

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 498**

51 Int. Cl.:

A61N 1/32

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2011 PCT/US2011/026701**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011 WO11109406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 11751208 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2542300**

54 Título: **Un dispositivo de electroporación cutánea tolerable y mínimamente invasivo**

30 Prioridad:

01.03.2010 US 309422 P

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

20.12.2016

73 Titular/es:

**INOVIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1787 Sentry Parkway West Building 18, Suite 400
Blue Bell, PA 19422, US**

72 Inventor/es:

**BRODERICK, KATE;
MCCOY, JAY;
KEMMERRER, STEPHEN V;
LIN, FENG y
KJEKEN, RUNE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 594 498 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

Un dispositivo de electroporación cutánea tolerable y mínimamente invasivo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a dispositivos de electroporación y su uso para facilitar la introducción de biomoléculas en células del tejido cutáneo en un mamífero.

10 Antecedentes

La magnitud de la respuesta inmunitaria a una vacuna de ADN puede depender, a menudo, de tres criterios principales - el diseño de vector optimizado, el uso de un adyuvante adecuado y el suministro con éxito y la posterior expresión del plásmido en el tejido diana. La electroporación in vivo ha demostrado ser particularmente eficaz para suministrar de forma eficiente inmunógenos de ADN al músculo y la piel y, de hecho, varios dispositivos se han visto involucrados en ensayos clínicos humanos.

El suministro de fármacos a tejido dérmico (intradérmico, ID) es un método atractivo en un entorno clínico por una serie de razones. La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, el más accesible, el más fácilmente monitorizado, además de ser altamente inmuno-competente. Sin embargo, la función de barrera impermeable de la piel ha sido un obstáculo fundamental para el suministro transdérmico de fármacos eficiente.

La piel humana se extiende hasta aproximadamente 2 m² de área y tiene, de promedio, aproximadamente 2,5 mm de grosor, convirtiéndola en el órgano más grande del cuerpo humano. Convencionalmente, la piel tiene dos tipos de tejido general, la epidermis y la dermis. La epidermis es un epitelio estratificado queratinizado de forma continua. La capa más externa de la piel es el estrato córneo (EC) y actúa como la función de barrera primaria para la piel. El EC es una capa de 15-30 células de grosor de corneocitos no viables pero bioquímicamente activos. Los otros tres estratos de la epidermis (E. granuloso, E. espinoso, E. basal) contienen todos queratinocitos en diferentes fases de diferenciación, así como las células de Langerhans inmunitarias y células dendríticas dérmicas.

Métodos tanto físicos como químicos para suministro transdérmico de fármacos y suministro de genes han sido detallados por grupos en todo el mundo. Iontoforesis, suministro de lípidos y pistola génica son ejemplos de ese tipo. Otro método físico para incrementar temporalmente la permeabilidad de la piel es la electroporación. La electroporación implica la aplicación de breves impulsos eléctricos que dan como resultado la creación de trayectorias acuosas dentro de las membranas de bicapa lipídica de las células de mamíferos. Esto permite el paso de moléculas grandes, que incluyen ADN, por la membrana celular que, de lo contrario, sería menos permeable. Por lo tanto, la electroporación incrementa la captación, así como la medida en que fármacos y ADN son suministrados a su tejido diana. Para la que la electroporación cause la formación de poros, es necesario que se alcance un umbral de energía y el movimiento producido por el efecto electroforético depende tanto del campo eléctrico como de la longitud del impulso.

En el caso de vacunas de ADN, la electroporación ha demostrado mejorar cuantitativamente respuestas inmunitarias, incrementar la amplitud de esas respuestas inmunitarias así como mejorar la eficiencia de la dosis. Las muchas ventajas del suministro cutáneo, de la forma más notable la presencia de diversas células inmunitarias relevantes, fácil accesibilidad clínica como órgano diana de inmunización, y la profundidad mínima de suministro (mínimamente invasiva) son atractivas; sin embargo, persiste la cuestión en cuanto a la capacidad de alcanzar tasas de transfección elevadas y posteriormente respuestas inmunitarias robustas.

El suministro de ADN desnudo a través de una inyección intramuscular (IM) estándar es notoriamente ineficiente fuera de modelos en roedor. Esto ha causado una incapacidad de alcanzar respuestas inmunitarias robustas en mamíferos grandes y seres humanos. Se han desarrollado varias estrategias para mejorar la expresión de vacunas a base de ADN, tales como optimización de codones, optimización de ARN, adición de secuencias líder y el desarrollo de secuencias consenso optimizadas. El documento US 2006/084938 A1 desvela dispositivos y electrodos para la aplicación de campos eléctricos controlados para suministro in vivo de compuestos farmacéuticos y genes al interior de células mediante electroporación.

A pesar de las mejoras en el diseño de vectores y el uso de adyuvantes moleculares, sigue habiendo una necesidad de un método eficiente de administración de vacunas de ADN que de cómo resultado un elevado nivel de expresión del plásmido en el tipo celular deseado del tejido deseado, de la forma más habitual, músculo, tumor o piel. Además, sigue habiendo una necesidad de un dispositivo y método de electroporación de suministro de vacunas que sea eficaz para generar una respuesta inmunitaria tanto protectora como tolerable (o casi indolora).

Sumario de la invención

65 La invención es tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Los numerosos objetivos y ventajas de la presente invención pueden ser entendidos mejor por los expertos en la materia mediante referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 presenta un plano de una realización de un conjunto de un dispositivo de EP mínimamente invasivo ("MIED").

La figura 2 presenta dibujos tridimensionales de componentes de una realización de un MIED. "a" muestra una carcasa de matriz estéril desechable, "b" muestra una carcasa duradera y "c" muestra la carcasa de electrodos dentro de la matriz desechable (2a).

La figura 3 presenta dibujos tridimensionales de una realización de un MIED que es de mano, que funciona con batería con matriz desprendible (para esterilización) "a" muestra una vista externa.

"b" muestra una vista interna (incluyendo baterías).

La figura 4 presenta fotos de una realización del MIED.

La figura 5 presenta imágenes fluorescentes de tejido de piel de cobaya para detectar la expresión de GFP después de administrar suministro facilitado por electroporación de construcciones de expresión de GFP usando un MIED.

La figura 6 presenta imágenes fluorescentes de tejido de la piel de diversos animales para detectar la expresión de GFP después de administrar suministro facilitado por electroporación de construcciones de expresión de GFP usando un MIED.

La figura 7 presenta gráficos que muestran resultados de inmunogenicidad en protección de provocación con gripe en ratones.

La figura 8 presenta gráficos que muestran resultados de inmunogenicidad en protección de provocación con gripe en cobaya.

La figura 9 presenta gráficos que muestran resultados de inmunogenicidad en protección de provocación con gripe en primates no humanos.

Descripción detallada de la invención

Se proporcionan las siguientes definiciones abreviadas o acortadas para ayudar a la comprensión de las realizaciones preferidas de la presente invención. Las definiciones abreviadas que se dan aquí no son de modo alguno exhaustivas ni contradictorias a las definiciones tal como se entienden en el campo o el significado en el diccionario. Las definiciones abreviadas se dan aquí para complementar o definir con mayor claridad las definiciones conocidas en la técnica.

La expresión "corriente constante" se usa en el presente documento para definir una corriente que es recibida o experimentada por un tejido, o células que definen dicho tejido, a lo largo de la duración de un impulso eléctrico suministrado al mismo tejido. El impulso eléctrico se suministra desde los dispositivos de electroporación descritos en el presente documento. Esta corriente se mantiene a un amperaje constante en dicho tejido a lo largo de la vida de un impulso eléctrico, ya que el dispositivo de electroporación proporcionado en el presente documento tiene un elemento de retroalimentación, que tiene preferentemente una retroalimentación instantánea. El elemento de retroalimentación puede medir la resistencia del tejido (o células) durante toda la duración del impulso y puede hacer que el dispositivo de electroporación altere su producción de energía eléctrica (por ejemplo, incremento de tensión), de modo que la corriente en el mismo tejido permanezca constante durante todo el impulso eléctrico (en el orden de microsegundos) y de impulso a impulso. En algunas realizaciones, el elemento de realimentación comprende un controlador. Los valores de amperaje de la corriente descritos para ser suministrados por los dispositivos en el presente documento son, preferentemente, valores de amperaje de corriente constante.

La expresión "tensión constante" se usa en el presente documento para definir una tensión o potencial eléctrico que es recibido o experimentado por un tejido, o células que definen dicho tejido, durante la duración de un impulso eléctrico suministrado al mismo tejido. El impulso eléctrico es suministrado desde los dispositivos de electroporación descritos en el presente documento. Esta tensión se mantiene en una tensión constante en dicho tejido a lo largo de la vida de un impulso eléctrico, ya que el dispositivo de electroporación proporcionado en el presente documento tiene un elemento de retroalimentación, que tiene preferentemente una retroalimentación instantánea. El elemento de retroalimentación puede medir la resistencia del tejido (o células) durante toda la duración del impulso y puede hacer que el dispositivo de electroporación altere su producción de energía eléctrica, de modo que la tensión en el mismo tejido se mantenga constante durante todo el impulso eléctrico (del orden de microsegundos) y de impulso a

impulso. En algunas realizaciones, el elemento de retroalimentación comprende un controlador. Los valores de tensión descritos para ser suministrados por los dispositivos en el presente documento son, preferentemente, valores de tensión constantes.

El término “retroalimentación” o la expresión “retroalimentación de corriente” se usan de forma intercambiable y significan la respuesta activa de los dispositivos de EP de la piel proporcionados, que comprende medir la corriente en el tejido entre los electrodos y alterar la producción de energía suministrada por el dispositivo de EP en consecuencia a fin de mantener la corriente a un nivel constante. Este nivel constante es predeterminado por un usuario antes de iniciar la secuencia de impulsos o el tratamiento eléctrico. Preferentemente, la retroalimentación se consigue mediante el componente de electroporación, por ejemplo, el controlador, del dispositivo de EP cutánea, ya que el circuito eléctrico en el mismo es capaz de monitorizar continuamente la corriente en el tejido entre los electrodos y comparar esa corriente monitorizada (o corriente dentro del tejido) con una corriente predeterminada y hacer continuamente ajustes en la producción de energía para mantener la corriente monitorizada en niveles predeterminados. En algunas realizaciones, el bucle de retroalimentación es instantáneo, ya que es una retroalimentación en bucle cerrado analógica.

El término “biomolécula”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, microburbujas (por ejemplo, vesículas cargadas con fármaco) y productos farmacéuticos. Preferentemente, la biomolécula es una vacuna, y más preferentemente la biomolécula es una vacuna de ADN, y aún más preferentemente una vacuna de ADN plasmídico.

El término “electroporación” y las expresiones “electro-permeabilización”, o “mejora electro-cinética” (“EP”), tal como se usan de forma intercambiable en el presente documento se refieren al uso de un impulso de campo eléctrico transmembrana para inducir trayectorias microscópicas (poros) en una membrana biológica; su presencia permite a biomoléculas tales como plásmidos, oligonucleótidos, ARNip, fármacos, iones y agua que pasen de un lado de la membrana celular al otro.

La expresión “corriente descentralizada” se usa en el presente documento para definir el patrón de corrientes eléctricas suministradas a partir de las diversas matrices de electrodos de aguja de los dispositivos de electroporación descritos en el presente documento, en el que los patrones minimizan, o preferentemente eliminan la aparición de estrés térmico relacionado con electroporación en cualquier zona del tejido que está siendo electroporado.

La expresión “mecanismo de retroalimentación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso realizado por software o hardware (o firmware), proceso que recibe y compara la impedancia del tejido deseado (antes, durante y/o después del suministro de impulsos de energía) con un valor presente, preferentemente corriente, y ajusta el impulso de energía suministrado para alcanzar el valor predeterminado. El término “impedancia” se usa en el presente documento cuando se describe el mecanismo de retroalimentación y se puede convertir en un valor de corriente de acuerdo con la ley de Ohm, lo que permite comparaciones con la corriente predeterminada. En una realización preferida, el “mecanismo de retroalimentación” se realiza mediante un circuito en bucle cerrado analógico.

La expresión “mínimamente invasivo/a”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una penetración limitada por los electrodos de aguja del dispositivo de electroporación proporcionado, y puede incluir electrodos no invasivos (o agujas no penetrantes). Preferentemente, la penetración es a un grado que penetra a través del estrato córneo, y preferentemente se introduce en la capa más externa de tejido vivo, el estrato granuloso, pero no penetra en la capa basal. La profundidad de penetración no debe superar 0,1 mm, y preferentemente profundidades que varían entre aproximadamente 0,010 mm y aproximadamente 0,040 mm para atravesar el estrato córneo. Preferentemente, esto se consigue usando un electrodo que tiene un extremo de trocar rectificado para proporcionar una punta afilada que permite la penetración a través del estrato córneo pero que evita la penetración profunda.

El término “tolerable” o “indoloro/a”, se usan en el presente documento de manera intercambiable, y cuando se refieren a la electroporación, significan un nivel del dolor asociado con la electroporación sustancialmente inferior al habitual con los dispositivos de electroporación disponibles. Más específicamente, la electroporación tolerable (o casi indolora) es el resultado de la combinación de utilizar el MIED descrito en el presente documento, evitando electroporación del músculo, junto con el suministro de campos eléctricos bajos, a las capas epidérmicas entre el estrato córneo y las capas basales. Preferentemente, los campos eléctricos estarán compuestos por niveles bajos de tensión, es decir, por ejemplo de aproximadamente 0,01 V a 70 V, de aproximadamente 1 V a 15 V. Cuando se miden usando una EVA, los sujetos que experimentan la electroporación con MIED de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento experimentan niveles de dolor que están dentro del 20 % (de la escala completa) desde su puntuación indolora o sin dolor, por ejemplo, en 2 puntos, con una escala completa de 0 - 10, y preferentemente dentro del 10 % desde su puntuación indolora.

En un aspecto de la presente divulgación, hay dispositivos de electroporación capaces de suministrar a un sujeto un potencial eléctrico tolerable a capas de tejido epidérmico entre el estrato córneo y las capas basales que da como resultado electroporación de células en dicho tejido que comprende: un generador de tensión; y una matriz que tiene

una pluralidad de electrodos en comunicación eléctrica con el generador de tensión. Cada uno de la pluralidad de electrodos están separados de cada electrodo adyacente una distancia de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 2,5 mm; el generador de tensión suministra, mediante los electrodos, un potencial eléctrico de aproximadamente 0,1 voltios a aproximadamente 50 voltios al tejido epidérmico; y los electrodos tienen un ápice en el extremo distal que es romo con una punta afilada que permite al electrodo penetrar en capas de tejido de la epidermis entre el estrato córneo y las capas basales, y suministra el potencial eléctrico desde el generador de tensión al tejido de la epidermis. En algunos casos, los electrodos tienen un ápice en el extremo distal que es generalmente romo pero tiene una punta afilada, o en otras palabras una punta afilada seguida por ángulos pocos profundos o romos. Por ejemplo, el electrodo puede tener un extremo distal que es un ápice de trocar de rectificados 10° fuera del eje, hasta casi perpendiculares al eje de la aguja.

En otro aspecto de la presente divulgación, hay dispositivos de electroporación capaces de suministrar a un sujeto un potencial eléctrico tolerable a tejido epidérmico que da como resultado electroporación de células en dicho tejido epidérmico que comprende: un generador de tensión; y una matriz que tiene una pluralidad de electrodos en comunicación eléctrica con el generador de tensión. Cada uno de la pluralidad de electrodos están separados de cada electrodo adyacente una distancia de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 2,5 mm; el generador de tensión suministra, mediante los electrodos, un potencial eléctrico de aproximadamente 0,1 voltios a aproximadamente 50 voltios al tejido epidérmico; y los electrodos están adaptados para penetrar en el tejido epidérmico a profundidades de 0,1 mm o menos.

En otro aspecto de la presente divulgación, hay dispositivos de electroporación capaces de suministrar a un sujeto un potencial eléctrico tolerable a tejido epidérmico que da como resultado electroporación de células en dicho tejido que comprende: un generador de tensión; y una matriz que tiene una pluralidad de electrodos en comunicación eléctrica con el generador de tensión. Cada uno de la pluralidad de electrodos están separados de cada electrodo adyacente una distancia de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 2,5 mm; el generador de tensión suministra a la matriz un campo eléctrico de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 voltios; y en el que los electrodos suministran un potencial eléctrico tolerable a las células del tejido epidérmico que es casi indoloro según lo medido mediante una escala visual analógica.

En otro aspecto de la presente divulgación, hay dispositivos de electroporación capaces de suministrar a un sujeto un potencial eléctrico tolerable a tejido epidérmico que da como resultado electroporación de células en dicho tejido que comprende: un generador de tensión; y una matriz que tiene una pluralidad de electrodos en comunicación eléctrica con el generador de tensión. Cada uno de la pluralidad de electrodos están separados de cada electrodo adyacente una distancia de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 2,5 mm; el generador de tensión suministra a la matriz un campo eléctrico de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 voltios; y en el que los electrodos suministran un potencial eléctrico tolerable a las células del tejido epidérmico como se demuestra mediante daño tisular mínimo en dichas células.

En algunas realizaciones, los dispositivos tienen electrodos que están adaptados para penetrar en el tejido epidérmico a profundidades de 0,1 mm o menos, y preferentemente a profundidades de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 0,04 mm. Preferentemente, los electrodos están separados de cada electrodo adyacente una distancia de aproximadamente 1,5 mm. Además, preferentemente, el generador de tensión suministra al tejido de la epidermis un potencial eléctrico de aproximadamente 1 voltio a aproximadamente 15 voltios, y más preferentemente aproximadamente 15 voltios.

En algunas realizaciones, los dispositivos suministran el potencial eléctrico tolerable, el potencial eléctrico durante una duración que varía entre aproximadamente 5 ms y aproximadamente 250 ms, intervalos de duración y tiempos entre ellos.

En algunas realizaciones, los dispositivos suministran un potencial eléctrico tolerable que genera una evaluación del dolor por dicho sujeto que es casi indoloro según lo medido mediante una escala visual analógica. La EVA es una línea horizontal de 100 mm de largo en la que 0 mm indicaba ningún dolor y 100 mm indicaba el peor dolor. Casi indoloro es una puntuación usando la metodología EVA que produce una puntuación media de aproximadamente < 20 mm (dentro del intervalo de confianza del 95 %), y preferentemente < 10 mm (dentro del intervalo de confianza del 95 %).

En algunas realizaciones, los dispositivos suministran un potencial eléctrico tolerable que es un potencial eléctrico que da como resultado daño tisular mínimo en dichas células del sujeto, y preferentemente ningún daño tisular visible mediante análisis histopatológico del tejido. El análisis histológico puede utilizarse para evaluar el daño visual.

El análisis histológico demuestra transfección en las capas superiores de la epidermis

Se realizó análisis histopatológico de tejido cutáneo de cobaya. Cada panel mostraba tejido que ha sido electroporado mediante MID. Todos los portaobjetos han sido teñidos con hematoxilina y eosina así como se han observado al microscopio fluorescente (objetivo de 20 aumentos) para visualizar la positividad de GFP. Se mostró la histopatología del tejido cutáneo después del sacrificio del animal 3 días después del tratamiento: el análisis reveló

ningún daño tisular asociado después de electroporación con el dispositivo mínimamente invasivo. En otras palabras, el análisis histopatológico del tejido con electroporación se mostraba similar al tejido sin electroporación.

En otro aspecto de la presente divulgación, hay métodos tolerables de suministro de una biomolécula a células de tejido epidérmico de un sujeto mediante suministro asistido por electroporación usando los dispositivos de electroporación descritos en el presente documento, que comprenden: administrar la biomolécula a las células; poner en contacto los electrodos con el tejido epidérmico de modo que los electrodos penetren a través del estrato córneo y residan en capas por encima de las capas basales; y suministrar un potencial eléctrico tolerable desde el generador de tensión a las células de la capa epidérmica mediante los electrodos.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden manipular los electrodos para penetrar en el tejido epidérmico a profundidades de 0,1 mm o menos, y preferentemente a profundidades de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 0,04 mm. La matriz puede ajustarse manualmente atrás y adelante (u ondularse) en el sitio de inyección para garantizar un buen contacto y da como resultado que el ápice de los electrodos atraviese la capa del estrato córneo. Preferentemente, la etapa de suministro comprende suministrar un potencial eléctrico tolerable que genera una evaluación del dolor por dicho sujeto que es casi indolora según lo medido mediante una escala visual analógica. Además, preferentemente, la etapa de suministro comprende suministrar un potencial eléctrico tolerable que da como resultado daño tisular mínimo en dichas células del sujeto. La etapa de suministro preferentemente suministra un potencial eléctrico de aproximadamente 0,1 voltios a aproximadamente 15 voltios a las células.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la etapa de suministro que comprende suministrar un potencial eléctrico durante una duración de aproximadamente 5 ms a aproximadamente 250 ms, e intervalos de duración y números entre ellos, y preferentemente 100 ms.

Dispositivos de electroporación generales

Se proporcionan generadores o controladores del dispositivo de electroporación que pueden suministrar un impulso de energía eléctrica a un tejido epidérmico entre el estrato córneo y las capas basales a campos eléctricos bajos para causar electroporación tolerable. Preferentemente, la electroporación se producirá principal o exclusivamente en la capa del estrato granuloso. Los dispositivos suministran el impulso de energía a través del MIED proporcionado mediante los electrodos de aguja que son capaces de penetrar a través del estrato córneo.

En algunas realizaciones, la capacidad de respuesta del presente MIED, que preferentemente mantiene una corriente constante en el tejido tratado, se alcanza a través de un mecanismo de retroalimentación en el dispositivo de EP cutánea, que impide el calentamiento de un tejido, y reduce el daño tisular, el dolor y contribuye al éxito global de la tecnología de electroporación cutánea proporcionada. En algunas realizaciones, el MIED puede estar compuesto además por un controlador; un generador de forma de onda en comunicación electrónica con el controlador; un registrador de forma de onda en comunicación electrónica con el controlador; y una batería conectada eléctricamente al generador de forma de onda. El controlador puede recibir una entrada del usuario, ordenar al generador de forma de onda que suministre el impulso de energía al tejido deseado de acuerdo con la entrada, y comunicar datos al registrador de forma de onda de acuerdo con el impulso de energía suministrado; y en el que la batería envía una carga eléctrica al generador de forma de onda, siendo la batería una batería de iones de litio, níquel- hidruro metálico, ácido-plomo, o níquel-cadmio. Preferentemente, el MIED (figura 3) es portátil. El dispositivo portátil puede ser accionado mediante un módulo de batería, y ser adecuado para vacunación en masa para fines terapéuticos o de vacunación.

El MIED puede ser una combinación de la matriz de electrodos proporcionada y el aplicador junto con diversos componentes, o generadores, que generan un campo eléctrico (o que generan un impulso eléctrico). En algunos ejemplos, los generadores pueden seleccionarse entre uno de los dispositivos de electroporación conocidos, incluyendo aunque sin limitarse a los siguientes: los dispositivos de electroporación descritos en la patente de Estados Unidos N.º 7.245.963, titulada, "Constant Current Electrode Assembly for Electroporation", y la patente de Estados Unidos N.º 5.273.525, la patente de Estados Unidos N.º 6.110.161, la patente de Estados Unidos N.º 6.261.281, la patente de Estados Unidos N.º 6.958.060, y la patente de Estados Unidos 6.939.862, entre otras. En ejemplos más preferidos, los generadores son aquellos usados con el dispositivo de EP CELLECTRA® y el dispositivo de EP Elgen EP (ambos de Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA).

Agujas de electroporación

Diversas agujas de electroporación conocidas capaces de suministrar una carga eléctrica pueden incorporarse en el MIED. Las agujas de electroporación son mínimamente invasivas, lo que incluye agujas no invasivas. Preferentemente, las agujas son afiladas, por ejemplo, algunos casos usan un rectificado de trocar, de modo que puedan penetrar a través del estrato córneo y alcanzar el estrato granuloso. El extremo del trocar puede ser rectificado para dejar una punta afilada que permita la penetración a través del estrato córneo pero evite una penetración profunda. En algunos ejemplos, los electrodos tienen un ápice en el extremo distal que es generalmente romo pero tiene una punta afilada, o en otras palabras una punta afilada seguida por ángulos poco profundos o

romos, por ejemplo, el electrodo puede tener un extremo distal que es un ápice de trocar de rectificados 10° fuera del eje, a casi perpendicular al eje de la aguja.

Matrices

Con el actual MIED pueden usarse una multitud de formaciones de matriz de agujas conocidas. Estas formaciones de matriz de agujas contempladas incluyen cualquier número de electrodos, cualquier patrón geométrico de electrodos en una disposición plana general. Preferentemente, los electrodos están dispuestos distribuidos uniformemente sobre la matriz de electrodos (o sobre la base o sustrato al que están unidos los electrodos). Más preferentemente, los electrodos de aguja están dispuestos en una disposición similar a un cuadrado con cada electrodo adyacente separado aproximadamente la misma distancia (excepto por los electrodos en el borde del cuadrado).

En algunas realizaciones, la matriz está compuesta por al menos tres agujas equidistantes en un patrón triangular, al menos cuatro agujas equidistantes en un patrón circular, o agujas dispuestas en un patrón 2 x 2, 3 x 3, 4 x 4, 5 x 5, o mayor. Como alternativa, el patrón puede ser rectangular o romboidal. Preferentemente, los electrodos de aguja están dispuestos en una disposición de matriz de agujas 4 x 4. Un ejemplo de la matriz de agujas 4 x 4 se muestra en la figura 1. La figura 2 muestra un ejemplo de la carcasa del MIED, carcasa de la matriz y carcasa del electrodo. Cada electrodo de aguja puede estar separado de cada electrodo de aguja adyacente una distancia de 150 mm o menos, de 100 mm a 1 mm, de 50 mm a 1 mm, de 40 mm a 1 mm, de 30 mm a 1 mm, de 20 mm a 1 mm, de 10 mm a 1 mm, de 5 mm a 1 mm, de 5 mm a 2 mm, de 5 mm a 2 mm, y preferentemente 2 mm, y más preferentemente 1,5 mm.

Impulsos eléctricos (potencial eléctrico suministrado)

Los dispositivos proporcionados funcionan a tensiones y corrientes más bajas que los métodos de EP típicos para mejorar la tolerabilidad mientras se mantiene la transfección con éxito de la biomolécula (tal como demuestra la expresión y posteriormente la respuesta inmunitaria). El dispositivo se usa habitualmente con un generador de impulsos diseñado para suministrar una tensión, una corriente constante o una combinación de ambas, según se deseen. Los impulsos eléctricos usados por el MIED para efectuar la transfección de las células en el tejido cutáneo son cualesquiera patrones de impulsos conocidos que proporcionen la baja energía eléctrica requerida para producir la electroporación tolerable. En algunas realizaciones, el MIED suministra un impulso eléctrico al tejido deseado a niveles de tensión de 0,01 V a 70 V, 0,01 V a 50 V, 0,01 V a 40 V, 0,01 V a 30 V, 0,01 V a 20 V, 0,01 V a 15 V, 0,1 V a 70 V, 0,1 V a 50 V, 0,1 V a 40 V, 0,1 V a 30 V, 0,1 V a 20 V, 0,1 V a 15 V, y preferentemente 1 V - 15 V. Más preferentemente los niveles de tensión son de 15 V cuando electrodos adyacentes del MIED están separados aproximadamente 2 mm, y preferentemente 1,5 mm.

En algunas realizaciones, el MIED suministra energía eléctrica tolerable que se caracteriza por un impulso eléctrico que suministra la siguiente corriente al tejido deseado: de 0,2 mA a 100 mA, 0,1 mA a 100 mA, 0,5 mA a 100 mA, 1 mA a 100 mA, 1 mA a 80 mA, 1 mA a 60 mA, 1 mA a 50 mA, 1 mA a 40 mA, 1 mA a 30 mA, pero preferentemente de 1 mA a 100 mA, y más preferentemente de 1 mA a 30 mA, y más preferentemente 10 mA.

Los impulsos eléctricos tolerables asociados con el MIED se caracterizarán, todos, por corta duración de cada impulso, incluyendo longitudes de impulso de 5 ms a 250 ms, impulso de 10 ms a 250 ms, 20 ms a 250 ms, 40 ms a 250 ms, 60 ms a 250 ms, 80 ms a 250 ms, 100 ms a 250 ms, 20 ms a 200 ms, 40 ms a 200 ms, 60 ms a 200 ms, 80 ms a 200 ms, 100 ms a 200 ms, 20 ms a 150 ms, 40 ms a 150 ms, 60 ms a 150 ms, 80 ms a 150 ms, 100 ms a 150 ms, 100 ms a 140 ms, 100 ms a 130 ms, 100 ms a 120 ms, 100 ms a 110 ms, y más preferentemente 100 ms.

Los impulsos eléctricos tolerables asociados con el MIED se caracterizarán también por impulsos bajos repetidos. Los impulsos suministrados por el MIED se repiten para suministrar el siguiente número de impulsos para cada vacunación: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, y preferentemente de 1-6 impulsos, y más preferentemente 2 impulsos.

Tejido para administrar vacuna + EP

El MIED es para el suministro de energía eléctrica que permite la electroporación a células de tejido cutáneo para ayudar al suministro de biomoléculas a las células en su interior, y preferentemente la vacunación con vacunas de ADN. Preferentemente, los electrodos penetran solamente en el tejido cutáneo que es la capa de tejido vivo justo debajo del estrato córneo y por encima de la capa basal; y preferentemente en las capas del estrato granuloso solamente. La biomolécula se suministra habitualmente al tejido diana usando la técnica de Mantoux.

Versión que funciona con batería con componentes electrónicos en el mango (véase la figura 3)

El MIED puede ser un dispositivo de EP portátil. Se proporciona un dispositivo MIED autónomo portátil en el que el dispositivo es de mano y en el que la fuente de energía eléctrica para impulsos eléctricos es al menos una batería que tiene un potencial de tensión de entre 1,5 V y 12 V.

El MIED portátil puede comprender una carcasa dentro de la cual está contenida dicha batería, una placa de circuitos que comprende un circuito eléctrico en comunicación eléctrica con y que funciona con dicha batería, y al menos un condensador capaz de contener una capacitancia de entre 1000 y 100000 μF (microFaradios). En una realización relacionada, los componentes (es decir, batería, circuito y condensador) están, en general, colocados espacialmente dentro de dicha carcasa en una disposición lineal o uno al lado del otro, de modo que la carcasa pueda tener una forma generalmente rectangular o cilíndrica capaz de estar sujeta en la mano de una persona que maneja el dispositivo. Por ejemplo, la carcasa tendrá un extremo proximal y un extremo distal, de modo que el cilindro o parte larga de dicho rectángulo esté entre ellos y en la que dicha batería está ubicada dentro de dicho extremo proximal de dicha carcasa y es accesible desde dicho extremo mediante una cubierta amovible. En el extremo distal de dicha carcasa pueden estar ubicados conductos eléctricos que están en comunicación eléctrica con dicho circuito y que sirven como conectores para conectar a al menos un cátodo y al menos un ánodo a usar para completar un circuito que comprende un pulso electroporador alimentado por dicha batería a través de dicho condensador y circuito. El extremo distal de dicha carcasa también puede comprender en asociación con, o como parte de, dicha carcasa un mecanismo para unir, de forma semipermanente o permanente, y/o desprender del mismo, un conjunto de cabeza, comprendiendo dicho conjunto de cabeza, a su vez, cualquiera de un depósito para contener un agente terapéutico fluido, un orificio en comunicación fluida con dicho depósito a través del cual dicho fluido puede ser dirigido a un tejido corporal, una fuente de energía para mover dicho fluido desde dicho depósito a través de dicho orificio, y al menos un electrodo que comprende al menos un ánodo y un cátodo.

En algunas realizaciones, el MIED portátil es capaz de suministrar al tejido cutáneo de un mamífero un impulso eléctrico capaz de electroporar células dentro de dicho tejido, teniendo dicho impulso eléctrico una tensión generalmente de entre 0,1 V y 70 V, preferentemente 0,1 V y 50 V, más preferentemente 1 V y 15 V. Es más, el dispositivo es capaz de administrar un impulso electroporador a dichas intensidades de campo durante un periodo de tiempo de entre 5 milisegundos y 250 milisegundos, y más habitualmente de entre 10 y 100 milisegundos, aún más habitualmente entre 30 y 70 milisegundos, y más preferentemente 50 milisegundos. Es más, el dispositivo es capaz, mediante su microprocesador, de suministrar un impulso bipolar o un impulso monopolar de energía eléctrica electroporadora, impulsos bipolares o monopolares que pueden comprender un tren predeterminado de múltiples impulsos, y/o impulsos conformados en tensión, o más aún impulsos de descarga de forma exponencial. Dicha capacidad de emitir impulsos variables permite la optimización del potencial del proceso de electroporación incluyendo optimización de la tensión, forma del impulso, duración y polaridad de los impulsos de electroporación.

Ejemplos

La presente divulgación se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos.

Puede llevarse a cabo un ensayo para evaluar tolerabilidad o el dolor reducido generado por los dispositivos de electroporación descritos en el presente documento. El personal del estudio puede poner en marcha un cronómetro para cada paciente en el momento de la administración de la electroporación. Cada paciente realizará evaluaciones de dolor estándar bajo la supervisión de personal del estudio formado, y registrarán estas evaluaciones en un diario a: cinco, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos, una hora y una hora y media después de la electroporación, a continuación cada hora durante 12 horas después de la electroporación, y a las 16 horas y 24 horas después de la electroporación. Los pacientes midieron la intensidad del dolor usando tanto una escala categórica como una EVA. Tal como se ha indicado previamente, la escala categórica incluía cuatro categorías:

0 = ninguno, 1 = leve, 2 = moderado y 3 = grave.

La EVA es una línea horizontal de 100 mm de largo en la que 0 mm indicaba ningún dolor y 100 mm indicaba el peor dolor. Usando esta escala de 100 mm, una puntuación casi indolora sería una puntuación que está dentro de 20 mm desde una puntuación que indica sin dolor (son se sintió ningún dolor). En algunos casos, casi indoloro serán puntuaciones de 10 mm desde una puntuación sin dolor.

Métodos

Los siguientes métodos se utilizan en cada uno de los ejemplos, a continuación, donde sea apropiado según la descripción.

Diseño del dispositivo mínimamente invasivo - Matrices de electrodos que consistían en una aguja de trocar bañada en oro de 4x4 de 0,0175 pulgadas de diámetro a una separación de 1,5 mm estaban construidos para usarse junto con el generador de impulsos ELGEN1000 (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) o un circuito de baja tensión que funciona con batería.

Preparación del plásmido - El plásmido gWiz GFP se adquirió de Aldevron (Fargo ND). El plásmido NP codifica la NP de longitud completa derivada de la cepa Puerto Rico 8 (H1N1) de la gripe. El plásmido M2 codifica la M2 de longitud completa de la cepa New Caledonia/99 (H1N1) de la gripe. La construcción tenía las señales que dirigen al núcleo mutadas y fue optimizada y sintetizada por GeneArt (Alemania). Todos los plásmidos se diluyeron en 1xPBS antes de la inyección. El cóctel plasmídico de vacuna contra la gripe SYNCON™ (construcción de ADN sintética) (100 μg /plásmido) que contenía pGX2005 (construcción de vacuna SYNCON™ que codifica una secuencia consenso

de H1HA) y pGX2009 (construcción de vacuna SYNCON[™] que codifica una secuencia consenso de H1HA de cerdo) se diluyeron en 1xPBS antes de la inyección.

Animales - Cobayas Hartley hembra (código de estirpe 051), conejos New Zealand hembra y ratones Balb C hembra se adquirieron de Charles River Laboratories. Ratas Wistar hembra se adquirieron de Charles River Laboratories. Cerdos Yorkshire hembra se adquirieron de S & S Farm's (Ramona, CA). Las cobayas, las ratas, los conejos y los ratones se alojaron en BioQuant (San Diego, CA). Macacos macho (4) y hembra (4) (*Macaca mulatto*) se alojaron individualmente en BIOQUAL, Inc. (Rockville, MD), con acceso *ad libitum* a alimento y agua. A los macacos se les permitió aclimatarse durante al menos 30 días en cuarentena antes del experimento. Todos los animales se alojaron y se manipularon de acuerdo con los estándares del *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC).

Preparación de animales - Los resultados de informador de GFP observados de las cobayas Hartley después de la eliminación del pelo fueron los mismos que los resultados observados en las cobayas sin pelo IAF en experimentos previos. Dado que la eliminación del pelo parecía no tener ningún efecto sobre la transfección resultante y debido a consideraciones de coste, se decidió llevar a cabo el resto del estudio en los animales Hartley. Las cobayas Hartley se afeitaron y el vello corto se eliminó mediante crema depilatoria (Veet) 24 h antes del tratamiento. Los ratones, las ratas, los conejos, los cerdos y los macacos se afeitaron antes del tratamiento.

Inyecciones de ADN - Los macacos se sedaron con ketamina inyectada. Todos los demás animales se sedaron con isoflurano inhalado. Todos los animales se inyectaron por vía intradérmica (método Mantoux - aguja para insulina del calibre 29) con 50 µl de 1 x PBS que contenía la dosis deseada de plásmido. A los ratones se les inyectaron por vía intramuscular, en el cuádriceps, 50 µl de 1xPBS que contenía la dosis deseada de plásmido. A los macacos se les inyectaron por vía intramuscular, en el cuádriceps, 400 µl de 1xPBS que contenía la dosis deseada de plásmido. El vector vacío se añadió para mantener cantidades de ADN iguales para cada grupo.

Electroporación con dispositivo dérmico - Inmediatamente después de la inyección de ADN, el dispositivo dérmico se aplicó al sitio de inyección dérmica. La matriz se "hizo oscilar" en el sitio de inyección para garantizar el buen contacto y electrotransferencia conseguida a través de la generación de impulsos a partir del Elgen 1000 o un circuito de batería de baja tensión. Los parámetros usados fueron tres impulsos de 15 voltios de 100 ms de duración. Electroporación del músculo - Inmediatamente después de la inyección IM, se realizó electroporación insertando una matriz de agujas de 27 G, 2 con una separación de electrodos de 4 mm en el sitio del músculo inyectado. Se suministraron dos impulsos de 125 V/cm que duraron 60 ms cada uno usando el Elgen 1000.

Imaginología de la piel - Se retiraron muestras o biopsias de piel post-mortem de animales después del sacrificio y se almacenaron en hielo hasta que se obtuvieron imágenes en un microscopio de imaginología OV 100 (Anti Cancer Inc., San Diego, CA) a 480 nm.

Histopatología - Se retiraron muestras o biopsias de piel post-mortem de animales después del sacrificio y se conservaron inmediatamente en formalina tamponada neutra al 10 % y se enviaron a Pacific Pathology, San Diego, CA, para procesamiento y análisis histopatológico. Tejidos apropiados se recortaron, se procesaron, se incluyeron en parafina, se seccionaron a aproximadamente 5 µm, y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los portaobjetos resultantes fueron examinados por un patólogo certificado por el consejo. Las secciones se visualizaron usando un microscopio Zeiss Axioplan con un objetivo 10 x en el Burnham Institute, San Diego, CA.

Detección de anticuerpos para NP en suero de ratón inmunizado - Las respuestas de anticuerpo contra NP se evaluaron mediante ELISA usando suero de ratones inmunizados. A los ratones se les extrajo sangre retro-orbital después semanas después de la última inmunización. Placas Nunc Maxi-Sorp Immuno Plates se revistieron con NP (5 µg/ml, Imgenex IMR-274) a 4 °C durante una noche. Los anticuerpos no unidos se eliminaron por lavado de la placa mediante un lavado de la placa automático usando PBS con Tween-20 al 0,05 %. Las placas se bloquearon para unión inespecífica añadiendo 200 µl de PBS con BSA al 0,5 % durante una hora a 37 °C. Después de lavar como anteriormente, se diluyó suero 1:50 en PBS con BSA al 0,2 % y Tween-20 al 0,05 % y se añadieron al primer pocillo. Se realizó una dilución sucesiva diluyendo de 1:3 a 1:5 para cada pocillo. El suero se incubó durante dos horas a 37 °C antes de lavar. La IgG-biotina anti-ratón (B9904 5 ml; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) se diluyó a 1:10000 y se añadieron 50 µl a cada pocillo y se incubaron una hora a 37 °C antes de lavar. A esto le siguió la adición a cada pocillo de 50 µl de estreptavidina-HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL, EE. UU.) diluido a 1:1000 y se incubó durante una hora a 37 °C antes de lavar. La etapa final se realizó añadiendo 50 µl de sustrato de HRP (P-9187, Sigma-Aldrich) e incubando a temperatura ambiente en la oscuridad durante 10 minutos antes de leer la densidad óptica (DO) a 450 nm. Se consideraba que una lectura era positiva si la DO era tres veces mayor que la DO del suero de ratones sin exposición previa. Los resultados se presentaron como valor cuantitativo final, es decir, la última dilución donde la DO era mayor o igual a tres veces mayor que la del suero sin exposición previa.

Ensayo ELISpot - Dos semanas después de la inmunización, se aislaron esplenocitos de cada grupo de ratones. Se aclararon suspensiones de células individuales de glóbulos rojos usando tampón de lisis RBC (eBioscience). El kit de ensayo ELISPOT se adquirió de R&D Systems. Placas ELISPOT de 96 pocillos (Millipore) se revistieron con anticuerpo monoclonal anti-interferón (IFN)-γ de ratón. Después de incubación durante una noche a 4 °C, los pocillos se lavaron y se bloquearon con tampón de bloqueo de acuerdo con el protocolo de R&D Systems. Esplenocitos combinados de cada grupo se añadieron a los pocillos y se incubaron con 1 µg/ml de NP147 (TYQRTRALV Biosynthesis Inc.) durante 48 h. Las placas se lavaron y revelaron a continuación siguiendo el protocolo tal como lo describe el fabricante. Las manchas fueron contadas y analizadas por Cellular Technology Ltd.

Provocación intranasal con gripe - Ratones Balb/c en grupos de 10 se inmunizaron la semana 0, 3 y 6. Los ratones se inmunizaron: Principal 30+30 µg semana 0, refuerzo 30+30 µg semana 3, refuerzo 100+100 µg semana 10. La semana 12, se llevaron a cabo experimentos de provocación con gripe usando protocolos BSL IV en *The National*

Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada, Winnipeg, MB, Canadá de acuerdo con directrices éticas de su comité ético. Una dosis de 100xLD₅₀ de la cepa A/Vietnam/1203/04 de H5N1 se usó para provocación nasal. Los ratones fueron monitorizados a continuación para supervivencia y peso corporal cada día durante 21 días después de la provocación.

Ensayos HAI - A los animales se les extrajo sangre y se almacenaron muestras de suero inmediatamente en hielo seco antes de enviarlo a BIOQUAL, Rockville, MD para procesamiento. Los sueros se trataron con enzima destructora del receptor diluyendo 1 parte de suero con 3 partes de enzima y se incubaron durante una noche en un baño de agua a 37 °C. La enzima se inactivó mediante 30 minutos de incubación a 56 °C, seguida por la adición de 6 partes de solución salina tamponada con fosfato para una dilución final de 1/10. Se realizaron ensayos HAI en placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo en V, usando 4 unidades de hemaglutinación de virus y glóbulos rojos al 1 % tal como se ha descrito previamente. Los virus usados para los ensayos HAI se obtienen a partir de la rama de gripe del CDC.

Ejemplo 1

La electroporación usando un dispositivo mínimamente invasivo da como resultado robusta transfección del gen informador

Un dispositivo de electrodos mínimamente invasivo (MIED) se diseñó para uso con el suministro de una vacuna de ADN. Este nuevo aplicador consiste en electrodos de aguja de acero inoxidable bañados en oro con rectificadores de trocar (los electrodos tienen un ápice en el extremo distal que es romo con una punta afilada) a una separación de 1,5 mm en un patrón de matriz 4 x 4 (figuras 4a y 4c). Hileras alternas de cuatro electrodos pueden activarse con polaridad inversa: positiva y a continuación negativa. Los electrodos son capturados en tomas eléctricas dentro del mango de plástico, permitiendo que cada electrodo sea dirigido individualmente para patrones de activación alternativos. El dispositivo está diseñado para establecer contacto solamente con la superficie de la piel y no penetrar directamente en el tejido. Tras el contacto apropiado, lo afilado de los electrodos puede permitir a la matriz del dispositivo romper la capa de barrera del estrato córneo, garantizando mediciones de impedancia coherentes dando como resultado tratamientos de electroporación repetibles. El dispositivo prototipo se construyó con cable de conexión para enlace al generador de impulsos (figura 4b).

Se estudiaron los límites inferiores de los parámetros de tensión requeridos para transfección exitosa y respuestas inmunitarias usando este nuevo dispositivo de electrodos de aguja mínimamente invasivo (MIED). Sitios de la piel diferentes en el flanco de una cobaya se inyectaron usando la técnica Mantoux con 50 µl de 1 mg/ml de plásmido de GFP y se sometieron a impulsos inmediatamente usando el MIED ajustado a una tensión de tan solo 15 V (figura 5a). La transfección de GFP robusta y reproducible era visible 8 horas después de tratamiento alcanzaba un máximo a los 3 días. La transfección de GFP mínima o ninguna era detectable después de la inyección del plásmido de GFP en solitario (datos no mostrados). Aunque un intervalo de parámetros eléctricos y tensiones daba como resultado transfección de GFP, impulsos a 15 voltios fueron más reproducibles (datos no mostrados). La reproducibilidad se cuantificó y se evaluó mediante recuento de píxeles positivos después de microscopía de fluorescencia en condiciones estandarizadas. Los números de recuento de píxeles más consistentes dentro de un área definida se obtuvieron a los parámetros de 10-15 voltios. Los patrones de transfección de GFP reales aparecieron como distintas "islas" alrededor del punto de contacto con cada electrodo (figura 5b). La EP eficaz es poco profunda y está altamente localizada alrededor del ápice del electrodo a baja tensión, por lo tanto, no hay ninguna transfección significativa por debajo de las capas del estrato basal de la epidermis.

Para asegurarse de que la transfección robusta no era un fenómeno específico de la cobaya, se llevó a cabo localización de GFP en una serie de especies. Sitios de la piel en ratones, conejos, ratas y cerdos se inyectaron con 50 µl (30 µl en ratones) de 1 mg/ml de plásmido de GFP y se sometieron a impulsos inmediatamente usando el MIED. Todas las especies demostraron una robusta transfección de GFP dérmica después de la electroporación con mínima o ninguna transfección detectada después de la inyección de plásmido de GFP en solitario (figura 6). En todas las especies, se detectó una fuerte positividad de GFP en todas las muestras de piel electroporadas. Sin embargo, solamente las muestras de conejo demostraron el patrón de "isla" distintivo observado en las muestras de cobaya (figura 5). La localización de GFP en la piel de rata, ratón y cerdo parecía más difusa. El área transfectada real fue similar entre rata, conejo y cerdo (aproximadamente 4 mm²) dado que estaba en función del tamaño de la burbuja de inyección. El área transfectada en la piel de ratón fue ligeramente más pequeña debido al volumen de inyección más pequeño. En el panel de ratón, se muestra toda la piel del ratón, de modo que puede apreciarse el tamaño relativo. Células positivas para GFP se detectaron solamente en la superficie de la piel en las muestras de rata, conejo y cerdo. No se observó ninguna señal de GFP en el lado inferior de estas muestras. El lado inferior de las pieles de ratón parecía tener una señal de GFP positiva. Sin embargo, esto parece estar relacionado con la delgadez de la muestra de piel.

Estos datos sugieren que el MIED puede transfectar de forma eficiente el plásmido a la piel en modelos en animales tanto pequeños como grandes.

Ejemplo 2

Electroporación usando un dispositivo mínimamente invasivo - El análisis histológico demuestra transfección en las capas superiores de la epidermis

Para abordar el efecto de electroporación mediante el MIED a nivel celular, se llevó a cabo un análisis histológico. Sitios en una cobaya se inyectaron con 50 de 1 mg/ml de plásmido de GFP y se sometieron a impulsos inmediatamente usando el MIED. Se extirparon muestras de biopsia 3 días después del tratamiento, se fijaron, se seccionaron en parafina y se tiñeron con H&E (no se muestra el portaobjetos). El análisis patológico no reveló ningún daño tisular asociado después de electroporación con el dispositivo mínimamente invasivo. Microscopía de alta potencia reveló que la mayoría de la transfección de GFP se producía en la capa de células del estrato granuloso de la epidermis (no se muestra el portaobjetos). También se detectaron células positivas para GFP en el estrato basal. En contraste, solamente unas pocas células positivas para GFP se detectaron en la biopsia que recibió inyección de plásmido de GFP en solitario. Esto contrastaba directamente con la robusta señal observada en la muestra de biopsia procedente de tejido que había recibido electroporación. Una estimación visual de mejora de la expresión sería superando las 100-1000 veces basándose en el número de células positivas para GFP con respecto a ADN en solitario.

Ejemplo 3

Electroporación usando un dispositivo mínimamente invasivo - resultados en respuestas celulares robustas y proporciona 100 % de protección contra provocación letal en ratones

Se inmunizaron ratones con ADN que codifica antígenos de la gripe NP y M2: Principal 30+30 µg semana 0, refuerzo 30+30 µg semana 3, refuerzo 100+100 µg semana 10. Antígeno NP emparejado de la cepa Puerto Rico/39 y antígeno M2 emparejado de la cepa New Caledonia/99 se optimizaron, se sintetizaron y a continuación se clonaron en la cadena principal de un vector de expresión de mamífero clínicamente aprobado, pMB76.5. Los antígenos NP y M2e se seleccionaron para evaluar principalmente la inmunidad celular. Estas proteínas no son capaces de inducir respuestas de anticuerpo neutralizante.

Se electroporaron grupos de ratones con el dispositivo dérmico mínimamente invasivo o con el dispositivo intramuscular Elgen 1000 (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA). La inducción de respuestas celular y humoral potentes en el modelo en ratón según lo medido por ensayos ELISpot con células T específicas de antígeno y los valores cuantitativos de anticuerpo se observaron en todos los ratones. Las respuestas de CTL específicas de antígeno fueron 200 +/- 57,9 UFE/10⁶ esplenocitos contra NP para MIED y 85+/- 36,3 UFE/10⁶ esplenocitos contra NP para IM (figura 7A). Aquellos animales electroporados por vía intradérmica mostraron valores cuantitativos más elevados y respuestas celulares aunque no estadísticamente significativas.

En un intento de determinar si las respuestas inmunitarias inducidas fueron capaces de afectar a la infección, los ratones fueron provocados con una dosis letal de gripe A/H5N1/Vietnam/1203/04 mediante inoculación intranasal (i.n.) (figura 7B). Se sabe que la cepa VN/1203/04 (H5N1) de la gripe causa morbilidad y mortalidad rápidas. Aunque el 100 % de los ratones sin provocación previa sucumbieron a la infección el día 11, el 100 % de los ratones inmunizados con el MIED fueron protegidos tanto contra morbilidad como contra mortalidad hasta el día 15 (fin del experimento). Análogamente, el día 15, el 90 % de los animales de control positivo inmunizados IM sobrevivieron.

Ejemplo 4

Electroporación usando un dispositivo mínimamente invasivo, resultados en inmunogenicidad humoral y valores cuantitativos HI protectores

Cobayas

Es difícil dirigirse a la dermis en ratones debido a la estructura extremadamente fina de la piel y la estrecha proximidad del músculo subyacente. Por esta razón, a menudo respuestas inmunitarias inducidas en ratones son una combinación de piel y músculo. Por lo tanto, el MIED se ensayó en un modelo en un animal más grande - cobayas, que tiene una estructura cutánea mejor definida.

Se inmunizaron cobayas con una vacuna para la gripe SYNCON™ de consenso descrita anteriormente mediante electroporación intradérmica mediante MIED. Los animales se vacunaron con un cóctel plasmídico de vacuna (100 µg/plásmido) que contenía pGX2005 (construcción de vacuna SYNCON™ que codifica una secuencia consenso de H1HA) y pGX2009 (construcción de vacuna SYNCON™ que codifica una secuencia consenso de H1HA de cerdo) en un volumen de 50 µl diluidos en 1 x PBS. Dos semanas después de dos inmunizaciones, cada animal desarrolló robustos valores cuantitativos de HAI por encima de 1:40 contra H1N1 la cepa pandémica Mexico/2009, y también para la cepa A/H3N2 Brisbane, y en cierta medida para la cepa A/H5N1 Vietnam/2005 (figura 8).

Macacos

Se vacunaron macacos con un cóctel plasmídico de vacuna para la gripe consenso descrito previamente (100 µg/plásmido) que contenía pGX2005 (construcción de vacuna SYNCON™ que codifica una secuencia consenso de H1HA) y pGX2009 (construcción de vacuna SYNCON™ que codifica una secuencia consenso de H1HA de cerdo) en un volumen de 50 µl mediante electroporación intradérmica (MIED) o intramuscular (Elgen 1000). Después de dos inmunizaciones, cuatro de cuatro animales desarrollaron valores cuantitativos de HAI por encima de 1:40 contra la cepa H1N1/Mexico/2009, y contra la cepa A/H1N1/New Caledonia, cuando se inmunizaban por vía intradérmica con MIED (figura 9).

Ejemplo 5

Estudio de tolerabilidad con el dispositivo mínimamente invasivo

Para evaluar el nivel de dolor de EP con el dispositivo de EP mínimamente invasivo, éste se aplica a las capas epidérmicas entre el estrato córneo y la capa basal. La respuesta visual del ensayo con animales anestesiados no produce los espasmos musculares observados con impulsos de mayor potencia o matrices de electrodos invasivas, aunque demostrando transfección eficaz con genes informadores y respuesta inmunitaria con plásmidos antigénicos. Tensiones de impulso hasta 15 V y corrientes hasta aproximadamente 30 mA producen solamente una sensación leve, mientras que inducen respuestas inmunitarias protectoras en cobayas y monos macaco rhesus para gripe.

Se aplica EP in vivo usando la matriz del dispositivo dérmico invasivo y ha demostrado una marcada reducción del dolor en comparación con las matrices invasivas del dispositivo intramuscular. Se espera que el MIED de cómo resultado una reducción del dolor aún mayor.

Se aplica EP in vivo usando la matriz del MIED después de una inyección ID de solución salina al 0,9 % en el estrato granuloso. A los pacientes se les inyectan 0,15 ml de solución salina en la capa del estrato granuloso y a continuación se realiza EP usando CELLECTRA® 2000 (*Adaptive Constant Current Device* o, como alternativa, un dispositivo Elgen 1000, Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA). Los parámetros de EP son 15 V, impulso de 100 ms, y 3 impulsos en total.

Para cada sujeto, el dolor en el sitio de inyección se evaluaría usando una puntuación visual analógica (EVA), que se determina inmediatamente después de EP.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de electroporación mínimamente invasivo que comprende:

5 un generador de tensión; y una matriz que tiene una pluralidad de electrodos en comunicación eléctrica con el generador de tensión, en el que:

10 el dispositivo de electroporación es capaz de suministrar a un sujeto un potencial eléctrico a capas de tejido epidérmico entre el estrato córneo y las capas basales que da como resultado la electroporación de células en las capas de tejido epidérmico entre el estrato córneo y las capas basales;
 cada uno de la pluralidad de electrodos están separados de cada electrodo adyacente una distancia de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 2,5 mm;
 el generador de tensión suministra, mediante los electrodos, un potencial eléctrico de aproximadamente 0,01 voltios a aproximadamente 70 voltios a las capas de tejido epidérmico entre el estrato córneo y las capas
 15 basales; y
 los electrodos tienen un ápice en el extremo distal que es romo con una punta afilada que permite que el electrodo penetre en las capas de tejido de la epidermis entre el estrato córneo y las capas basales al tiempo que impide que la profundidad de penetración supere 0,1 mm, estando dichos electrodos adaptados para suministrar el potencial eléctrico desde el generador de tensión a las capas de tejido de la epidermis entre el
 20 estrato córneo y las capas basales.

2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que los electrodos están adaptados para penetrar en las capas de tejido epidérmico entre el estrato córneo y las capas basales a profundidades de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 0,04 mm.

25 3. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que los electrodos están separados de cada electrodo adyacente una distancia de aproximadamente 1,5 mm.

30 4. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el generador de tensión suministra al tejido de la epidermis un potencial eléctrico de aproximadamente 1 voltio a aproximadamente 15 voltios.

35 5. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el generador de tensión suministra al tejido de la epidermis un potencial eléctrico a una corriente que varía entre aproximadamente 1 mA y aproximadamente 50 mA.

40 6. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el generador de tensión suministra al tejido de la epidermis un potencial eléctrico durante una duración que varía entre aproximadamente 5 ms y aproximadamente 250 ms.

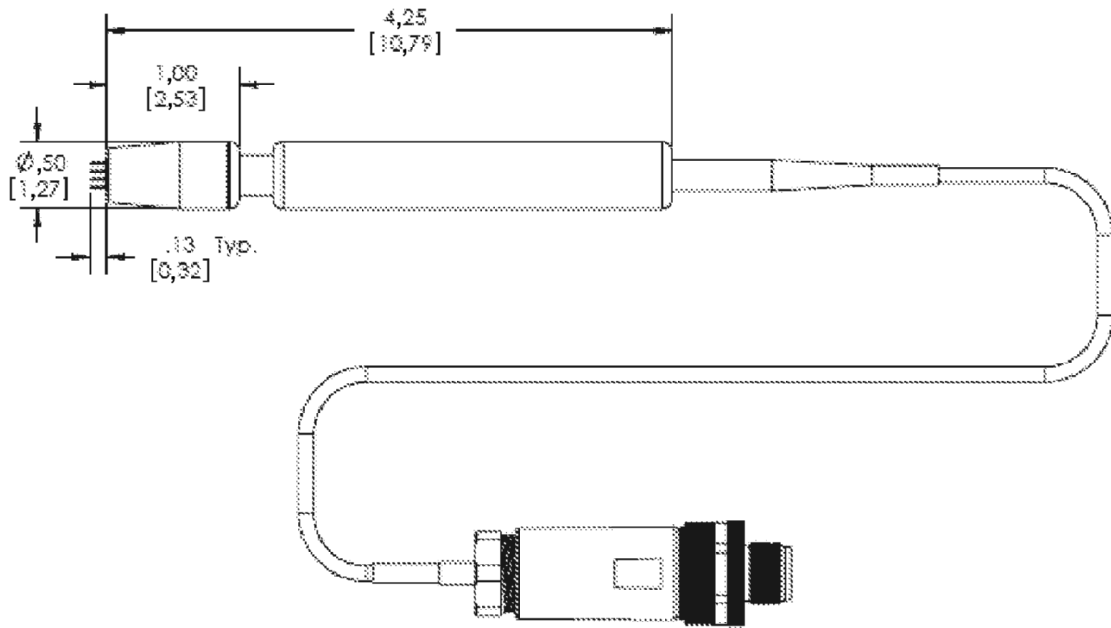


Figura 1 - Conjunto de dispositivo de EP mínimamente invasivo

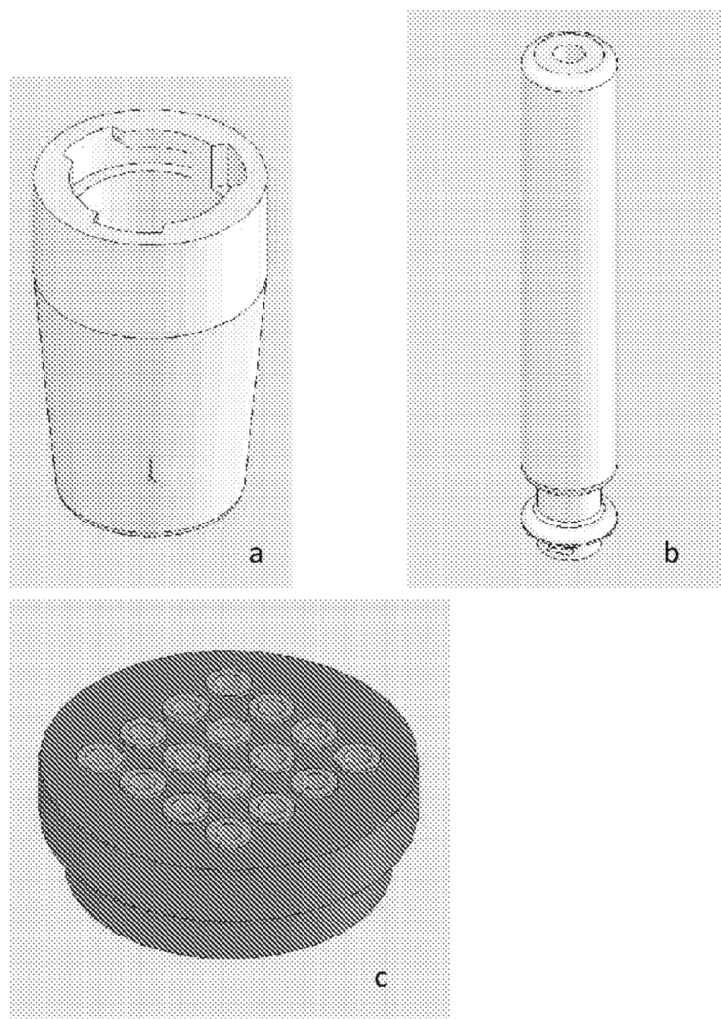


Figura 2 - Componentes de MIED. "a" muestra la carcasa de matriz estéril desechable, "b" muestra la carcasa duradera y "c" muestra la carcasa de electrodos dentro de la matriz desechable (2a)

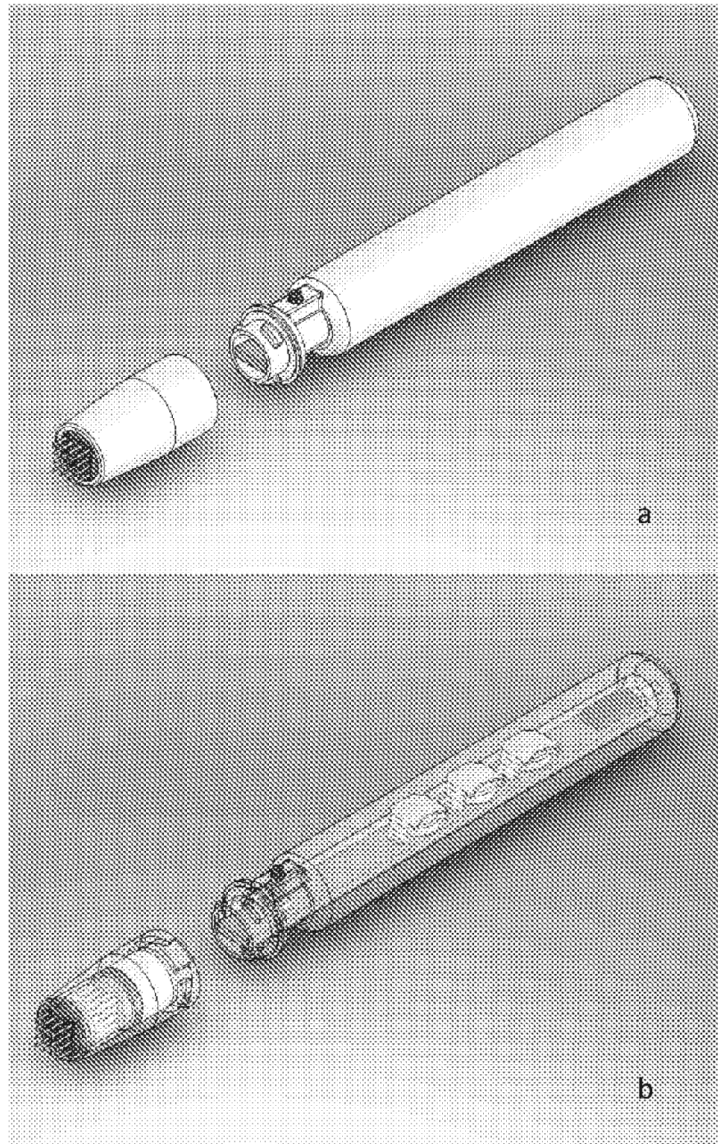


Figura 3 - Dispositivo de EP mínimamente invasivo que funciona con batería con matriz desprendible (para esterilización)

"a" muestra una vista externa. "b" muestra una vista interna (incluyendo las baterías)

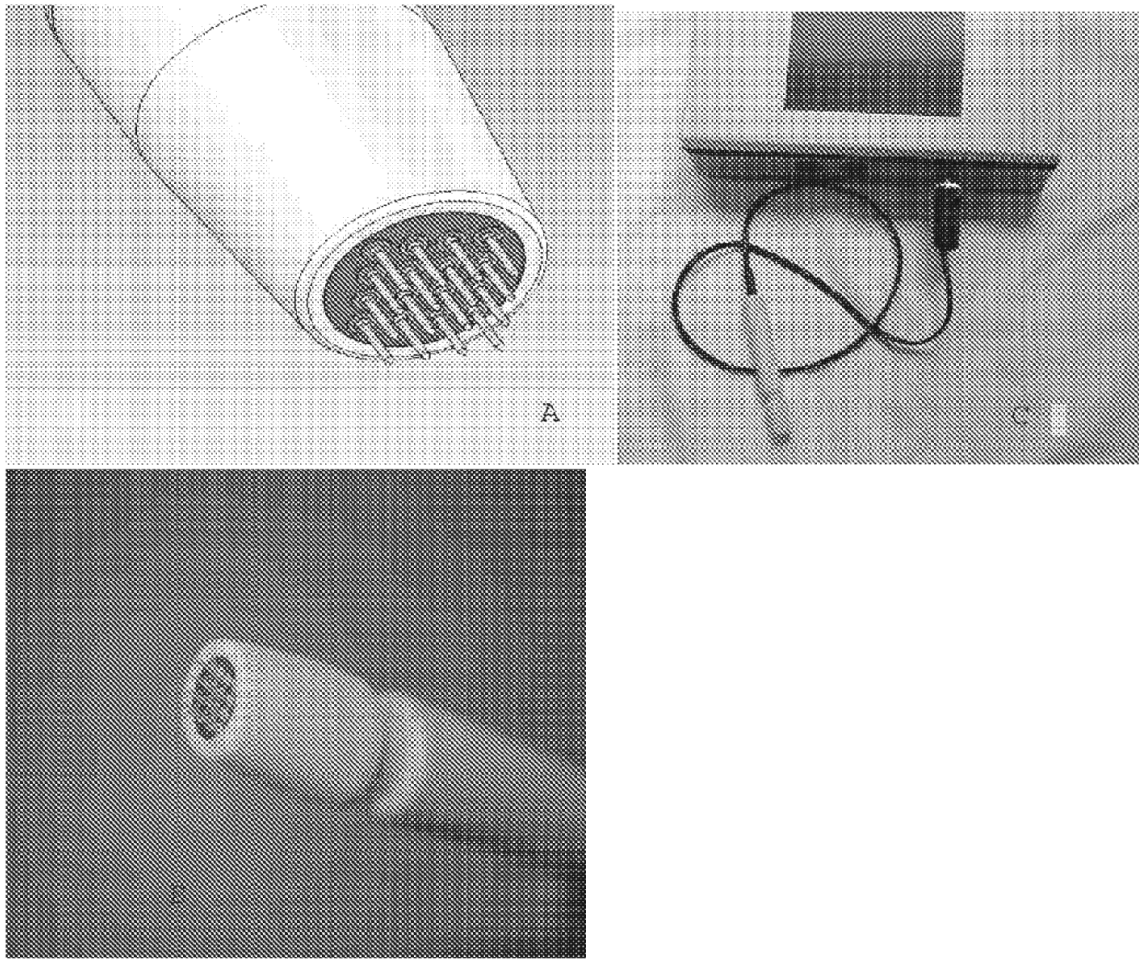


Figura 4 Dispositivo de electroporación mínimamente invasivo

(A) Dibujo CAD de un dispositivo mínimamente invasivo prototipo que consta de electrodos de aguja bañadas en oro con trocar a una separación de 1,5 mm en un patrón 4 x 4. (B) La matriz está unida al mango del dispositivo y conectada directamente al generador de impulsos, en este caso, el Elgen 1000. La EP puede desencadenarse mediante la activación de un pedal o un botón activador en la pantalla (C). El prototipo construido en funcionamiento

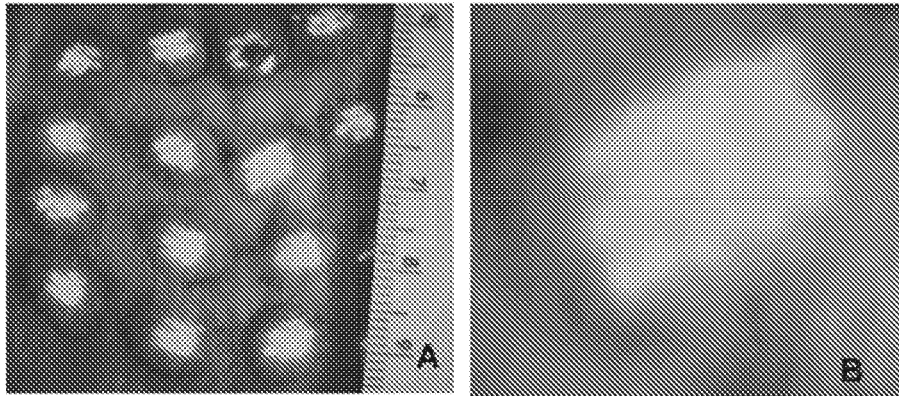


Figura 5 - La electroporación usando un dispositivo mínimamente invasivo da como resultado transfección robusta del gen informador

Expresión de proteína verde fluorescente (GFP) después de administración de plásmidos ID seguida por electroporación (EP) con el dispositivo mínimamente invasivo en piel de cobaya. (A) Los plásmidos se suministraron en múltiples sitios (14) y se comparó el tamaño del patrón con la matriz. (B) Ejemplo aumentado de un único sitio de tratamiento que muestra la transfección que se produce en el punto de contacto con los electrodos

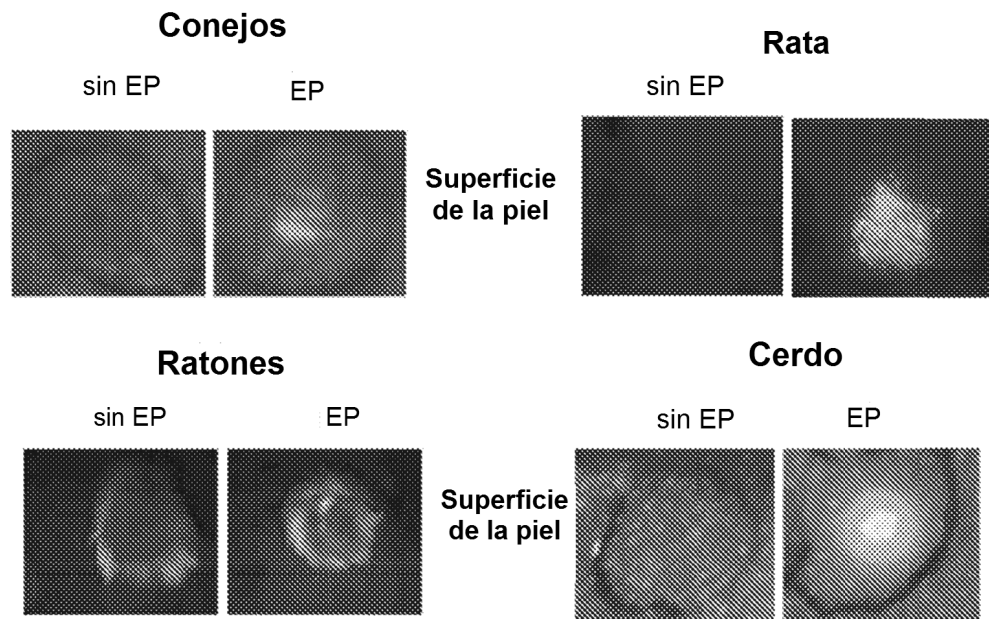


Figura 6 - La electroporación mínimamente invasiva da como resultado transfección positiva en un amplio espectro de especies

Expresión de proteína verde fluorescente (GFP) después de administración de plásmidos ID con o sin electroporación (EP) con el dispositivo mínimamente invasivo en piel de conejo, ratón y cerdo. Los paneles muestran el tejido cutáneo después del sacrificio del animal 3 días después del tratamiento. Los paneles muestran piel a la que se le inyectó plásmido de GFP en solitario o seguido inmediatamente por EP. Solamente se muestran las vistas del lado superior (superficie de la piel). El lado inferior (músculo subyacente) de la piel no mostraba transfección positiva

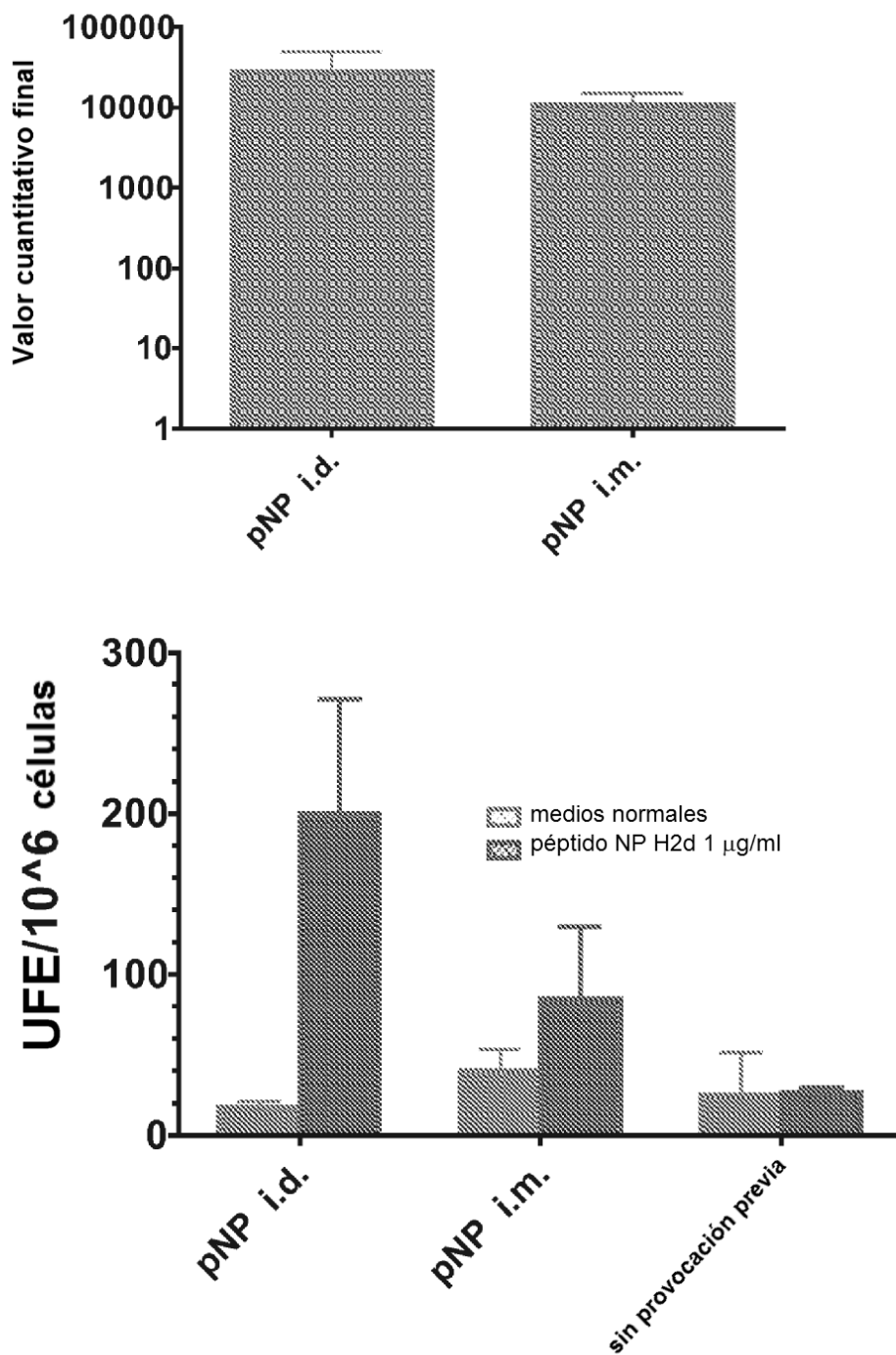


Figura 7A

Resultados de inmunogenicidad humoral y celular en la protección frente a provocación en ratones

La electroporación con el dispositivo mínimamente invasivo da como resultado respuestas de anticuerpo y celular robustas, lo que otorga protección de los ratones después de una provocación letal con gripe. (7A) Los ratones se inmunizaron con plásmido (3 µg) que expresa la proteína antigénica NP de gripe usando una vía i.d. (dispositivo mínimamente invasivo) o i.m. (inyector doble Elgen). Se midieron los valores cuantitativos de anticuerpo y ensayos ELISpot de células T específicas de antígeno.

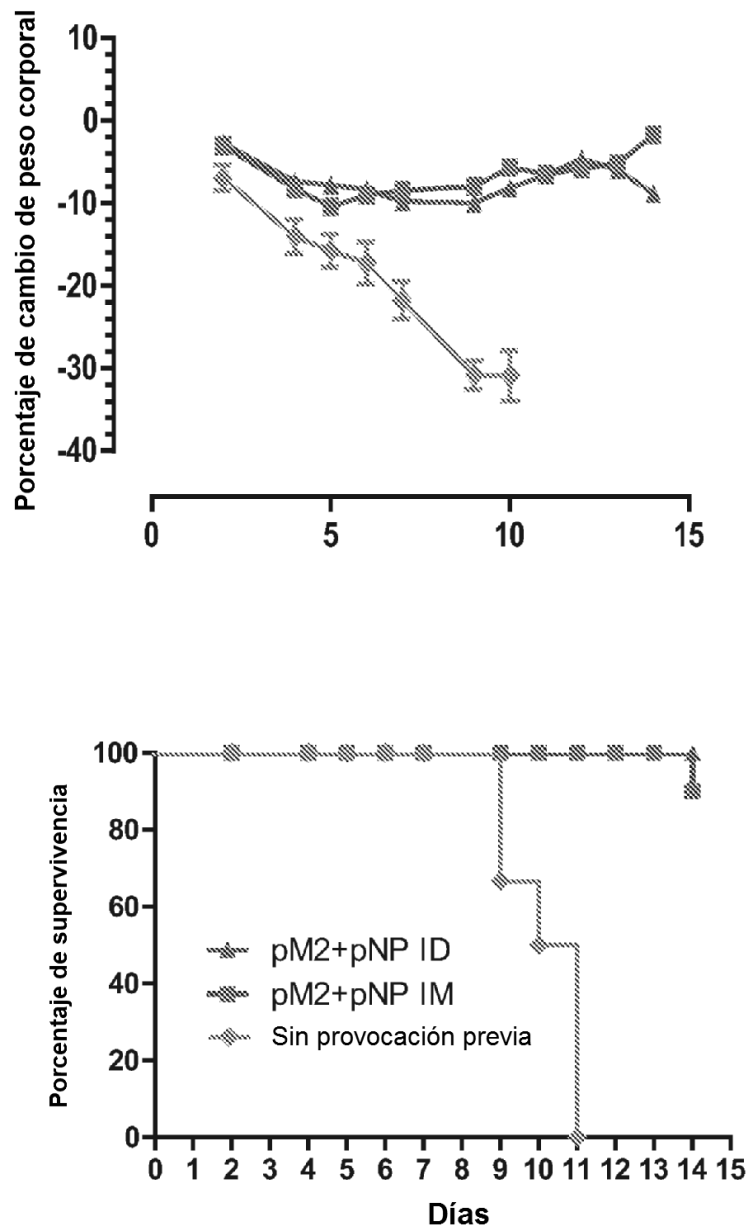


Figura 7B

Resultados de inmunogenicidad humoral y celular en la protección frente a provocación en ratones

La electroporación con el dispositivo mínimamente invasivo da como resultado respuestas de anticuerpo y celular robustas, lo que otorga protección de los ratones después de una provocación letal con gripe. (7B) Los animales inmunizados estaban protegidos para morbilidad y mortalidad cuando fueron provocados con la cepa VN/1203/04 (H5N1) de gripe

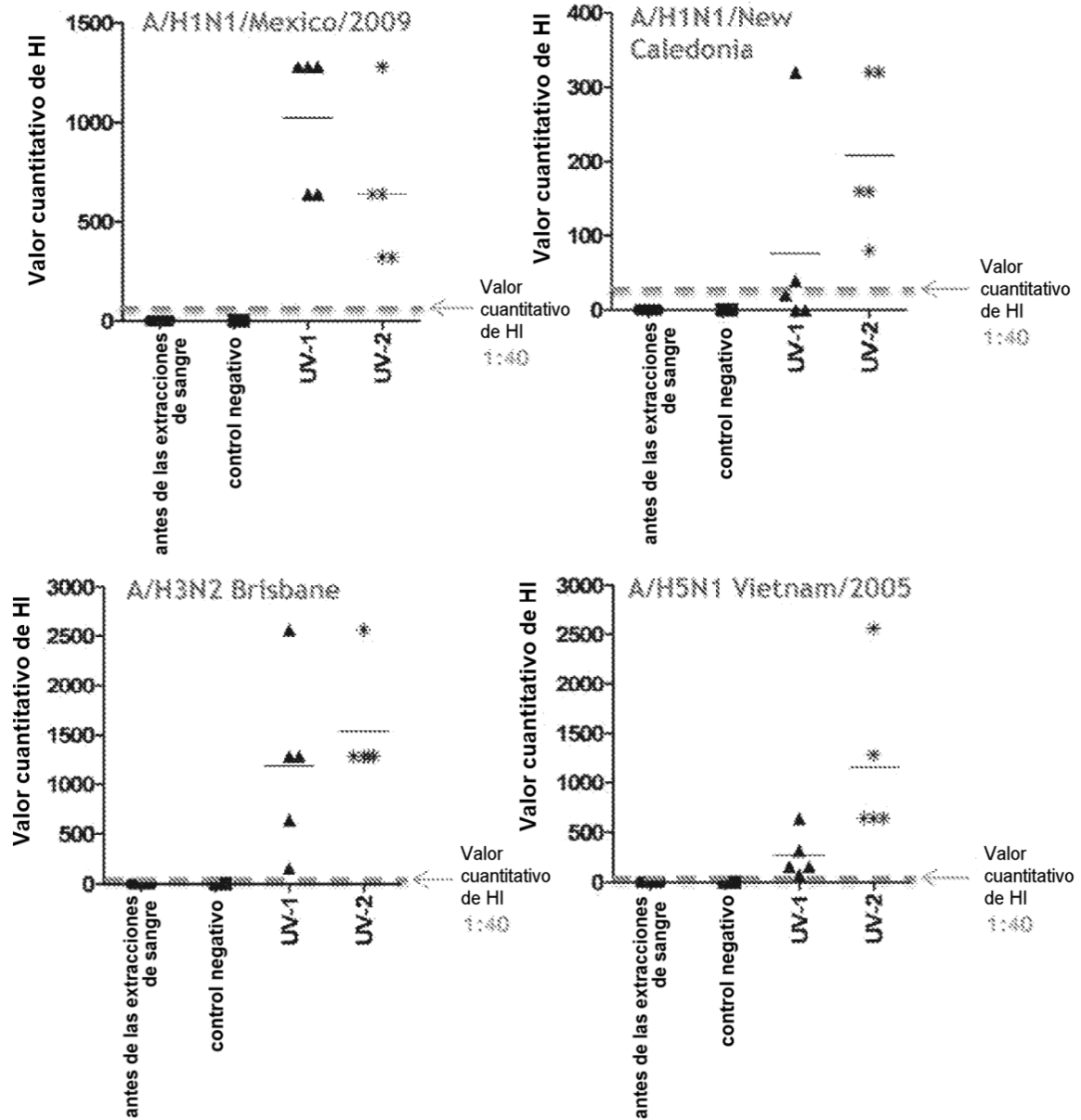


Figura 8 - Resultados de inmunogenicidad humoral en valores cuantitativos de HAI protectores en cobaya

Valores cuantitativos de HAI de macacos individuales 2 semanas después de la tercera inmunización contra las cepas de H1N1 (Mexico 2009 y New Caledonia), H3N2 (Brisbane) y H5N1 (Vietnam/2005). Los animales fueron inmunizados con las vacunas plasmídicas contra gripe SynCon descritas anteriormente mediante la vía i.d. (mínimamente invasiva) o la vía i.m. (inyector doble Elgen).

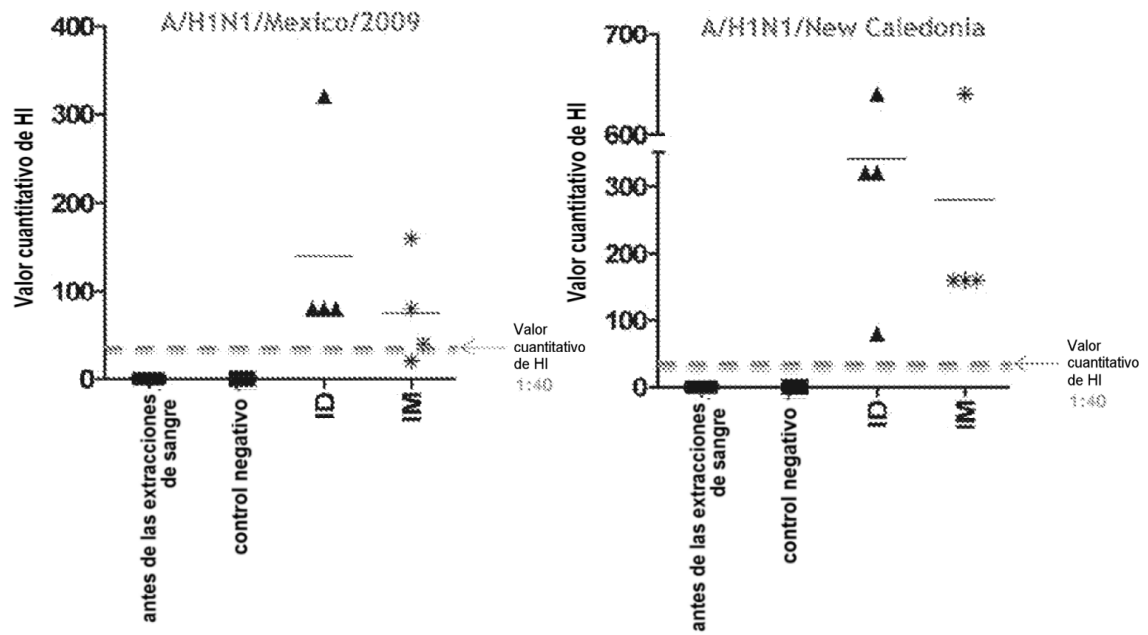


Figura 9 - Resultados de inmunogenicidad humoral en valores cuantitativos de HAI protectores en primates no humanos

Valores cuantitativos de HAI de macacos individuales 2 semanas después de la segunda inmunización contra dos cepas de H1N1 (Mexico 2009 y New Caledonia). Los animales fueron inmunizados con las vacunas plasmídicas contra gripe SynCon publicadas anteriormente mediante la vía i.d. (mínimamente invasiva) o la vía i.m. (inyector doble Elgen).