



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월25일
(11) 등록번호 10-2436439
(24) 등록일자 2022년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61N 1/32 (2006.01) A61M 37/00 (2006.01)
A61N 1/04 (2006.01) C12M 1/42 (2017.01)
C12N 15/87 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61N 1/327 (2013.01)
A61M 37/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7036357(분할)
(22) 출원일자(국제) 2021년06월28일
심사청구일자 2021년11월05일
(85) 번역문제출일자 2021년11월05일
(65) 공개번호 10-2021-0135370
(43) 공개일자 2021년11월12일
(62) 원출원 특허 10-2020-7030414
원출원일자(국제) 2021년06월28일
심사청구일자 2020년11월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/044539
(87) 국제공개번호 WO 2013/066427
국제공개일자 2013년05월10일
(30) 우선권주장
61/502,198 2011년06월28일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20080091135 A1
US20050048651 A1
US20080312580 A1
US20110046539 A1

(73) 특허권자
이노비오 파마수티컬즈, 인크.
미국 19462 펜실베이니아주 플리머스 미팅 스위트
110 저먼타운 파이크 660
(72) 발명자
브로데릭 케이트
미국 19422 펜실베이니아주 블루 벨 스위트 400 빌
딩 18 센트리 파크웨이 웨스트 1787, 이노비오 파
마수티컬즈, 인크.
캐머리 스테판
미국 19422 펜실베이니아주 블루 벨 스위트 400 빌
딩 18 센트리 파크웨이 웨스트 1787, 이노비오 파
마수티컬즈, 인크.
맥코이 제이
미국 19422 펜실베이니아주 블루 벨 스위트 400 빌
딩 18 센트리 파크웨이 웨스트 1787, 이노비오 파
마수티컬즈, 인크.
(74) 대리인
특허법인차

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 양성연

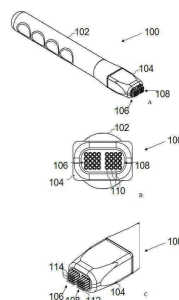
(54) 발명의 명칭 최소 침습 피부 전기천공 장치

(57) 요약

본 개시내용은 전기천공하고 하나 이상의 항원을 전달하는 장치 및 해당 장치를 사용하여 전기천공하고 하나 이
상의 항원을 표피조직의 세포에 전달하는 방법에 관한 것이다. 해당 장치는 하우징, 하우징으로부터 돌출된 다수
의 전극 어레이, 전극에 전기적으로 결합된 펄스 발생기, 펄스 발생기에 전기적으로 결합된 프로그램가능한 마이

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



크로컨트롤러, 및 펄스 발생기 및 마이크로컨트롤러에 결합된 전원을 포함하되, 각각의 전극 어레이는 적어도 하나의 전극을 포함한다. 전극 어레이는 공간적으로 분리된 부위를 정한다.

(52) CPC특허분류

A61N 1/0412 (2013.01)

A61N 1/0476 (2013.01)

C12M 35/02 (2013.01)

C12N 15/87 (2013.01)

A61M 2037/0007 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

전기천공하여 하나 이상의 항원을 전달하기 위한 장치로서,

상기 장치는,

원위(distal) 팁 부분을 갖는 하우징;

각각이 상기 팁 부분에 결합된 복수의 전극 어레이들로서, 상기 전극 어레이들은 상기 팁 부분으로부터 돌출되고 공간적으로 분리된 부위들을 정하며, 상기 전극 어레이 각각은 복수의 전극들을 포함하는 것인, 상기 복수의 전극 어레이들;

상기 각각의 전극 어레이 중 적어도 하나의 전극에 전기적으로 결합된 펄스 발생기;

상기 펄스 발생기에 전기적으로 연결된 프로그램가능한 마이크로컨트롤러로서, 상기 전극 각각은 표피조직의 세포에 전기천공 펄스를 전달하도록 구성되며, 상기 마이크로컨트롤러는 독립적으로 상기 전극 어레이 각각의 상기 전기천공 펄스의 변수를 독립적으로 조절하도록 구성되는 것인, 상기 프로그램가능한 마이크로컨트롤러; 및

상기 펄스 발생기 및 상기 마이크로컨트롤러에 연결된 전원

을 포함하되,

상기 펄스 발생기는 0.01 V 내지 70 V 범위의 전기적 포텐셜에서 각각의 상기 전극 어레이의 적어도 하나의 전극에 전기천공 펄스를 전달하도록 구성되고, 상기 마이크로컨트롤러는 상기 어레이 간의 상기 전기적 포텐셜을 변화시키도록 구성된 것인,

장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전기적 포텐셜은 1 V 내지 30 V 범위인, 장치.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 전기적 포텐셜은 15 V 내지 20 V 범위인, 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 전기천공 펄스는 0.1 mA 내지 100 mA 범위의 전기적 전류와 관련되며, 상기 마이크로컨트롤러는 상기 어레이 간의 상기 전기적 전류를 변화시키도록 구성된 것인, 장치.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 전기적 전류는 1 mA 내지 50 mA 범위인, 장치.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 전기적 전류는 10 mA 내지 20 mA 범위인, 장치.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 전기적 전류는 10 mA 내지 15 mA 범위인, 장치.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 전기천공 펄스는 지속기간과 관련되며, 상기 마이크로컨트롤러는 상기 어레이 간의 상기 지속기간을 변화시키도록 구성된 것인, 장치.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 지속기간은 5 ms 내지 250 ms 범위인, 장치.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 지속기간은 80 ms 내지 150 ms 범위인, 장치.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 지속기간은 100 ms 범위인, 장치.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 마이크로컨트롤러는 독립적으로 각각의 상기 전극 어레이에 대해 각각의 전기천공 펄스의 양을 조절하도록 구성되고, 상기 양은 1 내지 10의 전기천공 펄스인, 장치.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 양은 1 내지 3의 전기천공 펄스인, 장치.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 공간적으로 분리된 부위들은, 상기 전기천공 펄스가 전달될 때 상기 항원의 간섭을 실질적으로 방지하는 것인, 장치.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 전극 어레이 각각에서 상기 복수의 전극들은 각각의 패턴으로 배열되는 것인, 장치.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 전극 어레이 각각에서 상기 복수의 전극들 중 적어도 하나의 전극은 0.1 mm 이하의 길이를 지니는 조직-관통 단부를 포함하는 것인, 장치.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 전극 어레이 각각에서 상기 복수의 전극들 중 적어도 하나의 전극은 0.01 mm 내지 0.04 mm의 길이를 지니는 조직-관통 단부를 포함하는 것인, 장치.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 전기천공 펄스는 상기 표피조직의 상기 세포에서 손상을 실질적으로 방지하는 전기장과 관련된 것인, 장치.

청구항 19

제1항에 있어서, 서로 접한 전극들은 1.0 mm 이하의 길이에서 서로로부터 떨어진 것인, 장치.

청구항 20

제1항에 있어서, 서로 접한 전극들은 1.5 mm 이하의 길이에서 서로로부터 떨어진 것인, 장치.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 전극 어레이 각각에서 상기 복수의 전극들은 상기 전기천공 펄스를 실질적으로 동시에 전달하도록 구성된 것인, 장치.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 전원은 상기 하우징 내에 위치되고 상기 펄스 발생기에 전력을 공급하도록 구성된 배터리이며, 상기 배터리는 상기 장치를 휴대할 수 있게 하고, 상기 배터리는 리튬 이온 배터리, 니켈 금속 수소화물

배터리, 납산(lead acid) 배터리 및 니켈 카드뮴 배터리를 포함하는 그룹에서 선택되는 배터리 유형인, 장치.

청구항 23

전기천공하여 하나 이상의 항원을 전달하기 위한 장치로서,

상기 장치는,

원위(distal) 팁 부분을 갖는 하우징;

각각이 상기 팁 부분에 결합된 복수의 전극 어레이들로서, 상기 전극 어레이들은 상기 팁 부분으로부터 돌출되고 공간적으로 분리된 부위들을 정하며, 상기 전극 어레이 각각은 복수의 전극들을 포함하는 것인, 상기 복수의 전극 어레이들;

상기 각각의 전극 어레이 중 적어도 하나의 전극에 전기적으로 결합된 펄스 발생기;

상기 펄스 발생기에 전기적으로 연결된 프로그램가능한 마이크로컨트롤러로서, 상기 전극 각각은 표피조직의 세포에 전기천공 펄스를 전달하도록 구성되며, 상기 마이크로컨트롤러는 독립적으로 상기 전극 어레이 각각의 상기 전기천공 펄스의 변수를 독립적으로 조절하도록 구성되는 것인, 상기 프로그램가능한 마이크로컨트롤러; 및

상기 펄스 발생기 및 상기 마이크로컨트롤러에 연결된 전원

을 포함하되,

상기 펄스 발생기는 1 V 내지 30 V 범위의 전기적 포텐셜에서 각각의 상기 전극 어레이의 적어도 하나의 전극에 전기천공 펄스를 전달하도록 구성되고, 상기 마이크로컨트롤러는 상기 어레이 간의 상기 전기적 포텐셜을 변화시키도록 구성된 것이고,

상기 전기천공 펄스는 10 mA 내지 20 mA의 전기적 전류와 관련되며, 상기 마이크로컨트롤러는 상기 어레이 간의 상기 전기적 전류를 변화시키도록 구성된 것이고,

상기 전기천공 펄스는 80 ms 내지 150 ms 범위의 지속기간과 관련되며, 상기 마이크로컨트롤러는 상기 어레이 간의 상기 지속기간을 변화시키도록 구성된 것이고,

상기 마이크로컨트롤러는 독립적으로 각각의 전극 어레이에 대해 1 내지 3의 전기천공 펄스의 양을 각각 조절하도록 구성된 것인,

장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련출원과의 상호참조

[0002] 본 출원은 2011년 6월 28일 출원된 미국 가특허 출원 제61/502,198호의 우선권을 주장하며, 이 기초출원은 그것의 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0003] 연방정부 지원된 연구 및 개발

[0004] 본 발명의 대상의 개발에 관한 활동을 미국정부 육군 계약 번호 W81XWH-11-C-0051에 의해 적어도 부분적으로 지원되며, 따라서 미국은 본 발명에 특정 권리를 가질 수 있다.

[0005] 본 발명의 기술분야

[0006] 본 발명은 참을 수 있는 방법으로 공간적으로 분리된 부위에서 동시에 하나 이상의 플라스미드 백신을 전달할 수 있는 전기천공 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 항원 플라스미드를 통한 효과적인 예방접종에 대한 주된 장애는 DNA 백신이 세포 내로 전달될 필요이다. 표준 근육내 주사를 통한 네이키드(naked) DNA의 전달은 설치류 모델 이외에 악명높게 비효율적이다. 역사적으로, 이

는 거대 포유류 및 인간에서 강한 면역 반응을 달성하는데 불능을 유발하였다. 코돈-최적화, RNA 최적화, 리더 서열 첨가 및 최적화된 공통 서열의 발생과 같이 DNA-기반 백신의 발현을 향상시키기 위한 몇몇 전략이 개발되었다. 이들 최적화 전략은 개선된, 교차 반응성 면역 반응을 유발할 수 있다. 공동전달된 유전자 기반 분자 애주번트(adjuvant)의 첨가는 얻어진 면역 반응의 증가가 빈번하게 일어나는 다른 영역이다. 벡터 설계 및 분자 애주번트 사용의 개선에도 불구하고, 원하는 조직, 가장 흔하게는 근육, 종양 또는 피부의 원하는 세포 유형에서 고수준의 플라스미드 발현을 초래하는 DNA 백신의 효율적인 투여 방법에 대한 명확한 필요가 여전히 있다.

[0008] 피부 조직(피내)에 대한 약물 전달은 다수의 이유로 임상적 설정에서 매력적인 방법이다. 피부는 인간 신체 중 가장 큰 기관이며, 가장 접근가능하고, 용이하게 모니터링될 뿐만 아니라 고도로 면역적격성이다. 그러나, 불침투성인 피부 장벽 기능은 효율적인 경피 약물 전달에 대한 주된 장애가 되었다.

[0009] 인간 피부는 대략 2m²의 면적을 포함하고, 평균적으로 약 2.5mm의 두께이며, 인간 신체의 가장 큰 기관이 된다. 통상적으로, 피부는 2가지의 넓은 조직 유형, 즉 표피 및 진피를 가진다. 표피는 지속적으로 케라틴화되는 중층 상피이다. 피부의 가장바깥층은 각질층(stratum corneum: SC)이며, 1차 장벽으로서 작용한다. SC는 생존할 수 없지만, 생화학적으로 활성인 사세포의 15 내지 30개 세포 두께의 층이다. 표피의 다른 3가지 층(과립층(S. granulosum), 유극층(S. spinosum), 기저층(S. basale))은 모두 상이한 분화 단계뿐만 아니라 면역 랑게르한스 세포 및 피부 수지상 세포를 함유한다.

[0010] 경피 약물 전달 및 유전자 전달을 위한 물리적이며 화학적인 방법은 전 세계의 기업에 의해 상세하게 설명되었다. 이온도입법, 지질 전달 및 유전자 총은 이러한 샘플이다. 피부 침투성을 일시적으로 증가시키는 물리적 방법은 전기천공법(electroporation: EP)이다. 전기천공법은 포유류 세포의 지질 이중층 막 내에서 수성 경로의 생성을 초래하는 간략한 전기적 펄스의 적용을 수반한다. 이는 다른 경우에는 덜 침투성인 세포 막을 통해 DNA를 포함하는 거대 분자를 통과시킨다. 이와 같이, 전기천공법은 약물 및 DNA가 그것의 표적 조직에 전달되는 정도 또는 흡수를 증가시킨다.

[0011] 전기천공이 세포 형질전환을 가능하게 하는 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않았지만, 제안된 이론적 모델은 막의 탈안정화에 기인하는 천공 사건 다음에 세포 내로 하전된 분자의 전기 이동적 움직임을 수반한다. 전기천공이 일어나기 위해, 역치 에너지가 달성되고, 전기 이동성 효과에 의해 생성된 움직임이 전기장과 펄스 길이 둘 다에 의존하도록 기공의 형성이 필요하다.

[0012] DNA 백신의 경우에, 전기천공법은 면역 반응을 정량적으로 향상시키고, 해당 면역 반응의 폭을 증가시킬 뿐만 아니라 투약 효율을 개선시켰다. 더 최근에는, DNA-EP 플랫폼은 인간 임상적 상황으로 성공적으로 번역되었고, 몇몇 백신 연구에서 유의하게 개선된 면역 반응을 증명하였다. 따라서, 참을만하며, 사용하기 쉽고, 대량 생산으로 용이하게 처리될 수 있는 한편, 강한 면역 반응을 야기하는 높은 형질감염률을 계속해서 달성하는 피부 전기천공 장치에 대한 필요가 생겼다.

[0013] 다수의 근육내 장치가 현재 성공적으로 임상시험에 들어갔지만, 해당 절차는 일반적으로 침습적이며 통증이 있다. 특히 소아과 환경에서 집단 예방접종될 수 있는 것으로 고려되면, 더 참을 수 있는 전기천공법에 대한 해결책이 필요하다. 따라서, 참을 수 있는 방법으로 다중-작용제(multi-agent) DNA 백신을 전달할 수 있는 효과적인 피부 전기천공 장치가 바람직하다.

발명의 내용

[0014] 본 개시내용은 전기천공하고, 하나 이상의 항원을 전달하기 위한 장치에 관한 것이다. 해당 장치는 하우징, 하우징으로부터 돌출된 다수의 전극 어레이, 전극에 전기적으로 결합된 펄스 발생기, 펄스 발생기에 전기적으로 결합된 프로그램가능한 마이크로컨트롤러, 및 펄스 발생기 및 마이크로컨트롤러에 결합된 전원을 포함하되, 각각의 전극 어레이는 적어도 하나의 전극을 포함한다. 전극 어레이는 공간적으로 분리된 부위를 정한다. 전극은 표피조직의 세포에 전기천공 펄스를 전달하도록 구성된다. 마이크로컨트롤러는 각 전극 어레이의 전기천공 펄스의 변수를 독립적으로 조절하도록 구성된다.

[0015] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 장치를 사용하여 전기천공하여, 하나 이상의 항원을 표피조직의 세포에 전달하는 방법에 관한 것이다. 실시형태에서, 항원은 일반적으로 DNA 백신 DNA 백신 플라스미드, 펩타이드, 소분자, 및 이들의 조합을 포함한다. 해당 방법은 하나 이상의 항원을 표피 조직의 세포에 투여하는 단계, 표피조직을 전극과 접촉시키는 단계 및 전기천공 펄스를 전달하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1(A), 도 1(B) 및 도 1(C)는 실시형태에 따라 EP를 위한 최소 침습 장치(minimally invasive device: MID)의 투시도를 도시한 도면.

도 2는 도 1(A), 도 1(B) 및 도 1(C)의 실시형태의 전기적 시스템의 개략도를 도시한 도면.

도 3(A), 도 3(B) 및 도 3(C)는 다른 실시형태에 따른 EP를 위한 MID의 투시도를 도시한 도면.

도 4는 도 3(A), 도 3(B) 및 도 3(C)의 실시형태의 전기적 시스템의 개략도를 도시한 도면.

도 5(A), 도 5(B) 및 도 5(C)는 (A) 스테인레스강 전극 또는 (B) 금 전극을 지니거나 또는 (C) 대조군으로서 전기천공 없이 주사만을 지니는 MID를 사용하는 플라스미드의 주사 및 전기천공 후 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein: GFP)의 형광 현미경사진을 도시한 도면. GFP 픽셀 강도를 계산하였다 (D).

도 6(A) 및 도 6(B)는 (A) 1mm-간격 어레이(상부) 및 1.5mm-간격 어레이(하부) 전극 핸드 피스(hand piece)의 측면도로서 및 (B) 모두 25 니들 전극을 나타내는 1mm-간격 어레이의 면의 클로즈 업으로서 EP를 위한 MID를 도시한 도면.

도 7(A), 도 7(B) 및 도 7(C)는 1.5mm 또는 1mm 전극 간격 및 (A) 스테인레스강 전극 또는 (B) 금 전극을 지니는 MID를 사용하는 플라스미드의 전기천공 및 주사 후 GFP 발현의 형광 현미경사진을 도시한 도면. 주사만이 있고 전기천공이 없는 설정을 대조군으로서 사용하였다. GFP 픽셀 강도를 계산하였다(C).

도 8은 1.5mm 또는 1mm 전극 간격을 지니는 MID에 대한 전류 및 저항의 그래프를 도시한 도면. 전극은 조성물에서 금 또는 스테인레스강(stainless steel: SS) 중 하나였다.

도 9는 5 또는 15볼트에서 1.5mm 또는 1mm 전극 간격으로 MID에 대한 전류 및 임피던스의 그래프를 도시한 도면.

도 10(A)는 5 또는 15볼트에서 1.5mm 또는 1mm 전극 간격으로 MID를 사용하는 플라스미드의 전기천공 및 주사 후 GFP 발현의 형광 현미경사진을 도시한 도면. GFP 픽셀 강도를 계산하였다(B).

도 11(A)는 15볼트에서 1.5mm 또는 1mm 전극 간격으로 MID를 사용하는 플라스미드의 상이한 농도(0.5, 0.25 및 0.1 mg/ml)의 전기천공 및 주사 후 GFP 발현의 형광 현미경사진을 도시한 도면. GFP 픽셀 강도를 계산하였다(B).

도 12(A), 도 12(B) 및 도 12(C)는 MID를 사용하는 플라스미드의 전기천공 및 주사 후 림프구 염색의 형광 현미경사진을 도시한 도면. 도 12(A)는 20x 배율에서 미처리 동물에서 피부 생검이다. 도 12(B)는 20x 배율에서 플라스미드 발현 GFP로 처리한 동물로부터의 피부 생검이다. 도 12(C)는 도 12(B)의 샘플이지만, 40x 배율이다.

도 13(A)는 실시형태에 따른 EP를 위한 MID의 투시도를 도시한 도면, 도 13(B)는 4x4 어레이 및 1.5mm 간격의 사진을 도시한 도면, 도 13(C)는 5x5 어레이 및 1.0mm 간격을 지니는 MID의 사진 및 도 13(D)는 도 13(B) 및 13(C)에서 MID의 병렬 비교를 나타내는 사진을 도시한 도면.

도 14는 피내 주사 단독 후 GFP 발현(EP 없음)과 비교하여, 보고유전자 플라스미드의 피내 투여 및 도 13(B)의 이중헤드 MID에 의한 EP 후 GFP 발현을 나타내는 형광 현미경사진을 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

본 발명은 포유류에 항원의 이중성 피내 전달을 제공할 수 있는 전기천공 장치에 관한 것이다. 하나 이상의 항원은 다수의 전극 어레이를 갖는 최소 침습 장치(minimally invasive device: MID)를 통해 참을 수 있는 방식으로 공간적으로 분리된 부위에 동시에 전달될 수 있다. 전극 어레이는 어레이 간의 전기천공 펄스를 변화시키도록 구성된다. 예를 들어, 각각의 전극 어레이는 독립적으로 및 선택적으로 활성화되거나 또는 제어될 수 있다. 따라서, MID는 항원의 이중성 전달을 가능하게 한다. 이 MID를 통한 피부 전기천공법은 피험체의 피부에 백신을 효과적으로 전달하는 임상적으로 허용가능한 방법을 반영한다. 이 장치는 다양한 형태(핵산, 단백질, 소분자 또는 이들의 조합)로 다양한 백신을 동시에 전달하는 한편, 다양한 항원의 공동 전달로부터 초래되는 면역간섭에 관한 잠재적인 걱정을 제거하도록 처리될 수 있다. 또한 1회 치료 동안 더 높은 용량의 단일 항원을 전달하는 능력을 허용한다.

[0018]

1. 정의

[0019]

본 명세서에 사용된 용어는 단지 특정의 실시형태를 기재하는 목적을 위한 것이며, 제한하는 것으로 의도되지

않는다. 본 명세서 및 첨부되는 특허청구범위에 사용되는 바와 같이, 단수의 형태는 달리 명확하게 언급되지 않는다면 복수의 대상을 포함한다.

[0020] 본 명세서의 수치적 범위의 인용을 위해, 동일한 정도의 정확성으로 사이에 있는 숫자가 명확하게 고려된다. 예를 들어, 6 내지 9의 범위에 대해, 숫자 7 및 8은 6 및 9에 추가로 그리고 범위 6.0 내지 7.0에 추가로 고려되며, 숫자 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 및 7.0이 명확하게 고려된다.

[0021] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "전기천공법"은 생체막 내 미세한 경로(기공)를 유발하는 막관통 전기장의 사용을 지칭하며; 기공의 존재는 생체분자, 예컨대 플라스미드, 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 약물, 이온 및 물이 세포막의 한 측면으로부터 다른 측면으로 일시적으로 통과하게 한다.

[0022] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "최소 침습"은 제공된 EP 장치의 바늘 전극에 의한 제한된 관통을 지칭하며, 비침습적 전극(또는 비관통 바늘)을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 관통은 각질층을 관통하는 정도이며, 바람직하게는 가장 바깥의 살아있는 조직층인 과립층 내로 유입되지만, 기저층을 관통하지는 않는다. 관통 깊이는 바람직하게는 0.1mm를 초과하지 않으며, 일부 실시형태에서, 각질층을 뚫고 나간 관통 깊이는 약 0.01mm 내지 약 0.04mm의 범위에 있다. 이는 각질층을 통한 침투를 허용하며 더 깊은 침투를 회피하는 침단을 제공하는 트로카(trocar) 단부 바닥을 갖는 전극을 사용하여 수행될 수 있다.

[0023] 용어 "참을 수 있는" 및 "통증이 거의 없는"은 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용되고, EP를 지칭할 때, 전형적으로 이용가능한 EP 장치에 관해서보다 EP와 관련된 실질적으로 더 낮은 통증 수준을 의미한다. 더 구체적으로는, 각질층과 기저층 사이의 상피층에 낮은 전기장을 전달함과 함께 근육의 EP를 회피하는, 참을 수 있는 또는 통증이 거의 없는 EP는 본 명세서에 기재된 장치를 사용하는 조합의 결과이다. 바람직하게는, 전기장은 저전압 수준, 예를 들어 0.01V 내지 70V, 또는 1V 내지 15V를 포함할 것이다. 시각적 아날로그 스케일을 사용하여 측정할 때, 본 명세서에 제공된 방법에 따라 본 명세서에 기재된 장치를 지니는 EP를 경험하는 피험체는 그들의 통증없음 또는 무통증 스코어로부터 (전체 스케일의) 20% 내인, 또는, 예를 들어 0 내지 10의 전체 스케일에 의해 2 포인트 내인, 바람직하게는 그들의 통증 없음 스코어로부터 10% 내인 통증 수준을 경험한다.

[0024] 용어 "실질적으로 손상을 방지하는"은 상기 세포를 천공하기 위해 그리고 동일 세포에 대해 최소의 식별가능한 손상을 야기하기 위해 표적 세포에 기재된 장치에 의해 전달되는 에너지의 양을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 바람직하게는, 이러한 세포에 대해 식별가능한 거시적 조직학적 손상 또는 변성이 없다.

[0025] 2. 최소 침습 장치

[0026] 본 발명은 어레이 간에 전기천공 펄스를 다르게 하도록 구성된 다수의 전극 어레이를 갖는 최소 침습 장치(minimally invasive device: MID)에 관한 것이다. 도 1(A), 도 1(B) 및 도 1(C)는 전기천공하고, 하나 이상의 항원을 전달하기 위한 다수의 전극 어레이를 갖는 MID(100)를 개시한다. MID(100)는 팁 부분(104)을 갖는 하우징(102), 팁 부분(104)에 결합된 다수의 전극 어레이(106, 108)를 포함하되, 각각의 전극 어레이(106, 108)는 정사각형 4×4 패턴으로 배열된 전극(110)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 팁 부분(104) 및 전극(110) 중 하나 또는 둘 다는, 예를 들어 사용 후 멸균화를 위해 MID(100)의 나머지에서 탈착될 수 있고, 따라서 탈착된 부분은 다시 사용될 수 있다. 대안적으로, 팁 부분(104) 및 전극(110) 중 하나 또는 둘 다는 1회용일 수 있다.

[0027] 전극 어레이(106, 108)는 공간적으로 분리된 부위를 정한다. 도 1(A), 도 1(B) 및 도 1(C)가 2개의 전극 어레이(106, 108)를 포함하는 것과 같이 MID(100)를 도시하지만, 다른 실시형태에서, MID(100)는 2 이상의 전극 어레이, 예를 들어 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상 또는 10 이상의 전극 어레이를 포함할 수 있다.

[0028] 일부 실시형태에서, 각각의 어레이(106, 108)는 각각 0.1mm, 0.2mm, 0.3mm, 0.4mm, 0.5mm, 1.0mm, 1.5mm, 2.0mm, 2.5mm, 3.0mm, 3.5mm, 4.0mm, 4.5mm, 5mm, 6.0mm, 7.0mm, 8.0mm, 9.0mm 또는 10.0mm의 길이를 갖는 전극(110)의 4×4 어레이를 포함할 수 있다. 예시된 실시형태에서, 각각의 어레이(106, 108)가 전극(110)의 4×4 어레이, 즉, 16개의 전극(110)을 포함하지만, 각각의 어레이(106, 108)는 각각 다른 수 및/또는 패턴의 전극(110)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 각각의 어레이(106, 108)는 각각 1×1, 1×2, 1×3, 1×4, 1×5, 1×6, 1×7, 1×8, 1×9, 1×10, 2×1, 2×2, 2×3, 2×4, 2×5, 2×6, 2×7, 2×8, 2×9, 2×10, 3×1, 3×2, 3×3, 3×4, 3×5, 3×6, 3×7, 3×8, 3×9, 3×10, 4×1, 4×2, 4×3, 4×4, 4×5, 4×6, 4×7, 4×8, 4×9, 4×10, 5×1, 5×2, 5×3, 5×4, 5×5, 5×6, 5×7, 5×8, 5×9, 5×10, 6×1, 6×2, 6×3, 6×4, 6×5, 6×6, 6×7, 6×8, 6×9, 6×10, 7×1, 7×2, 7×3, 7×4, 7×5, 7×6, 7×7, 7×8, 7×9, 7×10, 8×1, 8×2, 8×3, 8×4, 8×5, 8×6, 8×7, 8×8, 8×9, 8×10, 9×1, 9×2, 9×3, 9×4, 9×5, 9×6, 9×7, 9×8, 9×9, 9×10, 10×

1, 10×2, 10×3, 10×4, 10×5, 10×6, 10×7, 10×8, 10×9, 10×10 또는 11 내지 100의 곱 및 이들의 임의의 조합의 패턴으로 배열된 전극(110)을 포함할 수 있다. 패턴은 다양한 형상, 예컨대 정사각형, 삼각형, 직사각형, 평행 사변형, 원 또는 다른 임의의 기하학적 형상으로 배열될 수 있다. 바늘형 전극(110)은 금, 백금, 티타늄, 스테인레스강, 알루미늄 또는 임의의 다른 전도성 재료를 포함할 수 있다. 전극은 금속, 예컨대 금, 구리, 백금, 은 또는 임의의 다른 전도성 재료로 코팅되거나 또는 플레이팅될 수 있다.

[0029] 일부 실시형태에서, 각각의 전극(110)은 바늘형이다. 즉, 전극(110)은 각각 샤프트(112) 및 점점 가늘어지는 조직-관통 또는 트로카 단부(114)를 포함한다. 도 2(B)는 일반적으로 원통형으로 되는 전극(110)을 도시하며, 다른 실시형태에서, 전극(110) 중 적어도 하나는, 반원통형, 규칙적 다면체 및 불규칙적 다면체 형상, 이들의 유도체 및 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 기하학적 형태로 추정될 수 있다. 조직-관통 단부(114)는 전극(110)이 각질층을 관통하여, 과립층에 도달되는 것을 용이하게 한다. 일부 실시형태에서, 조직-관통 단부(114)는 전극(110)이 각질층을 통과하게 하지만, 깊은 관통을 회피한다. 이것을 위하여, 조직-관통 단부(114)는 약 0.1mm 이하, 또는 약 0.01mm 내지 약 0.04mm의 길이를 가질 수 있다.

[0030] 도시된 전극(110)은 표피조직의 세포에 전기천공 펄스를 전달하도록 구성된다. 일부 실시형태에서, 전기천공 펄스는 표피조직의 세포에서 실질적으로 손상을 방지하는 전기장과 관련된다. 추가 실시형태에서, 전기천공 펄스는 시각적 아날로그 스케일에 의해 측정되는 바와 같이 통증의 거의 없는 전기적 포텐셜과 관련된다. 시각적 아날로그 스케일은 0mm가 통증 없음을 표시하고 100mm가 최악의 통증을 표시하는 본질적으로 100-mm-길이의 수평선이다. 통증이 거의 없음은 약 20mm이하(95% 신뢰구간 내) 및 바람직하게는 10mm 이하(95% 신뢰구간 내)의 평균 스코어를 생성하는 시각적 아날로그 스케일을 사용하는 스코어이다.

[0031] 일부 실시형태에서, 서로 접한 전극(110)은 약 1.5mm 이하의 거리로 서로 떨어져 있다. 추가 실시형태에서, 서로 접한 전극(110)은 약 1.0mm 이하의 거리로 서로 떨어져 있다. 전극(110) 사이의 더 짧은 거리는 전극(110)이 MID(100)의 효능을 증가시킬 수 있는 더 밀집한 방식으로 채워지며, 따라서 바람직할 수 있다는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 각각의 전극(110)은 150mm 이하, 100mm 내지 1.0mm, 50mm 내지 1.0mm, 40mm 내지 1.0mm, 30mm 내지 1.0mm, 20mm 내지 1.0mm, 10mm 내지 1.0mm, 5.0mm 내지 2.0mm, 5.0mm 내지 1.0mm, 대략 2.0mm, 대략 1.5mm 또는 대략 1.0mm의 거리로 각각의 인접한 전극(110)과 떨어질 수 있다.

[0032] 도 2를 참조하면, 펄스 발생기(116, 118)는 각각의 전극 어레이(106, 108)에 전기적으로 결합된다. 일부 실시형태에서, 펄스 발생기(116, 118) 중 적어도 하나는 엘젠(Elgen) 1000(펜실베이니아주 블루벨에 소재한 이노비오 파마슈티컬스 인코포레이티드(Inovio Pharmaceuticals, Inc.)) 펄스 발생기(도시하지 않음)일 수 있다. 그러나, 다른 실시형태에서, 전기천공 펄스는 다른 적합한 메커니즘을 사용하여 발생될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 프로그램가능한 마이크로컨트롤러(120)는 펄스 발생기(116, 118)에 전기적으로 결합된다. 입력 조건/신호에 반응하여, 마이크로컨트롤러(120)는 각각의 전극 어레이(106, 108)에 대한 사용 필요 또는 선호도에 따라서 독립적으로 각각의 전극 어레이(106, 108)의 EP 변수를 조절할 수 있다. 따라서, 마이크로컨트롤러(120)는 어레이 간의 전기천공 펄스를 변화시키도록 구성된다. 예를 들어, 펄스 전압, 전류, 지속기간 및 적용된 전기적 펄스의 양은 각각의 주사 부위에 적용된 cm² 당 줄(Joule)을 변화시키기 위해 어레이 간에 변할 수 있다. 일부 실시형태에서, 마이크로컨트롤러(120)는 실질적으로 동시에 전기천공 펄스를 전달하도록 구성된다. 도시된 실시형태에서, 각각의 전극 어레이(106, 108)는 각각의 펄스 발생기(116, 118)에 의해 구동된다. MID(100)는 또한 펄스 발생기(116, 118)에 결합된 전원(122) 및 전력을 제공하기 위한 마이크로컨트롤러(120)를 포함한다. 예시적 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 전원(122)과 동일한 기능을 수행하는 다른 전원이 대신 사용될 수 있지만, 전원(122)은 고전압 및 저전압 공급원이다.

[0033] 일부 실시형태에서, 각각의 전극 어레이(106, 108)의 전기천공 펄스는 0.01V 내지 70V, 0.01V 내지 50V, 0.01V 내지 40V, 0.01V 내지 30V, 0.01V 내지 20V, 0.01V 내지 15V, 0.1V 내지 70V, 0.1V 내지 50V, 0.1V 내지 40V, 0.1V 내지 30V, 0.1V 내지 20V, 0.1V 내지 15V, 1V 내지 30V, 1V 내지 20V, 1V 내지 15V, 15V 내지 30V 또는 15V 내지 30V의 전기적 포텐셜과 관련된다. 추가 실시형태에서, 시각적 아날로그 스케일에 의해 측정되는 바와 같이 전기적 포텐셜은 바람직하게는 EP가 참을만하거나 또는 통증이 거의 없도록 낮고, 또한 표피조직 내 세포의 형질감염을 달성하도록 충분히 높다. 예를 들어, MID(100)의 인접한 전극(110)이 1.0mm 내지 2.0mm만큼 떨어질 때, 전기적 포텐셜은 5V, 10V, 15V 또는 일부 실시형태에서 20V일 수 있다.

[0034] 일부 실시형태에서, 전극 어레이(106, 108)의 각각의 전기천공 펄스는 0.1mA 내지 100mA, 0.2mA 내지 100mA, 0.5mA 내지 100mA, 1mA 내지 100mA, 1mA 내지 80mA, 1mA 내지 60mA, 1mA 내지 50mA, 1mA 내지 40mA, 1mA 내지 30mA, 10mA 내지 50mA, 10mA 내지 40mA, 10mA 내지 30mA, 10mA 내지 20mA, 또는 10mA 내지 15mA, 또는 대략 10

mA, 또는 일부 실시형태에서 대략 20mA의 전기적 전류와 관련된다. 전기적 포텐셜과 유사하게, 전기적 전류는 바람직하게는 EP가 참을만하거나 또는 통증이 거의 없도록 낮고, 또한 표피조직 내 세포의 형질감염을 달성하도록 충분히 높다.

[0035] 일부 실시형태에서, 각각의 전극 어레이(106, 108)의 전기천공 펄스는 5ms 내지 250ms, 10ms 내지 250ms, 20ms 내지 250ms, 40ms 내지 250ms, 60ms 내지 250ms, 80ms 내지 250ms, 100ms 내지 250ms, 20ms 내지 150ms, 40ms 내지 150ms, 60ms 내지 150ms, 80ms 내지 150ms, 100ms 내지 150ms, 100ms 내지 140ms, 100ms 내지 130ms, 100ms 내지 120ms, 100ms 내지 110ms, 또는 대략 100ms의 지속기간과 관련된다. 일부 실시형태에서, 지속기간은 바람직하게는 EP가 참을만하거나 또는 통증이 거의 없도록 짧고, 또한 표피조직 내 세포의 형질감염을 달성하도록 충분히 길다.

[0036] 일부 실시형태에서, 마이크로컨트롤러(120)는 독립적으로 각각의 전극 어레이(106, 108)에 대한 전기천공 펄스의 각각의 양을 조절하도록 구성되고, 전기적 펄스의 수는 1 펄스 이상, 2 펄스 이상, 3 펄스 이상, 4 펄스 이상, 5 펄스 이상, 6 펄스 이상, 7 펄스 이상, 8 펄스 이상, 9 펄스 이상, 10 펄스 이상, 20 펄스 이상, 30 펄스 이상, 40 펄스 이상, 50 펄스 이상, 60 펄스 이상, 70 펄스 이상, 80 펄스 이상, 90 펄스 이상 또는 100 펄스 이상일 수 있다. 전기천공 펄스의 양을 증가시키고, 펄스 당 에너지를 감소시킴으로써, 피험체에 의해 감지되거나 또는 경험되는 통증의 양은 또한 더 높은 에너지에서 소수의 펄스와 비교할 때 감소될 수 있다. 바람직하게는, 발생되는 면역 반응을 감소시키지 않는 더 낮은 수의 펄스는, 피험체에 의해 경험되는 통증을 더 적게 만들기 때문에 사용된다. 더 나아가, 펄스 당 더 낮은 에너지를 사용함으로써 통증은 줄어들며, 더 양호하게 참을 수 있게 된다. 일부 실시형태에서, 전기천공 펄스의 양은 약 1 펄스 내지 약 10 펄스, 바람직하게는 약 1 펄스 내지 약 10 펄스, 및 더 바람직하게는 약 1 펄스 내지 약 3 펄스이다. 일부 실시형태에서 3가지의 펄스가 사용된다.

[0037] 일부 실시형태에서, 전극 어레이(106, 108)는 전기천공 펄스가 전달될 때 2개의 어레이(106, 108)에 의해 전달되는 두 항원의 간섭을 실질적으로 방지하기 위한 거리만큼 적어도 서로로부터 떨어진다. 플라즈마 간섭은 그것들이 피부 내 동일 부위에서 순차적으로 전달될 때 다수의 항원에 대해 관찰되었다. 특정 이론에 구속되지 않고, 이는 전사적 수준(프로모터에서 가능한 경쟁 등) 또는 번역 수준(단백질 수준에서 미스 폴딩 또는 이합체화)에서 간섭에 기인할 수 있다. 다수의 간격이 있는 전극 어레이(106, 108)를 갖는 MID(100)는 얻어진 면역 반응에 부정적으로 영향을 미칠 수 있는 이런 간섭 효과를 제거할 수 있다. 게다가, 다수의 전극 어레이(106, 108)를 갖는 MID(100)는 처치된 피험체가 한 번의 처치사건을 경험하게 하며, 따라서 경험되는 통증이 감소되게 하여, 두 번의 별개의 처치에 대한 필요를 없앨 수 있었다.

[0038] 일부 실시형태에서, MID(100)는 각각의 전극 어레이(106, 108)를 선택적으로 활성화시키기 위한 각각의 전극 어레이(106, 108)에 전기적으로 결합된 스위치(도시하지 않음)를 포함한다. 예를 들어, MID(100)는 풋 페달 또는 방아쇠 또는 전기 회로에 연결된 임의의 다른 방아쇠에 의해 촉발될 수 있다.

[0039] 도 3 및 도 4는 다른 실시형태에 따른 펄스 발생기(202)를 포함하는 MID(200)를 도시한다. 이 실시형태는 크게 동일한 구조를 사용하며, 도 1(A) 내지 도 1(C)와 함께 상기 기재된 MID(100)의 실시형태와 동일한 다수의 특성을 가진다. 따라서, 다음의 설명은 도 1(A) 내지 도 1(C)와 함께 상기 기재된 실시형태와 상이한 구조 및 특징에 주로 초점을 둔다. 도 1(A) 내지 도 1(C)의 실시형태의 구조 및 특징에 대응되는 도 3 및 도 4에 나타난 실시형태의 구조 및 특징은 본 명세서에서 이후에 동일한 참조 번호로 지정된다.

[0040] 이 실시형태에서, 펄스 발생기(202)는 배터리(204)에 의해 전력이 공급된다. 예시적 실시형태에서, 배터리(204)는 하우징(102) 내에 있다. 이와 같이, MID(200)는 휴대용일 수 있다. 배터리(204)는 리튬 이온, 니켈 금속 수소화물, 납산(lead acid) 또는 니켈 카드뮴 배터리일 수 있다.

[0041] 도 4를 참조하면, 펄스 발생기(202)는 고 및 저 전압 드라이버이다. 이 실시형태에서 펄스 발생기(202)는 전극 어레이(106, 108)를 구동시킨다. 마이크로컨트롤러(206)는 펄스 발생기(202)에 전기적으로 결합된다. 마이크로컨트롤러(206)는, 예를 들어 입력 조건/신호에 반응하여 독립적으로 각각의 전극 어레이(106, 108)의 전기천공 변수를 조절할 수 있다. 펄스 발생기(202)는 마이크로컨트롤러(206)에 의해 조절된 바와 같은 EP 변수에 의해 그리고, 배터리(204)와 협력하여 펄스를 발생시킬 수 있으며, 필요하다면 발생된 펄스를 증폭시킬 수 있다.

[0042] 3. 전기천공하고, 하나 이상의 항원을 전달하는 방법

[0043] 양태에서, 본 명세서에 기재된 다수의 전극 어레이(106, 108)를 갖는 MID(100, 200)는 이하에 논의되는 바와 같이 피험체의 피부, 기관 또는 다른 신체 부분을 통해 전기천공하고, 하나 이상의 항원을 전달하는 방법에 사용

될 수 있다. 즉, MID(100, 200)는 생체막 내 미시적 경로(기공)가 세포막의 한 측면으로부터 다른 측면까지 하나 이상의 항원을 전달하도록 유도하는 막관통 전기장 펄스를 적용하기 위해 사용될 수 있다. 해당 방법은 표피 조직의 세포에 항원을 투여하는 단계, 표피조직을 전극과 접촉시키는 단계 및 면역 반응을 발생시키는 전기천공 펄스를 전달하는 단계를 포함할 수 있다. 해당 방법은 세포에 항원을 동시에 전달하는 단계 및 면역 반응을 발생시키도록 전기천공 펄스를 전달하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

● 표피 조직의 세포에 항원을 투여하는 단계

다수의 항원은 공간적으로 분리된 부위에서 피내로 처음 주사된다. 일부 실시형태에서, 항원은 맨투스(Mantoux) 기법을 사용하여, 예를 들어 29 게이지 주사 바늘을 사용하여 표적 조직에 피내로 전달된다.

● 표피 조직을 전극과 접촉시키는 단계

다음에, 표피조직은 약 0.1mm 이하, 또는 약 0.01mm 내지 약 0.04mm의 깊이에서 적어도 하나의 전극(110)에 의해 관통된다. 주사 부위 및 조직-관통 부위는 바람직하게는 함께 위치된다. 일부 예에서, 주사 부위 및 조직-관통 부위를 함께 위치시키거나 또는 중앙으로 위치시키는 것을 가능하게 하기 위해, 표피조직은 피내 주사 전 표 시되거나 또는 자국을 낼 수 있다.

● 전기천공 펄스를 전달하는 단계

일단 표피조직이 관통되면, 표피조직은 전극(110)과 접촉되고, 전기관통 펄스는 전달된다. 일부 실시형태에서, 전기천공 펄스는 표피조직의 세포에 대한 손상을 실질적으로 방지하는 전기장과 관련된다. 추가 실시형태에서, 전기천공 펄스는 시각적 아날로그 스케일에 의해 측정된 바와 같이 통증이 거의 없는 전기적 포텐셜과 관련된다. 예를 들어, 전기천공 펄스는 약 1볼트 내지 약 30볼트, 또는 바람직하게는 약 15볼트 내지 약 20볼트의 전기적 포텐셜, 1mA 내지 약 50mA, 또는 바람직하게는 약 10mA 내지 약 15mA의 전기적 전류, 및 약 80ms 내지 약 150ms, 또는 바람직하게는 100ms 범위의 지속 기간 또는 이들의 조합과 관련된다. 이들 펄스는 연속해서, 바람직하게는 1 펄스 내지 10 펄스 및 더 바람직하게는 1 펄스 내지 3 펄스로 전달될 수 있다.

통상적인 피내 전달에 대한 단점은 피부에 전달될 수 있는 용적에 대한 제한이다. 1회용 바늘 주사에 대해, 피부 층간박리에 의한 문제 때문에 일반적으로 100 내지 150 μ l 이하의 용적이 피부에 직접 전달될 수 있다. 항원이 과량의 10mg/ml를 초과하지 않는 농도라면 생성될 수 있기 때문에, 용적 제한은 얻어진 용량을 제한할 수 있다.

일부 실시형태에서, MID(100, 200)는 더 높은 용량의 1회용 백신을 바람직하게 전달할 수 있다. MID(100, 200)의 사용은 100 내지 150 μ l의 1회용 주사 용적 제한을 회피한다. 일부 실시형태에서, 상당히 더 높은 용량이 환자에게 어떤 불편함을 더하지 않고 1회 치료로 동시에 전달될 수 있다. 더 높은 용량을 전달하는 능력은 구체적인 백신에 대한 결과 면역 반응에 대해 유효한 양성 효과를 가질 수 있었다. 멀티헤드(multi-head) 장치의 사용은 또한 단일 어레이 장치보다 더 많은 세포를 직접 표적화하는 추가된 이점을 가진다. 항원으로 형질감염된 증가된 수의 세포는 항원 제시 세포에 대한 증가된 제시를 통해 개선된 면역 반응을 야기할 수 있었다.

일부 실시형태에서, 개시된 방법은 포유류와 같은 피험체에 투여될 수 있다. 포유류는 인간, 원숭이, 개, 고양이, 가축, 기니아 피그, 마우스 또는 래트일 수 있다. 가축은, 예를 들어 소, 돼지, 양 또는 암소일 수 있다.

4. 항원

본 발명은 또한 상기 논의한 바와 같이 다수의 전극 어레이(106, 108)를 갖는 MID(100, 200)를 사용하여 적어도 하나의 항원을 전달하는 방법에 관한 것이다. 해당 방법은 MID(100, 200)에 의한 이중성 전달을 사용하는 2 이상의 항원 또는 이들의 조합의 전달에 관한 것일 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MID(100, 200)는 항원의 전달을 향상시키도록 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "항원"은 신체에 도입될 때 면역 반응을 유발하는(면역성을 생성하는) 임의의 물질 또는 유기체를 지칭한다.

일부 실시형태에서, 항원은 감염성 작용제 또는 자기-항원, 예를 들어 전립선-특이적 항원(prostate-specific antigen: PSA) 또는 전립선-특이적 막 항원(prostate-specific membrane antigen: PSMA)과 같은 전립선 암 항원으로부터 전달될 수 있다. 사용되는 특정 항원은 중요하지 않다. 항원은 당업계에 공지되어 있으며, 임의의 통상적인 방법을 사용하여 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물에서 사용을 위해 도입될 수 있다. 본 명세서에 기재된 다양한 양태 및 실시형태에서 사용을 위한 적합한 항원의 비제한적 열거는, 예를 들어 문헌[BioCarb Chemicals Catalogue; 및 The Jordan Report: Accelerated Development of Vaccine 1995 NIH, Bethesda, Md.,

1995]에서 발견할 수 있으며, 이들은 본 명세서에 참조로서 포함된다. 항원은 핵산, 펩타이드, 소분자, 화학치료제, 면역치료제 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 항원은 면역원을 포함할 수 있다.

[0057] 일부 실시형태에서, 항원은 핵산을 포함한다. 핵산은 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 화합물을 지칭하며, 표준 포스포다이에스터 결합 또는 다른 결합에 의해 공유적으로 결합된 질소의 헤테로사이클릭 염기 또는 염기 유사체를 갖는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오사이드 유사체를 포함한다. 핵산은 RNA, DNA, 키메라 DNA-RNA 중합체, 또는 이들의 유사체를 포함할 수 있다. DNA는 관심의 특정 항원을 발현시키는 플라스미드일 수 있다. 예를 들어, 플라스미드는 싱크온(SynCon) 인플루엔자 작제물(펜실베이니아주 블루벨에 소재한 이노비오 파마슈티컬스 인코포레이티드(Inovio Pharmaceuticals, Inc.))일 수 있다.

[0058] 일부 실시형태에서, 항원은 펩타이드를 포함한다. 펩타이드는 임의의 아미노산 서열을 포함한다. 펩타이드는 합성이거나 또는 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 펩타이드는 단백질일 수 있다. 펩타이드는 항체 또는 항체 단편일 수 있다.

[0059] 일부 실시형태에서, 항원은 소분자를 포함한다. 소분자는 유기 및 무기 화합물을 포함한다.

[0060] 일부 실시형태에서, 항원은 화학치료제를 포함한다. 화학치료제는, 예를 들어 메토티렉세이트(아메토티데린), 독소루비신(아드리마이신), 다우노루비신, 사이토신 아라비노사이드, 에토포사이드, 5-플루오로유라실, 멜팔란, 클로람부실 및 다른 질소 머스타드(예를 들어, 사이클로스파마이드), 시스-플라틴, 빈데신(및 다른 빈카 알칼로이드), 미토마이신, 블레오마이신, 퓨로티오닌(보리가루 올리고펩타이드), 마크로모마이신, 1, 4-벤조퀴논 유도체 및 트레니몬을 포함할 수 있다.

[0061] 일부 실시형태에서, 항원은 사이토카인을 포함한다. 사이토카인은 세포 간에 국소적으로 신호를 운반하는 면역계의 세포에 의해 분비된 물질을 지칭한다. 사이토카인은 단백질, 펩타이드 및 글라이코단백질을 포함한다. 사이토카인은, 인터페론, 케모카인, TGF- β , TNF- α 및 인터류킨을 포함한다. 인터류킨은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-35 및 IL-36을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 사이토카인은 인간 공급원 또는 인간 유전자를 발현시키는 유전자이식 비인간 공급원으로부터 유래될 수 있다.

[0062] 항원은 미생물 항원, 예컨대 기생충 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원, 암 항원, 코카인 및 니코틴 유도체와 같은 백신 항원 첨가 약물, 약물 또는 사멸된 박테리아, 약물 또는 사멸된 바이러스, 자가면역 항원 또는 비구조적 단백질 항원 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 항원은 적어도 하나의 독감, 자가면역, 코카인 또는 암 항원을 포함한다.

[0063] 일부 실시형태에서, 항원은 탄수화물계 백신에서 사용될 수 있는 박테리아 표면 다당류로부터 유래된 임의의 항원을 포함한다. 박테리아는 전형적으로 당단백질, 당지질, 지질다당류의 O-특이적 측쇄, 헤파다당 등의 부분으로서 세포 표면 상의 탄수화물을 발현시킨다. 적합한 박테리아 균주의 비제한적 예는 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 클렙시엘라 종(*Klebsiella* spp.), 슈도모나스 종(*Pseudomonas* spp.), 살모넬라 종(*Salmonella* spp.), 쉬겔라 종(*Shigella* spp.), 및 그룹 B 스트렙토코커스(*Group B streptococci*)를 포함한다. 일부 실시형태에서 임의의 공지된 박테리아 탄수화물 에피토프(예를 들어, 문헌[Sanders, et al. *Pediatr. Res.* **1995**, *37*, 812-819; Bartoloni, et al. *Vaccine* **1995**, *13*, 463-470; Pirofski, et al., *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 2906-2911]; 미국특허 제6,413,935호; 및 국제특허출원 공개 WO 93/21948호에 기재된 것)는 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에서 항원으로서 사용될 수 있다.

[0064] 일부 실시형태는 바이러스 항원을 포함하는 항원을 제공한다. 바이러스 항원의 비제한적 예는 HIV(예를 들어, gp120, nef, tat, pol), 인플루엔자 및 웨스턴 나일 바이러스(West Nile Virus: WNV)로부터 유래된 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원은 전부 사멸된 바이러스 또는 약독된 바이러스를 포함할 수 있다.

[0065] 일부 양태는 진균 항원을 제공한다. 진균 항원의 비제한적 예는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 콕시도이데스 종(*Coccidoides* spp.), 히스토플라스마 종(*Histoplasma* spp.) 및 아스페질러스 종(*Aspergillus* spp.)으로부터 유래된 것을 포함한다.

[0066] 일부 실시형태는 기생충으로부터 유래된 항원을 제공한다. 기생충 항원의 비제한적 예는 플라즈모듐 종(*Plasmodium* spp.), 트립파노소마 종(*Trypanosoma* spp.), 쉬스토소마 종(*Schistosoma* spp.), 리시마니아 종

(*Leishmania* spp.) 등으로부터 유래된 것을 포함한다.

[0067] 일부 실시형태에서, 항원은 탄수화물 에피토프를 포함한다. 본 명세서에 기재된 양태 및 실시형태에 사용될 수 있는 탄수화물 에피토프의 비제한적 예는: Gal α 1,4Gal β (박테리아 백신에 대해); GalNAc α (암 백신에 대해); Man β 1,2(Man β)_nMan β-(예를 들어 칸디다 알비칸스에 대해 유용한 진균 백신에 대해)(n은 0을 포함하는 임의의 정수임); GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc β-O-세라마이드(암 백신에 대해); Gal α 1,2(Tyr α 1,3)Man α 1,4Rha α 1,3Gal α 1,2-(Tyr α 1,3)Man α 4Rha- 및 Gal α 1,2(Abe α 1,3)Man α 1,4Rha α 1,3Gal α 1,2(Abe α 1,3)Man α 1,4Rha α 1,3Gal α 1,2(Abe α 1,3)Man α 1,4Rha(이들 둘 다 예를 들어 살모넬라 종에 대해 유용함)을 포함한다. 항원 또는 면역원 및 이들의 합성물로서 다른 예시적인 탄수화물 에피토프의 설명은 본 명세서에 참조로서 포함되는 미국특허 제6,413,935호에서 추가로 기재된다.

[0068] 항원의 다른 예는, 다음의 질병 및 질병-원인 작용제에 대한 면역 반응 또는 항원 반응을 생성하는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 탄저병; 아데노바이러스; 보르데텔라 퍼터시스(*Bordetella pertussis*); 보툴리누스 중독증; 소 비기관염; 브란하멜라 카타르할리스(*Branhamella catarrhalis*); 개 간염; 개 디스토프; 클라미디아속(*Chlamydiae*); 콜레라; 콕시디오마이코시스(coccidiomycosis); 우두; 거대세포바이러스; 거대세포바이러스; 탕기열; 탕기 독소플라스마증; 디프테리아; 뇌염; 독소원성 대장균(*Enterotoxigenic Escherichia coli*); 엡스타인 바르 바이러스; 말 뇌염; 말 전염성 빈혈; 말 인플루엔자; 말 폐렴; 말 리노바이러스; 고양이 백혈병; 플라비바이러스; 글로불린; 헤모필러스 인플루엔자 b형; 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*); 헤모필러스 퍼터시스(*Haemophilus pertussis*); 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*); 헤모필러스종(*Hemophilus* spp.); 간염; A형 간염; B형 간염; C형 간염; 헤르페스 바이러스; HIV; HIV-1 바이러스; HIV-2 바이러스; HTLV; 인플루엔자; 일본 뇌염; 클렙시엘라 종(*Klebsiellae* spp.) 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*); 리슈마니아; 한센병; 라임병; 말라리아 면역원; 홍역; 뇌수막염; 뇌척수막염; 뇌척수막염 다당류 그룹 A, 뇌척수막염 다당류 그룹 C; 볼거리; 뎀프스 바이러스; 마이코박테리아; 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*); 네이세리아 종(*Neisseria* spp.); 네이세리아 고노르호에(*Neisseria gonorrhoeae*); 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*); 양 블루팅(blue tongue); 양 뇌염; 유도종; 파라인플루엔자; 파라믹소바이러스; 파라믹소바이러스; 백일해; 흑사병; 뉴모코커스 종(*Pneumococcus* spp.); 뉴모시스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*); 폐렴; 폴리오바이러스; 프로테우스 종(*Proteus* species); 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*); 광견병; 호흡기 세포융합 바이러스; 로타바이러스; 풍진; 살모넬라; 주혈흡충증; 쉬겔라(*Shigellae*); 유인원 면역결핍 바이러스; 두창; 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*); 스탕필로코커스 종(*Staphylococcus* spp.); 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*); 스트렙토코커스 파이로젠스(*Streptococcus pyogenes*); 스트렙토코커스 종(*Streptococcus* spp.); 돼지 인플루엔자; 파상풍; 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*); 장티푸스; 중두증; 수두-대상포진 바이러스; 및 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*). 항원 또는 면역원은 다양한 독소, 바이러스 항원 및/또는 박테리아 항원, 예컨대 다음의 백신에서 보통 사용되는 항원; 수두 백신; 디프테리아, 파상풍 및 백일해 백신; 헤모필러스 인플루엔자 b형 백신(*haemophilus influenzae* type b vaccine: Hib); A형 간염 백신; B형 간염 백신; 인플루엔자 백신; 홍역, 볼거리 및 풍진백신(MMR); 폐렴구균 백신; 폴리오 백신; 로타바이러스 백신; 탄저병 백신; 및 파상풍 및 디프테리아 백신(Td)을 포함할 수 있다(예를 들어, 미국특허 제6,309,633호 참조).

[0069] 일부 실시형태에서, 항원은, 예를 들어 종양 관련 항원(tumor associated antigen: TSA)(백혈병 및 림프종과 관련된 항원을 포함), 예컨대 암배항원, 전립선 포스포타제, PSA, PSMA 등 및 암을 야기하는 작용제와 관련된 항원(예를 들어, 종양형성 바이러스, 예를 들어 아데노바이러스, HBV, HCV, HTLV, 카포씨 육종-관련 헤르페스 바이러스, HPV(가다실) 등)과 같은 암과 관련된 항원의 어떤 유형을 포함할 수 있다.

[0070] 항원은 펩타이드, 다당류, 지질, 핵산 등의 조합물과 같은 항원의 조합물을 포함할 수 있다. 항원은 당단백질, 당지질, 당단백질, 지단백질, 지질다당류 등을 포함할 수 있다.

[0071] 개시된 EP 방법을 수행하기 위해 사용된 항원은 그것에 하나 이상의 추가적인 기를 컨주게이트하거나 또는 결합시키는 것과 같은 어떤 방법으로 유도체화되거나 변형된 것을 포함하여, 예를 들어 미국특허 제6,493,402호(Pizzo et al.)(α-2 마크로글로불린 복합체); 미국특허 제6,309,633호; 미국특허 제6,207,157호; 및 미국특허 제5,908,629호에 기재된 것과 같은 기법을 포함하여 기능을 향상시키거나 또는 추가적인 기능, 예컨대 표적화 또는 이것의 향상된 전달을 달성한다.

[0072] MID(100, 200)의 예시적인 실시예 및 MID(100, 200)를 사용하는 방법은 이하에서 더욱 상세하게 기재된다.

[0073] [실시예]

[0074] 실시예 1

[0075] 형질감염 효율에 대한 전극 조성물의 효과

[0076] 보고유전자 국소화에 대한 전극 재료의 효과를 처리하기 위해, 형질감염 효율을 2개의 최소 침습 전극(MID)에 대해 상이한 전극 조성물(금 및 스테인레스 강)과 비교하였다. 이 비교는 형질감염 효율을 여전히 유지하는 동안 금 전극에 대해 더 저렴한 대안(스테인레스강)이 사용될 수 있는지 여부를 평가하기 위한 것이다. 전극 조성을 용이하게 시험하였는데, 금-플레이팅 전극이 그것의 소켓으로부터 용이하게 제거되고 동일한 게이지 및 길이의 스테인레스강 전극으로 대체되기 때문이다. 이는 전극 조성만이 다른 동일한 전극 헤드를 생성하였다.

[0077] 실험적 개요를 표 1에서 상술한다.

표 1

전극 조성물	DNA 전달됨	DNA 농도 (mg/ml)	처치 부위의 수	생검 제거 시간 (시간)	필요한 동물 의 수	최종 분석
금-플레이팅	pgWIZ-GFP	0.5	10	12, 24, 48	4	총체적 시각화/조직학
		1	10	12, 24, 48		
		2	10	12, 24, 48		
스테인레스강	pgWIZ-GFP	0.5	10	12, 24, 48	4	총체적 시각화/조직학
		1	10	12, 24, 48		
		2	10	12, 24, 48		

[0079] 일련의 생체내 발현 국소화 연구를 완료하였다. 하틀리(Hartley) 기니아 피그(미국 매사추세츠주 윌밍턴에 소재한 찰스 리버 래버러토리즈(Charles River Laboratories))에서 모든 생체내 실험을 수행하였으며, 이를 피부과적 적용을 위한 우수한 모델로 고려한다. 기관의 IACUC 프로토콜 하에 모든 실험을 수행하였다. 미국국방부(U.S. Department of Defense: DoD) 3216.1 "Use of Laboratory Animals in DoD Programs", 9 CFR 파트 1 내지 4 "Animal Welfare Regulations", 미국국립과학아카데미 간행물 "Guide for the Care & Use of Laboratory Animals" 개정판 및 동물복지를 실행하는 농무부 규칙(7 U.S.C. 2131-2159)뿐만 아니라 다른 적용가능한 연방 및 주법 및 규정 및 DoD 지침에 따라 모든 동물 실험을 수행하였다. 모든 동물 처치를 마취 하에 수행하였다. 보고유전자 GFP를 발현시키는 플라스미드를 기니아피그 피부에 피내로 주사하였다(0.5, 1 및 2 mg/ml). 주사 직후, 금 또는 스테인레스강 전극을 지니는 MID 장치를 사용하여 주사 부위에서 피부를 전기천공하였다. 처치 3일 후 동물을 희생시켰다. 피부를 절개하였고, 형광 현미경 하에 시각화하였다. 고해상도 사진을 촬영하였고, 후속하여 표준 소프트웨어(아도브 포토샵 CS5)를 사용하여 픽셀 강도에 대해 분석하였다. 사전결정한 처치 영역의 픽셀 카운트를 통해 발현 수준을 계산하였다. 전기장이 적용된 경우에만 형질감염이 일어나고, 전극이 피부와 직접 접촉되는 경우에만 형성된다는 추정치에 대해 픽셀 분석을 위한 전극 접촉의 "개폐 영역"을 확립하였다. MID 장치 내 제1 전극과 제4 전극 사이의 거리는 4.5mm였다. 이와 같이, 아도브 포토샵 CS5의 눈금자 툴(ruler tool)을 사용하여 4.5mm 영역을 분리시켰으며, 이는 길이로 대략 95 픽셀로서 정해진다. 아도브 포토샵 CS5는 3개의 상이한 채널(적, 녹, 청)에서 0 내지 255(가장 어두움 내지 가장 밝음)의 범위에 있는 픽셀 강도를 인식하였다. 양성 GFP 신호는 녹색 채널에서 지배적이기 때문에, 픽셀 분석은 이 채널로 제한되었다. 아도브 포토샵의 CS5 버전은 선택된 영역의 평균 및 중앙값을 자동으로 계산할 수 있다. 픽셀 강도의 분포는 대부분의 경우에 대칭이 아니기 때문에, 중앙값이 히스토그램의 중심 경향의 더 양호한 표현을 제공하는 것으로 여겨진다. 정확한 결과를 보장하기 위해, 다수의 동물에서 다수의 치료 부위로부터 풀 데이터(pooled data)를 분석하였다.

[0080] 결과를 도 5에 나타낸다. 결과를 또한 후속 전기천공 없이 피내 주사 후 GFP 표현과 비교하였다. 금과 스테인레스강 그룹 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(처치군과 ID 주사 단독 대조군 사이의 P 값 < 0.05). 결과는 더 저렴한 스테인레스 스틸 전극은 보고유전자 발현에서 금 전극으로서 효과적임을 시사하였다.

[0081] 실시예 2

[0082] 형질감염 효율에 대한 전극 간격의 효과

[0083] 형질감염 효율 및 보고유전자 국소화에 대한 전극 간격의 효과를 평가하기 위해, 1mm 간격의 회로판을 만들었고, 헤드피스 하우징에 끼웠으며, 1.5mm 간격 회로판을 지니는 유사한 MID와 비교하였다. 표면 처치 영역

이 상이한 간격의 두 핸드 피스 사이에 동일하게 남는 것을 보장하기 위해, 전극의 추가적인 행을 1mm 간격 회로판에 첨가하였다. 따라서, 4x4 행 전극(16 전극)을 지나는 1.5mm 간격 핸드 피스를 5x5 행 전극(25 전극)을 지나는 1mm 간격 핸드 피스와 비교하였다. 이와 같이, 각각의 핸드 피스는 대략 4 내지 4.5mm²의 대략의 처치 표면적을 가졌다. 도 6A는 측면 관점으로부터의 핸드 피스 둘 다의 사진을 나타낸다. 상부 핸드 피스는 1mm 간격이며, 하부 핸드 피스는 1.5mm 간격이다. 도 6B는 1mm 핸드 피스의 겉면의 클로즈업을 나타낸다.

[0084] 일련의 생체내 발현 국소화 연구를 실시예 1에 기재한 바와 같이 완료하였다. 구체적으로, 기니아피그 피부 내로 리포터 유전자 GFP를 발현시키는 플라스미드 DNA의 공지된 용량(0.5, 1 및 2 mg/mL)의 피내 주사 후, 1mm 또는 1.5mm 프로토타입 장치를 거의 즉시, 즉, 주사 후 10초 이내에 사용하였고, 얻어진 주사 기포를 전기천공하였다. 전극은 구성이 금 또는 스테인레스강이었다. 동물을 처치 후 3일에 희생시켰다. 피부를 절개하였고, 형광 현미경 하에 시각화하였다. 고해상도 사진을 촬영하였고, 후속적으로 표준 소프트웨어(아도브 포토샵 CS5)를 사용하여 픽셀 강도를 분석하였다. 사진결정된 처치 영역의 픽셀 카운트를 통해 발현 수준을 계산하였다. 정확한 결과를 보장하기 위해, 다수의 동물에 대한 다수의 처치 부위로부터의 풀 데이터를 분석하였다. GFP의 발현을 상이한 시간 기간(12, 24 및 48시간)에 걸쳐 모니터링하여 발현 역학을 평가하였다.

[0085] 실험 개요를 표 2에서 상술한다.

표 2

전극간격	DNA 전달	DNA 농도 (mg/mL)	처치 부위의 수	생검 제거 시간 (hr)	필요한 동물 의 수	최종 분석
1mm	pgWIZ-GFP	0.5	10	12, 24, 48	4	총체적 시각화/조직학
		1	10	12, 24, 48		
		2	10	12, 24, 48		
1.5mm	pgWIZ-GFP	0.5	10	12, 24, 48	4	총체적 시각화/조직학
		1	10	12, 24, 48		
		2	10	12, 24, 48		

[0087] 결과를 도 7에 나타낸다. 결과를 각 조건에 대해 6가지의 처치에 대해 나타낸다. 결과를 또한 후속 전기천공 없이 피내 주사 후 GFP 발현과 비교하였다. 1.5mm 간격 회로판과 1mm 간격 회로판을 지나는 장치에 대한 결과 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(처치군과 ID 주사-만의 대조군 사이의 P 값 < 0.05). 결과는 다수의 실험을 대표하며, 1.5mm 또는 1mm 전극 간격을 사용하는 최소 침습 장치 전기천공(MID EP)으로 성공적이고, 강한 형질감염을 달성하였다. 이들 결과는 두 전극 간격 사이에 시각적 차이가 관찰되지 않았기 때문에(육안에 의해 그리고 픽셀 카운팅을 통해 정량적으로 결정됨) 전극 간격이 피부 내 GFP 발현에 영향을 미치지 않는다는 것을 시사하였다. 따라서, 1.5mm 또는 1mm 전극 간격을 사용하는 MID EP에 의한 전기천공은 강한 보고유전자 발현을 야기하였다.

[0088] 실시예 3

[0089] 전류에 대한 전극 간격의 효과

[0090] 본 명세서에 기재된 장치는 그것들이 각각의 전기천공 펄스 동안 생검에 따라 모든 전기적 변수를 실시간으로 포획하고 저장하는 능력을 가질 수 있다. 실시예 1에 기재한 바와 같이 일련의 생체내 발현 국소화 연구를 완료하여, 상이한 전극 간격 및 조성의 장치를 지나는 전기천공을 위한 전류 및 전압을 시험하였다. 적용된 전압이 일정하게 남아있는 동안(15 볼트), 각 처치에 대해 전달된 임피던스(저항) 및 전류를 각각의 전극 간격 및 각각의 전극 구성에 대해 시험하였다.

[0091] 도 8은 얻어진 임피던스(저항(옴))와 전류(밀리암페어)를 둘 다 나타낸다.

[0092] 전류는 1.5mm 핸드 피스(평균 23mA)와 비교하여 1mm 핸드 피스(평균 85mA)에서 대략 3배 더 컸고, 또한 적용된 전압은 모든 질환에 대해 동일하였다. 1.5mm 핸드피스에서 증가된 전류는 조직의 임피던스에서 큰 감소를 야기하였다(대략 75%). 참을 수 있는 피부 장치를 생산하기 위한 견지로부터, 증가된 전류는 환자에 대해 더 많은 통증 또는 감각을 야기함으로써 문제가 될 수 있다. 증가된 전류는 환자에서 더 많은 통증 또는 감각을 야기할 수 있고, 따라서 증가된 전류는 참을 수 있는 피부 장치에서 문제가 될 수 있다. 이 결과는 전극 간격이 얻어진 GFP 발현에 영향을 미치는 것으로 나타나지 않았지만, 추가적인 전극의 간격 또는 존재는 전류에 영향을 미칠 수 있고, 조직의 임피던스에 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사하였다.

- [0093] 증가된 전류의 문제를 추가로 처리하기 위해, 적용된 전압이 1/3(5볼트까지)만큼 감소되고 또한 10 내지 20mA 전류를 야기할 수 있는지 여부를 조사하였다. 전극은 스테인레스강이었다. 결과를 도 9에 나타낸다. 결과는 추가적인 전극(사실상 전극 간격이 없음)이 얻어진 전류에 영향을 미친다는 것을 시사하였다.
- [0094] 감소된 전압이 형질감염 효율에 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해, 보고유전자 GFP를 발현시키는 DNA 플라스미드를 기니아피그 피부에 피내로 전달하였고, 직후에 15 또는 5볼트에서 1.5mm(4x4) 전극 간격 또는 1mm(4x4 또는 5x5) 전극 간격으로 MID 장치를 사용하여 전기천공하였다. 동물을 처치 3일 후에 희생시켰다. 피부를 절개하였고, 형광 현미경 하에 시각화하였다. 고해상도 사진을 촬영하였고, 후속하여 표준 소프트웨어를 사용하여 픽셀 강도에 대해 분석하였다(아도브 포토샵 CS5).
- [0095] 결과를 도 10에 나타낸다. 이들 결과는 입력 전압이 더 큰 전극 핸드피스 상에서 감소될 수 있는 한편, 형질감염 효율을 여전히 유지한다는 것을 시사하였다. 이와같이, 결과는 강한 형질감염이 더 큰 어레이로 달성될 수 있는 반면, 무통증 및 저전압 변수를 유지한다는 것을 시사하였다. 인간 임상 장치에서 사용 필요 또는 선호도, 예를 들어 주사 용적에 따라서 최적의 범위를 유지하는데 적어도 25 전극이 필요할 가능성이 있다.
- [0096] **실시예 4**
- [0097] **형질감염 효능에 대한 플라스미드 농도의 효과**
- [0098] 형질감염 효능에 대한 보고유전자 GFP를 발현시키는 플라스미드의 더 낮은 농도의 효과를 상이한 조성 및 전극 간격의 장치로 시험하였다.
- [0099] 실시예 1에 기재한 바와 같이 일련의 생체내 발현 국소화 연구를 완료하였다. 보고유전자 GFP를 발현시키는 플라스미드를 기니아피그 피부에 피내로 주사한 후(0.5, 0.25 및 0.1 mg/ml), 즉시 15볼트에서 금 또는 스테인레스강 전극 및 1mm- (5x5) 또는 1.5mm- (4x4) 간격 전극을 지니는 MID 장치를 사용하여 전기천공하였다. 동물을 처치 3일 후에 희생시켰다. 피부를 절개하였고, 형광 현미경 하에 시각화하였다. 고해상도 사진을 촬영하였고, 후속하여 표준 소프트웨어를 사용하여 픽셀 강도에 대해 분석하였다(아도브 포토샵 CS5). 사전결정한 처치 영역의 픽셀 카운트를 통해 발현 수준을 계산하였다. 정확한 결과를 보장하기 위해, 다수의 동물에 대해 다수의 처치 부위로부터의 폴 데이터를 분석하였다.
- [0100] 결과를 도 11에 나타낸다. 단독으로 ID 주사 후(EP없음) GFP 발현을 또한 관찰하였지만, 최소 발현을 검출하였다(데이터 미제시). 보고 유전자 GFP를 발현시키는 플라스미드의 농도 중 어떤 것에서 간격 또는 전극 조성에 통계적으로 유의한 차이가 없음을 관찰하였다.
- [0101] **실시예 5**
- [0102] **세포 수준에서 분석된 전기천공 효율**
- [0103] 상기 실시예에 상술된 실험으로부터 처치된 동물로부터 제거된 피부 샘플을 면역조직화학적으로 분석하였다. 피부 처치 후 절개하여 검시하고, 절편화하고, 파라핀 고정시켰다. GFP-발현 세포를 관찰하였고, 고전력 형광 현미경(올림푸스(Olympus) - BX51 TF)을 사용하여 계측하였다. GFP-발현 세포의 수 및 영역(즉, 표피의 스펙트럼층)을 주목하였다. 형질감염 세포 유형, 예컨대 림프구 IHC, 케라틴세포(표피 내 대다수의 세포) 및 랑게르한스 세포(표피 내에서 가장 흔한 APC)를 직접적으로 확인하게 하는 장착 전 조직학적 절편을 또한 상업적으로 입수 가능한 항체의 수집물로 대비염색하였다. 또한 항체를 사용하여 림프구 침윤에 대한 전기천공 효과를 관찰하였다.
- [0104] 강한 케라틴세포 염색을 표피에서 달성하였다. 피부 절편 내 상피 영역을 명확하게 정하였다. 전반적으로, 결과는 추가적인 전극이 전류에 대규모로 영향을 미치고, 이렇게 해서 조직의 임피던스에 영향을 미친다는 것을 시사하였다. 이 증가된 전류는 보고유전자의 얻어진 발현에 영향을 미치는 것으로 나타나지 않았다. 그러나, 전압은 5x5 1mm 핸드피스 상에서 감소될 수 있는 한편, 강한 전류 및 강한 형질감염을 여전히 달성 할 수 있다는 것이 명백하였다.
- [0105] 피부 내 랑게르한스 특이적 항체에 대한 양성 염색을 보기 위해, 비장 및 림프절을 희생시킨 동물로부터 제거하여 항체에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. 비장과 림프절 둘 다에서 강한 항체 염색이 검출되었지만, 피부에서는 검출되지 않았다. 특정 이론에 구속되지 않고, 이는 항체가 작동하지만 피부 내 신호 중 하나는 검출하기에 너무 약하거나, 또는 시험한 조직 내 존재하는 랑게르한스 세포가 없었다는 것을 시사하였다.
- [0106] 추가적인 결과를 도 12에 나타낸다. 보고유전자의 전기천공과 발현이 처치 영역에 대한 림프구의 침윤을 야기할

다는 것을 관찰하였다. EP 및 보고유전자 발현의 조합은 가장 큰 침윤을 야기하였다. 케라틴세포 염색 및 보고유전자 발현의 공동국소화를 관찰하였지만, 염색은 일치하지 않았다. 그러나, 림프구 IHC 및 보고유전자 발현의 공동국소화를 일시적으로 확인하였다.

[0107] 실시예 6

[0108] 이중-헤드 장치

[0109] 작은 완충 구역과 병렬로 2개의 어레이를 갖는 이중-헤드 장치를 제조하였다. 펄스를 동시에 전달하도록 어레이를 설계하였다. 대안적으로, 각각의 헤드를 추가적인 도구 변형으로 독립적으로 펄싱할 수 있다. 플라스틱 하우스 및 맞춤 전기 부품을 프로토타입화하였다. 장치를 도 13에 나타낸다.

[0110] 일련의 생체내 발현 국소화 연구를 실시예 1에 기재한 바와 같이 완료하였다. 보고유전자 GFP 또는 RFP를 발현시키는 플라스미드를 기니아피그 피부에 1mg/ml의 농도로 피내로 주사하였다. 주사한 직후 이중 헤드 장치(25V에서 4×4 어레이 및 1.5mm 간격의 16 스테인레스강 전극을 지님)를 사용하여 전기천공하였다. 결과를 도 14에 나타내며, 이는 단독으로 피내 주사 후(EP 없음) GFP 발현과 비교하여 MID(100, 200)를 지나는 EP 및 보고유전자 플라스미드의 피내 투여 후 GFP 발현을 나타내는 형광현미경 사진이다. MID(100, 200)의 전극(110)은 1.5mm의 간격만큼 서로로부터 간격을 두었다. 처치 후 동물을 희생시켰고, 피부를 형광 현미경 하에 절개하고 시각화하였다. 형광 현미경사진은 다수의 플라스미드를 공간적으로 분리된 부위에서 동시에 전달한다는 것을 확인한다.

[0111] 실시예 7

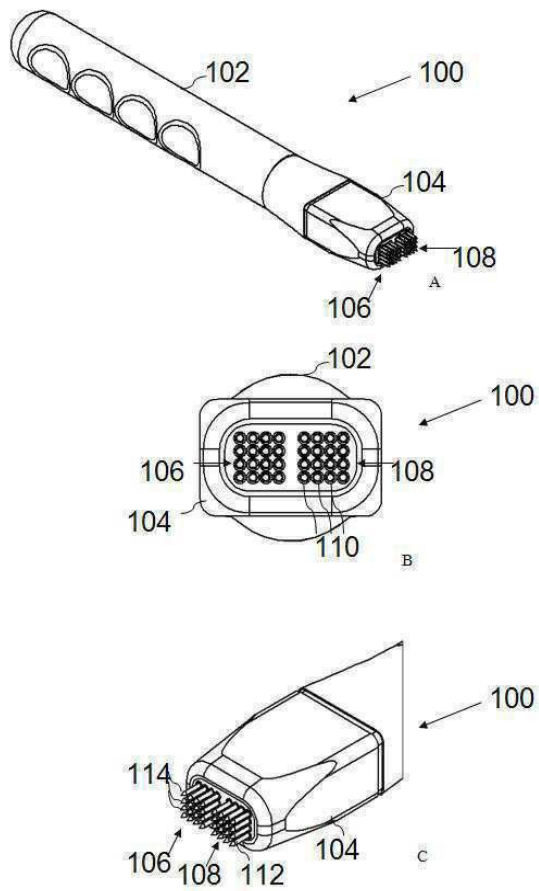
[0112] 형질감염의 역학

[0113] 실시예 1에 기재한 방법을 사용하여 일련의 생체내 발현 국소화 연구를 완료할 것이다. 구체적으로, 기니아피그 피부 내로 보고유전자 GFP를 발현시키는 플라스미드 DNA의 알려진 용량(0.5, 1 및 2 mg/ml)의 피내 주사 후, 1 mm 또는 1.5mm 얻어진 주사 기포를 즉시 전기천공하기 위해 프로토타입 장치를 사용할 것이다. MID의 전극은 조성이 금 또는 스테인레스강일 것이다. 처치 후 상이한 시점(12시간, 24시간 및 48시간, 3일)에 동물을 희생시킬 것이다. 각 시점에 대해 형광 현미경 하에 피부를 절개하고, 시각화할 것이다. 고해상도 사진을 촬영하고, 후속적으로 표준 소프트웨어(아도브 포토샵 CS5)를 사용하여 픽셀 강도에 대해 분석할 것이다. 사전결정한 처치 영역의 픽셀 카운트를 통해 발현 수준을 계산할 것이다. 정확한 결과를 보장하기 위해, 다수 동물에 대해 다수의 처치 부위로부터 풀 데이터를 분석할 것이다. 발현 역학의 평가를 용이하게 하기 위해 GFP의 발현을 상이한 시간 기간에 걸쳐 비교할 것이다.

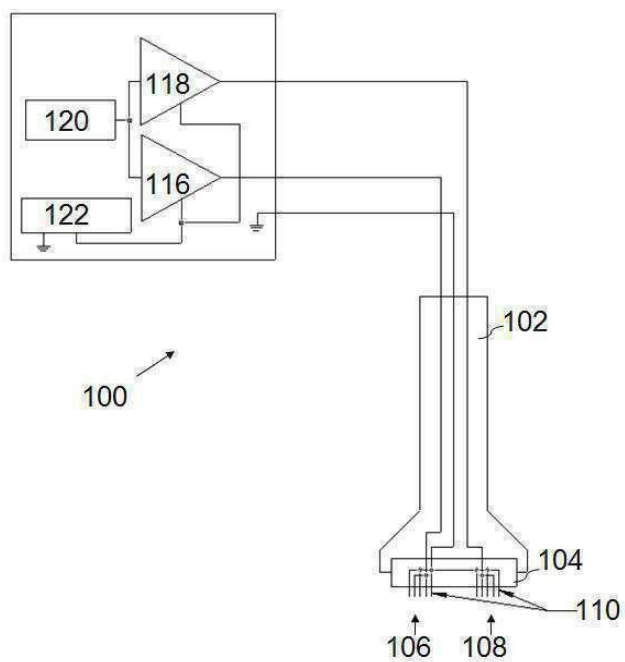
[0114] 특정 실시형태를 예시하고, 기재하였지만, 당업자에게 명백할 다양한 변형이 본 개시내용의 정신과 범주로부터 벗어나는 일 없이 이루어질 수 있다는 것이 앞의 언급으로부터 이해되어야 한다. 이러한 변화 및 변형은 본 명세서에 첨부된 특허청구범위에 정해진 바와 같은 본 개시내용의 범주 및 교시 내에 있다.

도면

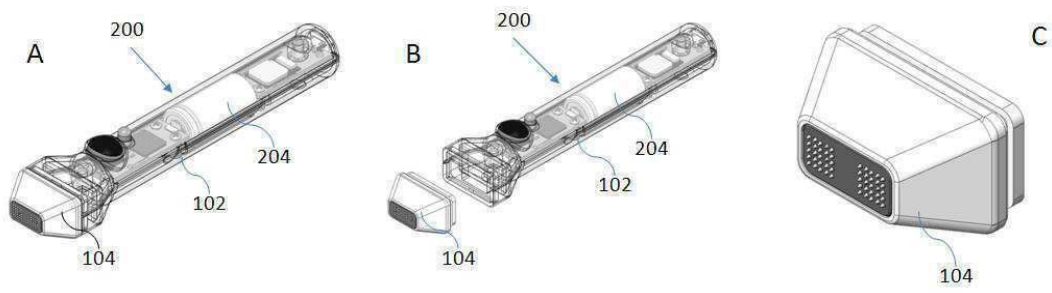
도면1



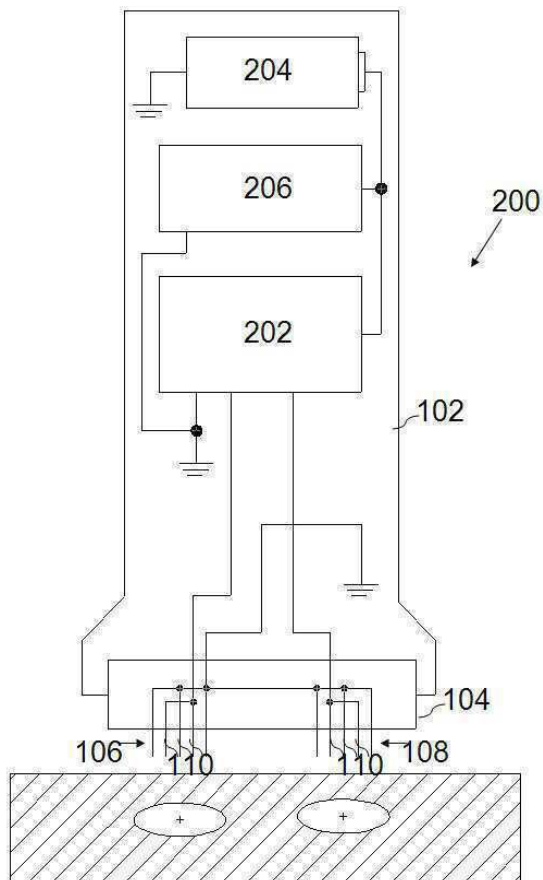
도면2



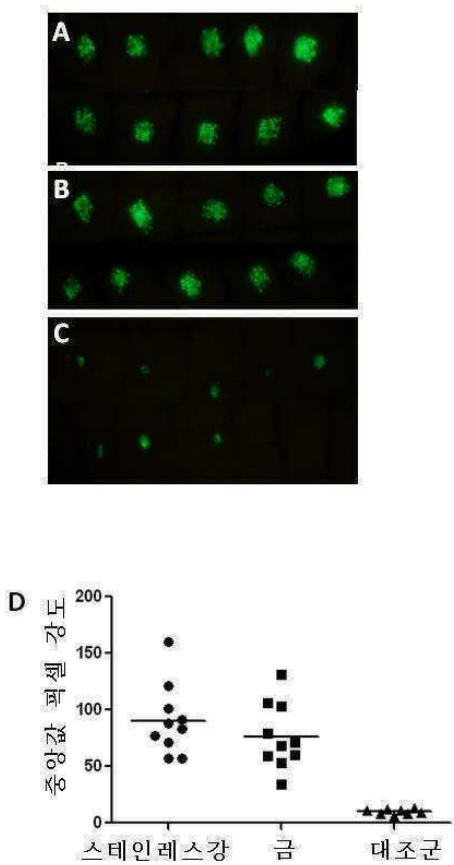
도면3



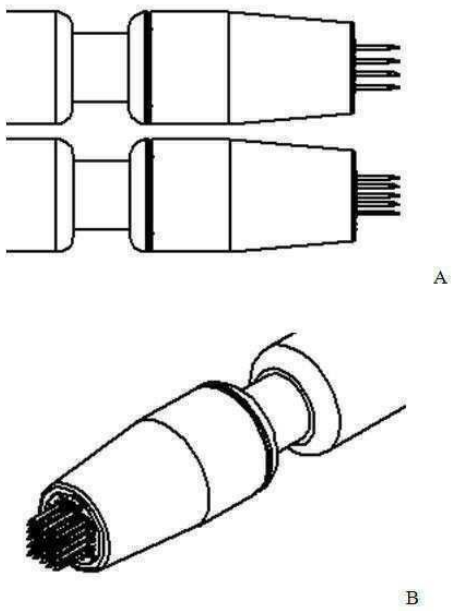
도면4



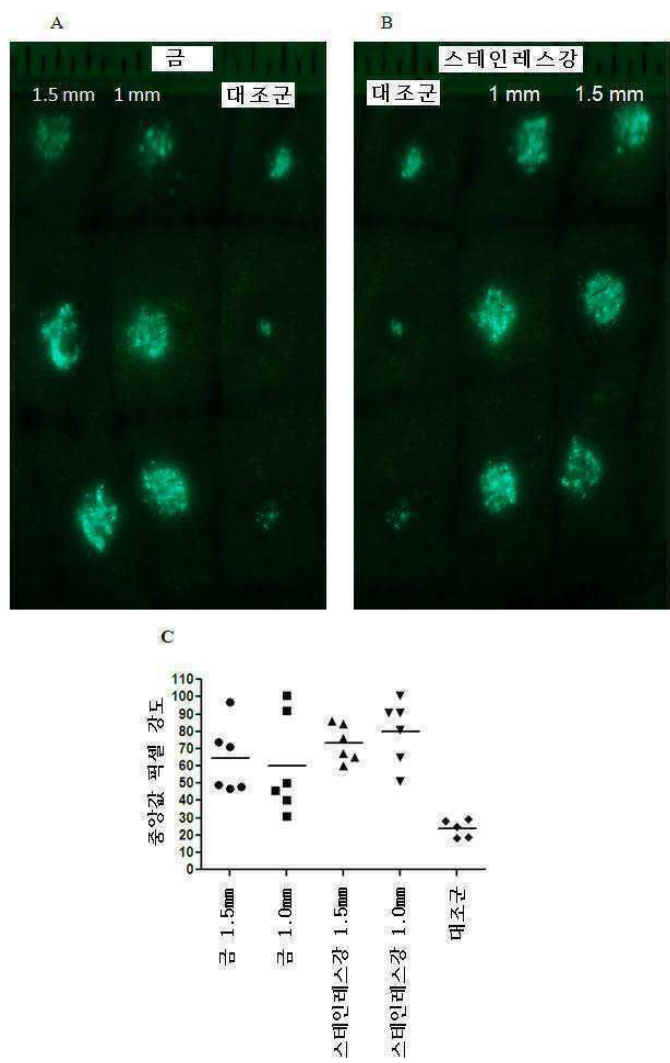
도면5



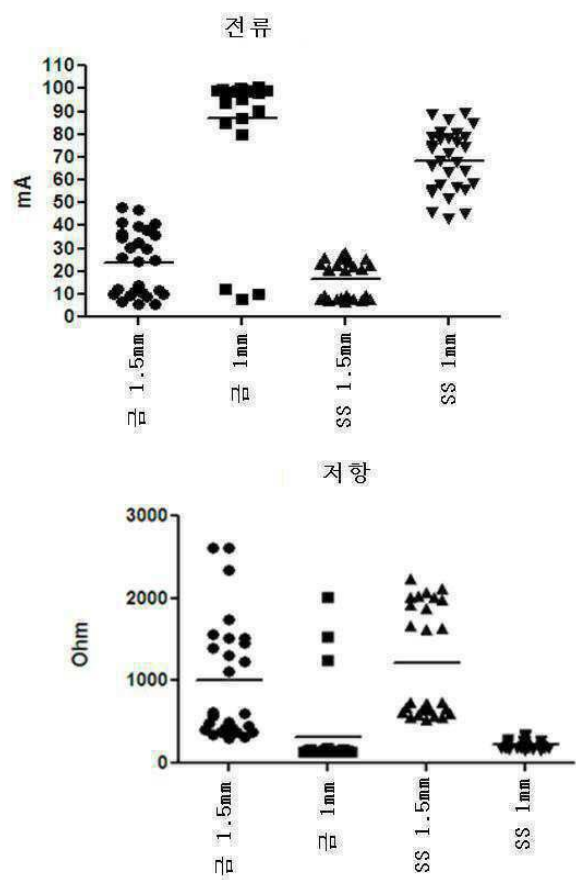
도면6



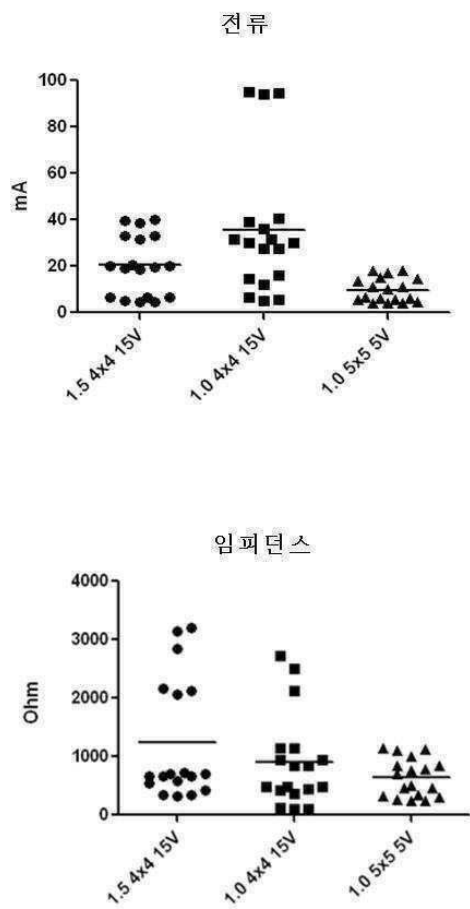
도면7



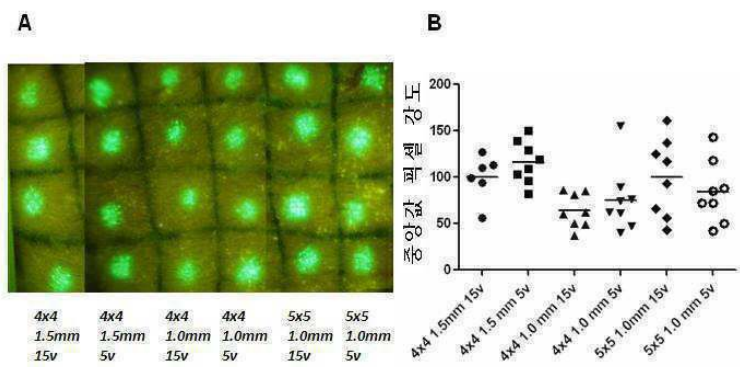
도면8



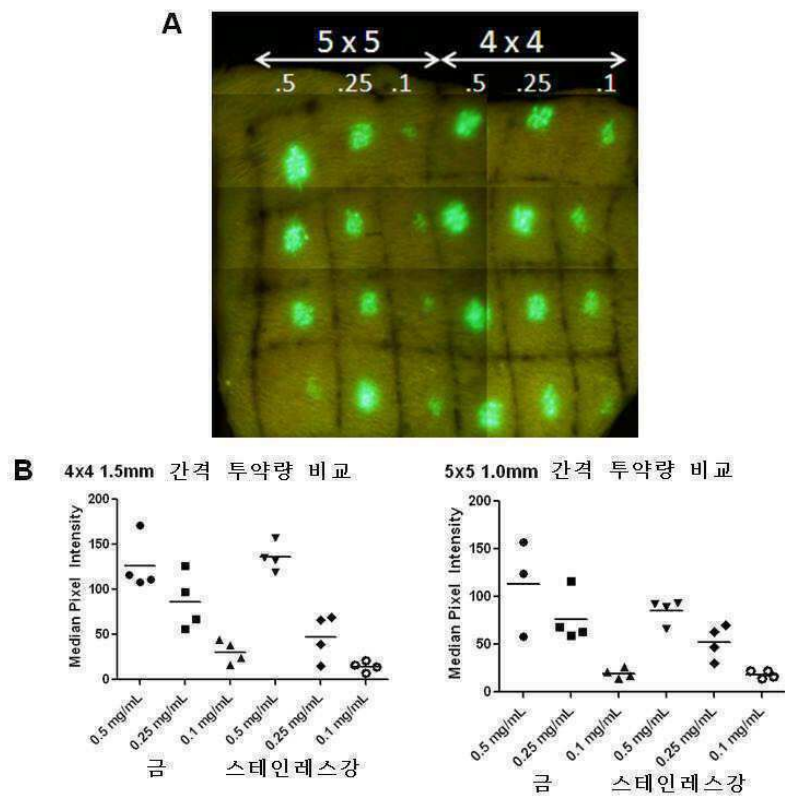
도면9



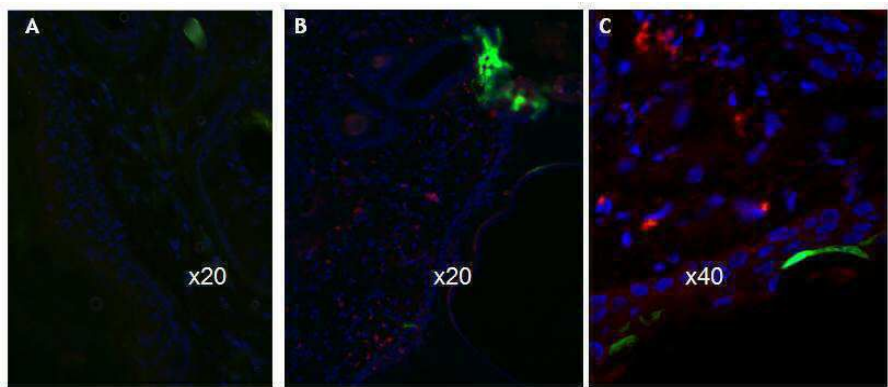
도면10



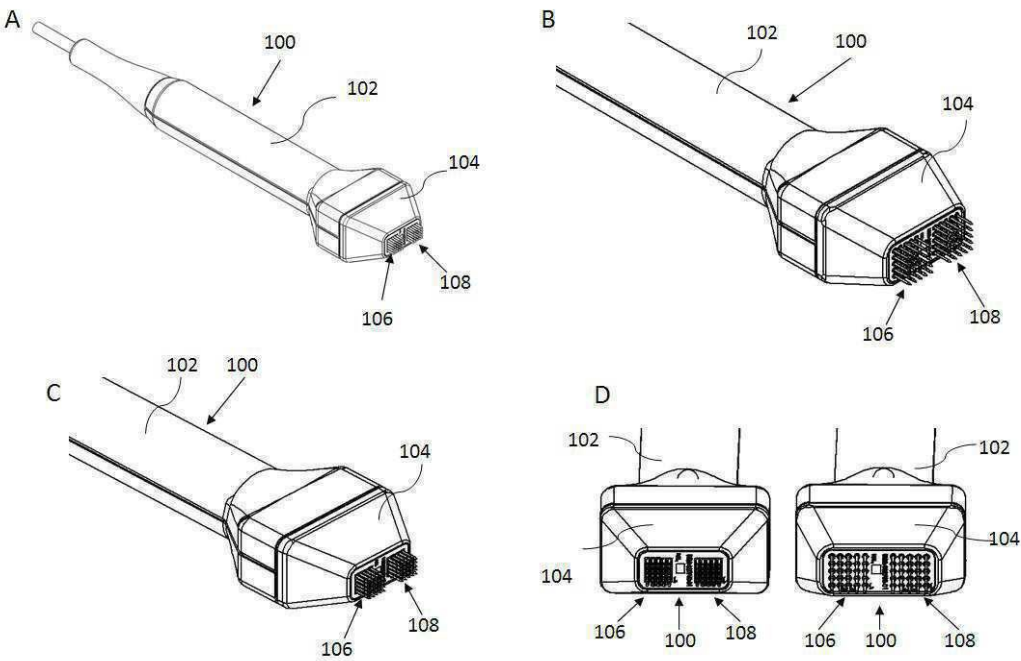
도면11



도면12



도면13



도면14

