(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 513 218**

(51) Int. Cl.:

A61N 1/30 (2006.01)
A61N 1/32 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2008 E 08767759 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2148721**

(54) Título: **Dispositivo y método para electroporación in vivo de aguja única**

(30) Prioridad:

18.05.2007 US 804703
20.08.2007 US 894653

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2014

(73) Titular/es:

INOVIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
660 W. Germantown Pike, Suite 110
Plymouth Meeting, PA 19462, US

(72) Inventor/es:

KJEKEN, RUNE;
MATHIESEN, IACOB;
TJELLE, TORUNN ELISABETH y
MCHUGH, GEORGE

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 513 218 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y método para electroporación in vivo de aguja única

Este invento se refiere a la electroporación de células in vivo, particularmente células de tejidos de un paciente. Más específicamente, el invento se refiere a nuevos dispositivos y métodos para entregar moléculas a células situadas en, cerca y/o junto a un lugar de huella o traza de inserción predeterminado de un electrodo de aguja única. Aún más específicamente, el invento se refiere a la entrega por electroporación de sustancias a células a lo largo y en la proximidad de la huella de la aguja hecha por inserción del electrodo desde la superficie de un tejido y al tejido a una profundidad de desde aproximadamente 3 milímetros a aproximadamente 3 cm, cuyos tejidos pueden comprender cualesquiera tejidos, incluyendo sin limitación la piel, epidermis, dermis, hipodermis, tejido conectivo, musculatura estriada y lisa a través de todas las capas de tejido del cuerpo, mucosa, y órganos.

Antecedentes del invento

La siguiente descripción incluye información que puede ser útil en la comprensión del presente invento. No es un reconocimiento que cualquiera de tales informaciones es técnica anterior, o relevante, a las invenciones actualmente reivindicadas, o que cualquier publicación específica o implícitamente referenciada es técnica anterior.

La electroporación ha sido aplicada para entregar moléculas a tejidos sub-superficiales utilizando distintos diseños de múltiples electrodos tales como agrupaciones de dos o más electrodos que típicamente son diseñados como electrodos de aguja para su inserción en dicho tejido. Generalmente, tales agrupaciones definen una zona de tratamiento que se encuentra entre los electrodos de aguja de la agrupación. Tales zonas de tratamiento comprende por ello un volumen tridimensional de tejido en el que células dentro de la zona de tratamiento son expuestas a un campo eléctrico de una intensidad suficiente para causar una formación de poros temporal o reversible, o incluso a veces una formación de poros irreversible, de las membranas de las células a aquellas células que se encuentran dentro y o cerca del volumen tridimensional.

Prácticas corrientes para electroporar células en tejido incluyen el uso de tensiones o voltajes significativos con el fin de impartir a través de la zona de tratamiento tridimensional un campo eléctrico relativamente uniforme. Por "relativamente uniforme" se quiere decir que las líneas eléctricas de fuerza coincidentes con la aplicación de un impulso eléctrico bastan para causar la formación de poros son impartidas a través de las células algo uniformemente a través de todo el volumen de la zona de tratamiento tridimensional. Últimamente, un gran número de agujas de electrodo combinadas con grandes volúmenes de inyección y campos eléctricos elevados han sido necesarios para asegurar un solapamiento suficiente entre un medicamento inyectado y el volumen de tejido que experimenta el campo eléctrico ya que típicamente, el bolo de inyección que es entregado a los tejidos se distribuye rápidamente desde la zona de inyección. El uso de campos eléctricos elevados y grandes agrupaciones de electrodos tiene varios inconvenientes. Por ejemplo, el uso de muchas agujas y un campo eléctrico elevado (tensiones) provoca más dolor mientras que el volumen de inyección elevado hace difícil controlar la dosificación ya que causa residuos del medicamento (la mayor parte del medicamento no está llegando a las células ya que estará fuera de la zona de tratamiento). También, el uso de tales dispositivos de múltiples agujas es engorroso y una causa de aprehensión desde el punto de vista del paciente.

El documento US 6778853 describe un dispositivo para manipular una molécula in vivo con relación a un tejido objetivo incluyendo al menos un miembro alargado que tiene al menos dos electrodos activables discreta y separadamente separados por un material aislante interpuesto entre ellos.

Además del aspecto invasivo de un dispositivo con múltiples agujas, las técnicas típicas de electroporación, como se ha establecido antes, dan como resultado la variabilidad de electroporación de las celdas dentro de una zona de tratamiento. Este es un inconveniente para el uso médico de la electroporación porque la dispersión de las moléculas de tratamiento del bolo inyectado en el tejido circundante da como resultado pérdida de control en cuanto a la cantidad de tal molécula de tratamiento que es últimamente transferida a las células dentro de la zona de tratamiento por el evento de electroporación. Así, existe una necesidad en las técnicas de electroporación para un dispositivo y método para estrechar o refinar el control sobre la "dosificación" de moléculas de tratamiento en lugares de entrega específicos y bien definidos dentro del tejido de un paciente. De modo similar, existe aún una necesidad en la técnica para metodologías y dispositivos que puedan electroporar con menos consecuencias invasivas e impartir menos dolor desde el impulso de campo eléctrico empleado en la entrega de sustancias terapéuticas a distintos tejidos incluyendo piel, músculo, mucosa y órganos.

Resumen del invento

El objeto para el que se desea protección es como se ha definido en las reivindicaciones.

En un primer aspecto, este invento proporciona medios para la electroporación de células in situ, particularmente células que están situadas subcutánea, intradérmica, subdérmica y/o intramuscularmente (particularmente músculo esquelético estriado, músculo estriado bajo la piel, músculo cardíaco, y músculo liso). En este aspecto, el invento proporciona medios para la electroporación de células cercanas y/o adyacentes a la huella hecha por inserción de un electrodo de aguja única alargado en el tejido. En realizaciones preferidas, las células que resultan electroporadas utilizando el dispositivo

del invento son las situadas dentro de un radio desde la huella de la aguja en cualquier parte desde entre 0,0 mm a aproximadamente 5 mm o incluso 6 mm de modo que comprenden una zona de tratamiento generalmente cilíndrica impartido por el nuevo diseño de electrodo y pulsación del campo eléctrico impartido al tejido por el electrodo de aguja única cuando es excitado por una alimentación de corriente.

El invento proporciona medios para cualquier disposición estructural adecuada del ánodo o ánodos y cátodo o cátodos en un electrodo de aguja única de acuerdo con el invento tal que hay al menos dos conductores eléctricamente opuestos eléctricamente conductores (es decir al menos un ánodo y al menos un cátodo) situados en asociación con un único vástago alargado, cuyo propio vástago está construido para ser eléctricamente inerte. En una realización dicho electrodo de aguja única puede comprender ánodos y cátodos y un material eléctricamente inerte, tal como plástico o policarbonato aceptable médicamente, que llena el espacio entre los ánodos y cátodos o un revestimiento eléctricamente inerte sobre un material rígido alargado que en sí mismo es eléctricamente conductor, tal como una aguja hipodérmica metálica. En una realización preferida el vástago sobre el que están situados los ánodos y los cátodos puede tener dimensiones en sección transversal de entre aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 1,5 mm.

El electrodo de aguja única comprende una combinación de ánodo y un cátodo alargados opuestos que perforan el tejido espaciados y eléctricamente aislados uno de otro pero sin material inerte entre ellos. En tal realización el ánodo y el cátodo espaciados discurren sustancialmente paralelos entre sí teniendo cada uno un extremo distal y un extremo proximal y estando posicionados uno con relación al otro de tal manera que los extremos distales se encuentran enfrentados uno a otro y los extremos proximales son sujetados uno a otro por un sustrato eléctricamente inerte. En cualquier realización, el ánodo o ánodos y el cátodo o cátodos del electrodo de aguja única que penetra el tejido pueden estar espaciados entre ellos entre aproximadamente 0,05 mm y aproximadamente 1,5 mm.

En una realización relacionada, los propios electrodos pueden tener una longitud expuesta a lo largo del vástago alargado en cualquier lugar desde la longitud total del electrodo de aguja única a solamente una parte del vástago de aguja única, tal como cerca de la punta de penetración del vástago.

En otra realización, los electrodos pueden tener dimensiones en sección transversal de entre aproximadamente 0,005 mm y 0,80 mm o aproximadamente.

Aún en otra realización de disposición estructural, el electrodo de aguja única puede comprender una aguja hipodérmica que comprende al menos dos electrodos alargados espaciados a lo largo de al menos una parte de la longitud de la aguja hipodérmica exterior. Por ejemplo, la aguja hipodérmica puede incluir al menos dos electrodos (es decir, un ánodo y un cátodo) que discurren a lo largo de una parte de la longitud de la aguja. Véase la fig. 10A. En otros ejemplos, pueden formarse múltiples electrodos en el exterior de una aguja de inyección hipodérmica tal como se ha descrito en la fig. 3A que comprende múltiples electrodos rectos y paralelos, o como se ha representado en las figs. 2 y 4 que comprende múltiples electrodos en hélice alrededor de la aguja de inyección. En realizaciones de trabajo, cada ánodo y cátodo está conectado a una fuente de energía eléctrica para generar un campo eléctrico alrededor del vástago de aguja única.

Aún en otras realizaciones, los electrodos de aguja única pueden ser fabricados utilizando cualquier número de métodos bien sabidos, incluyendo grabado y depósito por capas por tecnologías de Sistemas Micro Electromecánicos (MEM). En tales métodos de fabricación, se han utilizado procesos de micro-mecanización para añadir o desnudar capas de sustancias importantes al recocido, aislamiento y conducción apropiados de impulsos eléctricos y circuitos. Las figs. 13A, B, C, D y E son fotografías de la realización en la que los electrodos son grabados sobre el vástago de aguja única de entrega. Específicamente, la formación de capas de electrodo de oro ha sido revestida por encima de una capa de una sustancia inerte, tal como parylene, que por sí mismo ha sido depositado en capas sobre el vástago de la aguja hipodérmica. Métodos adicionales para fabricar los electrodos alargados incluyen tecnologías de extrusión en las que los conductores de ánodo y de cátodo son formados en el vástago de una composición eléctricamente inerte que tiene cualidades aislantes y/o a lo largo del mismo, tal como plástico, un derivado de poliéster, o poli(cloruro de vinilo) (PVC), o fibra de carbono aislante. Como se ha mostrado en la fig. 14A y B, una aguja hueca alargada puede ser extruida con componentes de ánodo y cátodo, tal como por ejemplo alambre bien a lo largo de lados opuestos de un vástago hueco o bien a modo de hélice como se ha mostrado en la fig. 14B.

Además aún, el vástago de la aguja puede también comprender secciones con electrodos no expuestos como se ha descrito en las figs. 10A y B. Por ejemplo, un extremo del vástago de la aguja se conecta a un cubo que forma un conector para conectar a una fuente de fluido, tal como por ejemplo, una jeringuilla. El aislamiento cerca o a lo largo de tal sección del vástago puede proporcionar una disminución adicional de sensación de estímulo eléctrico notable por el paciente. Aún en otra realización con respecto a cualquiera de tales configuraciones de electrodo de aguja única descrita aquí, cada uno de los ánodos y cátodos son individualmente excitables de modo que cualquier combinación de los ánodos y cátodos puede ser excitada a pares (es decir un cátodo y un ánodo) simultáneamente juntos, o en cualquier secuencia dada, y además utilizando cualquier tipo de impulso incluyendo sin limitación monopolar, bipolar, de declinación exponencial, o combinaciones de trenes de impulsos de cualquiera de los anteriores.

En un aspecto relacionado, el invento proporciona medios para utilizar una tensión y/o una corriente relativamente bajas, que a su vez no solo proporciona suficiente energía eléctrica para provocar una formación de poros reversible de células en la zona de tratamiento, sino que también permite un nivel de dolor bajo experimentado por sujetos durante la

aplicación de impulsos eléctricos al tejido que rodea el lugar de la inserción, utilizando dicha aplicación intensidades de campo eléctrico nominales de generalmente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 V, típicamente de entre 5 y 75 V, y más preferiblemente de entre 10 y 50 V. En otro aspecto relacionado, la corriente eléctrica empleada en el dispositivo y métodos del invento utiliza generalmente entre 1-1000 mA (miliamperios), típicamente de entre aproximadamente 10-500 mA, y más preferiblemente de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 250 mA. En una realización relacionada, el amperaje elegido depende de la superficie total de los electrodos. Por ejemplo, el electrodo de aguja única puede emplear un rango de entre 10 a 40, o 25 a 100, o 50 a 150, o 125 a 200, o 175 a 250, o 225 a 300, o 250 a 300, 300 a 400, 400-600, o 600 a 1000 mA dependiendo del área total de cada uno de los ánodos o cátodos. Cuanto menor es el área, menor es el amperaje necesario para conseguir un campo eléctrico de electroporación en el tejido in situ. Pueden ser empleadas secuencias de impulsos de cualquier número de impulsos deseado, duración de impulso, y retardos entre impulsos, prefiriéndose duraciones de impulsos de desde entre 0,1 y 1000 milisegundos, o aproximadamente.

La presente descripción proporciona medios para la entrega de moléculas de tratamiento en solución (es decir composición de líquido terapéutico) de distintas concentraciones (por ejemplo, entre aproximadamente 0,05 µg - 3 mg/ml) y preferiblemente a volúmenes de bolo bajos (por ejemplo generalmente de 1 µl a 1 ml). En una realización relacionada, utilizando una realización estructural que incluye un tubo de entrega asociado con el vástago del electrodo de aguja única, el volumen de la composición líquida terapéutica que contiene las moléculas de tratamiento (también denominadas aquí como "ingredientes activos") inmediatamente después de la inyección al tejido (tal como una inyección controlada en la que lo inyectado es entregado durante la inserción de la aguja) permanece sorprendentemente en un grado sustancial en la proximidad de la huella de inserción del vástago de la aguja. También se ha considerado el uso con respecto a la inyección de material que ha de ser entregado en la proximidad de la huella de la aguja de agujas provistas de aberturas en las que hay uno o más puertos u orificios de entrega espaciados a lo largo de la longitud del vástago del tubo de entrega del electrodo de aguja única (no mostrado pero comprensible para los expertos en la técnica). Las moléculas de tratamiento (es decir los ingredientes activos) se considera que incluyen cualquier medicamento o compuesto terapéutico útil, por ejemplo, pequeñas moléculas, compuestos orgánicos, así como proteínas y péptidos, y también ácidos nucleicos, incluyendo los que codifican la expresión de un péptido, polipéptidos, proteína, o especies de ácido nucleico biológicamente activos (por ejemplo y ARN antisentido, ARN de interferencia, ribocimas, otras especies de ARN catalíticas, etc.) que tienen o bien una actividad bilógica o bien que inducirán una respuesta inmune en el anfitrión una vez que tal polipéptido es expresado en la célula electroporada. Los polipéptidos una vez expresados en la célula están disponibles para interactuar con maquinaria metabólica celular y trayectos de sistema inmune.

Aún en otra realización, la energía eléctrica utilizada para transmitir impulsos al tejido proporciona un campo eléctrico único que es distinto de los campos anteriores aplicados utilizados para la electroporación de tejidos similares. Específicamente, los campos eléctricos de la técnica anterior imparten de manera intencionada e inherente que ha sido reconocido en las técnicas de electroporación como un campo eléctrico "uniforme", que significa que la energía eléctrica aplicada es de intensidad suficiente para impartir una intensidad de campo nominal y una caída de tensión relativamente uniforme a través de la zona de tratamiento creada separando ampliamente los electrodos en una distancia dada unos de otros y colocando la zona de tratamiento objetivo óptimamente centrada entre dichos electrodos espaciados. Tales diseños de agrupación de electrodos cuando son hechos pulsar en el tejido tienden a electroporar células principalmente dentro de la zona rodeada por los electrodos o entre ellos generalmente en la proximidad de las líneas de fuerza eléctricas y en menor grado en una zona de células situada justo adyacente y rodeando la zona de tratamiento tridimensional.

En contraste, el presente invento utiliza campos eléctricos que comprenden un campo generalmente cilíndrico o en forma de columna "no uniforme en que es creado alrededor de la longitud del vástago de aguja única creando por ello una zona de tratamiento de células que se encuentran dentro de un área lo bastante próxima a los ánodos y cátodos colocados centralmente para ser sometidos a un campo de electroporación "exterior" a la posición inmediata de los electrodos, de intensidad suficiente para formar poros en dichas células. Tal zona de tratamiento es completamente externa al vástago de aguja única central y lo rodea y el campo no uniforme se disipa con relación a la distancia hacia fuera desde el vástago de aguja única. Generalmente, se ha comprendido que la energía eléctrica de electroporación se disipa cuando aumenta la distancia desde el electrodo de aguja única, tal como, por ejemplo, disipación a una frecuencia exponencial. Sin embargo, tal velocidad de disipación, si es aplicable, no afecta negativamente al funcionamiento del dispositivo del invento o al resultado pretendido de entregar sustancias a células en una zona definida. Así, como la energía eléctrica necesaria para provocar la formación de poros de la célula se disipa con la distancia desde la fuente del campo eléctrico, el área que rodea el tracto de la aguja que es susceptible de electroporación está confinada de manera inherente a un núcleo central que se correlaciona con la longitud de la huella de la aguja y lateralmente a un radio dado que forma por ello una zona de tratamiento generalmente cilíndrica de radios variables dependiendo de la energía de impulso impartida a los ánodos y cátodos. En otra realización relacionada, cuanto más energía se ha utilizado para provocar el impulso, mayor es el potencial para dañar células directamente en contacto con los electrodos. Es aún otro intento del invento emplear la capacidad para provocar tal daño con el propósito de estimular adicionalmente el sistema inmune. Así, pueden utilizarse regímenes de tratamiento que intencionadamente imparten una energía mayor, en vez de una menor, de modo que proporcionen un estímulo para la actividad de respuesta inmune alrededor del lugar de tratamiento.

En otras realizaciones, el dispositivo puede ser utilizado para entregar medicamentos tales como polipéptidos naturales que tienen una actividad biológica y genes que codifican tales polipéptidos que pueden ser expresados in situ en células

dentro de la zona de tratamiento para tratar desórdenes o para modular una respuesta inmune en el anfitrión y/o para tratar una variedad de enfermedades que incluyen pero no están limitadas a enfermedades causadas por organismos patógenos virus y cánceres.

Otras características y ventajas del invento resultarán evidentes a partir de los dibujos siguientes, de la descripción detallada y de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La memoria contiene al menos una figura ejecutada en color. Se proporcionarán copias con dibujos en color previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

La fig. 1 es un dibujo que representa una aguja hipodérmica con un cátodo y ánodo alargados integrados en ella. La agujas se caracteriza por un puerto u orificio para dispensar una formulación líquida desde un lumen que discurre a su través, y un puerto u orificio para conectarla a un depósito que transporta fluido.

La fig. 2 representa una realización alternativa del dispositivo del invento en el que los ánodos y los cátodos son paralelos entre sí a través de un plano formado en una hélice alrededor de la aguja.

La fig. 3A es otra realización alternativa en la que una aguja de entrega comprende una multiplicidad de electrodos de ánodo y cátodo que discurren rectos y paralelos a lo largo de la longitud de la aguja de entrega. Como también se ha representado, esta figura incluye un ejemplo de un conector para conectar los electrodos a una fuente de energía eléctrica. La fig. 3B representa una vista de la sección transversal de un ejemplo de un electrodo del invento a lo largo de la línea AA. Como se ha mostrado, en una configuración, los electrodos pueden ser depositados en capas por cualesquiera número de técnicas conocidas por los expertos en las técnicas de fabricación en las secciones exteriores de un tubo de entrega y lumen. En el dibujo se ha representado una aguja interior 53 con el lumen 54 rodeado por un material aislante 55 sobre el que son depositados en capas los electrodos.

La fig. 4 es otro ejemplo de una realización que comprende ánodos y cátodos en hélice alrededor de la aguja de entrega. Los ánodos y cátodos así dispuestos en hélice pueden comprender una multiplicidad de pares de ánodo y cátodo, pero típicamente comprenden uno o dos pares, comprendiendo cada par un ánodo y un cátodo.

Las figs. 5A-C representan una realización del invento en la que se ha mostrado el electrodo del invento que comprende otras realizaciones que incluyen un depósito, típicamente un depósito de estilo jeringuilla, y una cubierta punzocortante que es capaz de retraerse cuando la aguja es insertada en un tejido de un paciente. El dibujo muestra también otras características que pueden ser realizadas dentro del dispositivo del invento tales como una membrana elástica que puede ser perforada tal como mediante una aguja para llenar el depósito y mecanismos para permitir que la cubierta punzocortante y el émbolo de la jeringuilla sean mantenidos en su sitio bien en una posición extendida o bien retraída. Además, la cubierta punzocortante reversible también actúa como una guía para la aguja y puede estar provista con topes para actuar como una guía de profundidad. Aunque no se ha mostrado, el electrodo de aguja única puede ser fijado a una jeringuilla y unido a un dispositivo de electroporación de entrega de aguja/entrega de fluido simultánea automática tal como se ha representado en la solicitud de patente Norteamericana US 2004/0059285 y WO 2004/004825. En tal realización, el dispositivo solamente tendría un electrodo de aguja única y una jeringuilla.

La fig. 6 muestra una representación del dispositivo del invento en uso en el que durante la inserción o después de que el electrodo/aguja de entrega sea insertado en el tejido, el material fluido administrado, los ánodos y cátodos son excitados de modo que imparten un campo eléctrico hacia fuera desde la huella de la aguja y al tejido. El campo eléctrico se disipa hacia fuera al tejido desde el lugar de la aguja insertada.

La fig. 7 muestra una vista superior de un tejido hipotético y una representación del campo eléctrico típico que el dispositivo del invento generaría en el tejido que rodea a la huella de la aguja y que tiene dimensiones laterales (a) y (b).

Las figs. 8A-C son dibujos que muestran agrupaciones de la técnica anterior con líneas de fuerza relativamente uniformes típicamente y campos eléctricos correspondientes entre agujas de agrupaciones de electrodos, en oposición a la del invento en el que líneas de fuerza no uniformes y un campo eléctrico respectivo rodean la agrupación y se disipan rápidamente desde la misma. Por ejemplo, la fig. 8A muestra tres electrodos opuestos en una agrupación lineal en la que las líneas de fuerza entre los electrodos son relativamente uniformes. En las figs. 8B y 8C se han representado agrupaciones circulares en las que la zona de tratamiento es central a los electrodos y bajo líneas de fuerza relativamente uniformes y campos eléctricos respectivos (individualmente pulsatorios en pares opuestos, fig. 8B, o pulsatorio en pares de electrodos opuestos en orientaciones diferentes, fig. 8C.

Las figs. 9A-D muestran aún otra realización del dispositivo del invento que comprende una guía para soportar la aguja y el depósito para penetración del tejido que ha de ser tratado en un ángulo agudo para utilizar en métodos que incluyen la entrega de sustancia de tratamiento cerca de la superficie del tejido. Este ángulo es típicamente de entre 3 y 25 grados a partir del plano formado por el área general de la superficie del tejido.

Las figs. 10A y 10B muestran una vista parcial de agujas de entrega que comprende electrodos expuestos cerca de la punta de la aguja de entrega. La fig. 10A representa una aguja que soporta electrodos rectos mientras la fig. 10B

representa una aguja que soporta electrodos en hélice. Los conductores para cada uno de un cátodo y ánodos están representados discurriendo hacia arriba en una sección interna de la aguja. También esta representación está destinada a representar que la parte superior de las agujas alargadas puede comprender aislamiento bien alrededor de los conductores del electrodo y/o revestir el vástago de la aguja superior.

Las figs. 11A y B muestran resultados de electroporación en un tejido en el que las células principalmente cerca de la pista de la aguja han sido afectadas por electroporación. En la fig. 11A hay una serie de fotos que muestran rebanadas de tejido adyacentes mientras que la fig. 11B muestra una aproximación de una rebanada central directamente a lo largo de la huella de la aguja.

La fig. 12 muestra los resultados de una única inyección al músculo del muslo de un conejo de un ácido nucleico que contiene un vector de expresión que codifica una proteína de marcador fluorescente (GFP) utilizando un dispositivo de electroporación de acuerdo con el invento.

Las figs. 13A, B, C, D y E muestran fotografías ampliadas de un prototipo de aguja hipodérmica en el que los electrodos alargados de oro han sido grabados sobre una aguja de inyección hipodérmica estándar utilizando una tecnología de MEMS, es decir micro depósito en capas, y grabado y nuevo depósito en capas de materiales sobre el vástago de la aguja de de base de tal modo que el ánodo y el cátodo comprenden cada uno 1/4 de la circunferencia del vástago de aguja. La fig. 13A muestra una vista de la aguja que representa un largo conductor del electrodo que discurre a lo largo de la longitud de la aguja. En la fig. 13B, se ha mostrado un detalle desde un ángulo que permite una visualización de las secciones terminales tanto del ánodo como del cátodo de oro. La fig. 13C es otra perspectiva que muestra un detalle de las secciones terminales del ánodo y cátodo grabados sobre el vástago de la aguja. Las figs. 13D y E muestran otra realización en la que el ánodo y cátodo fabricados por MEM son 1/16 de la circunferencia del vástago de la aguja.

Las figuras 14A, B y C son dibujos que muestran realizaciones adicionales de un diseño de aguja única en el que en el vástago comprende material eléctricamente inerte tal como por ejemplo, plástico extruido con conductores de electrodos formados en el vástago hipodérmico extruido. La fig. 14A representa un ánodo y cátodo rectos que discurren paralelos al vástago de la aguja. La fig. 14B representa el ánodo y el cátodo en una hélice alrededor del vástago. La fig. 14C representa la sección transversal AA-AA de la fig. 14A que muestra una realización en la que el ánodo y el cátodo del vástago pueden ser conectados a conductores eléctricos posicionados en el cubo de la aguja.

La fig. 15 es un gráfico que muestra el nivel de anticuerpos IgG anti-humana de conejo producidos después del impulso de electroporación utilizando el invento de aguja única (■) frente a no electroporación (▲).

La fig. 16 es un gráfico que muestra el nivel de anticuerpos anti-SEAP de conejo producidos después del impulso de electroporación utilizando el invento de aguja única (■) frente a no electroporación (▲).

Las figs. 17A y B son fotografías que muestran resultados de expresión de proteína fluorescente verde (GFP) después de la inyección de ADN plasmídico que codifica la GFP seguido por no electroporación. En combinación de luz natural y fluorescente, la fig. 17A muestra rebanadas adyacentes de tejido en la proximidad del lugar de huella de inyección/aguja. Las fotos muestran que no hay expresión sin electroporación.

Las figs. 18A y B son fotografías que muestran la combinación de luz natural y fluorescencia verde, o fluorescencia sola respectivamente, en que la inyección de ADN plasmídico que codifica la GFP fue seguida por electroporación llevada a cabo utilizando un electrodo de aguja única que comprende una aguja de calibre 23 y ánodo y cátodos que tienen una anchura de 1/16 de la circunferencia del vástago de la aguja. En este experimento, los electrodos fueron pulsados a una corriente constante de 50 mA.

Las figs. 19A y B son fotografías que muestran la combinación de luz natural y fluorescencia verde, o fluorescencia sola, en que la inyección de ADN plasmídico que codifica la GFP fue seguida por electroporación llevada a cabo utilizando un electrodo de aguja única que comprende una aguja de calibre 23 y ánodo y cátodos que tienen una anchura de 1/16 de la circunferencia del vástago de la aguja. En este experimento, los electrodos fueron pulsados a una corriente constante de 100 mA.

Las figs. 20A y B son fotografías que muestran la combinación de luz natural y fluorescencia verde, o fluorescencia sola, en que la inyección de ADN plasmídico que codifica la GFP fue seguida por electroporación llevada a cabo utilizando un electrodo de aguja única que comprende una aguja de calibre 23 y ánodo y cátodos que tienen una anchura de 1/4 de la circunferencia del vástago de la aguja. En este experimento, los electrodos fueron pulsados a una corriente constante de 50 mA.

Las figs. 21A y B son fotografías que muestran la combinación de luz natural y fluorescencia verde, o fluorescencia sola, en que la inyección de ADN plasmídico que codifica la GFP fue seguida por electroporación llevada a cabo utilizando un electrodo de aguja única que comprende una aguja de calibre 23 y ánodo y cátodos que tienen una anchura de 1/4 de la circunferencia del vástago de la aguja. En este experimento, los electrodos fueron pulsados a una corriente constante de 100 mA.

Las figs. 22A y B son fotografías que muestran la combinación de luz natural y fluorescencia verde, o fluorescencia sola, en que la inyección de ADN plasmídico que codifica la GFP fue seguida por electroporación llevada a cabo utilizando un

electrodo de aguja única que comprende una aguja de calibre 23 y ánodo y cátodos que tienen una anchura de 1/14 de la circunferencia del vástago de la aguja. En este experimento, los electrodos fueron pulsados a una corriente constante de 150 mA.

Las figs. 23A y B son fotografías que muestran la combinación de luz natural y fluorescencia verde, o fluorescencia sola, respectivamente, en que la inyección de ADN plasmídico que codifica la GFP fue seguida por electroporación llevada a cabo utilizando un electrodo de aguja única que comprende electrodos de 1 mm de separación sin realización de entrega de fluido y sin que se encuentre ningún material inerte entre ellos. En este experimento, los electrodos fueron pulsados a una corriente constante de 75 mA.

Las figs. 24A y B son fotografías que muestran la combinación de luz natural y fluorescencia verde, o fluorescencia sola, respectivamente, en que la inyección de ADN plasmídico que codifica la GFP fue seguida por electroporación llevada a cabo utilizando un electrodo de aguja única que comprende electrodos de 1 mm de separación sin realización de entrega de fluido y sin que se encuentre ningún material inerte entre ellos. En este experimento, los electrodos fueron pulsados a una corriente constante de 150 mA.

Las figs. 25A y B son fotografías que muestran la combinación de luz natural y fluorescencia verde, o fluorescencia sola, respectivamente, en que la inyección de ADN plasmídico que codifica la GFP fue seguida por electroporación llevada a cabo utilizando un electrodo de aguja única que comprende electrodos de 1 mm de separación sin realización de entrega de fluido y sin que se encuentre ningún material inerte entre ellos. En este experimento, los electrodos fueron pulsados a una corriente constante de 250 mA.

La fig. 26 es una foto en color de un dispositivo de electroporación Elgen (Innovio, AS, Noruega) equipado con un electrodo de aguja única.

La fig. 27 muestra un gráfico de resultados de títulos que muestran expresión mejorada de títulos de IgG anti-SEAP en grupos que reciben electroporación utilizando el electrodo de aguja única.

La fig. 28 es un gráfico que muestra respuestas inmunes celulares específicas de antígeno en conejos utilizando el dispositivo de aguja única. En el gráfico se han proporcionado el porcentaje de proliferación de PBMC de conejo contra 8 µg/ml (100%) de PHA.

La fig. 29 es un gráfico que muestra la provocación de producción de títulos de anticuerpo IgG anti-hIgG3 de conejo utilizando impulsos a dos tensiones diferentes. * indica $p<0,05$.

Las figs. 30A a H son fotografías en color que muestran rebanadas de tejido de los lugares de inyección del electrodo de aguja única. En las figs. 30A y B se han mostrado campo de luz y fluorescencia respectivamente, sin electroporación. En las figs. 30C y D se han mostrado campo de luz y fluorescencia, respectivamente, en que los impulsos de electroporación han utilizado 8 V. Las figs. 30E y F muestran campo de luz y fluorescencia, respectivamente, en que los impulsos de electroporación han utilizado 15 V, y las figs. 30G y H muestran campo de luz y fluorescencia, respectivamente, en que los impulsos de electroporación han utilizado 25 V.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En una primera realización, el invento comprende un dispositivo para electroporación de tejido in vivo que comprende un vástago hueco hecho de un material capaz de ser insertado en un tejido u órgano biológico in situ y de entregar a su través un medio fluido (es decir, un vástago de aguja de entrega), comprendiendo además dicho vástago al menos dos conductores eléctricos expuestos al menos en parte sobre una superficie exterior de dicho vástago, en el que dichos conductores eléctricos están separados uno del otro y situados paralelos uno con respecto al otro a lo largo de dicho vástago de aguja. Realizaciones para la colocación de los conductores eléctricos pueden emplear una variedad de diseños estructurales. Por ejemplo, conductores eléctricos de ánodo y cátodo pueden ser colocados en asociación con una aguja de entrega que discurren paralelos entre ellos y a la longitud de la aguja de entrega tal como se ha descrito en las figs. 1 y 3, o que son paralelos entre sí pero forman hélice alrededor del vástago de aguja como se ha representado en las figs. 2 y 4. El dispositivo del invento también incluye conductos eléctricos que conectan cada lado de dicho ánodo o ánodos y cátodo o cátodos a una fuente de energía eléctrica en la que dichos conductos eléctricos cuando dicha aguja es insertada en un tejido de un paciente son capaces de ser excitados individualmente, generando un campo eléctrico a las células en una zona de tratamiento que rodea a dicho vástago de aguja suficiente para hacer que las células situadas a lo largo y cerca de una huella hecha por inserción de dicha aguja en dicho tejido resulten con formación de poros de manera reversible de modo que permitan que las moléculas de tratamiento entren en dichas células. Para facilitar la entrega de sustancias a lo largo de los tejidos de la huella de aguja hecha por inserción de la aguja de entrega, el vástago de la aguja comprende una aguja con aberturas que tiene en ella puertos u orificios de entrega a lo largo de la longitud de la aguja, o al menos de una parte de la longitud de la aguja, además o alternativamente en lugar de un puerto u orificio de entrega en el extremo distal del vástago de la aguja.

La fabricación de tal electrodo de aguja única que contiene agujas de entrega de fluido puede ser llevada a cabo por cualquier número de métodos bien conocidos incluyendo la micro-mecanización tal como es comprendida corrientemente como tecnología MEMS. Por ejemplo, una aguja hipodérmica estándar (que puede ser de cualquier calibre tal como calibre 20, calibre 21, calibre 22, calibre 23, calibre 24, calibre 25, calibre 26, calibre 27, calibre 28 y calibre 29) puede ser

revestida con un material eléctricamente inerte seguida por deposición de material eléctricamente conductor tal como oro, seguido a su vez por grabado del material conductor en la orientación deseada sobre la superficie de la aguja. Específicamente, en general el proceso comprende la limpieza del vástago de la aguja hipodérmica en preparación para el depósito de la sustancia inerte, por ejemplo, un polímero que tiene propiedades de adherencia uniforme a superficies, tal como el parylene. Después de desnudar el vástago mecánico, el parylene es depositado, tal como por depósito bajo vacío, sobre la aguja. Esta es su vez diseñada utilizando un láser para depositar material conductor del electrodo, tal como oro, seguido a su vez por la retirada selectiva del oro para formar conductores eléctricos de ánodo y cátodo en un diseño predeterminado del vástago de la aguja. En el presente invento, el uso de tecnologías MEMS proporciona una capacidad para manipular la aguja tridimensional y los revestimientos y grabados a una escala en miniatura. La capacidad para fabricar un electrodo de aguja única es probada por las fotografías de las figs. 13A a E. La fabricación puede también ser llevada a cabo por tecnología de extrusión. Como se ha representado en las figs. 14A-C, en este aspecto los electrodos 202 y 203 (figura 14A) son excluidos como filamentos de fino alambre con una sustancia eléctricamente inerte tal como poli(cloruro de vinilo) o similar de una manera lineal. La punta de la aguja 204 puede ser mecanizada o cortada a una punta de penetración en el tejido y el otro extremo fijada a un cubo o conector 200 que comprende conductores de electrodos 201a y 201b y un accesorio 205 para unión a una fuente de medio fluido. La fig. 14B representa un ejemplo de una realización estructural que comprende una aguja extruida con electrodos y conductores de electrodos 210 y 211 en hélice.

La presente descripción proporciona un método para entregar moléculas a células in vivo que comprende proporcionar a un tejido del paciente que contiene dichas células una aguja de inyección que comprende además al menos dos conductores eléctricos alargados (es decir un cátodo y un ánodo) posicionados a lo largo del vástago de la aguja y al menos un depósito que contiene dichas moléculas en el que dicho depósito y moléculas están en comunicación de fluido con un lumen que discurre a través de dicho vástago de la aguja, inyectando las moléculas en dicho tejido, y excitando los conductores eléctricos con energía eléctrica para proporcionar un impulso eléctrico suficiente para hacer que las células en la proximidad del lugar de inyección y de la huella de la aguja resulten con poros formados de manera reversible, electroporando por ello dichas células para su admisión de dichas moléculas.

En una realización, el dispositivo proporciona medios para electroporación de células en una posición estrechamente definida, particularmente células a lo largo o cerca de la huella hecha por el dispositivo de electrodo de aguja única. En general, las células consideradas dentro del lugar de tratamiento son aquellas células que se encuentran en un radio alrededor de la huella de aguja de aproximadamente 6 a 5 milímetros, más típicamente de aproximadamente 3 mm, e incluso más particularmente de aproximadamente 2 mm y más en particular aproximadamente de 1 mm. En una realización relacionada, la generación de campos eléctricos suficientes para la electroporación de células que comprenden dicho lugar de tratamiento es un campo que se debilita hacia fuera desde el lugar de inserción del electrodo de aguja única situado centralmente de tal modo que el lugar de tratamiento es definido por la incapacidad de la energía pulsatoria para extenderse a los tejidos más allá de una cierta distancia desde el electrodo de aguja única.

En otra realización relacionada, el invento reclama el nuevo uso de una única sonda alargada, que comprende la aguja de inyección y el ánodo o ánodos y cátodo o cátodos, para realizar electroporación in situ de un conjunto de células muy localizadas en el tejido.

En otra realización, el dispositivo del invento puede ser utilizado con cualquiera de una variedad de condiciones pulsatorias eléctricas. Por ejemplo, el electrodo de aguja única puede ser cargado con al menos un impulso de corriente constante del orden de entre 1-1000 mA, típicamente entre 10 -500 mA, y más preferiblemente entre 20 y 250 mA. En otro ejemplo, los electrodos pueden ser cargados con un impulso de tensión del orden de 1 a 100 voltios. Además, el impulso eléctrico puede ser o bien un impulso monopolar o bien un impulso bipolar en el que dicho impulso puede ser una secuencia de un solo, doble o múltiple impulso que tiene distintas características tales como una caída de tensión establecida, trenes de impulsos de forma variable, o impulsos que emplean corriente constante.

En otras realizaciones, el dispositivo y método proporcionan medios para la entrega o transfección de medicamentos farmacéuticos, proteínas, ácidos nucleicos incluyendo ADN y ARN, y modificaciones sintéticas de los mismos, incluyendo ARNi, como son bien conocidos para los expertos en la técnica, a tejidos de pacientes, en particular a células que residen en los espacios subcutáneo, intradérmico, y subdérmico y así como compartimientos musculares esqueléticos y estriados del cuerpo de mamíferos, y órganos incluyendo el corazón, pulmón, páncreas, bazo, hígado, y órganos del tracto alimentario. Una vez transfeccionado con el material seleccionado, las células serán directamente afectadas por la actividad del medicamento, o proteína o ácido nucleico. Cuando son transfeccionados ácidos nucleicos, típicamente tales ácidos nucleicos son empleados para la proteína codificada por ello que puede ser expresada en las células del lugar de tratamiento. Además, las sustancias pueden comprender citoquinas, chemoquinas, y moléculas bioactivas relevantes inmunes incluyendo moléculas activas tales como moléculas reguladoras inmunes seleccionadas del grupo que consiste de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7. IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL12, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, LIF, LT, TGF-E, IFN, TNF-D, BCGF, CD2, o ICAM.

En otra realización, el material que ha de ser entregado a las células puede ser entregado en forma líquida en un volumen de entre 0,01 ml a 1 ml. En una realización el ácido nucleico que codifica un polipéptido puede ser disuelto en cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%. El disolvente exacto, sin embargo, no es crítico para el invento. Por ejemplo es bien conocido en la técnica que otros disolventes tales como la sacarosa son capaces de aumentar la admisión de ácido nucleico en el músculo esquelético. En una realización relacionada, el volumen que ha de ser entregado puede ser

ajustado en relación a la longitud de la aguja (ya que la longitud del vástago de la aguja determinará tanto el volumen de la sustancia que es transportada a su través) como, la huella de la aguja hecha de modo que determine el volumen del espacio disponible para que dicha sustancia llene al ser exprimida a través de la aguja y a la huella de la aguja y al tejido circundante. Por ejemplo, una aguja de 2 mm de longitud puede ser utilizada para entregar sustancias a los tejidos de la capa de piel y proporcionar medios para una inyección de un volumen del orden de 0,01 ml a 0,05 ml, mientras que puede ser utilizada una aguja de 5 mm de longitud para entregar volúmenes del orden de 0,1 ml a 0,15 ml, y una aguja de 1,5 a 2 cm de longitud puede ser utilizada para entregar volúmenes del orden de 0,3 ml a 0,5 ml.

Otras sustancias pueden también ser transfeccionadas al mismo tiempo con la molécula de interés para una variedad de razones beneficiosas. Por ejemplo, la molécula P199 (Iee y col, PNAS., 4524-8. 10, 89 (1992)), que es conocida para cerrar herméticamente membranas electropermeabilizadas, puede afectar de manera beneficiosa las eficiencias de transfección aumentando la tasa de supervivencia de fibras musculares transfeccionadas.

Con referencia a la fig. 6, por ejemplo, el electrodo de aguja única es insertado en un tejido paralelo a una profundidad de penetración deseada. El émbolo de la jeringuilla unida es activado para inyectar el volumen de líquido que contiene el material seleccionado para inyección, y los conductores eléctricos (es decir ánodos y cátodos) son inmediatamente después de ello, o alternativamente de modo simultáneo con la inyección de material, excitados con al menos un impulso de energía eléctrica suficiente para causar que al menos algunas de las células en la zona de tratamiento resulten con poros formados de manera reversible. Aunque el émbolo de la jeringuilla es activado típicamente utilizando medios animados, tales como mediante el uso de la mano, la jeringuilla puede también ser fijada a un dispositivo de sujeción tal como se ha descrito en la fig. 9, o incluso un aparato dispensador automático, tal como un dispositivo descrito en la solicitud de patente Norteamericana US 2004/0059285 presentada el 3 de Julio de 2003 (Véase la fig. 26).

En otras realizaciones, el invento puede ser aplicado a electroporación de células en distintas profundidades desde la superficie de un tejido corporal. Por ejemplo, además de la electroporación de células que residen dentro de los compartimientos del tejido muscular en el que la entrega de sustancias es iniciada por inyección de materiales en el tejido en una orientación que se aproxima a 90 grados desde la superficie del tejido, en una realización el dispositivo del invento puede ser utilizado para electroporar células en los espacios subcutáneo, intradérmico, o subdérmico de la piel. Puede también ser utilizado para electroporar sustancias en nodos linfáticos, o capas de tejido en otros órganos tales como tejido cardíaco y de vasos sanguíneos. Con respecto a la electroporación de células en cualquiera de estos locales, el uso del dispositivo para electroporar células en tales capas de tejido puede incluir el uso o bien de agujas cortas que tienen una longitud suficiente para penetrar las partes exteriores de las capas de tejido (es decir, piel, subdérmica, etc.) para inyección y electroporación a aproximadamente un ángulo de 90 grados con la superficie del tejido, o cuando una aguja de entrega es relativamente larga, tal como entre 3 y 4 cm, la inserción del electrodo de aguja única puede ser hecha en un ángulo agudo al tejido superficial utilizando un dispositivo de sujeción como se ha representado en la fig. 9A. Esto permitirá la electroporación de una parte mayor de tejido dentro de la capa deseada. Además, el ángulo agudo de inserción puede ser de entre 3 a 25 grados de ángulo desde la superficie del tejido. Tal superficie de tejido puede ser descrita como formando generalmente una superficie plana que forma un plano que abarca el lugar de inserción del electrodo de aguja única. Como se ha representado en las figs. 9A a D, la jeringuilla puede ser conectada a un medio de unión que está diseñado para contener la jeringuilla en un ángulo establecido sobre una bandeja de guía plana 100 con la aguja colocada a una distancia establecida X del tejido como se ha determinado basándose en la profundidad de inserción deseada predeterminada de la aguja en el tejido. La bandeja de guía, con la aguja expuesta, es llevada a contacto con la superficie del tejido de tal modo que la aguja se inserta en el tejido en el ángulo agudo prescrito. Después de que la aguja es así insertada y la sustancia terapéutica expelida desde la jeringuilla, los conductores eléctricos del electrodo de aguja única pueden ser excitados para provocar la entrega del material inyectado a las células subcutáneas, intradérmicas, o subdérmicas. El uso del dispositivo en un ángulo oblicuo como se ha descrito anteriormente puede también aplicarse a la electroporación de distintas capas de tejido orgánico.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos han sido dados para ilustrar distintas realizaciones que han sido hechas del presente invento. Ha de comprenderse que los siguientes ejemplos no son comprensivos o exhaustivos de los muchos tipos de realizaciones que pueden ser preparadas de acuerdo con el presente invento.

Ejemplo I

Volviendo ahora a distintos aspectos del invento, el dispositivo puede comprender componentes de depósito 20 de entrega de moléculas y de electrodo 10 de aguja única como se ha mostrado, por ejemplo, en (fig. 5). Realizaciones adicionales incluyen una cubierta punzocortante 11, una membrana elástica 12 que cierra herméticamente una parte de la estructura que comprende el depósito 20 para usos en el llenado del depósito (tal como mediante perforación de una aguja de jeringuilla), y mecanismos tales como hoyuelos 13 y rebajes 14 y 14* en la estructura de alojamiento del depósito 20 para mantener la cubierta punzocortante 11 en una posición semifija o bien de abierta/retraída (fig. 5C) o bien de cerrada/cubierta (figs. 5A y B). Otras realizaciones incluyen mecanismos para mantener el émbolo 9 en una posición semifija abierta/retraída o cerrada/expelida, tal como, por ejemplo, hoyuelos 15 y rebajes 16 y 16*. Debe estar claro para un experto en la técnica que independientemente del método empleado para proporcionar medios para un posicionamiento semifijo de la cubierta punzocortante 11 y del émbolo 9, tal posicionamiento puede ser cambiado fácilmente o bien con energía animada, tal como fuerza manual, o mecánicamente, tal como mediante un accionador

accionado electrónicamente. El extremo distal de la cubierta punzocortante 11 puede incluir unida de modo desmontable a ella una cubierta o tapa de esterilidad 60. La aguja 10 de electrodo de aguja única además puede comprender un lumen que discurre a su través terminando en una punta 22 perforadora de tejido, y un orificio 25 para conectar al depósito 20 (Véase fig. 1). La aguja 10 de electrodo de aguja única puede ser de un calibre comprendido entre los tamaños de calibre 18 y 29 de aguja hipodérmica estándar. En una realización preferida, el electrodo de aguja única comprende al menos un par de conductores eléctricos, tales como los conductores 21a y 21b de la fig. 1. Los conductores eléctricos comprenden al menos un ánodo y un cátodo que están en comunicación eléctrica con conductores eléctricos 24a y 24b. Dependiendo del diseño elegido para cualquier producto particular del invento, los conductores pueden terminar en un terminal de conductor 23 (véanse figs. 3 y 4 por ejemplo), o conectarse por cualesquiera otros medios con alambres conductores que discurren desde el electrodo de aguja única a una fuente de energía eléctrica, tal como un generador de impulsos. El componente 10 de aguja puede además incluir un conector 26 (figs. 3 y 4) para unir a un depósito de jeringuilla hipodérmica, o a un depósito de jeringuilla fijado con un mecanismo de bloqueo para sujetar de manera que se puede separar el componente 10 de aguja a un puerto u orificio de jeringuilla hipodérmica.

En otras realizaciones, el depósito 20 puede ser fabricado con una sustancia predeterminada para tratar una condición particular. Alternativamente, el depósito puede ser llenado con una sustancia de interés bien extrayendo tal sustancia al depósito a través de la aguja 10 de electrodo estirando del émbolo 9, o bien preferiblemente, el depósito puede en primer lugar ser liberado del émbolo retrayendo el émbolo a la posición abierta seguido por la entrega al depósito de la sustancia inyectándola al depósito mediante un cierre hermético elástico 12, de modo similar al procedimiento corrientemente realizado en la extracción de medicamentos desde viales estériles a jeringuillas e introduciéndolos en otro depósito.

El electrodo 10 de aguja única con su agrupación de ánodos y cátodos (tales como conductores eléctricos 21a y b, 31a y b, 51a y b, 52a y b, o 41 y 42, figuras 1-4, respectivamente) puede ser insertado en el tejido, usualmente en un ángulo aproximado de 90° con la superficie del tejido, o alternativamente en un ángulo agudo con respecto a la superficie del tejido, y la sustancia inyectada en la huella de las agujas y tejidos locales. El electrodo de aguja única puede ser excitado utilizando un generador de impulsos bien después de la inyección de dicha sustancia, o bien puede ser excitado simultáneamente con dicha inyección de sustancia. Como se ha representado en la fig. 6, cuando es excitado con un impulso eléctrico, el electrodo de aguja única soporta la generación de un campo eléctrico 20 que proporciona suficiente energía para provocar la formación de poros reversible de las células dentro de dicho campo. El campo eléctrico generado es no uniforme porque se cree que disminuye exponencialmente por la distancia desde la huella 80 de la aguja (fig. 7). Así, el campo eléctrico suficiente para proporcionar tal formación de poros tiene, dependiendo de la energía empleada, dimensiones laterales simétricas (a) x (b) (mostradas en la fig. 7) que forman un diámetro establecido de un campo eléctrico de electroporación que, con respecto a la longitud de la huella de la aguja, forma un volumen tridimensional definido. En general, el campo eléctrico suficiente para la formación de poros tiene un radio desde la aguja 10 de electrodo de aguja única de entre 0 mm y 5 mm e incluso de 6 mm, típicamente entre 0 mm y 4 mm, y preferiblemente entre 0 mm y 3 mm y más preferiblemente entre 0 mm y 2 mm.

Como será comprendido por aquellos que tienen experiencia en las técnicas de electroporación, el campo generado por el electrodo de aguja única del presente invento, de modo diferente a los aparatos de electroporación anteriores, es un campo eléctrico no uniforme en el que la intensidad de campo es mayor cerca de la aguja y disminuye cuando se mide hacia fuera desde el electrodo de aguja única. En contraste con la disposición de electrodo actual, la fig. 8 representa disposiciones de electrodo anteriores en las que un campo eléctrico uniforme es empleado a través de un lugar de tratamiento de gran volumen. El presente invento es distinto de manera mensurable de los conceptos anteriores que han sugerido una necesidad de utilizar un campo "uniforme". Así, el invento emplea un campo no uniforme que proporciona una formación de poros reversible de células en una mayor cantidad cerca de la posición de la aguja de entrega, es decir, el tracto de la aguja. Esto a su vez permite un beneficio claro para determinar la posición precisa de aquellas células que definen una dosis conocida de materiales terapéuticos. Este invento a través de sus realizaciones proporciona por ello medios para "ajustar" del campo eléctrico al lugar de inyección de modo que se distribuya material a las células de manera más uniforme y confinada al área de tejido local en oposición a la distribución variable permitida para sistemas de electroporación que utilizan un campo eléctrico uniforme convencional y una agrupación exterior de electrodos.

Con respecto a los conductores eléctricos en general, pueden comprender cualquier metal pero preferiblemente son de un metal que no imparte toxicidad debido a los iones metálicos a las células del tejido electroporado. Tales materiales incluyen oro, tungsteno, nitruro de titanio, platino, platino iridio, y óxido de iridio. El material del electrodo puede ser formado sobre el tubo de entrega (es decir aguja de inyección) de tal modo que hay una capa de aislamiento entre los electrodos y el tubo de entrega como se ha sugerido en la fig. 3B. Alternativamente, la aguja puede comprender un material que es no conductor en sí mismo eliminando una necesidad específica de aislar los conductores eléctricos del tubo de inyección. En este aspecto, el tubo de entrega puede ser construido a partir de cualquier material adecuado para inserción en un tejido in situ que no sea conductor, incluyendo, tal como una cerámica, o plástico biocompatible endurecido, incluyendo poli(cloruro de vinilo) o similar.

En otra realización, el componente de aguja de entrega/electrodo puede estar diseñado de tal modo que los conductores eléctricos 90 ó 101 (fig. 10) son expuestos a electroporación sólo cerca de la punta de la aguja como se ha representado en las figs. 9A y 10A y B. Las partes sin exponer 91 y 102 de los conductores eléctricos pueden estar aisladas y discurrir

a lo largo del exterior o interior de la aguja de entrega a la aguja. Específicamente, cuando se desea posicionar el volumen de tratamiento definido (definido por las dimensiones del campo eléctrico de electroporación impartido al tejido por la agrupación de conductores eléctricos) en un tejido en particular, con la intención de evitar la electroporación de otros tejidos, conductores eléctricos, tales como los descritos en la fig. 10, puede ser utilizado, por ejemplo, para la electroporación de tejido muscular profundo y evitar otros tejidos que se encuentran más cerca de la superficie del tejido, tales como capas de celda grasas, o alternativamente para la electroporación de tejidos cerca de la superficie, tal como por ejemplo, tejidos subdérmicos, como se ha sugerido en la fig. 9A. Tales realizaciones proporcionan un control adicional sobre la colocación y tamaño del volumen de tratamiento.

Ejemplo II

En este ejemplo, se han representado resultados para entregar moléculas por formación de poros reversible a células situadas a lo largo y cerca de la huella formada por la inserción del electrodo de aguja única del invento en un tejido.

Como se ha representado en las figs. 11A y B, se inyectó el músculo del cuádriceps del conejo con ADN que codifica beta-galactosidasa en un bolo que comprende 0,2 ml y con una concentración de ADN de 1 mg/ml. Los electrodos fueron alimentados pulsatoriamente utilizando 2 impulsos de 250 mA, de 20 ms de duración. Después de electroporación, el gen de beta-galactosidasa fue expresado en células afectadas por la electroporación. Al 4º día después de la electroporación, los conejos fueron sacrificados y los músculos fueron preparados en rebanadas de 3 mm de grosor a través del lugar en inserción del electrodo de aguja única. Después de fijación química, expresando la beta-galactosidasa células en la rebanadas del músculo donde fueron visualizadas por una reacción enzimática. Las flechas en la fig. 11A representan la dirección de la inserción del electorado en el músculo del conejo. Como se ha mostrado, ocurre un estancamiento predominantemente a lo largo de la huella formada por inserción en el tejido del electrodo.

Ejemplo III

Este ejemplo describe experimentos que emplean un dispositivo de electroporación de acuerdo con realizaciones del invento para entregar ADN que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) en el músculo del cuádriceps del conejo. Los resultados están mostrados en la fig. 12.

Conejos machos blancos de Nueva Zelanda, cada uno de los cuales pesaba de 4-5 Kg (Perry Scientific, San Diego, California), fueron inyectados cada uno con un vector de expresión (gWizGFP, lote 12311, comprado en Aldevron, LLC, Fargo, ND; véase también Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, California) que codifican una GFP brillante (Cheng, y col., (1996),biotecnología Nature, vol. 14:606-9) cuya expresión estuvo bajo el control de un citomegalovirus humano modificado inmediatamente antes del promotor/mejorador.

Antes de la inyección, cada conejo fue sedado en el lugar con acepromacina (1mg/Kg) y a continuación anestesiado por inyección intramuscular de una mezcla de ketamina (35 mg/Kg) y xilacina (5 mg/Kg) en presencia de glicopirrolato (0,01 mg/Kg), que había sido previamente administrado para impedir un latido desigual del corazón como resultado del tratamiento con ketamina/xilacina. El conejo fue a continuación afeitado en el lugar donde se llevó a cabo la inyección, es decir, en el músculo del cuádriceps. Se hizo un agujero en la piel que cubre el músculo insertando en primer lugar una aguja de calibre 18, y a continuación ensanchándolo ligeramente con un escalpelo. Un dispositivo de electroporación de aguja única que comprende una aguja hipodérmica de calibre 18 con dos conductores eléctricos paralelos (ánodo y cátodo) aplicados en oposición uno con otro a la superficie exterior de la aguja (como se ha representado en la fig. 1), fue a continuación insertado lentamente en tejido muscular, haciendo pausas periódicamente para inyectar ADN cada pocos milímetros a una profundidad de inserción final de aproximadamente 25 mm. Se inyectó un total de 500 µl de solución que contiene ADN que contiene 100 µg gWizGFP en cada lugar de inyección. Poco tiempo después de completar la inyección mientras el dispositivo de electrodo de aguja única estaba aún insertado a su profundidad de inserción final, se comenzó la electroporación. Específicamente, se aplicaron cinco impulsos de 250 mA, cada uno de veinte milisegundos (ms) de duración, al dispositivo de aguja de electroporación a intervalos de 10 Hz (es decir 100 ms) utilizando un Elgen 1000 (Innovio AS, Oslo, Noruega) de impulso de corriente restringida.

Cuatro días después del tratamiento se sacrificaron los animales del modo más humano. La piel que cubre la región de la pata donde fue depositado el vector fue cuidadosamente retirada, después de lo cual cada animal fue colocado a -20º C durante aproximadamente 1 hora. El músculo tratado se retiró entonces usando un escalpelo y después se colocó a -20º C por otras 1 a 2 horas. El tejido muscular congelado fue entonces seccionado en rebanadas de aproximadamente 3 mm de grueso utilizando un cortador de carne giratorio. La rebanadas musculares fueron dispuestas en bandejas de plástico y examinadas para expresión de GFP utilizando un microscopio de disección Leica MZ 12 provisto con una combinación de luz UV y filtro de GFP. La fig. 12 es una foto representativa de los resultados obtenidos por este análisis, y muestra claramente que un dispositivo de electroporación de acuerdo con el invento puede ser utilizado para entregar satisfactoriamente un agente, por ejemplo un vector de expresión basado en ácido nucleico que codifica una proteína deseada que es a continuación expresada en forma activa, a las células.

Ejemplo IV

En este ejemplo, los datos para el cual han sido mostrados en las figs. 15 y 16, utilizando la configuración del electrodo del invento, se electroporaron plásmidos que codifican SEAP (pSEAP#3 348, Aldevron) e IgG (pLNOH 2hg3 #11765, Aldevron) en células de tejidos de animales de ensayo (es decir inyección intramuscular en el tibial anteriores del animal)

y la expresión vigilada para aprobar el éxito de la expresión en el músculo del conejo así como medir las respuestas inmunes contra un antígeno "semana' y uno 'fuerte" (SEAP e IgG, respectivamente). En estos experimentos los plásmidos SEAP e IgG fueron administrados a una concentración final de 1 µg/µl.

Los animales utilizados fueron conejos machos blancos de Nueva Zelanda de 3,5 a 4,5 Kg. Se llevó a cabo la electroporación utilizando un Elgen 1000 (Innovio AS, Oslo, Noruega Número de Serie 009) que además comprendía un generador de impulsos de corriente restringida (prototipo) y un electrodo de aguja única en el que los conductores eléctricos (ánodo y cátodo) discurrían paralelos a la longitud del vástago de la aguja y separados, debido al diámetro de la aguja de aproximadamente 1mm. El electrodo de aguja única fue alimentado con impulsos durante una longitud de impulso de 20 ms con 5 impulsos cada uno a 150 mA con un intervalo de 250 ms entre impulsos (es decir una frecuencia de aproximadamente 4 Hz). El ánodo y el cátodo extendidos al tejido a aproximadamente 1,0 cm de profundidad.

Los experimentos comprende cada uno un proceso de entrega de dos pasos, es decir inyección de la solución plasmídica (200 µl) utilizando una jeringuilla de insulina de calibre 29 con inyección durante la inserción de la aguja para distribuir el ADN a diferentes profundidades, seguida por la retirada de la aguja del inyector e inserción del electrodo de aguja única.

Como se ha mostrado en la Tabla I siguiente, cada uno de los experimentos de IgG y SEAP tenía dos grupos de animales de ensayo, es decir un conjunto de animales que reciben electroporación y el otro no (control).

Tabla I

Grupo	Corriente	Tratamiento
1	150-250 mA	100 µl x 2 SEAP 1 mg/ml, 100 µl x 2 tibiales izquierdos, IgG 1 mg/ml 100 µl x 2 tibiales derechos
2	No EP	100 µl x 2 SEAP 1 mg/ml, 100 µl x 2 tibiales izquierdos, IgG 1 mg/ml 100 µl x 2 tibiales derechos

Se tomaron muestras los días 0, 14 y el día 21. Los conejos fueron a continuación muertos el día 21 con inyección subcutánea de 0.5 ml de hypnorm (Hypnorm 0,1 ml/Kg) seguida por inyección intravenosa de 1 ml/Kg de fenobarbital al 10% en la vena de la oreja.

Como queda claro a partir de los resultados de las figs. 15 y 16, los niveles de títulos de anticuerpos provocados a partir del electrodo de aguja única están lejos en exceso del control negativo. Específicamente, los dos antígenos de ensayo (IgG y SEAP) provocaron títulos uno con relación al otro como se ha esperado con el IgG que es un antígeno mucho más fuerte que el SEAP (véase escala de títulos). Ambos antígenos provocaron producción de anticuerpos en las muestras electroporadas y virtualmente sin producción de anticuerpos en las muestras no electroporadas.

Ejemplo V

En este experimento, los electrodos de aguja única prototipo fabricados por MEMS fueron ensayados en tejido del conejo utilizando una variedad de energías pulsatorias y una expresión de proteína fluorescente verde. Como se ha indicado en la Tabla II, fueron ensayadas tres realizaciones de electrodo diferentes, (1) un electrodo de aguja única en el que el ánodo y los cátodos fueron aplicados a una aguja de calibre 23 en 1/16 de la circunferencia de la aguja cada uno, y aplicados a la longitud completa de la aguja por tecnología MEM (figs. 13D-E), (2) un electrodo de aguja única en el que el ánodo y el cátodo son 1/4 de la circunferencia del vástago de la aguja cada uno (figs. 13A-C), y (3) un electrodo de aguja única en el que el ánodo y el cátodo están separados 1 mm sin tubo de entrega de medio fluido u otro material entre ellos. Como se ha mostrado en la Tabla II, fueron realizadas las distintas combinaciones de impulsos.

El protocolo utilizado para cada animal en este experimento comprendía inyectar el plásmido de GFP a las concentraciones indicadas, electroporar el tejido utilizando uno de los tres electrodos de aguja única de las realizaciones anteriores, seguido por el sacrificio de los animales y realizar la preparación del tejido cortando en rebanadas el músculo tratado en rebanadas adyacentes y observando la fluorescencia. Generalmente, debido a la dificultad de cortar en rebanadas el tejido de modo que se recuperen rebanadas paralelas a la huella de inyección, las fotos en la figura de la fluorescencia de GFP se muestran a menudo como círculos o elipses. Estos diseños de fluorescencia prueban que el electrodo de aguja única es funcional y proporciona medios para la electroporación de tejido a tensiones muy bajas y corrientes eléctricas relativas en posiciones definidas que rodean la huella de la aguja dentro del tejido.

Tabla II

Diseño de electrodo	Lugar del tejido	Corriente constante	Tensión (media V)	Número de impulsos	Concentración/volumen de ADN de pGFP
Electrodos de vástago de 1/4 de circunferencia	Cuádriceps	0,0	0,0	0,0	0,2 mg/ml
Electrodos de vástago de 1/16 de circunferencia	Cuádriceps	50 mA	8	2	0,2 mg/ml
	Cuádriceps	100 mA	18	2	0,2 mg/ml
Electrodos de vástago de	Cuádriceps	50 mA	11	2	0,2 mg/ml

1/4 de circunferencia	Cuádriceps	100 mA	15	2	0,2 mg/ml
	Cuádriceps	150 mA	20	2	0,2 mg/ml
	Cuádriceps	250 mA	33	2	0,2 mg/ml
Electrodos con 1 mm de separación sin realización de entrega de fluido	Tibial	75 mA	13	2	1,0 mg/ml
	Tibial	150 mA	18	2	1,0 mg/ml
	Tibial	250 mA	28	2	1,0 mg/ml
	Cuádriceps	150-200mA	20	2	1,0 mg/ml
	Cuádriceps	250-500 mA	40	2	1,0 mg/ml
	Cuádriceps	600-1000 mA	50	2	1,0 mg/ml

Las figs. 17A y B muestran fotografías tanto con luz natural como con luz fluorescente, respectivamente, de la expresión de GFP después de la inyección de ADN plasmídico que codifica GFP sin electroporación. Como se ha indicado, no hay virtualmente expresión de proteína fluorescente verde. Así, está claro que sin electroporación no hay suficiente admisión y expresión del gen deseado.

Con respecto a la electroporación in situ utilizando la separación de 1/16 de anchura del ánodo y cátodo alrededor del vástago de la aguja, la capacidad para expresar la GFP electroporada está mostrada en las figs. 18A y B y 19A y B. Las figs. 18A y B muestran los resultados de expresión de GFP al producirse la electroporación con una corriente constante de 50 mA, mientras que las figs. 19A y B muestran electroporación a 100 mA.

Para la expresión de GFP utilizando el electrodo de aguja única de 1/4 de circunferencia, los resultados son proporcionados en las figs. 20A y B, 21A y B, y 22A y B, en que la electroporación fue llevada a cabo utilizando 50, 100 y 150 mA, respectivamente.

La expresión de GFP fue también ensayada utilizando una realización en la que el electrodo de aguja única no comprendía un tubo de entrega de fluido asociado con los electrodos. Como se ha mostrado en las figs. 23A y B, 24A y B, y 25A y B, esta realización del dispositivo del invento fue ensayada a 75, 150, y 250 mA cada una a corriente constante. Aquí, la cantidad de GFP plasmídica fue cinco veces la concentración de los experimentos mostrados en las figs. 19-22. Consecuentemente, la zona de tratamiento aparece más fácilmente.

Ejemplo VI

En este ejemplo, se diseño un experimento similar al del Ejemplo IV. Sin embargo, tanto los títulos de anticuerpos como las respuestas de las células resultantes fueron evaluadas de manera consecutiva para la consistencia de datos.

En este experimento el dispositivo de aguja única comprendía una aguja de inyección hipodérmica de calibre 23 x 38 mm estándar. El ánodo y el cátodo de la aguja fueron aplicados mediante tecnología de MEM con una separación de 1/4 de uno a otro alrededor del vástago de la aguja. El dispositivo de aguja única fue montado sobre una jeringuilla de 1 ml estándar seguido por inyección de ADN plasmídico intramuscularmente antes de la entrega de impulsos eléctricos mediante el mismo electrodo de aguja única.

Conceptos plasmídicos para el experimento fueron gWiz-SEAP, que expresan fosfatasa alcalina placentaria secretada (SEAP) bajo el control humano del promotor/mejorador de CMV (obtenido en Aldevron LLC, Fargo, ND).

En los conejos machos de Nueva Zelanda (3,0-4,0 Kg), se estimularon los músculos cuádriceps con el ADN y se electroporaron. Específicamente cada grupo comprendía seis animales que recibían cada uno una inyección por estímulo. Los animales fueron de nuevo potenciados por un segundo tratamiento de electroporación después de 2 semanas. En cada inoculación, se inyectaron 400 µg de gWiz-SEAP en 200 µl de solución salina por lugar de tratamiento en cada conejo seguido por electroporación a través del mismo electrodo de aguja única. El impulso eléctrico en cada caso de estimulación y potenciación comprendía 2 impulsos a corriente constante de 125 ó 250 mA que corresponde aproximadamente a 15 V ó 25 V, longitud del impulso 60 ms, intervalo de 250 ms entre los impulsos lo que da aproximadamente una frecuencia de 4 Hz. Un grupo de animales recibía electroporación utilizando una combinación de tensiones alta y baja (HL) en un tren de impulsos, es decir 50 V durante 200 µs seguido por 10 V durante 200 milisegundos.

Se recogieron muestras de sangre para detección de anticuerpo anti-SEAP a las 2, 3, 4, 5 semanas después de la primera inmunización por sangrados de la arteria de la oreja. La expresión de títulos anticuerpo de conejo (IgG anti-SEAP de conejo) en el suero fue analizada por ensayos por inmunoabsorción ligados a la enzima (ELISA) conducidos como se han descrito bien en las técnicas inmunológicas.

Los resultados mostraron un título de suero de IgG anti-SEAP mejorado después de vacunación con ADN con electroporación en cuádriceps de conejo. Específicamente, los conejos fueron estimulados y potenciados en 2 semanas con gWiz-SEAP en ausencia o presencia de electroporación con 125 mA, 250 mA o tensiones alta y baja (HL, 50 V/200 µs y 10 V/200 ms). En la fig. 27 los datos procedentes de conejos individuales fueron agrupados a partir de dos experimentos idénticos, con un valor medio indicado por una barra horizontal. El curso del tiempo de los títulos de suero anti-SEAP está mostrado para grupos que no reciben electroporación, que reciben electroporación de 125 mA,

electroporación de 250 mA, y un grupo que utiliza los impulsos de tensión alta y baja. Los títulos de anticuerpos son significativamente más elevados que los de la inyección de ADN sin electroporación (*indica p<0,05).

La respuesta inmune celular de EP mejorada en conejos utilizando un electrodo de aguja única fue también mostrada como se ha exhibido en la fig. 28.

Para medir las respuestas inmunes celulares se recogieron muestras de sangre 2 semanas después de potenciación en tubos de recogida heparinizada con sodio (BD), y se aislaron los PBMC por centrifugación por gradiente de densidad utilizando Histopaque1077 (Sigma) y a continuación cultivadas en $2x10^5$ células/pozo en placas de 96 pozos utilizando RPMI-1640 completo durante 3 días al tiempo que se estimulaba con 2,5 µg/ml de SEAP. Al final del cultivo, se añadieron 25 µl de reactivo de Celltiter 96 Acuoso (Promega) a cada pozo y se incubaron durante 2-4 horas, seguido por la lectura de la absorbencia a 490 nm. Se realizaron ensayos por triplicado y los valores están mostrados como media ± S.D. de porcentaje de proliferación contra 40 µg/ml de PHA. * Indica significativamente mayor (p<0,05) que la del control negativo y grupos de ADN/sin electroporación.

Los resultados del experimento indican que comparado con una inyección de ADN sola, con respecto a las respuestas inmunes celulares, la EP in vivo utilizando el dispositivo de aguja única del presente invento aumenta la proliferación de linfocitos en 2 ó 3 veces. Esto es comparable sobre la tecnología de inmunización actual conocida, que proporciona potencialmente ventajas sustanciales para provocar inmunidad sobre los métodos y dispositivos utilizados actualmente.

Ejemplo VII

En este experimento, se ensayó aún otro antígeno para la provocación de producción de anticuerpos en un animal de ensayo para mostrar que el electrodo de aguja única es capaz de electroporar células lo suficiente para ocasionar respuestas inmunes apropiadas. Aquí, el concepto de antígeno IgG3 humano, pLNOH2hg3-hk-IEd (Aldevron, ND), que expresa el IgG3 humano, fueron utilizados para inmunización plasmídica de modo que para ensayar la reacción de anticuerpos contra el IgG3 humano. En este experimento, el músculo cuádriceps de conejos machos de Nueva Zelanda de 3-4 Kg fue estimulado el día 0 y potenciado el día 14. El ADN plasmídico de IgG3, disuelto en solución salina, fue inyectado los días 0 y 14 seguidos cada uno por impulsos utilizando el mismo electrodo de aguja única como se ha descrito en el ejemplo VI. Las cantidades de ADN plasmídicas utilizadas fueron de 100 µg de pLNOH2hg3-hk-IED en 200 µl de solución salina.

Se recogieron muestras de suero a las 2, 3, 4, 5 semanas después de la primera inmunización por sangrados de la arteria de la oreja. La expresión del título de anticuerpos de conejo (IgG3 de IgG anti-humana de conejo) en suero fue analizada por ensayos por inmunoabsorción ligados a la enzima (ELISA) conducidos como se ha descrito bien en las técnicas inmunológicas.

Los resultados mostraron títulos de suero de IgG3 de IgG anti-humana mejoradas después de la vacunación con ADN con electroporación en cuádriceps de conejo. Específicamente, los conejos fueron estimulados y potenciados a las 2 semanas con pLNOH2hg3-hk-IED en ausencia o presencia de electroporación con 125 mA, 250 mA o tensiones alta y baja (HL, 50 V/200 µs y 10 V/200 ms). En la fig. 29, se agruparon datos procedentes de conejos individuales a partir de dos mediciones idénticas con el valor medio indicado por una barra horizontal. El curso del tiempo de los títulos de suero de IgG3 de IgG anti-humana de conejo están mostrados para grupos que no reciben electroporación, los que reciben electroporación a 125 mA, electroporación a 250 mA, y grupo que utiliza los impulsos de tensión alta y baja. Los títulos de anticuerpos son significativamente más elevados que los de la inyección de ADN sin electroporación (*indica p<0,05).

Ejemplo VIII

En este conjunto de experimentos el diseño de expresión del transgen fue examinado en el músculo del conejo después de una transfección mejorada de Electroporación a diferentes niveles de corriente utilizando el mismo electrodo de aguja única que se ha descrito en el ejemplo VI y VII.

Los conceptos plasmídicos para el experimento fueron gWiz-GFP, que expresa la proteína fluorescente verde bajo el control humano del promotor/mejorador de CMV (obtenido en Aldevron LLC, Fargo, ND).

En músculos cuádriceps de conejos machos de Nueva Zelanda (3,0-4,0 Kg) se inyectaron con el ADN y fueron electroporados. En cada tratamiento, se inyectaron 200 µg de gWiz-GFP en 200 µl de solución salina por lugar de tratamiento en cada conejo seguido por electroporación a través del mismo electrodo de aguja única. El impulso eléctrico en cada caso de estimulación y potenciación comprendía 2 impulsos a corriente constante de 75, 125 o 250 mA correspondientes a 8 V, 15 V o 25 V, longitud del impulso de 60 ms, intervalo de 250 ms entre los impulsos lo que da aproximadamente una frecuencia de 4 Hz.

A los conejos se les aplicó eutanasia y fueron sacrificados el día 3, y los músculos fueron tomados y seccionados a un grosor de 1,5 mm para análisis de imagen utilizando el microscopio de fluorescencia Olympus OV-100 (objetivo 0,14x).

Los resultados de este experimento muestran que la expresión de GFP en cuádriceps de conejo mejoró dramáticamente con la inyección de ADN seguida por electroporación utilizando el electrodo de aguja única. Como se ha mostrado en las figs. 30A y 30B (campo de fluorescencia y luz combinados y fluorescencia solamente, respectivamente), el músculo de

un cuádriceps inyectado con ADN sólo sin electroporación seguido por expresión de GFP no dio expresión detectable de ADN.

Sin embargo, cuando la inyección de ADN fue seguida por electroporación utilizando cualquiera de dos impulsos de 60 ms a 8 V, 12,5 V, o 25 V, la expresión de GFP fue claramente visible a través de cuatro rebanadas continuas de aproximadamente 1,5 mm de grosor correspondientes a un cilindro o área transfeccionada de forma generalmente cilíndrica de 4-8 mm de diámetro x 20 mm de longitud correspondiente a la longitud de la huella de la aguja. Se han mostrado ejemplos representativos en Electroporación a 8 V (figs. 30C (luz/fluorescencia combinadas) y 30D (fluorescencia solamente), electroporación a 15 V (figs. 30E (luz/fluorescencia combinadas) y 30F (fluorescencia solamente)) y electroporación a 25 V (figs. 30 G (luz/fluorescencia combinadas) y 30H (fluorescencia solamente)).

La totalidad de las composiciones y métodos descritos y reivindicados aquí puede ser hecha y ejecutada sin experimentación indebida a la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y métodos de este invento han sido descritos en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y métodos y en las operaciones o en la secuencia de operaciones del método aquí descrito sin salir del marco del invento. Más específicamente, las realizaciones descritas han de ser consideradas en todos los aspectos solamente como ilustrativas y no restrictivas. Todos los sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica son considerados como que están dentro del marco del invento según ha sido definido por las reivindicaciones adjuntas.

Todas las patentes, solicitudes de patente, y publicaciones mencionadas en la memoria son indicativas de los niveles de aquellos expertos en la técnica a la que pertenece el invento.

El invento se ha descrito aquí ilustrativamente y puede ser puesto en práctica de manera adecuada en ausencia de cualesquiera elementos no específicamente descritos aquí. Así, por ejemplo, aquí en cada caso cualquiera de los términos " que comprende", "que consiste esencialmente de", y "que consiste de" puede ser sustituido con cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que han sido empleados son utilizados como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de que el uso de tales términos y expresiones impliquen la exclusión de ningún equivalente de las características mostradas y descritas en su totalidad o en parte de las mismas, pero se reconoce que son posibles distintas modificaciones dentro del marco del invento reivindicado. Así, debe comprenderse que aunque el presente invento ha sido descrito específicamente por realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos aquí descritos, y que tales modificaciones y variaciones se consideran que están dentro del marco del invento que ha sido definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un electrodo (10) de aguja única para electroporación reversible de tejido in vivo, que comprende:

a. un tubo de entrega hueco alargado capaz de penetrar un tejido corporal, en el que el tubo de entrega comprende al menos un ánodo y al menos un cátodo (21a, 21b, 31a, 31b, 41, 42, 51a, 51b, 90, 101) dispuestos en al menos una parte de una superficie exterior de dicho tubo de entrega; y

b. conductos que pueden ser eléctricamente conductores capaces de conectar dicho ánodo y dicho cátodo (21a, 21b, 31a, 31b, 41, 42, 51a, 51b, 90, 101) a una fuente de energía eléctrica;

caracterizado por que el ánodo y el cátodo son alargados y están separados y eléctricamente aislados unos de otros y situados paralelos uno con respecto al otro, y además caracterizado por que el tubo de entrega es una aguja con aberturas que tiene puertos u orificios de entrega a lo largo de la longitud de la aguja, en el que cuando dicho tubo de entrega es insertado en el tejido y cuando dicho ánodo o ánodos y dicho cátodo o cátodos (21a, 21b, 31a, 31b, 41, 42, 51a, 51b, 90, 101) son excitados por dicha fuente de energía, se genera un campo eléctrico para la electroporación de células de manera reversible en una zona de tratamiento que rodea a dicho tubo de entrega de modo que permita que dichas células admitan un ingrediente activo en una composición fluida entregada a través de dicho tubo de entrega.

2, El dispositivo según la reivindicación 1 en el que dicho tubo de entrega comprende una aguja hipodérmica dimensionada al calibre de una aguja de inyección seleccionada del grupo que consiste de calibre 20, calibre 21, calibre 22, calibre 23, calibre 24, calibre 25, calibre 26, calibre 27, calibre 28 y calibre 29.

3. El dispositivo según la reivindicación 2 en el que dicho tubo de entrega tiene una longitud de entre 3 mm y 1,5 cm.

4. El dispositivo según la reivindicación 2 en el que dicho tubo de entrega tiene una longitud de entre 1,0 y 3 cm.

5. El dispositivo según la reivindicación 1 en el que dicho tubo de entrega está aislado eléctricamente de cada ánodo y cátodo (21a, 21b, 31a, 31b, 41, 42, 51a, 51b, 90, 101).

6. El dispositivo según la reivindicación 5 en el que dicho ánodo y dicho cátodo (31a, 31b, 41, 42) están enrollados en hélice alrededor de dicho tubo al tiempo que mantienen una relación paralela entre sí en un plano en hélice alrededor de dicho tubo de entrega.

7. El dispositivo según la reivindicación 1 que comprende un depósito expandible o contraíble.

8. El dispositivo según la reivindicación 7 en el que dicho depósito tiene una capacidad de volumen variable seleccionada del grupo que consiste de 0,0 a 0,5 ml, 0,0 a 1 ml, 0,0 a 3 ml, y 0,0 a 5 ml.

9.El dispositivo según la reivindicación 1 que comprende además una fuente de energía eléctrica en que dicha fuente de energía eléctrica es un generador de impulsos de electroporación.

10. El dispositivo según la reivindicación 1 en el que dicho tejido comprende un tipo de tejido corporal u órgano seleccionado del grupo que consiste de piel, tejido subcutáneo, tejido intradérmico, tejido subdérmico, músculo esquelético, músculo estriado, músculo liso, órganos, corazón, seno, pulmón, páncreas, hígado, bazo y mucosa.

11. El dispositivo según la reivindicación 9 en el que dicha fuente de energía eléctrica es suministrada por un generador que es pulsatorio de tal modo que la tensión nominal por impulsos sea de entre 1 a 200 V.

12. El dispositivo según la reivindicación 9 en el que dicho generador es pulsatorio a una corriente constante del orden de desde 1 a 1000 mA.

13. El dispositivo según la reivindicación 12 en el que dicho margen de corriente constante es seleccionado del grupo que consiste de entre 10 y 40, 25 y 100, 50 y 150, 125 y 200, 175 y 250, 225 y 300, 250 y 300, 300 y 400, 400-600, y 600 a 1000 mA.

14. El dispositivo según la reivindicación 9 en el que dicho generador es pulsatorio a una frecuencia seleccionada de entre el margen de 1 a 10.000 Hz.

15. El dispositivo según la reivindicación 9 en el que dicho generador es pulsatorio a una duración de tiempo de entre aproximadamente 0,1 μs a 1000 ms.

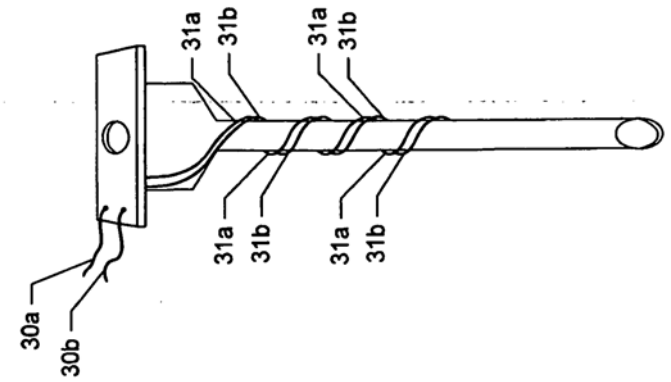

Fig. 2

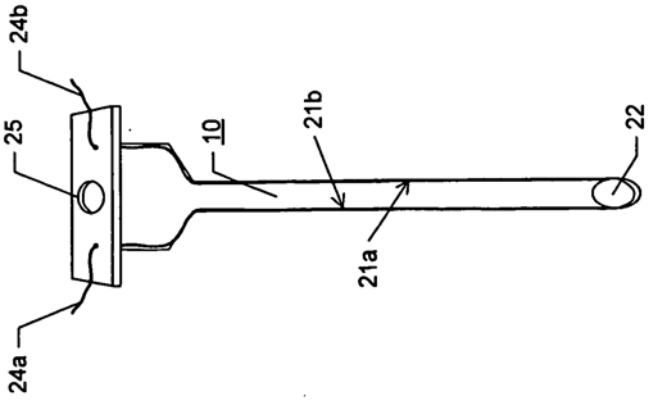

Fig. 1

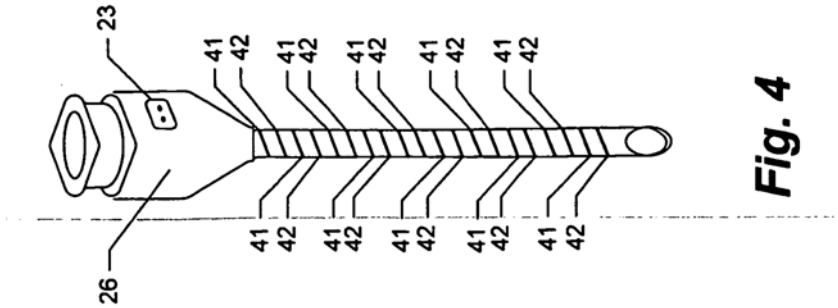

Fig. 4

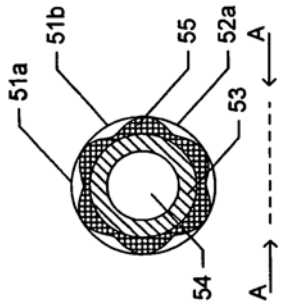

Fig. 3B

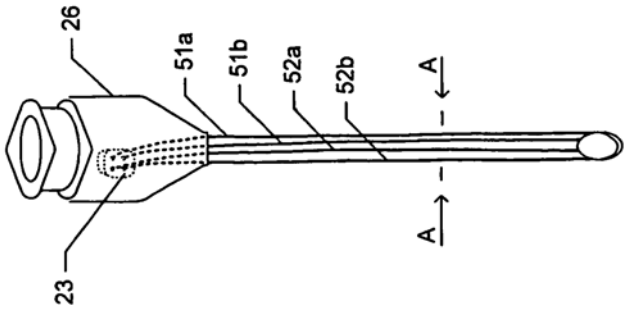

Fig. 3A

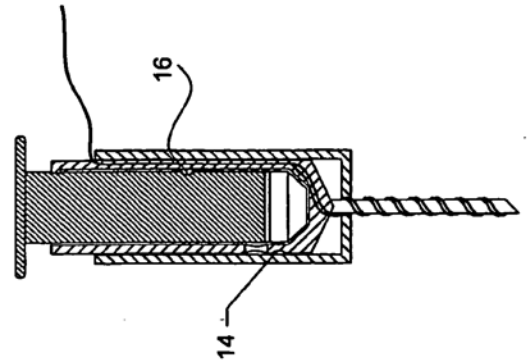

Fig. 5C

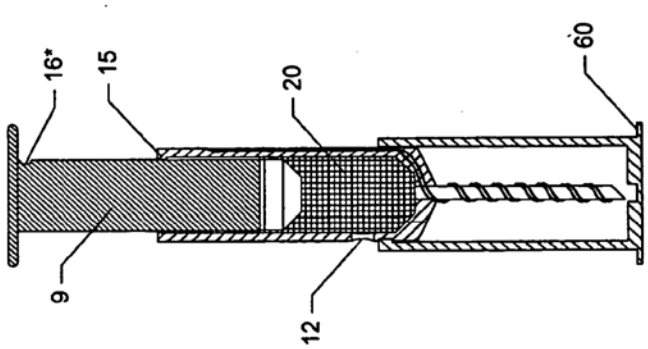

Fig. 5B

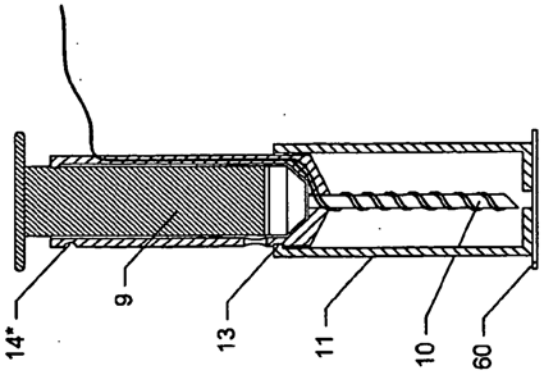

Fig. 5A

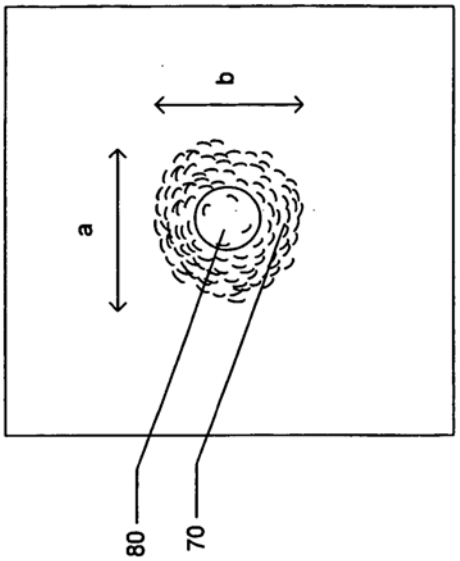

Fig. 7

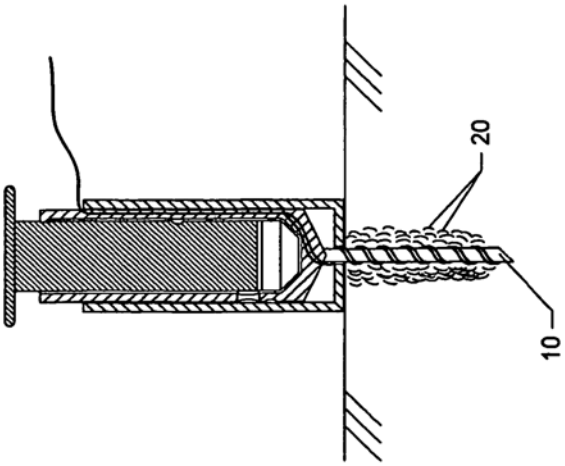

Fig. 6

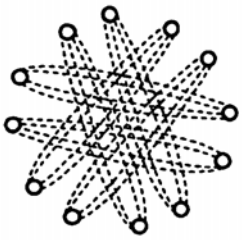

Fig. 8C

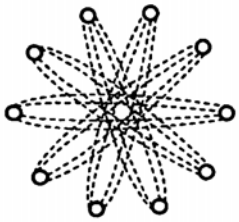

Fig. 8B

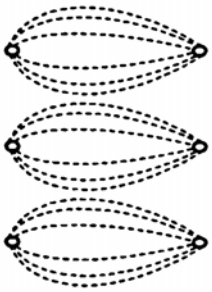

Fig. 8A

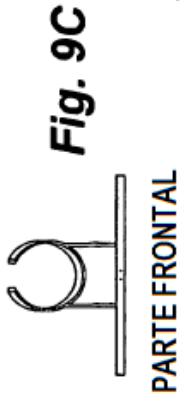

Fig. 9C

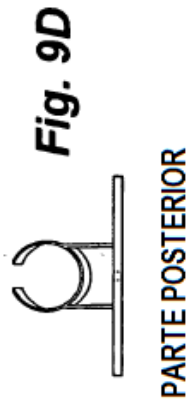

Fig. 9D

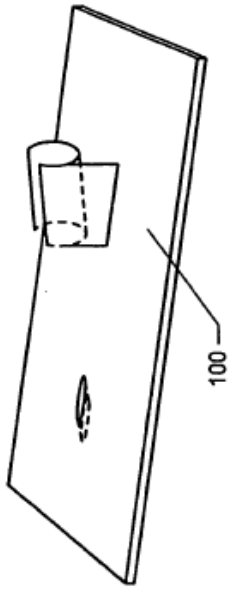

Fig. 9B

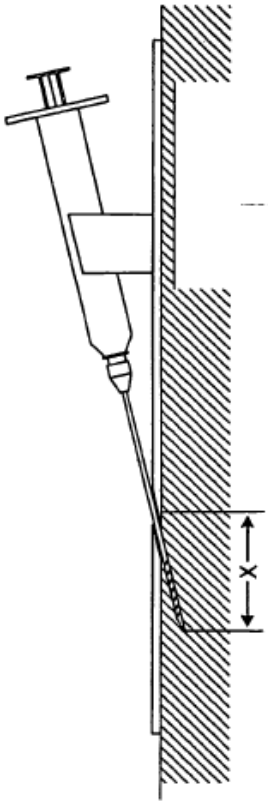

Fig. 9A

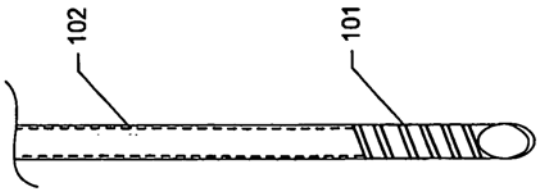

Fig. 10B

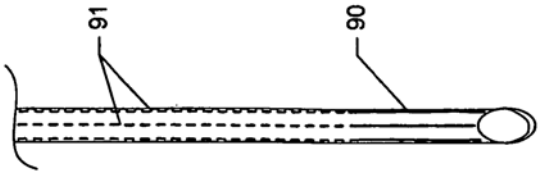

Fig. 10A

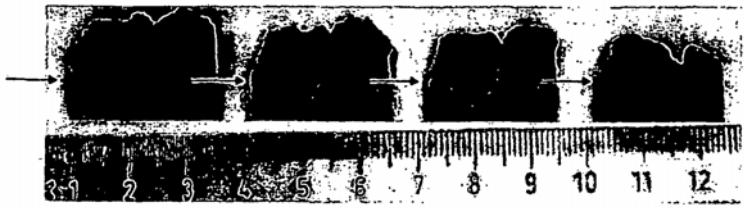

Fig. 11A

Fig. 11B

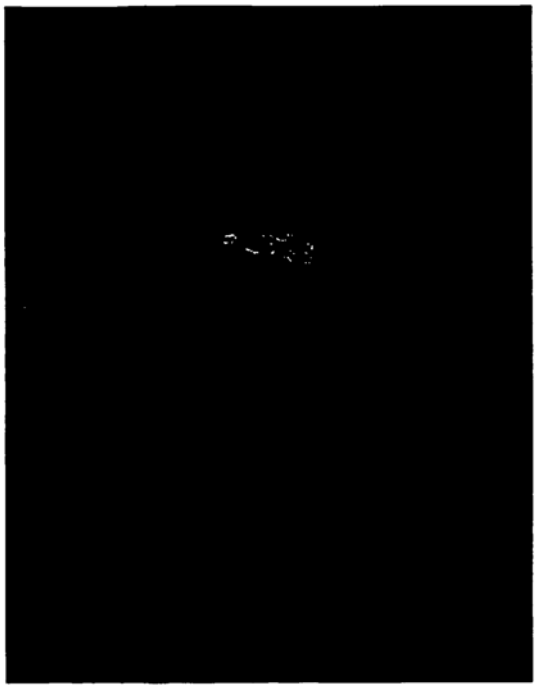

Fig. 12

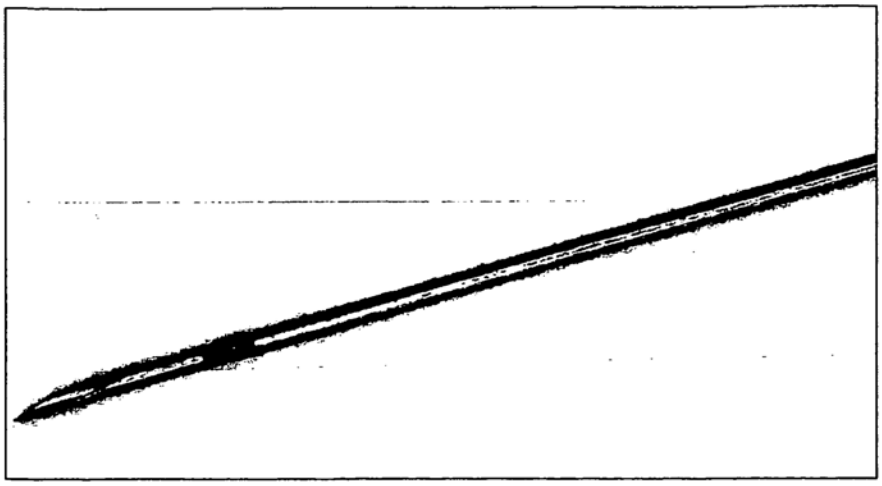

Fig. 13A

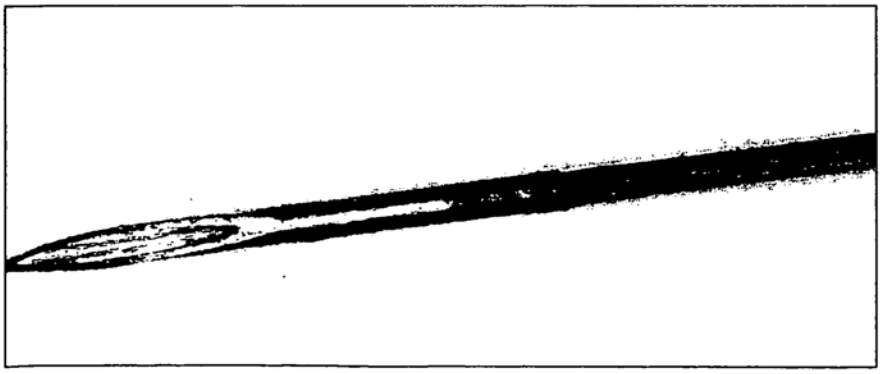

Fig. 13B

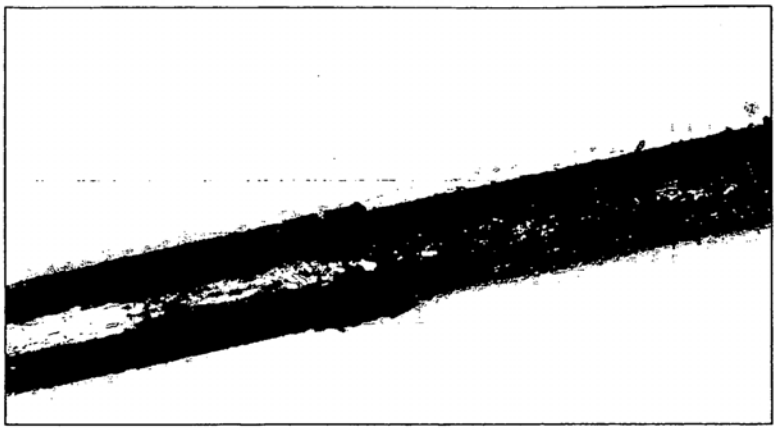

Fig. 13C

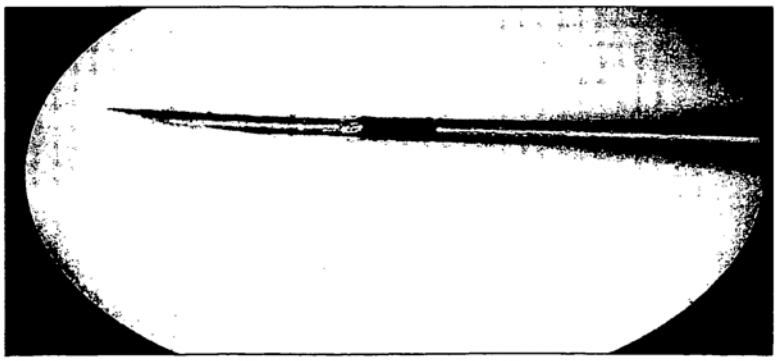

Fig. 13D

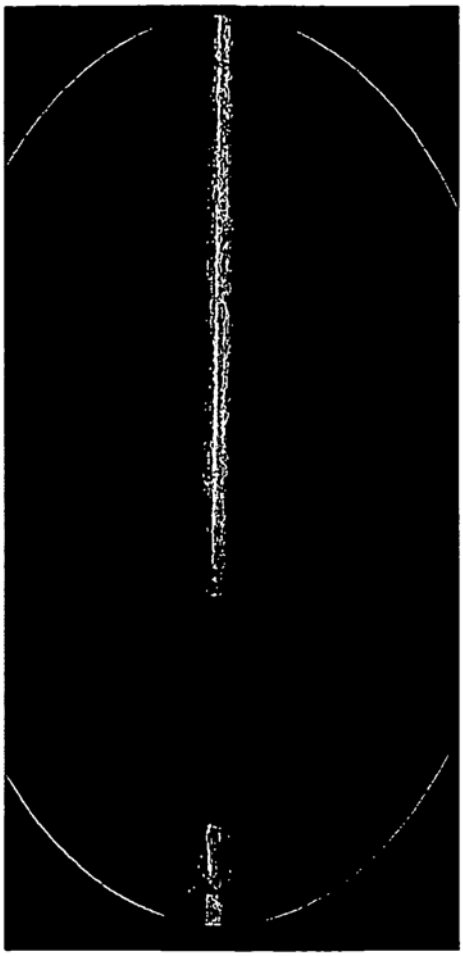

Fig. 13E

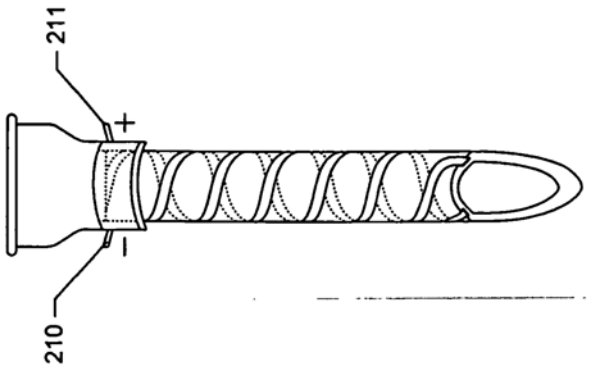

Fig. 14B

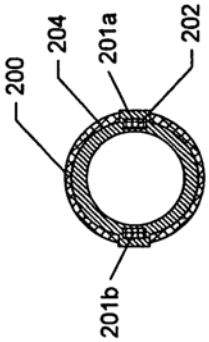

Fig. 14C

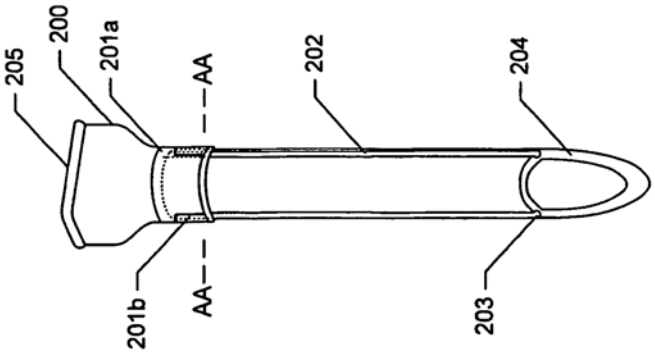

Fig. 14A

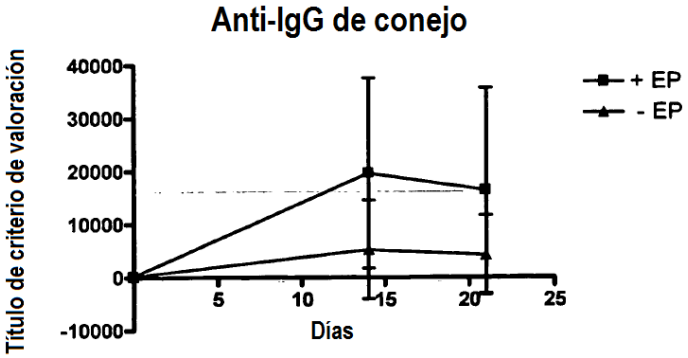
Anti-IgG de conejo
Título de criterio de valoración
40000
30000
20000
10000
0
-10000
5
10
15
20
25
Días
+ EP
- EP

Fig. 15

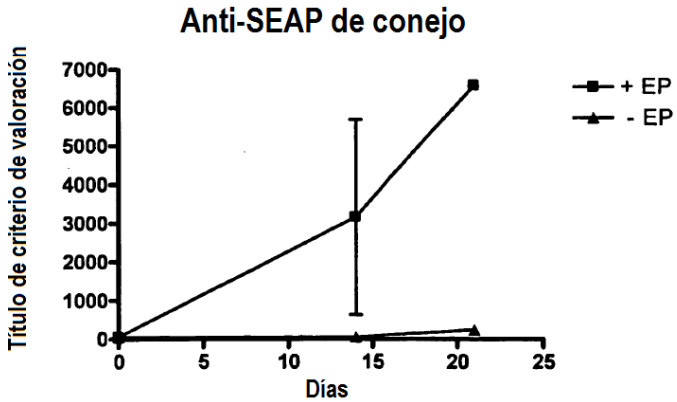
Anti-SEAP de conejo
Título de criterio de valoración
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
Días
+ EP
- EP

Fig. 16

Fig. 17B

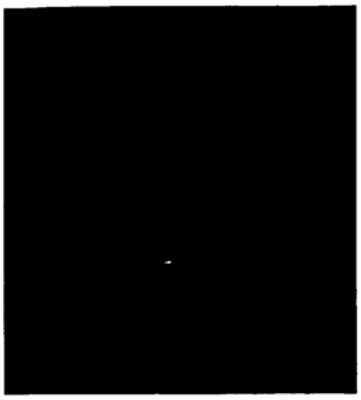

Fig. 18B

Fig. 17A

Fig. 18A

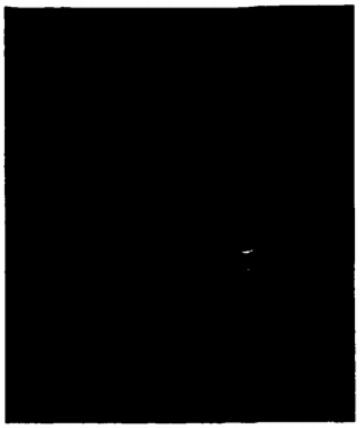

Fig. 19B

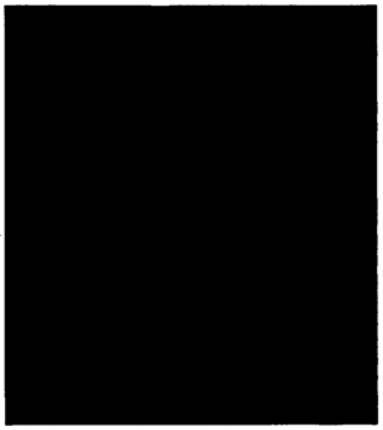

Fig. 20B

Fig. 19A

Fig. 20A

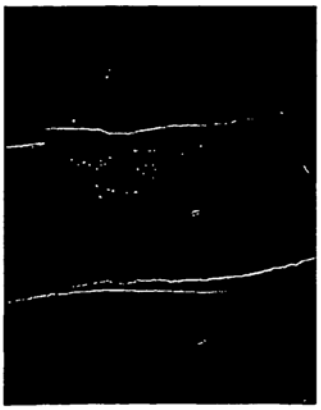

Fig. 21A

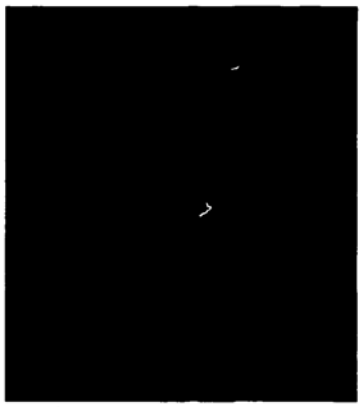

Fig. 21B

Fig. 22A

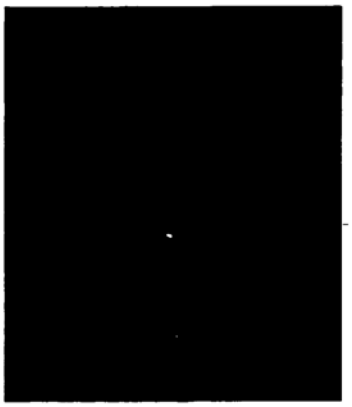

Fig. 22B

Fig. 23A

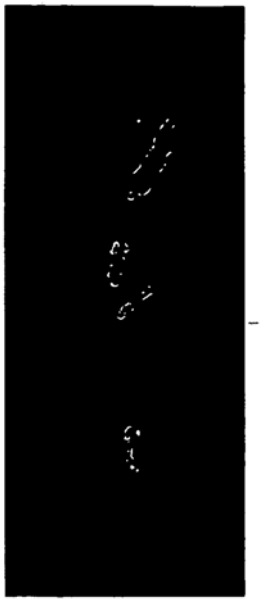

Fig. 23B

Fig. 24A

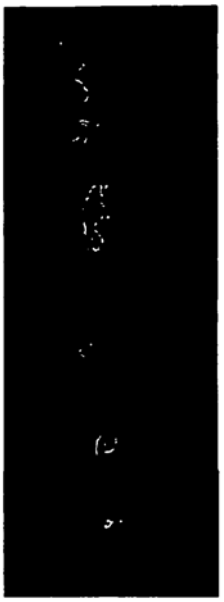

Fig. 24B

Fig. 25B

Fig. 25A

Figura 26

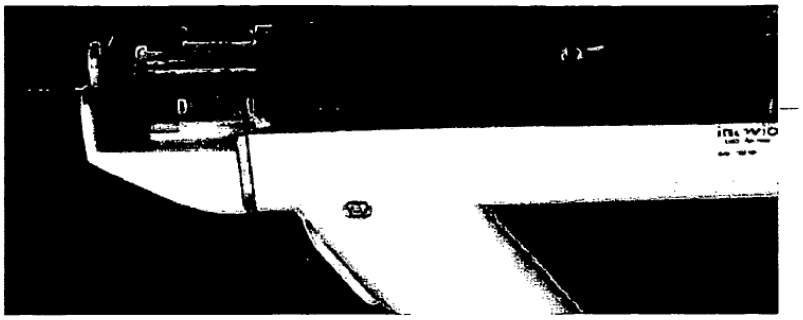

Figura 27

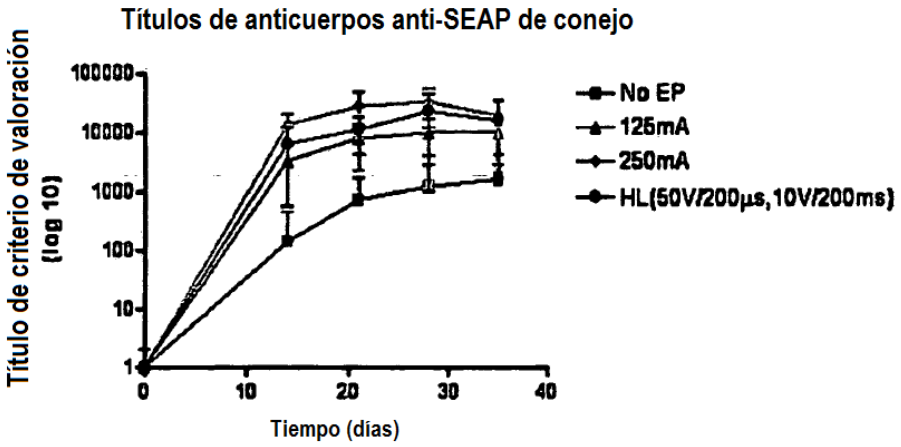

Figura 28

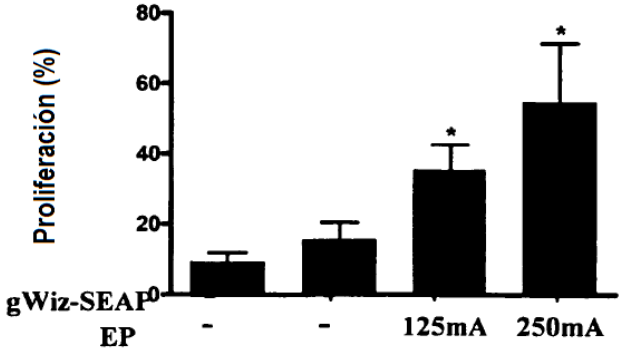

Figura 29

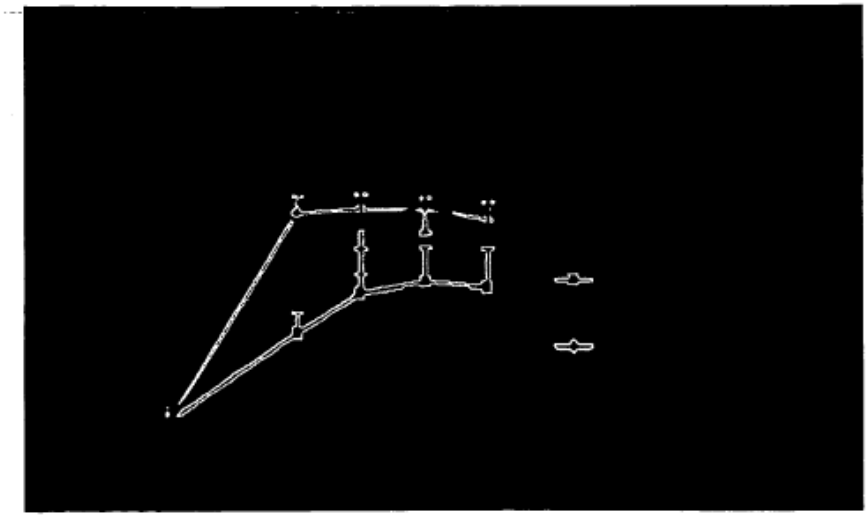

Figura 30

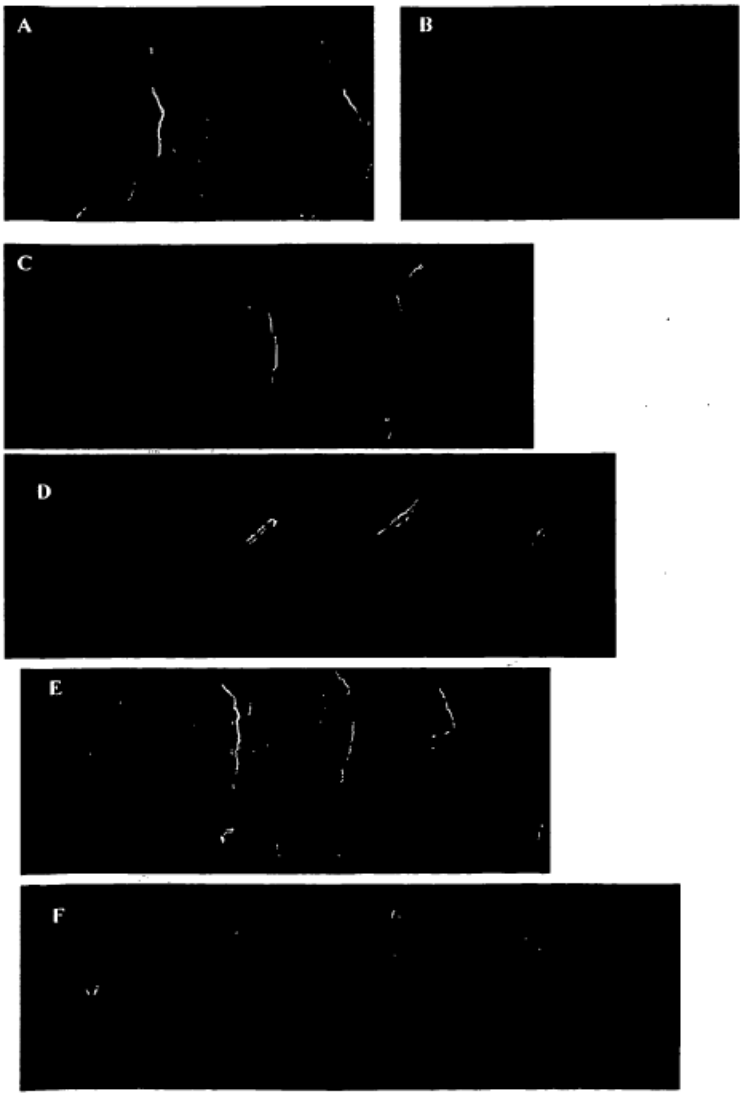

Figura 30 Continuación