(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0155616
(43) 공개일자 2023년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61N 1/32 (2006.01) *A61M 37/00* (2006.01)
A61N 1/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61N 1/327 (2013.01)
A61M 37/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7037846(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년09월22일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2022-7024752
원출원일자(국제) 2017년09월22일
심사청구일자 2022년08월17일
(85) 번역문제출일자 2023년11월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/052970
(87) 국제공개번호 WO 2018/057900
국제공개일자 2018년03월29일
(30) 우선권주장
62/398,932 2016년09월23일 미국(US)
62/480,180 2017년03월31일 미국(US)

(71) 출원인
이노비오 파마수티컬즈, 인크.
미국 19462 펜실베니아주 플리머스 미팅 스위트 110 저먼타운 파이크 660
(72) 발명자
피셔, 폴
미국 19462 펜실베니아주 플리머스 미팅 스위트 110 저먼타운 파이크 660 더블유., 이노비오 파마수티컬즈, 인크.
브로데릭, 케이트
미국 19462 펜실베니아주 플리머스 미팅 스위트 110 저먼타운 파이크 660 더블유., 이노비오 파마수티컬즈, 인크.
맥코이, 제이
미국 19462 펜실베니아주 플리머스 미팅 스위트 110 저먼타운 파이크 660 더블유., 이노비오 파마수티컬즈, 인크.
(74) 대리인
특허법인엠에이피에스

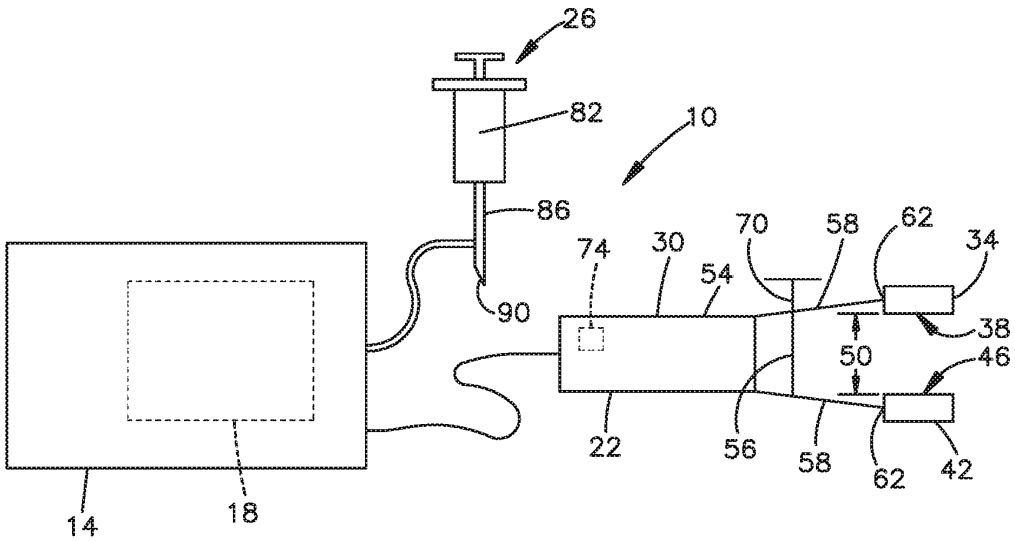
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **전기천공을 사용하여 지방 조직의 생체내 형질감염을 최소로 침습성으로 하기 위한 방법 및 장치**

(57) 요 약

조직의 지방질 층에서 지방세포를 전기천공하는 방법 및 장치로, 여기서 상기 장치는 프레임, 제1 접촉 표면을 가지고 상기 프레임에 커플링된 제1 전극, 제2 접촉 표면을 가지고 상기 프레임에 커플링된 제2 전극을 포함하고, 그리고 상기 제1 접촉 표면과 제2 접촉 표면은 그 사이에 치료 구역을 한정한다. 2개의 전극 사이에 형성된 치료 구역이 조직의 지방질 층을 포함하고 골격 근육을 포함하지 않도록 제1 전극과 제2 전극 사이에 조직의 주름을 배치시키는 단계를 포함하는 방법.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61N 1/0412 (2013.01)
A61N 1/042 (2013.01)
A61N 1/0424 (2013.01)
A61M 2037/0007 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

조직의 지방질 층에서 지방세포를 전기천공하는 방법으로서,

제1 접촉 표면을 갖는 제1 전극을 제공하는 단계로, 상기 제1 접촉 표면은 제1 주변을 갖는, 단계;

제2 접촉 표면을 갖는 제2 전극을 제공하는 단계로, 상기 제2 접촉 표면은 제2 주변을 갖는, 단계;

조직의 주름을 획득하는 단계;

상기 제1 전극의 제1 접촉 표면은 상기 제2 전극의 제2 접촉 표면을 향하여 면하도록 하여, 그 사이에 치료 구역을 생성하고, 상기 치료 구역 내에 배치된 조직은 조직의 지방질 층을 포함하도록, 상기 제1 전극과 상기 제2 전극 사이에 상기 조직의 주름을 배치시키는 단계; 및

상기 제1 전극 및 제2 전극에 전기 신호를 인가하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 치료 구역 내에 배치된 조직은 골격 근육을 포함하지 않는, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 조직의 주름을 획득하는 단계는 피부 층, 지방질 층, 및 평활근 층을 포함하는 조직의 주름을 획득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 제1 전극 및 제2 전극에 전기 신호를 인가하는 단계 전에 상기 조직의 주름의 지방질 층 안으로 사전 결정된 양의 제제를 주사하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 제1 전극 및 제2 전극에 전기 신호를 인가하는 단계는 전기 펄스를 인가하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 전기 펄스를 인가하는 단계는 5 볼트와 1000 볼트 사이의 전기 펄스를 인가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 전기 펄스를 인가하는 단계는 대략 100 마이크로초와 100 밀리초 사이의 전기 펄스를 인가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 전기 펄스를 인가하는 단계는 대략 1 펄스와 대략 10 펄스 사이를 인가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 제1 접촉 표면 및 제2 접촉 표면 중 적어도 하나는 이들로부터 연장하는 복수의 돌출부를 포함하는, 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 각각의 돌출부는 실질적으로 피라미드 형상인, 방법.

청구항 11

조직의 주름에 사용하기 위한 전기천공 장치로서, 상기 조직의 주름은 피부 층, 지방질 층, 및 평활근 층을 포함하고, 상기 전기천공 장치는,

프레임;

상기 프레임에 커플링된 제1 전극으로, 상기 제1 전극은 제1 주변을 한정하는 제1 접촉 표면을 가지는, 제1 전극;

상기 제1 전극 반대편에서 상기 프레임에 커플링된 제2 전극으로, 상기 제2 전극은 제2 주변을 한정하는 제2 접촉 표면을 가지고, 여기서 상기 제1 접촉 표면과 제2 접촉 표면은 그 사이에 치료 구역을 한정하는, 제2 전극; 및

여기서 상기 제1 및 제2 전극은 상기 치료 구역 내에 배치된 조직이 피부 층, 지방질 층, 및 표면 근육 층을 포함하도록 구성되는, 제1 및 제2 전극을 포함하는 장치.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 치료 구역 내에 배치된 조직은 골격 근육을 포함하지 않는, 전기천공 장치.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 장치는 제제를 조직의 지방질 층 내 지방세포에 투여하기 위해 사용되고,

상기 제제를 투여하는 것은,

조직의 주름을 수득하는 단계;

상기 제1 접촉 표면과 상기 제2 접촉 표면 사이에 상기 조직의 주름을 배치시켜 상기 제1 접촉 표면의 상기 비-절연된 부분이 상기 주름의 제1 측면과 접촉하고 상기 제2 접촉 표면의 상기 비-절연된 부분이 상기 주름의 제2 측면과 접촉하도록 하여, 상기 제1 접촉 표면 및 상기 제2 접촉 표면의 상기 비-절연된 부분들 사이에 치료 구역을 생성하는 단계로서, 상기 치료 구역 내에 배치된 상기 조직은 조직의 지방질 층을 포함하는 것인, 단계;

상기 제제를 상기 지방질 층 내로 주입하는 단계로서, 상기 제제는 상기 치료 구역 내에 위치되는 것인, 단계; 및

상기 제1 전극 및 상기 제2 전극에 전기 신호를 인가하는 단계로서, 상기 전기 신호는 상기 조직의 지방질 층 내 지방세포를 전기천공하기에 충분한 전위를 갖는 하나 이상의 전기 펄스를 포함하여, 상기 제제를 상기 지방세포 내로 전달하기 위한 상기 지방세포의 세포막 투과성을 증가시키는 것인, 단계

를 포함하는 것인, 전기천공 장치.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 치료 구역 내에 배치된 상기 조직은 골격 근육을 포함하지 않는 것인, 전기천공 장치.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 조직의 주름을 수득하는 단계는 상기 조직의 주름내에 피부 층, 지방질 층, 및 평활근 층을 수득하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 전기천공 장치.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 주입하는 단계는 상기 제1 전극 및 상기 제2 전극에 상기 전기 신호를 인가하는 단계 전에 상기 조직의 주름의 상기 지방질 층 내로 사전 결정된 양의 상기 제제를 주입하는 단계를 포함하는 것인, 전기천공 장치.

청구항 17

청구항 13에 있어서, 상기 제1 전극 및 상기 제2 전극에 상기 전기 신호를 인가하는 단계는,

상기 조직의 주름 내에 전기장을 생성하는 단계; 및

상기 지방질 층 내에 상기 전기장을 집중시켜, 상기 지방질 층 내에 형상이 실질적으로 구형 또는 타원체인 형질감염 영역을 생성하는 단계

를 추가로 포함하는 것인, 전기천공 장치.

청구항 18

청구항 13에 있어서, 상기 하나 이상의 전기 펄스는 5 볼트 내지 1000 볼트 사이의 전위를 갖는 것인, 전기천공 장치.

청구항 19

청구항 13에 있어서, 상기 하나 이상의 전기 펄스의 각각은 100 마이크로초 내지 100 밀리초 사이의 기간을 갖는 것인, 전기천공 장치.

청구항 20

청구항 13에 있어서, 상기 전기 펄스를 인가하는 단계는 1 펄스 내지 10 펄스 사이를 인가하는 것을 포함하는 것인, 전기천공 장치.

청구항 21

청구항 11에 있어서, 상기 제1 접촉 표면 및 상기 제2 접촉 표면 중 적어도 하나는 이들로부터 연장하는 복수의 돌출부를 포함하는 것인, 전기천공 장치.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 각각의 상기 돌출부는 실질적으로 피라미드 형상인 것인, 전기천공 장치.

청구항 23

청구항 11에 있어서, 상기 프레임을 지지하는 휴대용 도포기를 추가로 포함하고, 상기 휴대용 도포기는 상기 제1 아암 및 상기 제2 아암에 연결된 조정 기전을 포함하고, 상기 조정 기전은 사용자가 상기 제1 접촉 표면 및 상기 제2 접촉 표면 사이의 거리를 조작하는 것을 허용하도록 구성되는 것인, 전기천공 장치.

청구항 24

청구항 11에 있어서, 상기 제1 전극 및 상기 제2 전극의 각각은 상기 각각의 제1 접촉 표면 및 제2 접촉 표면의 상기 절연된 부분을 제공하는 절연 물질 층을 포함하는 것인, 전기천공 장치.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본원은 다음의 미국 출원에 대해 우선권을 주장한다. "전기천공을 사용하여 지방 조직의 생체내 형질감염을 최소로 침습성으로 하기 위한 방법 및 장치"의 명칭으로 2016년 9월 23일 출원된 특허 가출원 연속 번호 62/398,932, 및 "전기천공을 사용하여 지방 조직의 생체내 형질감염을 최소로 침습성으로 하기 위한 방법 및 장치"의 명칭으로 2017년 3월 31일 출원된 62/480,180으로, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 편입된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 전기천공을 사용하여 지방 조직의 *생체내* 형질감염을 최소로 침습성으로 하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 1970년대에, 전기장은 세포의 영구적 손상을 야기함이 없이 세포에 기공을 형성하기 위해 사용될 수 있다는 것이 발견되었다. 이 발견은 대분자, 이온, 및 물이 세포벽을 통해 세포의 세포질 안으로 도입되는 것을 가능하게 만들었다. 일부 사례에서, 전기천공은 두경부암과 같은 국소 치료에서 종양 안으로 화학물질 및 기타 화합물을 도입하기 위해 사용될 수 있다. 이들 절차 동안, 환자는 일반적인 마취 하에 있을 수 있거나 그렇지 않을 수 있어 통증 및 비자발적인 근육 운동이 최소화되어야 한다.

[0006] 골격 근육은 *생체내 DNA의 전기천공-매개된 (EP) 전달을 위해 잘-특성 규명된 표적이다.* 근세포는 장시간 동안 단백질을 생산하고 분비할 수 있으며, 그리고 이것은 근육 안으로 EP 강화 DNA 백신접종이 면역 반응을 일으킬 수 있음이 반복적으로 입증되었다. 피부는 EP에 대한 또 다른 인기 있는 표적으로; 그것은 쉽게 접근되고 풍부한 종류의 면역 세포를 함유한다. 피부의 천연 면역 기능과 그것의 세포 턴오버의 빠른 비는 전형적으로 EP-강화된 DNA 전달에 대한 신속하고, 강한 체액성 반응을 유발시킨다. 그러나, 근육 EP DNA 전달의 적용은 피하 지방의 가변성 두께에 의해 복잡해져, 상이한 지방 두께가 근육 조직 안으로 상이한 바늘 침투 깊이를 초래하기 때문에 "모두에 하나의 크기를 적용하는" 접근을 방지한다.

[0007] 역사적으로, 지방 조직은 주로 지질 액적의 형태로 에너지를 저장하는 데 사용되는 불활성 조직으로 간주되어 왔다. 이와 같이, EP-강화된 DNA 절차는 그 조직의 특정한 층에 지향되지는 않았다. 그러나, 최근 연구는 피하 지방이 실제로 많은 동적 역할을 한다는 것을 밝혀냈다. 지방 조직은 많은 줄기 세포 및 면역 세포를 함유하고, 그리고 수많은 호르몬을 분비함에 의하여 내분비 장기로 작용하고 많은 국소 신호를 분비하며 모세관의 정교한 네트워크를 함유한다. 지방 조직의 *생체내* 형질감염을 달성하기 위한 어떤 시도도 관계자가 지방 조직과 직접적으로 접촉할 수 있도록 환자의 피부의 샘플을 잘라내어 물리적으로 제거해야 하는 것을 요하는 외과적 기술에 제한되어 왔다. 이들 치료는 극도로 침습성이고 임상 장치에 적합하지 않다.

발명의 내용

[0008] 조직의 지방질 층에서 지방 세포를 전기천공하는 방법은 제1 주변을 갖는 제1 접촉 표면을 갖는 제1 전극을 제공하는 단계, 제2 주변을 갖는 제2 접촉 표면을 갖는 제2 전극을 제공하는 단계, 조직의 주름을 수득하는 단계 및 제1 전극의 제1 접촉 표면이 제2 전극의 제2 접촉 표면을 향하여 면하도록 제1 전극과 제2 전극 사이에 조직의 주름을 위치시켜 그 사이에 치료 구역을 생성하는 단계를 포함한다. 상기 치료 구역 내에 배치된 조직은 조직의 지방질 층을 포함한다. 상기 방법은 제1 전극 및 제2 전극에 전기 신호를 인가하는 단계를 포함한다.

[0009] 조직의 주름 (피부 층, 지방질 층, 및 평활근 층을 포함함)으로 사용하기 위한 전기천공 장치는 프레임, 프레임에 커플링된 제1 전극, 및 제1 전극 반대편 프레임에 커플링된 제2 전극을 포함한다. 상기 제1 전극은 제1 주변을 한정하는 제1 접촉 표면을 가지고 상기 제2 전극은 제2 주변을 한정하는 제2 접촉 표면을 가진다. 상기 제1 접촉 표면과 제2 접촉 표면은 그 사이에 치료 구역을 한정한다. 상기 제1 및 제2 전극은 치료 구역 내에 배치된 조직이 피부 층, 지방질 층, 및 표면근육 층을 포함하도록 구성된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명의 전기천공 장치의 개략도이다.

도 2는 전기천공 장치의 대안적인 구현예이다.

도 3은 도 2의 3-3 선을 따라 취한 단면도이다.

도 4는 플레이트 전극의 투시도이다.

도 5는 플레이트 전극의 대안적인 구현예의 투시도이다.

도 6은 조직의 주름에 적용된 도 5의 플레이트 전극을 예시하는 전기장 분포 지도이다.

도 7은 조직의 주름에 적용된 도 4의 플레이트 전극을 예시하는 전기장 분포 지도이다.

도 8은 조직의 주름에 적용된 2개의 플레이트 전극 셋업의 투시도이다.

도 9는 도 8에 예시된 셋업의 E-필드 모의실험이다.

도 10은 도 8에 예시된 셋업의 전류밀도 지도이다.

도 11은 조직의 주름에 적용된 바늘-내 3개의 전극 셋업의 투시도이다.

도 12는 도 11에 예시된 셋업의 E-필드 모의실험이다.

도 13은 도 11에 예시된 셋업의 전류밀도 지도이다.

도 14는 조직의 주름에 적용된 3개의 전극 플레이트 셋업의 투시도이다.

도 15는 도 14에 예시된 셋업의 E-필드 모의실험이다.

도 16은 도 14에 예시된 셋업의 전류밀도 지도이다.

도 17. 기니아 피그 지방 패드 데이터.플라스미드:GFP at 0.5 mg/mL, 250 μl.전기 파라미터:200V, 3 펄스, 100 msec 기간, 200 msec 지연.녹색 영역은 GFP를 발현하는 세포를 나타낸다. 조직 절편은 100 마이크론 두께이다.

도 18. 도 17의 더 높은 배율.

도 19. 기니아 피그 지방 조직 데이터. 지질 액적이 체류하는 비-발현 내측을 둘러싸는, 세포들의 경계 주변에서의 개별 지방 세포 발현 GFP.수 많은 개별 세포가 형질감염된다. 플라스미드:GFP at 0.5 mg/mL, 250 μl. 전기 파라미터:200V, 3 펄스, 100 msec 기간, 200 msec 지연.

도 20. 토끼 지방 조직 데이터. 녹색= GFP 발현. 적색= 지질 (오일 레드 O 얼룩). 청색= 세포 핵 (DAPI 얼룩). 플라스미드:0.5 mg/mL, 250 μl에서 GFP. 전기 파라미터:200V, 3 펄스, 100 msec 기간, 200 msec 지연.

도 21. 기니아 피그 지방 조직의 공초점 이미지.수 많은 세포 핵은 임의의 형질감염된 영역과 관련되지 않는다. GFP는 세포의 가장자리 주변 모두에서 발현된다. 플라스미드:0.5 mg/mL, 250 μl에서 GFP. 전기 파라미터:200V, 3 펄스, 100 msec 기간, 200 msec 지연.

도 22. 형질감염된 영역은 약 50 μl 내지 200 μl 사이의 주입용량으로 주목할만하게 변화하지 않았다. 플라스미드:0.5 mg/mL, 250 μl에서 적색 형광 단백질 (RFP). 전기 파라미터:200V, 3 펄스, 100 msec 기간, 200 msec 지연.

도 23. 단일 전기천공 실행에 따른 다수의 주사. 각각의 주사 부위가 뚜렷하게 가시적이다. 번호 표시 주사 순서.플라스미드:0.5 mg/mL, 250 μl에서 GFP.전기 파라미터:200V, 3 펄스, 100 msec 기간, 200 msec 지연.

도 24. 다양한 펄스 강도와 숫자는 더 밝은 GFP 신호 (더 많은 형질감염된 세포)를 생성할 수 있다. 플라스미드:0.5 mg/mL, 250 μl에서 GFP. 전기 파라미터:200V, 3 펄스, 100 msec 기간, 200 msec 지연.

도 25. EP를 사용하여 지방질 안으로 dMAb 전달. DNA EP 2 시간 전에 전처리된 하이알로니다제. 플라스미드= pGX9249. 화살표는 각각 제1 및 제2 치료를 나타낸다. X-축은 마지막 치료 이래로의 일수이다. 치료 1:1 mg 총 DNA, 200V, 3 펄스, 100 msec 기간. 치료 2:2 mg 총 DNA, 75V, 8 펄스, 100 msec 기간.

도 26. 개별 기니아 피그 dMAb 농도를 나타내는, 도 25와 동일한 연구.적색으로 강조된 동물은 1 sec 지연 펄스 대신에 신속 펄스 9100 msec 지연)를 받았다.

도 27. 인슐린 바늘 대 제트 인젝터 - 지방 조직 내 유체 분산. 염료=메틸렌 블루.No EP.

도 28. 지방 조직의 효소적 조직 분해 (효소로 전처리됨)는 유체 분산을 개선시킨다. 염료 = 메틸렌 블루.

도 29 및 30. EP 최적화.펄스 수가 증가함에 따른 저항 (도 29)과 전류 (도 30)의 추세를 주목한다. 또한 근육 경련에 기인한 100 V 치료에서의 가변성을 주목한다. 펄스 기간 = 100 msec. 펄스 지연= 100 msec.

도 31. 면역원성 비교.지방질 및 옆구리 피부 안으로 DNA의 전기천공. 파라미터:전압 및 치료 용적.

도 32. 조직-전극 어셈블리의 3D 컴퓨터 모델. 2개의 플레이트 전극 사이에서 주름진 조직을 갖는, 비침습성 EP.

도 33. 또 다른 조직-전극 어셈블리의 3D 컴퓨터 모델. 조직 안으로 직접적으로 삽입된 평행한 바늘 전극을 사용한 침습성 EP.

도 34. 200V 여기 전압을 사용한 바늘 (상단부) 및 플레이트 (하단부) 전극 배치형태에 대해 상이한 조직 유형 내에서의 모의실험된 전기장 분포. 히스토그램 (좌측으로부터 우측으로: 지방질, 근육, 피부)은 50 V/cm 초과의 전기장에 대해 각각의 조직 유형 내에서의 전기장 분포를 정량화한다. 오른쪽 상의 이미지는 피부 (S), 지방질 (A), 및 근육 (M)에 대한 외곽선 및 라벨과 함께 정량 분석에 사용된 전기장 분포를 도시한다. 각 눈금 막대 세

그먼트(흰색 또는 검정색)는 길이가 10 mm이고, 총 눈금 막대 길이가 20 mm이다.

도 35. 기니아 피그 피하 지방 패드 안으로 염료 주사. A 단일, 100 μL 주사 후 온전한 지방 패드.B.조직 내에 유체 분산을 보여주기 위해 시상 면을 따라 절단된 단일 부위 주사.C. 5 번 50 μL 주사 후 온전한 지방 패드. 화살표는 주사 부위를 나타낸다.

도 36. 전극의 적용 이전에 면도된 견갑골 사이의 영역 A, 2개의 비침습성 플레이트 전극 사이에 물린 치료 부위 B, 물린 치료 부위의 후면도 C를 도시하는, 지방질-EP 절차.

도 37. 상부:50V 내지 200V의 범위에서 비침습성 지방질-EP에 따른 온전한 기니아 피그 지방 패드 전반에 걸친 GFP 리포터 컨스트럭트 발현 (녹색) 분포.하부:EP 없이 (좌측) 또는 200V 지방질-EP로 (우측) 플라스미드 DNA 주사를 받은 기니아 피그에 대한 치료 부위에서 형광 신호의 비교. 마커는 콜라겐 격막 (*), GFP-발현 지방 세포 (화살촉), 및 높은 자가형광의 영역 (화살표)을 나타낸다. 기준 자는 10mm (상부) 또는 100 μm (하부)이다.

도 38. 200V에서 지방질-EP에 따른 온전한 기니아 지방 패드 (좌측)는 추가 조직학적 분석을 위해 사용하였고, 점선은 절단면을 나타냈다. 우측) 좌측 상의 부문은 점선을 따라 100 μm 두께 조직학적 부문으로 절단했다. GFP (녹색)는 염색되지 않은 조직의 밝은 영역 색상 이미지로 덮여 있다. 기준 자는 10mm (좌측) 및 1mm (우측)이다.

도 39. 단일 초점면 (중간 칼럼) 및 2개의 상이한 3-d 원근법 (우측 2개 칼럼)에서의 GFP 발현 (녹색) 및 핵 (청색)을 도시하는 공초점 이미지.

도 40. 200V에서 지방질-EP에 따른 유전자 발현 동력학 및 조직학적 변화. GFP 발현에 대한 기준 자 (상부)는 10mm이고, H&E 염색된 부문에 대한 기준 자 (하부)는 200 μm이다.

도 41 및 42. 플루 항원을 인코딩하는 플라스미드 DNA로 지방질-EP 및 ID-EP 백신접종에 대한 기니아 피그 항체 반응.기니아 피그는 25 μg 플라스미드로 0 주, 3 주, 6 주 및 21 주에서 백신접종되었다. 도 41:비교 (n=4)를 위해 ID-EP (피부)와 함께, 기니아 피그에서 상이한 지방질-EP 치료방법의 체액성 면역원성 동력학.도 42:EP 전압 (지방질 HV 및 지방질 L V에 대해 n=8, 피부에 대해 n = 4)에 의해 그룹화된, 동일한 면역원성 데이터. 데이터는 기하 평균 역가 ± 표준 오차이다. 지방질-EP 치료 파라미터는 HV = 고전압 (200V), LV = 저전압 (50V)으로 약칭되고, 및 도 41의 그래프에 대해, DNA 주사 부위의 수는 번호 (1 또는 5)에 의해 표시된다.

도 43. 플루 항원을 인코딩하는 플라스미드 DNA로 지방질-EP 및 ID-EP 백신접종에 대한 기니아 피그 T-세포 면역 반응.기니아 피그는 25 μg 플라스미드로 0 주, 3 주, 6 주 및 21 주에서 백신접종되었고, 최종 백신접종 18일 후 ELISPOT가 수행되었다. 결과는 웹타이드 풀 1에 대해 도시되었다. 치료 그룹은 EP 부위 (피부 또는 지방질)로 분할되고, 지방질-EP 치료는 전압 (HV = 200V, LV = 50V) 및 플라스미드 주사 부위의 수 (1 또는 5)에 의해 추가로 분할된다. 데이터는 기하 평균 ± 표준 오차 (n=4)이다.

도 44는 전기천공 장치에 커플링된 플레이트 전극의 대안적인 구현예의 투시도이다.

도 45는 시험 대상체에 사용된 도 44의 전기천공 장치의 사진이다.

도 46-48. 전기 데이터, 특히, 전류 데이터 (도 46), 전압 데이터 (도 47), 및 저항 데이터 (도 48), 각각 4마리 기니아 피그에 절연된 캘리퍼스 및 비-절연된 캘리퍼스 둘 모두의 적용으로부터 평균임.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 발명자들은 최소 침습성 방법으로 *생체내* 조직의 지방질 층을 표적화하고 형질감염시키는 전기천공 장치 및 방법을 개발하였다. 더 구체적으로, 치료는 주사 기전과 공조하여 복수의 플레이트 전극을 이용하여, 사전-측정될 수 있는 제제의 용적에 조직의 영역을 노출시키고, 그런 다음 지방질 층을 표적화하여 상응하는 지방세포에 전기천공을 야기하도록 구성된 조직의 동일한 영역 내에 전기장을 생성한다.

[0012] **I) 정의**

[0013] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 충돌할 있는 경우에는, 정의를 포함한 본 문서가 우선할 것이다. 비록 본 명세서에서 기재된 것과 유사한 또는 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 아래에 기재되어 있다. 본 명세서에서 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허 및 다른 참고 문헌은 전체적으로 참고로 인용된다. 본 명세서에 개시된 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적인 것이

며 제한하려는 것으로 의도되지 않는다.

[0014] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어들 "포함하다", "포괄하다", "가지는", "가진다", "할 수 있다", "함유하다" 및 그것의 변형은 추가의 작용 또는 구조의 가능성을 배제하지 않는 개방형 과도기적 어구, 용어들, 또는 단어인 것으로 의도된다. 단수형태 "a," "및", 및 "the"는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 참조를 포함한다. 본 개시내용은 또한 명백하게 제시되든 또는 제시되지 않든 본 명세서에서 제시된 구현예 또는 요소를 포함하는, 이들로 구성되는 및 이들로 본질적으로 구성되는 다른 구현예를 고려한다.

[0015] 관심 있는 1개 이상의 값에 적용될 때 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "약"은 언급된 기준 값에 유사한 값을 지칭한다. 특정 양태에서, 용어 "약"은 달리 언급되지 않거나 또는 문맥으로부터 달리 분명하지 않는 한 (이러한 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 제외하고) 언급된 기준 값의 어느 하나의 방향 (초과 또는 미만)에서 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만 이내로 되는 값의 범위를 지칭한다.

[0016] "제제"는 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 소분자, 또는 이들의 임의의 조합을 의미할 수 있다. 제제는 본 명세서에 참고로 편입된 PCT/US2014/070188에서 상세한 바와 같이 항체를 인코딩하는 재조합 핵산 서열, 이의 단편, 그것의 변이체, 또는 이들의 조합일 수 있다. "제제"는 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 소분자, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 조성물을 의미할 수 있다. 본 조성물은 본 명세서에 참고로 편입된 PCT/US2014/070188에서 상세한 바와 같이 항체를 인코딩하는 재조합 핵산 서열, 이의 단편, 그것의 변이체, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 제제는, 예를 들어 물 또는 완충액에서 제형화될 수 있다. 완충액은, 예를 들어 염수-나트륨 시트레이트 (SSC) 또는 포스페이트-완충 식염수 (PBS)일 수 있다. 완충액의 이온성 내용물은 전도도를 증가시킬 수 있어, 표적화된 조직에서 증가된 전류 흐름을 초래할 수 있다. 제형화된 폴리뉴클레오타이드의 농도는 1㎍ 내지 20 mg/ml 사이일 수 있다. 제형화된 폴리뉴클레오타이드의 농도는, 예를 들어 1㎍/ml, 10㎍/ml, 25㎍/ml, 50㎍/ml, 100㎍/ml, 250㎍/ml, 500㎍/ml, 750㎍/ml, 1mg/ml, 10mg/ml, 15mg/ml, 또는 20mg/ml일 수 있다.

[0017] "항체"는 부류 IgG, IgM, IgA, IgD, 또는 IgE, 또는 단편, 이의 단편이나 유도체의 항체를 의미할 수 있고, Fab, F(ab')2, Fd, 및 이들의 단일 사슬 항체, 및 유도체를 포함할 수 있다. 항체는 원하는 에피토프 또는 이들로부터 유래된 서열에 충분한 결합 특이성을 나타내는 포유동물 혈청 샘플로부터 단리된 항체, 다클론성 항체, 단클론성 항체, 친화성 정제된 항체, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 항체는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 합성 항체일 수 있다.

[0018] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같은 "항체 단편" 또는 "항체의 단편"은 항원-결합 부위 또는 가변 영역을 포함하는 온전한 항체의 부분을 지칭한다. 상기 부분은 온전한 항체의 Fe 영역의 불변 중쇄 도메인 (즉, 항체 아이소타입에 의존한, CH2, CH3, 또는 CH4)을 포함하지 않는다. 항체 단편의 예는, 비제한적으로, Fab 단편, Fab' 단편, Fab'-SH 단편, F(ab')2 단편, Fd 단편, Fv 단편, 디아바디, 단일-사슬 Fv (scFv) 분자, 단 하나의 경쇄 가변 도메인을 함유하는 단일-사슬 폴리펩타이드, 경쇄 가변 도메인의 3개의 CDR을 함유하는 단일-사슬 폴리펩타이드, 단 하나의 중쇄 가변 영역을 함유하는 단일-사슬 폴리펩타이드, 및 중쇄 가변 영역의 3개의 CDR을 함유하는 단일-사슬 폴리펩타이드를 포함한다.

[0019] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "단편"은 포유동물에서 면역 반응을 이끌어 낼 수 있는 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열 또는 이들의 일부분을 의미한다. 단편은 아래에 제시된 단백질 단편을 인코딩하는 다양한 뉴클레오타이드 서열 중 적어도 하나로부터 선택된 DNA 단편일 수 있다. "단편"은 또한 포유동물에서 면역 반응을 이끌어 낼 수 있는 폴리펩타이드 서열 또는 이들의 일부분을 지칭할 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "펩타이드", "단백질", 또는 "폴리펩타이드"는 아미노산의 연결된 서열을 의미할 수 있고 천연, 합성, 또는 변형 또는 천연과 합성의 조합일 수 있다.

[0021] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 함께 공유결합된 적어도 2종의 뉴클레오타이드를 의미한다. 폴리뉴클레오타이드는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있거나, 또는 이중 가닥 및 단일 가닥 서열 둘 모두의 일부분을 함유할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 DNA, 게놈과 cDNA 양자, RNA, 또는 하이브리드일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 데옥시리보- 및 리보-뉴클레오타이드의 조합, 및 우라실, 아데닌, 티민, 시토신, 구아닌, 이노신, 잔틴 하이포잔틴, 이소시토신, 이소구아닌, 및 합성 또는 비-자연 발생 뉴클레오타이드 및 뉴클레오사이드를 포함하는 염기의 조합을 함유할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 화학적 합성 방법에 의하거나 또는 재조합 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "대상체"는 포유동물을 의미할 수 있다. 포유동물 인간, 침팬지, 기니아 피그, 돼지, 마카크, 개, 고양이, 말, 소, 마우스, 랫트, 또는 다른 비-인간 영장류일 수 있다.

[0023] 핵산에 관하여 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "변이체"는 (i) 언급된 뉴클레오타이드 서열의 일부분 또는 단편; (ii) 언급된 뉴클레오타이드 서열 또는 이들의 일부분의 보체; (iii) 언급된 핵산 또는 그것의 보체에 실질적으로 동일한 핵산; 또는(iv) 엄격한 조건 하에서 언급된 핵산, 그것의 보체, 또는 여기에 실질적으로 동일한 서열로 혼성화하는 핵산을 의미한다.

[0024] "변이체"는 아미노산의 삽입, 결실, 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열에서 상이하지만 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드로 추가로 정의될 수 있다. "생물학적 활성"의 대표적인 예는 특이적 항체에 결합되거나 또는 면역 반응을 증진시키는 능력을 포함한다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 언급된 단백질에 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉, 유사한 특성 (예를 들어, 친수성, 하전된 영역의 정도 및 분포)의 상이한 아미노산으로 아미노산을 대체하는 것은 전형적으로 사소한 변화를 포함하는 것으로 당업계에서 인식된다. 이들 사소한 변화는 당업계에서 이해되는 바와 같이, 아미노산의 소수성 지수를 고려함에 의해 부분적으로 확인될 수 있다 (Kyte et al., J. Mol. Biol. 1982, 157, 105-132). 아미노산의 소수성 지수는 그것의 소수성 및 전하의 고려에 기반한다. 유사한 소수성 지수의 아미노산이 치환될 수 있고 여전히 단백질 기능을 보유한다는 것이 당업계에서 공지되어 있다. 일 양태에서, ± 2의 소수성 지수를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성이 또한 생물학적 기능을 유지하는 단백질을 초래하는 치환을 밝히는데 사용될 수 있다. 펩타이드와 관련하여 아미노산의 친수성의 고려는 그 펩타이드의 가장 큰 국소 평균 친수성을 계산할 수 있으며, 이는 항원성 및 면역원성과 잘 상관되는 것으로 보고된 유용한 척도이다. 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은 당업계에서 이해되는 바와 같은 생물학적 활성, 예를 들어 면역원성을 보유하는 펩타이드를 초래할 수 있다. 치환은 서로 ±2의 친수성 값을 갖는 아미노산으로 수행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값 둘 모두는 그 아미노산의 특정한 측쇄에 의해 영향을 받는다. 그 관찰과 일치하여, 생물학적 기능과 양립할 수 있는 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 다른 특성에 의해 밝혀진 바와 같은, 아미노산, 특히 이들 아미노산의 측쇄의 상대적인 유사성에 의존하는 것으로 이해된다.

[0025] 변이체는 전체 유전자 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 실질적으로 동일한 핵산 서열일 수 있다. 핵산 서열은 유전자 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다. 변이체는 아미노산 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 실질적으로 동일한 아미노산 서열일 수 있다. 아미노산 서열은 아미노산 서열 또는 이의 단편의 전장에 걸쳐 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "벡터"는 복제의 기원을 함유하는 핵산 서열을 의미한다. 벡터는 바이러스 벡터, 박테리오파아지, 박테리아 인공 염색체, 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 벡터는 자가-복제 염색체외 벡터일 수 있고, 바람직하게는, DNA 플라스미드이다.

[0027] 본 명세서에서 수치 범위의 인용에 대해, 동일한 정도의 정확성을 갖는 그 사이에 각각의 개재 번호가 명백하게 고려된다. 예를 들어, 6-9의 범위에 대해, 수 7 및 8이 6 및 9에 부가하여 고려되고, 6.0-7.0에 대해, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 및 7.0이 명백하게 고려된다.

[0028] **II) 전기천공 장치**

[0029] 본 발명은 복수의 비-침습성 플레이트 전극을 갖는 적용 장치를 포함하는 전기천공 장치에 대한 것이다. 본 전기천공 장치는 또한 플레이트 전극에 전기천공 신호를 제공하는 전원 공급 장치를 포함할 수 있고, 여기서 전극이 생물학적 샘플과 전기 접촉할 때, 전극에 공급된 전기천공 신호는 전기장이 표적화된 지방질 층에 형성되도록 조직의 지방질 층에 의해 주로 흡수된다. 이 전기장은 상응하는 지방 세포의 세포벽 내에서 전기천공을 일으켜, 그것에 의해 세포막의 투과성을 증가시키고, 예를 들어 세포 내로 제제가 도입되게 한다. 도 1에 예시된 바와 같이, 본 발명의 전기천공 장치 (10)는 전기천공 (EP) 신호 발생기 (18)를 함유하는 하우징 (14), 하우징 (14)에 제거가능하게 커플링된 도포기 (22), 및 전기천공이 일어나기 전에 지질과 같은 제제의 사전-결정된 용적을 샘플의 지방질 층 안으로 주입하기 위한 주사장치 (26)를 포함한다.

[0030] 도 1에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 휴대용 도포기 (22)는 프레임 (30), 제1 접촉 표면 (38)을 갖는 제1 전극 (34)으로, 프레임 (30)에 커플링된 제1 전극 (34),및 제2 접촉 표면 (46)을 갖는 제2 전극 (42)으로, 프레임

(30)에 커플링된 제2 전극 (42)을 포함하여, 제1 접촉 표면 (38)과 제2 접촉 표면 (46)은 서로 면하고 실질적으로 정렬되도록 된다. 사용 중에, 도포기 (22)는 사용자가 프레임 (30)을 조작하여 제1 접촉 표면 (38)과 제2 접촉 표면 (46) 사이의 거리가 변화하는 것을 허용하도록 구성된다. 본원의 목적을 위해, 제1 접촉 표면 (38)과 제2 접촉 표면 (46) 사이의 거리는 본 명세서에서 "전극 거리 (50)"로 언급된다.

[0031] 도포기 (22)의 프레임 (30)은 기부 (54) 및 기부 (54)로부터 각각 연장되어 상응하는 원위 말단 (62)을 생성하는 복수의 탄성 아암 (58)을 포함한다. 조립될 때, 각각의 원위 말단 (62)은 제1 및 제2 전극 (34, 42) 중 각각의 하나가 여기에 커플링되도록 구성된다. 설명된 구현예에서, 아암 (58)은 사용자가 아암 (58)을 탄성적으로 변형시켜 원위 말단 (62) 및 그것의 상응하는 전극 (34, 42)이 움직일 수 있도록 구성된다. 상응하는 전극 (34, 42)은 독립적으로 또는, 예를 들어 서로에 대해 협력하여 움직일 수 있다. 설명된 구현예에서, 프레임 (30)은 2개의 아암 (58)을 포함한다 (도 1); 그러나 대안적인 구현예에서, 프레임 (30)은 원하는 표적 조직의 치료를 위해 필요한 전극의 수를 지지하기 위해 그 초과 또는 그 미만의 아암 (58)을 포함할 수 있다.

[0032] 도 2에서 예시된 바와 같이, 도포기 (22')의 대안적인 구현예는 이로부터 신장하는 3개의 아암 (58a', 58b', 58c')을 갖는 프레임 (30')을 포함한다. 더 구체적으로, 프레임 (30')은 제1 접촉 표면 (38)과 제2 접촉 표면 (46)이 서로 면하고 실질적으로 정렬되도록 제1 및 제2 전극 (34, 42)을 지지하도록 구성된 2개의 대향하는 아암 (58a', 58b')을 포함한다. 프레임 (30')은 또한 제3 전극 (66')의 제3 접촉 표면 (68')이 제1 및 제2 접촉 표면 (38', 46')에 수직하여 배치되도록 제3 전극 (66')을 지지하도록 구성된 제3 아암 (58c')을 포함한다. 대안적인 도포기 (22')에서, 전극 거리 (50')는 제1 접촉 표면 (38')과 제2 접촉 표면 (46') 사이의 거리 (즉, 서로 면하는 2개의 접촉 표면 사이의 거리)로 정의된다.

[0033] 도포기 (22)는 또한 치료를 위해 그리고 치료 동안 준비를 위해 전극거리 (50)를 고정하거나 달리 조작하기 위해 조정 기전 (56)을 포함한다. 조정 기전 (56)은 제1 방향으로 아암 (58)에 대하여 막대 (70)의 회전이 전극 거리 (50)를 수축시키도록 프레임 (30)의 양 아암 (58) 사이에서 연장되고 나사식으로 맞물릴 수 있는 막대 (70)를 포함한다. 그에 반해서, 아암 (58)에 대한 막대 (70)의 제1 방향과 반대인 제2 방향으로의 회전은 전극 거리 (50)를 증가시킨다. 설명된 구현예에서, 막대 (70)는 막대 (70)가 사용자에 의해 회전되지 않으면 (즉, 나사산이 다시 구동 가능하지 않으면) 전극 거리 (50)가 고정된 채로 유지되도록 구성된다. 대안적인 구현예에서, 조정 기전 (56)은 전극 거리 (50)가 사용자에 의해 조정가능한 분리된 배치형태와 전극 거리 (50)가 고정되는 결합된 배치형태 사이에서 조정가능한 래치 (도시되지 않음)를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 조정 기전 (56)은 당해 분야에서 잘 알려지고 본 명세서에서 기재되지 않은 임의의 형태의 조정기전을 포함할 수 있다.

[0034] 도포기 (22)는 또한 신호 발생기 (18)와 작동가능하게 통신하고 장치 (10)의 작동 중에 전극 거리 (50)를 결정하도록 구성된 센서 (74)를 포함할 수 있다. 사용 중에, 센서 (74)는 현재의 전극 거리 (50)를 나타내는 신호를 신호 발생기 (18)에 전송한다. 일부 구현예에서, 센서 (74)는 도포기 (22)의 프레임 (30)에 커플링된 저항 센서, 광학 센서 및 기타 동종의 것을 포함할 수 있다. 설명된 구현예에서, 센서 (74)는 발생기 (18)가 전극 거리 (50) 데이터를 기록하고 치료 동안 상이한 전극 거리 (50)를 자동으로 보상하게 하는 신호를 신호 발생기 (18)에 제공한다. 대안적인 구현예에서 센서 (74)는 사용자가 전극 거리 (50)를 수작업으로 보상할 수 있게 하는 거리를 디스플레이 (도시되지 않음) 상에 나타낼 수 있다. 또 다른 구현예에서, 도포기 (22)는 사용자가 신호 발생기 (18) 내로 사전-결정된 전극 거리 (50)를 입력할 수 있도록 구성될 수 있으며, 그것에 의하여 도포기 (22)는 적절한 전극 거리 (50)를 생성하도록 전극 (34, 42)을 자동으로 조정할 것이다. 또 다른 구현예에서, 센서는 특성상 기계적일 수 있어, 다이얼 및 기타 동종의 것에 전극 거리 (50)를 표시할 수 있다.

[0035] 도 4에 예시된, 도포기 (22)의 제1 플레이트 전극 (34)은 표적 조직과 직접적으로 접촉하도록 구성된 제1 접촉 표면 (38)을 갖는다. 제1 플레이트 전극 (34)은 임의의 형상을 가질 수 있다. 본 형상은, 예를 들어 직사각형일 수 있다. 제1 플레이트 전극 (34)은 또한 접촉 표면 (38)의 둘레를 연장하고 그 범위를 한정하는 제1 주변 (78)을 포함한다. 사용 도중, 제1 플레이트 전극 (34)은 신호 발생기 (18)와 작동가능하게 연결되고, 치료 동안 샘플 조직과 결합하여 전기 전도도를 형성하도록 구성된다. 이와 같이, 플레이트 전극 (34)은 신호 발생기 (18)에 의해 생성된 전기천공 신호를 표적 조직에 인가할 수 있다. 플레이트 전극 (34)은 또한 임피던스, 전압, 전류 및 동종의 것과 같은 표적 조직에서의 파라미터를 검출할 수 있고, 그 정보를 진단 및 피드백을 위해 신호 발생기 (18)로 다시 중계할 수 있다. 예시된 구현예에서, 제1 플레이트 전극 (34)의 제1 접촉 표면 (38)은 실질적으로 평면이다; 그러나, 대안적인 구현예에서, 제1 접촉 표면 (38)은 윤곽이 곡선일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 제1 접촉 표면 (38)은 전극 (34)과 표적 조직 사이의 접촉에서 표면적의 양을 최대화하도록 의도된 임의의 형상 또는 크기를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 도포기는 복수의 전극 (34)을 포함할 수 있으며, 각각의 전극은 구체적으로 환자 또는 시험 대상체의 신체의 특정 영역과 대응하는 크기 및 형상을 갖는 제1 접촉

표면 (38)을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 전극의 크기 및 형상은 표적 조직 내의 전기장의 분포를 집중시키는데 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 제1 접촉 표면 (38)은 그 내부에 형성된 패턴 또는 널을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 제1 접촉 표면 (38)은 전극 (34)과 표적 조직 사이의 전도도 또는 그립을 개선시키기 위해 거기에 적용된 코팅 또는 접착제를 포함할 수 있다.

[0036] 도 5 및 6은 플레이트 전극 (34'')의 대안적인 구현예를 설명한다. 플레이트 전극 (34'')은 상기한 플레이트 전극 (34)과 실질적으로 유사하고 동일한 방식으로 동작한다. 이와 같이, 2개의 전극 (34'', 34) 사이의 차이점만이 본 명세서에서 상세히 설명될 것이다. 도 5에서 가장 잘 예시된 바와 같이, 플레이트 전극 (34'')의 접촉 표면 (38'')은 기부 (54'') 및 원위 말단 (62'')을 형성하는 돌출부 깊이 (64'') 기부 (54'')에 실질적으로 수직으로 각각 연장되는 복수의 돌출부 (58'')를 포함한다. 사용 동안, 플레이트 전극 (34'')의 돌출부 (58'')는 그를 통해 관통하지 않고 표적 조직을 가압하여, 돌출부 (58'')가 피부의 최상 층을 파괴 및 변경하게 하고, (도 6을 도 7에 비교하여) 표적 조직 내의 전기장 분포를 개선시키고 그리고 또한 그립을 향상시킨다. 더 구체적으로, 돌출부 (58'')는 주어진 입력 전압에 대해 표적 조직 내에 형성된 전기장의 크기를 증가시킨다. 예시된 구현예의 돌출부 (58'')는 모두 유사한 돌출부 깊이 (64'')를 생성하지만, 원하는 전도도와 표적 조직과의 파지를 생성하기 위해 필요에 따라 각각의 돌출부 (58'')는 크기가 다르게 될 수 있다고 이해된다. 또한, 도시된 실시예는 대략 500 미크론, 600 미크론, 700 미크론, 800 미크론, 900 미크론, 1 ㎜, 1.5 ㎜, 2 ㎜, 2.5 ㎜, and 3 ㎜의 돌출 깊이(64'')를 포함한다.

[0037] 예시된 구현예에서, 전극 (34'')의 각각의 돌출부 (58'')는 실질적으로 피라미드 형상이다. 각각의 피라미드 돌출부는 또한 대략 500 마이크론 곱하기 500 마이크론, 600 마이크론 곱하기 600 마이크론, 700 마이크론 곱하기 700 마이크론, 800 마이크론 곱하기 800 마이크론, 900 마이크론 곱하기 900 마이크론, 1 ㎜ 곱하기 1 ㎜, 1.5 ㎜ 곱하기 1.5 ㎜, 2 ㎜ 곱하기 2 ㎜, 2.5 ㎜ 곱하기 2.5 ㎜, 3 ㎜ 곱하기 3 ㎜의 기부 폭을 가질 수 있다. 대안적인 구현예에서, 각각의 피라미드 돌출부는 또한 기부 치수에서 비-정사각형일 수 있다. 대안적인 구현예에서, 각각의 돌출부 (58'')는 작동 중에 조직을 관통함이 없이 표적 조직 내로 가압하여 변형시키도록 구성된 임의의 다른 형상을 형성할 수 있다. 예를 들어, 돌출부 (58'')는 형상이 원통형, 직사각형, 원뿔형, 절두-원뿔형, 또는 절두-피라미드형일 수 있다. 게다가, 각각의 돌출부 (58'')는, 예를 들어 대략 500 마이크론, 600 마이크론, 700 마이크론, 800 마이크론, 900 마이크론, I ㎜, 1.5 ㎜, 2 ㎜, 2.5 ㎜, 또는 3 ㎜의 폭을 포함할 수 있다.

[0038] 또 추가의 구현예에서, 각각의 돌출부 (58'')는 표적 조직을 관통하도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 돌출부 (58'')는 기부 (54'')로부터 연장하는 바늘 (도시되지 않음)을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 이와 같은 돌출부 (58'')는 피하 주사침, 트로카 바늘 기타 동종의 것과 같이 형상화될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 이와 같은 돌출부 (58'')는 뭉툭한 선단 또는 평평한 선단을 가질 수 있다. 또 다른 구현예에서, 각각의 돌출부 (58'')는 동일한 전극상의 다른 돌출부 (58'')와 다르게 형상화될 수 있다.

[0039] 도 5에서 예시된, 전극 (34'')의 돌출부 (58'')는 플레이트 전극 (34'')의 기부 (58'') 상에 직사각형 어레이의 형태로 고르게 배치된다. 대안적인 구현예에서, 돌출부 (58'')는 필요한 전도도 및 표적 조직과의 파지를 제공하기 위해 필요한 임의의 패턴으로 배치될 수 있다. 예를 들어, 돌출부 (58'')는 동심성 고리 (도시되지 않음) 또는 다른 패턴으로 배치될 수 있다.

[0040] 도 44 및 45는 플레이트 전극 (34''')의 또 다른 대안적인 구현예를 예시한다. 본 플레이트 전극 (34''')은 상기된 플레이트 전극 (34)과 실질적으로 유사하고 이와 동일한 방식으로 작동한다. 이와 같이, 2개의 전극 (34''', 34) 사이의 차이점 만이 본 명세서에서 상세히 설명될 것이다. 도 44에서 가장 잘 예시된 바와 같이, 플레이트 전극 (34''')의 접촉 표면 (38''')은 접촉 표면 (38''')이 이들과 접촉 시 표적 조직과의 제1 저항을 생성하는 1개 이상의 비-절연된 부분 (500) 및 접촉 표면 (38''') 이들과 접촉 시 제1 저항보다 더 큰 표적 조직과의 제2 저항을 생성하는 1개 이상의 절연된 부분 (504)을 포함한다. 사용 동안, 표적 조직과 접촉 표면 (38''')의 비-절연된 및 절연된 부분 (500''', 504''')의 상호 작용은 표적 조직에 인가된 수득한 전기장에 영향을 미친다. 특히, 전극 (34''')의 접촉 표면 (38''')의 적어도 일부를 절연시킴으로써, 전극 (34''')은 표적 조직의 지방질 층 내에서 전기장을 더 잘 집중시켜 그것에 의해 환자가 겪는 근육 경련과 통증의 양을 감소시킨다. 달리 말하면, 대안적인 플레이트 전극 (34''')은 절연된 부분을 갖지 않는 유사하게 형상화된 및 크기의 플레이트 전극에 비교될 때 근육을 통해 이동하는 전류의 양의 감소시킨다 (적어도 하나의 절연된 부분 (504''')이 존재하는 "절연된 캘리퍼스"와 절연된 부분 (504''')이 존재하지 않는 비-절연된 캘리퍼스 사이의 차이를 나타내는 도 46 내지 도 48 참조).

[0041] 도 44 및 45에 예시된, 플레이트 전극 (34''')의 절연된 부분 (504''')은 그 사이에 저항을 증가시키기 위해 접촉 표면 (38''')과 표적 조직 사이에 배치된 절연 물질 층 (508''')을 포함한다 (도 45 참고). 예시된 구현예에서, 전극 (34''')은 전극 (34''')의 적어도 일부 위에 제거가능하게 배치될 수 있는 절연 물질 (508''')로부터 형성된 외피 (512''')를 포함한다. 외피 (512''')의 크기 및 형상에 따라, 접촉 표면 (38''')의 상이한 크기 및 형상이 절연 물질 (508''')에 의해 커버될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 절연 물질 (508''')은 전극 (34''')의 접촉 표면 (38''')에 (예를 들어, 코팅과 같이) 도포될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 절연 물질 (508''')은 제거가능한 접착제 (도시되지 않음)로 접촉 표면 (38''')에 도포될 수 있다.

[0042] 제2 플레이트 전극 (42)은 제1 플레이트 전극 (34)과 실질적으로 유사하고 이와 동일한 방식으로 동작한다. 제2 플레이트 전극 (42)은 제2 접촉 표면 (46)의 범위를 한정하는 제2 주변 (60)을 갖는 제2 접촉 표면 (46)을 포함한다. 이와 같이, 제2 플레이트 전극 (42)은 본 명세서에서 상세히 설명되지 않을 것이다. 예시된 구현예가 제1 전극 (34)과 동일한 크기 및 형상인 제2 플레이트 전극 (42)을 도시하고 있지만, 제2 전극 (42)은 제1 전극 (34)과는 다른 크기 및 형상으로 될 수 있다는 것이 이해된다. 게다가, 제2 전극 (42)의 제2 접촉 표면 (46)은 제1 전극 (34)의 제1 접촉 표면 (38)과는 다른 크기 및 형상으로 될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 하나의 플레이트 전극은 돌출부 (58'')를 포함할 수 있지만 또 다른 전극은 그렇지 않을 수 있다. 한층 더, 하나의 플레이트전극 절연된 부분 (504''')을 포함할 수 있지만 또 다른 전극은 그렇지 않을 수 있다.

[0043] 도1에 예시된 바와 같이, 장치 (10)는 원하는 위치에서 표적 조직으로 제제를 주입하기 위한 주사 장치 (26)를 더 포함할 수 있다. 더 구체적으로, 주사 장치 (26)는 그 내부에 사전 결정된 용적의 제제를 보유하도록 구성된 저장소 (82)와, 저장소 (82)로부터 연장되고 이와 유체 연통하여 원위 말단 (90)을 생성하는 주사 바늘 (86)을 포함한다. 사용 동안, 사용자는 원위 말단 (90)이 원하는 깊이 (즉, 지방질 층 (104) 내로; 도 11 참조)에 위치되도록 표적 조직 내로 주사 바늘 (86)을 삽입한다. 사용자는 그런 다음 저장소 (82) 내에 함유된 유체를 바늘 (86)을 통해 원위 말단 (90) 밖으로 그리고 원하는 조직 내로 주입할 수 있다. 예시된 주사 장치 (26)가 피하 주사침 (즉, 인슐린 바늘)을 포함하지만, 대안적인 구현예에서, 제트 주입기 또는 다른 형태의 주입이 이용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0044] 게다가, 일부 구현예에서, 주사 장치 (26)의 바늘 (86)은 신호 발생기 (18)와 작동 가능하게 연계될 수 있고 제1 및 제2 플레이트 전극 (34, 42)과 유사한 전극으로서 수행될 수 있다 (도 1 참조). 그와 같은 구현예에서, 신호 발생기 (18)는 바늘 (86)에 치료 신호를 전송할 뿐만 아니라 진단 및 피드백 목적을 위해 임피던스, 전류 흐름 및 기타 동종의 것과 같은 정보를 신호 발생기 (18)에서 다시 수신할 수 있다.

[0045] 주사 장치 (26)는 또한 샘플 조직 내의 원위 말단 (90)의 위치를 제어하기 위한 깊이 제한기 (도시되지 않음)를 포함할 수 있다. 사용 동안, 깊이 제한기는 깊이 제한기가 바늘 (86)의 원위 말단 (90)이 원하는 깊이를 넘어 조직 내로 관통하는 것을 막을 수 있도록 사전 결정된 깊이로 설정 될 수 있다. 일부 구현예에서, 깊이 제한기는 안내 구멍을 한정하는 단단한 멈춤부를 포함할 수 있다. 그와 같은 구현예에서, 안내 구멍의 길이는 바늘이 표적 조직을 관통하는 깊이를 지시한다. 또 다른 구현예에서, 깊이 제한기는 또한 바늘 (86)을 펄스 발생기 (18)와 전기적으로 결합시키기 위한 전기 커플러를 포함할 수 있다.

[0046] **III) 지방질 층의 치료**

[0047] 상기에 기재된 장치는 전기 천공을 사용하여 제제로 지방 조직을 형질감염하기 위해 의도된 다양한 치료 방법에 사용될 수 있다. 각각의 치료 또는 "셋업"은 샘플 조직 내에서 형성된 수득한 전기장의 크기, 형상 및 특성과 관련된 유연성을 제공한다. 각각의 셋업은 또한 다양한 침입 수준을 제공한다.

[0048] a) 2개의 전극 셋업

[0049] 2-전극 치료 셋업을 통해 치료를 실행하기 위해, 사용자는 먼저 환자를 얻어, 치료하고자 하는 부위 또는 영역 (이하에서, "조직 영역 (100'')")을 기록한다. 본원의 목적을 위해, 조직 영역 (100)은, 예를 들어 피부 층 (104), 지방질 층 (108) 및 평활근 층 (112) 중 하나 이상을 갖는 피부 조직을 포함할 수 있다.

[0050] 피부 층. 피부 층은 외부 표피 부분과 표피가 연결될 수 있는 진피 부분의 2개 부분을 가질 수 있다. 진피 아래에는 피하 층이 존재할 수 있으며 그물코모양 및 지방 조직을 함유할 수 있다. 진피로부터의 섬유는 피하층 아래로 연장되어 피하층을 피부층에 연결시킬 수 있다. 피하층은 기저 조직 및 기관이 부착될 수 있다.

[0051] 표피. 표피는 계층화된 편평 상피로 구성될 수 있고 케라틴생성세포, 멜라닌세포, 및 비착색된 과립상 돌기세포 (예를 들어, 랑게르한스 세포 및 그란스타인 세포)를 함유할 수 있다. 케라틴생성세포는 몇 개의 층으로 조직화

될 수 있다. 층의 수는 체내의 위치에 따라 달라 질 수 있다. 예를 들어, 마찰에 대한 노출이 큰 경우, 표피는 많은 층, 예를 들어 5개 층을 가질 수 있다. 마찰에 대한 노출이 크지 않은 경우, 예를 들어 표피는 5개 미만 층을 가질 수 있다. 표피는 하기 층 중 1개 이상을 가질 수 있다: 기저층, 가시층, 과립층, 투명층, 및/또는 각질층.

[0052] 진피. 진피는 교원성 및 탄성 섬유를 함유하는 결합조직으로 구성될 수 있다. 진피는 두껍거나 신체에서의 위치에 의존하는 것으로 생각될 수 있다. 예를 들어, 진피는 손바닥과 발바닥에서는 더 두껍지만 눈꺼풀에서는 더 얇을 수 있다. 진피는 혈관, 신경, 땀샘, 및 모발 소낭을 함유할 수 있다. 진피는 미세 탄성 섬유를 함유하는 느슨한 결합 조직으로 구성될 수 있는 유두상 영역 또는 층을 가질 수 있다. 유두상 영역은 또한 표피 안으로 투사하는 진피 유두를 가질 수 있다. 이들 유두는 촉각에 민감한 신경 종말인 모세관, 접촉 소체 (또는 마이스너 소체)를 함유할 수 있다. 진피 유두는 상피 위에 놓이는 융기를 야기할 수 있다.

[0053] 진피의 잔여 부분은 세망의 영역 또는 층일 수 있다. 이 영역은 조밀하게 충진된 결합조직과 교원성 및 조립 탄성 섬유의 다발을 함유할 수 있다. 세망의 영역의 다양한 두께는 피부의 두께에서의 차이에 대해 적어도 부분적으로 원인이 될 수 있다.

[0054] 지방질 층. 지방질 층 또는 조직은 지방세포가 지방을 저장하는 느슨한 결합 조직의 형태일 수 있다. 지방세포는 그것의 세포질과 세포 내의 지방의 액적에 의해 세포의 가장자리로 밀려진 핵을 가질 수 있다. 각각의 지방세포는 구조적 지지를 위해 교원성 기저막으로 둘러싸일 수 있고 모세관과 접촉할 수 있다. 지방세포의 클러스터는 교원성 격막에 의해 함께 유지될 수 있는 "엽" 내에 함유될 수 있다. 지방 조직은 느슨한 결합 조직이 위치한 곳에서 발견될 수 있다. 지방 조직은 피부 아래의 피하 층에 있을 수 있다.

[0055] 평활근 층. 평활근 층은, 예를 들어 혈관과 같은 중공 내부 구조의 벽에 위치할 수 있다. 평활근은 또한 모발 소낭에 부착될 수 있다. 평활근 층은 끈이 없는 비자발성 근육 조직이며 비자발성 신경 및 일부 호르몬에 의해 영향을 받을 수 있다. 평활근 층은 심장 근육 조직 및 골격 근육 조직과는 구별되는 근육 층 유형이다. 골격 근육은 주로 뼈에 부착되며 골격의 일부를 움직일 수 있다. 조직을 현미경으로 검사할 때 줄무늬 또는 밝은 색과 어두운 색의 띠 모양 구조가 교대로 나타나기 때문에 골격 근육은 또한 줄무늬가 있고, 자발적이며, 그것에 의하여 의식적 조절에 의해 수축 및 이완을 하게 할 수 있다. 심장 근육 조직은 줄무늬이고 비자발적이며 심장의 벽의 대부분을 형성한다.

[0056] 치료의 영역이 선택되면, 사용자는 주사 장치 (26)를 얻고 원위 말단 (90)이 지방질 층 (108) 내에 위치되도록 조직영역 (100) 안으로 바늘 (86)을 삽입한다. 사용자는 그런 다음 선택적으로 제제의 사전-측정된 용적인 제제의 용적을 조직 영역 (108)의 지방질 층 (108) 안으로 주사하여 주사 부위 (116)를 생성한다. 일단 주사가 완료되면, 사용자는 조직 영역 (100)으로부터 바늘 (86)을 제거한다.

[0057] 바늘 (86)이 제거된 상태에서, 사용자는 주사 부위 (116)를 포함하는 조직 영역 (100)의 일부분을 조작하고 그 안에 주름 (120)을 생성한다. 조직은 주름 (120) 내에 포함된 조직이 피부 층 (104), 지방질 층 (108) 및 평활근 층 (112)으로 제한되도록 조작된다. 골격 근육 (도시되지 않음)은 주름 (120) 안에 포함되지 않는다. 수득한 주름 (120)은 제1 측면 (124), 제1 측면 (124)에 대향하는 제2 측면 (128), 및 제1 측면 (124)과 제2 측면 (128) 사이에서 연장되는 최상부 (132)를 포함한다. (도 8). 주름 (120)은 또한 제1 측면 (124)과 제2 측면 (128) 사이의 거리로서 정의되는 주름 두께 (134)를 한정한다.

[0058] 주름 (120)을 준비한 후, 사용자는 전극 간격 (50)이 주름 두께 (134)보다 약간 더 클 때까지 도포기 (22)의 프레임 (30) 또는 조정 기전 (67)을 조작한다. 사용자는 그런 다음 각각의 전극 (34, 42)이 접촉 표면 (38, 46)이 내측으로 향하게 하여 주름 (120)의 대향면 상에 배치되도록 도포기 (22)를 위치시킨다 (도 9 참조). 더 구체적으로, 사용자는 제1 플레이트 전극 (34)의 제1 접촉 표면 (38)이 주름 (120)의 제1 측면 (124)과 접촉하고 제2 플레이트 전극 (42)의 제2 접촉 표면 (46)이 주름 (120)의 제2 측면 (128)과 접촉하여 그 사이에 치료 구역 (136)을 생성하도록 도포기 (22)를 위치시킨다. 일단 위치로 되면, 사용자는 두 전극 (34, 42) 사이에서 주름 (120)를 효과적으로 클램핑하기 위해 전극 거리 (50)를 증가 또는 감소시킬 수 있다.

[0059] 본원의 목적을 위해, 치료 구역 (136)은 제1 및 제2 전극 (34, 42) 사이에 배치된 공간의 용적으로 한정되고, 제1 및 제2 접촉 표면 (38, 46)에 의해 2개의 측면 상에 한정되고 제1 접촉 표면 (38)의 제1 주변 (78)과 제2 접촉 표면 (46)의 제2 주변 (60) 사이에 연장되는 가상적인 장벽에 의해 나머지 측면 상에서 한정된다 (도 8-10 참조). 이와 같이, 사용자가 주름 (120)의 대향 측면 상에 제1 및 제2 전극 (34, 42)을 배치시킨 후에, 현재 기재된 치료의 치료 구역 (136)은 주름 (120)의 적어도 일부분 및 그 안의 주사부위 (116)의 적어도 일부분을 함

유할 것이다. 설명된 구현예에서, 치료 동안 치료 구역 (136) 내에 배치된 조직은 피부 층 (104), 지방질 층 (108) 및 평활근 층 (112)으로 제한된다. 치료 구역 (136)은 여기에 임의의 골격 근육을 포함하지 않는다.

[0060] 예시된 구현예가 전극 (34, 42)의 접촉 표면 (38, 42)이 주름 (120)과 직접 접촉하여 배치되는 것을 예시하고 있지만, 전도성 겔 (도시되지 않음) 또는 다른 물질이 전극 (34, 42)과 주름 (120) 사이의 전기적 통신을 개선하기 위해 이용될 수 있다고 이해된다.

[0061] 일단 전극 (34, 42)이 위치되면, 도포기 (22)의 센서 (74)는 전극 거리 (50)를 결정하고 그 정보를 신호 발생기 (18)에 중계하여 이에 따라 전기천공 신호 (150)의 파라미터를 설정할 수 있게 한다. 신호 발생기 (18)는 또한 수득한 전류 및 전압이 전극 (34, 42)에 의해 검출될 수 있고 후속으로 신호 발생기 (18)에 의해 사용되어 치료되는 조직의 임피던스를 계산하는 테스트 신호 (즉, 저전압 펄스)를 생성할 수 있다. 게다가, 테스트 신호 동안 전극 (34, 42)에 의해 검출된 데이터는 또한 펄스가 성공적으로 개시되었는지를 확인하는데 사용될 수 있다그렇게 하기 위해, 신호 발생기 (18)는 펄스의 지속기간 동안 전류 흐름이 유지되는지 여부를 비교하여, 타이밍이 일치하지 않으면 (즉, 1 또는 2 이상의 데이터 수집 포인트가 누락된 경우) 펄스는 불완전한 것으로 간주될 수 있다. 더 구체적으로, 전기천공 신호의 펄스 전압 (158), 펄스 길이 (162), 펄스의 수 및/또는 펄스 지연 (166) 중 적어도 하나는 전극 거리 (50)에 의해 적어도 부분적으로 결정될 수 있다 (아래에 기재됨). 예시된 구현예에서, 전극 거리 (50)는 도포기 (22)의 센서 (74)에 의해 자동으로 결정된다. 그러나, 대안적인 구현예에서, 사용자는 전극 거리 (50)를 수작업으로 측정할 수 있고 전극 거리 (50)를 장치 (10)에 입력할 수 있다.

[0062] 예시된 구현예에서, 전기천공 신호 (150)는 일련의 전기적 "펄스 (154)"로 이루어지며, 여기서 각각의 펄스 (154)는 사전 결정된 펄스 전압 (158)으로 전달되고 사전 결정된 펄스 길이 (162)를 지속한다. 게다가, 각각의 개별 펄스 (154)는 펄스 지연 (166)에 의해 시간적으로 인접한 펄스 (154)로부터 분리된다. (도 26). 예시된 구현예에서, 전기천공 신호는 대략 50 V와 대략 200 V 사이의 펄스 전압 (158)을 포함한다. 다른 구현예에서, 신호는 대략 5V와 대략 10V 사이의 펄스 전압 (158)을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 신호는 대략 1 kV의 펄스 전압 (158)을 포함할 수 있다. 게다가, 예시된 전기천공 펄스 길이 (162)는 대략 100 마이크로초, 200 마이크로초, 300 마이크로초, 400 마이크로초, 500 마이크로초, 600 마이크로초, 700 마이크로초, 800 마이크로초, 900 마이크로초, 1 밀리초, 10 밀리초, 50 밀리초, 75 밀리초, 및 100 밀리초이다. 한층 더, 전기천공 펄스 길이 (166)는 대략 1 밀리초, 50 밀리초, 100 밀리초, 500 밀리초, 및 1 초이다. 한층 더, 각각의 전기천공 신호는 대략 1 펄스와 대략 10 펄스 사이를 포함한다. 함께, 일부 구현예에서 전기천공 신호 (150)는 펄스 사이의 200 밀리초의 지연으로 기간에서 대략 100 밀리초의 대략 200 V에서 3개의 펄스를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 전기천공 신호 (150)는 펄스 사이의 200 밀리초 지연으로 기간에서 대략 100 밀리초의 대략 50 V에서 3개의 펄스를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 전기천공 신호 (150)는 펄스 사이의 1 초 지연으로 기간에서 100 밀리초의 대략 50 V에서 10개의 펄스를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 전기천공 신호 (150)는 펄스 사이의 대략 100 밀리초의 지연으로 대략 100 밀리초의 기간의 75 V의 8개 펄스를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 전기천공 신호 (150)는 펄스 사이의 대략 100 밀리초 내지 대략 1 초 지연으로 대략 10 마이크로초와 대략 100 마이크로초 기간의 대략 500 V 내지 대략 1000 V 사이의 3개의 펄스를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서 전기천공 신호는 단일 펄스를 포함할 수 있다.

[0063] 전기천공 신호의 파라미터를 설정한 후, 장치 (10)의 신호 발생기 (18)는 제1 전극 (34) 중 하나는 양극 또는 음극 중 하나로 작용하고, 제2 전극 (42)은 양극 또는 음극 중 다른 전극으로 작용하도록 제1 및 제2 전극 (34, 42)에 원하는 신호를 송부한다. 더 구체적으로, 신호 발생기 (18)는 검출된 임피던스 값 및 전극 거리 (50)에 적어도 부분적으로 의존하여 전기천공 신호 (150)의 파라미터를 조정할 수 있다. 전기천공 신호를 수신하면, 전극 (34, 42)은 그 내부에 전기장을 생성하는 주름 (120)에 직렬식으로 신호를 전도한다 (도 9 및 10). 수득한 전기장은 지방질 층 (108)에 집중되어 주름 (120) 내에 형질감염 영역을 생성한다. 더 구체적으로, 전기장은 형상이 실질적으로 구형 또는 타원체인 형질감염 영역을 생성할 수 있다. 그러나, 대안적인 구현예에서, 형질감염 영역의 크기 및 형상은 표적 조직 내의 전기장 분포와 표적 조직 안으로 주사된 제제의 위치 및 양에 적어도 부분적으로 의존할 수 있다. 게다가, 전류는 하부 근육 층 (112)을 통해 자유롭게 흐르고, 피하 또는 근육 내 전기천공 전달을 위해 통상적으로 사용되는 관통형 바늘 전극 배치형태에 의해 수행되는 유사한 치료와 비교할 때, 주사 부위 (116) 근처에서 상대적으로 낮다. 전기장의 이와 같은 특성은 면역 반응이 바람직하지 않은 치료에 잠재적으로 유익하다.

[0064] 전기천공이 완료된 후에, 전극 (34, 42)은 주름 (120)으로부터 제거될 수 있다.

[0065] b) 바늘-형 3개 전극 셋업

[0066] 3개 전극 셋업을 통해 치료를 실행하기 위해, 사용자는 먼저 환자를 얻어, 이들이 치료하고자 하는 조직 영역 (100)을 기록한다. 본원의 목적을 위해, 조직 영역 (100)은 상기에 상세히 기재된 바와 같이, 예를 들어 피부층 (104), 지방질 층 (108) 및 평활근 층 (112) 중 하나 이상을 갖는 피부 조직을 포함할 수 있다. 조직 영역 (100)이 선택되면, 사용자는 조직 영역 (100)의 일부분을 조작하고 그 안에 주름 (120)을 생성한다. 더 구체적으로, 사용자는 조직 영역 (110)을 조작하여 피부 층 (104), 지방질 층 (108) 및 평활근 층 (112)을 포함하는 조직의 주름 (120)을 생성한다. 골격 근육은 주름 (120)에 포함되지 않는다. 게다가, 조직의 수득한 주름 (120)은 제1 측면 (124), 제1 측면 (124)에 대향하는 제2 측면 (128), 및 제1 측면 (124)과 제2 측면 (128) 사이에서 연장되는 최상부 (132)를 포함한다. 주름 (120)은 또한 제1 측면 (124)과 제2 측면 (128) 사이의 거리로서 정의되는 주름 두께 (134)를 한정한다.

[0067] 주름 (120)을 준비한 상태에서, 사용자는 주사 장치 (26)를 수득하고 바늘 (86)을 제1 측면 (124) 및 제2 측면 (128)에 실질적으로 평행한 주름 (120)을 통해 길이 방향으로 삽입한다. 사용자는 그런 다음 조직 영역 (100)의 지방질 층 (108) 안으로 미리 측정된 용적의 제제를 주사하여 주사 부위 (116)를 생성한다. 일단 주사가 완료되면, 사용자는 조직 (100)으로부터 바늘 (86)을 제거하지 않는다.

[0068] 주사 부위 (116)가 생성되고 바늘 (86)이 여전히 조직 (100) 내에 위치된 상태에서, 사용자는 전극 거리 (50)가 주름 두께 (134)보다 약간 더 클 때까지 도포기 (22)의 프레임 (30) 또는 조정 기전 (56)을 조작한다. 사용자는 그런 다음 각각의 전극 (34, 42)이 주름 (120)의 대향하는 면 상에 배치되도록 도포기 (22)를 위치시킨다 (도 11-13 참고). 더 구체적으로, 사용자는 제1 플레이트 전극 (34)의 제1 접촉 표면 (38)이 주름 (120)의 제1 측면 (124)과 접촉하고 제2 플레이트 전극 (42)의 제2 접촉 표면 (46)이 주름 (120)의 제2 측면 (128)과 접촉하여 그 사이에 치료 구역 (136)을 생성하도록 도포기 (22)를 위치시킨다 (위에 기재됨; 도 11-13 참고).

[0069] 예시된 구현예가 전극 (34, 42)의 접촉 표면 (38, 46)이 주름 (120)과 직접 접촉하여 배치되는 것을 예시하고 있지만, 전도성 겔 (도시되지 않음) 또는 다른 물질이 전극 (34, 42)과 주름 (120) 사이의 전기적 통신을 개선하기 위해 이용될 수 있다고 이해된다.

[0070] 일단 전극 (34, 42)이 위치되면, 도포기 (22)의 센서 (74)는 전극 거리 (50)를 결정하고 이에 따라 전기천공 신호의 파라미터를 설정한다 (위에 기재됨). 신호 발생기 (18)는 또한 수득한 전류 및 전압이 전극 (34, 42) 또는 바늘 (86)에 의해 검출될 수 있고 후속으로 신호 발생기 (18)에 의해 사용되어 치료되는 조직의 임피던스를 계산하는 테스트 신호 (위에 기재됨)를 생성할 수 있다. 예시된 구현예에서, 전기천공 신호 (150)는 일련의 전기적 펄스 (154)로 이루어지며, 여기서 각각의 펄스 (154)는 사전 결정된 펄스 전압 (158)에 제공되고 사전 결정된 펄스 길이 (162)를 지속한다. 게다가, 각각의 개별 펄스 (154)는 펄스 지연 (166)에 의해 시간적으로 인접한 펄스 (154)로부터 분리된다. (도 26 참고). 예시된 구현예에서, 전기천공 신호는 대략 5 V 내지 대략 500 V 사이의 펄스 전압 (158)을 포함한다. 펄스 전압은, 예를 들어, 5V, 10V, 20V, 40V, 60V, 80V, 100V, 150V, 200V, 250V, 300V, 350V, 400V, 450V, 또는 500V일 수 있다. 게다가, 예시된 전기천공 펄스 길이 (162)는 대략 1 마이크로초와 대략 100 밀리초 사이이다. 한층 더, 전기천공 펄스 지연 (166)은 대략 10 밀리초와 대략 1 초 사이이다. 한층 더, 각각의 전기천공 신호는 대략 1 내지 대략 10 펄스 사이를 포함한다. 대안적인 구현예에서, 전기천공 신호 (150)의 파라미터는 상이한 제제에 대해 최적의 성능을 허용하도록 변경될 수 있다. 신호 파라미터는 사용되는 제제, 원하는 형질감염 및 조직 손상의 정도에 따라 조정될 수 있다. 예를 들어, DNA 백신은 일반적으로 더 높은 전압, 더 짧은 지연 및 더 긴 펄스를 필요로 하는 반면, dMAb 컨스트럭트는 일반적으로 더 낮은 전압, 더 짧은 펄스 기간 및 더 긴 펄스 간 지연을 필요로 한다

[0071] 전기천공 신호의 파라미터를 설정한 후, 장치 (10)의 신호 발생기 (18)는 바늘 (86)이 양극 또는 음극 중 하나로 작용하는 반면 제1 및 제2 전극 (34, 42)이 함께 양극 또는 음극 중 다른 전극으로 작용하도록 전기천공신호를 제1 전극 (34), 제2 전극 (42), 및 바늘 (86)로 송부한다. 전기천공 신호를 수신하면, 전극 (34, 42) 및 바늘 (86)은 그 내부에 전기장을 생성하는 주름 (120)에 신호를 전도한다 (도 12 및 13). 수득한 전기장은 바늘 (86) 주위 지방질 층 (108)에 집중되어 이로부터 방사상으로 강도가 감소한다. 전기장은 또한 매우 긴 타원체 형상으로 바늘에 따른 궤도로 되는 형질감염 영역을 형성한다. 게다가, 전류는 바늘 (86) 주변에서 가장 높다.

[0072] 전기천공이 완료된 후에, 전극 (34, 42) 및 바늘 (86)은 주름 (120)로부터 제거될 수 있다.

[0073] c) 3개 플레이트 셋업

[0074] 3개 플레이트 셋업으로 치료를 실행하기 위해, 사용자는 먼저 환자를 얻어, 이들이 치료하고자 하는 조직 영역 (100)을 기록한다. 본원의 목적을 위해, 조직 영역 (100)은 상기에 상세히 기재된 바와 같이, 예를 들어 피부

층 (104), 지방질 층 (108) 및 평활근 층 (112) 중 하나 이상을 갖는 피부 조직을 포함할 수 있다. 치료의 영역이 선택되면, 사용자는 주사 장치 (26)를 얻고 원위 말단 (90)이 지방질 층 (108) 내에 위치되도록 조직영역 (100) 안으로 바늘 (86)을 삽입한다. 사용자는 그런 다음 조직 영역 (108)의 지방질 층 (108) 안으로 사전-측정된 용적의 제제를 주사하여, 주사 부위 (116)를 생성한다. 일단 주사가 완료되면, 사용자는 조직 영역 (100)으로부터 바늘 (86)을 제거한다.

[0075] 바늘 (86)이 제거되면, 사용자는 주사 부위 (116)를 포함하는 조직 영역 (100)의 부분을 얻고 주사 부위 (116), 피부 층 (104), 지방질 층 (108) 및 평활근 층 (112)을 포함하는 주름 (120)을 생성한다. 골격 근육은 주름 (120)에 포함되지 않는다. 게다가, 조직의 수득한 주름 (120)은 제1 측면 (124), 제1 측면 (124)에 대향하는 제2 측면 (128), 및 주름 (120)의 제1 측면 (124)과 제2 측면 (128) 사이에서 연장되는 최상부 (132)를 포함한다. 주름 (120)은 또한 제1 측면 (124)과 제2 측면 (128) 사이의 거리로서 정의되는 주름 두께 (134)를 한정한다.

[0076] 주름 (120)을 준비한 후, 사용자는 전극 거리 (50')가 주름 두께 (134)보다 약간 더 클 때까지 도포기 (22')의 프레임 (30') 또는 조정 기전 (56')를 조작한다. 사용자는 그런 다음 도포기 (22')를 위치시켜 제1 플레이트 전극 (34')의 제1 접촉표면 (38')이 주름 (120)의 제1 측면 (124)과 접촉하고 제2 플레이트 전극 (42')의 제2 접촉 표면 (46')이 주름 (120)의 제2 측면 (128)과 접촉하여, 그 사이에 치료 구역 (136)을 생성한다 (위에 기재됨). 사용자는 또한 제3 플레이트 전극 (66')이 제1 및 제2 전극 (34', 42') 중 어느 하나와 직접적으로 접촉하지 않도록 제3 접촉 표면 (68')이 주름 (120)의 최상부 (132)와 접촉하고 일반적으로 제1 및 제2 전극 (34', 42') 사이에 배치되도록 제3 플레이트 전극 (66')을 위치시킨다 (도 14-16 참고).

[0077] 예시된 구현예가 전극 (34', 42', 66')의 접촉 표면 (38', 46', 68')이 주름 (120)과 직접 접촉하여 배치되는 것을 예시하지만, 커플링 또는 전도성 겔 (도시되지 않음) 또는 다른 물질이 전극 (34', 42', 66')과 주름 (120) 사이의 전기 통신을 개선시키기 위해 이용될 수 있다.

[0078] 일단 전극 (34', 42', 66')이 위치되면, 도포기 (22')의 센서 (74')는 제1 및 제2 전극 (34', 42') 사이의 전극 거리 (50)를 결정하고 그에 따라 전기천공 신호의 파라미터를 설정한다 (위에 기재됨). 신호 발생기 (18)는 수득한 전류 및 전압이 전극 (34', 42', 66')에 의해 검출될 수 있고 이어서 신호 발생기 (18)에 의해 사용되어 치료되는 조직의 임피던스를 계산하는 테스트 신호 (위에 기재됨)를 생산할 수 있다. 예시된 구현예에서, 전기천공 신호는 일련의 전기적 "펄스 (154)"로 구성되며, 여기서 각각의 펄스 (154)는 사전 결정된 펄스 전압 (158)으로 주어지고 사전 결정된 펄스 길이 (162)를 지속한다. 게다가, 각각의 개별 펄스 (154)는 펄스 지연 (166) (도 26 참고)에 의해 인접한 펄스 (154)에 의해 시간적으로 분리된다. 예시된 구현예에서, 전기천공 신호는 대략 5 V 내지 대략 500 V 사이의 펄스 전압 (158)을 포함한다. 게다가, 예시된 전기천공 펄스 길이 (162)는 대략 1 마이크로초와 대략 100 밀리초 사이이다. 한층 더, 전기천공 펄스 지연 (166)은 대략 10 밀리초와 대략 1 초 사이이다. 한층 더, 각각의 전기천공 신호는 대략 1 내지 대략 10 펄스 사이를 포함한다.

[0079] 전기천공 신호의 파라미터를 설정한 후, 장치 (10)는 제1 및 제2 전극 (34', 42')이 양극과 음극 중 하나로 작용하고 반면 제3 전극 (66')은 양극과 음극 중 다른 전극으로 작용하도록 제1, 제2, 및 제3 전극 (34', 42', 66')에 전기천공 신호를 인가한다. 전기천공 신호를 수신하면, 전극 (34', 42', 66')은 주름 (120)에 직렬식으로 신호를 전달하여 그 내부에 전기장을 생성한다 (도 15 및 16). 수득한 전기장은 제3 플레이트 전극 (66') 바로 아래에서 가장 강하고 조직 깊이가 증가함에 따라 강도가 감소한다. 게다가, 전류는 주입 부위에서 보다 낮은 전류를 유지하면서 피부 층 (104)에서 강하고, 강한 전기장 사이에서 바람직한 균형을 형성하는 지방질 층 (108)에서 훨씬 약하다. 이와 같은 전기장은 얕은 피하 지방에 DNA 주사에 일반적으로 최적이다.

[0080] 전기천공이 완료된 후에, 전극 (34', 42', 66')은 주름 (120)로부터 제거될 수 있다.

[0081] **IV) 실시예.**

[0082] 실시예 1. 실험적 결과. *생체내* 치료는 암컷 Hartley 기니아 피그의 피하 지방 패드에서 상기한 치료의 변형을 사용하여 수행하였다. 실험 동안, 사용자는 기니아 피그의 목 뒤쪽에 가까운 치료 부위 근처에서 모발을 면도시켰다. 나중에, 모발 제거 크림을 사용하여 치료 부위로부터 임의의 나머지 수염을 완전히 제거했다. 그런 다음 인슐린 주사기를 사용하여 치료 부위의 지방질 층 안으로 플라스미드를 주사하여 주사 부위를 형성했다. 주사 부위와 치료 부위의 피부 조직을 그런 다음 조작하여 임의의 골격 근육에서 피부, 지방질 및 평활근 층을 분리했다. 수득한 피부의 주름은 그런 다음 한 쌍의 플레이트 전극 사이에 배치시키고, 각각의 전극은 전도성 겔로 덮인 대응하는 접촉 표면을 갖는다. 마지막으로, 전기 펄스가 플레이트 전극에 보내졌고, 여기서 하나의 플레이

트 전극은 양극으로 작용하고 다른 플레이트 전극은 음극으로 작용했다. 치료가 완료된 후, 치료 부위에서의 조직의 샘플을 분석을 위해 취했다 (도 17-30 참고).

[0083] 염료 주입 연구는 주입물이 지방질 엽을 둘러싸는 콜라겐성 격막을 우선적으로 이동한다는 것을 실증하였으며, 이들 관찰은 GFP 형질감염 패턴과 일치했다. 코딩된 단백질의 부문을 입증하기 위해, 검출가능한 전신 수준의 단백질을 유도하는 단클론성 항체 (dMAb)를 코딩하는 DNA를 사용하여 지방질-표적화된 EP 치료를 수행하였다. 마지막으로, H1N1 핵 단백질을 인코딩하는 플라스미드의 지방질-표적화된 EP DNA 백신접종이 면역원성인 것으로 나타났다. 전통적 근육내 경로와 비교할 때, 지방질-표적화된 EP DNA 백신접종은 낮은 전압, 더 얕은 주입 및 사용되는 비침습성 전극에 기인하여 내성 이점을 제공할 수 있다.

[0084] 더 높은 배율에서, 수많은 형질감염된 지방세포로 인해 밝은 녹색에서 지방세포의 "벌집" 패턴 특징이 나타날 수 있다. 또한 지방세포 네트워크를 통해 이동하는 고형 녹색 선으로 밝은 녹색 교원성 격막이 나타났다. 도 18을 참조하면, 여기서 녹색의 형질감염된 영역은 플레이트 전극 사이에 고정된 조직의 용적에 상응한다. 지방 조직의 부문을 면밀히 살펴보면 많은 개별 지방세포가 나타났다. 지질 액적은 단백질을 발현하지 않기 때문에 각각의 세포의 내측은 밝게 빛나지 않는다. 오히려, 녹색 형광 단백질 (GFP)은 단백질 합성, 생산, 이동조절, 및 변형이 일어나는 각각의 세포의 가장자리 부근에서 발견된다 (도 17, 18, 19 참고).

[0085] 이 기술은 또한 토끼에서 (목의 기부에서의 피하 지방에서) 실증되었다. 도 20을 참조하면, 여기서 오일 레드 O 얼룩은 지질 액적을 강조할 뿐만 아니라 GFP의 녹색 고리는 형질감염된 세포를 둘러싼다. 핵은 청색으로 도시되어 있다.

[0086] 형질감염된 기니아 피그 지방 조직의 공초점 이미지는 단백질이 세포의 전체 경계 부근에서 생산되고 발현된다는 것을 보여준다. 지방세포를 둘러싸는 수많은 더 작은 세포는 GFP를 발현하지 않으며, 이는 지방세포에 대한 특이성의 정도와 일치한다 (도 21 참고).

[0087] 주입 용량은 형질감염된 영역의 크기에 영향을 주지 않으면서 약 200 μl에서 50 μl로 감소될 수 있다 (도 22 참고). 단일 EP가 이어지는 다중 주사는 형질감염된 세포의 수를 증가시키는 하나의 방법일 수 있다 (도 23 참고). 전압을 낮추고 펄스 수를 증가시키면 GFP 신호를 개선할 수 있어, 가능하게는 더 많은 형질감염된 세포를 나타낼 수 있다. 80V 치료는 200V 치료에 비해 현저하게 약한 근육 경련을 야기했다 (도 24 참고). dMAb는 지방질 안으로의 제2 치료에 이어 기니아 피그에서 약 1000 ng/mL의 피크 수준으로 생성되었다제1 치료는 비-최적화된 파라미터를 사용하여 수행되었다 (도 25 참고).

[0088] 빠른 펄스를 받는 기니아 피그는 1초의 더 긴 펄스간 지연을 갖는 펄스를 받는 기니아 피그보다 더 많은 dMAb를 생산하였다 (도 26 참고). 분사 주입은 조직 전체에 걸쳐 DNA를 보다 균일하게 분포시키고 더 많은 세포를 형질감염시키는 것으로 나타났다. 도 27을 참고한다. 조직의 효소적 분해는 조직 전체에 걸쳐 유체 분포를 개선시켰다 (도 28 참고). 펄스의 수가 증가함에 따라, 전기 저항은 감소한다. 25V에서, 전류는 본질적으로 검출 불가능하였다 (도 30 참고). 100V에서, 근육 경련은 전기 판독 값에서의 변동을 야기하기에 충분히 강렬했다 (도 29 참고).

[0089] 실시예 2. 면역원성. *생체내* 치료는 5개 실험 그룹에 제공되었으며, 이들 모두는 동일한 용량의 DNA를 받았다. 실험을 위해, 하나의 그룹에는 진피내 EP가 제공되어 양성 대조군으로 작용했다. 나머지 4개 그룹은 높은 또는 낮은 전압 및 높은 또는 낮은 주입 용량의 다양한 조합을 사용하여 조직의 지방질 층에서 치료되었다. 4개 지방질 그룹에 대한 펄스 전압은 대략 50V 내지 대략 200V 사이에서 변화하는 반면, 주입 파라미터는 단일 부위에서 대략 100 마이크로리터에서 각각의 부위인 50 마이크로리터의 5회 주사 사이로 변화하였다. 각각의 주사에 대해, 플라스미드를 희석하여 전체적인 DNA 용량을 변경하지 않고 용적을 증가시켰다.

[0090] 도 31에 예시된 바와 같이, 고전압 및 높은 주입 용량으로 치료된 지방질 그룹은 진피내 치료된 그룹을 포함하여 임의의 다른 그룹보다 강력하고 보다 신속한 체액성 면역 반응 (즉, 종점 역가)을 가졌다. 이 반응의 강도는 6주 동안 계속 증가했다. 저전압 치료 둘 모두 (즉, 높은 및 낮은 용적으로)는 3주 후에 거의 반응을 나타내지 않았고 6주 후에는 반응이 약하거나 전혀 반응하지 않았다.

[0091] DNA 주사의 용적 및 EP의 전압 둘 모두는 지방 조직에서 면역 반응에 영향을 미치는 것으로 보인다. 조직 내로 주사되는 제제의 용적이 클수록 세포와 제제 간의 접촉이 증가된다. 증가된 용적은 지방 조직 안으로 수-제형화된 DNA의 투여와 관련된 문제를 해결할 수 있다. 또한, EP 전압이 높을수록 EP를 받을 수 있는 세포가 많아진다. 게다가, 더 높은 전압의 결과로 임의의 조직 손상은 면역 반응 및 관련된 세포의 유도에 도움이 될 수 있다.

[0092] 실시예 3. 실시예 4-9에 대한 물질 및 방법. 다른 EP 양식을 시뮬레이션하기 위해, SolidWorks 2013 (SolidWorks Corp., 미국 매사추세츠주 콩코드 소재)에서 3D CAD 어셈블리로 2개의 조직 모델을 생성했다. 양 모델은 3개의 전기적으로 등방성 층인: 피부, 지방질, 및 근육으로 구성되었다. 50V 정도의 낮은 전압으로 마이크로초 내에 각질층을 침투할 수 있기 때문에 각질층은 이들 모델에 포함되지 않았고, 따라서 총 조직 저항에 대한 그것의 영향은 무시할만하다. 각질층의 두께는 20㎛ 정도이며 매우 얇은 층은 유한 원소 분석에서 인공물을 유발할 수 있다. 플레이트 전극 사이에 고정된 조직을 모델링하기 위해, 접힌 조직 기하학을 만들고 400 cm^2으로 측정된 접촉 부위를 갖는 2개의 정사각형 플레이트 전극 기하학적구조를 접힘의 반대측 상에 배치했다 (도 32). 동일한 조직 내에서 관통 바늘 전극을 모델링하기 위해, 평평한 조직기하구조가 만들어졌고 2개의 19mm, 22-게이지 바늘 기하학적 구조가 전극간 간격 10mm 및 침투 깊이 18mm로 조직 안으로 배치되었다 (도 33).

[0093] 2개의 조직-전극 어셈블리는 유한 원소 해석을 위해 ANSYS Maxwell 2015.2 (ANSYS Software, 미국 펜실바니아주 캐논스버그 소재)로 수출되었다. 각각의 조직 유형에 대한 전기 전도도 값은 문헌 값을 기준으로 했으며 일정한 것으로 추정되었다. 모델에서 사용된 전도도 값과 일반적인 조직 치수는 표 1에 열거되어 있다. 하나의 전극에 여기 전압을 인가하는 반면 반대 전극에 제로의 전압을 할당하고 x-y 분석 평면에서 전극을 이등분하는 단면을 만들어 전기장 강도를 시각화했다.

[0094] 표 1

물질	전도도, S/m	두께 (주름), mm*	두께 (평평함), mm
피부	0.25	1	1
지방	0.05	10	5
근육	0.3	1	35
스텐레스 강	$1.1x10^6$	N/A	N/A

[0095] *두께는 전극을 이등분한 평면에서 측정된다*

[0096] 동물. 모든 동물 연구는 동물실험 윤리 위원회에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행되었다. 암컷 Hartley 기니아 피그를 모든 생체내 연구에 사용했다. 동물은 흡입된 이소플루란에 의한 전신 마취 하에 유지하면서 치료 및 채혈을 수행했다. 피하 주사는 척추에 평행하게 배향된 29-게이지 인슐린 바늘을 사용하여 견갑골 사이의 피하 지방 패드 (목의 뒷덜미에 위치됨) 안으로 수행했다. 말기 연구를 위해, 기니아 피그를 먼저 전신 마취 하에 놓은 다음, 펜토바르비탈의 심장내 주사에 의해 인도적으로 안락사시켰다.

[0097] 플라스미드. 유전자 발현 연구는 녹색 형광 단백질 (GFP)을 인코딩하는 플라스미드 DNA를 이용했다. 면역 연구는 인플루엔자 A (H1N1, A/Puerto Rico/ 8)의 전장 핵 단백질 (NP)을 인코딩하는 플라스미드 DNA를 사용하여 수행되었다. 모든 플라스미드 제형을 최종 완충액 농도가 1X가 되도록 염수 나트륨 시트레이트 완충액에서 제조하였다.

[0098] 염료 주입 연구. 메틸렌 블루 (Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)를 0.5 mg/mL의 농도로 탈이온수에 용해시켰다. 단일-부위 주사의 경우, 기니아 피그에 100 μL의 메틸렌 블루 용액을 피하로 주사하였다. 다중-부위 주사의 경우, 대략 5 mm 이격된 간격으로 5회의 별개의 50 μL 피하 주사를 수행했다. 주사 후, 전체 지방 패드를 2개의 플레이트 전극 사이에 단단히 붙잡아 전체 치료 프로토콜을 시뮬레이션했다. 동물을 즉시 안락사시키고 지방 패드를 그대로 이미지화하고, 그 다음 시상 면을 따라 해부하고 조직 내의 염료 분포를 시각화하기 위해 다시 이미지화하였다.

[0099] 일반적인 지방질-EP 치료 절차. 치료 부위를 면도하고 세척된 지방질-EP 치료를 견갑골 사이의 영역 내 피하 지방 패드에서 수행하는 반면, 피부 치료는 옆구리에서 수행하였다. 지방질 치료를 위해, 지방 패드를 분리하기 위해 조직을 두 손가락 사이에 끼우고 척추에 평행하게 배향된 29-게이지 인슐린 바늘을 사용하여 DNA를 주사했다. DNA 주사 직후, 대향하는 캘리퍼스 턱에 부착된 2개의 플레이트 전극을 전도성 겔로 코팅하고 그 다음 주사 부위를 둘러싼 조직을 끼우는 데 사용하고 Elgen 1000 제어장치 (Inovio Pharmaceuticals, 캘리포니아주 샌디에고 소재)를 사용하여 펄스를 투여했다. ID-EP 치료를 위해, DNA를 진피내로 주사하였고 즉시 바늘 전극의 4x4 어레이로 구성된 표면 전기천공 (SEP) 장치를 사용하여 전기천공하였다.

[0100] 총 이미지형성 및 조직학적 분석. 녹색 형광 단백질 (GFP) 연구를 위해, 지방질-EP는 GFP 플라스미드로 수행하고 손상되지 않은 지방 패드는 사전 결정된 시점에서 제거하고 FluorChem R 이미지 형성 시스템 (ProteinSimple, 미국 캘리포니아주 산호세 소재)을 사용하여 이미지화되었다. 지방 패드는 그런 다음

냉동되고, 대략 10mm x 10mm로 측정되는 샘플을 지방 패드의 형질감염된 영역에서 절단하고 형질감염의 깊이를 관찰하기 위하여 가로 단면을 따라 또는 형질감염된 세포의 수평 분포를 관찰하기 위해 관상면을 따라 30 마이크론의 두께로 냉동절단했다. 일부 절편을 4% 포르말린에 고정시키고, 자일렌에서 세척하고, DAPI 또는 Hoechst 3342 (Life Technologies, 캘리포니아주 칼스배드 소재)로 염색하고, Fluoromount (eBioscience, 캘리포니아주 샌디에고 소재)를 사용하여 커버글라스로 덮었다. 다른 절편은 포르말린에 고정시키고, 자일렌에서 세척하고, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로 염색하고 Permount (VWR, 미국 펜실바니아주 라드나 소재)를 사용하여 커버글라스로 덮었다. H&E 염색된 절편은 MicroPublisher 3.3 카메라 (Qlmaging, 캐나다 브리티시컬럼비아주 써리 소재)가 구비된 Olympus BX51 현미경 (Olympus, 펜실바니아주 센터 밸리 소재)을 사용하여 명시야에서 이미지화되었다. 형광 이미지는 Retiga 3000 카메라 (Qlmaging, 캐나다 브리티시컬럼비아주 써리 소재)로 포착되었다. 공초점 이미지는 Zeiss LSM 780 레이저 스캐닝 공초점 현미경 (Carl Zeiss, 독일 제나 소재)을 사용하여 전체 조직의 고해상도 다중-패널되고 자동-스티칭된 z-스택으로 수득하고 이미지를 Zen 2012 (Carl Zeiss) 및 IMARIS 소프트웨어 (Bitplane, 영국 벨파스트 소재)를 사용하여 추가로 가공했다

[0101] GFP 발현 및 세포 동력학. 지방질-EP는 100 μg의 GFP에 대해 인코딩하는 플라스미드 및 200V, 3 펄스, 100ms 기간, 및 100ms 펄스 간 지연의 EP 파라미터를 사용하여 14마리 기니아 피그 상에서 수행되었다. 대조군으로서, 2마리의 기니아 피그는 EP로 처리되었으나 플라스미드 주사를 받지 않았고, 2마리의 추가의 기니아 피그는 플라스미드 주사를 받았지만 EP로 처리하지는 않았다. 대조군을 처리 3일 후 희생시키고, 치료된 기니아 피그는 치료 후 3시간 내지 14일까지의 간격 (n=2)으로 뿐만 아니라 60일째의 장기간 추적관찰로 희생시켰다. 지방 패드는 GFP 발현을 위해 온전하게 이미지화되었고, 그 다음 절단되어 H&E로 염색되어 치료 부위에서 세포 침윤의 징후를 시각화했다.

[0102] 면역원성 연구. 기니아 피그를 25 μg의 NP DNA로 처리하였고 4 그룹의 기니아 피그 (n=4)는 상기한 바와 같이 지방질 EP 처리를 받았고, 그리고 각각의 그룹은 단일 100 μL DNA 주사 또는 5회 별개의 50 μL 주사 중 하나를 받았고, 이어서 200 msec의 펄스 간 지연을 갖는 3개의 100 msec 방형 파 펄스로 구성된 단일 EP 처리를 받았다. SEP 장치 (n=3)로 ID-EP를 통해 백신접종된 기니아 피그는 이 방법이 피하 지방 세포가 아니라 표피 세포를 형질감염시키는 것으로 이전에 나타났기 때문에 이 연구에 대한 비교자 그룹으로 사용되었다. 지방질-EP 그룹은 아래와 같다: 1 주사부위로 고전압 EP (HV-1), 5 주사부위로 고전압 EP (HV-5), 1 주사부위로 저전압 EP (LV-1), 및 5 주사부위로 저전압 EP (LV-5). 5 주사를 받는 기니아 피그의 경우, 최종 주사 직후에 단일 EP 절차가 수행되었다. 플라스미드 DNA의 총 용량은 모든 그룹에 대해서 동일하였다. 연구 설계는 표 2에 예시되어 있다. 연구 기간 동안 매 3 주마다 300 μL의 혈액을 수집하고 분석할 때까지 혈장을 -20℃에서 저장했다. 처리는 채혈 직후, 연구의 0 주, 3 주 및 6 주에 투여되었다. 연구 21주째에 모든 동물은 활성화되고 18일 후에 혈액 3 mL를 수집하고 말초 혈액 단핵 세포를 ELISpot 분석을 위해 분리했다.

[0103] 표 2

그룹	n	치료 부위	주사	전압, V	총 부피, μL	총 DNA 용량, μg
HV-1	4	지방	1	200	100	25
LV-1	4	지방	1	50	100	25
LV-5	4	지방	5	50	250	25
HV-5	4	지방	5	200	250	25
ID-EP	3	피부	1	25	50	25

[0104]

[0105] 백신 접종된 기니아 피그로부터의 ELISA 혈청은 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)을 사용하여 분석되었다. ELISA는 둘베코 포스페이트 완충 식염수 (PBS) (VWR)에서 0.3 μg/mL pNP 항원 (Sino Biological, 중국 베이징 소재)의 100 μL/웰로 밤새 코팅한 96-웰 플레이트 (Thermo Fisher Scientific, 미국 매사추세츠주 월샘 소재)를 사용하여 수행하였다. 플레이트를 세정하고, 3% 소과혈청 알부민 (BSA) (Sigma-Aldrich) 및 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich)을 함유하는 PBS로 150μL/웰에서 37℃에서 1시간 동안 차단한 다음 다시 세정하였다. 혈청은 100 μL/웰로 1% BSA와 0.05% Tween-20 (샘플 희석 완충액)을 함유한 PBS 내에 1:50 내지 1:2952450으로 연속적으로 희석되고 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션되었다. 플레이트는 그런 다음 세정되고, 홀스래디쉬 페록시다아제-접합된 염소 항-기니아 피그 IgG (Sigma-Aldrich)는 샘플 희석 완충액으로 1:10000으로 희석되고 그리고 37℃에서 1시간 동안 100 μ1/웰로 각 웰에 첨가되었다. 플레이트는 세정되고 그리고 테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질액 (VWR)이 100 μL/웰로 각 웰에 첨가되고 그리고 색상 전개는 6분 후 TMB 정지 시약 용액 (VWR)으로 중단되었다. 각각의 웰에서 450 nm에서의 흡광도 값은 SpectraMax PLUS 384 플레이트 리더 (Molecular Devices, 미국 캘리포니아주 서니베일 소재)를 사용하여 측정되었고, 문헌 [Frey, at al.]에 의해

기재된 바와 같이 양성 역가에 대한 컷오프가 계산되었고, 여기서 음성 대조군의 평균 흡광도 및 표준 편차 (이 경우, 사전-채혈된 샘플)를 사용하여 컷오프 흡광도 값을 계산하였다. 종점 역가는 제시된 모든 ELISA 결과에 사용되었다.

[0106] ELIS pot. 백신 접종된 기니아 피그를 면역 연구의 21주째에 활성화시키고 18일 후에 EDTA 튜브에 3mL의 말초 혈액을 취하고 수집하여 이전에 인-하우스에서 개발한 방법을 사용하여 인터페론 감마 (IFN-γ) ELISpot를 수행했다. 혈액을 HBSS로 1:1로 희석하고 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Biosciences, 미국 펜실바니아주 피츠버그 소재)를 통해 원심분리하였다. 버피 코트를 수확하고 R10 배지에서 1x106 생존 세포/mL의 농도로 재현탁하고, 5 μg/mL 일차 항-IFN-γ 항체 (V-E4)로 밤새 코팅되고 10% (w/v) 수크로스 및 2% (w/v) BSA를 함유하는 1X PBS로 3중으로 차단된 96-웰 밀리포어 IP 플레이트 상에 1x105 세포/웰의 밀도로 도말하였고, PBMC는 콘카나발린 A (ConA), 또는 면역자극성인 것으로 이전에 밝혀진 3가지 상이한 NP 항원 펩타이드 풀 중 하나로 18시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 제거하기 위한 세척 후, 0.2 μg의 바이오티닐화된 이차 항-IFN-γ 항체 (N-G3)를 각 웰에 첨가하고 2시간 동안 인큐베이션하였다. 웰들을 그런 다음 세정하고 100 μL의 BCIP/NBT 검출 시약 기질을 각 웰에 15분 동안 첨가하였다. 플레이트를 CTL-Immunospot S6 ELISPOT 플레이트 리더를 사용하여 이미지화하고, CTL-Immunospot 소프트웨어를 사용하여 가공하고 점을 계수했다. 각각의 동물에 대해, 점 계수는 자극되지 않은 세포의 계수를 빼서 정규화했다.

[0107] 통계적인 방법. 지방질-EP 처리된 그룹의 ELISA 역가 데이터를 비교하기 위해, EP 전압, 주사 부위의 수, 및 치료 주를 인자로 사용하여 모든 수집된 시점에 걸친 로그 변환 역가 데이터에 대해 반복된 측정 인수 ANOVA를 수행하였다. 모든 처리 간의 ELISA 역가 데이터의 비교를 위해, 데이터를 시점별로 계층화하고 그 다음 처리 그룹을 인자로 사용하여 로그-변환 데이터에 대해 원-웨이 ANOVA를 수행하였고, 쌍별 비교는 F-테스트가 중요할 때 Tukey 사후-검정 시험을 사용하여 수행되었다. 유형 II 오류는 최소화되었고 이 경우에 다중 비교에 대한 정정이 없었다. ELISpot 데이터는 EP 전압 및 치료 부위의 수를 인자로 하여 인수 ANOVA를 사용하여 지방질-EP 처리된 그룹에서 먼저 분석되었다. 원-웨이 ANOVA를 수행하여 ID-EP를 포함한 모든 처리 그룹에 대한 ELISA 데이터를 비교하였다. 유의성에 대한 컷오프는 $p<0.05$로 정의되었고 유의하지 않은 추세와 차이의 모든 관찰에는 p-값이 동반되었다.

[0108] 실시예 4. 유한 요소 분석 및 파라미터 최적화. EP 관점에서 지방 조직의 전기적 특성을 이해하기 위해, 유한 요소 분석이 수행되었다. 이것은 도 32에 예시된 전극 디자인을 사용하여 지방 조직에서 EP에 적절한 전압 범위를 정의하는 관심 있는 각각의 조직 유형 (이 경우, 피부, 근육 및 지방질) 내의 예상된 전기장 분포의 정량화를 가능하게 한다. x-y 평면에서의 유한 요소 분석은 표준 바늘 전극이 피부, 지방질 및 근육을 통해 동등하게 강력한 전기장 구배를 분포시켰음을 나타내지만 (도 34, 상부), 반면에 플레이트 전극은 거의 전적으로 지방 조직 내에서만 보다 균일한 전기장을 생성한다 (도 34, 하부). 바늘 전극은 350 V/cm보다 더 높은 전기장 강도를 각각의 조직의 12-14%에 제공할 것으로 예상되는 반면, 조직의 대략 절반은 150 V/cm 이하의 전기장 강도를 받는다. 플레이트 전극은 처리된 지방 조직의 95%에서 150 V/cm와 350 V/cm 사이의 전기장을 생성하는 것으로 예상되었고, 근육은 100 V/cm 이상의 전기장을 받지 못했다. 이들 모의실험에서, 플레이트 전극은 피부의 87%에서 150 V/cm 이하의 전기장을 생성했다.

[0109] 유한 요소 분석은 비-침습성 플레이트 전극이 전기장을 지방 조직에 활동적으로 집중시켜 이들이 침투하는 각각의 조직에 동일한 전기장을 무차별적으로 제공하는 바늘 전극에 반대로 작용한다는 것을 제안했다. 추가로, 플레이트 전극에 의해 생성된 전기장은 바늘 전극에 비해 더욱 균일하다.

[0110] 유한 요소 모델은 각각의 조직 유형에 대해 일정한 전기 전도도를 추정했다. 최근의 증거는 전도도는 사실상 전기장 강도의 함수이며 따라서 EP 동안 동적으로 변화한다는 것을 시사한다. 그러나, 이들 동적 모델은 단지 피부, 근육 및 종양 조직에서만 입증되었으므로 일정한 전도도가 선택되어 전기장 분포를 과대 평가할 수 있는 임의의 가정을 회피한다. 또한, 전극 바로 아래에 위치하며 근육 아래로 전류 흐름을 제한하는 집혀지지 않은 지방층은 1mm의 두께로 압축되었다는 것이 추정되었다. 이 가정은 지방 조직의 단열 용량을 과대 평가하는 것을 피하기 위해 만들어졌지만, 실제로는 하부 지방은 전극이 원위치에 단단히 고정되어 있어도 훨씬 더 두꺼울 수 있다. 모의실험의 결과는 "최악 경우" 시나리오로 간주될 수 있으며 지방에서 동적 전도도 모델의 검증은 지방 전체에 걸쳐서 예상된 전기장 강도를 증가시킬 것이다.

[0111] 플레이트 전극은 지방 조직 전체에 걸쳐 우월한 계산된 전기장 분포, 다른 조직 유형에서 전기장의 최소화 및 장치의 비침습적 특성에 기반한 후속적인 실험을 위해 선택되었다. 플레이트 전극의 최적화된 원형은 임상적으로 쉽게 적용될 수 있으며 이 유한 요소 분석에서 생성된 데이터는 인간에서의 보다 조밀하고 더 두꺼운 지방질

영역으로 외삽될 수 있다.

[0112] 실시예 5. 염료 주입 연구. 볼러스 IM 또는 ID 주사의 유체 역학 특성은 잘 특성규명되어 있지만 생체내 피하 지방 내의 유체 분포는 덜 명확하다. 추가로, 플레이트 전극 사이의 주사 부위를 압축하는 것이 유체 분산에 대해 미칠 수 있는 물리적 효과는 알려지지 않았다. 이들 역학은 염료 주입 연구에 의해 조사되었으며, 이는 지방 내의 주입된 유체의 분포를 가시화할 수 있도록 수행되었다. 주사 및 캘리퍼스 사이를 압착한 후, 염료는 손상되지 않은 지방 패드 내에서 연신된 볼러스 형상으로 관찰 가능하였다 (도 35, 상부 좌측). 지방을 해부한 후, 염료는 지방질 엽을 분할하는 교원성 격막 내에 주로 유지되는 것으로 나타났다 (도 35, 상부 우측). 청색 얼룩은 지방 패드 내에 유지되었고, 피부 위에나 근육 아래에는 얼룩이 거의 존재하지 않았다. 염료는 전극 사이에 압착된 후에 조직 전체에 걸쳐 이동하지 않는 것처럼 보이기 때문에, 지방 조직 전체에 걸쳐 DNA의 분포를 증가시키는 목적으로 다중 주사 부위로 동일한 염료 분석이 수행되었다. 5회 별개의 50 μL 염료 주입이 수행되고 그 다음 전극 플레이트 사이에 고정될 때, 5회 개별 염료 부위가 가시적으로 되더라도 일부는 그 외에서 보다 두드러졌다 (도 35, 하부). 해부되었을 때, 각각의 개별 주사 부위는 지방 조직 내에 유사한 염료 분포를 가지고 있었고, 교원성 격막을 따라 염료가 집중되었다.

[0113] 염료 연구는 일부 주입물이 진피와 접촉하지만 지방 패드 외부에서는 유전자 발현이 관측되지 않았다는 것을 제안했다. 이 관찰은 유한 요소 분석과 일치하며, 이는 형질감염을 일으키는 충분한 강도의 전기장이 거의 독점적으로 지방 조직에서 생성된다는 것을 시사한다. 다중 주사가 수행된 경우, 일부 부위는 그 외의 부위보다 두드러졌으며, 이는 플레이트 전극 사이에서 이들이 압착될 때 병합되는 인근 주입 부위로 인한 것일 수 있다. 가장 강한 염료 염색은 지방질 엽을 분할하는 콜라겐 격막을 따라 발생했으며, 사실상 많은 형질감염된 지방세포가 이들 격막 주위에 운집되었다. 아마도 전류와 DNA 용액은 주로 이들 교원성 격막을 통해 이동하며, DNA 용액이 이들 채널을 빠져나와 EP 이전에 인접한 지방세포와 접촉하는 경우 지방질 형질감염이 일어날 것이다.

[0114] 세포 수준에서는, 주사 부위에서 그것의 큰 크기, 각각의 세포의 중심을 차지하는 불활성 지질 액적에 의해 야기된 특징적인 구상 형상 및 고유의 "고리-형상화된" 유전자 발현 패턴에 의해 쉽게 구별할 수 있는, 충분한 수의 형질감염된 지방세포가 있었다. 지방 세포 사이 공간을 차지하는 수많은 다른 세포 유형에도 불구하고 GFP는 지방 세포 주위에서만 발현되었기 때문에 치료는 지방 세포에 대해 매우 선택적으로 보였다. 이것은 EP가 보다 낮은 전기장 강도에서 더 큰 세포를 우선적으로 형질감염시키는 경향이 있기 때문일 수 있다. 지방세포는 매우 큰 직경 (50-100 μm)의 구형 세포이며, 그것의 형상과 직경은 다른 더 작은 세포 유형보다 EP에 더 민감하게 할 가능성이 있다. 지방조직은 또한 수많은 면역 세포, 내피 세포, 줄기 세포 및 섬유모세포를 가지고 있고, 따라서 이들 다른 세포 유형의 명백한 광범위한 형질감염은 없었다는 것은 어느 정도 놀라운 것이었다.

[0115] 실시예 6. 지방세포의 *생체내* 형질감염. 지방 조직에서 리포터 컨스트럭트의 *생체내에 대한* 발현을 평가하기 위해, GFP를 인코딩하는 플라스미드를 기니아 피그 지방 패드 안으로 주입하고, 실시예 3의 일반적인 지방질-EP 처리 절차 부문에 기재된 바와 같은 비침습성 플레이트 전극을 사용하여 50V 내지 200V 범위의 전압으로 전기천공하였다. 치료 부위 및 EP 클램핑 절차는 도 36에 도시되어 있다. 이들 치료를 수행한 3일 후, 손상되지 않은 지방 패드를 제거하고 총 조직 수준에서 이미지화하였다. GFP는 길이가 대략 5-10㎜이고 횡으로 1-2㎜인 피하 지방 패드 내의 주사 부위에서 독점적으로 발현되었으며, 시험된 EP 전압 사이의 신호 영역이나 강도에서 가시적인 차이가 없었다 (도 37, 상부). 지방질-EP가 없는 플라스미드 주사를 받은 동물에서는 GFP 발현이 검출되지 않았다. 현미경적 세포 수준에서, 지방 세포는 세포 용적의 중심을 차지하는 지질 액적으로 인해 그것의 큰 직경 (50-100 μm) 및 특징적인 구상 형상에 의해 구별되었다 (도 37, 하부). 지방질-EP를 받은 기니아 피그의 지방 패드는 그것의 날카로운 형광 윤곽에 의해 쉽게 구별할 수 있는 수많은 GFP-발현 지방세포를 보유하고 있었다. 지방세포 사이의 세포외 공간에 위치한 강한, 확산 자가형광의 영역이 있었고 콜라겐 격막도 또한 두드러지게 형광성이었다. 지방질-EP 없이 플라스미드 DNA를 받은 기니아 피그에서 검출가능한 GFP-발현 지방세포 또는 높은 자가형광의 영역이 없었고 콜라겐 격막은 눈에 띄지만 덜 두드러졌다. 지방 패드의 깊이를 통한 리포터 컨스트럭트의 분포를 시각화하기 위해 추가의 조직학적 분석을 수행하였다. 가장 강력하고 가장 풍부한 GFP 신호는 지방질 엽을 분할하는 교원성 격막에 인접한 지방세포에 국한되었다 (도 38). GFP는 위에 있는 피부 층에서 검출 가능하지 않았다. 유전자 발현은 지방 안으로 수 밀리미터 깊이까지 검출가능했으며 일반적으로 염료 주입 연구에서 관측된 유체 분산과 일치하였다. 고해상도 공초점 이미지는 GFP가 각각의 형질감염된 지방세포를 둘러싸는 독특한 점상 방식으로 발현된다는 것을 나타내었다 (도 39). GFP 발현은, 지방질 내의 더 작은 이차 세포 모집단을 나타내는, 지방세포를 둘러싸고 그 사이에 있는 수많은 핵과 관련이 없었다. 이 모집단은 지방전구세포, 섬유모세포, 및 내피세포를 포함한다.

[0116] 실시예 7. 유전자 발현 동력학 및 조직학적 분석. 지방 세포 모집단에서의 리포터 컨스트럭트 발현의 동력학을

조사하기 위해, 비침습성 플레이트 전극으로 200V 지방질-EP 후 정해진 시점에서 처리된 지방 패드 샘플을 제거하고, 절단하고 분석하는 시간 경과 연구가 착수되었다. 유전자 발현은 지방질-EP 치료 후 24시간 만에 측정할 수 있었으며 발현은 모니터링된 60일 전체에 걸쳐 지속되었다 (도 40, 상부). 처음 7일 동안 GFP 형광의 강도 또는 분포에서 명확한 정성적 차이는 없었다. 신호는 14일에 시작되어 더 확산되었고, 60일에 더 약하고 더 확산되었다. GFP 발현의 각각의 구별되는 부위는 직경 10㎜의 정도에 있었다. 지방질-EP에 따른 지방질 절편의 H&E 염색을 통해 관찰될 때 조직학적 변화는 3일에 시작하여 현저하였으며, 14일까지 계속되었고 대부분 60일까지 해소되는 것으로 나타났다 (도 40, 하부). 치료 후 3시간 또는 24시간에 조직 생리학에서 검출가능한 차이가 관측되지 않았다. 이들 초기 시점에서, 지방세포는 명확하였고, 지질 축적 액적은 자일렌 제거로 인해 비어있는 공동으로 확인가능하였고, 교원성 격막은 더 어두운 에오신 염색 및 수 많은 핵으로 인해 가시적이었다. 3일째에서 시작하여 60일간의 관찰 기간을 지속하여, 침윤하는 세포에서 다수의 핵의 가시화에 기인한 것으로 보이는, 치료 부위의 교원성 격막이 현저히 더욱 두드러졌다. 교원성 격막이 더 두드러진 영역에서, 지방 세포 주위의 세포외 공간에도 더 많은 수의 세포가 생겨났다. 이들 조직학적 변화는 치료 후 3일에서 7일 사이에 가장 두드러졌으며, 60일째에 세포외 공간 안으로의 침윤은 경미하였으며 교원성 격막 내의 세포 밀도는 여전히 상승했지만 덜 확연하였다.

[0117] 지방조직은 단일 지방질-EP 치료 후 신속하고 지속적인 유전자 발현이 가능한 것으로 나타났다. 치료 후 24시간 만에 유전자 발현이 강력함에도 불구하고 치료 후 3일까지 세포 침윤의 조직학적 징후는 없었다. 그러나, 이들 동력학은 GFP보다는 매우 면역원성 항원에 대해 다를 수 있다. 지방질-EP는 주로 지방세포를 형질감염한 것으로 나타나, 면역원성이 우세하게 지방세포에 의해 생성된 항원에 기인함을 시사한다. 작은 수의 지방세포 (20-60 세포)가 대략 0.065 cm^2 접촉 표면적을 갖는 겸자 전극을 사용하여 수술로 노출된 지방 조직에 EP를 직접적으로 적용함에 의해 선택적으로 생체내 형질감염될 수 있다. 여기서, 비침습성 EP 기술을 사용하여 표면적이 대략 100배인 플레이트 전극을 사용하여 다수의 지방세포를 형질감염시킨다.

[0118] 실시예 8. 체액성 면역원성. DNA 백신접종을 위한 표적 조직으로서의 지방 조직의 적용 가능성 및 면역 반응이 유도될 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 비교로서 지방질-EP 또는 ID-EP를 사용하여 인플루엔자 핵단백질 (PR8) 항원을 발현하는 작제물로 기니아 피그를 면역화시키고, 그리고 ELISA를 사용하여 결합 역가를 측정하였다 지방질-EP 실험 그룹은 1 주사 부위로 고전압 EP (HV-1), 5 주사 부위로 고전압 EP (HV-5), 1 주사 부위로 저전압 EP (LV-1), 및 5 주사 부위로 저전압 EP (LV-5)를 포함했다. 모든 기니아 피그는 동일한 총 DNA 용량을 받았다. HV 지방질-EP와 ID-EP는 유사한 항체 반응 동력학을 초래했지만, LV 지방질-EP 치료는 HV 지방질-EP 또는 ID-EP에 비교하여 아주 가변성이고 일반적으로 보다 낮은 항체 반응을 초래했다 (도 41). 4개의 다른 지방질-EP 치료 간의 역가 차이는 반복된 측정 인수 ANOVA를 사용하여 평가되었다 역가에 대한 전압 ($p = 0.0062$)와 시점 ($p = 0.0065$)의 주요 효과는 있었지만, 주사 부위의 수는 그렇지 않았다 ($p = 0.16$). 다중 주사 부위가 체액성 면역의 더 빠른 개시를 제공하는 것으로 나타났지만, 주사 부위 수와 시간 사이의 상호작용은 유의하지 않았다 ($p = 0.13$). 간단한 주요 효과 분석은 HV와 L V 지방질-EP 치료 사이의 역가 차이는 6주 이후로 상당하였다는 것을 드러냈다 ($0.0056 < p < 0.039$). 임의의 시점에서 HV 지방질-EP와 ID-EP 사이에 역가에서의 차이가 없었고 ($0.31 < p < 0.79$), ID-EP는 모든 시점에서 LV 지방질-EP보다 일반적으로 더 높은 역가를 제공했다 ($0.075 < p < 0.12$). ID-EP와 LV 지방질-EP 사이의 유의차의 결여는 잠재적으로 이 탐색적 연구에서 ID-EP에 대한 반복의 수에 기인한다 (n=3). 강력한 체액성 반응을 유도하기 위해, DNA 백신의 전달은 EP를 통해 지방 조직으로 전달했다. 지방질 EP DNA 백신접종에 따른 체액성 면역 반응은, 신속하고 높은-규모의 항체 반응을 달성하는 데 특히 더 높은 전압이 중요한 것으로, 전압-의존적이고 그리고 공간 분포-의존적인 것으로 나타났다. 이것은 형질감염된 지방세포가 면역 반응을 유도할 수 있다는 첫 번째 시범이다. 유전자 발현에 전압-의존적 차이가 없더라도 강한 전압 의존성이 관찰되었다. 더 많은 세포가 플라스미드와 접촉하고 있기 때문에 다중 치료 부위의 긍정적인 영향이 기대된다.

[0119] 실시예 9. 세포 면역원성. 면역 반응의 세포 아암을 조사하기 위해, 면역화된 기니아 피그로부터의 말초 혈액에서 ELISpot을 수행하였다. HV-1 (n=3), HV-5 (n=2), 및 ID-EP (n=2)는 낮은 생존가능 세포 수의 결과로 보다 적은 복제를 가졌다. L V-5 (n=3)는 연구 초기에 관련 없는 이유로 인해 1마리의 기니아 피그가 죽었다. 모든 백신접종된 기니아 피그는 ConA 뿐만 아니라 세 펩티드 풀 모두에 반응하여 IFN-γ를 생산했다. 가장 면역원성인 펩타이드 풀 1을 추가의 분석을 위해 사용했다 (도 43). 점 계수는 ID-EP와 HV 지방질-EP 그룹 사이에서 유사하게 나타나고, LV-1이 특히 가장 약한 세포 면역 반응을 유도하는 것처럼 보이는, LV 지방질-EP에 대해 더 낮은 추세로 나타났다. 지방질-EP 치료 그룹 내에서, 인수 ANOVA는 전압 ($p = 0.15$) 또는 주사 부위의 수 ($p = 0.26$)에 대한 로그-변환 점 계수에서 유의한 차이가 드러내지 않았으며, 이들 두 인자 사이에 상호작용이 없었다

(p = 0.39). ID-EP를 포함한 모든 처리 그룹의 원-웨이 ANOVA 비교는 로그-변환 점 계수에서 유의한 차이를 나타내지 않았다 (p = 0.31).

[0120] 지방질-EP는 IDEP에 대해 동등한 세포 면역 반응을 생성할 수 있었고, 낮은 복제와 높은 가변성으로 인해 그룹 간의 차이는 상당하지 않았지만 최저 전압 및 단 하나의 치료 부위를 받은 이들 기니아 피그에 대한 점 계수는 더 낮은 경향이 있었다. 이들 발견은 지방질-EP 면역원성의 EP 전압과 DNA 분포 둘 모두에 대한 의존성을 지지하며, 조직 내의 전기천공 파라미터와 DNA 분포가 면역 반응을 개선시키기 위해 독립적으로 조정될 수 있는 중요한 인자임을 시사한다.

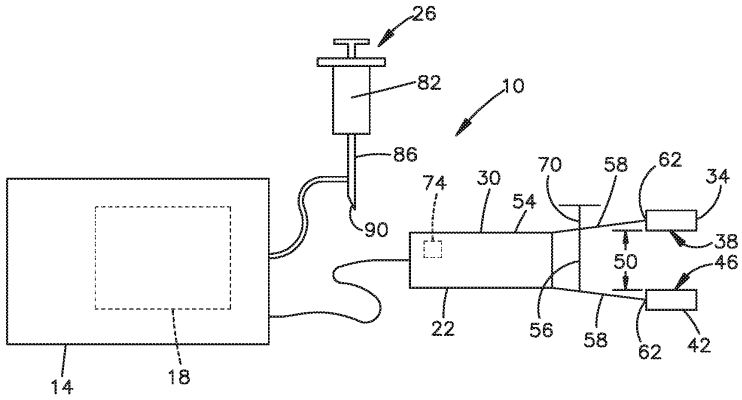
[0121] 항체 반응의 전압 의존성은 두 가지 중요한 인자를 갖는다. 첫째, 전압이 높을수록 더 크고 강한 전기장을 생성하므로 더 많은 세포가 잠재적으로 형질감염될 수 있다. 형질감염 효율 및 면역 반응은 다른 조직 예컨대 피부 및 근육에서 전압-의존적인 것으로 밝혀졌다. 그러나 최적화 연구의 결과는 저전압에서도 충분한 형질감염이 일어나고 있음을 나타냈고, 따라서 이것이 유일한 설명이 아닐 수 있다. 전압-의존적 항체 반응에 대한 두 번째 설명은 전압이 높을수록 높은 전류가 필요하여 저항성 가열로 인한 조직 손상 또는 자극을 유발할 수 있다는 것이다. 치료 부위에 외부 손상의 징후가 없었지만, 조직학적 분석은 치료 후 3일에 시작하는 지방 조직 내의 현저한 세포 침윤을 나타냈다. EP는 아쥬반트 효과를 갖는다는 것이 이전에 제안되었다. 따라서, 관찰된 세포 침윤이 EP에 의해 야기된 경미한 열적 손상과 연관될 수 있으며, 고전압에서 증가된 면역 반응에서 역할을 할 수 있다. 200V는 IM DNA EP 백신접종에 사용된 전압과 유사하지만 전류는 IA를 결코 초과하지 않으며 이는 IM-EP와 또한 유사하다. 따라서 유사한 전기 에너지의 양이 전형적인 19-인치, 22-게이지 바늘 (0.88 cm^2)에 비교해 더 큰 표면적 (6.25 cm^2)에 걸쳐 분포되고, 그래서 전극 표면에서 에너지 밀도는 IM-EP에 비교해 지방질 DNA EP 치료에서 대략 7-배 낮아야 한다.

[0122] 면역원성에 대한 DNA 주사 부위의 수를 증가시키는 경미한 긍정적인 효과는 EP 이전에 DNA와 접촉하는 세포의 증가된 수 때문인 것으로 보인다. 단일 부위에서 50 μL 이상으로 주입 용량을 증가시킴에 의해 유전자 발현에 대해 검출가능한 이점이 없다는 것이 실증되었으므로, 각각 50 μL 주사를 받는 5개의 다른 부위에 걸쳐 동일한 용량의 DNA를 분포시켰다. 다중-부위 치료가 단일-부위, 특히 초기 시점에서 동일한 용량 치료에 비해 면역원성 이점을 제공한다는 사실은, 지방질 EP DNA 백신접종이 더 많은 지방세포를 DNA에 노출시킴에 의해 직접적으로 유익할 수 있다는 증거를 제공한다.

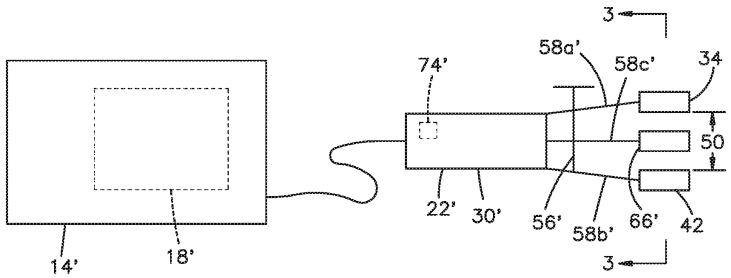
[0123] 결과는 더 많은 지방 세포를 포함시키고 최적의 전기천공 파라미터를 제공함에 의해 면역 반응이 증폭될 수 있음을 시사한다. 펄스 지속시간, 펄스의 수, 펄스간 지연 및 DNA 농도와 같은 다른 인자들이 모두 면역 반응에 기여할 수 있다. ID-EP는 용량을 절약하는 것으로 나타났지만, 이들 면역 데이터는 지방질-EP가 ID-EP와 동일한 용량에서 유사하게 강력한 면역 반응을 생성할 수 있었음을 보여준다. 지방 조직은, IM-EP와 관련된 내성 및 침습성의 단점 없이, 근육과 유사하게 ID-EP보다 훨씬 더 큰 용량을 수용할 수 있는 잠재력이 있다. 본 실시예는 지방질-표적화된 DNA 백신은 DNA 전달 및 전기천공 파라미터의 최적화에 따라 면역원성임을 입증한다. 이 접근법은 신속하고 지속적인 면역 반응을 제공하며 침습성 바늘 전극을 필요로 하지 않는다. 고정된 용량의 DNA에서, 면역 반응의 규모와 개시 둘 모두는 전기천공 전압과 주사 부위의 수를 증가시킴에 따라 개선된다. 지방질-표적화된 EP DNA 백신접종은 IM 투여보다 잠재적인 안전성, 내성 및 사용 용이성 이점을 제공하며, ID 치료의 투약량이나 세포 턴오버 제한을 받지 않는다.

도면

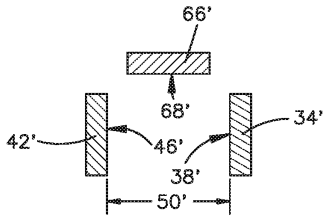
도면1



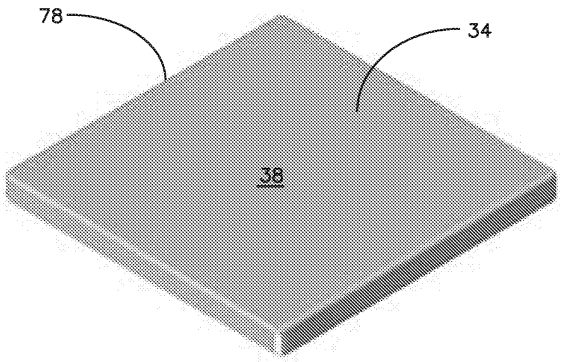
도면2



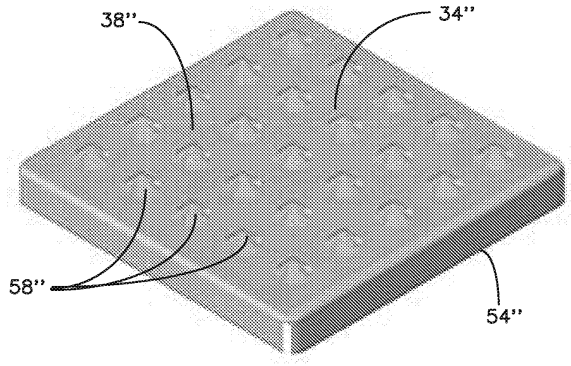
도면3



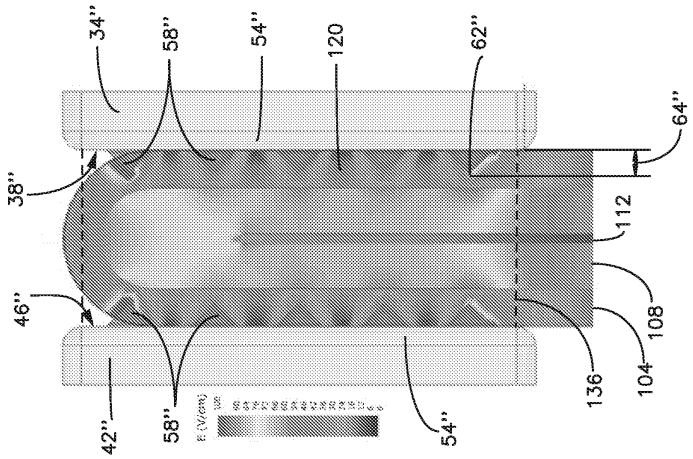
도면4



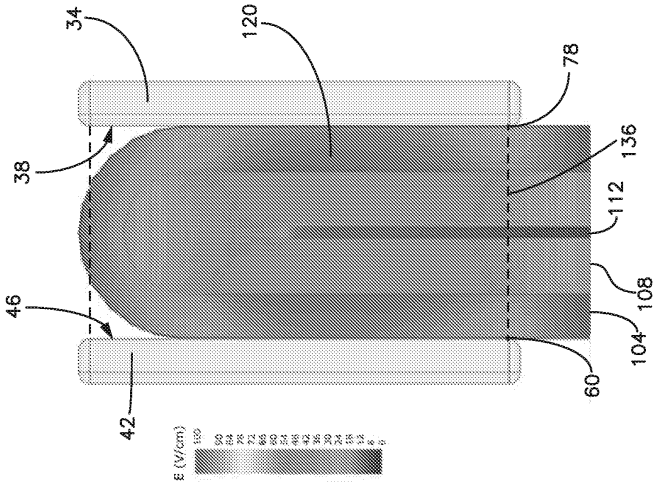
도면5


38''
34''
58''
54''

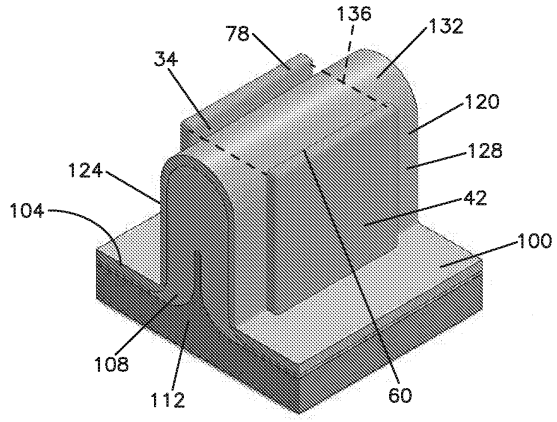
도면6


34''
58''
54''
120
62''
64''
38''
112
46''
108
136
104
42''
58''
54''

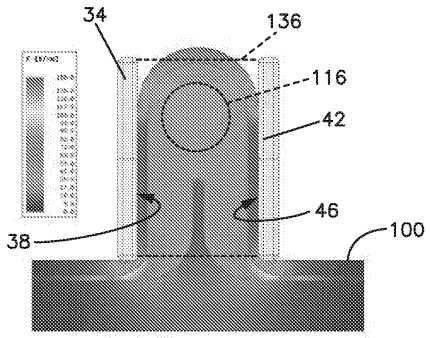
도면7


34
120
78
38
136
112
46
108
104
60
42

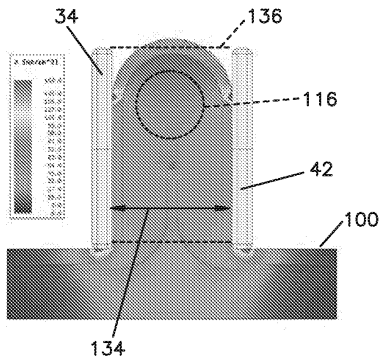
도면8


136
78
132
34
120
128
124
42
104
100
108
112
60

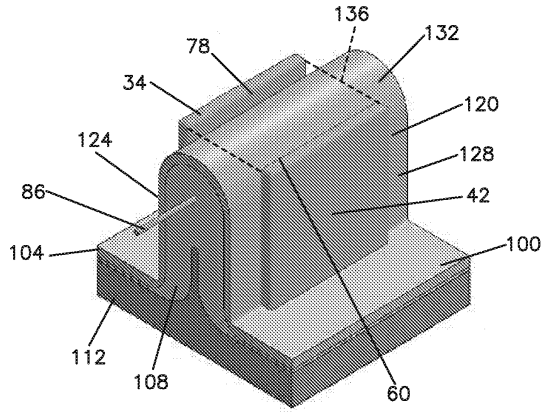
도면9


34
136
116
42
46
38
100

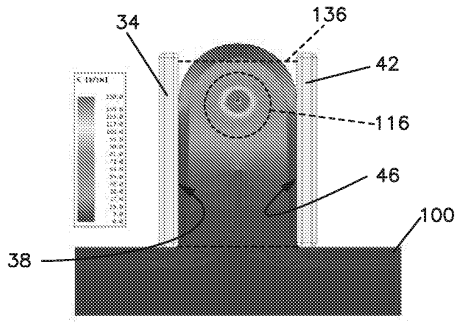
도면10


34
136
116
42
100
134

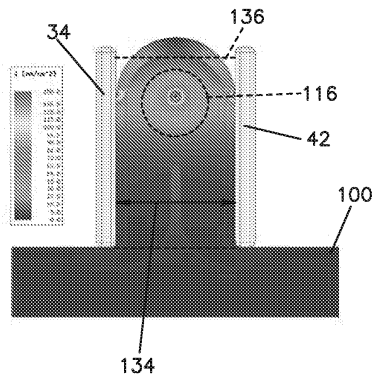
도면11



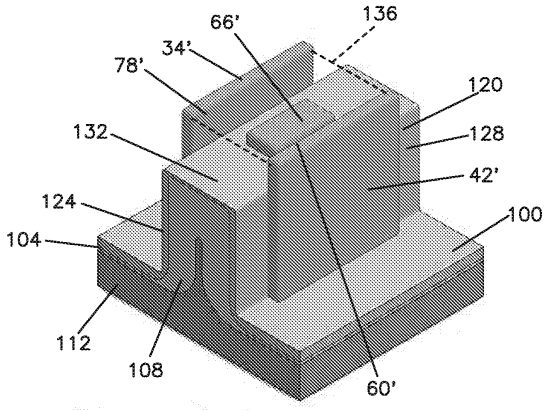
도면12



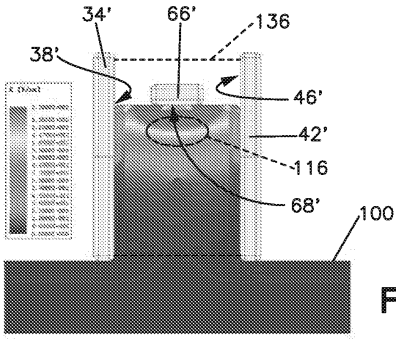
도면13



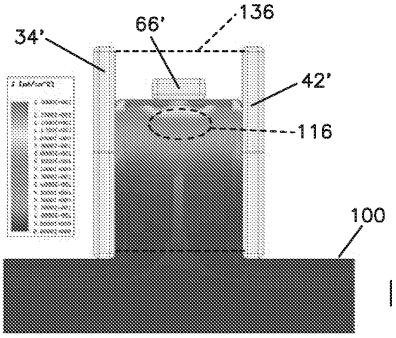
도면14



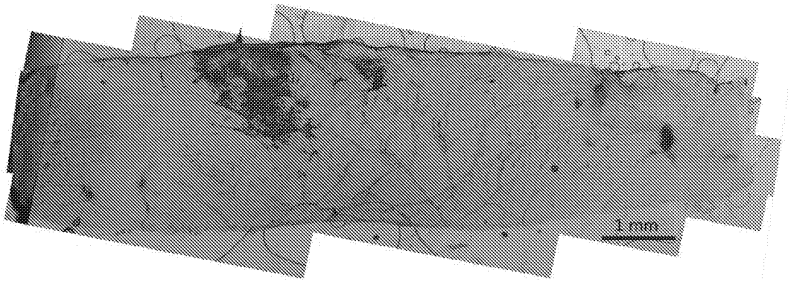
도면15



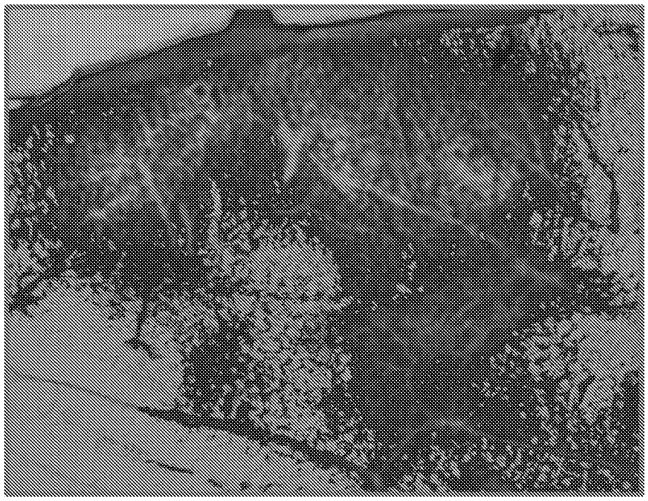
도면16



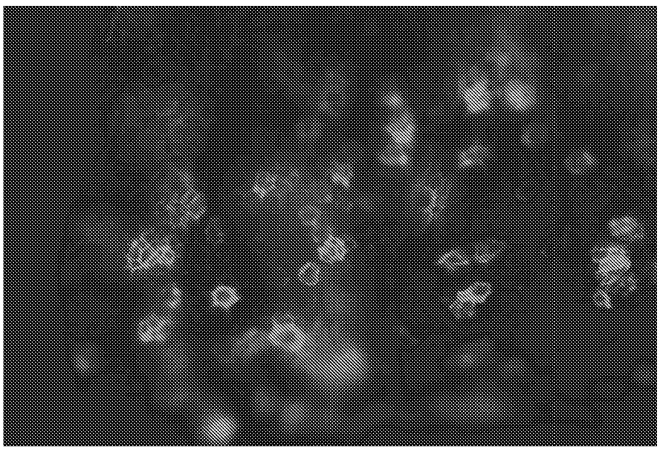
도면17



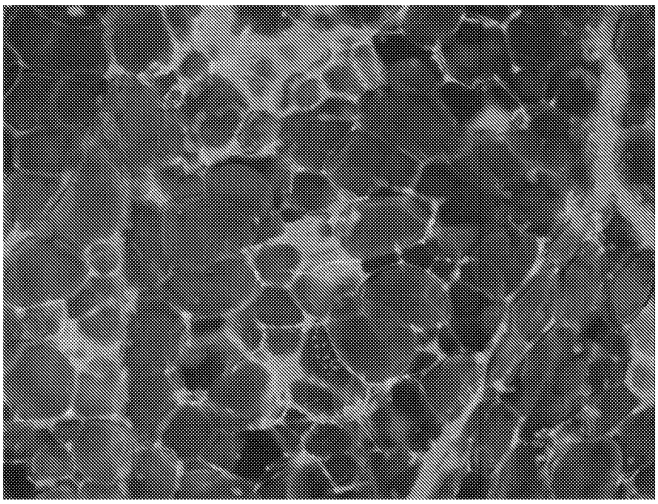
도면18



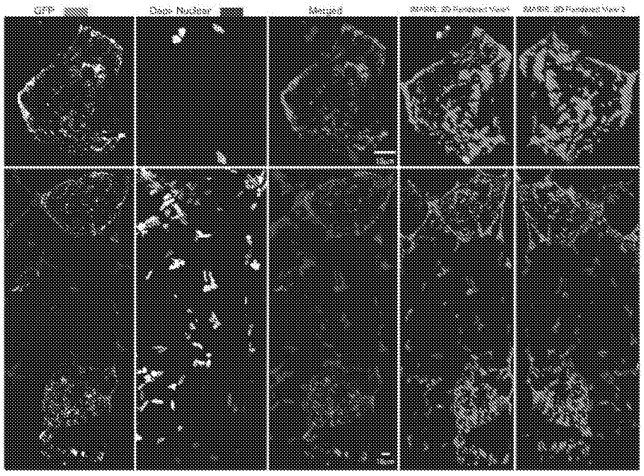
도면19



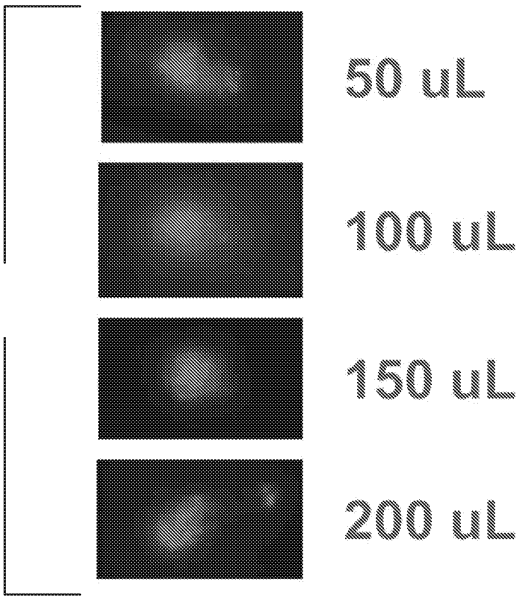
도면20



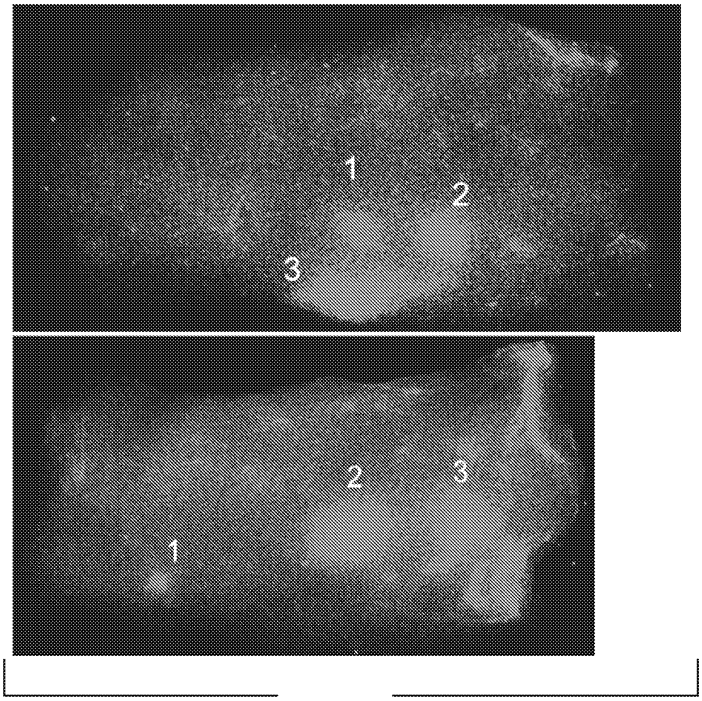
도면21


GFP
Dapi Nuclear
Merged
3MRR 3D Rendered View1
3MRR 3D Rendered View 2

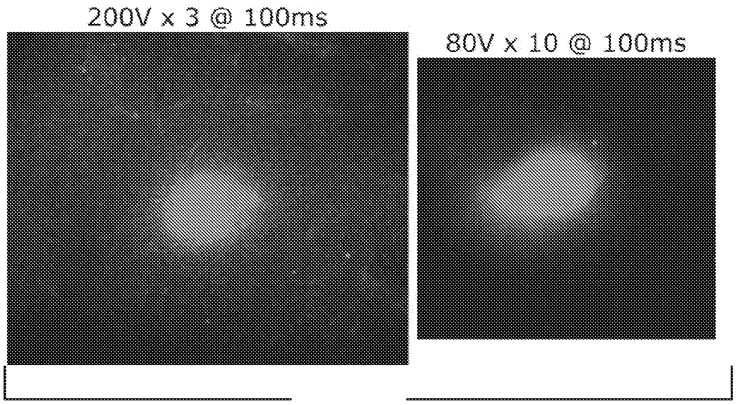
도면22


50 uL
100 uL
150 uL
200 uL

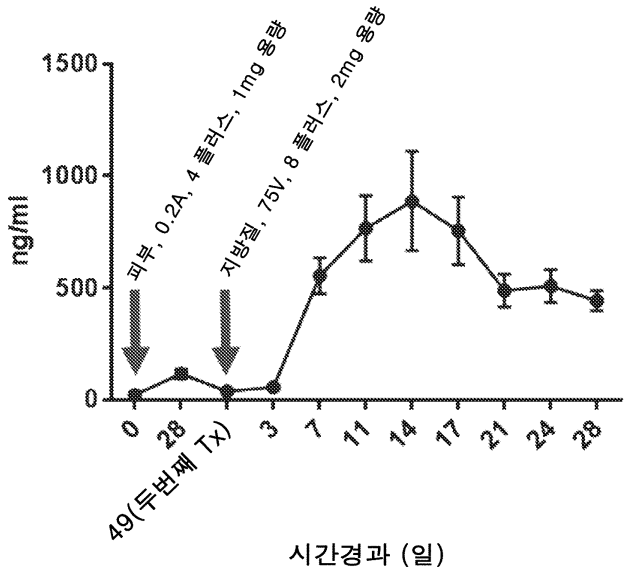
도면23



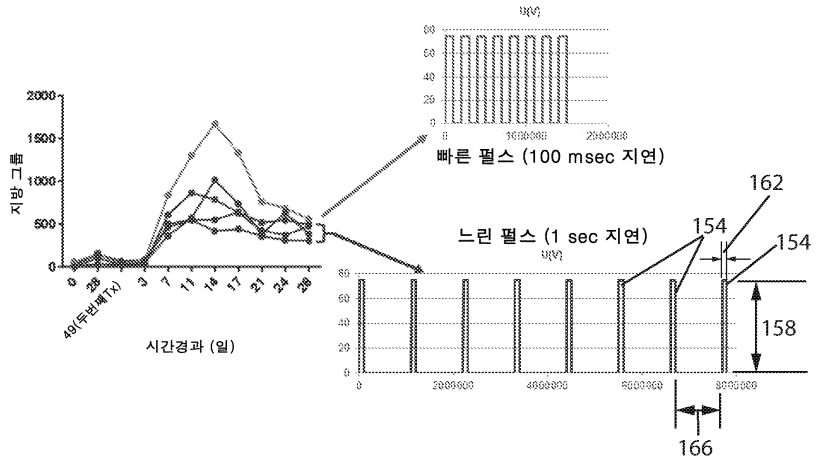
도면24



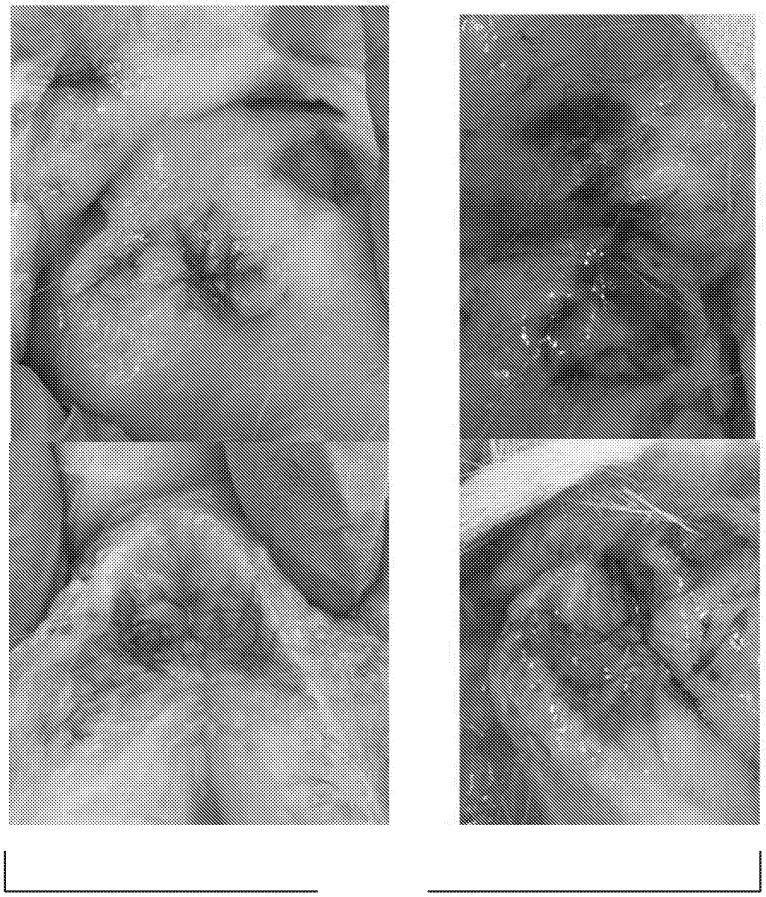
도면25


1500
1000
500
0
ng/ml
피부, 0.2A, 4 플러스, 1mg 용량
지방질, 75V, 8 플러스, 2mg 용량
0
28
49(두번째 Tx)
3
7
11
14
17
21
24
28
시간경과 (일)

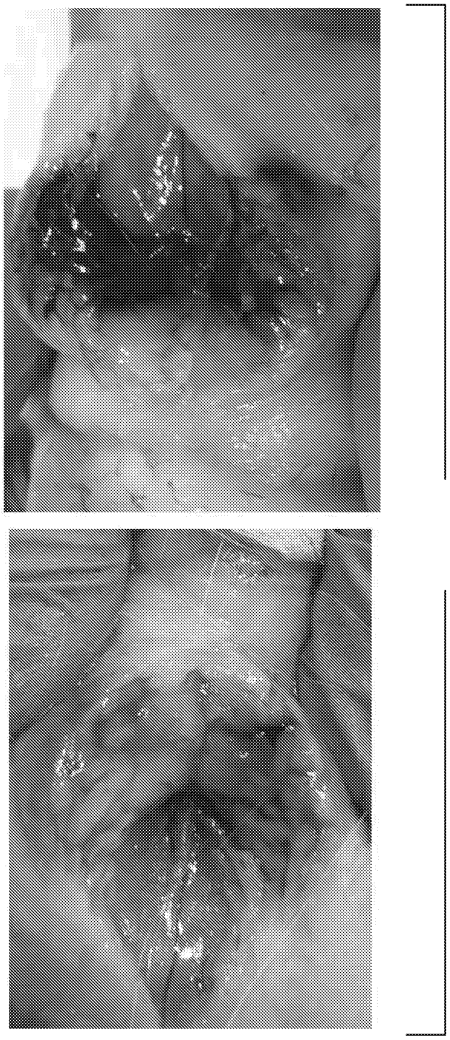
도면26


지방 그룹
시간경과 (일)
빠른 펄스 (100 msec 지연)
느린 펄스 (1 sec 지연)
162
154
154
158
166

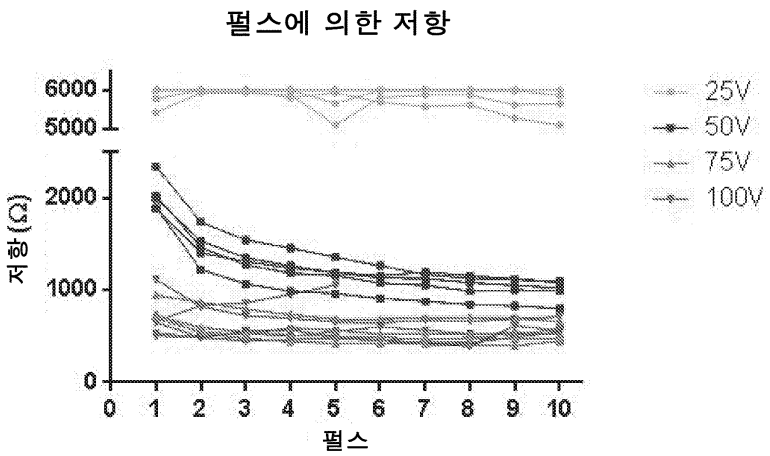
도면27



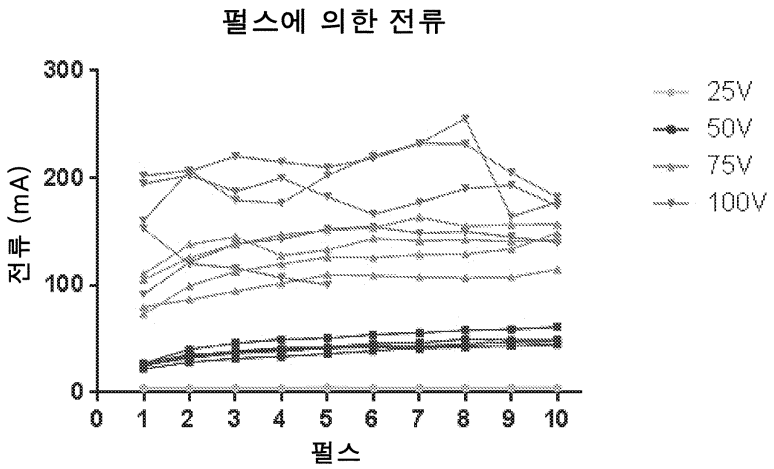
도면28



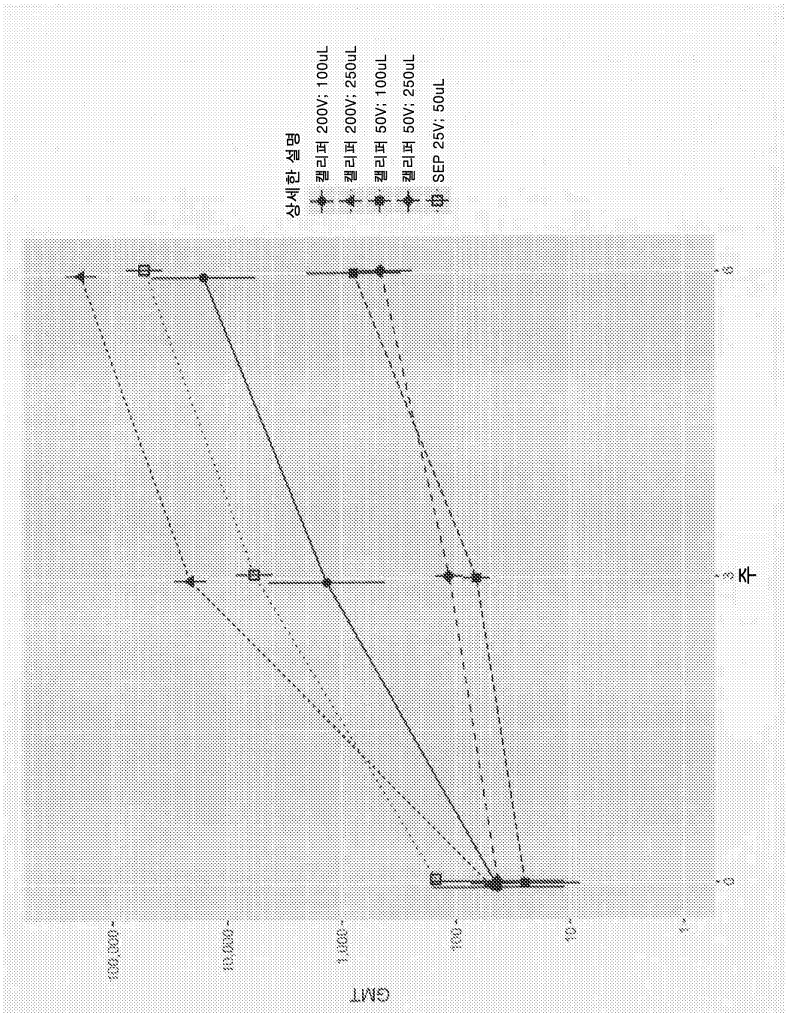
도면29


펄스에 의한 저항
6000
5000
2000
1000
0
저항(Ω)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
펄스
25V
50V
75V
100V

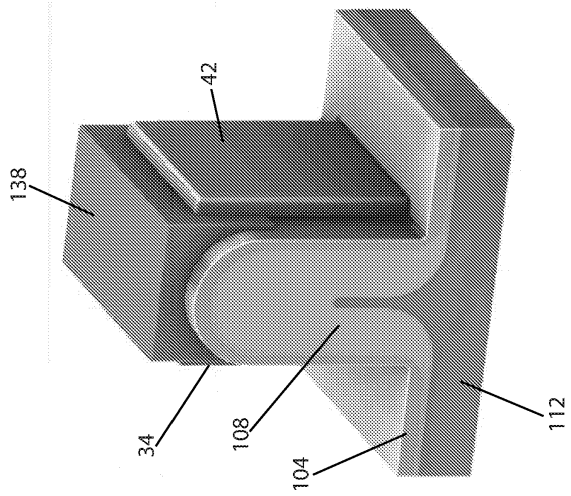
도면30


펄스에 의한 전류
300
200
100
0
전류 (mA)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
펄스
25V
50V
75V
100V

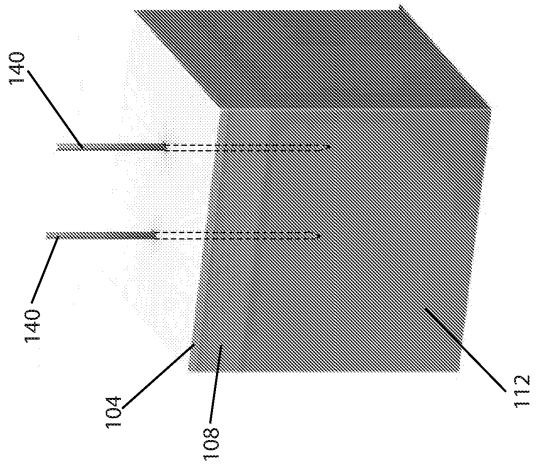
도면31


상세한 설명
캘리퍼 200V; 100uL
캘리퍼 200V; 250uL
캘리퍼 50V; 100uL
캘리퍼 50V; 250uL
SEP 25V; 50uL
GMT

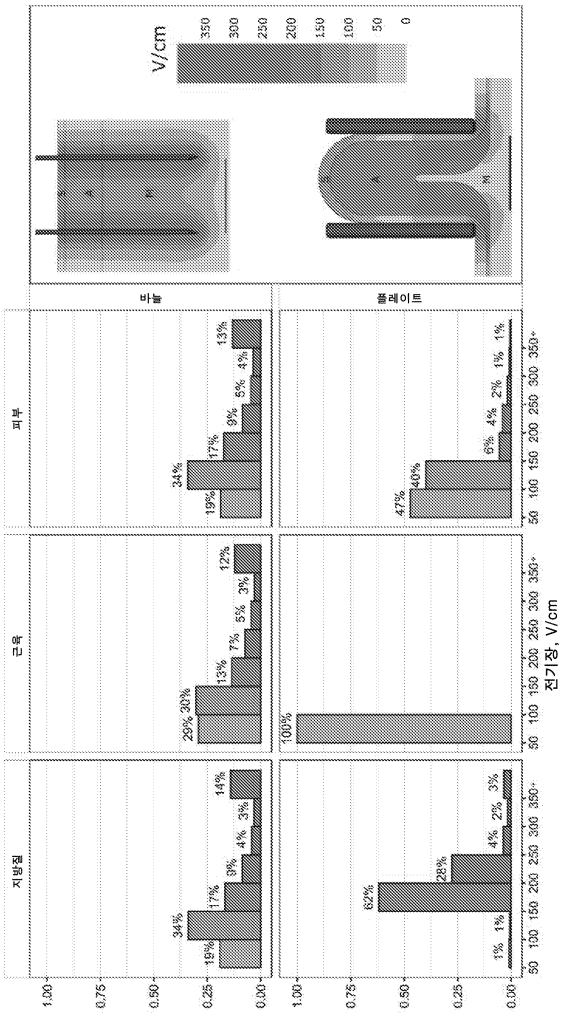
도면32



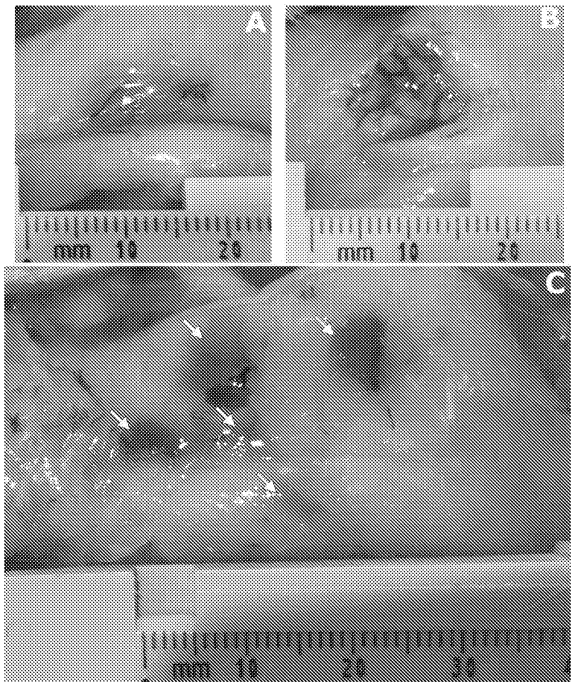
도면33



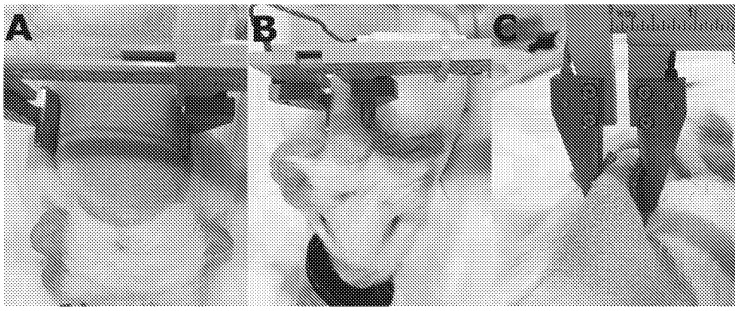
도면34


V/cm
350
300
250
200
150
100
50
0
바늘
플레이트
피부
근육
지방층
전기장, V/cm
50
100
150
200
250
300
350+
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00

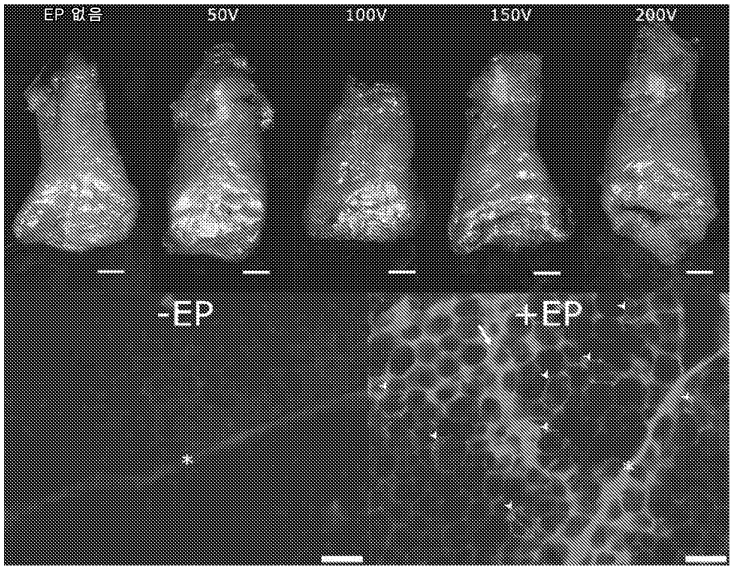
도면35


A
B
C
mm
10
20
30

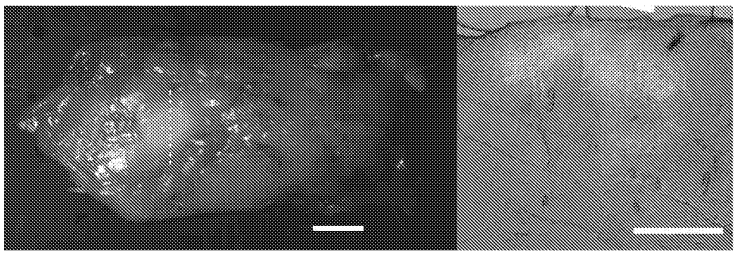
도면36



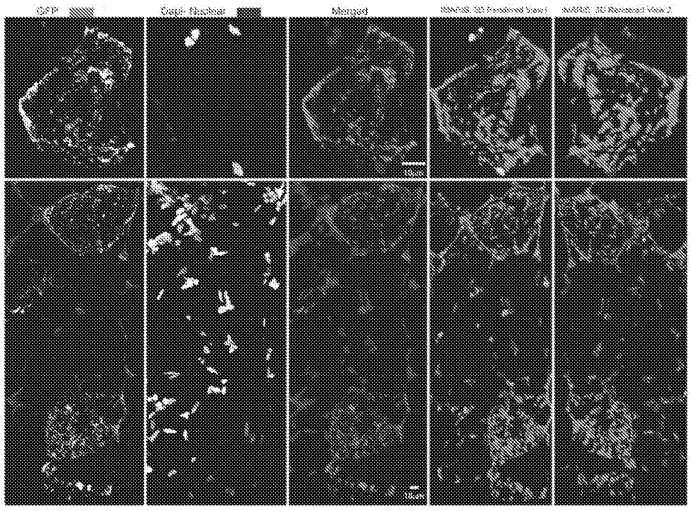
도면37



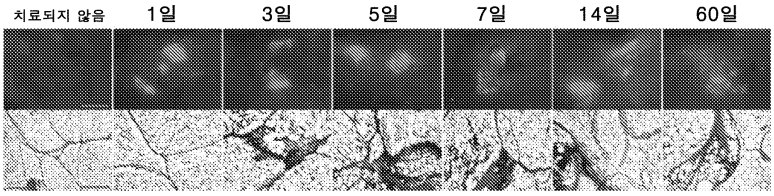
도면38



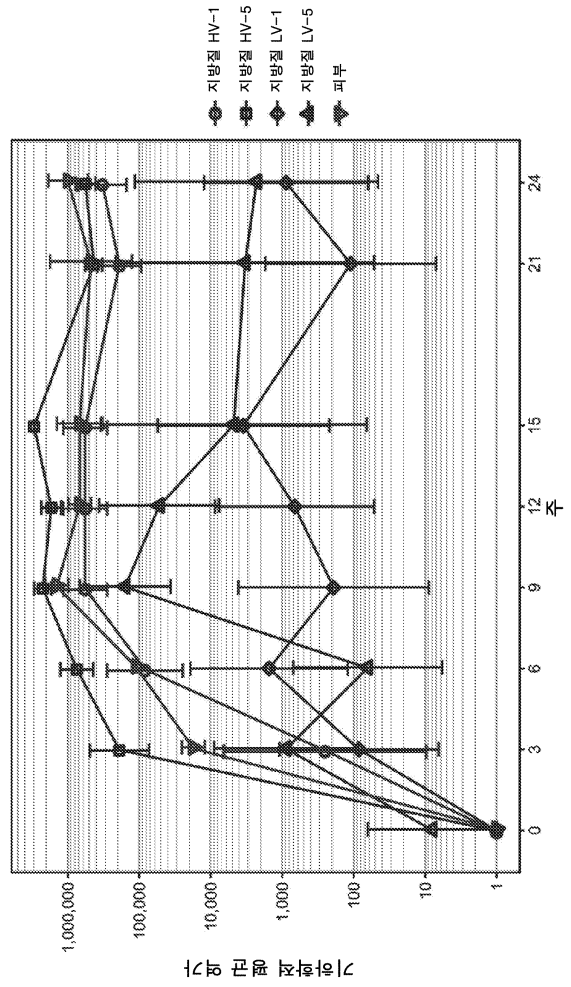
도면39



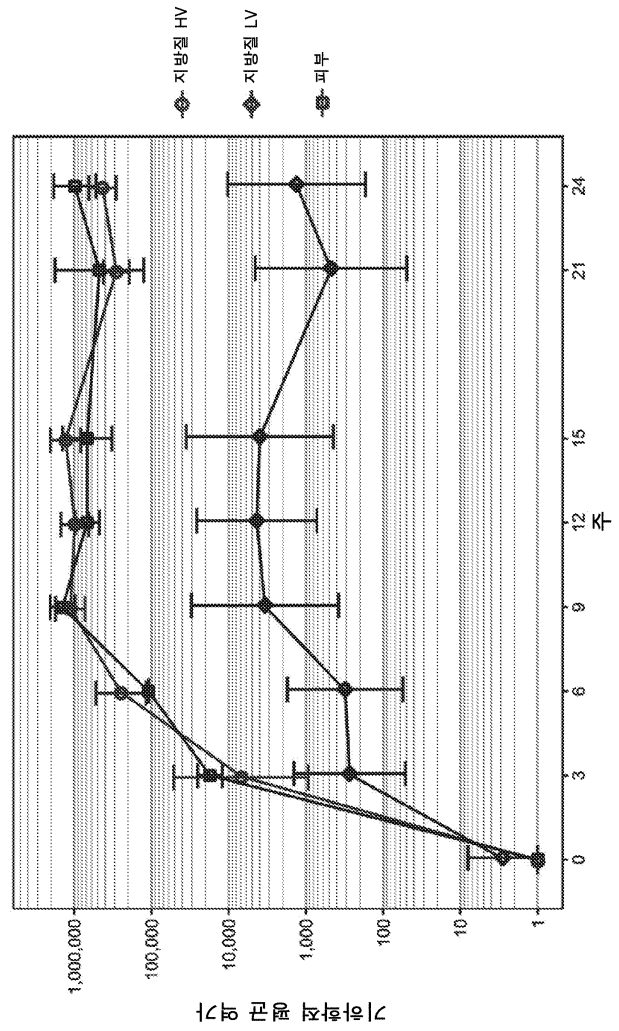
도면40



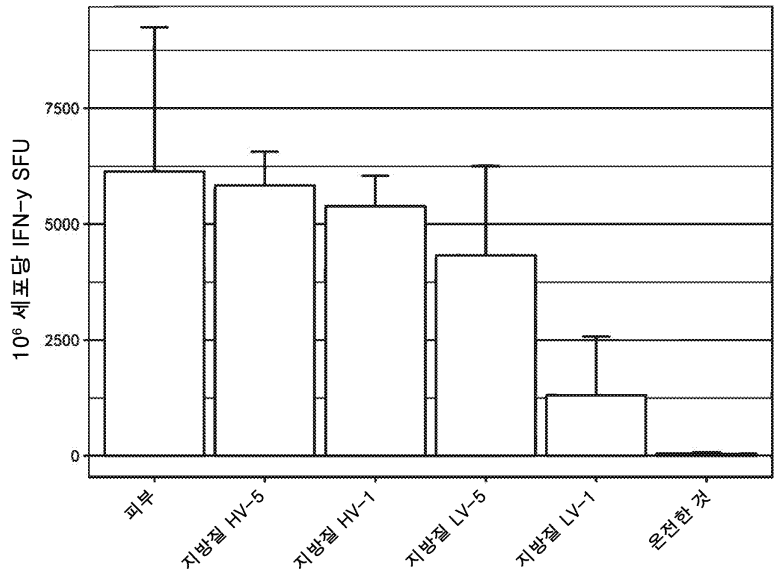
도면41


지방질 HV-1
지방질 HV-5
지방질 LV-1
지방질 LV-5
피부
기하학적 평균 역가
1,000,000
100,000
10,000
1,000
100
10
1
0
3
6
9
12
15
21
24
주

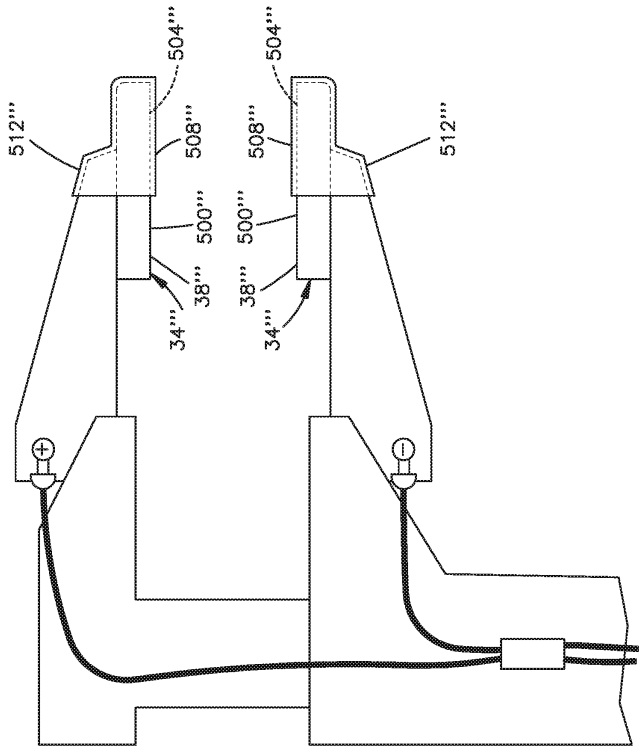
도면42


지방질 HV
지방질 LV
피부
기하학적 평균 역가
1,000,000
100,000
10,000
1,000
100
10
1
0
3
6
9
12
15
21
24
주

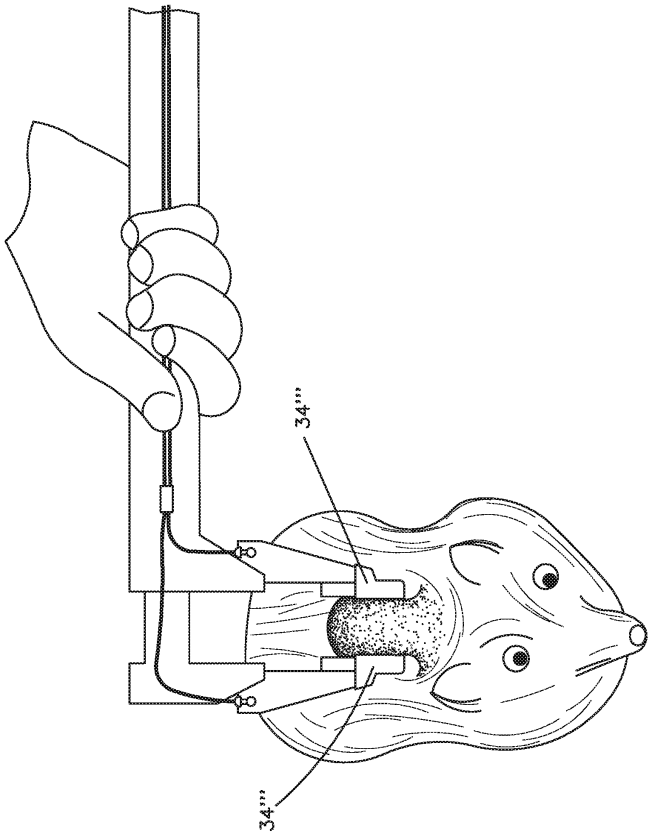
도면43


10⁶ 세포당 IFN-γ SFU
7500
5000
2500
0
피부
지방질 HV-5
지방질 HV-1
지방질 LV-5
지방질 LV-1
온전한 것

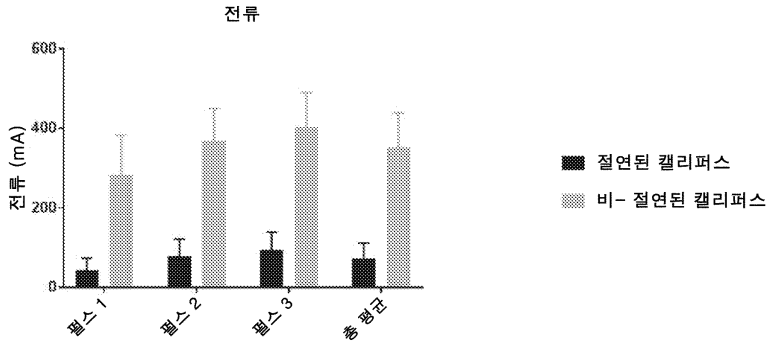
도면44



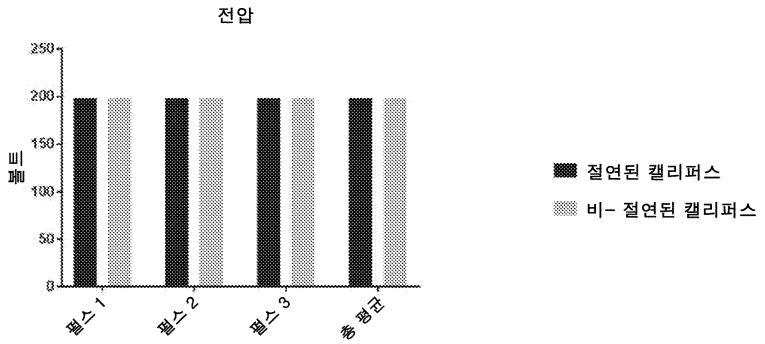
도면45



도면46



도면47



도면48

