

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 384**

51 Int. Cl.:

A61N 1/04 (2006.01)

A61N 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2004 PCT/US2004/028998**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2005 WO05025669**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2004 E 04788598 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 1673140**

54 Título: **Dispositivo de electroporación con corriente constante**

30 Prioridad:

08.09.2003 US 657725

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

17.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SMITH, LOUIS C.;
DRAGHIA-AKLI, RUXANDRA;
KHAN, AMIR S.;
CARPENTER, ROBERT H. y
DARNELL, JEFF**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 668 384 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de electroporación con corriente constante

5 Antecedentes

La presente invención se refiere a un dispositivo de electroporación y a su uso para facilitar la introducción de una macromolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electrocinético ("EKD") que proporciona una serie de patrones de pulsos de corriente constante programables entre electrodos en una matriz, control y entrada por parte del usuario de los parámetros de pulso, y almacenamiento y adquisición de datos. El dispositivo de electroporación también comprende un disco de electrodos reemplazable, o intercambiable, que tiene una matriz de electrodos de aguja, un canal de inyección central para una aguja de inyección, y un disco guía amovible.

La tecnología de transferencia de plásmidos ha estado tradicionalmente limitada en su alcance debido a que los niveles de expresión *in vivo* que resultan de la transferencia de ADN desnudo han sido bajos, solo fracciones de los conseguidos por transferencia viral de genes. Numerosos investigadores han perfilado las preocupaciones de seguridad y toxicológicas con la inyección de virus como vectores de ADN en animales y seres humanos (Pilaro y Serabian, 1999). En consecuencia, la inyección directa de ADN plasmídico se ha vuelto más atractiva como una alternativa viable. La transferencia de ADN plasmídico persistente se consigue con la aplicación de una serie de pulsos eléctricos para conducir el ADN a una población de células estables y que no se dividen. Las células del músculo esquelético han proporcionado una diana ideal para la transferencia directa de plásmidos para vacunas de ADN y otras aplicaciones (Mor y Eliza, 2001; Stoll y Calos, 2002). La mejora de la administración del plásmido mediante electroporación permite que el músculo inyectado se use como un biorreactor para la producción y secreción persistentes de proteínas al torrente sanguíneo. Los niveles de expresión se incrementan en hasta dos o tres órdenes de magnitud con respecto a la inyección de plásmido solo, a niveles comparables a los de la administración de genes mediada por adenovirus y, en algunos casos, puede alcanzar intervalos fisiológicos.

El método de administración de plásmidos *in vivo*, denominado electroporación, electropermeabilización o potenciación electrocinética, es sencillo, eficiente y reproducible. Se ha vuelto valioso para la investigación básica, con un gran potencial para la transferencia de genes y la vacunación con ADN. La electroporación se ha usado con mucho éxito para transfectar células tumorales después de la inyección de plásmido o para administrar el fármaco antitumoral bleomicina a tumores cutáneos y subcutáneos en seres humanos. La electroporación se ha usado ampliamente en ratones, ratas, perros y cerdos para administrar genes terapéuticos que codifican una variedad de hormonas, citoquinas, enzimas o antígenos. Los numerosos tejidos y órganos que se han seleccionado incluyen hígado, piel, ojo, testículos, músculo cardíaco, músculo liso, tumores en diferentes ubicaciones y músculo esquelético.

En términos generales, la electroporación es el uso de un pulso de campo eléctrico transmembrana para inducir trayectorias microscópicas (poros) en una biomembrana. Estos poros se denominan comúnmente "electroporos". Su presencia permite que macromoléculas, iones y agua pasen de un lado de la membrana al otro. Por tanto, la electroporación se ha usado para introducir fármacos, ADN u otras moléculas en tejidos multicelulares, y puede resultar eficaz para el tratamiento de ciertas enfermedades. Sin embargo, el uso de electroporación en organismos vivos presenta varios problemas, incluida la muerte celular que resulta del calor generado y la incapacidad de los electroporos para volver a cerrarse. Los efectos beneficiosos del fármaco o la macromolécula están extremadamente limitados con métodos de electroporación de la técnica anterior en los que se producen un calentamiento celular y una muerte celular excesivos.

Para comprender mejor el proceso de electroporación, es importante observar algunas ecuaciones simples. Cuando se aplica una diferencia de potencial (tensión) a través de los electrodos implantados en un tejido, ésta genera un campo eléctrico (" E "), que es la tensión aplicada (" V ") dividida por la distancia (" d ") entre los electrodos.

$$E = V/d$$

La intensidad del campo eléctrico E ha sido un valor muy importante en la técnica anterior cuando se formulan protocolos de electroporación para la administración de un fármaco o macromolécula a la célula del sujeto. La intensidad del campo es inversamente proporcional a la distancia entre los electrodos ya que, dada una tensión, la intensidad del campo aumenta a medida que disminuye la distancia entre los electrodos. Sin embargo, una advertencia es que se puede generar un campo eléctrico en un tejido con electrodos aislados (es decir, el flujo de iones no es necesario para crear un campo eléctrico). Aunque sin desear estar ligados a una teoría, es el flujo de iones el que abre los electroporos y permite el movimiento de las moléculas hacia las células de un sujeto durante la electroporación. El flujo de carga eléctrica en un conductor o medio entre dos puntos que tienen una diferencia de potencial se denomina corriente. La corriente entre electrodos se consigue mediante los iones o partículas cargadas en los tejidos, que pueden variar entre los tejidos y los pacientes. Además, el flujo de iones conductores en el tejido puede cambiar entre electrodos desde el comienzo del pulso eléctrico hasta el final del pulso eléctrico.

Cuando los tejidos tienen una pequeña proporción de iones conductores, aumenta la resistencia, se genera calor y las células son destruidas. La ley de Ohm expresa la relación entre corriente (" I "), tensión (" V ") y resistencia (" R "):

$$R = V/I$$

5 La resistencia en el tejido entre dos electrodos varía dependiendo de las partículas cargadas presentes en el mismo. Por tanto, la resistencia en el tejido cambia desde el comienzo del pulso eléctrico hasta el final del pulso eléctrico.

10 El calentamiento es el producto de la impedancia entre electrodos (es decir, la combinación de resistencia y reactancia y se mide en ohmios), y es proporcional al producto de la corriente, la tensión y la duración del pulso. El calentamiento también se puede expresar como el cuadrado de la corriente y la duración del impulso (" t ", tiempo). Por ejemplo, durante la electroporación, el calentamiento o la potencia (" W ", vatios) generados en el tejido de soporte se pueden representar mediante la siguiente ecuación:

$$W = I^2 R t$$

15 En términos generales, la técnica anterior enseña que los electrodos metálicos se ponen en contacto con los tejidos y se imponen pulsos cortos de tensiones predeterminadas sobre los electrodos que inician las células para abrir los poros de la membrana de manera transitoria. Los protocolos descritos actualmente para la electroporación se definen en términos de las intensidades de campo E resultantes, que dependen de pulsos cortos de tensión proporcional a la distancia entre los electrodos e independientemente de la corriente. Por consiguiente, la resistencia o el calentamiento no pueden determinarse para el tejido electroporado, lo que causa un éxito variado con diferentes protocolos de electroporación de tensión pulsada. Ciertamente, la diferencia en las amplitudes del límite superior de un pulso de tensión entre los protocolos de electroporación que facilitan la electroporación efectiva y los protocolos de electroporación que hacen que las células mueran es muy pequeña. Adicionalmente, se ha observado una correlación definida entre la muerte de las células y el calentamiento de las células causado por las amplitudes de límite superior de los pulsos de tensión cortos. Por tanto, el sobrecalentamiento de las células entre los electrodos sirve como causa principal de la ineficacia de cualquier protocolo de pulsación de tensión de electroporación dado. Además, la corriente entre electrodos sirve como un determinante primario de la efectividad de cualquier protocolo de pulsación dado, y no la tensión a través de los electrodos.

20 Cuando se suministra electricidad a las células de un sujeto, la dosis de electricidad puede describirse con precisión en términos de carga (" Q "), que es la corriente (" I ") y el tiempo (" t "), de acuerdo con la fórmula:

$$Q = I t$$

35 Si la corriente no es constante, como es el caso en los electroporadores de la técnica anterior, Q representa la integral temporal de I . A este respecto, las partículas cargadas, ya sean iones o moléculas, se comportan de manera similar. Por ejemplo, cuando los iones de plata se depositan en un electrodo para definir la unidad estándar de carga eléctrica (el culombio), solo la carga, tal como se ha definido anteriormente, es de importancia. Debe existir una cierta tensión mínima para generar una corriente, pero la cantidad de iones depositados no puede determinarse a partir de una tensión predeterminada. De forma correspondiente, la cantidad de partículas cargadas suministradas a las células en un electroporador no puede derivarse de la tensión impuesta sobre los electrodos.

40 Aunque la electroporación es ampliamente usada para la transfección de genes en laboratorio y gana mayor importancia para la terapia génica no viral, generalmente se emplea usando esquemas de optimización de ensayo y error por falta de métodos para predecir los efectos de la electroporación sobre las células (Cadenatella y Prausnitz, 2001). Por ejemplo, se ha demostrado que la eficacia de la transferencia de genes plasmídica al músculo esquelético puede mejorarse significativamente mediante la aplicación de un campo eléctrico al músculo después de la inyección del ADN plasmídico. Sin embargo, esta electrotransferencia está asociada con un daño muscular significativo que puede dar como resultado una pérdida sustancial de fibras musculares transfectadas (McMahon y col., 2001). La reducción de la tensión utilizada en la técnica puede dar como resultado una disminución del daño muscular, con una reducción concomitante de la expresión, pero sin una disminución significativa del número de fibras transfectadas.

45 La efectividad de la electroporación está limitada por el hecho de que existe un valor umbral para la intensidad del pulso por debajo del cual no se produce la electroporación, y un límite superior por encima del cual se destruyen las células. La evidencia experimental muestra que la diferencia entre los límites superior e inferior es tan pequeña que es muy difícil diseñar protocolos de pulsación efectivos sin experimentación excesiva. Esto hace que el uso de la técnica sea difícil.

50 Las referencias en la técnica que se refieren a un aparato de electroporación ilustran la utilidad tanto de un aparato de electrodo como de un método de electroporación *in vivo*. De forma correspondiente, hay muchas patentes de Estados Unidos que reivindican electrodos o métodos de electroporación específicos. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.302.874 es un método y aparato para administración tópica asistida eléctricamente de agentes para aplicaciones cosméticas; la patente de Estados Unidos 5.676.646; es un aparato de electroporación por flujo para implantar moléculas en células sanguíneas vivas de un paciente; las patentes de Estados Unidos 6.241.701 y

6.233.482 describen un método y aparato para administración mediada por electroporación de fármacos y genes. Más específicamente, describen un método y aparato para terapia de electroporación ("EPT") para tratar tumores con una combinación de electroporación usando el aparato de la invención y un agente quimioterapéutico para producir regresión de tumores *in vivo*; la patente de Estados Unidos 6.216.034 describe un método de programación de una matriz de electrodos de aguja para terapia de electroporación de tejido; la patente de Estados Unidos 6.208.893 describe un aparato de electroporación con un modelo de electrodo conectivo; la patente de Estados Unidos 6.192.270 describe un conjunto de electrodos para un aparato y un método de administración molecular transsuperficial; la patente de Estados Unidos 6.181.964 describe un aparato y método mínimamente invasivos para electroporar fármacos y genes en el tejido. Usando EPT tal como se describe en la invención, los tumores tratados mediante una combinación de electroporación usando el aparato de la invención y un agente quimioterapéutico causaron la regresión de los tumores *in vivo*. La patente de Estados Unidos 6.150.148 describe un aparato de electroporación para el control de la temperatura durante el proceso, generando y aplicando un campo eléctrico de acuerdo con un esquema de perfil de pulsación y temperatura especificado por el usuario; la patente de Estados Unidos 6.120.493 describe un método para la introducción de agentes terapéuticos que utiliza un aparato de electroporación de campo eléctrico; la patente de Estados Unidos 6.096.020 describe un método y aparato de electroporación para generar y aplicar un campo eléctrico de acuerdo con un esquema de pulsación especificado por el usuario; la patente de Estados Unidos 6.068.650 describe un método de aplicación de forma selectiva de configuraciones de matriz de agujas para la terapia de electroporación *in vivo*; y la patente de Estados Unidos 5.702.359 describe un aparato de electrodo para la aplicación de electroporación a una parte del cuerpo de un paciente con un elemento de detección para detectar una distancia entre los electrodos y generar una señal de distancia proporcional a la distancia entre dichos electrodos, y medios sensible a dicha señal de distancia para aplicar pulsos de señal eléctrica de gran amplitud a los electrodos proporcionalmente a la distancia entre dichos electrodos. Todas estas patentes citadas se incorporan por la presente como referencia.

Se han obtenido recientemente progresos significativos en la mejora de la expresión del plásmido *in vivo* y la consecución de los niveles fisiológicos de una proteína secretada usando electroporación (Draghia-Akli y col., 2002). Los estudios muestran que la inyección de un plásmido que expresa la hormona liberadora de la hormona del crecimiento ("GHRH"), seguida de electroporación, es escalable y representa un enfoque prometedor para la producción estable de proteínas secretadas para el tratamiento de grandes mamíferos (Draghia-Akli y col., 2003a; Draghia-Akli y col., 2003b). A pesar de los avances recientes en la administración de plásmidos desnudos (Dean y col., 2003; Fattori y col., 2002), se necesitan mejoras adicionales en las técnicas de electroporación.

Los investigadores anteriores han utilizado dispositivos de electroporación para la transferencia de ADN plasmídico, todos los cuales se basan conceptualmente en sistemas de tensión constante, utilizando una tensión predeterminada entre los electrodos. Debido que la impedancia entre los electrodos que están incrustados en un tejido puede variar de un caso a otro, o de un tejido a otro, una tensión predeterminada no produce una corriente predeterminada. Un pulso de tensión predeterminada causa un aumento no regulado en la corriente que fluye a través de un tejido muscular durante la duración del pulso, además de la pérdida de la función de onda cuadrada perfecta. Por el contrario, una fuente de corriente constante mantiene una corriente constante de función de onda cuadrada a través del tejido muscular. Sin embargo, los dispositivos de electroporación comerciales existentes no tienen el diseño de firmware para permitir la medición de la cantidad exacta de corriente a la que están expuestas las células. La corriente no regulada generada con dispositivos de electroporación convencionales puede generar cantidades de calor en los tejidos que pueden destruir fácilmente a las células (Martin y col., 2002; Pliquet y col., 2002). Por ejemplo, un pulso electrónico típico de 50 milisegundos (ms) con una corriente promedio de 5 amperios (A o Amp) a través de una impedancia de carga típica de 25 *ohmios* (Ω) teóricamente puede elevar la temperatura en el tejido a 7,5 °C, que es suficiente para destruir células. La física de la lesión tisular causada por una descarga eléctrica es revisada por Lee y col. (Lee y col., 2000). Por el contrario, la disipación de potencia es menor en un sistema de corriente constante y controla el calentamiento de un tejido, lo que puede reducir el daño al tejido y contribuir al éxito global del procedimiento. Por tanto, existe la necesidad de evitar los problemas tecnológicos asociados con la electroporación de tensión constante al proporcionar un medio para controlar eficazmente la cantidad de electricidad suministrada a las células y conseguir de este modo una electroporación idónea.

Las dificultades presentes en los electrodos de la técnica anterior se derivan del hecho de que la energía del pulso se concentra en el centro de la matriz, el punto donde se deposita el material a transfectar. Como resultado, la distribución espacial del suministro de energía asume un carácter muy no uniforme. Por lo tanto, solo se electropora una fracción de las células en el volumen abarcado por el conjunto de electrodos. Por tanto, también existe una necesidad de proporcionar un medio para controlar eficazmente la dosificación de la electricidad suministrada a las células en el espacio entre los electrodos controlando de forma precisa el flujo iónico que incide sobre los conductos en las membranas celulares.

Además, los dispositivos de electroporación disponibles en el mercado y las matrices de agujas normalmente no permiten la inyección y la electroporación en una operación combinada. Con estos instrumentos, el procedimiento requiere que la aguja de inyección se inserte en el músculo diana para la administración del plásmido, y luego se retire. Posteriormente, los electrodos se insertan en el músculo en la proximidad de la zona inyectada, habitualmente identificada por un tatuaje en la piel. Sin embargo, el músculo subyacente puede moverse o contraerse, por lo que el sitio de inyección puede no estar completamente circunscrito por los electrodos de aguja. Por tanto, existe una

necesidad de un dispositivo de electroporación que permita la inyección y la electroporación en una operación combinada de modo que los electrodos de aguja delimiten la zona de inyección durante todo el procedimiento de electroporación.

5 Además, los dispositivos de electroporación que usan matrices de agujas reemplazables invasivas de la piel y el músculo como electrodos para suministrar la corriente eléctrica requieren el mantenimiento de condiciones estériles cuando se produce la sustitución de la matriz de agujas. Esto es necesario tanto desde la práctica médica como desde el punto de vista del cumplimiento normativo. Normalmente, si hay un orificio en el mango del electroporador y en el disco de electrodos a través del cual debe pasar la aguja de inyección para suministrar soluciones al tejido, el orificio no es estéril. Dependiendo de la habilidad del operador, la aguja de inyección puede o no tocar las superficies no estériles del orificio. Además, la sustitución del disco de electrodos se realiza normalmente de forma manual, con riesgo de contaminación de la matriz de agujas. Por tanto, también existe una necesidad de proporcionar un disco de electrodos que permita la administración de la solución medicinal y la sustitución de la matriz de agujas en condiciones estériles.

15 Sumario

La presente invención se refiere a un dispositivo de electroporación y su uso para facilitar la introducción de una macromolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un electrodo de electroporación o dispositivo electrocinético ("EKD"), que proporciona corriente constante para producir un campo eléctrico y tiene un hardware que permite al usuario, a través de un controlador, tal como un microcontrolador de un solo chip y una aplicación de software o firmware, controlar los parámetros del pulso eléctrico y documentar las características eléctricas de cada pulso. La presente invención también se refiere a un disco de electrodos reemplazable o intercambiable que comprende una matriz de electrodos de aguja montada sobre una estructura de soporte que tiene un canal de inyección central, o puerto central, para una aguja de inyección. El canal central permite que una aguja de inyección se inserte simultáneamente con la inserción de los electrodos de aguja para permitir tanto la administración estéril de la solución medicinal como la delimitación de la zona de inyección por los electrodos. También se proporciona un disco guía de grosor variable para el disco de electrodos, que permite al operador controlar la profundidad de penetración de los electrodos de aguja y sustituir el disco de electrodos sin tocar las agujas estériles.

El dispositivo de electroporación y el EKD pueden usarse para electroporar células y administrar ADN plásmido sin causar daño permanente a las células adyacentes. Además, el uso del dispositivo de electroporación provoca un aumento en la eficacia de electroporación, lo que significa que se necesita una cantidad menor de plásmido para generar niveles adecuados de proteínas diana.

El dispositivo electrocinético ("EKD") proporciona un campo eléctrico de corriente constante a través de la matriz de agujas de electrodo en diversos patrones de pulsos programables por el usuario y facilita la introducción de una macromolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El EKD comprende un conjunto de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos de aguja; un generador de forma de onda de corriente para aplicar un patrón de pulsos de corriente constante o una forma de onda de tren de pulsos de corriente que se extiende a través de la matriz de electrodos; una fuente de alimentación; un controlador para controlar el funcionamiento del generador de forma de onda de corriente y otros dispositivos periféricos; y un registrador de forma de onda para registrar la tensión de electroporación y las formas de onda de corriente que se generan. El controlador del EKD opera a través de una aplicación de software o firmware que permite a los usuarios introducir los parámetros deseados y controlar el funcionamiento del EKD. El EKD también puede incluir un ensayador de impedancia para monitorización opcional de la cantidad de resistencia en el tejido diana. Otros componentes del EKD pueden incluir: un dispositivo de entrada para introducir parámetros de funcionamiento; un dispositivo de notificación de estado para notificar información de estado; un puerto de comunicación; una memoria; y un conmutador de alimentación. Otro aspecto del EKD es el conjunto de electrodos, que incluye preferentemente un mango no conductor. El conjunto de mango de electrodo contiene la matriz de electrodos de aguja y puede contener un dispositivo de notificación de estado y un conmutador de activación. El conjunto de mango también puede estar adaptado para recibir el disco de electrodos reemplazable.

El canal central, o puerto, del disco de electrodos permite al usuario inyectar la solución medicinal y electroporar la zona de tejido en una sola operación, lo que garantiza que la zona de inyección será delimitada por los electrodos de aguja. El disco de electrodos también elimina la contaminación cruzada entre los sujetos en un grupo que reciben soluciones inyectables acompañadas de electroporación con el mismo equipo. Cada disco puede esterilizarse, insertarse en el mango sujetando el disco guía, y usarse para inyectar la solución medicinal a través del canal central sin riesgo de contaminación de la aguja de inyección o los electrodos.

El EKD produce una forma de onda de tren de pulsos de corriente constante que se secuencia entre al menos dos electrodos cualesquiera del conjunto de electrodos de aguja. El EKD puede suministrar un pulso de corriente constante descentralizado a una zona de un tejido de modo que no se desarrollen puntos de solapamiento de electroporación. Además, la utilización de un pulso de corriente constante presenta varias ventajas respecto a la técnica anterior, siendo una ventaja un calentamiento y la posterior muerte del tejido electroporado reducidos. La

presente invención también permite que todo el sistema de electrodos modular sea portátil y funcione gracias a un módulo de batería.

5 La presente invención también se refiere a un método para facilitar el transporte de una macromolécula al interior de células de un tejido seleccionado en el cuerpo o planta. En resumen, un operador puede insertar firmemente la pluralidad de electrodos de aguja en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. En las realizaciones preferidas, los electrodos de aguja son parte del disco de electrodos reemplazable. El disco guía amovible puede usarse para controlar la profundidad de penetración de los electrodos de aguja. Una aguja de inyección puede hacerse pasar a 10 continuación a través del canal central estéril del disco de electrodos. Las macromoléculas son administradas mediante la aguja de inyección al interior del tejido seleccionado. El EKD se activa, se introduce una secuencia de electroporación, y se aplica la secuencia de disparo de electrodos a la pluralidad de electrodos de aguja. El pulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la macromolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos. La muerte celular debido al sobrecalentamiento se previene manteniendo la corriente constante por debajo de cierto valor crítico. Cuando se sustituyen discos de electrodos, estos pueden sujetarse mediante el disco 15 guía para garantizar la esterilidad continuada de los electrodos de aguja.

Breve descripción de los dibujos

- 20 La figura 1 muestra un diagrama del sistema, o diagrama de flujo, de una realización preferida del EKD.
- La figura 2 muestra un ejemplo de un controlador que puede usarse en el EKD.
- La figura 3 muestra una vista lateral del disco de electrodos reemplazable.
- 25 La figura 4 muestra una vista superior del disco de electrodos reemplazable.
- La figura 5 muestra una vista lateral del disco guía.
- 30 La figura 6 muestra una vista superior del disco guía.
- La figura 7 muestra una vista lateral del disco guía montado sobre el disco de electrodos reemplazable.
- 35 La figura 8 muestra un ejemplo de un patrón de pulsos de electrodo programado, etiquetado como programa 0000, para el EKD.
- La figura 9A muestra una representación artística de pulsos de corriente y la figura 9B muestra una representación artística de forma de onda de corriente, ambos de los cuales son producidos por el patrón de pulsos de la figura 8.
- 40 La figura 10 muestra un ejemplo de un patrón de pulsos de electrodo programado, etiquetado como programa 0001, para el EKD.
- La figura 11 muestra un ejemplo de un patrón de pulsos de electrodo programado, etiquetado como programa 45 0002, para el EKD.
- La figura 12 muestra un ejemplo de un patrón de pulsos de electrodo programado, etiquetado como programa 0003, para el EKD.
- 50 La figura 13 muestra un ejemplo de un patrón de pulsos de electrodo programado, etiquetado como programa 0004, para el EKD.
- La figura 14 muestra un ejemplo de un patrón de pulsos de electrodo programado, etiquetado como programa 0005, para el EKD.
- 55 La figura 15 muestra un ejemplo de un patrón de pulsos de electrodo programado, etiquetado como programa 0006, para el EKD.
- La figura 16 muestra un ejemplo de un patrón de pulsos de electrodo programado, etiquetado como programa 60 0007, para el EKD.
- La figura 17 muestra un ejemplo de un patrón de pulsos de electrodo programado, etiquetado como programa 0008, para el EKD.
- 65 La figura 18 muestra un ejemplo de un patrón de pulsos de electrodo programado, etiquetado como programa 0009, para el EKD.

La figura 19 muestra un diagrama de la primera mitad de una secuencia de funcionamiento de administración de muestras para el EKD.

5 La figura 20 muestra un diagrama de la segunda mitad de una secuencia de funcionamiento de administración de muestras para el EKD.

La figura 21 muestra un ejemplo de un primer conjunto de datos que pueden ser adquiridos y almacenados por el EKD durante un procedimiento de electroporación de muestras.

10 La figura 22 muestra un ejemplo de un segundo conjunto de datos que pueden ser adquiridos y almacenados por el EKD durante un procedimiento de electroporación de muestras.

15 La figura 23 muestra un ejemplo formateado de un tercer conjunto de datos que pueden ser adquiridos y almacenados por el EKD durante un procedimiento de electroporación de muestras.

La figura 24 muestra los niveles de expresión de SEAP en animales a los que se les inyectaron diferentes cantidades del plásmido pSP-SEAP y se electroporaron con el EKD en el programa de patrón de pulsos 0000.

20 La figura 25 muestra los niveles de expresión de SEAP en animales a los que se les inyectó la misma cantidad de plásmido pSP-SEAP en diferentes volúmenes y se electroporaron con el EKD en el programa de patrón de pulsos 0000.

25 La figura 26 muestra los niveles de expresión de SEAP en animales a los que se les inyectó la misma cantidad de plásmido pSP-SEAP y se electroporaron con el EKD en el programa de patrón de pulsos 0000 a diferentes intensidades de campo eléctrico.

30 La figura 27 muestra los niveles de expresión de SEAP en animales a los que se les inyectó la misma cantidad de plásmido pSP-SEAP y se electroporaron con el EKD en diferentes patrones de pulsos y a diferentes intensidades de campo eléctrico.

La figura 28 muestra los niveles de expresión de SEAP en animales a los que se les inyectó la misma cantidad de plásmido pSP-SEAP y se electroporaron con el EKD después de diferentes tiempos de demora entre la inyección del plásmido y el primer pulso del programa de patrón de pulsos 0000.

35 La figura 29 muestra los niveles de expresión de SEAP en animales a los que se les inyectó la misma cantidad de plásmido pSP-SEAP y se electroporaron bien de forma contemporánea o después de la retirada y la recolocación del electrodo en el músculo.

40 La figura 30 muestra los niveles de expresión de SEAP en animales a los que se les inyectaron diferentes cantidades de plásmido pSP-SEAP y se electroporaron con un dispositivo de electroporación alternativo.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

45 El término "corriente" tal como se usa en el presente documento, se refiere al flujo o tasa de flujo de carga eléctrica en un conductor o medio entre dos puntos que tiene una diferencia de potencial, expresada generalmente en amperios.

50 El término "amperio" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la unidad estándar para medir la intensidad de una corriente eléctrica. Es la tasa de flujo de carga en un conductor o medio conductor de un culombio por segundo.

55 El término "culombio" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la unidad de carga eléctrica de un metro, kilogramo, segundo igual en magnitud a la carga de $6,28 \times 10^{18}$ electrones o la carga transportada a través de un conductor por una corriente de un amperio que fluye durante un segundo.

60 El término "tensión" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la fuerza electromotriz, o diferencia de potencial eléctrico, expresada en voltios, que son las unidades prácticas de fuerza electromotriz o diferencia de potencial entre dos puntos en un campo eléctrico que requiere un julio de trabajo para mover una carga positiva de un culombio desde el punto de menor potencial al punto de mayor potencial.

65 El término "potencia" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una fuente de fuerza o energía física o mecánica que está trabajando, o puede ponerse, a trabajar, por ejemplo "*potencia eléctrica, potencia hidráulica*".

El término "impedancia" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la oposición total ofrecida por un circuito eléctrico al flujo de una corriente alterna de una sola frecuencia. Es una combinación de resistencia y reactancia y se mide en ohmios.

El término "campo" tal como se usa en el presente documento, se refiere una cantidad física especificada en puntos a lo largo de una región del espacio.

La expresión "mecanismo de liberación rápida" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier mecanismo conector que permita fijar firmemente la pluralidad de electrodos de aguja y liberarla rápidamente del subsistema generador de pulsos de corriente constante. Cuando los electrodos de aguja se fijan firmemente, el mecanismo de liberación rápida también mantiene la comunicación eléctrica con el subsistema generador de pulsos de corriente constante. Muchos tipos diferentes de mecanismos de liberación rápida son bien conocidos en la técnica de la ingeniería.

El término "amplitud" tal como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo extremo de una cantidad fluctuante, como una corriente alterna o el balanceo de un péndulo, generalmente medido desde el promedio o desde la media hasta el extremo. Es la cantidad o grado en que una cosa se extiende.

El término "frecuencia" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de oscilaciones periódicas, vibraciones u ondas por unidad de tiempo. Habitualmente se expresa en hercios (Hz).

El término "macromolécula" tal como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de ácido nucleico, proteínas, lípidos, microburbujas (por ejemplo, vesículas cargadas con fármacos) y productos farmacéuticos.

La presente invención se refiere a un dispositivo electrocinético ("EKD") para proporcionar un campo eléctrico de corriente constante a través de una la matriz de agujas de electrodo y facilitar la introducción de una macromolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El EKD produce una forma de onda de pulsos de corriente que pasa a través de los electrodos de la matriz de agujas de electrodo de acuerdo con una secuencia programada y puede monitorizarse y registrarse durante el procedimiento.

La presente invención también se refiere a un disco de electrodos reemplazable o intercambiable que tiene una matriz de agujas que se puede usar en asociación con un dispositivo de electroporación, tal como un EKD. El disco de electrodos tiene un canal central o puerto, a través del cual se puede insertar una aguja de inyección para permitir la administración estéril de la solución medicinal, y un disco guía amovible, para controlar la profundidad de penetración de los electrodos de aguja y facilitar la sustitución del disco.

La figura 1 muestra un diagrama del sistema de una realización preferida del EKD. Los principales elementos funcionales del EKD se muestran en el diagrama. Cada elemento se describe en términos de la funcionalidad de hardware de cada elemento. Las secuencias de acontecimientos habilitados por el hardware se controlan mediante software o firmware, tal como se describe a continuación.

El elemento central del EKD es el controlador, que es responsable de controlar varios dispositivos periféricos conectados a él. El controlador es responsable de gestionar el procedimiento de electroporación, que incluye operaciones tales como: (1) generar la secuencia de disparo de electroporación o patrón de pulsos de corriente constante para el conjunto de electrodos controlando el generador de forma de onda de corriente; (2) realizar ensayos de impedancia para determinar si se debe realizar la electroporación; (3) detectar y procesar órdenes del usuario; (4) proporcionar al usuario información de estado; (5) transmitir datos de electroporación a un dispositivo electrónico externo a través del puerto de comunicación; y (6) guardar y recuperar datos de electroporación (por ejemplo, curvas de tensión y corriente) hacia y desde una memoria.

El controlador es, preferentemente, un microcontrolador de un solo chip (tal como, Texas Instruments msp430F149 o Motorola 68HC908AZ60A), tal como el microcontrolador que se muestra en la figura 2. Los cuadros etiquetados como "Periférico" en la figura 2 representan cualquiera de los dispositivos periféricos del EKD que se muestran en la figura 1 y se describe a continuación. El software que dirige las etapas del procedimiento de electroporación es preferentemente el firmware, porque reside permanentemente dentro y se ejecuta desde el microcontrolador de un solo chip.

Otro componente del EKD es el generador de forma de onda de corriente. El generador de forma de onda de corriente genera una forma de onda de pulsos de corriente que pasa a través de los electrodos de la matriz de electrodos de acuerdo con una secuencia programada. El tren de pulsos es de forma cuadrada y el número de pulsos está limitado por el software o el firmware. Se aplica un pulso a cada conjunto de electrodos. Normalmente, cada pulso tiene una duración de 52 ms y se produce a una frecuencia de 1 Hz. La amplitud del tren de pulsos es programable por el operador y varía de 0,1 A a 1,5 A en incrementos de 0,1 A. El generador de onda de corriente puede estar compuesto por circuitos analógicos generales de transistor de potencia que funcionan como lo indica el controlador.

Un componente adicional del EKD es el ensayador de impedancia. El ensayador de impedancia determina si la resistencia de la carga (por ejemplo, el tejido muscular) es suficientemente baja. Si la resistencia es demasiado alta, la tensión resultante a través de los electrodos podría ser demasiado alta y causar calentamiento y daño celular. El tratamiento de electroporación puede, por lo tanto, ser precedido por un ensayo de impedancia. Si cualquiera de las

mediciones de impedancia supera $100 \Omega \pm 5 \Omega$, el ensayo de impedancia resulta insatisfactorio y la secuencia de electroporación no se inicia. El ensayo de impedancia es un elemento programable por el operador controlado por software o firmware que puede ser desactivado durante el funcionamiento. El ensayador de impedancia puede estar compuesto por circuitos analógicos de amplificador operacional general ("op-amp") que funcionan como lo indica el controlador.

El ensayador de impedancia también funciona como un elemento de seguridad en el EKD para que sea un dispositivo seguro de manejar. Indica si todos los electrodos han penetrado en el mismo tejido y se puede establecer un circuito. Los electrodos en contacto con el aire, especialmente el aire seco, tienen una resistencia extremadamente alta. Si comienza la electroporación y uno o más electrodos no han penetrado en el tejido, las tensiones del electrodo resultante pueden ser de miles de voltios, lo que podría tener consecuencias letales y también dañar el EKD. Por esta razón, se puede implementar una protección contra sobrecarga de tensión para evitar tensiones excesivas en los electrodos. Por ejemplo, independientemente de la carga eléctrica (por ejemplo, aire o tejido muscular), la protección contra sobretensión puede activarse si V_{ij} supera los 200 V durante un período no superior a 1 ms. V_{ij} es la tensión a través del electrodo i y j donde $i, j = 1$ a 5. Si la protección contra sobretensión se activa, V_{ij} pasa a aproximadamente 0 V hasta que se dispare el siguiente pulso de electroporación. Mientras que el EKD está en estado desactivado, la tensión en cualquier par de electrodos preferentemente no supera los 10 V.

Un componente más del EKD es un registrador de forma de onda. El registrador de forma de onda registra formas de onda de tensión y corriente de electroporación, que se muestrearán continuamente durante el tratamiento de electroporación. Al muestrear y monitorizar los parámetros del procedimiento de electroporación, un operador puede analizar más fácilmente los posibles problemas y ajustar la configuración en caso de que un procedimiento de electroporación sea insatisfactorio o no consiga los resultados deseados. Una tasa de muestreo ejemplar es de 2000 muestras por segundo, aproximadamente 104 muestras para cada uno de los 5 pulsos de corriente. Un período de muestra total ejemplar es de 4152 ms con un muestreo que comienza aproximadamente 50 ms antes de que se dispare el primer pulso y se detiene aproximadamente 50 ms después del último pulso. Las formas de onda de tensión y corriente se pueden cuantificar en una representación digital de 12 bits con una linealidad de ± 1 bit menos significativo ("LSB"). La resolución de la forma de onda de corriente debe ser al menos de 5 mA y la resolución de la forma de onda de tensión debe ser al menos de 0,25 V. El registrador de forma de onda puede estar compuesto por circuitos analógicos de op-amp general y un sistema convertidor analógico a digital ("A/D") adecuado para uso con el controlador.

Otro componente del EKD es un dispositivo de entrada para introducir órdenes del usuario. Por ejemplo, los parámetros de funcionamiento del EKD pueden ser introducidos por un operador a través de un teclado numérico (tal como, Grayhill 88AB2). En una realización preferida, los números introducidos en el teclado se muestran en una pantalla de cristal líquido ("LCD"). Los parámetros típicos que se pueden programar son la corriente de pulso de electroporación, la habilitación/inhabilitación del ensayo de impedancia y el retardo de disparo de la electroporación. Las características relacionadas con el teclado también están dirigidas por el controlador.

Otros posibles componentes del EKD incluyen el dispositivo de notificación de estados para visualizar o notificar al operador sobre el estado del sistema. Este dispositivo de notificación de estados puede incluir un panel de visualización de información, tal como una pantalla de cristal líquido ("LCD") (tal como, Lumex LCM-S02004DSF u Optrex DMC-20434N). La pantalla LCD es preferentemente del tipo de visualización de caracteres y es preferentemente capaz de mostrar 4 líneas de 20 caracteres cada una. La pantalla LCD también está equipada con una luz de fondo que se puede encender y apagar con un conmutador de palanca. La información de estado también puede ser proporcionada por una notificación audible, tal como un zumbador (tal como, CUI CEP-2202AS) que suena en varios tonos. Cada tono tiene preferentemente un significado diferente, según lo controla el software o firmware. Por ejemplo, el volumen del zumbador puede tener 3 ajustes programables y un intervalo aproximado de 60 a 80 dB a una distancia de 1 metro del zumbador. El intervalo de nivel de presión acústica solo se proporciona como referencia. El nivel de sonido se considera aceptable si es audible en un entorno ruidoso (por ejemplo, una granja) si se establece en su nivel más alto y no es demasiado alto en un entorno tranquilo (por ejemplo, una oficina) si se establece en su nivel más bajo. Además, el EKD puede estar equipado con un diodo emisor de luz ("LED") (tal como, Lumex SSI-LXR1612ID o cualquier LED rojo de montaje en panel) para designar si la unidad se enciende o se apaga.

Un componente más del EKD es un puerto de comunicación que puede usarse para cargar datos de forma de onda de electroporación en un dispositivo electrónico externo, tal como un asistente digital personal ("PDA") o un ordenador personal ("PC"), para fines de visualización. Preferentemente, el puerto de comunicación es un puerto de comunicaciones en serie óptico, tal como un puerto de infrarrojos ("IR") (tal como, Transceptor: Vishay TFDU4100 o Zilog ZHX1201; Codificador: Microchip MCP2120 o TI TIR1000).

El EKD también puede poseer un componente de memoria. El componente de memoria almacena datos de forma de onda de electroporación y parámetros de funcionamiento. Preferentemente, la memoria (tal como, Atmel AT45DB321B) no es volátil, lo que significa que conserva sus datos incluso si el EKD está apagado. Para conservar la memoria, los datos de forma de onda de electroporación solo pueden guardarse en la memoria durante los periodos activos del tren de pulsos de electroporación. Durante los periodos inactivos, los datos muestreados solo

pueden almacenarse en la memoria si cualquiera de las formas de onda supera un umbral especificado. Por ejemplo, estos umbrales pueden ser un umbral de tensión de 2 V y un umbral de corriente de 10 mA. Los datos almacenados en la memoria durante los períodos inactivos del tren de pulsos corriente pueden tener un sellado de tiempo de modo que el índice de tiempo de los datos se conozca una vez que se reconstruyan las formas de onda. Se puede prever el almacenamiento de hasta 40 muestras (20 ms) de datos que se producen durante los períodos inactivos del tren de pulsos. El almacenamiento puede limitarse a 20 ms porque el software puede especificar que el resto de la secuencia de electroporación se cancelará si se supera cualquiera de los umbrales durante un período acumulado de más de 20 ms. Un conjunto de datos de forma de onda de electroporación requiere aproximadamente 2 kB de memoria cuando se implementa la técnica de compresión anterior. El EKD contiene preferentemente suficiente memoria para guardar al menos 600 conjuntos de datos de forma de onda de electroporación.

Otros componentes del EKD son una fuente de alimentación y un conmutador de alimentación. La fuente de alimentación es preferentemente una batería (tal como, 2 X Powersonic PS-640 F1 o Panasonic LC-R064R2P) y es responsable de proporcionar energía a cada circuito del EKD. Estos circuitos incluyen una fuente de alimentación de baja tensión/baja capacidad de potencia para el controlador y sus periféricos, una fuente de alimentación de baja tensión y baja capacidad de potencia para el ensayador de impedancia, y una fuente de alimentación de alta capacidad de potencia para el generador de forma de onda de corriente. El conmutador de alimentación (tal como, E-Switch R5CBLKBLKEF0, o cualquier conmutador basculante de montaje en panel DPDT 10A) controla la alimentación al EKD y puede estar encendido o apagado. En la posición de apagado, todas las conexiones eléctricas al conjunto de electrodos son eléctricamente neutras dentro de los 5 segundos después de desconectar la alimentación.

El EKD también incluye un conjunto de mango de electrodo. Preferentemente, el conjunto de mango de electrodo incluye tres elementos: una matriz de electrodos de aguja, un dispositivo de notificación de estado para notificar el estado del EKD, y un conmutador activador. En una realización preferida, la matriz de electrodos de aguja es circular y comprende cinco electrodos de aguja. El estado del EKD se indica preferentemente en el conjunto de mango a través del uso de uno o más LED, que pueden ser de colores variables y estar programados para parpadear de intermitente para indicar diversas etapas de la secuencia de disparo de los electrodos. El conmutador activador del conjunto de mango se usa preferentemente para iniciar diversas etapas de la secuencia de disparo de los electrodos.

Otra realización de la presente invención es un disco de electrodos reemplazable que puede montarse de forma amovible en el mango de un dispositivo de electroporación. En una realización preferida, En una realización preferida, el disco de electrodos reemplazable se monta en el conjunto de mango de electrodo del EKD. La figura 3 muestra una vista lateral del disco de electrodos y la figura 4 muestra una vista superior del disco de electrodos. En las figuras 3 y 4, el disco de electrodos 10 tiene una pluralidad de electrodos de aguja 101 montados sobre una estructura de soporte 102 en una disposición espacial para penetrar en el tejido seleccionado. En una realización preferida, la disposición espacial es una matriz circular. Los electrodos individuales en la matriz de agujas en el lado del mango del disco de electrodos son romos y están desbarbados para su inserción en los accesorios de contacto eléctrico complementarios en el mango. El mango preferentemente aloja un conector eléctrico desde los electrodos de aguja hasta el generador de pulsos o EKD. La estructura de soporte 102 del disco de electrodos también tiene un canal de inyección central estéril 103 (mostrado en líneas de puntos), a través del cual se puede hacer pasar una aguja de inyección para la inyección de las macromoléculas. El canal 103 preferentemente se extiende hacia fuera en el lado superior del disco de electrodos 10, a través de la estructura de soporte 102 y el mango, a una longitud suficiente para crear un tubo estéril que pasa a través del mango y el disco. Por tanto, el mango proporciona al usuario un medio fácil para implantar los electrodos de aguja en un tejido seleccionado e inyectar de forma contemporánea las macromoléculas.

También se proporciona un disco guía que puede montarse sobre el disco de electrodos reemplazable. La figura 5 muestra una vista lateral del disco guía y la figura 6 muestra una vista superior del disco guía. Como se muestra en las figuras 5 y 6, el disco guía 20 tiene una pluralidad de agujeros guía 201 que corresponden a la separación física de los electrodos de aguja 101 (figuras 3 y 4) y un pasaje central 203 que corresponde al canal central 103 (figuras 3 y 4) del disco de electrodos para la inserción de la aguja de inyección. El disco guía puede ser de grosor variable, permitiendo al operador controlar la profundidad de penetración de los electrodos de aguja. El disco guía también permite al sustituir el disco de electrodos sin tocar las agujas estériles. La figura 7 muestra el disco guía 20 montado sobre el disco de electrodos 10.

En una realización preferida, los electrodos de aguja en el conjunto de electrodos del EKD así como en el disco de electrodos reemplazable están en una matriz circular. En una realización preferida más, la pluralidad de electrodos de aguja consiste en cinco electrodos de aguja. En una realización preferida adicional, los centros de los cinco electrodos de aguja están en una matriz circular en forma de un pentágono inscrito por un círculo de aproximadamente 1,0 cm de diámetro.

Dado que las formas de onda requeridas para la electroporación son especificadas por el software o el firmware, el EKD difiere de otros dispositivos de electroporación, que dependen de las especificaciones de hardware. Por ejemplo, como se muestra en la figura 8, en una secuencia programada designada programa 0000, el número de

pulsos es 5. Para el pulso 1, el flujo de corriente va del electrodo 1 a los electrodos 3 y 4. El electrodo 1 es positivo y los electrodos 3 y 4 son negativos. Los electrodos 2 y 5 están eléctricamente aislados de los electrodos 1, 3 y 4. La tensión de aislamiento es al menos de 200 V. Se representa la secuencia completa en la que los electrodos 1 a 5 se convierten en el electrodo positivo sucesivamente, con dos electrodos de carga negativa en los vértices opuestos de la matriz pentagonal. El código para la configuración del electrodo es P = positivo, O = apagado y N = negativo. El diagrama compuesto es la suma de todos los pulsos y la dirección del flujo de corriente, usando la notación física convencional.

Los pulsos de corriente típicos producidos en el programa 0000 se muestran en la figura 9A. La figura 9B muestra la forma de onda de cada pulso de corriente. Los parámetros de forma de onda son:

Periodo (t_p): 1000 ms \pm 250 μ s.
 Tiempo de ascenso (t_r): 20 μ s máximo.
 Tiempo de estabilización (t_s): 20 μ s máximo.
 Anchura del pulso (t_w): 52 ms \pm 100 μ s.
 Tiempo de caída (t_f): 20 μ s máximo.
 Corriente nominal (I_n): $I_n \in \{0,1 \text{ A}, 0,2 \text{ A}, 0,3 \text{ A} \dots 1,5 \text{ A}\}$
 $\pm 10\%$ de I_n durante t_h y con $R_l \leq 100 \Omega$. R_l es la
 resistencia de carga entre cualquiera de los 5 conjuntos de electrodos mostrados en la figura 8.

Solo la forma de onda de corriente se especifica en la figura 9B. La forma de la forma de onda de tensión depende de la impedancia vista por los electrodos mientras el pulso de corriente está disparando (durante t_h). La forma de onda de tensión no se especifica durante t_h ya que la impedancia es desconocida durante este período. La tensión a través de cualquier conjunto de electrodos durante t_f es 0 V.

El EKD es programable para utilizar una variedad de patrones de pulsos de electrodo. Los ejemplos de estos patrones de pulsos se ilustran en las figuras 10 - 18. Cada patrón puede ensayar hipótesis relacionadas con la expresión óptima del transgén variando el volumen de tejido electroporado, el daño potencial asociado con el flujo de corriente en direcciones opuestas a través del mismo volumen de tejido y la corriente total por volumen de tejido.

Se cree el fenómeno subyacente de la electroporación es el mismo en todos los casos, pero el mecanismo exacto responsable de los efectos observados no ha sido dilucidado. Aunque sin desear estar ligados a una teoría, la manifestación patente del efecto electroporativo es que las membranas celulares se vuelven transitoriamente permeables a moléculas grandes, después de que las células han estado expuestas a pulsos eléctricos. Hay conductos a través de las paredes celulares que, en circunstancias normales, mantienen un potencial transmembrana en reposo de 90 mV permitiendo la migración iónica bidireccional.

Aunque sin desear estar ligados a una teoría, la electroporación hace uso de las mismas estructuras, forzando un alto flujo iónico a través de estas estructuras y abriendo o agrandando los conductos. En la técnica anterior, los electrodos metálicos se colocan en contacto con los tejidos y se les imponen tensiones predeterminadas, proporcionales a la distancia entre los electrodos. Los protocolos usados para la electroporación se definen en términos de las intensidades de campo resultantes, de acuerdo con la fórmula $E=V/d$, donde (" E ") es el campo, (" V ") es la tensión impuesta y (" d ") es la distancia entre los electrodos.

La intensidad del campo eléctrico E ha sido un valor muy importante en la técnica anterior cuando se formulan protocolos de electroporación para la administración de un fármaco o macromolécula a la célula del sujeto. Por consiguiente, es posible calcular cualquier intensidad del campo eléctrico para una variedad de protocolos aplicando un pulso de tensión predeterminada que es proporcional a la distancia entre electrodos. Sin embargo, una advertencia es que se puede generar un campo eléctrico en un tejido con electrodos aislados (es decir, el flujo de iones no es necesario para crear un campo eléctrico). Aunque sin desear estar ligados a una teoría, es la corriente la que es necesaria para la electroporación exitosa, no el campo eléctrico per se. La activación del generador de forma de onda de corriente del EKD distribuirá un pulso eléctrico de corriente constante a la pluralidad de electrodos de aguja, de modo que se produzca un acontecimiento de electroporación descentralizada en una zona donde no se desarrollan puntos de solapamiento de electroporación congruentes. La permeabilidad de las células en la zona de la electroporación descentralizada aumenta y la macromolécula es suministrada al interior de la célula del sujeto sin sobrecalentar ni dañar la célula o el tejido.

La presente invención se refiere a un dispositivo de electroporación para introducir macromoléculas en una o más células de un animal o una planta. El dispositivo de electroporación comprende el EKD y un conjunto de electrodos. El dispositivo de electroporación también puede comprender un disco de electrodos reemplazable o intercambiable que tiene una pluralidad de electrodos de aguja, un canal central o puerto, y un disco guía amovible opcional. Conjuntamente, el disco de electrodos reemplazable o intercambiable y el disco guía forman un conjunto de electrodos de aguja que pueden montarse sobre un mango de un dispositivo de electroporación. El mango contiene un conector eléctrico del conjunto de electrodos de aguja a un subsistema generador de pulsos de corriente constante o el EKD. El mango no es conductor y está diseñado para proporcionar al usuario un medio fácil para implantar el conjunto de electrodos de aguja en un tejido seleccionado. La utilización de un conjunto de agujas

5 desechables y soportes de montaje a presión en el mango permite al usuario unir y desprender rápidamente el conjunto de electrodos de aguja. El disco guía proporciona un medio para sujetar el conjunto de electrodos sin contaminar las agujas estériles. La fuente de alimentación del dispositivo de electroporación, en particular el EKD, puede utilizar módulos de batería para uso en el campo donde el acceso y el uso de un enchufe en la fuente de alimentación es peligroso o inconveniente.

10 También debe entenderse que pueden realizarse numerosos cambios y modificaciones del EKD y el propio conjunto de electrodos sin alejarse del espíritu y el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, en otra realización, la invención proporciona un método para la administración de una macromolécula a las células que forman las paredes de los vasos sanguíneos o simplemente a células en cultivo. Con modificaciones, la matriz de electrodos de aguja podría convertirse en una matriz de electrodos de catéter que está conectada al mismo EKD descrito en el presente documento. El catéter podría colocarse dentro de un vaso sanguíneo y las macromoléculas podrían administrarse directamente al interior de la pared del vaso utilizando protocolos de corriente constante descritos en el presente documento, que no sobrecalentarían ni destruirían la pared del vaso sanguíneo. El pulso de corriente constante sería generado por el EKD. Este método no causará la muerte celular debido al calentamiento. Dichos aparato y método serían un excelente mecanismo para la administración directa y más regulada de macromoléculas al interior del torrente sanguíneo.

20 El concepto se puede extender a cualquier número de electrodos, tales como una matriz de tres electrodos. La distancia L se elige de modo que la intensidad de energía en el punto B sea un tercio de la del punto A. Después de tres pulsos, (1 a 2, 2 a 3 y 3 a 1), el punto B ha recibido una dosis acumulativa igual a la del punto A. A medida que aumenta el número de electrodos en la matriz, la distancia L necesaria para producir una distribución de energía uniforme se vuelve proporcionalmente más larga. $L = k \times n$ donde n es el número de electrodos, y k es una constante de proporcionalidad. Por tanto, seleccionando un mayor número de electrodos se puede abarcar un mayor volumen de tejido. El número óptimo de electrodos elegidos puede depender del volumen del material a transfectar y de la distancia que está disperso entre la inyección y la electroporación.

30 También se puede usar una jeringa con un cartucho de inyección de macromoléculas especialmente diseñado para administrar una concentración única de macromoléculas preesterilizadas en un cuerpo o planta. Este cartucho de inyección de macromoléculas puede ser una parte de recipiente de plástico que contiene la concentración de dosis única de macromoléculas preesterilizadas y una aguja puntiaguda hueca preesterilizada que se extiende desde la parte de recipiente de plástico que transportará los fluidos desde dentro del recipiente al exterior a través de la punta de la aguja hueca cuando la aguja se inserta en el cuerpo o planta. El canal de inyección central del disco de electrodos garantiza que las macromoléculas y la aguja preesterilizadas no se contaminen durante el proceso de inyección.

35 Ejemplo 1. Funcionamiento del dispositivo electrocinético ("EKD")

40 El funcionamiento del controlador se muestra en las figuras 19 y 20, que ilustran una secuencia de funcionamiento preferida del EKD. En una realización preferida, una pantalla LCD con panel de visualización de información visualiza cada etapa de la secuencia para promover un funcionamiento sencillo para el usuario. Antes de hacer funcionar el EKD, el conjunto de electrodos se inserta firmemente en el tejido diana.

45 En primer lugar, se enciende la alimentación y se inicia el EKD. El firmware permanece en estado inactivo hasta recibir una entrada por parte del usuario. Para iniciar una secuencia de electroporación, se introduce una contraseña para obtener un mensaje introductorio en la pantalla LCD. En este punto, se presiona el conmutador activador del conjunto de mango. El usuario introduce un número, preferentemente un número de identificación de animal, que se registra con los datos de cada pulso almacenado para su posterior descarga. El número se introduce preferentemente usando un teclado numérico. A continuación, se le solicita al usuario, a través de un "pitido" desde el zumbador, que presione el conmutador de activación para continuar la secuencia de electroporación. Después de que se ha presionado el conmutador de activación, el firmware establece si el ensayador de impedancia está habilitado o no. Si el ensayador de impedancia está habilitado, el software realiza inmediatamente una serie de mediciones de impedancia. El firmware ensaya la impedancia entre electrodos con una baja tensión de CC. Estas mediciones se realizan lo más rápido posible para obtener lecturas suficientemente precisas. Durante el ensayo de impedancia, se enciende un LED rojo en el conjunto de mango. Si cualquiera de las 5 mediciones de impedancia es insatisfactoria, sonará un "pitido" de error largo, el LED del mango se mantendrá en rojo, la pantalla LCD mostrará el error y el firmware volverá al estado inactivo.

60 Si las 5 mediciones son satisfactorias, se emite un breve "pitido", se enciende un LED verde en el conjunto de mango y la pantalla solicita al usuario que presione el conmutador de activación para continuar. El firmware espera a que el interruptor de activación del mango vuelva a presionarse para continuar la secuencia. Si se presiona cualquier tecla del teclado en este momento, sonará un "pitido" de error prolongado y la unidad volverá al estado inactivo.

65 Normalmente, el plásmido se inyecta en el músculo en este punto de la secuencia. Cuando se completa la inyección del plásmido, el usuario presiona el conmutador de activación para continuar la secuencia de electroporación. Se emite un breve "pitido", y el firmware cuenta hacia atrás usando un retardo de disparo programado para la secuencia

real de disparo del electrodo. Durante el retardo de disparo, el LED verde en el conjunto de mango parpadea una vez por segundo. Si se presiona cualquier tecla del teclado en este momento, se emite un "pitido" de error prolongado y la unidad vuelve al estado inactivo. Durante los últimos 5 segundos antes de la electroporación, el zumbador emite un "pitido" de longitud intermedia una vez por segundo.

Al final del retardo de disparo, el firmware implementa la secuencia de disparo prohibida por el programa de pulsos seleccionado. El LED rojo en el conjunto de mango se ilumina cada segundo durante aproximadamente 500 ms durante el período de 5 segundos de electroporación. Cuando la secuencia de electroporación se completa con éxito, el EKD vuelve al estado inactivo. Si la corriente total suministrada fue menor que la especificada por el firmware, se muestra un mensaje de error. La fracción de corriente suministrada, en comparación con la especificada, se da como el porcentaje completado.

Ejemplo 2. Adquisición y almacenamiento de datos

El software o firmware del EKD permite la adquisición y el almacenamiento de datos en tiempo real en la memoria no volátil. La figura 21 ilustra una primera parte de datos que se pueden recopilar durante el proceso de electroporación. La primera sección del encabezado del archivo contiene el nombre del archivo y el número del animal. Los datos en columna describen el pulso en secuencia, el tiempo de espera antes del pulso, la anchura del pulso y la corriente de pulso para cada uno de los cinco electrodos. La figura 22 ilustra una segunda parte de datos, que identifica la configuración de cada electrodo durante una secuencia de pulsos dada. Leyendo verticalmente para el primer pulso, el electrodo 1 es positivo, 2 está apagado, 3 es negativo, 4 es negativo y 5 está apagado. Las configuraciones de electrodos para los pulsos 2, 3, 4 y 5 constituyen el resto de las columnas de datos. La figura 23 ilustra una versión formateada de una tercera parte de datos brutos para la misma electroporación, que consiste en 10 puntos temporales, separados aproximadamente 20 ms, para los cinco electrodos. Leyendo verticalmente para el primer pulso, la columna 1 registra la tensión y la columna 2 la corriente. Los datos de corriente de tensión para los pulsos 2, 3, 4 y 5 se encuentran en las columnas 3 y 4, 5 y 6, 7 y 8, y 9 y 10, respectivamente.

Ejemplo 3. Diseño del plásmido, métodos de administración y animales experimentales

Construcción de plásmidos. El plásmido pSP-SEAP (5019 pb) es un plásmido de expresión específico de músculo para fosfatasa alcalina embrionaria secretada ("SEAP"). El promotor es SPc5-12, un promotor sintético potente, específico de músculo (Li y col., 1999), y los extremos 3' de los transcritos de SEAP se definen por la señal de poli (A) tardía de SV40. El plásmido se construyó insertando un fragmento Acc65I-HindIII de 394 pb, que contenía la secuencia promotora SPc5-12 de 334 pb, entre los sitios Acc65I e HindIII del vector básico pSEAP-2 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA).

Condiciones de electroporación. Se usaron pulsos de onda cuadrada en todos los experimentos. Las condiciones de electroporación se establecen individualmente para cada experimento. En todos los casos, se usó corriente constante a de 0,4 a 1,0 Amperios, con 3 o 5 pulsos, durante 52 milisegundos/pulso, y con un segundo entre pulsos. El dispositivo de electroporación EKD contenía una matriz circular (1 cm de diámetro) de cinco electrodos de aguja de acero inoxidable macizos de calibre 21 equidistantes, montados sobre un material no conductor. El disco de electrodos tenía un canal central a través del cual se podía insertar la aguja de inyección en el músculo, de modo que el plásmido se administraba dentro de la zona que se delineó con los cinco electrodos circundantes. Todos los electrodos tenían 2 cm de longitud y se insertaron completamente a través de la piel en el músculo durante todos los tratamientos. En todos los experimentos menos uno, se usó el EKD (ADViSYS). En el último experimento, se usó un modelo diferente de dispositivo de electroporación (ADViSYS Enducer, Modelo BB) para fines de comparación.

Inyección intramuscular de ADN plasmídico en cerdos. Se usaron cerdos híbridos jóvenes de sexo mixto, de tres a seis semanas de edad, con pesos entre 15 - 40 kg, en los estudios de SEAP (n = 6 a 7/grupo/experimento). Los animales fueron alojados en grupos en corrales con acceso ad libitum a una dieta con un 24 % de proteína (Producers Cooperative Association, Bryan, TX) y agua. Las preparaciones de plásmidos libres de endotoxinas se diluyeron en agua estéril y se formularon al 1 % en peso/peso con poli-L-glutamato. El día 0 del experimento, los animales se sujetaron manualmente y la solución de plásmido SEAP se les inyectó directamente a través de la piel intacta en el músculo semimembranoso usando una aguja de calibre 21. Todos los vasos sanguíneos principales de la superficie se evitaron al encontrar un sitio de inyección apropiado. En un intervalo de tiempo predeterminado después de la inyección del plásmido, se aplicó electroporación a través de la matriz de 5 electrodos.

Recogida de sangre. Los días 0, 3, 7, 10 y 14 de cada experimento, los animales se pesaron y se recogió sangre mediante punción de la vena yugular en tubos separadores de suero MICROTAINER. La sangre se dejó coagular durante de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3000xg durante 10 minutos. El suero se almacenó a -80 °C hasta un análisis posterior.

Ensayo de fosfatasa alcalina embrionaria secretada. Las muestras de suero se descongelaron y se analizaron 50 µl para actividad de SEAP usando el kit de ensayo Phospha-Light™ Chemiluminescent Reporter (Applied Biosystems, Bedford, MA), según las instrucciones del fabricante. El límite inferior de la detección del ensayo fue de 3 pg/ml. Las muestras de suero más concentradas se diluyeron a 1: 10 en suero de ratón antes de analizar la actividad de SEAP.

Todas las muestras se leyeron usando un luminómetro LUMIstar Galaxy™ (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania).

5 *Estadística.* Los datos se analizaron usando el paquete de estadísticas Microsoft Excel™. Los valores que se muestran en las figuras son la media \pm SEM. Se obtuvieron valores específicos por comparación usando la prueba de la t o ANOVA de una vía. Se estableció un valor de $p < 0,05$ como el nivel de significación estadística.

Ejemplo 4. Efectos de la dosis de plásmido

10 A los animales se les inyectaron 0,5 mg o 1 mg de plásmido que expresaba SEAP en un volumen total de 2 ml. La intensidad del campo eléctrico fue de 0,5 A usando el programa 0000 (figura 8). El tiempo de demora entre la inyección del plásmido y la electroporación fue de 80 segundos. Como se ilustra en la figura 24, la expresión de SEAP dependía de la cantidad de plásmido administrado. El día 7, la expresión de SEAP después de la inyección en animales tratados con 1 mg de plásmido fue 2,1 veces mayor que la del animal tratado con 0,5 mg de plásmido (71,6 \pm 22 frente a 33,7 \pm 10 pg/ml/kg, * $P < 0,09$, debido a la elevada variabilidad entre animales a mayores dosis de plásmido). En todos los experimentos posteriores, se usó una dosis total de plásmido de 0,5 mg.

Ejemplo 5. Efectos del volumen de plásmido

20 A los animales se les inyectaron 0,5 mg de plásmido que expresa SEAP en un volumen total de 2, 3 o 4 ml de agua. La intensidad del campo eléctrico fue de 0,5 A usando el programa 0000 (figura 8). El tiempo de demora entre la inyección del plásmido y la electroporación fue de 80 segundos. Como se muestra en la figura 25, la expresión de SEAP dependía del volumen del plásmido. El día 3, la expresión de SEAP fue significativamente mayor en los animales a los que se administró el plásmido en un volumen de inyección de 2 ml: 54 \pm 17 pg/ml/kg, * $P < 0,02$ frente a 11 \pm 3 pg/ml/kg en el grupo tratado de 3 ml y 0,13 \pm 0,3 pg/ml/kg en el grupo tratado con 4 ml, † $P < 0,03$; el día 7, 38,5 \pm 18 pg/ml/kg, † $P < 0,05$ frente a 1 \pm 0,3 pg/ml/kg en el grupo tratado con 4 ml; y el día 10 * $P < 0,04$ frente al grupo tratado con 3 ml.

Ejemplo 6. Efectos de la intensidad del campo eléctrico

30 La intensidad del campo eléctrico se correlaciona con el patrón de pulsos para la captación óptima del plásmido y la expresión transgénica. En un primer experimento, a todos los animales se les inyectaron 0,5 mg de plásmido que expresaba SEAP en un volumen total de 2 ml. El tiempo de demora entre la inyección y la electroporación fue de 80 segundos. Usando el patrón de pulsos del programa 0000 del EKD (figura 8), la intensidad del campo eléctrico disminuyó desde los controles positivos de 1 Amp a 0,6 Amp, mientras que la expresión aumenta, como se muestra en la figura 26. Se eligió la condición de 1 Amp debido al importante cuerpo bibliográfico con datos de dispositivos de electroporación de tensión constante que sugieren que esta intensidad del campo eléctrico produciría el mejor nivel de expresión (Mir y col., 1998). Como se ha afirmado, en este caso los mejores resultados se obtuvieron usando una intensidad del campo eléctrico de 0,6 amperios. El día 3 - * $P < 0,04$ para 0,6 Amp y † $P < 0,03$ para 0,5 Amp; el día 7 - * $P < 0,03$ para 0,6 Amp; y el día 10 - * $P < 0,01$ para 0,6 Amp.

45 Se realizó una comparación adicional entre las intensidades del campo eléctrico, usando un modelo de patrón de pulsos diferente. Las intensidades de campo eléctrico de 0,4, 0,5 y 0,6 Amp, usando el patrón de pulsos del programa 0005 (figura 14 - tres pulsos, sin inversión del campo eléctrico), fueron comparados a 1 Amp usando el patrón de pulsos del programa 0000 (figura 8 - cinco pulsos, inversión completa del campo eléctrico), como referencia de control positivo. A todos los animales se les inyectaron 0,5 mg de plásmido que expresaba SEAP en un volumen total de 2 ml. El tiempo de demora entre la inyección del plásmido y la electroporación fue de 80 segundos. Usando este patrón de pulsos, como se muestra en la figura 27, se obtuvieron los mejores niveles de expresión usando un campo eléctrico de solo 0,4 Amp: el día 3 - * $P < 0,02$ para 0,4 Amp; día 7 - * $P < 0,03$ para 0,4 Amp; y día 10 - * $P < 0,03$ para 0,4 Amp. En todos los puntos temporales ensayados, el grupo tratado a 0,5 Amp presentaba una tendencia hacia valores de SEAP aumentados ($P = 0,06 - 0,07$).

Ejemplo 7. Efectos del tiempo de demora

55 Experimentos previos utilizaron un tiempo de demora de 2 minutos entre la inyección de plásmidos y la electroporación (Draghia-Akli y col., 1999; Mir y col., 1999). Para facilitar las aplicaciones a gran escala de la tecnología, es importante considerar acortar el tiempo de demora tanto como sea posible. Sin embargo, como se muestra en la figura 28, el tiempo de demora entre la inyección del plásmido y la electroporación no debe ser inferior a 80 segundos. En este experimento, a todos los animales se les inyectaron 0,5 mg de plásmido que expresaba SEAP en un volumen total de 2 ml. La intensidad del campo eléctrico fue de 0,5 A. Los niveles de expresión de SEAP disminuyeron cuando el tiempo de demora se redujo de 80 a 70, 60 o 50 segundos. Hubo una clara reducción en los niveles de expresión de SEAP en tiempos de retardo menores a 80 segundos: día 10 - * $P < 0,05$ entre el grupo electroporado a los 50 segundos y el grupo que recibió la electroporación a los 80 segundos después de la inyección. Aunque sin desear estar ligados a una teoría, este tiempo de demora puede ser necesario para permitir que el plásmido inyectado se distribuya en el músculo y se una a la superficie de la membrana antes de que ésta se reestructure de forma eléctrica y reversible.

Ejemplo 8. Delineación de la zona de inyección

5 Los dispositivos de electroporación disponibles en el mercado y las matrices de agujas no permiten la inyección y la electroporación en una operación combinada. Con estos instrumentos, el procedimiento requiere que la aguja de inyección se inserte en el músculo diana para la administración del plásmido, y luego se retirara del músculo. Los electrodos se insertaban a continuación en el músculo en las inmediaciones de la zona inyectada, habitualmente basándose a un tatuaje de la piel. Sin embargo, el músculo subyacente puede moverse o contraerse, por lo que el sitio de inyección puede no estar completamente circunscrito por los electrodos de aguja.

10 En este experimento, a todos los animales se les inyectaron 0,5 mg de plásmido que expresaba SEAP en un volumen total de 2 ml. La intensidad del campo eléctrico fue de 0,5 A. El tiempo de demora entre la inyección y la electroporación fue de 80 segundos. A un grupo de animales se les insertaron las agujas en el músculo diana y se mantuvieron en su lugar durante todo el procedimiento. En un segundo grupo, las agujas se retiraron inmediatamente después de la inyección del plásmido, se reinsertaron después de 15 segundos en el mismo sitio de inyección para visualizado en la piel, y comenzó la cuenta atrás de 80 segundos. Los niveles de SEAP fueron $43,5 \pm 16,8$ pg/ml/kg en el grupo A frente a $9 \pm 1,7$ pg/ml/kg el día 7 - * P <0,02; y $45,6 \pm 16$ pg/ml/kg frente a $12 \pm 2,5$ pg/ml/kg el día 10 - * P <0,02. Como se muestra en la figura 28, la no especificidad del sitio de electroporación redujo la expresión del plásmido hasta en un 75 %. Este descubrimiento hace hincapié en la importancia de electroporar con precisión y exactitud el sitio de inyección para una mayor expresión génica.

20

Ejemplo 9. Estudio comparativo

25 Se administraron dosis escalonadas de pSP-SEAP de 0 a 10 mg de acuerdo con los ejemplos anteriores. La inyección del plásmido fue seguida por electroporación usando un dispositivo de electroporación diferente (ADViSYS Enducer, Modelo BB, solicitud de patente de los Estados Unidos, N.º de serie 10/360.768). Como se muestra en la figura 30, el nivel de expresión dependía de la dosis. No obstante, el día 7 después de la inyección, los niveles de SEAP promediaron $7 \pm 2,2$ pg/ml/ kg, mientras que los experimentos con EKD mostraron una expresión de SEAP en el punto temporal correspondiente que promediaba $33,7 \pm 10$ pg/ml/kg, un aumento de 4 veces. Aunque sin desear estar ligados a una teoría, este aumento en la expresión puede resultar de la etapa habilitante, que permite al operador asegurarse de que todas las agujas están en el mismo músculo; la pantalla, que permite el control en tiempo real del procedimiento; el software, que permite la visualización de cada pulso; y el posterior ajuste de los parámetros si el primer procedimiento de electroporación resulta insatisfactorio.

30

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo electrocinético ("EKD") para uso en un procedimiento para electroporación de células de un tejido seleccionado para facilitar la introducción de macromoléculas, que comprende:
 - 5 un conjunto de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos de aguja conductores para penetrar en el tejido seleccionado;
 - un ensayador de impedancia en comunicación eléctrica con la pluralidad de electrodos de aguja para determinar una resistencia,
 - 10 un generador de forma de onda de corriente en comunicación eléctrica con la pluralidad de electrodos de aguja para aplicar un patrón de pulsos de corriente constante descentralizado entre cualquier pluralidad de electrodos; en el que el generador de forma de onda de corriente distribuye un pulso eléctrico de corriente constante a la pluralidad de electrodos de aguja, de modo que un acontecimiento de electroporación descentralizado se produce en una zona donde no se desarrollan puntos de solapamiento de electroporación congruentes;
 - 15 una fuente de alimentación en comunicación eléctrica con el generador de forma de onda de corriente; y un controlador en comunicación con el generador de forma de onda de corriente y la fuente de alimentación, en el que el controlador gestiona el procedimiento de electroporación.
2. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, que comprende además un registrador de forma de onda en comunicación con el controlador para muestrear y registrar datos de electroporación relacionados con el patrón de pulsos de corriente constante descentralizado.
3. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, que comprende además el ensayador de impedancia configurado para llevar a cabo un ensayo de impedancia como un elemento programable por el operador controlado por software o firmware que puede deshabilitarse durante el funcionamiento.
4. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, que comprende además un dispositivo de entrada para introducir órdenes en el controlador.
5. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 4, en el que el dispositivo de entrada es un teclado.
6. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, que comprende además un dispositivo de notificación de estado para notificar información de estado durante el procedimiento de electroporación.
7. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 6, en el que el dispositivo de notificación de estado es un panel de visualización de información, una notificación audible, un diodo emisor de luz ("LED"), o una combinación de los mismos.
8. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, que comprende además un puerto de comunicación en comunicación con el controlador para transmitir datos de electroporación relacionados con el patrón de pulsos de corriente constante a dispositivos electrónicos externos.
9. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 8, en el que el puerto de comunicación es un puerto de comunicaciones en serie óptico.
10. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 8, en el que el puerto de comunicación es un puerto de infrarrojos.
11. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, que comprende además una memoria en comunicación con el controlador para almacenar los datos de electroporación relacionados con el patrón de pulsos de corriente constante descentralizado.
12. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 11, en el que la memoria es no volátil.
13. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, en el que la fuente de alimentación es una batería.
14. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, en el que el conjunto de electrodos comprende además un mango que tiene una estructura de montaje para fijar la pluralidad de electrodos de aguja al mango.
15. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 14, en el que el conjunto de electrodos comprende además un conmutador de activación montado en el mango y en comunicación con el controlador.
16. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, en el que el conjunto de electrodos comprende además un dispositivo de notificación de estado para notificar el estado del procedimiento de electroporación.

17. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 16, en el que el dispositivo de notificación de estado es un diodo emisor de luz ("LED").
- 5 18. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de electrodos de aguja está en una matriz circular.
19. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 18, en el que la matriz circular tiene aproximadamente 1,0 cm de diámetro.
- 10 20. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 1, en el que el EKD comprende además un conjunto de mango y un disco de electrodos reemplazable (10) que comprende el conjunto de electrodos, estando el mango adaptado para recibir el disco de electrodos reemplazable, en el que el disco de electrodos reemplazable comprende además:
- 15 una estructura de soporte (102) capaz de estar montada de forma amovible en el conjunto de mango y que tiene un canal central (103) para recibir una aguja de inyección; y la pluralidad de electrodos de aguja montados sobre la estructura de soporte y que tienen una disposición espacial, en el que la disposición espacial es una matriz circular.
- 20 21. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 20, en el que la matriz circular tiene aproximadamente 1,0 cm de diámetro.
22. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 20, en el que el canal central es de suficiente longitud para extenderse a través del conjunto de mango.
- 25 23. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 20, que comprende además un disco guía (20) que tiene agujeros (201) que corresponden to la disposición espacial de los electrodos de aguja y un pasaje central (203) que corresponde al canal central de la estructura de soporte, en el que el disco guía puede montarse de forma amovible sobre la pluralidad de electrodos de aguja.
- 30 24. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 23, en el que el disco guía tiene un grosor que corresponde a la profundidad de penetración deseada de la pluralidad de electrodos de aguja.
- 35 25. El dispositivo electrocinético ("EKD") de la reivindicación 23, en el que el disco de electrodos puede montarse de forma amovible en el conjunto de mango sujetando el disco guía.

Figura 1

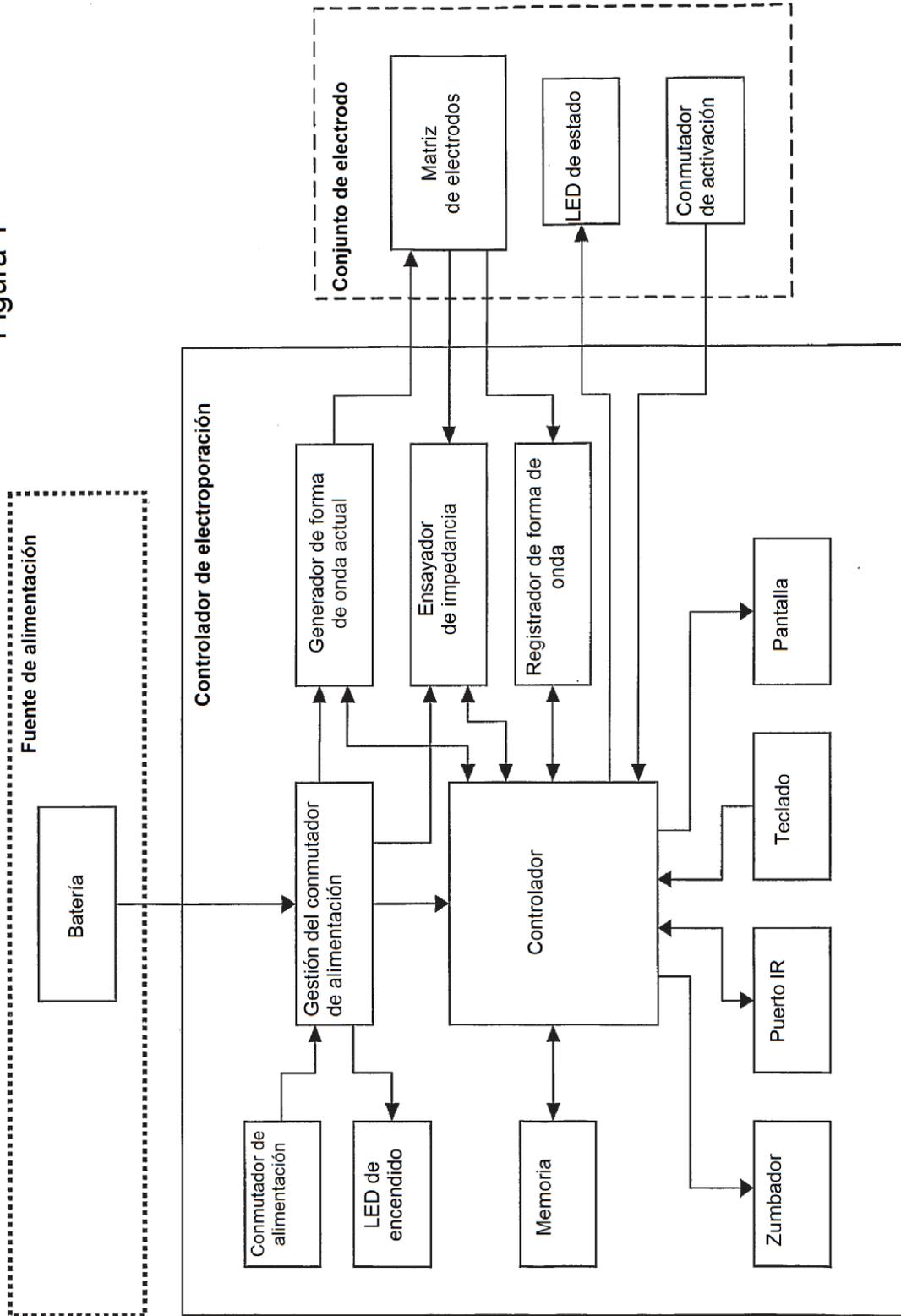
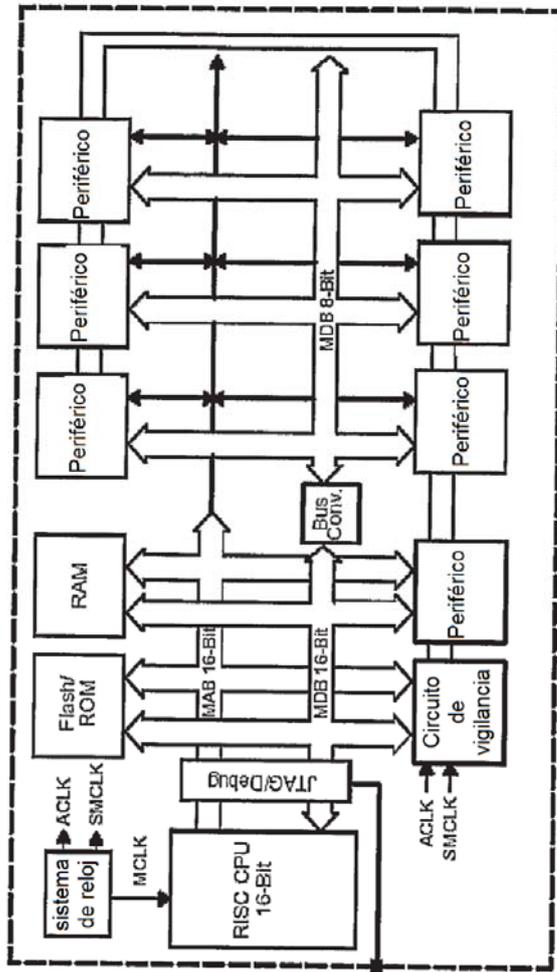


Figura 2



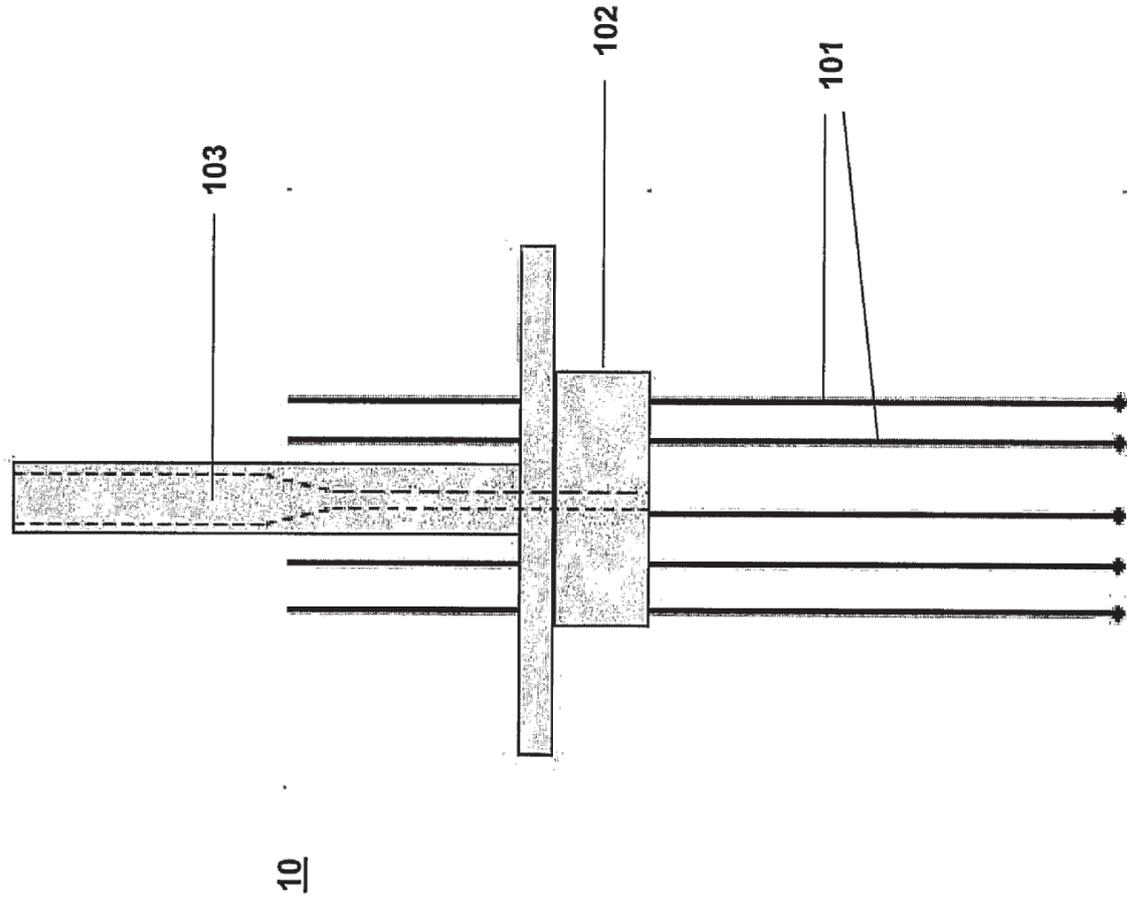


Figura 3

Figura 4

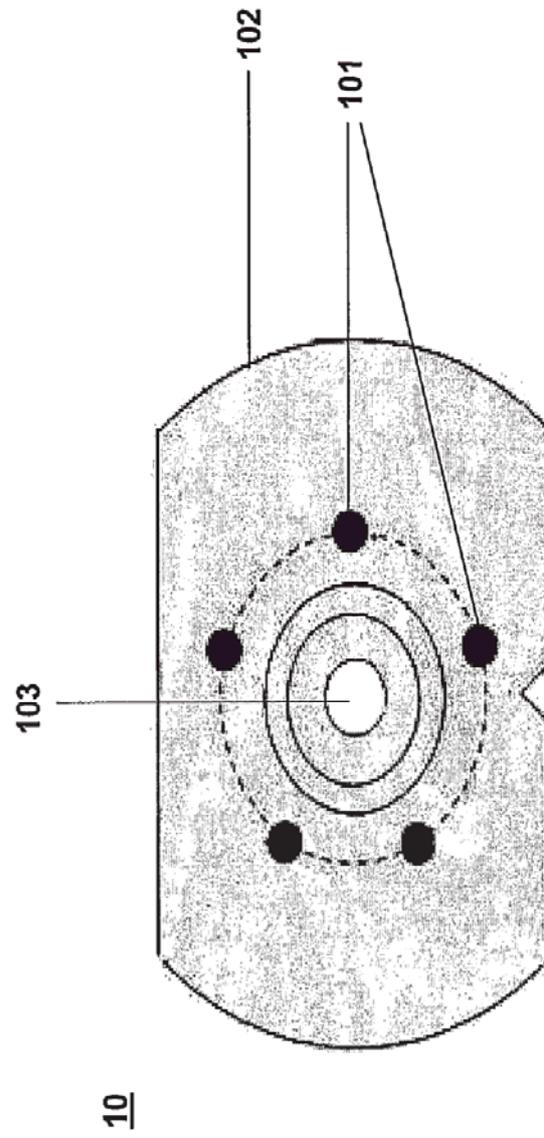


Figura 5

20

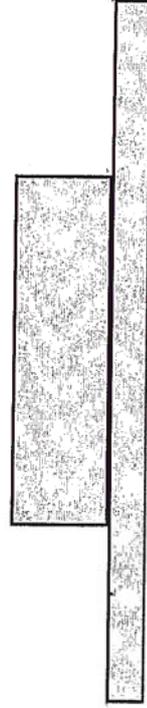
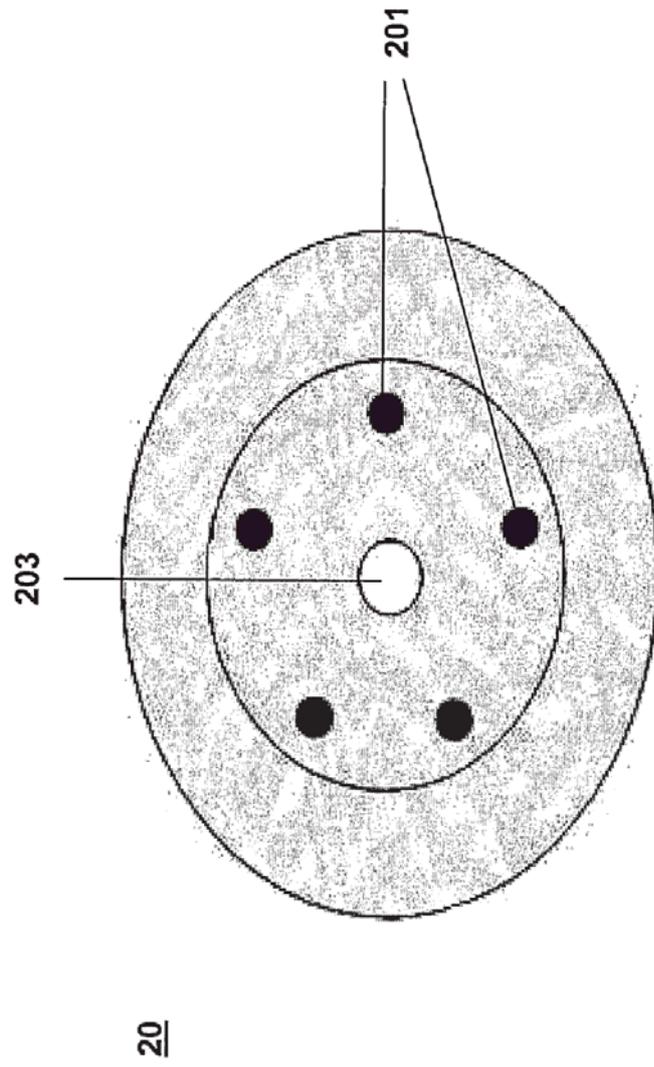


Figura 6



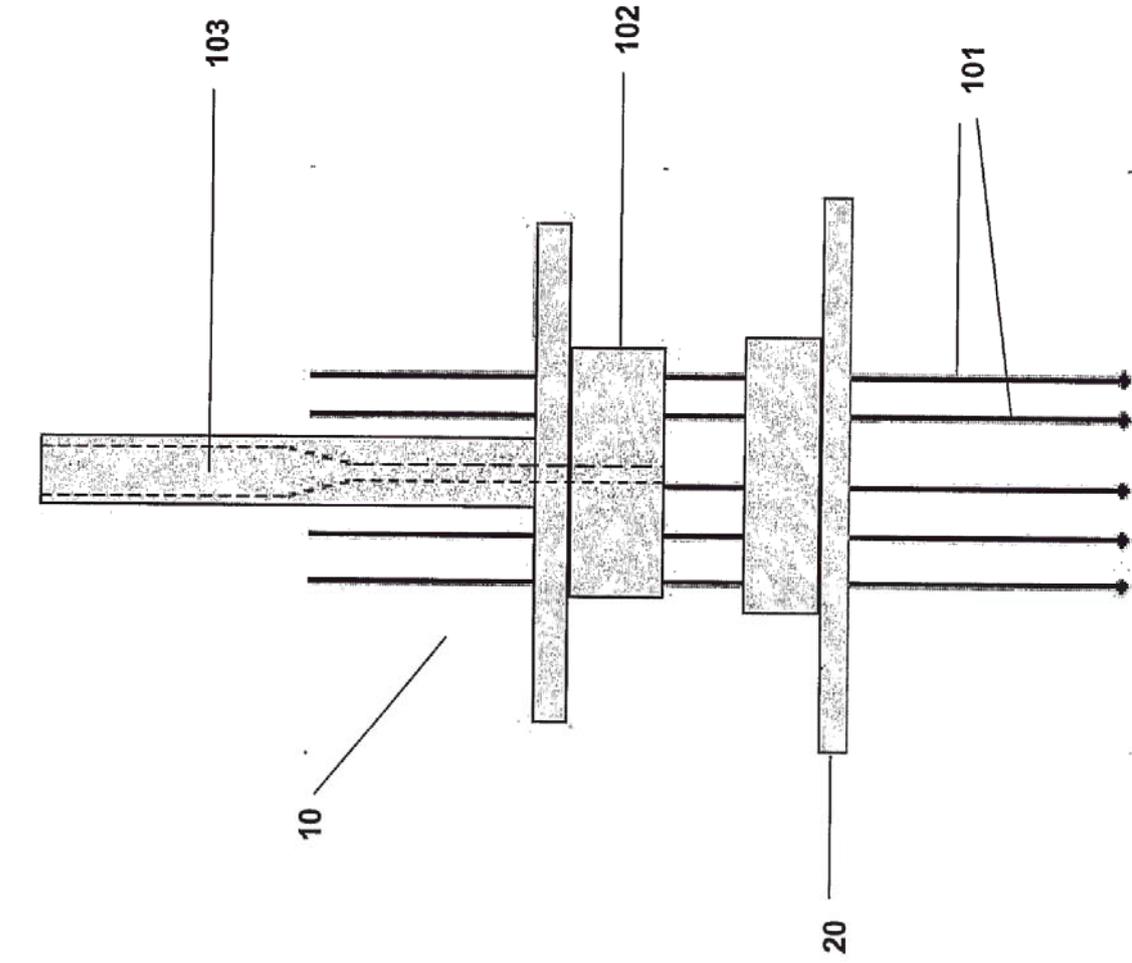
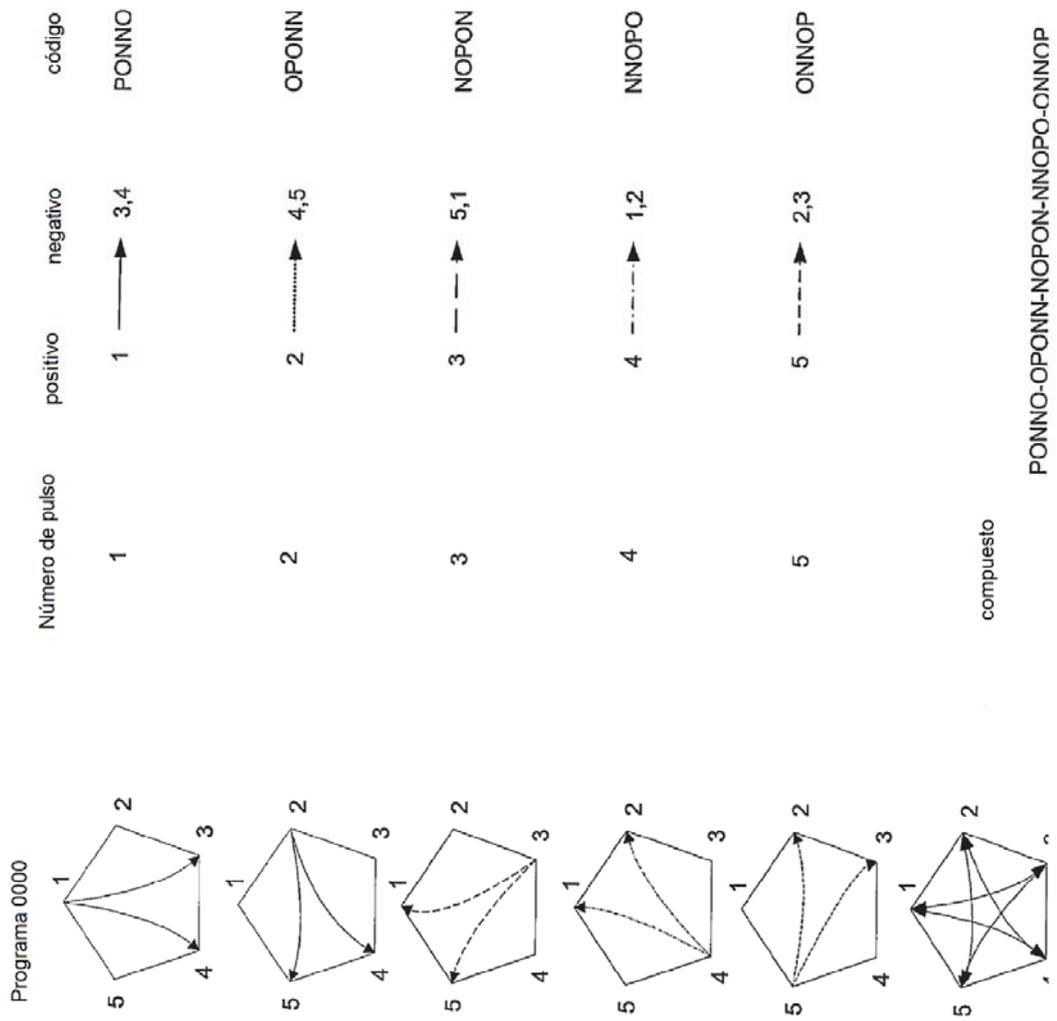


Figura 7

Figura 8



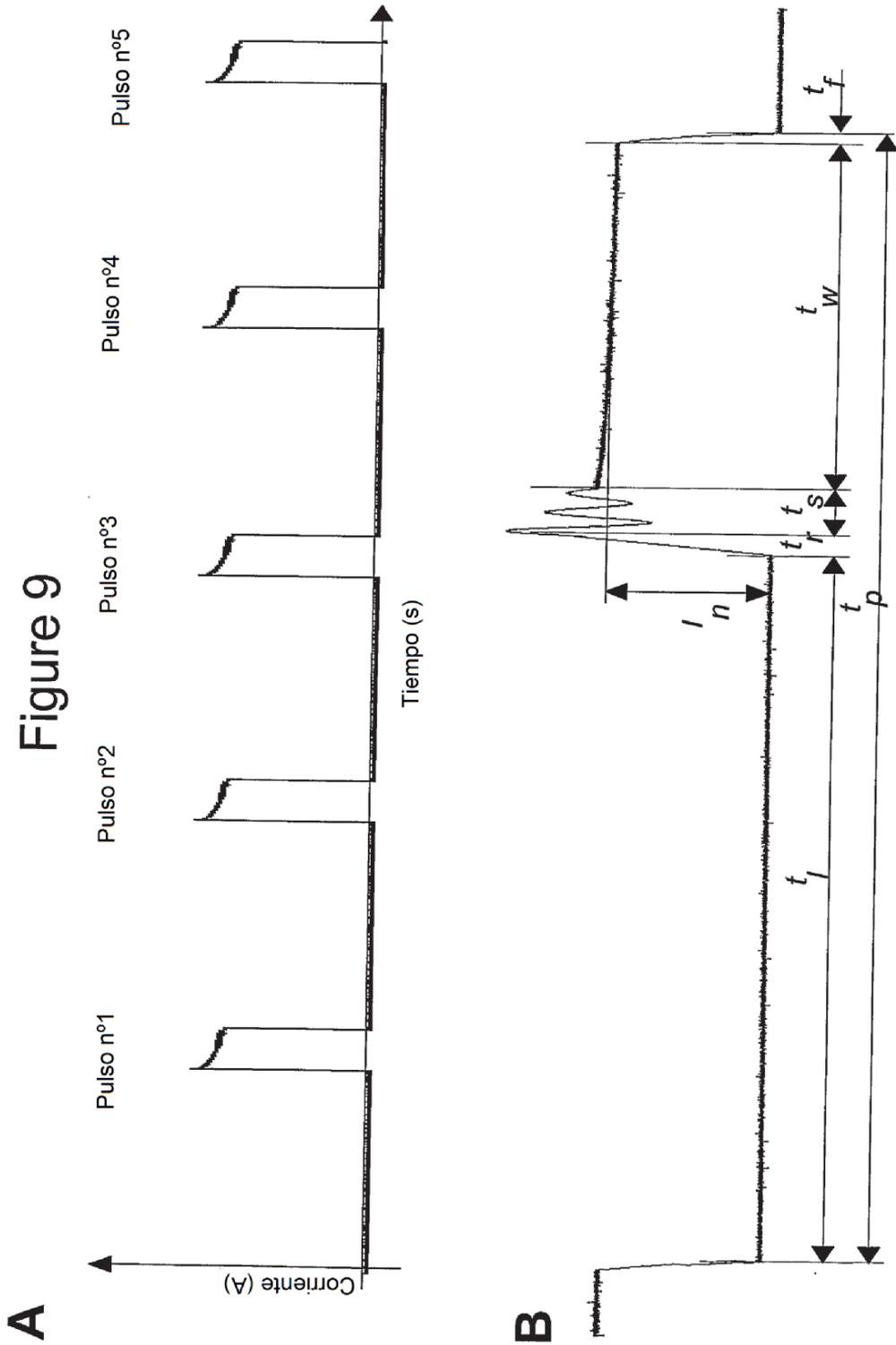


Figura 10

Programa 0001

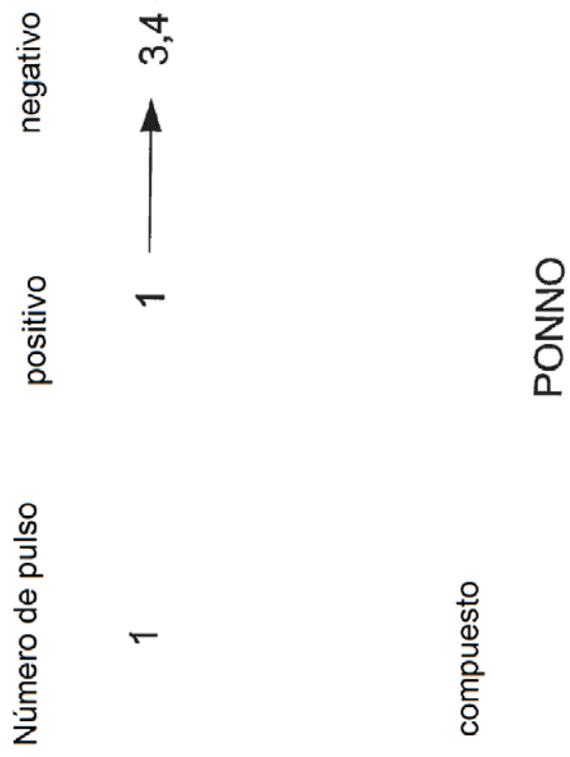
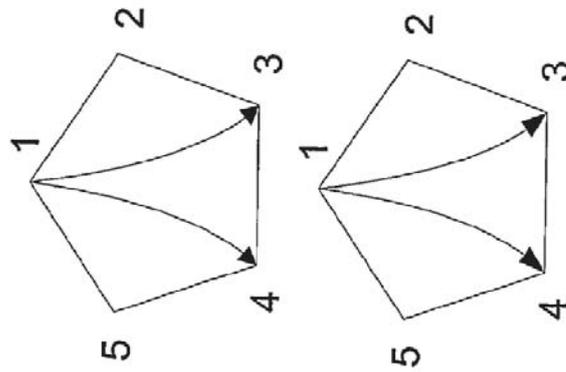


Figura 11

Programa 0002

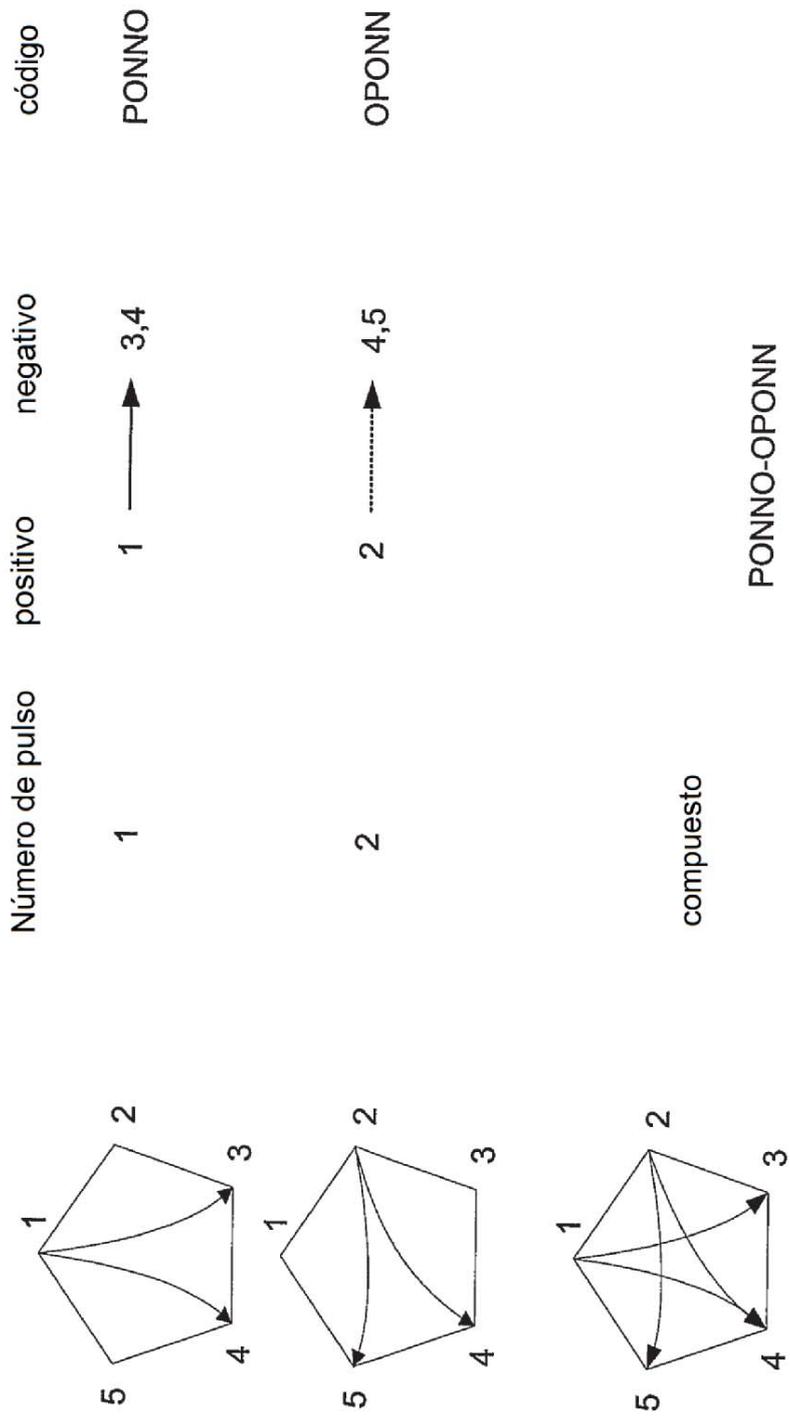


Figura 12

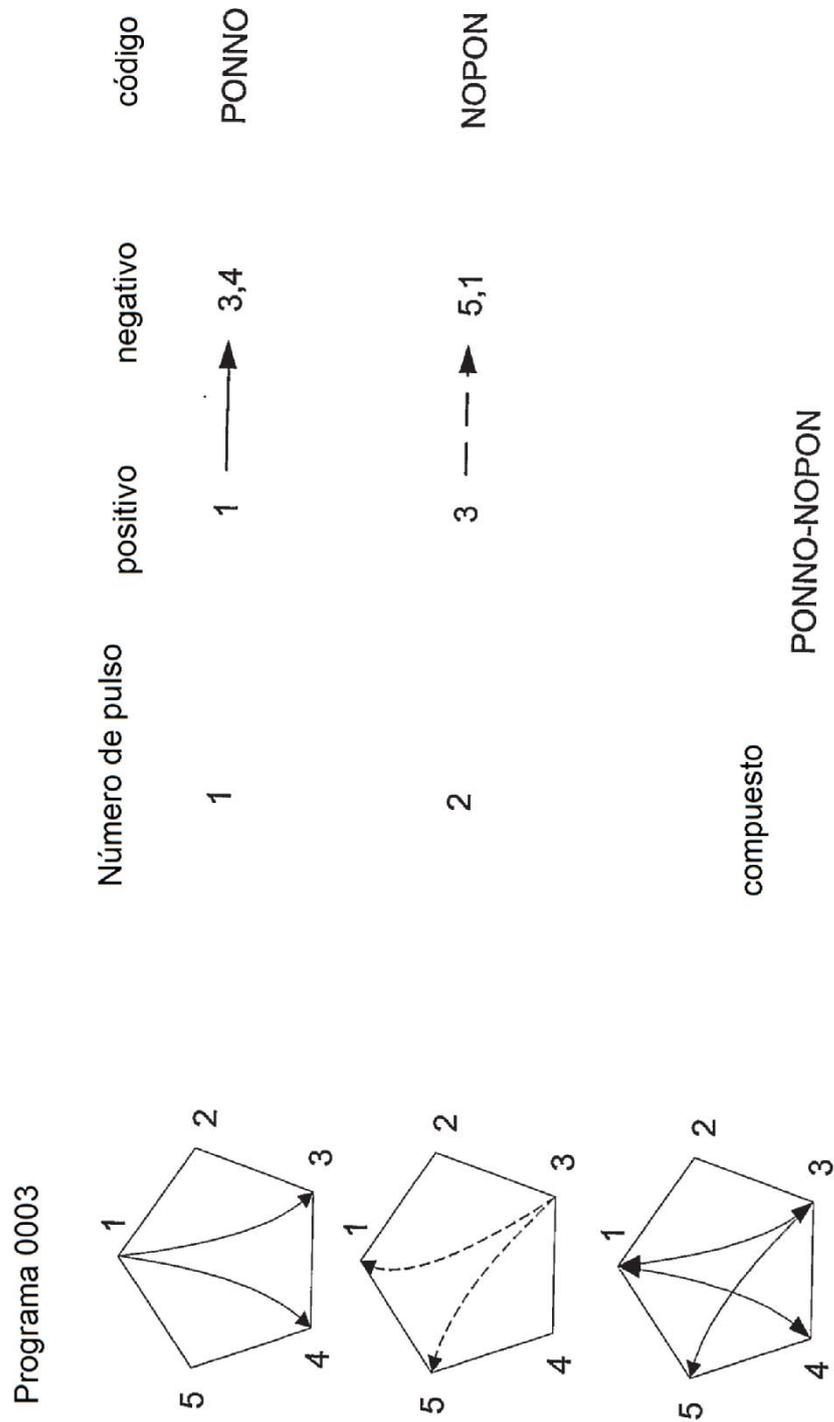


Figura 13

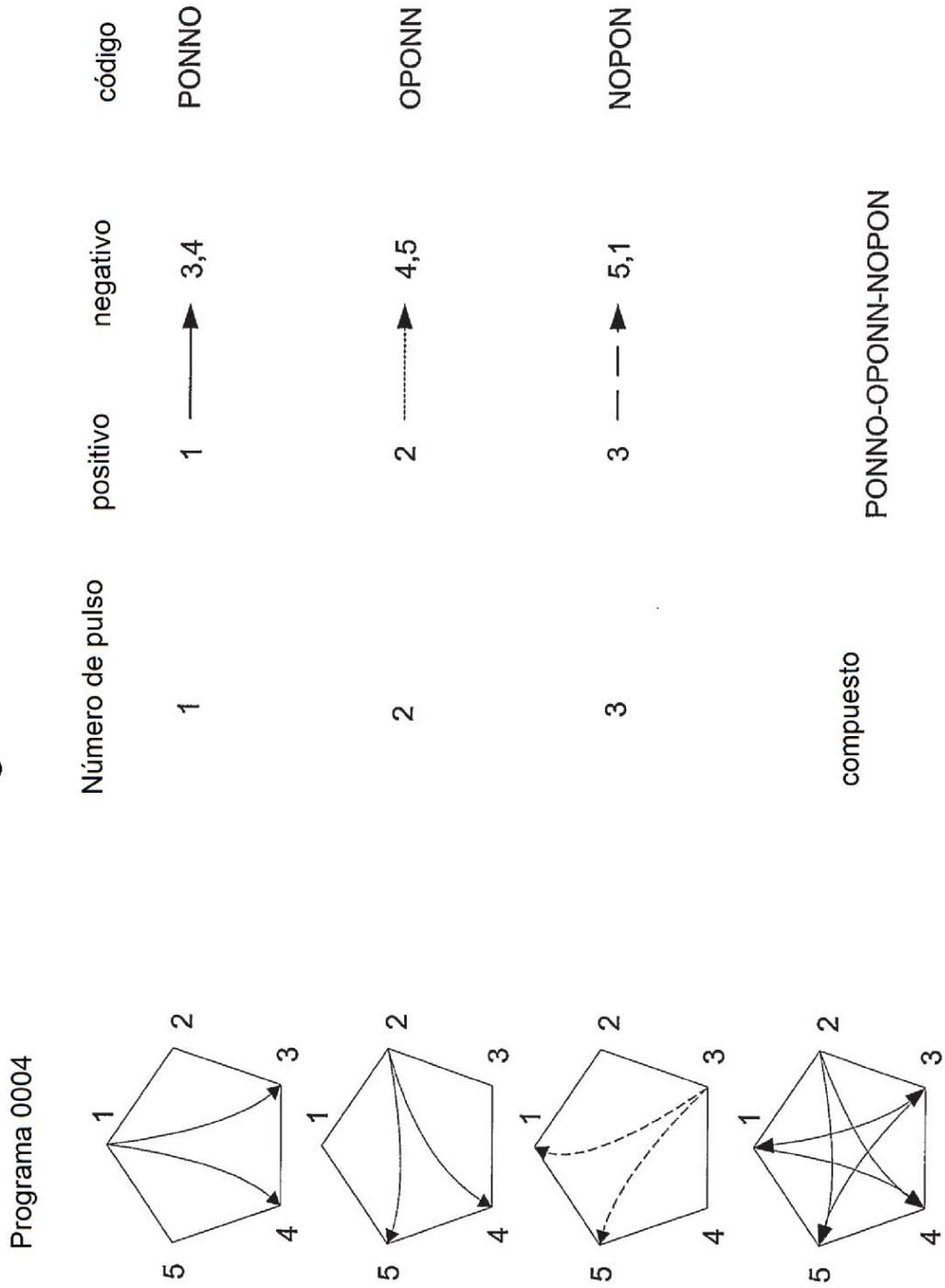


Figura 14

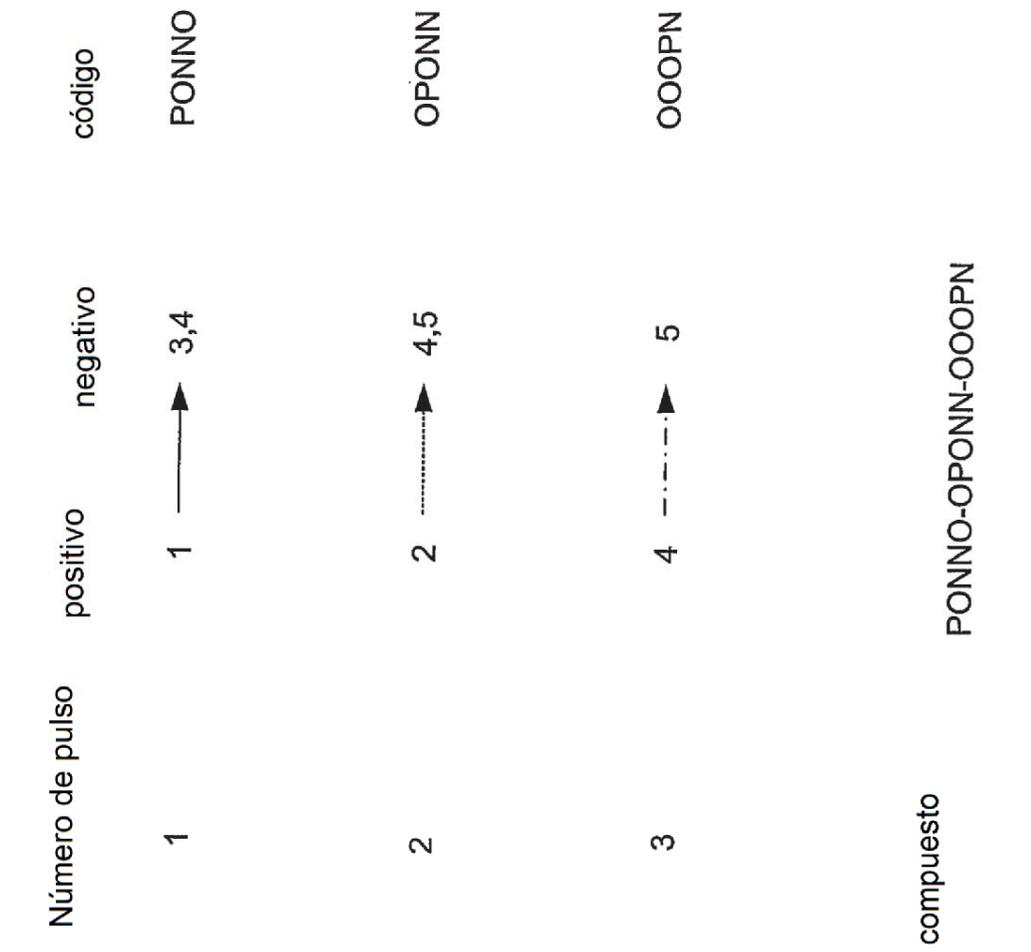
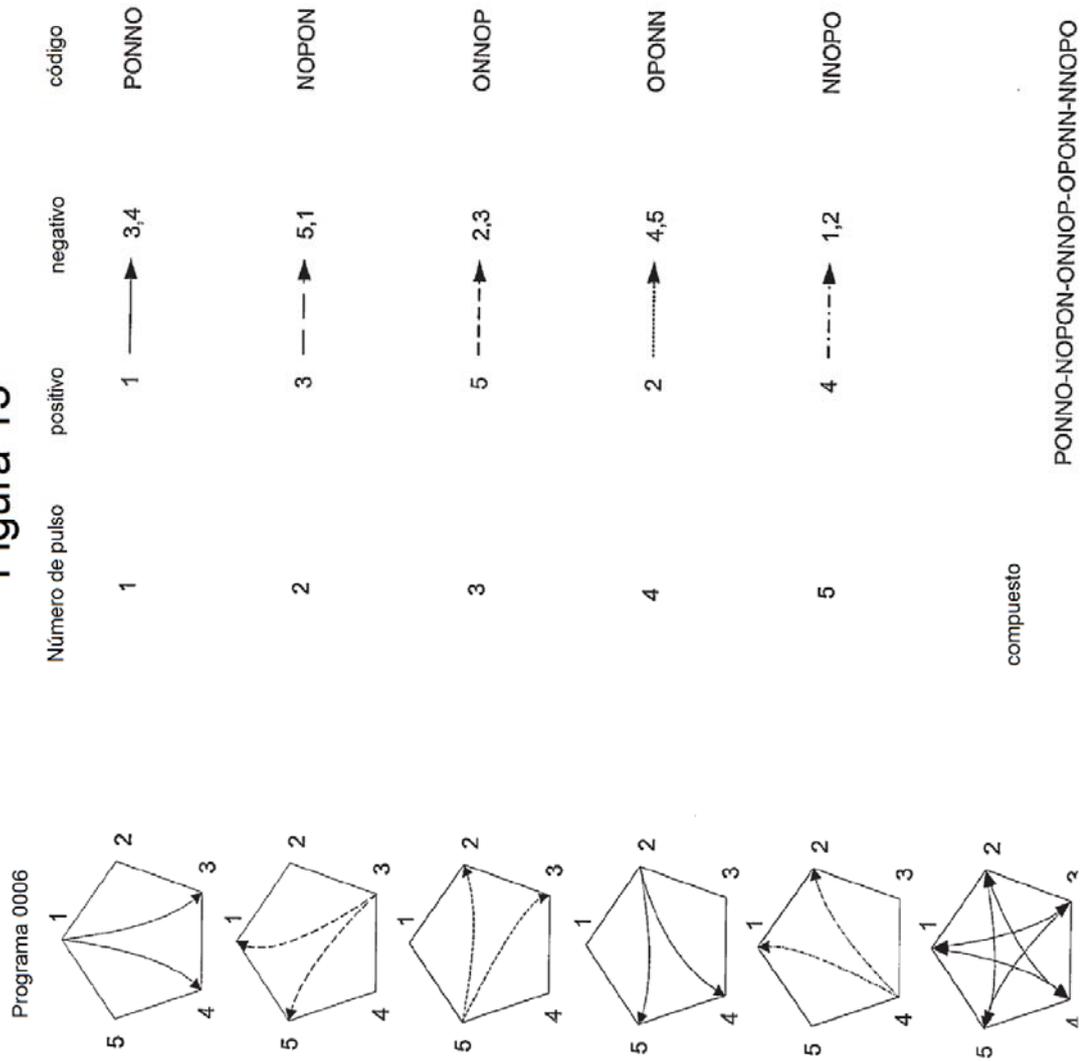


Figura 15



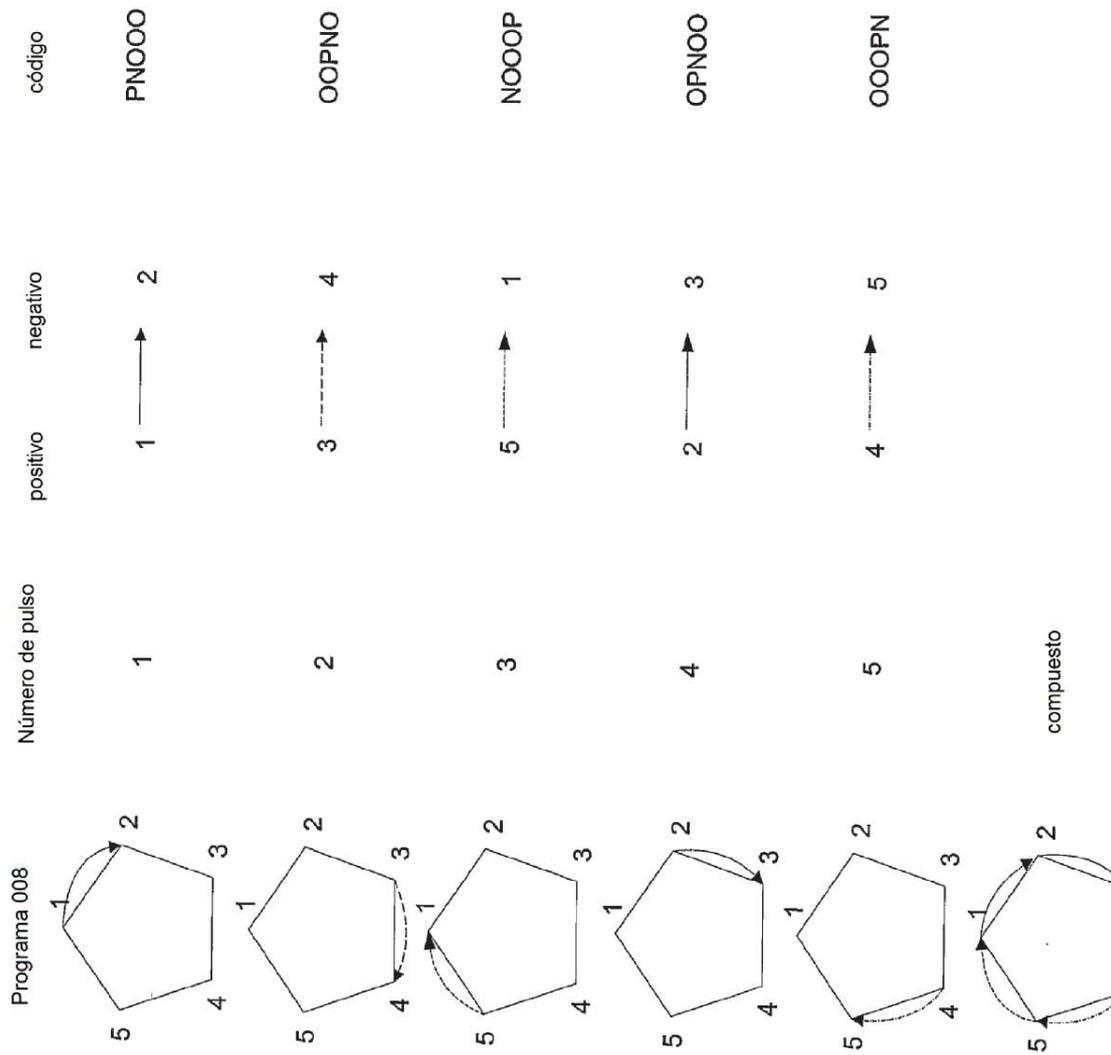


Figura 17

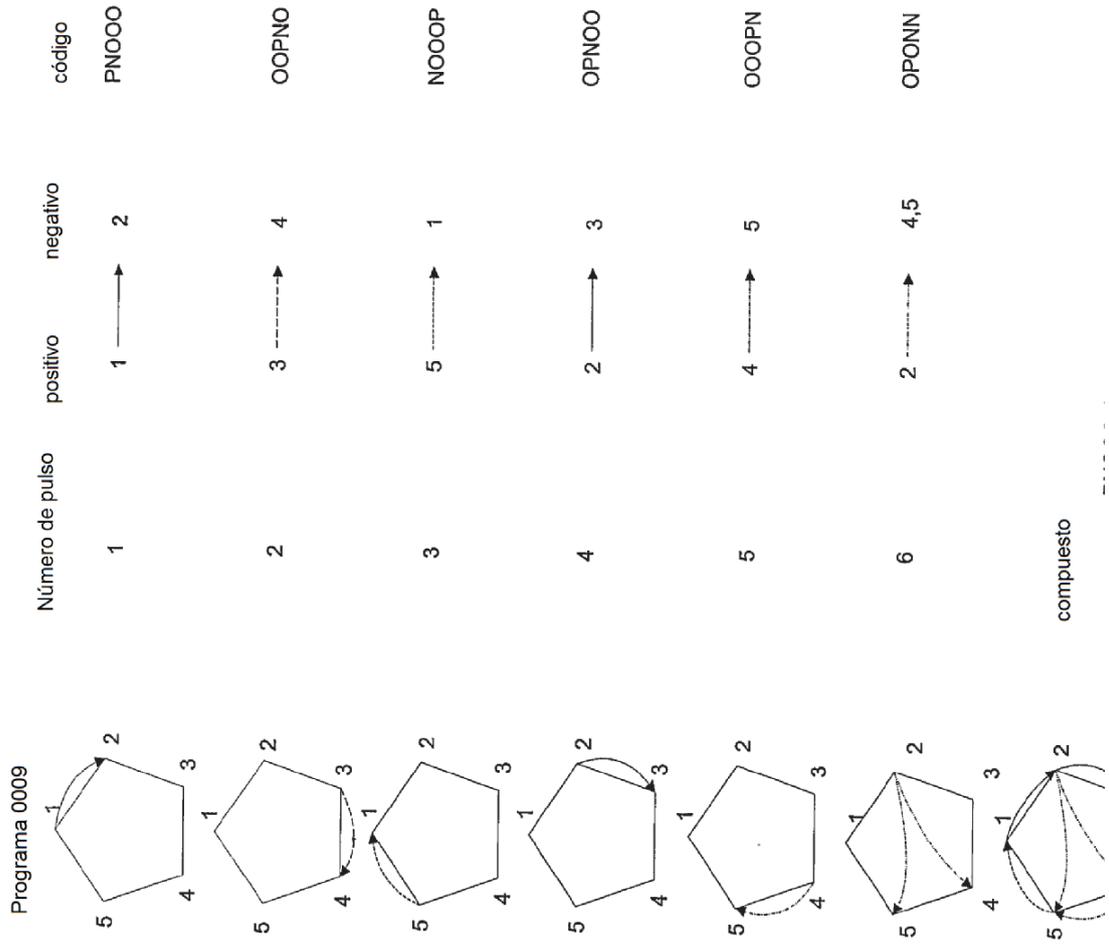


Figura 18

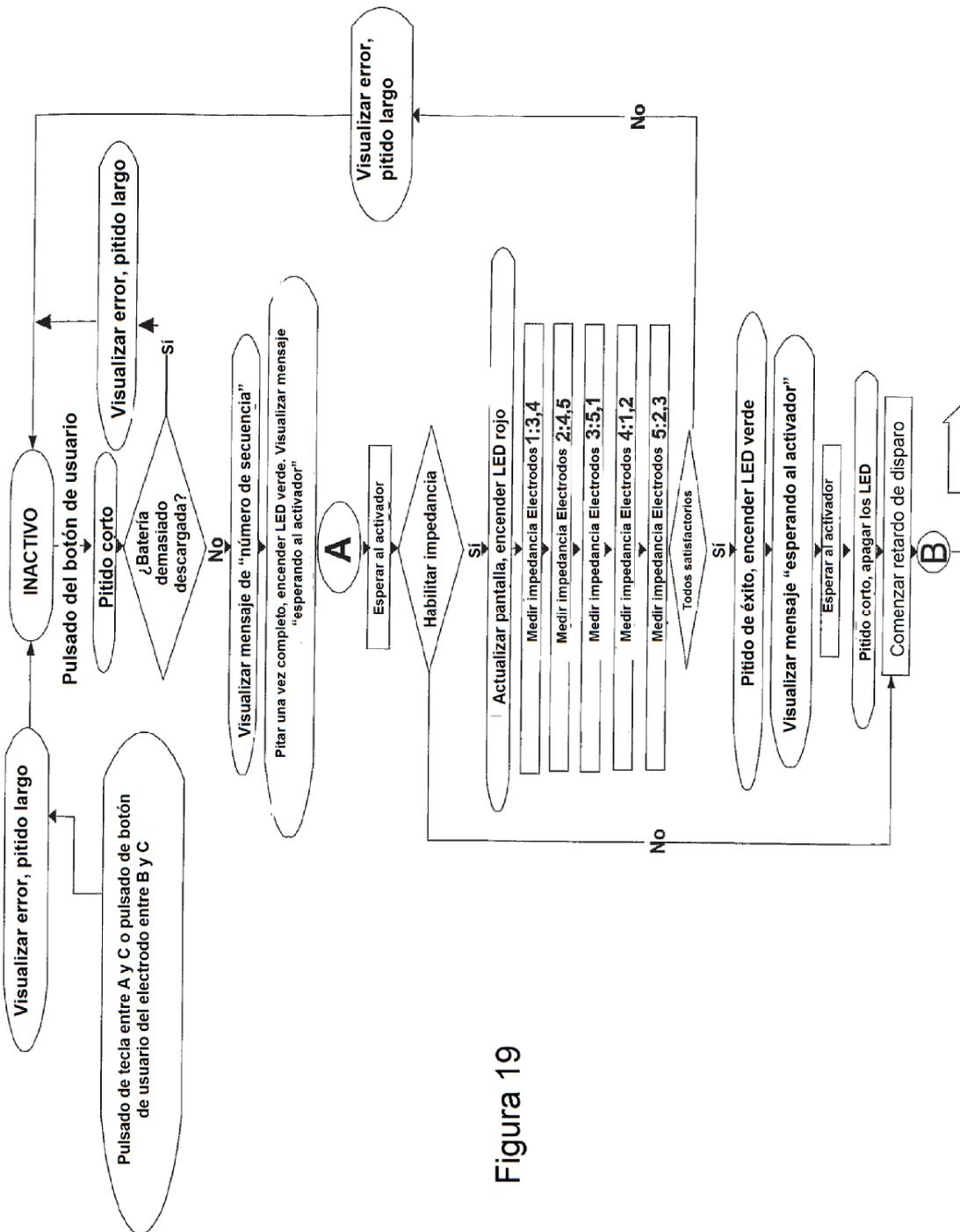


Figura 19

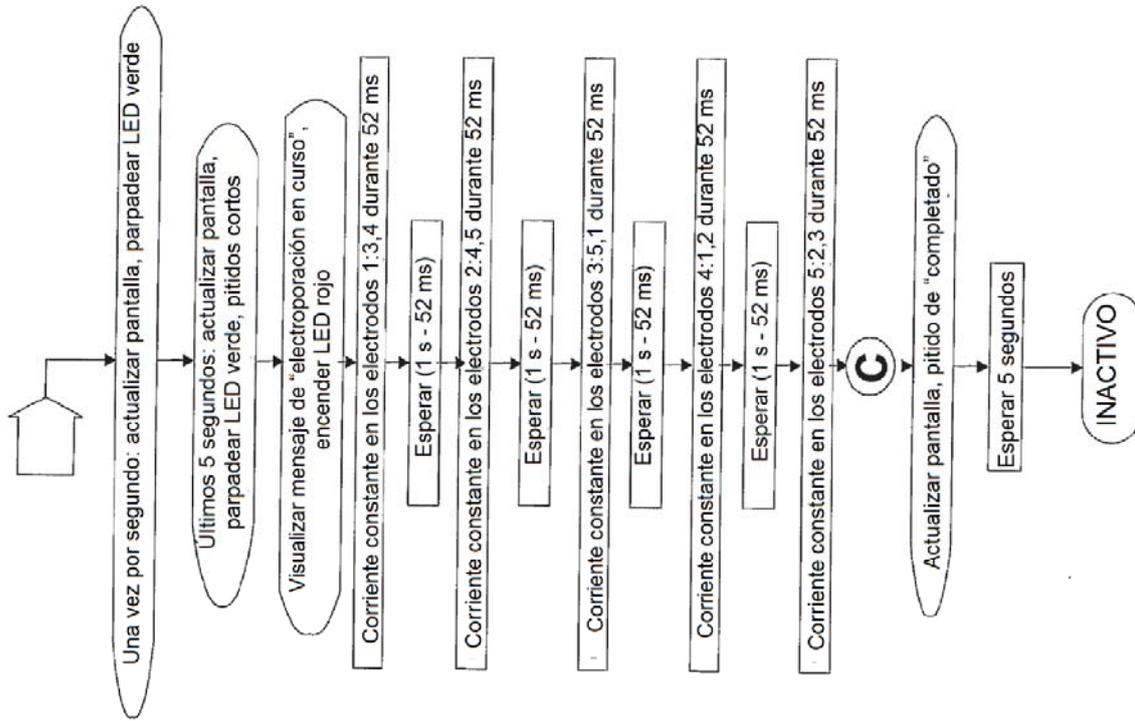


Figura 20

Figura 21

Nombre de archivo:	00001138_03_08_13_1 6_16_02.csv				
Número de animal:	1138				
Pulso en la secuencia:	1	2	3	4	5
Pre-espera(s):	80	1	1	1	1
Anchura del pulso (ms):	52	52	52	52	52
Corriente del pulso (A):	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Figura 22

Electrodo 1:	POS	OFF	NEG	NEG	OFF
Electrodo 2:	OFF	POS	OFF	NEG	NEG
Electrodo 3:	NEG	OFF	POS	OFF	NEG
Electrodo 4:	NEG	NEG	OFF	POS	OFF
Electrodo 5:	OFF	NEG	NEG	OFF	POS

Figura 23

Pulso 1		Pulso 2		Pulso 3		Pulso 4		Pulso 5	
Tensión	Corriente								
2,34	0	2,3	0	2,34	0	2,3	0	2,34	0
2,39	0	2,34	0	2,39	0	2,34	0	2,34	0
2,3	0,49	68,25	0,51	2,34	0,5	54,47	0,5	62,09	0,5
69,08	0,49	66,73	0,51	55,98	0,5	53,79	0,5	58,28	0,5
69,03	0,5	66,24	0,51	55,5	0,51	53,25	0,51	57,89	0,48
69,61	0,51	66,78	0,5	55,4	0,49	53,49	0,51	57,3	0,5
69,81	0,5	67,12	0,49	55,3	0,51	53,44	0,51	57,3	0,5
70	0,5	67,42	0,51	55,25	0,5	53,54	0,5	57,5	0,5
70,84	0,5	66,93	0,49	54,81	0,52	53,83	0,49	57,89	0,51
71,28	0,48	67,76	0,51	54,96	0,49	54,57	0,49	57,79	0,49

Figura 24

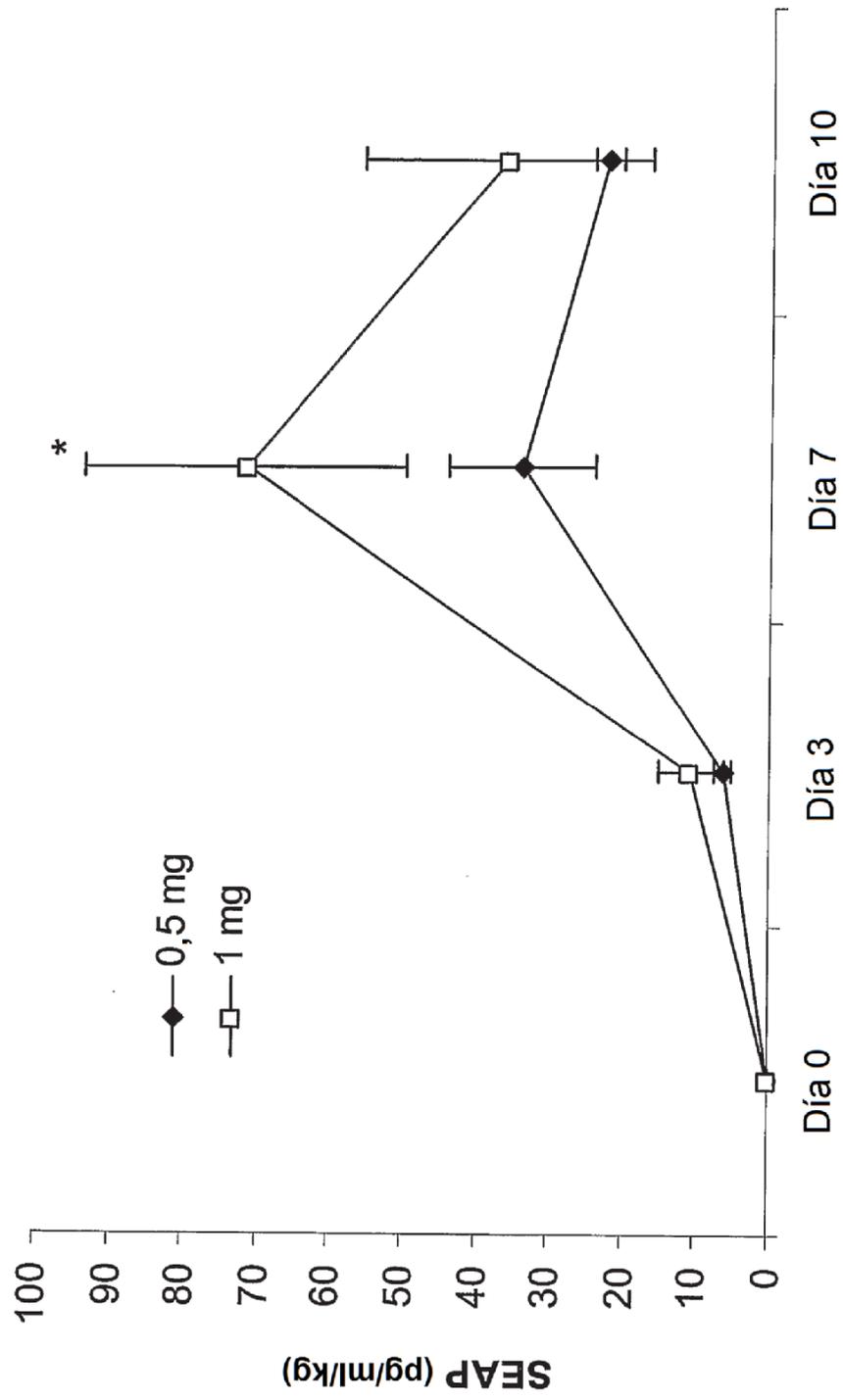


Figura 25

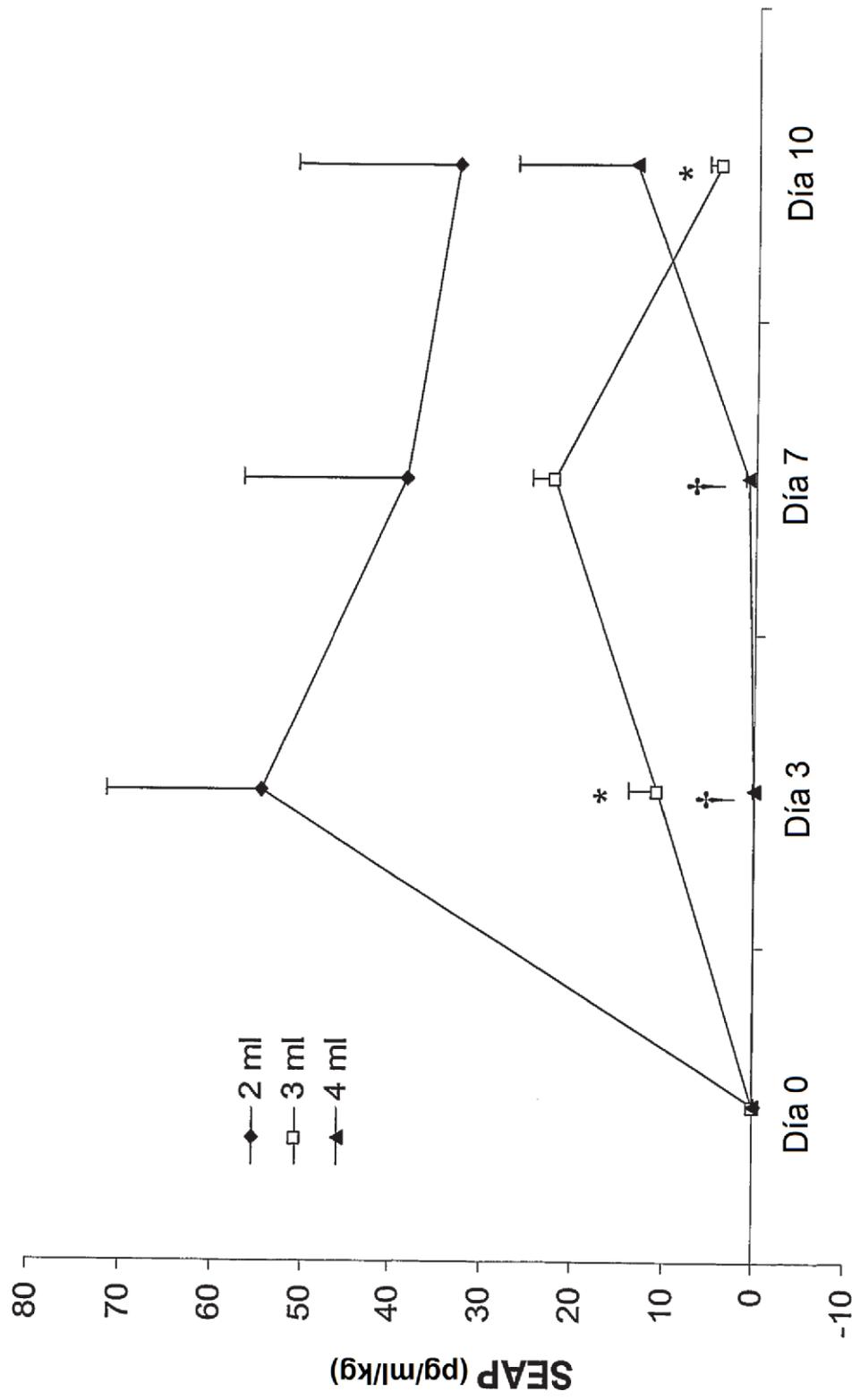


Figura 26

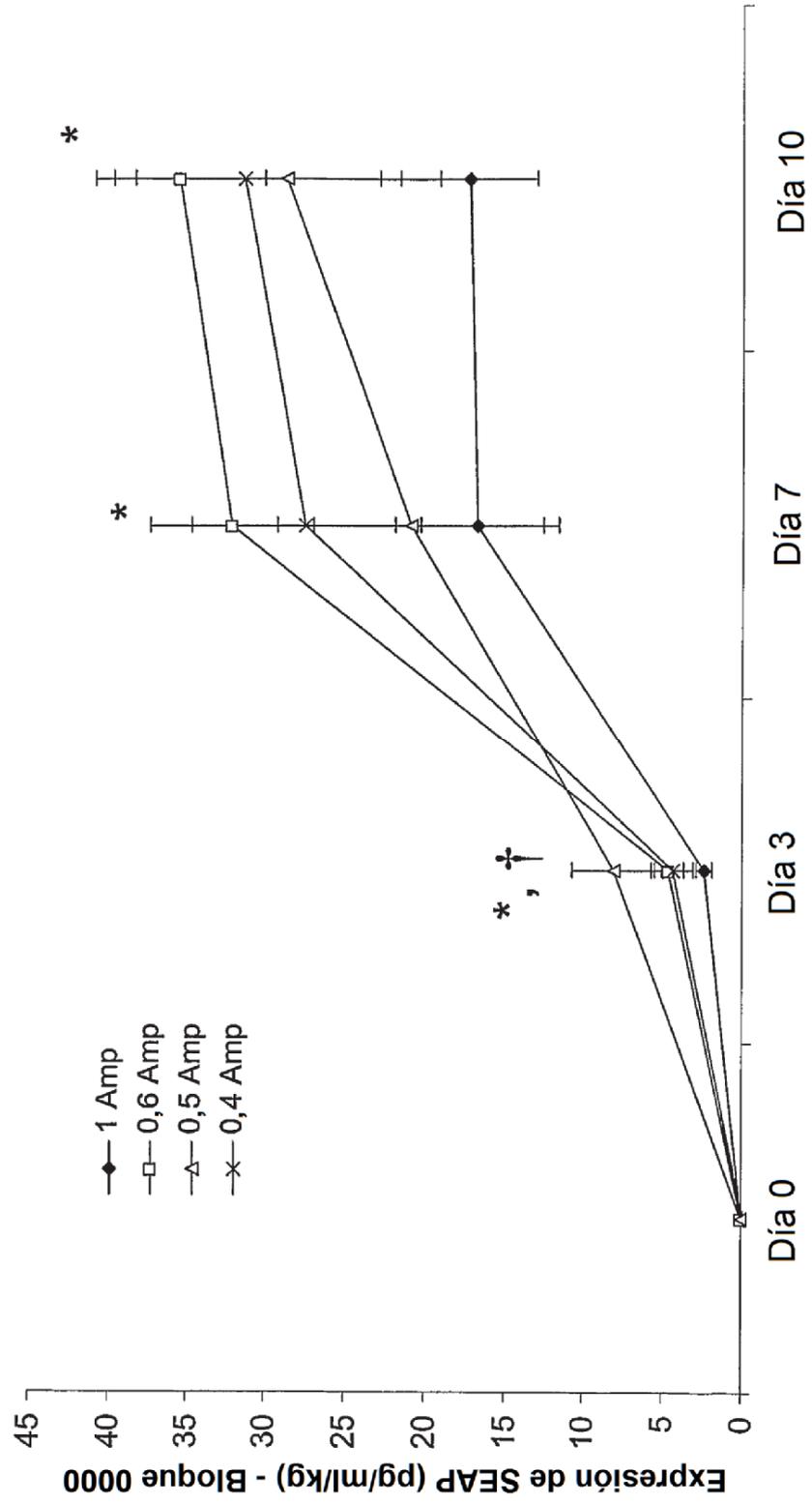


Figura 27

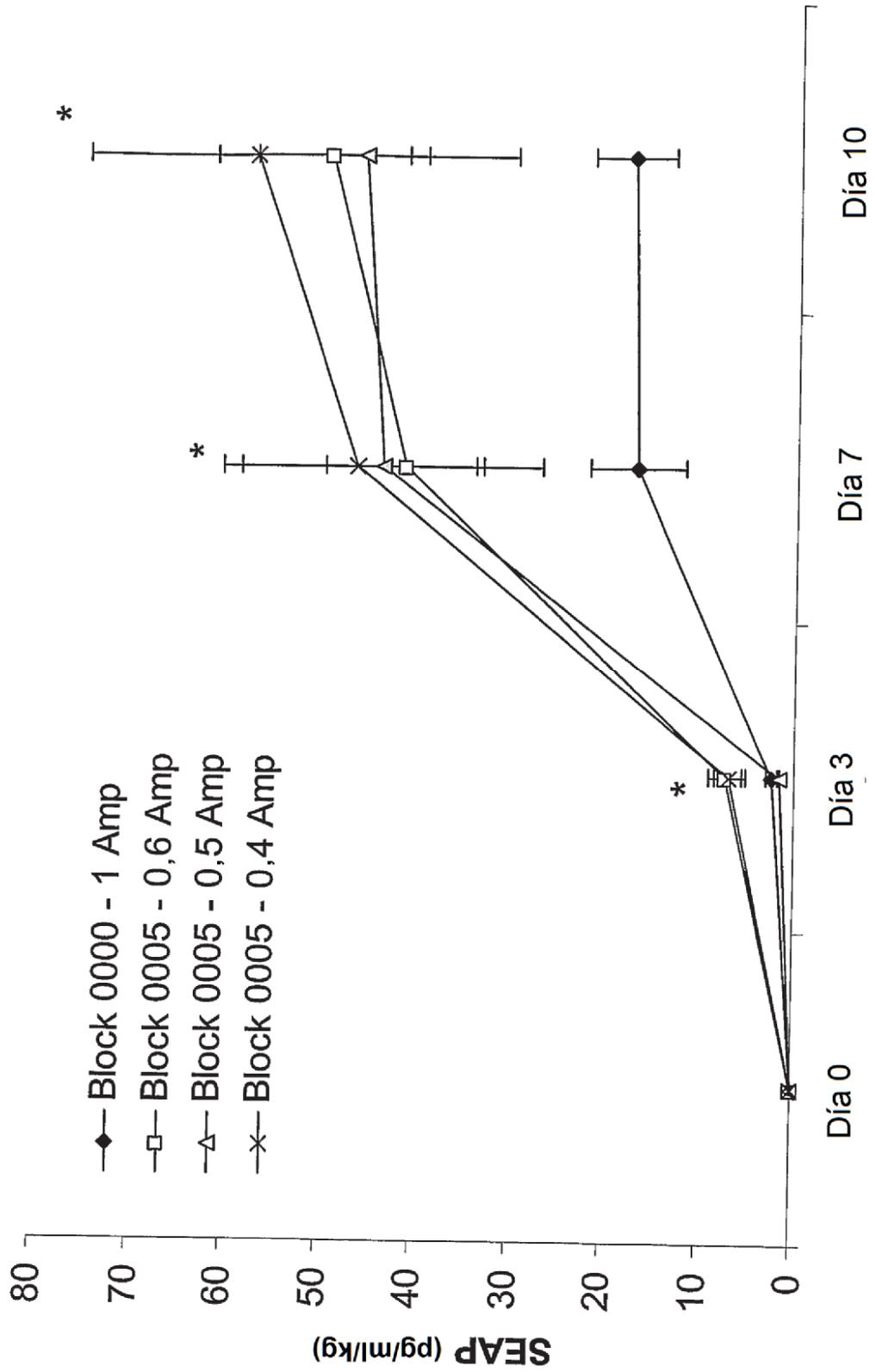


Figura 28

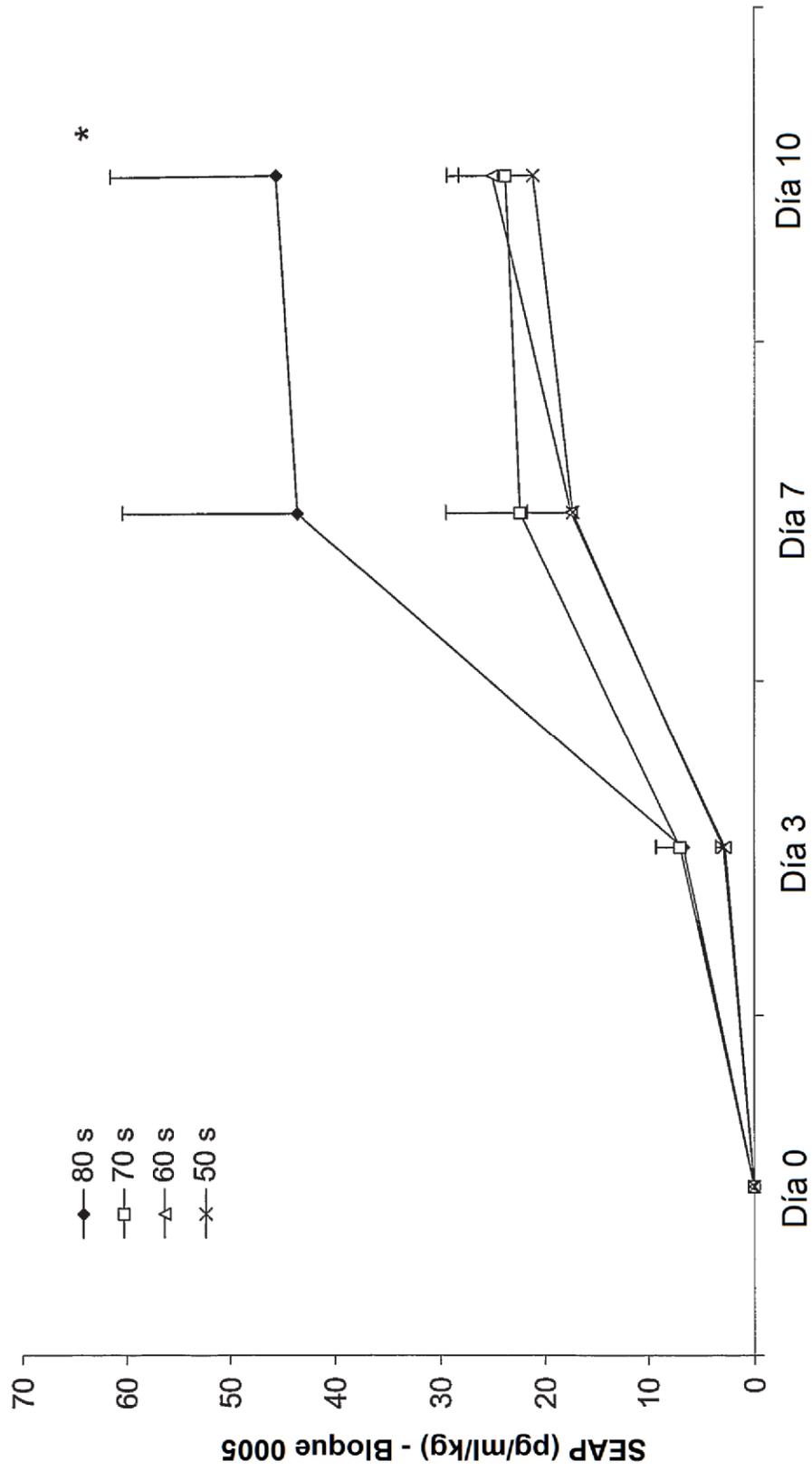


Figura 29

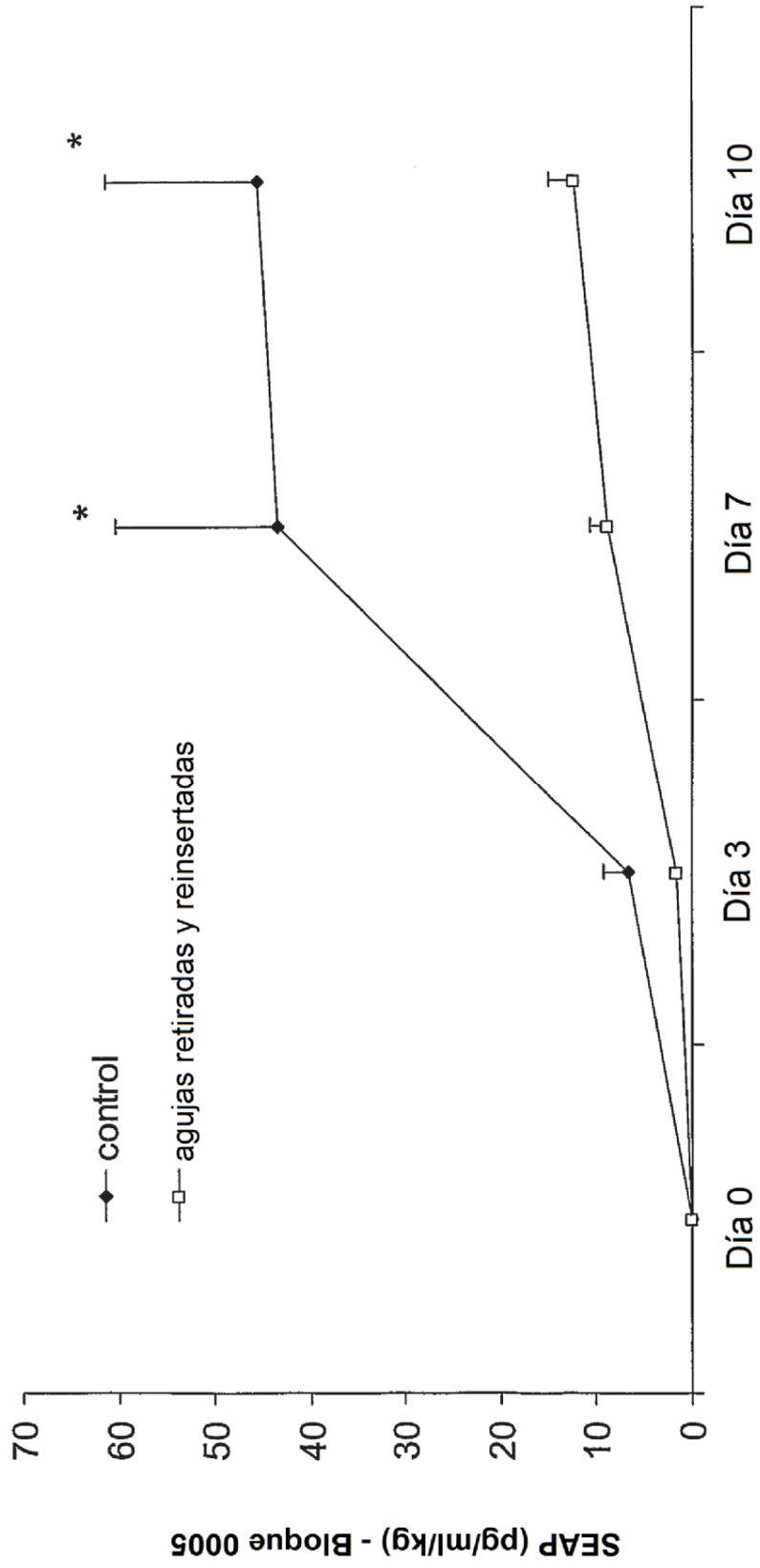


Figura 30

