

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 744**

51 Int. Cl.:

A61N 1/32 (2006.01)

A61N 1/04 (2006.01)

A61B 5/053 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2007 E 11184546 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2409727**

54 Título: **Dispositivos de electroporación para la electroporación de células en mamíferos**

30 Prioridad:

17.10.2006 US 852149 P

10.10.2007 US 978982 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BROWN, PATRICIA A.;
DRAGHIA-AKLI, RUXANDRA;
KHAN, AMIR y
POPE, MELISSA A.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 703 744 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

Dispositivos de electroporación para la electroporación de células en mamíferos

5 Campo de la invención

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

10 Antecedentes de la invención

La piel de los mamíferos o el tejido de la piel se caracteriza por capas de células, divididas en regiones específicas (ver Figura 1). La región más superficial es la epidermis (1.1), que a su vez se puede dividir en 5 subcapas: estrato córneo (1.1.1), estrato espinoso (1.1.2), estrato lúcido (1.1.3), estrato granuloso (1.1.4), y estrato basal (1.1.5). La dermis (1.2) está situada justo debajo de la epidermis, y es una región muy bien vascularizada; Las raíces del pelo y las glándulas sudoríparas se encuentran en esta capa. La capa subcutánea está situada justo debajo de la dermis.

La piel ha evolucionado para proteger, no solo actuando como una barrera física, sino también por su papel en el sistema inmunológico. Como primera línea de la defensa del huésped contra los patógenos, la piel está bien equipada para la vigilancia inmunológica. Por ejemplo, en comparación con muchos otros tejidos, la epidermis de la piel contiene una alta población de células de Langerhans, que son células dendríticas inmaduras muy potentes ("DC"). Por lo tanto, apuntar los antígenos a la epidermis de la piel debería ser capaz de inducir eficientemente fuertes respuestas inmunes. Sin embargo, la barrera que presenta la capa de estrato córneo (1.1.1) de la epidermis (1.1) (ver Figura 1) tiende a prevenir la entrada efectiva de antígenos en la epidermis. Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígenos en la piel. Una alta población de DC en la piel hace que la inmunización intradérmica ("ID") sea una ruta atractiva.

La tecnología de transferencia de plásmidos in vivo, particularmente en lo que se refiere a la transferencia de plásmidos a tejido o células intradérmicas ("ID") o subcutáneas ("SQ"), ha sido tradicionalmente limitada en su alcance porque los niveles de expresión in vivo resultantes de la transferencia de ADN desnudo (plásmido) ha sido baja, con solo fracciones de las logradas por la transferencia de genes virales. Las dosis de plásmido que pueden administrarse en un volumen adaptado para la ID o SQ son pequeñas en comparación con las dosis que se pueden usar en inyecciones intramusculares ("IM"). Numerosos investigadores han descrito las preocupaciones de seguridad y toxicológicas con la inyección de virus como vectores de ADN en animales y humanos (Frederickson, et al., Mol. Ther. 8:8-10 (2003)). En consecuencia, la inyección directa de ADN plasmídico se ha convertido en una técnica de administración deseada, sin embargo, la administración eficiente en células y los niveles de expresión de proteínas han sido un desafío. Las células musculares esqueléticas han proporcionado un objetivo principal para la transferencia directa de plásmidos para vacunas de ADN y otras aplicaciones (Prud'homme, et al., Curr. Gene Ther. 6:243-273 (2006)).

Un avance reciente para el suministro de plásmidos in vivo ha sido el de la electroporación ("EP"). El EP se utiliza para la administración de una gran variedad de moléculas: de iones a medicamentos, colorantes, marcadores, anticuerpos y oligonucleótidos, a ARN y ADN (Gehl, Acta Physiol Scand. 177:437-447 (2003)). Este proceso expone el tejido objetivo a un breve pulso de campo eléctrico que induce poros temporales y reversibles en la membrana celular. Durante el período de desestabilización de la membrana, las moléculas como los plásmidos pueden ganar acceso intracelular. Anteriormente, los informes han demostrado que las mejoras en el proceso de EP aumentan la eficacia de la transferencia y reducen la cantidad de plásmido necesaria para generar niveles específicos de antígenos in vivo mediante el uso de un dispositivo de corriente constante (Draghia-Akli y Smith, Página 245 en Gene Therapy-Therapeutic Mechanisms and Strategies, N. S. Templeton and D. D. Lasic, eds. Marcel Dekker, Inc., New York. (2003)). La mejora del suministro de plásmidos utilizando EP permite que el tejido inyectado se use como un biorreactor para la alta producción y la secreción de proteínas en el torrente sanguíneo y/o la presentación de antígenos. Los niveles de expresión aumentan hasta dos o tres órdenes de magnitud sobre la inyección de plásmido solo, hasta niveles comparables a los de la administración de genes mediada por adenovirus y, en algunos casos, pueden alcanzar rangos fisiológicos.

La electroporación se ha convertido en una herramienta útil para la investigación básica, con aplicación en el área de transferencia de genes y vacunación con ADN. La electroporación se ha utilizado con éxito para transfectar células tumorales después de la inyección de plásmido o para administrar el medicamento antitumoral bleomicina a tumores cutáneos y subcutáneos en seres humanos. La electroporación se ha utilizado 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 han sido focalizados incluyen el hígado, los ojos, los testículos, el músculo cardíaco, el músculo liso, los tumores en diferentes ubicaciones y el músculo esquelético.

Uno de los desafíos del EP cutáneo en mamíferos grandes y humanos es la variación individual del grosor de la piel, así como la variación del grosor de la piel entre diferentes regiones anatómicas. Por ejemplo, el grosor de la piel en el nivel deltoideo en humanos es de aproximadamente 2 milímetros ("mm"), mientras que en el nivel supraescapular es de aproximadamente 2.6 mm, en la cintura es de aproximadamente 1.7-1.9 mm y en el muslo es de aproximadamente

1.6 -1.7 mm. La piel es sensible, por lo que los electrodos también deben adaptarse en el calibre y la configuración para crear la menor incomodidad. Mientras que, con fines terapéuticos, un cierto grado de malestar a veces es aceptable para los pacientes durante la terapia, se ha sugerido que solo se puede usar un método relativamente indoloro para la vacunación profiláctica. La configuración y las características de la matriz de electrodos, y los patrones de pulso del dispositivo, deben adaptarse a este desafío. Se sabe que el campo eléctrico máximo uniforme se genera durante la electroporación desde aproximadamente 2 mm más allá de la punta de un electrodo hasta un punto de un tercio del electrodo desde su punta.

La Patente de Estados Unidos No. 7,245,963 de Draghia-Akli, et al. describe los sistemas de electrodos modulares y su uso para facilitar la introducción de una biomolécula en las células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Los sistemas de electrodos modulares comprenden una pluralidad de electrodos de aguja; una aguja hipodérmica; un conector eléctrico que proporciona un enlace conductor desde un controlador de pulso de corriente constante programable a la pluralidad de electrodos de aguja; y una fuente de poder. Un operador puede agarrar la pluralidad de electrodos de aguja que están montados en una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Las biomoléculas se administran a través de la aguja hipodérmica en el tejido seleccionado. El controlador de pulso de corriente constante programable se activa y el pulso eléctrico de corriente constante se aplica a la pluralidad de electrodos de aguja. El pulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la biomolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos.

La Patente de EE. UU. 2005/0052630 presentada por Smith, et al. describe un dispositivo de electroporación que se puede utilizar para facilitar de manera efectiva la introducción de una biomolécula en las células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electro-cinético ("dispositivo EKD") cuyo funcionamiento está especificado por software o firmware. El dispositivo EKD produce una serie de patrones de pulso de corriente constante programables entre electrodos en una matriz basada en el control del usuario y la entrada de los parámetros de pulso, y permite el almacenamiento y la adquisición de datos de forma de onda de corriente. El dispositivo de electroporación también comprende un disco de electrodo reemplazable que tiene una matriz de electrodos de aguja, un canal de inyección central para una aguja de inyección y un disco de guía extraíble.

Las matrices de electrodos y los métodos descritos en la patente de EE. UU. No. 7,245,963 y en la publicación de patente de EE. UU. 2005/0052630 están adaptados para una penetración profunda no solo en tejidos como el músculo, sino también en otros tejidos u órganos. Debido a la configuración de la matriz de electrodos, la aguja de inyección (para administrar la biomolécula de elección) también se inserta completamente en el órgano objetivo, y la inyección se administra perpendicular a la cuestión objetivo, en el área que está delineada previamente por los electrodos. Los electrodos descritos en la patente de EE. UU. No. 7,245,963 y en la patente de EE. UU. 2005/005263 son preferentemente 20 mm de largo y calibre 21.

El documento WO 2005/025669 A2 divulga un dispositivo de electroporación que se usa para facilitar de manera efectiva la introducción de una macromolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta.

El documento WO 01/07583 A1 divulga un análisis de células/tejidos mediante una electroporación controlada.

En general, la electroporación es el uso de un pulso de campo eléctrico transmembrana para inducir vías microscópicas (poros) en una biomembrana. Estos poros son comúnmente llamados "electroporos". Su presencia permite que las biomoléculas, los iones y el agua pasen de un lado a otro de la membrana. Por lo tanto, la electroporación se ha utilizado para introducir medicamentos, ADN u otras moléculas en tejidos multicelulares, y puede resultar eficaz para el tratamiento de ciertas enfermedades. Sin embargo, el uso de EP en organismos vivos tiene varios problemas, incluida la muerte celular que resulta del calor generado y la incapacidad de los electroporos para resellar. Los efectos beneficiosos del fármaco o la biomolécula son extremadamente limitados en los métodos de EP en los que se produce un calentamiento celular excesivo y la muerte celular.

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

$$E = V/d$$

La intensidad de campo eléctrico E ha sido un valor muy importante al formular protocolos de electroporación para el suministro de un fármaco o biomolécula a la célula del sujeto. La intensidad del campo es inversamente proporcional a la distancia entre los electrodos en que, dado un voltaje, 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 no se quiere estar limitado por la teoría, se cree que el flujo de iones abre los electroporos y permite el movimiento de moléculas en 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 los electrodos se logra 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 los electrodos desde el comienzo del pulso eléctrico hasta el final del pulso eléctrico.

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

$$R = V/I$$

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

15 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, el voltaje y la duración del pulso. El calentamiento también se puede expresar como el cuadrado de la corriente y la duración del pulso ("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:

$$W = I^2Rt$$

20 En general, se colocan electrodos metálicos o dieléctricos en contacto con los tejidos y se imponen pulsos cortos de voltajes predeterminados sobre los electrodos que inician las células para abrir transitoriamente los poros de la membrana. Los protocolos descritos actualmente para la electroporación se definen en términos de las intensidades de campo E resultantes, que dependen de pulsos cortos de voltaje proporcionales a la distancia entre los electrodos, e independientemente de la corriente o la resistencia del tejido. Por consiguiente, la resistencia o el calentamiento no se pueden determinar para el tejido electroporado, lo que conduce a un éxito variado con diferentes protocolos de electroporación de voltaje pulsado. Ciertamente, la diferencia en las amplitudes del límite superior de un pulso de voltaje entre los protocolos de electroporación que facilitan la electroporación efectiva y los protocolos de electroporación que causan la muerte de las células es muy pequeña. Además, se ha observado una correlación definitiva entre la muerte de las células y el calentamiento de las células causado por las amplitudes del límite superior de los pulsos de voltaje corto. Por lo tanto, el sobrecalentamiento de las células entre los electrodos sirve como causa principal de la ineficacia de cualquier protocolo de pulsos de voltaje de electroporación dado. Además, la corriente entre los electrodos sirve como un determinante principal de la efectividad de cualquier protocolo de pulsos dado, no del voltaje a través de los electrodos.

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

$$Q = it$$

40 Si la corriente no es constante, Q representa la integral de tiempo 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 coulomb), solo la carga, como se definió anteriormente, es importante. Debe existir un cierto voltaje mínimo para generar una corriente, pero la cantidad de iones depositados no se puede determinar a partir de un voltaje predeterminado. En consecuencia, la cantidad de partículas cargadas entregadas a las células en un electroporador no puede derivarse del voltaje impuesto sobre los electrodos.

50 La efectividad de la electroporación está limitada por el hecho de que hay 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 pulsos efectivos sin una experimentación excesiva. Esto dificulta el uso de la técnica, principalmente cuando se trata de tejidos que tienen inherentemente una composición celular no homogénea, como células de la piel en epidermis y dermis de diferente grosor y número de estratos, grasa, fascia, vasos sanguíneos de diferentes dimensiones desde capilares a pequeños vasos; solo un verdadero dispositivo impulsado por software capaz de analizar instantáneamente la variable de las condiciones instantáneas de individuo a individuo y entre ubicaciones en la superficie de la piel de cada individuo y adaptar la salida a las condiciones específicas cumpliría estos requisitos. Además, el electrodo debe adaptarse a la morfología de la piel y evitar daños en los tejidos y sangrado.

60 Las referencias dirigidas hacia un aparato de electroporación ilustran la utilidad tanto de un aparato de electrodo como de un método de electroporación in vivo. En consecuencia, hay muchas patentes de EE. UU. Que reivindican electrodos específicos o métodos para la electroporación. Por ejemplo, la patente de EE. UU. 6,302,874 de Zhang, et al. describe un método y un aparato para el suministro tópico asistido eléctricamente de agentes para aplicaciones cosméticas. La Patente de Estados Unidos 5,676,646 de Hofmann, et al. enseña un flujo a través de un aparato de electroporación para implantar moléculas en células sanguíneas vivas de un paciente. Las patentes de EE. UU. 6,241,701 de Hofmann, et al. y 6,233,482 de Hofmann, et al., describen un método y un aparato para la administración mediada por electroporación de fármacos y genes. Más específicamente, describen un método y un aparato para la

terapia de electroporación ("EPT") para tratar tumores con una combinación de electroporación y un agente quimioterapéutico para producir la regresión de tumores in vivo. La patente estadounidense 6,216,034 de Hofmann, et al., describe un método de programación de una matriz de electrodos de aguja para la terapia de electroporación de tejido. La Patente de Estados Unidos 6,208,893 de Hofmann, et al., describe un aparato de electroporación con una plantilla de electrodo conectivo. La Patente de Estados Unidos 6,192,270 de Hofmann, et al., describe un conjunto de electrodo para un aparato y un método de entrega molecular transsuperficial. La Patente de Estados Unidos 6,181,964 de Hofmann, et al., describe un aparato y un método mínimamente invasivos para electroporar medicamentos y genes en tejidos. La Patente de Estados Unidos 6,150,148 de Nanda, et al., describe un aparato de electroporación para controlar la temperatura durante el proceso, generando y aplicando un campo eléctrico de acuerdo con un esquema de perfil de temperatura y pulsos especificados por el usuario. La Patente de Estados Unidos 6,120,493 de Hofmann, et al., describe un método para la introducción de agentes terapéuticos que utilizan un aparato de electroporación de campo eléctrico. La Patente de Estados Unidos 6,096,020 de Hofmann, et al., describe un método y aparato de electroporación para generar y aplicar un campo eléctrico de acuerdo con un esquema de pulsos especificado por el usuario. La Patente de Estados Unidos 6,068,650 de Hofmann, et al., describe un método para aplicar selectivamente configuraciones de matriz de agujas para terapia de electroporación in vivo, y la Patente de Estados Unidos 5,702,359 de Hofmann, et al., describe un aparato de electrodo para la aplicación de electroporación a una porción del cuerpo de un paciente con un elemento sensor para detectar una distancia entre los electrodos y generar una señal de distancia proporcional a la distancia entre dichos electrodos, y medios que responden a dicha señal de distancia para aplicar pulsos de señal eléctrica de alta amplitud a los electrodos proporcionalmente a la distancia entre dichos electrodos. La Publicación de Patente de Estados Unidos 2005/0070841 por Mathiesen, et al., divulga un dispositivo de electroporación y un aparato de inyección. Los dispositivos utilizados en combinación con los nuevos electrodos de piel presentados aquí, y utilizados en los experimentos descritos en este documento se reivindican en la publicación de patente de EE. UU. 2004/0167458 y en la publicación de patente de EE. UU. 2005/0052630.

El progreso en el mejoramiento de la expresión del plásmido in vivo y el logro de los niveles fisiológicos de una proteína secretada se ha informado recientemente mediante el uso de la electroporación (Draghia-Akli, et al., *Technology in Cancer Research & Treatment* 1: 365-371 (2002)). Los estudios muestran que la inyección de un plásmido que expresa la hormona liberadora de la hormona del crecimiento ("GHRH"), seguida de la electroporación, es escalable y representa un enfoque para producir de forma estable proteínas secretadas para el tratamiento de grandes mamíferos (Draghia-Akli, et al., *Journal of Animal Science* 81: 2301-2310 (2003); Draghia-Akli, et al., *FASEB J* 17: 526-528 (2003)). Aún así, se necesitan mejoras adicionales en las técnicas de electroporación, en particular para una electroporación eficiente de la piel con fines de vacunación y terapia génica, y la electroporación con dolor e invasividad reducidos.

Investigadores anteriores han utilizado dispositivos de electroporación para la transferencia de ADN plasmídico que se basan conceptualmente en sistemas de voltaje constante, utilizando un voltaje predeterminado entre los electrodos. Debido a que la impedancia entre los electrodos incrustados en un tejido puede variar de un caso a otro, o de un tejido a otro, un voltaje predeterminado no produce una corriente predeterminada. Un pulso de voltaje predeterminado 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 en realidad mantiene una corriente de función de onda cuadrada constante a través del tejido muscular. Sin embargo, los dispositivos de electroporación comerciales existentes no tienen el firmware diseñado para permitir la medición de la cantidad exacta de corriente a la que están expuestas las células. La corriente no regulada generada con los dispositivos convencionales de electroporación puede generar cantidades de calor en los tejidos que pueden matar fácilmente las células. 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 ohms (" Ω ") puede, en teoría, elevar la temperatura en el tejido 7.5 °C, que es suficiente para matar las células. La física de la lesión tisular causada por una descarga eléctrica es revisada por Lee, et al., (Lee, et al., *Annu. Rdo. Biomed. Eng* 2: 477-509.: 477-509 (2000)). Por lo tanto, existe la necesidad de evitar los problemas tecnológicos asociados con la electroporación de voltaje constante al proporcionar un medio para controlar efectivamente la cantidad de electricidad suministrada a las células y, de ese modo, lograr una electroporación competente al tiempo que se limita la destrucción de las células.

Las dificultades presentes en muchos electrodos se deben al 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 de la entrega de energía asume un carácter muy no uniforme. Por lo tanto, solo una fracción de las celdas en el volumen abarcado por el conjunto del electrodo es electroporado. Por lo tanto, también existe la necesidad de que algunas aplicaciones proporcionen un medio para controlar de manera efectiva la dosis de electricidad suministrada a las células en el espacio interelectrodo al controlar con precisión el flujo iónico que incide en los conductos de las membranas celulares. Además, los electrodos existentes en el mercado para aplicaciones de animales grandes y humanos generalmente no permiten la focalización ID o SQ para células dendríticas, ya que suelen ser demasiado largas, de un calibre inadecuado y una orientación de bisel inadecuada. Por lo tanto, existe la necesidad de ciertas aplicaciones para un electroporador de la piel, que facilite el suministro in vivo de una biomolécula, como un plásmido, en el tejido de la piel, por ejemplo, espacios ID o SQ en un animal.

Además, los dispositivos de electroporación y las matrices de agujas disponibles en el mercado no permiten el control de la variación inter e intraindividual de la resistencia del tejido, el grosor y las condiciones locales. Con estos instrumentos, se suministra un voltaje predeterminado a través de los electrodos independientemente de la resistencia o el espesor del tejido individual. Por lo tanto, también existe la necesidad de un dispositivo de electroporación y electrodos de piel que permitan una electroporación adaptada que tenga en cuenta la variación individual antes y durante los pulsos.

Además, los dispositivos de electroporación que utilizan conjuntos de agujas reemplazables invasivas para la piel y los músculos como electrodos para suministrar la corriente eléctrica requieren el mantenimiento de condiciones estériles cuando se produce el reemplazo de la matriz de agujas. Esto es necesario tanto desde el punto de vista de la práctica médica como del cumplimiento normativo. Al mismo tiempo, se necesita un electrodo de piel desechable para permitir menores costos de producción y uso en la vacunación masiva de propósitos terapéuticos y profilácticos. Por lo tanto, también existe la necesidad de proporcionar un disco de electrodo de piel que permita una fácil sustitución de la matriz de piel de la aguja.

Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los aspectos, realizaciones y ejemplos divulgados de la presente divulgación que no están incluidos en el alcance de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención y se suministran simplemente con propósitos ilustrativos.

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan dispositivos de electroporación que efectúan la electroporación en el tejido de un mamífero suministrando una corriente constante al tejido, siendo el tejido preferiblemente tejido de la piel. En algunas realizaciones, los dispositivos de electroporación están configurados para suministrar a un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía que produce una corriente constante similar a una entrada de corriente predeterminada por parte de un usuario. El dispositivo de electroporación comprende un componente de electroporación y un conjunto de electrodo de piel. El componente de electroporación es capaz de suministrar el pulso de energía que produce la corriente constante en el tejido deseado, e incluye un mecanismo de retroalimentación. El conjunto de electrodos de piel incluye una matriz de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos de piel en una disposición espacial, en la que el conjunto de electrodos de piel recibe el pulso de energía del componente de electroporación y entrega el mismo al tejido deseado a través de los electrodos de piel. Al menos uno de la pluralidad de electrodos de la piel es neutro durante el suministro del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al componente de electroporación. El mecanismo de retroalimentación puede recibir la impedancia medida y puede ajustar el pulso de energía suministrado por el componente de electroporación para mantener la corriente constante.

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan conjuntos de asas de electroporación configurados para suministrar un pulso de energía a un tejido deseado de un mamífero para producir una corriente constante en el tejido deseado similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. El conjunto de asa que comprende una matriz de electrodos de piel que tiene una pluralidad de electrodos de piel en una disposición espacial, en la que al menos uno de los electrodos de piel es neutro durante el suministro del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado; un controlador en comunicación con la matriz de electrodos de la piel, el controlador controla el suministro del pulso de energía a través de los electrodos de la piel; y un medio para realizar un mecanismo de retroalimentación, en el que el mecanismo de retroalimentación se realiza mediante software o hardware, que recibe la impedancia medida desde el electrodo neutro de la piel y ajusta el pulso de energía suministrada, si es necesario, para mantener la corriente constante.

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para usar los dispositivos de electroporación de la presente invención para administrar biomoléculas a células de un tejido de un mamífero. En algunas realizaciones, los métodos comprenden usar los dispositivos de electroporación de la piel descritos en el presente documento para suministrar el pulso de energía al tejido de la piel deseado para producir la corriente constante similar a una entrada de corriente predeterminada por parte de un usuario. Los métodos incluyen: insertar una pluralidad de electrodos de piel de aguja en el tejido de la piel sin penetrar sustancialmente en el tejido muscular; y aplicar el pulso de energía a la pluralidad de electrodos de piel de aguja para suministrar una corriente igual a la corriente preestablecida en el tejido de la piel; y medir la impedancia del tejido de la piel con uno neutral de la pluralidad de electrodos de piel de aguja y usar un mecanismo de retroalimentación en el dispositivo de electroporación para ajustar el pulso de energía aplicado en respuesta a la impedancia medida para mantener constante la corriente suministrada al tejido de la piel.

En algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan métodos que comprenden las etapas de: proporcionar un conjunto de electrodo de piel que tiene una pluralidad de electrodos de piel de aguja, el conjunto de electrodo de piel en comunicación eléctrica con un generador de forma de onda de corriente; poner en contacto el tejido de la piel de un mamífero con la pluralidad de electrodos de piel de aguja sin penetrar sustancialmente en el tejido muscular del mamífero; y aplicar un pulso eléctrico de energía desde el generador de forma de onda de corriente a la pluralidad de electrodos de piel de aguja durante un tiempo y en condiciones efectivas para exponer el tejido de la piel contactado a una corriente sustancialmente constante.

Breve descripción de los dibujos

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

5 La figura 1 muestra un diagrama de la estructura de la piel. La región más superficial es la epidermis (1.1), que a su vez se puede dividir en 5 subcapas: estrato córneo (1.1.1), estrato espinoso (1.1.2), estrato lúcido (1.1.3), estrato granuloso (1.1.4), y estrato basal (1.1.5). La dermis (1.2) está situada justo debajo de la epidermis, y es una región muy bien vascularizada; También las raíces del pelo y las glándulas sudoríparas se encuentran en esta capa. La capa subcutánea está situada justo debajo de la dermis;

La Figura 2A muestra un diagrama de sistema de una realización preferida de los dispositivos EP descritos en este documento.

15 La Figura 2B muestra un ejemplo de un controlador que puede ser parte de los dispositivos EP descritos aquí.

La Figura 2C muestra un ejemplo de una grabación de secuencia de pulsos real descargada al final de la secuencia de pulsos, utilizando el dispositivo EP de piel como generador de pulsos, y la matriz de electrodos de piel descrita para administrar los pulsos eléctricos después de la inyección de la formulación del plásmido en las capas ID y SQ de la piel en un cerdo de 25 kg: ("2.1") muestra el nombre del archivo que se ha descargado a través de un puerto de infrarrojos en una computadora personal o dispositivo de mano; ("2.2") muestra el número del sujeto, tal como se ingresó directamente en el dispositivo EP de piel a través del teclado numérico, como condición previa para que pueda comenzar el proceso del EP; ("2.3") muestra las características de los pulsos eléctricos seleccionados por el operador, incluido el número de pulsos en la secuencia de pulsos, el tiempo de espera antes y entre los pulsos (en segundos, "s"), el ancho del pulso (en milisegundos, "ms"), la amplitud de la corriente del pulso (en amperios, "A"); ("2.4") muestra la carga eléctrica de cada electrodo durante cada pulso: para cada uno de los electrodos 1, 2, 3 de la piel es posible cualquiera de las siguientes posiciones: positivo, "pos"; negativo, "neg"; o apagado "apagado": el(los) electrodo(s) apagado(s) está(n) importando información al dispositivo antes, durante y después de cada pulso ("retroalimentación"); ("2.5") muestra el amperaje real ("A"), el voltaje ("V") y la resistencia del tejido de la piel, Z, en el área de inyección ("Ohmios") durante cada pulso de la secuencia del pulso; a medida que surge la retroalimentación cada 0.1-0.2 ms (y en este caso los pulsos tenían una longitud de 52 ms), solo se ha incluido una pequeña proporción del archivo de retroalimentación, para propósitos de ejemplo;

La Figura 3 muestra un ejemplo de la visualización gráfica de los datos descargados cuando se utiliza un electrodo de revestimiento de piel mediante la entrega de pulsos eléctricos por el dispositivo del dispositivo EP de revestimiento. El gráfico muestra tanto el voltaje ("3.1.1") como la corriente ("3.1.2") medida por el dispositivo EP de la piel en el pulso 1 ("3.1"), así como el voltaje ("3.2.1") y la corriente ("3.2.2") según lo medido por el dispositivo EP de piel en el pulso 2 ("3.2"). La resistencia del tejido (medida durante los pulsos eléctricos) también se muestra para el pulso 1 ("3.3") y el pulso 2 ("3.4");

La Figura 4 muestra un ejemplo de la visualización gráfica de los datos descargados cuando se utiliza una gran cantidad de electrodos para la entrega de pulsos eléctricos por el dispositivo del dispositivo EP de la piel a la piel. El gráfico muestra tanto el voltaje ("4.1.1") como la corriente ("4.1.2") medida por el dispositivo EP de la piel en el pulso 1 ("4.1"), el voltaje ("4.2.1") y la corriente ("4.2.2") según lo medido por el dispositivo EP de piel en Pulso 2 ("4.2"), y el voltaje ("4.3.1") y la corriente ("4.3.2") según lo medido por el dispositivo EP de piel en Pulso 3 ("4.3"). La resistencia del tejido (medida durante los pulsos eléctricos) también se muestra para el Pulso 1 ("4.4"), el Pulso 2 ("4.5") y el Pulso 3 ("4.6");

La Figura 5 muestra una representación esquemática de una matriz de electrodos de piel, que incluye características detalladas: ("5.1") vista lateral que representa la longitud y el ángulo del extremo de inserción de un solo electrodo de aguja; ("5.2") vista frontal que representa ángulos y grados para el punto revere-trocar; ("5.3") notas indicando especificaciones del electrodo de aguja;

La Figura 6 muestra una representación visual ("6.1") y esquemas ("6.2") del asa del electrodo de piel: ("6.1.1") gatillo utilizado para activar la verificación de impedancia y luego la secuencia de electroporación; ("6.1.2") "LED" se muestra verde o rojo cuando el dispositivo EP de piel está listo para tratar o durante un error, respectivamente; ("6.1.3") matriz de electrodos de revestimiento encajados en su lugar; ("6.1.4") cable que contiene cables individuales y señales entre el asa de electroporación de la piel y la unidad del dispositivo EP de la piel; ("6.1.5") cables individuales cuyo detalle se representa en el diagrama de cableado eléctrico en la Figura 8; ("6.2.1") esquema de gatillo; ("6.2.2") esquema LED; ("6.2.3") esquema que describe la cresta levantada en la matriz de electrodos de piel utilizada para facilitar la expulsión del asa del electrodo de piel después de completar la secuencia de pulsos de electroporación; ("6.2.4") esquema de los electrodos de aguja de la matriz de electrodos de piel; ("6.2.5") esquema de la vista lateral de la matriz de electrodos de revestimiento fijada en su lugar en el asa ("6.2.6") esquema del brazo de bloqueo y del retén (en el asa); ("6.2.7") esquema que muestra las tomas dentro del asa del electrodo de la piel que se usa para recibir y hacer contacto para la conexión del circuito; ("6.2.8") un esquema que representa cables que albergan cables individuales cuyo detalle se muestra en la Figura 8;

La Figura 7 muestra la matriz de electrodos de piel montada en el asa: ("7.1") esquema de vista lateral de tomas individuales para recibir y realizar la conexión eléctrica entre los electrodos de aguja individuales en la matriz de electrodos de piel y el asa del electrodo de piel;

5 La figura 8 muestra el diagrama de cableado eléctrico para el conjunto de matriz y asa;

La Figura 9 muestra la representación esquemática del contenedor de embalaje de empaque plegable de la matriz de electrodos de multipiel que permite la carga estéril del asa entre los sujetos de tratamiento: ("9.1") tapa; ("9.2") base, incluidos los pocillos individuales diseñados a medida para albergar matrices; ("9.3") vista lateral de los pocillos; y

10 La Figura 10 muestra los niveles de expresión promedio de GFP en animales que se inyectaron con diferentes cantidades de plásmido pSP5-12-GFP y se sometieron a electroporación con el dispositivo de EP de piel utilizando la matriz de electrodos de piel y las condiciones de EP específicas de piel (MA), en comparación con los electrodos y condiciones generalmente empleadas para la administración de plásmidos al músculo esquelético (LA).

15 La Figura 11 muestra una matriz de agujas de tres electrodos donde la distancia $L = kxn$, donde n representa el número de electrodos y k representa una constante de proporcionalidad.

20 La Figura 12 muestra un gráfico de los niveles de expresión de la SEAP (pg/mL/kg) durante 11 días desde el momento de la electroporación utilizando los plásmidos que expresan la respectiva SEAP.

La Figura 13 muestra una gráfica de los niveles de expresión de SEAP en el día 11 para varias muestras junto con los resultados de ELISA relacionados (en una dilución promedio de anticuerpos).

25 La Figura 14 muestra un gráfico de los niveles de expresión de IGF-I (mg/mL) durante 11 días desde el momento de la electroporación utilizando los plásmidos que expresan IGF-I respectivos.

30 La Figura 15 representa imágenes fluorescentes que representan la expresión de la proteína fluorescente verde después de la administración del plásmido ID/SQ seguida de electroporación (EP) en piel de cerdo. Los plásmidos se administraron a diferentes dosis y volúmenes con la matriz de EP más grande utilizada habitualmente para IM + EP (A), o el EP de piel (B).

35 La Figura 16 representa un gráfico que muestra los niveles de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) detectada en suero de cerdo a los 4-11 días después de la administración de pSEAP. Los animales recibieron la misma dosis de plásmido (1 mg), ya sea en una formulación concentrada (a 10 mg/ml) o en una formulación regular (a 2 mg/ml) ($n = 5$ /grupo). Los datos se muestran como respuestas medias grupales \pm SEM.

40 La Figura 17 ilustra el diseño del estudio de primates no humanos: la Fig. 17A muestra que los macacos Rhesus se inmunizaron dos veces con una dosis baja (0.2 mg por antígeno) de inmunógenos de VIH-1 y rhesus IL-12 codificado por plásmidos en las semanas 0 y 4; y luego se inmuniza dos veces con una dosis más alta (1.0 mg por antígeno) en las semanas 8 y 12. Las muestras de sangre se recolectaron aproximadamente cada dos semanas para los análisis inmunes. Los ELISpots se realizaron dos semanas después de cada inmunización y los ELISA se realizaron en las semanas 0, 4, 8, 12, 18. La Fig. 17B muestra un diagrama de la matriz de electrodos de piel y el asa. El EP de piel consta de un conjunto de un solo uso que tiene 3 electrodos de acero inoxidable, 0.404 mm (calibre 26), 3.5 mm de longitud. La matriz está unida al aplicador de asa del dispositivo; El procedimiento de EP puede iniciarse presionando el botón disparador en el aplicador de asa.

50 La Figura 18 representa un gráfico que muestra una respuesta inmune celular mejorada a los inmunógenos del VIH-1 con coinyección de ID/SQ de plásmido codificado IL-12 seguido de EP. IFN γ ELISpots se realizaron dos semanas después de cada inmunización. Las respuestas a env se representan como las barras blancas y gag se representan como barras negras con los datos mostrados como respuestas medias de grupo apiladas \pm SEM.

55 La Figura 19 representa un gráfico que muestra respuestas de memoria mejoradas a inmunógenos de VIH-1 con ID/SQ EP. Diez semanas después de la última inmunización, se realizaron ensayos ELISpot para determinar las respuestas de memoria específicas del antígeno a gag y env en los grupos ID/SQ e ID/SQ + EP. Los datos se muestran como respuestas medias grupales \pm SEM.

60 La Figura 20 representa un gráfico que muestra la inducción de la respuesta celular mediada por T $_H$ 1 y no por T $_H$ 2 después de la inmunización ID/SQ de gag, env de y VHI-1 y plásmido de rhIL-12. Se realizó una ELISpot de IL-4 en la semana 10 para evaluar la inducción de una respuesta T $_H$ 2 específica de gag o env. Las respuestas a env se representan como las barras blancas y gag se representan como barras negras con los datos mostrados como respuestas medias de grupo apiladas \pm SEM.

65 La Figura 21 representa una gráfica que muestra la inducción de los anticuerpos p24 (21A) y gp160 (21B). El suero se recogió en las semanas 0, 4, 8, 12 y 18. Los títulos de anticuerpos gag y env se determinaron mediante ELISA p24

y gp160, respectivamente, en los grupos inmunizados ID/SQ e ID/SQ + EP. Los datos se muestran como respuestas medias grupales \pm SEM.

La Figura 22 representa una gráfica de barras que muestran la expresión de SEAP medida en diferentes músculos en ratones. A los ratones se les inyectaron 10 μ g de plásmido C5-12-SEAP en el músculo tibial anterior (TA) o en el músculo gastrocnemio (G) y EP después de un retraso de 4s u 80s. Los ratones también se inyectaron con 10 μ g pf de plásmido C5-12-SEAP sin EP (no EP). Los niveles séricos de SEAP fueron mayores en ratones con músculo TA y músculo G inyectados en comparación con los ratones de control que recibieron el plásmido sin EP (* P <1.3 E-21). Los ratones inyectados con el casete de expresión sin el esqueleto del plásmido (NB) y luego electroporados tuvieron niveles de SEAP más altos que el grupo NB sin EP. Sin embargo, los grupos NB fueron significativamente más bajos que los ratones que recibieron C5-12-SEAP en el músculo idéntico (NB 4s en comparación con TA 4 s ** P <0.008; NB 80s en comparación con TA 80s *** P <0.004). Los ratones inyectados en el músculo TA producen una expresión más alta que los animales inyectados en el músculo G y reduciendo el retraso entre la inyección y el EP en el músculo TA de 80s a 4s no afectó la expresión.

La Figura 23 representa gráficos de barras que muestran la expresión promedio de GFP cuantificada en ratones después de la inyección intramuscular (IM) o intradérmica (ID) de 50 μ g de plásmido CMV-EGFP a concentraciones de 2 mg/mL o 10 mg/mL en un volumen total de 25 o 5 μ l, respectivamente. La expresión de GFP fue más alta en los grupos a los que se administró una concentración de 10 mg/ml en comparación con los animales a los que se administró una concentración de 2 mg/ml (ID e IM, * P = 0.01), aunque los sitios de inyección de ID e IM arrojaron puntuaciones generales similares cuando se compararon entre sí.

La Figura 24 representa gráficos de barras que muestran la expresión de SEAP, que fue impulsada por el ubicuo promotor de CMV, medido en diferentes músculos en ratones bajo diversas configuraciones de corriente. La formulación del plásmido se probó: solución salina, solución salina + LGS, agua o agua + LGS. La formulación de solución salina + LGS a 0.1 A en el músculo TA produjo la expresión más alta. Los animales que recibieron plásmido formulado en agua y electroporación a 0.2A produjeron niveles de SEAP significativamente más bajos que los que recibieron 0.1A para el mismo músculo (* P <0.05 para TA y ** P <0.001 para G). Cuando se utilizó agua + LGS como formulación plasmídica, las diferencias en los niveles séricos de SEAP no fueron significativas para el músculo TA, pero sí para el músculo G (** P <0.04).

La Figura 25 representa los títulos para los anticuerpos anti-SEAP medidos 14 días después del tratamiento, que fueron más altos en ratones tratados con 0.1A de corriente en el músculo G cuando se formuló el plásmido en (A) solución salina + LGS y en el músculo TA cuando se formuló en (B) agua + LGS.

La Figura 26 representa un esquema de una realización de una matriz de contacto de relé.

La Figura 27A muestra una primera parte de un diagrama de flujo del flujo funcional de electroporación.

La Figura 27B muestra una segunda parte del diagrama de flujo del flujo funcional de electroporación.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Las siguientes definiciones abreviadas o acortadas se proporcionan para ayudar a comprender las realizaciones preferidas de la presente invención. Las definiciones abreviadas que se dan aquí no son de ninguna manera exhaustivas ni contradictorias a las definiciones tal como se entienden en el significado de campo o diccionario. Las definiciones abreviadas se proporcionan aquí para complementar o definir más claramente las definiciones conocidas en la técnica.

El término "corriente constante" se usa en este documento para definir una corriente que es recibida o experimentada por un tejido, o células que definen dicho tejido, durante la duración de un pulso eléctrico administrado al mismo tejido. El pulso eléctrico se administra desde los dispositivos de electroporación descritos en este documento. Esta corriente permanece en un amperaje constante en dicho tejido durante la vida útil de un pulso eléctrico porque el dispositivo de electroporación provisto aquí tiene un elemento de retroalimentación, preferiblemente con retroalimentación instantánea. El elemento de retroalimentación puede medir la resistencia del tejido (o células) a lo largo de la duración del pulso y hacer que el dispositivo de electroporación altere su salida de energía eléctrica (por ejemplo, aumentar el voltaje), por lo que la corriente en el mismo tejido permanece constante durante todo el pulso eléctrico (en el orden de los microsegundos), y de pulso a pulso. En algunas realizaciones, el elemento de retroalimentación comprende un controlador.

El término "retroalimentación" o "retroalimentación de corriente" se usa indistintamente y significa la respuesta activa de los dispositivos EP de piel proporcionados, que comprende medir la corriente en el tejido entre electrodos y alterar la salida de energía entregada por el dispositivo EP en consecuencia para mantener la corriente a un nivel constante. Este nivel constante es preestablecido por un usuario antes del inicio de una secuencia de pulso o tratamiento eléctrico. Preferiblemente, la retroalimentación se realiza mediante el componente de electroporación, por ejemplo, el controlador, del dispositivo EP de la piel, ya que el circuito eléctrico en él puede monitorear continuamente la corriente

en el tejido entre los electrodos y comparar esa corriente monitorizada (o corriente dentro del tejido) con una corriente preestablecida y continuamente hacer ajustes de salida de energía para mantener la corriente monitorizada en niveles preestablecidos. En algunas realizaciones, el bucle de retroalimentación es instantáneo ya que es una retroalimentación analógica de bucle cerrado.

5 El término "biomolécula", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, microburbujas (por ejemplo, vesículas cargadas de fármaco) y productos farmacéuticos.

10 Los términos "electroporación", "electropermeabilización" o "mejoramiento electrocinético" ("EP") como se usan de manera intercambiable en este documento se refieren al uso de un pulso de campo eléctrico transmembrana para inducir vías microscópicas (poros) en una biomembrana; su presencia permite que las biomoléculas como los plásmidos, oligonucleótidos, ARNs, fármacos, iones y agua pasen de un lado de la membrana celular al otro.

15 El término "corriente descentralizada" se usa en el presente documento para definir el patrón de las corrientes eléctricas suministradas desde los diversos conjuntos de electrodos de aguja de los dispositivos de electroporación descritos en el presente documento, en donde los patrones minimizan, o preferiblemente eliminan, la aparición de estrés por calor relacionado con la electroporación en cualquier área del tejido que está siendo electroporado.

20 El término "región de la piel" (o "tejido de la piel"), como se usa en el presente documento, se refiere a tejido de piel, dermis, subdermis y capas o espacios intradérmicos ("ID"), intracutáneos, subcutáneos ("SQ"). La región de la piel no incluye tejido muscular.

25 El término "sin penetrar sustancialmente" como se usa en este documento se refiere a la penetración de no más de aproximadamente 1 mm a 2 mm por un objeto (por ejemplo, una aguja) de interés, y preferiblemente no más de aproximadamente 5 mm.

30 El término "mecanismo de retroalimentación", como se usa en este documento, se refiere a un proceso realizado por software o hardware (o firmware), proceso que recibe y compara la impedancia del tejido deseado (antes, durante y/o después de la administración del pulso de energía) con un valor presente, preferiblemente corriente, y ajusta el pulso de energía suministrado para alcanzar el valor preestablecido. El término "impedancia" se usa aquí cuando se discute el mecanismo de retroalimentación y se puede convertir a un valor de corriente de acuerdo con la ley de Ohm, lo que permite comparaciones con la corriente preestablecida. En una realización preferida, el "mecanismo de retroalimentación" se realiza mediante un circuito analógico de bucle cerrado.

35 Un aspecto de la presente invención se relaciona con los dispositivos de electroporación de la presente invención y su capacidad para suministrar un pulso de energía a un tejido deseado de un mamífero y mantener una corriente constante en el mismo, siendo el tejido preferiblemente intradérmico o un tejido subcutáneo. Preferiblemente, los dispositivos de electroporación son dispositivos de electroporación de la piel ("dispositivos EP de la piel"). Los dispositivos EP de la piel pueden penetrar preferiblemente en el tejido de la piel sin penetrar sustancialmente en el tejido muscular durante el EP. Los dispositivos suministran el pulso de energía a través de electrodos de aguja de la piel que pueden penetrar en el tejido de la piel, por ejemplo, tejido intradérmico y subcutáneo, y suministran el pulso de energía y mantienen la corriente constante en el tejido durante la duración del pulso de energía y el proceso de electroporación completa. La capacidad de respuesta del dispositivo EP de piel descrito actualmente que mantiene la corriente constante en el tejido tratado se logra a través de un mecanismo de retroalimentación en el dispositivo EP de piel, que evita el calentamiento de un tejido y reduce el daño tisular, el dolor y contribuye al éxito general de la tecnología de electroporación de la piel proporcionada. El mecanismo de retroalimentación es una funcionalidad de cierto software o hardware (o firmware) descrito aquí, y preferiblemente es una funcionalidad del hardware. En realizaciones donde el mecanismo de retroalimentación es una parte del software, dicho software está en comunicación digital con el controlador que controla el funcionamiento del dispositivo EP de piel y realiza los actos de recepción de impedancia desde el electrodo de piel neutra y compara la impedancia con el valor predeterminado corriente y ajuste del pulso de energía entregado al tejido deseado para mantener una corriente constante en el tejido.

55 En una realización de la presente invención, se proporcionan dispositivos de electroporación configurados para suministrar a un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía que produce una corriente constante similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. El dispositivo de electroporación comprende un componente de electroporación y un conjunto de electrodo de piel. El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos EP de piel, que incluyen: controlador, generador de forma de onda de corriente, comprobador de impedancia, registrador de forma de onda, elemento de entrada, elemento de informe de estado, puerto de comunicación, componente de memoria, fuente de alimentación, y el interruptor de encendido. En algunas realizaciones, el componente de electroporación puede funcionar como un elemento de los dispositivos EP de la piel, y los otros elementos son elementos (o componentes) separados en comunicación con el componente de electroporación. En algunas realizaciones, el componente de electroporación puede funcionar como más de un elemento de los dispositivos de EP de la piel, que puede estar en comunicación con otros elementos de los dispositivos de EP de la piel separados del componente de electroporación. La presente invención no está limitada por los elementos de los dispositivos EP de protección de la piel que existen como partes de un dispositivo electromecánico o mecánico, ya que los elementos pueden funcionar como un dispositivo o como elementos

separados en comunicación entre sí. El componente de electroporación es capaz de suministrar el pulso de energía que produce la corriente constante en el tejido deseado, e incluye un mecanismo de retroalimentación. El conjunto de electrodos de piel incluye una matriz de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos de piel en una disposición espacial, en la que el conjunto de electrodos de piel recibe el pulso de energía del componente de electroporación y lo entrega al tejido deseado a través de los electrodos de piel. Al menos uno de la pluralidad de electrodos de la piel es neutro durante el suministro del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al componente de electroporación. El mecanismo de retroalimentación puede recibir la impedancia medida y puede ajustar el pulso de energía suministrado por el componente de electroporación para mantener la corriente constante. En algunas realizaciones, el tejido deseado es tejido de la piel, y preferiblemente tejido subcutáneo o tejido intradérmico.

La Figura 2A muestra un diagrama de sistema de una realización preferida de los dispositivos EP provistos aquí. Los elementos funcionales principales de los dispositivos EP se muestran en el diagrama, pero son solo para fines ilustrativos ya que no todos los elementos funcionales son necesarios para todas las realizaciones. Cada elemento se describe en términos de la funcionalidad de hardware de cada elemento. Las secuencias de eventos habilitados por el hardware pueden ser controladas por software, como se describe aquí. El elemento central del dispositivo es el controlador en este ejemplo. Se puede ver un ejemplo de un controlador en el esquema que se muestra en la Figura 2B, que es un microcontrolador, que en algunas realizaciones es un Texas Instruments msp430F149 o Motorola 68HC908AZ60A. Los expertos en la técnica de la ingeniería eléctrica conocen otros controladores alternativos y pueden reemplazar fácilmente los ejemplos ilustrativos anteriores.

En algunas realizaciones, los electrodos de la piel son electrodos de aguja, varillas conductoras o áreas de película conductora, y preferiblemente electrodos de aguja. Preferiblemente, los electrodos de aguja son capaces de entrar en contacto con un tejido intradérmico o subcutáneo sin penetrar sustancialmente en un tejido muscular. En algunas realizaciones, los electrodos de piel pueden montarse sobre una base, que puede ser de material plástico, formando un disco de electrodos de piel reemplazable o intercambiable que tiene una serie de electrodos de piel (o matriz de piel o matriz de aguja de piel) que se pueden usar en asociación con los dispositivos de piel EP descritos en este documento. En algunas realizaciones, los electrodos de la piel pueden ser de aproximadamente 1 mm a 20 mm; 1 mm a 12 mm; 2 mm a 10 mm; 2 mm a 7 mm de longitud; o aproximadamente unos 5 mm de longitud. En algunas realizaciones, el electrodo de piel puede ser de 0.64 a 0.32 mm (calibre 22 a 28); 0.58 a 0.361 mm (calibre 23 a 27); 0.51 a 0.361 mm (calibre 24 a 27), o alrededor de 0.404 mm (calibre 26). Preferiblemente, el electrodo de piel es de aproximadamente 5 mm de longitud y 0.404 mm (calibre 26). En algunas realizaciones, el electrodo de la piel es la única parte del dispositivo EP de la piel que realmente toca la piel del paciente (para evitar la contaminación cruzada). Se puede administrar una formulación de vacuna en el área seleccionada, el área rodeada por la matriz de la piel y los electrodos de la piel insertados en la piel. La matriz de piel crea preferiblemente una presión uniforme alrededor de los electrodos de piel insertados en la piel, y de ese modo ayuda a generar un campo eléctrico uniforme durante el proceso de EP en el área objetivo.

En algunas realizaciones, el conjunto de electrodo de piel comprende, además: un interruptor activador, y un indicador de estado para informar la activación del conjunto de electrodo de piel. En algunas realizaciones, la matriz de electrodos comprende al menos tres electrodos de piel, y preferiblemente los tres electrodos de piel tienen una disposición espacial que es un triángulo. Preferiblemente, el triángulo es un triángulo isósceles. En algunas realizaciones, la matriz de electrodos comprende tres electrodos de piel dispuestos espacialmente como un triángulo isósceles que tiene lados de 5 mm de longitud y una base de 3 mm de longitud. En algunas realizaciones, la matriz de electrodos es desechable y está conectada de manera extraíble al conjunto de electrodos de revestimiento. Preferiblemente, la matriz de electrodos desechables es un disco de electrodos de piel, y más preferiblemente, el disco de electrodos de piel es esterilizable.

En algunas realizaciones, la pluralidad de electrodos de piel puede administrar el pulso de energía en un patrón descentralizado. En algunas realizaciones, la pluralidad de electrodos de piel puede administrar el pulso de energía en el patrón descentralizado a través del control de los electrodos de piel bajo una secuencia programada, y la secuencia programada es ingresada por un usuario al componente de electroporación. En algunas realizaciones, la secuencia programada comprende una pluralidad de pulsos administrados en secuencia, en donde cada pulso de la pluralidad de pulsos es administrado por al menos dos electrodos activos de la piel con un electrodo neutro que mide la impedancia, y en donde un pulso subsiguiente de la pluralidad de los pulsos son administrados por uno diferente de al menos dos electrodos activos para la piel con un electrodo neutro para la piel que mide la impedancia.

En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación se realiza por hardware o software. Preferiblemente, el mecanismo de retroalimentación se realiza mediante un circuito analógico de circuito cerrado. Preferiblemente, esta retroalimentación ocurre cada 50 μ s, 20 μ s, 10 μ s o 1 μ s, pero preferiblemente es una retroalimentación en tiempo real o instantánea (es decir, sustancialmente instantánea según lo determinado por las técnicas disponibles para determinar el tiempo de respuesta). En algunas realizaciones, el electrodo neutro mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al mecanismo de retroalimentación, y el mecanismo de retroalimentación responde a la impedancia y ajusta el pulso de energía para mantener la corriente constante en un valor similar a la corriente preestablecida. En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación mantiene la corriente constante de forma continua e instantánea durante el suministro del pulso de energía.

5 En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de la piel también incluye un controlador que recibe las entradas del usuario y controla el componente de la electroporación para administrar el pulso de energía de acuerdo con las entradas. En algunas realizaciones, el controlador puede recibir las entradas del usuario y controlar el componente de electroporación para suministrar el pulso de energía de acuerdo con las entradas. Preferiblemente, el controlador es un microcontrolador de un solo chip.

10 En algunas realizaciones, un elemento del dispositivo EP de piel es el controlador, que puede ser responsable de controlar diversos dispositivos periféricos conectados a este o asociados con este. El controlador es responsable de administrar el procedimiento de electroporación, que incluye operaciones como: (1) generar la secuencia de activación de la electroporación o el patrón de pulso de corriente constante para el ensamblaje del electrodo mediante el control del generador de forma de onda de corriente; (2) realizar pruebas de impedancia para determinar si se debe realizar una electroporación; (3) detectar y procesar comandos del usuario; (4) proporcionar al usuario información de estado; (5) transmitir datos de electroporación a un dispositivo electrónico externo a través del puerto de comunicaciones; y (6) guardar y recuperar datos de electroporación (por ejemplo, curvas de voltaje y corriente) hacia y desde la memoria.

15 El controlador puede operar a través de una aplicación de software o firmware, lo que le permite al usuario ingresar los parámetros de pulso y la secuencia programada deseados (incluida la secuencia de activación del electrodo) y controlar el funcionamiento del dispositivo EP de piel.

20 En algunas realizaciones, el controlador incluye o está programado usando un software que procesa de manera eficiente la información tanto de un usuario como del tejido que está experimentando EP de la piel y controla la salida de energía eléctrica para suministrar al tejido una corriente constante. Programado puede incluir cualquiera de una serie de parámetros de pulso que se preseleccionan antes de la electroporación, incluida la corriente preestablecida, la secuencia programada (de secuencia de activación del electrodo), la duración del pulso, el número de pulso (en el tren de pulsos), el error permitido alrededor de la corriente preestablecida. Este proceso de recibir y procesar entradas

25 y factorizar lo mismo para decidir la salida eléctrica puede ocurrir dentro de la duración de un pulso eléctrico, y puede ocurrir, preferiblemente, dentro de 1 milisegundo (ms), más preferiblemente 100 microsegundos (μ s), y más preferiblemente dentro de 10 μ s, e incluso más preferiblemente dentro de 1 μ s. En algunas realizaciones, este proceso ocurre en tiempo real o instantáneamente.

30 En un ejemplo del funcionamiento de los dispositivos EP de piel descritos en el presente documento, el controlador puede suministrar pulsos de energía de acuerdo con una secuencia programada al menos al establecer la corriente constante deseada a la de la corriente predefinida. En una realización, un circuito analógico de retroalimentación de circuito cerrado mantiene continuamente la corriente constante deseada ajustando el voltaje aplicado a través de los electrodos a medida que cambia la resistencia del tejido objetivo, preferiblemente la piel. El controlador puede finalizar el pulso cuando la duración del tiempo del pulso se ha cumplido ajustando la corriente de salida deseada a cero.

35 Cuando finaliza la secuencia de pulsos, el controlador puede revisar los datos de la forma de onda y alertar al usuario si la corriente en el tejido deseado estaba fuera de una ventana de error alrededor de la corriente preestablecida durante la secuencia de electroporación.

40 El controlador puede ser un microcontrolador de un solo chip, preferiblemente un procesador que tenga una o más de las siguientes propiedades: I/O abundantes, periféricos integrados, bajo consumo de energía y capacidad de memoria extensa. En algunas realizaciones, el controlador comprende un procesador de Texas Instruments msp430F149. El software puede dirigir los pasos del procedimiento de electroporación, y puede dirigir los pasos junto con el hardware, y es preferiblemente firmware porque reside permanentemente dentro y se ejecuta desde el microcontrolador de un solo chip. En algunas realizaciones, el software realiza un algoritmo que incluye recibir la entrada de un usuario del dispositivo, recibir información de los electrodos de aguja sobre la resistencia en el tejido receptor de pulso, o la corriente en el mismo, y ajustar la salida eléctrica en función de las entradas recibidas dentro de la duración de cada pulso eléctrico.

50 En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de piel también incluye un generador de forma de onda de corriente en comunicación con el componente de electroporación y en comunicación eléctrica con el conjunto de electrodo de piel; el generador de forma de onda de corriente genera una forma de onda de tren de pulsos de corriente para suministrar a través del conjunto de electrodo de piel. En algunas realizaciones, el usuario ingresa una secuencia programada al componente de electroporación, que comunica la secuencia programada al generador de forma de onda de corriente; en el que el generador de forma de onda de corriente es capaz de generar la forma de onda del tren de pulsos de corriente según la secuencia programada proporcionada. Preferiblemente, el generador de forma de onda de corriente es un circuito analógico de transistor de potencia. El generador de forma de onda de corriente puede generar una forma de onda de tren de pulsos de corriente que pasa a través de los electrodos de la matriz de electrodos de acuerdo con la secuencia programada. El tren de pulsos es preferiblemente de forma cuadrada y el número de pulsos está limitado por el software o firmware, y preferiblemente de 1 a 10 pulsos, y más preferiblemente de 2 a 5 pulsos, y más preferiblemente de 2 a 3 pulsos. Se aplica un pulso a cada conjunto de electrodos. En algunas realizaciones, un pulso es de 20 ms a 52 ms de duración y se produce a una velocidad de 1 Hz. La amplitud del tren de pulsos es programable por el operador y oscila entre 0.1 Amperios (A o Amp) y 1.5 A en incrementos de 0.1 A. En una realización para la presente invención, la amplitud del pulso es inferior a 0.4 A, y preferiblemente entre 0.1 y 0.2 A (ver Figuras 2 y 3). La amplitud del tren del pulso se puede adaptar como una función de la resistencia del tejido individual, tanto entre individuos como en diferentes áreas de focalización del cuerpo, preferiblemente tejido de la piel,

del mismo individuo. El generador de forma de onda de corriente puede comprender un circuito analógico de transistor de potencia general, que puede funcionar bajo la dirección del controlador.

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de la piel también incluye un comprobador de impedancia capaz de probar el establecimiento de una conexión eléctrica entre los electrodos de la piel y el tejido deseado. El probador de impedancia se puede usar para determinar si los circuitos de los dispositivos EP de la piel han establecido una conexión eléctrica adecuada al tejido. Esta prueba verifica que los electrodos de la piel insertados hayan establecido una buena conexión con el asa y que los electrodos de la piel también tengan una buena conexión con el tejido. El tratamiento con EP puede ser precedido de una prueba de impedancia. Si alguna de las mediciones de impedancia cae fuera de un rango de resistencia programable (medido en ohmios, Ω), la prueba de impedancia falla y la secuencia de electroporación no se inicia. Vea el flujo funcional de la electroporación en la Figura 27A, particularmente la caja de decisión 27A.10, que puede provocar un retraso en el disparo si la impedancia no está habilitada (en otras palabras, no se hace un contacto eléctrico entre los electrodos y el tejido deseado).

La prueba de impedancia es una función programable por el operador, controlada por software o firmware que se puede desactivar durante la operación. El probador de impedancia puede estar compuesto por circuitos analógicos de amplificador operacional general que funcionan como lo indica el controlador.

El probador de impedancia puede funcionar como una característica de seguridad en el dispositivo EP de piel. Puede indicar, por ejemplo, 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 (una posibilidad real cuando se trata de electrodos de piel y procedimientos de EP de piel), los voltajes de electrodos resultantes pueden ser miles de voltios, lo que podría tener consecuencias letales o perjudiciales para el sujeto y también dañar el dispositivo EP de la piel. Por este motivo, se puede implementar una protección de voltaje de sobrecarga para evitar voltajes excesivos en los electrodos. En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación incluye una característica de seguridad, la característica de seguridad es un límite de voltaje que evita que el dispositivo entregue el pulso de energía al tejido cuando el ajuste al pulso de energía arrojaría un voltaje por encima del límite de voltaje. Independientemente de la carga eléctrica (por ejemplo, aire, piel o tejido muscular), la protección de sobrevoltaje puede activarse (o se puede activar el límite de seguridad) si V_{ij} supera los 200 V durante un período de no más de 1 ms. V_{ij} es el voltaje en los electrodos i y j donde $i, j = 1$ a 5. Si se activa la protección de voltaje en exceso (o se activa el límite de seguridad), V_{ij} pasa a aproximadamente 0 V hasta que se dispara el siguiente pulso de electroporación. Mientras que el dispositivo EP de revestimiento está en estado apagado, el voltaje a través de cualquier par de electrodos preferiblemente no excede los 10V.

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de la piel también incluye un registrador de forma de onda en comunicación con el componente de electroporación. Preferiblemente, el registrador de formas de onda es capaz de registrar el voltaje de la electroporación y las formas de onda de la corriente de manera continua durante el suministro del pulso de energía. Más preferiblemente, el registrador de formas de onda es capaz de registrar el voltaje de la electroporación y las formas de onda de corriente a una velocidad de 2000 muestras por segundo. El registrador de formas de onda, al muestrear y monitorizar los parámetros del procedimiento de electroporación, permite al usuario recibir y procesar posibles problemas y ajustar las configuraciones en caso de que un procedimiento de electroporación falle o no logre los resultados deseados. Una velocidad de muestreo de ejemplo es de 2000 muestras por segundo, aproximadamente 104 muestras para cada uno de los 2-3 pulsos de corriente de 52 milisegundos (ms). Un período de muestra total ejemplar es de 2208 ms, y el muestreo comienza aproximadamente 50 ms antes de que se dispare el primer pulso y se detenga aproximadamente 50 ms después del último pulso en un patrón de 2 pulsos. El voltaje y las formas de onda de la corriente se pueden cuantificar en una representación digital de 12 bits con una linealidad de bit menos significativa ("LSB") de ± 1 . La resolución de la forma de onda de corriente debe ser preferiblemente de al menos 10 miliamperios (mA) y la resolución de la forma de onda de voltaje debe ser preferiblemente de al menos 1.0 V. El registrador de forma de onda puede estar compuesto de circuitos analógicos de amplificador operacional general y un convertidor analógico a digital ("A/D") adecuado para su uso con el controlador. Un ejemplo de la característica del registrador de forma de onda para el suministro a la piel de formulaciones de ADN se tabula en la Figura 2C (consulte "2.5").

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de la piel también incluye un dispositivo de entrada en comunicación directa con el usuario y el componente de electroporación, el dispositivo de entrada capaz de recibir comandos de entrada y comunicar los comandos de entrada al componente de electroporación. Preferiblemente, el dispositivo de entrada es un teclado numérico o una pantalla táctil. En un ejemplo, un operador puede ingresar los parámetros de funcionamiento de los dispositivos EP de la piel mediante un teclado numérico (como Grayhill 88AB2). En una realización preferida, los números ingresados 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 la electroporación, la habilitación/inhabilitación de la prueba de impedancia y el retardo de activación de la electroporación. Las funciones relacionadas con el teclado también pueden ser dirigidas por el controlador. Un ejemplo de la información que es útil para la electroporación utilizando uno de los dispositivos EP de la piel descritos incluye: número de identificación del sujeto, número de pulsos en secuencia, tiempo de preespera (segundos, s, seg), ancho de pulso (ms), corriente de pulso (Amp), y el patrón de cambio para los electrodos de aguja de la matriz de electrodos de la piel (número de

identificación del sujeto, así como todas las condiciones de electroporación se registran automáticamente y están disponibles para su análisis). En la Figura 2C se proporciona un ejemplo de la información que es útil para la electroporación utilizando uno de los dispositivos EP de piel (tenga en cuenta que el número de identificación del sujeto, así como todas las condiciones de electroporación se registran automáticamente y están disponibles para su análisis).

En algunas realizaciones, los dispositivos EP de la piel pueden incluir además un elemento de informe de estado para mostrar o de otra manera notificar al operador sobre el estado del sistema. En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de la piel también incluye un elemento de informe de estado en comunicación con el componente de electroporación. Preferiblemente, el elemento de informe de estado es un panel de visualización de información, una notificación audible, un diodo emisor de luz, o una combinación de ellos. El elemento de informe de estado puede informar la confirmación de la generación del pulso de energía y el suministro de la corriente constante. Estos elementos de informe de estado pueden incluir un panel de visualización de información, como una pantalla de cristal líquido ("LCD") (como Lumex LCM-S02004DSF). El LCD es preferiblemente del tipo de visualización de caracteres y, preferiblemente, puede mostrar 4 líneas de 20 caracteres cada una. La pantalla LCD también está equipada preferiblemente con una retroiluminación que se puede encender y apagar por medio de un interruptor de palanca. La información de estado también puede proporcionarse mediante una notificación sonora, como un zumbador (como el CUI CEP-2202 AS) que suena en varios tonos. Cada tono tiene preferiblemente un significado diferente, según lo controlado por el software o firmware. Por ejemplo, el volumen del zumbador puede tener 3 configuraciones programables y oscilar aproximadamente entre 60 y 80 dB a una distancia de 1 metro del zumbador. El rango de nivel de presión de sonido solo se da como referencia. El nivel de sonido se considera aceptable si es audible en un entorno ruidoso (por ejemplo, una granja o un complejo militar) 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 SKIN EP DEVICE puede estar equipado con un diodo emisor de luz ("LED") (como el Lumex SSI-LXR1612ID o cualquier LED rojo montado en panel) para designar si la unidad está encendida o apagada.

Preferiblemente, los elementos de informe de estado incluyen una confirmación visual de la generación exitosa de un campo eléctrico en la pantalla LCD después de completar la secuencia del pulso eléctrico. En una realización, después de cada proceso de electroporación (o secuencia de electroporación), la pantalla LCD mostrará una lista de tres o cinco números, ya sea "1" o "0", uno para cada uno de los pulsos de la secuencia de electroporación. Un "0" indica que el pulso era normal y un "1" indica que el pulso era anormal. Más específicamente, cada pulso debe alcanzar al menos el 90% de la corriente establecida para que se describa como normal o se mostrará un "0" en la pantalla LCD. Si un pulso determinado alcanza menos del 90% de la corriente establecida, el pulso es anormal y se mostrará un "1". Además, se muestran la corriente más baja y promedio de los pulsos anormales. Por ejemplo, para una secuencia de electroporación de cinco pulsos establecida a una corriente de 0.5 amperios, si los pulsos 3 y 5 alcanzan solo 0.4 amperios y 0.3 amperios, respectivamente, se mostrará "0 0 1 0 1", así como "Bajo: 60% Promedio 80%".

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de la piel también incluye un puerto de comunicación en comunicación con el componente de electroporación. En algunas realizaciones, el puerto de comunicaciones que se puede usar para cargar datos de forma de onda de electroporación a un dispositivo electrónico externo, como un ordenador personal de mano (por ejemplo, "Pocket PC"), asistente digital personal ("PDA") u ordenador personal ("PC"), para fines de visualización. Preferiblemente, el puerto de comunicaciones es un puerto de comunicaciones serie óptico, como un puerto de infrarrojos ("IR") (como, Transceptor: ACTISYS ACT-IR220LN115, oZilogZHX1201; Codificador: Microchip MCP2120, o TITIR1000).

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de la piel también incluye un componente de memoria en comunicación con el componente de electroporación. El componente de memoria puede almacenar datos de forma de onda de electroporación y parámetros operativos. Preferiblemente, el componente de memoria (como Atmel AT45DB321B o AT45DB321C-TU) no es volátil, lo que significa que conserva sus datos incluso si el dispositivo EP de la piel está apagado. Para conservar la memoria, los datos de la forma de onda de la electroporación solo se pueden guardar en la memoria durante los períodos activos del tren de pulsos de la electroporación. Durante los períodos inactivos, los datos muestreados solo pueden almacenarse en la memoria si una de las formas de onda supera un umbral especificado. Por ejemplo, estos umbrales pueden ser un umbral de voltaje 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 de corriente pueden marcarse en el tiempo para 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 abortará si se supera alguno 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 componente de memoria de los dispositivos EP de la piel contiene preferiblemente memoria suficiente para guardar al menos 8000 pulsos (cada pulso se almacena por separado).

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de la piel también incluye una fuente de energía en comunicación con el componente de electroporación. Preferiblemente, la fuente de alimentación es una batería, y más preferiblemente, una batería tal como una batería de ion litio, hidruro de níquel metálico, ácido de plomo o níquel-

cadmio. En algunas realizaciones, la fuente de alimentación es preferiblemente una batería (como dos Panasonic de 6V-LC-R064R5P 4.5Ah, dos génesis de 6V NP7-6 6V 7.0 Ah) y es responsable de proporcionar energía a cada uno de los circuitos de los dispositivos EP de la piel. Estos circuitos incluyen una fuente de alimentación de bajo voltaje/baja capacidad de potencia para el controlador y sus periféricos, una fuente de alimentación de bajo voltaje y baja capacidad de potencia para el probador de impedancia, y una fuente de alimentación de alta capacidad de potencia para el generador de forma de onda de corriente. El interruptor de alimentación (como, E-Switch R5CBLKBLKEF0, o cualquier interruptor basculante de montaje en panel DPDT 10A) controla la alimentación de los dispositivos EP con revestimiento y puede activarse o desactivarse. En la posición de apagado, todas las conexiones eléctricas al conjunto del electrodo son eléctricamente neutras dentro de los 5 segundos posteriores a la desconexión de la alimentación.

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan conjuntos de asas de electroporación (o "conjunto de asas") configurados para suministrar un pulso de energía a un tejido deseado de un mamífero para producir una corriente constante en el tejido deseado similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. El conjunto de asa que comprende una matriz de electrodos de piel que tiene una pluralidad de electrodos de piel en una disposición espacial, en la que al menos uno de los electrodos de piel es neutro durante el suministro del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado; un controlador en comunicación con la matriz de electrodos de la piel, el controlador controla el suministro del pulso de energía a través de los electrodos de la piel; y un medio para realizar un mecanismo de retroalimentación, en el que el mecanismo de retroalimentación se realiza mediante software o hardware, que recibe la impedancia medida desde el electrodo neutro de la piel y ajusta el pulso de energía suministrada, si es necesario, para mantener la corriente constante.

En algunas realizaciones, los dispositivos EP de piel también incluyen un conjunto de asa de electrodo de piel. Preferiblemente, el conjunto de asa incluye tres elementos: una matriz de electrodos de piel (preferiblemente, una matriz de electrodos de aguja de piel), un indicador de estado para informar el estado del dispositivo EP de piel y un interruptor activador. La matriz puede incluir cualquier número de electrodos de aguja en una o más disposiciones espaciales diferentes, y preferiblemente incluir un número impar de electrodos y también preferiblemente un número menor de electrodos, preferiblemente 7 electrodos o menos. En una realización preferida, el conjunto de electrodos de revestimiento de aguja es circular y comprende tres electrodos de revestimiento de aguja colocados en una formación isósceles, con los lados grandes de 5 mm y la base pequeña de 3 mm; se cree que esta colocación es importante para el patrón de pulso y la generación de campo eléctrico y, por consiguiente, la calidad del EP de la piel. El estado del dispositivo EP de revestimiento de la piel se indica preferiblemente en el ensamblaje del asa mediante el uso de indicadores de estado, como uno o más LED, que pueden tener diferentes colores y programarse para parpadear intermitentemente para indicar varios pasos de la secuencia de encendido del electrodo. El interruptor activador del conjunto de asa se usa preferiblemente para iniciar varios pasos de la secuencia de disparo del electrodo ("6.1.1").

En algunas realizaciones, el conjunto de asa es inalámbrico y puede operarse de forma remota desde el componente de electroporación (o controlador). El conjunto de asa inalámbrico puede recibir información del componente de electroporación (o controlador), incluidos la secuencia programada y los parámetros de pulso, y suministrar un pulso de energía al tejido deseado y mantener la corriente constante en el mismo tejido. El conjunto de asa inalámbrica puede incluir una batería interna o un condensador que mantiene una carga eléctrica para su funcionamiento. Preferiblemente, el conjunto de asa inalámbrico incluirá el mecanismo de retroalimentación, preferiblemente el circuito analógico de circuito cerrado. El conjunto de asa inalámbrica puede acoplarse con el componente de electroporación e intercambiar información y proporcionar una o más de las funcionalidades de los dispositivos EP de la piel descritos aquí.

En algunas realizaciones, la matriz de electrodos es desechable y está conectada de manera extraíble al conjunto de electrodos de revestimiento. Preferiblemente, la matriz de electrodos desechables es un disco de electrodos de piel, y más preferiblemente, el disco de electrodos de piel es esterilizable.

En una realización de la presente invención, los dispositivos EP de revestimiento incluyen un disco de electrodo de revestimiento reemplazable que puede montarse de manera extraíble en el conjunto de asa. En una realización preferida, el disco de electrodo de piel reemplazable está montado en el conjunto de asa del dispositivo EP de la piel. Las figuras 6.1 y 6.2 representan la vista lateral de la matriz de electrodos ("6.2.3" y "6.2.5"). En las Figuras 6.1 y 6.2, el disco de electrodos tiene una pluralidad de electrodos de piel de aguja montados en una estructura de soporte en una disposición espacial para penetrar en el tejido seleccionado, en particular la piel. En una realización preferida, la disposición espacial es una matriz de piel circular. Los electrodos individuales de la piel en la matriz de agujas en el lado del asa del disco del electrodo de la piel son romos y están desbarbados para su inserción en los accesorios de contacto eléctricos complementarios en el asa. El asa aloja preferiblemente un conector eléctrico desde los electrodos de piel de aguja hasta el generador de pulsos o el dispositivo EP de la piel.

En una realización preferida, los electrodos de piel de aguja en el conjunto de electrodo de piel del dispositivo EP de piel, así como en el disco de electrodo de piel reemplazable, están en una matriz circular. En una realización preferida adicional, la pluralidad de electrodos de piel de aguja consiste en tres electrodos de piel de aguja. En una realización preferida adicional, el centro de los tres electrodos de piel de aguja cae en una matriz circular en forma de una formación inscrita por 2 lados de 5 mm y una pequeña base de 3 mm.

En una realización preferida, los electrodos de piel de aguja se almacenan estériles en un sistema de empaque específico (Figura 9) que permite un cambio rápido de la matriz de electrodos de piel entre sujetos tratados, mientras se mantiene estéril cada matriz de electrodos de piel.

5 En algunas realizaciones, se proporciona una secuencia programada para el funcionamiento de los dispositivos EP de la piel, que controla si cada electrodo de la matriz de agujas de la piel puede funcionar como un electrodo positivo, negativo o neutro. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 2C, en una secuencia programada, cada electrodo puede funcionar como una posición positiva, negativa o de apagado. La secuencia completa en la Figura 2C se representa en la que los electrodos 1 a 3 se convierten sucesivamente en el electrodo positivo, con dos electrodos de carga negativa en vértices opuestos de la matriz de la piel ("2.4" - segunda columna), o un electrodo apagado, uno positivo y otro negativo ("2.4" - cuarta columna).

15 En algunas realizaciones, el componente de electroporación comprende un controlador; un generador de forma de onda en comunicación electrónica con el controlador; un registrador de formas de onda en comunicación electrónica con el controlador; y una batería conectada eléctricamente al generador de forma de onda. El controlador puede recibir una entrada del usuario, instruir al generador de formas de onda para que envíe el pulso de energía al tejido deseado de acuerdo con la entrada, y comunicar los datos al registrador de formas de onda de acuerdo con el pulso de energía entregada; y en el que la batería envía una carga eléctrica al generador de forma de onda, siendo la batería una batería de ion litio, hidruro de níquel metálico, ácido de plomo o níquel-cadmio. Preferiblemente, el dispositivo es portátil. El dispositivo portátil puede operarse a través de un paquete de baterías y es adecuado para la vacunación masiva con fines terapéuticos o de vacunación.

25 En algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan métodos para usar los dispositivos de electroporación de la piel descritos en el presente documento para suministrar el pulso de energía al tejido de la piel deseado para producir la corriente constante similar a una entrada de corriente predeterminada por parte de un usuario. Los métodos incluyen: insertar una pluralidad de electrodos de piel de aguja en el tejido de la piel sin penetrar sustancialmente en el tejido muscular; y aplicar el pulso de energía a la pluralidad de electrodos de piel de aguja para suministrar una corriente igual a la corriente preestablecida en el tejido de la piel; y medir la impedancia del tejido de la piel con uno neutral de la pluralidad de electrodos de piel de aguja y usar un mecanismo de retroalimentación en el dispositivo de electroporación para ajustar el pulso de energía aplicado en respuesta a la impedancia medida para mantener constante la corriente suministrada al tejido de la piel. En un ejemplo de una realización preferida, los métodos de uso de los dispositivos de EP de piel incluyen el progreso a través de una secuencia funcional de electroporación tal como la representada en el diagrama de flujo proporcionado en las Figuras 27A y 27B. En particular, 27B.10 en la Fig. 27B muestra una explosión de la etapa de "producir pulsos de corriente" y describe el mecanismo de retroalimentación, que preferiblemente se realiza mediante un circuito analógico de circuito cerrado y funciona en tiempo real (o instantáneamente).

35 En algunas realizaciones, los métodos incluyen además medir la impedancia antes de aplicar el pulso de energía para determinar si se hace contacto eléctrico entre el tejido cutáneo deseado y los electrodos de la piel de aguja. En algunas realizaciones, los métodos de la invención se usan para poner al menos una vacuna de ADN en contacto con dicho tejido intradérmico o subcutáneo.

40 En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención incluyen el registro de datos compilados por el dispositivo de electroporación desde el suministro del pulso de energía al tejido cutáneo deseado.

45 En algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan métodos que comprenden las etapas de: proporcionar un conjunto de electrodo de piel que tiene una pluralidad de electrodos de piel de aguja, el conjunto de electrodo de piel en comunicación eléctrica con un generador de forma de onda de corriente; poner en contacto el tejido de la piel de un mamífero con la pluralidad de electrodos de piel de aguja sin penetrar sustancialmente en el tejido muscular del mamífero; y aplicar un pulso eléctrico de energía desde el generador de forma de onda de corriente a la pluralidad de electrodos de piel de aguja durante un tiempo y en condiciones efectivas para exponer el tejido de la piel contactado a una corriente sustancialmente constante.

50 En algunas realizaciones, la aplicación del paso eléctrico de pulso de energía comprende: medir la impedancia en el tejido de la piel contactado con un neutro de la pluralidad de electrodos de la piel de aguja; y comunicar la impedancia medida a un mecanismo de retroalimentación en comunicación eléctrica con el generador de forma de onda de corriente, en donde el mecanismo de retroalimentación ajusta el pulso de energía suministrada desde el generador de forma de onda de corriente en respuesta a la impedancia medida para mantener la corriente sustancialmente constante. En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación se realiza mediante un circuito analógico de circuito cerrado que forma parte del dispositivo de electroporación, y los pasos de medición y comunicación se realizan instantáneamente a lo largo de la duración del pulso de energía.

55 Un aspecto de la presente invención se refiere a los dispositivos EP de la piel, que permiten la electroporación in vivo de biomoléculas, por ejemplo, plásmidos de ADN, en tejidos o células cutáneas deseados. En algunas realizaciones, los dispositivos EP de la piel proporcionan un campo eléctrico de corriente constante a un tejido de la piel de interés a través de una matriz de agujas de electrodos de la piel y facilitan la introducción de una biomolécula en células de

tejido cutáneo seleccionado, preferiblemente tejido subcutáneo (SQ) y/o intradérmico (ID). Los dispositivos EP de piel producen una forma de onda de tren de pulso de corriente que pasa a través de los electrodos de la matriz de agujas del electrodo de piel de acuerdo con una secuencia programada y se puede monitorizar y registrar durante el procedimiento. Los electrodos de aguja son capaces de entrar en contacto con el tejido de la piel, como el tejido de SQ o ID, sin penetrar sustancialmente en el tejido muscular. Los dispositivos EP de piel producen una forma de onda de tren de pulso de corriente que pasa a través de los electrodos de piel de la matriz de piel de acuerdo con una secuencia programada y se puede monitorizar y registrar durante el procedimiento (ver Figura 2C). Los electrodos de piel de aguja son capaces de entrar en contacto con tejido intradérmico o subcutáneo sin penetrar sustancialmente en el tejido muscular.

La patente de EE. UU. No. 7,245,963 y la publicación de patente de EE. UU. 2005/0052630 divulga diagramas de sistemas de ciertos componentes de la electroporación que pueden usarse de acuerdo con la presente invención, donde son adaptables en o como parte de los dispositivos EP de la piel. Cada elemento se describe aquí en términos de la funcionalidad de hardware de dicho elemento. Las secuencias de eventos habilitados por el hardware se controlan mediante software o firmware o una combinación de ambos, como se describe en este documento.

En algunas realizaciones, el componente de electroporación del dispositivo EP de piel comprende una matriz de relé de conexión de electrodo, que puede facilitar la secuencia programada y operar la activación de los electrodos en el conjunto del electrodo de piel. La matriz de relé puede controlar cada uno de los electrodos, preferiblemente los electrodos de aguja, de modo que cada electrodo se encuentre en uno de los cinco estados: apagado, bajo voltaje positivo, entrada de medición de impedancia, alto voltaje positivo y alto voltaje negativo (regulador). En una realización, la matriz de relés incluye 11 doble polo, relés de doble tiro (DPDT) que crean una matriz de conmutación. 10 de esos relés se activan utilizando un conjunto de registros de desplazamiento conectados al puerto de la interfaz de periféricos en serie (SPI) como un puerto SPI a paralelo. La entrada de esclavo SPI, salida maestra (SIMO) está conectada al pin de entrada de datos de ambos registros de desplazamiento 74VHC595 (o equivalente aprobado). El 74VHC595 tiene 2 entradas de reloj. La señal universal de la interfaz de comunicación síncrona/asíncrona en serie (UCLK) se conecta a los pines de entrada del reloj del registro de desplazamiento (SCK) de los registros utilizados para transferir datos al registro. Los pines de entrada/salida de propósito general separados (GPIO) van a las entradas de reloj del reloj de registro de almacenamiento (RCK) que se utilizan para registrar los datos del registro de desplazamiento, en paralelo, en el registro de salida. El resultado es que los mismos datos en serie se cambian en ambos registros de desplazamiento, pero entonces los datos solo se registran en el registro de salida del que se va a cambiar.

Para impulsar las bobinas de relé reales, las salidas del circuito del puerto SPI alimentan 2 controladores de bobina de relé de 8 canales ULN2003A (o equivalente aprobado). Este chip es básicamente una matriz de transistores de unión bipolar de colector abierto (BJT). Cada salida de canal también tiene un diodo de retroceso interno a través de él, eliminando la necesidad de diodos externos. El lado positivo de las bobinas del relé está atado a 15 voltios, mientras que el lado negativo de las bobinas se tira a tierra a través de las partes ULN2003A.

Hay 3 conjuntos de relés en la matriz de contacto. Un ejemplo de una matriz de contacto de relé se puede ver en la Figura 26. El primer conjunto es realmente 1 relé DPDT. Un conjunto de contactos cambia el riel positivo de la tensión de medición de impedancia de bajo voltaje a la salida de la fuente de alimentación de 200V. El otro conjunto de contactos en el mismo relé cambia el riel negativo entre el circuito de medición de impedancia y el circuito de regulación de la corriente de pulso. Por lo tanto, la posición de este relé establece los rieles positivo y negativo para hacer un pulso de corriente o para hacer una medición de impedancia. El siguiente conjunto de relés es el conjunto de relés de polaridad de 5 relés. Estos relés, uno para cada electrodo, cambian la polaridad de ese electrodo al riel positivo o negativo. El último conjunto de relés es solo un conjunto de contactos en línea para permitir que cada contacto sea aislado como positivo o negativo. Para mejorar la vida útil de los contactos de relé, la matriz está destinada únicamente a conectar la carga a los electrodos apropiados de la manera deseada. Los circuitos de pulso o impedancia luego pasan el voltaje o la corriente a la carga. El voltaje o la corriente se eliminan antes de que se abra cualquier contacto. Dado que los contactos no cambian realmente cuando se está aplicando la corriente, la vida útil de los contactos se puede extender considerablemente.

En las figuras 3.1 y 3. 2 se muestra un ejemplo de un pulso de corriente producido por los dispositivos EP de la piel. Las figuras 3.1 y 3.2 muestran la forma de onda de cada pulso de corriente. Los parámetros de forma de onda son:

Período (t_p): 1000 ms \pm 250 μ s.

Tiempo de subida (t_r): máximo 20 μ s.

Tiempo de establecimiento (t_s): máximo 20 μ s.

Anchura del pulso (t_w): 52 ms \pm 100 μ s.

Tiempo de caída (t_f): máximo 20 μ s.

Corriente nominal (I_n): $I_n \in (0.1A, 0.2A, 0.3A \dots 1.5A) \pm 10\%$ de I_n durante t_n y con $R_1 \leq 100\Omega$. R_1 es la resistencia de carga entre cualquiera de los 3 conjuntos de electrodos mostrados en la figura 3.3 y 3.4. Solo la forma de onda de corriente se especifica en la Figura 3.1 y 3.2. La forma de la forma de onda del voltaje depende de la impedancia vista por los electrodos mientras se dispara el pulso de corriente (durante t_n). La forma de onda del voltaje no se especifica durante t_n , ya que la impedancia es desconocida durante este período. El voltaje a través de cualquier conjunto de electrodos durante t_1 es 0V.

A pesar de no querer limitarse a la teoría, se cree que la electroporación hace uso de las mismas estructuras y fuerza un alto flujo iónico a través de estas estructuras y abre o amplía los conductos. Los electrodos metálicos o dieléctricos se colocan en contacto con los tejidos y se les imponen voltajes predeterminados, proporcionales a la distancia entre los electrodos. Los protocolos utilizados 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 el voltaje impuesto y ("d") es la distancia entre los electrodos.

La intensidad del campo eléctrico E ha sido un valor importante al formular protocolos de electroporación para el suministro de un fármaco o biomolécula a la célula del sujeto. Por consiguiente, es posible calcular cualquier intensidad de campo eléctrico para una variedad de protocolos aplicando un pulso de voltaje predeterminado que es proporcional a 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, flujo de iones no es necesario para crear un campo eléctrico). Aunque no se quiere estar limitado por la teoría, es la corriente necesaria para un EP exitoso, campo no eléctrico *per se*. La activación del generador de forma de onda de corriente del dispositivo EP de piel distribuirá un pulso eléctrico de corriente constante a la pluralidad de electrodos de piel de aguja de modo que ocurra un evento EP descentralizado en un área donde no se desarrollen puntos de superposición EP congruentes. La permeabilidad de las células en el área del EP descentralizado aumenta y la biomolécula se administra en la célula del sujeto sin sobrecalentarse y dañar la célula o el tejido.

Un aspecto de la presente invención se refiere a dispositivos de EP de piel para introducir biomoléculas en una o más células de un animal, en particular piel, con fines de vacunación ID o SQ. Preferiblemente, los dispositivos EP de la piel introducen las biomoléculas en el tejido de la piel, como el tejido SQ o ID, al administrar y mantener una corriente constante en el mismo tejido durante toda la duración del pulso eléctrico administrado. En algunas realizaciones, el asa del conjunto de asa de electrodo de piel no es conductor y está diseñado para proporcionar al usuario un medio fácil para implantar el conjunto de electrodo de piel de aguja en un tejido seleccionado, en particular piel. La utilización de discos desechables de electrodos con revestimiento de aguja con montajes a presión en el asa permite al usuario colocar y desmontar rápidamente los discos de electrodos con revestimiento de aguja, y permitir un cambio rápido (y estéril) entre los sujetos tratados. La fuente de energía de los dispositivos EP de la piel puede utilizar paquetes de baterías para el uso en el campo donde el acceso y el uso de un tomacorriente u otra fuente de energía es peligroso o inconveniente, como por ejemplo en una vacunación masiva durante un ataque de bioterrorismo.

Las biomoléculas para el suministro a las células del tejido de la piel, como el tejido SQ e ID, incluyen plásmidos de ADN, vacunas de ADN (las vacunas de ADN y plásmidos de ADN que no se excluyen mutuamente), genes, fármacos terapéuticos u otros agentes, ya sean agentes complementarios o potenciadores. Preferiblemente, las biomoléculas son plásmidos de ADN que pueden expresarse en las células del tejido cutáneo seleccionado, y las biomoléculas para el suministro de EP en la piel pueden incluir más de una biomolécula. En algunas realizaciones, las biomoléculas son plásmidos de ADN que

Los plásmidos de ADN utilizados con la presente invención pueden ser aquellos útiles para la terapia génica, es decir, la transferencia de genes seleccionados a un huésped con el fin de prevenir, mejorar o curar una lesión o estado patológico. Los plásmidos de ADN pueden expresar el gen de interés en el mamífero utilizando los dispositivos EP de la piel para mejorar los síntomas de una enfermedad, reducir la patogénesis de la enfermedad, eliminar la causa raíz de la enfermedad o prevenir la aparición de la enfermedad. El gen codificante en el plásmido de ADN puede ser un gen heterólogo obtenido de una fuente exógena. La terapia génica puede proporcionarse para enfermedades genéticas, como la fibrosis quística o la distrofia muscular. La terapia génica también se puede aplicar para el tratamiento de tumores. Preferiblemente, los genes de los plásmidos de ADN codifican una hormona liberadora de la hormona del crecimiento o un factor I de crecimiento de la insulina, ya sean formas sintéticas o naturales, o fragmentos completos o funcionales de la misma.

En algunas realizaciones, los plásmidos de ADN utilizados con la presente invención se pueden introducir en las células del mamífero para propósitos de vacunación, o inoculación contra enfermedades infecciosas, como hepatitis, influenza, dengue, encefalitis japonesa y VIH, por ejemplo. En algunos ejemplos, los plásmidos de ADN pueden expresar polipéptidos que son fragmentos inmunogénicos de proteína viral.

Los ejemplos de fármacos que se pueden usar como biomoléculas para el suministro al tejido cutáneo por EP cutáneo incluyen agentes quimioterapéuticos que tienen un efecto antitumoral o citotóxico, que incluyen bleomicina, neocarzinostatina, suramina, doxorubicina, carboplatino, taxol, mitomicina C y cisplatina. Los expertos en la técnica conocen otros agentes quimioterapéuticos, y se pueden encontrar en referencias que incluyen The Merck Index. Además, los agentes que ayudan a la administración transmembrana ("agentes de administración") también se

contemplan como biomoléculas para la administración y pueden incluir: N-alquilmelamida y benzoato de para-cloro mercurio. En realizaciones en las que las biomoléculas son plásmidos de ADN o vacunas de ADN, otra biomolécula para el suministro junto con, antes o después de los plásmidos de ADN o vacunas de ADN, es uno o más plásmidos de ADN adicionales o vacunas de ADN. En realizaciones en las que las biomoléculas son plásmidos de ADN o vacunas de ADN que están destinadas a expresar proteínas diana que provocan una respuesta inmunitaria, otra biomolécula para el suministro junto con, antes o después de los plásmidos de ADN o vacunas de ADN, es uno o más genes para proteínas que mejoran aún más la respuesta inmune contra dichas proteínas diana. Ejemplos de dichos genes son aquellos que codifican otras citoquinas y linfocinas como el interferón alfa, el interferón gamma, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MHC, CD80, CD86 e IL-15 incluyendo IL-15 que tiene la secuencia de señal eliminado y opcionalmente incluyendo el péptido señal de IgE. Otros genes que pueden ser útiles incluyen aquellos que codifican: MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inactivo, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta a interferón, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, LIGANDO RANK, Ox40, LIGANDO Ox40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y sus fragmentos funcionales.

Los dispositivos EP de revestimiento pueden incluir cualquier número de electrodos, como una matriz de tres electrodos dispuestos en un patrón diferente, que se puede ver en la Figura 11. 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 lo tanto, al seleccionar un mayor número de electrodos, se puede abarcar un mayor volumen de tejido. El número óptimo de electrodos cutáneos elegidos puede depender del volumen del material a transfectar y de la distancia entre la inyección y la electroporación.

Preferiblemente, las formulaciones de ADN para usar con los dispositivos EP de la piel descritos en este documento tienen altas concentraciones de ADN, preferiblemente concentraciones que incluyen cantidades en gramos de ADN en pequeños volúmenes que son óptimos para el suministro a la piel, preferiblemente un volumen de inyección pequeño, idealmente de 25 a 200 microlitros (μ L). En algunas realizaciones, las formulaciones de ADN tienen altas concentraciones de ADN, como 1 mg/ml o más (mg de ADN/volumen de formulación). Más preferiblemente, la formulación de ADN tiene una concentración de ADN que proporciona cantidades en gramos de ADN en 200 μ l de fórmula, y más preferiblemente cantidades en gramos de ADN en 100 μ l de fórmula.

Los plásmidos de ADN para usar con los dispositivos EP de la piel de la presente invención se pueden formular o fabricar usando una combinación de dispositivos y técnicas conocidas, pero preferiblemente se fabrican usando una técnica de fabricación de plásmidos optimizada que se describe en la solicitud provisional de los EE. UU. copendiente de propiedad común EE.UU. serie No. 60/939,792, que se presentó el 23 de mayo de 2007. En algunos ejemplos, los plásmidos de ADN utilizados en estos estudios pueden formularse en concentraciones mayores o iguales a 10 mg/ml. Las técnicas de fabricación también incluyen o incorporan diversos dispositivos y protocolos que son comúnmente conocidos por los expertos en la técnica, además de los descritos en el número de serie de EE. UU. 60/939792, incluidos los descritos en una patente de propiedad común, la patente de EE. UU. No. 7,238,522, emitida el 3 de julio de 2007. Las altas concentraciones de plásmidos utilizados con los dispositivos EP de la piel y las técnicas de administración descritas en este documento permiten la administración de plásmidos en el espacio ID/SC en un volumen razonablemente bajo y ayuda a mejorar la expresión y los efectos de la inmunización.

Ejemplo 1. Funcionamiento del dispositivo electroquinético ("dispositivo ep de la piel") para electroporación de la piel

Primero, se enciende el dispositivo EP de alimentación. El firmware permanece en estado inactivo hasta que se recibe la entrada del usuario. Para iniciar una secuencia de electroporación, se ingresa una contraseña para obtener un aviso introductorio en la pantalla LCD. En este punto, se presiona el interruptor del activador del conjunto de asa. Luego, el usuario ingresa un número, preferiblemente un número de identificación del sujeto, que se registra con los datos de cada pulso almacenado para su posterior descarga. El número se ingresa preferiblemente usando un teclado numérico. La formulación de la biomolécula se administra luego como una inyección ID o SQ en un volumen de inyección razonablemente pequeño, idealmente de 25 a 200 litros de piel y la matriz de electrodos de piel se inserta en la piel para rodear completamente el área de inyección que se visualiza fácilmente. Luego se le indica al usuario, a través de un "pitido" del zumbador, que presione el interruptor de activación para continuar con la secuencia de electroporación. Después de presionar el interruptor de activación, el firmware establece si el probador de impedancia está habilitado o no. Si el comprobador de impedancia está habilitado, el software realiza inmediatamente una serie de mediciones de impedancia. El firmware prueba la impedancia entre los electrodos con un voltaje de CC bajo.

Una vez que los electrodos se han insertado en el tejido objetivo y durante la verificación de impedancia, el procesador verifica la conductividad del tejido al nivel del electrodo. Esto se hace para asegurar que los electrodos estén haciendo contacto eléctrico con el tejido objetivo en el paciente. Estas mediciones se realizan en cuestión de segundos con tiempo suficiente para lograr lecturas precisas, a menudo menos de 2 segundos. Durante la prueba de impedancia, se enciende un LED rojo en el conjunto del asa. Si cualquiera de las mediciones de impedancia falla, se escuchará un "pitido" de error largo, el LED del asa permanecerá en rojo, la pantalla LCD mostrará el error y el firmware volverá al estado inactivo.

Si todas las mediciones pasan, se emite un "pitido" corto, se enciende un LED verde en el conjunto del asa y la pantalla solicita al usuario que presione el interruptor de activación para continuar. El firmware espera a que se presione nuevamente el interruptor de activación del asa para continuar la secuencia. Si se presiona cualquier tecla en el teclado en este momento, se escuchará un largo "pitido" de error y la unidad volverá al estado inactivo.

El firmware implementa la secuencia de disparo según lo proscribió el programa de pulsos seleccionado. Durante el suministro de cada pulso eléctrico o pulso de energía, el dispositivo EP ajusta continuamente su salida en función de la resistencia medida en el tejido objetivo, por ejemplo, la piel, para mantener la corriente deseada. En esencia, el procesador comienza la secuencia de pulsos estableciendo el nivel de corriente de salida deseado al de un valor de corriente preestablecido ingresado por un usuario. Un circuito de retroalimentación de hardware (es decir, un circuito analógico de circuito cerrado) mantiene continuamente la corriente de salida deseada al ajustar el voltaje aplicado a través de los electrodos a medida que cambia la resistencia del tejido objetivo. Durante la entrega del pulso de energía, el procesador registra la forma de onda del pulso. El procesador finaliza el pulso cuando se ha cumplido la duración del pulso al establecer la corriente de salida deseada en cero en ese momento. Cuando finaliza la secuencia de pulsos, el procesador revisa los datos de la forma de onda y alerta al operador si la corriente no estaba dentro de los parámetros establecidos durante la secuencia de electroporación; por lo tanto, informando al usuario de si la secuencia de electroporación o el tratamiento fue defectuoso o no.

Cuando la secuencia de EP se completa con éxito, el dispositivo EP de piel vuelve al estado inactivo. Hay una confirmación visual adicional de la generación exitosa de un campo eléctrico en la pantalla LCD después de completar la secuencia del pulso eléctrico. Después de cada secuencia, la pantalla LCD mostrará una lista de tres o cinco números, ya sea "1" o "0", uno para cada uno de los pulsos de la secuencia de electroporación. Un "0" indica que el pulso era normal y un "1" indica que el pulso era anormal. Más específicamente, cada pulso debe alcanzar al menos el 90% de la corriente establecida para que se describa como normal o se mostrará un "0" en la pantalla LCD. Si un pulso determinado alcanza menos del 90% de la corriente establecida, el pulso es anormal y se mostrará un "1". Además, se muestran la corriente más baja y promedio de los pulsos anormales. Por ejemplo, para una secuencia de electroporación de cinco pulsos establecida a una corriente de 0.5 amperios, si los pulsos 3 y 5 alcanzan solo 0.4 amperios y 0.3 amperios, respectivamente, se mostrará "0 0 10 1", así como "Bajo: 60% promedio 80% ". Este mecanismo de control es esencial cuando se administran vacunas para aplicaciones terapéuticas o profilácticas. Si la administración de la vacuna es inadecuada, existe una alta probabilidad de que no se logren las respuestas celulares o de anticuerpos necesarias para el tratamiento o la protección, y el sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad (Roth et al., 2005).

Ejemplo 2

Adquisición y almacenamiento de datos

El software o firmware del dispositivo EP de piel permite la adquisición y el almacenamiento de datos en tiempo real en una memoria no volátil. La Figura 2C ilustra una primera porción de los datos que se pueden recopilar durante el proceso de electroporación. La primera sección del encabezado del archivo contiene el nombre del archivo ("2.1") y el número del animal ("2.2"). Los datos en columnas ("2.3") describen el pulso en secuencia, el tiempo de espera antes del pulso, el ancho del pulso y la corriente del pulso para cada uno de los tres electrodos. La Figura 2.4 ilustra una segunda porción de datos, que identifica la configuración de cada electrodo durante una secuencia de pulso dada. La Figura 2.5 ilustra una versión formateada de una tercera porción de datos sin procesar para la misma electroporación. El archivo se descarga desde el dispositivo EP de aspecto como un archivo CSV de Microsoft Excel. Los datos se copian y pegan en una plantilla de Microsoft Excel Spreadsheet. Las columnas en la hoja de cálculo representan el voltaje medido (V) y la corriente (amperios) durante el pulso de electroporación, así como la resistencia del tejido calculada (ohmios). Los datos descargados luego de que se usaron electrodos más pequeños en la piel de los cerdos produjeron casi el doble de resistencia que después de usar electrodos más grandes (700Ω a 2200Ω).

Ejemplo 3

Diseño de plásmidos, métodos de entrega y estudio experimental en cerdos

Construcción de plásmidos. pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA) utilizado en los experimentos descritos aquí, codifica una variante de desplazamiento hacia el rojo de GFP de tipo silvestre que se ha optimizado para una fluorescencia más brillante y una mayor expresión en células de mamíferos (excitación máxima = 488 nm; emisión máxima = 507 nm) pEGFP-N1 codifica la variante de GFPmutl que contiene la sustitución de doble aminoácido de

Phe-64 a Leu y Ser-65 a Thr. La secuencia de codificación del gen EGFP contiene más de 190 cambios de base silenciosos que corresponden a las preferencias de uso del codón humano. Las secuencias que flanquean EGFP se han convertido en un sitio de inicio de traducción por consenso de Kozak para aumentar aún más la eficiencia de traducción en células eucariotas. La poliadenilación de SV40 se señala corriente abajo del procesamiento directo adecuado del gen EGFP del extremo 3' del ARNm de EGFP. La columna del vector también contiene un origen de SV40 para la replicación en células de mamíferos que expresan el antígeno T de SV40. Un casete de resistencia a la neomicina (neor), que consiste en el promotor temprano SV40, el gen de resistencia a la neomicina/kanamicina de Tn5, y las señales de poliadenilación del gen timidina quinasa de Herpes simplex permiten la selección de células eucarióticas transfectadas de manera estable utilizando G418. Un promotor bacteriano corriente arriba de este casete expresa la resistencia a la kanamicina en *E. coli*. La columna de pEGFP-N1 también proporciona un origen de replicación pUC 19 para la propagación en *E. coli* y un origen f1 para la producción de ADN de cadena sencilla.

Condiciones de electroporación. Se utilizaron pulsos de onda cuadrada en todos los experimentos. Las condiciones de electroporación se establecen individualmente para cada experimento. En todos los casos, se utilizó una corriente constante de 0.1 a 0.4 amperios, con 2 o 3 pulsos, durante 20 o 52 milisegundos/pulso, y con un segundo entre pulsos. El dispositivo de electroporación del dispositivo EP de control de la piel (utilizado anteriormente para administrar biomoléculas al músculo esquelético) contenía una matriz circular (1 cm de diámetro) de cinco electrodos de aguja de acero inoxidable sólido igualmente espaciados, de 0.71 mm (calibre 21), montados en un material no conductor. Los electrodos de piel de la electroporación de la piel consisten de tres electrodos de aguja de acero inoxidable sólido de 0.404 mm (calibre 26), en una formación de triángulo isósceles (dos lados largos tienen una longitud de 5 mm y el lado corto tiene una longitud de 3 mm), montados en material no conductor.

Inyección intramuscular de ADN plásmido en cerdos. En los estudios de GFP se utilizaron cerdos jóvenes híbridos de género mixto, de tres a seis semanas de edad, con pesos entre 15 y 40 kg. Los animales se alojaron en corrales individuales con acceso ad libitum a alimentos 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) de bajo peso molecular purificado por HPLC (promedio de MW 10,900). En el día 0 del experimento, los animales se restringieron manualmente y la solución de plásmido GFP se inyectó directamente ID y/o SQ como se describe. Se colocó un tatuaje a 2 cm del centro en la esquina superior izquierda de un cuadrado donde se colocó el lugar de la inyección en el centro del cuadrado, de modo que cada sitio de inyección se pudiera identificar y diseccionar fácilmente. Todos los principales vasos sanguíneos de la superficie se evitaron al encontrar un sitio de inyección adecuado.

Colección de pieles. Los cerdos se desangraron y se identificaron los sitios de inyección. Un área de 2.5 cm² de la piel, tejido subcutáneo y una pequeña cantidad de músculo subyacente se diseccionaron inmediatamente en cada sitio de inyección. El área diseccionada se observó en una habitación oscura usando una luz UV a una longitud de onda de 365 nm.

Análisis fotográfico del área de expresión. Las muestras que demostraron suficiente fluorescencia se fotografiaron con una cámara digital. No se fotografiaron muestras con fluorescencia muy pequeña o ninguna. La fluorescencia se calificó en una escala de 0 a 5 por tres observadores cegados al tratamiento. Cero asignado a aquellos sin fluorescencia, 1 a los que se observó que tenían una fluorescencia muy pequeña observada pero no fotografiada, y 3 a 5 evaluados a partir de la fluorescencia fotografiada. Las muestras se guardaron para examen histológico.

Ejemplo 4.

Estudio comparativo

Se tabularon los datos de todas las condiciones probadas. La Figura 10 presenta solo las condiciones en las que los puntajes promedio fueron superiores o iguales a 2, mientras que el puntaje máximo posible es 5 (para la explicación de la puntuación, consulte el párrafo [0099]). Mientras que el siguiente grupo (segunda fila, Figura 10) tiene el mismo puntaje numérico, debe notarse que para la matriz de la piel ("MA") solo se usaron 50 µg de plásmido formulado en 50 µL, mientras que con la gran matriz ("LA"), se utilizó una cantidad doble, 100 µg de plásmido formulado en 100 µl. Además, al usar las condiciones optimizadas para la matriz de electrodos de la piel, el tiempo del procedimiento se redujo sustancialmente: el tiempo de procedimiento observado entre la inyección y el EP es de 4 segundos (ver columna siguiente, Figura 10) cuando se usa el MA, y 80 segundos cuando se usa el LA. Muchas otras condiciones para la dosis del plásmido, el volumen de la formulación, el tiempo de retraso, la amplitud de la corriente y la longitud del pulso se ensayaron y se presentan en la Figura 10. Como regla general, se encontró que un volumen más pequeño (soluciones más concentradas), con una dosis de plásmido adecuada, produce mejores resultados.

Ejemplo 5 Comparaciones de suministro intradérmico con suministro intramuscular en cerdos

Se compararon la entrega y la expresión de dosis concentradas de plásmido CMV-GHRH y CMV-SEAP entregados por vía intradérmica (ID) o intramuscular (IM) en cerdos. Los resultados demostraron qué método de administración produce la mayor expresión en cerdos utilizando ambas proteínas secretadas (SEAP, GHRH), así como probando la inmunogenicidad de SEAP en cerdos por primera vez.

Los animales se alojaron individualmente y se aclimataron durante 7 días. En el Día de estudio 0, los animales se pesaron y sangraron, luego se anestesiaron. Los cerdos (n = 4/grupo) se inyectaron con 1 mg de CMV-SEAP y CMV-GHRH + 0.1% de sal sódica de poli-L-glutamato a concentraciones variables e intensidades de corriente (Tabla 1). Después de 4 segundos, los animales se sometieron a electroporación usando el dispositivo de electroporación CELLECTRA™ (VGX Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA 19422) ((5 agujas, pulsos de 52 milisegundos, 1 segundo entre pulsos, 3 pulsos totales) con corriente variable (0.1 a 0.5 amperios). Se permitió que los cerdos se recuperaran de la anestesia y se monitorizaron durante 24 horas para asegurar la recuperación completa. Se observó cualquier animal que no se recuperó completamente en 2 a 3 horas después del tratamiento. Los cerdos se pesaron y sangraron los días 2, 4, 7, 9 y 11. La comida y el agua estaban disponibles ad libitum durante la duración del estudio. La sangre se recogió para SEAP, ELISA de anticuerpos SEAP, GHRH e IGF-1.

Tabla 1. Resumen del grupo experimental

Grupo	Plásmido	Dosis	Volumen de inyección	IM o ID	Corriente de EP	n=
1	CMV-SEAP CMV-GHRH	10 mg/mL	100 µL	ID	0.2 Amp	4
2	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 µL	ID	0.2 Amp	4
3	CMV-SEAP CMV-GHRH	10 mg/mL	100 µL	IM	0.5 Amp	4
4	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 µL	IM	0.5 Amp	4
5	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 µL	IM	0.4 Amp	4
6	CMV-SEAP CMV-GHRH	2 mg/mL	500 µL	IM	0.3 Amp	4
7	CMV-SEAP CMV-GHRH	10 mg/mL	100 µL	IM	0.1 Amp	4

La expresión de la SEAP se midió en muestras de suero utilizando un kit de ensayo químico de quimioluminiscencia Phospha-Light Chemiluminescent Reporter Assay Kit (Applied Biosystems, Bedford, MA), según las instrucciones del fabricante, como se ve en la Figura 12. El límite inferior de detección para el ensayo es 3pg/mL. Los niveles de SEAP fueron mayores en los grupos a los que se les administró plásmido diluido en comparación con el plásmido concentrado en animales inyectados IM sometidos a electroporación a 0.5 amperios (43% más, *P = 0.024). Se encontraron niveles muy bajos de proteína SEAP detectable en el suero de animales inyectados ID.

La SEAP utilizada en este estudio es una proteína humana y, por lo tanto, provoca una respuesta inmune en los cerdos. Se realizó la medición de la respuesta de anticuerpos utilizando un ELISA, y los resultados se pueden ver en el gráfico que se muestra en la Figura 13. La respuesta de anticuerpos en muestras de suero en el día 11 se graficó con los resultados de la SEAP en suero en el día 11. Las muestras de plásmidos concentrados dieron como resultado los títulos de anticuerpos medios más altos.

La expresión de GHRH se midió utilizando una hormona corriente abajo en el eje GHRH, el factor 1 de crecimiento tipo insulina o IGF-I. Los resultados se pueden ver en el gráfico que se muestra en la Figura 14. IGF-I es una proteína más estable en el suero y se puede medir fácilmente con el kit IGF-IRIA. Los niveles séricos de IGF-I en el día 11 posterior a la inyección fueron mayores en el grupo que recibió el plásmido IM no concentrado (D-IM-0.5 A) en comparación con el grupo que recibió el plásmido concentrado IM (C-IM-0.5 A).

Los resultados indican que el volumen y la vía de inyección desempeñan un papel muy importante en la expresión de proteínas expresadas y secretadas y en la inmunogenicidad contra esas proteínas. Hubo una diferencia significativa entre el ADN concentrado y el no concentrado en cuanto a la expresión frente a la inmunogenicidad.

La expresión de IGF-I fue mayor en animales inyectados IM y electroporados con una intensidad de corriente de 0.5 amperios. Las intensidades de corriente más bajas dieron niveles de expresión más bajos, pero el pequeño número de animales hizo la diferencia no estadísticamente diferente.

Ejemplo 6

Estudios de ep de piel en cerdos

Materiales y métodos

Animales

En los estudios preliminares (n = 5/grupo) se utilizaron cerdos híbridos jóvenes de género mixto, de tres a seis semanas de edad, con pesos entre 25 y 40 kg. Los animales se alojaron en Stillmeadow, Inc., Sugarland, TX, de acuerdo con los estándares de la Asociación Americana para la Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio. Los animales se agruparon en corrales con acceso ad libitum a alimentos y agua. Los animales se aclimataron durante 5 días antes del comienzo de los experimentos.

Plásmidos

Se usaron el vector básico pEGFP-N1 o pSEAP-2 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) en los experimentos 1 y 2, respectivamente. pEGFP-N1, utilizado en el experimento 1 (Exp. 1), codifica una variante de desplazamiento rojo de la proteína verde fluorescente de tipo silvestre (GFP) que se ha optimizado para una fluorescencia más brillante y una mayor expresión en células de mamíferos (excitación máxima = 488 nm; emisión máxima = 507 nm). Un promotor de citomegalovirus ubicuo (CMV) impulsó la expresión de una fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) en el vector básico pSEAP-2; este plásmido se usó en el experimento de cerdo 2 (Exp. 2). Los plásmidos se obtuvieron utilizando un kit disponible comercialmente (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, EE. UU.). Los niveles de endotoxinas estaban a menos de 0.01 EU/μg, medido por LAL cromogénico cinético (Endosafe, Charleston, SC). Las preparaciones de plásmidos se diluyeron en agua estéril y se formularon al 1% en peso/peso con sal sódica de poli-L-glutamato (MW = 10.5 kDa promedio) (Sigma, St. Louis, MO), HPLC adicional purificada en VGX Pharmaceuticals, División de terapéutica inmunológica (The Woodlands, TX).

Administración de plásmidos intradérmicos/subcutáneos (ID/SQ) y electroporación (EP)

En el día 0 del Exp. 1, los animales se pesaron y se anestesiaron con isoflurano (5% de inducción, 2-3% de mantenimiento). Se afeitaron y limpiaron cuidadosamente dos sitios de 3" x 3" en cada flanco. Se marcaron bloques de una pulgada con tinta de tatuaje para su posterior identificación. Cada inyección de plásmido se administró en el centro del bloque. Los animales recibieron inyecciones de ID/SQ; en diversas condiciones de EP (ver a continuación), volúmenes y dosis de inyección: dosis de plásmido, volumen de inyección (50 μg/50 μl, 50 μg/100 μl, 100 μg/100 μl, y 200 μg/100 μl), la amplitud de la corriente y la longitud del pulso variaron y las biopsias del área tratada fueron calificadas por un observador independiente ciego a las identidades de los grupos de tratamiento. Se tomaron fotografías de secciones de piel disecadas y se midió la fluorescencia 5 días después de la inyección. Se calculó una puntuación numérica basada en el área de distribución y la intensidad de fluorescencia, en comparación con la muestra con la expresión más alta (0 = sin fluorescencia, sin distribución; 5 = fluorescencia más brillante, mayor distribución). Los pulsos de onda cuadrada se utilizaron en todos los experimentos y se administraron utilizando un dispositivo EP cutáneo, el dispositivo CELLECTRA (TM) (VGX Pharmaceuticals, División de terapéutica inmunológica, The Woodlands, TX), que puede proporcionar una corriente constante de adaptación (corriente constante según la experiencia del tejido subyacente). En todos los casos, los parámetros adaptativos de corriente constante estuvieron entre 0.1 y 0.4 amperios, con 2 o 3 pulsos, durante 20 milisegundos/pulso o 52 milisegundos/pulso, y con un segundo entre pulsos.

Se utilizaron dos tipos de matrices en el Exp. 1: la matriz de electrodos utilizada anteriormente para EP intramuscular (IM) que es una matriz circular (1 cm de diámetro) de cinco electrodos de aguja de acero inoxidable sólido de calibre 21, igualmente espaciados, montados en un material no conductor; los electrodos de aguja de piel ID/SC consisten en tres electrodos de aguja de acero inoxidable sólido calibre 26, de 3 mm de longitud, colocados en forma de triángulo isósceles (dos lados largos tienen 5 mm de longitud y el lado corto tiene 3 mm de longitud), montado en material no conductor (ver también la Figura 17B).

En el Exp. 2, a los animales se les inyectaron ID/SQ y EP de piel con 1 mg de pSEAP, ya sea como una preparación plasmídica estándar a 2 mg/ml (500 μl, similar a una inyección TM), o como una preparación plasmídica concentrada a 10 mg/ml (100 μl) y la expresión de SEAP se midió hasta 11 días después de la administración del plásmido.

Recolección de sangre y ensayo SEAP.

En los días 0, 4, 7 y 11 del Exp. 2, los animales se pesaron a las 8:30 am y la sangre se recogió mediante punción de la vena yugular en tubos separadores de suero MICROTAINER. La sangre se dejó coagular durante 10 a 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3000 x g durante 10 min y el suero se almacenó a -80°C hasta un análisis adicional.

Las muestras de suero se descongelaron y se analizaron 50 μL para determinar la actividad de la SEAP usando el kit de ensayo de reportero quimioluminiscente Phospha-Light (Applied Biosystems, Bedford, MA), según las instrucciones del fabricante. El límite inferior de detección para el ensayo es 3pg/mL. Las muestras de suero más concentradas se diluyeron 1: 10 en suero de ratón antes de analizar la actividad SEAP. Todas las muestras se leyeron utilizando el luminómetro LUMIstar Galaxy (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania).

Resultados

Exp. 1.

5 Las puntuaciones más altas de GFP se lograron utilizando la matriz de electrodos de aguja de piel y el electrodo de IM. Sin embargo, los resultados óptimos con el electrodo IM requerían utilizar el doble de la dosis del plásmido a la concentración idéntica, 100 µg de plásmido formulado en 100 µL en comparación con solo 50 µg de plásmido formulado en 50 µl con el conjunto de electrodos de aguja de la piel (Figura 15). Además, utilizando los 0.2 amperios, 2 pulsos, 52 ms/pulso, 1 seg entre pulsos, que se determinaron como las condiciones optimizadas para el EP de la piel, el tiempo del procedimiento se redujo sustancialmente: el tiempo del procedimiento es de solo 4-5 segundos cuando se usa el dispositivo EP de piel, y 80 segundos cuando se usa la matriz IM. Como regla general, se encontró que un volumen más pequeño (soluciones más concentradas), con una dosis de plásmido adecuada, produce mejores resultados.

15 Exp. 2

Los cerdos se trataron utilizando las condiciones determinadas en el experimento anterior para ser óptimos para el suministro de plásmido ID/SQ junto con EP de piel, es decir, 0.2 Amperios, 2 pulsos, 52 ms/pulso, 1 seg entre pulsos. A los animales se les administró la misma cantidad de plásmidos, 1 mg de pSEAP, utilizando la formulación de pequeño volumen, o un volumen habitual para las inyecciones de EM + EP. Los valores de SEAP más altos se obtuvieron utilizando la preparación de plásmido concentrado y los volúmenes de inyección más bajos (Figura 16), $P < 0.05$. Estas condiciones se validaron adicionalmente en los experimentos con primates no humanos.

Ejemplo 7 experimentos con primate

25 Los macacos Rhesus se inmunizaron dos veces con una dosis baja de ADN (0.2 mg/antígeno) y luego se inmunizaron tres veces con una dosis alta de ADN (1.0 mg/antígeno) mediante inyección ID/SQ seguida de EP cutáneo. Las dos inmunizaciones de dosis bajas dieron como resultado respuestas inmunitarias celulares débiles según lo determinado por IFN γ ELISpot tanto en ID/SQ solo como en inyección ID/SQ seguida de grupos de EP (ID/SQ + EP) en la piel. Sin embargo, un aumento en la dosis de ADN reforzó las respuestas a 1,000 SFU/10⁶ PBMC en el grupo ID/SQ después de 3 inmunizaciones. El grupo ID + EP tuvo 50% más de células productoras de IFN γ que el grupo ID/SQ. El aumento de la inmunogenicidad en el grupo ID/SQ + EP también se observó en las respuestas de las células T de memoria con el grupo ID/SQ + EP que tiene el doble de células productoras de IFN γ específicas de antígeno que el grupo ID/SQ. La inmunización ID/SQ sola no dio lugar a una producción significativa de títulos de anticuerpos gag o env (título de punto final <50). Sin embargo, el suministro de plásmidos con EP dio lugar a títulos de punto final de gag pico de 8800 y títulos de punto final env de 1600. Finalmente, la coinmunización de la rIL-12 codificada por el plásmido también dio como resultado una respuesta inmunitaria polarizada T_H1 según lo determinado por un ensayo ELISpot de IL-4.

Materiales y Métodos

40 Animales

Macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), fueron alojados individualmente en BIOQUAL, Inc. (Rockville, MD), de acuerdo con los estándares de la Asociación Americana para la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio, con acceso ad libitum a alimentos y agua. Los animales se dejaron aclimatar durante al menos 30 días en cuarentena antes de cualquier experimentación.

Plásmidos

50 En este estudio se utilizaron los plásmidos pGag4Y, pEY2E1-B y WLV104. pGag4Y contiene un casete de expresión que codifica para una proteína gag de VIH. El gen Gag4Y se subclonó en el vector de expresión, pVax (Invitrogen, Carlsbad, CA), para un estudio adicional. pEY-2E1-B contiene un casete de expresión que codifica la envoltura del clado B de VIH. WLV104M es un plásmido que codifica un gen IL-12 de rhesus. Los plásmidos se obtuvieron utilizando un kit disponible comercialmente (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, EE. UU.). Los niveles de endotoxinas estaban a menos de 0.01 EU/µg, medido por Kinetic Chomagenic LAL (Endosafe, Charleston, SC). Las preparaciones de plásmidos se diluyeron en agua estéril y se formularon al 1% en peso/peso con sal sódica de poli-L-glutamato (MW = 10.5 kDa promedio) (Sigma, St. Louis, MO), HPLC adicional purificada en VGX Pharmaceuticals, División de terapéutica inmunológica, The Woodlands, TX.

60 Inmunización

Se administraron vacunas de ADN de VIH ID/SQ en primates no humanos con (n = 3/grupo) y sin (n = 3/grupo) EP, usando el dispositivo de EP de corriente constante adaptativa CELLECTRA™ (como en el Ejemplo 3, anterior) y las matrices de electrodos de aguja de piel. Las inmunizaciones se realizaron con cuatro semanas de diferencia, y los animales se sangraron cada dos semanas para medir las respuestas de anticuerpos y células T. Las dos primeras inmunizaciones proporcionaron 0.2 mg de cada uno de los dos antígenos de VIH. (gag y env) y el plásmido que

expresa IL-12 como adyuvante, en un volumen de 200 µl, dividido en 2 sitios de inyección ID/SQ por animal. Las dos inmunizaciones posteriores se realizaron utilizando 1 mg de cada vacuna VIH y plásmidos IL-12 (3 mg en total) a la concentración más alta del plásmido (10 mg/ml) para lograr la mayor dosis de plásmido en el mismo volumen que las dos inmunizaciones anteriores. Las condiciones de electroporación fueron de 0.2 amperios de corriente constante, 2 pulsos, 52 ms de longitud de pulso con 1 segundo entre pulsos.

Recolección de sangre

Los animales se sangraron cada dos semanas durante la duración del estudio. Se recogieron 10 ml de sangre en tubos de EDTA. Las PBMC se aislaron mediante centrifugación estándar con Ficoll-hypaque y luego se resuspendieron en medio de cultivo completo (RPMI 1640 con 2 mM/L de L-glutamina suplementada con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 55 µm/E de β-mercaptoetanol). Los glóbulos rojos se lisaron con tampón de lisis ACK (Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ).

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Se recubrieron placas de noventa y seis pocillos durante la noche con 100 ng/pocillo de VIH-1 IIB p24 o gp120 recombinante (ImmunoDiagnostics, Woburn, MA) para determinar las respuestas gag y env del VIH, respectivamente. Las placas recubiertas con 100 ng/pocillo de albúmina de suero bovino sirvieron como control negativo. Las placas se bloquearon con 3% de BSA-PBST durante 1 hora a 37 °C. Las placas se incubaron luego con diluciones séricas en serie de cuatro veces durante 1 hora a 37 °C. El anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante IgG antimono de cabra se añadió luego a una dilución 1: 10,000 (MP Biomedicals, Aurora, OH) a las placas y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se usó tetrametilbenzidina (R&D systems, Minneapolis, MN) para desarrollar las placas y se detuvieron las reacciones con H₂SO₄ 2N. Luego se midieron las densidades ópticas (OD).

Los títulos de punto final de IgG se definieron como la dilución de suero recíproco que dio como resultado valores de OD que fueron mayores que el doble del valor de OD promedio de los pocillos BSA.

Ensayo Immunospot ligado a enzimas (ELISpot)

Los ELISpot se realizaron utilizando anticuerpos de captura y detección de IFN γ o IL-4 (MabTech, Suecia). Las respuestas específicas de antígeno se determinaron restando el número de spot en los pocillos de control negativo de los pocillos que contienen péptidos. Los resultados se muestran como el valor medio (spot/millón de esplenocitos) obtenido para los pocillos por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos se analizan utilizando el software Prism Graphpad y se expresan como media \pm SEM.

Diseño de estudio de primates no humanos

Los macacos Rhesus se inmunizaron con construcciones de gag y env de VIH-1 optimizadas y Rhesus IL-12 codificado por plásmidos según el diseño especificado en la Figura 17A; el dispositivo utilizado en los experimentos con cerdos también se usó en primates no humanos (Figura 17B). Tres animales se inmunizaron mediante inyección de ID/SQ y tres animales se inmunizaron con inyección de ID/SQ seguida de electroporación de la piel (ID/SQ + EP). Los animales fueron inmunizados cinco veces en las semanas 0, 4, 8, 12, 16. La sangre se recolectó cada dos semanas y los ensayos ELISpot se realizaron dos semanas después de cada inmunización, mientras que los ensayos ELISA se realizaron cuatro semanas después de cada inmunización.

Análisis de ELISpot

La inducción de la respuesta inmunitaria celular después de cada inmunización se determinó mediante IFN γ ELISpot (Figura 18). Después de una inmunización de dosis baja de 0.2 mg por antígeno, los grupos ID/SQ e ID/SQ + EP tuvieron respuestas muy débiles (72 ± 11 SFU/10⁶ PBMC y 85 ± 34 SFU/10⁶ PBMC), respectivamente). Una segunda inmunización de dosis baja duplicó el número de células productoras de IFN γ en el grupo ID/SQ (173 ± 77 SFU/10⁶ PBMC) y triplicó la respuesta en el grupo ID/SQ + EP (287 ± 34 SFU/10⁶ PBMC). Habiendo observado una respuesta celular muy débil después de las dos inmunizaciones de dosis baja, utilizamos una dosis más alta (1 mg por antígeno) de ADN para las siguientes tres inmunizaciones. La respuesta inmune no aumentó significativamente con la tercera inmunización en el grupo ID/SQ (176 ± 72 SFU/10⁶ PBMC). Sin embargo, el grupo ID/SQ + EP se reforzó con la dosis más alta para duplicar la cantidad de células productoras de IFN γ específicas de antígeno (383 ± 162 SFU/10⁶ PBMC). Los animales se inmunizaron por cuarta vez con la dosis de 1 mg de ADN. Se observó un aumento de tres veces en la respuesta de IFN γ en el grupo ID/SQ en comparación con la inmunización previa (376 ± 210 SFU/10⁶ PBMC). Al igual que con la tercera inmunización, la administración de la dosis alta de ADN con EP de la piel resultó en una duplicación de la respuesta de IFN γ (1466 ± 762 SFU/10⁶ PBMC). Estos altos niveles de respuestas específicas de antígeno se mantuvieron a través de la inmunización final (1453 ± 873 SFU/10⁶ PBMC). La última inmunización duplicó aún más la cantidad de células productoras de IFN γ en el grupo ID/SQ (927 ± 191 SFU/10⁶ PBMC).

Respuestas de células T de memoria

5 La inducción de una respuesta de células T de memoria robusta es un aspecto importante de una vacuna exitosa. Para evaluar la población de células T de memoria inducida por las inmunizaciones de ADN ID/SQ, se realizó un análisis ELISpot 10 semanas después de la última vacunación con ADN (Figura 19). El grupo ID/SQ + EP tenía una respuesta de memoria IFN γ que era el doble de la magnitud del grupo ID/SQ (998 ± 290 y 449 ± 108 SFU/10⁶ PBMC, respectivamente).

10 Respuestas de células T T_{H2}

10 Los estudios que utilizan la pistola de genes para las inmunizaciones cutáneas han demostrado la inducción de respuestas de células T cargadas con T_{H2}. Sin embargo, se ha demostrado que esta carga podría revertirse a una respuesta T_{H1} si también se administrara la proteína IL-12. La administración conjunta de rhesus IL-12 en una inmunización con ADN de ID se realizó para determinar si su administración conjunta daría lugar a una inducción de respuesta cargada por T_{H1} (Figura 20). La inducción de respuestas T_{H2} específicas de antígeno se determinó mediante un ensayo ELISpot de IL-4 10 semanas después de la inmunización final. Todos los animales en el grupo ID/SQ solo tuvieron una respuesta negativa a IL-4 (> 50 SFU/10⁶ PBMC) y solo un animal en el grupo ID/SQ + EP tuvo una respuesta positiva a IL-4 (136 SFU/10⁶ PBMC), lo que sugiere una respuesta T_{H1} predominante.

20 Respuestas humorales

20 Una debilidad de las inmunizaciones de ADN radica en su incapacidad para inducir respuestas de anticuerpos en primates no humanos y en estudios clínicos en humanos. La capacidad de cada grupo para inducir los títulos de anticuerpos específicos de gag y env de VIH-I para antígenos p24 y gpl60 recombinantes se determinó mediante un ensayo ELISA (Figura 21). Para ambos antígenos, el grupo ID/SQ no mostró títulos de anticuerpos significativos (título de punto final <50). El grupo ID/SQ + EP desarrolló un bajo nivel de anticuerpos después de la segunda inmunización de dosis baja (título final: 100 ± 50). Sin embargo, se observó una mayor inducción de anticuerpos después de que la dosis de ADN administrada aumentara en la tercera inmunización con la dosis alta de ADN (2220 ± 1000). Los títulos de anticuerpos se reforzaron a través de la cuarta inmunización (8800 ± 4000). Las respuestas de los anticuerpos env también reflejaron los resultados que observamos con el antígeno gag, con el grupo ID/SQ que tiene títulos bajos (título de punto final <50) y el grupo ID/SQ + EP que alcanzó un título de punto final máximo de 1600 ± 800 .

Electroporación IM vs ID/SQ

35 Los macacos rhesus se inmunizaron tres veces con las mismas construcciones de gag, env y rhlIL-12 de VIH (como se discutió anteriormente) en 1.0 mg/mL por inmunización IM. Comparando la inducción de respuestas inmunes celulares, tanto la IM como la ruta ID/SQ tenían niveles similares de células productoras de IFN γ después de las dos primeras inmunizaciones. En contraste, la inmunización por ID/SQ + EP dio lugar a altos niveles de títulos de anticuerpos gag del VIH después de una inmunización de dosis alta en comparación con IM + EP. Después de dos inmunizaciones, el grupo ID/SQ + EP tenía títulos de punto final gag de VIH que eran el doble que los del grupo IM + EP.

45 En estos experimentos, utilizamos electrodos de aguja de piel para el suministro en el compartimiento ID/SQ, y comparamos la respuesta inmune resultante con las obtenidas después de IM + EP (consulte la Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de respuestas inmunes inducidas por electroporación a través de la ruta IM o ID/SQ. Se muestran los resultados de ELISA de IFN γ ELISpot y VIH gag tomados después de 3 inmunizaciones de dosis altas (1.0 mg/antígeno).

	IM	ID	IM+EP	ID+EP
ELISpot				
Total de respuestas gag y env (SFU/10 ⁶ PBMCs)				
1	136 \pm 51	95 \pm 38	482 \pm 181	635 \pm 171
2	223 \pm 76	376 \pm 210	1924 \pm 417	1466 \pm 762
3	2042 \pm 311	927 \pm 191	5300 \pm 378	1465 \pm 762
ELISA				
Título de punto final Gag				
1	<50	<50	150	2200
2	<50	<50	4800	8800
3	<50	<50	12800	2150

50

Ejemplo 8: vacunación con adn en ratones que utilizan ep de piel

A. Construcciones de plásmidos

5 Un promotor de citomegalovirus ubicuo (CMV) o un promotor sintético específico del músculo (SPc5-12) impulsa la expresión de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada por humanos (SEAP) en el Vector básico pSEAP-2 utilizado en los experimentos con ratones 1 y 3 (Exp. 1 y Exp. 3). Una variante de desplazamiento al rojo del plásmido que expresa proteína verde fluorescente verde (GFP), pEGFP-N1, que se ha optimizado para una fluorescencia más brillante y una mayor expresión en células de mamíferos (excitación máxima = 488 nm; emisión máxima = 507 nm).
 10 También se ha utilizado en los experimentos de gen reportero (Exp. 2). Los plásmidos se obtuvieron utilizando un kit disponible comercialmente (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). Los niveles de endotoxinas estaban a menos de 0.01 EU/μg, medido por Kinetic Chromagenic LAL (Endosafe, Charleston, SC). Las construcciones de HA y NA de consenso se generaron mediante el análisis de secuencias de virus primarios de 16 virus H5 que han resultado fatales para los humanos en los últimos años, y más de 40 virus N1 humanos. Estas secuencias se descargaron de la base de datos
 15 de secuencias de influenza del Laboratorio Nacional de Los Álamos. Después de generar las secuencias de consenso, las construcciones se optimizaron para la expresión de los mamíferos, incluida la adición de una secuencia Kozak, la optimización de codones y la optimización de ARN. Estas construcciones se subclonaron luego en el vector pVAX (Invitrogen, Carlsbad, CA). A menos que se indique lo contrario, las preparaciones de plásmidos se diluyeron en agua estéril y se formularon al 1% en peso/peso con sal sódica de poli-L-glutamato (LGS) (MW = 10.5 kDa promedio) (Sigma, St. Louis, MO), y se purificó por HPLC en VGX Pharmaceuticals, División de Terapéutica Inmune (The Woodlands, TX).

B. Experimentos de genes reporteros en ratones

25 Este estudio probó el suministro y la expresión de los plásmidos que expresan SEAP o EGFP para determinar qué parámetros de electroporación (corriente efectiva más baja), el tiempo de demora (tiempo entre la inyección y el inicio de la electroporación), la formulación y la expresión del impacto muscular objetivo y los niveles de anticuerpos. Los animales se sometieron a electroporación utilizando el dispositivo EP cutáneo CELLECTRA™ (incluido el uso de electrodos 3 x 0.4 mm (calibre 26) con corriente variable y tiempo de retardo para la inyección IM o ID.

30 En un primer experimento (Exp. 1), los grupos de ratones C57/B16 (n = 10/grupo) se inyectaron con 10 μg de un plásmido que expresaba SEAP bajo el control de un promotor sintético específico del músculo (pSPc5-12-SEAP) en el músculo tibial anterior (TA) o gastrocnemio (G) en un tiempo de retraso de 4 u 80 segundos y una corriente constante de 0.1 A. Un grupo de control recibió el plásmido en el TA sin EP (No EP). Grupos adicionales de animales recibieron en concentración equimolar un casete de expresión sin columna de plásmido (NB), pero promotor idéntico, transgén y señal de poliadenilación 3', en los músculos TA y G con y sin EP.

35 En el segundo experimento (Exp. 2), los grupos fueron ratones (n = 4) que fueron inyectados con 50 μg de pCMV-EGFP, en un volumen total de 5 o 25 μL, respectivamente, para una concentración de plásmido final de 10 mg/ml o 2 mg/ml, ya sea IM o ID. Se tomaron fotografías de piel disectada y secciones de músculos y se midió la fluorescencia 5 días después de la inyección. El área tratada fue calificada por un observador independiente ciego a las identidades de los grupos de tratamiento. Se calculó una puntuación numérica basada en el área de distribución y la intensidad de fluorescencia, en comparación con la muestra con la expresión más alta (0 = sin fluorescencia, sin distribución; 5 = fluorescencia más brillante, mayor distribución).

45 En el tercer experimento con ratones (Exp. 3), se utilizaron 16 grupos x 5 ratones por grupo para un total de 80 ratones (TABLA 2). Los ratones (n = 5/grupo) se inyectaron con 50 μg de CMV-SEAP (a 10 mg/ml) en formulaciones variables (solución salina, solución salina + 1% de LGS, agua, agua + 1% de LGS) e intensidades de corriente. Los animales se sometieron a electroporación con un tiempo de retardo de 4 segundos con una corriente variable (0.1 A a 0.2 A)
 50 para inyección IM en el músculo TA o G.

Tabla 2. Grupos para el Experimento de formulación CMV- SEAP en ratones (Exp. 3)

Grupo	Formulación	Cono (mg/mL)	Dosis Total (mg/anima l)	EP	n
1	Salina	10	50	0.2	5
2	Salina	10	50	0.1	5
3	Salina	10	50	0.2	5
4	Salina	10	50	0.1	5
5	Salina + LGS	10	50	0.2	5
6	Salina + LGS	10	50	0.1	5
7	Salina + LGS	10	50	0.2	5
8	Salina + LGS	10	50	0.1	5
9	Agua	10	50	0.2	5
10	Agua	10	50	0.1	5

11	Agua	10	50	0.2	5
12	Agua	10	50	0.1	5
13	Agua + LGS	10	50	0.2	5
14	Agua + LGS	10	50	0.1	5
15	Agua + LGS	10	50	0.2	5
16	Agua + LGS	10	50	0.1	5

En todos los casos, los animales se aclimataron durante 3 días, se pesaron y se les colocó una etiqueta en la oreja. La comida y el agua estaban disponibles ad libitum para la duración del experimento. En el Día de estudio 0, los animales se pesaron, se sangraron y se anestesiaron con la combinación de anestésico para roedores: xilazina (37.5 mg/ml; 0.05 ml/30 gramos de peso corporal), ketamina (1.9 mg/ml; 0.016 ml/10 gramos de peso corporal), Acepromazina (0.37 mg/ml; 0.025 ml/15 gramos de peso corporal), el plásmido se administró según el diseño y se sometió a electroporación. Para los Exp. 1 y 3, la sangre se recolectó a través de un sangrado retro-orbital y se dejó coagular. Toda la sangre recogida se centrifugó para aislar el suero y el plasma y luego se dividió en alícuotas en tubos en hielo para los ensayos SEAP y ELISA anti-SEAP, como se realizó previamente con modificaciones menores. Después del día 14, todos los animales se desangraron bajo un plano quirúrgico de anestesia.

C. análisis

15 Recolección de sangre

En los días 0, 4, 7 y 11, los ratones se pesaron y la sangre se extrajo mediante sangrado retro-orbital en tubos de microfuga, respectivamente. La sangre se dejó coagular durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se centrifugó a 3000xg durante 10 minutos y el suero se almacenó a -80 °C hasta un análisis posterior.

20 Ensayo SEAP

Las muestras de suero se descongelaron y se analizaron 50 µL para determinar la actividad de la SEAP como se describió anteriormente usando el Phospha-Light Chemiluminescent Reporter Assay Kit (Applied Biosystems, Bedford, MA), según las instrucciones del fabricante. El límite inferior de detección para el ensayo es de 3 pg/mL. Las muestras de suero más concentradas se diluyeron 1:10 en el suero de control específico de la especie antes de analizar la actividad de la SEAP. Todas las muestras se leyeron utilizando el luminómetro LUMIstar Galaxy (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania).

30 SEAP ELISA indirecto

La inmunogenicidad a la proteína SEAP humana se midió en ratones utilizando el siguiente procedimiento modificado. Las placas Nunc Maxisorb (Rochester, NY) se recubrieron con fosfatasa alcalina placentaria humana purificada en PBS (100 µl que contenía 100 nanogramos/pocillos de fosfatasa alcalina placentaria humana (Sigma)) durante la noche a 4 °C. Las placas se decantaron y lavaron tres veces. Las placas se bloquearon con BSA al 1% (Sigma) en Tween 20 al 0.05% en PBS (solución de bloqueo) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras de suero se diluyeron 1: 100 seguido de diluciones en serie de 1: 4 en BSA al 1% (Sigma) en Tween 20 al 0.05% en PBS en placas de dilución separadas. La solución de bloque se decantó de las placas. Se añadieron 100 µl de suero de ensayo diluido a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Las diluciones de suero se decantaron y lavaron tres veces. El anticuerpo secundario se diluyó (antirato de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante) 1: 1000 en BSA al 1% en Tween 20 al 0.05% en PBS y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Las placas se decantaron y lavaron. Se añadieron 100 µl de sustrato de o- fenilendiamina (OPD) por pocillo (0.67 mg/ml) en tampón de ácido cítrico 0.1 M y se incubaron durante 8 minutos; se añadieron 100 µl de H₂SO₄ 1 M para detener la reacción. La absorbancia se midió a 490 nm en el lector de placas Spectramax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

D. Resultados en ratones

La expresión de SEAP depende del músculo objetivo.

La expresión aumentó si la inyección de plásmido que expresa SEAP se administra en el TA (Figura 22) en comparación con el músculo G, tanto en el tiempo de retraso de 80s como de 4s entre la inyección y el EP usando el dispositivo EP de la piel. Cuando se inyectó el plásmido SPC5-12-SEAP en el músculo TA, los niveles séricos de SEAP fueron 285 veces más altos que en los animales de control que recibieron el plásmido en ausencia de EP (P <1.3 E-21); no se observó diferencia entre el tiempo de retraso de 80 y 4 segundos para el músculo TA (357 ± 6 vs. 357 ± 6.2 pg/ml/g); la inyección en condiciones idénticas en el músculo G dio como resultado niveles de SEAP de 90 a 182 veces más altos que los controles (G 80s versus ningún control EP, P <0.003; G 4s vs. ningún control EP, P <7.7 E-06). Cuando los fragmentos de plásmidos que contenían los casetes de expresión solo se inyectaron en la TA y G (sin columna (NB), pero promotor idéntico, transgén y señal de poliadenilación 3') en una formulación equimolar, los niveles

de expresión fueron 210-250 veces más altos que los controles que no recibieron IM + EP (80s vs. no EP, $P < 1.8 \times 10^{-8}$; 4s vs. no EP, $P < 3.8 \times 10^{-5}$). La expresión de SEAP en los TA 80 fue un 24% más alta que en el grupo NB 80 ($P < 0.008$), mientras que la TA 4 fue un 37% más alta que en el grupo NB 4 ($P < 0.004$). Ambos grupos administrados C5-12-SEAP y NB sin EP (No EP) demostraron una expresión de SEAP despreciable.

5 Expresión GFP

10 La expresión de GFP se visualizó después de una disección cuidadosa del sitio de inyección y se calificó por un observador cegado a los grupos de tratamiento. Las puntuaciones de GFP fueron más altas en los grupos que recibieron plásmido concentrado en ambos ID (4.63 ± 0.24 vs. 3.25 ± 0.14 , $P = 0.01$) e IM (4.75 ± 0.14 vs. 3 ± 0.54 , $P = 0.01$) animales inyectados versus plásmido no concentrado (Figura 23). En estos estudios, las formulaciones concentradas (hasta 10 mg/ml) se asociaron con una mayor expresión general. Sobre la base de los resultados de este experimento, los plásmidos se utilizaron a una concentración de 10 mg/ml en Exp. 3.

15 La expresión de SEAP depende de la formulación y la intensidad de la corriente.

20 Las diferencias en los niveles de SEAP se evaluaron cuando el transgén de SEAP está bajo el control de un promotor ubicuo (en comparación con un promotor específico de músculo como se usa en Exp. 1). De acuerdo con los experimentos previos, la expresión aumentó si el procedimiento de inyección de plásmido-EP se realiza en la TA (Figura 24) en comparación con el músculo G ($P = 0.05$). En este experimento particular, la formulación de solución salina + LGS resultó en niveles más altos de SEAP en suero en comparación con la formulación de solución salina (41.1 ± 7.9 pg/mL/g vs. 31.0 ± 5.9 pg/mL/g, respectivamente), aunque esto no alcanzó significancia estadística debido a la alta variabilidad intragrupo. En general, los animales sometidos a electroporación a una corriente de 0.1 A produjeron una expresión de SEAP ligeramente mayor que los animales que recibieron una formulación de plásmido LGS idéntica, administrada a una corriente constante de 0.2 A. Sin embargo, los animales que recibieron el plásmido 0.2 A formulado en agua produjeron niveles de SEAP significativamente más bajos que los que recibieron 0.1 A para el mismo músculo ($P < 0.05$ para TA y $P < 0.001$ para G). Cuando se agregó LGS a la formulación de agua, las diferencias no fueron significativas para el músculo TA, pero aún se mantuvieron para el músculo G ($P < 0.04$).

30 Inducción de anticuerpos anti-SEAP

35 La formulación del plásmido SEAP con solución salina + LGS produjo una mayor expresión de proteínas, sin embargo, los títulos de anticuerpos antiSEAP fueron más bajos en comparación con los animales inyectados con el plásmido SEAP formulado en agua + LGS (Figura 25), aunque esto no alcanzó significancia estadística debido a alta variabilidad intragrupo.

Ejemplo 9 comparaciones de suministro intradérmico con

Suministro intramuscular en primates.

40 Suero de PRIMATE

Títulos A/Vietnam/2003/04 HI sobre 1% de caballo RBC			
Grupo	ID Primate	Grupo de estudio	Título HI wk 6
	4497	C	80
H5 +M2	4498	C	80
IM			
CELLECTRA™	4499	C	40
1mg por plasma	4500	C	80
	4501	C	<20
	4250	D	160
H5 +M2	4251	D	80
ID			
CELLECTRA	4522	D	160
1 mg por plasma	4523	D	40
	4534	D	160
	4508	G	160
H5 + env + 2 HPV	4510	G	<20
IM solo	4511	G	<20
1 mg por plasmido	4512	G	<20
	4513	G	<20
	4529	H	<20
Control negativo	4530	H	<20

ES 2 703 744 T3

4531	H	<20
4532	H	<20
4533	H	<20
H5 suero de ref.		1,600
Construcciones de ADN		
1	VIH Env Clado A	
2	VIH Env Clado C	
3	VIH Env Clado D	
4	VIH Gag	
5	VIH Pol	
6	Flu H5	
7	Flu NA	
8	Flu M2 NP	
9	HPV 16 E6/E7	
	10	HPV 18 E6/E7
	11	IL12

Grupo estudio	de	Construcciones de ADN	No de Animales	Ruta de Admin	Dosis	Total D (mg)/A
A		ADN 1+2+3+4+5+11	5	IM CELLECTRA™ ID	1mg/Const	6
B		ADN 1+2+3+4+5+11	5	CELLECTRA™ IM	1mg/Const	6
C		ADN 6+9	5	CELLECTRA™ ID	1mg/Const	2
D		ADN 6+9	5	CELLECTRA™ IM	1mg/Const	2
E		ADN 7+8+10	5	CELLECTRA™ ID	1mg/Const	3
F		ADN 7+8+10	5	CELECTRA™	1mg/Const	3
G		ADN 1+6+9+10	5	IM Jeringa	1mg/Const	4
H		Control Negativo	5	N/A	1mg/Const	0
		TOTAL	40			

5 Los macacos Rhesus fueron inmunizados en estos estudios. Los animales se aclimataron durante 2 meses antes del comienzo de los experimentos. El estudio avanzó de la siguiente manera: Semana 0: se realizó la 1ª inmunización (administración de la dosis del plásmido) y el sangrado de referencia; La semana 2 se realizó sangrado; La semana 3 se realizó la 2ª inmunización (administración de dosis de plásmidos); La semana 5 se realizó sangrado; La semana 6 se realizó la 3ª inmunización (administración de la dosis del plásmido) y sangrado; la semana 8 se realizó sangrado.

10 Todos los plásmidos se formularon a 10 mg/ml en agua para inyección + 1% de LGS, como se describe en los ejemplos anteriores, y se mezclaron en una sola solución POR GRUPO(S) DE ESTUDIO (Grupos A-H, en la tabla anterior). Se calculó el volumen de inyección correcto para cada grupo designado IM CELLECTRA™ ID CELLECTRA™ IM Jeringa. Para la administración de ID, si el volumen de inyección requerido superaba los 100 µl por sitio, la formulación se dividió en varios sitios de inyección (2, 3 o 6, dependiendo de la cantidad total de mg de vacuna administrada). Los animales que recibieron la(s) inyección(es) de IM recibieron la formulación completa en un solo sitio.

15 El dispositivo de corriente constante adaptativo CELLECTRA™ utilizado en los experimentos con cerdos y en experimentos no humanos descritos en los ejemplos anteriores también se usó en estos experimentos con primates no humanos. Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: para los grupos de inyección IM y electroporación, las condiciones fueron: 0.5 amperios, 52 mseg/pulso, tres pulsos, 4 segundos de retraso entre la inyección de plásmidos y la electroporación. Para los grupos de inyección ID y electroporación, las condiciones fueron: 0.2 amperios, 52 mseg/pulso, tres pulsos, 4 segundos de retraso entre la inyección de plásmidos y la electroporación.

20 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI): los sueros de mono se trataron con una enzima que destruye el receptor (RDE) diluyendo una parte de suero con tres partes de enzima y se incubaron durante la noche en un baño de agua a 37 °C. La enzima se inactivó por 30 min de incubación a 56 °C seguido de la adición de seis partes de PBS para una dilución final de 1/10. Los ensayos HI se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en V, utilizando cuatro unidades HA de virus y 1% de glóbulos rojos de caballo. Los datos presentados aquí son los resultados después de la segunda inmunización (sangrado recolectado antes de la tercera inmunización).

30 Los aspectos y características de la presente divulgación se exponen en el siguiente número de cláusulas que contienen la materia objeto de las cláusulas de la solicitud parental tal como están presentadas.

35 1. Un dispositivo de electroporación configurado para suministrar a un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía que produce una corriente constante similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario, el dispositivo de electroporación que comprende:

un componente de electroporación capaz de suministrar el pulso de energía que produce la corriente constante en el tejido deseado, teniendo el componente de electroporación un mecanismo de retroalimentación;

5 un conjunto de electrodos de piel que incluye una matriz de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos de piel en una disposición espacial, en el que el conjunto de electrodos de piel recibe el pulso de energía del componente de electroporación y lo entrega al tejido deseado a través de los electrodos de piel;

10 en el que al menos uno de la pluralidad de electrodos de la piel es neutro durante el suministro del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado y comunica dicha impedancia al componente de electroporación; y

en el que el mecanismo de retroalimentación puede recibir la impedancia medida y puede ajustar el pulso de energía suministrado por el componente de electroporación para mantener la corriente constante.

15 2. El dispositivo de la cláusula 1, en el que el tejido deseado es tejido de la piel.

3. El dispositivo de la cláusula 1, en el que el tejido deseado es tejido subcutáneo o tejido intradérmico.

20 4. El dispositivo de la cláusula 3, en el que los electrodos de la piel son electrodos de aguja, varillas conductoras o áreas de película conductora.

5. El dispositivo de la cláusula 3, en el que los electrodos de la piel son electrodos de aguja.

25 6. El dispositivo de la cláusula 5, en el que los electrodos de aguja son capaces de entrar en contacto con un tejido intradérmico o subcutáneo sin penetrar sustancialmente en un tejido muscular.

7. El dispositivo de la cláusula 5, en el que el conjunto de electrodo de piel comprende además:

un interruptor activador, y un indicador de estado para informar la activación del conjunto de electrodo de piel.

30 8. El dispositivo de la cláusula 5, en el que la matriz de electrodos comprende al menos tres electrodos de piel.

9. El dispositivo de la cláusula 8, en el que los tres electrodos de piel tienen una disposición espacial que es un triángulo.

35 10. El dispositivo de la cláusula 9, en el que el triángulo es un triángulo isósceles.

11. El dispositivo de la cláusula 10, en el que el triángulo isósceles tiene lados de 5 mm de longitud y una base de 3 mm de longitud.

40 12. El dispositivo de la cláusula 5, en el que la pluralidad de electrodos de piel puede suministrar el pulso de energía en un patrón descentralizado.

45 13. El dispositivo de la cláusula 12, en el que la pluralidad de electrodos de piel puede administrar el pulso de energía en el patrón descentralizado a través del control de los electrodos de piel bajo una secuencia programada, la secuencia programada es ingresada por un usuario al componente de electroporación.

50 14. El dispositivo de la cláusula 13, en el que la secuencia programada comprende una pluralidad de pulsos administrados en secuencia, en donde cada pulso de la pluralidad de pulsos se administra mediante al menos dos electrodos de piel activos con un electrodo de piel neutra que mide la impedancia, y en donde el pulso subsiguiente de la pluralidad de pulsos es administrado por uno diferente de al menos dos electrodos activos de la piel con un electrodo de piel neutro que mide la impedancia.

55 15. El dispositivo de la cláusula 5, en el que el mecanismo de retroalimentación se realiza mediante hardware o software.

16. El dispositivo de la cláusula 5, en el que el mecanismo de retroalimentación se realiza mediante un circuito analógico de circuito cerrado.

60 17. El dispositivo de la cláusula 16, en el que el electrodo neutro mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al mecanismo de retroalimentación, y el mecanismo de retroalimentación responde a la impedancia y ajusta el pulso de energía para mantener la corriente constante en un valor similar a la corriente preestablecida.

65 18. El dispositivo de la cláusula 17, en el que el dispositivo de electroporación incluye una característica de seguridad, siendo la característica de seguridad un límite de voltaje que evita que el dispositivo entregue el pulso de energía al tejido cuando el ajuste al pulso de energía arrojaría un voltaje por encima del límite de voltaje

19. El dispositivo de la cláusula 17, en el que el mecanismo de retroalimentación mantiene la corriente constante de forma continua e instantánea durante el suministro del pulso de energía.
- 5 20. El dispositivo de la cláusula 19, que además comprende:
un controlador que recibe las entradas del usuario y controla el componente de electroporación para suministrar el pulso de energía de acuerdo con las entradas.
- 10 21. El dispositivo de la cláusula 3, que además comprende: un controlador que recibe las entradas del usuario y controla el componente de electroporación para suministrar el pulso de energía de acuerdo con las entradas.
- 15 22. El dispositivo de la cláusula 21, en el que el controlador es un microcontrolador de un solo chip.
23. El dispositivo de la cláusula 3, que comprende, además: un generador de forma de onda de corriente en comunicación con el componente de electroporación y en comunicación eléctrica con el conjunto de electrodo de piel; el generador de forma de onda de corriente genera una forma de onda de tren de pulso de corriente para suministrar a través del conjunto de electrodo de piel
- 20 24. El dispositivo de la cláusula 23, en el que el usuario ingresa una secuencia programada al componente de electroporación, que comunica la secuencia programada al generador de forma de onda de corriente; en el que el generador de forma de onda de corriente es capaz de generar la forma de onda del tren de pulso de corriente según la secuencia programada proporcionada.
- 25 25. El dispositivo de la cláusula 23, en el que el generador de forma de onda de corriente es un circuito analógico de transistor de potencia.
- 30 26. El dispositivo de la cláusula 3, que comprende además un probador de impedancia capaz de probar el establecimiento de una conexión eléctrica entre los electrodos de la piel y el tejido deseado.
- 35 27. El dispositivo de la cláusula 3, que comprende además un registrador de forma de onda en comunicación con el componente de electroporación.
28. El dispositivo de la cláusula 27, en el que el registrador de formas de onda es capaz de registrar el voltaje de la electroporación y las formas de onda de la corriente continuamente durante el suministro del pulso de energía.
- 40 29. El dispositivo de la cláusula 27, en el que el registrador de formas de onda es capaz de registrar el voltaje de la electroporación y las formas de onda de corriente a una velocidad de 2000 muestras por segundo.
30. El dispositivo de la cláusula 3, que comprende además un dispositivo de entrada en comunicación directa con el usuario y el componente de electroporación, el dispositivo de entrada capaz de recibir comandos de entrada y comunicar los comandos de entrada al componente de electroporación.
- 45 31. El dispositivo de la cláusula 30, en el que el dispositivo de entrada es un teclado numérico o una pantalla táctil.
32. El dispositivo de la cláusula 3, que comprende además un elemento de informe de estado en comunicación con el componente de electroporación.
- 50 33. El dispositivo de la cláusula 32, en el que el elemento de informe de estado es un panel de visualización de información, una notificación audible, un diodo emisor de luz, o una combinación de ellos.
34. El dispositivo de la cláusula 33, en el que el elemento de informe de estado informa la confirmación de la generación de pulsos de energía y el suministro de la corriente constante.
- 55 35. El dispositivo de la cláusula 3, que comprende además un puerto de comunicación en comunicación con el componente de electroporación.
36. El dispositivo de la cláusula 3, que comprende además un componente de memoria en comunicación con el componente de electroporación.
- 60 37. El dispositivo de la cláusula 3, que comprende además una fuente de alimentación en comunicación con el componente de electroporación.
38. El dispositivo de la cláusula 37, en el que la fuente de alimentación es una batería.
- 65 39. El dispositivo de la cláusula 3, en el que la matriz de electrodos es desechable y está conectada de manera extraíble al conjunto de electrodos de piel.

40. El dispositivo de la cláusula 39, en el que el conjunto de electrodos desechables es un disco de electrodos de piel.
41. El dispositivo de la cláusula 40, en el que el disco del electrodo de la piel es esterilizable.
- 5 42. El dispositivo de la cláusula 6, en el que el componente de electroporación comprende:
- un controlador
- un generador de forma de onda en comunicación electrónica con el controlador;
- 10 un registrador de formas de onda en comunicación electrónica con el controlador; y
- una batería conectada eléctricamente al generador de forma de onda; donde
- 15 el controlador recibe una entrada del usuario, le indica al generador de formas de onda que envíe el pulso de energía al tejido deseado de acuerdo con la entrada y comunica los datos al registrador de formas de onda de acuerdo con el pulso de energía suministrado; y en donde
- 20 la batería envía una carga eléctrica al generador de forma de onda, la batería es una batería de ion litio, hidruro de níquel metálico, ácido de plomo o níquel-cadmio.
43. El dispositivo de la cláusula 42, en el que el dispositivo es portátil.
44. Un conjunto de asa de electroporación configurado para suministrar un pulso de energía a un tejido deseado de un mamífero para producir una corriente constante en el tejido deseado similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario, que comprende:
- 25 una matriz de electrodos de piel que tiene una pluralidad de electrodos de piel en una disposición espacial, en donde al menos uno de los electrodos de piel es neutro durante el suministro del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado;
- 30 un controlador en comunicación con la matriz de electrodos de la piel, el controlador controla el suministro del pulso de energía a través de los electrodos de la piel; y
- 35 un medio para realizar un mecanismo de retroalimentación, en el que el mecanismo de retroalimentación se realiza mediante software o hardware, que recibe la impedancia medida desde el electrodo neutro de la piel y ajusta el pulso de energía suministrada, si es necesario, para mantener la corriente constante.
45. El conjunto de asa de la cláusula 44, en el que el conjunto de electrodos de piel es desechable y está unido de manera extraíble al conjunto de asa.
- 40 46. El conjunto de asa de la cláusula 44, en el que la matriz de electrodos de piel comprende tres electrodos de piel dispuestos espacialmente en un triángulo.
- 45 47. El conjunto de asa de la cláusula 44, en el que los electrodos de piel tienen una longitud de 5 mm y un calibre 26.
48. El conjunto de asa de la cláusula 44, en el que, durante el suministro de un pulso de energía, al menos dos de la pluralidad de electrodos de la piel están activos y uno de la pluralidad de electrodos de la piel es neutro.
- 50 49. Un método para administrar un pulso de energía al tejido cutáneo deseado en un mamífero para provocar que se produzca la electroporación en las células de dicho tejido deseado utilizando un dispositivo de electroporación configurado para administrar el pulso de energía, produciendo una corriente constante similar a una entrada de corriente predeterminada por un usuario, que comprende:
- 55 insertar una pluralidad de electrodos de piel de aguja en el tejido de la piel sin penetrar sustancialmente en el tejido muscular; y aplicar el pulso de energía a la pluralidad de electrodos de piel de aguja para suministrar una corriente igual a la corriente preestablecida en el tejido de la piel;
- 60 medir la impedancia del tejido de la piel con uno neutral de la pluralidad de electrodos de piel de aguja y utilizando un mecanismo de retroalimentación en el dispositivo de electroporación para ajustar el pulso de energía aplicado en respuesta a la impedancia medida para mantener constante la corriente suministrada al tejido de la piel.
50. El método de la cláusula 49, en el que el tejido cutáneo deseado es un tejido subcutáneo o intradérmico.
- 65

51. El método de la cláusula 50, que además comprende:

5 medir la impedancia antes de aplicar el pulso de energía para determinar si se hace contacto eléctrico entre el tejido cutáneo deseado y los electrodos de piel de aguja.

52. El método de la cláusula 50, en el que al menos una vacuna de ADN está en contacto con dicho tejido intradérmico o subcutáneo.

10 53. El método de la cláusula 49, que comprende además el registro de los datos compilados por el dispositivo de electroporación desde la entrega del pulso de energía al tejido cutáneo deseado.

54. Un método que comprende los pasos de:

15 proporcionar un conjunto de electrodo de piel que tiene una pluralidad de electrodos de piel de aguja, el conjunto de electrodo de piel en comunicación eléctrica con un generador de forma de onda de corriente; poner en contacto el tejido de la piel de un mamífero con la pluralidad de electrodos de piel de aguja sin penetrar sustancialmente en el tejido muscular del mamífero; y

20 aplicar un pulso eléctrico de energía desde el generador de forma de onda de corriente a la pluralidad de electrodos de piel de aguja durante un tiempo y en condiciones efectivas para exponer el tejido de la piel en contacto con una corriente sustancialmente constante.

55. El método de la cláusula 54, en el que la aplicación de la etapa del pulso eléctrico de energía comprende:

25 medir la impedancia en el tejido de la piel contactado con uno neutro de la pluralidad de electrodos de piel de aguja; comunicar la impedancia medida a un mecanismo de retroalimentación en comunicación eléctrica con el generador de forma de onda de corriente, en donde el mecanismo de retroalimentación ajusta el pulso de energía suministrado desde el generador de forma de onda de corriente en respuesta a la impedancia medida para mantener la corriente sustancialmente constante.

30 56. El método de la cláusula 55, en el que el mecanismo de retroalimentación se realiza mediante un circuito analógico de circuito cerrado que forma parte del dispositivo de electroporación, y en el que las etapas de medición y comunicación se realizan instantáneamente a lo largo de la duración del pulso de energía.

35 57. El método de la cláusula 54, que además comprende establecer una característica de seguridad, la característica de seguridad es un límite de voltaje que evita que el dispositivo entregue el pulso de energía al tejido cuando el ajuste al pulso de energía arrojaría un voltaje por encima del límite de voltaje.

40 58. El método de la cláusula 54, que además comprende establecer una característica de seguridad, la característica de seguridad es un límite de voltaje que evita que el dispositivo entregue el pulso de energía al tejido cuando el ajuste al pulso de energía arrojaría un voltaje por encima del límite de voltaje.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjunto de asa de electroporación configurado para suministrar un pulso de energía a un tejido deseado de un mamífero para producir una corriente constante en el tejido deseado similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario, que comprende:
- una matriz de electrodos de piel que tiene una pluralidad de electrodos de piel en una disposición espacial; y
- 10 un controlador en comunicación con la matriz de electrodos de la piel, el controlador controla el suministro del pulso de energía a través de los electrodos de la piel;
- 15 caracterizado porque al menos uno de los electrodos de la piel en la matriz de electrodos de la piel es neutral durante el suministro del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado, y el conjunto de asa de electroporación comprende además un medio para realizar un mecanismo de retroalimentación, en el que el mecanismo de retroalimentación se realiza mediante software o hardware, que recibe la impedancia medida desde el electrodo neutro de la piel y ajusta el pulso de energía suministrada, si es necesario, para mantener la corriente constante.
- 20 2. El conjunto de asa de la reivindicación 1, en el que el conjunto de electrodos de piel es desechable y está unido de forma extraíble al conjunto de asa.
3. El conjunto de asa de la reivindicación 1, en el que la matriz de electrodos de piel comprende tres electrodos de piel dispuestos espacialmente en un triángulo.
- 25 4. El conjunto de asa de la reivindicación 1, en el que los electrodos de piel son de 5 mm de longitud y 0.404 mm de diámetro (calibre 26).
5. El conjunto de asa de la reivindicación 1, en el que durante el suministro de un pulso de energía al menos dos de la pluralidad de electrodos de la piel son activos y uno de la pluralidad de electrodos de la piel es neutro.

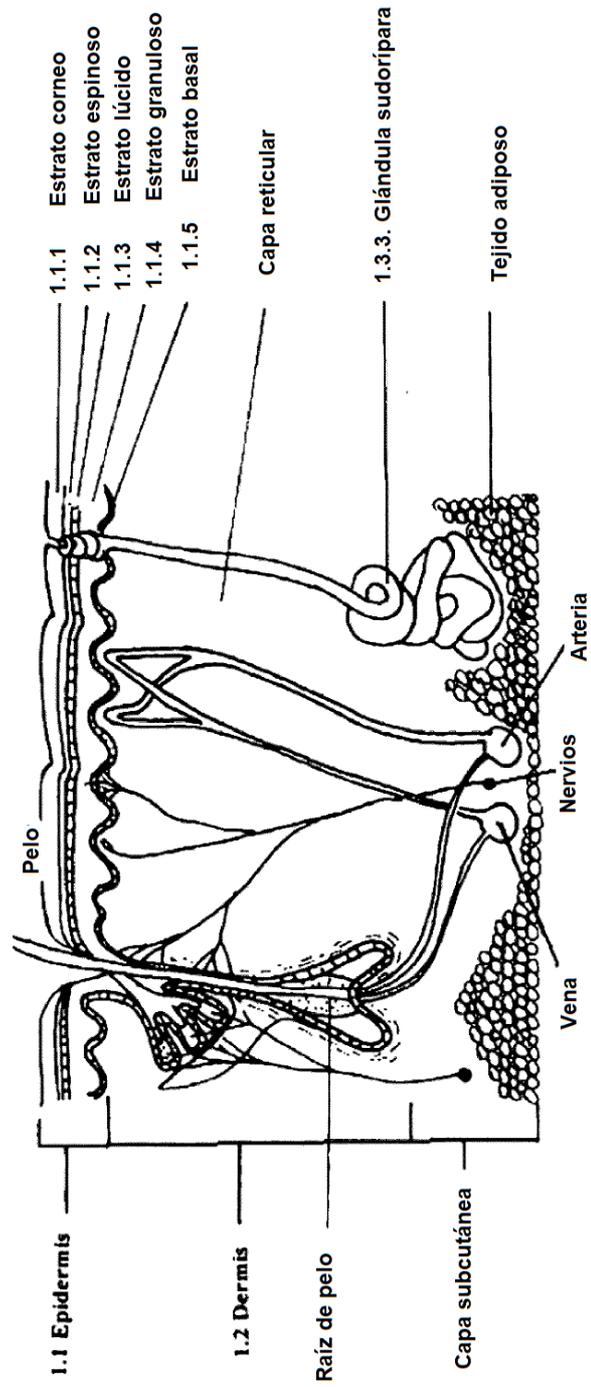


FIGURA 1

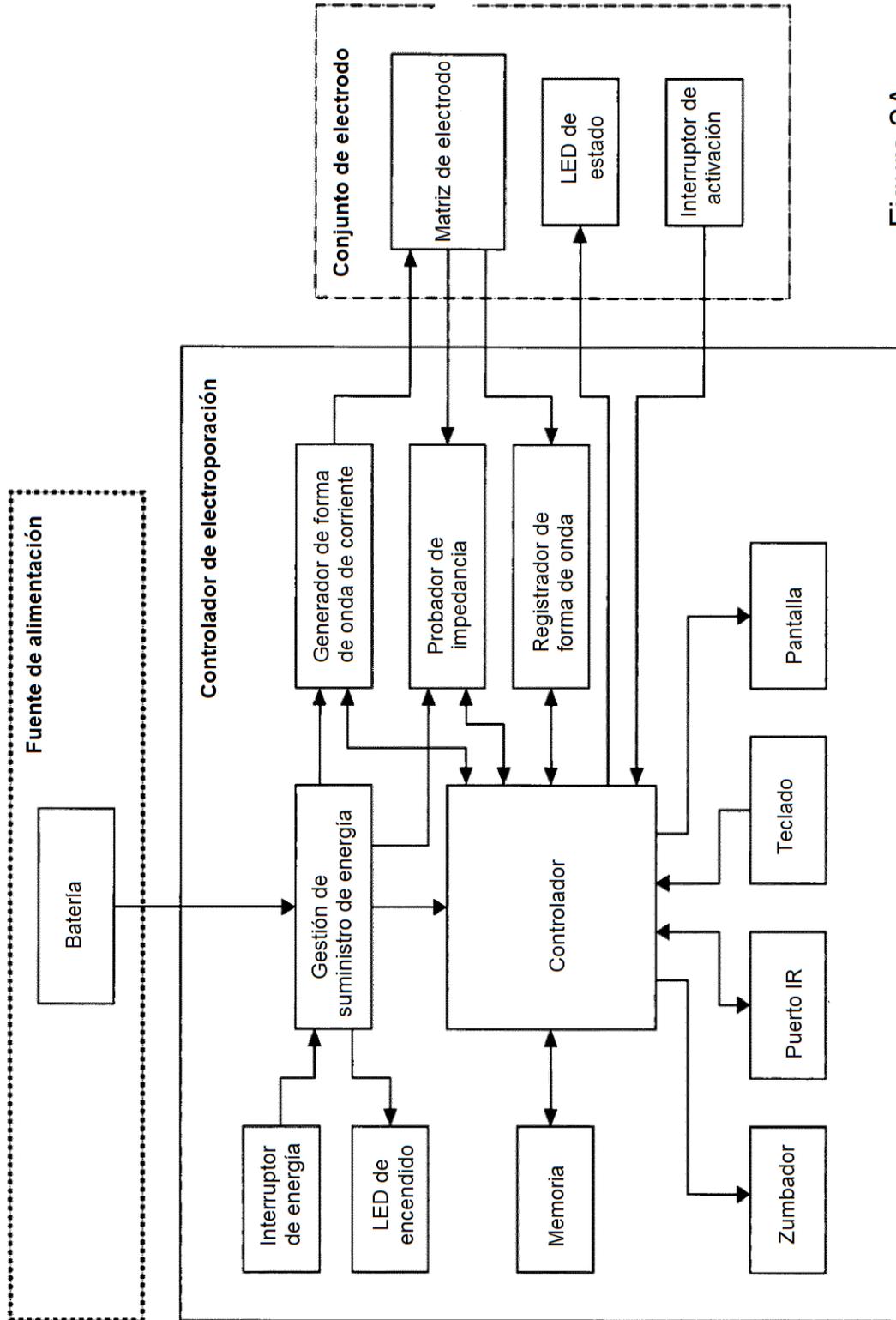


Figura 2A

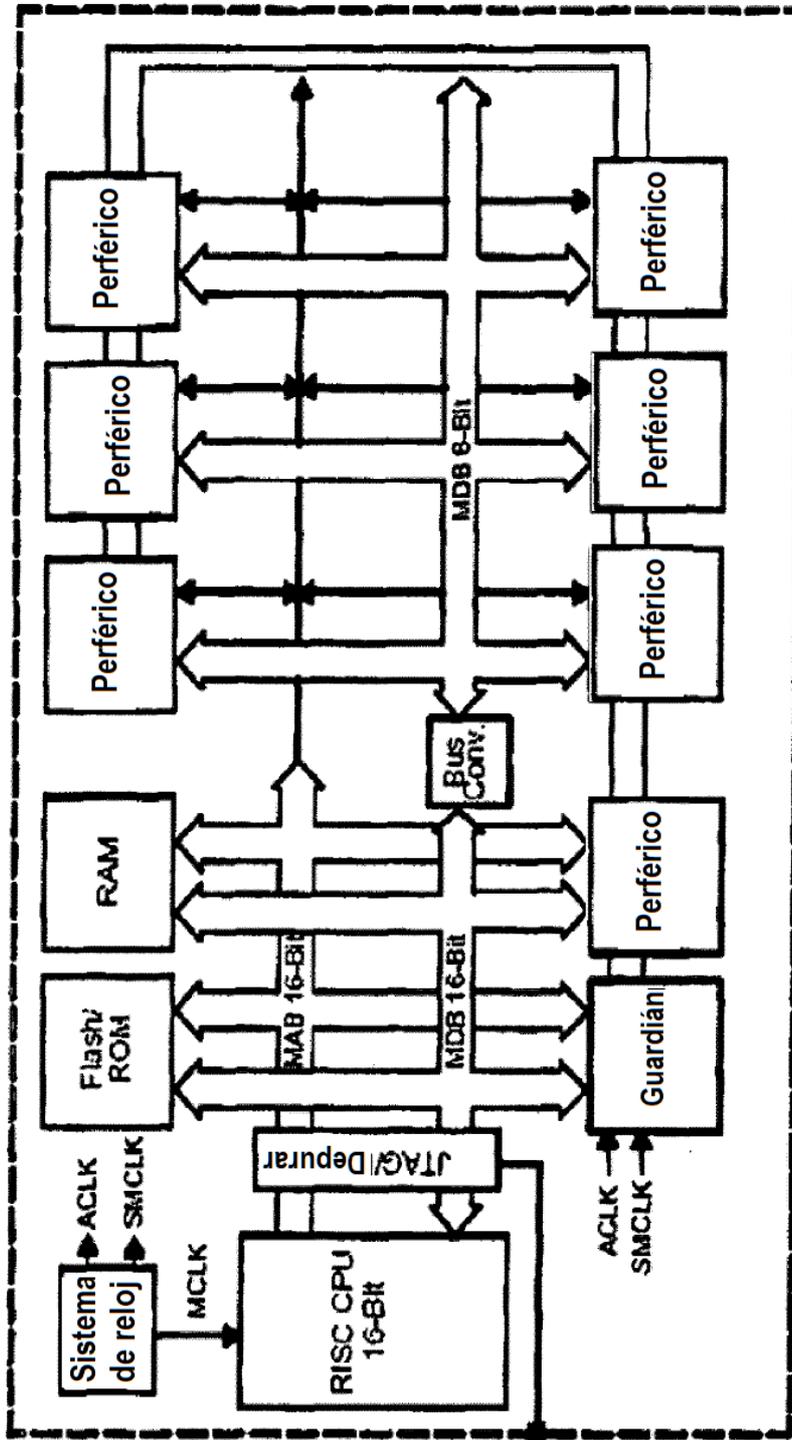


Figura 2B

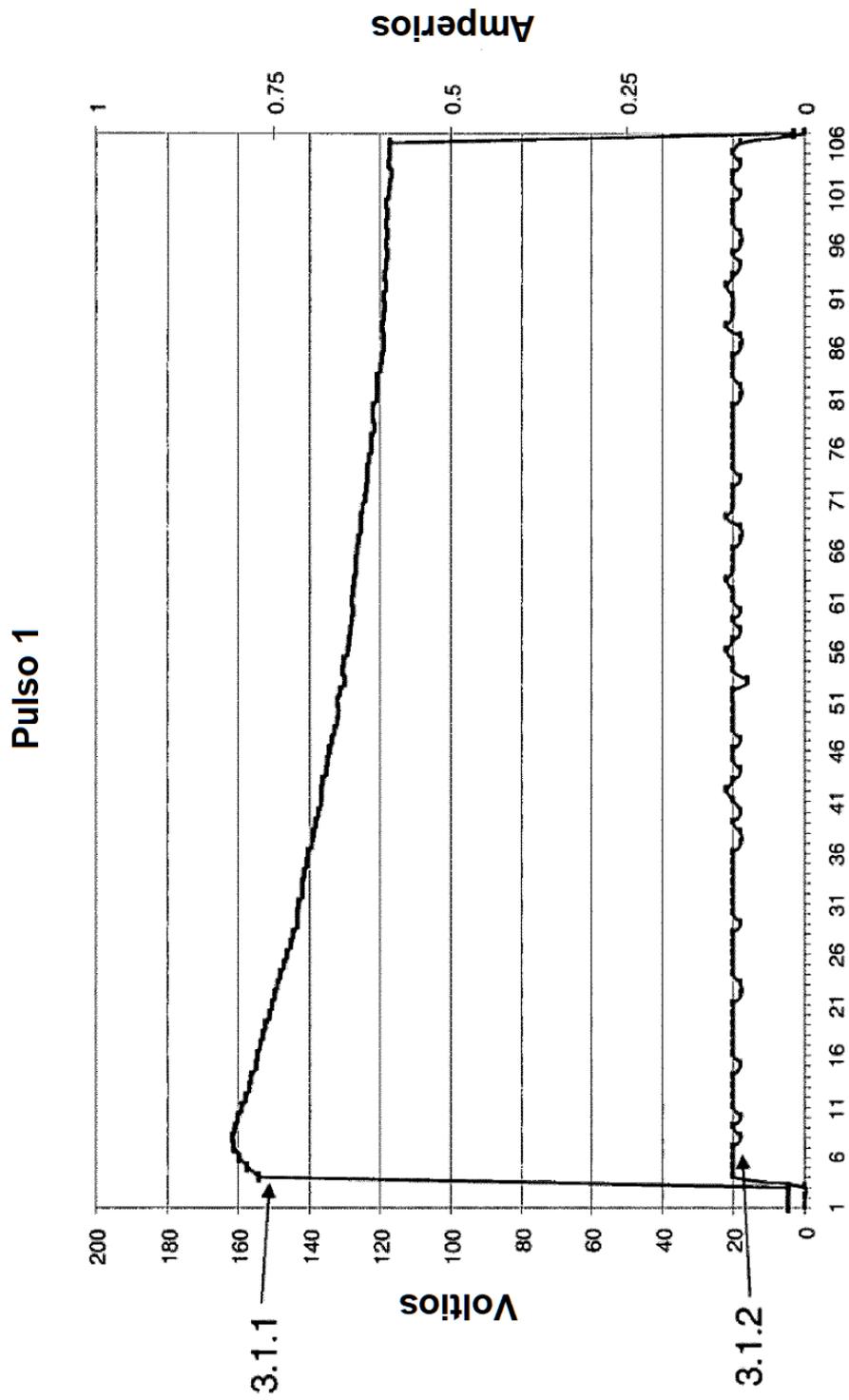


FIGURA 3.1

Pulso 2



FIGURA 3.2

Pulso 1 Z

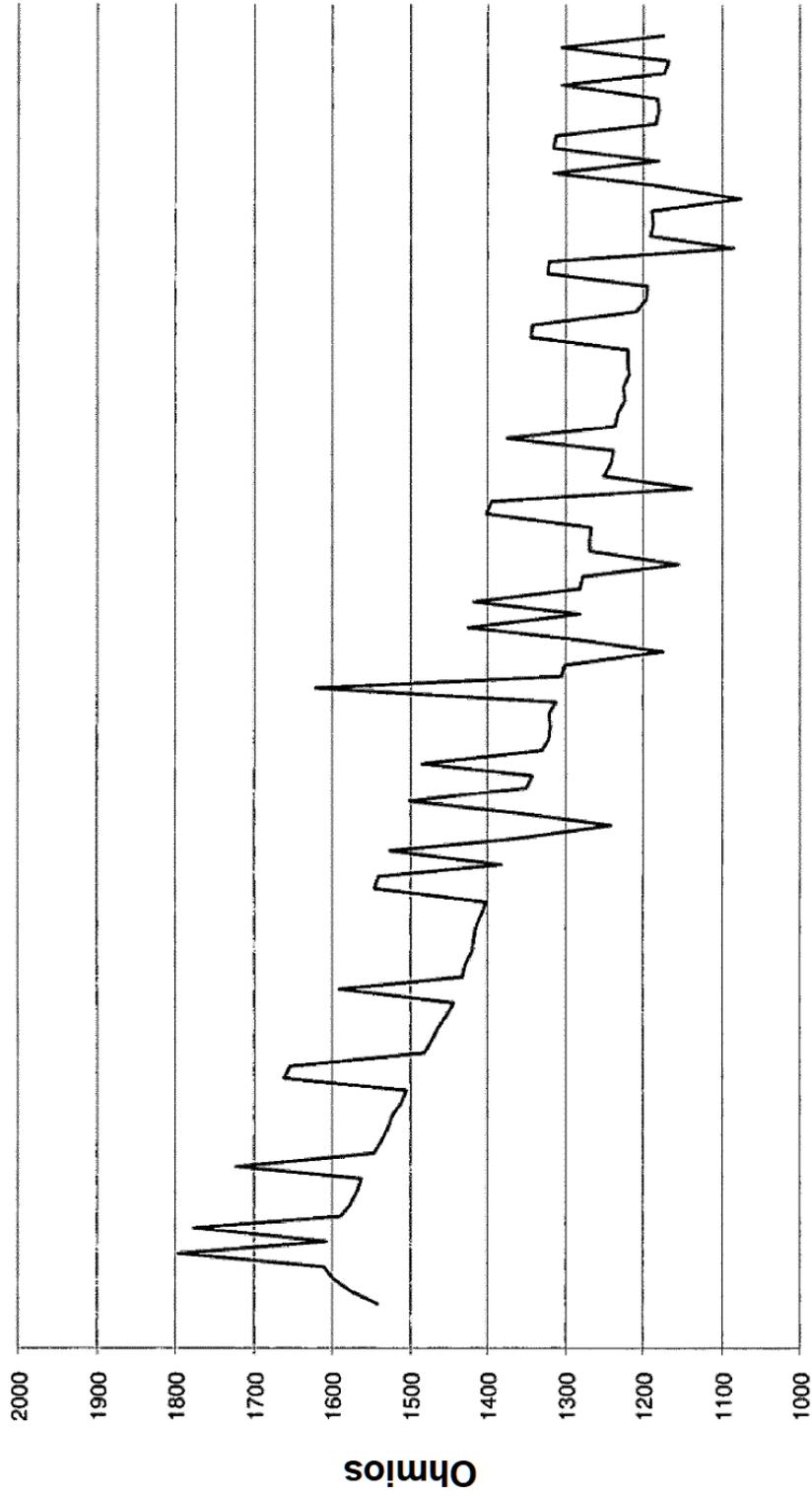


FIGURA 3.3

Pulso 2 Z

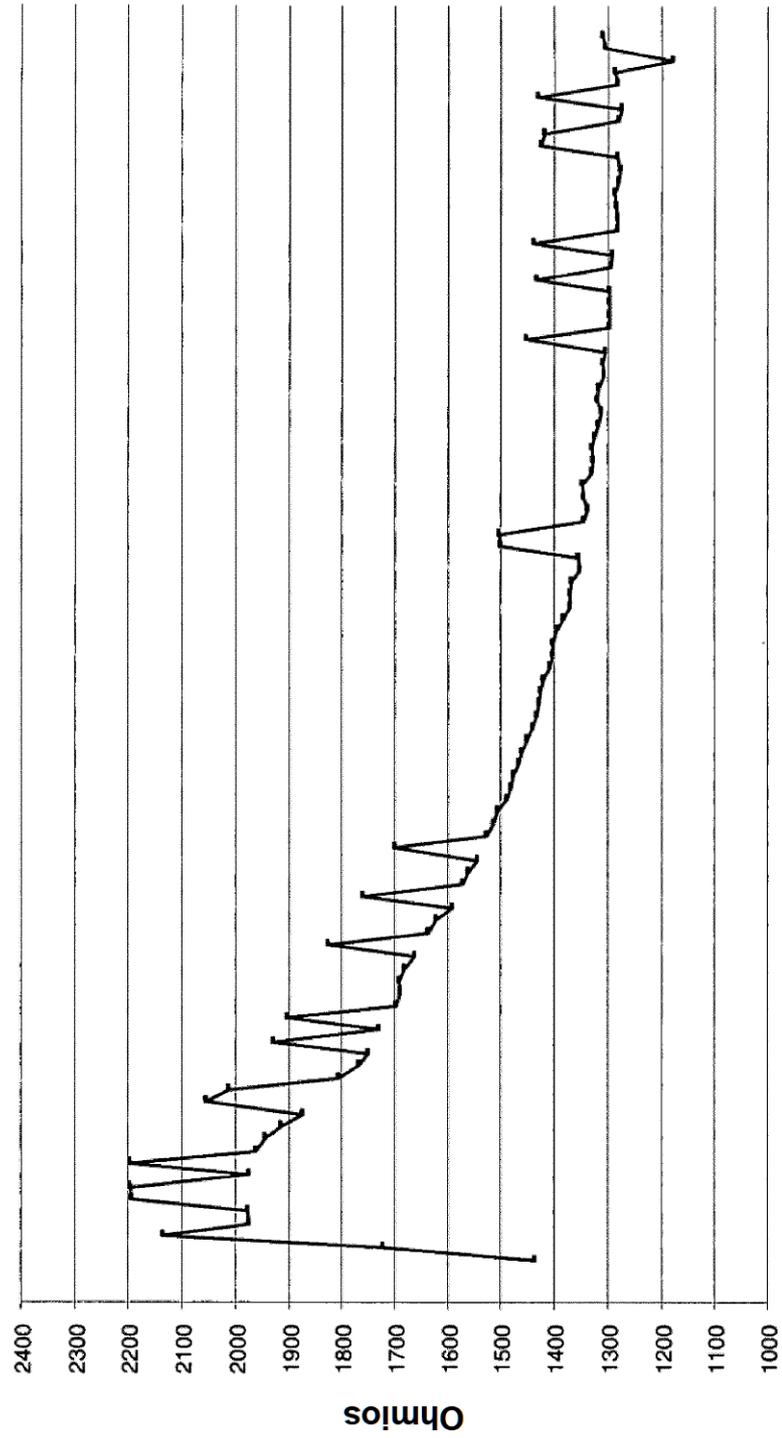


FIGURA 3.4

Pulso 1

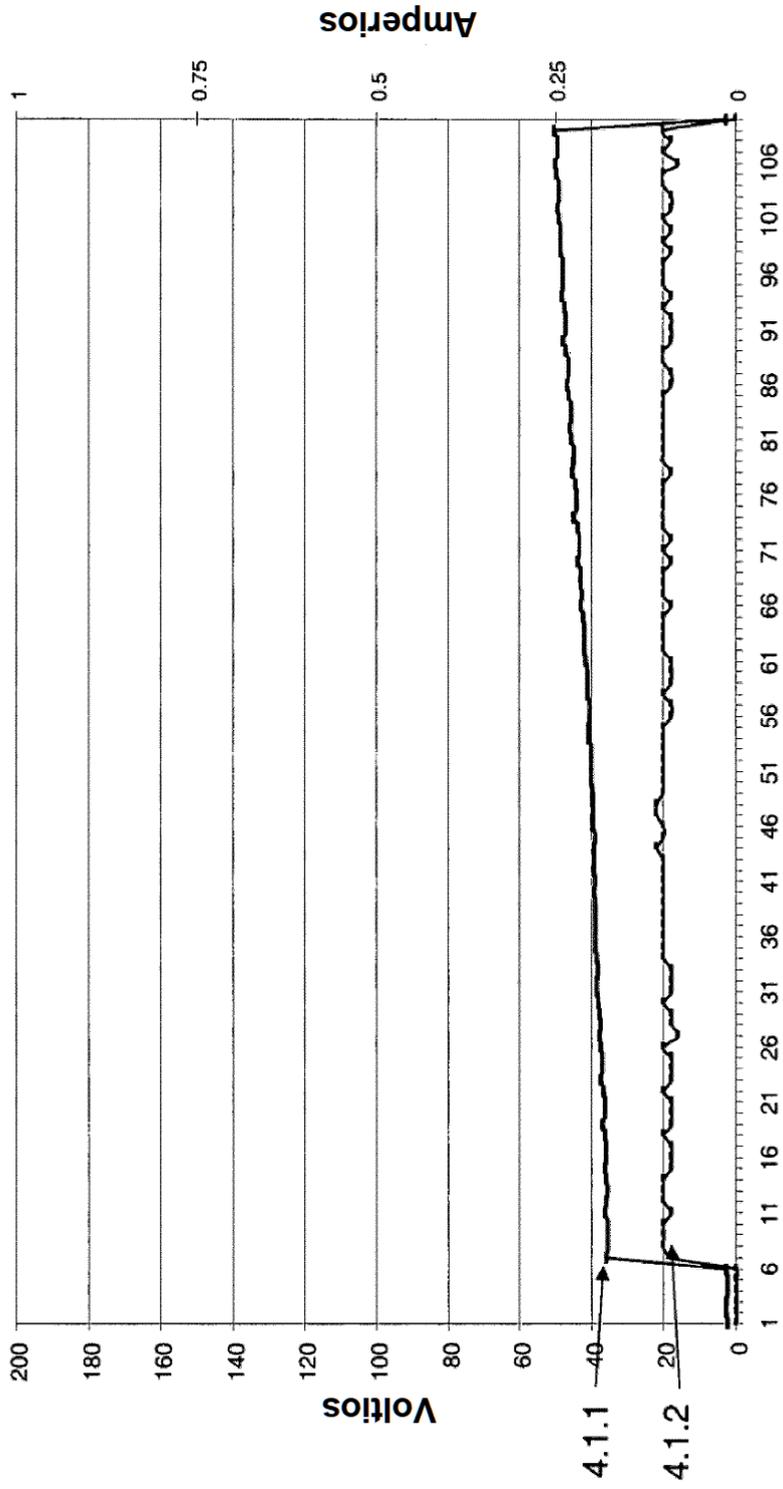


FIGURA 4.1

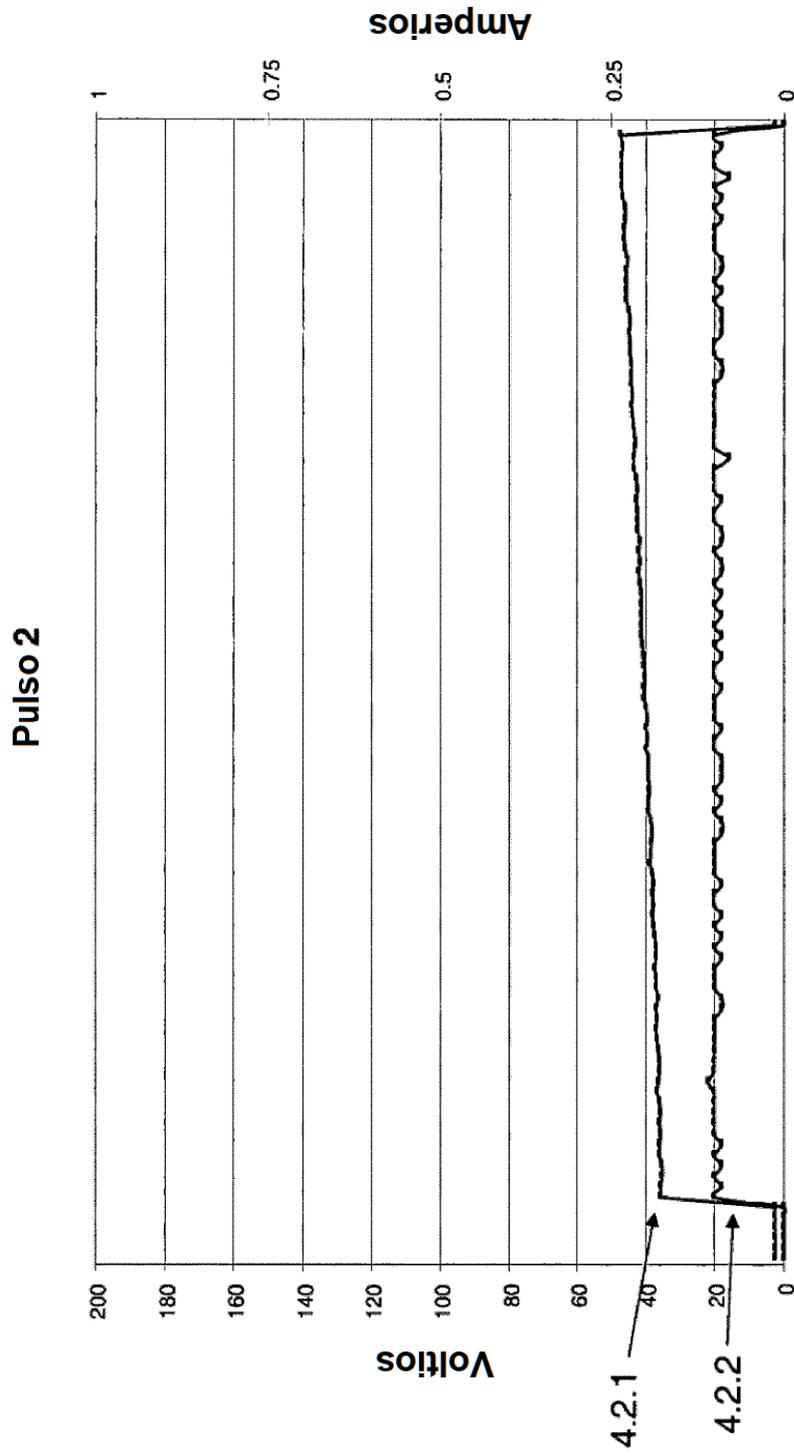


FIGURA 4.2

Pulso 3

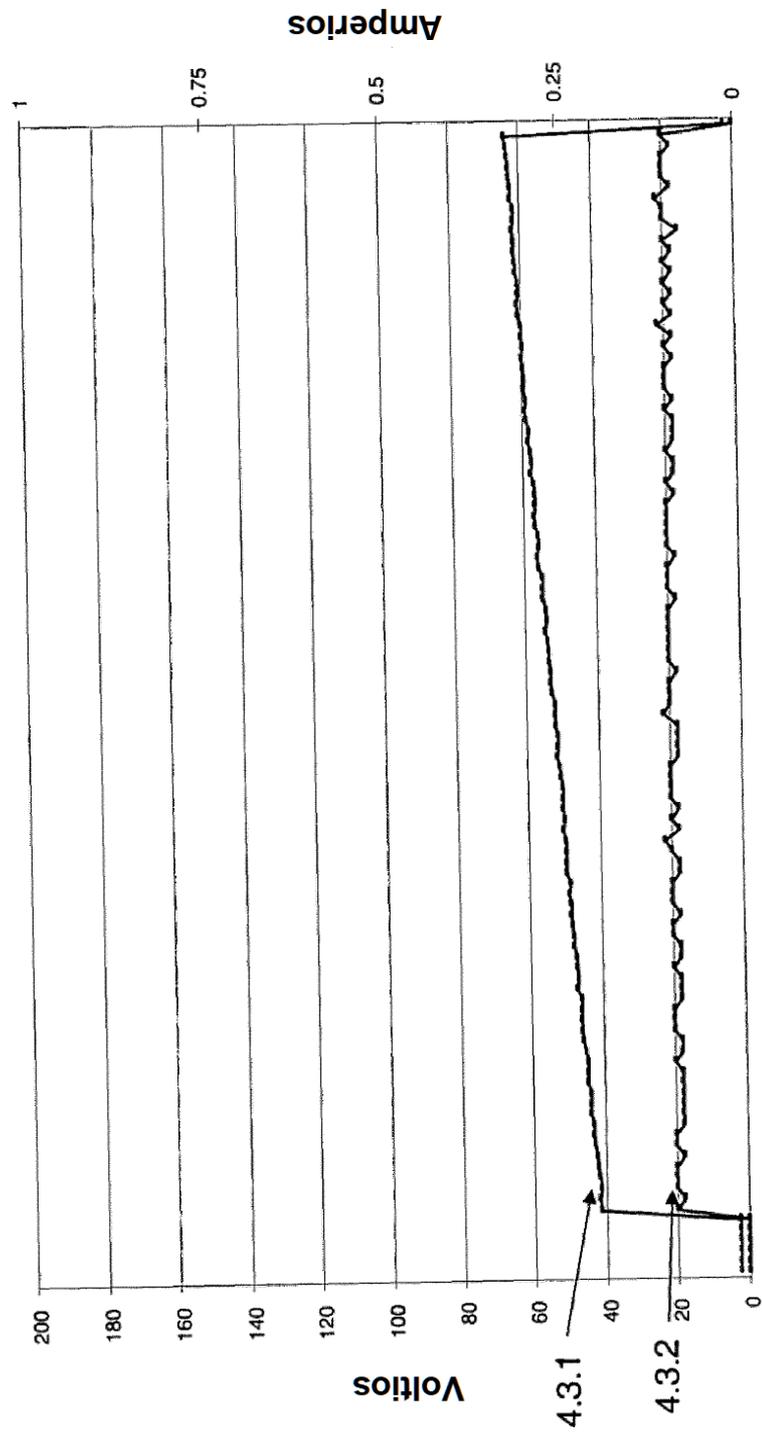


FIGURA 4.3

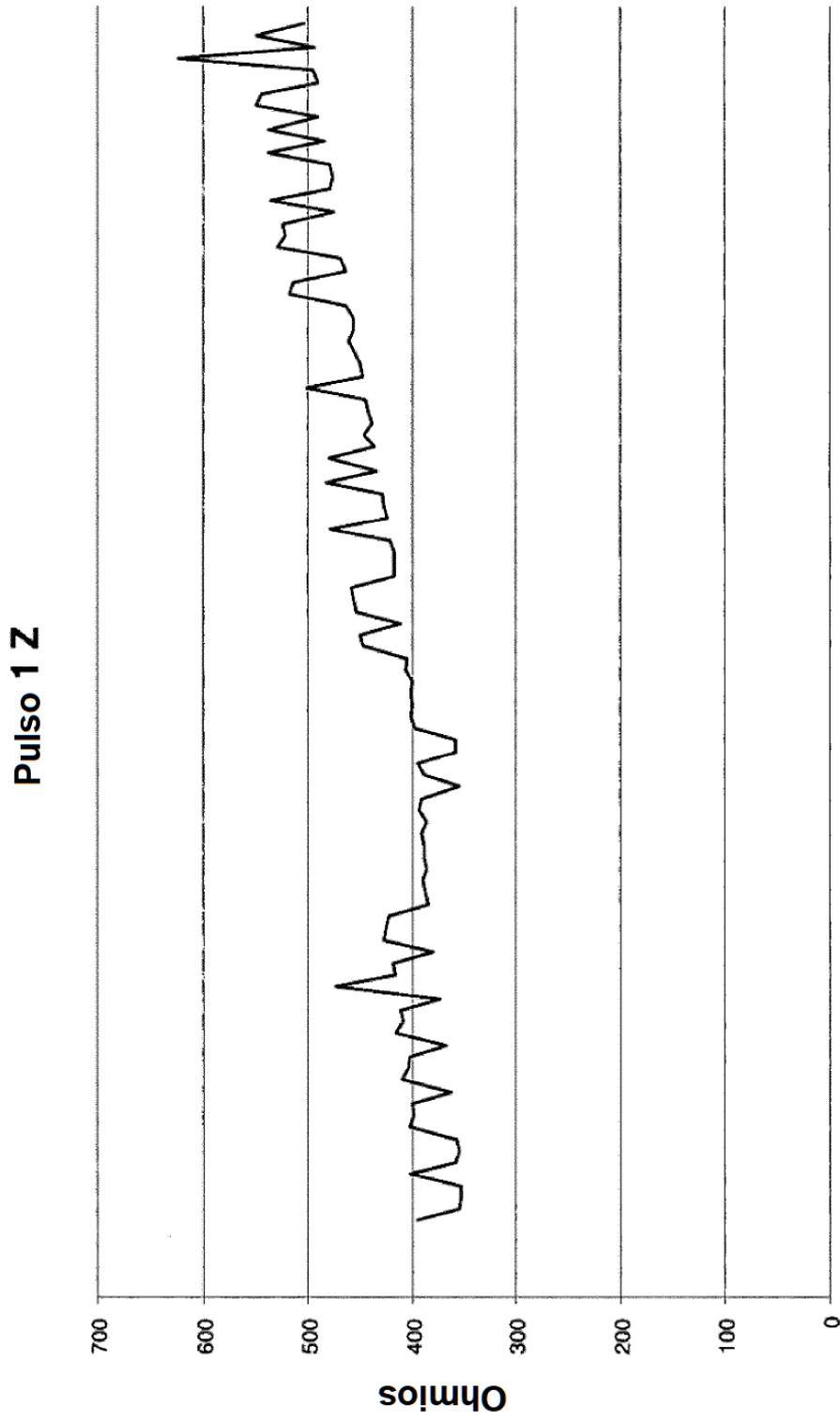


FIGURA 4.4

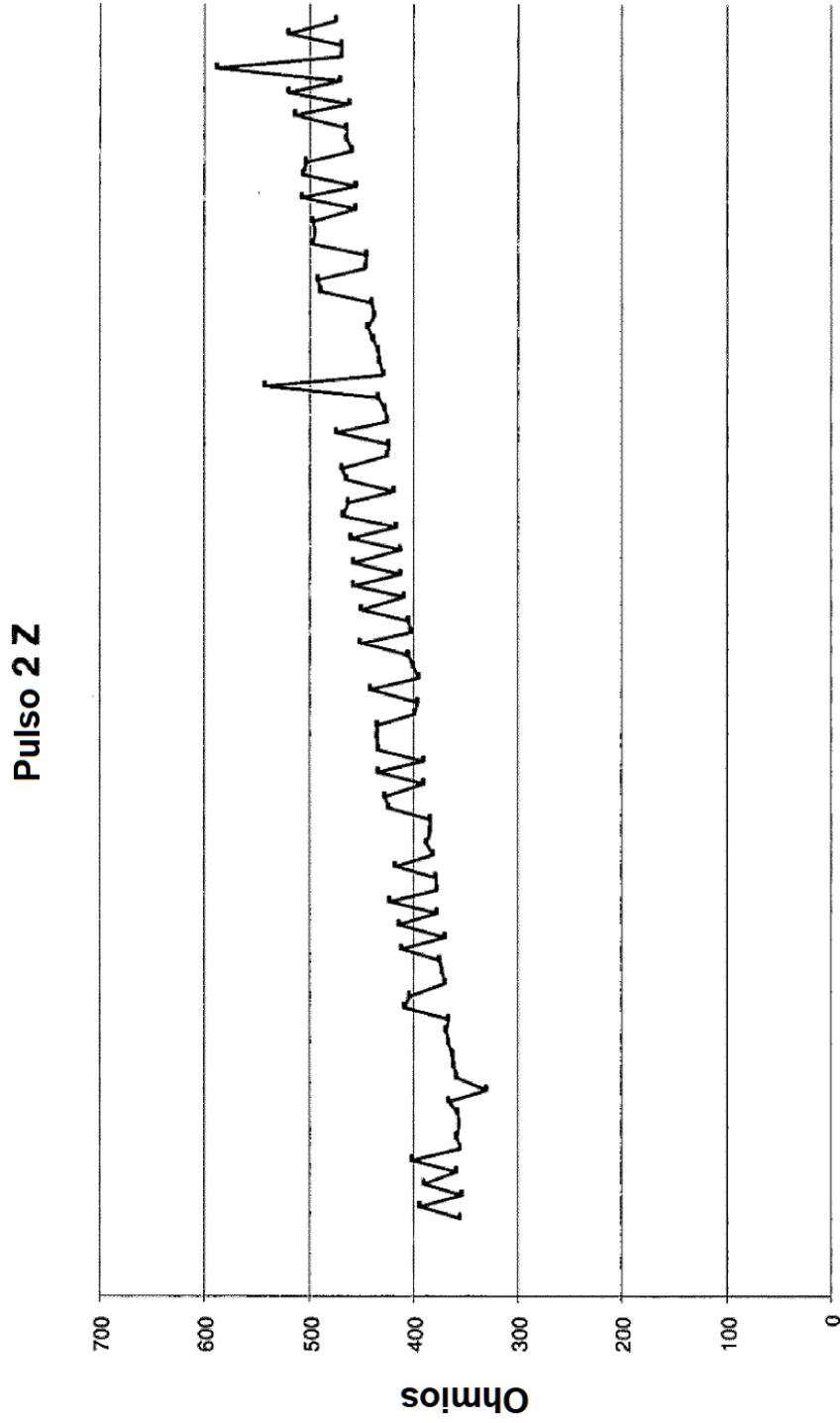


FIGURA 4.5

Pulso 3 Z

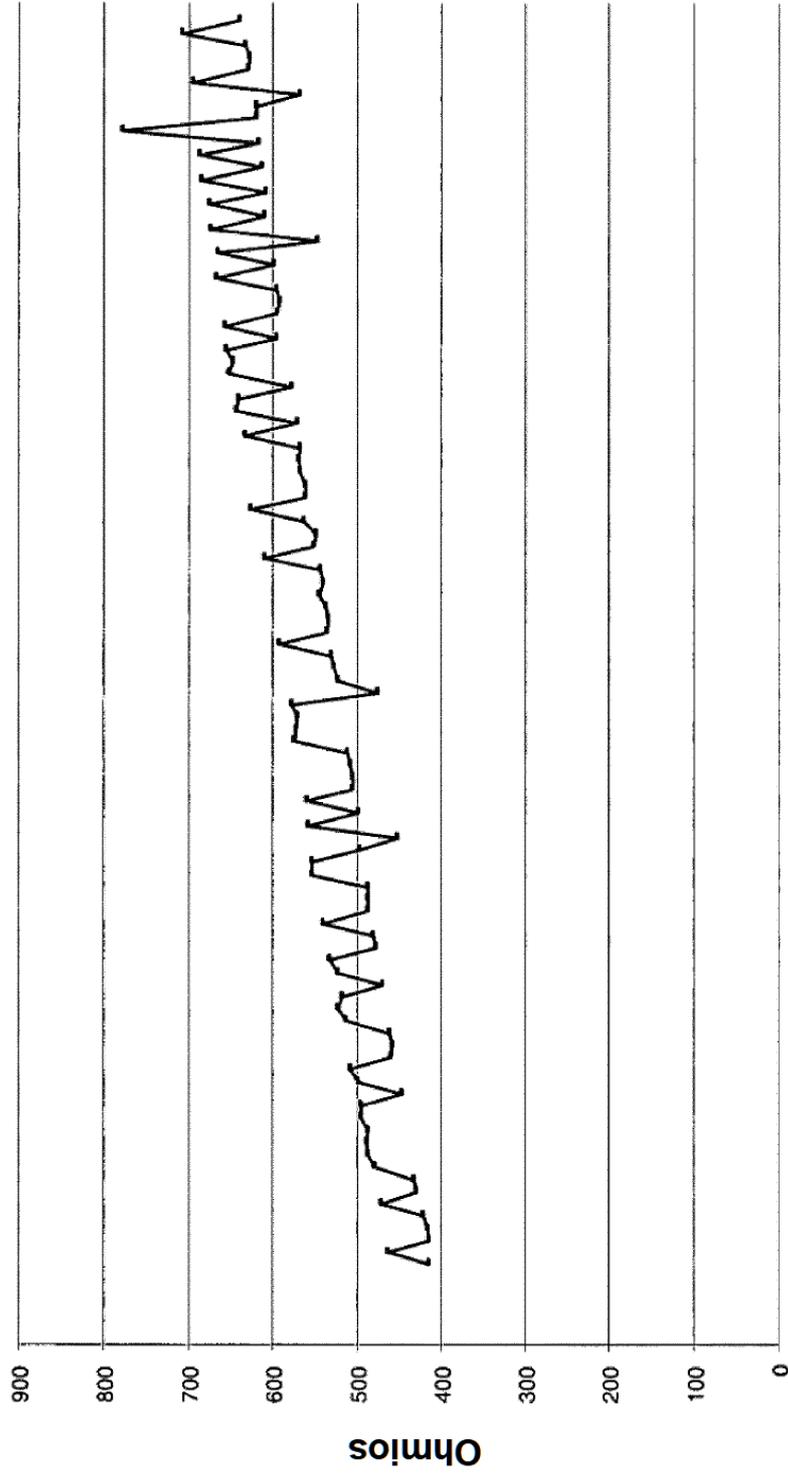


FIGURA 4.6

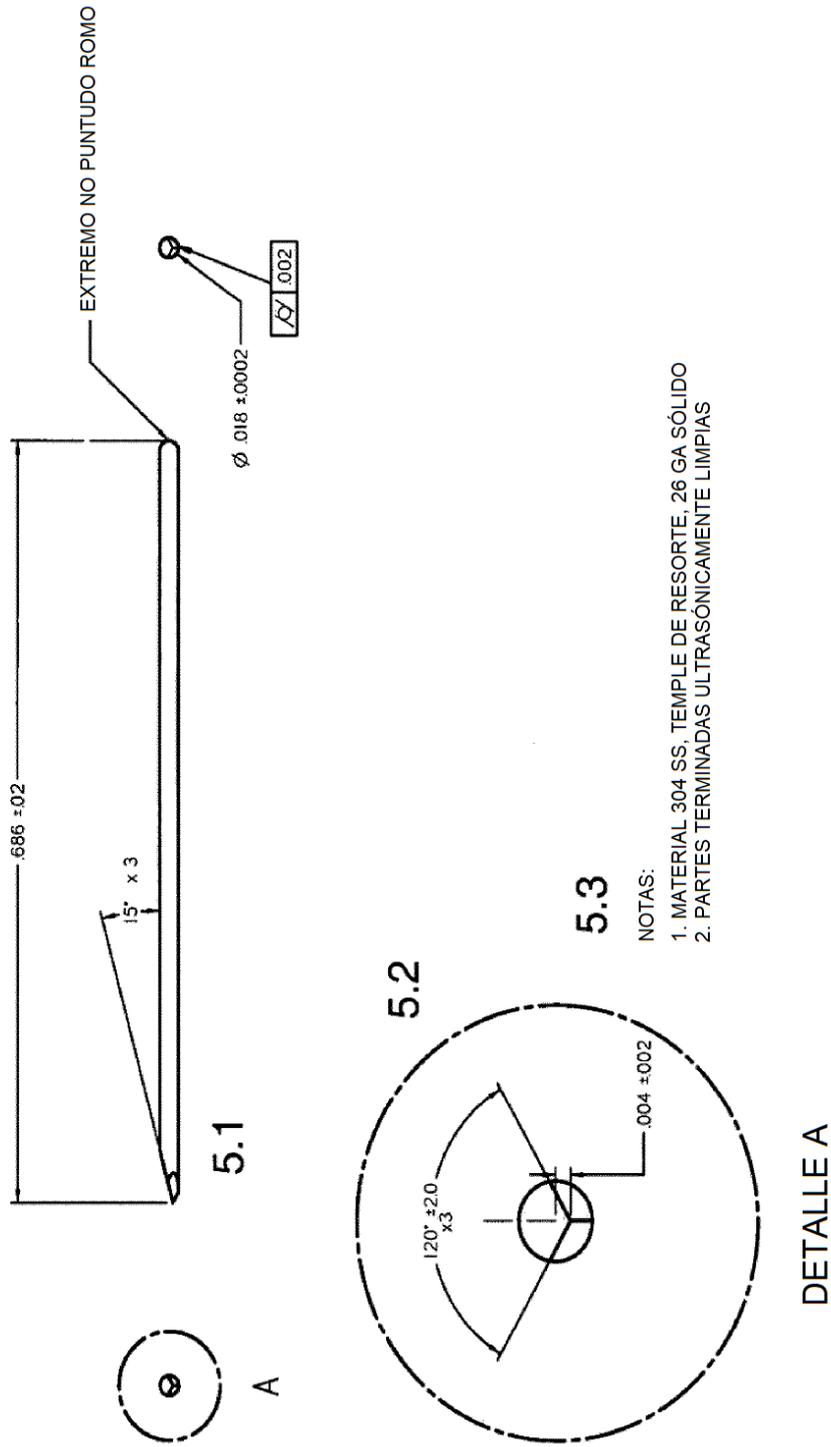


FIGURA 5

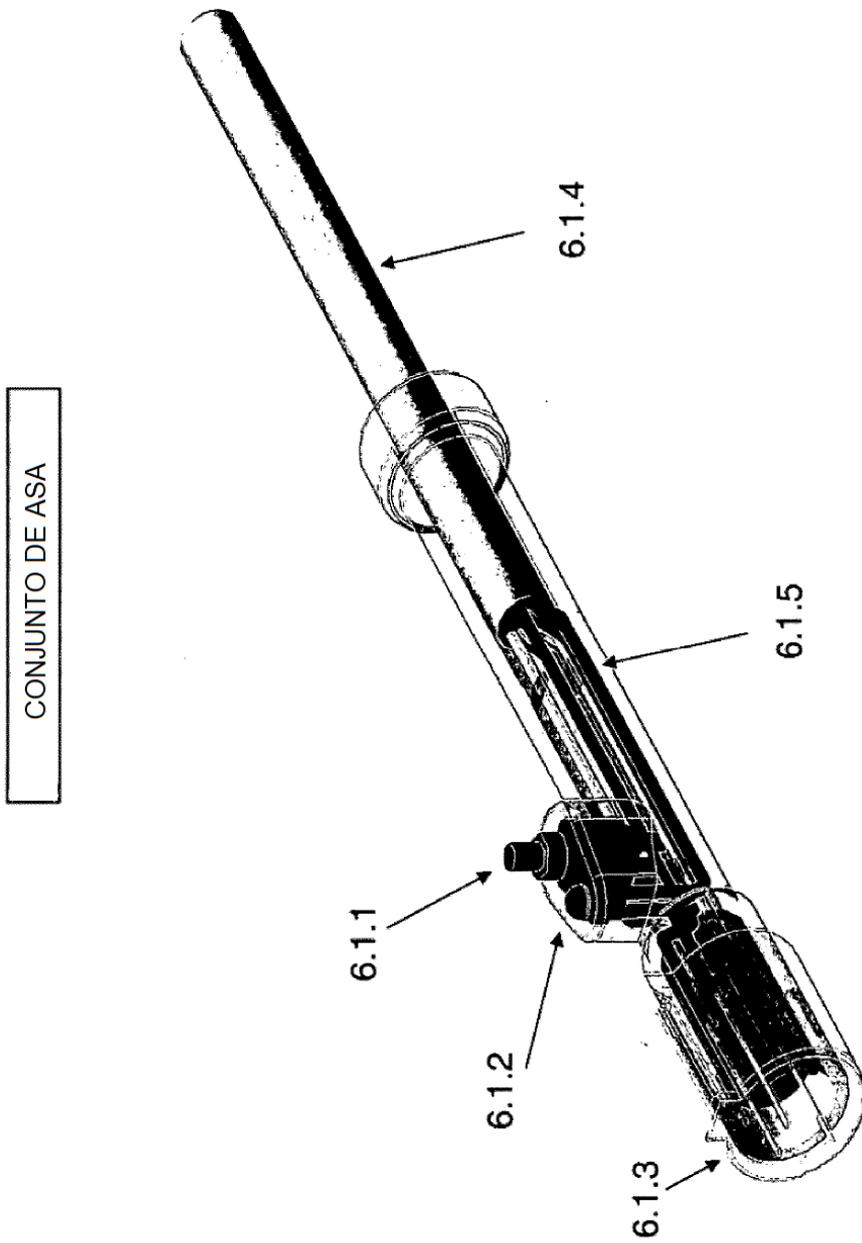


FIGURA 6.1

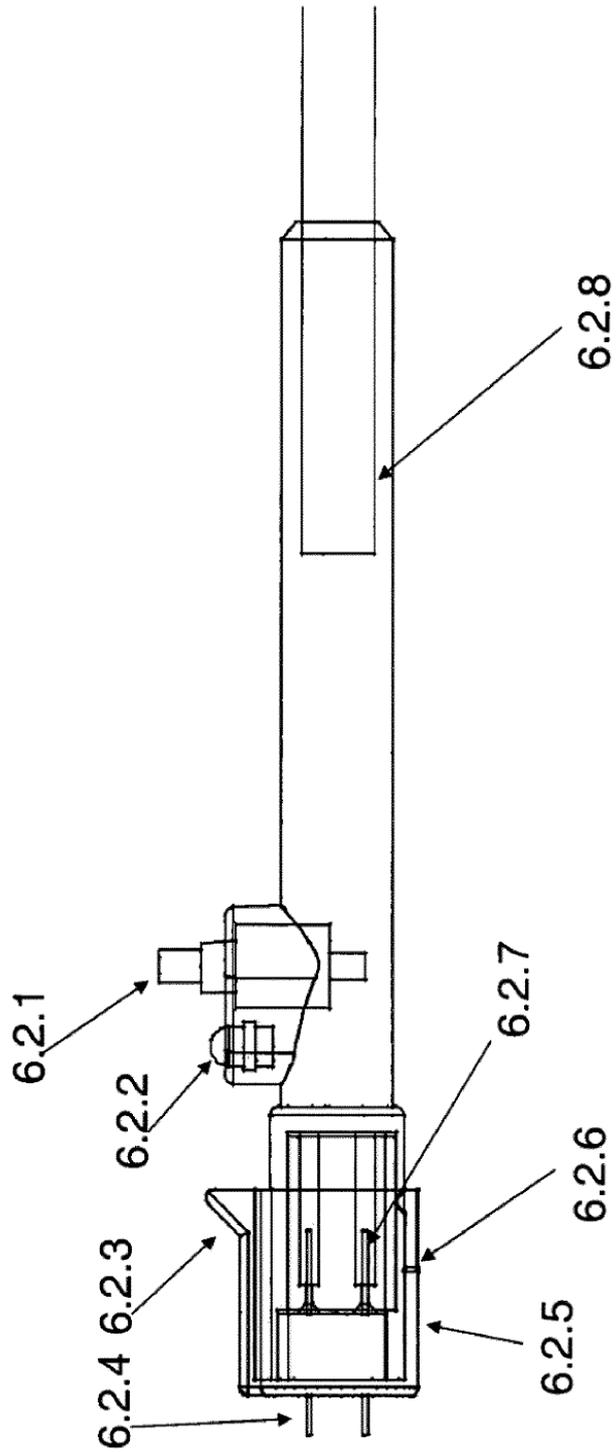


FIGURA 6.2

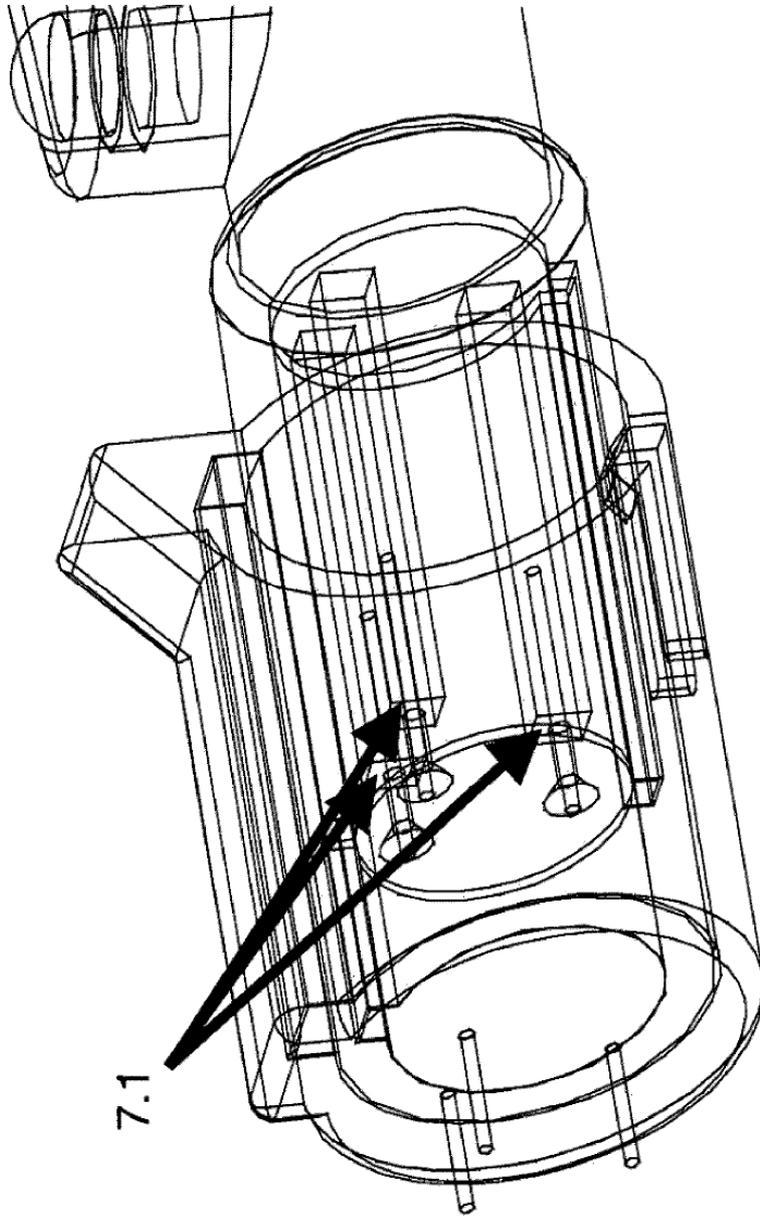


FIGURA 7

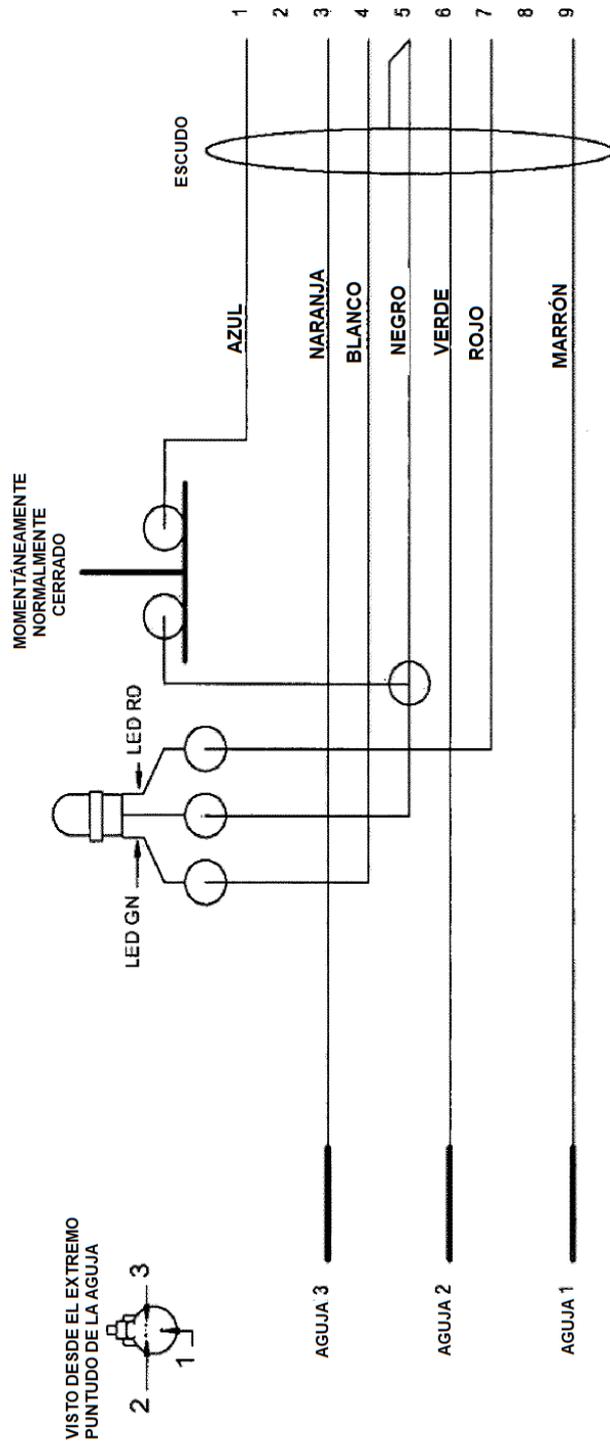


FIGURA 8

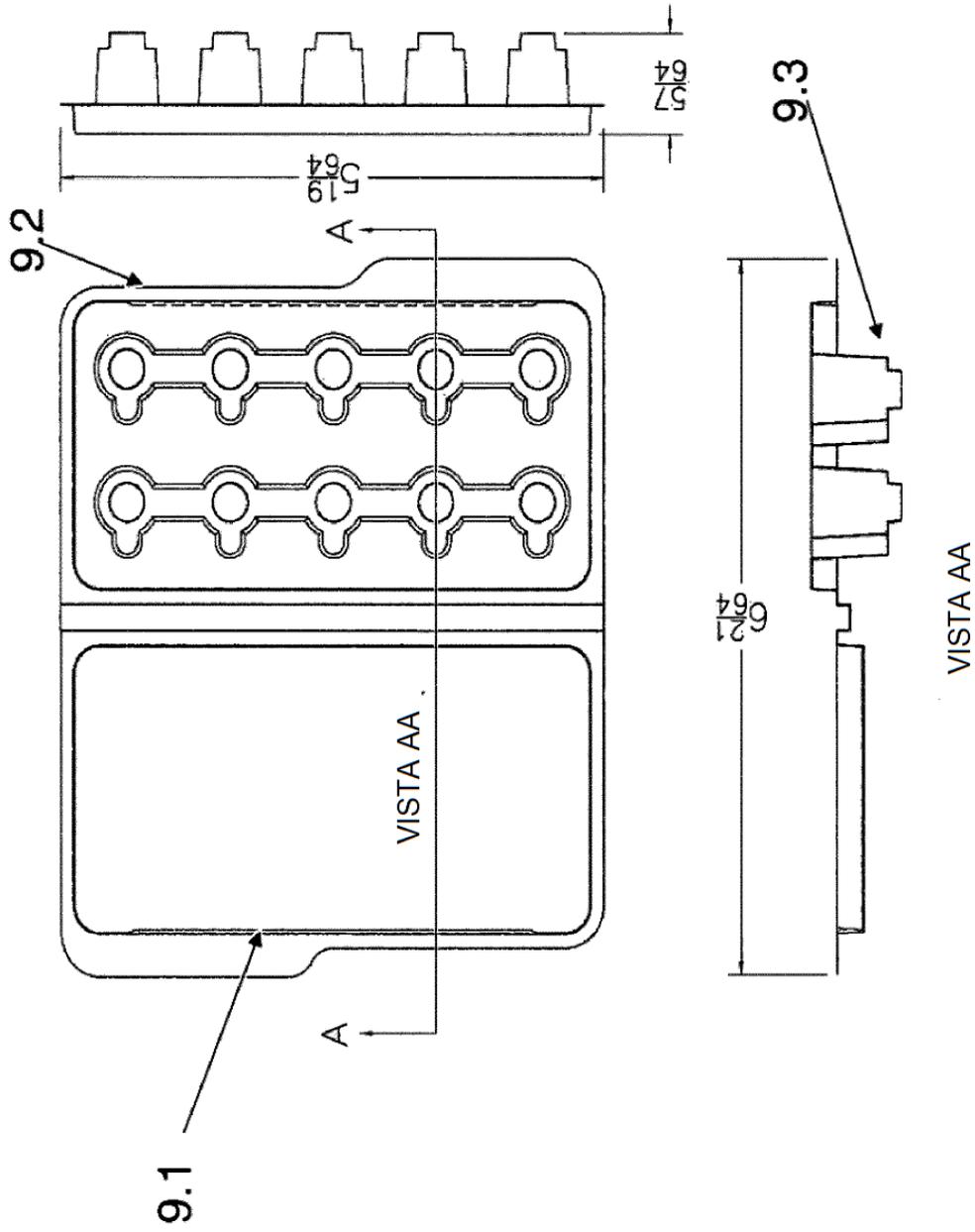


FIGURA 9

<u>Dosis µg</u>	<u>Volumen µL</u>	<u>Corriente</u>	<u>Retraso</u>	<u>Asa</u>	<u>Pulso</u>	<u>Calificación</u>	<u>Media SE</u>
50	50	0.2A	4	MA	20ms	5.00	0.00
100	100	0.2A	80	LA	20ms	5.00	0.00
100	100	0.2A	4	LA	20ms	4.33	0.24
200	100	0.1A	4	LA	52ms	4.17	0.17
100	100	0.1A	4	LA	20ms	4.00	0.00
200	100	0.4A	80	LA	52ms	3.67	0.33
100	50	0.2A	4	LA	52ms	3.33	0.33
50	50	0.2A	4	MA	52ms	3.00	0.00
100	100	0.1A	80	LA	52ms	2.83	0.17
200	100	0.4A	80	LA	20ms	2.83	0.17
50	50	0.2A	80	MA	20ms	2.67	0.17
100	200	0.1A	80	LA	20ms	2.33	0.33
200	100	0.6A	80	LA	52ms	2.17	0.17
100	50	0.1A	80	MA	52ms	2.00	0.00
50	50	0.6A	80	MA	52ms	2.00	0.00
50	50	0.2A	80	MA	20ms	2.00	0.00
100	200	0.2A	80	LA	20ms	2.00	0.00
100	100	0.1A	4	LA	20ms	2.00	0.00
200	100	0.1A	4	LA	20ms	2.00	0.00
200	100	0.2A	4	LA	52ms	2.00	0.00

FIGURA 10

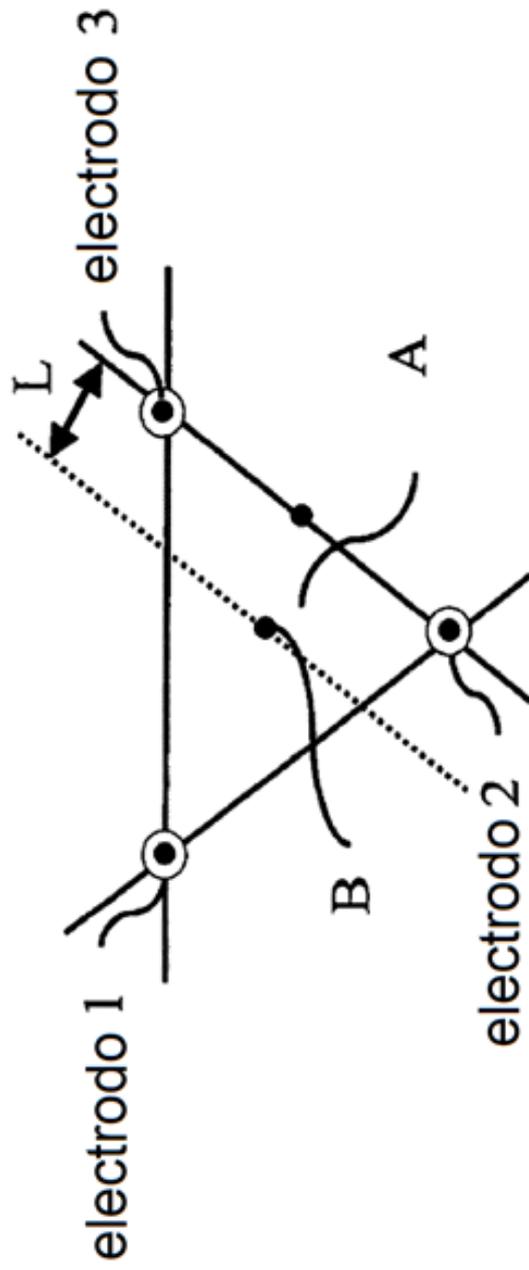


Figura 11

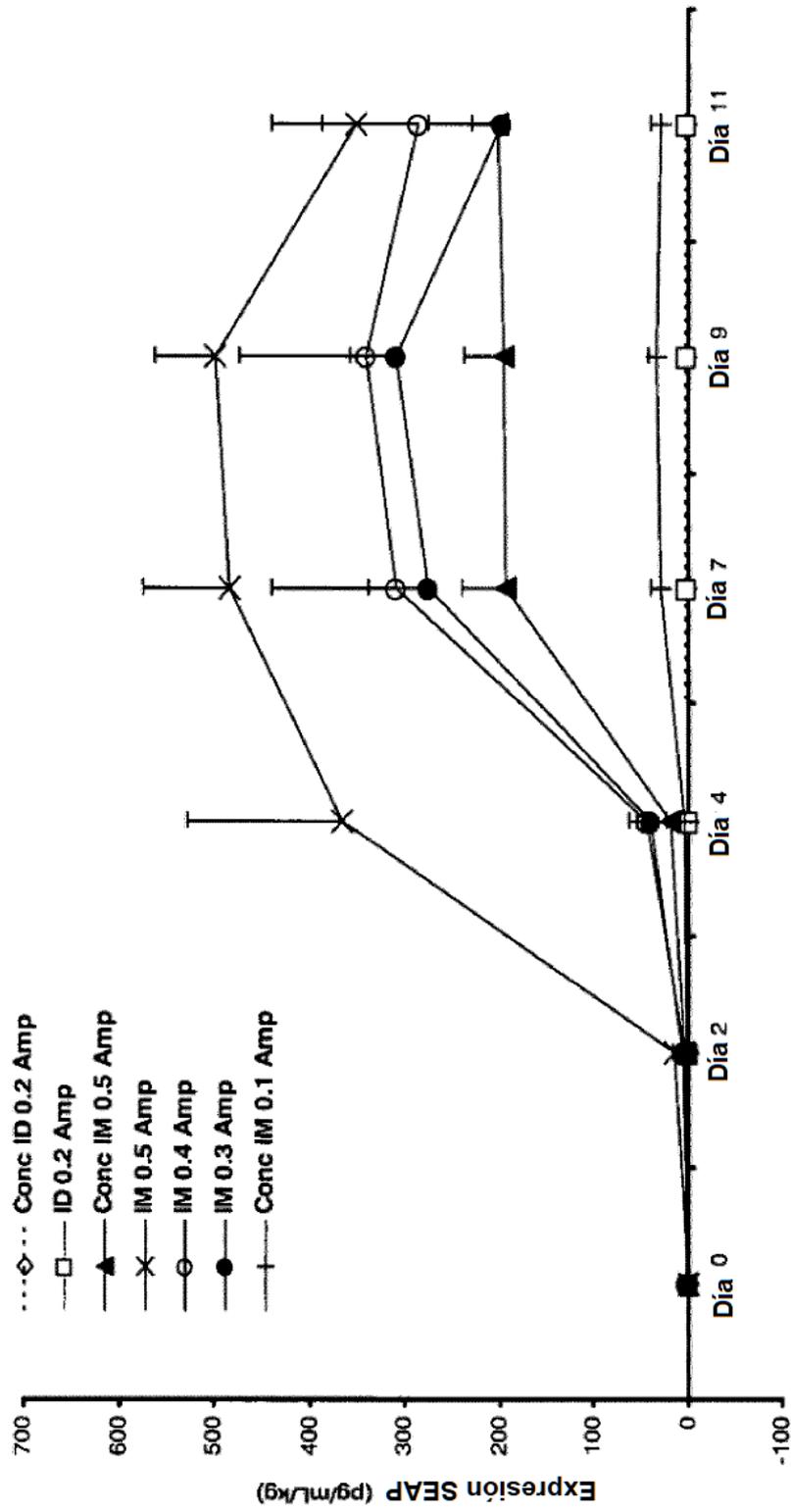


Figura 12

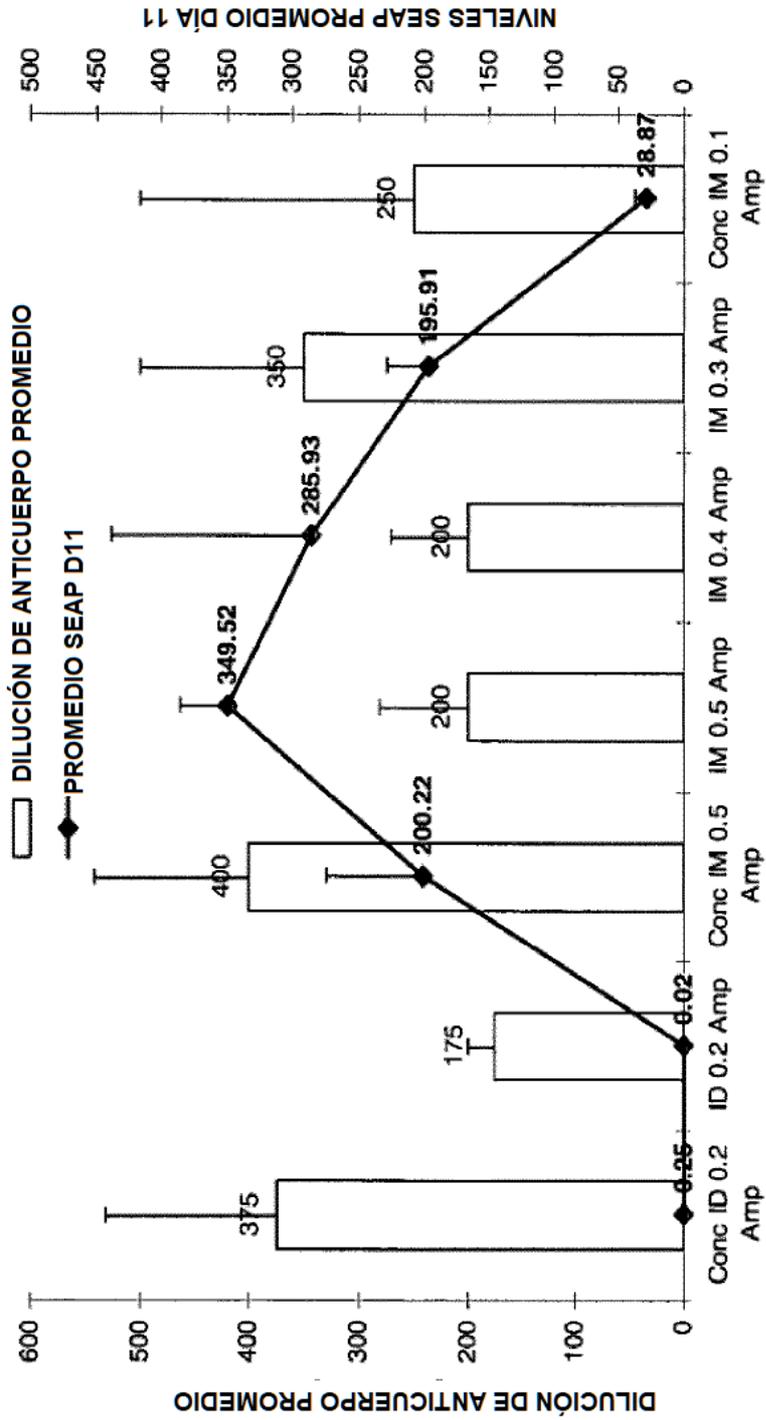


Figura 13

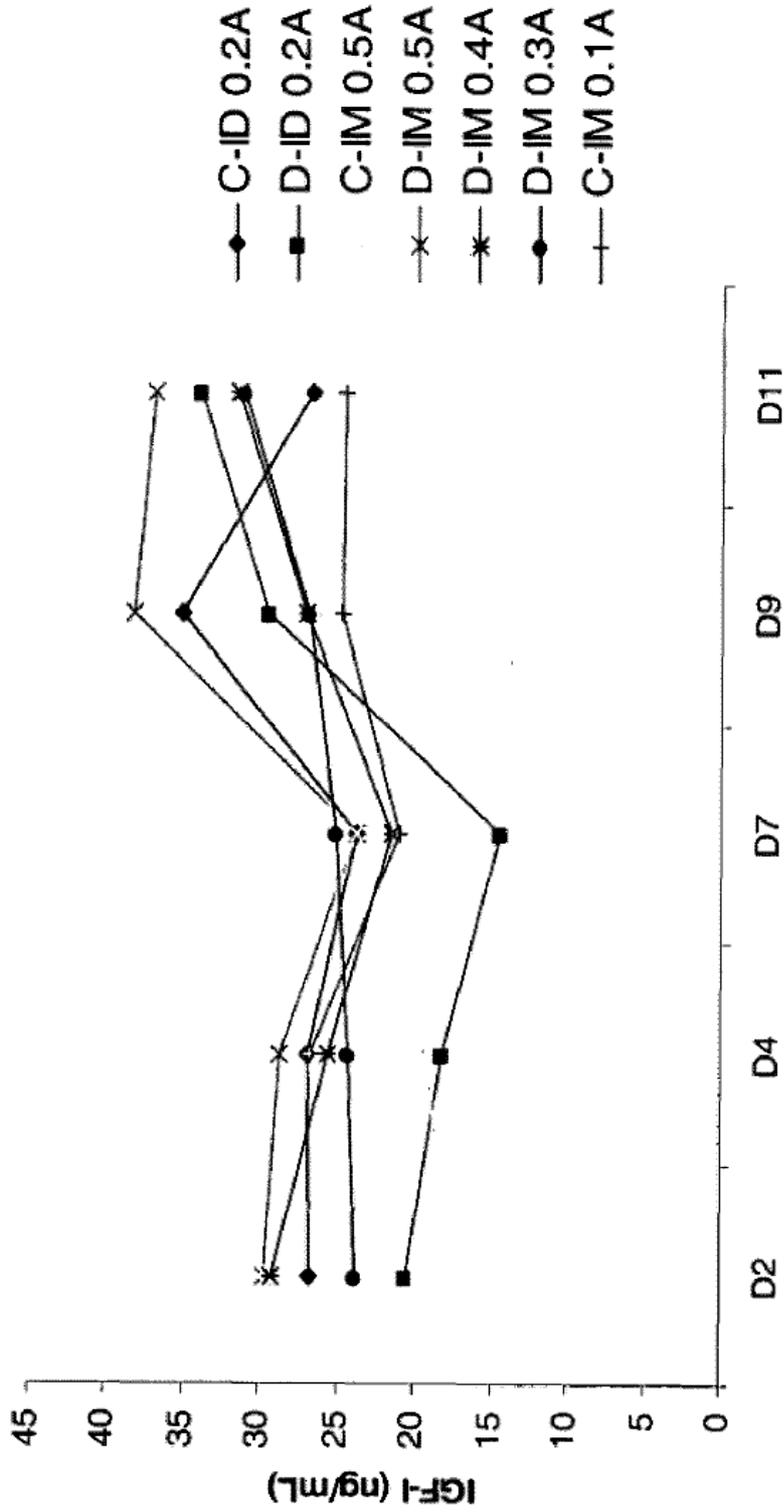


Figura 14



50µg/50µL, EP de PIEL



100µg/100µL, IM EP

Figura 15

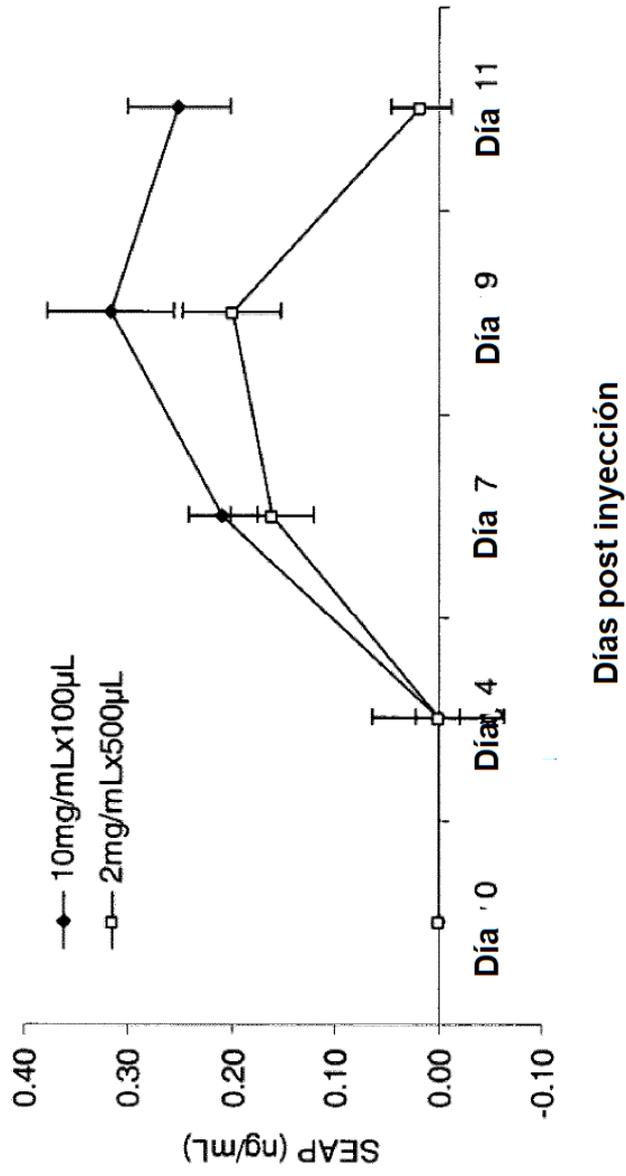


Figura 16

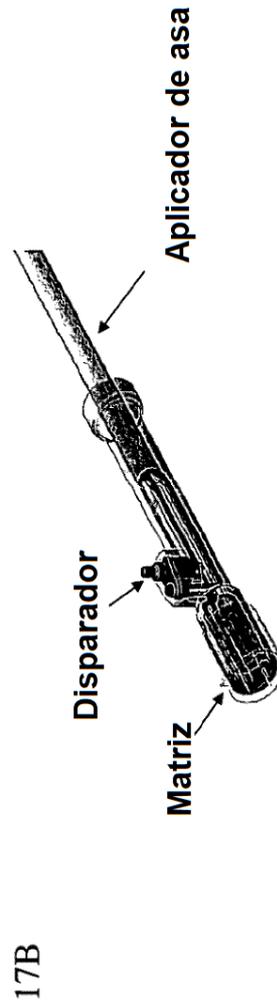
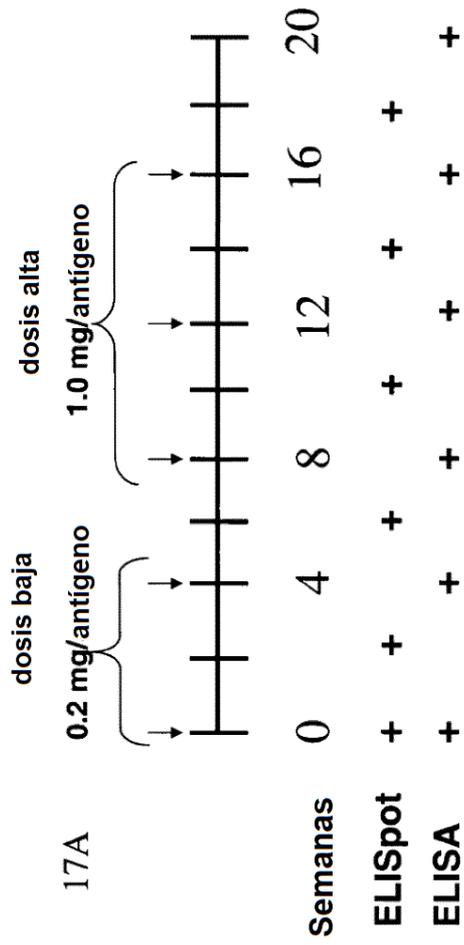


Figura 17

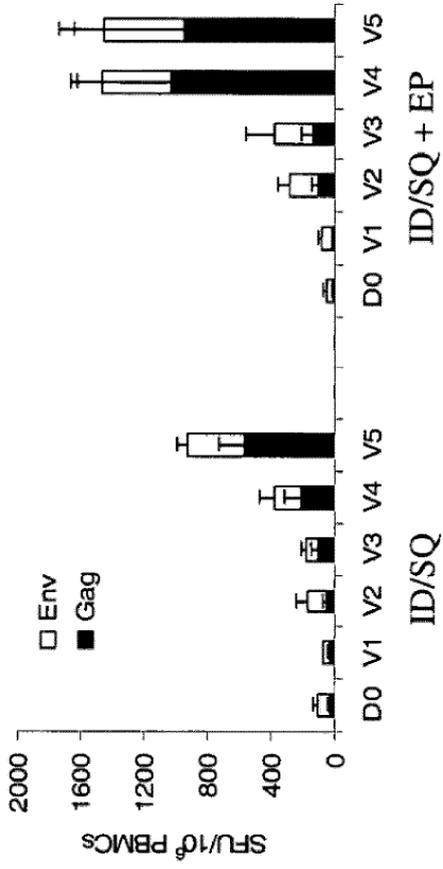


Figura 18

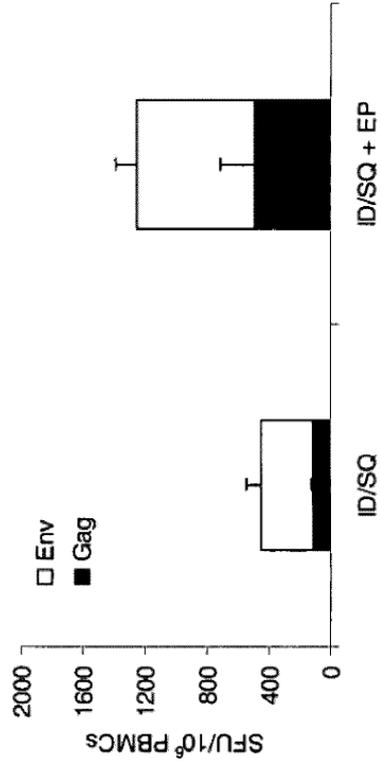


Figura 19

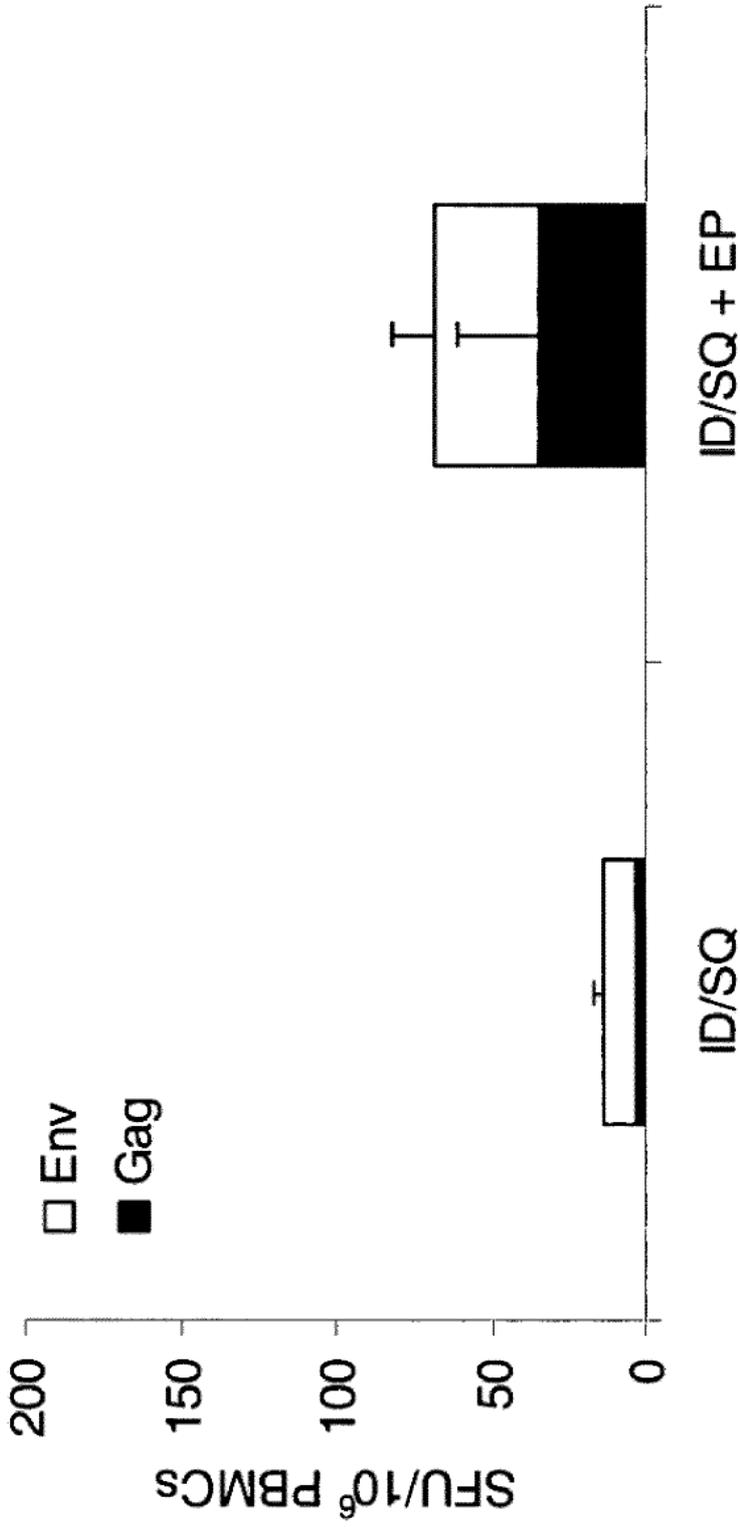
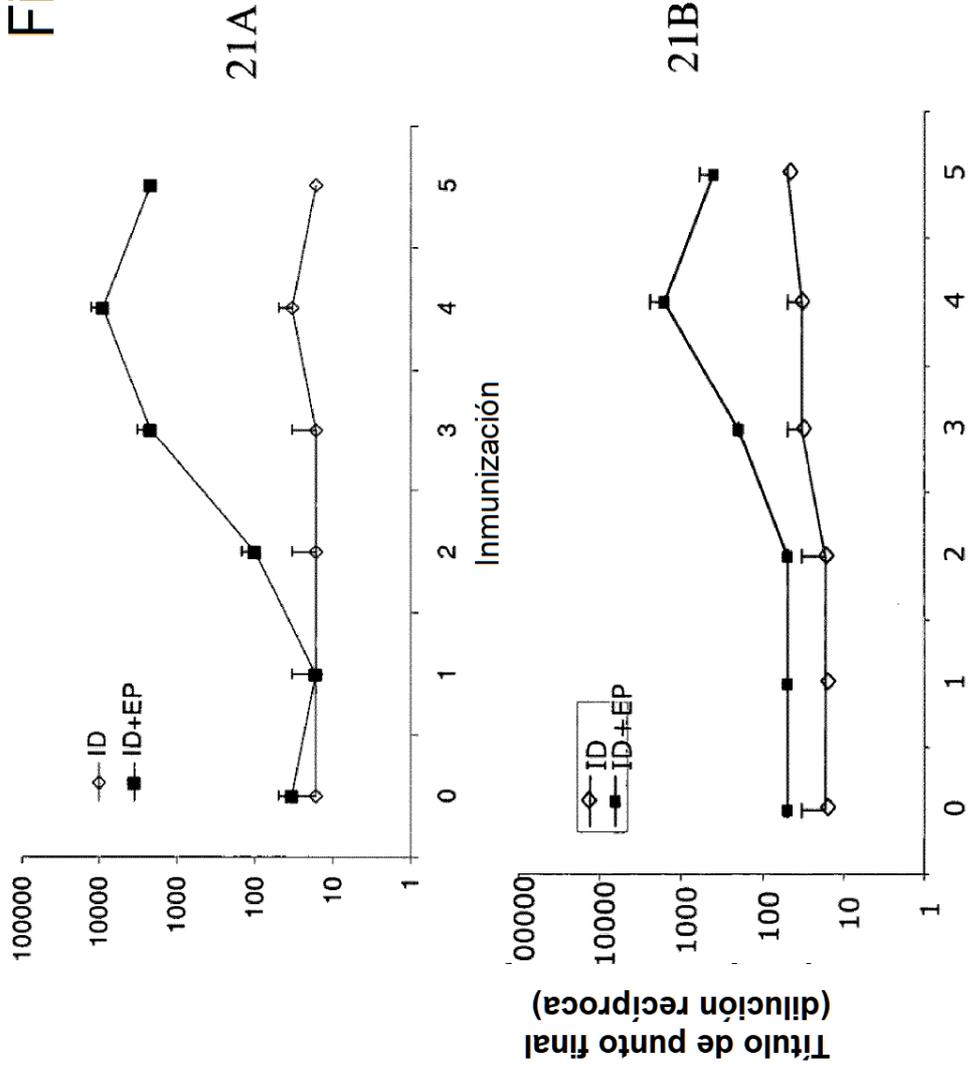


Figura 20

Figura 21



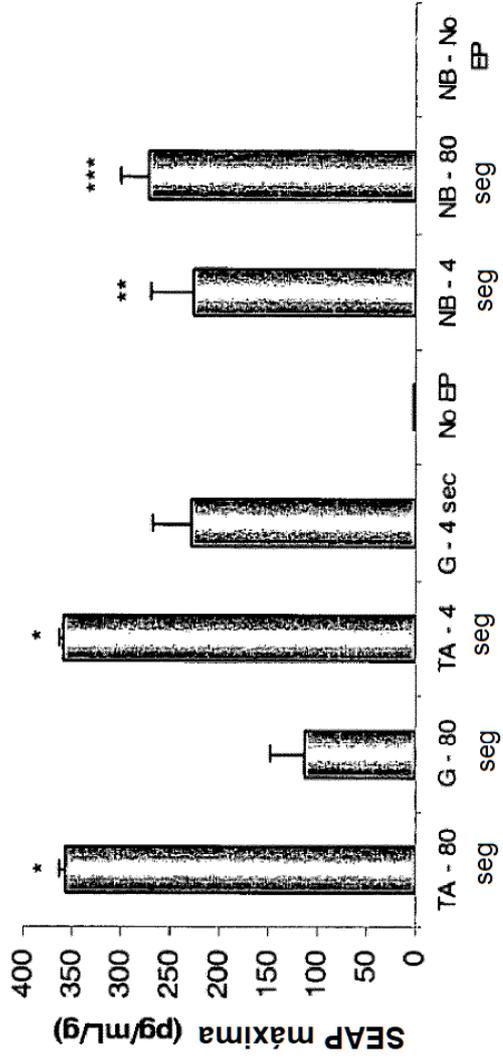


Figura 22

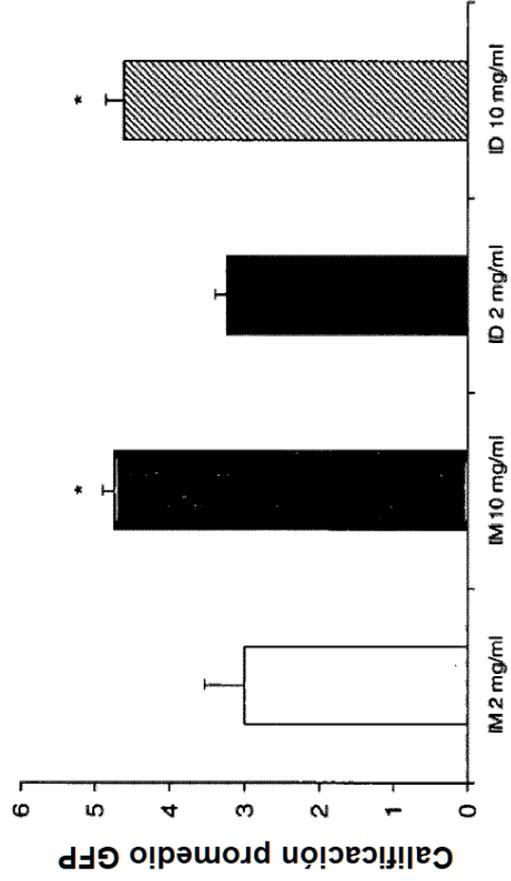


Figura 23

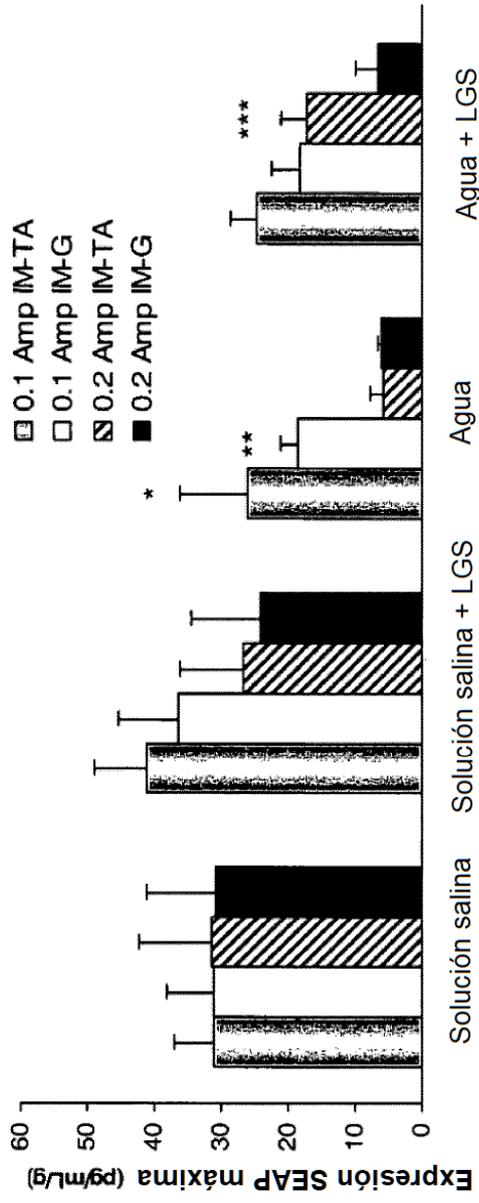


Figura 24

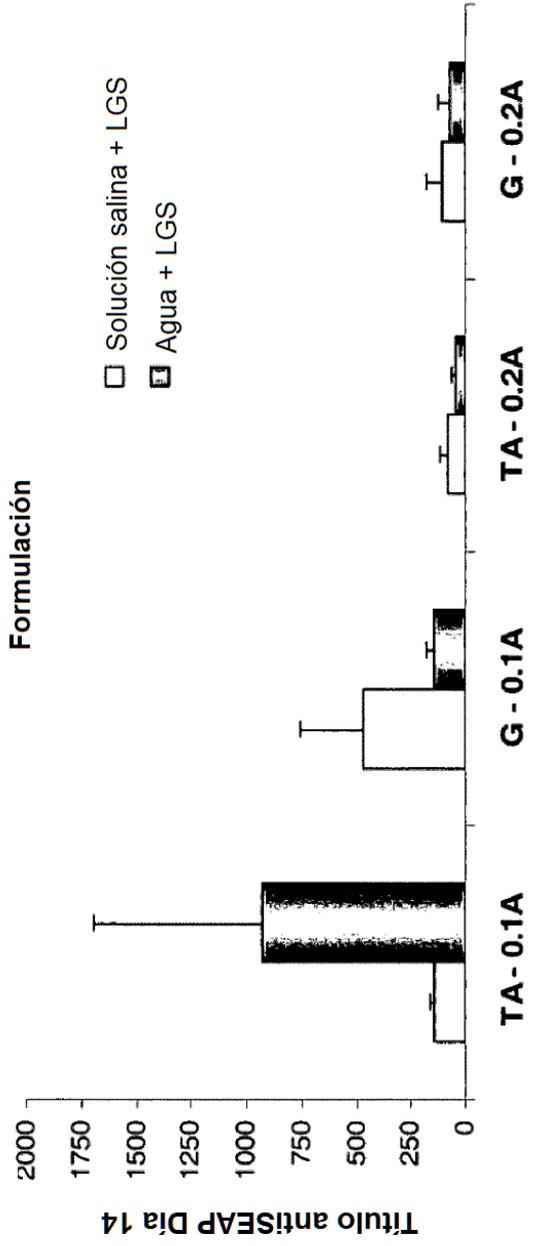


Figura 25

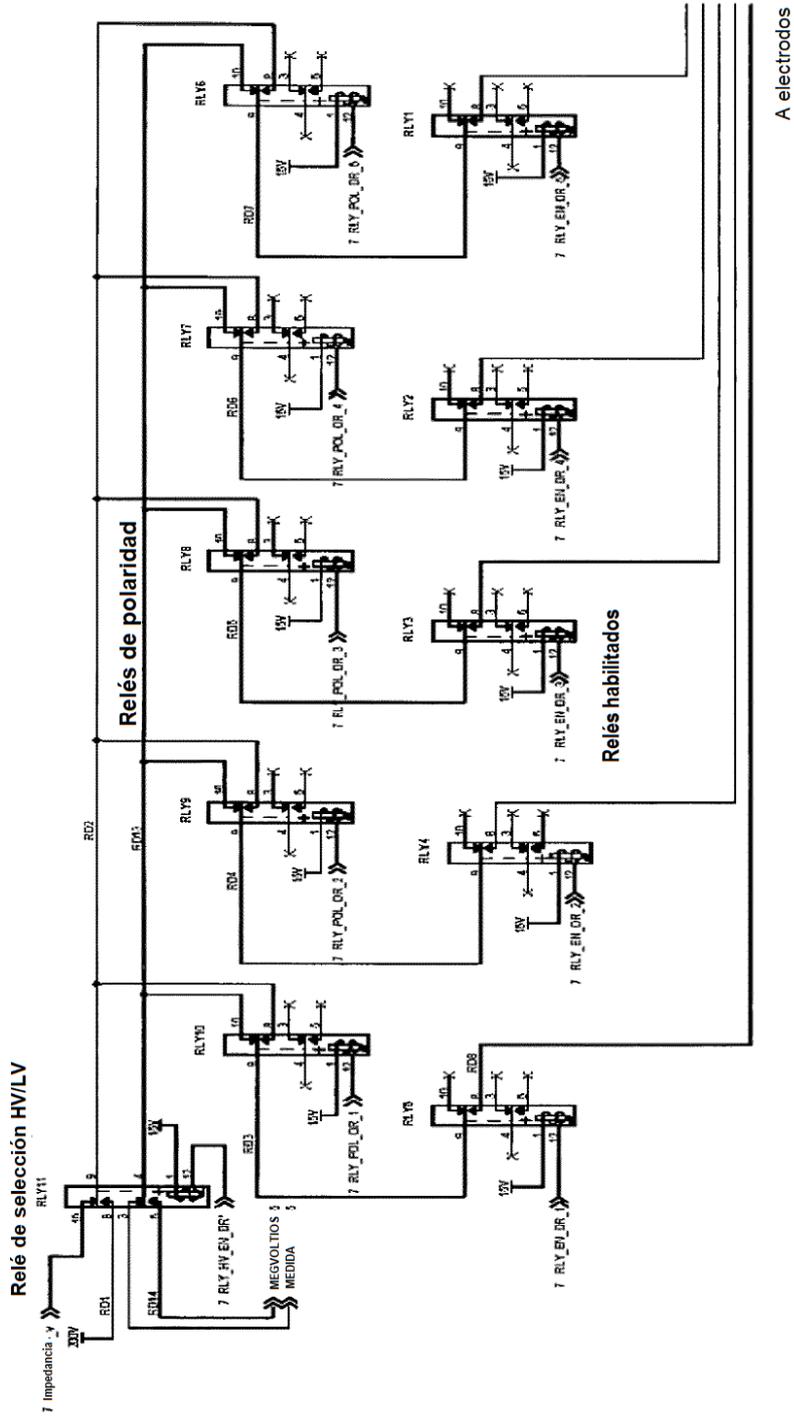


Figura 26

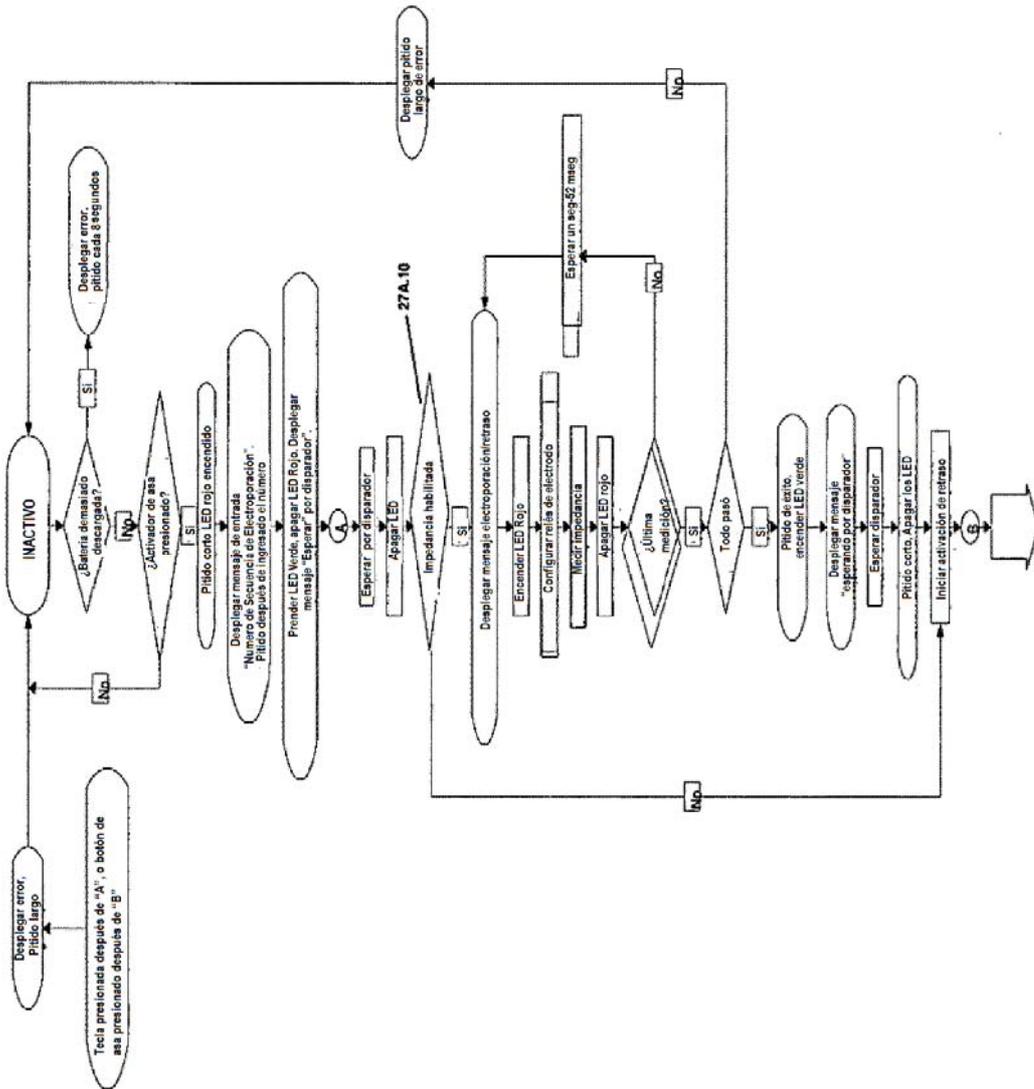


FIGURA 27A

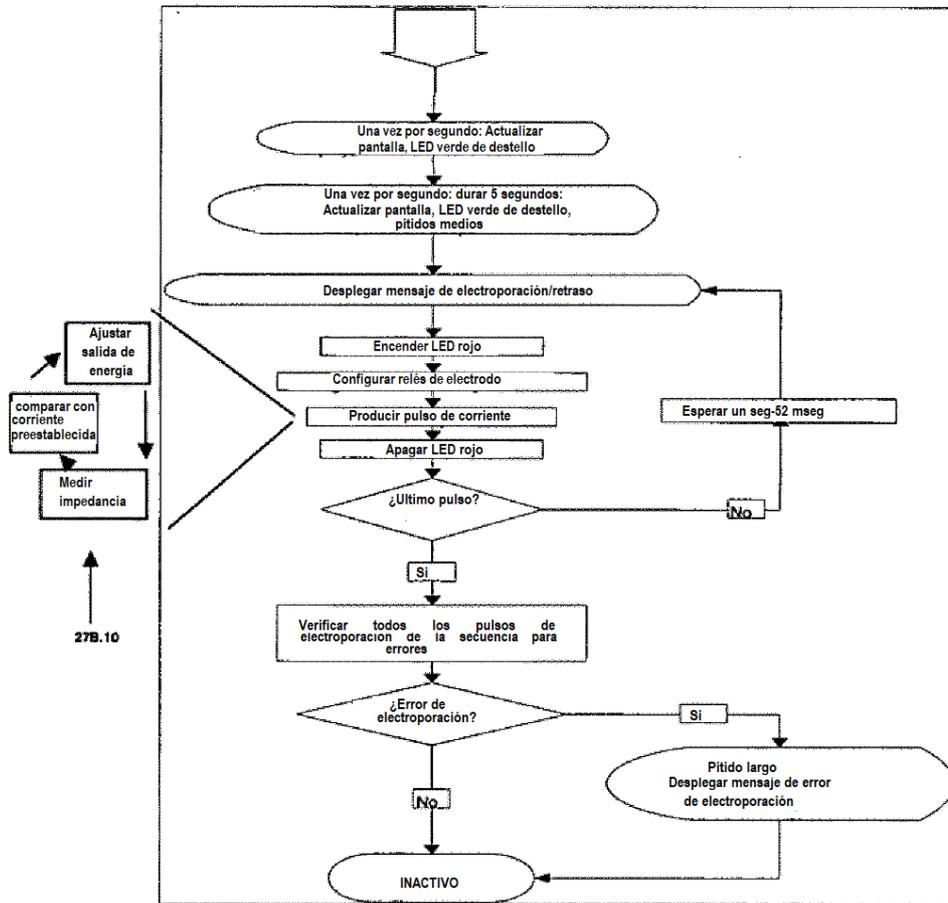


FIGURA 27B