

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 832**

51 Int. Cl.:

A61B 18/18

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2004** **E 04815540 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 1696812**

54 Título: **Ablación de tejido con electroporación irreversible**

30 Prioridad:

24.12.2003 US 532588 P

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

24.08.2015

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**DAVALOS, RAFAEL y
RUBINSKY, BORIS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 543 832 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

Ablación de tejido con electroporación irreversible

Campo de la invención

Esta invención se refiere a los campos de la electroporación de tejido y a los tratamientos mediante los cuales el tejido es destruido mediante electroporación irreversible.

Antecedentes de la invención

En muchos procedimientos médicos, tales como el tratamiento de tumores benignos o malignos, es importante ser capaces de realizar la ablación del tejido no deseable de un modo controlado y orientado sin afectar al tejido circundante deseable. Con los años, se ha desarrollado un gran número de métodos mínimamente invasivos para destruir selectivamente zonas específicas de tejidos no deseables como una alternativa a la cirugía de resección. Existe una variedad de técnicas con ventajas y desventajas específicas, que están indicadas y contraindicadas para diversas aplicaciones. Por ejemplo, la criocirugía es una técnica mínimamente invasiva a temperatura baja en la que el tejido se congela al entrar en contacto con una sonda enfriada con criógeno insertada en el tejido no deseable (Rubinsky, B., ed. *Cryosurgery*. Annu. Rev. Biomed. Eng. Vol. 2. 2000. 157-187). La zona afectada por las terapias de baja temperatura, tales como criocirugía, se puede controlar fácilmente a través de imágenes. Sin embargo, las sondas son grandes y difíciles de utilizar. La ablación química no selectiva es una técnica en la que se inyectan agentes químicos tales como etanol en el tejido no deseable para causar la ablación (Shiina, S., et al., *Percutaneous ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma: results in 146 patients*. AJR, 1993. 160: págs. 1023-8). La terapia química no selectiva es fácil de aplicar. Sin embargo, la zona afectada no puede ser controlada debido al flujo sanguíneo local y al transporte de las especies químicas. Las temperaturas elevadas también se utilizan para llevar a cabo la ablación de tejido. El ultrasonido orientado es una técnica no invasiva de alta temperatura en la que el tejido se calienta hasta la coagulación, utilizando haces de ultrasonidos orientados de alta intensidad sobre el tejido no deseable (Lynn, J. G., et al., *A new method for the generation of use of focused ultrasound in experimental biology*. J. Gen Physiol., 1942. 26: págs. 179-93; Foster, R. S., et al., *High intensity focused ultrasound in the treatment of prostatic disease*. Eur. Urol., 1993. 23: págs. 44-7). Las corrientes eléctricas también se utilizan comúnmente para calentar el tejido. La ablación por radiofrecuencia (RF) es una técnica mínimamente invasiva a alta temperatura en la que un electrodo activo se introduce en el tejido no deseable y una corriente alterna de alta frecuencia de hasta 500 kHz se utiliza para calentar el tejido hasta la coagulación (Organ, L. W., *Electrophysiological principles of radiofrequency lesion making*. Appl. Neurophysiol, 1976. 39: págs. 69-76). Además de RF también son comunes los métodos tradicionales de calentamiento de Joule con electrodos insertados en tejidos y corrientes dc o ac (Erez, A., Shitzer, A. (*Controlled destruction and temperature distribution in biological tissue subjected to monoactive electrocoagulation*) J. Biomech. Ing. 1980:102(1): 42-9). La coagulación con láser intersticial es una técnica térmica de alta temperatura en la que los tumores se calientan lentamente a temperaturas superiores a los umbrales de desnaturalización de las proteínas utilizando láseres de baja potencia suministrados a los tumores por medio de fibras ópticas (Bown, S. G., *Phototherapy of tumors*. World J. Surgery, 1983. 7: págs. 700-9). Las terapias térmicas de alta temperatura tienen la ventaja de la facilidad de aplicación. La desventaja es que la extensión de la zona tratada es difícil de controlar debido a que la circulación de la sangre tiene un fuerte efecto local sobre el campo de temperatura que se desarrolla en el tejido. El arsenal de la cirugía se ve reforzado por la disponibilidad de un gran número de técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas que existen, cada una con sus propias ventajas y desventajas y sus aplicaciones particulares. Este documento describe otra técnica quirúrgica mínimamente invasiva para la ablación de tejido, la electroporación irreversible. Los autores de la presente invención describirán la técnica, evaluarán su viabilidad a través de modelos matemáticos y demostrarán la viabilidad con estudios experimentales in vivo.

La electroporación se define como el fenómeno que hace que las membranas celulares sean permeables al exponerlas a ciertos pulsos eléctricos (Weaver, J. C. y Y. A. Chizmadzhev, *Theory of electroporation: a review*. Bioelectrochem. Bioenerg., 1996. 41: págs. 135-60). Los pulsos de electroporación se definen como aquellos pulsos eléctricos que a través de una combinación específica de amplitud, forma, duración de tiempo y número de repeticiones producen un efecto sustancial sobre las células biológicas que no es otro que la permeabilización de la membrana celular. El intervalo de parámetros eléctricos que producen electroporación está limitado por: a) parámetros que no tienen ningún efecto sustancial sobre la célula y la membrana celular, b) parámetros que causan efectos térmicos sustanciales (calentamiento de Joule) y c) parámetros que afectan al interior de la célula, p. ej., el núcleo, sin afectar a la membrana celular. El calentamiento de Joule, el efecto térmico que producen las corrientes eléctricas cuando se aplican a materiales biológicos se conoce desde hace siglos. Se observó en el párrafo anterior que los efectos térmicos eléctricos que elevan las temperaturas a valores que dañan las células se utilizan comúnmente para la ablación de tejidos no deseables. Los parámetros del pulso que producen efectos térmicos son más largos y/o tienen amplitudes más altas que los pulsos de electroporación cuyo único efecto sustancial es la permeabilización de la membrana celular.

Existen una variedad de métodos para producir efectos térmicos eléctricamente que producen la ablación del tejido. Estos incluyen RF, calentamiento con electrodos y calentamiento por inducción. Los pulsos eléctricos que producen efectos térmicos son claramente diferentes de los pulsos que producen electroporación. La distinción puede ser el

reconocimiento a través de su efecto sobre las células y su utilidad. El efecto de los pulsos eléctricos térmicos es principalmente sobre la temperatura del material biológico y su utilidad reside en el aumento de la temperatura para inducir la ablación del tejido a través de efectos térmicos.

El efecto de los parámetros de electroporación es principalmente sobre la membrana celular y su utilidad reside en la permeabilización de la membrana celular para diversas aplicaciones. Los parámetros eléctricos que solo afectan al interior de la célula, sin afectar a la membrana celular también se identificaron recientemente. Se conocen normalmente como "pulsos de nanosegundos". Se ha demostrado que los pulsos de alta amplitud y corta duración (sustancialmente más cortos que los pulsos de electroporación - nanosegundos frente a milisegundos), pueden afectar al interior de la célula y, en particular, al núcleo sin afectar a la membrana. Los estudios sobre los pulsos de nanosegundos demuestran que son "claramente diferentes de los pulsos de electroporación" (Beebe S.J. Fox P.M. Rec L.J. Somers K. Stark R.H. Schoenbach K.H. *Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition*. PPPS-2001 Pulsed Power Plasma Science 2001. 28ª IEEE International Conference on Plasma Science and 13ª IEEE International Pulsed Power Conference. Digest of Technical Papers (Núm. Cat. 01CH37251). IEEE. Parte vol.1, 2001, págs. 211-15 vol.1. Piscataway, NJ, USA. Se han identificado varias aplicaciones para los pulsos de nano-segundos. Una de ellas es para la ablación de tejidos a través de un efecto sobre el núcleo (Schoenbach, K.H., Beebe, S.J., Buescher, K.S. *Method and apparatus for intracellular electro-manipulation* Pub. de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2002/0010491 A1, 24 de Enero de 2002). Otra es la de regular los genes en el interior de la célula, (Gunderson, M.A. et al. *Method for intracellular modification within living cells using pulsed electrical fields - regulate gene transcription and entering intracellular* Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2003/0170898 A1, 11 de Sept, 2003). Los pulsos eléctricos que producen efectos intracelulares son claramente diferentes de los pulsos que producen electroporación. La distinción puede ser el reconocimiento a través de su efecto sobre las células y su utilidad. El efecto de los pulsos eléctricos intracelulares es principalmente sobre el contenido intracelular de la célula y su utilidad reside en la manipulación de los contenidos intracelulares para diversos usos - incluyendo la ablación. El efecto de los parámetros de electroporación es principalmente sobre la membrana celular y su utilidad reside en la permeabilización de la membrana celular para diversas aplicaciones, que serán discutidas en mayor detalle más adelante.

La electroporación es conocida desde hace más de medio siglo. Se encontró que como una función de los parámetros eléctricos, los pulsos de electroporación pueden tener dos efectos diferentes sobre la permeabilidad de la membrana celular. La permeabilización de la membrana puede ser reversible o irreversible como una función de los parámetros eléctricos utilizados. En la electroporación reversible la membrana celular se vuelve a sellar un cierto tiempo después de que los pulsos cesan y la célula sobrevive. En la electroporación irreversible la membrana celular no se vuelve a sellar y la célula se lisa. Un diagrama esquemático que muestra el efecto de los parámetros eléctricos sobre la permeabilización de la membrana celular (electroporación) y la separación entre ningún efecto, electroporación reversible y electroporación irreversible se muestra en la Figura 1 (Dev, S.B., Rabussay, D.P., Wiedera, G., Hofmann, G.A., *Medical applications of electroporation*, IEEE Transactions of Plasma Science, Vol 28 Núm. 1, Feb 2000, págs. 206 - 223). La ruptura dieléctrica de la membrana celular debida a un campo eléctrico inducido, electroporación irreversible, se observó por primera vez en la década de 1970 (Neumann, E. y K. Rosenheck, *Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes*. J. Membrane Biol., 1972. 10: págs. 279-290; Crowley, J.M., *Electrical breakdown of biomolecular lipid membranes as an electromechanical instability*. Biophysical Journal, 1973. 13: págs. 711-724; Zimmermann, U., J. Vienken, y G. Pilwat, *Dielectric breakdown of cell membranes*, Biophysical Journal, 1974. 14(11): págs. 881-899). La capacidad de la membrana para volverse a sellar, electroporación reversible, fue descubierta por separado durante la década de 1970 (Kinosita Jr, K. y T.Y. Tsong, *Hemolysis of human erythrocytes by a transient electric field*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977. 74(5): págs. 1923-1927; Baker, P.F. y D.E. Knight, *Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes*. Nature, 1978. 276: págs. 620-622; Gauger, B. y F.W. Bentrup, *A Study of Dielectric Membrane Breakdown in the Fucus Egg*. J. Membrane Biol., 1979. 48(3): págs. 249-264).

El mecanismo de electroporación no se entiende todavía completamente. Se cree que el campo eléctrico cambia el potencial electroquímico alrededor de una membrana celular e induce inestabilidades en la bicapa lipídica de la membrana celular polarizada. La membrana inestable altera después su forma formando vías acuosas que posiblemente son los poros de nano escala a través de la membrana, de ahí el término "electroporación" (Chang, D.C., et al., *Guide to Electroporation and Electrofusion*. 1992, San Diego, CA: Academic Press, Inc.). La transferencia de masa se puede producir ahora a través de estos canales bajo control electroquímico. Cualquiera que sea el mecanismo mediante el cual la membrana celular se convierte en permeable, la electroporación se ha convertido en un importante método para mejorar la transferencia de masa a través de la membrana celular.

La primera aplicación importante de las propiedades de electroporación permeabilizadoras de la membrana celular es debida a Neumann (Neumann, E., et al., *Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields*. J. EMBO, 1982. 1: págs. 841-5). Han demostrado que mediante la aplicación de electroporación reversible a las células es posible permeabilizar suficientemente la membrana celular de modo que los genes, que son macromoléculas que normalmente son demasiado grandes para entrar en las células, puedan entrar en la célula después de la electroporación. El uso de parámetros eléctricos de electroporación reversible es crucial para el éxito del procedimiento, ya que el objetivo del procedimiento es tener una célula viable que incorpore el gen.

Después de este descubrimiento la electroporación empezó a utilizarse comúnmente para permeabilizar de manera reversible la membrana celular para diversas aplicaciones en medicina y biotecnología para introducir en las células o para extraer de las células especies químicas que normalmente no pasan, o tienen dificultad para pasar a través de la membrana celular, desde pequeñas moléculas tales como colorantes fluorescentes, fármacos y trazadores radiactivos a moléculas de alto peso molecular, tales como anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos, dextranos de alto peso molecular y ADN. Es importante destacar que en todas estas aplicaciones es necesario que la electroporación sea reversible ya que el resultado del transporte de masa requiere que las células estén vivas después de la electroporación.

Después del trabajo sobre las células fuera del organismo, la electroporación reversible comenzó a ser utilizada para la permeabilización de las células en el tejido. Heller, R., R. Gilbert, y M.J. Jaroszeski, *Clinical applications of electrochemotherapy*. Advanced drug delivery reviews, 1999. 35: págs. 119-129. La electroporación de tejidos se está convirtiendo ahora en una técnica quirúrgica mínimamente invasiva cada vez más popular para la introducción de pequeños fármacos y macromoléculas en células en áreas específicas del organismo. Esta técnica se lleva a cabo mediante la inyección de fármacos o macromoléculas en la zona afectada y la colocación de electrodos en o alrededor del tejido diana para generar un campo eléctrico reversible permeabilizante en el tejido, introduciendo de este modo los fármacos o macromoléculas en las células de la zona afectada (Mir, L.M., *Therapeutic perspectives of in vivo cell electroporomeabilization*. Bioelectrochemistry, 2001. 53: págs. 1-10).

El uso de la electroporación para la ablación de tejido no deseable fue introducido por Okino y Mohri en 1987 y Mir et al. en 1991. Ellos han reconocido que hay fármacos para el tratamiento del cáncer, tales como la bleomicina y el cis-platino, que son muy eficaces en la ablación de las células cancerosas, pero tienen dificultades para penetrar en la membrana celular. Además, algunos de estos fármacos, como la bleomicina, tienen la capacidad de afectar de manera selectiva a las células cancerosas que se reproducen sin afectar a las células normales que no se reproducen. Okino y Mori y Mir et al. descubrieron por separado que la combinación de pulsos eléctricos con un fármaco anticanceroso incapaz de penetrar a través de una membrana semipermeable mejoraba en gran medida la eficacia del tratamiento con ese fármaco (Okino, M. y H. Mohri, *Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors*. Japanese Journal of Cancer Research, 1987. 78(12): págs. 1319-21; Mir, L.M., et al., *Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses*. European Journal of Cancer, 1991. 27: págs. 68-72). Mir et al. pronto siguieron con los ensayos clínicos que mostraron resultados prometedores y acuñaron el término de tratamiento de electroquimioterapia (Mir, L.M., et al., *Electrochemotherapy, a novel antitumor treatment: first clinical trial*. C. R. Acad. Sci., 1991. Ser. III 313(613-8)).

Actualmente, las aplicaciones terapéuticas primarias *in vivo* de electroporación son la electroquimioterapia antitumoral (ECT), que combina un fármaco citotóxico no penetrante con pulsos eléctricos de permeabilización y la electrogenoterapia (EGT) como una forma de terapia génica no viral, y la administración transdérmica de fármacos (Mir, L.M., *Therapeutic perspectives of in vivo cell electroporomeabilization*. Bioelectrochemistry, 2001. 53: págs. 1-10). Los estudios sobre electroquimioterapia y electrogenoterapia se han resumido recientemente en varias publicaciones (Jaroszeski, M.J., et al., *In vivo gene delivery by electroporation*. Advanced applications of electrochemistry, 1999. 35: págs. 131-137; Heller, R., R. Gilbert, y M.J. Jaroszeski, *Clinical applications of electrochemotherapy*. Advanced drug delivery reviews, 1999. 35: págs. 119-129; Mir, L.M., *Therapeutic perspectives of in vivo cell electroporomeabilization*. Bioelectrochemistry, 2001. 53: págs. 1-10; Davalos, R.V., *Real Time Imaging for Molecular Medicine through electrical Impedance Tomography of Electroporation*, in *Mechanical Engineering*. 2002, University of California at Berkeley: Berkeley. págs. 237). Un reciente artículo resume los resultados de los ensayos clínicos realizados en cinco centros de investigación del cáncer. Se trataron carcinoma de células basales (32), melanoma maligno (142), adenocarcinoma (30) y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, (87) para un total de 291 tumores (Mir, L.M., et al., *Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy*. British Journal of Cancer, 1998. 77(12): págs. 2336-2342).

La electroquimioterapia es una técnica quirúrgica mínimamente invasiva prometedora para la ablación local del tejido y para tratar tumores, independientemente de su tipo histológico con efectos secundarios adversos mínimos y una alta tasa de respuesta (Dev, S.B., et al., *Medical Applications of Electroporation*. IEEE Transactions on Plasma Science, 2000. 28(1): págs. 206-223; Heller, R., R. Gilbert, y M.J. Jaroszeski, *Clinical applications of electrochemotherapy*. Advanced drug delivery reviews, 1999. 35: págs. 119-129). La electroquimioterapia, que se realiza a través de la inserción de electrodos en el tejido no deseable, la inyección de fármacos citotóxicos en el tejido y la aplicación de parámetros de electroporación reversible, se beneficia de la facilidad de aplicación tanto de las terapias de tratamiento de alta temperatura como de las terapias químicas no selectivas y produce resultados comparables tanto a las terapias de alta temperatura como a las terapias químicas no selectivas.

Además, debido a que el campo eléctrico de permeabilización de la membrana celular no se ve afectado por el flujo sanguíneo local, el control sobre la extensión del tejido afectado por este modo de ablación no depende del flujo de sangre como en las terapias químicas térmicas y no selectivas. En el diseño de los protocolos de electroporación para la ablación de tejido con fármacos que se incorporan a la célula y la función en las células vivas era importante emplear la electroporación reversible; ya que los fármacos solo pueden funcionar en una célula viva. Por lo tanto, en el diseño de protocolos para electroquimioterapia el énfasis estaba en evitar la electroporación irreversible. El foco del campo completo de electroporación para la ablación de tejido estaba en el uso de pulsos reversibles, evitando al mismo tiempo los pulsos de electroporación irreversible, que pueden causar la incorporación de fármacos selectivos

al tejido no deseable para destruir selectivamente las células malignas. La electroquimioterapia que emplea la electroporación reversible combinada con fármacos, es beneficiosa debido a su selectividad, sin embargo, una desventaja es que por su naturaleza, se requiere la combinación de agentes químicos con un campo eléctrico y depende de la incorporación satisfactoria del agente químico dentro de la célula.

- 5 Los autores de la presente invención han reconocido que la electroporación irreversible, cuya capacidad para lisar diversos tipos de células fuera del cuerpo se ha conocido durante al menos cinco décadas, nunca se ha utilizado para la ablación de tejido en el organismo y, de hecho, se considera perjudicial para la electroquimioterapia convencional. Aunque la electroporación irreversible de tejido no es tan selectiva como la electroporación reversible con la incorporación de fármacos, los autores de la presente invención han encontrado que es eficaz en la ablación de volúmenes de tejidos no deseados de una manera comparable a otros métodos de ablación en masa no discriminatorios tales como la criocirugía, los métodos térmicos o la inyección de alcohol.

El documento US2001/0044596 describe un dispositivo de ablación intravascular que utiliza la electroporación irreversible. El documento no logra describir un gradiente de voltaje de $600 \text{ V/cm} \pm 10$.

- 15 El documento WO 03/099382 describe un dispositivo para la ablación de tejido que combina la electroporación reversible con ultrasonidos. El documento utiliza intensidades de campo eléctrico de aproximadamente 600 n/cm .

Compendio de la invención

- 20 La presente invención comprende un método para la ablación de tejido no deseable, que implica la colocación de electrodos en o en la proximidad del tejido no deseable con la aplicación de pulsos eléctricos causando la electroporación irreversible de las células en toda la región no deseable. Los pulsos eléctricos irreversiblemente penetran las membranas, invocando de ese modo la muerte celular. La duración de los pulsos eléctricos, el voltaje aplicado y la permeabilidad de membrana resultante se controlan dentro de intervalos definidos. Las células permeabilizadas irreversiblemente se pueden dejar *in situ* y pueden ser eliminadas por medio de procesos naturales tales como el propio sistema inmunológico del organismo. La cantidad de ablación de tejido alcanzable mediante el uso de la electroporación irreversible sin inducir daño térmico es considerable, como se revela y se describe aquí.

- 25 Este concepto de la electroporación irreversible en el tejido para destruir tejidos no deseados es diferente de otras formas de terapias y tratamientos eléctricos. La electroporación irreversible es diferente de la electro-manipulación intracelular que sustancialmente solo afecta al interior de la célula y no causa daño irreversible a la membrana celular. La electroporación irreversible no es una coagulación térmica inducida eléctricamente - que induce el daño celular a través de efectos térmicos, sino más bien un método más benigno para destruir solamente la membrana celular de las células en el tejido elegido como diana. La electroporación irreversible que destruye de manera irreversible la membrana celular también es diferente de electroquimioterapia ya que los pulsos de electroporación reversible se utilizan para introducir fármacos en las células vivas y que los fármacos afectan con posterioridad a la célula viva.

- 35 Un pulso eléctrico puede tener o no tener efecto alguno sobre la membrana celular, afectar a los componentes celulares internos, abrir reversiblemente la membrana celular después de lo cual las células pueden sobrevivir, o abrir irreversiblemente la membrana celular, después de lo cual las células mueren. De estos efectos, la electroporación irreversible de tejido se consideraba (antes de la presente invención) generalmente no deseable debido a la posibilidad de necrosis instantánea de todo el tejido afectado por el campo eléctrico, independientemente de su estado de enfermedad o salud. La electroporación irreversible es perjudicial en ciertas aplicaciones, tales como la terapia génica o la electroquimioterapia, donde el único propósito de los pulsos eléctricos es facilitar la introducción del fármaco o el gen en las células de un tejido sin matar la célula (Mir., L.M. y S. Orlowski, *The basis of electrochemotherapy, in Electrochemotherapy, electrogenetherapy, and transdermal drug delivery: Electrically mediated delivery of molecules to cells*, M.J. Jaroszeski, R. Heller, R. Gilbert, Editors, 2000, Humana Press, págs. 99-118).

- 45 En contraste, la electroporación irreversible del tipo descrito aquí, únicamente utiliza pulsos eléctricos para servir como medio activo para la destrucción del tejido por un medio específico, es decir, desorganizando fatalmente la membrana celular. La electroquimioterapia puede ser selectiva, pero requiere la combinación de agentes químicos con el campo eléctrico. La electroporación irreversible, aunque no es selectiva, se puede utilizar para la ablación de tejido no deseable (tal como un tumor) como un procedimiento quirúrgico mínimamente invasivo sin el uso de fármacos coadyuvantes. Su modo no selectivo de ablación de tejido es aceptable en el campo de la cirugía mínimamente invasiva y proporciona resultados que en cierto modo son comparables a la criocirugía, la ablación química no selectiva y la ablación térmica de alta temperatura.

- 55 Un aspecto de la invención es un dispositivo por medio del cual las células del tejido son sometidas a electroporación irreversible mediante la aplicación de pulsos de longitud y voltaje determinados de manera muy precisa. Esto se puede realizar mientras se miden y/o se observan los cambios en la impedancia eléctrica en tiempo real y se toma nota de la disminución al inicio de la electroporación y se ajusta la corriente en tiempo real para obtener el daño celular irreversible. En realizaciones en las que se aplica voltaje, el seguimiento de la impedancia proporciona al usuario el conocimiento de la presencia o ausencia de poros. Esta medición muestra el progreso de la

formación de poros e indica si la formación de poros irreversible, que lleva a la muerte celular, se ha producido.

Un aspecto de esta invención es que el inicio y el alcance de la electroporación de células en el tejido pueden estar correlacionados con los cambios en la impedancia eléctrica (término que se utiliza en la presente memoria para significar la sobrecorriente del voltaje) del tejido. En un momento dado, la electroporación se vuelve irreversible. Una disminución en la resistividad de un grupo de células biológicas se produce cuando las membranas de las células se vuelven permeables debido a la formación de poros. Mediante la supervisión de la impedancia de las células biológicas en un tejido, se puede detectar el punto medio en el tiempo en el que se produce la formación de poros en las células, así como el grado relativo de permeabilidad de la membrana celular debido a la formación de poros. Al aumentar gradualmente el voltaje y someter a ensayo las células en un tejido dado se puede determinar un punto en el que se produce la electroporación irreversible. Esta información puede entonces ser utilizada para establecer que, como promedio, las células del tejido han experimentado, de hecho, una electroporación irreversible. Esta información también se puede utilizar para controlar el proceso de electroporación que rige la selección de la magnitud del voltaje.

La invención proporciona la electroporación irreversible simultánea de multitud de células proporcionando una indicación directa de la existencia real de electroporación y una indicación del grado de electroporación promediada sobre la multitud. El descubrimiento es también útil en la electroporación irreversible de tejido biológico (masas de células biológicas con membranas contiguas) por las mismas razones. Los beneficios de este proceso incluyen un alto nivel de control sobre el punto de inicio de la electroporación irreversible.

Una característica de la invención es que la magnitud de la corriente eléctrica durante la electroporación del tejido se vuelve dependiente del grado de electroporación de modo que la corriente y la duración del pulso se ajustan dentro de un intervalo predeterminado para obtener la electroporación irreversible de las células elegidas como diana del tejido a la vez que minimiza el daño celular a las células y el tejido circundantes.

Un aspecto de la invención es que la duración del pulso y la corriente se ajustan con precisión dentro de los intervalos para proporcionar más que una mera electro-manipulación intracelular que da como resultado la muerte celular y menor que la que podría causar daños térmicos a los tejidos circundantes.

Otro aspecto de la invención es que la electroporación se lleva a cabo sin la adición de fármacos, ADN, u otros materiales de cualquier tipo que se vayan a introducir en las células.

Otra característica de la invención es que la medición de la corriente (en tiempo real) a través de un circuito proporciona una medición del grado global promedio de la electroporación obtenida.

Otro aspecto de la invención es que la resistencia eléctrica precisa del tejido se calcula a partir de la medición de voltaje a través del tiempo con electrodos sonda y medición de corriente transversal con el circuito conectado a los electrodos de electroporación.

Otro aspecto de la invención es que la resistencia eléctrica precisa del tejido se calcula a partir de la medición del voltaje a través del tiempo con electrodos sonda y medición de corriente transversal con el circuito conectado a los electrodos de electroporación.

Otro aspecto de la invención es que las mediciones eléctricas del tejido se pueden utilizar para mapear la distribución de la electroporación del tejido.

A diferencia de la tomografía de impedancia eléctrica para la detección de la electroporación reversible que hay que realizar durante o cerca del momento en el que se aplican los pulsos de electroporación reversible - debido a la naturaleza transitoria de la electroporación reversible; en la electroporación irreversible es posible y tal vez incluso preferente realizar las mediciones de corriente o EIT en un momento sustancial (varios minutos o más) después de la electroporación para verificar que en efecto es irreversible.

Estas y otras características, ventajas y objetos de la invención se comprenderán mejor a partir de la siguiente descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se entiende mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lea conjuntamente con los dibujos adjuntos. Se destaca que, según la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características están arbitrariamente ampliadas o reducidas para mayor claridad. Incluidas en los dibujos se encuentran las siguientes figuras:

Fig 1. es un gráfico que muestra una relación esquemática entre la intensidad de campo y la duración del pulso aplicable a la electroporación de las células.

Las Figuras 2A, 2B y 2C son cada una imágenes de zonas sometidas a electroporación irreversible para configuraciones de dos electrodos utilizando 10 mm de separación de centro a centro de la siguiente manera para las Figuras 2A, B y C: electrodos de diámetro (2A) 0,5 mm (857V); (2B) 1,0 mm (1295V); (2C) 1,5 mm (1575V) con

un umbral de 680V/cm para la electroporación irreversible.

Las Figuras 3A, 3B y 3C son imágenes que muestran regiones sometidas a electroporación irreversible utilizando un umbral de 680 V/cm para una configuración de dos electrodos con un diámetro de 1 mm y 876V y un espaciado de 5 mm para las Figuras 3A; 1116V y 7,5 mm para la Figura 3B; y 1295V y un espaciado de 10 mm para la Figura 3C.

Las Figuras 4A, 4B y 4C son imágenes que muestran el efecto de diámetro del electrodo para una configuración de 4 electrodos con un espaciado de 10 mm en donde la Figura 4A es para 0,5 mm de diámetro y 940V; la Figura 4B es para 1,0 mm de diámetro y 1404V y la Figura 4C es para 1,5 mm y 1685V.

Las Figuras 5A, 5B y 5C son imágenes que muestran el efecto de separación entre electrodos para una configuración de 4 electrodos en donde el electrodo es de 1 mm de diámetro y la Figura 5A muestra resultados con 5 mm y 910V; la Figura 5B 7,5 mm y 1175V y la Figura 5C 10 mm y 1404V.

La Figura 6 es una imagen que muestra la región irreversible (umbral 1295V, 680V/cm) en comparación con la reversible (umbral 1300V, 360V/cm) utilizando prácticamente los mismos parámetros eléctricos. 1300V es el voltaje más común aplicado a través de dos electrodos para ECT. Los parámetros más comunes de voltaje son ocho pulsos de 100 μ s a una frecuencia de 1 Hz. La aplicación de un solo pulso de 800 μ s proporciona una estimación conservadora del calentamiento asociado con un procedimiento. El espacio de un segundo normalmente entre los pulsos ampliará la cantidad de calor por área que se va a disipar a través del tejido.

La Figura 7 es una imagen que muestra la electroporación reversible con electrodos de 1 mm, espaciado de 10 mm. Un voltaje de 189V aplicado entre los electrodos induce la electroporación reversible sin ninguna electroporación irreversible al no superar el umbral de electroporación irreversible de 680V/cm en el dominio. La zona sombreada es mayor de 360 V/cm.

Las Figuras 8A y 8B muestran una comparación del efecto del flujo de sangre y el metabolismo sobre la cantidad de electroporación irreversible. En la Figura 8A no hay flujo de sangre o metabolismo. Figura 8B $w_b = 1 \text{ kg/m}^3$, $C_b = 3640 \text{ J/(kg K)}$, $T_b = 37^\circ\text{C}$, y $q'' = 33,8 \text{ kW/m}^3$.

La Figura 9 es una vista esquemática de un hígado entre dos electrodos cilíndricos de Ag/AgCl. La distancia entre los electrodos era de 4 mm y el radio de los electrodos era de 10 mm. Los electrodos se sujetaron con plataformas paralelas especiales y concéntricas entre sí. El lóbulo del hígado se comprimió entre los electrodos para lograr un buen contacto.

La Figura 10 es una foto de una vista de un hígado que fue sometido a electroporación mediante electroporación irreversible con dos electrodos de superficie cilíndrica de 10 mm de diámetro. La histología muestra que la zona oscura es necrótica.

La Figura 11 es una foto de una sección transversal a través de un hígado sometido a electroporación. La histología muestra que la zona oscura es necrótica. La distancia entre los dos placas A1 que sujetan el hígado es exactamente de 4 mm. Los electrodos de electroporación tenían 10 mm de diámetro y estaban centrados en el centro de la lesión.

La Figura 12 muestra el hígado de la distribución de temperatura calculada (C), panel superior, y el gradiente de potencial eléctrico (gradiente de electroporación) (V/cm), panel inferior, para el experimento in vivo. La Figura 12 también muestra las condiciones a través de una sección transversal de un bloque de hígado a través del centro de la zona sometida a electroporación. La altura del bloque es de 4 mm.

La Figura 13 combina las Figuras 11 y 12 para mostrar una comparación entre el grado de necrosis del tejido (zona oscura) y la temperatura y la distribución en gradiente de voltaje en el tejido sometido a electroporación. La foto de la Figura 11 se muestra esquemáticamente en la parte inferior de la Figura 13. Resulta evidente que la mayor parte de la zona oscura estaba a una temperatura de alrededor de 42°C siguiendo el pulso de electroporación de 40 milisegundos. El borde de la zona oscura parece corresponder a la línea del gradiente de electroporación de 300 V/cm.

Descripción detallada de la invención

Antes de describir los presentes métodos, tratamientos y dispositivos, se debe entender que esta invención no está limitada a las realizaciones particulares descritas, ya que estas, pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio hasta la décima de la unidad del límite inferior, entre los límites superior e inferior de ese intervalo, también se describe específicamente a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo

establecido está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden ser incluidos o excluidos independientemente del intervalo, y cada intervalo en el que cualquiera de los dos, ninguno o ambos límites se incluyen en los intervalos más pequeños también se incluyen dentro de la invención, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación. Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria se incorporan aquí como referencia para revelar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones. La presente exposición está controlando el grado en el que ésta entra en conflicto con cualquier publicación incorporada.

Cabe señalar que, según se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un pulso" incluye una pluralidad de tales pulsos y la referencia a "la muestra" incluye la referencia a una o más muestras y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones descritas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en esta memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que puede ser necesario confirmar de forma independiente.

Definiciones

El término "electroporación reversible" abarca la permeabilización de la membrana celular a través de la aplicación de pulsos eléctricos a través de la célula. En la "electroporación reversible" la permeabilización de la membrana celular cesa después de la aplicación del pulso y la permeabilidad de la membrana celular vuelve a la normalidad. La célula sobrevive en la "electroporación reversible". Se utiliza como un medio para la introducción de productos químicos, ADN, u otros materiales en las células.

El término "electroporación irreversible" también abarca la permeabilización de la membrana celular por medio de la aplicación de pulsos eléctricos a través de la célula. Sin embargo, en la "electroporación irreversible" la permeabilización de la membrana celular no cesa después de la aplicación del pulso y la permeabilidad de la membrana celular no vuelve a la normalidad. La célula no sobrevive a la "electroporación irreversible" y la muerte de la célula está causada por la desorganización de la membrana celular y no simplemente por la perturbación interna de los componentes celulares. Las aberturas en la membrana celular se crean y/o aumentan de tamaño, lo que da como resultado una interrupción fatal en el flujo normal controlado de material a través de la membrana celular. La membrana celular está altamente especializada en su capacidad para regular lo que sale y entra en la célula. La electroporación irreversible destruye la capacidad de regular de una manera tal que la célula no puede compensar y, como tal, la célula muere.

Invención en general

La invención proporciona un dispositivo para la destrucción (ablación) de tejido no deseable. Este implica la inserción (inclusión) de electrodos de electroporación en la proximidad del tejido no deseable y en buen contacto eléctrico con el tejido y la aplicación de pulsos eléctricos que causan la electroporación irreversible de las células en toda la zona del tejido no deseable. Las células cuya membrana se permeabiliza de manera irreversible pueden dejarse *in situ* (no se eliminan) y como tales pueden ser eliminadas gradualmente por el sistema inmunitario del organismo. La muerte celular se produce mediante la inducción de los parámetros eléctricos de electroporación irreversible en la zona no deseable.

Los protocolos de electroporación implican la generación de campos eléctricos en el tejido y se ven afectados por el calentamiento de Joule de los pulsos eléctricos. En el diseño de protocolos de electroporación de tejido es importante determinar los parámetros eléctricos apropiados que maximicen la permeabilización del tejido sin inducir efectos térmicos perjudiciales. Se ha demostrado que los volúmenes sustanciales de tejido se pueden someter a electroporación con electroporación reversible sin inducir efectos térmicos perjudiciales en las células y se han cuantificado estos volúmenes (Davalos, R.V., B. Rubinsky, y L.M. Mir, *Theoretical analysis of the thermal effects during in vivo tissue electroporation* Bioelectrochemistry, 2003. Vol. 61 (1-2): págs. 99-107).

Los pulsos eléctricos necesarios para inducir la electroporación irreversible en el tejido tienen una mayor magnitud y duración de los pulsos eléctricos necesarios para la electroporación reversible. Además, la duración y la fuerza de los pulsos necesarios para la electroporación irreversible son diferentes de otras metodologías que utilizan pulsos eléctricos tales como la electro-manipulación intracelular o la ablación térmica. Los métodos son muy diferentes

incluso cuando se utiliza la electro-manipulación intracelular (nano-segundos) para causar la muerte celular, p. ej., para realizar la ablación del tejido de un tumor o cuando los efectos térmicos producen daño a las células causando la muerte celular.

5 Los valores típicos para la longitud del pulso para la electroporación irreversible están en un intervalo de aproximadamente 5 microsegundos a aproximadamente 62.000 milisegundos o de aproximadamente 75 microsegundos a aproximadamente 20.000 milisegundos o de aproximadamente 100 microsegundos $\pm$ 10 microsegundos. Esto es significativamente más largo que la longitud del pulso utilizado generalmente en la electro-manipulación intracelular (nano-segundos) que es de 1 microsegundo o menos - véase la Solicitud de los Estados Unidos Publicada Núm. 2002/0010491 publicada el 24 de Enero de 2002.

10 El pulso para la electroporación irreversible de acuerdo con la invención es a un voltaje de aproximadamente 600 V/cm $\pm$ 10%. Esto es sustancialmente menor que el utilizado para la electro-manipulación intracelular que es de aproximadamente 10.000 V/cm, véase la solicitud de los Estados Unidos Núm. 2002/0010491 publicada el 24 de Enero de 2002.

15 El voltaje expresado anteriormente es el gradiente de voltaje (voltaje por centímetro). Los electrodos pueden ser de diferentes formas y tamaños y se colocan a diferentes distancias entre sí. La forma puede ser circular, ovalada, cuadrada, rectangular o irregular etc. La distancia de un electrodo a otro puede ser de 0,5 a 10 cm, de 1 a 5 cm, o de 2-3 cm. El electrodo puede tener un área de superficie de 0,1- 5 cm² o de 1-2 cm².

20 El tamaño, la forma y las distancias de los electrodos pueden variar y esto puede cambiar el voltaje y la duración del pulso utilizado. Los expertos en la técnica ajustarán los parámetros de acuerdo con esta descripción para obtener el grado deseado de electroporación y evitar el daño térmico a las células circundantes.

25 Los efectos térmicos requieren pulsos eléctricos que son sustancialmente más largos de los utilizados en la electroporación irreversible (Davalos, R.V., B. Rubinsky, y L.M. Mir, *Theoretical analysis of the thermal effects during in vivo tissue electroporation*. Bioelectrochemistry, 2003. Vol. 61 (1-2): págs. 99-107). La Figura 1 muestra que los pulsos de electroporación irreversible son más largos y tienen una mayor amplitud que los pulsos de electroporación reversible. Cuando se utiliza la electroporación irreversible para la ablación de tejido, puede haber preocupación de que los pulsos de electroporación irreversible serán tan grandes que causen efectos térmicos dañinos para el tejido circundante y la extensión del tejido que padezca la ablación mediante electroporación irreversible no sea significativa con respecto a la ablación por efectos térmicos. Bajo tales circunstancias la electroporación irreversible no podría ser considerada una modalidad eficaz de ablación de tejido, ya que actuará en superposición con la ablación térmica.

30 Una configuración evalúa, a través de modelos matemáticos y experimentos, el grado máximo de ablación de tejido que podría lograrse mediante electroporación irreversible antes de la aparición de efectos térmicos. Los modelos se centran en la electroporación de tejido hepático con electrodos de dos y cuatro agujas y en la electroporación de tejido hepático con dos placas paralelas infinitas utilizando datos experimentales disponibles. El experimento (Ejemplo 3) evalúa la electroporación irreversible entre dos electrodos cilíndricos, también en el hígado. El hígado fue elegido porque es considerado un posible candidato para la ablación por electroporación irreversible. Los resultados demuestran que la zona que puede ser sometida a ablación por electroporación irreversible antes de la aparición de los efectos térmicos es comparable a la que puede ser sometida a ablación por electroquimioterapia, validando el uso de la electroporación irreversible como una modalidad quirúrgica mínimamente invasiva potencial.

35 Los estudios anteriores han demostrado que se pueden obtener imágenes del grado de electroporación en tiempo real con la tomografía de impedancia eléctrica (EIT) (Davalos, R.V., B. Rubinsky, and D.M. Otten, *A feasibility study for electrical impedance tomography as a means to monitor tissue electroporation for molecular medicine*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2002. 49(4): págs. 400-403). En la electroporación irreversible la zona sometida a electroporación persiste indefinidamente después del pulso de electroporación, mostrando que se pueden obtener imágenes de la electroporación irreversible lentamente con EIT. La electroporación irreversible, por lo tanto, tiene la ventaja de una técnica de ablación de tejido que es tan fácil de aplicar como la ablación a alta temperatura, sin la necesidad de productos químicos coadyuvantes como la electroquimioterapia y con un control en tiempo real de la zona afectada con tomografía de impedancia eléctrica.

Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos normales en la técnica una completa exposición y descripción de cómo llevar a cabo y utilizar una configuración de presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los autores de la presente invención consideran como su invención ni se pretende que representen que los siguientes experimentos son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), pero deben contabilizarse algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario,

45 las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderal, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es la atmosférica o próxima a ella.

Ejemplo 1

El modelo matemático aquí proporcionado demuestra que la ablación tisular irreversible puede afectar a grandes volúmenes de tejido, sin inducir efectos térmicos perjudiciales. Para este fin, la presente invención utiliza la ecuación de Laplace para calcular la distribución del potencial eléctrico en el tejido durante pulsos de electroporación típicos y una ecuación de Pennes (biocalor) modificada (Pennes, H.H., *Analysis of tissue and arterial blood flow temperatures in the resting forearm*. J of Appl. Physiology., 1948.1: págs. 93-122), para calcular la distribución de temperatura resultante. Es importante tener en cuenta que hay varias formas de ecuación de biocalor que han sido revisadas (Carney, C.K., *Mathematical models of bioheat transfer, in Bioengineering heat transfer*, Y.I. Choi, Editor. 1992, Academic Press, Inc: Boston, págs. 19-152; Eto, T.K. y B. Rubinsky, *Bioheat transfer, in Introduction to bioengineering*, S.A. Berger, W. Goldsmith, y E.R. Lewis, Editores. 1996, Oxford Press). Mientras que la ecuación de Pennes es controvertida, se utiliza comúnmente, sin embargo, ya que puede proporcionar una estimación de los diversos parámetros biológicos de transferencia de calor, tales como el flujo sanguíneo y el metabolismo. La ecuación de Pennes modificada en este estudio contiene el término de calentamiento de Joule en el tejido como una fuente de calor adicional.

El potencial eléctrico asociado con un pulso de electroporación se determina resolviendo la ecuación de Laplace para la distribución potencial:

$$\nabla \cdot (\sigma \nabla \phi) = 0 \quad (1)$$

donde ϕ es el potencial eléctrico y σ es la conductividad eléctrica. La condición eléctrica límite del tejido que está en contacto con el electrodo o los electrodos más a la izquierda en el que se aplica el pulso de electroporación es:

$$\phi = V_0 \quad (2)$$

La condición eléctrica límite en la interfase del electrodo o los electrodos de más a la derecha es:

$$\phi = 0 \quad (3)$$

Los límites en los que el dominio analizado no está en contacto con un electrodo se tratan como eléctricamente aislantes para proporcionar un límite superior para el campo eléctrico cerca de los electrodos de electroporación y un límite superior para la distribución de temperatura que resulta de la electroporación:

$$\frac{\partial \phi}{\partial n} = 0 \quad (4)$$

La resolución de la ecuación de Laplace permite calcular el calentamiento de Joule asociado, la tasa de generación de calor por unidad de volumen de un campo eléctrico (p):

$$p = \sigma |\nabla \phi|^2 \quad (5)$$

Este término se añade a la ecuación original de Pennes, (Pennes, H.H., *Analysis of tissue and arterial blood flow temperatures in the resting forearm*. J of Appl. Physiology., 1948. 1: págs. 93-122) para representar el calor generado por el procedimiento de electroporación:

$$\nabla \cdot (k \nabla T) + w_b c_b (T_a - T) + q'' + p = \rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} \quad (6)$$

Para resolver la ecuación (4) se supone que todo el tejido está inicialmente a la temperatura fisiológica de 37°C:

$$T(x, y, z, 0) = 37 \quad (7)$$

La superficie exterior del dominio analizado y las superficies de los electrodos se toman como adiabáticas, lo que debe producir un límite superior para la distribución de la temperatura calculada en el tejido:

$$\frac{\partial T}{\partial n} = 0 \quad \text{sobre el límite de los electrodos y el dominio de la superficie exterior} \quad (8)$$

El análisis modeló las condiciones típicas para la electroporación del tejido en el hígado. El hígado fue elegido porque es el órgano que tratan las técnicas de ablación más mínimamente invasivas ya que el cáncer en el hígado

puede ser resuelto por la extirpación de la zona enferma, mientras que la resección quirúrgica no es posible en muchos casos para este órgano (Onik, G., B. Rubinsky, y et al., *Ultrasound-Guided Hepatic Cryosurgery in the Treatment of Metastatic Colon Carcinoma*. Cancer, 1991. 67(4): págs. 901-907). Los parámetros de electroporación, es decir, parámetros de pulso para la electroporación reversible e irreversible, se obtuvieron a partir de los datos de hígado de rata (Miklavcic, D., et al., *A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy*. Biochimica et Biophysica Acta, 2000. 1523(1): págs. 73-83; Suzuki, T., et al., *Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation*. FEBS Letters, 1998. 425(3): págs. 436-440), pero los parámetros biológicos correspondientes al hígado humano se utilizaron en el análisis. Las propiedades térmicas del tejido se toman de la referencia (Duck, F.A., *Physical Properties of Tissues: A Comprehensive Reference Book*. 1990, San Diego: Academic Press) y las propiedades eléctricas de la referencia (Boone, K., D. Barber, y B. Brown, *Review - Imaging with electricity: report of the European Concerted Action on Impedance Tomography*. J. Med. Eng. Technol., 1997. 21: págs. 201-232) y se enumeran en la tabla 1. El tejido se supone isotrópico y macroscópicamente homogéneo. La intención del análisis fue determinar la extensión de la región en la que se induce la electroporación reversible o irreversible durante varios voltajes y duraciones de electroporación mientras que la temperatura máxima en el tejido está por debajo de 50°C. El daño térmico es un proceso dependiente del tiempo descrito por una ecuación de tipo Arrhenius (Henriques, F.C. y A.R. Moritz, *Studies in thermal injuries: the predictability and the significance of thermally induced rate processes leading to irreversible epidermal damage*. Arch Pathol., 1947. 43: págs. 489-502; Diller, K.R., *Modeling of bioheat transfer processes at high and low temperatures, in Bioengineering heat transfer*, Y.I. Choi, Editor. 1992, Academic Press, Inc: Boston. págs. 137-357),

$$\Omega = \int \xi e^{-E_a/RT} dt \quad (9)$$

Donde Ω es una medida del daño térmico, ξ es el factor de frecuencia, E_a es la energía de activación y R es la constante universal de los gases. Una descripción detallada sobre los diversos grados de daño térmico como se describe en la Ecuación (9) anterior se puede encontrar en (Diller, K.R., *Modeling of bioheat transfer processes at high and low temperatures, in Bioengineering heat transfer*, Y.I. Choi, Editor-1992, Academic Press, Inc: Boston. págs. 157-357).

Un examen cuidadoso muestra que el daño térmico es una función compleja de tiempo, temperatura y todos los parámetros de la Ecuación (9) anterior y que hay varios grados de daño térmico. En diversas aplicaciones o para diversas consideraciones es posible diseñar protocolos de electroporación irreversible que inducen algún grado de daño térmico, ya sea en parte de la región sometida a electroporación o a un nivel reducido en toda la región de electroporación. Sin embargo, en este ejemplo los autores de la presente invención han elegido 50°C como temperatura diana por varias razones. El daño térmico comienza a temperaturas superiores a 42°C, pero solo para exposiciones prolongadas. El daño es relativamente bajo hasta 50°C - 60°C a los que la tasa de daño aumenta espectacularmente (Diller, K.R., *Modeling of bioheat transfer processes at high and low temperatures, in Bioengineering heat transfer*, Y.I. Choi, Editor. 1992, Academic Press, Inc: Boston. págs. 157-357). Por lo tanto 50°C será un límite relativamente bajo sobre los posibles efectos térmicos durante la electroporación irreversible. Se prevé que los parámetros eléctricos elegidos para la electroporación irreversible sin un efecto térmico podrían ser sustancialmente más prolongados y más altos que los obtenidos a partir de una evaluación de 50°C en este ejemplo. Además, puesto que las ecuaciones de Laplace y de biocalor son lineales, los resultados proporcionados aquí se pueden extrapolar y considerar indicativos del comportamiento térmico global.

Las configuraciones analizadas tienen electrodos de dos agujas o cuatro agujas incluidos en un modelo cuadrado del hígado. Los electrodos de aguja se utilizan comúnmente en la electroporación de tejido y muy probablemente también serán utilizados en el hígado (Somari, S., et al., *Theory and in vivo application of electroporative gene delivery*. Molecular Therapy, 2000. 2(3): págs. 178-187). El modelo cuadrado de hígado se eligió lo suficientemente grande como para evitar los efectos de los límites de la superficie exterior y para producir un límite superior para la temperatura, que se desarrolla durante la electroporación en el hígado. Para cada configuración se supone que la superficie de un electrodo tiene un voltaje prescrito con el otro electrodo fijado a tierra. El efecto de la separación entre los electrodos se investigó comparando las distancias de 5, 7,5 y 10 mm, que son las típicas. Los electrodos también se modelaron con dimensiones típicas de 0,5, 1 y 1,5 mm de diámetro. La tasa de perfusión de flujo sanguíneo fue tomada a cero o 1,0 kg/m³s (Deng, Z.S. y J. Liu, *Blood perfusion-based model for characterizing the temperature fluctuations in living tissue*. Phys A STAT Mech Appl, 2001. 300: págs. 521-530). El calor metabólico se tomó como cero o 33,8 kW/m³ (Deng, Z.S. y J. Liu, *Blood perfusion-based model for characterizing the temperature fluctuations in living tissue*. Phys A STAT Mech Appl, 2001. 300: págs. 521-530).

Los cálculos se realizaron para un pulso de electroporación de 800 μ s. Esta duración del pulso fue elegida porque normalmente, la electroporación reversible se realiza con ocho pulsos separados de 100 μ s, (Miklavcic, D., et al., *A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy*. Biochimica et Biophysica Acta, 2000. 1523(1): págs. 73-83) y por lo tanto el valor que eligieron los autores de la presente invención es un límite superior del efecto térmico en un marco de tiempo de pulso comparable al de la electroporación reversible. En consecuencia, los resultados obtenidos aquí son el límite inferior en posible tamaño de la lesión durante la electroporación irreversible. Cabe destacar que los autores de la presente invención creen que la ablación de tejido por electroporación irreversible se puede llevar a cabo con pulsos más cortos que

800 μ s. Para evaluar el efecto térmico, los autores de la presente invención aumentaron gradualmente en su modelo matemático la amplitud del pulso aplicado para la longitud del pulso de 800 μ s hasta que sus cálculos indicaron que la temperatura de la sonda de electroporación alcanzaba los 50°C, lo que consideraron que era el límite de daño térmico. Después, se evaluó la distribución del campo eléctrico en todo el hígado.

Se requiere un potencial transmembrana en el orden de 1V para inducir la electroporación irreversible. Este valor es dependiente de una variedad de condiciones tales como el tipo de tejido, el tamaño celular y otras condiciones externas y parámetros del pulso. El parámetro eléctrico principal que afecta al potencial transmembrana para un tipo de tejido específico es la amplitud del campo eléctrico al que está expuesto el tejido. Los umbrales del campo eléctrico utilizados en la estimación de la extensión de la región que fue sometida a electroporación irreversible fueron tomados de los estudios fundamentales de Miklavcic, Mir y sus colegas realizados con tejidos de hígado de conejo (Miklavcic, D., et al., *A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electroporation for gene therapy*. Biochimica et Biophysica Acta, 2000. 1523(1): págs. 73-83). En este estudio, que correlacionaba los experimentos de electroporación con el modelado matemático, han encontrado que el campo eléctrico para la electroporación reversible es de 362 +/- 21 V/cm y es de 637 +/- 43 V/cm para la electroporación irreversible para el tejido de hígado de rata. Por lo tanto, en el análisis se toma un campo eléctrico de 360 V/cm para representar la delimitación entre la no electroporación y la electroporación reversible y 680 V/cm para representar la delimitación entre la electroporación reversible e irreversible.

Todos los cálculos se realizaron utilizando un solucionador de elementos finitos de MATLAB, Femlab v2.2 (The MathWorks, Inc. Natick, MA). Para garantizar la calidad de la malla y la validez de la solución, la malla fue refinada hasta que hubo una diferencia de menos de 0,5% en la solución entre los refinamientos. La malla del momento inicial con dos electrodos de 1 mm, 10 mm de separación tenía 4035 nodos y 7856 triángulos. Las simulaciones se llevaron a cabo en un Dell Optiplex GX240 con 512 MB de memoria RAM que operaba en Microsoft Windows 2000.

Resultados y discusión

Las Figuras 2 y 3 examinan el efecto del tamaño del electrodo y el espaciamiento en la zona sometida a ablación en una configuración de electroporación de dos agujas. En la obtención de estas figuras, los autores de la presente invención ignoraron el efecto del flujo sanguíneo y el metabolismo en la ecuación de transferencia de calor, que debe proporcionar un límite superior para la zona de ablación estimada. La Figura 2 compara la extensión de la zona sometida a electroporación irreversible para los tamaños de electrodos de electroporación de 0,5, 1 y 1,5 mm de diámetro y una distancia entre los electrodos de 10 mm. El fuerte efecto del tamaño del electrodo es evidente. Se observa que para los electrodos más pequeños, la zona sometida a electroporación irreversible no es contigua, mientras que para un electrodo de 1,5 mm, la zona de tejido potencial, la ablación tiene una forma elíptica con unas dimensiones de aproximadamente 15 mm por 10 mm. En los paréntesis, los autores de la presente invención proporcionan el voltaje de electroporación para el cual la temperatura de la sonda alcanza 50°C en estas tres configuraciones. Se observa que el intervalo es de 857V para la sonda de 0,5 mm a 1575V para la sonda de 1,5 mm. Esto está dentro del intervalo típico de pulsos de electroporación de tejidos. La Figura 3 evalúa el efecto de la separación entre los electrodos. Se observa que en el intervalo sometido a ensayo, la pequeña dimensión de la forma elíptica contigua de la lesión sometida a ablación sigue siendo la misma, mientras que la dimensión más grande parece aumentar a escala con la distancia entre los electrodos.

Las Figuras 2 y 3 demuestran que el grado de ablación de tejido con la electroporación irreversible es comparable a la de otros métodos mínimamente invasivos típicos para la ablación de tejido, tales como la criocirugía (Onik, G.M., B. Rubinsky, et. al., *Ultrasound-guided hepatic cryosurgery in the treatment of metastatic colon carcinoma* Cancer, 1991. 67(4): págs. 901-907; Onik, G.M., et al., *Transrectal ultrasound-guided percutaneous radical cryosurgical ablation of the prostate*. Cancer, 1993. 72(4): págs. 1291-99). También muestra que la variación de tamaño del electrodo y el espaciamiento pueden controlar el tamaño y la forma de la lesión. La forma y el tamaño de la lesión de ablación también se pueden controlar variando el número de electrodos utilizados. Esto se muestra en las Figuras 4 y 5, para una configuración de cuatro electrodos. Estas figuras también comparan el efecto del tamaño de la sonda y el espaciamiento y los resultados también se obtuvieron ignorando el efecto del flujo sanguíneo y el metabolismo en la ecuación de energía. Una vez más, se observa que los electrodos más grandes tienen un efecto sustancial sobre la extensión de la región sometida a ablación y que el grado de ablación aumenta a escala con la separación entre los electrodos.

Una comparación entre los protocolos de electroporación reversible e irreversible se puede lograr a partir de las Figuras 6 y 7. En la Figura 6, se aplicó un pulso de 800 μ s, 1295 V entre dos electrodos de 1,5 mm de diámetro colocados a 10 mm. Esto produce una temperatura del tejido inferior a 50°C. La figura representa gráficamente el margen de la región sometida a electroporación de manera irreversible, es decir, gradientes de voltaje a distancia de 680 V/cm y el de la región sometida a electroporación reversible, gradientes de 360 V/cm. La Figura 7 se obtuvo para dos electrodos de 1 mm colocados a 10 mm. En esta figura, los autores de la presente invención produjeron una región de electroporación que solo se sometió a electroporación reversible, es decir, con campos eléctricos inferiores a 360 V/cm. En la comparación de las Figuras 6 y 7, es obvio que la extensión de la zona de ablación posible a través de solo electroquimioterapia es sustancialmente menor que a través de solo electroporación irreversible.

El efecto del flujo sanguíneo y el metabolismo sobre la extensión de la electroporación irreversible se ilustra en la Figura 8. Las figuras comparan una situación con un metabolismo y una tasa de flujo sanguíneo relativamente altos con una situación sin flujo de sangre ni metabolismo. Es obvio que el metabolismo y la perfusión de sangre tienen un efecto insignificante sobre la posible extensión de la electroporación irreversible del tejido. Esto es debido a que el efecto de calentamiento de Joule producido por la corriente de electroporación es sustancialmente mayor que los efectos del flujo sanguíneo o el metabolismo.

Una estimación aún más conservadora para el daño térmico se puede obtener suponiendo que el tejido alcanza los 50°C instantáneamente, durante los pulsos de electroporación de tal manera que el daño se define como

$$\Omega = t_p \xi e^{-\Delta E / RT} \quad (10)$$

Varios valores tomados de las publicaciones para la energía de activación y el factor de frecuencia se aplicaron a la ecuación (10) con las longitudes de pulso calculadas en los ejemplos anteriores. Debido a que la aplicación del pulso es tan corta, el daño sería próximo a cero, muchas veces menor que el valor ($\Omega = 0,53$) para inducir una quemadura de primer grado (Diller, K.R., *Modeling of bioheat transfer processes at high and low temperatures*, in *Bioengineering heat transfer*, Y.I. Choi, Editor. 1992, Academic Press, Inc: Boston. págs. 157-357) con independencia de los valores utilizados para la energía de activación y el factor de frecuencia.

Actualmente, la ablación de tejido mediante electroporación se produce mediante el uso de fármacos citotóxicos inyectados en el tejido combinados con electroporación reversible, un procedimiento conocido como electroquimioterapia. La presente descripción muestra que la electroporación irreversible por sí misma produce una ablación de tejido sustancial para la destrucción de tejidos no deseados en el organismo. La preocupación fue que los voltajes más altos requeridos para la electroporación irreversible causarían un calentamiento de Joule e inducirían daño tisular térmico en un grado que haría que la electroporación irreversible fuera un efecto marginal en la ablación del tejido. Utilizando un modelo matemático para calcular el potencial eléctrico y el campo de temperatura en el tejido durante la electroporación, la presente descripción muestra que la zona sometida a ablación por electroporación irreversible del tejido antes de la aparición de los efectos térmicos es sustancial y comparable a la de otras técnicas de ablación de tejidos tales como la criocirugía. Los estudios anteriores de los autores de la presente invención han demostrado que la extensión de la electroporación se puede representar en imágenes en tiempo real con tomografía de impedancia eléctrica (Dávalos, R.V., B. Rubinsky y D.M. Otten, *A feasibility study for electrical impedance tomography as a means to monitor tissue electroporation for molecular medicine*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2002. 49(4): págs. 400-403; Dávalos, R.V., et al., *Electrical impedance tomography for imaging tissue electroporation*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2004). La electroporación irreversible, por lo tanto, tiene la ventaja de ser una técnica de ablación de tejido, que es tan fácil de aplicar como la ablación a alta temperatura, sin la necesidad de productos químicos adyuvantes como se requiere en la ablación electroquímica y en la electroquimioterapia. Además, un aspecto único de la electroporación irreversible es que la zona afectada se puede controlar en tiempo real con tomografía de impedancia eléctrica.

Ejemplo 2

Este ejemplo fue desarrollado para producir una correlación entre los pulsos de electroporación y los efectos térmicos. El sistema analizado es un volumen de control infinitamente pequeño de tejido expuesto a un gradiente de voltaje de electroporación de V (voltios/cm). Toda la energía eléctrica se disipa en forma de calor y no hay conducción de calor desde el sistema. Los cálculos producen el aumento de la temperatura con el tiempo durante la aplicación del pulso y los resultados son un límite inferior seguro para cuánto tiempo se puede administrar un cierto pulso de electroporación hasta que se alcanza una cierta temperatura. Para generar la correlación se realiza un balance de energía sobre un volumen de control entre el calentamiento de Joule producido a partir de la disipación de calor del gradiente de potencial eléctrico en V (voltios/cm) (campo eléctrico local) que se disipa a través del tejido con una conductividad eléctrica de σ (Ohm-cm) y el aumento en la temperatura del volumen de control realizado de tejido con una densidad ρ (g/cc) y un calor específico, c, (J/g K). El cálculo produce la siguiente ecuación para el aumento de la temperatura (T) por unidad de tiempo (t) como una función de los gradientes de voltaje y las propiedades térmicas y eléctricas del hígado.

$$\frac{dT}{dt} = \frac{V^2 \sigma}{\rho c} \quad (2-1)$$

La siguiente tabla se obtuvo para el hígado con las siguientes propiedades:

Resistividad eléctrica del hígado - 8,33 Ohm-metro

Calor específico del hígado - J/g K

Densidad de hígado - 1 g/cc

Los autores de la presente invención obtienen la siguiente tabla:

TABLA 1

Gradiente de Voltaje - V (V/cm)	Tiempo por subida de grado C (ms)	Tiempo de 37°C a 65°C (ms)
50	1199,52	33586,56
100	299,88	8396,64
150	133,28	3731,84
200	74,97	2099,16
250	47,98	1343,46
300	33,32	932,96
350	24,48	685,44
400	18,74	524,79
450	14,81	414,65
500	12,00	336,87
550	9,91	277,57
600	8,33	233,24
650	7,10	198,74
700	6,12	171,36
750	5,33	149,27
800	4,69	131,20
850	4,15	116,22
900	3,70	103,66
950	3,32	93,04
1000	3,00	83,97
1050	2,72	76,16
1100	2,48	69,39
1150	2,27	63,49
1200	2,08	58,31
1250	1,92	53,74
1300	1,77	49,68
1350	1,65	46,07
1400	1,53	42,84
1450	1,43	39,94
1500	1,33	37,32

La segunda columna de la Tabla 1 proporciona la cantidad de tiempo que lleva que la temperatura del hígado se eleve 1°C, cuando el tejido experimenta el pulso de electroporación en la columna 1. El tiempo, incluso para un voltaje de electroporación relativamente alto de 1500 V/cm es del orden de 1,33 milisegundos para una subida de 1°C y 37,32 milisegundos hasta que se alcanza una temperatura de 65°C. Utilizando la ecuación (2-1) o la Tabla 1 es posible evaluar la cantidad de tiempo que un cierto pulso se puede aplicar sin inducir efectos térmicos. Teniendo en cuenta los parámetros de electroporación típicos referidos hasta el momento no existe ninguna limitación en la duración de la electroporación a partir de las consideraciones térmicas. La columna 3 de la Tabla 1 muestra el tiempo requerido para alcanzar los 65°C, que es cuando puede comenzar el daño térmico. Los cálculos en este ejemplo proporcionan un límite inferior para la medida de tiempo en la que se inducirán ciertos efectos térmicos por los pulsos de electroporación. Para cálculos más precisos es posible utilizar la ecuación desarrollada en este ejemplo con la ecuación (9) o (10) del Ejemplo 1.

Ejemplo 3

El objetivo de este experimento fue verificar la capacidad de los pulsos de electroporación irreversible para producir la ablación del tejido sustancial en el régimen no térmico. Para ello los autores de la presente invención han realizado experimentos en el hígado de ratas macho Sprague-Dawley (250 g a 350 g) en virtud de un protocolo de uso y cuidado de los animales aprobado. Después de que los animales fueran anestesiaron por medio de una inyección de Solución de Nembutal Sódico (50 mg/ml de Pentobarbital) el hígado fue expuesto a través de incisiones en la línea media y un lóbulo se sujetó entre dos electrodos cilíndricos de Ag/AgCl, con un diámetro de 10 mm (*In Vivo Metric*, Healdsburg CA) - Los electrodos tenían su superficie plana paralela; eran concéntricos y el hígado entre los electrodos se comprimió de modo que los lóbulos estaban separados por 4 mm. Un diagrama esquemático de los electrodos y el hígado se muestra en la Figura 9. El hígado fue expuesto a un único pulso de electroporación de 40 milisegundos. Un electrodo se fijó a 400 V y el otro se conectó a tierra. El resto del hígado no estuvo en contacto con ningún medio y por lo tanto se consideró aislado eléctricamente. Después de la electroporación la rata se mantuvo bajo anestesia controlada durante tres horas. Después de la exanguinación el hígado se lavó con solución salina fisiológica bajo presión y se fijó por medio de perfusión con formaldehído. El hígado fue resacado por el centro de la región de electroporación y se analizó mediante histología. Las Figuras 10 y 11 muestran la apariencia del hígado. La histología determinó que la zona oscura correspondía a la región de la necrosis del tejido. El campo eléctrico en el hígado sometido a electroporación y la distribución de la temperatura se calcularon usando las ecuaciones del Ejemplo 1, sujeto a un electrodo a un voltaje de 400V y el otro se conectó a tierra, durante 40 milisegundos. El hígado fue modelado como una losa infinita con un espesor de 4 mm, con electrodos cilíndricos concéntricos (véase la Figura 9). Los resultados se muestran en la Figura 12. La figura 12 muestra líneas de gradientes de voltaje constante (V/cm) y líneas de temperatura constante. Es evidente que en la mayoría de los tejidos sometidos a electroporación la temperatura es de aproximadamente 42°C inmediatamente después del pulso. La temperatura más alta se produce cerca del borde de los electrodos cilíndricos, donde es de aproximadamente 50°C. La Figura 13 se obtuvo al reunir las Figuras 11 y 12. La superposición de los resultados calculados sobre las mediciones histológicas revela que el margen de la zona oscura (necrótica) corresponde a los parámetros de electroporación de aproximadamente 300 V/cm. Los resultados demuestran que la electroporación irreversible puede inducir necrosis sustancial del tejido sin la necesidad de aditivos químicos como en electroquimioterapia y sin un efecto térmico.

Se apreciará que los expertos en la técnica serán capaces de idear diversas configuraciones que, aunque no se describen explícitamente o se muestran en la presente memoria, encarnan los principios de la invención y se incluyen dentro de su alcance. Por otra parte, todos los ejemplos y el lenguaje condicional citado en la presente memoria tienen como principal objetivo ayudar al lector en la comprensión de los principios de la invención y los conceptos aportados por los autores de la presente invención para promover la técnica, y se debe considerar que no están limitados a tales ejemplos y condiciones citados específicamente. Por otra parte, se pretende que todas las declaraciones en la presente memoria recitan, aspectos y realizaciones de la invención, así como ejemplos específicos de los mismos, pretenden abarcar tanto equivalentes estructurales y funcionales de los mismos. Además, incluyan los equivalentes tanto estructurales como funcionales de los mismos. Adicionalmente se pretende que tales equivalentes incluyan tanto los equivalente conocidos en la actualidad como los equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualesquier elemento desarrollado que realice la misma función, con independencia de su estructura. Por lo tanto, no se pretende que el alcance de la presente invención se limite a las realizaciones ilustrativas mostradas y descritas en la presente memoria. En vez de eso, el alcance de la presente invención se plasma en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para la ablación de tejido, que comprende:

un primer y un segundo electrodos que se sitúan en una zona del tejido que va a ser tratada entre ellos;

5 un medio generador de voltaje que aplica un voltaje entre el primer y el segundo electrodos de una manera que proporciona un campo eléctrico predeterminado en torno a la zona del tejido durante un tiempo suficiente para realizar la electroporación irreversible para destruir sustancialmente todas las células de la zona de tejido identificada, en donde el medio generador genera pulsos a un gradiente de voltaje de aproximadamente $600 \text{ V/cm} \pm 10\%$.

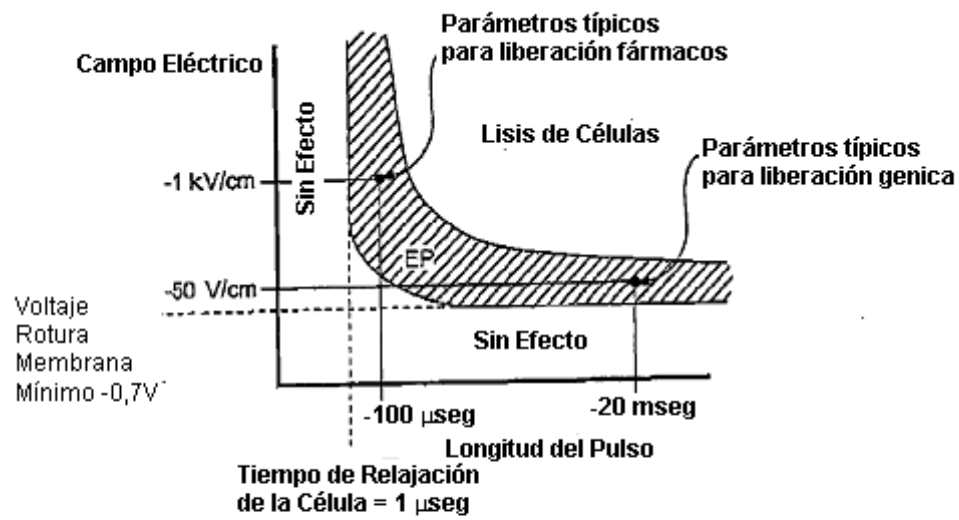


FIG. 1

FIG. 2A

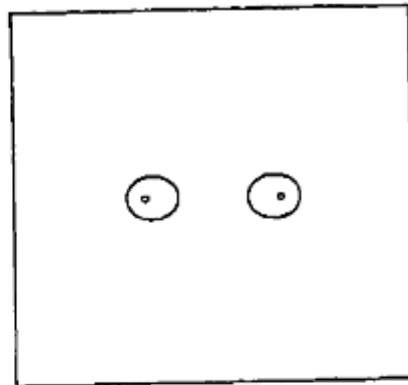


FIG. 2B

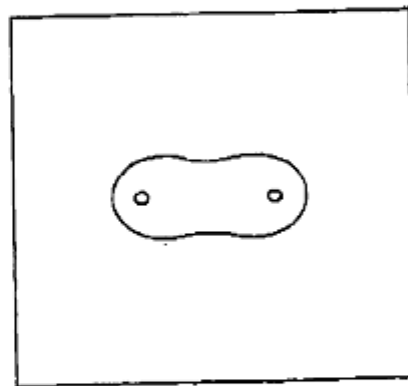


FIG. 2C

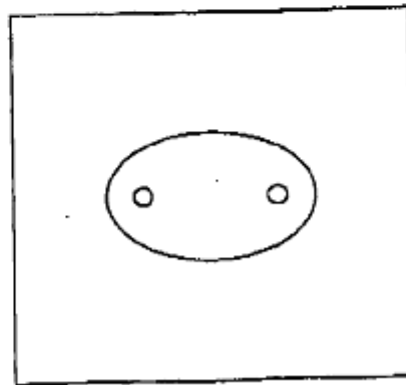


FIG. 3A

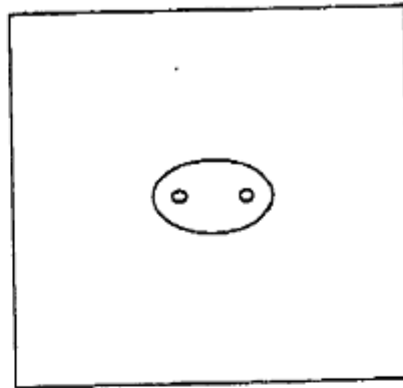


FIG. 3B

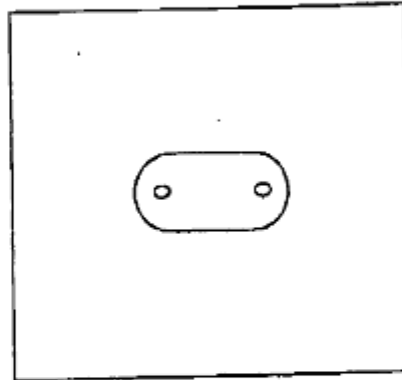


FIG. 3C

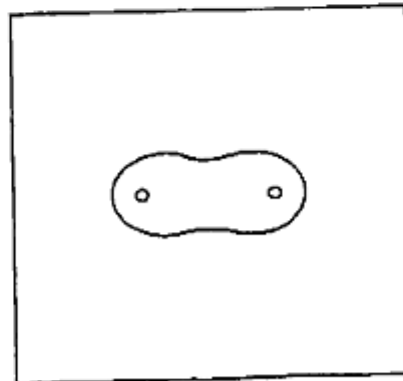


FIG. 4A

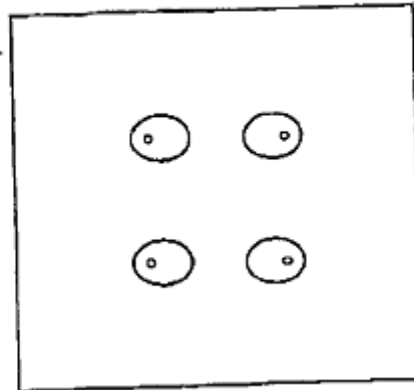


FIG. 4B

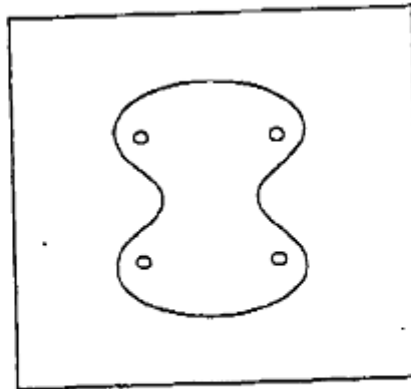


FIG. 4C

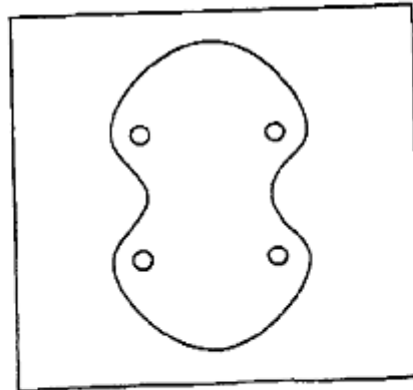


FIG. 5A

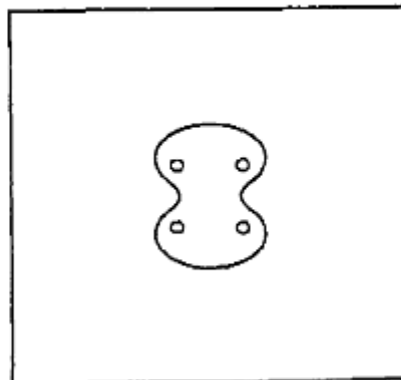


FIG. 5B

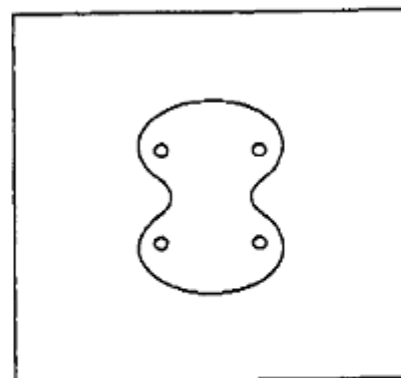


FIG. 5C

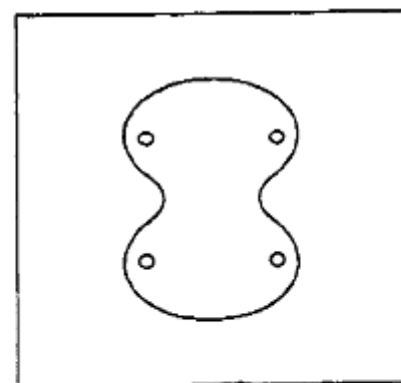


FIG. 6

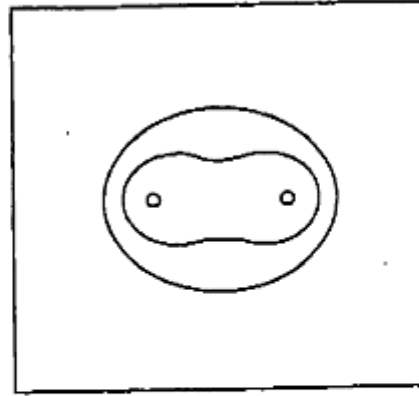


FIG. 7

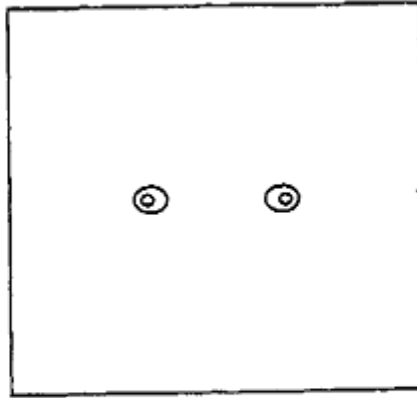


FIG. 8A

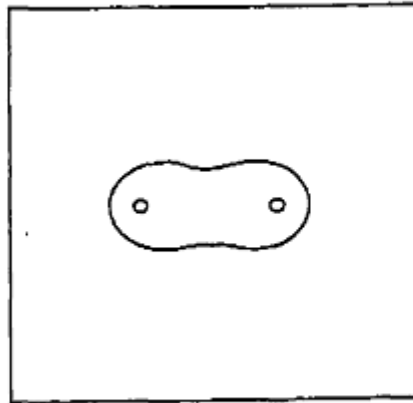


FIG. 8B

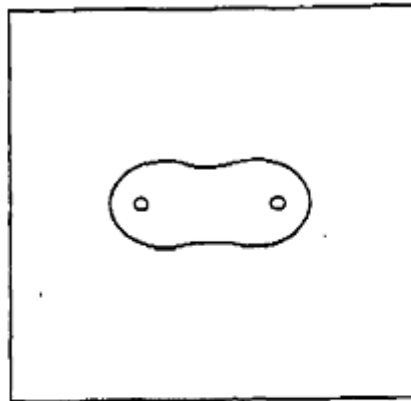
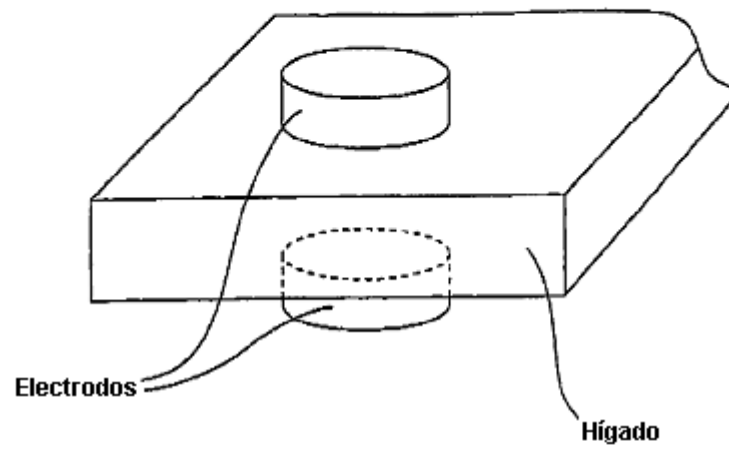


FIG. 9



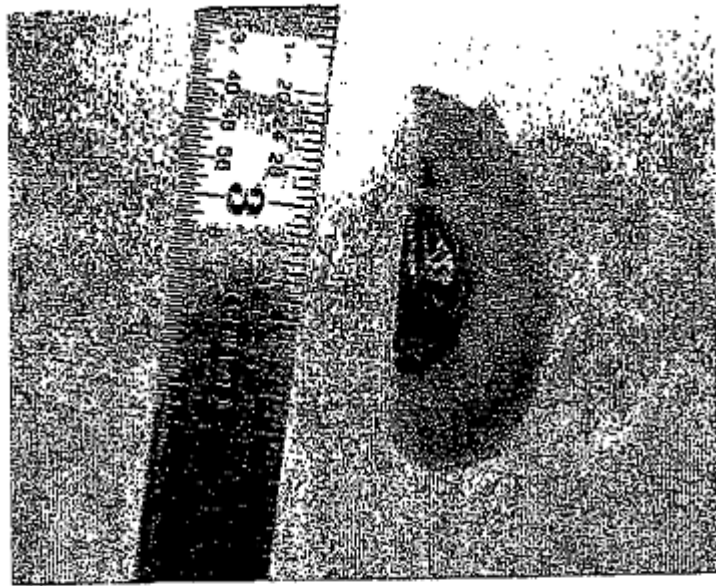


FIG. 10

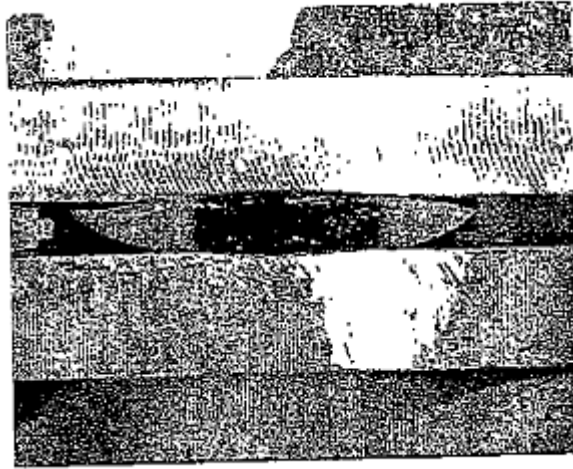


FIG. 11

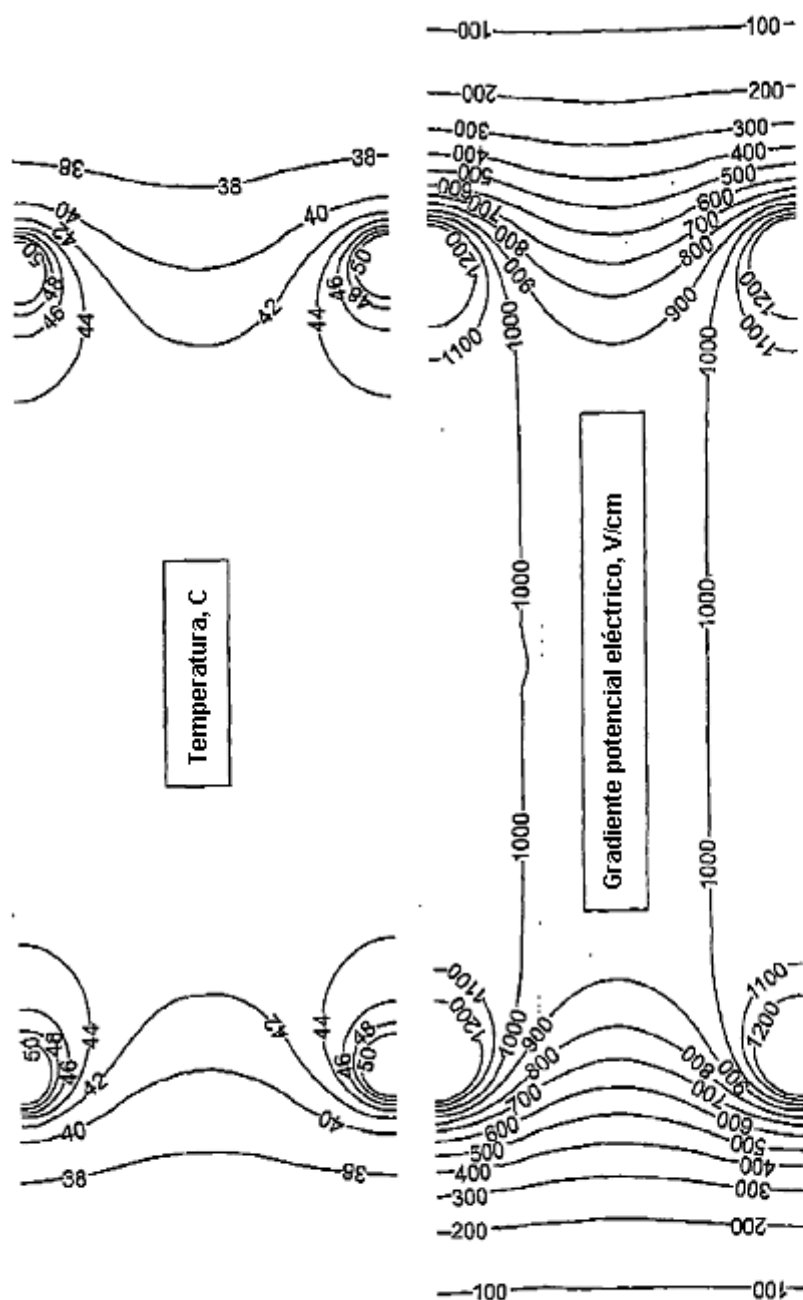


FIG. 12

