 согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 13В показан вид сверху аппликатора 400 согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 14 показано объемное изображение аппликатора 400 согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 15 показаны детали бокового кожуха и электродного соединения для электропорации 496 аппликатора 400 согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 16 показано объемное изображение аппликатора согласно принципам настоящего изобретения, иллюстрирующее субблок для загрузки кассеты 456;

на фиг. 17А-17В показаны изображения аппликатора в описанном здесь устройстве. На фиг. 17А показано объемное изображение аппликатора согласно принципам настоящего изобретения, иллюстрирующее субблок привода для загрузки 454. На фиг. 17В показана рейка 154 субблока привода для загрузки 454 согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 18А-18С показаны изображения аппликатора в описанном здесь устройстве в различных видах. На фиг. 18А показаны детали субблока для загрузки кассеты 456 согласно принципам настоящего изобретения, где блок привода аппликатора для вставки/инъекции соединен с кассетным блоком. На фиг. 18В показан кассетный блок в поперечном разрезе согласно принципам настоящего изобретения, где блок привода аппликатора для вставки/инъекции соединен с кассетным блоком. На фиг. 18С показаны детали загрузки кассеты, вставки электрода и субблоков для инъекций 452 аппликатора 400 согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 19 показаны различные компоненты системы регуляторов согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 20А-20Д показано изображение описанного здесь устройства. На фиг. 20А показаны различные компоненты системы регуляторов согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 20В показаны детали соединительного порта 708 аппликатора и лотка 710 системы регуляторов согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 20С показаны детали экрана дисплея стимулятора системы регуляторов согласно принципам настоящего изобретения. На фиг. 20Д детально показан вид сзади системы регуляторов согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 21 представлена блок-схема, иллюстрирующая способ работы согласно принципам настоящего изобретения;

на фиг. 22 показана электродная матрица TriGrid (в поперечном разрезе) для внутримышечной (i.m.) доставки, которая состоит из четырех электродов, расположенных в виде двух равнобедренных треугольников, имеющих ромбовидную форму, окружающую центральную иглу для инъекций;

на фиг. 23А-23В изображены устройства TriGrid TDS-IM v1.0, адаптированные для использования в мышечной модели (фиг. 23А) и модели приматов, не являющихся человеком (NHP) (фиг. 23В);

на фиг. 24 изображено устройство TDS-IM v2.0 TriGrid, адаптированное для использования в моде-

ли приматов, не являющихся человеком (NHP);

на фиг. 25А-25Н показаны конструкция и оптимизация экспрессионных кластеров и ДНК-плазмид, кодирующих антигены рол и коровые антигены HBV, как описано в примере 1. На фиг. 25А схематически представлена стратегия экспрессии, где кодирующие последовательности коровых антигенов и антигенов рол HBV связаны друг с другом с сохранением рамки считывания. На фиг. 25В схематически представлена стратегия экспрессии, где кодирующие последовательности коровых антигенов и антигенов рол HBV экспрессируются из одной плазмиды посредством сайта вырезания рибосомы FA2. На фиг. 25С схематически представлена стратегия экспрессии, где коровые антигены и антигены рол экспрессируются из двух отдельных плазмид. На фиг. 25D проиллюстрирован Вестерн-блот-анализ на экспрессию корового антигена в клетках HEK293T, трансфицированных плазмидой, экспрессирующей коровый антиген в присутствии и в отсутствии постранскрипционного регуляторного элемента WPRE; экспрессия была протестирована в клеточном лизате (слева) и в супернатанте (sup; справа) с использованием антитела против а-корового антигена. На фиг. 25Е показан Вестерн-блот-анализ, иллюстрирующий сравнение экспрессии корового антигена в клетках HEK293T, трансфицированных плазмидой, экспрессирующей коровый антиген и включающей последовательность интрона/экзона, происходящую от предшественника человеческого аполипопротеина А1 ("интрон А1"), от нетранслируемого домена R-U5 длинного концевой повтора (LTR) вируса человеческого Т-клеточного лейкоза типа 1 (HTLV-1), ("HTLVR") или от тройной последовательности гибридных энхансеров HTLV-1 LTR, синтетического интрона кроличьего - глобина и энхансера сплайсинга ("тройного"); немеченая дорожка представляет собой очищенный коровый белок, используемый в качестве маркера размера; экспрессия была протестирована в лизате (слева) и в супернатанте (sup; справа); экспрессия корового антигена была самой высокой в случае тройной последовательности гибридных энхансеров. На фиг. 25F показан Вестерн-блот-анализ секреции корового антигена с использованием различных сигнальных пептидов, присоединенных к N-концу корового антигена HBV; а наиболее эффективная секреция белка наблюдалась в случае сигнального пептида цистатина S. На фиг. 25G схематически представлены оптимизированные экспрессионные кластеры корового антигена/антигена рол HBV для каждой из трех стратегий экспрессии, проиллюстрированных на фиг. 25А-25С. CMVpr: человеческий промотор CMV-IE. TRE: тройная энхансерная последовательность. SP: сигнальный пептид цистатина S. FA2: сайт вырезания рибосомы FMDV. рА: сигнал полиаденилирования BGN;

на фиг. 25Н представлен Вестерн-блот-анализ на экспрессию корового антигена и антигена рол HBV векторов рДК, содержащих каждый из экспрессионных кластеров, представленных на фиг. 25G. Дорожки 1 и 2: рДК-коровый антиген. Дорожки 3 и 4: рДК-рол. Дорожки 5 и 6: рДК-coreFA2Pol. Дорожки 7 и 8: гибрид рДК-коровый антиген-антиген рол. Наиболее приемлемый профиль экспрессии для клеточных и секретируемых коровых антигенов и антигенов рол наблюдался в случае, когда антигены кодировались отдельными векторами;

на фиг. 26А-26В схематически представлены ДНК-плазмиды согласно вариантам осуществления изобретения. На фиг. 26А показана ДНК-плазида, кодирующая антиген полимеразы (рол) HBV согласно варианту осуществления изобретения. На фиг. 26В показана ДНК-плазида, кодирующая коровый антиген HBV, согласно варианту осуществления изобретения. Коровые антигены и антигены рол HBV экспрессируются под контролем промотора CMV посредством N-концевого сигнального пептида цистатина S, который отщепляется от экспрессированного антигена после секреции из клетки. Элементы регуляции транскрипции плазмиды включают последовательность энхансера, расположенную между промотором CMV и полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген HBV, и последовательность полиаденилирования bGN, расположенную ниже последовательности полинуклеотида, кодирующей антиген HBV. Второй экспрессионный кластер включен в плазмиду в обратной ориентации, включая ген резистентности к канамицину под контролем промотора Amp^r (bla), и ориджин репликации (pUC) также включен в обратной ориентации.

Одинаковые ссылочные позиции обозначают одинаковые элементы во всем описании. Элементы не были масштабированы, если это не оговорено особо.

Подробное описание изобретения

В нижеследующем описании и в примерах подробно проиллюстрированы варианты осуществления изобретения. Следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными здесь вариантами его осуществления, и такие варианты могут варьироваться. Для специалистов в данной области будет очевидно, что существует множество вариантов и модификаций согласно изобретению, которые входят в объем изобретения.

Все термины употребляются в общепринятых значениях, известных специалистам в данной области. Если это не оговорено особо, то все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют те же значения, которые обычно понятны специалистам в области, к которой относится изобретение.

Используемые здесь заголовки разделов приводятся лишь в организационных целях и не должны рассматриваться как ограничение предмета описанного изобретения.

Хотя различные признаки изобретения могут быть описаны в контексте одного варианта осуществ-

ления изобретения, однако, эти признаки могут быть также представлены отдельно или в любой подходящей комбинации. И наоборот, для ясности, хотя настоящее изобретение может быть описано здесь в контексте отдельных вариантов осуществления изобретения, однако, настоящее изобретение может быть также реализовано в одном варианте осуществления изобретения.

В попытке помочь читателю понять настоящее описание, данное описание было разделено на различные параграфы или разделы или подразделено на различные варианты настоящей заявки. Эти разделы не следует рассматривать как отклонение сущности параграфа или раздела или вариантов изобретения от сущности другого параграфа или раздела или вариантов. И наоборот, специалисту в данной области понятно, что данное описание имеет широкое применение и охватывает все комбинации различных разделов, параграфов и предложений, которые могут быть рассмотрены. Обсуждение любого варианта осуществления изобретения приводится лишь в иллюстративных целях и при этом, не предполагается, что объем раскрытия, включая формулу изобретения, будет ограничен этими примерами. Так, например, хотя варианты векторов HBV, которые могут быть использованы в описанной здесь заявке (например, плазмидная ДНК или вирусные векторы), могут содержать конкретные компоненты, включая, но не ограничиваясь ими, некоторые промоторные последовательности, энхансерные последовательности или регуляторные последовательности, сигнальные пептиды, кодирующую последовательность антигена HBV, последовательности сигнала полиаденилирования и т.п., расположенные в определенном порядке, однако, специалистам в данной области должно быть очевидно, что раскрытые здесь концепции могут в равной степени применяться и к другим компонентам, расположенным в другом порядке, которые могут быть использованы в векторах HBV, подходящих для применения. Такое применение предусматривает использование любого из применяемых компонентов в любой комбинации, имеющей любую последовательность, которая может быть использована в векторах HBV, подходящих для их применения, независимо от того, указана ли точно такая конкретная комбинация или нет.

Нижеследующие определения дополняют определения, имеющиеся в литературе, и относятся к настоящей заявке, но они не должны рассматриваться как определения, применимые к любым родственным или неродственным документам, например, к любым патентам или заявкам, имеющих общего собственника. Хотя для практического осуществления настоящего изобретения могут быть применены любые методы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь методам и материалам, однако, предпочтительными являются материалы и методы, описанные в настоящем изобретении. В соответствии с этим, используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения, и не рассматривается как ограничение объема изобретения.

В настоящей заявке, слово, используемое в единственном числе, включает это слово во множественном числе, если это не оговорено особо. Следует отметить, что используемые в настоящем изобретении существительные в единственном числе могут относиться и к существительным во множественном числе, если из контекста описания не следует обратное. В настоящей заявке, используемый союз "или" означает "и/или", если это не оговорено особо. Кроме того, используемый здесь термин "включающий", а также другие его формы, такие как "включать" и "включенный" не является ограничивающим.

В данном описании, ссылки на "некоторые варианты осуществления изобретения", "вариант осуществления изобретения", "вариант изобретения" или "другие варианты осуществления изобретения" означают, что конкретные признаки, структуры или характеристики, описанные в комбинации с вариантами осуществления изобретения, включены по меньшей мере в некоторые варианты осуществления и, хотя и не обязательно, во все варианты осуществления изобретения.

Используемые в данном описании и в формуле изобретения слова "содержащий" (и любая его форма, такая как "содержать" и "содержит"), "имеющий" (и любая его форма, такая как "иметь" и "имеет"), "включающий" (и любая его форма, такая как "включает" и "включать") или "содержащий" (и любая его форма, такая как "содержит" и "содержать") имеют инклюзивный или неисчерпывающий смысл и не исключают дополнительных неуказанных элементов или стадий способов. При этом предполагается, что любой вариант осуществления изобретения, обсуждаемый в данном описании, может быть реализован в любом способе или в любой композиции изобретения, и наоборот. Кроме того, композиции согласно изобретению могут быть использованы для осуществления способов согласно изобретению.

Используемый здесь термин "приблизительно", употребляемый в отношении используемого здесь эталонного числового значения, и его грамматические эквиваленты могут включать само числовое значение и интервал значений плюс или минус 10% от этого числового значения. Так, например, термин "приблизительно 10" включает 10 и любые значения от 9 до 11. Так, например, термин "приблизительно", употребляемый в отношении эталонного числового значения, может также включать интервал значений плюс или минус 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% от этого значения.

В настоящем изобретении раскрываются усовершенствованные системы, наборы, способы и устройства для воспроизводимой, последовательной и эффективной доставки вакцин против HBV, таких как нуклеиновые кислоты, кодирующие антигены HBV, и их комбинации, вводимые путем электрически опосредуемой доставки терапевтического агента (например, вакцины против HBV) (EMTAD).

В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к устройству для доставки вакцины против HBV в заранее определенный участок у индивидуума, где указанное устройство включает кассетный

блок, содержащий внешнюю кассету, внутреннюю кассету, резервуар, содержащий вакцину против HBV, где приемник резервуара находится во внешней кассете и имеет конфигурацию, подходящую для подачи в резервуар; аппликатор, содержащий приемник кассетного блока нужного объема, втулку для иглы и детектор введения, где детектор введения определяет загрузку резервуара через его приемник; по меньшей мере одну блокировку, где такая блокировка облегчает правильное выполнение процедуры введения вакцины против HBV; по меньшей мере одно отверстие для инъекции, через которое вводят вакцину против HBV; множество проникающих электродов с заданным пространственным расположением по отношению к отверстию; генератор электрического поля для генерации электрического сигнала, функционально соединенный с электродами; и регулируемый источник энергии, достаточный для переноса заранее определенного количества вакцины против HBV с заранее определенной скоростью из резервуара через отверстие в заранее определенный участок у индивидуума.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к набору для доставки вакцины против HBV в заранее определенный участок у индивидуума, где указанный набор содержит вакцину против HBV и устройство, включающее кассетный блок, содержащий внешнюю кассету; внутреннюю кассету; резервуар, содержащий вакцину против HBV, где приемник резервуара находится во внешней кассете, и имеет конфигурацию, подходящую для подачи в резервуар; аппликатор, содержащий приемник кассетного блока, втулку для иглы и детектор введения, где детектор введения определяет загрузку резервуара через его приемник; по меньшей мере одну блокировку, где такая блокировка облегчает надлежащее выполнение процедуры введения вакцины против HBV; по меньшей мере одно отверстие для инъекции, через которое вводят вакцину против HBV; множество проникающих электродов с заданной пространственной взаимосвязью по отношению к отверстию; генератор электрического поля для генерации электрического сигнала, функционально соединенный с электродами; и регулируемый источник энергии, достаточный для переноса заранее определенного количества вакцины против HBV с заранее определенной скоростью из резервуара через отверстие в заранее определенный участок у индивидуума.

Вакцина против HBV, включенная в устройство или в набор согласно изобретению, может содержать:

первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, где антиген полимеразы HBV не обладает обратной транскриптазной активностью и активностью РНКазы H;

вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую второй полинуклеотид, кодирующий усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и

фармацевтически приемлемый носитель,

где первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты или в двух различных молекулах нуклеиновой кислоты.

В некоторых аспектах раскрытия изобретения, EMTAD может означать введение вакцины против HBV в представляющую интерес биологическую ткань, и предварительную, одновременную или последовательную подачу электрических сигналов в биологическую ткань в целях улучшения проникновения вакцины против HBV в указанную ткань и/или поглощения этой вакцины указанной тканью. Способ EMTAD состоит из двух стадий: 1) введения терапевтического агента (то есть вакцины против HBV) (ТАА) и 2) подачи электрического сигнала (ESA), достаточного для индуцирования желаемого эффекта EMTAD. В настоящем изобретении, ТАА может быть осуществлено, например, регулируемым способом, называемым регулируемым введением терапевтического агента (например, вакцины против HBV) (СТАА). Используемый здесь термин СТАА может означать способы или устройства, которые обеспечивают пространственную и/или временную регуляцию введения вакцины против HBV в отношении индуцирования эффекта EMTAD. В регулируемых способах введения могут быть использованы варианты обычного шприца с иглой (например, автоматического устройства для инъекций) и/или различные безыгольные методики (например, струйный инжектор, трансдермальный/чрескожный пластырь, пероральное введение, нанесение геля, крема или введение путем ингаляции). Используемый здесь термин ESA может означать подачу электрических сигналов для облегчения или улучшения доставки активных агентов, например, вакцин против HBV, путем улучшения проникновения указанных агентов в указанную ткань и/или поглощения этих агентов указанной тканью, и тем самым индуцирование эффекта EMTAD. Способы ESA, если они применяются для облегчения или улучшения доставки вакцины против HBV, такие как электропорация, ионтофорез, электроосмос, электропенетрация, электростимуляция, электромиграция и электроконвекция, представляют собой различные варианты EMTAD, где один или более из этих способов могут быть включены в описанные здесь способы.

Конкретные применения описанных здесь устройств, наборов и систем включают, но не ограничиваются ими, доставку вакцин против HBV, содержащих одну или более молекул нуклеиновой кислоты. Обычно при таких применениях, EMTAD инициируют путем инъекции вакцины против HBV с помощью стандартного шприца с иглой. После введения агента, устройство, подходящее для ESA, вводят индивидууму в определенный участок. И наконец, для обеспечения желаемого облегчения или улучшения дос-

тавки вакцины против HBV используется соответствующий протокол ESA. Однако, несмотря на традиционное использование EMTAD, желаемая пространственная и временная взаимосвязь между введением агента и ESA пока не может быть реализована.

Пространственные параметры.

В некоторых вариантах описанных здесь систем, наборов, способов и устройств, введение вакцины против HBV осуществляют с помощью обычного шприца с иглой. Необходимость доставки определенных агентов посредством EMTAD вносит дополнительную сложность в осуществлении ТАА. Как показано на фиг. 1, при любой инъекции с помощью обычного шприца с иглой, когда игла 5 вводится в ткань, то глубина 1 и угол 2 введения относительно поверхности ткани 3 могут трудно поддаваться регуляции. Кроме того, точка введения иглы 4 на поверхность ткани 3 может не соответствовать местоположению отверстия 6 и области введения агента 7 в ткань-мишени. В качестве репрезентативного примера, внутримышечная инъекция может не соответствовать участку введения в кожу, поскольку две ткани часто могут перемещаться относительно друг друга.

Хотя этот традиционный подход обычно является адекватным для доставки многих различных терапевтических средств, которые не требуют EMTAD, однако, эти изменения приводят к распределению вакцины против HBV после инъекции, которое часто является несоответствующим и/или неопределенным и может препятствовать эффективному осуществлению EMTAD. В некоторых описанных здесь вариантах осуществления изобретения, наиболее эффективное применение EMTAD включает использование предварительно определенной взаимосвязи между вакциной против HBV и ESA у индивидуума. В результате, в отсутствие пространственной регуляции при ТАА в ткани-мишени, использование обычного шприца с иглой может приводить к снижению эффективности применения EMTAD по сравнению с устройством, способом или системой, которые обеспечивают пространственный и временной контроль. Одним из иллюстративных примеров этой концепции является применение электропорации для облегчения доставки вакцины против HBV. Электропорация обычно является наиболее эффективной для улучшения доставки вакцины против HBV, если ТАА и ESA совместно локализуются в области ткани-мишени. Во многих случаях, если доставляемый агент и индуцированный эффект электропорации вместе не локализуются в области ткани-мишени, то доставка указанного агента является недостаточно оптимальной.

Другим примером необходимости адекватной пространственной регуляции ТАА в EMTAD является ионтофорез. В этом способе EMTAD используются электрические поля для инициации движения заряженных молекул. Для достижения желаемого движения агента должна быть реализована надлежащая пространственная взаимосвязь между электродами и вакциной против HBV. Если отрицательно заряженный агент поместить в непосредственной близости от местоположения положительного электрода, то будет наблюдаться незначительное движение агента через ткань или полное его отсутствие. В противоположность этому, локализация указанного отрицательно заряженного агента возле отрицательного электрода будет приводить к значительному перемещению агента через ткань в направлении положительного электрода.

Как показано в предыдущих примерах, для достижения желаемого эффекта важно отрегулировать точное место ТАА относительно участка ESA. Таким образом, описанные здесь варианты устройств и способов обеспечивают регуляцию точного места ТАА относительно участка ESA и являются подходящими для достижения воспроизводимого, согласованного и хорошо охарактеризованного распределения одной или более вакцин против HBV.

Временные параметры.

В случае стандартной инъекции с помощью шприца с иглой, скорость инъекции при ТАА может варьироваться в зависимости от оператора, что будет приводить к несоответствующему распределению агента в ткани. Дополнительная временная изменчивость наблюдается в том случае, когда для завершения способа EMTAD требуется размещение множества устройств. Так, например, одно из применений EMTAD требует введения плазмидной ДНК, кодирующей терапевтический белок, с последующей генерацией электрического поля, индуцированного электропорацией. С применением традиционного способа EMTAD, вакцину против HBV вводят с помощью шприца с иглой, а затем осуществляют введение и активацию устройства для электропорации. Если требуется размещение двух отдельных устройств (сначала шприца с иглой, а затем устройства для ESA), то такая процедура может давать различные эффекты у различных индивидуумов, что обусловлено несоответствующим по времени применения каждого устройства оператором. Кроме того, размещение двух отдельных используемых устройств будет неизбежно давать временной интервал между размещением устройства врачом и активацией каждого устройства. Это осложняется еще в том случае, когда для достижения адекватной доставки агента в конкретную область в ткани-мишени требуется множество участков введения.

Эти проблемы являются особенно актуальными в случае использования таких агентов, как нуклеиновые кислоты, которые могут разлагаться или инактивироваться во внеклеточной среде. Разложение нуклеиновых кислот в вакцине против HBV может приводить к снижению эффективности и согласованности при применении терапии. Кроме того, степень разложения нуклеиновых кислот в вакцине против HBV у различных индивидуумов не является постоянной, что способствует общей терапевтической не-

совместимости инъекции с помощью стандартного шприца с иглой в комбинации с ESA а, более конкретно, при терапии посредством электропорации.

Из-за сложности пространственной и временной изменчивости, неизменно наблюдаемой при инъекции с помощью обычного шприца с иглой в комбинации с ESA, точное место и время ТАА относительно ESA часто неизвестны. В результате, эффективное введение и дозировка вакцин против HBV с помощью EMTAD могут быть несовместимыми и невоспроизводимыми. Хотя инъекция с помощью обычного шприца с иглой иногда является достаточной для введения вакцины против HBV, однако, воспроизводимая и согласованная доставка вакцин против HBV значительно улучшается благодаря регуляции пространственной и временной взаимосвязи между введением вакцины против HBV и индуцированием желаемого эффекта EMTAD.

Таким образом, хотя традиционная процедура EMTAD может быть адекватной для определенных целей, однако, временная и пространственная регуляция являются весьма желательными для клинических применений, при которых обычно требуется высокая степень согласованности и воспроизводимости. В отличие от традиционного способа EMTAD, варианты описанных здесь способов, систем и устройств облегчают проведение СТАА и ESA и являются более эффективными способами и устройствами для клинического применения EMTAD. В настоящем изобретении используются различные аспекты СТАА в комбинации с ESA, что обеспечивает воспроизводимую, согласованную и эффективную доставку вакцины против HBV. В настоящем изобретении описаны способы и устройства для обеспечения пространственной и временной регуляции при введении вакцины против HBV вместе с подачей электрических сигналов, и тем самым, для улучшения перемещения указанной вакцины в ткань-мишень и/или ее поглощения этой тканью.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описаны способы и устройства, обеспечивающие регулируемую пространственную взаимосвязь между введением вакцины против HBV и подачей электрических сигналов. Перед лечением определяют оптимальное местоположение для ТАА относительно ESA. Эта пространственная взаимосвязь между ТАА и ESA зависит от параметров лечения, включая природу вводимого агента и свойства ткани-мишени, в которую вводят этот агент. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, электрические сигналы предпочтительно подаются на значительном расстоянии от места введения вакцины против HBV. В некоторых других вариантах осуществления изобретения, пространственная взаимосвязь заключается в подаче электрических сигналов с помощью EMTAD на участок, расположенный поблизости от места введения агента. В некоторых случаях, предпочтительной является совместная локализация ТАА и ESA. Это часто наблюдается в том случае, когда для достижения желаемого эффекта EMTAD применяются электропорация и/или ионтофорез.

В другом аспекте изобретения, описанное здесь устройство, обеспечивает регулируемую временную взаимосвязь между последовательностью и синхронизацией ТАА и ESA. Перед лечением определяют оптимальную последовательность и время проведения комбинации ТАА и ESA. Как и в случае пространственной взаимосвязи, желаемая временная взаимосвязь между ТАА и ESA определяется такими параметрами, как природа вводимого агента и свойства ткани-мишени, в которую вводят этот агент. В некоторых случаях, воздействие электрических полей, ассоциированных с ESA, может негативно влиять на вакцину против HBV. При таком практическом применении, после генерации таких электрических полей осуществляют СТАА. Тем не менее, типичной временной взаимосвязью является проведение СТАА, а затем ESA.

Настоящее изобретение относится к усовершенствованным способам и устройствам для воспроизводимой, согласованной и эффективной доставки вакцин против HBV, содержащих конструкции на основе нуклеиновых кислот, вместе с EMTAD. Эта цель достигается путем регуляции пространственного и временного введения вакцины против HBV относительно подачи электрических сигналов. В определенном варианте осуществления изобретения, EMTAD инициируют путем инъекции вакцины против HBV с помощью обычного шприца с иглой. После введения агента, устройство, подходящее для ESA, вводят индивидууму в определенный участок. Соответствующий протокол ESA обеспечивает желаемое облегчение или улучшение доставки вакцины против HBV. Репрезентативным способом ESA, который доказал свою эффективность практически для клеток всех типов, является электропорация. Другими репрезентативными способами электрически опосредованной доставки являются, но не ограничиваются ими, ионтофорез, электроосмос, электропенетрация, электростимуляция, электромиграция и электроконвекция. Эти термины используются лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

В методе электропорации используется подача электрических полей для индуцирования кратковременного увеличения проницаемости клеточной мембраны и перемещения заряженных частиц. Благодаря проницаемости клеточных мембран в ткани-мишени, электропорация значительно улучшает внутриклеточное поглощение экзогенных веществ, которые были введены в ткань-мишень. Увеличение проницаемости клеточной мембраны и молекулярного транспорта благодаря электропорации представляет собой способ доставки вакцины против HBV путем ее прохождения через барьер, такой как клеточная мембрана. Применение электропорации в качестве метода индуцирования EMTAD имеет то преимущество, что физическая природа такого метода позволяет применять электропорацию в тканях практически всех ти-

пов. В соответствии с этим, в различных аспектах и вариантах осуществления изобретения, обсуждается, но не ограничивается ею, электропорация как метод индуцирования EMTAD.

Вакцины против HBV.

Используемый здесь термин "вакцина против HBV" употребляется здесь в самом широком смысле и включает любой агент, способный обеспечить желательный или полезный иммунный ответ, терапевтический и/или профилактический эффект против HBV в живой ткани. Таким образом, этот термин включает как профилактические, так и терапевтические вакцины против HBV, а также любую другую категорию агентов, обладающих такими желаемыми эффектами. Объем настоящего изобретения является достаточно широким и включает регулирующую доставку любых вакцин против HBV, независимо от их классификации. Вакцины против HBV включают, но не ограничиваются ими, фармацевтические лекарственные средства и вакцины, и последовательности нуклеиновых кислот (такие как суперспирализованная, стерически релаксированная и линейная плазмидная ДНК, РНК, антисмысловые конструкции, искусственные хромосомы или любые другие терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот) и любые их составы. Такие составы агентов включают, но не ограничиваются ими, катионные липиды, катионные и/или неионные полимеры, липосомы, физиологический раствор, ингибиторы нуклеазы, анестетики, полноксимеры, консерванты, растворы фосфата натрия или другие соединения, которые могут улучшать введение, повышать стабильность и/или эффект вакцины против HBV. Дополнительные составы включают агенты и добавки, сообщающие способность регулировать вязкость и электрическое сопротивление вводимого агента.

В предпочтительном аспекте применения изобретения, вакцина против HBV для ее применения в настоящем изобретении может включать:

первую молекулу нуклеиновой кислоты, а предпочтительно, первый плазмидный ДНК-вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий антиген полимеразы HBV, а предпочтительно, антиген полимеразы HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, например, по меньшей мере на 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична SEQ ID NO: 4, где антиген полимеразы HBV не обладает обратной транскриптазной активностью и активностью РНКазы H;

вторую молекулу нуклеиновой кислоты, а предпочтительно, второй плазмидный ДНК-вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий усеченный коровый антиген HBV, а предпочтительно, усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14; и

фармацевтически приемлемый носитель; и

где первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, такой как один и тот же плазмидный ДНК-вектор, или в двух различных молекулах нуклеиновой кислоты, таких как два отдельных плазмидных ДНК-вектора.

Каждый из используемых здесь терминов "коровый антиген HBV", "HBcAg" и "коровый антиген" означают антиген HBV, способный индуцировать иммунный ответ, например гуморальный и/или клеточно-опосредуемый ответ против корового белка HBV у индивидуума. Каждый из терминов "сердцевина", "коровый полипептид" и "коровый белок" относится к вирусному коровому белку HBV. Полноразмерный коровый антиген обычно имеет длину 183 аминокислоты и включает домен сборки (аминокислоты от 1 до 149) и домен, связывающийся с нуклеиновой кислотой (аминокислоты от 150 до 183). Домен, связывающийся с нуклеиновой кислотой и имеющий 34 остатка, необходим для инкапсидирования прегеномной РНК. Этот домен также функционирует как сигнал ядерного импорта. Он содержит 17 аргининовых остатков и является высокой степени основным, что соответствует его функции. Клеточный белок HBV является димерным в растворе, причем, димеры способны к самосборке в икосаэдрические капсиды. Каждый димер корового белка имеет четыре α -спиральных пучка, фланкированных α -спиральным доменом с обеих сторон. Усеченные коровые белки HBV, не содержащие домена, связывающегося с нуклеиновой кислотой, также способны образовывать капсиды.

В одном из аспектов настоящей заявки, антиген HBV, используемый в настоящем изобретении, представляет собой усеченный коровый антиген HBV. Используемый здесь термин "усеченный коровый антиген HBV" означает антиген HBV, который не содержит полноразмерный коровый белок HBV, но способен индуцировать иммунный ответ против корового белка HBV у индивидуума. Так, например, коровый антиген HBV может быть модифицирован для удаления одной или более аминокислот из С-концевого домена корового антигена, связывающегося с нуклеиновой кислотой и имеющего высокий положительный заряд (богатый аргинином), и такой антиген обычно содержит семнадцать аргининовых остатков (R). Усеченный коровый антиген HBV согласно изобретению предпочтительно представляет собой усеченный у С-конца коровый белок HBV, который не содержит сигнала ядерного импорта корового HBV и/или усеченный коровый белок HBV, из которого был удален С-концевой сигнал ядерного импорта корового HBV. В одном варианте осуществления изобретения, усеченный коровый антиген HBV имеет делецию в С-концевом домене, связывающемся с нуклеиновой кислотой, такую как делеция 1-34 аминокислотных остатков С-концевого домена, связывающегося с нуклеиновой кислотой, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33

или 34 аминокислотных остатка, а предпочтительно, делеция всех 34 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, усеченный коровый антиген HBV имеет делецию в С-концевом домене, связывающемся с нуклеиновой кислотой, а предпочтительно всех 34 аминокислотных остатков.

Коровый антиген HBV, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой консенсусную последовательность, происходящую от HBV множества генотипов (например, генотипов А, В, С, D, Е, F, G и H). Используемый здесь термин "консенсусная последовательность" означает искусственную аминокислотную последовательность, полученную на основе выравнивания аминокислотных последовательностей гомологичных белков, например, как было определено путем выравнивания (например, с использованием Clustal Omega) аминокислотных последовательностей гомологичных белков. Может быть вычислен порядок наиболее часто встречающихся аминокислотных остатков, обнаруженных в каждом положении при выравнивании последовательностей на основе последовательностей антигенов HBV (например, core, pol и т.п.) по меньшей мере из 100 природных изолятов HBV. Консенсусной последовательностью может быть не-природная последовательность и последовательность, отличающаяся от нативных вирусных последовательностей. Консенсусные последовательности могут быть сконструированы путем выравнивания множества последовательностей антигена HBV из различных источников с использованием программ множественного выравнивания последовательностей и в различных положениях выравнивания с отбором наиболее часто встречающихся аминокислот. Предпочтительно, консенсусная последовательность антигена HBV происходит от HBV генотипов В, С и D. Термин "консенсусный антиген" используется для обозначения антигена, имеющего консенсусную последовательность.

Типичный усеченный коровый антиген HBV, используемый в настоящем изобретении, не обладает функцией связывания с нуклеиновой кислотой и может индуцировать иммунный ответ у млекопитающего по меньшей мере против двух генотипов HBV. Предпочтительно, усеченный коровый антиген HBV может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего по меньшей мере на генотипы HBV В, С и D. Более предпочтительно, усеченный коровый антиген HBV может индуцировать CD8-Т-клеточный ответ у человека против по меньшей мере генотипов HBV А, В, С и D.

Предпочтительно, коровый антиген HBV, используемый в настоящем изобретении, представляет собой консенсусный антиген, а предпочтительно, консенсусный антиген, происходящий от генотипов HBV В, С и D, а более предпочтительно, усеченный консенсусный антиген, происходящий от генотипов HBV В, С и D. Репрезентативный усеченный коровый консенсусный антиген HBV согласно изобретению состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14, например по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14. SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 представляют собой коровые консенсусные антигены, происходящие от генотипов HBV В, С и D. SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 14 содержат домен нативного корового антигена, связывающегося с нуклеиновой кислотой и имеющего высокий положительный заряд (богатый аргинином) с С-концевой делецией из 34 аминокислот.

В конкретном варианте осуществления изобретения, коровый антиген HBV представляет собой усеченный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В другом конкретном варианте осуществления изобретения, коровый антиген HBV представляет собой усеченный антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, являются, но не ограничиваются ими, полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 95,5%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 96,5%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 97,5%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 98,5%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,1%, по меньшей мере на 99,2%, по меньшей мере на 99,3%, по меньшей мере на 99,4%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 1, а предпочтительно, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 1.

Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, являются, но не ограничиваются ими, полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 15, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 95,5%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 96,5%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 97,5%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 98,5%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,1%, по меньшей мере на 99,2%, по меньшей мере на 99,3%, по меньшей мере на 99,4%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8%, по меньшей мере на 99,9% или 100% идентична SEQ ID NO: 15, а предпочтительно, приблизительно на 98%, приблизи-

тельно на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 15.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, вакцина против HBV, используемая в настоящем изобретении, содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую усеченный коровый антиген HBV, и такая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15.

Используемый здесь термин "антиген полимеразы HBV", "антиген Pol HBV" или "антиген pol HBV" означает антиген HBV, способный индуцировать иммунный ответ, например, гуморальный и/или клеточно-опосредуемый ответ против полимеразы HBV у индивидуума. Каждый из терминов "полимераза", "полипептид полимеразы", "Pol" и "pol" означает вирусную ДНК-полимеразу HBV. Вирусная ДНК-полимераза HBV имеет четыре домена, включая, от N-конца до С-конца, концевой домен белка (TP), который действует как праймер для синтеза минус-цепи ДНК; спейсер, который не играет существенной роли в функционировании полимеразы; домен обратной транскриптазы (OT) для транскрипции; и домен РНКазы Н.

В одном из вариантов настоящей заявки, антиген HBV содержит антиген Pol HBV или любой иммуногенный фрагмент или их комбинацию. Антиген Pol HBV может содержать дополнительные модификации для повышения иммуногенности антигена, например, путем введения мутаций в активные центры доменов полимеразы и/или РНКазы Н для уменьшения или значительного устранения некоторых ферментативных активностей.

Предпочтительно, антиген Pol HBV, подходящий для применения в настоящем изобретении, не обладает обратной транскриптазной активностью и активностью РНКазы Н и способен индуцировать иммунный ответ у млекопитающего по меньшей мере против двух генотипов HBV. Предпочтительно, антиген Pol HBV может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего по меньшей мере на генотипы HBV В, С и D. Более предпочтительно, антиген Pol HBV может индуцировать CD8-Т-клеточный ответ у человека против по меньшей мере HBV генотипов А, В, С и D.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, антиген Pol HBV, используемый в настоящем изобретении, представляет собой инактивированный антиген Pol. В одном варианте осуществления изобретения, инактивированный антиген Pol HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном центре полимеразного домена. В другом варианте осуществления изобретения, инактивированный антиген Pol HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном центре домена РНКазы Н. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, инактивированный антиген Pol HBV содержит одну или более аминокислотных мутаций в активном центре полимеразного домена и домена РНКазы Н. Так, например, мотив "YXDD" в полимеразном домене антигена pol HBV, который может потребоваться для связывания с нуклеотидом/ионом металла, может быть мутирован, например, путем замены одного или более аспартатных остатков (D) аспарагиновыми остатками (N) для устранения или уменьшения функции координирования с металлом, что, тем самым, будет уменьшать или существенно устранять функцию обратной транскриптазы. Альтернативно или помимо мутации мотива "YXDD", мотив "DEDD" в домене РНКазы Н антигена pol HBV, необходимый для координирования с Mg^{2+} , может быть мутирован, например, путем замены одного или более аспартатных остатков (D) аспарагиновыми остатками (N) и/или замены глутаматного остатка (E) глутамином (Q), что, тем самым, будет уменьшать или существенно устранять функцию РНКазы Н. В конкретном варианте осуществления изобретения, антиген pol HBV модифицируют путем (1) замены аспартатных остатков (D) аспарагиновыми остатками (N) в мотиве "YXDD" полимеразного домена; и (2) замены первого аспартатного остатка (D) аспарагиновым остатком (N) и первого глутаматного остатка (E) глутаминовым остатком (N) в мотиве "DEDD" домена РНКазы Н, что, тем самым, будет уменьшать или существенно устранять функцию обратной транскриптазы и РНКазы Н антигена pol.

В предпочтительном варианте настоящей заявки, антиген pol HBV представляет собой консенсусный антиген, а предпочтительно, консенсусный антиген, происходящий от HBV генотипов В, С и D, а более предпочтительно, инактивированный консенсусный антиген, происходящий от HBV генотипов В, С и D. Репрезентативный консенсусный антиген pol HBV согласно изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, например по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична SEQ ID NO: 4, а предпочтительно, по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, например, по меньшей мере на 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 4 представляют собой консенсусный антиген pol HBV, происходящий от HBV генотипов В, С и D, и содержащий четыре мутации в активных центрах доменов полимеразы и РНКазы Н. В частности, четыре мутации включают замену остатков аспарагиновой кислоты (D) аспарагиновыми остатками (N) в мотиве "YXDD" полимеразного домена; и замену первого аспартатного остатка (D) аспарагиновым остатком (N) и замену первого глутаматного остатка (E) глутаминовым остатком (Q) в мотиве "DEDD" домена РНКазы Н.

В конкретном варианте осуществления изобретения, антиген pol HBV, используемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В других вариантах настоящей заявки, коровый антиген HBV, используемый в настоящем изобретении, состоит из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 4.

Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих антиген pol HBV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, являются, но не ограничиваются ими, полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, например, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, а предпочтительно на 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16. В конкретных вариантах настоящей заявки, вакцина против HBV, используемая в настоящем изобретении, содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген pol HBV, и эта не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16.

Используемый здесь термин "гибридный белок" или "гибрид" означает одну полипептидную цепь, имеющую по меньшей мере два полипептидных домена, которые обычно не присутствуют в одном природном полипептиде.

В аспекте настоящего изобретения, антиген HBV, используемый в настоящем изобретении, может включать гибридный белок, содержащий усеченный коровый антиген HBV, функционально присоединенный к антигену Pol HBV, или антиген Pol HBV, функционально присоединенный к усеченному коровому антигену HBV, предпочтительно посредством линкера. Используемый здесь термин "линкер" означает соединение или его часть, которые действуют как молекулярный мостик для функционального связывания двух различных молекул, где одна часть линкера функционально присоединена к первой молекуле, а другая часть линкера функционально присоединена ко второй молекуле. Используемый здесь термин "функционально присоединенный" относится к связи или положению, где описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать определенным образом. Так, например, регуляторная последовательность, функционально присоединенная к представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты, способна регулировать транскрипцию представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты, или сигнальная последовательность, функционально присоединенная к представляющей интерес аминокислотной последовательности, способна секретировать или транслоцировать представляющую интерес аминокислотную последовательность в нужный участок.

Так, например, в гибридном белке, содержащем первый полипептид и второй гетерологичный полипептид, линкер служит, главным образом, в качестве спейсера между первым и вторым полипептидами. В одном варианте осуществления изобретения, линкер состоит из аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями, предпочтительно из 1-20 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 встречающихся в природе аминокислот. В одном варианте осуществления изобретения, 1-20 аминокислот выбраны из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Предпочтительно, линкер состоит из большинства аминокислот, которые являются стерически незатрудненными, таких как глицин и аланин. Репрезентативными линкерами являются полиглицины, а в частности (Gly)₅, (Gly)₈; поли(Oly-Ala) и полиаланины. Одним из репрезентативных подходящих линкеров является (AlaGly)_n, где n означает целое число от 2 до 5.

Предпочтительно, гибридный белок, используемый в настоящем изобретении, может индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против корового антигена HBV и антигена Pol HBV по меньшей мере двух генотипов. Предпочтительно, гибридный белок может индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего по меньшей мере против генотипов В, С и D HBV. Более предпочтительно, гибридный белок может индуцировать CD8-Т-клеточный ответ у человека по меньшей мере против генотипов А, В, С и D HBV.

В одном аспекте настоящей заявки, гибридный белок, используемый в настоящем изобретении, может содержать усеченный коровый антиген HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, например, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична SEQ ID NO: 2 или 14; линкер и антиген Pol HBV, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, например, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична SEQ ID NO: 4.

Предпочтительно гибридный белок, используемый в настоящем изобретении, содержит усеченный коровый антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 или 14; линкер, содержащий (AlaGly)_n, где n равно целому числу от 2 до 5, и антиген Pol HBV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Более предпочтительно, чтобы гибридный белок, используемый в настоящем изобретении, содержал аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах настоящей заявки, гибридный белок, используемый в настоящем изобретении, также содержит сигнальную последовательность. Предпочтительно, сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 19. Более предпочтительно, гибридный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих гибридный белок, используемый в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, полинуклеотидная последователь-

ность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, например по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, а предпочтительно на 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 15, которые функционально связаны с кодирующей линкерной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 22, например, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична SEQ ID NO: 22, а предпочтительно на 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 22, которая также функционально присоединена к полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, например, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16, а предпочтительно на 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 16. В конкретных вариантах настоящей заявки, вакцина против HBV, используемая в настоящем изобретении, содержит не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 1, функционально присоединенную к SEQ ID NO: 22, которая также функционально присоединена к SEQ ID NO: 3.

В аспекте настоящей заявки, в вакцине против HBV, используемой в настоящем изобретении, первая и вторая молекулы нуклеиновой кислоты представляют собой первый и второй плазмидные ДНК-векторы, соответственно, и каждый первый и второй плазмидные ДНК-векторы содержат ориджин репликации, ген резистентности к антибиотику и от 5'-конца до 3'-конца, промоторную последовательность, энхансерную последовательность, последовательность, кодирующую сигнальный пептид, первую полинуклеотидную последовательность или вторую полинуклеотидную последовательность и последовательность сигнала полиаденилирования. В предпочтительном варианте изобретения, плазмидная ДНК представляет собой экспрессионный вектор, подходящий для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих. Экспрессионные векторы, подходящие для экспрессии белка в клетках-хозяевах млекопитающих, включают, но не ограничиваются ими, pcDNATM, pcDNA3TM, pVAX, pVAX-1 и т.п. Предпочтительно, экспрессионный вектор основан на pVAX-1, которая может быть дополнительно модифицирована для оптимизации экспрессии белка в клетках млекопитающих. pVAX-1 является наиболее часто используемой плазмидой в ДНК-вакцинах и содержит сильный предранний промотор человеческого цитомегаловируса (CMV-IE), за которым следует последовательность полиаденилирования (pA), происходящая от бычьего гормона роста (bGH). Кроме того, pVAX-1 содержит ориджин репликации pETC и ген резистентности к канамицину, индуцируемый небольшим прокариотическим промотором, который обеспечивает размножение бактериальной плазмиды. Предпочтительно, плазмидный ДНК-вектор содержит оптимизированный по кодам ген резистентности к канамицину, имеющий полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 12, а предпочтительно на 100% идентична SEQ ID NO: 12.

В конкретном варианте осуществления изобретения, вакцина против HBV, используемая в настоящем изобретении, включает:

а) первый плазмидный ДНК-вектор, включающий от 3'-конца до 5'-конца, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, энхансерную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид и содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11;

б) второй плазмидный ДНК-вектор, включающий от 3'-конца до 5'-конца, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, энхансерную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, последовательность, кодирующую сигнальный пептид и содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и

с) фармацевтически приемлемый носитель,

где первый плазмидный ДНК-вектор и второй плазмидный ДНК-вектор также содержат ген резистентности к канамицину, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, и ориджин репликации, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и

где первый плазмидный ДНК-вектор и второй плазмидный ДНК-вектор находятся в одной и той же композиции или в двух различных композициях.

В тех вариантах изобретения, в которых вакцина против HBV включает первый вектор, такой как первая ДНК-плазида, и второй вектор, такой как вторая ДНК-плазида, количество каждого из первого и второго векторов не имеет конкретных ограничений. Так, например, первая ДНК-плазида и вторая ДНК-плазида могут присутствовать в отношении от 10:1 до 1:10 по массе, например, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1,

6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно, первая и вторая ДНК-плазмиды присутствуют в отношении 1:1 по массе.

Композиции и иммуногенные комбинации согласно изобретению могут содержать дополнительные полинуклеотиды или векторы, кодирующие дополнительные антигены HBV, и/или дополнительные антигены HBV или их иммуногенные фрагменты. Однако, в конкретных вариантах осуществления изобретения, композиции и иммуногенные комбинации согласно изобретению не содержат определенных антигенов. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, вакцина против HBV, используемая в настоящем изобретении, не содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген HBV, выбранный из группы, состоящей из поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена оболочки HBV (Env) и белкового антигена L HBV, а также не содержит антигена HBV, выбранного из группы, состоящей из поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антигена оболочки HBV (Env) и белкового антигена L HBV.

Вакцина против HBV, используемая в настоящем изобретении, также может содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель является нетоксичным и не должен негативно влиять на эффективность активного ингредиента. Фармацевтически приемлемые носители могут включать один или более компонентов, таких как вода, гликоли, сахар, масла, аминокислоты, спирты, консерванты, смягчители, стабилизаторы, красители и т.п.

Другие примеры вакцин против HBV, используемых в настоящем изобретении, описаны в Международной патентной заявке под названием "Вакцины против вируса гепатита В (HBV) и их применение", поданной в тот же день, что и настоящая заявка, под номером документа поверенного 688097-403WO1, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Наборы/Системы.

В своем общем аспекте, настоящее изобретение относится к набору или к системе для регулируемой доставки вакцины против HBV в заранее определенный участок ткани индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный набор содержит вакцину против HBV и устройство для введения вакцины против HBV в заранее определенный участок ткани посредством электропорации. Так, например, набор или система может содержать предварительно упакованный контейнер, такой как шприц, содержащий предварительно отмеренное количество вакцины против HBV, которое можно загрузить в описанное здесь устройство для последующего введения вакцины против HBV.

Способы индуцирования иммунного ответа.

В другом своем общем аспекте, настоящее изобретение относится к способу индуцирования иммунного ответа против вируса гепатита В (HBV) у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение индивидууму иммуногенно эффективного количества вакцины против HBV с использованием устройства, набора или системы согласно изобретению. В способах согласно изобретению могут быть использованы любые описанные здесь устройства, наборы или системы согласно изобретению. Используемый здесь термин "инфекция" означает инвазию хозяина агентом, вызывающим заболевание. Возбудитель заболевания считается "инфекционным", если он способен заражать хозяина и реплицироваться или размножаться внутри хозяина. Примерами инфекционных агентов являются вирусы, например, HBV и некоторые виды аденовирусов, прионы, бактерии, грибы, простейшие и т.п. Термин "HBV-инфекция", в частности, означает инвазию организма хозяина, такого как клетки и ткани организма хозяина, вирусом HBV.

Используемый здесь термин "индуцирование иммунного ответа" если он относится к описанным здесь способам, охватывает вырабатывание желаемого иммунного ответа или эффекта у индивидуума, нуждающегося в этом, против инфекции, например, HBV-инфекции. Термин "индуцирование иммунного ответа" также охватывает обеспечение терапевтического иммунитета для лечения заболевания, вызываемого патогенным агентом, например, HBV. Используемый здесь термин "терапевтический иммунитет" или "терапевтический иммунный ответ" означает, что организм вакцинированного индивидуума способен бороться с инфекцией патогенным агентом, против которого была сделана вакцинация, например, вырабатывать иммунитет против HBV-инфекции, сообщаемый вакциной против HBV. В варианте осуществления изобретения, термин "индуцирование иммунного ответа" означает вырабатывание иммунитета у индивидуума, нуждающегося в этом, например, для обеспечения терапевтического эффекта против заболевания, такого как HBV-инфекция. В некоторых вариантах осуществления изобретения, термин "индуцирование иммунного ответа" означает вырабатывание или повышение клеточного иммунитета, например, Т-клеточного ответа против HBV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, термин "индуцирование иммунного ответа" означает вырабатывание или повышение гуморального иммунного ответа против HBV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, термин "индуцирование иммунного ответа" означает вырабатывание или повышение клеточного и гуморального иммунного ответа против HBV.

Используемый здесь термин "протективный иммунитет" или "протективный иммунный ответ" означает, что организм вакцинированного индивидуума способен бороться с инфекцией патогенным агентом, против которого была сделана вакцинация. Обычно у индивидуума, у которого выработался "протективный иммунный ответ", наблюдаются лишь слабые или умеренные клинические симптомы, либо

эти симптомы вообще отсутствуют. Обычно, индивидуум, имеющий "протективный иммунный ответ" или "протективный иммунитет" против определенного агента, не умирает от инфицирования указанным агентом.

Обычно, введение вакцины против HBV в соответствии с вариантами настоящего изобретения осуществляют в терапевтических целях для вырабатывания иммунного ответа против HBV после заражения HBV или развития симптомов, характерных для HBV-инфекции, например, для терапевтической вакцинации.

Используемый здесь термин "иммуногенно эффективное количество" или "иммунологически эффективное количество" означает количество композиции, полинуклеотида, вектора или антигена, достаточное для индуцирования желаемого иммунного эффекта или иммунного ответа у индивидуума, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления изобретения, иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для индуцирования иммунного ответа у индивидуума, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для вырабатывания иммунитета у индивидуума, нуждающегося в этом, например, для обеспечения терапевтического эффекта против заболевания, такого как HBV-инфекция. Иммуногенно эффективное количество может варьироваться в зависимости от ряда факторов, таких как физическое состояние индивидуума, возраст, масса тела, состояние здоровья и т.п.; от конкретного применения, например, обеспечения протективного иммунитета или терапевтического иммунитета; и от конкретного заболевания, например, вирусной инфекции, против которой желательно вырабатывание иммунитета. Иммуногенно эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области исходя из описания изобретения.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, иммуногенно эффективное количество означает количество композиции или иммуногенной комбинации (такой как вакцина против HBV), которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более нижеследующих эффектов, таких как: (i) уменьшение или ослабление тяжести HBV-инфекции или ассоциированного с ней симптома; (ii) уменьшение длительности HBV-инфекции или ассоциированного с ней симптома; (iii) предотвращение прогрессирования HBV-инфекции или ассоциированного с ней симптома; (iv) индуцирование регрессии HBV-инфекции или ассоциированного с ней симптома; (v) предотвращение развития или возникновения HBV-инфекции или ассоциированного с ней симптома; (vi) предотвращение рецидива HBV-инфекции или ассоциированного с ней симптома; (vii) уменьшение числа госпитализаций индивидуумов с HBV-инфекцией; (viii) сокращение продолжительности госпитализации индивидуума, имеющего HBV-инфекцию; (ix) повышение выживаемости индивидуумов с HBV-инфекцией; (x) устранение HBV-инфекции у индивидуума; (xi) ингибирование или снижение репликации HBV у индивидуума; и/или (xii) усиление или повышение профилактического(их) или терапевтического(их) эффекта(ов) другой терапии.

В других конкретных вариантах осуществления изобретения, иммуногенно эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения уровней HBsAg до их полного удаления, на что указывает клиническая сероконверсия; достижения устойчивого клиренса HBsAg, ассоциированного с уменьшением количества инфицированных гепатоцитов под действием иммунной системы индивидуума; индуцирования активированных Т-клеточных популяций, специфичных к антигену HBV; и/или для персистентной потери HBsAg в течение 12 месяцев. Примерами целевого индекса является более низкое значение HBsAg, то есть значение ниже порогового значения, составляющего 500 копий в соответствии с Международными единицами (МЕ) HBsAg и/или более высокое число CD8.

В соответствии с общим руководством, иммуногенно эффективное количество, при его использовании в отношении ДНК-плазмиды, может составлять в пределах приблизительно от 0,1 мг/мл до 10 мг/мл от общего количества плазмидной ДНК, например 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/мл. Предпочтительно, иммуногенно эффективное количество ДНК-плазмиды составляет менее 8 мг/мл, более предпочтительно, менее 6 мг/мл, а еще более предпочтительно, 3-4 мг/мл. Иммуногенно эффективное количество может быть вычислено исходя из одного вектора или плазмиды или из множества векторов или плазмид. Иммуногенно эффективное количество может быть введено в одной композиции или в нескольких композициях, таких как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 композиций (например, таблеток, капсул или инъекций), где совместное введение множества капсул или инъекций обеспечивает у индивидуума иммуногенно эффективное количество. Также возможно введение индивидууму иммуногенно эффективного количества с последующим введением другой дозы иммуногенно эффективного количества тому же индивидууму по так называемой схеме "прайм-буст". Эта общая концепция схемы "прайм-буст" хорошо известна специалистам в области вакцинации. При необходимости, помимо этой схемы могут быть проведены, но необязательно, дополнительные бустер-введения.

Согласно вариантам осуществления изобретения, иммуногенная комбинация, содержащая две ДНК-плазмиды, например, первую ДНК-плазмиду, кодирующую коровый антиген HBV, и вторую ДНК-плазмиду, кодирующую антиген *pol* HBV, может быть введена индивидууму путем смешивания обеих плазмид и доставки этой смеси в один анатомический участок. Альтернативно, могут быть осуществлены две отдельные иммунизации, каждая из которых доставляет одну экспрессионную плазмиду. В таких вариантах осуществления изобретения, независимо от того, вводят ли обе плазмиды за одну иммуниза-

цию в виде смеси или за две отдельные иммунизации, первую ДНК-плазмиду и вторую ДНК-плазмиду можно вводить в отношении от 10:1 до 1:10 по массе, например, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10 по массе. Предпочтительно, первую и вторую ДНК-плазмиды вводят в отношении 1:1 по массе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом, подлежащим лечению в соответствии со способами согласно изобретению, является HBV-инфицированный индивидуум, а в частности, индивидуум, имеющий хроническую HBV-инфекцию. Острая HBV-инфекция характеризуется эффективной активацией врожденной иммунной системы, которая дополняется последующим широким адаптивным ответом (например, вырабатыванием HBV-специфических Т-клеток, нейтрализующих антител), что обычно приводит к успешному подавлению репликации или удалению инфицированных гепатоцитов. В противоположность этому, такие ответы ухудшаются или снижаются из-за высокой вирусной и антигенной нагрузки, например, белки оболочки HBV продуцируются в избытке и могут высвобождаться в субвирусных частицах в 1000-кратном избытке по отношению к инфекционному вирусу.

Хроническая HBV-инфекция описывается в виде фаз, характеризующихся вирусной нагрузкой, уровнем ферментов печени (некротизационная активность), нагрузкой HBeAg или HBsAg или наличием антител к этим антигенам. Уровни ссДНК остаются относительно постоянными и составляют примерно от 10 до 50 копий на клетку, даже несмотря на то, что вирусная нагрузка может значительно варьироваться. Персистентное присутствие видов ссДНК приводит к хроническому инфицированию. Более конкретно, фазы хронической HBV-инфекции включают: (i) иммунотолерантную фазу, характеризующуюся высокой вирусной нагрузкой и нормальными или минимально повышенными уровнями ферментов печени; (ii) HBeAg-позитивную фазу иммунной активации, при которой наблюдаются более низкие или снижающиеся уровни репликации вируса со значительно повышенными уровнями ферментов печени; (iii) неактивную фазу поддержания HBsAg, которая представляет собой низкое репликативное состояние с низкими вирусными нагрузками и нормальными уровнями ферментов печени в сыворотке, которые могут затем подвергаться сероконверсии HBeAg; и (iv) HBeAg-негативную фазу, в которой периодически происходит репликация вируса (реактивация) с сопутствующими колебаниями уровней ферментов печени, где мутации в предкоровом и/или базальном коровом промоторе являются наиболее распространенными, а поэтому HBeAg не продуцируется инфицированной клеткой.

Используемый здесь термин "хроническая HBV-инфекция" относится к индивидууму, у которого было детектировано присутствие HBV в течение более 6 месяцев. Индивидуум, имеющий хроническую HBV-инфекцию, может находиться в любой фазе хронической HBV-инфекции. Термин "хроническая HBV-инфекция" имеет свое общепринятое значение, известное специалистам в данной области. Хроническая инфекция HBV может, например, характеризоваться постоянным присутствием HBsAg в течение 6 месяцев или более после острой HBV-инфекции. Так, например, используемый здесь термин "хроническая HBV-инфекция" соответствует определению, данному специалистами Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), согласно которому хроническую HBV-инфекцию можно охарактеризовать с помощью лабораторных критериев, таких как: (i) отрицательный тест на антитела IgM против корового антигена гепатита В (анти-HBc IgM) и положительный тест на поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), антиген е вируса гепатита В (HBeAg), или тест на наличие нуклеиновой кислоты, а именно, ДНК вируса гепатита В, или (ii) положительный тест на HBsAg или на нуклеиновую кислоту ДНК HBV, или положительный тест на HBeAg, проводимый два раза с перерывом по меньшей мере в 6 месяцев.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления изобретения, иммуногенно эффективное количество означает количество композиции или иммуногенной комбинации, которое является достаточным для лечения хронической HBV-инфекции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуум, имеющий хроническую HBV-инфекцию, проходит лечение нуклеозидным аналогом (NUC), и эта инфекция подавляется NUC. Используемый здесь термин "NUC-подавляемый" относится к индивидууму, имеющему недетектируемый уровень вируса HBV и стабильные уровни аланинаминотрансферазы (ALT) в течение по меньшей мере шести месяцев. Примерами лечения нуклеозидным/нуклеотидным аналогом является лечение ингибиторами полимеразы HBV, такими как энтакавир и тенофовир. Предпочтительно, индивидуум, имеющий хроническую инфекцию HBV, не имеет прогрессирующего фиброза или цирроза печени. Такой индивидуум обычно имеет показатель METAVIR менее чем 3, для фиброза и результат фибросканирования менее чем 9 кПа. Показатель METAVIR представляет собой систему баллов, которая обычно используется для оценки степени воспаления и фиброза путем гистопатологической оценки при биопсии печени пациентов с гепатитом В. Система баллов включает две стандартизированные оценки: одну оценку, указывающую на степень воспаления, и одну оценку, указывающую на степень фиброза.

Считается, что устранение или уменьшение хронической HBV-инфекции позволяет выявить тяжелое заболевание печени на ранней стадии, включая вирусный цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Таким образом, способы согласно изобретению могут быть также применены в качестве терапии для лечения заболеваний, вызываемых HBV. Примерами HBV-индуцированных заболеваний являются, но не ограничиваются ими, цирроз, рак (например, гепатоцеллюлярная карцинома) и фиброз, а в частности,

запущенный фиброз, характеризующийся показателем METAVIR 3 или выше для фиброза. В таких вариантах осуществления изобретения, иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для достижения персистентной потери HBsAg в течение 12 месяцев и значительного ослабления клинического заболевания (например, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и т.п.).

Способы согласно вариантам осуществления изобретения дополнительно включают введение индивидууму, нуждающемуся в этом, другого иммуногенного агента (такого как другой антиген HBV или другой антиген) или другого агента против HBV (такого как нуклеозидный аналог или другой агент против HBV) в комбинации с композицией согласно изобретению.

Способность индуцировать или стимулировать иммунный ответ против HBV после введения в организм животного или человека может быть оценена либо *in vitro*, либо *in vivo* с помощью ряда анализов, которые являются стандартными в данной области. Общее описание методов оценки возникновения и активации иммунного ответа можно найти, например, в публикации Coligan et al. (1992 и 1994, *Current Protocols in Immunology*; ed. J Wiley & Sons Inc., National Institute of Health). Измерение клеточного иммунитета может быть осуществлено путем измерения профилей цитокинов, секретируемых активированными эффекторными клетками, включая клетки, происходящие от CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток (например, путем количественной оценки клеток, продуцирующих IL-10 или IFN-гамма с помощью ELISPOT), путем определения статуса активации иммунных эффекторных клеток (например, с помощью анализов на пролиферацию Т-клеток по классическому поглощению [3H]-тимидина), с помощью анализа на антиген-специфические Т-лимфоциты у сенсibilизированного индивидуума (например, на пептид-специфический лизис в анализе на цитотоксичность и т.п.).

Способность стимулировать клеточный и/или гуморальный ответ можно определить по связыванию антител и/или по конкурентному связыванию (см., например, Harlow, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press). Так, например, титры антител, продуцируемых в ответ на введение композиции, обеспечивающей иммуногенность, могут быть оценены с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Иммунные ответы могут быть также определены с помощью анализа с использованием нейтрализующих антител, где нейтрализация вируса определяется как потеря инфекционности посредством реакции вируса со специфическим антителом/ингибирования/нейтрализации вируса этим антителом. Иммунный ответ может быть дополнительно оценен с помощью анализа на антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP).

Ткани-мишени.

Тканями-мишенями, наиболее подходящими для EMTAD с применением описанных здесь способов, устройств и систем, являются как здоровые, так и патологические клетки, присутствующие, например, в ткани эпидермиса, дермы, гиподермы, в соединительной и в мышечной ткани. Этот способ может быть также применен в отношении здоровых или пораженных органов, доступ к которым должен осуществляться минимально инвазивными или другими хирургическими методами. Такими тканями-мишенями являются печень, легкие, сердце, кровеносные сосуды, лимфатическая система, головной мозг, почки, поджелудочная железа, желудок, кишечник, толстая кишка, мочевой пузырь и репродуктивные органы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, желаемый терапевтический эффект может быть достигнут с применением описанного здесь способа или устройства для доставки определенного количества агента в клетки определенных типов, обычно присутствующих в тканях-мишенях, а также в клетки других типов, которые являются аномальными в указанных тканях (например, при химиотерапевтическом лечении опухолей).

Как обсуждалось ранее и как показано на фиг. 1, недостатки традиционной EMTAD заключаются в отсутствии точной и воспроизводимой пространственной и временной взаимосвязи между введением вакцины против HBV и подачей электрического сигнала. В отличие от традиционного способа EMTAD, в настоящем описании раскрываются способы и устройства для комбинированных СТАА и ESA, проводимых для обеспечения более предпочтительного клинического применения EMTAD. В настоящем изобретении раскрываются различные аспекты СТАА в комбинации с ESA для достижения воспроизводимой, согласованной и эффективной доставки вакцины против HBV. Описанные здесь способы и устройства обеспечивают пространственную и временную регуляцию введения вакцины против HBV относительно подачи электрических сигналов, и тем самым, улучшают транспорт указанного агента в ткань-мишень и/или его поглощение этой тканью.

Методы.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к системам, наборам и устройствам для их применения в способах регулируемого введения вакцины против HBV индивидууму, нуждающемуся в этом, с последующей ESA. Используемый здесь термин "индивидуум" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, а наиболее предпочтительно, человека, который может быть или был подвергнут лечению способом в соответствии с вариантом осуществления изобретения. Используемый здесь термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примерами млекопитающих являются, но не ограничиваются ими, коровы, лошади, овцы, свиньи, кошки, собаки, мыши, крысы, кролики, морские свинки, приматы, не являющиеся человеком (NHP), такие как обезьяны или человекообразные обезьяны, человек и т.п., а более предпочтительно, человек.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к системам, наборам и устройствам для их применения в способах регулируемого введения вакцины против HBV, которому предшествует ESA. В другом своем аспекте, описанное здесь изобретение относится к системам и устройствам для их применения в способах регулируемого введения вакцины против HBV, которое сопровождается ESA. Эти способы включают, но не ограничиваются ими, пространственную или согласованную взаимосвязь с определением параметров лечения, процедуры подготовки индивидуума, СТАА, ESA и дополнительные меры.

Определение параметров лечения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, параметры лечения основаны на желаемых количествах и/или продолжительности введения доз вакцины против HBV. Дозировка вакцины против HBV может зависеть, например, от конкретных показаний или применений для лечения (таких как тип и местоположение ткани-мишени), а также от различных особенностей индивидуума (таких как возраст и масса тела). Дозирование вакцины против HBV может регулироваться параметрами, относящимися к введению вакцины против HBV и ESA. Репрезентативные регулируемые параметры, относящиеся к СТАА, включают, но не ограничиваются ими, объем агента, вязкость агента и скорость инъекции. Репрезентативные регулируемые параметры, относящиеся к ESA, включают, но не ограничиваются ими, характеристики электрических сигналов, объем ткани, подвергаемый воздействию электрических сигналов, и формат электродной матрицы. Относительное время и участок СТАА и ESA представляют собой параметры, обеспечивающие дополнительную регуляцию введения доз вакцины против HBV.

Подготовка индивидуума.

В описанных здесь вариантах осуществления изобретения, описанные здесь способы могут включать стадию подготовки индивидуума. Подготовка индивидуума может включать, но не ограничивается ею, антисептическую очистку и введение анестетика, включая местную или регионарную анестезию, проводниковую анестезию, спинальную анестезию, эпидуральную анестезию или общую анестезию. В репрезентативном случае внутримышечной (IM) ESA, протоколы минимизации эффектов электрической стимуляции мышц могут быть включены в описанный здесь способ, например, включая терморегуляцию (например, охлаждение мышц), введение анестетиков и/или альтернативные модели стимуляции, достаточные для смягчения дискомфорта. Следует отметить, что выбранные способы подготовки индивидуума не должны оказывать негативного влияния на терапевтическую эффективность, если существуют приемлемые альтернативы. Так, например, было показано, что в некоторых случаях, внутримышечное введение анестетиков на основе амидов могут оказывать нежелательное воздействие на терапию, осуществляемую на основе внутримышечной доставки плазмидной ДНК, что, вероятно, обусловлено слабой миотоксичностью этих агентов, которые могут подавлять способность мышечных клеток к экспрессии белка, кодируемого вводимой последовательностью ДНК.

СТАА и ESA.

В некоторых описанных здесь вариантах осуществления изобретения представлен способ, в котором СТАА и ESA объединяют в целях обеспечения согласованной и воспроизводимой доставки вакцины против HBV. В некоторых случаях, настоящее изобретение относится к устройствам или наборам, подходящим для СТАА, включая, например, устройству, содержащее по меньшей мере одно из автоматических устройств для инъекций и струйных инжекторов.

Настоящее изобретение относится к способам, наборам и устройствам, позволяющим осуществлять чрескожное размещение множества удлиненных электродов на нужную глубину безопасным и согласованным способом относительно нужного участка распределения агента у реципиентов с неоднородной толщиной и составом кожи для поддержания подачи электрических полей в ткань в целях облегчения внутримышечного, интрадермального и/или подкожного введения терапевтических или профилактических агентов, таких как нуклеиновые кислоты, фармацевтические препараты, антитела, пептиды, белки или их комбинации.

Системы и способы согласно принципам настоящего изобретения обеспечивают возможность согласованного чрескожного размещения множества удлиненных проникающих в ткань электродов в заранее определенный участок ткани-мишени для распространения электрических полей в коже, в подкожной ткани и/или в скелетной мышце. Раскрытое здесь изобретение дает возможность пользователю с минимальной подготовкой размещать электроды на нужную глубину, сохраняя при этом соответствующую пространственную взаимосвязь между множеством электродов, даже если такая процедура осуществляется на участках с различными особенностями кожи. Такие варианты могут быть обусловлены вариативностью особенностей кожи на разных участках у одного индивидуума или у различных групп реципиентов. Другими словами, системы и способы согласно изобретению должны обеспечивать согласованный профиль независимо от лица, осуществляющего введение, или реципиента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, размещение электродов сопровождается введением одной или более игл для инъекций, которые имеют конфигурацию, подходящую для введения вакцин против HBV в область ткани-мишени и расположены в заранее определенной пространственной взаимосвязи с электродами, используемыми для ЕКА. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, электроды расположены так, чтобы любые электрические сигналы от указанных электродов предпочтительно подавались на

определенном расстоянии от участка введения вакцины против HBV с помощью одной или более игл для инъекции. В другом варианте осуществления изобретения, электроды расположены так, чтобы любые электрические сигналы предпочтительно подавались на участок, расположенный поблизости от участка введения вакцины против HBV с помощью одной или более игл для инъекции.

Аспекты раскрытия изобретения могут быть использованы отдельно или в комбинации для обеспечения чрескожного введения электродов в целях подачи электрических полей *in vivo* для облегчения внутримышечного, интрадермального и/или подкожного введения нуклеиновых кислот, небольших молекул лекарственных средств, антител, пептидов, белков и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, размещение электродов и последующее распространение электрического поля осуществляют скоординированным образом с распределением представляющего интерес агента по участку ткани-мишени. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, введение агента и подачу одного или более электрических полей осуществляют регулируемым и контролируемым образом, так, чтобы обеспечить максимальную вероятность достижения пространственной и временной совместной локализации распределения агента на участке подачи электрического поля.

В общих чертах, в настоящем изобретении раскрываются способы и устройства для чрескожного размещения электродов в заранее определенном участке в коже, в подкожной ткани и/или в скелетной мышце реципиента в комбинации с введением представляющего интерес агента и локальной подачей электрических полей для улучшения доставки, поглощения и/или биологического действия агента. В некоторых вариантах, настоящее изобретение было осуществлено так, чтобы установка и использование устройства могли выполняться эффективно и надежно пользователями с минимальной подготовкой. В другом варианте, настоящее изобретение также включает установку множества блокировок, датчиков и контуров обратной связи для уменьшения частоты и/или потенциального воздействия возможных ошибок пользователя, допущенных во время настройки и использования устройства. На фиг. 2, вариант описанного здесь устройства включает "кассетный блок" 100, который представляет собой съемное устройство, соединенное с помощью интерфейса с "аппликатором" 400, который имеет конфигурацию, подходящую для подключения к регулятору 700, действующему как источник электрической энергии для активации электрода и последующей генерации электрического поля, а также для диагностики и других рутинных процедур регуляции. Регулятор 700 также имеет пользовательский интерфейс, лоток, держатель для аппликатора 400 и различные другие описанные элементы. Как видно на фиг. 2, в способе применения, резервуар 101 подходящего размера и определенной формы может быть вставлен в кассетный блок 100.

Детали кассетного блока 100, представленного в некоторых вариантах описанного здесь устройства, подробно описаны, например, на фиг. 3A-12, вместе с соответствующими взаимодействующими частями аппликатора 400 на фиг. 13A-18C, а за ними следуют, где это необходимо, части регулятора 700 на фиг. 19-20D. Далее представлены остальные части аппликатора 400, а за которыми следуют остальные части регулятора 700.

Кроме того, как показано на фиг. 3A-4, в некоторых описанных здесь вариантах, кассетный блок 100 может иметь опорную конструкцию, имеющую конфигурацию, подходящую для подсоединения к аппликатору 400 и содержащую два или более удлиненных электрода 122, установленных на структуре для образования матрицы. Во избежание нежелательного распространения электрических токов внутри устройства, конструкция и материалы монтажной конструкции электрода должны быть определены таким образом, чтобы между электродами противоположной полярности внутри устройства был достаточный диэлектрический барьер. Дистальная область 137 удлиненных электродов соединена с монтажной структурой посредством стандартных механических элементов и/или связующих веществ, соответствующих составу материала электродной монтажной конструкции и электродов.

В репрезентативном варианте осуществления изобретения, внешняя конструкция корпуса кассеты 102 имеет конфигурацию, подходящую для подсоединения к резервуару для жидкости 101, содержащему вакцину против HBV, где резервуар 101 и конструкция корпуса кассеты 102 имеют конфигурацию, подходящую для оперативного соединения по меньшей мере с одним отверстием для инъекции (иглой 105), через которое вакцина против HBV вводится в ткань-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта конфигурация облегчает совместную локализацию распределения представляющего интерес агента на участке подачи электрического поля. В другом варианте осуществления изобретения, эта конфигурация облегчает реализацию заранее определенной пространственной взаимосвязи между устройством для ESA и СТАА. В еще одном репрезентативном варианте осуществления изобретения, шприц 101 вставляется в кассету 100, где после загрузки кассеты в аппликатор 400, шприц 101 продвигается по направлению к втулке для иглы 152 и соединяет кассету с иглой.

Некоторые варианты осуществления изобретения могут включать использование шприцев, флаконов, ампул, кассет или эквивалентных структур для хранения одной или более вакцин против HBV. В некоторых вариантах осуществления изобретения, резервуары могут быть изготовлены по меньшей мере из стекла или пластика, причем, материал должен быть выбран так, чтобы он был совместим с представляющим интерес агентом. На используемый резервуар могут быть нанесены покрытия для обеспечения желаемых смазывающих или защитных свойств. Как описано выше, электроды 122 могут быть полыми, а

в некоторых случаях, они могут иметь отверстия для инъекции, которые могут быть оперативно соединены с резервуарами для жидкости. Альтернативно, отверстие для инъекции может содержать одну или более игл для подкожных инъекций и/или безыгольные порты для инъекции, расположенные соответствующим образом по отношению к электродам. Выбор типа и размера отверстия для инъекции может зависеть от желаемого способа введения, распределения в ткани и физических свойств представляющего интерес агента. В определенном варианте осуществления изобретения, конструкция кассеты гарантирует заранее определенную пространственную взаимосвязь между отверстием для инъекции и электродами в месте их расположения, так, чтобы распределение представляющего интерес агента происходило, по существу, в ткани, ограниченной проводящими областями множества электродов. Чтобы свести к минимуму необходимость обращения пользователя с острыми предметами, в определенном варианте осуществления изобретения, кассета 100, предназначенная для использования игл для подкожных инъекций, имеет такую конфигурацию, при которой игла для подкожных должна быть соединена с кассетой уже во время изготовления, а не в более распространенном случае соединения иглы со шприцем во время использования. В определенных вариантах осуществления изобретения, аспект раскрытия изобретения может включать элементы в кассете и/или иглу для гарантированного удержания иглы во время изготовления, распределения, обработки и использования, а также элементы, обеспечивающие правильное соединение резервуара с иглой перед использованием. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие признаки могут минимизировать риски утечки агента из резервуара или соединительного отверстия резервуара из-за поломки или неправильного соединения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, кассета может включать поверхность контакта с тканью, находящуюся на дистальном конце субблока. В некоторых вариантах осуществления изобретения, поверхность контакта с тканью имеет, по существу, плоскую структуру, расположенную перпендикулярно электродам удлиненной формы и имеющую одно или более отверстий, которые имеют конфигурацию, подходящую для прохождения электродов через поверхность контакта с тканью. Для вариантов осуществления изобретения, включающих встроенный резервуар и отверстие для инъекции, такая поверхность контакта также имеет апертуру для размещения отверстия для инъекции или безыгольной инъекции. Для минимизации риска загрязнения электродов и иглы для инъекции, а также непреднамеренного прикосновения пользователя или реципиента к острым предметам, в определенном варианте осуществления изобретения, отверстия для размещения электродов и иглы для инъекций должны иметь размер, подходящий для предотвращения случайного контакта с электродами и иглой для инъекций. Чаще всего, поверхность контакта с тканью состоит из одного или более пластиков, подходящих по меньшей мере для кратковременного контакта с тканью.

Во избежание потенциального перекрестного загрязнения биологического материала реципиентами, кассетный блок 100 может иметь конфигурацию, подходящую для его одноразового использования. В некоторых случаях, кассета содержит один или более механических, электрических и/или идентификационных элементов, которые ограничивают использование кассеты одним введением. Примерами механических элементов такого типа являются, например, но не ограничиваются ими, блокировки и/или фиксаторы, которые закрепляют конструкцию крепления электрода и/или защитный экран (см. ниже) во включенном состоянии после использования. Примерами электрических элементов являются, например, плавкие предохранители или плавкие вставки, расположенные последовательно с одним или более электродами, которые отключаются источником электрической энергии по окончании первого использования кассеты. Примерами элементов идентификации являются, например, серийные устройства идентификации радиочастот, штрих-коды или коды быстрого реагирования, выполненные так, чтобы они считывались аппликатором, и/или источник электрической энергии. Затем, идентификационная информация для конкретной кассеты может быть использована для предотвращения случайного или преднамеренного повторного использования этой кассеты аппликатором и/или источника энергии. В одном варианте осуществления изобретения, один или более избыточных элементов включены для минимизации возможности повторного использования кассет.

В одном варианте описанного здесь устройства, как показано на фиг. 2, аппликатор 400 содержит опорную конструкцию, имеющую конфигурацию, подходящую для соединения с кассетным блоком 100, пользовательский интерфейс 410-418 (фиг. 13B), электропроводящие электрические соединения, имеющие конфигурацию, подходящую для обеспечения оперативного соединения между областью проводящего контакта, расположенной в дистальной области удлиненных электродов, и источником электрической энергии при введении электродов в ткань-мишень реципиента. В некоторых случаях, пользовательский интерфейс содержит дескриптор, один или более элементов изображения, предназначенных для передачи информации пользователю, и один или более элементов, способных принимать входные данные для пользователя. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элементы изображения имеют конфигурацию, позволяющую передавать информацию о рабочем состоянии устройства во время его настройки и использования, а также соответствующие предупреждения/сообщения об ошибках. Такие дисплеи могут содержать механические элементы, источники света, алфавитно-цифровые дисплеи и/или электронные экраны дисплея. В некоторых случаях, элементы, способные принимать входные данные для пользователя, выполнены так, чтобы они позволяли пользователю на соответствующем этапе проце-

дуры отключать элементы безопасности в устройстве, предотвращающем случайный разряд, и сделать выбор конкретных параметров процедуры (например, предполагаемой глубины инъекции) и инициировать процедуру введения, и такие элементы могут включать кнопки, триггеры, механические рельсы и/или рычаги.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аппликатор 400 также включает механизмы привода, которые взаимодействуют с кассетным блоком, и которые предназначены для чрескожного размещения электродов, позиционирования отверстия для инъекций по отношению к тканям-мишеням, выпуска представляющего интерес агента из резервуара через отверстие на участок ткани-мишени и/или передачи электрических сигналов от генератора электрического поля, такого как регулятор 700, в кассету 100. Аппликатор 400 может быть сконструирован так, чтобы энергия для приведения в действие механизмов подавалась пользователем или, более предпочтительно, чтобы устройство могло содержать один или более неактивных источников энергии, функционально связанных с механизмами привода в аппликаторе. Такие неактивные источники энергии включают, например, электромеханические устройства (соленоиды, двигатели, ходовые винты), механические компоненты (пружины и родственные устройства) и сжиженные газы.

Репрезентативная реализация кассетного блока 100 описана на фиг. 3А, где кассетный блок 100 включает отверстие для загрузки резервуара 140 и приемник резервуара 142 для приема и хранения лекарственного средства в резервуаре 101. Кассетный блок 100 является необходимым, поскольку для устройства, в котором электрическое поле должно генерироваться и использоваться в процессе терапии, генератор электрического поля, такой как регулятор 700, необходим для электрического взаимодействия с устройством, содержащим электроды, сконструированные так, чтобы они контактировали с тканью-мишенью. Поскольку регулятор может быть предназначен для многократного использования, а резервуар 101 может быть предназначен для одноразового использования, то кассетный блок 100 может служить для удерживания электродов 122, а резервуар 101 может служить для соединения с устройством для многократного использования и кассетным блоком 100, предназначенным для одноразового использования. Таким образом, аппликатор 400 может быть повторно используемым компонентом, а кассетный блок 100 может быть предназначен для одноразового использования. Кассетный блок 100 может быть также приведен в состояние, предотвращающее его последующее использование, если при вставке резервуара 101 возникают ошибки или искажения информации или если присутствуют дефекты.

Термин "резервуар 101" может означать шприц, флакон или любое другое устройство, которое может содержать лекарственное средство или вакцину против HBV, и которое может быть соединено с устройством, имеющим отверстие, таким как игла, показанная на фиг. 4, а именно, игла 105, имеющая втулку для иглы 152. Резервуар 101 для кассетного блока 100 данного типа имеет, в основном, обычную форму и размер. Различные компоненты в кассетном блоке 100 допускают отклонение от точных размеров и/или производственных допусков, но, как правило, имеют обычные формы и размеры, необходимые для снижения риска того, что лекарственные средства, не маркированные для их использования в кассете 100, будут ошибочно доставлены этим устройством. Если резервуар 101 подходящего размера не находится в распоряжении пользователя, то одна или более блокировок в кассетном блоке 100 не смогут его отключить, и система будет нефункциональной до тех пор, пока не будет вставлен резервуар 101 подходящего размера.

Как показано на фиг. 3В, резервуар 101 может быть снабжен поршнем и отверстием 156 для выхода лекарственного средства. Съемный колпачок 158 может быть также предусмотрен для поддержания стерильности и целостности агента до тех пор, пока резервуар не будет вставлен и использован. Отверстие для выхода лекарственного средства может находиться рядом с используемой втулкой для иглы 152, а поршень может находиться напротив этого отверстия для выхода лекарственного средства. В качестве альтернативы открытому отверстию для выхода лекарственного средства, в некоторых вариантах осуществления изобретения, резервуар может быть сконструирован так, чтобы он содержал перегородку, которая закрывает и герметизирует конец контейнера напротив поршня. Перегородка может быть изготовлена из эластомерных соединений, таких как силикон или бутылкаучук, с определенным составом и покрытием из материала, выбранного для обеспечения стабильности и совместимости с агентом, содержащимся в резервуаре. Такой компонент, как перегородка, обычно удерживается на месте обжимным уплотнителем или другим крепежным механизмом. Такая конфигурация уплотнителя перегородки устраняет необходимость в съемном колпачке, но требует, чтобы игла 105 была снабжена подходящим прокалывающим элементом, таким как игла, шип или другие элементы, для доступа к жидкости, содержащейся в резервуаре. Конкретные реализации для этой конфигурации включают использование двухсторонних игл и адаптеров для ампул с шипами.

Кассетный блок 100 создан не только для приема резервуара 101, но также и для приема аппликатором 400 через приемное отверстие 401 кассетного блока аппликатора (фиг. 2). Таким образом, кассетный блок 100 включает устройство, позволяющее аппликатору 400 втягивать и удерживать его во внутреннем объеме, по меньшей мере частично. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство представляет собой одну или более реек на поверхности(ях) кассетного блока 100, которые сцепляются с соответствующим узлом движущейся шестерни в аппликаторе 400. В других вариантах реализации, ап-

пликатор 400 может быть соединен с кассетным блоком 100 без необходимости втягивать его вовнутрь. В других вариантах осуществления изобретения, могут быть использованы и другие технологии, позволяющие кассетному блоку 100 соединяться с аппликатором 400, например, движущимися дорожками или кронштейнами и т.п., к которым может быть подсоединен кассетный блок 100.

Аппликатор 400 дополнительно снабжен интерфейсными элементами, позволяющими ему управлять некоторыми действиями в кассетном блоке 100. В частности, аппликатор 400 может иметь конфигурацию, подходящую для регуляции введения иглы, доставки лекарственного средства, введения электрода и активацию электрода с использованием различных подсистем. В некоторых случаях, эти стадии являются взаимосвязанными, в результате чего одно действие аппликатора 400 инициирует множество этих стадий. В некоторых вариантах осуществления изобретения, все эти стадии, кроме доставки лекарственного средства и активации электрода, запускаются одним действием, как описано ниже в репрезентативном варианте осуществления изобретения.

После соответствующей активации, такой как использование электрических или оптических сигналов, подаваемых на механические, электрические или оптические элементы кассетного блока 100, аппликатор 400 может обеспечивать тестирование подсистем в кассетном блоке 100 с гарантией, что они будут работать соответствующим образом и будут правильно настроены для доставки лекарственного средства посредством подачи электрического поля. Так, например, такие подсистемы представляют собой подсистемы, которые могут быть протестированы с помощью аппликатора 400 для гарантии того, что кассетный блок 100 ранее не использовался; что резервуар был правильно размещен в кассетном блоке; что соответствующее усилие, приложенное к телу индивидуума, осуществлялось посредством выравнивающей панели/бокового экрана 108; что глубина была правильно выбрана пользователем; и что внешняя кассетная крышка 110 была удалена. Кроме того, аппликатор 400 может быть сконструирован так, чтобы он позволял осуществлять мониторинг состояния функций кассет во время выполнения процедуры. Так, например, такие подсистемы представляют собой подсистемы, которые могут быть протестированы с помощью аппликатора 400 для гарантии того, что электроды 122 будут расположены в нужном участке у индивидуума еще до начала введения лекарственного средства; что поршень в резервуаре был надлежащим образом приведен в действие до подачи электрических полей; и что пользователь поддерживал соответствующую силу, приложенную к телу индивидуума во время процедуры введения и т.п.

Помимо подсистем, которые управляются аппликатором 400, кассетный блок 100 может включать соответствующие подсистемы, включая подсистемы, которые взаимодействуют с аппликатором 400, и подсистемы, которые не взаимодействуют с ним, так, чтобы это позволяло осуществлять доставку лекарственного средства и проведение терапии путем подачи электрического поля. Такими подсистемами являются подсистема для введения иглы и электрода, подсистема для защиты пользователей от соприкосновения с острыми предметами после проведения терапии; подсистема для обеспечения различной глубины введения иглы/электродов; подсистема для обеспечения адекватного усилия, прилагаемого к ткани реципиента до начала проведения этой процедуры и впоследствии, во время этой процедуры введения и т.п. Хотя это часто описывается применительно к размещаемым иглам и электродам, однако, следует отметить, что это не является строго обязательным, и что системы с неразмещаемыми или фиксированными иглами и электродами также имеют преимущества при применении систем и способов согласно принципам настоящего изобретения, включая описанные подсистемы.

В одном репрезентативном варианте осуществления изобретения, как показано на фиг. 4, кассетный блок 100 включает внешнюю кассету 102, в некоторых случаях, называемую корпусом. Внешняя кассета 102 заканчивается на дистальном конце внешней кассетной крышкой 106. Внешняя кассета 102 включает приемник внутренней кассеты 150 для подачи во внутреннюю кассету 103, которая принимается и перемещается с возможностью скольжения относительно внешней кассеты 102. Внутренняя кассета 103 включает приемник 142 резервуара, и в ней может находиться резервуар 101. Внутренняя кассета 103 входит в зацепление с внутренней кассетной крышкой 104 на дистальном конце. Внутренняя кассетная крышка 104 выполняет ряд функций, в том числе блокирует электроды 122 в определенном месте (сама внутренняя кассета 103 имеет углубления, в которые помещены электроды 122) и обеспечивает опорную поверхность для защитного экрана 134. Внутренняя кассетная крышка 104 фиксируется на внутренней кассете 103.

Задняя часть 112 кассеты входит в часть приемника 142 резервуара во внутренней кассете 103, то есть в часть, противоположную внутренней кассетной крышке 104. Детектирующая крышка 118 резервуара входит в зацепление с задней частью 112 кассеты посредством детектирующей пружины 116 резервуара. Стопорное кольцо 114 кассеты блокирует систему на определенном участке, включая заднюю часть 112 кассеты, сцепленную с внутренней кассетой 103. Детектирующая пружина 116 резервуара также служит для подталкивания резервуара 101 в зацепление с втулкой иглы 152, а также служит для создания допустимых размеров резервуара 101.

Блокировка 120 резервуара обеспечивает механическую блокировку для предотвращения непреднамеренного или нежелательного срабатывания элементов кассеты. В частности, блокировка 120 резервуара, также называемая первым элементом запуска для вставки резервуара, расположена ниже внутренней кассеты 103 и имеет пальцы, которые проходят через прорезы или отверстия, имеющиеся во внут-

ренной кассете 103 (см. фиг. 5В). Пальцы препятствуют скольжению задней части 112 кассеты относительно внутренней кассеты 103, и, в частности, перемещению внутри внутренней кассеты 103 по направлению к внутренней кассетной крышке 104 до того, как резервуар будет вставлен в приемник 142 резервуара.

Когда резервуар 101 будет правильно вставлен приемник 142 резервуара, блокировка 120 резервуара подается вниз, и пальцы также опускаются вниз, и больше не продвигаются в приемник 142 резервуара. Такое опускание или нажатие блокировки 120 резервуара может быть также осуществлено со слышимым, тактильным или осязаемым "щелчком", который может информировать пользователя о правильной вставке. После нажатия, задняя часть 112 кассеты, которая больше не блокируется пальцами блокировки 120 резервуара, затем может перемещаться и, в частности, может перемещаться в направлении к внутренней кассетной крышке 104.

Перемещение задней части 112 кассеты вызывается действием стыка 470 крышки пружины/кассеты, когда кассетный блок 100 вставляется в аппликатор 400 способом, описанным ниже. Когда задняя часть 112 кассеты перемещается достаточно далеко вперед, она фиксируется на месте, закрепляя резервуар 101 в приемнике 142 резервуара, и обеспечивая его правильное положение относительно втулки 152 для иглы, что будет гарантировать продвижение интактной жидкости от резервуара 101 к отверстию иглы 105.

В тех вариантах устройства, в которых игла для инъекций встроена в кассету 100, использование стандартных "коммерчески доступных" одноразовых игл для подкожных инъекций может быть осуществлено с помощью такого устройства. Тем не менее, эксплуатационные характеристики и характеристики надежности устройства могут быть улучшены за счет включения специально сконструированных элементов, которые отсутствуют в иглах для подкожных инъекций, предназначенных для обычных процедур парентерального введения. Конкретные особенности втулки 152 для иглы могут включать материал, из которого она состоит, элементы удерживания для предотвращения смещения втулки 152 для иглы из внутренней кассеты 103 во время распределения и использования и ориентацию любых скошенных элементов в игле относительно втулки.

Стандартные одноразовые иглы для инъекций обычно состоят из полипропиленового термопластика, полученного литьем под давлением. Однако, для многих целей, ударная вязкость, предел прочности при растяжении и прочность на изгиб полипропилена могут быть недостаточными для гарантии целостности втулки при воздействии сил, характерных для введения иглы и инъекции с помощью этого устройства. Конкретными недостатками, вызывающими беспокойство, являются разрушение стенки втулки из-за ударных или инъекционных сил, а также нарушение соединения втулки с иглой по этим причинам. Хотя для устранения этих недостатков могут быть проведены коррекции в конструкции втулки, включая ее геометрию и толщину стенки, однако, не всегда возможно изменить конструкцию в достаточной степени так, чтобы можно было предотвратить поломку втулки, и, при этом гарантировать, что втулка будет сохранять свой размер, необходимый для правильного сопряжения с коническими люэровскими скользящими соединителями, как описано в соответствующем документе по стандартам, опубликованном Международной Организацией по стандартам (ISO) ISO 80369-7: 2016, под заголовком "Разъемы малого диаметра для жидкостей и газов, используемых в здравоохранении" - часть 7. "Соединители для внутрисосудистого или подкожного применения". В частности, учитывая силы, которым подвергаются игла и втулка шприца во время введения, в некоторых вариантах осуществления изобретения используется материал с улучшенной ударной вязкостью, прочностью на растяжение и прочностью на изгиб. Одним из примеров является использование поликарбонатных пластиков, изготовленных путем литья под давлением (таких как ZELUX® GS, Makrolon или Lexan) или сополиэфиров (таких как Eastman Tritan Copolyester MX731, MX711 и MX 730). При оценке согласно ISO 180:2000 "Пластики - Определение ударной вязкости по Изоду" считается, что ударная прочность с надрезом, подходящая для этой цели, составляет по меньшей мере 70 кДж/м². При оценке в соответствии с ISO 527-1:2012. "Пластики - Определение свойств при растяжении". Часть 1. "Общие принципы", предел прочности при растяжении, подходящий для этой цели, составляет по меньшей мере 30 МПа. При оценке в соответствии с ISO 178:2010. "Пластики - Определение свойств при изгибе", считается, что прочность на изгиб, подходящая для этой цели, составляет по меньшей мере 50 МПа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, специально выбранная смола является совместимой с предполагаемым методом стерилизации (например, гамма-излучением) и не обнаруживает каких-либо нежелательных изменений физических свойств, которые могут нарушать ее функцию.

В те варианты осуществления изобретения, в которых используется специально изготовленная игла для инъекций, включены один или более механических элементов, которые обычно не присутствуют в стандартных втулках шприца, и которые позволяют вставлять устройство во внутреннюю кассету 103. Такие элементы могут включать петли, защелки или выступы с соответствующими механическими элементами, расположенными во внутренней кассете 103. В некоторых случаях, элементы выполнены таким образом, что втулка сопрягается с внутренней кассетой 103 в согласованной ориентации. Комбинация со способом изготовления иглы, который обеспечивает согласованную ориентацию скоса или другой особенности отверстия для иглы, гарантирует, что отклонения в месте инъекции или в распределении лекар-

ственного средства из-за расположения и конструкции отверстия могут быть учтены при конструировании устройства. Так, например, иглы с асимметричными проникающими наконечниками (например, со скошенным вырезом) могут вызывать направленное смещение во время ее введения в ткань из-за взаимодействия между тканью и асимметричным элементом пенетрации на игле. Если электроды имеют симметричный элемент наконечника для пенетрации (например, наконечник иглы троакара), то электроды не будут иметь соответствующего смещения при их введении. Следовательно, крепежный элемент для втулки 152 для иглы на внутренней кассете 103 может давать смещение в положении отверстия для инъекции иглой 105 относительно электродов 122 перед их размещением с учетом ожидаемых свойств асимметрического скоса иглы при размещении. Точный размер смещения может зависеть от природы ткани-мишени и ожидаемого диапазона глубины проникновения, но в некоторых вариантах осуществления изобретения, игла смещается на 0,5-1 мм на каждые 10 мм глубины проникновения. При использовании электродов и игл для инъекций с различными профилями наконечников, или в случае, когда профили наконечников должны быть последовательно ориентированы по отношению друг к другу, такие особенности выгодны для обеспечения совместной локализации при распределении лекарственного средства путем подачи электрических полей.

Включение детектирующей крышки 118 шприца, установленной на детектируемой пружине 116 шприца, гарантирует, что кассетный блок 100 может принимать и правильно размещать шприц 101 относительно втулки 152 для иглы в пределах диапазона производственных допусков, ожидаемых для шприца 101. Аппликатор 400 позволяет задней части 112 кассеты перемещаться вперед во время процедуры загрузки, когда стык 470 крышки/кассеты пружины в аппликаторе 400 перемещается дистально относительно кассетного блока 100. Это действие происходит, когда кассетный блок 100 загружается в аппликатор 400, и кассетный блок 100 втягивается в аппликатор 400, например, под действием механизма загрузки, например, механизма реечной передачи, описанного ниже.

Движение задней части 112 кассеты может действовать как вторая блокировка. В частности, в одном варианте осуществления изобретения, как видно на фиг. 5C-5D, линия визирования является видимой и детектируемой посредством соответствующим образом сконструированного датчика в кассетном блоке, в приемнике 403 кассетного блока, через серию блокирующих отверстий 144' резервуара (фиг. 5D). Эта линия визирования видна, когда кассетный блок 100 загружается в аппликатор 400. Эта световая линия визирования или ее окклюзия могут действовать как часть второй блокировки, которая должна быть отключена для того, чтобы регулятор 700 мог активировать и запускать устройство, включая введение иглы и электрода, доставку лекарственного средства и активацию электрода.

Так, например, в одном варианте осуществления изобретения, блокирующие отверстия 144' резервуара (фиг. 5D) должны быть закрыты для работы устройства. Если присутствует видимая линия визирования, например, как было обнаружено с помощью ИК-излучателя или излучателя видимого света и детектора, спаренного с приемником 403 кассетного блока аппликатора, то устройство может быть выведено в нерабочее состояние и может генерировать и отображать сообщение об ошибке на дисплее аппликатора 404 и/или регулятора 700, включая дисплей регулятора 712, для уведомления пользователя о состоянии устройства, а также о рекомендуемых шагах, которые необходимо предпринять для устранения ошибки.

Таким образом, в этом варианте осуществления изобретения, одно состояние ошибки может заключаться в том, что резервуар 101 не был загружен в кассетный блок 100, или в том, что шприц не был надлежащим образом установлен во внутреннюю кассету 103. В этом случае, блокировка 120 резервуара не может быть нажата, так как резервуар 101 не выполняет это действие. В этом случае, задняя часть 112 кассеты не может перемещаться вперед в дистальном направлении, то есть по направлению к внутренней кассетной крышке 104. Конструкция этих компонентов может быть такой, что открытое состояние задней части дает открытую линию визирования 146 посредством первых блокирующих отверстий 144' резервуара (фиг. 5D). Дополнительная проверка заключается в том, что задняя часть 112 кассеты не может быть закрыта, и это может проявляться как неспособность кассеты перемещаться на необходимое расстояние назад или дистально в приемник 403 кассетного блока. Поскольку эти условия определены системой как состояние ошибки, то то же самое можно идентифицировать и использовать при получении сообщения об ошибке, например, соответствующего сообщения пользователю на пользовательский интерфейс на дисплее 404 аппликатора и/или регулятора 700, включая дисплей 712 регулятора. Подобное состояние ошибки может возникнуть, если резервуар 101 будет неправильно загружен, или если будет нарушена блокировка 120 резервуара. Обычно, в этом случае, соответствующее сообщение об ошибке может сопровождаться инструкциями для пользователя по извлечению кассеты, повторной установке нового резервуара и попытке повторного введения кассетного блока 100 в аппликатор 400.

Другое состояние ошибки может заключаться в том, что задняя часть 112 кассеты перемещается пользователем вперед вручную без резервуара 101, что происходит, когда пользователь вручную выталкивает блокировку 120 из приемника 142 резервуара. Эта ситуация также может быть определена как состояние ошибки, и такая же ситуация может быть обнаружена потому, что другая (вторая) серия блокирующих отверстий 144 резервуара (фиг. 5C) размещена на части внешней кассеты 102. Если резервуар не установлен, но задняя часть 112 кассеты перемещается вперед под действием блокировки 120 резер-

вуара, находящейся в нажатом состоянии, то блокирующие отверстия 144' резервуара (фиг. 5D) совмещаются с блокирующими отверстиями 144 резервуара (фиг. 5C), что снова приводит к созданию открытой линии визирования 146 и последующему состоянию ошибки. Это состояние ошибки также может возникать, если блокировка 120 резервуара повреждена, и его пальцы больше не находятся в приемнике 142 резервуара. В определенном варианте осуществления изобретения, это состояние ошибки не может быть исправлено путем попытки переустановить резервуар, поскольку резервуар может не уместиться в приемник 142 резервуара с заблокированной задней частью 112 кассеты. В определенном варианте осуществления изобретения, требуется новый кассетный блок 100.

В противоположность этому, если резервуар 101 соответствующего размера расположен в нужном месте, то детектирующая крышка 118 резервуара откидывается назад к детектирующей пружине 116 резервуара, и движение детектирующей крышки 118 резервуара закрывает блокирующие отверстия 144 резервуара (фиг. 5C) и блокирующие отверстия 144' резервуара (фиг. 5D). В этом случае, состояние ошибки отсутствует, что позволяет устройству работать. Оклюзия и обнаружение окклюзии происходят внутри корпуса аппликатора 400 после того, как будет вставлен кассетный блок 100, и, таким образом, попытки пользователя снять эту блокировку будут безуспешными, независимо от того, является ли такое снятие намеренным, случайным или вызванным каким-либо дефектом. Следует отметить, что это состояние "без ошибки" все еще возникает, даже если пользователь преднамеренно или по неосторожности сам закрывает заднюю часть 112 кассеты во время работы с кассетой 100.

В зависимости от того, в каком состоянии возникает ошибка, кассетный блок 100 может оставаться пригодным для использования или нет. Если задняя часть 112 кассеты зафиксирована на месте, то кассетный блок 100 становится непригодным для использования. Однако, если задняя часть 112 кассеты не была зафиксирована на месте, то кассетный блок 100 можно извлечь из аппликатора 400 и вставить новый резервуар 101.

Хотя было обнаружено, что вышеупомянутый набор из двух блокировок (один механический с блокировкой 120 резервуара и один с излучателем и коллектором света и блокирующими отверстиями 144 и 144' резервуара) являются особенно подходящими в некоторых вариантах осуществления изобретения, однако, следует понимать, что могут быть использованы блокировки и других типов (фиг. 5C-5D). Так, например, вместо состояния ошибки, в том случае, когда блокирующие отверстия 144 резервуара не были закрыты, может возникнуть состояние ошибки (в результате изменения местоположения блокирующего отверстия резервуара и программной логики), если блокирующие отверстия 144 резервуара были закрыты (и чистая линия визирования 146 будет соответствовать состоянию "без ошибок"). Блокировка 120 резервуара может включать дополнительные механические сигнальные элементы, которые не видны в кассетном блоке, когда блокировка включена, но становятся видимыми для датчика с соответствующей конфигурацией, когда шприц 101 был правильно вставлен, и блокировка 120 резервуара находится в отжатом положении. В других вариантах осуществления изобретения, для определения присутствия линии визирования, например оптической, акустической, электрической или т.п. могут быть применены и другие способы, при условии, что подходящий излучатель и коллектор будут находиться в аппликаторе 400. Для того, чтобы определить, является ли резервуар 101 правильно загруженным, могут быть также применены и другие способы, например, механические методы, известные специалистам в данной области. В зависимости от целей реализации, если обнаружено состояние ошибки, то аппликатор 400 может быть отключен от работы с кассетным блоком 100 в определенном месте, или аппликатор 400 может быть отключен даже от принятия кассетного блока 100 в первую очередь. Так, например, кассета сконструирована так, чтобы блокировка 120 резервуара включала механические язычки или блокирующие элементы, которые простираются от одной или более поверхностей кассеты до тех пор, пока шприц 101 не будет правильно вставлен в кассету 100. Механические язычки предназначены для взаимодействия с соответствующим фиксатором, расположенным в аппликаторе 400, так чтобы загрузка кассеты 100 в аппликатор 400 была физически блокирована до тех пор, пока не будет снята блокировка 120 резервуара. Это механическое взаимодействие будет обеспечивать обратную связь с пользователем или системой, и сообщать о том, что условие ошибки должно быть устранено до загрузки кассеты 100 в аппликатор 400. В других вариантах осуществления изобретения, могут быть использованы более или менее чем две блокировки, хотя обе эти блокировки могут быть соответствующим образом ассоциированы с различными профилями безопасности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в вышеуказанных методах определения или для усовершенствования этих методов могут быть также использованы и другие элементы. Так, например, когда двигатель используется для проталкивания кассетного блока 100 в аппликатор 400, могут быть использованы описанные ниже датчики для детектирования пространственного положения кассетного блока 100 кассеты в процессе вставки. Другими словами, аппликатор 400 может определить, в каком месте приемника 403 кассетного блока находится этот кассетный блок 100. В некоторых случаях, это дает возможность определить другие состояния ошибок либо напрямую, либо путем инициации активации дополнительных датчиков для оценки состояния устройства. Так, например, в используемой кассете, задняя часть 112 кассеты зафиксирована в определенном положении. Если попытаться повторно использовать кассетный блок 100, то оптический детектор будет обнаруживать кассетный блок 100 в другом

положении, отличающемся от положения неиспользуемого кассетного блока 100. Использование электродвигателя для одной или более системных функций также обеспечивает возможность мониторинга его рабочего состояния, включая величины напряжения и тока, подаваемые на двигатель, а также количество оборотов, которые выполняет двигатель во время конкретной операции. Измерение этих величин во время работы системы может быть проведено с применением основного или второго метода детектирования потенциальных или фактических состояний неисправности. Так, например, использование механических блокировок, предназначенных для блокирования процедуры загрузки, если кассета 100 была неправильно сконструирована, может быть осуществлено в комбинации с датчиками и логическими схемами для гарантии правильной загрузки кассеты 100 в аппликатор 400. Так, например, взаимодействие описанных выше механических элементов, предназначенных для предотвращения загрузки кассеты 100 без правильно установленного резервуара 102, будет приводить к увеличению нагрузки на механизм привода двигателя, что будет приводить к большему потреблению тока. Детектирование повышения силы тока, потребляемого двигателем, будет приводить к остановке процедуры загрузки и сообщать пользователю об остановке работы и состоянии неисправности, например, на дисплее 712 стимулятора и/или дисплее 404 аппликатора.

Поскольку возможно, что лекарственные средства, не предназначенные для введения этим способом, могут содержаться в резервуарах, имеющих такой же размер и конфигурацию, как и резервуары, предназначенные для их использования этим способом доставки. Следовательно, дополнительным аспектом системы является применение одного или более способов для гарантии того, что резервуар 101, вставленный пользователем в кассету 100, будет специально предназначен для использования с данным устройством. Введение таких элементов будет снижать риск неправильного введения лекарственного средства данному индивидууму. Обычно конкретная информация в инструкциях для пользователя и маркировка лекарственного средства включает схему и способ введения. Однако, для дальнейшего снижения вероятности ошибок пользователя, может оказаться желательным включение механических, оптических и/или электрических элементов в резервуар и устройство. В одном варианте осуществления изобретения, шприц может быть сконструирован так, чтобы он включал один или более уникальных механических элементов, отсутствующих в других резервуарах, которые могут быть аналогичны резервуарам, предназначенным для использования в этом способе доставки. Так, например, резервуар может быть специально изготовлен так, чтобы он включал ребро или другой удлиненный элемент на фланце или корпусе резервуара. В этом варианте осуществления изобретения, соответствующий элемент сопряжения должен быть включен в блокировку 120 резервуара, так, чтобы блокировка резервуара могла быть отключена только в том случае, если резервуар с соответствующим элементом сопряжения был правильно вставлен в устройство. В случае, если не представляется возможным непосредственно использовать этот элемент при конструировании резервуара, то в качестве альтернативного варианта, в резервуар может быть включен второй механический компонент, который будет уникальным для резервуаров, предназначенных для использования с этим устройством. Так, например, кольцо или другой соответствующим образом сконструированный элемент, предназначенный для скольжения по корпусу резервуара, можно использовать для "подбора" резервуара в целях его использования с этим устройством путем сопряжения с соответствующим элементом во внешней кассете 102, внутренней кассете 103, в блокировке 120 резервуара, в детектируемой крышке 118 резервуара или в другом подходящем элементе в кассете 100. Дополнительный вариант осуществления изобретения включает специальную изготовленную метку подходящего размера, цвета и/или электрической проводимости, нанесенную на заранее определенное место на наружной поверхности резервуаров, которые предназначены для использования с этим устройством. Соответствующие оптические или электрические датчики в аппликаторе 400 могут быть сконструированы так, чтобы они детектировали присутствие или отсутствие метки на поверхности резервуара для подтверждения того, что лекарственное средство, введенное в кассету, будет предназначено для использования с этим устройством. Способ детектирования включает использование оптических или электрических сигналов, подаваемых на поверхность для определения присутствия или отсутствия метки. Таким образом, резервуары, содержащие лекарственные средства, не предназначенные для использования с этим устройством (и, следовательно, имеющие несоответствующую метку), могут быть обнаружены и удалены во избежание возможного неправильного их использования.

Ниже описана конфигурация датчиков для определения загрузки кассеты и шприца, описанных выше, где такие датчики также составляют часть субблока для загрузки кассеты в аппликаторе 400. Более подробно и со ссылкой на фиг. 6, 17В и 18С, репрезентативным способом определения места расположения кассетного блока 100 является использование датчика загрузки 436 кассеты и датчика конца загрузки 438 кассеты, которые составляют часть субблока привода загрузки 454, где субблок 454 дополнительно включает направляющие рельсы 442 для кассеты и загрузочный двигатель 444, который имеет соединение с узлом шестерни 448, который проталкивает кассетный блок 100 в приемник 403 кассетного блока посредством реечных передач 154 на основании внешней кассеты 102. Более подробно, если датчик загрузки кассеты 436 обнаруживает сигнал инициации 172 на кассетном блоке 100 (см. фиг. 6), то двигатель может быть готов к началу загрузки. Когда датчик конца загрузки 438 кассеты обнаруживает тот же самый сигнал, то загрузка может быть прекращена. Может быть использован сигнал продолжения

174, который должен указывать на продолжение загрузки.

Первые "зубья" рейки 154 могут быть изготовлены так, чтобы пользователь имел тактильное ощущение (или слышимое или осязательное) в случае, когда кассетный блок 100 вставляется в приемник 403 кассетного блока. Такая конфигурация может иметь форму и/или размер зубьев рейки 154, а также степень изгиба, допускаемые их расположением во внешней кассете. Путем адаптации реализации зубьев рейки может быть достигнута желаемая степень тактильной обратной связи, при этом гарантируется, что она не будет оказывать значительного воздействия на двигатель загрузки 444 после приема и загрузки кассетного блока 100.

Кроме того, как показано на фиг. 17А, и как было отмечено выше, кассетный блок 100 вставляют в приемник 403 кассетного блока в аппликаторе 400. Хотя для этой вставки могут быть применены различные способы, однако, найден один особенно подходящий способ, а именно, способ, осуществляемый посредством сцепления узла шестерни 448 с рейками 154 на внешней кассете 102. Использование более, чем одной рейки обеспечивает дополнительную стабильность, а в частности, устойчивость к вихревым колебаниям во время фазы загрузки. Как показано на фиг. 18А, где представлен узел привода для вставки/инъекции 456, помимо втягивания кассетного блока 100 в приемник 403 кассетного блока, в процессе вставки дополнительно сжимается пружина 472 вставки электрода/иглы через стык 470 пружинной крышки /кассеты. Пружина 472 вставки электрода/иглы используется в качестве основной движущей силы для введения иглы и электрода во время доставки лекарственного средства.

Это гибридное двигатель-пружинное действие дает множество преимуществ. Привод двигателя выгоден, так как он является хорошо управляемым и позволяет загружать кассету 100 в аппликатор 400 полуавтоматическим способом с минимально необходимым приложением механической силы пользователем. Как описано выше, реализация механизмов на основе привода двигателя обеспечивает мониторинг рабочего состояния системы. Так, например, передача потребляемого тока и число оборотов по логической и управляющей схеме в системе обеспечивает дополнительный метод детектирования и диагностики возможных состояний неисправностей. Несмотря на эти преимущества, в некоторых случаях, электродвигатели могут быть плохо адаптированы для приложения необходимой линейной силы в течение достаточно коротких временных интервалов, что наиболее желательно для эффективного чрескожного введения матриц, содержащих множество удлиненных электродов, а в некоторых вариантах осуществления изобретения, игл для подкожных инъекций. В частности, проникновение в ткани дермы лучше всего достигается путем приложения большой линейной силы в течение короткого промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, наиболее благоприятные характеристики введения достигаются в случае, когда проникающие электроды и игла для инъекции, если она присутствует, контактируют с кожей с более высокой скоростью. Это объясняется тем, что острые предметы, движущиеся с повышенной скоростью в точке контакта с кожей, приводят к меньшей деформации ткани по мере ее разрезания или проникновения в ткань. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, желательно быстрое ускорение движения острых предметов до контакта с кожей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, часто используют множество электродов и игл для инъекций. В другом варианте осуществления изобретения, скорость электродов составляет по меньшей мере 50 мм/секунду до контакта с кожей. В еще одном варианте осуществления изобретения, скорость электрода составляет по меньшей мере 500 мм/секунду до контакта с кожей. Такой способ введения сводит к минимуму дискомфорт, ощущаемый индивидуумом во время проникновения электрода, и является наиболее благоприятным для поддержания согласованной пространственной взаимосвязи между множеством электродов. В отличие от электромеханических двигателей, пружинные механизмы демонстрируют более благоприятный профиль разряда, который способен придавать быструю импульсную силу электродам и игле для инъекций, что желательно для чрескожной имплантации электродов. В частности, сила, действующая путем сжатия пружины, достигает своего пика при начальном разряде. Это может оказаться благоприятным для чрескожного введения, когда высокая скорость в точке контакта с кожей является благоприятной, и из-за вязкоупругости кожной ткани, для проникновения через кожу требуется наибольшее усилие, особенно при контакте кожи с множеством электродов и/или игл для инъекций. Кроме того, пружинный механизм способен генерировать эту силу из простого, долговечного и компактного по форме устройства, которое может быть легко встроено в формате портативного устройства. Однако, недостаток пружинных механизмов состоит в том, что для приведения их в действие, они обычно требуют от пользователя значительных механических усилий, особенно для пружин с высокими силовыми константами и/или большими смещениями. Использование гибридного двигатель-пружинного механизма, как описано в настоящем изобретении, позволяет получить желаемые характеристики силы для размещения, в то же время, оно является простым в эксплуатации для пользователя. Хотя гибридный двигатель-пружинный механизм является предпочтительным вариантом осуществления изобретения, однако, в зависимости от целей применения, могут быть также использованы и другие гибридные механизмы, включающие два или более приводных механизмов, где один из них способен генерировать быстрое импульсное усилие, а другой способен запускать импульсный силовой механизм, например, насос, способный создавать в камере сжиженный газ с последующим нагнетанием сжиженного газа для сообщения импульсной силы для размещения электродов, и, если это необходимо, иглы(игл) для подкожных инъек-

ций.

В любом случае, после загрузки, желаемая глубина размещения электродов и/или введение агента конструктивно выбирается врачом или другим специалистом по введению лекарственного средства, и эти параметры вводятся в аппликатор 400. Как показано на фиг. 13В, глубина может быть выбрана с помощью кнопок 409 выбора глубины (или другого эквивалентного интерфейса, такого как тумблер или ползунковый переключатель), и результат отображается на индикаторах 408 выбора глубины инъекции (или, опять же, на другом эквивалентном интерфейсе). Доступная глубина инъекции передается пользователю посредством соответствующей маркировки аппликатора 400 и/или кассеты 100. В некоторых вариантах осуществления изобретения, любая маркировка, касающаяся глубины инъекции, расположена на кассете 100 и остается видимой для пользователя после установки в аппликатор 400. Так, например, доступная глубина инъекции может быть помечена на верхней поверхности выравнивающей панели/бокового экрана 108. Во избежание случаев, когда пользователь забывает или пренебрегает выбором глубины инъекции, предпочтительно, чтобы такое устройство не позволяло пользователю продолжить процедуру введения до тех пор, пока не будет сделан правильный выбор. Это может быть достигнуто путем введения в систему соответствующих контрольных логических схем, так, чтобы последующие элементы настройки или использования устройства были недоступны до тех пор, пока пользователь не проведет правильный выбор глубины. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда пользователю предлагается окончательно выбрать глубину инъекции, то дисплей регулятора может передавать пользователю информацию, касающуюся надлежащих способов оценки и определения индивидуальным подходящей глубины инъекции для выбранного участка введения.

Кроме того, как показано на фиг. 18А-18В, при правильной установке кассетного блока, стык 470 пружинной крышки/кассеты входит в зацепление, а также прижимается к отверстию 471 пружинной крышки и язычкам 491. Хотя большая сила пружины давит на внутреннюю кассету 103, однако, эта сила препятствует движению вперед вследствие зацепления множества опорных стоек 488 со стенками 494 внешней кассеты 102. Однако, усилие, оказываемое на 470, увеличивает расстояние между язычками 491 (что предотвращает случайное вращение стопорного кольца в процессе обработки) и тем самым позволяет вращать стопорное кольцо 114 кассеты посредством механизма привода двигателя. Вращение стопорного кольца 114 кассеты инициирует вращение опорных стоек 488. Опорные стойки 488 можно поворачивать в сторону каналов для первой глубины 490 или каналов для второй глубины 492. Длина каналов для первой глубины 490 соответствует одному из вариантов выбора глубины, а длина каналов для второй глубины 492 соответствует другому варианту, причем, одна или другая глубина выбирается пользователем с помощью кнопок 409. Так, например, длина каналов 490 может составлять в пределах 20-30 мм, а длина каналов 492 может составлять в пределах 12-20 мм. Необходимость для пользователя правильно выбрать глубину обеспечивается еще одной блокировкой. Без правильного выбора, аппликатор не может разрешить активацию/введение иглы. Таким образом, вращение стопорного кольца 114 кассеты осуществляется посредством вращения по часовой стрелке или против часовой стрелки, регулируемого аппликатором 400 в соответствии с требованиями пользователя. Требование вращательного движения серии стоек в такие каналы для размещения электродов и иглы для инъекций, если она присутствует, будет значительно снижать риск случайного разряда даже после опасных помех или отключений.

Более подробно, вращение стопорного кольца 114 кассеты передается на кассетный блок 100 посредством опорных стоек 488, которые устанавливаются после правильной вставки кассетного блока 100 в пазы на кольце привода механизма вставки 478. На фиг. 18А, пазы на кольце 478 привода механизма вставки находятся в положениях часовой стрелки 3 и 9 ч. Кольцо привода 478 механизма вставки устанавливается на кольцо механизма частичной вставки 479, которое приводится в движение приводным двигателем 482 механизма вставки. Запуск кольца механизма частичной вставки 479 приводит в действие кольцо привода механизма вставки 478, что вызывает вращение либо по часовой стрелке, либо против часовой стрелки. Сигнал 481 на кольце 480 и соответствующий датчик 483 положения механизма вставки используются для определения положения кольца 478 привода механизма вставки, а также используются для точного его возврата в положение стрелки 3 и 9 ч, когда аппликатор 400 должен быть повторно использован с другой кассетой.

Вышеуказанная реализация дает различные преимущества. Так, например, пользователь должен провести выбор глубины, прежде чем продолжить процедуру введения. При этом, пользователь должен оценить правильную глубину инъекции для выбранного места этой инъекции и подготовить это место, как указано в руководстве или инструкциях документа по использованию. Как было отмечено, механизм вставки, требующий вращательного движения для размещения, в значительной степени защищен от случайного неправильного размещения из-за падения, вибрации, поломки и т.п.

Специалистам в данной области должны быть известны различные варианты. Так, например, хотя для каждой глубины используются два канала и две опорные стойки, однако, могут быть также использованы один канал и одна опорная стойка. Различные типы двигателей и механизмов могут быть использованы для передачи вращательного движения, необходимого для поворота стоек в каналах. Также известны и другие варианты, включая использование соленоидов и т.п. Вместо использования каналов для выбора глубины может быть использовано устройство для введения, управляемое двигателем, и такая

глубина может регулироваться просто путем определения того, насколько этот двигатель способен регулировать инициацию размещения. Предпочтительно, в этом контексте, описанный гибридный механизм привода должен быть сконструирован так, чтобы механизм импульсного разряда (например, пружинный механизм) был использован для начального введения в дерму, а затем механизм привода двигателя был использован для введения электродов на нужную глубину.

Могут быть установлены одна или более блокировок, которые должны быть отключены до того, как кольцо привода механизма вставки 478 начнет вращаться, вращая опорные стойки 488 в каналах.

Во-первых, может быть установлена подсистема блокировки детектирования силы, которая требует, чтобы устройство прикладывалось к индивидууму с силой, превышающей предварительно определенную величину, прежде чем начать процедуру введения. Эта сила может быть измерена с помощью соответствующей механической или электромеханической системы, и результат такого измерения возвращается обратно в регулятор 700 и используется как блокировка, предотвращающая запуск устройства, если сила является недостаточной. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регулятор 700 способен передавать сообщение о состоянии блокировки силы пользователю посредством визуальных, осязательных или звуковых сигналов, так, чтобы состояние неадекватной силы могло быть скорректировано, и пользователь мог приступить к введению. В случае, если пользователь предпримет попытку продолжить введение в состоянии неадекватного силового контакта (например, путем нажатия кнопки запуска 407 или других кнопок запуска), то дополнительные визуальные, осязательные или звуковые сигналы могут поступать на аппликатор 400 или регулятор 700 для уведомления пользователя о том, что блокировка должна быть отключена до начала введения.

Определение силы, действующей на индивидуума, может быть осуществлено несколькими способами. В соответствии с конкретной реализацией как показано фиг. 4 и 8А-8В, выравнивающая панель/боковой экран 108 снабжены преобразователем силового контакта 128. Выравнивающая панель/боковой экран 108 могут быть механически смещены в дистальном направлении (по направлению к индивидууму) под действием одной или более пружин 126 силового контакта, четыре из которых показаны на фиг. 4. Преобразователь силового контакта 128 меняет свое положение благодаря силе, приложенной на выравнивающую панель/боковой экран 108. При этом, он также изменяет состояние электрической цепи, образованное преобразователем силового контакта 128, серией первых контактных площадок 162, серией вторых контактных площадок 164 и гибкой схемой 160. В частности, путем проверки непрерывности между одной или более контактными площадками 162 и одной или более соответствующими контактными площадками 164, можно определить, насколько далеко или близко продвигается выравнивающая панель/боковой экран 108 под действием приложенной силы, и, таким образом, определить, насколько эта сила является достаточной для правильной доставки. Состояние схемы считывается аппликатором 400 под действием контактов датчика 434 (см. фиг. 16). Если датчик указывает на достаточную силу, то блокировка силового контакта отключается, что позволяет пользователю управлять устройством.

В одном варианте такой реализации, в первой точке контакта, система может не регистрировать какую-либо конкретно приложенную силу. Во второй точке контакта, система может регистрировать, парциальное (но недостаточное) давление. В третьей точке контакта, система может зарегистрировать, что достигнут заданный уровень давления, необходимый для продолжения процедуры введения, и блокировка может быть отключена. Предпочтительно, состояние схемы силового контакта сообщается пользователю на дисплей 404 аппликатора.

Варианты должны быть понятны специалисту в данной области. Так, например, блокировка силового контакта может образовывать электрический замок, который отключается либо в регуляторе 700, либо в самом аппликаторе 400. В другом варианте, схема силового контакта может быть построена так, чтобы поступала информация о состоянии устройства на протяжении всей процедуры введения. В частности, система может включать контур обратной связи между схемой силового контакта и регулятором 700, где уменьшение силы, прикладываемой пользователем, ускоряет генерацию визуального, тактильного или звукового сигнала регулятором 700 и/или аппликатором 400, так, чтобы можно было скорректировать состояние уменьшенной силы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, контур обратной связи присутствует между схемой силового контакта и регулятором 700, так что обнаружение изменения приложенной силы побуждает систему иницировать проверку того, правильно ли электроды размещены в ткани индивидуума, например, посредством проверки импеданса или сопротивления между электродами. Если проверка пройдена, то процедура продолжается в обычном режиме. В случае, если положение электродов больше не является приемлемым, то процедура может быть прервана, и пользователь получает сообщение о состоянии устройства посредством генерации визуального, тактильного или звукового сигнала регулятором 700 и/или аппликатором 400. Этот контур обратной связи имеет особое значение при введении лекарственного средства. Благодаря мониторингу положения устройства и состояния электродов, контура обратной связи между схемой силового контакта и сопротивлением/импедансом электродов, система может обнаружить, что если электроды (и, следовательно, игла для инъекций) больше не находятся у индивидуума, то это позволяет прекращать работу системы механизма 456 привода для инъекции, и тем самым прекратить нажатие на поршень 484 резервуара и прекратить

инъекцию лекарственного средства. Хотя этот вариант осуществления изобретения наиболее легко реализовать с помощью привода для инъекции 456, управляемого двигателем, однако, могут быть реализованы и другие варианты в случае механизмов с ручным или пружинным приводом, где запуск механических блокировок может использоваться для остановки действия поршня резервуара после обнаружения состояния неисправности. Эта особенность может быть особенно подходящей для предотвращения случайного распыления вакцины против HBV в окружающую среду, когда аппликатор 400 удаляется из ткани индивидуума до завершения доставки лекарственного средства. Для лекарственных средств или терапевтических агентов, которые потенциально опасны для пользователя или окружающей среды, такая конструкция позволяет избежать непреднамеренных выбросов/воздействий.

Поскольку количество дозы, доставляемой индивидууму в ситуации с частичной дозой, может играть важную роль в информировании врача-клинициста, принимающего решение относительно дальнейшего лечения, то предпочтительно, чтобы механизм 456 привода для инъекции включал соответствующие сенсорные и контрольные функции для определения положения приводного поршня 484 для инъекции в тот момент, когда процедура инъекции была остановлена из-за обнаружения неисправного состояния или других обстоятельств, при которых необходимо остановить процедуру инъекции. Предпочтительно, это достигается путем мониторинга числа оборотов двигателя, используемого для приведения в действие поршня 484 привода для инъекции, но могут быть использованы и другие способы мониторинга положения поршня 484 привода для инъекции, включая оптические или электрические датчики. Исходя из известных размеров поршня 484 привода для инъекции, глубины введения и резервуара 101, использование соответствующих логических и контрольных схем позволяет по положению поршня привода для инъекции судить об объеме лекарственного средства, оставшегося в шприце на момент прекращения процедуры введения инъекции. Такая информация может быть передана пользователю на дисплей 712.

Помимо функции завершения процедуры инъекции в случае обнаружения состояния неисправности, использование привода двигателя 456 для инъекции может также давать информацию об обнаружении состояния неисправности или другой рабочей проблемы. В частности, включение соответствующих измерительных и логических схем для мониторинга работы цепи посредством двигателя во время процедуры инъекции может быть проведено для подтверждения того, что инъекция была введена в соответствии с определенными требованиями. Ожидаемые диапазоны для тока, потребляемого двигателем, могут быть установлены на различных этапах процедуры инъекции, включая: начальный запуск поршня 484 привода для инъекции, прежде чем он будет контактировать с блокаторм поршня 159, начальным интерфейсом между поршнем 484 привода для инъекции и блокаторм поршня 159; приведение в действие блокатора поршня 159 вперед в цилиндре резервуара 101; и завершение процедуры инъекции, после того, как блокаторм поршня 159 будет контактировать с концом цилиндра резервуара 101. Сопоставляя положение поршня 484 привода для инъекции с измеренным потреблением тока двигателем до ожидаемых значений во время каждой фазы инъекции агента, система способна выявлять возможные неисправные состояния и передавать их пользователю. Так, например, если пользователь случайно вставил резервуар 101, в котором блокаторм поршня 159 был частично приведен в действие (и, следовательно, не содержал полную предполагаемую дозу лекарственного средства), в кассету 100, то система может показать, что ожидаемое увеличение силы тока, потребляемого приводом двигателя 456 для инъекций, не происходит, если поршень 484 привода для инъекции достигает внешнего допуска для позиционирования поршня. В этом случае, система может прекратить процедуру введения и уведомить пользователя об обнаруженной неисправности. С помощью этого способа потенциально могут быть обнаружены дополнительные состояния неисправности, включая (но не ограничиваясь ими) неисправные компоненты в аппликаторе 400, поломку резервуара 101 и/или неисправную кассету 100.

Другая "блокировка" для облегчения правильного выполнения процедуры введения обеспечивается выравнивающей панелью/боковым экраном 108, которые показаны на фиг. 9С. На этой фигуре, выравнивающая панель/боковой экран 108 показаны со скошенными элементами 168 и имеющимся там отверстием 170 для скользящего перемещения защитного экрана 134. Защитный экран 134 показан на фиг. 9В, и также показаны электродные отверстия 167. Для чрескожного введения электродов и, если это необходимо, игл для инъекции, наличие соответствующей поверхности контакта с кожей облегчает размещение электродов в ткани-мишени при сохранении желаемого пространственного соотношения между множеством элементов. В частности, правильное размещение достигается наилучшим образом, если поверхность кожи перпендикулярна направлению введения. Кроме того, неправильное выравнивание электродов и иглы для инъекций можно устранить при натяжении кожи в ориентации, перпендикулярной направлению размещения. Как можно видеть, защитный экран 108 включает механические элементы, включая ребра и кромки для сцепления с кожей и для ее натяжения, перпендикулярного направлению размещения электродов. В сочетании с системой преобразования цепи силового контакта, описанной выше, которая гарантирует постоянное усилие, прикладываемое к коже, выравнивающая панель/боковой экран 108 будут гарантировать, что кожа и ее натяжение будут перпендикулярны направлению размещения электродов. Хотя в этом варианте используются механические ребристые элементы для фиксации кожи на поверхности устройства, однако, для такой фиксации может быть применено множество других

конструкций и элементов, включая использование альтернативных материалов с высоким коэффициентом трения при контакте с кожей (например, использование каучуковых вставок, клейких пластырей и т.п.) или альтернативных механических элементов, включая сформованные конструкции, разрезы и элементы зубьев пилы, способных создавать натяжение кожи.

Как можно видеть, выравнивающая панель/боковой экран 108 имеет определенную предпочтительную ориентацию. Как описано выше, пространственная и временная совместная локализация распределения лекарственного средства и приложения электрического поля являются желательными. Примечательно, что структурные свойства, присущие скелетным мышцам, определяют характерный паттерн эллипсоидального распределения внутримышечных инъекций, где главная ось эллипсоида совпадает с поперечно-полосатой структурой мышечных волокон. Поэтому, при применении для внутримышечных инъекций, желательно размещать электроды так, чтобы они давали эллипсоидальный профиль электрического поля. Для того, чтобы обеспечить правильную ориентацию электродной матрицы и результирующего профиля электрического поля относительно поперечно-полосатой структуры скелетной мышцы-мишени, использование выравнивающей панели является особенно подходящим для внутримышечного введения. Выравнивающая панель предназначена для облегчения размещения устройства так, чтобы ориентация электродной матрицы была наиболее благоприятной по отношению к поперечно-полосатым мышцам и для облегчения конечного распределения лекарственного средства после инъекции. Для инъекции в руку желательно, чтобы выравнивающая панель/боковой экран 108 оборачивались вокруг руки горизонтально, подобно повязки на руку. Аналогичная ориентация была бы желательна и для ног с защитным экраном, горизонтально обернутым вокруг ноги. Было обнаружено, что выравнивающая панель/боковой экран 108 имеют конфигурацию, позволяющую доставлять лекарственное средство пользователем с точностью >98% даже в отсутствии устных инструкций. Была показана предпочтительная ориентация, и такое конечное размещение на коже является особенно подходящим для внутримышечных инъекций, поскольку ромбовидная электродная матрица (см. матрицу дистальных концов электродов 137 на фиг. 9А, которая приблизительно соответствует форме защитного экрана 134 и ассоциированных с ним отверстий 167) затем ориентируется должным образом для обеспечения доставки лекарственного средства и инициации электропорации лекарственного средства, предпочтительно, вдоль направления поперечно-полосатой структуры мышцы. Главной особенностью является то, что при правильном выравнивании, кожа должна быть на одном уровне с границей раздела кожи, где находится отверстие, например, там, где появляется игла. Таким образом, образуется согласованная граница раздела кожи.

Когда выравнивание относительно мышцы-мишени является неправильным, дуга обычно вызывает визуально видимый зазор, например, 2-5 мм, между выравнивающей панелью/боковым экраном 108 и кожей. Визуально наблюдаемый зазор может использоваться в качестве напоминания пользователю о переориентации аппликатора 400. Аппликатор 400 может быть менее устойчивым к коже индивидуума. Элементы выравнивающей панели, в которых расстояние между краями "крыльев" элемента по меньшей мере в 1,3 раза превышает высоту элемента по вертикали, являются предпочтительными для обеспечения правильного размещения. Кроме того, в некоторых случаях конструкция элемента такова, что поверхность контакта с тканью может располагаться на одном уровне с кожей в желаемой ориентации, в то же время имеет воздушный зазор по меньшей мере 2 мм при размещении под углом 90° относительно желаемой ориентации.

Специалистам в данной области должны быть понятны различные варианты конструкции выравнивающей панели. Например, вместо дугообразной выравнивающей панели/бокового экрана 108 могут быть использованы V-образные формы. Также известны и другие варианты, ключевая особенность которых состоит в том, что устройство может быть размещено непосредственно напротив кожи в желаемой ориентации, при этом, между поверхностью раздела ткани и кожи реципиента присутствует визуально видимый зазор размером в 2 мм или более, если устройство смещено относительно поперечно-полосатых мышц-мишеней.

Как указывалось выше, в некоторых вариантах такой реализации, выравнивающая панель/боковой экран 108 ориентированы по форме электродной матрицы, поскольку ромбовидная симметрия электродной матрицы имеет определенное ассоциированное с ней распределение, и такое распределение должно находиться в заданной взаимосвязи с формой выравнивающей панели/бокового экрана 108. На фиг. 9А-9В, показаны электроды, а в частности, дистальные части 137, число которых равно четырем. Электроды расположены в виде ромбовидной матрицы, и это может означать, что они имеют симметрию второго порядка, то есть имеют двойную симметрию, то есть они могут вращаться, и в двух разных положениях выглядят одинаково. Электроды простираются в этом массиве от отверстий 167, присутствующих в защитном экране 134. Использование ромбовидной матрицы особенно полезным, поскольку оно обычно желательна для внутримышечных инъекций, как обсуждалось выше. Следует напомнить, что симметричная матрица второго порядка дает симметрично приложенное электрическое поле второго порядка. Этот тип приложенного электрического поля может иметь предпочтительное направление вдоль поперечных полос мышц, если выравнивающая панель/боковой экран 108 ориентированы должным образом. Таким образом, выравнивающая панель/боковой экран 108 и электрическое поле второго порядка имеют синергическую ориентацию, что способствует распространению лекарственного средства по направле-

нию к поперечно-полосатой мышце.

Вообще говоря, в форме ромба или в другой симметричной форме второго порядка обычно имеется большая (длинная) ось и малая (короткая) ось. Оси могут иметь заданное соотношение с предпочтительной осью выравнивающей панели/бокового экрана 108. Так, например, если предполагается, что выравнивающая панель/боковой экран 108 имеют крылья дугообразной формы, окружающие рычаг, то отрезок прямой, соединяющий центр крыльев, может быть перпендикулярен большой оси ромбовидной матрицы.

Изменения должны быть понятны специалисту в данной области. Так, например, хотя ромб является одной из возможных форм электродной матрицы, однако, другой репрезентативной формой является прямоугольник, который также имеет симметрию второго порядка. Электроды могут быть размещены в соответствующих положениях, но они могут быть перемещены в пределах заранее определенного или желаемого допуска, например, в пределах 5, 10% и т.п. Электроды могут иметь и различные другие формы, при условии, что они будут создавать вращательно-симметричное электрическое поле второго порядка.

В другом варианте, для невнутримышечных инъекций могут быть использованы симметрии другого порядка. Так, например, для кожи обычно нет предпочтительного направления распространения лекарственного средства, а поэтому для интрадермальных инъекций можно использовать даже кольцевую электродную матрицу.

Другие соображения относительно электродных матриц заключаются в следующем. Самая простая конфигурация матрицы содержит два электрода, соединенных с противоположными полюсами источника электрической энергии. Как раскрывается в патентах США 5873549 и 6041252 (которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки), три или более одновременно активных электродов, расположенных в виде многоэлементной матрицы, могут быть использованы для увеличения объема ткани-мишени и повышения однородности в распространении электрического поля в ткани-мишени. Для подачи электрического поля в ткань был разработан широкий спектр геометрических расположений электродов и схем активации. Такими электродами являются электроды, расположенные в линейной, прямоугольной, круглой или треугольной конфигурации, и способные распространять электрические поля в объеме ткани приблизительно в форме эллипсоида, кубоида, цилиндра или сфероида. Чаще всего электроды располагаются параллельно друг другу и имеют конфигурацию, подходящую для чрескожного введения в ориентации, по существу, перпендикулярной поверхности кожи. Для гарантии того, что электрическое поле будет действовать на ткань-мишень определенного объема и формы, желательно, чтобы предполагаемая пространственная взаимосвязь между каждым из электродов в матрице достигалась после чрескожного введения. В частности, следует избегать случайных изменений в межэлектродном интервале, поскольку они могут вызвать изменения величины электрических полей, распространяющихся в ткань-мишени, что может привести к негативным последствиям для безопасности и/или эффективности процедуры.

Другая блокировка включает использование внешней кассетной крышки 110. В частности, выравнивающая панель/боковой экран 108 при хранении закрывают внешней кассетной крышкой 110. Внешняя кассетная крышка 110 изготовлена так, чтобы она могла не только в целом защищать дистальный конец устройства до момента его использования, но также и сама выполняла функцию блокировки. Хотя защита дистального конца кассетного блока 100 служит для защиты иглы и электродов от окружающей среды, однако, часто встречающаяся проблема заключается в том, что пользователи часто забывают снять такие крышки. Одно из решений этой проблемы состоит в том, чтобы сделать крышку яркого цвета, который будет отличаться от цвета (цветов) других компонентов в кассете 100, и тем самым, напоминать пользователю о ее наличии и, таким образом, о необходимости ее удаления. Другая часть этого решения состоит в том, чтобы включать сигнал расширения или напоминания 190, как показано дугообразным участком рядом с прямоугольным участком, где дугообразный участок виден даже тогда, когда кассетный блок 100 расположен напротив объекта. Поскольку этот сигнал напоминания 190 является видимым, то он может служить как напоминание об удалении внешней кассетной крышки 110, даже если это напоминание о внешней кассетной крышке 110 не было видно.

Как более подробно показано на фиг. 10A-10B, внешняя кассетная крышка 110 включает наружную поверхность, дистально обращенную к объекту, и внутреннюю поверхность, обращенную лицом к выравнивающей панели/боковому экрану 108. На внутренней поверхности находится несколько крюков 176, которые входят в зацепление с соответствующей стенкой 180 выравнивающей панели/бокового экрана 108. Эти крюки удерживают внешнюю кассетную крышку 110 на месте.

Однако, если внешняя кассетная крышка 110 случайно была оставлена на месте, а аппликатор 400 прижимается к месту вставки с определенной силой, то сила выравнивающей панели/бокового экрана 108 по отношению к внешней кассетной крышке 110 может привести к "открытию" внешней кассетной крышки 110, благодаря отталкиванию от положения сцепления выравнивающей панели/бокового экрана 108. Однако на крюках 176 имеются скошенные поверхности 178, которые имеют тенденцию действовать на защитный экран 134 при приложении давления, что будет вызывать расширение крюков 176 наружу и увеличивать их удерживающее воздействие на выравнивающую панель/боковой экран 108 и пре-

дотвращать отсоединение внешней кассетной крышки 110. Кроме того, скошенная поверхность действует и дальше на защитный экран, предотвращая перемещение выравнивающей панели/бокового экрана 108 относительно защитного экрана 134. Если выравнивающая панель/боковой экран 108 не может перемещаться относительно защитного экрана 134, то блокировка обнаружения усилия не может быть отключена, так как преобразователь силового контакта 128 не может двигаться к третьей точке силового контакта, описанной выше, где обнаруживается полное давление (или, в этом случае, даже ко второй точке контакта силы). Регулятор может давать информацию о том, что происходит с регулятором. Так, например, на дисплей пользовательского интерфейса может подаваться сообщение, например, "Вам нужно снять внешнюю кассетную крышку", и то же самое вызвано нажатием кнопки запуска в отсутствии адекватного усилия.

Хотя некоторые блокировки были описаны выше, однако, в любом данном варианте осуществления изобретения может быть использовано большее или меньшее число блокировок. Так, например, для детектирования силы могут быть применены другие элементы, которые могут служить в качестве сигналов запуска блокировок. Могут быть также использованы и блокировки других типов, включая триггерные замки, защитные переключатели и т.п. Другие типы блокировок будут также понятны специалистам в данной области исходя из описания изобретения.

После того, как глубина введения будет правильно выбрана пользователем, и внешняя кассетная крышка 110 будет удалена, а собственная сила будет детектирована посредством блокировки силы, активация триггера будет вызывать вращение стопорного кольца 114 кассеты по часовой стрелке или против часовой стрелки, где направление вращения будет зависеть от глубины вставки, выбранной пользователем. Вращение вызывает перемещение опорных стоек 488 в каналы выбранной глубины, что, в свою очередь, позволяет размещать иглы и электроды. В частности, внутренняя кассета 103, задняя часть 112 кассеты, резервуар 101, внутренняя кассетная крышка 104, втулка для иглы 152, игла 105, электроды 122 и связанные с ними элементы перемещаются вперед под воздействием пружины 472 для вставки электродов/игл. В варианте осуществления изобретения, эти элементы жестко соединены друг с другом и таким образом могут двигаться вперед как отдельный элемент.

Для дополнительной минимизации риска получения пользователем травм от острых предметов, предпочтительно, чтобы кассетный блок также включал механизм нанесения покрытия на электроды и любые иглы для инъекций после их удаления из ткани реципиента. Это может быть достигнуто за счет включения защитного экрана, который будет служить кожухом для электродов и иглы для инъекции (если она присутствует) до их использования, а затем это распространяется на электроды и иглу для инъекций (если она имеется) после их размещения и удаления из ткани индивидуума. Обычно, поверхность, контактирующая с тканью, включает дистальную поверхность защитного элемента. Хотя может рассматриваться использование защитных элементов, выполненных вручную, однако, предпочтительно, чтобы устройство включало механизм для автоматического расширения защитного элемента на электроды и, кроме того, для включения функции блокировки в целях сохранения защитного элемента экрана в расширенном состоянии после его удаления из ткани реципиента. Примером служит (являются) элемент экрана, который является скользящим и входит в зацепление с внешним корпусом кассеты и функционально связан с источником накопленной энергии, таким как пружина, которая сдвигает экран вперед при извлечении электродов из ткани реципиента. Альтернативно, этот механизм может содержаться внутри аппликатора и может быть выполнен так, чтобы он мог изменять шаг размещения электрода, и тем самым, оттягивал электроды и любые ассоциированные с ними иглы для инъекций за пределы поверхности, контактирующей с тканью. Это может быть достигнуто с помощью простых электромеханических механизмов для поступательного движения, таких как двигатели или соленоиды.

В конкретном варианте такой реализации и как показано на фиг. 4, а также на фиг. 11А и 11С, защитный экран 134 выполнен так, чтобы он мог оставаться в положении, при котором происходит доставка лекарственного средства, но перемещать вперед внутреннюю кассету 103 и другие связанные с ней компоненты во время доставки лекарственного средства, что будет приводить к сжатию пружины 138 защитного экрана. Эта сжатая пружина защитного экрана 138 будет затем ослабляться по мере удаления аппликатора из организма индивидуума, так как защитный экран 134 вынужден двигаться вперед, если аппликатор 400 удаляется из организма индивидуума, закрывая иглу и электроды и защищая индивидуума и т.п. от соприкосновения с непокрытыми острыми предметами. Примечательно, что эта функция также предотвращает визуализацию острых предметов во время их удаления, что может уберечь индивидуумов от испытывающего ими беспокойства, связанное с этими иглами.

В противном случае, хотя ослабленная пружина способна к повторному сжатию, а, в частности, если бы пользователь перемещал защитный экран 134 в проксимальном направлении, однако, это может быть предотвращено действием опорного рычага 132 защитного экрана, который вмонтирован во внутреннюю часть внешней кассеты 102 и выполняют функцию храповика, когда защитный экран 134 движется вперед. В частности, как показано на фиг. 11А и 11С, опорные рычаги 132 защитного экрана перемещаются по различным последовательно расположенным опорным стенкам и могут легко это делать, когда защитный экран 134 перемещается дистально. Однако, в проксимальном направлении, перемещение защитного экрана 134 предотвращается благодаря опорным рычагам 132 защитного экрана, которые

упираются в опорные стенки в этом направлении по механизму храповика и не допускают прохода.

Первоначальная серия опорных стенок 188 предотвращает проксимальное перемещение защитного экрана 134 до использования кассетного блока 100. Серия первых опорных стенок 184 для первой выбранной глубины предотвращает проксимальное перемещение защитного экрана 134 после разряда на первой выбранной глубине. Серия вторых опорных стенок 184 для второй выбранной глубины предотвращает проксимальное перемещение защитного экрана 134 после разряда на второй выбранной глубине. Защитный экран 134 предотвращает полное удаление из кассетного блока 100 благодаря действию опорных крюков 182 защитного экрана, действующих на внутреннюю кассету 103.

Эти варианты должны быть понятны специалисту в данной области. Так, например, в одном варианте осуществления изобретения, опорные рычаги 132 защитного экрана могут быть снабжены штампованными опорными металлическими плевами, которые взаимодействуют с внешней кассетой 102. В некоторых вариантах осуществления изобретения, элементы опорного рычага непосредственно встроены как пластиковые элементы, полученные путем литьевого формования, во внешнюю кассетную крышку 106 и/или в выравнивающую панель/боковой экран 108. Конкретный материал должен быть выбран так, чтобы он обеспечивал достаточную жесткость и поддержку удлиненных электродов, сохраняя при этом достаточную эластичность, чтобы предотвратить разрушение компонента под нагрузкой. При выборе материала следует также учитывать предполагаемый метод стерилизации электродной матрицы (например, посредством гамма-излучения, стерилизации паром, обработки этиленоксидом или электронного излучения) для гарантии того, что такие элементы будут сохранять адекватные свойства материала после стерилизации. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, элементы, сконструированные соответствующим образом, должны удерживать защитный экран 134 от проксимального перемещения в случае приложения силы по меньшей мере 5 Н, а более предпочтительно, по меньшей мере 15 Н. Могут быть также использованы и другие способы обеспечения функции храповика для предотвращения проксимального перемещения защитного экрана, включая зубчатую рейку, вставленную в защитный экран 134, и соответствующий элемент храповика, вставленный во внешнюю кассетную крышку 106.

Как показано на фиг. 4, каждый удлиненный электрод 122 в матрице содержит дистальную часть 137 и проксимальную часть 135, которые находятся в кондуктивной связи. Дистальная часть сконструирована так, чтобы она могла проникать в ткань и распространять электрическое поле в ткани, а проксимальная часть сконструирована так, чтобы она имела проводящую контактную область, способную надежно осуществлять кондуктивную связь с электрическими соединениями, содержащимися в аппликаторе с подходящим источником электрической энергии. Источник электрической энергии может, из-за временного изменения мощности, приложенной к отдельным электродам, вызывать изменяющееся в пространстве и времени электрическое поле в организме индивидуума, которое обычно ограничено объемом вокруг области распределения лекарственного средства, и то же самое может быть использовано в терапии путем электропорации.

Соответствующие характеристики электродов включают форму, диаметр, профиль наконечника, длину, состав материала и проводимость, технические параметры которых выбирают в зависимости от предполагаемой цели применения. Чаще всего, электроды содержат электропроводящие удлиненные стержни с криволинейным диаметром поперечного сечения 0,1-1,5 мм. Электроды могут быть сплошными или полыми. Чаще всего полые электроды содержат одно или более отверстий и оперативное соединение с резервуаром для жидкости, что позволяет вводить представляющий интерес агент или другие сопутствующие лекарственные средства, включая анестетики, поверхностно-активные вещества, белки, адъюванты или стимуляторы, из самого электрода. В зависимости от целей применения, соответствующими металлическими электродными материалами являются, но не ограничиваются ими: титан, золото, серебро, алюминий, медь, тантал, вольфрам, молибден, нержавеющая сталь, MP35N и их сплавы. Электроды также могут состоять из электропроводящей керамики или пластмасс. Для минимизации нежелательных электрохимических реакций на границе раздела электрода и ткани часто желательно, чтобы один или более электродов были покрыты проводящим материалом, обеспечивающим улучшенную электрохимическую стабильность по сравнению с самим материалом электрода. Такие материалы для покрытия включают, но не ограничиваются ими: платину, иридий, палладий, осмий, золото, серебро, титан и их сплавы.

Как описано выше, наконечник дистальной части выполнен так, чтобы он мог проникать в ткань. Общие профили наконечника включают, но не ограничиваются ими: троакар, скос, конус, лезвие, пику и конус с уклоном. Для чрескожного размещения электродов, предпочтительными являются профили наконечника с одной или более режущими кромками. В некоторых случаях, когда профиль проникающего наконечника может быть нежелательным для создания требуемых электрических полей, наконечник может состоять из непроводящего материала, находящегося на дистальном наконечнике электрода, либо проникающий наконечник может быть покрыт адгезивным покрытием или прокладочным слоем, состоящим из биосовместимого электроизоляционного материала, такого как полимер п-ксилилена, полиолефин, поливинилхлорид, полиуретан, полиэфир, полиимид, силиконовый каучук, термопластичный эластомер/каучук, этилентетрафторэтилен, фторированный этиленпропилен и/или перфторалкоксипластик.

Рядом с проникающим наконечником находятся одна или более проводящих областей, имеющих

конфигурацию, подходящую для распространения электрических полей в ткани. Для ограничения распространения электрических полей в область ткани-мишени, обычно, а особенно для подкожного и внутримышечного введения, по меньшей мере часть длины электрода, имеющего конфигурацию, подходящую для проникновения в ткань, покрывают адгезивным покрытием или прокладочным слоем, состоящим из биосовместимого электроизоляционного материала, такого как полимер п-ксилилена, полиолефин, поливинилхлорид, полиуретан, полиэфир, полиимид, силиконовый каучук, термопластичный эластомер/каучук, этилентетрафторэтилен, фторированный этиленпропилен и/или перфторалкоксопластик. Таким образом, электроды могут быть сконструированы так, чтобы они активировались только на определенной глубине в ткани.

В целом, количество электродов и их межэлектродное расстояние, а также глубина проникновения электродов и длина их проводящей области определяют объем ткани, на которую подают электрические поля. Эти параметры выбирают исходя из конкретных целей процедуры введения, включая участок ткани-мишени, объем, дозу и вязкость доставляемого агента, а также изменение толщины кожи и подкожной ткани у предполагаемой группы реципиентов. Обычно, матрицы для интрадермального введения человеку-реципиенту, содержат 2-16 электродов диаметром 0,2-0,7 мм, с расстоянием между электродами 2-8 мм, глубиной проникновения электрода 0,5-4 мм и проводящей длиной 0,5-4 мм. Обычно, матрицы для подкожного введения человеку-реципиенту, содержат 2-8 электродов диаметром 0,3-0,8 мм, с расстоянием между электродами 4-10 мм, глубиной проникновения электрода 5-15 мм и проводящей длиной 2-8 мм. Обычно, матрицы для внутримышечного введения человеку-реципиенту, содержат 2-8 электродов диаметром 0,3-1,2 мм, с расстоянием между электродами 4-12 мм, глубиной проникновения электрода 10-60 мм и проводящей длиной 2-20 мм.

Во избежание нежелательной визуализации и воздействия на электроды во время использования устройства, кассетный блок 100 предпочтительно имеет такую конфигурацию, при которой электроды 122 углубляются вовнутрь устройства до их введения в ткань реципиента. Чаще всего, это достигается за счет того, что внешняя конструкция корпуса 102 может скользить и входить в зацепление с крепежной опорой электрода, которая, в одном варианте осуществления изобретения, содержит внутреннюю кассету 103, имеющую сделанные там углубления, в которых расположены электроды. Электроды, перед их использованием, утоплены во внешнем корпусе 102. Во время использования, скользящее зацепление крепежной конструкции электрода, например, внутренней кассеты 103 с внешним корпусом позволяет электродам 122 скользить вперед относительно дистального наконечника внешнего корпуса 102, и размещать электроды 122 во внешнем корпусе 102. Длина скользящего зацепления между монтажной конструкцией электрода и внешним корпусом соответствует желаемой максимальной глубине проникновения электрода для данного применения.

Как видно на фиг. 4, электроды 122 имеют проксимальную часть 135 и дистальную часть 137. Проксимальная часть отделена от дистальной части плечом или изгибом 139. Плечо или изгиб 139 скреплены между собой и между внутренней кассетной крышкой 104 и внутренней кассетой 103. Плечо или изгиб 139 выполняют ряд функций. Во-первых, хотя электроды на дистальном конце кассетного блока 100 необходимы для формирования матрицы определенного размера и формы, как описано выше, однако, установка электродов 122 в виде матрицы нужного размера и формы на проксимальном конце кассетного блока 100 нецелесообразна из-за наличия резервуара 101. Другими словами, электроды 122 должны изгибаться "на далеком расстоянии", чтобы освободить место для резервуара 101. Кроме того, наличие изгиба, особенно когда изгиб является зафиксированным на месте трения между внутренней кассетой 103 и внутренней кассетной крышкой 104, обеспечивает поверхность для стыка электродов 122, если сила введения иглы и электродов сдвигается в дистальном направлении, когда электроды 122 взаимодействуют с тканью во время их размещения. Изгиб может быть устойчивым к осевым поворотам, что выгодно тем, что электроды не обнаруживают значительного крутящего движения и вращаются вдали от своих электрических контактных площадок 130 (как описано ниже). Кроме того, в отличие от методов предшествующего уровня техники, где множество электродов соединены с аксиально разделенными коаксиальными кольцами, требующими различной конфигурации для каждого электрода, настоящая система позволяет использовать общий тип электрода для всех четырех электродов.

Системы и способы согласно принципам настоящего изобретения обеспечивают распространение электрического поля в коже, в подкожной ткани и/или в скелетных мышцах реципиента, что облегчает внутриклеточную доставку вакцины против HBV в указанную ткань реципиента. В этом аспекте, устройство включает два или более удлиненных электродов 122, расположенных в заданной пространственной взаимосвязи и имеющих конфигурацию, обеспечивающую размещение этих электродов в ткани-мишени, в которую должен быть введен или в которой должен быть распределен представляющий интерес агент. Желаемое усиление активности агента зависит от достижения совместной локализации участка распределения агента с распространением электрических полей, магнитуа которых является достаточной для индуцирования желаемых физиологических эффектов. Поэтому желательно, чтобы в устройстве достигалось согласованное размещение электрода на заданную глубину и с определенным межэлектродным расстоянием. В частности, это будет гарантировать, что электрические поля будут распространяться в нужном участке ткани, поскольку магнитуа электрических полей, распространяющихся в ткани, зависит

от расстояния между электродами, и от безопасной и эффективной напряженности электрического поля. Тем не менее, изменение толщины, плотности и состава кожи и подкожной ткани между участками данного реципиента и между группами реципиентов может приводить к значительному изменению характеристик размещения электрода. Так, например, у реципиентов с повышенной плотностью кожи, будет наблюдаться повышенная чувствительность к искажению электрода, и/или глубина проникновения будет недостаточной, что может негативно повлиять на совместную локализацию в участке распределения агента.

Системы и способы согласно принципам настоящего изобретения также способствуют согласованному чрескожному введению электродных матриц, содержащих 2-16 электродов диаметром 0,2-1,3 мм с межэлектродным расстоянием 2-12 мм и глубиной проникновения электрода 0,5-60 мм, реципиентам с кожей разной толщины, состава и состояния. Для обеспечения возможности чрескожного введения, электроды, проникающие в ткань, чаще всего имеют удлиненную форму и имеют конфигурацию с наконечником, проникающим в ткань, а также областью контакта с тканью в дистальной части и областью электрического контакта в проксимальной части. Принимая во внимание удлиненную конфигурацию электродов, они подвержены искривлению, изгибу и/или гофрированию (называемые общим термином "искажение"), когда на них влияют силы сжатия, возникающие во время чрескожного введения реципиенту. Такие искажения во время введения электрода нежелательны, так как они могут привести к неправильному введению электрода, характеризующемуся недостаточной глубиной проникновения и/или чрезмерным изменением межэлектродного расстояния. Следует отметить, что у людей и животных наблюдаются значительные внутривидовые и межвидовые различия в толщине, составе и состоянии кожи, любое из которых может оказывать существенное влияние на силы, которые электроды испытывают во время чрескожного введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройства для чрескожного введения удлиненных электродов сконструированы так, чтобы они противостояли силам, возникающим при самых жестких условиях введения электродов, которые наблюдаются у группы реципиентов, которым вводят эти электроды. Возникновение искажения электрода может быть частично устранено выбором материала электрода, а также уменьшением длины и увеличением диаметра электродов в матрице. Тем не менее, выбор материала может быть ограничен из-за проблем с производительностью, стоимостью, технологичностью и биосовместимостью. Кроме того, электроды уменьшенной длины могут препятствовать адекватному охвату целевой группы индивидуумов с отличающейся толщиной ткани, тогда как электроды большего диаметра ассоциируются с повышенным дискомфортом и травмой ткани. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам и устройствам для облегчения чрескожного введения электродов независимо от этих параметров.

В первом варианте осуществления изобретения, кассетный субблок, содержащий электродную матрицу, включает один или более динамических опорных элементов, находящихся в физическом контакте с одним из электродов во время введения в ткань, и имеет конфигурацию, позволяющую ограничивать перемещение электродов перпендикулярно направлению введения и поддерживать желаемую пространственную взаимосвязь между электродами. Так, например, на фиг. 12 показан опорный элемент 124 электрода, в котором имеются отверстия 192 для электродов и отверстие 194 для прохода иглы. Тенденция удлиненных электродов к деформации или изгибу под нагрузкой усугубляется любыми искривлениями, эксцентриситетом или изгибом электродов, которые могут возникать во время изготовления или сборки. Таким образом, предпочтительно использовать такое устройство, как опорный элемент 124 электрода для фиксации электрода в целях предотвращения или устранения любых искривлений, эксцентриситета или изгиба электродов, которые могут возникать в состоянии покоя, и в целях предотвращения нежелательного перпендикулярного движения электрода после нагрузки, которая возникает в процессе его встраивания в ткань.

В контексте раскрытия изобретения, динамический опорный элемент определяется как структурный элемент, который обеспечивает скользящее сцепление с удлиненными электродами во время введения в ткань реципиента, и который имеет конфигурацию, позволяющую изменять положение, размер и/или конформацию во время вставки электрода, для поддержания желаемой пространственной взаимосвязи электродов по мере их размещения в ткань-мишень на определенную глубину. Поскольку электроды подвергаются наибольшим нагрузкам при первоначальном контакте с кожей, то на сцепление динамического опорного элемента с электродами, составляющими матрицу, предпочтительно воздействовать до первоначального контакта с тканью реципиента и продолжать поддерживать эти электроды по мере их размещения на полную глубину проникновения. Также желательно, чтобы динамический опорный элемент был сконструирован так, чтобы он поддерживал эти электроды и иглу для инъекции при минимальных потерях силы проникновения электродов из-за трения.

Хотя основанная функция динамического опорного элемента заключается в поддержании желаемой пространственной взаимосвязи множества электродов в матрице по отношению друг к другу и к игле для инъекции, однако, также желательно, чтобы конструкция динамического опорного элемента включала элементы, способные стабилизировать эту матрицу как единое целое. Это предпочтительно достигается путем создания дополнительных структурных опорных элементов, которые ограничивают боковое перемещение опорного звена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти опорные элементы

встроены в кожух, защищающий от острых предметов, который также служит для защиты пользователя от случайного воздействия электродов и/или иглы для инъекций. Ниже раскрыты различные варианты динамических опорных элементов согласно изобретению.

Один из вариантов раскрытия изобретения, описанный выше как опорный элемент 124 электрода, включает использование плоской опорной конструкции 124, расположенной перпендикулярно по отношению к электродам удлиненной формы. Была создана плоская опорная конструкция с одним или более отверстиями 192, которые соответствуют положениям указанных электродов в их заданной пространственной взаимосвязи. Размер, форма и положение отверстий позволяют опорной конструкции плавно скользить вдоль удлиненных электродов в пределах матрицы при ограничении нежелательного движения перпендикулярно направлению размещения электродов. Обычно, отверстия могут представлять собой дыры или прорези 192 в плоской структуре с достаточным зазором для электрода (по меньшей мере на 10% больше, чем наибольшее поперечное сечение электрода, включая любые покрытия или другие адгезивные материалы). Однако, если для конкретных электродов требуется более существенная поддержка, то одно или более отверстий могут содержать трубчатые структуры 196, расположенные перпендикулярно к плоской опорной конструкции. Отверстия, содержащие такие трубчатые структуры, увеличивают площадь поверхности, контактирующей с электродом, и, таким образом, улучшают опору для удлиненных электродов. Плоская опорная конструкция может быть изготовлена из любого материала с подходящими структурными характеристиками, включая металлические, полимерные, керамические или композиционные материалы, и может быть изготовлена путем формования, механической обработки, литья под давлением или другими способами. Во избежание нежелательных электрических взаимодействий с электродами, предпочтительно, чтобы поверхность раздела между электродами и плоской опорной конструкцией не была электропроводящей. Материал и способ изготовления также следует выбирать так, чтобы можно было минимизировать величину трения на границе раздела между электродами и динамическим опорным элементом. Учитывая ряд факторов, включая низкую стоимость, простоту изготовления и благоприятные электрические свойства, опорную конструкцию электрода обычно изготавливают из термопластика, такого как поликарбонат, полистирол, полипропилен, акрил или полиэтилен. Конкретный материал должен быть выбран так, чтобы он имел жесткость, достаточную для поддержания удлиненных электродов при сохранении достаточной эластичности в целях предотвращения разрушения компонента под нагрузкой. При выборе материала необходимо также учитывать предполагаемый способ стерилизации электродной матрицы (например, посредством гамма-излучения, стерилизации паром, обработки этиленоксидом или электронным облучением) для гарантии того, что динамический опорный элемент будет совместимым. Конкретные размеры и конструкция опорного элемента зависят от свойств выбранного материала. Тем не менее, желательно свести к минимуму размеры опорной конструкции так, чтобы она чрезмерно не ограничивала расстояние между размещаемыми электродами или не оказывала негативного влияния на другие функциональные свойства устройства. Обычно, жесткие плоские конструкции имеют достаточную толщину 0,5-2 мм.

Еще один вариант, относящийся к динамическому опорному элементу, представляет собой использование пружины сжатия с отверстиями для размещения электродов и сдерживания их бокового смещения. Пружина сжатия может быть изготовлена из металлических, полимерных или эластомерных материалов и может быть изготовлена путем формования, механической обработки, литья под давлением или другими способами. В состоянии покоя, пружина не сжимается или минимально сжимается под действием электродов, вставленных в отверстия по всей длине пружины. По мере размещения электродов, пружина сжимается в направлении размещения, при этом, отверстия обеспечивают скользящее движение электродов перпендикулярно виткам пружины. Этот вариант осуществления изобретения является особенно подходящим в сочетании с экраном или оболочкой, используемыми для размещения проникающих электродов/игл после их удаления из участка ткани. В этих вариантах осуществления изобретения, сила, сообщаемая пружине при перемещении электродов вперед, может использоваться для помещения оболочки или экрана над электродами при удалении устройства из ткани.

В способе реализации, проиллюстрированном на фиг. 4, пружина защитного экрана 138 может быть использована для частичной поддержки опоры 124 для электрода, а, в частности, радиус пружины может быть выбран так, чтобы он соответствовал (или был немного больше) радиуса стенки 198 опоры 124 для электрода. Таким образом, опора 124 для электрода может быть вставлена в середину пружины защитного экрана 138 во время использования. Опора 124 для электрода может затем скользить во внутренней части защитного экрана 134. При размещении в центре пружины, опора 124 для электрода обычно сохраняет положение в центре пружины, что обеспечивает нужную "точку посередине" для опоры электродов, то есть приблизительно посередине между их точкой опоры на внутренней кассетной крышке 104 и точкой их проникновения на границе раздела тканей.

Могут быть использованы и другие опоры для электродов на основе пружин. Так, например, сконструированная пружина сжатия расположена в области электродов, что обеспечивает адаптивную опору для электрода. Сконструированные пружины сжатия могут иметь форму и пропорции, точно соответствующие относительным положениям электродов, что позволяет ограничить их боковое движение. Необязательный смещающий элемент может быть расположен вместе со сконструированной пружинной

сжатия и может служить для смещения электродов наружу по отношению к сконструированной пружине сжатия. Сконструированные пружины сжатия могут быть изготовлены из металлических, полимерных или эластомерных материалов и могут быть изготовлены путем формования, механической обработки, литья под давлением или другими способами. Смещающий элемент может быть изготовлен из металлических, полимерных или эластомерных материалов и может быть изготовлен путем формования, механической обработки, литья под давлением или другими способами.

Также рассматриваются опоры для электродов, сконструированных на основе других механизмов, например, телескопические трубки. Телескопические трубки служат для поддержки электродов при их введении индивидууму. Размер телескопических трубок может быть рассчитан на свободное перемещение относительно друг друга или может быть рассчитан на перемещение только при приложении к ним осевого усилия.

Рассматриваются также и другие опорные конструкции, например опорные конструкции на основе подвижных, гибких или вращающихся опорных элементов. Боковые опорные элементы могут прикрепляться к электродам с помощью, но необязательно, шарнирных элементов. Боковые опорные элементы могут быть сконструированы как единое целое с конструкцией, в которой расположены электроды, или могут представлять собой отдельные компоненты, прикрепленные обычными способами (путем защелкивания, сварки, склеивания, крепежа и т.п.).

Другим вариантом осуществления изобретения является использование сжимаемого матричного материала, в который встроены электроды. По мере размещения электродов, материал сжимается в направлении размещения, обеспечивая боковую поддержку вдоль направления перемещения. Примерами сжимаемых матричных материалов являются целлюлоза, пенообразные пластики или каучуковые полимеры, такие как пластики с микропорами, пенообразный силикон или пенообразный полихлоропрен или матрицы на основе углеродной пены. Поскольку эти материалы предназначены для контактирования с электродами и/или иглой для инъекции (если она присутствует), то такие материалы должны быть выбраны так, чтобы они были совместимы с непрямым контактом с тканями.

Таким образом, описанные выше структуры поддерживают чрескожное размещение множества удлиненных электродов на глубине ткани до 60 мм, сохраняя при этом желаемую пространственную взаимосвязь между множеством электродов и, в конкретных вариантах осуществления изобретения, отверстием иглы для подкожных инъекций. Такие опорные элементы сцеплены с множеством удлиненных электродов во время чрескожного введения и ограничивают отклонение электродов в одном или более направлениях, перпендикулярных их удлиненной ориентации. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способам и устройству для нанесения биосовместимых маслянистых соединений на поверхность множества электродов в целях уменьшения приложенной силы, необходимой для достижения согласованного чрескожного размещения множества удлиненных электродов на глубину до 60 мм. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, биосовместимые силиконовые соединения, такие как Dow Corning 360 Medical Fluid или Dow Corning MDX4-4159, могут быть нанесены обычным распылением или нанесением путем погружения на множество электродов, составляющих матрицу, для улучшения характеристик вставки электродов. Конкретный выбор покрытия и условий нанесения, таких как способ и толщина покрытия, зависит от количества, размера, состава и конфигурации наконечника электродов, а также от ткани-мишени, в которой размещены эти электроды.

Как показано на фиг. 4 и 7А-7В, проксимальные части 135 электродов 122 могут быть расположены на внешней стороне внутренней кассеты 103 кассетного блока 100 (фиг. 7В). Таким образом, если внутренняя кассета 103 расположена так, чтобы она скользила внутри внешней кассеты 102 (фиг. 7А), то проксимальные части 135 контактируют с соответствующими электродными контактами 130, а в частности, с внутренними частями 133 внешней кассеты электродных контактов 130, и эти внутренние части 133 имеют конфигурацию, обеспечивающую электрическую связь с проксимальными частями 135. Благодаря длине проксимальных частей 135 и длине внутренних частей 133 внешней кассеты, электрическая связь может осуществляться в нескольких местах вдоль их непрерывной границы раздела, независимо от продольного расположения внутренней кассеты относительно внешней кассеты. Электродные контакты 130 также включают внешние контакты 131 внешней кассеты, имеющей конфигурацию, обеспечивающую электрическую связь с соответствующими соединениями 496 на аппликаторе 400 (см. фиг. 18С). Электродные контакты 130 состоят из проводящего материала, достаточного для передачи электрического сигнала. В некоторых вариантах осуществления изобретения, выбор конструкции и материала гарантирует, что такой контакт будет обеспечивать адекватное сцепление и будет давать электропроводящую границу раздела с соответствующим электродом в пределах ожидаемых производственных изменений в положении электрода и контакта, не препятствуя или не мешая прямому перемещению электродов 122, смонтированных на внутренней кассете 103. Такая конструкция также должна обеспечивать постоянное сцепление при воздействии ожидаемых условий хранения в течение указанного срока хранения продукта. В определенном варианте осуществления изобретения, электрические контакты 130 изготовлены из штампованного или сформованного металла подходящего состава для облегчения взаимодействия с электродом, и могут иметь покрытия, такие как золото или медь, для обеспечения целостности электрических контактов и предотвращения коррозии. Помимо гарантии того, что электрический контакт с элек-

тродами может поддерживаться в нескольких местах вдоль их непрерывной границы раздела, включение электродных контактов во внешнюю кассету 102 в этой конфигурации гарантирует, что любой износ из-за скользящего взаимодействия между электродами 122 и электродными контактами 130 будет наблюдаться в кассете 100, предназначенной для одноразового использования, что тем самым обеспечивает устойчивую границу раздела между внешними контактами 131 кассеты и электрическими контактами 496 аппликатора, и сводит к минимуму потенциальный механический износ электродных соединений 496 аппликатора, предназначенных для многократного использования. Преимущество этой конфигурации заключается в продлении срока годности аппликатора для многократного применения.

Далее следует описание остальных частей аппликатора 400. Такими частями обычно являются части, которые не зависят от работы с кассетным блоком 100. Как показано на фиг. 13А, аппликатор 400 включает рычаг 402 и многожильный кабель 406, предназначенный для передачи электрических сигналов и сигналов управления, а также электрических сигналов, которые должны быть поданы на ткань. Кабель 406 обычно заканчивается в разъеме с соответствующим контактом соединителя в регуляторе 700. Аппликатор 400 дополнительно включает пользовательский интерфейс 404, в котором пользователь может просматривать аспекты процедуры и может направлять аппликатор на выполнение различных функций, а в частности, выбор глубины. Аппликатор 400 дополнительно включает кнопку запуска 407 процедуры, которую индивидуум нажимает для инициации процедуры.

Кроме того, как показано на фиг. 13В, аппликатор 400 включает в себя таймер 410 обратного отсчета времени процедуры, который информирует пользователя об оставшейся продолжительности процедуры и также указывает пользователю на то, что он не должен удалять аппликатор 400 до тех пор, пока показания таймера времени обратного отсчета не дойдут до нуля. Индикатор мощности 418 предназначен для указания удовлетворительного и подключенного к питанию соединения с регулятором 700. Индикатор 414 ошибки процедуры предназначен для информирования пользователя об ошибке, например, если одна из описанных выше блокировок не была отключена. Индикатор 412 участка размещения предназначен для информирования пользователя о том, что, если на ткань было подано нужное давление, то это позволяет начать процедуру.

На фиг. 14 показан ряд конструктивных компонентов аппликатора 400, включая разъем 426 (не масштабирован) для соединения с регулятором 700, верхний корпус 420, боковые корпуса 422 и 424 и внутреннюю защитную оболочку 432. Передняя крышка 430 представлена вместе с торцевой крышкой 428. Также представлены различные электромеханические субблоки 450, некоторые из которых были описаны выше.

На фиг. 15 представлено более детальное изображение аппликатора 400, где показаны контакты 434 датчика давления кассеты и субблоки 452, соответствующие функциям загрузки кассеты, введения электрода и инъекции, а также соответствующие датчики.

На фиг. 16 представлено более детальное изображение группы субблоков 452, включающих субблоки 454 приводов для загрузки и субблок 456 для загрузки кассеты. Работа субблоков была описана выше.

На фиг. 17А представлено более детальное изображение субблока 454 привода для загрузки, общий принцип работы которого был описан выше. В этой связи следует отметить, что загрузка иницируется путем передачи сигнала на кассетный блок 100, и что обнаружение сигнала приводит к запуску системы переключателем 464. Субблок привода для загрузки смонтирован на корпусе аппликатора с помощью кронштейнов 466 и 468. Действие двигателя 444 передается на узел шестерни 448 приводным валом 462 двигателя.

На фиг. 17В представлено более детальное изображение узла 456 привода для вставки/инъекции. Многие из этих компонентов были описаны выше. В этой связи следует отметить, что рабочие компоненты прикреплены к корпусу аппликатора с помощью монтажного кронштейна 476. После установки электродов 122 и иглы 105, поршень иглы 105 опускается под действием поршня 484 привода для инъекций, что приводит к выталкиванию лекарственного средства из отверстия иглы. Поршень привода для инъекций приводится в действие двигателем привода для инъекций и узлом передачи 486.

Обычно, поршень привода для инъекций, приводимый в действие узлом 486 привода для инъекций, движется вперед до точки, в которой он больше не может двигаться вперед, то есть дистально, что указывает на то, что он достиг конца каждого шага. На это обычно указывает то, что ток, используемый в приводном двигателе 486 для инъекций, существенно увеличивается, что, в свою очередь, указывает на то, что поршень резервуара достиг конца резервуара и что инъекция завершена. Однако, в некоторых случаях, число оборотов двигателя может быть использовано для определения количества доставленного лекарственного средства. Такая функция может быть использована для подтверждения нужной дозы лекарственного средства или для уведомления пользователя в том случае, когда объем доставки не соответствует ожидаемому общему количеству, например, когда ожидается полный объем резервуара 101 для инъекции, но, основываясь на положении стержня поршня, этот резервуар не был опустошен. Такие ситуации могут возникнуть в том случае, когда пользователь не смог прижать аппликатор 400 к телу индивидуума до завершения процедуры, например, до тех пор, пока показания таймера обратного отсчета не достигли нуля. Как было отмечено выше, в течение промежуточного периода времени проведения про-

цедуры, когда сила, приложенная к индивидууму, больше не определяется, то может быть проведена проверка импеданса, чтобы определить, находятся ли электроды внутри индивидуума. Если это не так, то можно предположить, что аппликатор был преждевременно удален, и на двигатель 486 привода для инъекций может быть отправлен сигнал о прекращении инъекции и об ограничении количества лекарственного средства, выбрасываемого за пределы организма индивидуума.

На фиг. 19 показана система/блок регуляторов 700, включающие регулятор/генератор 750 электрического поля, рычаг 702 и держатель 706 аппликатора. Регулятор может иметь конфигурацию как для настольного, так и для переносного применения. В случае конфигурации для переносного применения желательно, чтобы это устройство включало бункер 704 для хранения. Детали регулятора в конфигурации для переносного применения представлены на фиг. 20A-20D, включая фиксаторы колес для защиты узла регулятора от перемещения в рабочем положении, лоток 710 для размещения расходных материалов, включая материалы для подготовки индивидуума, резервуары/флаконы/шприцы и т.п. Соединительный порт 708 аппликатора показан в виде соединения аппликатора 400 с блоком 700 регулятора. Дисплей 712 отображает состояние процедуры введения, а в частности, подключение к IFU.

Кнопка 714 извлечения кассеты предусмотрена для выемки кассетного блока 100 из аппликатора 400. Кнопки 716 навигации по меню позволяют осуществлять навигацию и манипуляцию компонентов, как видно на дисплее 712. Кнопка 718 отключения звука предназначена для отключения звука предупреждений или других звуковых индикаторов, если это необходимо. Кнопка питания 722 предназначена для подачи питания на устройство, и эта же кнопка включается в том случае, когда был включен переключатель 726 питания от сети (фиг. 20D).

Дисплей также включает индикатор батареи 720, который обеспечивает индикацию уровня заряда батареи, где предусмотрена система резервирования батареи. Такая система резервного питания от батареи может быть включена в регулятор/генератор 750 для адаптации к ситуациям, при которых потеря мощности блокирует подачу энергии на устройство от основного источника питания. Такая система может также использоваться в качестве резерва, когда процедура была запущена источником питания от сети, но, при этом, произошла его потеря. В этом случае, логическая схема и схема управления реализуются так, чтобы это обеспечивало практически плавный переход от питания от сети к питанию от батареи, чтобы можно было завершить процедуру с использованием резервной батареи. Желательно, чтобы регулятор включал схему контроля батареи, которая способна контролировать, достаточно ли заряжена батарея для завершения процедуры после потери питания от сети. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регулятор также включает дисплей для уведомления пользователя о том, что заряд батареи является недостаточным для завершения процедуры в случае отсутствия питания от сети.

Как показано на фиг. 20D, где проиллюстрирован вид сзади регулятора 750, такой регулятор может включать USB-порт 724, переключатель 726 питания от сети и источник питания от сети 728.

Как показано на фиг. 21, в одном способе применения, проиллюстрированном на блок-схеме 800, регулятор/генератор 750 подключают к сети и его программа автоматически запускается (стадия 802). Затем подключают аппликатор (стадия 804), и информация или инструкция для выполнения этого действия могут отображаться на экране 712 дисплея пользователя, если аппликатор не был подключен. Система может выполнять самотестирование (стадия 806), причем, самотестирование не только обеспечивает надежную работу регулятора/генератора 750, но также обеспечивает правильное соединение аппликатора 400 с регулятором/генератором 750.

Программа может давать на экран дисплея пользователя инструкцию по подготовке участка введения (стадия 808). Эта стадия может гарантировать правильную доставку лекарственного средства, указание на то, что его срок годности не истек, имеющиеся противопоказания, а также соблюдение предписаний/мер предосторожности.

Затем пользователь снимает крышку резервуара и вставляет резервуар 101 в кассетный блок 100 (стадия 810). В некоторых вариантах осуществления изобретения, пользователю подается звуковой, тактильный или осязательный сигнал (стадия 811), указывающий на правильное размещение резервуара в кассетном блоке.

Затем пользователь вставляет кассетный блок 100 в аппликатор 400 (стадия 816). Затем проверяется состояние ошибки (стадия 818), например, в отношении правильного размещения резервуара, и, если эта ошибка обнаруживается, то процедура останавливается, отображается сообщение об ошибке, и пользователь получает инструкцию по ее исправлению. Если ошибка может быть исправлена, например, если пользователь неправильно вставил резервуар, или не вставил или не закрыл заднюю часть кассеты, то пользователю может быть дано указание удалить кассету и снова правильно вставить в резервуар (состояние 820). В некоторых случаях, кассета извлекается автоматически, а в других случаях, для этого пользователю необходимо нажать кнопку "извлечение кассеты". При других состояниях ошибки, например, когда задняя часть кассеты была закрыта, пользователь может быть проинструктирован относительно использования новой кассеты.

В любом случае, после завершения установки устройства и достижения состояния "без ошибок", пользователь может перейти к введению лекарственного средства и проведению терапии путем электропорации (стадия 822).

Основная функция регулятора заключается в создании электрического поля, необходимого для достижения желаемой доставки лекарственного средства, для управления работой системы во время настройки и применения, для мониторинга состояния системы во время настройки и применения, а также для сообщения пользователю о состоянии системы во время настройки и применения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регулятор может давать рекомендации и инструкции по использованию устройства при обучении пользователя, а также во время устранения неисправностей при обычном применении.

Система и способ работы регулятора могут быть полностью реализованы с использованием любого количества вычислительных устройств, включая микропроцессоры, микрорегуляторы, программируемые логические регуляторы. Обычно, инструкции размещаются на электронном носителе, обычно, нетранзисторном, и эти инструкции являются достаточными для реализации процессором компьютера способа согласно изобретению. Электронный носитель может представлять собой жесткий диск или твердотельный носитель, имеющий инструкции, которые при запуске загружаются в оперативную память. Доступ к приложениям, например, от множества пользователей или от любого одного пользователя, может быть осуществлен с помощью любых соответствующих компьютерных устройств ввода. Так, например, пользователи могут использовать вспомогательную клавиатуру, обычную клавиатуру, мышь, сенсорный экран, джойстик, сенсорную панель, другое устройство для управления координатами или любое другое такое компьютерное устройство для ввода данных, относящихся к вычислениям. Данные также могут быть введены посредством встроенной микросхемы памяти, жесткого диска, флэш-памяти с интерфейсом, флэш-памяти, оптических носителей, магнитных носителей или любого другого типа носителя для хранения файлов. Выходные данные могут быть доставлены пользователю посредством видеографической матрицы или встроенных микропроцессоров для получения графической информации, соединенных с дисплеем пользователя. Альтернативно, система может выводить один или более форматов электронного документа, либо может быть использован принтер для вывода печатных копий результатов. На основании этой информации, любое количество других значимых результатов также следует понимать как реализация раскрытия изобретения. Так, например, выходные данные могут храниться на микросхеме памяти, жестком диске, флэш-памяти с интерфейсом, флэш-памяти, оптических носителях, магнитных носителях или на носителе любого другого типа. Следует также отметить, что раскрытие может быть реализовано на любых вычислительных устройствах различных типов, например, на персональных компьютерах, портативных компьютерах, ноутбуках, компьютерах типа ноутбуков, но с собственной системой ввода, карманных компьютерах, персональных цифровых помощниках, мобильных телефонах, смартфонах, планшетных компьютерах, а также на устройствах, специально предназначенных для этих целей. В одном варианте осуществления изобретения, пользователь смартфона или устройства, подключенного к WiFi, загружает копию приложения на свое устройство с сервера, используя беспроводное интернет соединение. Соответствующая процедура аутентификации и процесс безопасной транзакции могут предусматривать оплату провайдеру. Приложение может загружаться через мобильное соединение или через WiFi или другое беспроводное сетевое соединение. Затем приложение может быть запущено пользователем. Такая сетевая система может предоставлять подходящую компьютерную информацию для реализации, в которой множество пользователей предоставляют отдельные входные данные для системы и способа. В приведенной ниже системе, где предусматривается управление аппликатором, множественные входы позволяют множеству пользователей вводить соответствующие данные одновременно.

Таблица элементов

# Позиций	Элементы
100	Кассетный блок
101	Резервуар
102	Внешняя кассета, также называемая корпусом
103	Внутренняя кассета
104	Внутренняя кассетная крышка
105	Игла
106	Внешняя кассетная крышка
108	Выравнивающая панель/боковой экран
110	Внешняя кассетная крышка (безопасности)
112	Задняя часть кассеты
114	Стопорное кольцо кассеты
116	Детектирующая пружина резервуара
118	Детектирующая крышка резервуара
120	Блокировка резервуара, также известная как кнопка вставки резервуара
122	Электроды

124	Опора электродов
126	Пружины силового контакта
128	Преобразователь силового контакта
130	Электродные контакты
131	Внешние электродные части внешней кассеты для соединения с аппликатором
132	Опоры защитного экрана
133	Внутренние электродные части внешней кассеты для соединения с внутренней кассетой
134	Защитный экран
135	Проксимальные электродные части внутренней кассеты для соединения с внешней кассетой
137	Дистальные электродные части внутренней кассеты для введения в ткань
138	Гибкая схема силового контакта
139	Плечо или изгиб электрода
140	Отверстие для загрузки резервуара
142	Емкость резервуара
144 и 144'	Отверстия для блокировки резервуара (1-й или 2-й комплект)
146	Оптическая линия визирования
148	Детектор ввода, например ИК-датчик излучателя/коллектора в аппликаторе
150	Приемник внутренней кассеты
152	Втулка для иглы
154	Рейка
156	Выходной порт
158	Крышка резервуара
159	Стопор поршня
160	Гибкая схема
162	Первая серия контактных площадок
164	Вторая серия контактных площадок
166	Узлы защитного экрана
167	Отверстия защитного экрана
168	Боковой экран
170	Отверстие выравнивающей панели для защитного экрана

172	Сигнал инициации
174	Сигнал продолжения
176	Крюки внешней кассетной крышки
178	Внешние поверхности ребра кассетной крышки
180	Крюк для сцепления со стенкой выравнивающей панели/бокового экрана 108
182	Крепежные крюки защитного экрана
184	Опорная стенка первой глубины
186	Опорная стенка второй глубины
188	Начальная или остальная опорная стенка
190	Сигнал напоминания
192	Отверстия опорного элемента электрода
194	Отверстие для иглы опорного элемента электрода
196	Опорная конструкция с отверстием для электрода опорной конструкции электрода
198	Стенка опорного элемента электрода
400	Аппликатор
401	Отверстие приемника кассетного блока аппликатора
402	Рычаг
403	Приемник кассетного блока, который окружен корпусом
404	Пользовательский интерфейс
406	Многожильный кабель
407	Триггер
408	Индикатор(ы) выбора глубины инъекции
409	Кнопка(и) выбора глубины инъекции (может быть переключателем или другими формами в других вариантах реализации)
410	Таймер обратного отсчета времени процедуры
412	Индикатор размещения аппликатора
414	Индикатор неисправности при проведении процедуры
416	Индикатор завершения процедуры
418	Индикатор питания
420	Верхний корпус
422	Первый боковой корпус
424	Второй боковой корпус

426	Электрический разъем
428	Торцевая крышка
430	Верхняя крышка
432	Внутренняя защитная оболочка
433	Электрические контакты для привода двигателя 444
434	Контакты датчика силы кассеты
435	Разъемы для переключения
436	Датчик загрузки кассеты
438	Датчик загруженности кассеты
440	Предохранитель или трек
442	Направляющие рельсы для кассеты
444	Приводной двигатель загрузки
446	Разъем для запуска двигателя
448	Шестерня с зубчатой передачей
450	Электромеханические субблоки
452	Субблоки для загрузки кассеты, введения электрода и инъекции
454	Субблок привода для загрузки
456	Субблок загрузки кассеты
462	Приводной вал двигателя
464	Системный переключатель
466	Кронштейн крышки передачи
468	Монтажный кронштейн
470	Стык пружинной крышки/кассеты
471	Отверстие пружинной крышки
472	Пружина для введения электродов/иглы
474	Втулка зубчатой передачи для введения
476	Монтажный кронштейн
478	Приводное кольцо механизма передачи для вставки
479	Кольцо механизма передачи для вставки
480	Стабилизатор сигнала
481	Сигнал механизма вставки
482	Приводной двигатель механизма для вставки
483	Датчик положения механизма вставки
484	Приводной поршень для инъекции

486	Приводной двигатель и передача для инъекции
488	Опорные стойки (опорный элемент)
490	Каналы для первой глубины
491	Сигналы блокировки
492	Каналы для второй глубины
494	Опорная стенка
496	Электродные контакты аппликатора для электропорации
700	Узел регулятора
702	Рычаг
704	Контейнер для хранения
706	Лоток аппликатора
708	Порт для подключения аппликатора
710	Поддон
712	Экран дисплея
714	Кнопка извлечения кассеты
716	Кнопки навигации по меню
718	Кнопка отключения звука
720	Индикатор батареи
722	Кнопка питания
724	USB-порт
726	Переключатель питания от сети
728	Порт питания от сети
750	Генератор электрического поля

Примеры

Нижеследующие примеры согласно изобретению приводятся для дополнительной иллюстрации сущности изобретения. При этом, следует отметить, что нижеследующие примеры не ограничивают объема изобретения, который должен определяться прилагаемой формулой изобретения.

Пример 1. Получение последовательностей корового антигена и антигена Pol вируса HBV и оптимизация плазмиды.

Т-клеточные эпитопы на коровом белке вируса гепатита играют важную роль в элиминации вирусной инфекции гепатита В и белков вируса гепатита В, таких как полимеразы, и могут служить для расширения диапазона ответов. Таким образом, коровые белки и белки полимеразы вируса гепатита В были выбраны в качестве антигенов для разработки терапевтической вакцины против вируса гепатита В (HBV).

Дериватизация консенсусных последовательностей корового антигена и антигена полимеразы HBV.

Консенсусные последовательности антигена pol и корового антигена HBV были получены на основе вируса HBV генотипа В, С и D. Различные последовательности HBV были получены из различных источников и выровнены отдельно для коровых белков и белков полимеразы. Выравнивание исходных последовательностей для всех подтипов (от А до Н) были затем ограничены генотипами вируса HBV, В, С и D. Консенсусные последовательности были определены для каждого выравнивания белков отдельно для каждого подтипа и во всех комбинированных последовательностях BCD. В различных положениях выравнивания, наиболее часто встречающаяся аминокислота использовалась в консенсусной последовательности.

Оптимизация корового антигена HBV.

Консенсусная последовательность корового антигена HBV была оптимизирована путем делеции в нативном вирусном белке. В частности, была сделана делеция из тридцати четырех аминокислот, соответствующих С-концевому сегменту с высоким положительным зарядом, что необходимо для инкапсуляции пре-геномной РНК.

Оптимизация антигена Pol HBV.

Консенсусная последовательность антигена pol HBV была оптимизирована путем замены четырех остатков для удаления ферментативных активностей обратной транскриптазы и РНКазы Н. В частности, аспартатные остатки (D) были заменены на аспарагиновые остатки (N) в мотиве "YXDD" домена обрат-

ной транскриптазы для элиминации любой координационной функции и, таким образом, связывания нуклеотида/иона металла. Кроме того, первый аспартатный остаток (D) был заменен на аспарагиновый остаток (N), а первый глутаматный остаток (E) был заменен на глутаминовый остаток (A) в мотиве "DEDD" домена РНКазы Н для устранения координации Mg^{2+} . Кроме того, последовательность антигена pol HBV была оптимизирована по кодонам для скремблирования внутренних открытых рамок считывания белков оболочки, включая белок S и варианты белка S с N-концевыми удлинениями pre-S1 и pre-S2. В результате, были удалены открытые рамки считывания для белков оболочки (pre-S1, pre-S2 и белка S), и для белка X.

Оптимизация стратегий экспрессии корового антигена и антигена pol HBV.

Для достижения максимальной и равной экспрессии коровых антигенов и антигенов pol из плазмидных векторов были протестированы три различных стратегии: (1) присоединения коровых антигенов и антигенов pol вируса HBV в одной рамки считывания к небольшому AGAG, встроенному между кодирующими последовательностями для продуцирования одного гибридного белка Core-Pol (фиг. 25A); (2) экспрессии коровых антигенов и антигенов pol из одной плазмиды посредством сайта вырезания рибосомы, а в частности, сайта вырезания FA2 вируса ящура (FMDV), с получением бицистронного экспрессионного вектора, экспрессирующего отдельные коровые белки и белки pol из одной мРНК (фиг. 25B); и (3) разделения двух отдельных плазмид, кодирующих коровые антигены и антигены pol HBV, соответственно (фиг. 25C).

Анализ на экспрессию *in vitro*.

Кодирующие последовательности консенсусных коровых антигенов и антигенов pol HBV в соответствии с каждой из трех вышеуказанных стратегий экспрессии клонировали в коммерчески доступную экспрессионную плазмиду pcDNA3.1. Клетки HEK-293T трансфицировали векторами, и экспрессию белка оценивали с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием антигена, специфичного к сердцевине HBV.

Оптимизация посттранскрипционных регуляторных элементов.

Для повышения уровней экспрессии белка путем стабилизации первичного транскрипта, облегчения его удаления из ядра и/или повышения уровня транскрипции-трансляции было оценено четыре различных посттранскрипционных регуляторных элемента: (1) посттранскрипционного регуляторного элемента HBV сурка (WPRE) (GenBank: J04514.1); (2) последовательности интрона/экзона, происходящей от предшественника человеческого аполипопротеина A1 (GenBank: X01038.1); (3) нетранслируемого домена R-U5 длинного концевой повтора (LTR) вируса человеческого Т-клеточного лейкоза типа 1 (HTLV-1) (GenBank: KM023768.1); и (4) комбинированной последовательности, состоящей из LTR HTLV-1, синтетического интрона кроличьего β -глобина (GenBank: V00882.1) и энхансера сплайсинга (последовательности из трех компонентов). Энхансерные последовательности были введены между промотором CMV и последовательностями, кодирующими антиген HBV, в плаزمиды. Вестерн-блот-анализ не выявил каких-либо значимых различий в экспрессии корового антигена, если он экспрессировался из плазмиды в присутствии и в отсутствие элемента WPRE (фиг. 25D). Однако, если экспрессию корового антигена в трансфицированных клетках HEK293T из плазмид, имеющих другие три посттранскрипционные регуляторные последовательности, оценивали с помощью Вестерн-блот-анализа, то тройная энхансерная последовательность давала самый высокий уровень экспрессии корового антигена (фиг. 25E).

Выбор сигнального пептида для эффективной секреции белка.

Были оценены три различных сигнальных пептида, введенных с сохранением рамки считывания у N-конца корового антигена HBV: (1) сигнальный пептид тяжелой цепи Ig-гамма SPIgG (BAA75024.1); (2) сигнальный пептид тяжелой цепи Ig-эпсилон SPIgE (AAB59424.1); и (3) сигнальный пептид предшественника цистатина S SPCS (NP 0018901.1). Сайты расщепления сигнального пептида были оптимизированы *in silico* для присоединения корового антигена с использованием программы предсказания Signal P. Эффективность секреции определяли путем анализа на уровни корового белка в супернатанте. Вестерн-блот-анализ на секрецию корового антигена, проведенный с использованием трех различных сигнальных пептидов, присоединенных у N-конца, показал, что сигнальный пептид цистатина S дает наиболее эффективную секрецию белка (фиг. 25F).

Оптимизация вакцинного вектора ДНК.

Оптимизированные экспрессионные кластеры, содержащие энхансерную последовательность из трех компонентов, расположенную выше последовательности, кодирующей антиген HBV, вместе с N-концевой последовательностью сигнального пептида цистатина S, клонировали в вакцинный ДНК-вектор pVax-1 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Экспрессионный кластер в pVax-1 содержит человеческий промотор CMV-IE, за которым следует последовательность полиаденилирования (pA), происходящая от бычьего гормона роста (BGH). Размножение бактерий индуцируется репликоном ori pUC и геном резистентности к канамицину (Kan R), находящимся под контролем небольшого эукариотического промотора. Репликон ori pUC, экспрессионный кластер KanR и экспрессионный кластер, находящийся под контролем промотора CMV-IE, находятся в одной и той же ориентации внутри остова плазмиды. Однако, заметное снижение уровней экспрессии корового антигена наблюдалось в векторе pVax-1 по сравнению с уровнем экспрессии, наблюдаемым в векторе pcDNA3.1.

Для повышения уровня экспрессии белка было применено несколько стратегий: (1) превращения полноразмерного кластера pUCori-KanR в кластер, находящийся в ориентации против часовой стрелки (pVD-core); и (2) изменения оптимизации по кодонам гена KanR наряду с заменой промотора Kan на промотор Amp, происходящий от вектора pcDNA3.1 (pDK-core). Обе стратегии позволяют восстановить экспрессию корового антигена, при этом, экспрессия корового антигена была самой высокой в присутствии вектора pDK, который содержал оптимизированный по кодонам ген Kan R, промотор AmpR (вместо промотора KanR) и кластер pUCori-KanR, имеющий обратную ориентацию.

Четыре различных экспрессионных кластера, оптимизированные по коровому антигену/антигену pol HBV, и представленные на фиг. 25G, вводили в плазмидный остов pDK для тестирования каждой из трех стратегий экспрессии, проиллюстрированных на фиг. 25A-25C. Плазмиды тестировали *in vitro* на экспрессию корового антигена и антигена pol с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием антител, специфичных к коровому антигену и антигену pol. Наиболее согласованный профиль экспрессии для клеточных и секретируемых коровых антигенов и антигенов pol достигался в том случае, когда коровые антигены и антигены pol кодировались отдельными векторами, а именно, отдельными ДНК-векторами pDK-core и pDK-pol (фиг. 25H). Векторы pDK-pol и pDK-core схематически представлены на фиг. 26A и 26B, соответственно.

Пример 2. Опосредуемое электропорацией внутримышечное введение биофармацевтических препаратов на основе нуклеиновых кислот с помощью устройства для системной доставки TriGrid (TDS-IM).

Внутриклеточная доставка последовательностей нуклеиновых кислот в скелетные мышцы верхних или нижних конечностей у индивидуума может быть улучшена с использованием репрезентативного устройства, например, описанного здесь устройства для системной доставки TriGrid (TDS-IM) модели II. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство TDS-IM используется вместе с агентами, одобренными для их использования в исследовательских целях в устройстве TDS-IM. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, апробированным агентом являются нуклеиновые кислоты, то есть ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство TDS-IM используется только для индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, устройство TDS-IM используется только для индивидуума, включенного в программу открытых клинических испытаний посредством внутримышечной доставки нуклеиновой кислоты путем электропорации.

В целях запуска системы для введения, основное питание устройства подается на стимулятор, а батарея системы адекватно заряжается для его использования. Для этого включают выключатель электропитания, и нажимают кнопку питания на передней панели. Аппликатор подключают к разъему для аппликатора. Правильное подключение аппликатора подтверждается подсветкой индикатора мощности аппликатора. Стартовый экран появляется после того, как система завершит все самопроверки. Затем нажимают кнопку ОК для продолжения процедуры введения.

Для вставки шприца в кассету TDS, со шприца снимают крышку, а фланец шприца совмещают с отверстием для загрузки шприца кассеты TDS. Шприц должен защелкнуться и быть полностью установленным в кассете TDS. После загрузки шприца нажимают кнопку "OK" на стимуляторе импульса для продолжения процедуры. Крышка кассеты должна оставаться прикрепленной к ней до тех пор, пока кассета не будет загружена в аппликатор.

Для вставки кассеты с загруженным шприцем в аппликатор, кассету выравнивают с аппликатором так, чтобы отверстие для загрузки шприца кассеты было обращено лицом вверх. После вставки кассеты в аппликатор, кассета автоматически подается в полностью загруженном положении в аппликаторе. Успешная загрузка кассеты указывается в стимуляторе. После загрузки кассеты, аппликатор возвращается в свой лоток и выбирается подходящее место для инъекции индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения, участком инъекции для внутримышечной доставки нуклеиновой кислоты является медиальная дельтовидная мышца, расположенная приблизительно на три ширины пальца ниже края отростка акромиона (плечевой кости). В репрезентативном варианте осуществления изобретения, глубина инъекции в медиальную дельтовидную мышцу составляет приблизительно 0,75-1,25 дюйма (19-30 мм). В некоторых вариантах осуществления изобретения, участком для инъекции посредством внутримышечной доставки нуклеиновой кислоты является vastus lateralis (широкая латеральная мышца)(внешней поверхности бедра) приблизительно в средней точке между бедром и коленом. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, глубина инъекции в мышцу vastus lateralis составляет приблизительно 1,0-1,5 дюйма (25-38 мм). После выбора участка инъекции нажимают кнопку выбора глубины аппликатора, а затем кнопку выбора глубины инъекции, соответствующую участку/глубине инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индикатор выбора глубины инъекции постоянно освещается, что подтверждает выбранную глубину инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кнопка выбора глубины на правой стороне соответствует более глубокой глубине инъекции. В одном варианте осуществления изобретения, где первоначально выбранный участок инъекции должен быть изменен, нажимается кнопка выбора, соответствующая другой глубине инъекции, и при появлении окна выбора глубины инъекции, выбирают другую глубину инъекции.

Чтобы начать введение индивидууму апробированного агента с помощью устройства TDS-IM,

крышку кассеты снимают и отбрасывают. Устройство выравнивают и плотно прижимают к нужному участку инъекции. Когда устройство будет плотно прижато к нужному месту инъекции, все четыре полосы индикатора размещения аппликатора загораются, а таймер обратного отсчета процедуры начинает светиться с "8" с, указывая на время, оставшееся до окончания процедуры введения. Для введения агента нажимают кнопку запуска аппликатора при поддержании постоянного давления. Когда таймер обратного отсчета процедуры достигает "0", подается электрическая стимуляция. После завершения процедуры введения загорается индикатор завершения процедуры, и устройство можно извлечь из места инъекции. Извлекать устройство из места инъекции запрещается до тех пор, пока процедура не будет завершена или не загорится индикатор неисправности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в случае обнаружения устройством неисправностей во время проведения процедуры введения, устройство прерывает процедуру введения и загорается индикатор ошибки. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, если устройство прерывает процедуру введения, и это устройство быстро удаляют из индивидуума, то на дисплее стимулятора устройства появляются дополнительные инструкции.

Для выемки кассеты из аппликатора после завершения процедуры введения агента индивидууму, нуждающемуся в этом, нажимают кнопку извлечения, расположенную на стимуляторе. Аппликатор автоматически выдвигает кассету в положение, при котором ее можно извлечь вручную из аппликатора. Как только кассета перестает двигаться, для извлечения кассеты из аппликатора, ее можно взять за стороны, указанные стрелками. После извлечения кассеты, полное завершение инъекции можно проверить путем визуального осмотра положения поршня шприца. Для выключения устройства, аппликатор помещают в кожух и кнопку питания на передней панели нажимают, удерживая в течение 5 с.

Пример 3. Электропорация TDS-IM на мышах и приматах, не являющихся человеком.

Для улучшения доставки конструкций на основе ДНК в мышечную ткань была применена технология электропорации путем внутримышечной системной доставки TriGrid (TDS-IM). Электродная матрица TriGrid для внутримышечной (i.m.) доставки состоит из четырех электродов, расположенных в виде двух равносторонних треугольников, образующих ромбовидную форму, окружающую центральную иглу для инъекции (фиг. 22). Объединение доставки агента и распространения электрического поля в одном устройстве гарантирует, что индуцирование эффекта электропорации будет происходить в месте распределения агента, и позволяет вводить плазмидную конструкцию и подавать электрические импульсы за одну стадию. Таким образом, i.m.-доставка плазмидной ДНК достигается эффективным и воспроизводимым способом.

Электродные матрицы TriGrid для каждого животного-модели масштабировали для эффективной доставки ДНК-плазмид, таких как плазмиды, полученные как описано в примере 1, в выбранную мышцу независимо от размера и свойств конкретной мышечной ткани. Основными параметрами устройства для электропорации, которые были масштабированы для использования для каждого животного-модели, являются размер TriGrid (то есть расстояние между электродами), подаваемое напряжение (250 В/см, где см - размер TriGrid), диаметр электрода и глубина проникновения электрода. Вторичная адаптация к устройству включает изменение объема шприца, объема плазмидной ДНК и калибра/длины иглы для подкожных инъекций.

Исследования на мышах проводили с помощью устройства TDS-IM v1.0 с использованием электродной матрицы с расстоянием между электродами 2,5 мм. Эта корректировка размера электродной матрицы была осуществлена для размещения этих электродов в мышцу мыши меньшего размера. На фиг. 23А представлен вариант TriGrid TDS-IM v1.0, адаптированный для использования в мышинной модели. Исследования на обезьянах, не являющихся GLP (зелеными длиннохвостыми мартишками), также проводили на устройстве TDS-IM v1.0, но с расстоянием между электродами 6 мм. На фиг. 23В показан вариант TriGrid TDS-IM v1.0, адаптированный для испытаний на приматах, не являющихся человеком (NHP) и используемых в качестве моделей.

Устройство, используемое в испытаниях на обезьянах GLP, представляет собой устройство TDS-IM v2.0, которое также предназначено для клинических исследований с участием человека. В этом устройстве, расстояние между электродами составляет 6 мм а условия активации являются такими же, как и для устройства TDS-IM v1.0. Материалы электродов, используемых в устройстве TDS-IM v2.0, идентичны материалам в устройстве TDS-IM v1.0, используемому в описанном выше исследовании на NHP, но опорная конструкция кассеты и шприц, используемые для введения, отличаются. Кроме того, также отличаются глубина вставки для человека и приматов, не являющихся человеком. Таким образом, устройство TDS-IM v2.0 было оснащено распорной втулкой в целях адаптации устройства TDS-IM v2.0 для его использования в мышцах NHP гораздо меньшего размера. На фиг. 24 представлен вариант TriGrid TDS-IM v2.0, адаптированный для испытаний на приматах, не являющихся человеком (NHP) и используемых в качестве моделей.

В каждом испытании на животных, этих животных анестезировали для иммобилизации перед проведением процедуры введения путем электропорации. Участок введения был выбран с учетом регионарных анатомических особенностей кости в качестве контрольных точек, и на выбранном участке была удалена шерсть с помощью электрической машинки для стрижки волос, а затем с помощью асептического тампона. Матрицу TDS-IM вводили чрескожно в выбранную мышцу, причем главная ось ромбообраз-

ной конфигурации был ориентирована параллельно мышечным волокнам. После введения электрода проводили инъекцию для распределения ДНК в мышцах. После завершения i.m.-инъекции локально подавали электрическое поле 250 В/см с общей продолжительностью 400 мс при 10%-ном рабочем цикле (то есть в течение этих 400 мс, напряжение активно подавали только всего 40 мс). После завершения процедуры электропорации, матрицу TriGrid™ удаляли, и состояние животных было восстановлено.

Переменные компоненты для каждого варианта TDS-IM и/или животного-модели приведены в табл. 1 и в 2.

Таблица 1
Вариант TDS-IM и детали TriGrid

Вариант TDS-IM	Животное-модель	Размер TriGrid (мм)	Диаметр электрода (дюйм)	Длина проводника (мм)	Эффективная глубина проникновения (мм)	Объем инъекций ДНК (см³)	Объем шприца (см³)	Калибр иглы для инъекции	Способ инъекции
TDS-IM v1.0	мышь	2,5	0,030	3,2	3,2	0,020	3/10 см³	30	Вручную
TDS-IM v1.0	NHP	6,0	0,021	5,0	15,5	1,0	1,0 см³	22	автоматически
TDS-IM v2.0	NHP	6,0	0,023	5,0	9,0*	1,0	1,0 см³	22	автоматически

* Масса тела и размер мышц NHP, необходимые для меньшей глубины проникновения; для снижения глубины проникновения до 9 мм был использован ограничитель глубины 10 мм.

Таблица 2
Вариант TDS-IM и детали импульсного стимулятора

Вариант TDS-IM	Животное-модель	Подаваемое электрическое поле (В/см)	Диапазон подаваемого напряжения (В)	Ограничение подачи тока (А)	Ограничение подачи тока (А/сек)	Общее число импульсов	Продолжительность активной стимуляции (мс)	Максимальная продолжительность последовательности импульсов (мс)
TDS-IM v1.0	мышь	250	59,4- 5,6	N/A* - 4	0,16	6	40,8	369,3
TDS-IM v1.0	NHP	250	142,4- 157,6	0,6-4	0,16	6	40,8	369,3
TDS-IM v2.0	NHP	250	142,4-157,6	0,6-4	0,16	6	40,8	369,3

* Нижний предел подачи тока отключен для адаптации к особенностям мыши-модели.

Пример 4. Электропорация с помощью TDS-IM для человека.

В клиническом испытании использовали устройство TDS-IM v2.0. Это устройство, по существу, является таким же, как и устройство, используемое для обезьян GLP. Глубина введения для человека и приматов, не являющихся человеком, отличалась. Таким образом, устройство TDS-IM v2.0 было оснащено распорной втулкой в целях адаптации устройства TDS-IM v2.0 для его использования в мышцах NHP гораздо меньшего размера. Условия стимуляции были в основном такими же, как и для обезьян GLP, за исключением того, что глубина проникновения составляла приблизительно 19 мм, а не 9 мм, как для обезьян GLP.

Хотя предпочтительные варианты осуществления изобретения были раскрыты и описаны в настоящем изобретении, однако, для специалистов в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления изобретения представлены только в качестве примера. Специалистам в данной области очевидно, что в настоящее изобретение могут быть внесены различные изменения, модификации и замены, не выходящие за рамки объема изобретения. Следует отметить, что для осуществления настоящего изобретения могут быть применены различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем изобретении, или комбинации одного или более из этих описанных здесь вариантов или аспектов изобретения. При этом следует иметь в виду, что объем раскрытия изобретения определяется нижеследующей формулой изобретения, которая охватывает способы и структуры, входящие в объем этой формулы изобретения, и их эквиваленты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устройство для регулируемой доставки вакцины против вируса гепатита В (HBV) в заранее определенный участок ткани у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанное устройство включает:

кассетный блок (100), содержащий внешнюю кассету (102); внутреннюю кассету (103); резервуар (101), содержащий вакцину против HBV, где приемник (142) резервуара находится во внешней кассете (102) и имеет конфигурацию, подходящую для подачи в резервуар (101);

аппликатор (400), содержащий приемник (403) кассетного блока, втулку для иглы (152) и детектор введения (148), где детектор введения (148) определяет загрузку резервуара (101) в приемник (142) резервуара;

по меньшей мере одну блокировку (120), где такая блокировка (120) облегчает правильное выполнение процедуры введения вакцины против HBV;

по меньшей мере одно отверстие для инъекции, через которое вводят вакцину против HBV;

множество проникающих электродов (122), расположенных в заданной пространственной взаимосвязи по отношению к отверстию;

генератор электрического поля (750) для генерации электрического сигнала, функционально соединенный с электродами (122); и

регулируемый источник энергии, достаточный для переноса заранее определенного количества вакцины против HBV с заранее определенной скоростью из резервуара (101) через отверстие в заранее определенный участок у индивидуума,

где вакцина против HBV содержит:

первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий антиген полимеразы HBV, где антиген полимеразы HBV содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, и где антиген полимеразы HBV не обладает обратной транскриптазной активностью и активностью РНКазы Н;

вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую второй полинуклеотид, кодирующий усеченный коровий антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и

фармацевтически приемлемый носитель,

где первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты или в двух различных молекулах нуклеиновой кислоты.

2. Устройство по п.1, где электроды (122) представляют собой множество удлиненных электродов, и блокировка (120) предотвращает случайное срабатывание функции кассеты.

3. Устройство по п.1, где по меньшей мере одна блокировка (120) выбрана из группы, состоящей из механической блокировки, излучателя/коллектора света, задней части кассеты (112), блокировки силы, выравнивающей панели (108) и бокового экрана (108), блокировки триггера и аварийного выключателя.

4. Устройство по любому из пп.1-3, где устройство содержит по меньшей мере два набора блокировок (120), где первая блокировка представляет собой механическую блокировку, а вторая блокировка выбрана из группы, состоящей из излучателя/коллектора света, задней части кассеты (112), блокировки силы, выравнивающей панели (108) и бокового экрана (108), блокировки триггера и аварийного выключателя, предпочтительно где механическая блокировка представляет собой блокировку резервуара, дополнительно содержащую (i) по меньшей мере одно отверстие блокировки резервуара (144), или (ii) индикаторную панель, простирающуюся вдоль одной или более поверхностей кассеты, где этот индикатор указывает на правильное введение резервуара в кассету, и предпочтительно задняя часть кассеты (112) обеспечивает оптическую линию визирования по меньшей мере через одно отверстие блокировки резервуара (144).

5. Устройство по п.4, где устройство также содержит третью блокировку (120), которая представляет собой блокировку силы, где блокировка силы определяет силу, приложенную к заранее определенному участку ткани индивидуума, и предотвращает введение вакцины против HBV индивидууму, если такая сила является недостаточной, предпочтительно где блокировка силы также образует электрический замок внутри аппликатора (400).

6. Устройство по любому из пп.1-5, где устройство также содержит по меньшей мере один датчик, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из датчика загрузки кассеты (436), датчика загруженности кассеты (438), датчика силы кассеты, датчика положения механизма вставки (483), датчика вставки, оптического детектора (148) и электрического датчика.

7. Устройство по п.6, где датчик детектирует метку резервуара и подтверждает наличие вакцины против HBV.

8. Устройство для регулируемой доставки вакцины против HBV в заранее определенный участок ткани у индивидуума, где указанное устройство включает:

кассетный блок (100), содержащий корпус (102); резервуар (101), содержащий вакцину против HBV, где приемник (142) резервуара находится в корпусе (102) и имеет конфигурацию, подходящую для подачи в резервуар (101);

аппликатор (400, содержащий приемник кассетного блока (403), втулку для иглы (152) и детектор введения (148), где детектор введения (148) определяет загрузку резервуара (101) в приемнике для резервуара (142);

по меньшей мере одно отверстие для инъекции, через которое вводят вакцину против HBV; множество проникающих электродов (122), расположенных в заданной пространственной взаимосвязи по отношению к отверстию;

опорную конструкцию электрода (124), содержащую отверстие и стенку, где опорная конструкция электрода предотвращает случайное перпендикулярное движение электродов (122);

генератор электрического поля (750) для генерации электрического сигнала, функционально соединенный с электродами (122); и

регулируемый источник энергии, достаточный для переноса заранее определенного количества вакцины против HBV с заранее определенной скоростью из резервуара (101) через отверстие в заранее определенный участок у индивидуума,

где вакцина против HBV содержит:

первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первый полинуклеотид, кодирующий антиген полимеразы HBV, где антиген полимеразы HBV содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4, и где антиген полимеразы HBV не обладает обратной транскриптазной активностью и активностью РНКазы H;

вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую второй полинуклеотид, кодирующий усеченный коровий антиген HBV, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и

фармацевтически приемлемый носитель, и

где первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты присутствуют в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты или в двух различных молекулах нуклеиновой кислоты.

9. Устройство по п.8, где опорная конструкция электрода (124) обеспечивает рабочее соединение между проводящей областью контакта, расположенной в дистальной области (137) электродов (122), и регулируемым источником энергии, если электроды (122) размещены в заданном участке ткани у индивидуума, предпочтительно где опорная конструкция электрода (124) содержит по меньшей мере одно отверстие для прохода электродов (122) и отверстие для прохода иглы для инъекции.

10. Устройство по п.8 или 9, где опорная конструкция электрода (124) представляет собой плоскую опорную конструкцию, расположенную перпендикулярно относительно вытянутой ориентации электродов (122), предпочтительно где плоская опорная конструкция содержит по меньшей мере одно отверстие, имеющее конфигурацию, обеспечивающую проход электрода (122) через заданный участок ткани.

11. Устройство по любому из пп.8-10, где опорная конструкция электрода (124) является адаптивной опорой электрода, предпочтительно где адаптивная опора электрода представляет собой пружину сжатия, изготовленную из металла, полимера или эластомерного материала.

12. Устройство по любому из пп.8-11, где опорная конструкция электрода (124) содержит по меньшей мере одно из телескопической трубки, пружины защитного экрана (138) и по меньшей мере одного бокового опорного элемента, прикрепленного к электродам (122) по меньшей мере одним необязательным шарнирным элементом.

13. Устройство по любому из пп.1-12, где вакцина против HBV способна индуцировать иммунный ответ у млекопитающего против по меньшей мере двух генотипов HBV, а предпочтительно, вакцина против HBV способна индуцировать Т-клеточный ответ у млекопитающего против генотипов HBV по меньшей мере В, С и D, а более предпочтительно, вакцина против HBV способна индуцировать CD8-Т-клеточный ответ у человека против генотипов HBV по меньшей мере А, В, С и D.

14. Устройство по любому из пп.1-13, где первая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствует в первом плазмидном ДНК-векторе, а вторая не встречающаяся в природе молекула нуклеиновой кислоты присутствует во втором плазмидном ДНК-векторе.

15. Устройство по п.14, где вакцина против HBV включает:

а) первый плазмидный ДНК-вектор, включающий, от 3'-конца до 5'-конца, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7; энхансерную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8; последовательность, кодирующую сигнальный пептид и содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5; первую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3; и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11;

б) второй плазмидный ДНК-вектор, включающий от 3'-конца до 5'-конца, промоторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7; регуляторную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8; последовательность, кодирующую сигнальный пептид и содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5; вторую полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1; и последовательность сигнала полиаденилирования, содержащую полинуклеотидную по-

следовательность SEQ ID NO: 11; и

с) фармацевтически приемлемый носитель,

где первый плазмидный ДНК-вектор и второй плазмидный ДНК-вектор также содержат ген резистентности к канамицину, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, и ориджин репликации, имеющий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и где первый плазмидный ДНК-вектор и второй плазмидный ДНК-вектор находятся в одной и той же композиции или в двух различных композициях.

16. Устройство по любому из пп.1-15, для индуцирования иммунного ответа против HBV по меньшей мере двух генотипов, а более конкретно, для его применения при лечении заболеваний, вызванных HBV, где указанное устройство адаптировано для электропорации при введении вакцины против HBV индивидууму, нуждающемуся в этом, а предпочтительно человеку.

17. Устройство по любому из пп.1-16, где расстояние между электродами составляет 6 мм.

18. Способ индуцирования иммунного ответа против HBV-инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный способ включает доставку вакцины против HBV в заранее определенный участок ткани у индивидуума с использованием устройства по любому из пп.1-17.

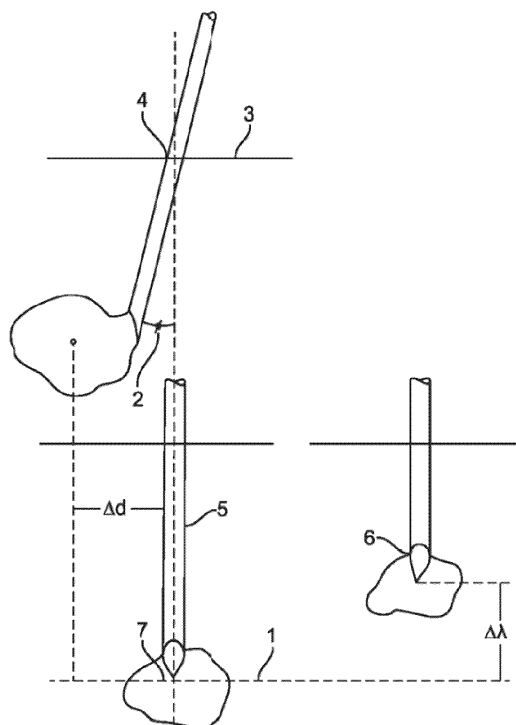
19. Способ по п.18, где указанным индивидуумом является человек, страдающий хронической HBV-инфекцией.

20. Способ по п.18, где указанным способом осуществляется лечение заболевания, вызванного HBV, у индивидуума, нуждающегося в этом, где указанное заболевание, вызванное HBV, выбрано из группы, состоящей из прогрессирующего фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК).

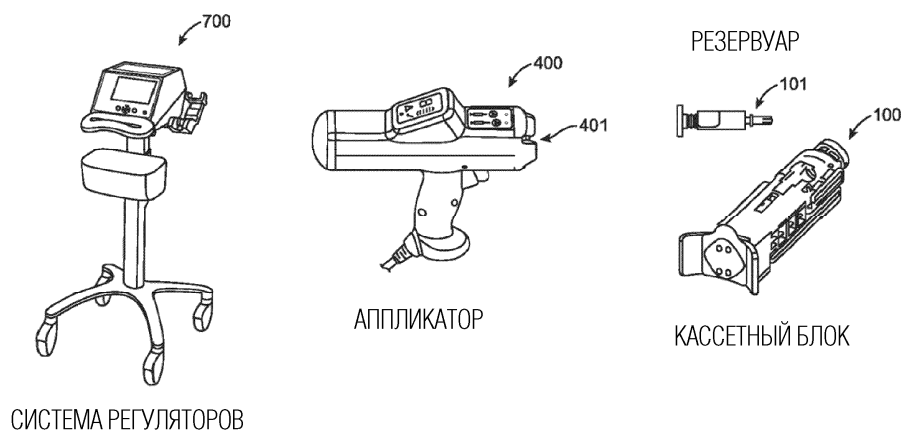
21. Способ по любому из пп.18-20, где заданный участок ткани расположен в скелетной мышце индивидуума.

22. Способ по п.21, где скелетная мышца индивидуума представляет собой медианную дельтовидную мышцу или широкую латеральную мышцу.

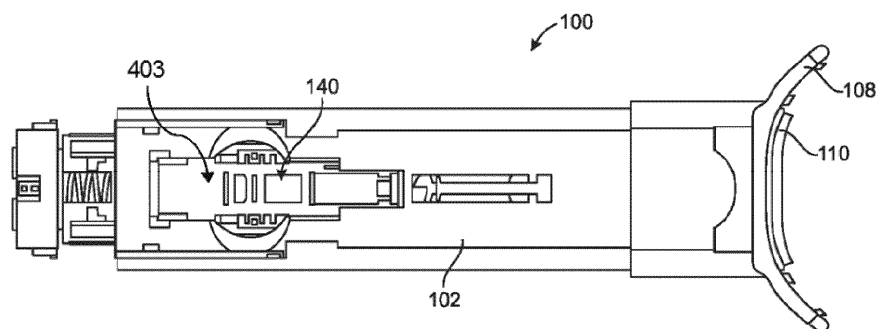
23. Способ по любому из пп.18-22, где электрический сигнал, функционально связанный с электродами, имеет напряженность электрического поля от 100 В/см до 400 В/см, а предпочтительно 250 В/см; напряжение от 50 до 200 В, предпочтительно, приблизительно 150 В; и электрический заряд от 0,5 до 5 А/с, предпочтительно от 0,6 до 4 А/с, более предпочтительно 0,16 А/с.



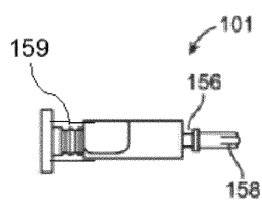
Фиг. 1



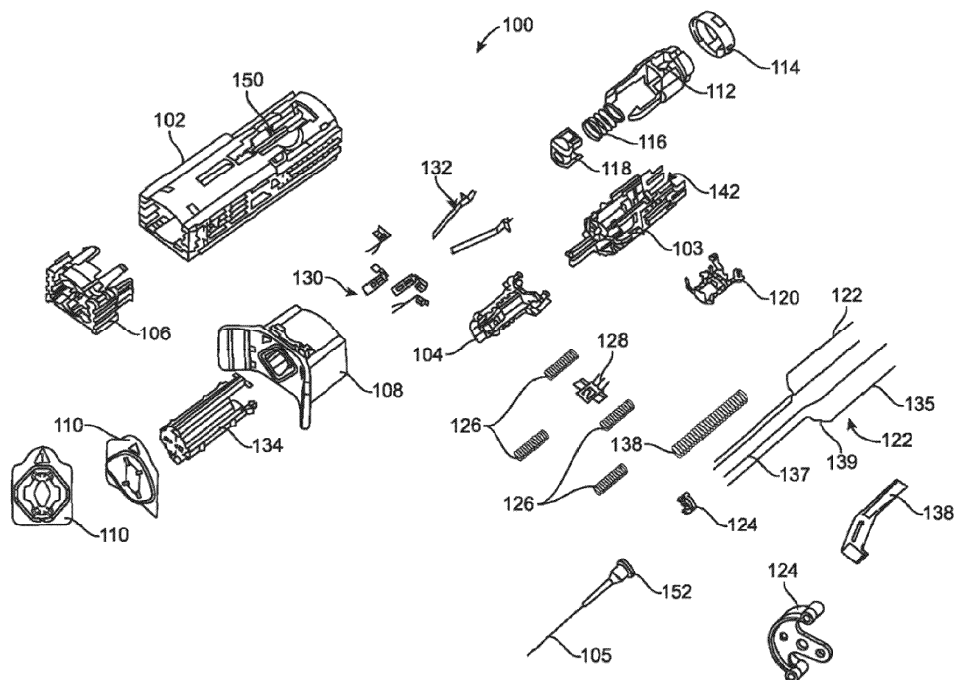
Фиг. 2



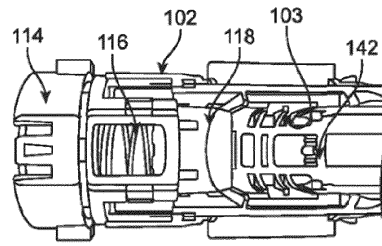
Фиг. 3А



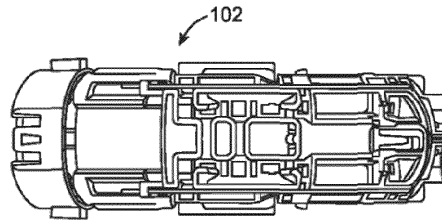
Фиг. 3В



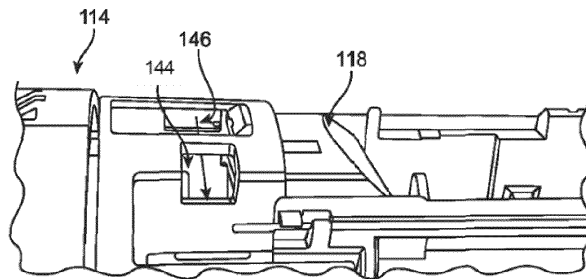
Фиг. 4



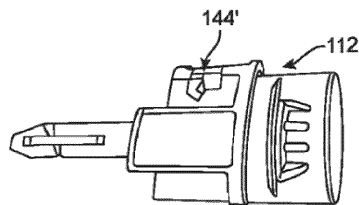
Фиг. 5А



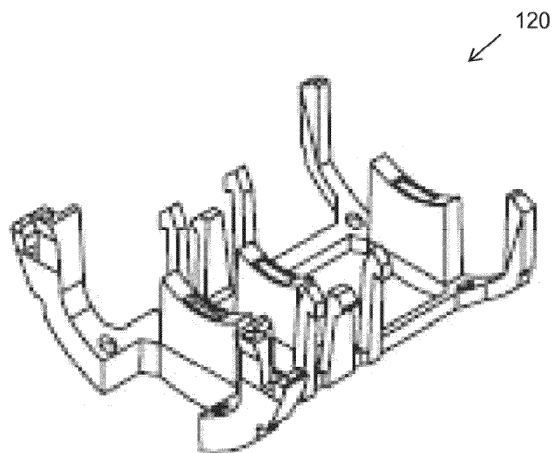
Фиг. 5В



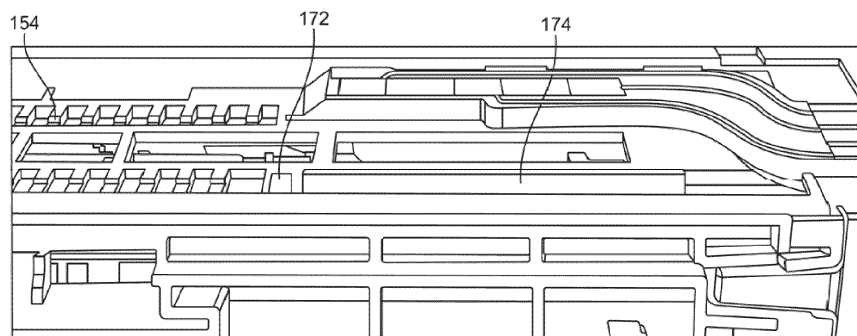
Фиг. 5С



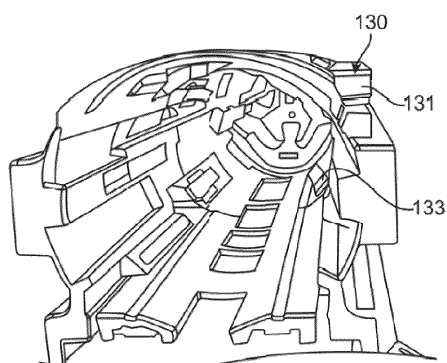
Фиг. 5D



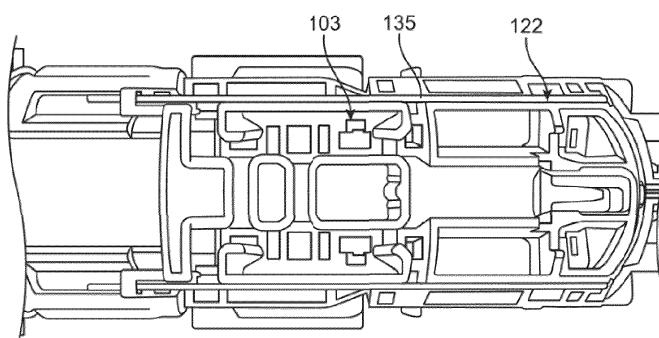
Фиг. 5Е



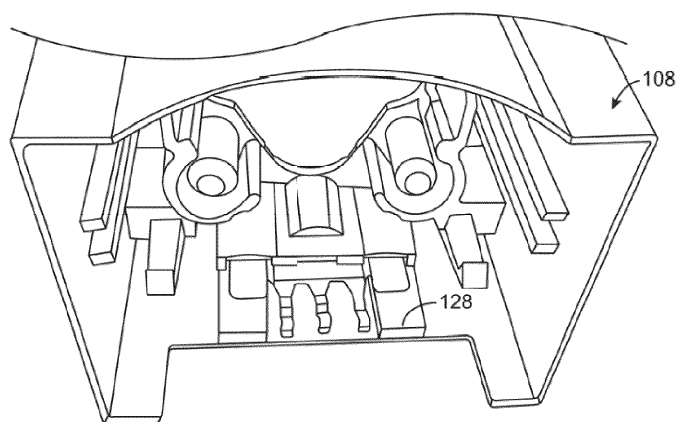
Фиг. 6



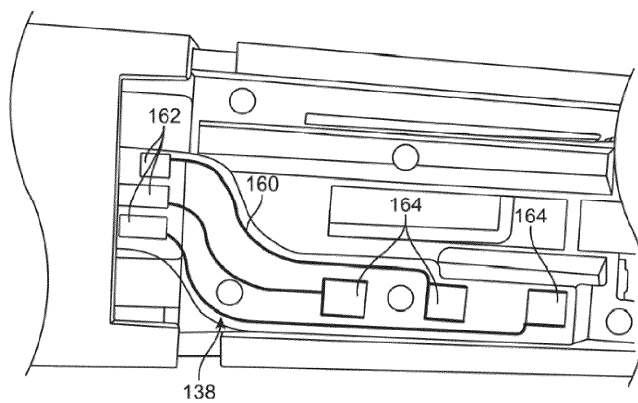
Фиг. 7А



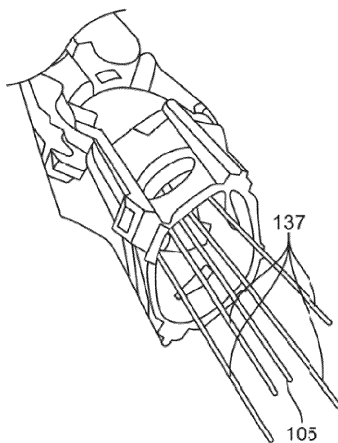
Фиг. 7В



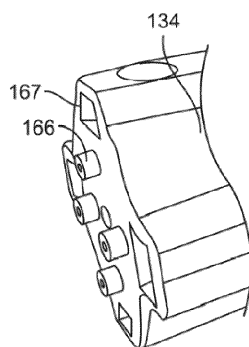
Фиг. 8А



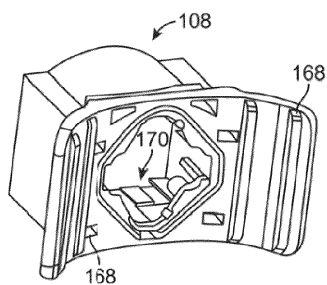
Фиг. 8В



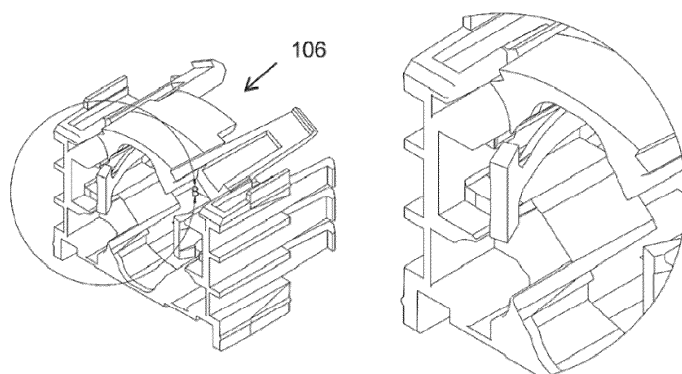
Фиг. 9А



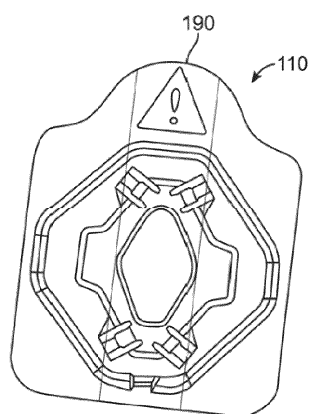
Фиг. 9В



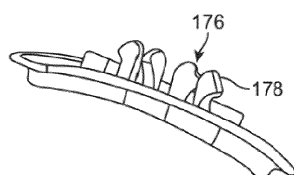
Фиг. 9С



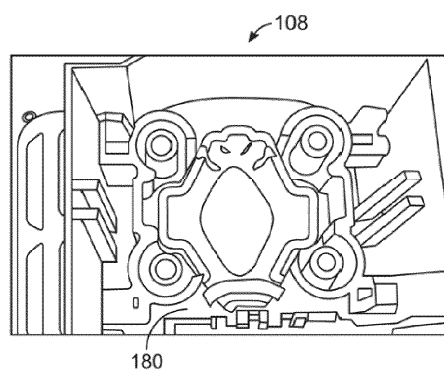
Фиг. 9D



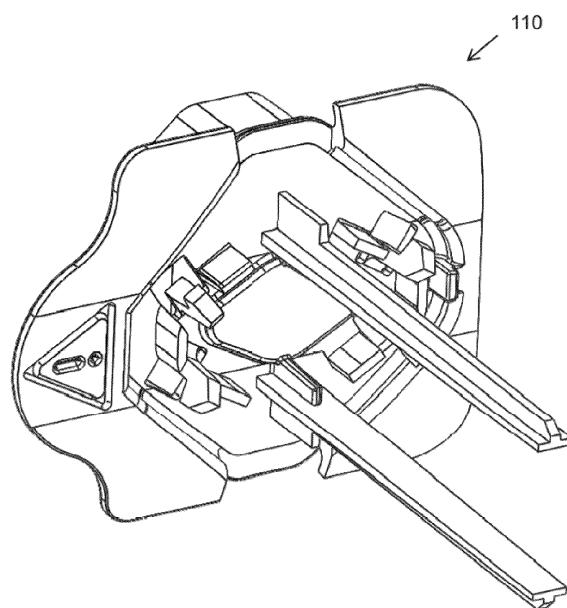
Фиг. 10A



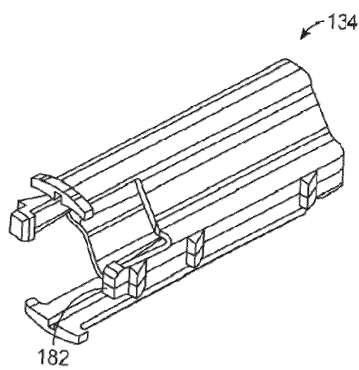
Фиг. 10B



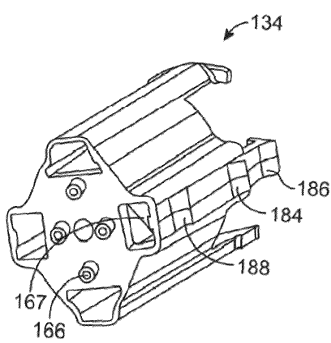
Фиг. 10C



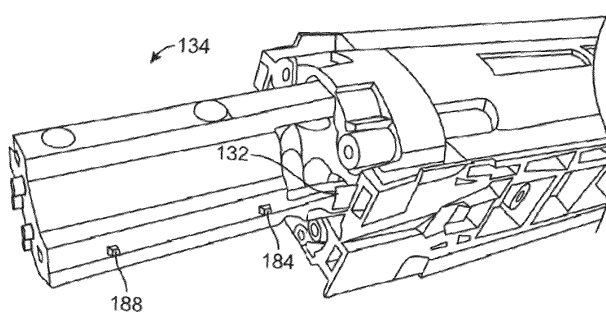
Фиг. 10D



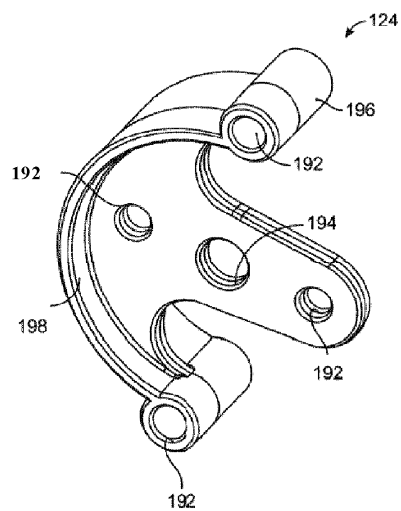
Фиг. 11A



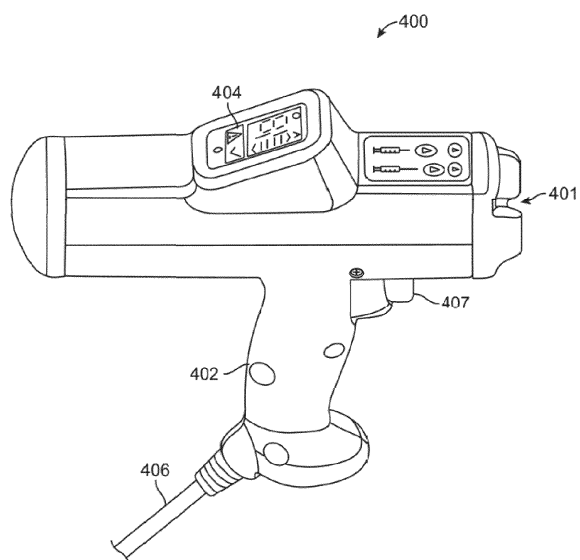
Фиг. 11B



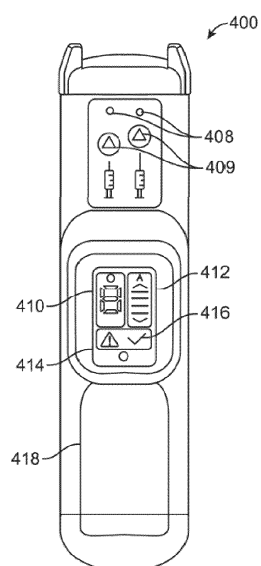
Фиг. 11C



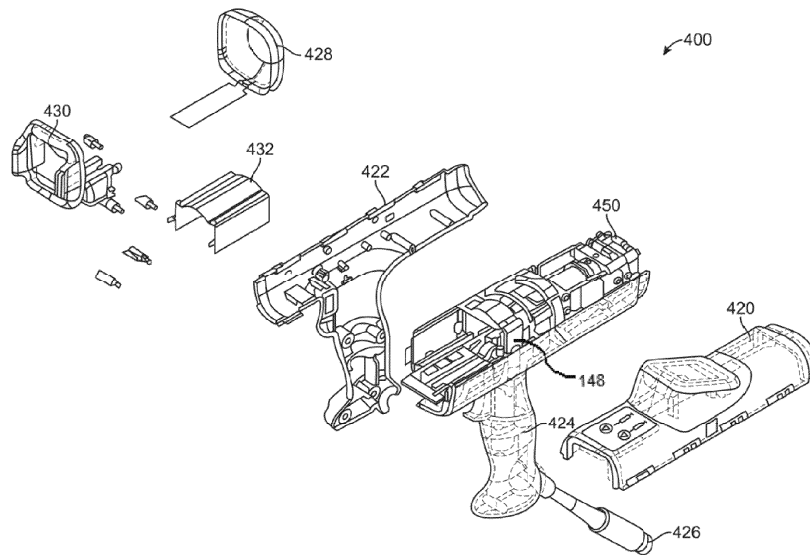
Фиг. 12



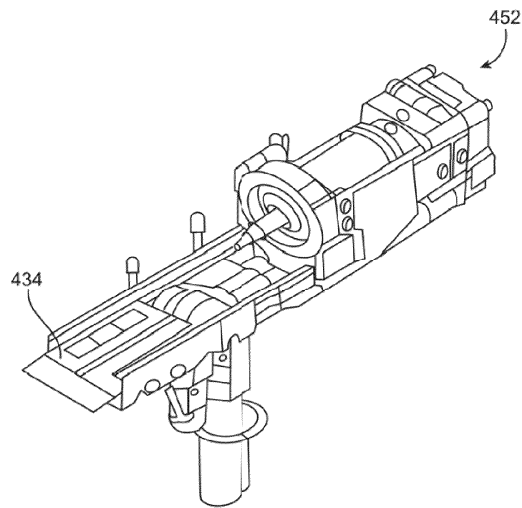
Фиг. 13А



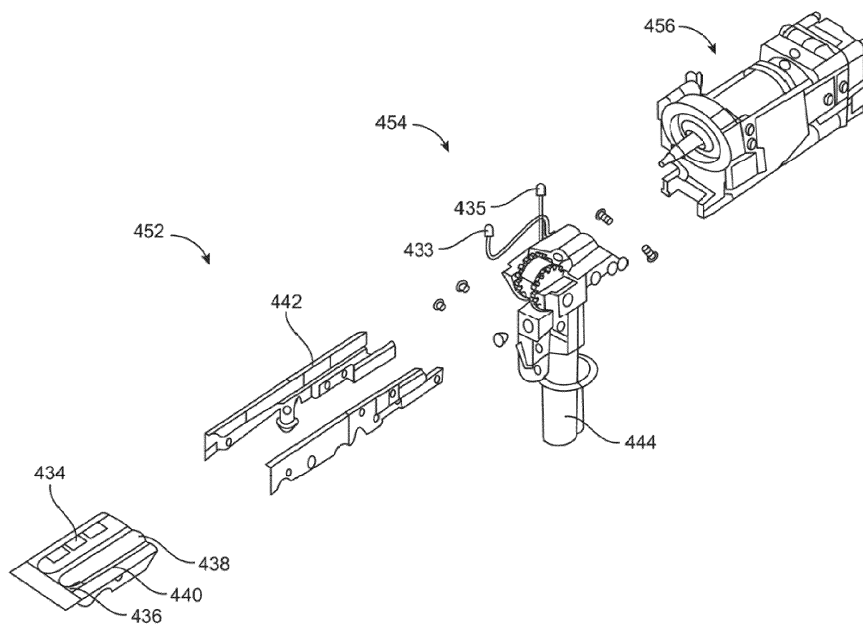
Фиг. 13В



Фиг. 14

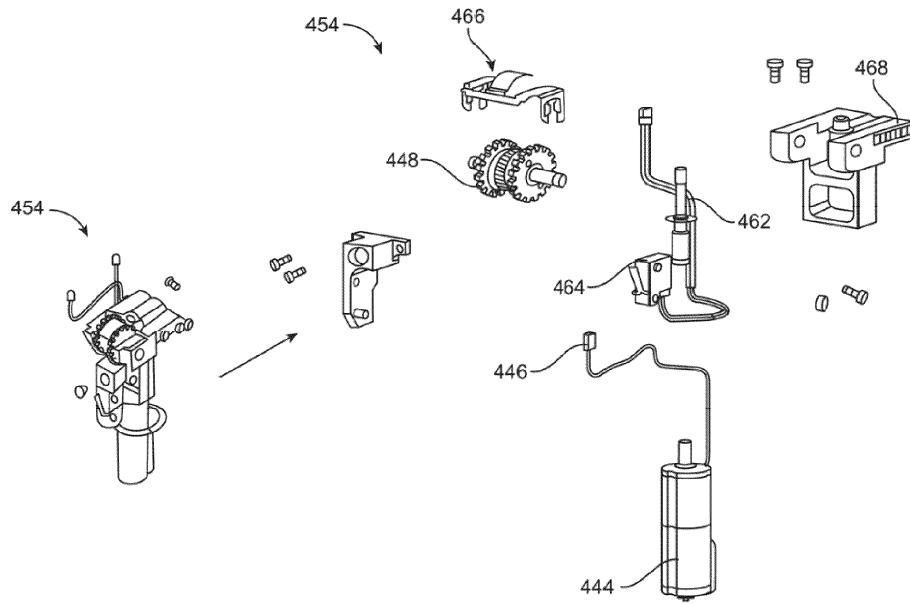


Фиг. 15

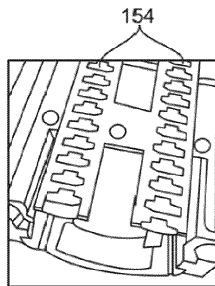


Фиг. 16

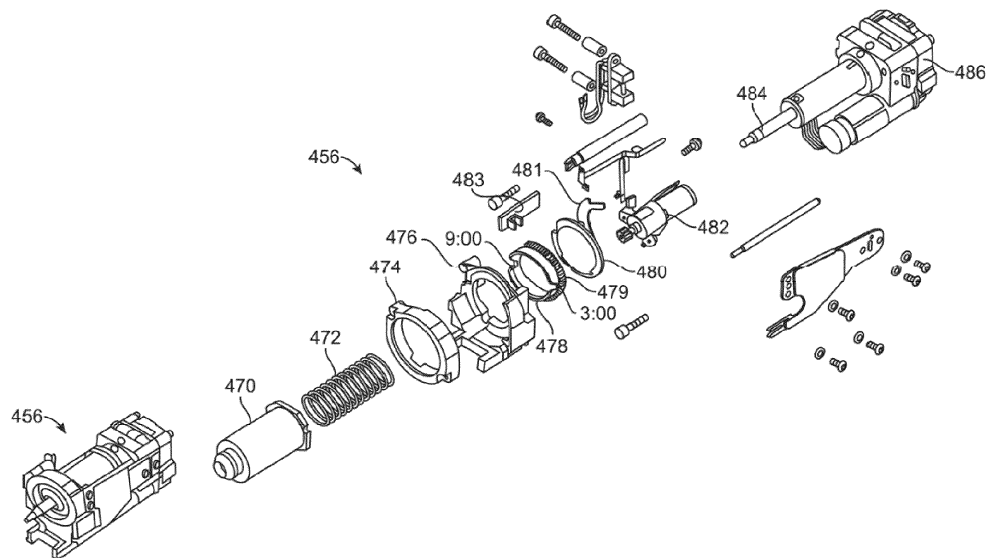
043519



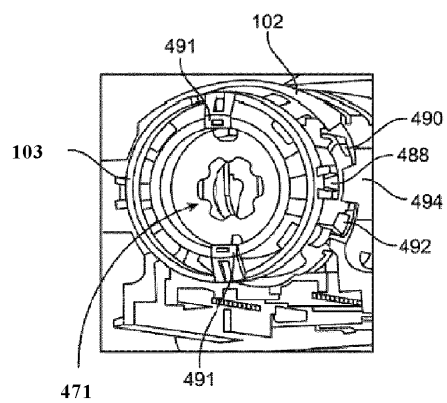
Фиг. 17А



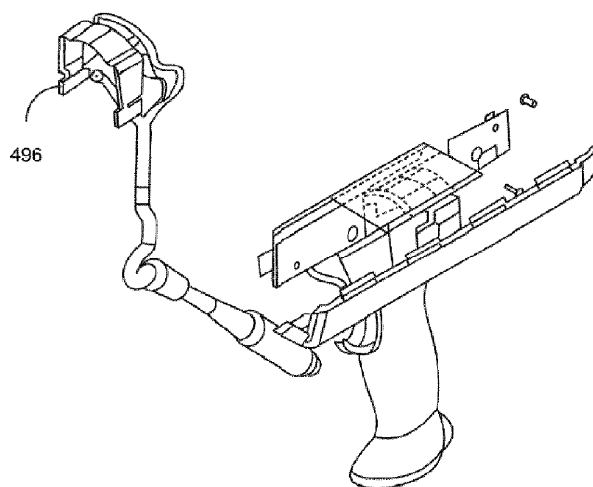
Фиг. 17В



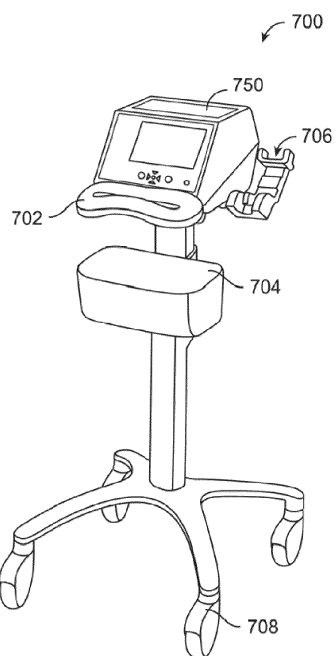
Фиг. 18А



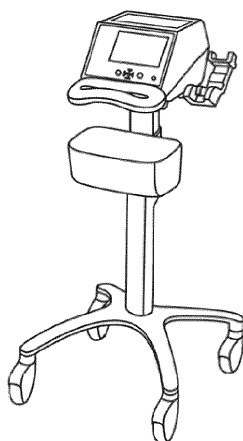
Фиг. 18В



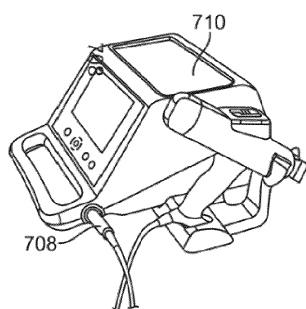
Фиг. 18С



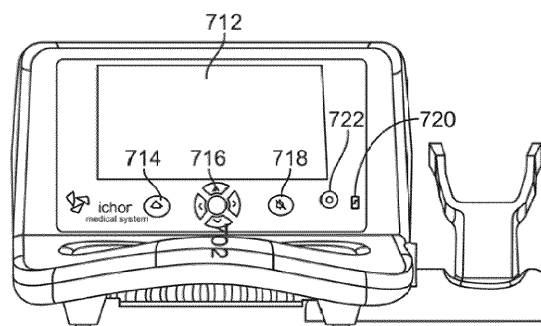
Фиг. 19



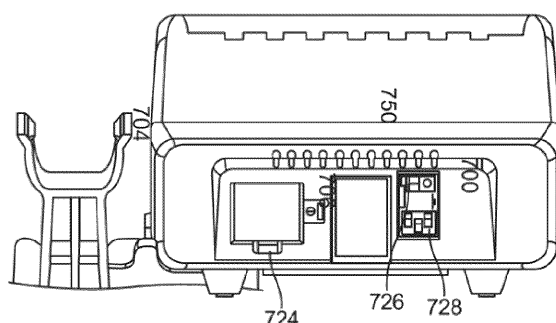
Фиг. 20А



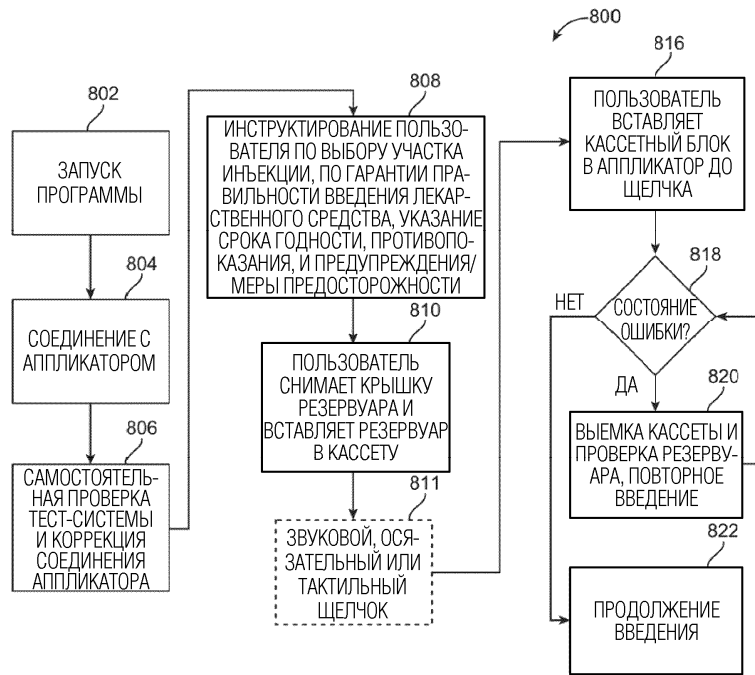
Фиг. 20В



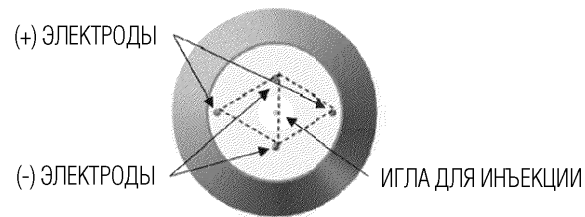
Фиг. 20С



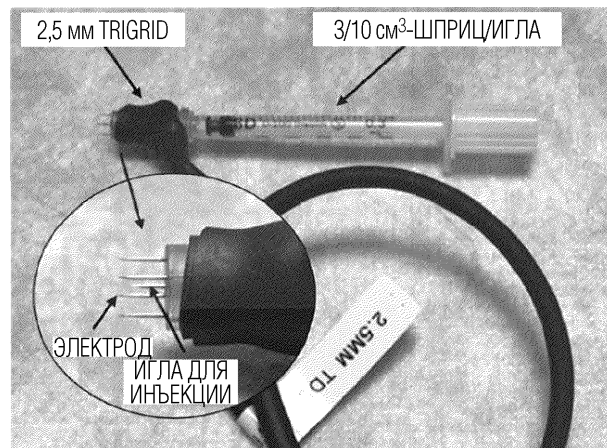
Фиг. 20D



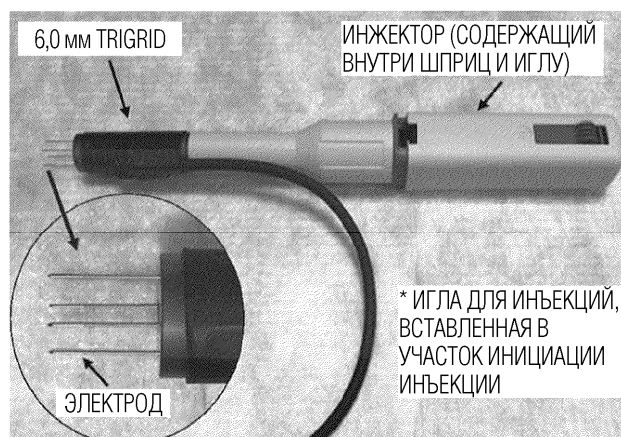
Фиг. 21



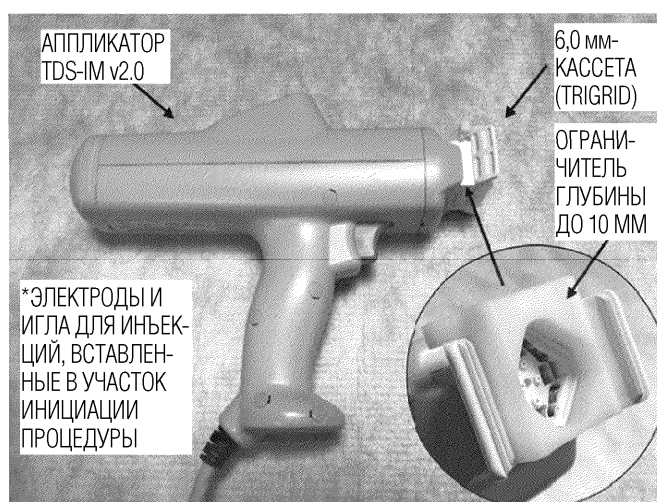
Фиг. 22



Фиг. 23А



Фиг. 23В



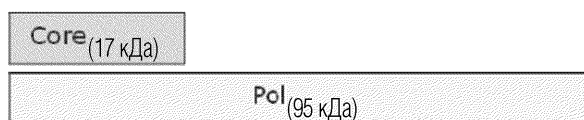
Фиг. 24



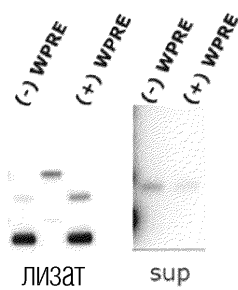
Фиг. 25А



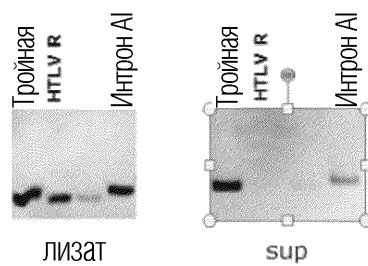
Фиг. 25В



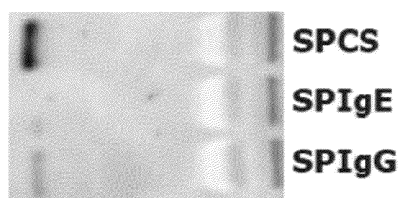
Фиг. 25С



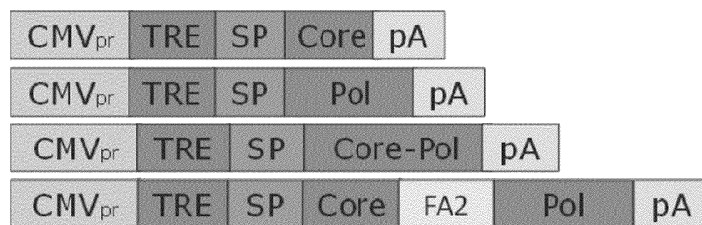
Фиг. 25D



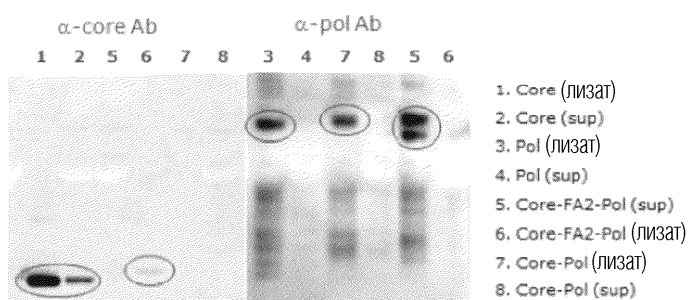
Фиг. 25Е



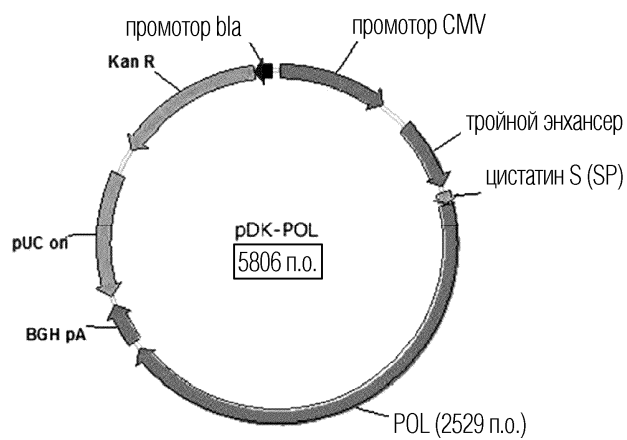
Фиг. 25F



Фиг. 25G



Фиг. 25Н



Фиг. 26А

