

백신 전달기술 개발 동향과 과제

정형일* · 김정동 · 김미루 · 마니타 당골

연세대학교 생명공학과

Development of Vaccine Delivery System and Challenges

Hyungil Jung*, Jung Dong Kim, Mi-roo Kim, and Manita Dangol

Department of Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract Vaccine is a protective clinical measure capable of persuading immune system against infectious agents. Vaccine can be categorized as live attenuated and inactivated. Live attenuated vaccines activate immunity similar to natural infection by replicating living organisms whereas inactivated vaccines are either whole cell vaccines, eliciting immune response by killed organisms, or subunit vaccines, stimulating immunity by non-replicating sub cellular parts. The components of vaccine play a critical role in deciding the immune response mediated by the vaccine. The innate immune responds against the antigen component. Adjuvants represent an important component of vaccine for enhancing the immunogenicity of the antigens. Subunit vaccines with isolated fractions of killed and recombinant antigens are mostly co-administered with adjuvants. The delivery system of the vaccine is another essential component to ensure that vaccine is delivered to the right target with right dosage form. Furthermore, vaccine delivery system ensures that the desired immune response is achieved by manipulating the optimal interaction of vaccine and adjuvant with the immune cell. The aforementioned components along with routes of administration of vaccine are the key elements of a successful vaccination procedure. Vaccines can be administered either orally or by parenteral routes. Many groups had made remarkable efforts for the development of new vaccine and delivery system. The emergence of new vaccine delivery system may lead to pursue the immunization goals with better clinical practices.

Keywords: Adjuvant, Vaccine delivery, Edible vaccine, Transdermal delivery, Microneedle

서 론

백신은 약독화되거나 불활성화된 병원체를 의미한다. 백신을 인체에 주입하면 항원으로 작용하여 체액성 면역을 통해 항체를 형성하게 되므로 질병에 대한 저항, 면역성을 가지게 하는 의약품이다. 바이러스를 항원으로 사용하는 백신은 크게 비활성화 백신, 생백신, 아단위 (subunit) 백신의 3가지로 분류할 수 있다. 비활성화 백신의 경우 바이러스의 증식이 이루어질 수 없도록 열, 화학 처리 등을 통해 바이러스를 불활성화 시켜 만드는 백신이고, 생백신은 바이러스의 병원성 (virulence) 만을 약화시켜서 만드는 백신이라 위험도는 크지만 비활성화 백신에 비해 효과가 좋은 백신이다. 또 최근 들

어 유전자 공법, 단백질 정제 기술이 발달함에 따라 바이러스에서 항원으로 작용하는 부분만 정제하여 만드는 아단위 백신이 많이 개발되고 있고, 대표적으로 인플루엔자 백신을 예로 들 수 있다.

백신에 의한 면역 반응은 적응 면역 반응 가운데서도 체액성 면역의 형태로 나타난다. 체액성 면역이란 보조 T림프구와 B림프구가 체내에 들어온 항원을 항원제공세포의 도움을 받아 인식한 후 항원에 특이적인 항체를 만들어내서 항원-항체 결합을 일으켜 항원을 무력화시키는 면역반응을 의미하며, 기억을 한다는 특징을 갖기 때문에 다시 들어오는 항원을 쉽게 무력화시키는 역할을 수행한다 [1,2].

최근에는 면역반응을 통해 질병을 예방하는데 쓰이던 백신이 치료용으로도 개발되어 FDA 승인을 획득하였다. 미국의 덴드레온 (Dendreon Corp.) 사의 치료용 암백신 프로벤지 (Provenge, sipuleucel-T)라는 제품은 전립선 암을 타겟으로 하여 질병이나 감염을 제압하는 면역시스템의 자연적인

*Corresponding author

Tel: +82-2-2123-2884, Fax: +82-2-362-7265

e-mail: hijung@yonsei.ac.kr

Table 1. Classification of vaccine adjuvants [13]

종류	백신보조제
Mineral salts	Aluminium hydroxide, aluminium phosphate, calcium phosphate
Immunostimulatory adjuvants	Cytokines, e.g. IL-2, IL-12, GM-CSF, saponins, (e.g. QS21), MDP (Monophosphoryl Lipid A) derivatives, bacterial DNA (CpG oligos), LPS, MPL and synthetic derivatives, lipopeptides
Lipid particles	Emulsions, e.g. Freund's (CFA and IFA), ISA 25, 51, 206, SAF, MF59, liposomes, virosomes, ISCOMS, cochleates
Biodegradable microsphere	PLG microparticles, poloxamer particles, chitosan particles

메커니즘을 자극하는 기전을 갖고 있는 치료용 백신이다 [3]. 이 백신은 환자의 면역시스템이 암을 제압하도록 설계된 첫 면역세포치료기반암백신이라고 볼 수 있다.

이와 같이 예방용 백신만이 아니라 치료용 백신이 개발되면서 효율적인 백신 사용에 대한 관심이 증가하고 있으며, 백신 자체의 개발과 동시에 백신의 효능을 극대화시키고 안전하게 체내로 전달할 수 있는 기술에 대한 중요성이 강조되고 있다. 본문에서는 백신의 효과를 효율적으로 높일 수 있는 백신보조제 및 다양한 백신 전달 기술의 동향을 살펴보고 앞으로 나아가야 할 백신 전달 기술의 전망에 대해 기술하고자 한다.

백신의 효과 증대를 위한 백신보조제

효율적인 백신을 개발하기 위한 방법으로서 생백신의 효력을 유지하면서 유전자 재조합 단백질 백신만큼 안전하게 백신을 개발하는 방법과 유전자 재조합 단백질을 생백신만큼 효과가 좋도록 개발하는 방법이 제안되었다 [4]. 하지만, 면역 효과가 향상될수록 여러 가지 부작용이 나타나는 문제와, 반대로 백신을 안전하게 만들수록 면역 효과가 줄어드는 문제점이 나타나 효능이 증대된 백신을 개발하는데 어려움을 겪었다 [5]. 이에 대한 해결책으로 백신 자체를 새롭게 개발하기 보다는 백신보조제를 사용하여 효과를 증대시키는 방법이 다양하게 연구되어 왔다 [6,7].

백신보조제는 항원의 양이 적을 때 항원에 대한 면역반응을 신속하고 강력하게, 그리고 장시간 유지시켜주는 역할을 하기 때문에 백신 제조 시 주로 쓰이고 있다. 또한, 백신의 효능과 부작용에 영향을 미칠 수 있고, 특히 백신이 영유아 등 소아의 질병 예방으로 주로 사용되기 때문에 백신 제조에 있어서 백신보조제의 개발이 매우 중시되어 왔다 [8]. 백신보조제가 어떤 방식으로 면역력 향상에 기여하는지에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나 리포솜 (Liposome), ISCOM (Immune stimulating complex) 등의 백신보조제를 사용하여 백신의 크기를 조절함으로써 백신 효과를 향상시킬 수 있다고 알려졌다 (Fig. 1) [5]. 실제로 APC (antigen presenting cell)가 항원의 다양한 특성에 따라 흡착효과에 영향을 받는다는 연구결과가 있었으며, 다양한 백신보조제가 항원과 물리적 복합체를 형성하여 면역효과를 향상시키는 데 사용되고 있다 [9]. 또한 백신의 크기는 적응 면역 반응을 담당하는 림프기관으로의 항원 이동에 관여한다는 사실도 밝혀졌다. 200-500 nm 이상의 크기를 지닌 백신은 림프 기관

으로 효과적으로 이동하기 어렵고, 100-200 nm 이하의 경우 모세 림프관을 통해 효과적으로 림프 기관 내로 이동이 가능하다는 사실이 밝혀졌다 [10-12].

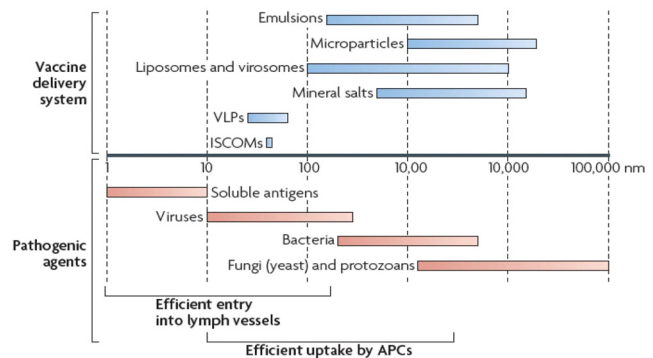


Fig. 1. The sizes of adjuvant delivery systems and pathogenic agents [5].

이상적인 백신보조제의 조건은 면역증진효과 외에도 안전성, 안정성 및 실용성 측면에서 몇 가지 조건을 갖추어야 한다. 독성이 없어야 하고, 생체분해성이 좋고 안정적이며, 사용이 편리하고, 쉽게 구매할 수 있어야 하며, 가격이 저렴하고 화학적 동정이 가능해야 한다 [13]. 이러한 백신보조제의 종류는 Table 1에서 볼 수 있듯이 크게 금속염 화합물, 면역자극성 보조제, 지질 입자형 보조제, 생분해성 마이크로원형구조체 (Biodegradable microsphere)의 4종류로 구분할 수 있다 [14].

금속염 화합물

금속염 화합물의 경우 알루미늄염, 칼슘염 등 여러 종류의 금속염을 사용하는 것이 가능하지만, 알루미늄염 화합물에 의한 항원의 서방출을 통해 면역체계의 지속적 활성화를 유도하는 방법이 주로 사용되고 있다. 하지만 알루미늄염 백신보조제는 체액성 면역 반응에는 효과적이거나, 세포매개성 면역반응에 효과적이지 않기 때문에 세균성 감염에 효과가 낮은 것으로 알려져 있다 [15]. 또한 흥반, 피하결절, 접촉성 과민반응 등 다양한 부작용을 수반하고, 백신 품질관리에 어려움이 있는 상태이다 [8].

면역자극성 보조제

면역자극성 보조제는 세균성 보조제, 식물성 보조제, 사이

토카인 등으로 분류된다. 세균성 보조제에 대한 연구는 1924년 결핵균에 감염된 기니피그가 정상군보다 항체를 많이 생산한다는 것이 밝혀지면서 시작되었다고 볼 수 있다 [16]. 그에 따라 결핵균의 MDP (muramyl dipeptide), 파상풍과 디프테리아 toxoid 등에 대한 연구가 진행되어 왔으며 이러한 세균성 보조제들이 대식세포를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF와 T, B-cell에 영향을 주는 성장인자를 분비하여 면역반응을 효과적으로 증강시킨다고 알려져 있다 [17,18].

식물성 보조제는 배당체의 일종인 사포닌으로써 여러 식물군에 폭넓게 분포하고 있으며, 초기에는 정제되지 않은 사포닌을 백신보조제로 활용하여 많은 부작용을 유발하였다 [19]. 현재는 일반적으로 *Quila saponaria*에서 추출한 식물성 보조제를 사용하고 있다. 처음으로 추출되어 사용된 Quil A 라는 물질은 다양한 종류의 서로 다른 성분으로 구성되어 강한 활성을 가지고 있으며, 동물 종류에 따라 독성과 효과가 서로 다르게 나타났다. 하지만 1992년 Kensil에 의해 낮은 독성을 보이면서 백신보조제로 활성에 중요한 구조인 QS-21 이 분리되었으며, 강력한 세포독성 유도능을 지니고 있는 것으로 알려져 암백신 보조제로 많은 연구가 진행되었다 [20].

1990년대에는 싸이토카인을 백신보조제로 사용하는 방법에 대한 다양한 연구가 이루어졌다 [21-24]. 싸이토카인을 보조제로 사용할 때 생체 내 항체 생성이 증가되는 것이 보고되었으나 효과를 위한 투여 횟수 증가 및 사용량 증대로 심각한 부작용이 유발되었다 [25]. 사이토카인을 백신보조제로 사용하기 위해서는 다른 보조제에 비해 불안정하고, 체내 반감기가 짧다는 문제점 역시 해결해야 할 과제이다.

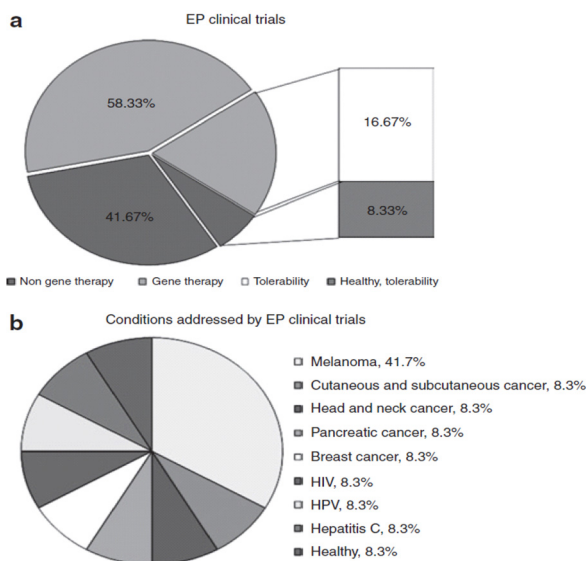


Fig. 2. Clinical trials using electroporation [43].

지질 입자형 보조제

지질 입자형 보조제는 1916년 Le Moignic 등이 사멸된 대장균을 mineral oil에 에멀전화 시켜 면역반응을 증가시

키면서 에멀전 형태로 처음 개발되었다 [26]. 특히 1937년 발견된 complete Freund's adjuvant가 큰 주목을 받았으며 Mycobacterium이 없는 water-in-oil 에멀전을 incomplete Freund's adjuvant라 하여 동물백신에 많이 사용되었다. 하지만 점도가 너무 높고, 생체 내 주입이 어렵다는 단점이 있어서 삼중 에멀전 또는 water-in-oil in water 에멀전이 개발되었다. 삼중 에멀전 개발로 점도를 낮출 수는 있었으나, 여전히 안정성이 낮고 상분리 (phase separation)가 일어나 생산이 어렵다는 단점이 있어 이를 극복할 적절한 유화기술이 요구되고 있다.

미네랄 오일만이 아닌 땅콩기름, 참기름, 상어의 간유 등 다양한 동 식물성 오일이 백신보조제로서 개발되고 있으며, 리포솜, 바이로솜 (Virosome)을 항원과 결합시켜 백신보조제로서 사용할 수도 있다. 리포솜의 장점은 표면에 단백질을 노출시켜 표적지향적으로 작용하도록 구성하는 것이 용이하다는 점이다. 특히 바이로솜은 지질의 표면에 바이러스 표면 단백질을 코팅하여 바이러스의 항원성을 지니게 하고 입자 크기도 유사하게 만들어 면역 세포에 의한 인식, 흡수를 용이하게 조작할 수 있는 장점이 있다. 특히 점막에 적용하여 그 효과가 뛰어난 것으로 밝혀져 인플루엔자 백신 시장에 도입되어 있다 [27]. 또한 ISCOM이라는 지질 입자형 보조제는 콜레스테롤, 인지질, 사포닌 그리고 항원을 혼합하여 만드는 물질로서 cage 형태의 구조를 가지고 있다. ISCOM 자체는 면역원성이 없을 뿐만 아니라 면역억제를 일으키지 않으므로 보조제나 전달체로서 사용 목적에 적합하고 부작용이 없어 매우 유용하게 사용이 가능하지만, 이를 위해서는 항원으로 사용되는 단백질의 소수성기가 존재해야 한다는 문제점이 있었다. 하지만 대부분의 재조합 단백질은 용해성 단백질로 소수성기가 제거되어 있기 때문에 이 문제를 해결하기 위해 공유결합에 의해 palmitic acid를 붙여 용해성 단백질과 ISCOM의 결합을 유도하는 방법이 개발되었다 [28]. 이렇듯 ISCOM을 활용하여 다양한 백신의 면역반응을 향상시키려는 노력이 진행되어 왔으며 지금도 진행되는 중이다 [29,30].

생분해성 마이크로원형구조체 (Biodegradable microsphere)

생분해성 마이크로원형구조체 (Biodegradable microsphere) 형태로 만들어지는 보조제는 poly (lactic)/glycolic acid (PLGA), poloxamer, polyphosphazene, polyanhydrides 등의 생분해성 물질로 제조한다 [31]. 특히 PLGA는 그 동안 봉합사로 사용되어 왔기 때문에 안전성의 문제가 없다고 알려졌으나, 항원의 안정성을 유지하기 위해서는 항원에 따른 별도의 연구가 필요하다. Microsphere는 항원을 점막표면의 APC로 운반하는 역할을 수행하며, 주사 및 서방출성 제제로 제조가 가능하여 주목받고 있다. 특히 요즘에는 PLGA 뿐만 아니라 chitosan을 활용한 microsphere를 개발하여 백신보조제로 활용하려는 연구도 이루어지고 있다 [32,33].

Table 2. New technologies targeting vaccine delivery into the skin [34]

Technology	Company	Vaccine (development phase)
Prefilled microinjection system	BD Medical Pharmaceutical Systems/Sanofi Pasteur	Trivalent inactivated seasonal influenza (clinical phase 3)
	BD Medical Pharmaceutical Systems/Oncovax	Cancer vaccine (clinical phase 2)
Non-prefilled microinjection needle	Nanopass, Micro-Pyremidal Needle Georgia Institute of Technology Debiotec	Flu (clinical phase 1) Pre-clinical Pre-clinical
Topical Patch with cholera toxin adjuvant	Iomai Corporation	Trivalent inactivated seasonal influenza (clinical phase 2) Travelers' diarrhea (clinical phase 2)
Topical Patch	Vaxin, Inc. Ichor Medical Systems, TriGrid	Pre-clinical Pre-clinical
	Cyto Pulse: Derma Vax, Easy Vax Inovio, Medpulsar DNA Delivery System	Pre-clinical DNA dengue (clinical phase 1); HIV Pre-clinical
Transdermal with electroporation	Genetronics Biomedical Corporation Alza Corporation, Macroflux	Pre-clinical DNA, proteins vaccine (pre-clinical)
Solid microneedle array	Biovalve, Micro-Trans Epidermal Powder Immunization	Pre-clinical DNA vaccines (clinical phase 2)
Jet injector (Powder)	PowderMed	DAN HIV (clinical phase 1) herpes simplex type 2 (clinical phase 1), DNA cancer vaccine (clinical phase 1)
Jet injector (liquid)	Bioject	IPV (WHO studies, clinical phase 2)
Skin abrasion	BD Technology, Microenhancer Array	Hepatitis B (pre-clinical)
Skin permeation by low frequency (20 kHz) ultrasound associated with topical patch	Sonics & Materials, Newtown, CT	Tetanus toxoid (pre-clinical)
Nanoparticle and microparticle formulation	Chiron Various	Pfizer HiV2, HPV, Flu

백신의 효과향상을 위해 개발된 백신 전달 방법

백신의 고비용과 부작용 문제, 면역효과 개선, 사용자 편의성 등 여러 가지 요구를 만족시키기 위해 기존의 근육주사 방법을 대체하려는 다양한 연구가 시도되어 왔다 [34] (Table. 2). 이러한 방법들 가운데 경구 투여를 제외한 대부분의 방법은 피부에 많이 존재하는 면역세포를 통해 면역활성을 강화하고자 하는 목적으로 개발된 방법이다.

경구투여

기존 백신 투여를 위해서 사용되는 근육주사는 전문적인 의료진의 도움이 필요로 하였다. 이러한 문제를 해결하기 위해 입을 통해 백신을 전달할 수 있는 경구 투여형 백신이 개발되고 있다. 경구 백신은 점중에 따른 통증이 없고, 분무식 백신의 문제점인 점중량 조절 문제를 해결할 수 있는 장점을 가지고 있으나 소화기관을 지나가면서 백신의 효능이 약화되거나, 내성을 일으키는 등의 부작용으로 인해 개발에 어려움이 많았다. 하지만 지금은 소아마비를 예방할 수 있는 경구 백신과, 콜레라를 예방하기 위한 듀코탈액, 유아의 위장관 감염에 의한 질환을 막기 위한 로타텍, 로타리스크 등의 다양

한 경구투여 백신이 시판되고 있으며, 임상단계에서 연구 중인 백신도 있다 [35,36].

특히 경구백신 가운데에서도 재조합 백신의 안전성과 경구백신의 점중 편의성을 결합하려는 시도으로써 식물체를 이용한 경구백신 기술이 시도되고 있다 [36]. 이 기술은 항원유전자를 식물에 형질전환 시키거나 식물 바이러스에 발현시켜 식물체에서 유래하는 항원단백질을 생산하여 식품을 섭취하듯 백신을 경구투여 할 수 있는 기술로써 기존 백신의 단점인 안정성, 고비용 문제점을 해결할 수 있는 기술로 주목받고 있다 [37]. 예전에는 감자와 담배가 주로 사용되었으나 2000년대에 들어와서 토마토, 옥수수, 당근과 같은 다양한 식용 식물들을 사용한 연구가 진행되고 있다 [38-40].

EP (Electroporation)

바이러스를 통한 DNA 전달 시스템은 일반적으로 높은 유전자 발현율을 보여왔지만 면역학적 결점으로 인해 비바이러스성백터를 사용한 백신 전달방법이 많이 연구되고 있다. 비바이러스성 유전자 치료의 효능을 높이기 위한 기술로써 jet injection, gene gun delivery, 소노포레이션 (sonoporation) 등이 사용되고 있다. 이 중 EP기술은 세포막

에 전기장을 걸어주어 일시적으로 세포막을 불안정화시킴으로써 외부 물질의 세포나 조직으로의 진입을 가속화 시키는 기술이다 [41].

EP를 통한 거대분자의 세포 내 주입에 대한 정확한 기작은 아직 밝혀지지 않았지만 항암제와 같은 미세분자의 경우 전기파에 의한 단순한 확산 작용으로 세포 내 이동이 이루어지는 것으로 보인다. 이에 반해 플라스미드 DNA와 같은 거대 분자는 전기충격에 의해 불안정화된 세포막과 DNA간의 상호작용에 의해 단계적으로 세포 내 진입이 이루어지는 것이라 여겨지고 있다 [42]. EP 기술은 DNA와 같은 거대분자를 *in vitro* 상에서 세포 내로 주입시키는 수단으로 사용되어 왔으며 최근에는 *in vivo* 상에서도 플라스미드를 다양한 조직으로 주입시키는데 응용되고 있다.

EP 기술의 DNA 백신으로의 대표적 적용 예를 살펴보면 2006, 2007년도에 EP를 통한 Xenogeneic tyrosinase DNA 백신 전달 연구를 들 수 있다. Tyrosinase DNA 백신은 체내에서 tyrosinase을 발현하여 cytotoxic lymphocyte (CTL)에 의한 면역반응을 활성화시키고 흑색종 세포에 저항성을 갖게 한다. 마우스를 통한 동물실험에서 tyrosinase가 코딩된 유전자를 통한 xenogeneic DNA vaccination 결과 항원 유발 및 cytotoxic T cell responses가 증가됨을 확인하였다 [43,44]. 또한, EP 기술을 적용하여 melanocyte antigen tyrosinase-related protein-2가 코딩된 플라스미드를 마우스에 주입한 결과 CD8+ T cells의 수가 매우 높게 증가하였으며, 종양의 성장속도 또한 크게 감소됨을 확인하였다 [45]. 이러한 결과를 바탕으로 개를 이용한 동물실험이 진행되었으며 주사바늘이 없는 약물 전달 기기인 Biojector2000을 사용하여 human tyrosinase plasmid DNA를 근육주사 (IM)한 결과, 일반적인 치료법으로 처방된 개들은 1~5개월의 생존기간을 갖은 반면 1년 이상이라는 높은 생존율을 보인 연구 결과가 있었다 [46]. 주사바늘이 없는 다양한 백신 전달기기에 EP 기술을 접목시켜 xenogeneic tyrosinase DNA vaccine의 안전성 및 면역활성 평가를 위한 연구 및 흑색종 환자를 대상으로 한 임상 평가 또한 진행되었다 [47].

이외에도 EP과 근육주사를 접목하여 마우스에 인플루엔자 백신인 H5N1 hemagglutinin (HA)-based DNA vaccine을 주입한 연구 사례가 있었다 [48]. EP-mediated IM 기술을 통한 DNA 백신 전달 시스템이 일반적인 주사기를 통한 주입식 DNA 백신 전달 방식에 비해 DNA 백신의 유전자 발현 수준을 크게 증대시켜 면역체계 활성화 및 단백질 발현에 높은 효능을 보이고 있으나 기존 EP 시스템의 사용 편의성 효율이 떨어져 일반인들이 쉽게 이용하기 힘들다는 단점이 있었다 [49]. 2010년 최근 이노비오 바이오메디컬 사는 이러한 EP 시스템의 사용 편의성을 높인 새로운 소형 무선기기인 셀렉트라 SP 시리즈 (CELLECTRA-SP series)를 개발하였다 [50]. 셀렉트라 SP 기기는 모든 구성요소를 무선전송기 크기의 편리한 휴대용 기기 안에 결합함으로써 소비자의 사용 편의성을 높였으며, 동물 연구 결과를 통해 긍정적인 효과를 보인바 있다.

초음파 기술

백신접종에 있어서 초음파 (ultrasound) 기술은 주로 주사기를 통한 약물 주입시 피부 두께 등의 피부조직에 대한 이해를 돕기 위해 사용되어왔다. 하지만, 최근에는 초음파를 통해 세포막에 전기장을 가해줌으로써 비침습적으로 항체의 투과 효능을 증가시킬 수 있음이 알려졌으며, cholera toxin과 같은 백신보조제 적용 시에도 부작용을 보이지 않음이 보고되었다 [51,52]. 백신보조제의 양이 기존 근육 주사에 필요한 양보다 소량일 경우에도 초음파 기술 적용 시 본래의 수준과 비슷한 효능을 보였으며 이는 항체의 체내 흡수율 증가 효과 이외에도 피부 진피층에 존재하는 APC, 특히 Langerhans cells (LCs)이 초음파에 의해 활성화 되었기 때문이라 여겨진다.

초음파는 최초로 1987년 소노포레이션 기술을 이용하여 DNA를 동물세포에 주입시키는데 성공함에 따라 부각되기 시작하여 그 이후 다양한 종류의 세포와 조직에 적용되었다 [53]. 소노포레이션 기술은 마이크로버블 (microbubbles)을 매개하여 이루어지는데 이는 다량의 약물 및 유전자의 세포 내 주입이 가능하다는 장점을 갖는다. Chick embryo에 적용 시 EP 기술에 비해 더 뛰어난 효능을 보인다는 연구 결과도 발표된 바 있다 [54]. 또한 2010년 코토대학교 연구팀은 이러한 초음파 기술을 기반으로 mannose-modified gene carrier를 이용하여 DNA 백신 치료에 대해 연구한 바 있다. Man-PEG2000 bubble lipoplexes라는 mannose를 변형시켜 제작한 유전자 전달체와 초음파를 사용하여 *in vivo* 상에서 DNA 백신을 투여한 결과 APCs에서 특이적으로 유전자 발현량이 크게 증가됨을 확인하였다 [55].

초음파 기술은 이미징, 지혈, 유전자 치료 등 다양하게 적용되고 있지만 초음파 기술을 통한 백신의 세포 내 전달 기작에 대한 정확한 이해가 아직 부족하기 때문에 백신접종에 응용하기 위해서는 많은 연구가 필요한 실정이다.

Jet injection

주사바늘이 사용되지 않는 jet injection 기술은 기존의 가스 압력에 의해 파우더 또는 액상 형태의 백신을 피부를 통해 비침습적으로 전달하는 기술로써 1940년 최초로 개발된 이래 다양한 백신 접종을 위해 연구되어 왔다 [56]. 2004년 진행된 연구에 따르면 다섯 종류의 백신을 대상으로 jet injection의 효능을 평가해본 결과 기존의 주사기를 기반으로 한 백신 전달 방식에 비해 4가지 종류의 백신에서 기존 보다 높거나 혹은 동등한 효능을 보인 바 있다 [57,58]. 백신뿐만 아니라 적용할 수 있는 약물의 종류 또한 DNA coated nanoparticles, naked DNA, inactivated virus, polysaccharide-protein conjugates, toxoids 그리고 whole cell vaccines 등으로 다양하여 탄력적인 약물 적용성을 갖는다는 장점이 있다.

주사기를 기반으로 한 백신접종과는 다르게 jet injector에 의한 백신 전달은 진피, 피하조직, 근육 등으로 백신이 넓게 확산되어 분포되는 경향을 보이며, 이러한 확산 때문에 백신

을 진피에만 집중적으로 전달할 수 없었다. 또한 jet injection 은 피부에 손상 없이 백신을 전달하는 것을 주요한 장점으로 내세우고 있지만 수포, 홍반, 경화, 혈종 등의 피부 부작용을 보인다는 연구결과가 있었다 [57,58]. 실제로 DNA 백신을 대상으로 피하주사기와 jet injection 통한 IM 투여 결과를 비교해 본 결과 jet injection의 경우 두 배 이상의 부작용 효과를 나타낸 바 있다 [61]. 이러한 논쟁의 와중에도 jet injection 은 주사바늘의 위험성을 극복할 수 있으며 짧은 시간에 많은 양의 백신 투여가 가능하다는 장점에 힘입어 황열과 IPV 백신 접종에 적용되고 있다. 최근에는 일회용 노즐을 통한 mono-dose injectors 개발에 중점을 두어 보다 향상된 기기개발이 진행되고 있다.

현재 판매되고 있는 대표적인 jet injection 제품으로는 PowderMed사의 PMED와 Bioject사의 Biojector가 있다 (Fig. 3). PMED의 경우 분말 형태의 DNA 백신을 헬륨가스를 이용하여 피부 내로 투과시킨다. 이에 반해 Biojector는 분말 형태가 아닌 액상 백신의 경우 사용되며 근육, 피하 주사 시 1 mL 까지 약물을 전달할 수 있다. 현재 경피 주사를 위한 기기개발 및 임상시험을 준비 중에 있다.

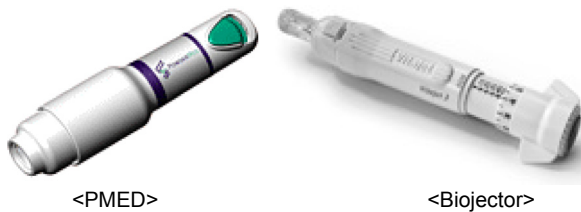


Fig. 3. Jet injectors.

마이크로니들 (Microneedle)

기존에는 일반 피하주사기를 이용한 근육 주사로 백신 접종이 이루어졌지만, 이러한 주사기를 통한 백신 전달 방식은 일반인이 손쉽게 이용하기에는 한계가 있었으며, 주사기 사용에 의한 통증 및 안전상의 문제가 있어왔다. 리서치 전문 기업 리서치앤리서치가 최근 18세 이상 59세 이하의 일반인을 대상으로 진행한 조사에서, 주사에 대한 두려움을 가진 이들 중 87.8%가 주사 치료 회피 의향을 경험한 것으로 나타났으며, 실제로 주사 치료를 회피한 경험이 있는 사람의 비율도 42%를 차지한 것으로 보고된 바 있다.

마이크로니들은 기존의 주사기 (hypodermic needle)가 지닌 단점인 통증, 외상, 감염, 거부감을 극복하고자 2000년도 초반에 개발된 새로운 차원의 주사기으로써 환자의 주사 공포증을 없애고 고효율로 약물 및 생리활성물질을 전달할 수 있는 기술이다. 마이크로 사이즈로 제작된 각각의 마이크로니들은 어레이 형태의 패치로 제작되며 피부의 최외각층인 각질층 (Stratum corneum: 10~15 μm)만 뚫어서 피부 내로 백신을 전달하는 것을 목적으로 하고 있다. 초기의 마이크로니들은 단순히 피부 내 채널을 형성시키는 마이크로스파이크 형태였으나 그 이후 일반 피하주사기와 동일하게 피부 관통 후 주사

기의 구멍을 통해 액상 약물을 직접적으로 체내에 전달시킬 수 있는 중공형 마이크로니들이 개발되었다 [62]. 2008년에는 피부 관통 후 마이크로니들 그 자체가 분해되어 혼합된 약물을 전달하는 새로운 타입인 생분해성 마이크로니들이 개발되어 서방형 약물전달 소재로써 유용하게 적용되고 있다 [63].

마이크로니들은 그 사용 목적에 따라 의약 및 미용 등의 분야에 널리 적용 가능하며 2010년에는 백신의 경피 전달 시스템으로 각광받으며 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 피부 면역에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 피내 주사 접종 방식이 보다 효과적인 면역반응을 일으킬 수 있음이 밝혀지면서 마이크로니들을 통한 백신 전달 방법이 각광을 받게 되었다. 이는 진피 층이 수직상 세포, 대식세포를 비롯한 많은 면역세포들이 고밀도로 분포되어 있는 영역일 뿐만 아니라 다량의 세포와 체액 교환이 이루어짐으로써 빠른 면역세포 활동이 가능한 구역이기 때문이다. 마이크로니들을 통한 백신 전달 시 진피층에 존재하는 antigen-presenting Langerhans cells과 dermal dendritic cells (DCs)에만 국소적으로 백신을 전달할 수 있기 때문에 보다 향상된 백신 immunogenicity 효과를 보인다는 장점이 있다. 또한 마이크로니들의 무통증 약물 투여를 통해 기존에 근육주사에 대한 두려움을 이유로 인플루엔자 예방접종을 주저하는 이들의 예방접종을 돕고, 궁극적으로 인플루엔자 예방 접종률을 높이는데 기여할 것으로 기대된다 [64].

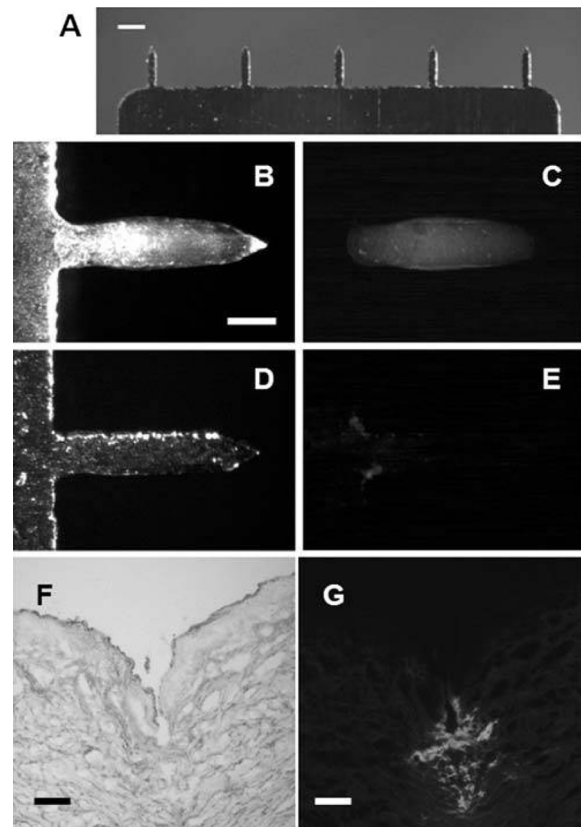


Fig. 4. Influenza vaccine coated microneedle [65].

조지아 공대 (Georgia Tech) 연구팀은 2009년 마이크로니들표면에 인플루엔자 백신을 코팅하여 사용자가 손쉽게 처방할 수 있는 새로운 백신 전달 시스템을 개발하였다 [65]. 스테인레스 스틸 시트를 미세 레이저 가공 과정을 통해 어레이 타입의 마이크로니들을 제작한 후 dip-coating 기기를 이용하여 인플루엔자 백신을 마이크로니들표면에 코팅하였다 (Fig. 4). 또한 코팅 후 약물의 건조 과정 시 인플루엔자 백신의 HA activity를 높이기 위한 보조제로써 trehalose를 사용하였다. 인플루엔자 백신과 Trehalose가 코팅된 마이크로니들은 인플루엔자 백신만 코팅된 마이크로니들과 근육 주사를 통한 백신 전달에 비해 IgG 발현양이 현저히 높게 나타남을 확인하였다. 그러나 사용자가 손쉽게 사용하기 위해서는 피부에 손쉽게 부착할 수 있는 패치 형태의 제품이 적합하나 금속소재질의 마이크로니들 제품은 이에 한계가 있었다.

이러한 단점을 극복하고자 2010년 10월 에모리 (Emory) 와 조지아 공대에서 생분해성 마이크로니들제작기술을 통해 백신이 탑재된 패치 형태의 제품을 개발하였다 [66]. 매우 높은 양의 인플루엔자를 감염시킨 마우스에 백신이 탑재된 생분해성 마이크로니들 패치를 처리했을 때 바이러스의 clearance가 증가되는 것을 관찰하였다. 에모리와 조지아 공대 연구원들은 의약품에 많이 사용되는 water-soluble polymer인 polyvinylpyrrolidone (PVP)로 마이크로구조체를 제작하였으며 (Fig. 5), 이때 비활성인 인플루엔자 백신을 마이크로니들 내에 탑재하였다. 제작된 생분해성 마이크로니들 패치 (650 μm in length)를 피부에 붙이면 수분 내에 마이크로니들이 녹으면서 약 80%의 백신이 내부로 들어가 약효를 나타내게 된다.

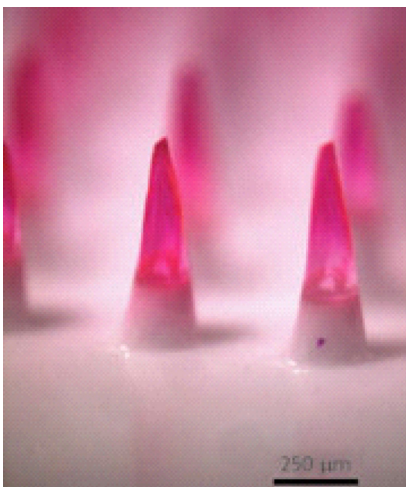


Fig. 5. Influenza vaccine loaded dissolving PVP microneedle [66].

백신이 탑재된 생분해성 마이크로니들 패치를 처리한 마우스는 주사제로 동일한 백신양을 처리한 마우스와 비교했을 시 유사한 항체 반응을 보였다. 특히 치명적인 양의 인플루엔자에 감염시킨 마우스를 90일 후에 생분해성 마이크로니들 패치로 처리하고 근육 주사한 마우스와 비교했을 때 폐에서

바이러스가 1000배나 더 효과적으로 제거된 결과를 얻었다. 이는 생분해성 마이크로니들패치로 처리된 마우스가 근육 주사를 통한 백신 전달 방식에 비해 향상된 면역억제 반응을 보임에 따라 비장과 폐에 있는 항체 발현 세포의 수가 크게 증가하였고 이러한 현상을 통하여 폐에서 바이러스를 효과적으로 제거하였기 때문인 것으로 여겨진다 [66].

생분해성 마이크로니들 이외에도 중공형 마이크로니들을 이용한 백신 전달 제품이 최근 사노피 파스퇴르(주)에서 출시되었다 [67]. ID Flu 라는 제품으로 피내 접종용 인플루엔자 예방백신으로써 기존 바늘 길이의 1/10 수준인, 1.5 mm의 미세 주사 시스템 (Micro-injection System)에 1968년부터 사용되어 효능과 안전성이 입증된 사노피 파스퇴르의 인플루엔자 백신 박씨그리프가 주입된 프리필드 시린지 (Pre-filled Syringe) 제형으로 개발되었으며, 예방접종에 있어 이상적인 부위인 진피 층에 백신을 전달하였다 (Fig. 6).

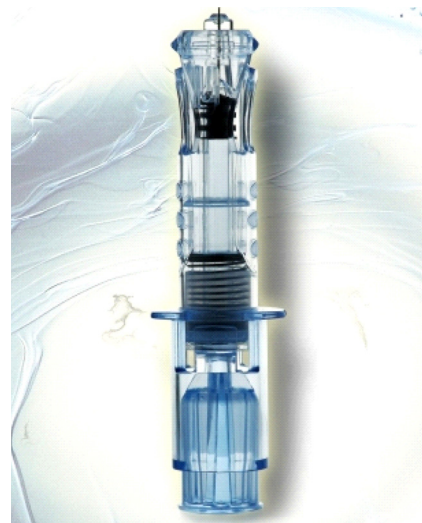


Fig. 6. ID Flu of Sanofi-Pasteur [67].

진피 층의 면역 활성화를 통해 9 μg 의 항원으로도, 15 μg 의 항원을 근육 주사하는 기존의 인플루엔자 예방접종과 동등한 예방효과를 보였으며, 기존의 인플루엔자 예방 접종에 사용되는 피내주사기에 비해 열 배 이상 짧은 1.5 mm 길이의 바늘로 예방 접종에 대한 심리적인 부담을 덜어주는 장점을 가졌다. 2,384명을 대상으로 유해약물반응에 대한 임상실험 결과 피내접종 후 나타나는 외견적 국소 약물유해반응은 근육접종보다 더 자주 나타났으며, ID Flu의 전신약물유해반응의 안전성 비교자료는 근육접종과 유사하였다.

기존에 상용되고 있는 피하주사기 중 가장 적은 통증을 유발하는 인슐린 주사바늘의 외경이 31 G인 반면 ID Flu 주사바늘의 외경은 30 G로써 비슷한 크기를 갖는다. 그에 반해 주사바늘의 길이를 1.5 mm로 축소 제작하여 통증을 줄였지만, 이상적인 중공형 마이크로니들로 적용되기 위해서는 주사바늘의 외경 또한 줄일 수 있는 방법을 모색할 필요가 있다. 또한 ID Flu 제품은 일회용 제품으로써 재사용이 불가능하

므로 기존의 근육주사와 비교하여 소비자가 합리적으로 받아들일 수 있는 가격으로 판매되어야 하며, 기술적 측면에 있어서는 중공형 마이크로니들이 지녀야 할 주사바늘의 견고성, 약물의 정량투여, 통증 최소화를 만족시킬 수 있도록 개선이 되려야 할 것이다.

안점막 투여

최근에는 백신을 주사제가 아닌 점안액 형태로 눈에 투여하여 안점막을 통해 전달할 수 있다는 결과가 발표되었다 [68]. 이 연구에서는 influenza vaccine과 Salmonella vaccine을 쥐의 눈을 통해 투여하여 점안백신을 투여한 쥐에서 주사제 접종시보다 많은 양의 'Ig G'와 'Ig A'가 관찰되고 질병이 예방되는 것을 확인하였다. 또한 이 점안백신은 통증이 없어 주사에 대한 공포로 백신 접종이 쉽지 않았던 아이들도 쉽게 접종이 가능하고, 냉장보관을 해야 하는 주사제와 달리 상온에서 안약형태로 방부제와 같이 혼합해 멸균상태에서 운반, 사용이 가능한 장점도 있다. 이 백신은 또한 기존 코점막에 사용하던 백신이 뇌로 들어가는 부작용이 있었던 것과 달리 뇌에 특별한 영향을 미치지 않았을 뿐만 아니라 가려움이나 염증 등 눈에도 특별한 부작용이 없다고 밝혀졌다. 물론 동물실험만을 통해 밝힌 결과이기 때문에 아직 임상실험을 거쳐 그 안전성이 입증해야 할 것이지만 새로운 백신 전달 방법으로서 주목받고 있는 연구 결과라 할 수 있다.

향후 개발 방향

지금까지 소개된 다양한 백신 전달 방법은 모두 전달 방식, 투여 경로 등 각각의 특성에 맞추어 독자적으로 개발되고 있다. 현재 주로 상용되고 있는 피내 주사법의 단점을 극복하고 보다 이상적인 백신 전달 기술을 개발하기 위해서는 우선 면역효능이 가장 높게 나타나는 진피층을 백신 전달의 최종 목표 부위로 설정하고 진피층에 국소적으로 백신이 전달될 수 있는 기술을 개발해야 할 것이다. 또한 접종되는 백신양의 조절이 가능해야 하며 접종 과정 중 또는 접종이 끝난 뒤 부작용이 없어야 한다. 백신의 면역효능 측면 이외에도 백신접종의 대중화를 위해서는 사용자의 편의성을 고려해야 한다. 이를 해결하기 위해서는 백신 투여에 대한 별도의 교육 없이도 일반인이 쉽게 처방할 수 있어야 하며, 통증을 최소화하고, 비침습적 투여가 가능해야 한다.

최근의 백신 전달기술은 주로 주사바늘을 사용하지 않는 가운데 비침습적 전달 이 가능한 방향으로 개발이 이루어지고 있다. 이러한 비침습적 백신 전달 기술들에 의한 백신접종의 대중화가 이루어 지기 위해선 백신의 효능을 최대로 발현하고 안정하게 체내로 전달하며, 소비자가 손쉽게 처방할 수 있는 전달 기술이 개발되어야 할 것이다. 또한 현재 DNA 백신 연구가 활발히 진행 되고 있으므로 DNA 백신 개발과 동시에 이를 효율적으로 전달 할 수 있는 전달기술 또한 병행하여 개발되어야 할 것이다.

접수 : 2010년 10월 8일, 게재승인 : 2010년 12월 20일

감 사

본 연구는 서울시 산학연 협력사업 (10816)으로 수행된 연구 결과임.

REFERENCES

1. Pier, G. B., J. B. Lyczak, and L. M. Wetzler (2004) *Immunology, Infection, and Immunity*. ASM Press.
2. Janeway, C. A. Jr., P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik (2001) *Immunobiology*. (5th ed.). Garland Publishing.
3. Kantoff, P. W., C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson, C. H. Redfern, A. C. Ferrari, R. Dreicer, R. B. Sims, Y. Xu, M. W. Frohlich, and P. F. Schellhammer (2010) Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Eng. J. of Med.* 363: 411-422.
4. Jennings, G. T. and M. F. Bachmann (2007) Designing recombinant vaccines with viral properties: a rational approach to more effective vaccines. *Curr. Mol. Med.* 7: 143-155.
5. Martin F. B. and T. J. Gary (2010) Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns *Nat. Rev. Immunol.* 10: 787-796.
6. Petrovsky N., S. Heinzel, Y. Honda, and A. B. Lyons (2007) New-age vaccine adjuvants: Friend or foe? *BioPharm International* 20: A24-A33.
7. Hackett, C. J., D. A. Harn, and Jr. (2006) Vaccine Adjuvants: Immunological and Clinical Principles. *Humana Press*.
8. Allison A. C. and N. E. Byars (1991) Immunological adjuvants: Desirable properties and side-effects. *Mol. Immunol.* 28: 279-284.
9. Ahsan, F., I. P. Rivas, M. A. Khan, and A. I. Torres Suarez (2002) Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers - liposomes and microspheres - on the phagocytosis by macrophages. *J. Control. Release* 79: 29-40.
10. Reddy, S. T., A. J. van der Vlies, E. Simeoni, V. Angeli, G. J. Randolph, C. P. O'Neil, L. K. Lee, M. A. Swartz, and J. A. Hubbell (2007) Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nature Biotech.* 25: 1159-1164.
11. Leak, L. V. (1971) Studies on the permeability of lymphatic capillaries. *J. Cell Biol.* 50: 300-323.
12. Swartz, M. A., D. A. Berk, and R. K. Jain (1996) Transport in lymphatic capillaries. I. Macroscopic measurements using residence time distribution theory. *Am. J. Physiol.* 270: H324-329.

13. Edelman, R. (1994) Vaccine adjuvants. *Rev. infect Dis.* 24: 2421-2428.
14. Singh, M. and D. T. O'Hagan (2003) Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J. for Parasitol.* 33: 469-478.
15. Gupta, R. K. (1998) Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 155-172.
16. Lewis, P. A. and D. Loomis (1924) Allergic irritability. The formation of anti-sheep hemolytic amboceptor in the normal and tuberculous guinea pig. *J. Exp. Med.* 40: 503.
17. Akasaki, M., T. Takashi, Y. Kita, and W. Tsukada (1987) Augmentation of immune responses by a muramyl dipeptide analog, MDP-Lys (L18). *Agents Actions* 22: 144-150.
18. Licciardi, P. V. and J. R. Underwood (2010) Identification of a novel vaccine adjuvant that stimulates and maintains diphtheria toxoid immunity. *Vaccine* 28: 3865-3873.
19. Dalsgaard, K. (1978) A study of the isolation and characterization of the saponin quill A. Evaluation of its adjuvant activity, with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and mouth disease. *Acta. Vet. Scand* 69: 1-40.
20. Newman, M. J., Y. J. Wu, B. H. Gardner, K. K. J. Munroe, D. Leombruno, J. Recchai, C. R. Kensiil, and R. T. Coughlin, Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Immunol.* 148: 2357-2362.
21. Pardoll, D. M. (1995) Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 399-415.
22. Bliss, J., V. Van Cleave, K. Murray, A. Wiencis, M. Ketchum, R. Maylor, T. Haire, C. Resmini, A. K. Abbas, and S. F. Wolf (1996) IL-12, as an adjuvant, promotes a T helper 1 cell, but does not suppress a T helper 2 cell recall response. *J. Immunol.* 156: 887-894.
23. Odean, M. J., C. M. Frane, M. Van der Vieren, M. A. Tomai, and A. G. Johnson (1990) Involvement of gamma interferon in antibody enhancement by adjuvants. *Infect Immun.* 58: 427-432.
24. Luis, C., C. Afonso, T. M. Scharton, L. Q. Vieira, M. Wysocka, G. Trinchieri, and P. Scott (1994) The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 263: 235-237.
25. Nohria, A. and R. H. Rubin (1994) Cytokines as potential vaccine adjuvants. *Biotherapy* 7: 261-269.
26. Le, Moignic and Pinoy (1916) Application to man of vaccines consisting of emulsions in fatty substances (lipo-vaccines). *Compt. Rend. Sot. Bio.* 29: 352-358.
27. Gkick, R. R. Mischler, B. Finkel, J. U. Que, B. Scarpa, and S. J. Cryz Jr. (1994) Immunogenicity of new virosome influenza vaccine in elderly people. *Lancet* 344: 160-163.
28. Pedersen, I. R., T. C. BØg-Hansen, K. Dalsgaard, P. M. H. Heegaard (1992) Iscom immunization with synthetic peptides representing measles virus hemagglutinin. *Virus Res.* 24: 145-169.
29. Barr, I. G., A. Sjolander, and J. C. Cox (1998) ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 32: 247-271.
30. Morein, B. K. F. Hu, and Abusugra (2004) Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. *Adv. Drug Del. Rev.* 56: 1367-1382.
31. Men, Y., H. P. Merkle, B. Gander, and G. Corradin (1996) Induction of sustained and elevated immune responses to weakly immunogenic synthetic malaria peptides by encapsulation in biodegradable polymer microspheres. *Vaccine* 14: 1442-1450.
32. Zhao, K., G. X. Li, Y. Y. Jin, H. X. Wei, Q. S. Sun, T. T. Huang, Y. F. Wang, and G. Z. Tong (2010) Preparation and immunological effectiveness of a Swine influenza DNA vaccine encapsulated in PLGA microspheres. *J. Microencapsul.* 27: 178-186.
33. Kang, M. L., C. S. Cho, and H. S. Yoo (2009) Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. *Biotechnol. Adv.* 27: 857-865.
34. Lambert, P. H. and P. E. Laurent (2008) Intradermal vaccine delivery: Will new delivery systems transform vaccine administration. *Vaccine* 26: 3197-3208.
35. Kimpen, J. L. and P. L. Ogra (1990) Poliovirus vaccines. A continuing challenge. *Pediatr. Clin. North Am.* 37: 627-649.
36. Dennehy, P. H. (2008) Rotavirus vaccines: an overview. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 198-208.
37. Dalsgaard, K. A. Uttenthal, and T. D. Jones (1997) Plant derived vaccines protects target animals against a viral disease. *Nat. Biotechnol.* 15: 248-252.
38. Sandhu, J. S., S. F. Krasnyanski, L. L. Domier, S. S. Korban, M. D. Osadjan, and D. E. Buetow (2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res.* 9: 127-135.
39. Chikwamba, R., J. Cunnick, D. Hathaway, J. McMurray, H. Mason, and K. Wang (2002) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res.* 11: 479-493.
40. Marquet-Blouin, E., F. B. Bouche, A. Steinmetz, and C. P. Muller (2003) Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.) derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol. Biol.* 51: 459-469.
41. Rols, M. P. (2008) Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues. *Methods Mol. Biol.* 423: 19-33.
42. Escoffre, J. M., T. Portet, L. Wasungu, J. Teissie, D. Dean, and M. P. Rols (2009). What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol.*

- Biotechnol.* 41: 286-295.
43. Bodles-Brakhop, A. M., R. Heller, and R. Draghia-Akli (2009) Electroporation for the Delivery of DNA-based Vaccines and Immunotherapeutics: Current Clinical Developments. *The Am. Soc. of Gene Ther.* 17: 589-592.
 44. Weber, L. W., W. B. Bowne, J. D. Wolchok, R. Srinivasan, J. Qin, Y. Moroi, R. Clynes, P. Song, J. J. Lewis, and A. N. Houghton (1998) Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA. *J. Clin. Invest.* 102: 1258-1264.
 45. Bowne, W. B., R. Srinivasan, J. D. Wolchok, W. G. Hawkins, N. E. Blachere, R. Dyal, J. J. Lewis, and A. N. Houghton (1999) Coupling and uncoupling of tumor immunity and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 190: 1717-1722.
 46. Kalat, M., Z. Kupcu, S. Schuller, D. Zalusky, M. Zehetner, W. Paster, and T. Schweighoffer (2002) *In vivo* plasmid electroporation induces tumor antigen-specific CD8+ T-cell responses and delays tumor growth in a syngeneic mouse melanoma model. *Cancer Res.* 62: 5489-5494.
 47. Liao, J. C., P. Gregor, J. D. Wolchok, F. Orlandi, D. Craft, C. Leung, A. N. Houghton, and P. J. Bergman (2006) Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immun.* 6: 8-24.
 48. Clinical Trials. gov ID NCT00471133.
 49. Chen, M. W., T. J. Cheng, Y. Huang, J. T. Jan, S. H. Ma, A. L. Yu, C. H. Wong, and D. D. Ho (2008) A consensus-hemagglutinin-based DNA vaccine that protects mice against divergent H5N1 influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 13538-13543.
 50. Inovio Pharmaceuticals, Inc. homepage.
 51. Tezel, A., S. Paliwal, Z. Shen, and S. Mitragotri (2005) Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. *Vaccine* 23: 3800-3807.
 52. Glenn, G. M., M. Rao, G. R. Matyas, and C. R. Alving (1998) Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 391: 851-852.
 53. Fechheimer, M., J. F. Boylan, S. Parker, J. E. Sicken, G. L. Patel, and S. G. Zimmer (1987) Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8463-8467.
 54. Ohta, S., K. Suzuki, K. Tachibana, and G. Yamada (2003) Microbubble-enhanced sonoporation: efficient gene transduction technique for chick embryos. *Genesis* 37: 91-101.
 55. Un, K., S. Kawakami, R. Suzuki, K. Maruyama, and F. Yamashita (2010) Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy. *Biomaterials* 31: 7813-7826.
 56. Jackson, L. A., G. Austin, R. T. Chen, R. Stout, F. DeStefano, G. J. Gorse, F. K. Newman, O. Yu, and B. G. Weniger (2001) Safety and immunogenicity of varying dosages of trivalent inactivated influenza vaccine administered by needle free jet injectors. *Vaccine* 19: 4703-4709.
 57. Giudice, E. L. and J. D. Campbell (2006) Needle-free vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv.* 58: 68-89.
 58. Weniger, B. G. (2004) New high speed jet injectors for mass vaccination: pros and cons of DCJIs versus MUNJIs. *WHO initiative for vaccine research: Global Vaccine Research Forum*, Montreux, Switzerland.
 59. Mumper, R. J. and Z. Cui (2003) Genetic immunization by jet injection of targeted pDMA coated nanoparticles. *Methods* 31: 255-266.
 60. Williams, C. G. (2000) Poliomyelitis: extinct by year 2000: But not over. *AAOHN J.* 48: 25-31.
 61. Laurent, P. E., S. Bonnet, P. Regolini, P. Alchas, J. A. Mikszta, R. Pettis, and N. G. Harvey (2007) Evaluation of the clinical performance of new intradermal vaccine administration technique and associated delivery system. *Vaccine* 25: 8833-8842.
 62. Henry, S., D. V. McAllister, M. G. Allen, and M. R. Prausnitz (1998) Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 87: 922-925.
 63. Lee, J. W., J. H. Park, and M. R. Prausnitz (2008) Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. *Biomaterials* 29: 2113-2124.
 64. Kenney, R. T., S. A. Frech, L. R. Muenz, C. P. Villar, and G. M. Glenn. (2004) Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N. Engl. J. Med.* 351: 2295-2301.
 65. Dimitrios, G. K., M. del P. Martin, V. G. Zarnitsyn, S. P. Sullivan, R. W. Compans, M. R. Prausnitz, and L. Skountzou (2009) Transdermal influenza immunization with vaccine-coated microneedle arrays. *PLoS ONE* 4: e4773.
 66. Sullivan, S. P., D. G. Koutsonanos, M. del P. Martin, J. W. Lee, V. Zarnitsyn, S. O. Choi, N. Murthy, R. W. Compans, L. Skountzou, and M. R. Prausnitz (2010) Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nature Med.* 16: 915-920.
 67. Laurent, P. E., S. Bonnet, P. Alchas, P. Regolini, J. A. Mikszta, R. Pettis, and N. G. Harvey (2007) Evaluation of the clinical performance of a new intradermal vaccine administration technique and associated delivery system. *Vaccine* 25: 8833-8842.
 68. Seo, K. Y., S. J. Han, H. R. Cha, S. U. Seo, J. H. Song, S. H. Chung, and M. N. Kweon (2010) Eye Mucosa: An Efficient Vaccine Delivery Route for Inducing Protective Immunity. *J. Immunol.* 185: 3610-3619.