(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월22일
(11) 등록번호 10-1421760
(24) 등록일자 2014년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61N 1/32 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7007847
(22) 출원일자(국제) 2007년10월17일
심사청구일자 2012년05월15일
(85) 번역문제출일자 2009년04월16일
(65) 공개번호 10-2009-0107014
(43) 공개일자 2009년10월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/022139
(87) 국제공개번호 WO 2008/048632
국제공개일자 2008년04월24일
(30) 우선권주장
60/852,149 2006년10월17일 미국(US)
60/978,982 2007년10월10일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2001007583 A1*
WO2005025669 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
브이지엑스 파머시우티컬즈, 인크.
미국 펜실베니아주 19422 블루 벨 센트리 파크웨이 450
(72) 발명자
드라기아-아클리 룩산드라
미국 77035 텍사스주 휴스턴 스타크리지 드라이브 5215
칸 아미르 에스
미국 77381 텍사스주 더 우드랜즈 리서치 파크 드라이브 8900 넘버 1704
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 20 항 심사관 : 김의태

(54) 발명의 명칭 **포유류의 세포의 전기천공용 전기천공 장치 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명의 양태는, 신체의 선택된 조직의 세포, 특히 진피내 또는 피하 등의 피부로의 생체 분자의 주입을 효과적으로 향상시키는 전기천공장치 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에 있어서, 본 발명은 피부 전극 배열체를 사용하여 에너지 펄스를 발생시키고 또한 피부 조직에 에너지 펄스를 전달하며, 미리 설정된 전류를 포함하는 사용자 입력에 기초하여 동일한 피부 조직에서 일정한 전류를 유지하고, 그리고 전류 파형 데이타를 저장 및 획득하는 피부 EP 장치에 관한 것이다.

(72) 발명자
포프 멜리사 에이
미국 77381 텍사스주 더 우드랜즈 썬더크릭 플레이스 55

브라운 파트리시아 에이
미국 77354 텍사스주 매그놀리아 캐틀 드라이브 1826

특허청구의 범위

청구항 1

사용자가 입력한 미리 설정된 전류와 유사한 정전류를 생체내 발생시키는 에너지 펄스를 포유류의 소망하는 조직에 전달하도록 되어 있는 전기천공 장치로서,

소망하는 조직에 정전류를 발생시키는 에너지 펄스를 전달할 수 있는 전기천공 부품과,

공간적으로 배열된 다수의 피부 전극을 갖는 전극 배열체를 포함하는 피부 전극 조립체를 포함하고,

상기 피부 전극 조립체는 전기천공 부품으로부터 에너지 펄스를 받아서 이를 피부 전극을 통해 소망하는 조직에 전달하며,

상기 전기천공 부품은 피드백 기구를 포함하고,

다수의 피부 전극들 중 적어도 하나는 에너지 펄스의 전달 동안에 중성이 되도록 배치되고, 소망하는 조직에서 임피던스를 측정하여 그 임피던스를 펄스의 전달 동안 상기 피드백 기구에 전달하도록 배치되며,

상기 피드백 기구는 측정된 임피던스를 받아서, 정전류를 유지시키기 위해 전기천공 부품에 의해 전달되는 에너지 펄스를 조절하도록 배치되는 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 피부 전극은 바늘 전극, 전도성 봉, 또는 전도성 막영역인 전기천공 장치.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 바늘 전극은 근육 조직을 실질적으로 뚫지 않고 진피내 또는 피하 조직과 접촉하도록 적응되는 전기천공 장치.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 피부 전극 조립체는 작동 스위치 및 피부 전극 조립체의 작동을 보고하는 상태 지시기를 더 포함하는 전기천공 장치.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 전극 배열체는 적어도 세개의 피부 전극을 포함하는 전기천공 장치.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 세 피부 전극은 이등변 삼각형의 공간적 배열을 갖는 전기천공 장치.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 다수의 피부 전극은 프로그램된 시퀀스하에서 피부 전극의 제어를 통해 에너지 펄스를 분산 패턴으로 전달할 수 있고, 프로그램된 시퀀스는 사용자에 의해 전기천공 부품에 입력되는 전기천공 장치.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 프로그램된 시퀀스는 차례대로 전달되는 다수의 펄스를 포함하고, 다수의 펄스들 중의 각 펄스는 적어도 두개의 작용 피부 전극을 통해 전달되고, 한 중성 피부 전극은 임피던스를 측정하며, 다수의 펄스들 중의 다음 펄스는 적어도 두개의 작용 피부 전극중의 다른 전극에 의해 전달되고 한 중성 피부 전극은 임피던스를 측정하는 전기천공 장치.

청구항 9

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 피드백 기구는 아날로그 폐루프 회로로 실행되는 전기천공 장치.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 사용자로부터 입력을 받고 이 입력에 따라 에너지 펄스를 전달하기 위해 전기천공 부품을 제어하는 제어기를 더 포함하는 전기천공 장치.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 제어기는 단일 칩 마이크로제어기인 전기천공 장치.

청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 전기천공 부품과 소통하고 피부 전극 조립체와 전기적으로 소통하는 전류 파형 발생기를 더 포함하고, 사용자는 프로그램된 시퀀스를 전기천공 부품에 입력하고, 이 전기천공 부품은 프로그램된 시퀀스를 전류 파형 발생기에 전달하게 되며, 전류 파형 발생기는 이 프로그램되어 제공된 시퀀스에 따라 전류 펄스열 파형을 발생시킬 수 있는 전기천공 장치.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 전류 파형 발생기는 파워-트랜지스터 아날로그 회로인 전기천공 장치.

청구항 15

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 피부 전극과 소망하는 조직 사이에 전기적 연결이 이루어졌는지를 시험할 수 있는 임피던스 시험기를 더 포함하는 전기천공 장치.

청구항 16

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 전기천공 부품과 소통하는 파형 로거(logger) 를 더 포함하고, 이 파형 로거는 에너지 펄스의 전달 동안에 전기천공 전압 및 전류 파형을 연속적으로 기록할 수 있는 전기천공 장치.

청구항 17

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 사용자 및 전기천공 부품과 직접 소통하는 입력 장치를 더 포함하고, 이 입력 장치는 입력 명령을 받아서 그 입력 명령을 전기천공 부품에 전달할 수 있으며, 입력 장치는 숫자 키패드 또는 터치 스크린인 전기천공 장치.

청구항 18

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 전기천공 부품과 소통하는 상태 보고 요소를 더 포함하는 전기천공 장치.

청구항 19

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 전기천공 부품과 소통하는 소통 포트, 전기천공 부품과 소통하는 메모리 부품, 전기천공 부품과 소통하는 전원, 또는 이들의 조합을 더 포함하는 전기천공 장치.

청구항 20

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 전극 배열체는 일회용이고 피부 전극 조립체에 제거가능하게 연결되며, 일회용 전극 배열체는 피부 전극 디스크인 전기천공 장치.

청구항 21

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 전기천공 부품은

제어기,

상기 제어기와 전자적으로 소통하는 파형 발생기,

상기 제어기와 전자적으로 소통하는 파형 로거, 및

상기 파형 발생기와 전기적으로 연결되어 있는 배터리를 포함하고,

제어기는 사용자로부터 입력을 받고, 이 입력에 따라 에너지 펄스를 소망하는 조직에 전달하라고 파형 발생기에 지시하며, 또한 전달되는 에너지 펄스에 따라 데이타를 파형 로거에 전달하게 되며,

배터리는 파형 발생기에 전하를 보내며, 이 배터리는 리튬 이온, 니켈 금속 수소화물, 납산 또는 니켈 카드뮴 배터리인 전기천공 장치.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2006년 10월 17일에 출원된 U.S. Ser. No. 60/852149 및 2007년 10월 10일에 출원된 U.S. Ser. No. 60/978,982 의 임시 출원의 우선권을 주장한다.

[0002] 본 발명은, 무엇보다도, 포유류의 선택된 조직, 바람직하게는 피부의 세포로의 생체 분자의 도입을 용이하게하기 위한 전기천공 장치 및 이의 사용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 포유류의 피부 또는 피부 조직은 특정한 영역으로 나누어진, 세포의 층을 특징으로 한다 (도 1 참조). 최외부 영역은, 각질층 (1.1.1), 유극층 (1.1.2), 투명층 (1.1.3), 과립층 (1.1.4), 및 기저층 (1.1.5) 의 5 개의 하위 층으로 나누어질 수 있는, 상피 (1.1) 이다. 진피 (1.2) 는 상피의 바로 아래에 위치되고, 혈관이 배우 잘 분포된 영역이며, 모근 및 땀샘이 이 층에 위치된다. 피하층은 진피 바로 아래에 위치된다.

[0004] 피부는 물리적 배리어로서 작용하는 것뿐만 아니라, 또한 면역 체계로서의 그의 역할에 의해 보호를 위하여 발달해왔다. 병원체에 대한 환자의 방어 전선으로서, 피부는 면역 감시를 위해 잘 준비되어 있다. 예컨대, 많은 다른 조직과 비교하여, 피부의 상피는, 매우 강력한 미성숙 가지 세포 ("DC") 인, 높은 비율의 랑게르한스 세포 (Langerhans cell) 를 포함한다. 따라서, 피부 상피에 대한 표적 항원은 강한 면역 반응을 효율적으로 유도할 수 있어야 한다. 하지만, 상피 (1.1) 의 각질층 (1.1.1) 에 의한 배리어는 (도 1 참조) 상피 안으로의 항원의 효과적인 진입을 방해하는 경향이 있다. 가지 세포는 피부의 주요 항원 존재 세포이다. 피부 내의 높은 DC 비율이 매력적인 경로로 진피내 ("ID") 면역화를 달성한다.

[0005] 특히 진피내 ("ID") 또는 피하 ("SQ") 조직 또는 세포로의 플라즈미드 (plasmid) 의 전달에 관한 것으로서, 생체내 플라즈미드 전달 기술은 맨 DNA (naked DNA) (plasmid) 전달로부터의 생체내 발현 레벨이 낮고, 단지 이들의 일부만이 바이러스성 유전자 전달에 의해 달성되기 때문에, 전통적으로 범위에 제한된다. ID 또는 SQ 에 적용된 양으로 전달될 수 있는 플라즈미드의 투여양은 근육내 주입("IM") 에 사용되는 양과 비교하여 소량이다. 수 많은 연구자들이 동물 및 사람에게 DNA 벡터로서 바이러스를 주입하는 것에 관한 안정성 및 독성에 대하여 약술하였다 (Frederickson 등, Mol. Ther. 8:8 - 10 (2003)). 그 결과, 플라즈미드 DNA 를 직접 주입하는 것이 바람직한 전달 기술이 되었지만, 세포 및 단백질로의 효율적인 전달 발현 레벨이 문제가 되었다.

골격근육 세포는 DNA 백신을 위해 직접 플라즈미드를 전달하기 위해 그리고 다른 적용을 위해 주요 표적을 제공하였다 (Prud'homme 등, Curr. Gene Ther. 6:243 - 273 (2006)).

[0006] 생체내 플라즈미드 전달을 위한 최근의 발전은 전기천공 ("EP") 이다. EP 는 이온에서 약물, 염료, 추적자, 항체, 및 올리고핵산염에 이르는 많은 종류의 분자를 RNA 및 DNA 에 전달하는데 사용된다 (Gehl, Acta Physiol Scand. 177:437 -447 (2003)). 이러한 과정은 목표 조직을 간단한 전기장 펄스에 노출시켜 세포막에 일시적이고 가역적인 구멍을 유도한다. 막의 불안정화의 기간 동안, 플라즈미드와 같은 분자는 세포내 접근을 얻을 수 있다. 이전에, 보고서는 EP 과정에서의 개선이 전달의 효능을 증가시키고 정전류 장치를 사용함으로써 원하는 레벨의 생체내 항원의 발생에 필요한 플라즈미드의 양을 낮추는 것을 나타내었다 (Draghia-Akil and Smith, Page 245 in Gene Therapy-Therapuetic Mechanisms and Strategies, N.S. Templeton and D.D.Lasic, eds. Marcel Dekker, Inc., New York. (2003)). EP 를 사용하는 플라즈미드 전달의 강화는 주입되는 조직이 높은 생산 및 혈류로의 단백질의 분비, 및/또는 항원전달에 대한 생물 반응기 로서 사용되는 것을 가능하게 한다. 발현 레벨은 플라즈미드 주입이상의 2 ~ 3 등급만큼 증가되어, 아데노바이러스 매개 유전자 전달의 양과 비교할 만한 레벨로 증가된다.

[0007] 전기천공은 유전자 전달 및 DNA 백신 접종의 적용과 함께, 기본적인 연구를 위한 유용한 도구가 되었다. 전기천공은 플라즈미드의 주입 이후 종양 세포를 감염시키는데 또는 종양 항원 약물 블레오마이신을 사람의 피부 및 피하 종양에 전달하는데 성공적으로 사용되어왔다. 전기천공은 다양한 호르몬, 사이토카인, 효소, 또는 항원을 인코딩하는 치료 유전자를 전달하기 위해 생쥐, 집쥐, 개 및 돼지에 사용되어왔다. 표적이 되는 수많은 조직 및 기관은 간, 눈, 고환, 심근, 평활근, 상이한 위치에 있는 종양, 및 골격근육을 포함한다.

[0008] 큰 포유류 및 사람의 피부 EP 의 문제 중 하나는 상이한 해부학적 영역 사이의 피부 두께의 변화뿐만 아니라 피부 두께의 개별 변화이다. 예컨대, 사람의 삼각근 레벨의 피부 두께는 대략 2 밀리미터 ("㎜") 이고, 견갑부 레벨에서 피부 두께는 대략 2.6 ㎜ 이고, 허리에서 피부 두께는 대략 1.7 ~ 1.9 ㎜ 이고, 허벅지에서 피부 두께는 대략 1.6 ~ 1.7 ㎜ 이다. 피부는 민감하고, 따라서 전극은 또한 최소한의 불편함을 발생하는 게이지 및 구성으로 되어야 한다. 치료를 위해 어느 정도의 불편함은 때때로 치료 동안 환자에게 받아들일 수 있지만, 단지 비교적 고통이 적은 방법이 예방 접종에 사용될 수 있는 것이 제안되었다. 전극 배열체 (array) 구성 및 특징, 장치 펄스 패턴은 이러한 문제에 대하여 적응되어야 한다. 최대한의 균일한 전기장은 전극의 팁을 지나 대략 2 ㎜ 로부터 그의 팁으로부터의 전극의 1/3 지점까지의 전기천공 동안 발생되는 것이 알려져 있다.

[0009] Draghia-Akli 등에 의한 U.S. 특허 제 7,245,963 는 인체 또는 식물의 선택된 조직의 세포에 생체 분자의 도입을 용이하게하기 위한 모듈형 전극 시스템 및 이들의 사용을 기재하고 있다. 모듈형 전극 시스템은 다수의 바늘 전극, 피하 바늘, 프로그램 가능한 정전류 (constant-current) 펄스 제어기로부터 다수의 바늘 전극으로의 전도성 연결을 제공하는 전기적 커넥터, 및 전원을 포함한다. 시술자는 지지 구조 상에 장착된 다수의 바늘 전극을 잡아서 이들을 인체 또는 식물의 선택된 조직 안으로 확실히 삽입할 수 있다. 생체 분자는 피하 바늘을 통하여 선택된 조직 안으로 전달된다. 프로그램 가능한 정전류 펄스 제어기가 작동되고 정전류 전기 펄스가 다수의 바늘 전극에 가해진다. 가해진 정전류 전기적 펄스는 다수의 전극들 사이의 세포 안으로의 생체 분자의 도입을 용이하게 한다. U.S. 특허 제 7,245,963 의 전체 내용은 여기서 참조로 통합된다.

[0010] Smith 에 의해 제출된 U.S. 특허 공보 2005/0052630 은 인체 또는 식물의 선택된 조직의 세포 안으로의 생체 분자의 도입을 효과적으로 용이하게 하는 데 사용될 수 있는 전기천공 장치를 기재하고 있다. 이 전기천공 장치는 그 작동이 소프트웨어 또는 펌웨어에 의해 구체화되는 동전기 (electro kinetic) 장치 ("EKD 장치") 를 포함한다. EKD 장치는 사용자 제어를 기본으로 하는 배열체의 전극과 펄스 매개변수의 입력 사이에 일련의 프로그램 가능한 정전류 펄스 패턴을 생산하고, 전류 파형 데이타를 저장 및 입수를 가능하게 한다. 전기천공 장치는 또한 바늘 전극의 배열체를 갖는 교체 가능한 전극 디스크, 바늘을 위한 중앙 주입 채널, 및 제거 가능한 안내 디스크를 포함한다. U.S. 특허 공보 2005/0052630 의 전체 내용은 여기서 참조로 통합된다.

[0011] U.S. 특허 제 7,245,963 및 U.S. 특허 공보 2005/0052630 에 기재된 전극 배열체 및 방법은 단지 근육 같은 조직뿐만 아니라, 다른 조직 또는 기관으로의 깊은 침투를 위해 적응된다. 전극 배열체의 구성 때문에, 전극에 의해 미리 윤곽이 그려진 구역 내에, 바늘 (정선한 생체 분자를 전달하기 위한) 은 또한 표적 기관에 완전히 삽입되고, 주입은 목표 조직에 수직으로 투여된다. U.S. 특허 제 7,245,963 및 U.S. 특허 공보 2005/005263 에 기재된 전극은 바람직하게는 20 ㎜ 의 길이이고 21 게이지이다.

[0012] 대체로, 전기천공은 생체막 내에 미시적인 경로 (구멍) 를 유도하기 위해 막통과 전기장 펄스를 이용하는 것이

다. 이러한 구멍은 보통 "전기 구멍" 이라고 불린다. 이들의 존재는 생체 분자, 이온, 및 물이 막의 한 측에서 다른 측으로 통과하는 것을 가능하게 한다. 따라서, 전기천공은 약물, DNA 또는 다른 분자를 다세포 조직 내에 도입하는데 사용되었고, 어떠한 질병의 치료에 효과적인 것을 증명할 수 있다. 하지만, 살아있는 기관에 EP 를 사용하는 것은, 발생된 열 및 전기 구멍이 다시 밀봉될 수 없는 것으로부터 초래되는 세포 죽음을 포함하는, 몇몇 문제점을 갖는다. 약물 또는 생체 분자의 이로운 효과는 과도한 세포 가열 및 세포 죽음이 발생하는 EP 방법에서는 극도로 제한된다.

[0013] 전기천공의 과정을 더 잘 이해하기 위해, 어떤 간단한 식을 보는 것이 중요하다. 전위차 (전압) 가 조직에 이식된 전극에 인가될 때, 전극 사이의 거리 (*"d"*) 로 인가된 전압 (*"V"*) 을 나눈 것인, 전기장 (*"E"*) 을 발생시킨다.

[0014] $$E = V / d$$

[0015] 전기장 세기 (*E*) 는 약물 또는 생체 분자를 치료대상의 세포에 전달하기 위한 전기천공 프로토콜을 세울 때 매우 중요한 값이다. 전기장 세기는 주어진 전압에 대하여 전극 사이의 거리에 반비례하고, 전극 사이의 거리가 줄어듦에 따라 전기장 세기는 증가한다. 하지만, 전기장이 절연된 전극을 갖는 조직에서 발생될 수 있어야 한다 (즉, 이온의 흐름이 전기장을 발생시키는데 반드시 필요한것은 아니다). 이론의 제약을 받는 것을 원하지 않지만, 이온의 흐름은 전기 구멍을 개방하고 전기천공 동안 치료대상의 세포 안으로의 분자 이동을 가능하게 한다. 전위차를 갖는 두 지점 사이의 도체 또는 매체에서의 전하의 흐름은 전류라고 부른다. 전극 사이의 전류는, 조직 및 환자 내에서 변할 수 있는 이온 또는 조직 내의 대전된 입자에 의해 달성된다. 또한, 조직 내의 전도성 이온의 흐름은 전기 펄스가 개시되어 끝날 때까지 전극 사이에서 변할 수 있다.

[0016] 조직이 적은 비율의 전도성 이온을 가질 때, 저항은 증가되고, 열이 발생되고 세포는 죽게 된다. 옴의 법칙은 전류 (*"I"*), 전압 (*"V"*), 및 저항 (*"R"*) 사이의 관계를 나타낸다.

[0017] $$R = V / I$$

[0018] 조직 내의 두 개의 전극 사이의 저항은 그 곳에 존재하는 대전된 입자에 따라 변한다. 따라서, 조직 내의 저항은 전기 펄스가 개시되어 끝날 때까지 변한다.

[0019] 열은 전극간 임피던스에 의해 발생하고 (즉, 저항과 리액턴스의 조합이며 옴으로 측정됨), 전류, 전압 및 펄스 지속 시간의 곱에 비례한다. 열은 또한 전류의 제곱과 펄스 지속 시간 (*"t"*, 시간) 으로 표현될 수 있다. 예컨대, 전기천공 동안, 지지 조직에서 발생된 열 또는 전력 (*"W"*, 와트) 은 이하의 식으로 나타낼 수 있다.

[0020] $$W = I^2Rt$$

[0021] 대체로, 금속 또는 유전체 전극은 조직과 접촉하여 위치되고 미리 정해진 전압의 짧은 펄스는 세포가 막 구멍을 일시적으로 개방하게 하는 전극에 부과된다. 전기천공을 현재 설명하는 프로토콜은 결과적인 전기장 세기 (E) 로 정의되며, 이는 전극 사이의 거리에 비례하는 전압의 짧은 펄스에 의존하고, 전류 또는 조직 저항과는 관계없다. 따라서, 저항 또는 열은 전기천공된 조직에 의해 정해질 수 없고, 이는 상이한 펄스 전압 전기천공 프로토콜에 의한 다양한 성공을 유도한다. 확실하게, 효과적인 전기천공을 용이하게하는 전기천공 프로토콜과 세포가 죽는 것을 야기하는 전기천공 프로토콜 사이의 전압 펄스의 상한 진폭의 차이는 매우 적다. 추가적으로, 짧은 전압 펄스의 상한 진폭에 의해 야기되는 세포의 죽음과 세포의 가열 사이에 명확한 상관관계가 관찰되었다. 따라서, 전극 사이의 세포의 과열은 어떠한 주어진 전기천공 전압 펄스 프로토콜의 무효성에 대한 주 이유로 작용한다. 또한, 전극 사이의 전압이 아니라, 전극 사이의 전류가 어떠한 주어진 펄스 프로토콜의 유효성의 주된 결정자로 작용한다.

[0022] 전기가 치료대상의 세포에 전달될 때, 전기의 투여량은 전하량 (*"Q"*) 으로 정확하게 설명될 수 있으며, 이 전하량은 전류 (*"I"*) 와 시간 (*"t"*) 인 이하의 식에 따른다.

[0023] $$Q = It$$

[0024] 전류가 일정하지 않다면, Q 는 I 에 대한 시간 적분이다. 이러한 점에서, 대전된 입자 (이온 또는 분자) 는 유사한 방식으로 거동한다. 예컨대, 은 이온이 전기량 (쿨롱, coulomb) 의 표준 단위를 규정하기 위해 전극에 쌓일 때, 단지, 상기 규정된 전하량만이 중요하다. 어떠한 최소 전압은 전류를 발생시키기 위해 반드시 존재해야 하지만, 쌓이는 이온의 양은 미리 정해진 전압으로부터 정해질 수 없다. 이에 따라, 전기천공기 내의 세포에 전달되는 대전된 입자의 양은 전극에 부과되는 전압으로부터 얻을 수 없다.

[0025] 전기천공의 유효성은 전기천공이 그 이하로 발생되지 않는 펄스 세기에 대한 임계치, 및 세포가 파괴되는 상한이 있음으로 인해 제한된다. 실험적 증거는 상한과 하한 사이의 차이가 매우 적어서 과도한 실험 없이 효과적인 펄스 프로토콜을 설계하는 것이 매우 어렵다는 것을 보여준다. 이는, 피부 (상이한 두께와 층의 수의 상피와 진피의 세포, 지방, 근막, 모세혈관으로부터 작은 혈관에 이르는 상이한 치수의 혈관) 와 같은 주로 본래적으로 비 균일 세포 조성을 갖는 하나의 목표 조직일 때, 기술의 사용을 어렵게 하는데, 개체들의 즉각적인 상태의 변화와 각각의 개체의 피부 표면 상의 위치를 즉각적으로 분석할 수 있고 구체적인 상태를 출력할 수 있는 장치를 구동하는 정확한 소프트웨어만이 이러한 요구를 충족할 것이다. 또한, 전극은 피부 형태에 적응되어야 하고 조직 손상 및 출혈을 방지해야한다.

[0026] 전기천공 기구에 대한 참조는 전극 기구와 전기천공의 생체내 방법 양 쪽에 모두 유용함을 나타낸다. 대응적으로, 구체적인 전극이나 전기천공 방법을 주장하는 많은 U.S. 특허가 있다. 예컨대, Zhang 등의 U.S. 특허 6,302,874 는 성형 분야용 약품의 전기적으로 도움을 받은 국부적인 전달을 위한 방법 및 기구를 기재하고 있다. Hofmann 등의 U.S. 특허 5,676,646 는 환자의 생체 혈액 세포에 분자를 이식하는 전기천공 기구를 통해 유량을 교시하고 있다. Hofmann 등의 U.S 특허 6.241.701 및 Hofmann 등의 6,233,482 는 약물과 유전자의 매개 전달 전기천공을 위한 방법 및 기구를 기재하고 있다. 더 구체적으로는, 이들은 생체내 종양의 퇴행을 일으키기 위해 전기천공과 화합요법 약물의 조합하여 종양을 치료하기 위한 전기천공 치료 ("EPI") 를 위한 방법 및 기구를 기재하고 있다. Hofmann 등의 U.S. 특허 6,216,034 는 조직의 전기천공 치료를 위한 바늘 전극의 배열체의 프로그래밍 방법을 기재하고 있다. Hofmann 등의 U.S. 특허 6,208,893 은 연계 전극 템플릿을 갖는 전기천공 기구를 기재하고 있다. Hofmann 등의 U.S. 특허 6,192,270 은 기구를 위한 전극 조립체 및 표면 통과 분자 전달 방법을 기재하고 있다. Hofmann 등의 U.S. 특허 6,181,964 는 조직 안으로 약물 및 유전자를 전기천공하기 위해 최소한으로 침투하는 기구 및 방법을 기재하고 있다. Nanda 등의 U.S. 특허 6,150,148 은 사용자 지정 펄스 및 온도 프로파일 도표에 따라 자기장을 발생 및 인가함으로써, 과정 동안의 온도 제어를 위한 전기천공 기구를 기재하고 있다. Hofmann 등의 U.S. 특허 6,120,493 은 자기장 전기천공 기구를 이용하는 치료 약품의 도입 방법을 기재하고 있다. Hofmann 등의 U.S. 특허 6,096,020 은 사용자 지정 펄스 도표에 따른 자기장을 발생 및 인가하는 전기천공 방법 및 장치를 기재하고 있다. Hofmann 등의 U.S. 특허 6,068,650 은 생체네 전기천공 치료를 위해 바늘 배열체 구성을 선택적으로 인가하는 방법을 기재하고 있고, Hofmann 등의 U.S. 특허 5, 702,359 는 전극 사이의 거리를 감지하고 상기 전극 사이의 거리에 비례하는 거리 신호를 발생시키기 위한 감지 요소에 의해 환자의 신체의 일부에 전기천공을 적용하는 전극 기구와, 상기 전극 사이의 거리에 비례하여 전극에 높은 진폭의 자기 신호의 펄스를 인가하기 위한 상기 거리 신호에 반응하는 수단을 기재하고 있다. Mathiesen 등에 의한 U.S. 특허 공보 2005/0070841 은 전기천공 장치와 주입 기구를 기재하고 있다. 모든 이러한 인용된 특허는 여기서 참조로 통합된다. 여기 나타낸 새로운 피부 전극과 조합하여 사용되고, 여기서 설명된 실험에 사용되는 장치는 U.S. 특허 공보 2004/0167458 및 U.S. 특허 공보 2005/0052630 에서 주장되고, 각각의 전체 내용은 여기서 참조로 통합된다.

[0027] 생체내 플라즈미드 발현의 강화와 분비된 단백질의 생리학적 레벨의 달성의 경과가 전기천공을 사용하여 최근 보고되고 있다 (Draghia-Akli 등, Technology in Cancer Research & Treatment 1:365 - 371 (2002)). 연구는, 전기천공에 의해 일어나는 성장 호르몬 방출 호르몬 ("GHRH") 을 나타내는 플라즈미드의 주입은 저울로 달 수 있고 대형 포유류를 치료하기 위해 분비되는 단백질을 안정적으로 생산하기위한 접근을 나타낸다는 것을 나타낸다 (Draghia-Akli 등, Journal of Animal Science 81:2301 - 2310 (2003), Draghia-Akli 등, FASEB 17:526 - 528 (2003)). 여전히, 전기천공 기술에서, 특히 예방 접종 및 유전자 치료를 위한 효과적인 피부 전기천공에 대하여, 그리고 줄어든 침투 및 고통을 갖는 전기천공을 위해, 추가적인 개선이 필요하다.

[0028] 이전의 연구자들은 플라즈미드 DNA 전달을 위해, 개념적으로는 전극 사이에 미리 정해진 전압을 사용하는 정전압 시스템을 기본으로 하는전기천공 장치를 이용하였다. 조직에 끼워진 전극 사이의 임피던스는 각 경우마다, 또는 각 조직마다 변할 수 있기 때문에, 미리 정해진 전압은 미리 정해진 전류를 생산하지 않는다. 미리 정해진 전압 펄스가 완벽한 구형파형 함수의 손실에 더하여 펄스의 지속 시간 동안 근육 조직을 통하는 전류의 불규칙한 증가를 야기한다. 대조적으로, 정전류원은 실제로 근육 조직을 통하는 전류인 구형파형 함수를 유지한다. 하지만, 존재하는 상업상의 전기천공 장치는 세포가 노출되는 전류의 정확한 양을 측정할수 있게 설계된 펌웨어를 갖지 않는다. 종래의 전기천공 장치에 의해 발생된 불규칙한 전류는 조직 내에 쉽게 세포를 죽일 수 있는 양의 열을 발생할 수 있다. 예컨대, 통상적인 25 옴 ("Ω") 의 부하 임피던스에 걸친 5 암페어 ("A", 또는 "Amp") 의 평균 전류에 의한 통상적인 전기 50 밀리초 (*ms*) 는 이론적으로 조직내에서 세포를 죽이기에 충분한 7.5℃ 의 온도를 높일 수 있다. 전기적 쇼크에 의해 야기된 조직 손상의 물리적 현상은

Lee 등에 의해 재고되었다 (Lee 등, Annu. Rev. Biomed. Eng 2:477 - 509.:477-509 (200)). 따라서, 세포에 전달되는 전기량을 효과적으로 제어하기 위한 수단을 제공함으로써 정전압 전기천공과 관련한 기술적 문제를 피할 필요가 있고 이에 의해 세포의 파괴를 제한하면서 능숙한 전기천공을 달성한다.

[0029] 펄스 에너지가 배열체의 중앙에 집중된다는 사실로부터 많은 전극 스템에는 어려움이 존재하고, 물질이 감염되는 지점은 적층된다. 그 결과, 에너지 전달의 공간적 분배는 매우 불균일한 특징을 가질 것이다. 따라서, 전극 조립체에 의해 둘러싸인 부피 내의 세포의 일부만이 전기천공된다. 따라서, 또한 어떠한 경우에는 세포막 내의 도관에 영향으로 주는 이온 흐름을 정확하게 제어함으로써 내부 전극 공간 내의 세포에 전달되는 전기의 투여량을 효과적으로 제어하기 위한 수단을 제공할 필요가 있다. 또한, 상업적으로 존재하는 큰 동물의 경우 및 사람에 대한 전극은 일반적으로 가지세포를 표적으로 하는 ID 또는 SQ 에는 허용되지 않는데, 이는 이들은 통상적으로 너무 길고, 부적절한 게이지 및 부적당한 경사 배향을 갖기 때문이다. 따라서, 피부 전기천공기를 위한 어떠한 경우에, 피부 조직, 즉 동물에서의 ID 또는 SQ 공간 안으로 플라즈미드와 같은 생체 분자의 생체내 전달을 용이하게 하는 것에 대한 요구가 있다.

[0030] 또한 상업적으로 이용 가능한 전기천공 장치 및 바늘 배열체는 통상적으로 조직 저항, 두께 및 국부적 상태의 내부 및 개인내 변화의 제어를 허락하지 않는다. 이러한 도구에 의해, 미리 정해진 전압이 개인의 조직 저항 또는 두께와 관계없이 전극을 통해 전달된다. 따라서, 전기천공 장치와 피부 전극을 위해 펄스 전 및 그 동안 개별 변화를 고려한 적응된 전기천공을 허락하는 것에 대한 요구가 있다.

[0031] 게다가, 전기 전류를 전달하기 위한 전극과 같이 피부 및 근육 침투 교체 가능한 바늘 배열체를 사용하는 전기천공 장치는 바늘 배열체의 교체가 발생할 때 살균 상태를 유지하는 것이 요구된다. 이는 의학적 실행 및 규제에 따르는 관점 양쪽에 모두 필요하다. 이와 동시에, 일회용 피부 전극이 치료 및 예방의 목적으로 더 낮은 생산 비용과 대량의 예방 접종의 사용시에 허락되는 것이 필요하다. 따라서, 바늘 피부 배열체의 용이한 교체를 가능하게 하는 피부 전극 디스크를 제공하는 것이 또한 필요하다.

발명의 상세한 설명

[0032] 본 발명의 일 태양에 따르면, 조직(바람직하게는 피부 조직)에 정전류를 전달하여 포유류의 조직에 전기천공을 행하는 전기천공 장치가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 이 전기천공 장치는 사용자가 입력한 미리 설정된 전류와 유사한 정전류를 발생시키는 에너지 펄스를 포유류의 소망하는 조직에 전달하도록 되어 있다. 본 전기천공 장치는 전기천공 부품과 피부 전극 조립체를 포함한다. 전기천공 부품은 소망하는 조직에 정전류를 발생시키는 에너지 펄스를 전달할 수 있으며, 피드백 기구를 포함한다. 피부 전극 조립체는 공간적으로 배열된 다수의 피부 전극을 갖는 전극 배열체를 포함한다. 피부 전극 조립체는 전기천공 부품으로부터 에너지 펄스를 받아서 이를 피부 전극을 통해 소망하는 조직에 전달한다. 다수의 피부 전극들 중 적어도 하나는 에너지 펄스의 전달 동안에 중성이며 소망하는 조직에서 임피던스를 측정하여 그 임피던스를 전기천공 부품에 전달하게 된다. 상기 피드백 기구는 측정된 임피던스를 받아서, 정전류를 유지시키기 위해 전기천공 부품에 의해 전달되는 에너지 펄스를 조절하게 된다.

[0033] 본 발명의 일 태양에 따르면, 사용자가 입력한 미리 설정된 전류와 유사한 정전류를 발생시키기 위해 에너지 펄스를 포유류의 소망하는 조직에 전달하도록 되어 있는 전기천공 핸들 조립체가 제공된다. 이 핸들 조립체는, 공간적으로 배열된 다수의 피부 전극을 가지며, 이 피부 전극들 중 적어도 하나는 에너지 펄스의 전달 동안에 중성이며 또한 소망하는 조직에서 임피던스를 측정하게 되는 피부 전극 배열체; 피부 전극 배열체와 소통하고 피부 전극을 통한 에너지 펄스의 전달을 제어하는 제어기; 및 피드백 기구를 실행하는 수단을 포함하고, 이 피드백 기구는 소프트웨어 또는 하드웨어로 실행되며, 중성 피부 전극으로부터 측정된 임피던스를 받아서, 필요하다면 정전류를 유지시키기 위해 전달되는 에너지 펄스를 조절하게 된다.

[0034] 본 발명의 일 태양에 따르면, 포유류의 조직의 세포에 생체 분자를 전달하는데 있어 본 발명의 전기천공 장치를 사용하는 방법이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 이 방법은 용자가 입력한 미리 설정된 전류와 유사한 정전류를 발생시키기 위해 소망하는 피부 조직에 에너지 펄스를 전달하기 위해 여기서 설명하는 피부 전기천공 장치를 사용하는 것을 포함한다. 상기 방법은, 근육 조직을 실질적으로 뚫지 않고 다수의 피부 바늘 전극을 피부 조직안으로 삽입하는 단계; 다수의 피부 바늘 전극에 에너지 펄스를 가하여, 미리 설정된 전류와 동일한 전류를 피부 조직에 전달하는 단계; 및 다수의 피부 바늘 전극들 중의 중성 전극으로 피부 조직의 임피던스를 측정하고, 전기천공 장치내의 피드백 기구를 사용해서, 측정된 임피던스에 응답하여 가해지는 에너지 펄스를 조절하여 피부 전극에 전달되는 전류를 일정하게 유지시키는 단계를 포함한다.

[0035] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 다수의 바늘 피부 전극을 가지며 전류 파형 발생기와 전기적 소통을 하는 피부 전극 조립체를 제공하는 단계; 포유류의 근육 조직을 실질적으로 뚫지 않고 다수의 바늘 피부 전극과 포유류의 피부 조직을 접촉시키는 단계; 및 접촉된 피부 조직에 실질적인 정전류가 흐르는데 효과적인 조건하에서 잠시 동안 전류 파형 발생기로부터 전기 에너지 펄스를 다수의 바늘 피부 전극에 가하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0036] 본 발명의 수 많은 목적과 이점은 첨부된 도면을 참조하여 당업자에게 더 잘 이해될 수 있을 것이다.

실 시 예

[0067] 이하의 간략화된 또는 단축된 정의는 본 발명의 바람직한 실시형태에 대한 이해를 돕기 위해 주어진 것이다. 여기서 주어진 간략화된 정의는 배타적이거나 당업계에서 또는 사전적 의미로서 이해되는 정의에 모순되는 것은 결코 아니다. 여기서 간략화된 정의는 당 기술분야에서 알려져 있는 정의를 보충하거나 또는 보다 명확히 정의하기 위해 주어진 것이다.

[0068] 용어 "정전류(constant current)" 는 조직에 전달되는 전기 펄스 기간 중에 동일 조직 또는 이 조직을 형성하는 세포가 받거나 경험하는 전류를 의미한다. 전기적 펄스는 여기서 설명하는 전기천공 장치로부터 전달된다. 이 전류는 전기적 펄스 기간 중에 상기 조직에서 정전류량으로 유지되는데, 왜냐하면 여기서 제공되는 전기천공 장치는 피드백 요소(바람직하게는 즉각적인 피드백을 갖는)를 갖기 때문이다. 이 피드백 요소는 펄스 기간 전체에 걸쳐 조직(또는 세포)의 저항을 측정할 수 있으며, 또한 동일 조직내의 전류가 전기 펄스 전체에 걸쳐(마이크로초 정도) 또한 펄스 마다 일정하게 유지되도록 전기천공 장치가 그의 전기 에너지 출력을 변경하도록(예컨대, 전압을 증대시키도록) 한다. 몇몇 실시형태에서 피드백 요소는 제어기를 포함한다.

[0069] 용어 "피드백" 또는 "전류 피드백" 은 서로 바꾸어 쓸수 있으며, 제공된 EP 장치의 능동적 응답을 의미하며, 이는 전극 사이의 조직내 전류를 측정하고 전류를 일정한 레벨로 유지시키기 위해 EP 장치에 의해 전달되는 에너지 출력을 변경하는 것을 포함한다. 이 일정한 레벨은 펄스 시퀀스의 개시 또는 전기적 처리 전에 사용자에 의해 미리 설정된다. 바람직하게는, 상기 피드백은 피부 EP 장치의 전기천공 부품(예컨대, 제어기)에 의해 이루어지는데, 그안의 전기 회로는 전극 사이의 조직내 전류를 연속적으로 모니터링하고 이 모니터링된 전류(또는 조직내 전류)를 미리 설정된 전류와 비교하며 또한 모니터링된 전류를 미리 설정된 전류로 유지시키기 위해 연속적으로 에너지 출력 조절을 행하게 된다. 몇몇 실시형태서는 피드백 루프는 아날로그 폐루프 피드백이므로 즉각적이다.

[0070] 여기서 사용되는 용어 "생체 분자" 는 핵산 시퀀스, 단백질, 지질, 마이크로버블(예컨대, 약물 탑재 소낭) 및 파마슈티컬(pharmaceuticals)을 의미한다.

[0071] 여기서 상호 교환적으로 사용되는 용어 "전기천공", "전기 투과" 또는 "전기 동역학적 향상("EP")" 은 생체 막에서 미세 경로(세공)를 유도하기 위해 막통과 전기장 펄스를 사용하는 것을 말하는데, 이들 미세 경로의 존재로 플라즈미드, 올리고뉴클레오티드, siRAN, 약물, 이온 및 물과 같은 생체 분자가 세포막의 일측에서 타측으로 갈 수 있게 된다.

[0072] 용어 "분산 전류" 는 여기서 설명하는 전기천공 장치의 다양한 니들 전극 배열체로부터 전달되는 전류의 패턴을 규정하는데 사용되는데, 이 패턴은 전기천공되는 조직의 영역에서 전기천공과 관련된 열응력이 발생하는 것을 최소화해주거나 바람직하게는 제거해준다.

[0073] 여기서 사용되는 용어 " 피부 영역" (또는 "피부 조직")은 피부 조직, 진피, 진피하 및 진피내("ID"), 피내, 피하("SQ") 층 또는 공간을 말하고, 피부 영역은 근육 조직은 포함하지 않는다.

[0074] 여기서 사용되는 "실질적으로 뚫지 않고" 는 해당 대상물(예컨대, 바늘)에 의한 뚫기가 약 1～2mm 이하, 바람직하게는 약 5mm 이하임을 의미한다.

[0075] 여기서 사용되는 용어 "피드백 기구" 는 소프트웨어 또는 하드웨어(펌웨어)에 의해 수행되는 과정을 말하며, 이 과정은 소망하는 조직의 임피던스(에너지 펄스의 전달 전, 중 및/또는 후의) 를 미리 설정된 값, 바람직하게는 전류와 비교하고, 미리 설정된 값을 얻기 위해 전달되는 에너지 펄스를 조절하게 된다. 여기서 용어 "임피던스" 는 피드백 기구를 논의할 때 사용되는 것으로, 옴(Ohm)의 법칙에 따라 전류값으로 변환될 수 있으며, 따라서 미리 설정된 전류와의 비교가 가능하게 된다. 바람직한 실시형태에서, "피드백 기구" 는 아날로그 폐루프 회로에 의해 수행된다.

[0076] 본 발명의 일 태양은 본 발명의 전기천공 장치 및 포유류의 소망하는 조직에 에너지 펄스를 전달하고 그 조직에서 정전류를 유지할 수 있는 상기 전기천공 장치의 능력에 관한 것이며, 상기 조직은 바람직하게는 진피내 또는 피하 조직이다. 바람직하게는, 전기천공 장치는 피부 전기천공 장치("피부 EP 장치")이다. 피부 EP 장치는 EP 중에 근육 조직은 실질으로 뚫지 않고 피부 조직을 바람직하게 뚫게 된다. 상기 장치는 피부 조직(예컨대, 진피내 및 피하 조직)을 뚫을 수 있는 피부 바늘 전극을 통해 에너지 펄스를 전달하며, 에너지 펄스를 전달하고 에너지 펄스의 기간과 전체 전기천공 과정 중에 조직에서 정전류를 유지시킨다. 치료되는 조직에서 정전류를 유지시키는 현재 설명하는 피부 EP 장치의 응답성은 피부 EP 장치내 피드백 기구를 통해 달성되며, 이 피드백 기구는 조직의 열발생을 방지하며 조직 손상과, 통증을 줄여주고 제공되는 피부 전기천공 기술의 전체적인 성공에 기여하게 된다. 피드백 기구는 여기서 설명하는 어떤 소프트웨어 또는 하드웨어(또는 펌웨어)의 기능이며, 바람직하게는 하드웨어의 기능이다. 피드백 기구가 소프트웨어의 일부분인 실시형태에서, 그러한 소프트웨어는 피부 EP 장치의 작동을 제어하는 제어기와 디지털 소통을 하게 되는데, 이 제어기는 중성 피부 전극으로부터 임피던스를 받고 또한 그 임피던스를 미리 설정된 전류와 비교하며 조직내에서 정전류를 유지시키기 위해 소망하는 조직에 전달되는 에너지 펄스를 조절하는 작용을 수행한다.

[0077] 본 발명의 일 실시형태에서, 사용자가 입력한 미리 설정된 전류와 유사한 정전류를 발생시키는 에너지 펄스를 포유류의 소망하는 조직에 전달하도록 구성된 전기천공 장치가 제공된다. 이 전기천공 장치는 전기천공 부품 및 피부 전극 조립체를 포함한다. 전기천공 부품은 제어기, 전류 파형 발생기, 임피던스 시험기, 파형 로거(logger), 입력 요소, 상태 보고 요소, 소통 포트, 메모리 부품, 전원 및 전원 스위치를 포함하여 피부 EP 장치의 다양한 요소들 중 하나 이상을 포함하거나 통합한다. 몇몇 실시형태에서는, 전기천공 부품은 피부 EP 장치의 한 요소로서 기능하며, 다른 요소들은 전기천공 부품과 소통하는 별개의 요소(또는 부품)이다. 몇몇 실시형태에서는, 전기천공 부품은 피부 EP 장치의 하나 이상의 요소로서 기능하며, 이는 전기천공 부품과는 별개인 피부 EP 장치의 또 다른 요소와 소통할 수 있다. 본 발명은 한 전기 기계적 또는 기계적 장치의 일 부분으로 존재하는 피부 EP 장치의 요소로 제한되는 것은 아니며, 이 요소는 한 장치 또는 서로 소통하는 별개의 요소들로서 기능할 수 있다. 전기천공 부품은 소망하는 조직에서 정전류를 발생시키는 에너지 펄스를 전달할 수 있으며 피드백 기구를 포함한다. 피부 전극 조립체는 공간적인 배열로 다수의 피부 전극을 갖는 전극 배열체를 포함하며, 피부 전극 조립체는 전기천공 부품으로 부터 에너지 펄스를 받으며 이 에너지 펄스를 피부 전극을 통해 소망하는 조직에 전달한다. 다수의 피부 전극 중 적어도 하나는 에너지 펄스의 전달 동안에 중성이며, 소망하는 조직에서의 임피던스를 측정하고 그 임피던스를 전기천공 부품에 전달한다. 피드백 기구는 측정된 임피던스를 받고 정전류를 유지시키기 위해 전기천공 부품에서 전달되는 에너지 펄스를 조절할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 소망하는 조직은 피부 조직이고, 바람직하게는 피하 조직 또는 진피내 조직이다.

[0078] 도 2a 는 여기서 제공되는 EP 장치의 한 바람직한 실시형태의 시스템 다이어그램을 보여준다. 모든 기능 요소가 모든 실시형태에 필요한 것은 아니므로, EP 장치의 주 기능 요소가 단지 실례의 목적으로 상기 다이어그램에 나타나 있다. 각 요소는 각 요소의 하드웨어 기능 면에서 설명되어 있다. 하드웨어에 의해 실행되게 되는 일련의 일(event)이 여기서 설명하는 바와 같이 소프트웨어에 의해 제어될 수 있다. 이 예에서 장치의 중심 요소는 제어기이다. 제어기의 일예는 마이크로제어기로 도 2b 에 나타나 있는 개략도에서 볼 수 있으며, 이 마이크로제어기는 몇몇 실시형태에서는 텍사스 인스트루먼트 msp430F149 또는 모토롤라 68HC908AZ60A 이다. 다른 대안적인 제어기는 전기 공학의 당업자에게 알려져 있으며 위의 실례를 쉽게 교체할 수 있다.

[0079] 몇몇 실시형태에서 피부 전극은 바늘 전극, 전도성 봉 또는 전도성 막영역이며, 바람직하게는 바늘 전극이다. 바람직하게는, 바늘 전극은 근육 조직을 실질적으로 뚫지 않고 진피내 또는 피하 조직과 접촉할 수 있다. 몇몇 실시형태에서 피부 전극은, 여기서 설명하는 피부 EP 장치와 관련하여 사용될 수 있는 피부 전극 배열체(또는 피부 배열체 또는 바늘 피부 배열체)를 갖는 교체가능한 또는 교환가능한 피부 전극 디스크를 형성하는 기부(플라스틱재 일 수 있음)에 장착될 수 있다. 몇몇 실시형태에서 피부 전극의 길이는 약 1mm~20mm, 1mm~12mm, 2mm~10mm, 2mm~7mm 또는 약 5mm 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서 피부 전극은 22~28 게이지, 23~27 게이지, 24~27 게이지 또는 약 26 게이지일 수 있다. 바람직하게는, 피부 전극은 약 5mm 의 길이를 갖고 또한 26 게이지이다. 몇몇 실시형태에서 피부 전극은 피부 EP 장치 중에서 환자의 피부와 실제로 접촉하는 부분만으로 될 수 있다(교차 오염을 방지하기 위해). 선택된 영역에 백신 제형이 전달될 수 있고, 그 영역은 피부 배열체로 둘러싸이며 피부 전극이 피부안으로 삽입된다. 피부 배열체는 피부에 삽입된 피부 전극 주위에 균일한 압력을 바람직하게 발생시키며, 그리 하여 목표 영역에서 EP 과정 중에 균일한 전기장을 발생시키는데 도움을 준다.

[0080] 몇몇 실시형태에서, 피부 전극 조립체는 작동 스위치 및 피부 전극 조립체의 작동을 보고하는 상태 지시기를 더

포함한다. 몇몇 실시형태에서, 전극 배열체는 적어도 세개의 피부 전극을 포함하며, 바람직하게는 이 세개의 전극은 삼각형의 공간적 배열을 갖는다. 이 삼각형은 이등변 삼각형인 것이 바람직하다. 몇몇 실시형태에서, 전극 배열체는 측변의 길이가 5mm 이고 밑변의 길이가 3mm 인 이등변 삼각형으로 공간적으로 배열된 세개의 피부 전극을 포함한다. 몇몇 실시형태에서 전극 배열체는 일회용일 수 있으며 피부 전극 조립체에 게거가능하게 연결된다. 바람직하게는, 일회용 전극 배열체는 피부 전극 디스크이며, 더 바람직하게는 피부 전극 디스크는 살균가능하다.

[0081] 몇몇 실시형태에서, 복수의 피부 전극이 분산 패턴으로 에너지 펄스를 전달할 수 있다. 몇몇 실시형태에서 복수의 피부 전극은 프로그램된 시퀀스에 따라 피부 전극의 제어하에서 분산 패턴으로 에너지 펄스를 전달할 수 있으며, 프로그램된 시퀀스는 사용자에 의해 전기천공 부품에 입력된다. 몇몇 실시형태에서, 프로그램된 시퀀스는 차례대로 전달되는 복수의 펄스를 포함하는데, 복수 펄스의 각 펄스는 임피던스를 측정하는 하나의 중성 전극을 갖는 적어도 두개의 작용 피부 전극에 의해 전달되며, 복수의 펄스 중의 다음 펄스는 임피던스를 측정하는 하나의 중성 피부 전극을 갖는 적어도 두개의 작용 피부 전극 중 다른 전극에 의해 전달된다.

[0082] 몇몇 실시형태에서, 피드백 기구는 하드웨어 또는 소프트웨어로 수행된다. 바람직하게는 피드백 기구는 아날로그 폐루프 회로에 의해 수행된다. 바람직하게는, 이 피드백은 매 50㎲, 20㎲, 10㎲ 또는 1㎲ 마다 일어나는데, 하지만 실시간 피드백 또는 즉각적인(즉, 응답 시간을 결정하는데 이용가능한 기술로 결정할 때 실질적으로 즉각적인) 것이 바람직하다. 몇몇 실시형태에서, 중성 전극은 소망하는 조직에서 임피던스를 측정하고 그 임피던스를 피드백 기구에 전달하며, 그 피드백 기구는 임피던스에 응답하여, 정전류를 미리 설정된 전류에 유사한 값으로 유지시키기 위해 에너지 펄스를 조절하게 된다. 몇몇 실시형태에서, 피드백 기구는 에너지 펄스의 전달 동안에 정전류를 연속적이고도 즉각적으로 유지시킨다.

[0083] 몇몇 실시형태에서, 피부 전기천공 장치는, 사용자로부터 입력을 받고 이 입력에 따라 에너지 펄스를 전달하기 위해 전기천공 부품을 제어하는 제어기를 더 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 이 제어기는 사용자로부터 입력을 받을 수 있으며, 이 입력에 따라 에너지 펄스를 전달하기 위해 전기천공 부품을 제어할 수 있다. 바람직하게는 상기 제어기는 단일 칩 마이크로제어기이다.

[0084] 몇몇 실시형태에서, 피부 EP 장치의 일 요소는 제어기로, 이 제어기는 그에 연결된 또는 그와 관련된 다양한 주변 장치를 제어하는 일을 맡을 수 있다. 제어기는 전기천공 절차를 관리할 수 있으며, 이 절차는 (1) 전류 파형 발생기를 제어하여 전극 조립체를 위한 정전류 펄스 패턴 또는 전기천공 발생 시퀀스를 생성시키는 일, (2) 전기천공이 수행되어야 하는지를 결정하기 위해 임피던스 시험을 수행하는 일, (3) 사용자 명령을 감지하고 처리하는 일, (4) 사용자에게 상태 정보를 제공하는 일, (5) 소통 포트를 통화여 전기천공 데이타를 외부의 전자 장치에 전달하는 일, 및 (6) 전기천공 데이타(예컨대, 전압 및 전류 곡선)를 메모리에 저장하고 그로부터 불러오는 일과 같은 작업을 포함한다. 제어기는 소프트웨어 또는 펌웨어의 사용으로 작동될 수 있으며, 이를 통해 사용자는 소망하는 펄스 파라미터 및 프로그램된 시퀀스(전극 점화(firing) 시퀀스를 포함해서)를 입력할 수 있고 또한 피부 EP 장치의 작동을 제어할 수 있다.

[0085] 몇몇 실시형태에서, 제어기는 사용자 및 피부 EP 를 받는 조직 모두로부터 온 정보를 효율적으로 처리하고 또한 조직에 정전류를 전달하기 위해 전기 에너지 출력을 제어하는 소프트웨어를 포함하거나 이 소프트웨어를 사용하여 프로그램된다. 프로그램은 미리 설정된 전류, 프로그램된 시퀀스(전극 점화 시퀀스), 펄스 기간, 펄스 수(펄스열의), 미리 설정된 전류에 대한 허용 오차를 포함하여, 전기천공 전에 미리 선택되는 다수의 펄스 파라미터 중 임의의 파라미터를 포함할 수 있다. 입력을 받아 처리하고 전기적 출력을 결정하기 위해 이를 팩토링하는 과정은 전기 펄스의 기간 중에 일어날 수 있고, 바람직하게는 1밀리초(ms), 더 바람직하게는 100마이크로초(㎲), 및 더욱 바람직하게는 10㎲, 더더욱 바람직하게는 1㎲ 내로 일어날 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 이 과정은 실시간으로 또는 즉각적으로 일어날 수 있다.

[0086] 여기서 설명하는 피부 EP 장치의 작동 예에서, 적어도 소망하는 정전류를 미리 설정된 전류로 설정하여 제어기는 프로그램된 시퀀스에 따라 에너지 펄스를 전달할 수 있다. 일 실시형태에서, 아날로그 폐루프 피드백 회로가 목표 조직(바람직하게는 피부)의 저항이 변함에 따라 전극에 인가되는 전압을 조절하여 소망하는 정전류를 연속적으로 유지시킨다. 소망하는 출력 전류를 제로로 설정하여 펄스 시간 길이에 이르게 되면 제어기는 펄스를 중단시킬 수 있다. 펄스 시퀀스가 종료되면, 제어기는 파형 데이타를 검토하고 소망하는 조직내의 전류가 전기천공 과정 중에 미 설정된 전류의 오차 범위를 벗어나면 사용자에게 경보를 발할 수 있다.

[0087] 제어기는 단일 칩 마이크로제어기일 수 있으며, 바람직하게는 여분의 I/O, 온보드 주변요소, 저전력 소비 및 확장성 메모리 능력 중 하나 이상의 특성을 갖는 프로세서이다. 몇몇 실시형태에서 제어기는 텍사스 인스트루먼

트 프로세서 msp430F149 를 포함한다. 소프트웨어는 전기천공 과정의 단계를 감독할 수 있고 또한 하드웨어와 함께 이 단계를 감독할 수 있으며, 펌웨어인 것이 바람직한데, 왜냐하면 이것은 단입 칩 마이크로제어기내에 영구적으로 속해있고 또한 그로부터 실행되기 때문이다. 몇몇 실시형태에서 소프트웨어는, 장치 사용자의 입력을 받고, 바늘 전극으로부터 펄스 수용 조직의 저항에 관한 정보 또는 그 조직내의 전류를 받으며 또한 각 전기펄스의 기간내에 받은 입력에 근거하여 전기 출력을 조절하는 것을 포함하는 알고리듬을 수행한다.

[0088] 몇몇 실시형태에서, 피부 전기천공 장치는 전기천공 부품과 소통하는 전류 파형 발생기도 포함하며, 이 발생기는 피부 전극 조립체와 전기적으로 소통된다. 상기 전류 파형 발생기는 피부 전극 조립체를 통해 전달되는 전류 펄스열 파형을 발생시키게 된다. 몇몇 실시형태에서, 사용자는 프로그램된 시퀀스를 전기천공 부품에 입력하며, 이 전기천공 부품은 프로그램된 시퀀스를 전류 파형 발생기에 전달한다. 전류 파형 발생기는 프로그램되어 제공된 시퀀스에 따라 전류 펄스열 파형을 발생시킬 수 있다. 바람직하게는, 전류 파형 발생기는 파워-트랜지스터 아날로그 회로이다. 전류 파형 발생기는 프로그램된 시퀀스에 따라 전극 배열체의 전극을 통과하는 전류 펄스열 파형을 발생시킨다. 펄스열은 바람직하게는 정사각형이며, 펄스수는 소프트웨어 또는 펌웨어에 의해 제한되는데, 바람직하게는 1~10 펄스, 더 바람직하게는 2~5 펄스, 보다 더 바람직하게는 2~3 펄스이다. 각 전극 세트에 하나의 펄스가 주어진다. 몇몇 실시형태에서, 펄스는 20ms~52ms 의 기간을 가지며 1Hz 의 비율로 발생된다. 펄스열의 진폭은 작동자에 의해 프로그램가능하며 0.1 암페어(A 또는 Amp)~1.5A 이고 증분은 0.1A 이다. 본 발명의 일 실시형태에서 펄스 진폭은 0.4A 이하, 바람직하게는 0.1~0.2A 이다(도 2, 3 참조). 펄스열의 진폭은 개별 조직의 저항에 따라 또한 개인 별로 적합하게 될 수 있고 또한 동일 개인 신체(바람직하게는 피부 조직)의 다른 영역에서도 달라질 수 있다. 전류 파형 발생기는 일반적인 파워-트랜지스터 아날로그 회로를 포함할 수 있는데, 이 회로는 제어기의 감독하에 기능한다.

[0089] 몇몇 실시형태에서, 피부 전기천공 장치는 피부 전극과 소망하는 조직 간에 전기적 연결을 이루기 위한 시험을 할 수 있는 임피던스 시험기를 또한 포함한다. 이 임피던스 시험기는 피부 EP 장치의 회로가 조직과의 적절한 전기적 연결을 이루었는지를 판단하는데 사용될 수 있다. 이러한 시험을 통해, 삽입된 피부 전극이 핸들과 양호하게 연결되었는지, 또한 피부 전극도 조직에 양호하게 연결되었는지를 확인할 수 있다. EP 치료에 앞서 임피던스 시험을 할 수 있다. 임피던스 측정치가 저항(옴(Ω)으로 측정됨)의 프로그램가능한 범위를 벗어나면, 임피던스 시험은 실패하여 전기천공 시퀀스는 개시되지 않는다(도 27a 의 전기천공 기능 흐름도참조(특히, 판단단계 27A.10 참조), 임피던스가 활성화되지 않으면(다시 말해, 전극과 소망하는 조직 사이에 전기적 접촉이 없으면) 상기 판단 단계에서 점화 지연단계로 갈 수 있다).

[0090] 임피던스 시험은 작동자가 프로그램할 수 있는 것이며, 작동 중에 비활성화될 수 있는 하드웨어 또는 소프트웨어에 의해 제어된다. 임피던스 시험기는 제어기의 감독을 받으면서 기능하는 일반적 작동의 증폭기 아날로그 회로로 구성될 수 있다.

[0091] 임피던스 시험기는 피부 EP 장치에서 안전 요소로서 기능할 수 있다. 이 시험기는 예컨대 모든 전극이 동일한 조직을 뚫었는지 또한 회로가 성립될 수 있는지를 알려줄 수 있다. 공기, 특히 건조 공기와 접촉하는 전극은 매우 높은 저항을 갖는다. 전기천공이 시작되고 하나 이상의 전극이 조직을 뚫지 못하였으면(이는 피부 전극의 취급과 피부 EP 과정시에 실제 일어날 수 있음), 결과적인 전극 전압은 수천 볼트가 될 수 있는데, 이러한 전압은 치료 대상자에게 치명적이거나 상해를 입히는 결과를 주게 되며 또한 피부 EP 장치를 손상시킬 수 있다. 이러한 이유로, 전극에 과도한 전압이 걸리는 것을 방지하기 위해 과부하 전압 보호를 실시할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 전기천공 장치는 안전 요소를 포함하고, 이 안전 요소는 전압 캡이며, 에너지 펄스에 대한 조절로 전압이 전압 캡 보다 높게 되면 그 전압 캡은 전기천공 장치가 조직에 에너지 펄스를 전달하는 것을 막게 된다. 전기적 부하(예컨대, 공기, 피부 또는 근육 조직)에 관계없이, V_{ij} 가 1ms 이하의 기간 동안 200V 를 넘으면 과전압 보호가 이루어질 수 있다(또는 안전 캡이 촉발될 수 있음). V_{ij} 는 전극 i 와 j 에 대한 전압이다(여기서, i, j 는 1~5 이다). 과전압 보호가 이루어지면(또는 전압 캡이 촉발되면), V_{ij} 는 다음 전기천공 펄스가 발생될 때까지 대략 0V 로 된다. 피부 EP 장치가 오프 상태일 때, 어떠한 전극쌍에 대한 전압도 바람직하게 10V 를 넘지 않는다.

[0092] 몇몇 실시형태에서, 피부 전기천공 장치는 전기천공 부품과 소통하는 파형 로거를 또한 포함한다. 바람직하게, 이 파형 로거는 에너지 펄스의 전달 동안에 전기천공 전압 및 전류 파형을 연속적으로 기록할 수 있다. 보다 바람직하게는, 파형 로거는 2000 샘플/초의 속도로 전기천공 전압 및 전류 파형을 기록할 수 있다. 파형 로거는 전기천공 과정의 파라미터를 샘플링하고 모니터링하여, 사용자가 있을 수 있는 문제를 받아서 처리할 수 있게 해주며 또한 전기천공 과정이 실패하거나 소망하는 결과를 얻지 못할 때는 설정을 조절할

수 있게 해준다. 대표적인 샘플 속도는 2000 샘플/초이며, 52밀리초(ms)의 2-3 전류 펄스 각각에 대해서는 약 104 샘플이다. 대표적인 전체 샘플 기간은 2208ms 이고, 샘플링은 첫번째 펄스가 발생되기 약 50ms 전에 시작되어 마지막 펄스 후 약 50ms 에서 끝나는 2-펄스 패턴이다. 전압과 전류 파형은 ±1 최하위 비트("LSB") 선형성으로 12-비트 디지탈 표시로 정량화될 수 있다. 전류 파형 분해능은 바람직하게는 적어도 10밀리암페어(mA) 이어야 하며 전압 파형 분해능은 바람직하게는 적어도 1.0V 이어야 한다. 파형 로거는 일반적 작동의 증폭기 아날로그 회로 및 제어기와 함께 사용하는데 적합한 아날로그-디지탈("A/D") 변환기로 구성될 수 있다. DNA 제형의 피부 전달을 위한 파형 로거의 특성의 예가 도 2c 에 표로 나타나 있다("2.5" 참조).

[0093] 몇몇 실시형태에서, 피부 전기천공 장치는 사용자 및 전기천공 부품과 직접 소통하는 입력 장치를 또한 포함하며, 이 입력 장치는 입력 명령을 받을 수 있고 또한 이 입력 명령을 전기천공 부품에 전달할 수 있다. 바람직하게는, 입력 장치는 숫자 키패드 또는 터치 스크린이다. 일 예에서, 피부 EP 장치 작동 파라미터는 작동자에 의해 숫자 키패드(Grayhill 88AB2 와 같은) 를 통해 입력된다. 바람직한 실시형태에서, 키패드에 입력되는 숫자는 액정 디스플레이("LCD")에 나타나게 된다. 프로그램될 수 있는 전형적인 파라미터는 전기천공 펄스 전류, 임피던스 시험 활성/비활성 및 전기천공 발생 지연이다. 키패드에 관련된 사항들은 또한 제어기의 감독을 받을 수 있다. 설명한 피부 EP 장치들 중 하나를 사용하는 전기천공에 유용한 정보의 일 예로는, 치료대상 식별 숫자, 열내 펄스의 수, 사전 대기 시간(초), 펄스폭(ms), 펄스 전류(Amp) 및 피부 전극 배열체의 바늘 전극을 위한 스위칭 패턴이 있다(치료대상 식별 숫자 및 모든 전기천공 조건들은 자동적으로 기록되고 분석에 이용될 수 있다). 설명한 피부 EP 장치들 중 하나를 사용하는 전기천공에 유용한 정보의 일 예로가 도 2c 에 나타나 있다 (치료대상 식별 숫자 및 모든 전기천공 조건들은 자동적으로 기록되고 분석에 이용될 수 있다).

[0094] 몇몇 실시형태에서, 피부 EP 장치는 시스템의 상태를 나타내거나 이를 작동자에게 알려주는 상태 보고 요소를 더 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 피부 전기천공 장치는 또한 전기천공 부품과 소통하는 상태 보고 요소를 포함한다. 바람직하게는, 상태 보고 요소는 정보 표시 패널, 청각적 알림 수단, 발광 다이오드 또는 이들의 조합물이다. 상태 보고 요소는 펄스 에너지의 발생 및 정전류의 전달을 확인해 보고할 수 있다. 이들 상태 보고 요소는 액정 디스플레이("LCD")(예컨대, Lumex LCM-S02004DSF)와 같은 정보 표시 패널을 포함한다. LCD 는 문자 표시형인 것이 바람직하고 각각 20 문자의 4개의 라인을 표시할 수 있는 것이 바람직하다. LCD 는 토글 스위치에 의해 온/오프될 수 있는 백라이트를 구비하는 것이 바람직하다. 상태 정보는 부저(예컨대, CUI CEP-2202AS)와 같은 청각적 알림 수단으로 제공될 수도 있다. 바람직하게 각각의 피치는 소프트웨어 또는 펌웨어에 의해 제어되어 상이한 의미를 갖는다. 예컨대, 버저의 음량은 프로그램가능한 세개의 설정을 가질 수 있으며 버저에서 1m 떨어진 거리에서 약 60~80 dB이다. 음압 레벨 범위는 참조용으로만 주어진다. 소리 레벨은, 최고 레벨로 설정된 상태에서 시끄러운 분위기(예컨대, 농장 또는 군사 시설)에서도 들을 수 있고 최저 레벨로 설정된 상태에서는 조용한 분위기(예컨대, 사무실)에서 너무 시끄럽지 않으면 허용가능한 것으로 생각한다. 또한, 피부 EP 장치는 꺼져 있는지 아니면 켜져 있는지를 나타내기 위해 발광 다이오드("LED")(예컨대, Lumex SSI-LXR1612ID 또는 패널 장착 적색 LED)를 구비할 수 있다.

[0095] 바람직하게는, 상태 보고 요소는 전기 펄스 시퀀스의 완료 후에 LCD 에 전기장이 성공적으로 발생되었음을 시각적으로 확인해주는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 각각의 전기천공 과정(또는 전기천공 시퀀스) 후에, LCD 는 3개 또는 5개의 숫자("1" 또는 "0", 전기천공 시퀀스의 각 펄스 마다 하나의 숫자가 부여됨) 의 리스트를 보여줄 것이다. "0" 은 펄스가 정상임을 나타내고 "1" 은 펄스가 비정상임을 나타낸다. 보다 구체적으로는, 각 펄스는 정상적인 설정 전류의 적어도 90% 를 얻어야 하며 또는 "0" 이 LCD 에 표시될 것이다. 어떤 펄스가 설정 전류의 90% 미만을 얻으면, 펄스는 비정상이며 "1" 이 표시될 것이다. 더욱이, 비정상 펄스의 최저 및 평균 전류가 표시될 것이다. 예컨대, 0.5Amp 의 전류로 설정된 5개의 펄스 전기천공 시퀀스에 대해, 펄스 3 과 펄스 5 가 각각 0.4Amp 와 0.3Amp 를 얻는다면, "00101" 과 "최저:60% 평균: 80%" 가 표시될 것이다.

[0096] 몇몇 실시형태에서, 피부 전기천공 장치는 또한 전기천공 부품과 소통하는 소통 포트를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 이 소통 포트는 보기의 목적으로 외부 전자 장치(휴대형 개인 컴퓨터(예컨대, "포켓 PC"), 개인 디지털 정보 단말기("PDA") 또는 개인 컴퓨터("PC")와 같은) 에 전기천공 파형 데이타를 업로딩하는데 사용될 수 있는 것이다. 바람직하게는, 통신 포트는 적외선("IR")포트(예컨대, 트랜시버:ACTiSYSACT-IR220LN115 또는 ZilogZHX1201; 인코더:Microchip MCP2120 또는 TIR1000)와 같은 광학 시리얼 통신 포트이다.

[0097] 몇몇 실시형태에서, 피부 전기천공 장치는 전기천공 부품과 소통하는 메모리 부품을 또한 포함한다. 이 메모리 부품은 전기천공 파형 데이타 및 작동 파라미터를 저장할 수 있다. 바람직하게는, 메모리 부품(예컨대, Atmel AT45DB321B 또는 AT45DB321C-TU)은 비휘발성인데, 이는 피부 EP 장치가 꺼져 있더라도 그 데이타를 유지할 수 있음을 의미한다. 메모리를 보존하기 위해, 전기천공 펄스열의 작용 기간 중에 전기천공 파형 데이타만

이 메모리에 저장될 수 있다. 비작용 기간에는 파형들 중 어느 하나가 특정의 문턱값을 초과하는 경우에, 샘플링된 데이타만이 메모리에 저장될 수 있다. 예컨대, 이들 문턱값은 2V 의 전압 문턱값 및 10mA 의 전류 문턱값일 수 있다. 전류 펄스열의 비작용 기간 중에 메모리에 저장된 데이타는, 일단 파형이 재구성되면 데이타의 시간 지수가 알려지도록 시간 스탬핑될 수 있다. 펄스열의 비작용 기간 중에는 데이타가 40 샘플(20ms)까지 저장되게 할 수 있다. 저장은 20ms로 제한될 수 있는데, 그 이유는 문턱값 중 임의의 하나가 20ms 보다 긴 누적 기간 중에 초과되면 전기천공 시퀀스의 나머지는 중단될 것임을 소프트웨어가 특정할 수 있기 때문이다. 전기천공 파형 데이타 세트는 상기 압축 기술이 실행될 때 약 2kB의 메모리를 요구한다. 바람직하게는 피부 EP 장치의 메모리 부품은 바람직하게는 적어도 8000 펄스(각 펄스는 개별적으로 저장됨)를 저장하기에 충분한 메모리를 갖는다.

[0098] 몇몇 실시형태에서, 피부 전기천공 장치는 전기천공 부품과 소통하는 전원을 또한 포함한다. 바람직하게는, 이 전원은 배터리이고, 더 바람직하게는 리튬 이온, 니켈 금속 수소화물, 납산 또는 니켈 카드뮴 배터리와 같은 배터리이다. 몇몇 실시형태에서, 전원은 바람직하게는 배터리(두개의 6V 파나소닉 LC-R064R5P 4.5Ah, 두개의 6V 제네시스 NP7-6 6V 7.0 Ah 와 같은) 이고 피부 EP 장치의 회로 각각에 전력을 공급한다. 이들 회로는 제어기와 그의 주변 요소를 위한 저전압/저전력 용량 전력 공급부, 임피던스 시험기를 위한 저전압, 저전력 용량 전력 공급부 및 전류 파형 발생기를 위한 고전력 용량 전력 공급부를 포함한다. 전원 스위치(E-스위치 R5CBLKBLKEF0 또는 DPDT 10A 패널 장착 로커 스위치와 같은)는 피부 EP 장치에 대한 전력을 제어하고 온 또는 오프될 수 있다. 오프 위치에서 전극 조립체에 대한 모든 전기 접속은 전원이 꺼진 후 5초 이내에 전기적으로 중성으로 된다.

[0099] 본 발명의 일 태양에서, 사용자가 입력한 미리 설정된 전류와 유사한 정전류를 소망하는 조직에 발생시키기 위해 포유류의 소망하는 조직에 에너지 펄스를 전달하도록 구성된 전기천공 핸들 조립체(또는 핸들 조립체)가 제공된다. 핸들 조립체는 공간적으로 배열된 다수의 피부 전극들을 갖는 피부 전극 배열체와, 이 피부 전극 배열체와 소통하는 제어기 및 피드백 기구를 실행하는 수단을 포함한다. 피부 전극들 중 적어도 하나는 에너지 펄스의 전달 동안에는 중성이며 소망하는 조직에서 임피던스를 측정하고, 상기 제어기는 피부 전극을 통한 에너지 펄스의 전달을 제어하게 되며, 상기 피드백 기구는 소프트웨어 또는 하드웨어로 실행되고, 중성 피부 전극으로 부터 측정된 임피던스를 받아서 필요하다면 정전류를 유지시키기 위해 전달되는 에너지 펄스를 조절하게 된다.

[0100] 몇몇 실시형태에서, 피부 EP 장치는 피부 전극 핸들 조립체를 또한 포함한다. 바람직하게는, 이 핸들 조립체는 세개의 요소, 즉 피부 전극 배열체(바람직하게는, 바늘 피부 전극 배열체), 피부 EP 장치의 상태를 보고하는 상태 지시기 및 작동 스위치를 포함한다. 상기 배열체는 하나 이상의 상이한 공간적 배열을 이루는 임의의 수의 바늘 전극과, 바람직하게는 홀수 갯수의 전극 및 또한 바람직하게는 더 적은 갯수의 전극(바람직하게는 7개 이하의 전극)을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 바늘 피부 전극 배열체는 원형이며 이등변 형태(긴변은 5mm 이고 짧은 변은 3mm)로 배치되는 세개의 바늘 피부 전극을 포함한다. 이러한 배치는 펄스 패턴과 전기장 발생 및 그에 따라 피부 EP 의 질에 중요한 것으로 생각된다. 피부 EP 장치의 상태는 하나 이상의 LED(가변적인 색을 발하며 전극 점화 시퀀스의 다양한 단계를 표시하기 위해 간헐적으로 발광하도록 프로그램될 수 있다)와 같은 상태 지시기의 사용을 통해 핸들 조립체에 바람직하게 표시된다. 핸들 조립체 작동 스위치는 전극 점화 시퀀스의 다양한 단계들을 개시하는데 바람직하게 사용된다("6.1.1")

[0101] 몇몇 실시형태에서, 핸들 조립체는 무선형이며 전기천공 부품(또는 제어기)로부터 원격으로 작동될 수 있다. 무선 핸들 조립체는 전기천공 부품(또는 제어기)로부터 정보(프로그램된 시퀀스 및 펄스 파라미터를 포함하여)를 받고 소망하는 조직에 에너지 펄스를 전달하며 그 조직에서 정전류를 유지시킬 수 있다. 무선 핸들 조립체는 작동을 위한 전기 충전을 유지하는 내부 배터리 또는 캐패시터를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 무선 핸들 조립체는 피드백 기구(바람직하게는 아날로그 폐루프 회로)를 포함한다. 무선 핸들 조립체는 전기천공 부품과 연결되어 정보를 교환하며 여기서 설명하는 피부 EP 장치의 기능을 하나 이상 제공한다.

[0102] 몇몇 실시형태에서, 전극 배열체는 일회용이며 피부 전극 조립체에 제거가능하게 연결된다. 바람직하게는, 일회용 전극 배열체는 피부 전극 디스크이며, 더 바람직하게는 피부 전극 디스크는 살균가능하다.

[0103] 본 발명의 일 실시형태에서, 피부 EP 장치는 핸들 조립체에 제거가능하게 장착될 수 있는 교체가능한 피부 전극 디스크를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 교체가능한 피부 전극 디스크는 피부 EP 장치의 핸들 조립체에 장착된다. 도 6a 및 6b 는 전극 배열체 (6.2.3 및 6.2.5) 의 측면도를 나타낸다. 도 6a 및 6b 에서, 전극 디스크는 지지체에 공간적 배열로 장착되어 선택된 조직(특히, 피부)에 뚫고 들어가게 되는 다수의 바늘 피부

전극을 갖는다. 바람직한 실시형태에서, 공간적 배열은 원형의 피부 배열이다. 피부 전극 디스크의 핸들측에 있는 바늘 배열체의 개별 피부 전극은 핸들에 있는 상보적인 전기 접촉 부속물에 삽입될 수 있도록 끝이 뭉툭하고 디버링되어 되어 있다. 핸들은 바늘 피부 전극과 펄스 발생기 또는 피부 EP 장치를 연결해주는 전기 커넥터를 바람직하게 내장한다.

[0104] 바람직한 실시형태에서, 피부 EP 장치의 피부 전극 조립체 및 교체가능한 피부 전극 디스크에 있는 바늘 피부 전극은 원형으로 배열된다. 더 바람직한 실시형태에서, 다수의 바늘 피부 전극은 세개의 바늘 피부 전극으로 이루어진다. 다른 바람직한 실시형태에서, 세개의 바늘 피부 전극의 중심은 2개의 변(5mm)과 짧은 밑변(3mm)이 내접하는 형태의 원형으로 배열된다.

[0105] 바람직한 실시형태에서, 바늘 피부 전극은 각 피부 전극 배열체를 살균 상태로 유지하면서 치료대상 간에 피부 전극 배열체를 신속하게 교환할 수 있도록 해주는 특정한 패키징 시스템(도 9)안에 살균 보관된다.

[0106] 몇몇 실시형태에서, 피부 EP 장치의 작동을 위해 프로그램된 시퀀스가 제공되며, 이는 바늘 피부 배열체의 각 전극이 양,음 또는 중성 전극으로 기능할 수 있는지를 제어한다. 예컨대, 도 2c 에 도시된 바와 같이, 프로그램된 시퀀스에서 각 전극은 양, 음 또는 오프 위치로서 기능할 수 있다. 도 2c 의 전체 시퀀스에서 보는 바와 같이, 전극 (1~3) 은 연속적으로 양 전극으로 되며, 피부 배열체의 서로 반대편 꼭지점에 있는 두 전극은 음으로 대전되거나("2.4" 에서 두번째 칼럼) 또는 한 전극은 오프되고 한 전극은 양이며 다른 한 전극은 음이다("2.4" 에서 네번째 칼럼).

[0107] 몇몇 실시형태에서, 전기천공 부품은 제어기, 이 제어기와 소통하는 파형 발생기, 상기 제어기와 전자적으로 소통하는 파형 로거, 및 파형 발생기에 전기적으로 연결된 배터리를 포함한다. 제어기는 사용자로부터 입력을 받을 수 있고, 이 입력에 따라 소망하는 조직에 에너지 펄스를 전달하라고 파형 발생기에 지시를 할 수 있고 또한 전달된 에너지 펄스에 따라 파형 로거에 데이타를 보낼 수 있다. 배터리는 파형 발생기에 전하를 보내며, 이 배터리는 리튬 이온, 니켈 금속 수소화물, 납산 또는 니켈 카드뮴 배터리이다. 장치는 휴대가능한 것이 바람직하다. 휴대형 장치는 배터리 팩으로 작동될 수 있고 치료 또는 백신 투여 목적으로 대량의 백신 접종에 적합하다.

[0108] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 에너지 펄스를 소망하는 피부 조직에 전달하여 사용자가 입력한 미리 설정된 전류와 유사한 정전류를 발생시키기 위해 상기 피부 전기천공 장치를 사용하는 방법이 제공된다. 이 방법은 근육 조직은 실질적으로 뚫지 않고 피부 조직에 다수의 바늘 피부 전극을 삽입하는 단계와, 미리 설정된 전류와 동일한 전류를 피부 조직에 전달하기 위해 다수의 바늘 피부 전극에 에너지 펄스를 가하는 단계와, 다수의 바늘 피부 전극중의 중성 전극으로 피부 조직의 임피던스를 측정하는 단계, 및 전기천공 장치에 있는 피드백 기구를 사용하여 측정된 임피던스에 응답하여 가해지는 에너지 펄스를 조절해서 피부 조직에 전달되는 전류를 일정하게 유지시키는 단계를 포함한다. 바람직한 일 실시형태에서, 피부 EP 장치의 사용 방법은 도 27a 와 27b 에 제공된 흐름도에 도시된 바와 같은 전기천공 기능 시퀀스를 통한 진행을 포함한다. 특히, 도 27b 의 27b.10 는 "전류 펄스 발생" 단계를 확대시켜 보여주며 피드백 기구를 나타낸다. 이 피드백 기구는 아날로그 폐루프 회로에 의해 실행되며 실시간으로(또는 즉각적으로) 작동된다.

[0109] 몇몇 실시형태에서, 본 방법은 에너지 펄스를 가하기 전에 소망하는 피부 조직과 바늘 피부 전극 간에 전기적 접촉이 이루어졌는지를 판단하기 위해 임피던스를 측정하는 단계를 더 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 방법은 적어도 하나의 DNA 백신을 진피내 또는 피하 조직에 접촉시키기 위해 사용된다.

[0110] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 방법은 에너지 펄스의 소망하는 피부 조직으로의 전달로부터 전기천공 장치에 의해 컴파일링되는 데이타를 기록하는 것을 포함한다.

[0111] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 다수의 바늘 피부 전극을 가지며 또한 전류 파형 발생기와 전기적으로 소통하는 피부 전극 조립체를 제공하는 단계, 포유류의 근육 조직을 실질적으로 뚫지 않고 그 포유류의 피부 조직을 다수의 바늘 피부 전극에 접촉시키는 단계, 및 접촉된 피부 조직에 실질적인 정전류가 흐르는데 효과적인 조건하에서 잠시 동안 전류 파형 발생기로부터 전기 에너지 펄스를 다수의 바늘 피부 전극에 가하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0112] 몇몇 실시형태에서, 전기 에너지 펄스를 가하는 단계는, 다수의 바늘 피부 전극 중의 중성 전극으로 상기 접촉된 피부 조직에서 임피던스를 측정하고 전류 파형 발생기와 전기적 소통을 하는 피드백 기구에 측정된 임피던스를 전달하는 것을 포함한다. 상기 피드백 기구는 실질적인 정전류를 유지시키기 위해 측정된 임피던스에 응답하여 전류 파형 발생기로부터 전달되는 에너지 펄스를 조절하게 된다. 몇몇 실시형태에서는, 피드백 기구는 전기

천공 장치의 일 부분인 아날로그 폐루프 회로에 의해 실행되며, 측정 및 전달 단계는 에너지 펄스의 기간 전체에 걸쳐 즉각적으로 수행된다.

[0113] 본 발명의 일 태양은 소망하는 피부 조직 또는 피부 세포 안으로 생체 분자(예컨대, DNA 플라즈미드) 를 생체내 전기천공법으로 전달하는 피부 EP 장치에 관한 것이다. 몇몇 실시형태에서, 피부 EP 장치는 피부 전극 바늘 배열체를 통해 해당 피부 조직에 정전류의 전기장을 제공하며 선택된 피부 조직(바람직하게는 피하(SQ) 및/또는 진피내(ID) 조직)의 세포 안으로 생체 분자의 도입을 용이하게 해준다. 피부 EP 장치는 프로그램된 시퀀스에 따라 피부 전극 바늘 배열체의 전극을 통과하는 전류 펄스열 파형을 발생시키며, 이 전류 펄스열 파형은 과정 중에 모니터링 및 기록 될 수 있다. 바늘 전극은 근육 조직을 실질적으로 뚫지 않고 피부 조직(SQ 또는 ID 와 같은)에 접촉할 수 있다. 피부 EP 장치는 프로그램된 순서에 따라 피부 배열체의 피부 전극을 통과하는 전류 펄스열 파형을 발생시키며, 이 전류 펄스열 파형은 과정 중에 모니터링 및 기록될 수 있다(도 2c 참조). 바늘 피부 전극은 근육 조직을 실질적으로 뚫지 않고 진피내 또는 피하 조직에 접촉할 수 있다.

[0114] 미국 특허 제 7,245,963 및 미국 특허 공보 2005/0052630 에는 본 발명에 따라 사용될 수 있는 어떤 전기천공 부품의 시스템 다이어그램이 개시되어 있는데, 이 전기천공 부품은 피부 EP 장치에 결합될 수 있거나 그의 일 부분이 될 수 있다. 각 요소가 그의 하드웨어 기능면에서 설명되어 있다. 이들 공보의 전체 내용은 본 발명에 첨조로 관련되어 있다. 하드웨어에 의해 활성되는 일련의 일들은 그 공보에서 설명하는 바와 같이 소프트웨어 또는 펌웨어 또는 이들의 조합으로 제어된다.

[0115] 어떤 실시형태에서, 피부 EP 장치의 전기천공 부품은 전극 연결 릴레이 매트릭스를 포함하는데, 이는 프로그램된 시퀀스를 용이하게 하고 또한 피부 전극 조립체에 있는 전극의 점화를 작용시킨다. 릴레이 매트릭스는 각 전극, 바람직하게는 바늘 전극을 제어할 수 있고, 각 전극은 5개의 상태(오프, 양의 저전압, 임피던스 측정 입력, 양의 고전압 및 음의 (규제) 고전압) 중 하나에 있다. 몇몇 실시형태에서, 릴레이 매트릭스는 스위치 매트릭스를 생성하는 11개의 더블 폴, 더블 스로우(DPDT) 릴레이를 포함한다. 이들 릴레이 중 10개는 SPI-병렬 포트인 시리얼 주변 인터페이스(SPI) 포트에 연결되는 일 세트의 시프트 레지스터를 사용하여 구동된다. SPI 슬레이브 인, 마스터 아웃(SIMO) 는 두 74VHC95(또는 승인된 등가물)시프트 레지스터의 데이타 인 핀에 연결된다. 74VHC595 는 2개의 클럭 입력부를 갖는다. 범용의 시리얼 동기/비동기 소통 인터페이스 클록(UCLK)신호는 레지스터에 데이타를 시프트시키는데 사용되는 레지스터의 시프트 레지스터 클럭 입력(SCK)핀에 연결된다. 개별적인 일반 목적의 입력/출력(GPIO)핀은 시프트 레지스터로부터 병렬로 출력 레지스터로 데이타를 클럭킹하는데 사용되는 저장 레지스터 클럭(RCK)클럭 입력부로 간다. 그 결과 동일한 시리얼 데이타가 양 시프트 레지스터에 시프트되는데, 하지만 그리고 나서 그 데이타는 변하는 것의 출력 레지스터에만 클럭킹된다.

[0116] 실제 릴레이 코일을 구동시키기 위해, SPI 포트 회로의 출력부는 2 ULN2003A(또는 승인된 등가물)8-채널 릴레이 코일 구동기에 대한 공급을 수행한다. 이 칩은 기본적으로 개방 콜렉터 이극 접합 트랜지스터(BJT) 의 배열체이다. 각 채널 입력부는 그것을 가로지르는 내부 킥백 다이오드를 또한 갖고 있어 외부 다이오드가 필요 없다. 릴레이 코일의 양극 측은 15볼트이고 그 코일의 음극 측은 ULN2003A 부품을 통해 접지된다.

[0117] 접촉자 매트릭스에는 3세트의 릴레이가 있다. 릴레이 접촉자 매트릭스의 일예는 도 26 에서 볼 수 있다. 제 1 세트는 실제로 1 DPDT 릴레이다. 한 세트의 접촉자는 양의 레일을 저전압(임피던스 측정 전압)으로부터 200V의 공급 출력으로 전환시킨다. 동일 릴레이에 있는 다른 세트의 접촉자는 임피던스 측정 회로와 펄스-전류 규제 회로 사이에서 음의 레일을 전환시킨다. 이렇게 해서, 이 릴레이의 위치에 따라 양 및 음의 레일 모두는 전류 펄스를 내거나 또는 임피던스 측정을 하게 된다. 다음 세트의 릴레이는 양극성(polarity) 렐레이의 5-릴레이 세트이다. 각 전극에 대해 하나씩 주어지는 이들 릴레이는 그 전극에 대한 극성을 양 또는 음의 레일로 전환시킨다. 마지막 세트의 렐레이는 접촉자의 인라인 세트로, 각 접촉자가 양 또는 음으로 고립되지 않도록 해준다. 릴레이 접촉자의 수명을 개선시키기 위해, 매트릭스는 소망하는 방식으로 부하를 적절한 전극에 연결시키도록 되어 있다. 그리고 펄스 또는 임피던스 회로는 전압 또는 전류를 부하에 전달한다. 그리고 나서 전압 또는 전류는 어떤 접촉자라도 개방되기 전에 제거된다. 전류가 가해지는 중에는 접촉자는 실제로 전환되지 않기 때문에, 접촉자의 수명이 크게 연장될 수 있다.

[0118] 피부 EP 장치에 의해 발생되는 전류의 일예가 도 3a 및 3b 에 나와 있다. 도 3a 및 3b 는 각 전류 펄스의 파형을 보여준다. 파형 파라미터는 다음고 같다.

[0119] 기간(t_p): 1000ms±250㎲

[0120] 상승 시간(t_r): 최대 20㎲

[0121] 안정 시간(t_s): 최대 20μs

[0122] 펄스 폭(t_w): 52ms ± 100μs

[0123] 하강 시간(t_f): 최대 20μs

[0124] 공칭 전류(I_n): I_n ∈(0.1 A, 0.2A, 0.3A ... 1.5A) ± I_n(t_h 동안, R_l ≤100Ω)의 ± 10%. R_l 는 도 3c 및 3d 에 나타난 세 전극 세트 중 임의의 것 사이의 저항이다. 전류 파형만 도 3a 및 3b 에 특정되어 있다. 전압 파형의 형상은 전류 펄스가 발생 중일 때(t_h 동안) 전극에 의해 나타나는 임피던스에 의존한다. t_h 동안에는 임피던스가 알려지지 않기 때문에 이 기간 동안에는 전압 파형이 특정되지 않는다. t_l 동안 임의의 전극 세트에 걸리는 전압은 0V 이다.

[0125] 이론의 제약을 받는 걸 원치 않지만, 전기천공은 동일한 구조를 이용하고 높은 이온 플럭스를 이들 구조에 통과시키고 도관을 개방하거나 확장시키는 것으로 생각한다. 금속 또는 유전 전극이 조직에 접촉하여 배치되고 전극 사이의 거리에 비례하는 미리 정해진 전압이 그에 부여된다. 전기천공에 사용되는 프로토콜은 식 E = V/d 에 따라 결과적으로 얻어지는 전기장의 세기로 정해지며, 여기서 "E" 는 전기장, "V" 는 부여된 전압이고, "d" 는 전극 사이의 거리이다.

[0126] 전기장 세기 E 는 치료대상의 세포 안으로 약물 또는 생체 분자를 전달하기 위한 전기천공 프로토콜을 세울 때 중요한 값이다. 따라서, 전극 사이의 거리에 비례하는 미리 정해진 전압의 펄스를 인가하여 다양한 프로토콜에 대한 전기장 세기를 계산할 수 있다. 그러나, 절연된 전극이 있는 조직에서 전기장이 발생될 수 있어야 한다(즉, 전기장을 발생시키기 위해 이온 흐름이 필요치 않다). 이론의 제약을 받는 걸 원치 않지만, 성공적인 EP 에 필요한 것은 전류이지, 전기장 그 자체는 아니다. 피부 EP 장치의 전류 파형 발생기의 작동은 일치하는 EP 겹침 지점이 생기지 않는 영역에서 분산 EP 가 일어나도록 정전류의 전기 펄스를 다수의 바늘 피부 전극에 분배하게 된다. 분산 EP 의 영역에 있는 세포의 투과성은 증가하고 생체 분자들은 세포 또는 조직을 과열시키거나 손상시키는 일이 없이 치료대상의 세포 안으로 전달된다 .

[0127] 본 발명의 일 태양은 ID 또는 SQ 백신 접종의 목적으로 포유류, 특히 피부의 하나 이상의 세포 안으로 생체 분자를 도입하는 피부 EP 장치에 관한 것이다. 바람직하게는, 이 피부 EP 장치는 전기 펄스가 전달되는 기간 전체에 걸쳐 SQ 또는 ID 조직과 같은 피부 조직에 정전류를 유지시켜서 그 조직에 생체 분자를 전달하게 된다. 몇몇 실시형태에서, 피부 전극 핸들 조립체의 핸들은 비도전성이고, 선택된 조직, 특히 피부 안으로 바늘 피부 전극 조립체를 이식하는데 용이한 수단을 사용자에게 제공하도록 설계되어 있다. 핸들의 스냅온 마운트와 함께 일회용 바늘 피부 전극 디스크를 사용하면, 바늘 피부 전극 디스크를 신속하게 탈부착할 수 있어 치료대상 간에 빠른(또한 살균 상태의) 교체가 가능하게 된다. 피부 EP 장치의 전원은 예컨대 생물학적 테러 공격 동안에 대량 백신 접종을 할 때 전기 출구 또는 다른 전원의 접근 또는 사용이 위험하거나 불편한 곳에서 사용되는 배터리 팩을 사용할 수 있다.

[0128] SQ 또는 ID 조직과 같은 피부 조직의 세포 안으로 전달되는 생체 분자는 DNA 플라즈미드, DNA 백신(DNA 백신과 DNA 플라즈미드는 서로 배타적이지 않음), 유전자, 치료 약물 또는 다른 제제(상보적인 제제이든 아니면 개선적인 제제이든)를 포함한다. 바람직하게는 생체 분자는 목표 피부 조직의 세포내에서 발현될 수 있는 DNA 플라즈미드이며, 피부 EP 전달을 위한 생체 분자는 하나 이상의 생체 분자를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서 생체 분자는 .....한 DNA 플라즈미드이다.

[0129] 본 발명에 사용되는 DNA 플라즈미드는 유전자 치료, 즉 상처 또는 질병 상태를 방지, 개선 또는 치료하기 위한 목적으로 수용자에게 선택된 유전자를 전달하는데 유용한 것일 수 있다. 질병의 병인을 줄이고 질병의 근원적 원인을 제거하거나 또는 질병의 발생을 방지하기 위해 DNA 플라즈미드는 질병의 증상을 개선시키기 위해 피부 EP 장치를 사용하여 포유류의 해당 유전자를 발현시킬 수 있다. DNA 플라즈미드에 있는 인코딩 유전자는 외생원에서 얻어지는 이종 유전자일 수 있다. 유전자 치료는 낭포성 섬유증 또는 근이영양증과 같은 유전적 원인 질병에 제공될 수 있다. 유전자 치료는 종양의 치료에도 적용될 있다. 바람직하게는, DNA 플라즈미드의 유전자는 성장 호르몬 방출 호르몬 또는 인슐린 성장 인자-I(합성 또는 자연적인 형태이든 전체 길이 또는 기능성 단편이든)를 인코딩한다.

[0130] 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 사용되는 DNA 플라즈미드는 예컨대, 간염, 인플루엔자, 뎅기열, 일본 뇌염 및 HIV 와 같은 전염병에 대한 백신 투여 또는 접종을 위해 포유류의 세포 안으로 도입될 수 있다. 어떤 예로

DNA 플라즈미드는 바이러스성 단백질의 면역성 단편인 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다.

[0131] 피부 EP 에 의해 피부 조직에 전달되는 생체 분자로서 사용될 수 있는 약물의 예를 들면, 블레오마이신, 네오카르시노스타틴, 수라민, 독소루비신, 카르보플라틴, 택솔, 미토마이신 C 및 시스플라틴을 포함하여, 항종양 또는 세포독성 효과를 갖는 화학요법제가 있다. 다른 화학요법제는 당업자에게 알려져 있으며, Merck Index 를 포함한 참고 문헌에서 찾아 볼 수 있다. 또한, 막간 전달("전달제")를 보조해 주는 제제 또한 전달대상 생체 분자로서 생각될 수 있으며, N-알킬멜라미드 및 파라-클로로 머큐리 벤조에이트를 포함할 수 있다. 생체 분자가 DNA 플라즈미드 또는 DNA 백신인 실시형태에서는, DNA 플라즈미드 또는 DNA 백신과 함께, 그 전에 또는 그 후에 전달되는 다른 생체 분자는 추가적인 하나 이상의 DNA 플라즈미드 또는 DNA 백신이다. 생체 분자가 면역 반응을 일으키는 목표 단백질을 발현시키도록 되어 있는 DNA 플라즈미드 또는 DNA 백신인 실시형태에서, DNA 플라즈미드 또는 DNA 백신과 함께, 그 전에 또는 그 후에 전달되는 다른 생체 분자는 그러한 목표 단백질에 대한 면역 반응을 더 향상시키는 단백질을 위한 하나 이상의 유전자이다. 이러한 유전자의 예를 들면, 알파 인터페론, 감마 인터페론, 혈소판 유도 성장 인자(PDGF),TNFα,TNFβ,GM-CSF,상피 성장 인자(EGF),IL-1,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,lL-10,IL-12,lL-18,MHC,CD80,CD86 및 신호 시퀀스가 삭제되어 있고 IgE 로부터의 신호 펩티드를 선택적으로 포함하는 IL-15를 포함하는 IL-15 와 같은 다른 사이토카인 및 림포카인을 인코딩하는 유전자들이 있다. 유용할 수 있는 다른 유전자는 MCP-1,MIP-1□,MIP-1p,IL-8,RANTES,L-셀렉틴,P-셀렉틴,E-셀렉틴,CD34,GlyCAM-1,MadCAM-1,LFA-1, VLA-1, Mac-1,p150.95,PECAM,ICAM-1,ICAM-2,ICAM-3,CD2,LFA-3,M-CSF,G-CSF,IL-4, IL-18의 돌연변이 형, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, IL-7, 신경 성장 인자, 혈관 내피세포 성장 인자, Fas,TNF 수용자,Flt,Apo-1,p55,WSL-1,DR3,TRAM, Apo-3,AIR,LARD,NGRF,DR4,DR5,KILLER,TRAIL-R2,TRICK2,DR6, 카스파제 ICE,Fos,c-접합, Sp-1,Ap-1,Ap-2,p38,p65Rel,MyD88,IRAK,TRAF6,IkB,비작용NIK,SAPK,SAP-1,JNK,인터페론반응유전자,NFkB,Bax,TRAIL,TRAILrec,TRAILrecDRC5,TRAIL-R3,TRAIL-R4,RANK,RANKLIGAND,Ox40,Ox40LIGAND,NKG2D,MICA,MICB,NKG2A, NKG2B,NKG2C,NKG2E,NKG2F,TAP1,TAP2 및 그의 기능적 단편을 인코딩하는 것들이 있다.

[0132] 당업자라면 피부 EP 장치의 많은 변경과 수정이 본 발명의 요지와 범위를 벗어나지 않고 가능할 수 있음을 이해할 것이다. 피부 EP 장치는 도 11 에서 볼 수 있는 임의의 수의 전극(예컨데, 상이한 패턴으로 배열되는 3개의 전극 배열체)을 포함할 수 있다. 거리 L 는 점 B 에서의 에너지 세기가 점 A 에서의 에너지 세기의 1/3 이 되도록 선택된다. 세 펄스 후에(1-2, 2-3 및 3-1), 점 B 는 점 A 와 동일한 누적 투여량(dose)를 받았다. 배열체 내 전극의 수가 많아질 수록, 균일한 에너지 분포를 내는데 필요한 거리 L 는 비례하여 커지게 된다. $L = k \times n$ 이다(여기서, n 은 전극의 수이고, k 는 비례 상수이다). 따라서, 더 많은 수의 전극을 선택함으로써, 더 많은 부피의 조직을 둘러쌀 수 있다. 선택되는 피부 전극의 최적의 수는 세포감열될 물질의 부피 및 주입과 전기천공 사이에서 얼마나 멀리 분산되는가에 달려 있다.

[0133] 본 발명을 다음의 실시예로 더 설명한다. 이들 실시예는 본 발명의 바람직한 실시형태를 나타내는 것으로 실례로만 주어진 것임을 이해해야 한다. 상기 설명과 이들 실시예로부터, 당업자라면 본 발명의 중요한 특징을 확인할 수 있을 것이고 또한 다양한 용도와 조건에 맞추기 위해 본 발명의 요지와 법위를 벗어나지 않고 다양한 변경과 수정을 가할 수 있을 것이다. 따라서, 여기서 설명하고 보여준 것 외의 본 발명에 대한 다양한 수정은 전술한 설명으로부터 명백할 것이다. 이러한 수정 또한 첨부된 청구범위에 속하는 것이다.

[0134] 바람직하게는 여기서 설명한 피부 EP 장치에 사용되는 DNA 제형은 높은 DNA 농도를 갖는데, 바람직하게는 피부 전달에 최적인 소량의 DNA 그램양, 바람직하게는 작은 주입량(이상적으로는 25~200 마이크로리터(㎕)) 을 포함하는 농도를 갖는다. 몇몇 실시형태에서, DNA 제형은 1mg/ml 이상과 같은 높은 DNA 농도(단위 부피의 제형 당 mg DNA)를 갖는다. 보다 바람직하게는, DNA 제형은 제형 200㎕ 에서 DNA 의 그램양(더 바람직하게는, 제형 100㎕ 에서 DNA 의 그램양)을 제공하는 DNA 농도를 갖는다.

[0135] 본 발명의 피부 EP 장치에 사용되는 DNA 플라즈미드는 공지된 장치와 기술의 조합을 사용하여 조제 또는 제조될 수 있지만, 바람직하게는 공동으로 소유되어 계류중인 미국 가출원 일련번호 제 60/939,792(2007년 5월 23일 출원)에 기재되어 있는 최적화된 플라즈미드 제조 기술을 사용하여 제조된다. 몇몇 실시에서, 이들 연구에 사용되는 DNA 플라즈미드는 10mg/ml 이상의 농도로 조제될 수 있다. 제조 기술은 또한 공동으로 소유된 미국 특허 제 7,238,522 (2007년 7월 3일 출원)에 기재된 것을 포함하여, 미국 일련번호 제 60/939,792 에 기재된 것 외에도 통상의 당업자에게 일반적으로 알려져 있는 다양한 장치와 프로토콜을 포함 또는 병합할 수 있다. 여기서 설명된 피부 EP 장치와 전달 기술에 사용되는 고농도의 플라즈미드는 합당하게 적은 양으로 ID/SC 공간내로 플라즈미드를 투여할 수 있게 해주고 또한 발현과 면역 효과를 향상시키는데 도움을 준다. 공동으로 소유된 출

원(미국 일련 번호 제 60/939,792) 및 특허(미국 특허 제 7,238,522)는 그 전체가 본 발명에 관련되어 있다.

[0136] 실시예 1. 피부 전기천공을 위한 동전기 장치 ("피부 EP 장치") 의 작동

[0137] 먼저, 피부 EP 장치를 통전시킨다. 사용자로부터 입력을 수신받을 때까지 펌웨어를 아이들 상태로 한다. 전기천공 시퀀스를 시작하기 위해서, 패스워드를 입력하여 LCD 에 도입 프롬프트가 뜬다. 이 시점에서, 핸들 조립체 작동 스위치를 누른다. 그 후, 사용자는 추후에 다운로드하기 위해 저장되는 모든 펄스의 데이타로 로그되는 숫자, 바람직하게는 치료대상 식별 숫자를 입력한다. 이 숫자는 숫자 키패드를 사용하여 입력되는 것이 바람직하다. 그 후, 생체 분자 제형이 합리적으로 적은 주입 부피, 이상적으로는 25-200 피부리터로 ID 또는 SQ 주입물로서 투여되고, 피부 전극 배열체는 피부에 삽입되어 용이하게 가시화되는 주입 영역을 완전히 둘러싼다. 그 후, 사용하는 버저로부터의 "경적" 을 통하여 작동 스위치를 누르게 되어 전기천공 시퀀스를 계속하게 된다. 작동 스위치를 누른 후에, 임피던스 시험기가 작동되는지의 여부를 펌웨어가 확인한다. 임피던스 시험기가 작동되면, 소프트웨어는 즉시 일련의 임피던스 측정을 실시한다. 펌웨어는 낮은 DC 전압으로 전극간의 임피던스를 시험한다.

[0138] 목표 조직에 전극이 삽입된 후, 그리고 임피던스 체크시, 프로세서는 전극 레벨에서 조직의 전도성을 체크한다. 이렇게 함으로써, 전극이 환자의 목표 조직과 전기 접촉을 형성하고 있음을 보장한다. 이러한 측정은 정확한 기록을 얻기 위해 충분한 시간, 종종 2 초 미만으로 신속하게 실시된다. 임피던스 시험시, 핸들 조립체에 적색 LED 가 켜진다. 임피던스 측정이 실패하면, 긴 에러 "경적" 이 울릴 것이고, 핸들의 LED 는 적색으로 유지될 것이며, LCD 에는 에러가 표시될 것이고, 펌웨어는 아이들 상태로 복귀할 것이다.

[0139] 모든 측정을 통과하면, 짧은 "경적" 이 나오고, 핸들 조립체에는 녹색 LED 가 켜지며, 디스플레이에서는 사용자가 작동 스위치를 계속 누르도록 한다. 펌웨어는 핸들 작동 스위치가 다시 눌러져서 시퀀스를 계속하도록 대기한다. 이 시점에서 키패드에 어떠한 키가 눌러지면, 긴 에러 "경적" 이 울릴 것이고, 유닛은 아이들 상태로 복귀할 것이다.

[0140] 펌웨어는 선택된 맥동 프로그램에 의해 규제되는 바와 같이 점화 시퀀스를 실시한다. 에너지 중 전기 펄스 또는 그 각각의 전달시, EP 장치는 목표 조직, 예를 들어 피부에서 측정되는 저항에 기초하여 출력을 연속적으로 조절하여 소망하는 전류를 유지한다. 본질적으로, 프로세서는 소망하는 출력 전류 레벨을 사용자에 의해 입력된 미리 설정된 전류값으로 설정함으로써 펄스 시퀀스를 개시한다. 목표 조직의 저항이 변경함에 따라 전극에 인가된 전압을 조절함으로써, 하드웨어 피드백 루프 (즉, 아날로그 폐루프 회로) 가 소망하는 출력 전류를 유지한다. 에너지 펄스의 전달동안에, 프로세스는 펄스 파형을 기록한다. 프로세스는, 상기 시간에서 소망하는 출력 전류를 영으로 설정함으로써, 펄스 시간 길이가 충족될 때 펄스를 종료한다. 펄스의 시퀀스가 끝나면, 프로세스는 파형 데이타를 검토하고 전류가 전기천공 시퀀스 동안 설정된 파라미터내에 있지 않으면 작동자에게 경보를 보내고, 그리하여 사용자에게 전기천공 시퀀스 또는 치료가 잘못되었는지의 여부를 알려준다.

[0141] EP 시퀀스가 성공적으로 완료되면, 피부 EP 장치는 아이들 상태로 되돌아간다. 전기 펄스 시퀀스의 완료 후에 LCD 에는 전기장이 성공적으로 생성됨을 시각적으로 더 확인하게 된다. 각각의 시퀀스 다음에, LCD 는 3 개 또는 5 개의 숫자 ("1" 또는 "0" 으로 전기천공 시퀀스의 펄스 각각에 대하여 하나의 숫자 주어짐) 리스트를 나타낸다. "0" 은 펄스가 정상인 것을 나타내고, "1" 은 펄스가 비정상인 것을 나타낸다. 보다 자세하게는, 각각의 펄스는 설정 전류의 적어도 90% 를 얻어야만 정상으로 나타나고 또는 LCD 에 "0" 이 표시될 것이다. 어떠한 펄스가 설정 전류의 90% 미만을 얻게 되면, 펄스는 비정상이고, "1" 이 표시될 것이다. 게다가, 비정상 펄스의 최저 및 평균 전류가 표시된다. 예를 들어, 0.5 Amp 의 전류로 설정된 5 개의 펄스 전기천공 시퀀스에 대하여, 펄스 3 및 5 가 단지 0.4 Amp 및 0.3 Amp 를 각각 얻게 되면, "0 0 1 0 1" 이 표시되고 또한 "최저:60%, 평균:80%" 도 표시될 것이다. 이러한 제어 메커니즘은 치료 또는 예방용 백신을 전달할 때 중요하다. 백신이 부적절하게 전달되면, 치료 또는 보호에 필요한 항체 또는 세포 반응을 얻을 수 없을 가능성이 높고, 또한 치료대상이 병에 걸릴 위험이 있다 (Roth 등, 2005년).

[0142] 실시예 2. 데이타 획득 및 저장

[0143] 피부 EP 장치의 소프트웨어 또는 펌웨어로 인해 실시간 데이타 획득 및 비휘발성 메모리에 저장할 수 있다. 도 2c 에서는 전기천공 과정 중 수집될 수 있는 데이타의 제 1 부분을 나타낸다. 파일 헤더의 제 1 부분에는 파일 이름 ("2.1") 및 동물 번호 ("2.2") 를 포함한다. 세로단 데이타 ("2.3") 는 3 개의 전극 각각에 대하여 시퀀스의 펄스, 맥동화 이전의 대기 시간, 펄스 폭, 및 펄스 전류를 나타낸다. 도면의 2.4 는 소정

의 펄스 시퀀스 중 각 전극의 형상을 식별하는 데이타의 제 2 부분을 나타낸다. 도면의 2.5 는 동일한 전기천공을 위한 원시 데이타의 제 3 부분의 포맷된 버전을 나타낸다. 마이크로소프트 엑셀 CSV 파일인 피부 EP 장치로부터 파일을 다운로드한다. 데이타는 복사되어 임시 마이크로소프트 엑셀의 스프레드시트 파일에 붙여진다. 이 스프레드시트의 세로단은 전기천공 펄스시 측정된 전압 (V) 및 전류 (Amp) 뿐만 아니라 산출된 조직 저항 (Ohm) 을 나타낸다. 거의 두 배의 피부 저항을 나타내는 돼지 피부에는, 큰 전극 (700Ω 내지 2200Ω) 을 사용한 후에 다운로드한 데이타보다 작은 전극을 사용한 후에 다운로드한 데이타를 사용한다.

[0144] 실시예 3. 돼지에 대한 플라즈미드 설계, 전달 방법 및 실험 연구

[0145] 플라즈미드 구조. 본원에 기재된 실험에 사용되는 pEGFP-N1 (캘리포니아주 마운티뷰에 소재하는 Clontech) 가 포유류의 세포의 더 밝은 형광성 및 더 높은 발현성 (최대 여기 : 488 nm, 최대 방출 : 507 nm) 에 대하여 최적화된 야생형 GFP 의 적향 변위 (red-shifted) 변수를 인코딩하고, pEGFP-N1 은 Leu 로의 Phe-64 및 Thr 로의 Ser-65 의 이중 아미노산 치환물을 포함하는 GFPmut1 을 인코팅한다. EGFP 유전자의 코딩 시퀀스는 인간의 코돈 사용 선호도 (preference) 에 대응하는 190 이상의 사일런트 베이스 변경을 포함한다. EGFP 를 플랭킹하는 시퀀스는 코작 컨센서스 이송 개시 지점으로 전환되어 진핵 세포에서 이송 효율을 더 향상시킨다. EGFP 유전자의 하류측 SV40 폴리아데닐레이션 신호가 EGFP mRNA 의 제 3 단부의 적절한 프로세싱을 지시한다. 또한 벡터 백본은 SV40 T-항원을 나타내는 포유류의 세포에서 복사용 SV40 원본을 포함한다. SV40 초기 조촉매로 이루어진 네오마이신-저항 카세트(네오르), Tn5 의 네오마이신/카나마이신 저항 유전자 및 헤르페스 심플렉스 티미딘 키나제 유전자로부터의 폴리아데닐레이션 신호는, 안정적으로 형질감염된 진핵 세포를 G418 을 사용하여 선택하도록 한다. 이러한 카세트의 상류측 박테리아 조촉매는 E. coli 에서 카나마이신 저항을 나타낸다. 또한, pEGFP-N1 백본은 E. coli 에서의 전파를 위한 복사용 pUC19 원본 및 단일 스트랜드형 DNA 제조용 f1 원본을 제공한다.

[0146] 전기천공 조건. 모든 실험에는 구형파 펄스가 사용된다. 각각의 실험에 대하여 전기천공 조건이 개별적으로 지정된다. 모든 경우에, 정전류가 0.1 ~ 0.4 Amp 에서 20 또는 52 밀리초/펄스 에 대하여 2 또는 3 개의 펄스 및 펄스간에 1 초로 사용된다. 비교대상 피부 EP 장치, 전기천공 장치 (생체 분자를 골격근육에 전달하는데 이전에 사용됨) 는 균일하게 이격된 5 개의 21 게이지 솔리드 스테인리스 강재 바늘 전극 (비전도성 재료에 장착됨) 의 원형 배열체 (1 cm 직경) 를 포함하였다. 피부 전기천공 피부 전극은 이등변 삼각형 형태 (2 개의 긴 변의 길이가 5 mm 이고, 짧은 변의 길이가 3 mm 임) 의 3 개의 26 게이지 솔리드 스테인리스 강재 바늘 전극으로 이루어지고, 비전도성 재료에 장착된다.

[0147] 돼지의 플라즈미드 DNA 의 근육내 주입. 3 ~ 6 주 정도의 나이이고 15 ~ 40 kg 의 중량의 혼성 교배종 새끼 돼지를 GFP 연구에 사용하였다. 음식물 및 물에 마음대로 접근가능한 개별 우리에 동물을 수용하였다. 균체내 독소가 없는 플라즈미드 형성물을 살균수에 희석하고 HPLC 정제된 저분자량 폴리-L-글루타메이트 (평균 MW 10,900) 로 1% 중량/중량으로 형성된다. 실험 0 일째, 동물을 손으로 잡아서 GFP 플라즈미드 용액을 전술한 바와 같이 ID 및/또는 SQ 로 직접 주입하였다. 각각의 주입 지점이 용이하게 식별되어 절개되도록, 주입 지점이 정사각형의 중간에 위치하는 정사각형의 좌측 상부 코너에서 중심으로부터 2 cm 에 문신을 위치시킨다. 적절한 주입 지점을 찾을 때, 모든 주표면의 혈관을 피한다.

[0148] 피부 수집. 돼지로부터 채혈하고 주입 지점을 식별한다. 피부의 2.5 cm 의 정사각형 영역, 피하 조직 및 소량의 밑에 놓인 근육은 각각의 주입 지점에서 즉시 절개된다. 절개된 영역은 365 nm 의 파장에서 UV 광을 사용하여 암실에서 관찰된다.

[0149] 발현 영역의 사진 분석. 디지털 카메라를 사용하여 충분한 형광성을 나타내는 샘플을 사진촬영한다. 형광성이 없거나 형광성이 적은 샘플은 사진촬영되지 않는다. 이러한 형광성은 이러한 치료를 모르는 3 명의 관찰자에 의해 0 ~ 5 스케일로 채점하였다. 영은 형광성이 없는 것에 부여되고, 1 은 매우 적은 형광성이 관찰되지만 사진촬영되지 않는 것으로 여겨지는 것에 부여되며, 3 ~ 5 는 사진촬영된 형광성으로부터 평가되었다. 조직 시험을 위해 샘플들을 보관하였다.

[0150] 실시예 4. 비교 연구

[0151] 모든 시험된 조건으로부터의 데이타를 표로 작성하였다. 도 10 에서는 조건만을 나타내고, 평균 점수는 2 이상이지만, 최대 가능한 점수는 5 이다 (점수에 대한 설명부 참조요, 식별번호 <103> 참조요). 도시된 데이타에서와 같이, 최고의 전체 결과는 피부-특정 피부 배열체 (도 10 의 첫번째 열) 를 사용하여 얻을 수 있다. 다음의 그룹 (도 10 의 두번째 열) 은 동일한 수치의 점수를 가지지만, 피부 배열체 ("MA") 에 대해서는 50

㎕ 에 조제된 단지 50 ㎍ 의 플라즈미드가 사용되고, 대형 배열체 ("LA") 에 대해서는 100 ㎕ 에 조제된 100 ㎍ 의 플라즈미드인 두배의 양이 사용된다. 게다가, 피부 전극 배열체에 대한 최적의 조건을 사용하여, 처리 시간이 실질적으로 감소되고, 주입 및 EP 간의 관찰된 처리 시간은 MA 를 사용할 때 4 초 (도 10 의 네번째 세로단 참조) 이고 LA 를 사용할 때 80 초이다. 플라즈미드 투여를 위한 많은 다른 조건, 조제 부피, 지연 시간, 전류 진폭 및 펄스 길이가 평가되고 도 10 에 나타내었다. 일반적으로, 부피가 작을수록 (용액이 보다 농축될수록), 적절한 플라즈미드 투여로 인해 더 나은 결과를 얻을 수 있다.

[0152] 실시예 5. 돼지의 근육내 전달과 진피내 전달 비교

[0153] 돼지의 진피내 (ID) 및 근육내 (IM) 전달된 CMV-GHRH 및 CMV-SEAP 플라즈미드의 집중적인 투여의 전달 및 발현이 비교된다. 전달 방법은 분비된 단백질 (SEAP, GHRH) 둘 다를 사용할 뿐만 아니라 처음에 돼지의 SEAP 면역성을 시험하여 돼지에서 최상의 발현을 나타내는 결과를 도시하였다.

[0154] 동물은 7 일 동안 개별적으로 수용되어 길들여졌다. 0 일째날 연구에서, 동물들의 체중을 재고 채혈한 후에 마취시켰다. 농도 및 전류 강도를 변화시키면서 (표 1 참조) 1 mg 의 CMV-SEAP 및 CMV-GHRH + 0.1% 의 폴리 L-글루타메이트 나트륨염을 돼지 (n=4/그룹) 에게 주입하였다. 4 초 후에, CELLECTRA™ 전기천공 장치 (펜실베니아주 19422 블루벨에 소재하는 VGX Pharmaceuticals, Inc.) 를 사용하여 동물을 전기천공하였다 ((5 개의 바늘, 52 밀리초 펄스, 펄스 사이 1초, 총 3 개의 펄스) 전류 (0.1 ~ 0.5 Amp) 를 변화시킴). 돼지는 마취로부터 회복되어 완전히 회복되도록 24 시간 관찰하였다. 치료 후 2 ~ 3 시간내에 완전히 회복되지 않는 어떠한 동물은 표시해두었다. 2 일째, 4 일째, 7 일째, 9 일째 및 11 일째에 돼지의 체중을 재고 재혈하였다. 장기간의 연구를 위해 음식물과 물은 마음대로 이용가능하다. SEAP, SEAP 항체 ELISAs, GHRH 및 IGF-I 를 위해 채혈하였다.

표 1

[0155]

실험 그룹 요약

그룹	플라즈미드	투여량	주입부피	IM or ID	EP 전류	n=
1	CMV-SEAP CMV-GHRH	10 mg/mL	100 μL	ID	0.2 Amp	4
2	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 μL	ID	0.2 Amp	4
3	CMV-SEAP CMV-GHRH	10 mg/mL	100 μL	IM	0.5 Amp	4
4	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 μL	IM	0.5 Amp	4
5	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 μL	IM	0.4 Amp	4
6	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 μL	IM	0.3 Amp	4
7	CMV-SEAP CMV-GHRH	10 mg/mL	100 μL	IM	0.1 Amp	4

[0156] 도 12 에 도시된 바와 같이, 제조자의 지시에 의하여, 화학발광 키트, 포스파-광 화학발광 레포터 분석 키트 (메사츄세스주 베드포드에 소재하는 Applied Biosystems) 를 사용하여 혈청 샘플내의 SEAP 발현을 측정하였다. 분석을 위한 검출 하한은 3 pg/㎖ 이다. SEAP 레벨은 0.5 Amp (43% 초과, *P=0.024) 에서 전기천공되는 IM 주입된 동물의 농축 플라즈미드에 대하여 희석 플라즈미드가 투여된 그룹에서 더 높다. 매우 낮은 레벨의 검출가능한 SEAP 단백질은 ID 주입된 동물로부터의 혈청에서 발견되었다.

[0157] 본 연구에 사용되는 SEAP 는 인간의 단백질이고, 그리하여 돼지내의 면역 반응을 유도한다. ELISA 를 사용하여 항체 반응을 측정하고, 그 결과는 도 13 에 도시된 그래프에서 볼 수 있다. 11 일째 혈청 샘플의 항체 반응은 11 일째 혈청 SEAP 결과에 따라 그래프화하였다. 최고 평균 항체 역가 중에는 농축된 플라즈미드 샘플이 있다.

[0158] GHRH 축선에서 하류측 호르몬, 인슐린 유형의 성장 인자 I 또는 IGF-I 을 사용하여 GHRH 발현이 측정된다. 그 결과는 도 14 에 도시된 그래프에서 볼 수 있다. IGF-I 은 혈청내에서 보다 안정적인 단백질이고 IGF-I RIA 키트를 사용하여 용이하게 측정가능하다. 주입후 11 일째에 혈청 IGF-I 레벨은 농축 플라즈미드 IM (C-IM-0.5 A) 이 투여된 그룹과 비교하여 비농축 플라즈미드 IM (D-IM-0.5 A) 이 투여된 그룹에서 더 높다.

[0159] 이 결과로부터, 주입 부피 및 경로는 발현되는 분비된 단백질의 발현성 및 이러한 단백질에 대한 면역성에 있어서 매우 중요하다고 나타났다. 농축 및 비농축 DNA 간에는 면역성에 대한 발현성에 있어서 상당한 차이가

있다.

[0160] IGF-I 발현성은 IM 이 주입되고 또한 0.5 Amp 전류 강도로 전기천공된 동물에서 높다. 전류 강도가 낮을수록 발현 레벨도 낮아지지만, 적은 수의 동물에서는 비통계적으로 상이한 차이가 난다.

[0161] 실시예 6. 돼지의 피부 EP 연구

[0162] 재료 및 방법

[0163] 동물

[0164] 3 ~ 6 주 정도의 나이이고 25 ~ 40 kg 의 중량의 혼성 교배종 새끼 돼지를 예비 연구에 사용하였다 (n=5/그룹). 미국 실험 동물 관리 평가 인증 협회의 표준기준에 따라서, 텍사스주 슈가랜드에 소재하는 Stillmeadow, Inc. 에 동물을 수용하였다. 동물은 음식물 및 물에 마음대로 접근할 수 있는 우리에 수용된 그룹이다. 동물은 실험 개시전에 5 일 동안 길들여졌다.

[0165] 플라즈미드

[0166] pEGFP-N1 또는 pSEAP-2 베이직 벡터 (캘리포니아주 팔로알토에 소재하는 Clontech Laboratories, Inc.) 가 실험 1, 2 에 각각 사용되었다. 실험 1 (Exp. 1) 에 사용되는 pEGFP-N1 은 포유류의 세포에서 더 밝은 형광성 및 더 높은 발현에 대하여 최적화된 야생형 녹색 형광성 단백질 (GFP) 의 적향 변위 변수를 인코딩하였다 (여기 최대 = 488 nm, 방출 최대 = 507 nm). 유비쿼터스 사이토메갈로바이러스 촉진제 (CMV) 는 pSEAP-2 베이직 벡터의 분비된 배아 알칼리성 포스파타제 (SEAP) 의 발현을 촉진시키고, 이러한 플라즈미드는 실험 2 (Exp. 2) 의 돼지에 사용된다. 상업적으로 구입가능한 키트 (미국 캘리포니아주 챗스워스에 소재하는 Qiagen, Inc.) 를 사용하여 플라즈미드가 얻어진다. 균체내 독소 레벨은 Kinetic Chromagenic LAL (스코틀랜드 찰스톤에 소재하는 Endosafe) 에 의해 측정된 바와 같이 0.01 EU/㎍ 미만이다. 플라즈미드 형성물은 살균수에 희석되고 폴리-L-글루타메이트 나트륨 염 (MW=10.5 kDa 평균) (미주리주 세인트 루이스에 소재하는 Sigma), 또한 VGX Pharmaceuticals, Inc., 면역 치료 부서 (텍사스주의 산림지대) 에서 정제된 HPLC 로 1% 중량/중량으로 조제되었다.

[0167] 진피내/피하 (ID/SQ) 플라즈미드 투여 및 전기천공 (EP)

[0168] 실험 1 의 0 일째날, 동물의 무게를 측정하고 이소플루란 (5% 유도, 2 ~3 유지) 으로 마취시켰다. 각 옆구리의 2 개의 3" × 3" 를 깎아서 주의깊게 세정하였다. 추후 식별을 위해서 문신 잉크를 사용하여 1 인치 블록을 표시하였다. 이 블록의 중심에서 각각의 플라즈미드 주입물을 전달하였다. 동물은 ID/SQ 주입물을 수용하고, 다양한 EP 조건 (이하 참조) 에서 주입 부피와 투여량, 플라즈미드 투여량, 주입 부피 (50 ㎍/50 ㎕, 50 ㎍/100 ㎕, 100 ㎍/100 ㎕ 및 200 ㎍/100 ㎕), 전류 진폭 및 펄스 길이는 변하고, 치료된 영역의 생검은 이러한 치료 그룹을 알지 못하는 별개의 관찰자에 의해 점수를 매겼다. 피부 부분을 해부한 사진을 찍고 주입후 5 일째 형광성을 측정하였다. 점수는 최고 발현을 가진 샘플과 비교하여 분포 영역 및 형광 강도에 기초하여 산출된다 (0 = 무형광성, 무분산성; 5 = 가장 밝은 형광성, 가장 큰 분산성). 모든 실험에는 구형파 펄스가 사용되고, 적합한 정전류 (하부 조직에 흐르는 정전류) 를 전달할 수 있는 피부 EP 장치 (VGX Pharmaceuticals, Inc., 면역 치료 부서 (텍사스주의 산림지대)) 를 사용하여 구형파 펄스가 투여된다. 모든 경우에, 적합한 정전류 파라미터는 0.1 ~ 0.4 Amp 이고, 20 밀리초/펄스 또는 52 밀리초/펄스에 대하여 2 또는 3 의 펄스 및 펄스간에 1 초를 가진다.

[0169] 2 가지 유형의 배열체가 실험 1 에 사용되는데, 그 중 하나의 전극 배열체는 5 개의 동일하게 이격된 21-게이지 솔리드 스테인리스 강재 바늘 전극 (비전도성 재료에 장착됨) 으로 된 원형 배열체 (1 cm 직경) 인 근육내 (IM) EP 용으로 이전에 사용되던 것이고, 길이가 3 mm 인 26-게이지 솔리드 스테인리스 강재 바늘 전극으로 이루어진 ID/SC 피부 바늘 전극은 이등변삼각형 형태 (2 개의 긴 변의 길이가 5 mm 이고, 짧은 변의 길이가 3 mm 임) 로 배치되고, 비전도성 재료에 장착된다 (도 17b 참조).

[0170] 실험 2 에서, 2 mg/㎖ 에서 표준 플라즈미드 형성물 (500 ㎕, IM 주입물과 유사) 또는 10 mg/㎖ 에서 농축 플라즈미드 형성물 (100 ㎕) 로서 1 mg 의 pSEAP 로 ID/SQ 및 피부 EP 를 동물에게 주입하고, SEAP 발현은 플라즈미드 투여 후에 11 일째까지 측정된다.

[0171] 혈액 수집 및 SEAP 분석

[0172] 실험 2 의 0 일째, 4 일째, 7 일째 및 11 일째에, 8:30 AM 에 동물의 무게를 측정하고, 목정맥 천공에 의해

MICROTAINER 혈청 분리기 튜브안으로 혈액을 수집한다. 이 혈액은 실온에서 10 ~ 15 분간 응고되며 그 후에 10 분간 3000 χg 에서 원심분리되며, 혈청은 추후 분석할 때까지 -80℃ 에 저장된다.

[0173] 혈청 샘플은 해동되고 50 ㎕ 는 제조자의 지시에 따라 포스파-광 화학발광 레포터 분석 키트 (메사츄세스주 베드포드에 소재하는 Applied Biosystems) 를 사용하여 SEAP 활성도에 대하여 분석되었다. 분석을 위한 검출하한은 3 pg/㎖ 이다. 보다 농축된 혈청 샘플은 SEAP 활성도에 대하여 분석하기 전에 생쥐의 혈청에서 1 : 10 으로 희석되었다. 모든 샘플은 LUMIstar Galaxy 발광측정기 (독일 오펜버그에 소재하는 BMG Labtechnologies) 를 사용하여 기록하였다.

[0174] 결과

[0175] 실험 1

[0176] 피부 바늘 전극 배열체 및 IM 전극 둘 다를 사용하여 가장 큰 GFP 점수가 얻어진다. 하지만, IM 전극으로 최적의 결과는, 피부 바늘 전극 배열체로 50 ㎕ 에서 조제되는 50 ㎍ 의 플라즈미드와 비교하여, 동일한 농도에서 두배의 플라즈미드 투여를 사용하여, 100 ㎕ 에서 형성되는 100 ㎍ 의 플라즈미드를 필요로 한다 (도 15 참조). 게다가, 피부 EP 에 대한 최적의 조건이 되도록 판정되는, 0.2 Amp, 2 펄스, 52 ms/펄스, 펄스간 1 초를 사용하여, 이 과정 시간이 실질적으로 줄어들고, 피부 EP 장치를 사용할 때 이 과정 시간은 단지 4 ~ 5 초이고, IM 배열체를 사용할 때 이 과정 시간은 80 초이다. 일반적으로 부피가 작아지면 (더 농축 용액), 적절한 플라즈미드 투여로 더 나은 결과를 얻을 수 있는 것으로 나타났다.

[0177] 실험 2

[0178] 피부 EP 와 함께 ID/SQ 플라즈미드 전달을 위해 최적인 이전의 실험에서 결정된 조건, 0.2 Amp, 2 펄스, 52 ms/펄스, 펄스간 1 초를 사용하여 돼지를 치료하였다. IM + EP 주입용으로 통상적인 부피 또는 작은 부피 제형을 사용하여 동일한 플라즈미드의 양, 1 mg 의 pSEAP 를 동물에 투여하였다. 농축 플라즈미드 형성물을 사용하여 높은 SEAP 값이 얻어지고 낮은 주입 부피(도 16 참조), $P < 0.05$ 가 얻어진다. 이러한 조건은 비인간 영장류 실험에서 더 유효하다.

[0179] 실시예 7. 영장류 실험

[0180] 붉은털 원숭이를 ID/SQ 주입 및 그 후의 피부 EP 에 의해서 낮은 투여량의 DNA (0.2 mg/항원) 로 두번 면역시킨 후 높은 투여량의 DNA (1.0 mg/항원) 로 세번 면역시켰다. 두번의 낮은 투여량의 면역에서는, ID/SQ 단독 및 ID/SQ 주입 후에 피부 EP (ID/SQ + EP) 그룹 둘 다에서 IFNγELISpot 에 의해 결정된 바와 같이, 약한 세포 면역 반응이 나타났다. 하지만, DNA 투여가 증가하면 3 번의 면역 후에 ID/SQ 그룹에서 1,000 SFU/10^6 PBMCs 에 대한 반응이 증가하였다. ID+EP 그룹은 ID/SQ 그룹보다 50% 이상 IFNγ-형성 세포를 가진다. ID/SQ+EP 그룹에서의 면역성 향상은 또한 ID/SQ 그룹보다 두배나 많은 항원-특정 IFNγ-생성 세포를 가진 ID/SQ+EP 그룹으로 메모리 T 세포 반응에서 보여진다. ID/SQ 면역만으로는 개그 (gag) 또는 엔브 (env) 항체 역가 (<50 말단 역가) 의 상당한 생성을 유발하지 않는다. 하지만, EP 로 플라즈미드 전달은 8800 의 피크 개그 말단 역가 및 1600 의 피크 엔브 말단 역가를 나타낸다. 또한, 최종적으로, 플라즈미드-인코딩된 rhIL-12 의 상호 면역으로 IL-4 ELISpot 분석에 의해 결정되는 바와 같이 T_H1 극성 면역 반응을 유발한다.

[0181] 재료 및 방법

[0182] 동물

[0183] 붉은털 원숭이 (Macaca mulatta) 는 미국 실험 동물 관리 평가 인증 협회의 표준기준에 따라서, 음식물 및 물에 마음대로 접근할 수 있는 BIOQUAL, Inc. (매릴랜드주 록빌) 에 개별 수용된다. 동물들은 어떠한 실험 이전에 검역시 적어도 30 일 동안 길들여진다.

[0184] 플라즈미드

[0185] pGag4Y, pEY2E1-B 및 WLV104 플라즈미드가 이 연구에 사용된다. pGag4Y 는 HIV 의 개그 단백질을 위해 인코딩하는 발현 카세트를 포함한다. Gag4Y 유전자는 추후의 연구를 위한 발현 벡터, pVax (캘리포니아주 칼스배드에 소재하는 Invitrogen) 에 서브클론화된다. pEY-2E1-B 는 HIV 클래드 B 의 엔벨로프를 위해 인코딩하는 발현 카세트를 포함한다. WLV104M 은 원숭이 IL-12 유전자를 인코딩하는 플라즈미드이다. 플라즈미드는 상업적으로 이용가능한 키트 (미국 캘리포니아 챗스워스에 소재하는 Qiagen Inc.) 를 사용하여 얻어진다. 균체내 독소 레벨은 Kinetic Chromagenic LAL (스코틀랜드 찰스톤에 소재하는 Endosafe) 에 의

해 측정했을 때 0.01 EU/㎍ 미만이다. 플라스미드 형성물은 살균수에 희석되고 폴리-L-글루타메이트 나트륨 염 (MW=10.5 kDa 평균) (미주리주 세인트 루이스에 소재하는 Sigma), 또한 VGX Pharmaceuticals, Inc., 면역 치료 부서 (텍사스주의 산림지대) 에서 정제된 HPLC 로 1% 중량/중량으로 형성되었다.

[0186] 면역화

[0187] HIV DNA 백신은, CELLECTRA™ 적합한 정전류 EP 장치 (상기 실시예 3 에서와 같이) 및 피부 바늘 전극 배열체를 사용하여 (n=3/그룹) EP 및 (n=3/그룹) 없는 EP 로 비인간 영장류에 전달된 ID/SQ 이다. 4 주 동안 면역을 실시하고 동물은 매 2 주마다 채혈하여 항체 및 T 세포 반응을 측정하였다. 처음 2 개의 면역물은 2 개의 0.2 mg HIV 항체 각각을 전달한다. 보조제로서 (개그 및 엔브) 및 IL-12 발현 플라스미드는 200 ㎕ 의 부피로 동물당 2 개의 ID/SQ 주입 지점으로 분리된다. 더 높은 플라스미드 농도 (10 mg/㎖) 에서 1 mg 의 HIV 백신 및 IL-12 플라스미드 각각 (총 3 mg) 을 사용하여 후속의 2 번의 면역이 실시되어, 이전의 2 번의 면역과 동일한 부피로 더 높은 플라스미드 투여량을 얻을 수 있다. 전기천공 조건은 0.2 Amp 의 정전류, 2 개의 펄스, 펄스간에 1 초인 52 ms 의 펄스 길이이다.

[0188] 채혈

[0189] 동물은 연구 기간동안 2 주마다 채혈되었다. 10 ㎖ 의 혈액이 EDTA 튜브에 수집되었다. PBMCs 는 표준 Ficoll-hypaque 원심분리에 의해 분리된 후 완전한 배양 매체 (culture medium) (10% 열-불활성화 태반 혈청, 100 IU/㎖ 페니실린, 100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신 및 55 μM/L β-메르캅토에탄올이 보충된 2 mM/L L-글루타민을 갖는 RPMI 1640) 내에 재부유된다. PBCs 는 ACK 용해 완충액 (뉴저지주 이스트 러더포드에 소재하는 Cambrex Bio Science) 으로 용해된다.

[0190] 효소 면역 측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

[0191] 96 개의 웰 플레이트 (well plates) 는 100 ng/웰의 재조합 HIV-1 IIIB p24 또는 gp120 (매사츄세스주 워번에 소재하는 ImmunoDiagnostics) 로 밤새 코팅되어, HIV 개그 및 엔브 반응을 각각 결정한다. 100 ng/웰의 태반 혈청 알부민으로 코팅된 플레이트는 음성 대조군으로서 사용된다. 37℃ 에서 1 시간동안 3% BSA-PBST 로 플레이트를 차단하였다. 그 후, 이 플레이트를 37℃에서 1 시간 동안 4 배의 시리얼 혈청 희석물로 인공배양하였다. 그 후, 염소 항원숭이 (goat anti-monkey) IgG 양고추냉이 과산화효소 복합 항체가 1:10,000 희석물 (오하이오주 오로라에 소재하는 MP Biomedicals) 에서 플레이트에 첨가되고 37℃ 에서 1 시간 동안 인공배양된다. 플레이트를 현상하기 위해서 테트라메틸벤지딘 (미네소타주 미니아폴리스에 소재하는 R&D Systems) 이 사용되고, 2N H_2SO_4 로 반응이 중지된다. 그 후, 광학 밀도 (OD) 가 측정된다.

[0192] IgG 말단 역가는 BSA 웰의 평균 OD 값의 2 배보다 큰 OD 값을 유발하는 가역 혈청 희석물로서 규정된다.

[0193] 효소 면역법(enzyme linked immunospot assay, ELISpot)

[0194] IFNγ 또는 IL-4 포획 및 검출 항체 (스웨덴에 소재하는 MabTech) 를 사용하여 ELISpot 가 실시된다. 펩티드 함유 웰로부터 음성 대조군 웰내에 스팟 개수를 차감함으로써 항원 특정 반응이 결정된다. 3 중 웰에 대하여 얻어진 평균값 (스팟/밀리언 비세포 (splenocytes)) 으로 결과를 나타내었다.

[0195] 통계적 분석

[0196] 프리즘 그래프패드 소프트웨어를 사용하여 데이타를 분석하고 평균 ±SEM 으로 나타내었다.

[0197] 비인간 영장류 연구 설계

[0198] 붉은털 원숭이는 도 17a 에 구체적으로 도시된 바와 같이 최적화된 HIV-1 개그 및 엔브 구조물 및 플라스미드 인코딩된 붉은털 원숭이 IL012 로 면역화하였고, 돼지의 실험에 사용되는 장치는 또한 비인간 연장류에 사용된다 (도 17b). 3 마리의 동물은 ID/SQ 주입으로 면역화되고, 3 마리의 동물은 ID/SQ 주입후에 피부 전기천공 (ID/SQ+EP) 으로 면역화하였다. 동물들은 0 주째, 4 주째, 8 주째, 12 주째, 16 주째에 5 배 면역화되었다. 2 주마다 혈액을 채취하고, 각각의 면역후에 4 주째에 ELISA 분석을 수행하면서 각각의 면역후에 4 주째에 ELISpot 분석을 실시하였다.

[0199] ELISpot 분석

[0200] 각각의 면역후에 세포의 면역 반응의 유도를 IFNγELISpot 으로 결정하였다 (도 18). 항원당 0.2 mg 의 하

나의 낮은 투여 면역화 후에, ID/SQ 및 ID/SQ+EP 그룹 둘 다는 매우 약한 반응 (각각 72±11 SFU/10^6 PBMCs 및 85±34 SFU/10^6 PBMCs) 을 가진다. 두번째 낮은 투여 면역화는, ID/SQ 그룹 (173±77 SFU/10^6 PBMCs) 에서 IFNɣ 생성 세포의 수가 두배로 되고, ID/SQ+EP 그룹 (287±34 SFU/10^6 PBMCs) 에서 반응이 세배가 된다. 두 개의 낮은 투여 면역화 후에 매우 약한 세포 반응이 관찰되면 다음의 3 개의 면역화를 위해 DNA 를 더 많이 (항체당 1 mg) 투여하는 것을 사용한다. 면역 반응은 ID/SQ 그룹 (176±72 SFU/10^6PBMCs) 에서 세번째 면역화로 상당히 증가하지 않는다. 하지만, ID/SQ+EP 그룹에서는 더 많은 투여로 항체-특정 IFNɣ 생성 세포 (383±162 SFU/10^6PBMCs) 의 2 배로 증가시킬 수 있다. 동물은 1 mg 의 DNA 투여로 4 번 면역화된다. IFNɣ 에서의 3 배 증가는, 이전의 면역화와 비교하여 ID/SQ 그룹 (376±210 SFU/10^6PBMCs) 에서 관찰된다. 3 차 면역화로, 피부 EP 로 높은 투여량의 DNA 전달로 IFNɣ 반응 (1466±762 SFU/10^6PBMCs) 을 배가시킨다. 이러한 높은 레벨의 항체 특정 반응은 최종 면역화 (1453±873 SFU/10^6PBMCs) 를 통하여 유지된다. 마지막 면역화는 ID/SQ 그룹 (927±191 SFU/10^6PBMCs) 에서 IFNɣ 생성 세포의 양을 더 배가시킨다.

[0201] 메모리 T 세포 반응

[0202] 로부스트 메모리 T 세포 반응의 유도는 성공적인 백신의 중요한 양태이다. ID/SQ DNA 면역에 의해 유도되는 메모리 T 세포 개체군을 평가하기 위해서, 마지막 DNA 백신화 후에 10 주 동안 ELISpot 분석을 실시한다 (도 19 참조). ID/SQ+EP 그룹은 ID/SQ 그룹 크기의 2 배인 메모리 IFNɣ반응을 가진다 (각각 998±290 및 449±108 SFU/10^6PBMCs).

[0203] T_H2 T 세포 반응

[0204] 피부 면역을 위한 유전자 건을 사용한 연구에서는 T_H2 편향 T 세포 반응의 도입을 설명한다. 하지만, IL-12 단백질이 전달되면 이러한 편향은 T_H1 반응로 바뀔 수 있다. ID DNA 면시 붉은털 원숭이 IL-12 의 상호 전달이 실시되어 이러한 상호 전달로 T_H1 편향 반응의 도입을 유도할지의 여부를 결정한다 (도 20 참조). 항원 특정 T_H2 반응의 도입은 최종 면역 후에 10 주 동안 IL-4 ELISpot 분석에 의해 결정된다. ID/SQ 만의 그룹에서 모든 동물은 네거티브 IL-4 반응 (>50 SFU/10^6PBMCs) 을 보이고, ID/SQ+EP 그룹에서 단지 한마리의 동물이 포지티브 IL-4 반응 (136 SFU/10^6PBMCs) 을 보이며 뛰어난 T_H1 반응을 나타낸다.

[0205] 체액성 반응

[0206] DNA 면역의 단점은 비인간 영장류 및 인간 임상 연구에서 항체 반응을 유도하지 못한다는 것이다. HIV-1 개그 및 엔브 특정 항체 역가 둘 다를 재조합 p24 및 gp160 항원으로 유도기 위한 각 그룹의 능력은 ELISA 분석에 의해 결정된다 (도 21 참조). 항원 둘 다에 대하여, ID/SQ 그룹은 상당한 항체 역가 (<50 말단 역가) 를 나타내지 못하였다. ID/SQ+EP 그룹은 제 2 낮은 투여 면역화 (말단내 역가: 100±50) 후에 낮은 레벨의 항체가 나타났다. 하지만, 높은 투여량의 DNA (2220±1000) 로 제 3 면역화시 전달된 DNA 투여가 증가된 후, 더 높은 항체 유도가 나타났다. 항체 역가는 제 4 면역 (8800±4000) 을 통하여 향상된다. 엔브 항체 반응은 또한 낮은 역가 (<50 말단 역가) 를 가진 ID/SQ 그룹 및 1600±800 의 최대 말단 역가에 도달하는 ID/SQ+EP 그룹을 갖는 개그 항체로 관찰되는 결과를 반영한다.

[0207] IM 대 ID/SQ 전기천공

[0208] 붉은털 원숭이는 1.0 mg/mℓ 에서 IM 면역화에 의해 동일한 HIV 개그, 엔브 및 rhIL-12 구성물 (전술함) 로 3 번 면역화된다. 세포 면역 반응의 도입과 비교해보면, IM 및 ID/SQ 둘 다의 경로는 제 1 두번의 면역화 후에 유사한 레벨의 IFNɣ 생성 세포를 가진다. 이와 반대로, ID/SQ+EP 에 의한 면역화는, IM+EP 에 비하여 하나의 높은 투여 면역화 후에, 높은 레벨의 HIV 개그 항체 역가를 나타내었다. 2 번의 면역화 후에, ID/SQ+EP 그룹은 IM+EP 그룹의 두배의 HIV 개그 말단 역가를 가진다.

[0209] 이러한 실험에서, ID/SQ 격실안으로 전달하기 위한 피부 바늘 전극을 사용하였고, 최종 면역 반응을 IM+EP 후에 얻어지는 반응과 비교하였다 (표 2 참조).

표 2

IM 또는 **ID/SQ** 경로를 통한 전기천공에 의해 유도되는 면역 반응의 비교.
3 고투여량 (1.0**mg/**항원) 면역화 후에 취한
IFNɣ ELISpot 및 **HIV** 개그 **ELISA** 결과 도시

	IM	ID	IM+EP	ID+EP
ELISpot 전체 개그 및 엔브 반응 (SFU/10^6 PBMCs)				
1	136 ± 51	95 ± 38	482 ± 181	635 ± 171
2	223 ± 76	376 ± 210	1924 ± 41	1466 ± 762
3	2042 ± 311	927 ± 191	5300 ± 378	1465 ± 762
ELISA 개그 말단 역가				
1	<50	<50	150	2200
2	<50	<50	4800	8800
3	<50	<50	12800	2150

[0210]

[0211] 실시예 8. 피부 EP 를 사용하는 생쥐의 DNA 백신접종

[0212] A. 플라즈미드 구성물

[0213] 유비쿼터스 사이토메갈로바이러스 (CMV) 촉진제 또는 근육 특정 합성 촉진제 (SPc5-12) 는 생쥐의 실험 1 및 3 (Exp.1 및 Exp.3) 에 사용되는 pSEAP-2 베이직 벡터의 분비된 배아 알칼리성 포스파타제 (SEAP) 의 발현을 촉진시킨다. 또한, 레포트 유전자 실험 (Exp.2) 에는, 포유류의 세포에서 더 밝은 형광성 및 더 높은 발현 (최대 여기=488 nm, 최대 방출=507) 에 대하여 최적화된 pEGFP-N1, 야생형 녹색 형광 단백질 (GFP)-발현 플라즈미드의 적향 변위 변수가 사용된다. 상업적으로 구입가능한 키트 (캘리포니아주 챗스워스에 소재하는 Qiagen Inc.) 를 사용하여 플라즈미드가 얻어진다. 균체내 독소 레벨은 Kinetic Chromagenic LAL (스코틀랜드 찰스톤에 소재하는 Endosafe) 에 의해 측정했을 때 0.01 EU/㎍ 미만이다. 컨센서스 HA 및 NA 구성물은, 최근 인간에게 치명적인 것으로 밝혀진 16 H5 및 40 이상의 인간 N1 바이러스로부터 초기 바이러스 시퀀스를 분석함으로써 형성된다. 이러한 시퀀스는 로스 알라모스 국립 연구소의 인플루엔자 시퀀스 데이타베이스로부터 다운로드된다. 컨센서스 시퀀스를 발생시킨 후에, 이 구성물은 코작 시퀀스의 추가, 코돈 최적화 및 RNA 최적화를 포함하는 포유류의 발현을 위해 최적화된다. 그 후, 이러한 구성물은 pVAX 벡터 (캘리포니아주 칼스배드에 소재하는 Invitrogen) 로 서브클론화된다. 다르게 지적하지 않는 한, 플라즈미드 형성물은 살균수에 희석되고 폴리-L-글루타메이트 나트륨 염 (LGS) (MW=10.5 kDa 평균) (미주리주 세인트 루이스에 소재하는 Sigma), 또한 VGX Pharmaceuticals, Inc., 면역 치료 부서 (텍사스주의 산림지대) 에서 정제된 HPLC 로 1% 중량/중량으로 형성되었다.

[0214] B. 생쥐의 리포터 유전자 실험

[0215] 이러한 연구는, SEAP 또는 EGFP 발현 플라즈미드의 전달 및 발현을 시험하여 전기천공 파라미터 (최저 유효 전류), 지연 시간 (전기천공의 주입 및 개시간의 시간), 제형 및 대상 근육은 발현 및 항체 레벨에 영향을 주는 것을 결정한다. IM 또는 ID 주입에 대한 전류 및 지연 시간을 변경하면서 CELLECTRA™ 피부 EP 장치 (3×26 게이지 전극의 사용 포함) 를 사용하여 동물을 전기천공한다.

[0216] 제 1 실험 (Exp.1) 에서, C57/B16 생쥐 그룹 (n=10/그룹) 에서는, 근육 특정 합성 촉진제 (pSPc5-12-SEAP) 의 제어하에서 10 ㎍ 의 플라즈미드 발현 SEAP 를 4 또는 80 초의 지연 시간 및 0.1 A 의 정전류에서 앞정강근 (TA) 또는 비복근 (G) 으로 주입된다. 비교대상 그룹은 EP (No EP) 없이 TA 에서 플라즈미드를 수용한다. 추가의 동물 그룹은 플라즈미드 노 백본 (NB) 발현 카세트를 등몰의 농도로 수용하지만, EP 가 있고 EP 가 없는 TA 및 G 에서, 동일한 촉진제, 형질전환유전자 및 3' 폴리아데닐레이션 신호를 수용한다.

[0217] 제 2 실험 (Exp.2) 에서, 그룹은 10 mg/㎖ 또는 2 mg/㎖ 의 IM 또는 ID 의 최종 플라즈미드 농도에 대하여, 각각 5 또는 25 ㎕ 의 총 부피로, 50 ㎍ 의 pCMV-EGFP 로 주입된 생쥐 (n=4) 이다. 주입 후 5 일째 해부한 피부 및 근육 부분의 사진을 촬영하고 형광성을 측정하였다. 이러한 치료 그룹을 알지 못하는 개별 관찰자에 의해 처리된 영역을 점수로 매겼다. 점수는, 최대의 발현성을 가진 샘플과 비교하여, 분산 영역 및 형광 강도에 기초하여 산출되었다 (0= 무형광성, 무분포성; 5 = 최대 밝은 형광성, 최대 큰 분산성).

[0218] 제 3 생쥐 실험 (Exp.3) 에서, 16 그룹 × 5 마리의 생쥐/그룹, 총 60 마리의 생쥐가 사용되었다 (표 3).

생쥐 (n=5/그룹) 에는 제형 (식염수, 식염수+1% LGS, 물, 물+1% LGS) 및 전류 강도를 변화시키면서 50 ㎍ 의 CMV-SEAP (10 mg/㎖) 가 주입된다. 동물은 TA 또는 G 근육에 IM 주입을 위한 전류 (0.1 A ~ 0.2 A) 를 변화시키면서 4 초의 지연 시간으로 전기천공된다.

표 3

생쥐의 **CMV-SEAP** 제형 실험을 위한 그룹 **(Exp. 3)**

그룹	제형	*Conc (mg/mL)*	전체 투여량 *(μg/*동물*)*	*EP*	*n*
1	식염수	10	50	0.2	5
2	식염수	10	50	0.1	5
3	식염수	10	50	0.2	5
4	식염수	10	50	0.1	5
5	식염수 + LGS	10	50	0.2	5
6	식염수 + LGS	10	50	0.1	5
7	식염수 + LGS	10	50	0.2	5
8	식염수 + LGS	10	50	0.1	5
9	물	10	50	0.2	5
10	물	10	50	0.1	5
11	물	10	50	0.2	5
12	물	10	50	0.1	5
13	물 + LGS	10	50	0.2	5
14	물 + LGS	10	50	0.1	5
15	물 + LGS	10	50	0.2	5
16	물 + LGS	10	50	0.1	5

[0219]

[0220] 모든 경우에, 동물들은 3 일동안 길들여지고 무게를 측정하며 귀에 태그를 붙였다. 음식물과 물은 실험 기간동안 마음대로 이용가능하다. 0 일째 연구시, 동물들은 무게가 측정되고, 채혈되며 설치류용 마취 조합물을 사용하여 마취되고 - 실라진 (37.5 mg/㎖; 0.05 ㎖/30 그램 체중량), 케타민 (1.9 mg/㎖; 0.016 ㎖/10 그램 체중량), 아세프로마이진 (0.37 mg/㎖; 0.025 ㎖/15 그램 체중량), 플라즈미드가 디자인당 투여되고 전기천공된다. Exp.1 및 3 에 대해서, 혈액은 역-오비탈 출혈을 통해 수집되고 응고된다. 수집된 모든 혈액은 원심분리되어 혈청과 플라즈마를 분리한 후, 최소한의 개질로 이미 실시되는 바와 같이, SEAP 분석 및 항-SEAP ELISA 용 얼음상의 튜브안으로 등분된다. 14 일째 후에, 모든 동물들은 마취의 수술 평면하에서 채혈된다.

[0221] C. 분석

[0222] 혈액 수집

[0223] 0 일째, 4 일째, 7 일째 및 11 일째에, 생쥐들의 무게를 재고 역-오비탈 출혈을 통하여 수집된 혈액을 미세분리 튜브안으로 넣는다. 혈액은 실온에서 10 ~ 15 분 동안 응고된 후 10 분 동안 3000 χg 에서 원심분리되고, 혈청은 추후 분석할 때까지 -80℃ 에서 저장된다.

[0224] SEAP 분석

[0225] 혈청 샘플은 해동되고 50 ㎕ 는 제조자의 지시에 따라 포스파-광 화학발광 레포터 분석 키트 (메사츄세스주 베드포드에 소재하는 Applied Biosystems) 를 사용하여 SEAP 활성도에 대하여 분석되었다. 분석을 위한 검출하한은 3 pg/㎖ 이다. 보다 농축된 혈청 샘플은 SEAP 활성도에 대하여 분석하기 전에 입안 혈청에서 1 : 10 으로 희석되었다. 모든 샘플은 LUMIstar Galaxy 발광측정기 (독일 오펜버그에 소재하는 BMG Labtechnologies) 를 사용하여 기록하였다.

[0226] SEAP 간접 ELISA

[0227] 인간 SEAP 에 대한 면역성은 다음의 변형된 과정을 사용하여 생쥐에서 측정되었다. Nunc Maxisorb (뉴욕에 소재하는 Rochester) 플레이트는 4℃ 에서 밤새 PBS (100 나노그램/웰의 인간 태반 알칼 포스파타제 (Sigma) 를 포함하는 100 ㎕) 의 정제된 인간 태반 알칼리성 포스파타제로 코팅된다. 플레이트는 경사(傾瀉) 되고 3 번 세척된다. 플레이트는 PBS (차단 용액) 의 0.05% 의 Tween 20 에 1% BSA (Sigma) 를 사용하여 차단되고 실온에서 2 시간 동안 인공배양된다. 혈청 샘플은 1:100 으로 희석된 후, 별도의 희석 플레이트에서 PBS 의 0.05% 의 Tween 20 에 1% BSA (Sigma) 내에 1:4 로 연속 희석된다. 차단 용액은 플레이트로부터 따라졌다. 100 ㎕ 의 희석된 시험 혈청은 각각의 웰에 첨가되고 실온에서 2 시간 동안 인공배양된다. 혈청 희석물은 따라지고 3 번 세척된다. 2 차 항체는 PBS 의 0.05% 의 Tween 20 에 1% BSA (Sigma) 내에 1:1000 로 희석되고 (고추냉이 페록시다제와 결합되는 토끼 항-마우스), 실온에서 1 시간 동안 인공배양된다. 플레이트는 경사되고 세척된다. 웰당 100 ㎕ 의 오페닐렌에디아민 (OPD) 기재가 0.1M 시트르산 버퍼에 (0.67 mg/㎖) 첨가되고 8 분 동안 인공배양되며, 100 ㎕ 의 1M H_2SO_4 가 첨가되어 반응을 중지시킨다. Spectamax Plus 384 플레이트 리더 (캘리포니아주 선니배일에 소재하는 Molecular Devices) 에서 490 nm 에서 흡수성이 측정되었다.

[0228] D. 생쥐의 결과

[0229] SEAP 발현은 목표 근육에 따른다.

[0230] SEAP-발현 플라즈미드 주입이 피부 EP 장치를 사용하여 주입 및 EP 간의 80 초 및 4 초의 지연 시간 둘 다에서, G 근육에 대한 TA 근육 (도 22 참조) 에 투여된다면, 발현이 증가된다. SPc5-12-SEAP 플라즈미드가 TA 근육에 주입될 때, EP 가 없을 시 (P<1.3E-21) 플라즈미드를 수용하는 비교대상 동물에서보다 혈청 SEAP 레벨이 285 배 높고; TA 근육에 대하여 80 초 및 4 초의 지연 시간간의 차이가 관찰되지 않으며 (357±6 대 357±6.2 pg/㎖/g); 동일한 조건하에서 G 근육안으로의 주입은 비교대상보다 90 내지 182 배 더 높은 SEAP 레벨을 유발한다 (G 80초 대 EP 가 없는 비교대상, P<0.003; G 4초 대 EP 가 없는 비교대상, P<7.7E-06). 발현 카세트를 포함하는 플라즈미드 단편이 등몰 제형의 TA 및 G (노 백본 (NB) 이지만 동일한 촉진제, 형질전환유전자 및 3' 폴리아데닐레이션 신호) 에 주입되면, 발현 레벨은 IM+EP 를 수용하지 않는 비교대상보다 210 ~ 250 배 더 높다 (80 초 EP 가 없는 비교대상, P<1.8E-08; 4초 EP 가 없는 비교대상, P<3.8E-05). TA 80 초에서의 SEAP 발현은 NB 80 초 그룹보다 24% 더 높고 (P<0.008), 반면 TA 4 초는 NB 4 초 그룹보다 37% 더 높다 (P<0.004). EP 없이 (No EP) NB 및 C5-12-SEAP 가 투여된 그룹 둘 다에서는 무시할만한 SEAP 발현이 나타났다.

[0231] GFP 발현

[0232] 주입 지점의 주의 깊은 해부에 의해 GFP 발현이 가시화되고 이러한 치료 그룹을 모르는 관찰자에 의해 점수를 매겼다. GFP 점수는 비농축 플라즈미드에 대하여 동물에게 주입된 ID (4.63±0.24 대 3.25±0.14, P=0.01) 및 IM (4.75±0.14 대 3±0.54, P=0.01) 둘 다에서 농축된 플라즈미드가 투여된 그룹에서 더 높다 (도 23 참조). 이러한 연구에서, 농축된 제형 (10 mg/㎖ 까지) 은 더 높은 전체 발현과 관련있다. 이러한 실험으로부터의 결과에 기초하여, 플라즈미드는 Exp.3 의 10 mg/㎖ 의 농도에서 사용된다.

[0233] SEAP 발현은 제형 및 전류 세기에 따른다.

[0234] SEAP 레벨의 차이는, SEAP 형질전환유전자가 (Exp.1 에서 사용되는 근육 특정 촉진제에 대하여) 유비쿼터스 촉진제의 제어하에 있을 때 평가된다. 이전의 실험과 동일하게, G 근육 (P=0.05) 에 대하여 TA (도 24 참조) 근육에서 플라즈미드 주입-EP 과정이 실시되면 발현성이 증가한다. 이러한 특정 실험에서, 그룹내 높은 가변성으로 인해 통계학적 중요성을 얻을 수 없을지라도, 식염수+LGS 제형은 식염수 제형 (각각 41.1±7.9 pg/㎖/g 대 31.0±5.9 pg/㎖/g) 과 비교하면 혈청 SEAP 레벨이 더 높아지게 된다. 일반적으로, 0.1 A 전류 설정에서 전기천공되는 동물은 동일한 LGS 플라즈미드 제형을 수용하는 동물보다 약간 더 높은 SEAP 발현성을 나타내고, 0.2 A 의 정전류로 전달된다. 그럼에도 불구하고, 물로 형성되는 0.2 A 플라즈미드를 수용하는 동물은 동일한 근육에 대하여 0.1 A 를 수용하는 것보다 상당히 낮은 SEAP 레벨을 나타낸다 (TA 에 대해서는 P<0.05, G 에 대해서는 P<0.001). 물 제형에 LGS 가 첨가되면, 이러한 차이는 TA 근육에는 중요하지 않지만 G 근육에 대해서는 여전히 유지된다 (P<0.04).

[0235] 항-SEAP 항체의 도입

[0236] 식염수 + LGS 를 갖는 SEAP 플라즈미드 제형은 더 높은 단백질 발현성을 나타내지만, 그룹내 가변성으로 인해 통계학적 중요성을 얻을 수 없을지라도, 항-SEAP 항체의 역가는 물 + LGS 에서 형성되는 SEAP 플라즈미드가 주

입된 동물에 비하여 낮다 (도 25 참조).

[0237] 실시예 9. 영장류에서 근육내 전달과 진피내 전달의 비교

[0238] 영장류 혈청

[0239] 1% 말의 RBC 의 A/베트남/2003/04 HI 역가

그룹	영장류 ID	연구 그룹	HI 역가 wk 6
H5 + M2 IM CELLECTRA™ 1 mg/플라즈미드	4497	C	80
	4498	C	80
	4499	C	40
	4500	C	80
	4501	C	<20
H5 + M2 ID CELLECTRA™ 1 mg/플라즈미드	4520	D	160
	4521	D	80
	4522	D	160
	4523	D	40
	4534	D	160
H5 + env + 2 HPV IM 단독 1 mg/플라즈미드	4508	G	160
	4510	G	<20
	4511	G	<20
	4512	G	<20
	4513	G	<20
음성 대조군	4529	H	<20
	4530	H	<20
	4531	H	<20
	4532	H	<20
	4533	H	<20
	H5 ref. 혈청		1,600

[0240]

DNA 구성물	
1	HIV Env Clade A
2	HIV Env Clade C
3	HIV Env Clade D
4	HIV Gag
5	HIV Pol
6	Flu H5
7	Flu NA
8	Flu M2 NP
9	HPV 16 E6/E7
10	HPV 18 E6/E7
11	IL12

[0241]

연구 그룹	DNA 구성물	동물 번호	투여 경로	투여량	전체 DI (mg)/A
A	DNA 1+2+3+4+5+11	5	IM CELLECTRA™	1 mg/Const	6
B	DNA 1+2+3+4+5+11	5	ID CELLECTRA™	1 mg/Const	6
C	**DNA 6+9**	**5**	**IM CELLECTRA™**	**1 mg/Const**	**2**
D	**DNA 6+9**	**5**	**ID CELLECTRA™**	**1 mg/Const**	**2**
E	DNA 7+8+10	5	IM CELLECTRA™	1 mg/Const	3
F	DNA 7+8+10	5	ID CELLECTRA™	1 mg/Const	3
G	**DNA 1+6+9+10**	**5**	**IM 주입기**	**1 mg/Const**	**4**
H	네거티브 제어	**5**	**N/A**		**0**
	총	40			

[0242] 붉은털 원숭이는 이러한 연구에서 면역화된다. 동물은 실험을 개시하기 전에 2 달 동안 길들여진다. 연구는 다음과 같이 진행되었다. 0 주째에는 제 1 면역 (플라즈미드 투여량 투여) 을 실시하고 또한 기준 채혈을 실시하고, 2 주째에는 채혈을 실시하며, 3 주째에는 제 2 면역 (플라즈미드 투여량 투여) 을 실시하고, 5 주째에는 채혈을 실시하며, 6 주째에는 제 3 면역 (플라즈미드 투여량 투여) 을 실시하고 채혈하며, 8 주째에는 채혈을 실시하였다.

[0243] 모든 플라즈미드는 이전의 실시예에 기재된 바와 같이 +1% LGS 주입을 위해서 물에 10 mg/㎖ 로 형성되며, 단일 용액 PER STUDY GROUP(S) (그룹 A~H, 전술한 표 참조) 으로 혼합된다. IM CELLECTRA™ ID CELLECTRA™ 및 IM 주입기로 지정된 각 그룹에 대한 정확한 주입 부피가 산출된다. ID 투여에 대해서, 필요한 주입 부피가 지점당 100 ㎕ 을 초과하면, 제형은 다수의 주입 지점 (얼마나 많은 백신의 전체 mg 가 투여되는가에 따라서 2, 3 또는 6 지점) 으로 분할된다. IM 주입(들)을 수용하는 동물은 하나의 단일 지점에서 전체 제형이 주어진다.

[0244] 상기에서, 실시예에 기재된 돼지 실험 및 비인간 실험에 사용되는 CELLECTRA™ 적합한 정전류 장치는 이러한 비인간 영장류 실험에도 사용된다. 전기천공 조건은 다음과 같다.

[0245] <u>IM 주입 및 전기천공 그룹에 대하여</u>, 조건은 0.5 Amp, 52 msec/펄스, 3 펄스, 플라즈미드 주입 및 전기천공간에 4 초 지연이다.

[0246] <u>ID 주입 및 전기천공 그룹에 대하여</u>, 조건은 0.2 Amp, 52 msec/펄스, 3 펄스, 플라즈미드 주입 및 전기천공간에 4 초 지연이다.

[0247] 적혈구 응결 방지 (HI) 분석 - 원숭이 혈청은 1 부분의 혈청을 3 부분의 효소와 희석함으로써 수용체 파괴 효소 (RDE) 로 처리되고 37℃ 수조에서 밤새 인공배양되었다. 효소는 56℃ 에서 30 분 인공배양시킴으로써 비활성화된 후 1/10 의 최종 희석물에 대하여 6 부분 PBS 를 첨가하였다. HI 분석은 4 HA 유닛의 바이러스와 1% 말의 적혈구를 사용하여 V-바닥 96-웰 마이크로틸터 플레이트에서 실시하였다. 본원에 기재된 데이타는 제 2 면역화 (제 3 면역화 전에 채혈됨) 후의 결과이다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1 은 피부 구조의 다이어그램을 나타낸다. 최외부 영역은, 각질층 (1.1.1), 유극층 (1.1.2), 투명층 (1.1.3), 과립층 (1.1.4), 및 기저층 (1.1.5) 의 5 개의 서브 층으로 나누어질 수 있는, 상피 (1.1) 이다. 진피 (1.2) 는 상피의 바로 아래에 위치되고, 혈관이 배우 잘 분포된 영역이며, 모근 및 땀샘이 이 층에 위치된다. 피하층은 진피 바로 아래에 위치된다.

[0038] 도 2a 는 여기 설명되는 EP 장치의 바람직한 실시형태의 시스템 다이어그램을 나타낸다.

[0039] 도 2b 는 여기 설명되는 EP 장치의 일부일 수 있는 제어기의 실시예를 나타낸다.

[0040] 도 2c 는, 펄스 발생기로서 피부 EP 장치를 사용하는, 펄스 시퀀스의 끝에서 다운로드된 실제 펄스 시퀀스 기록의 실시예 및 25kg 돼지의 피부의 ID 및 SQ 층에 플라즈미드 제형 주입 이후에 전기 펄스를 전달하는 설명된 피부 전극 배열체를 나타내고, ("2.1") 은 개인용 컴퓨터 또는 소형 장치 상의 적외선 포트를 통하여 다운로드된 파일 이름을 나타내고, ("2.2") 는 숫자 패드를 통해 피부 EP 장치에 직접적으로 입력되는, EP 과정이 시작되기 전에 미리 입력되는 조건인, 치료대상 번호를 나타내고, ("2.3") 은 펄스 시퀀스에서의 펄스의 수, 펄스 전 및 사이의 대기 시간 (초, "*s*"), 펄스 폭 (밀리초, "*ms*"), 펄스 전류 진폭 (암페어, "*A*") 를 포함하는, 작동자에 의해 선택된 전기 펄스의 특징을 나타내고, ("2.4") 는 각각의 펄스 동안 각각의 전극의 전하량을 나타내며, 피부 전극 (1, 2, 3) 각각에 대하여, 어떠한 이하의 위치가 가능하며, 양 ("pos"), 음 ("neg") 또는 오프 ("off") - "off" 전극은 각각의 펄스의 전, 동안 및 이후에 장치로 정보를 다시 들여오며 ("feed-back"), ("2.5") 는 펄스 시퀀스의 각각의 펄스 동안 주입 영역 ("Ohms") 에서, 실제 암페어 ("A"), 전압 ("V") 및 피부 조직 저항 (Z) 을 나타내며, 피드백이 매 0.1 ~ 0.2 ms 마다 일어날 때 (그리고 이러한 경우 펄스는 길이가 52 ms 임), 예컨대 목적과 같은, 단지 작은 비율의 피드백 파일이 포함된다.

[0041] 도 3 은 피부 EP 장치에 의한 전기 펄스의 피부 전극 전달을 이용할 때 다운로드 된 데이타의 그래프 표시의 실시예를 나타낸다. 그래프는 펄스 2 ("3b") 의 피부 EP 장치에 의해 측정된 전압 ("3.2.1") 및 전류 ("3.2.2") 뿐만아니라 펄스 1 ("3a") 의 피부 EP 장치에 의해 측정되는 전압 ("3.1.1") 및 전류 ("3.1.2") 양쪽 모두를 설명한다. 조직 저항 (전기 펄스 동안 측정된) 은 또한 펄스 1 ("3c") 및 펄스 2 ("3d") 에 대하

여 표시된다.

[0042] 도 4 는 큰 전극 배열체를 사용할 때의 피부 EP 장치에 의한 피부로의 전기 펄스의 전달시에 다운로드된 데이타의 그래프 표시의 실시예를 나타낸다. 그래프는 펄스 1 ("4a") 에서의 피부 EP 장치에 의해 측정된 전압 ("4.1.1" 및 전류 ("4.1.2"), 펄스 2 ("4b") 에서의 피부 EP 장치에 의해 측정된 전압 ("4.2.1" 및 전류 ("4.2.2"), 및 펄스 3 ("4c") 에서의 피부 EP 장치에 의해 측정된 전압 ("4.3.1") 및 전류 ("4.3.2") 양 쪽을 모두 나타낸다. 조직 저항 (전기 펄스 동안 측정된) 은 또한 펄스 1 ("4d"), 펄스 2 ("4e"), 및 펄스 3 ("4f") 에 대하여 표시되었다.

[0043] 도 5 는 상세한 특징을 포함하는, 피부 전극 배열체의 개략적인 그림을 나타내며, ("5.1") 은 단일 바늘 전극의 삽입 단부의 길이와 각도를 나타내는 측면도, ("5.2") 는 리비어 (revere) 투관침 지점에 대한 각도 및 정도를 나타내는 정면도, ("5.3") 은 바늘 전극의 설명을 나타내는 기록이다.

[0044] 도 6 은 피부 전극 핸들의 시각적인 그림 ("6a") 및 개략도 ("6b") 를 나타내고, ("6.1.1") 은 임피던스 검사 및 그 후의 전기천공 시퀀스를 활성화하는데 사용되는 트리거, ("6.1.2") 는 피부 EP 장치가 치료할 준비가 되거나 또는 오류인 동안, 각각 녹색 또는 적색을 표시하는 "LED", ("6.1.3") 는 위치에 고정되는 피부 전극 배열체, ("6.1.4") 는 개별 와이어 및 피부 전기천공 핸들과 피부 EP 장치 유닛 사이의 신호를 포함하는 코드, ("6.1.5") 는 도 8 의 전기 배선 다이어그램에서 상세하게 나타낸 개별 와이어, ("6.2.1") 은 개략적인 트리거, ("6.2.2") 는 개략적인 LED, ("6.2.3") 은 전기천공 펄스 시퀀스의 완료 이후 피부 전극 핸들로부터 방출을 용이하게 하는데 사용되는 피부 전극 배열체 상의 개략적으로 나타낸 상승된 리지 (ridge), ("6.2.4") 는 피부 전극 배열체의 개략적인 바늘 전극, ("6.2.5") 는 핸들 상의 위치에 고정된 피부 전극 배열체의 개략적인 측면도, ("6.2.6") 은 개략적인 고정 암 및 멈춤쇠 (핸들 상의), ("6.2.7") 은 회로 연결을 위해 수용하고 접촉하는데 사용되는 피부 전극 핸들 내의 개략적으로 나타낸 소켓, ("6.2.8") 은 도 8 에 상세하게 나타낸 개별 와이어를 수납하는 개략적으로 나타낸 코드이다.

[0045] 도 7 은 핸들 상에 장착된 피부 전극 배열체를 나타내며, ("7.1") 은 피부 전극 배열체 내의 개별 바늘 전극과 피부 전극 핸들 사이의 전기적 연결을 수용하고 이루기 위한 개별 소켓의 개략적인 측면도이다.

[0046] 도 8 은 배열체와 핸들 조립체에 대한 전기 배선 다이어그램을 나타낸다.

[0047] 도 9 는 치료대상의 사이에 핸들의 살균 탑재를 가능하게 하는 다중 피부 전극 배열체의 클램쉘 (clamshell) 폴딩 패키지 컨테이너의 개략적인 그림을 나타내며, ("9.1") 은 리드 (lid), ("9.2") 는 배열체를 수납하도록 맞춤 설계된 개별 웰 (well) 을 포함하는 바닥부, ("9.3") 은 웰의 측면도이다.

[0048] 도 10 은 골격근육으로의 플라즈미드 전달을 위해 보통 사용되는 전극 및 상태 (LA) 와 비교하여, 상이한 양의 플라즈미드 pSP5-12-GFP 가 주입되고 피부 전극 배열체 및 피부의 구체적인 EP 상태 (MA) 를 사용하는 피부 EP 장치에 의한 전기천공된 동물에서의 GFP 의 평균 발현 레벨을 나타낸다.

[0049] 도 11 은, 거리 L = kxn (n 은 전극의 수이며 k 는 비례 상수) 인 3-전극 바늘 배열체를 나타낸다.

[0050] 도 12 는 대표적인 SEAP 발현 플라즈미드를 사용하는 전기천공으로부터 11일까지의 SEAP 발현 레벨 (pg/mL/kg) 의 그래프를 나타낸다.

[0051] 도 13 은 다양한 샘플에 대한 11 일째의 SEAP 발현 레벨 및 관련된 ELISA 결과 (평균 항체 희석도) 를 나타내는 그래프를 나타낸다.

[0052] 도 14 는 대표적인 IGF-I 발현 플라즈미드를 사용하는 전기천공으로부터 11 일 이후의 IGF-I 발현 레벨 (mg/mL) 의 그래프를 나타낸다.

[0053] 도 15 는 돼지 피부의 전기천공 (EP) 이 뒤따르는 ID/SQ 플라즈미드 투여 이후의 녹색 형광 단백질 발현을 나타내는 형광 이미지를 표시한다. 플라즈미드는 IM + EP (A) 에 통상적으로 사용되는 더 큰 EP 배열체 또는 피부 EP (B) 에 상이한 투여량 및 부피로 전달된다.

[0054] 도 16 은 pSEAP 투여 이후 4 ~ 11 일 째의 돼지 혈청에서 검출된 분비된 배아 알칼리성 포스파타아제 (SEAP) 의 레벨을 나타내는 그래프를 표시한다. 동물들은, 농축된 제형 (10mg/mL) 또는 보통 제형 (2mg/mL) 중 하나로, 동일한 플라즈미드 투여량 (1mg) 을 받았다. 데이타는 그룹 평균 반응 ±SEM 으로 나타내었다.

[0055] 도 17 은 비인간 영장류 연구 기획을 나타내며, 도 17A 는 붉은털 원숭이가 0 주 및 4 주일 때 HIV-1 면역원 및 플라즈미드 인코딩된 붉은털 원숭이 IL-12 의 저투여 (항원 당 0.2mg) 로 두 번 면역되고, 그리고 그 후 8 주

및 12 주일 때 고투여 (항원 당 1.0mg) 로 두 번 면역되는 것을 나타낸다. 혈액 샘플은 면역을 분석하기 위해 대략 2 주마다 수집되었다. ELISpot 이 각각의 면역화에 이어 2 주에 수행되었고 ELISA 가 0, 4, 8, 12, 18 주에 수행되었다. 도 17B 는 피부 전극 배열체와 핸들의 다이어그램을 표시한다. 피부 EP 는 3 개의 스테인리스 강, 26 게이지 전극, 3 ~ 5 ㎜ 길이인 일회용 배열체로 구성된다. 배열체는 장치의 핸들 어플리케이터에 부착되고, EP 과정은 핸들 어플리케이터 상의 트리거 버튼을 누름으로써 시작될 수 있다.

[0056] 도 18 은 EP 가 뒤따르는 인코딩된 IL-12 플라즈미드와 동시 주입된 ID/SQ 에 의한 HIV-1 면역원에 대한 강화된 세포 면역 반응을 나타내는 그래프이다. IFNγ ELISpot 은 각각의 면역화 이후 2 주에 수행되었다. 누적된 그룹 평균 반응 ±SEM 으로 나타낸 데이타에 의해 *env* 에 대한 반응은 흰색 바로 나타내었고 *gag* 는 검정 바로 나타내었다.

[0057] 도 19 는 ID/SQ EP 에 의한 HIV-1 면역원에 대한 강화된 기억 반응을 나타내는 그래프를 표시한다. 마지막 면역화 이후 10 주에, ID/SQ 및 ID/SQ + EP 그룹의 *gag* 및 *env* 에 대한 항원 특정 기억 반응을 결정하기 위해 ELISpot 분석이 수행되었다. 데이타는 그룹 평균 반응 ±SEM 으로 나타내었다.

[0058] 도 20 은 HIV-1 *gag*, *env* 및 플라즈미드 rhIL-12 의 ID/SQ 면역화를 따르는 T_H1 의 도입 및 T_H2 이 아닌 매개 세포 반응을 나타내는 그래프를 표시한다. IL-4 ELISpot 이 *gag* 의 도입 또는 *env* 특정 T_H2 반응을 평가하기 위해 10 주 째에 수행되었다. 누적된 그룹 평균 반응 ±SEM 으로 나타낸 데이타에 의해 *env* 에 대한 반응은 흰색 바로 나타내었고 *gag* 는 검정 바로 나타내었다.

[0059] 도 21 은 p24 (21A) 와 gp160 (21B) 항체의 도입을 나타내는 그래프를 표시한다. 혈청이 0, 4, 8, 12, 및 18 주에 수집되었다. *Gag* 및 *env* 항체 적정량은 ID/SQ 및 ID/SQ + EP 면역된 그룹에서, 각각 p24 및 gp160 ELISA 에 의해 결정되었다. 데이타는 그룹 평균 반응 ±SEM 으로 나타내었다.

[0060] 도 22 는 생쥐의 상이한 근육에서 측정된 SEAP 발현을 나타내는 바 그래프를 표시한다. 생쥐에는 앞정강근 (TA) 또는 장딴지근 (G) 에 10 ㎍ C5-12-SEAP 플라즈미드가 주입되었고 4s 또는 80s 후에 EP 되었다. 생쥐에는 또한 EP 없이 (EP 없음) 10 ㎍ C5-12-SEAP 플라즈미드가 주입되었다. 혈청 SEAP 레벨은 EP 없이 플라즈미드를 수용한 대조 표본 생쥐와 비교하여 TA 근육 및 G 근육에 주입된 생쥐에서 더 높았다 (*P < 1.3 E-21). 플라즈미드 백본이 없이 (NB) 발현 카세트가 주입된 후 전기천공된 생쥐는 EP 를 하지 않은 NB 그룹보다 더 높은 SEAP 레벨을 가졌다. 하지만, NB 그룹은 동일한 근육에 C5-12-SEAP 가 투여된 생쥐보다 현저히 낮았다 (TA 4s 와 비교한 NB 4s, **P < 0.008, TA 80s 와 비교한 NB 80s, ***P < 0.004). TA 근육에 주입된 생쥐는 G 근육에 주입된 동물보다 더 높은 발현을 나타내었고 TA 근육에서 주입과 EP 사이의 간격을 80s 에서 4s 로 낮추는 것은 발현에 영향을 주지 않았다.

[0061] 도 23 은 총 부피 25 또는 5 μL 에서 각각 2 mg/mL 또는 10 mg/mL 의 농도로, 각각 50 ㎍ 의 CMV-EGFP 의 근육내 (IM) 주입 또는 진피내 (ID) 주입 이후 생쥐에서 정량된 평균 GFP 발현을 나타내는 막대 그래프를 표시한다. GFP 발현은, 비록 ID 및 IM 주입 부위가 서로 비교할 때 유사한 총 점수를 산출하였지만, 2 mg/mL 농도 (ID 및 IM, *P = 0.01) 로 투여된 동물과 비교하여 10 mg/mL 농도로 투여된 그룹이 가장 높았다.

[0062] 도 24 는 유비쿼터스 CMV 프로모터에 의해 구동된, 다양한 전류 설정 하의 생쥐에서 상이한 근육에서 측정된 SEAP 발현을 나타내는 막대 그래프를 표시한다. 플라즈미드 제형이 식염수, 식염수 + LGS, 물, 또는 물 + LGS 에서 시험되었다. TA 근육에서 0.1 A 의 식염수 + LGS 가 가장 높은 발현을 나타냈다. 물에 조제되고 0.2 A 에서 전기천공된 플라즈미드를 수용하는 동물은 동일한 근육에 대하여 0.1 A 의 전류를 받는 동물보다 현저히 낮은 SEAP 레벨을 나타냈다 (TA 에 대하여 *P < 0.05, G 에 대하여 **P < 0.001). 플라즈미드 제형으로 물 + LGS 가 사용될 때, 혈청 SEAP 레벨에서의 차이는 TA 근육에 대해서는 현저하지 않지만, G 근육에 대해서는 현저하다 (***P < 0.04).

[0063] 도 25 는 14 일의 후처리에서 측정된 안티-SEAP 항체에 대한 역가를 표시하며, 0.1 A 로 처리된 생쥐에서 플라즈미드가 (A) 식염수 + LGS 로 조제될 때 G 근육에서 역가가 가장 높았고 (B) 물 + LGS 로 조제될 때는 TA 근육에서의 가장 높았다.

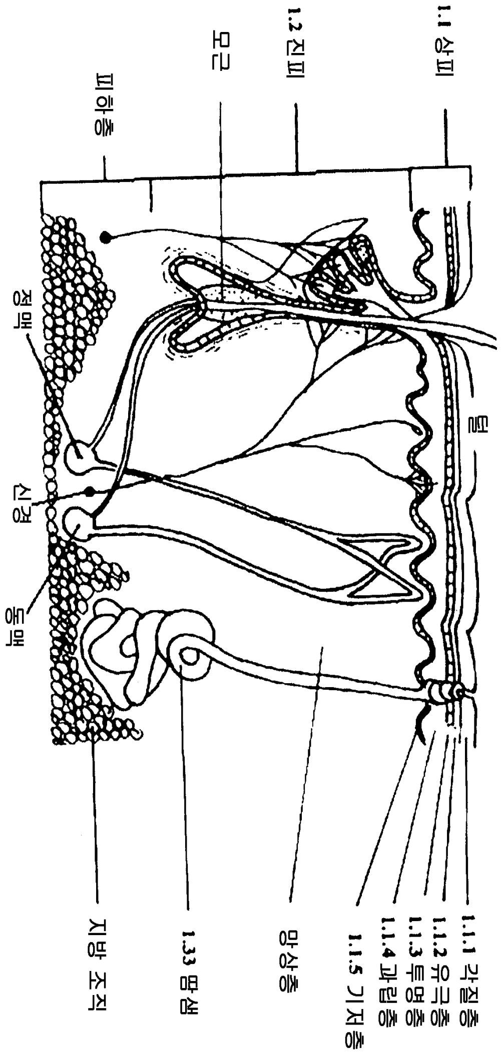
[0064] 도 26 은 릴레이 접촉자 매트릭스의 한 실시형태의 개략도를 표시한다.

[0065] 도 27a 는 전기천공 흐름의 순서도의 제 1 부분을 표시한다.

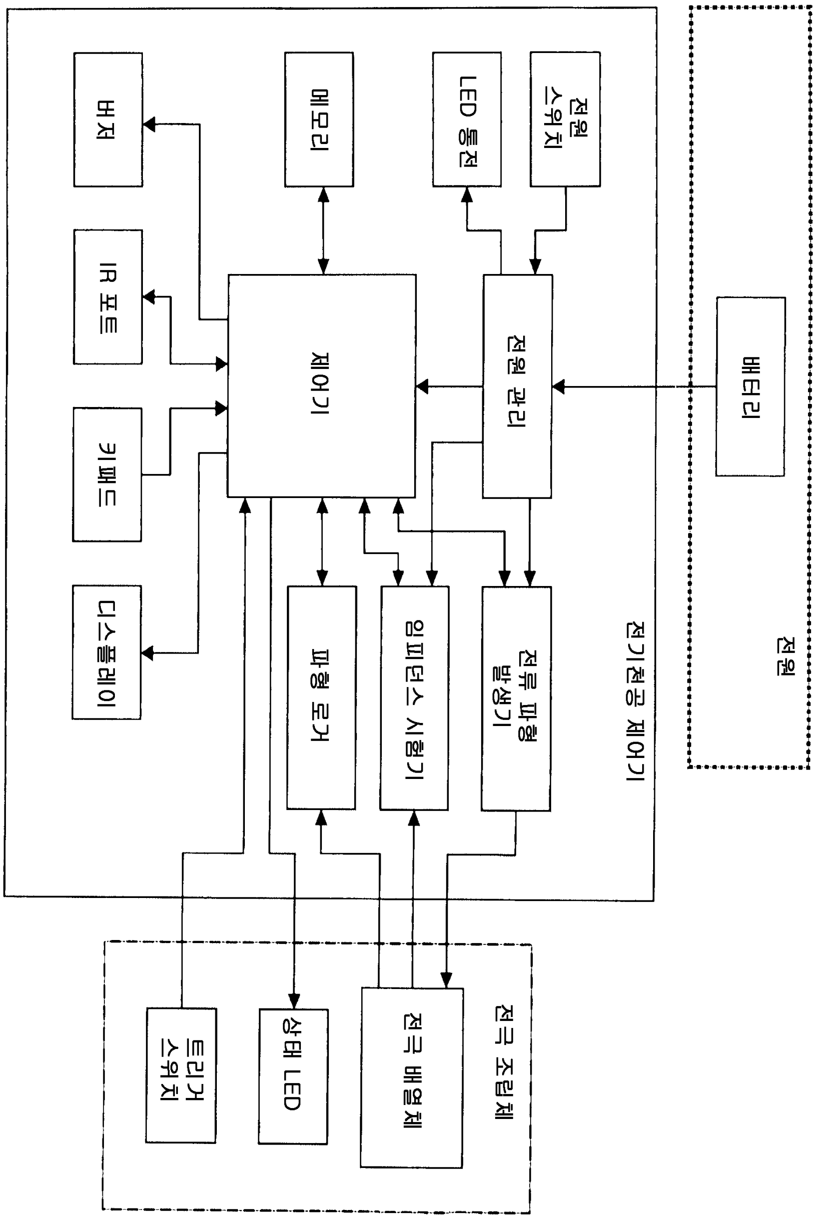
[0066] 도 27b 는 전기천공 흐름의 순서도의 제 2 부분을 표시한다.

도면

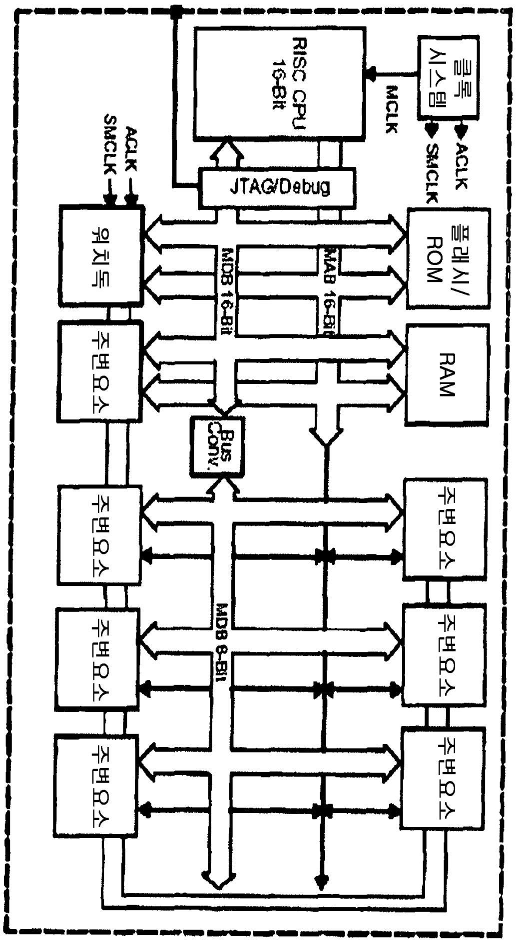
도면1


1.1 상피
1.2 진피
모근
피하층
털
정맥
신경
동맥
1.1.1 각질층
1.1.2 유극층
1.1.3 투명층
1.1.4 과립층
1.1.5 기저층
망상층
1.33 땀샘
지방 조직

도면2a


버저
메모리
LED 통신
전원 스위치
IR 포트
제어기
전원 관리
배터리
키패드
디스플레이
파형 로거
임피던스 시험기
전류 파형 발생기
전기천공 제어기
전원
트리거 스위치
상태 LED
전극 배열체
전극 조립체

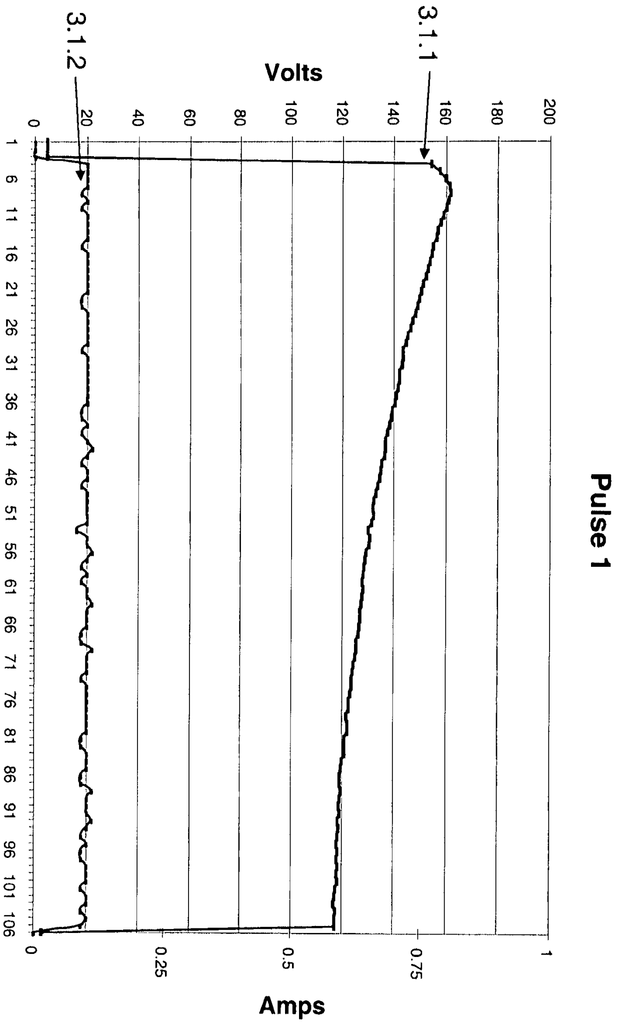
도면2b


클록 시스템
MCLK
ACLK
SMCLK
RISC CPU 16-Bit
JTAG/Debug
플래시/ROM
RAM
MAB 16-Bit
MDB 16-Bit
Bus Conv.
MDB 8-Bit
ACLK
SMCLK
워치독
주변요소
주변요소
주변요소
주변요소
주변요소
주변요소
주변요소

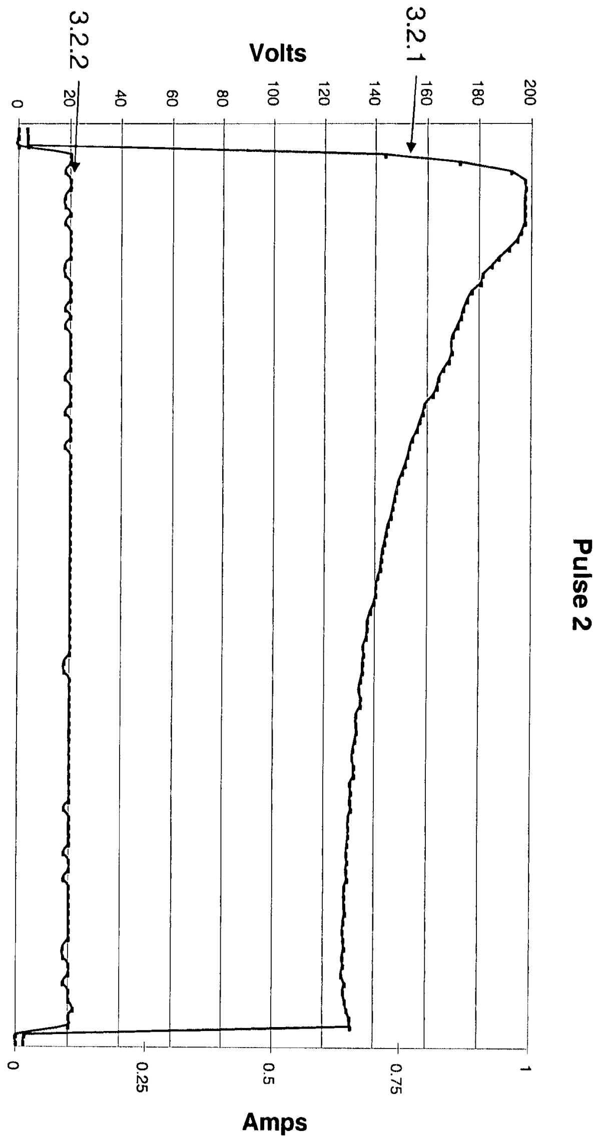
도면2c

2.1	파일이름:	00032210_06_06_28_15_26_43.csv						
2.2	동물 번호:	32210						
2.3	시퀀스의 펄스	1		2				
	예비대기시간 (s)	4		1				
	펄스 폭 (ms):	52		52				
	펄스 전류 (A):	0.1		0.1				
2.4	전극 **1:**	POS		OFF				
	전극 **2:**	NEG		POS				
	전극 **3:**	NEG		NEG				
2.5	전압 **(V)**	전류 **(A)**	전압 **(V)**	전류 **(A)**			**Z1 (Ohms)**	**Z2 (Ohms)**
	4.54	0	3.37	0				
	4.49	0	3.42	0				
	4.59	0	3.42	0				
	154.08	0.1	143.53	0.1			1540.6459	1435.1565
	157.6	0.1	172.35	0.1			1575.8424	1723.3277
	159.84	0.1	192.23	0.09			1598.2402	2135.6516
	161.06	0.1	197.36	0.1			1610.439	1973.4027
	161.65	0.09	197.7	0.1			1795.9116	1976.8023
	160.82	0.1	197.51	0.09			1608.0392	2194.3117
	159.99	0.09	197.61	0.09			1777.4692	2195.4227
	159.01	0.1	197.36	0.1			1589.941	1973.4027
	157.69	0.1	197.61	0.09			1576.7423	2195.4227
	156.86	0.1	196.09	0.1			1568.4432	1960.7039
	156.23	0.1	194.43	0.1			1562.1438	1944.1056
	155.01	0.09	191.45	0.1			1722.142	1914.3086
	154.57	0.1	187.35	0.1			1545.5454	1873.3127

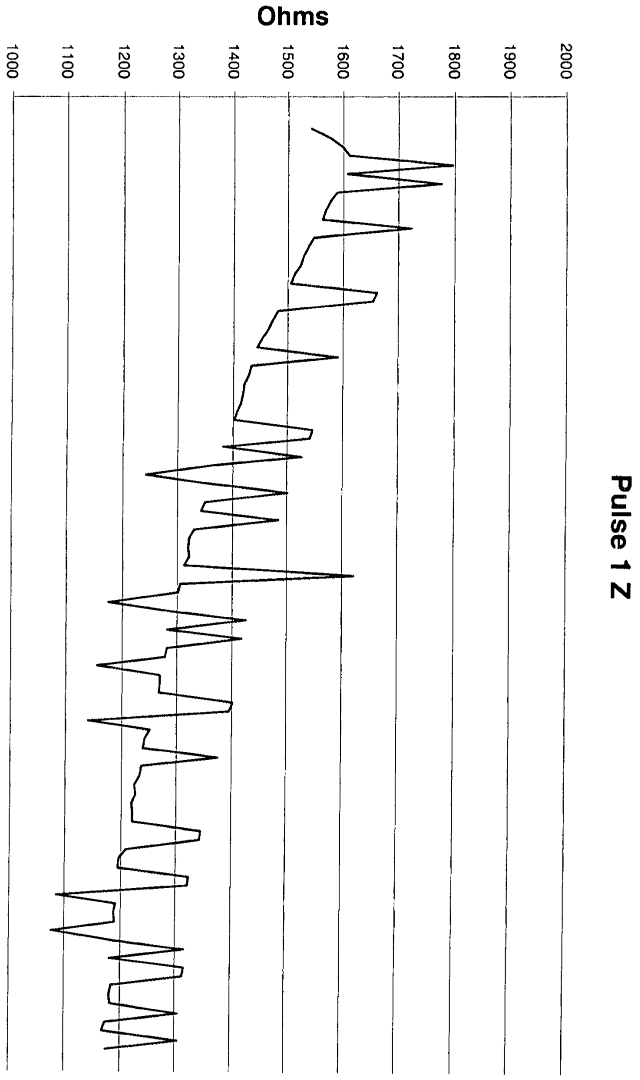
도면3a


Pulse 1
Volts
Amps
3.1.1
3.1.2
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
0
0.25
0.5
0.75
1
1 6 11 16 21 26 31 36 41 46 51 56 61 66 71 76 81 86 91 96 101 106

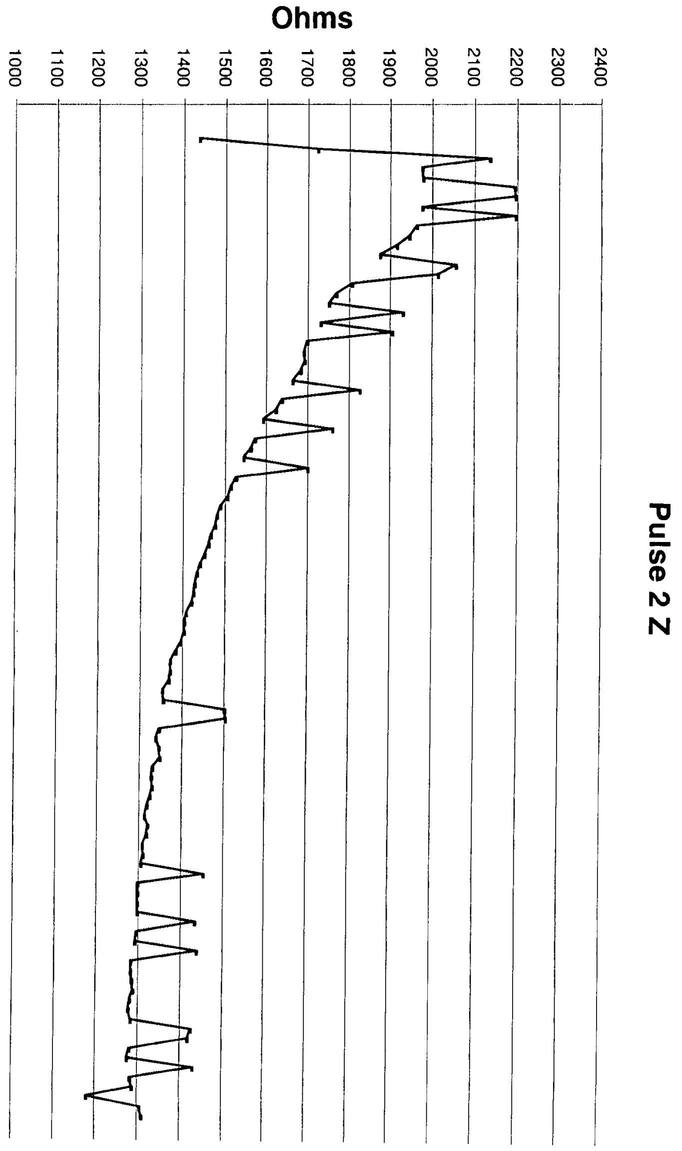
도면3b


Pulse 2
Volts
Amps
3.2.1
3.2.2
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
0
0.25
0.5
0.75
1

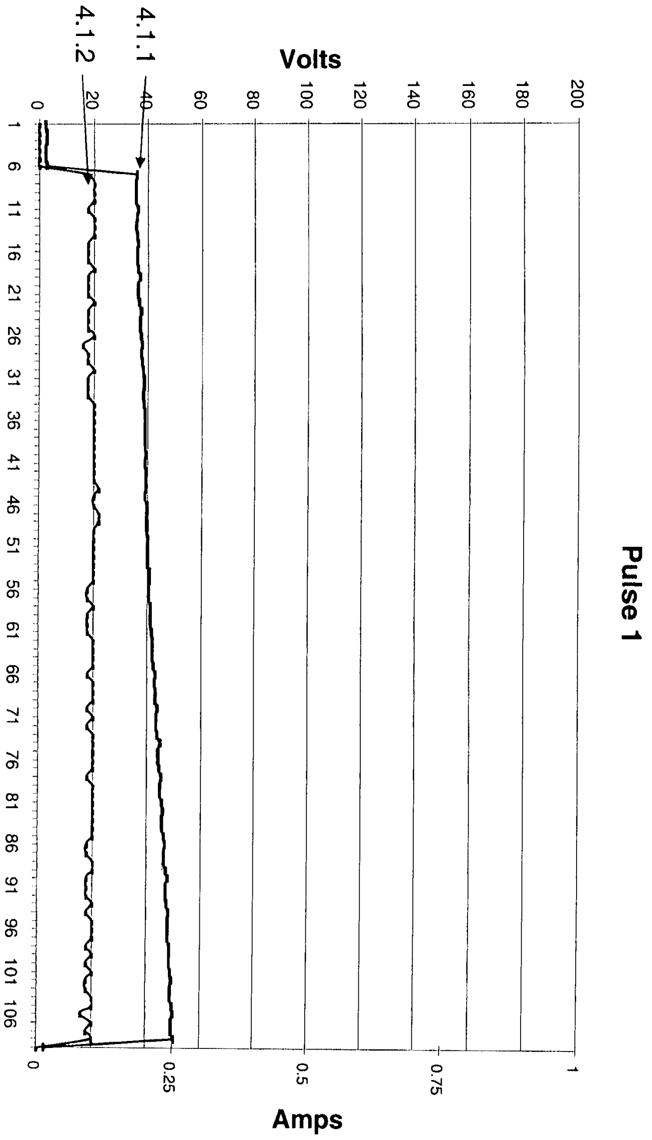
도면3c


Ohms
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
1800
1900
2000
Pulse 1 Z

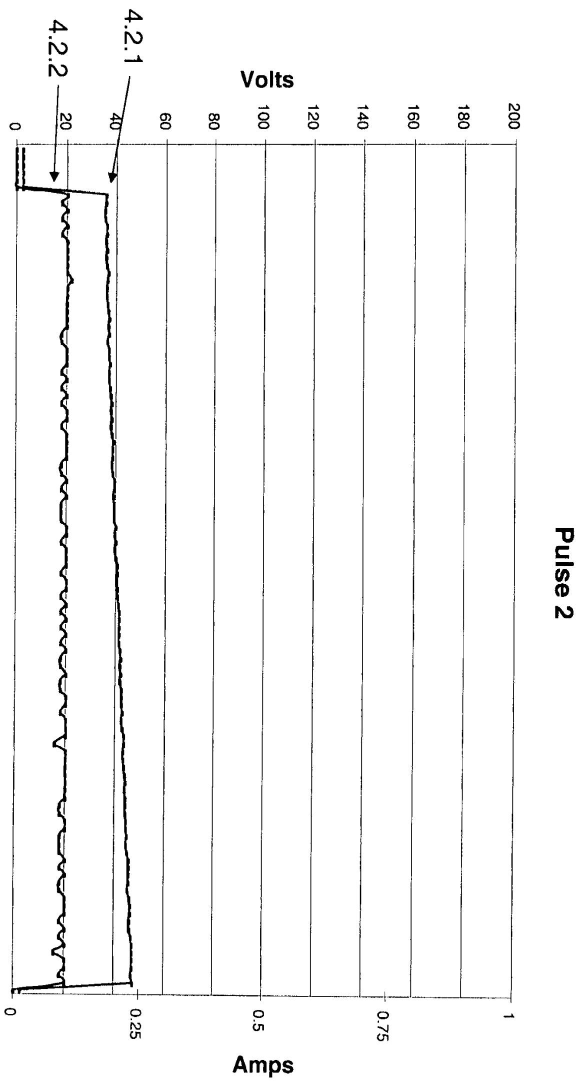
도면3d


Ohms
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
1800
1900
2000
2100
2200
2300
2400
Pulse 2 Z

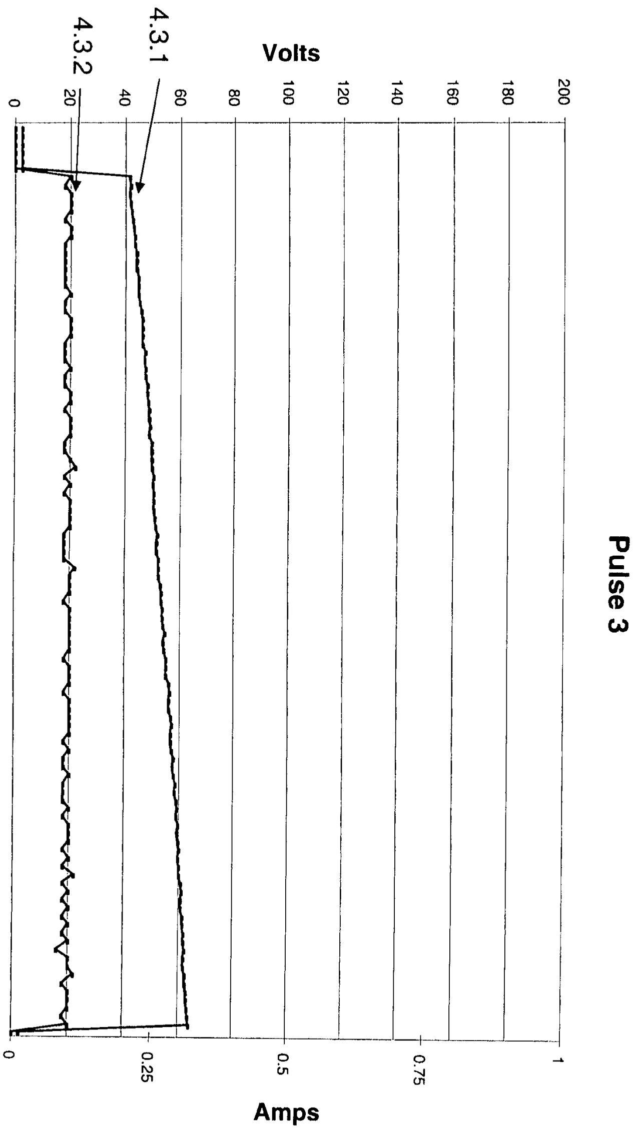
도면4a


Pulse 1
Volts
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Amps
0
0.25
0.5
0.75
1
4.1.1
4.1.2
1 6 11 16 21 26 31 36 41 46 51 56 61 66 71 76 81 86 91 96 101 106

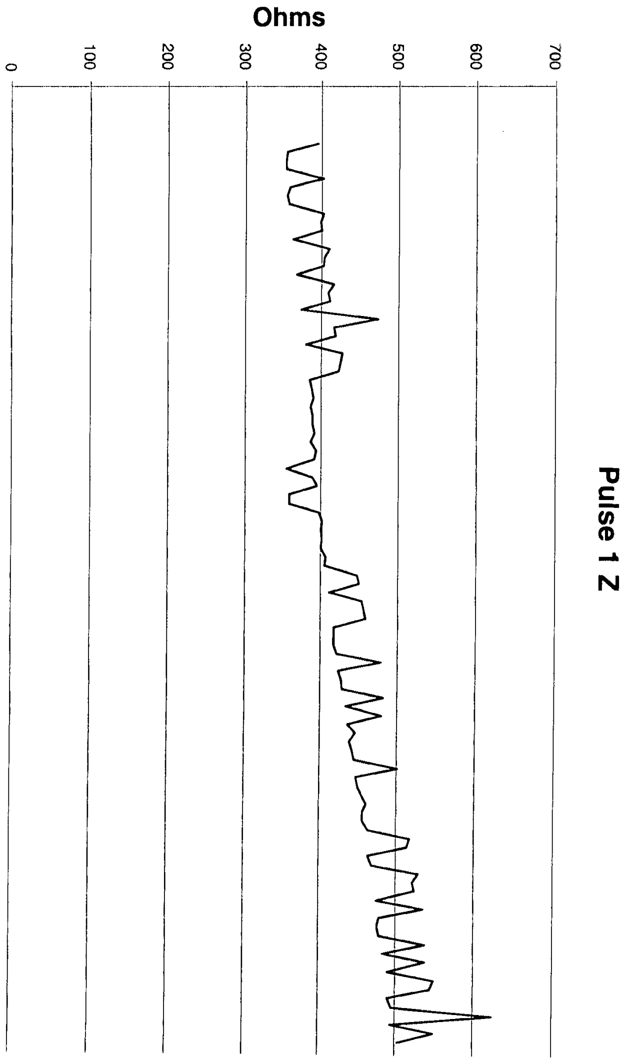
도면4b


4.2.1
4.2.2
Volts
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Pulse 2
0
0.25
0.5
0.75
1
Amps

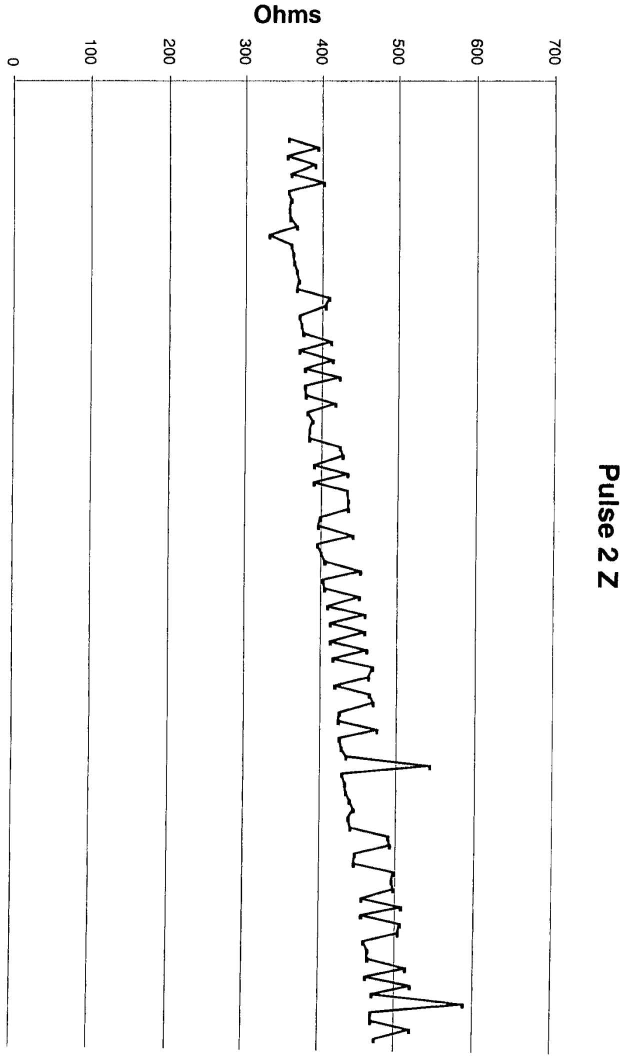
도면4c


Pulse 3
Volts
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Amps
0
0.25
0.5
0.75
1
4.3.1
4.3.2

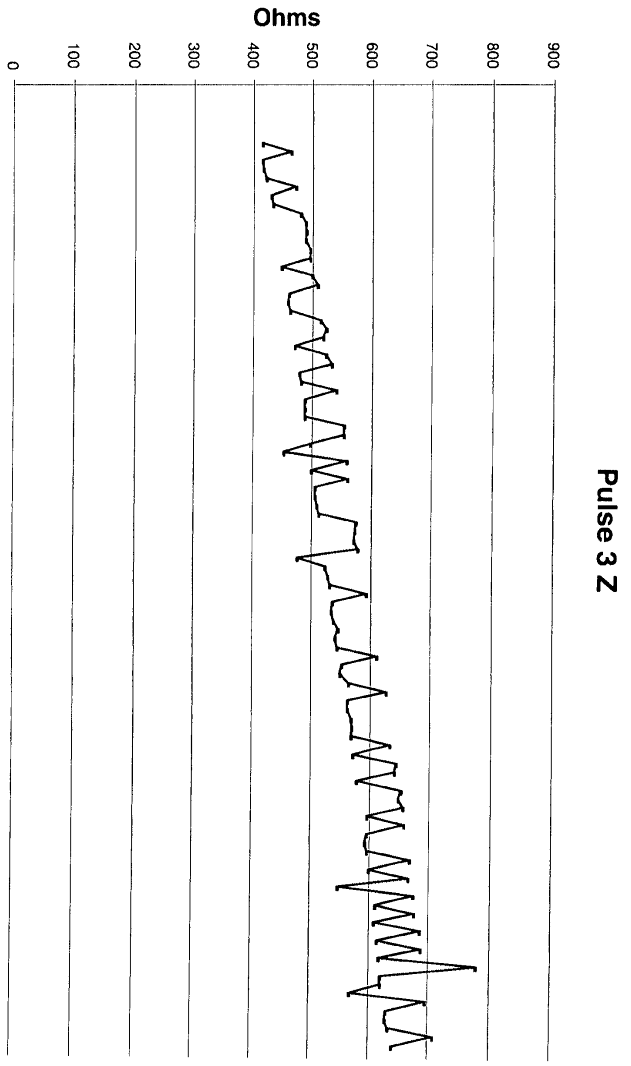
도면4d



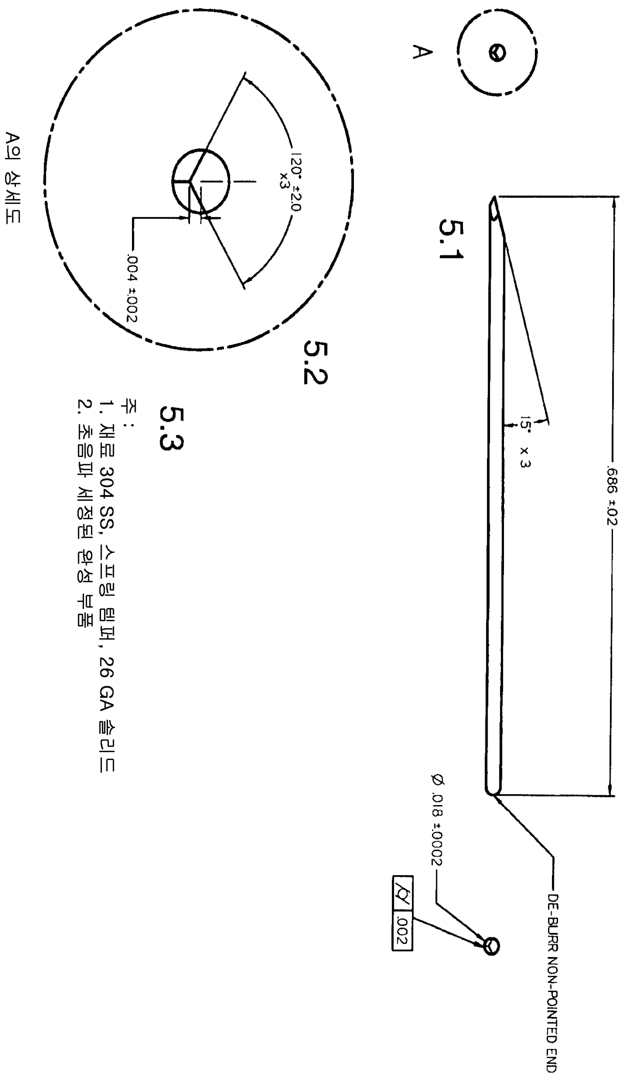
도면4e



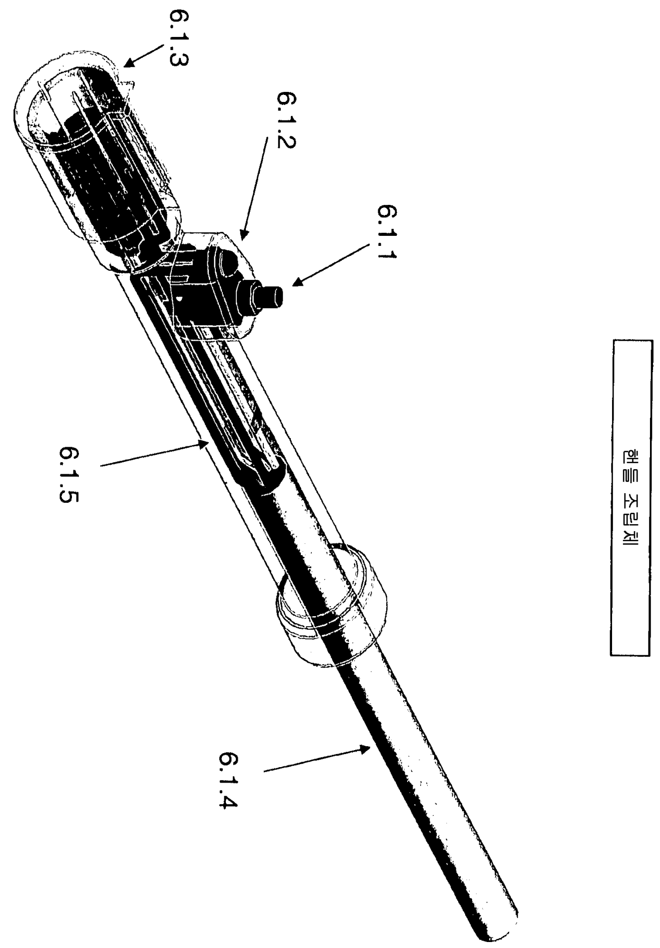
도면4f



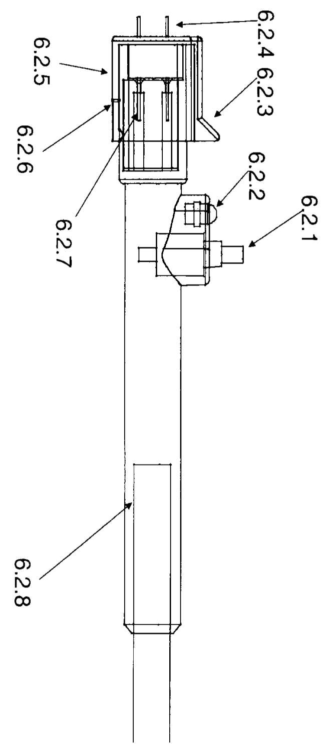
도면5


5.1
A
.686 ±.02
15° x 3
DE-BURR NON-POINTED END
Ø .018 ±.0002
.002
5.2
120° ±20 x3
.004 ±.002
A의 상세도
5.3
주 :
1. 재료 304 SS, 스프링 템퍼, 26 GA 솔리드
2. 초음파 세정된 완성 부품

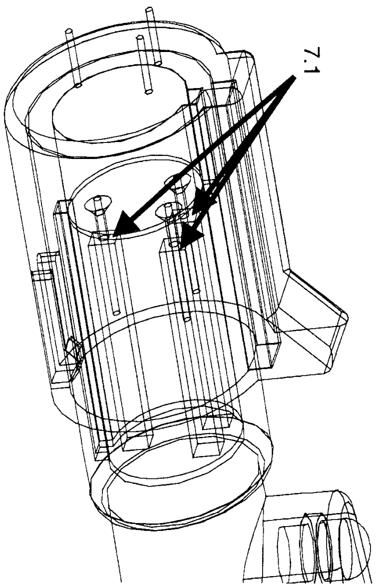
도면6a



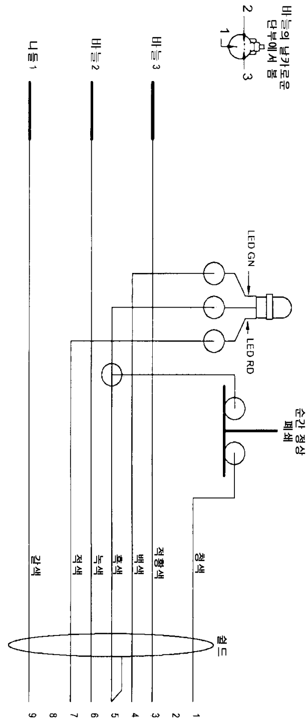
도면6b



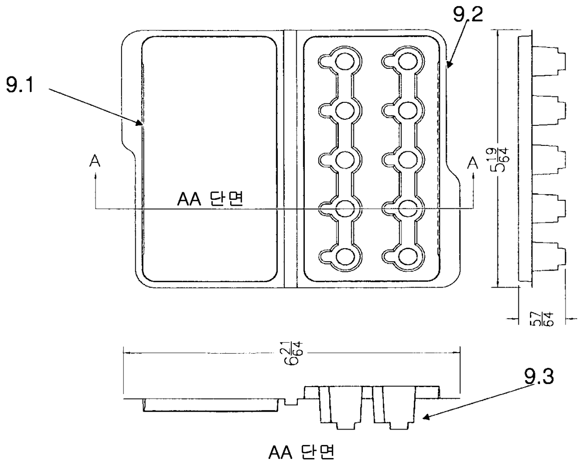
도면7



도면8


바늘의 날카로운
단부에서 봄
1
2
3
바늘 3
바늘 2
바늘 1
LED GN
LED RD
순간 정상
폐쇄
청색
적황색
백색
흑색
녹색
적색
갈색
실드
1
2
3
4
5
6
7
8
9

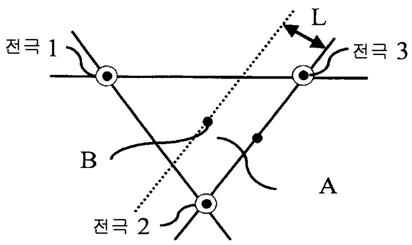
도면9


9.1
9.2
9.3
A
A
AA 단면
AA 단면

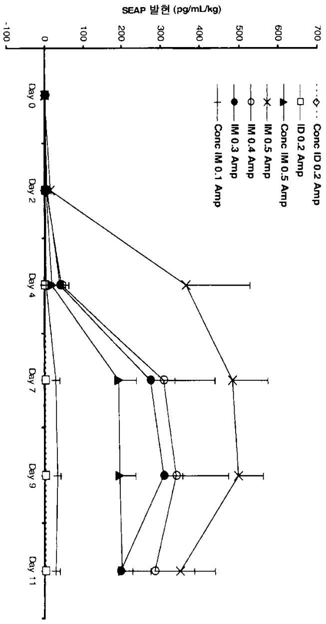
도면10

투여량(μg)	부피 (μL)	전류	지연	핸들	펄스	점수	SE 평균
50	**50**	**0.2A**	**4**	**MA**	**20ms**	**5.00**	**0.00**
100	100	0.2A	80	LA	20ms	5.00	0.00
100	100	0.2A	4	LA	20ms	4.33	0.24
200	100	0.1A	4	LA	52ms	4.17	0.17
100	100	0.1A	4	LA	20ms	4.00	0.00
200	100	0.4A	80	LA	52ms	3.67	0.33
100	50	0.2A	4	LA	52ms	3.33	0.33
50	50	0.2A	4	MA	52ms	3.00	0.00
100	100	0.1A	80	LA	52ms	2.83	0.17
200	100	0.4A	80	LA	20ms	2.83	0.17
50	50	0.2A	80	MA	20ms	2.67	0.17
100	200	0.1A	80	LA	20ms	2.33	0.33
200	100	0.6A	80	LA	52ms	2.17	0.17
100	50	0.1A	80	MA	52ms	2.00	0.00
50	50	0.6A	80	MA	52ms	2.00	0.00
50	50	0.2A	80	MA	20ms	2.00	0.00
100	200	0.2A	80	LA	20ms	2.00	0.00
100	100	0.1A	4	LA	20ms	2.00	0.00
200	100	0.1A	4	LA	20ms	2.00	0.00
200	100	0.2A	4	LA	52ms	2.00	0.00

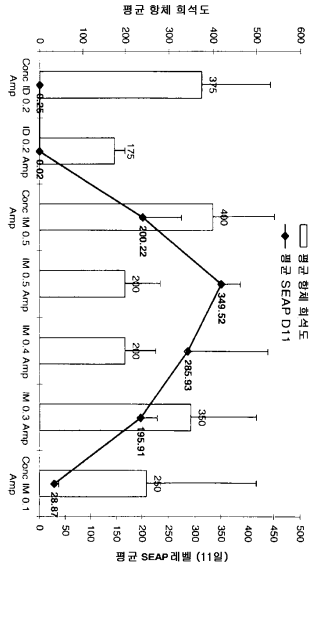
도면11



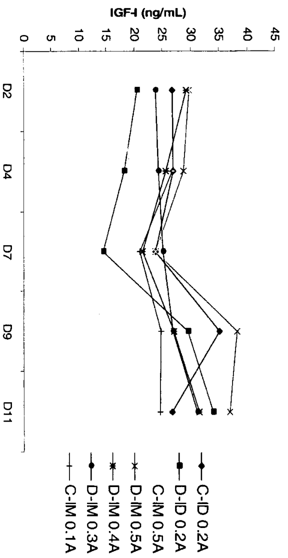
도면12


SEAP 발현 (pg/mL/kg)
Conc ID 0.2 Amp
ID 0.2 Amp
Conc IM 0.5 Amp
IM 0.5 Amp
IM 0.4 Amp
IM 0.3 Amp
Conc IM 0.1 Amp
Day 0
Day 2
Day 4
Day 7
Day 9
Day 11

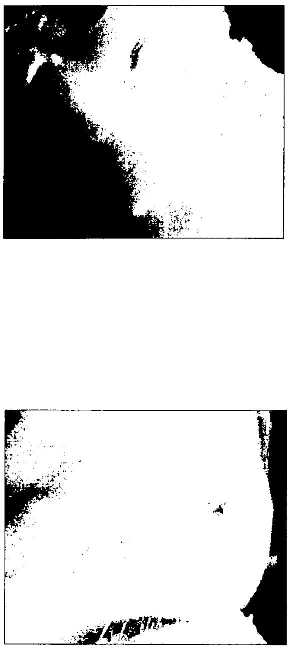
도면13


평균 항체 희석도
평균 SEAP 레벨 (11일)
평균 항체 희석도
평균 SEAP D11
Conc ID 0.2 Amp
ID 0.2 Amp
Conc IM 0.5 Amp
IM 0.5 Amp
IM 0.4 Amp
IM 0.3 Amp
Conc IM 0.1 Amp
375
175
400
200
200
350
250
200.22
349.52
285.93
195.91
28.87

도면14



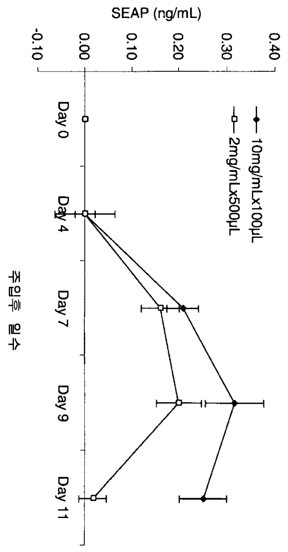
도면15



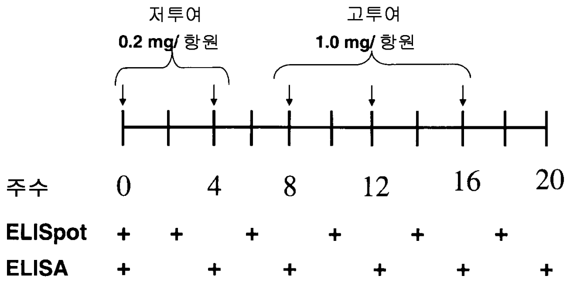
100μg/100μL, IM EP

50μg/50μL, 피부 EP

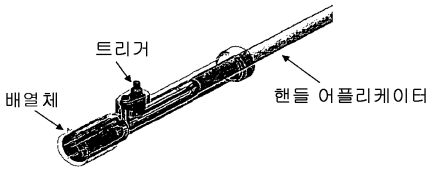
도면16



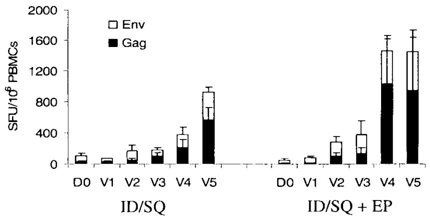
도면17a



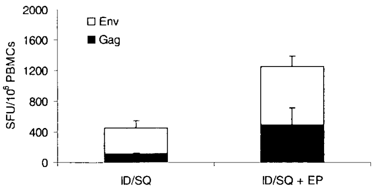
도면17b



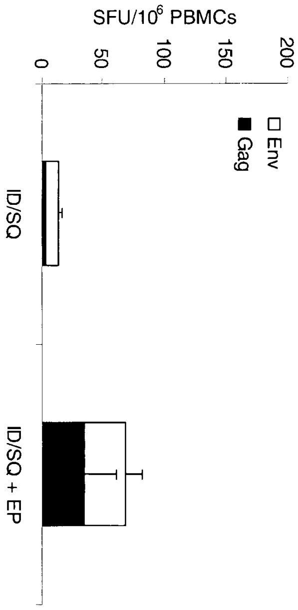
도면18



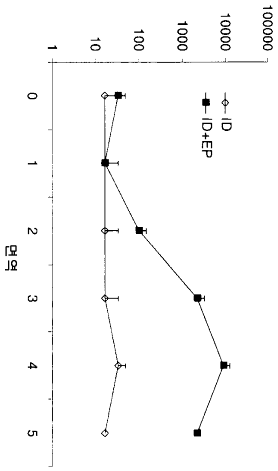
도면19



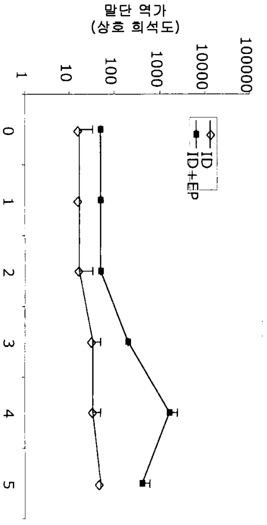
도면20



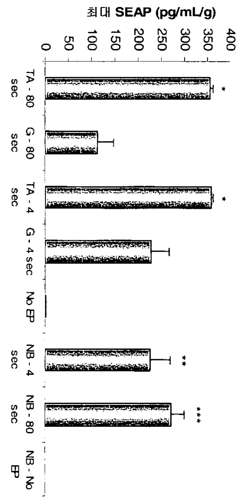
도면21a



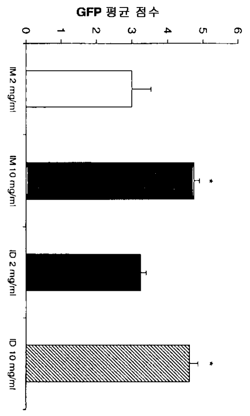
도면21b



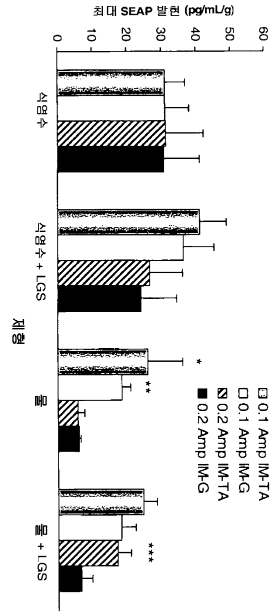
도면22



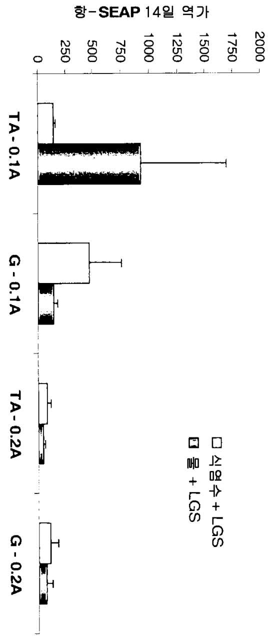
도면23



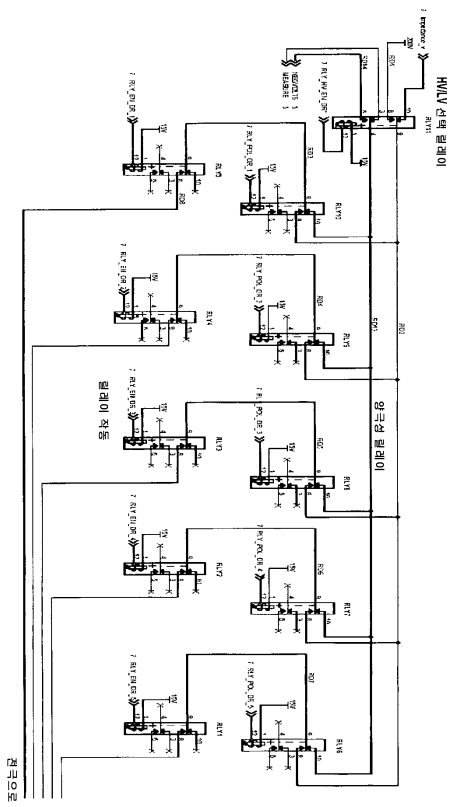
도면24


최대 SEAP 발현 (pg/mL/g)
0
10
20
30
40
50
60
식염수
식염수 + LGS
물
물 + LGS
제형
0.1 Amp IM-TA
0.1 Amp IM-G
0.2 Amp IM-TA
0.2 Amp IM-G
*
**
***

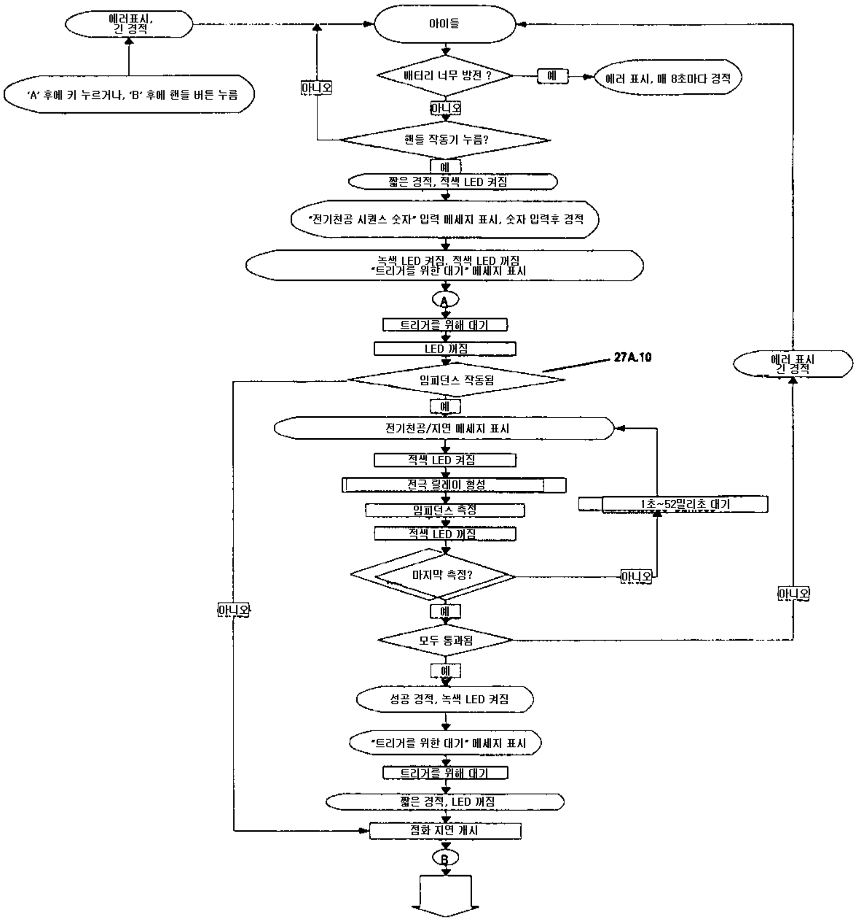
도면25


항-SEAP 14일 역가
0
250
500
750
1000
1250
1500
1750
2000
TA - 0.1A
G - 0.1A
TA - 0.2A
G - 0.2A
식염수 + LGS
물 + LGS

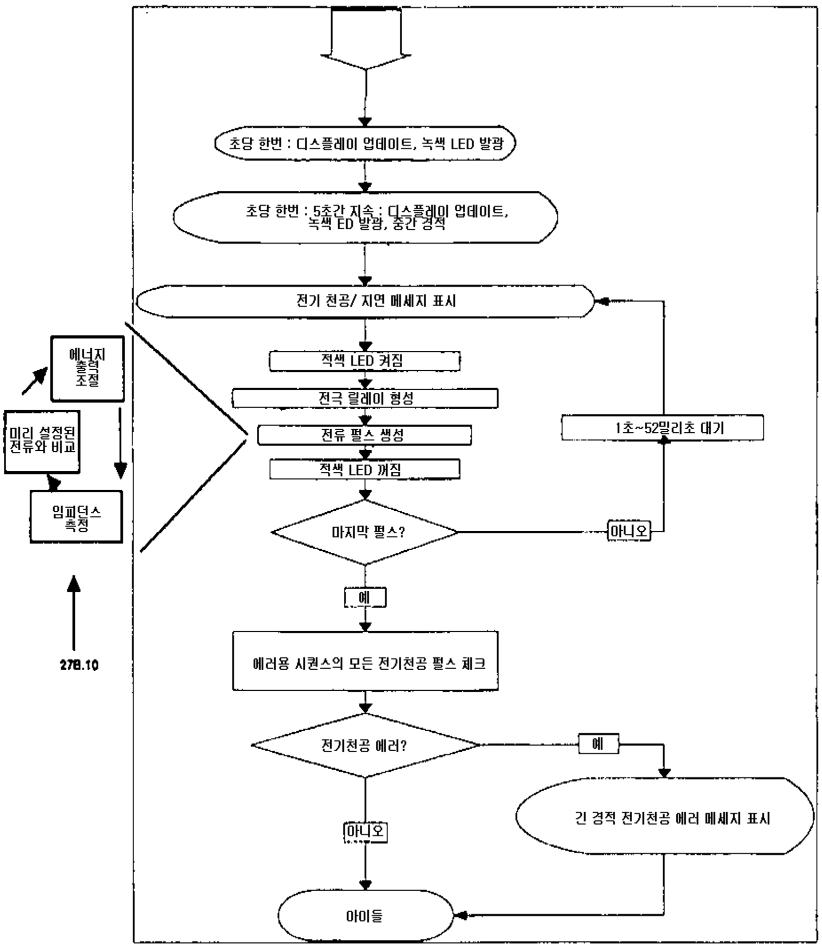
도면26



도면27a


에러표시,
긴 경적
'A' 후에 키 누르거나, 'B' 후에 핸들 버튼 누름
아이들
배터리 너무 방전 ?
예
에러 표시, 매 8초마다 경적
아니오
아니오
핸들 작동기 누름?
예
짧은 경적, 적색 LED 켜짐
"전기천공 시퀀스 숫자" 입력 메세지 표시, 숫자 입력후 경적
녹색 LED 켜짐, 적색 LED 꺼짐
"트리거를 위한 대기" 메세지 표시
A
트리거를 위해 대기
LED 꺼짐
27A.10
임피던스 작동됨
에러 표시
긴 경적
예
전기천공/지연 메세지 표시
적색 LED 켜짐
전극 릴레이 형성
1초~52밀리초 대기
임피던스 측정
적색 LED 꺼짐
마지막 측정?
아니오
아니오
아니오
예
모두 통과됨
예
성공 경적, 녹색 LED 켜짐
"트리거를 위한 대기" 메세지 표시
트리거를 위해 대기
짧은 경적, LED 꺼짐
점화 지연 개시
B

도면27b



초당 한번 : 디스플레이 업데이트, 녹색 LED 발광
초당 한번 : 5초간 지속 : 디스플레이 업데이트, 녹색 ED 발광, 중간 경적
전기 천공/ 지연 메세지 표시
적색 LED 켜짐
전극 릴레이 형성
전류 펄스 생성
적색 LED 꺼짐
마지막 펄스?
아니오
1초~52밀리초 대기
예
에러용 시퀀스의 모든 전기천공 펄스 체크
전기천공 에러?
예
긴 경적 전기천공 에러 메세지 표시
아니오
아이들
에너지 출력 조절
미리 설정된 전류와 비교
임피던스 측정
27B.10