

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 877**

51 Int. Cl.:

**A61N 1/32** (2006.01)

**C12N 13/00** (2006.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

**C12M 1/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2009 PCT/US2009/000273**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2009 WO09091578**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2009 E 09702445 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2240238**

54 Título: **Sistema de electroporación de aguja única de densidad de corriente variable**

30 Prioridad:

**17.01.2008 US 11772 P**

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

**04.02.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KJEKEN, RUNE;  
KEMMERRER, STEPHEN VINCENT;  
LIN, FENG;  
RABUSSAY, DIETMAR y  
KARDOS, THOMAS JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 739 877 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

Sistema de electroporación de aguja única de densidad de corriente variable

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al uso de pulsos eléctricos para aumentar la permeabilidad de las células, y más específicamente a dispositivos para aplicar campos eléctricos electroporativos controlados a tejidos *in vivo* de seres humanos y animales para el suministro de compuestos farmacéuticos y ácidos nucleicos en células de los mismos. Asimismo, esta invención se refiere a un diseño de electrodos novedoso y mejorado para llevar a cabo electroporación que proporciona una densidad de corriente focalizada cerca del sitio de tratamiento del tejido que se está sometiendo a la electroporación y un campo eléctrico simultáneo no electroforativo de baja densidad de corriente lejos de dicho sitio de tratamiento del tejido, cuyo diseño proporciona tanto el enfoque de los pulsos eléctricos electroporativos en un volumen de tejido predeterminado y medible, como en el músculo esquelético y/o en los tejidos dérmicos y subdérmicos, además de proporcionar una reducción sustancial de la corriente eléctrica en los tejidos de la superficie de los mamíferos que contienen células sensoriales nerviosas.

## Antecedentes de la invención

20 La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención, que se define en la reivindicación independiente 1. No es una admisión de que dicha información sea del estado de la técnica o sea relevante, a las invenciones actualmente reivindicadas, o que cualquier publicación referenciada específicamente o implícitamente es técnica anterior.

25 El modo clásico de administrar vacunas y otros agentes farmacéuticos en los tejidos corporales es mediante inyección directa en tejidos musculares o cutáneos con una jeringa y una aguja. Como se ha descrito bien en la técnica, la incorporación de pulsos electroporativos de energía eléctrica con inyección directa permite el suministro de dichas vacunas o agentes directamente a las células dentro del tejido. Dicho suministro directo a las células mediante pulsos eléctricos electroporativos puede tener un efecto clínico profundo en la calidad de la respuesta de los sistemas metabólico y/o inmunológico del cuerpo en comparación con la simple inyección de jeringa y aguja. Además, la capacidad de suministro directo de sustancias a la célula a través de la electroporación ha permitido el suministro efectivo de ADN desnudo expresable que codifica un polipéptido, teniendo cualquier número de funciones, incluyendo antigénicas para provocar respuestas inmunes, o alternativamente, metabólicas para afectar varias vías biológicas que resultan en un efecto clínico.

35 Aunque la tecnología de electroporación permite un suministro más avanzado de sustancias a los compartimentos celulares del cuerpo, el proceso electroporativo, como se realiza comúnmente en la actualidad utilizando matrices de electrodos que penetran en el tejido, como se describe en las patentes US 6.041.252, 6.278.895 y 7.245.963, tiene al menos dos inconvenientes distintos para el uso clínico práctico. Estos incluyen primero, la necesidad de penetrar la barrera cutánea con múltiples agujas inductoras de traumas y, en segundo lugar, no hay capacidad para determinar fácilmente el volumen del tejido que experimenta la electroporación. La técnica de electroporación clásica, el uso de matrices de electrodos de aguja espaciadas que perforan el tejido proporciona un área relativamente extendida del tejido que se está sometiendo a electroporación. Habitualmente, el volumen de tejido que experimenta la electroporación cuando se usa una serie de electrodos espaciados es mayor que el volumen limitado por los electrodos de la matriz. Esto se debe al flujo natural de líneas eléctricas de fuerza a través del tejido *in vivo* entre los electrodos positivo y negativo. No es fácil cuantificar qué tan lejos alrededor de la parte exterior de la matriz son capaces de desplazarse las fuerzas electroporativas. Esto hace que una medida cuantificable de la cantidad de fármaco que toman las células sea muy difícil. Por lo tanto, con respecto al control de la administración de dosis terapéuticas, sigue existiendo la necesidad de cuantificar la cantidad de tejido que experimenta la electroporación y, en consecuencia, la dosis de fármaco que se administra en las células de dicho tejido utilizando la electroporación.

Con respecto a la penetración en los tejidos, el diseño típico de la matriz de agujas espaciadas también causa una sensación sustancial, no solo de penetración de una multiplicidad de agujas en la carne, sino debido a las longitudes expuestas eléctricamente conductoras de los electrodos penetrantes, el receptor del pulso electroporativo experimentará una descarga eléctrica notable incluso si la porción superior de la aguja insertada tiene un revestimiento no conductor. Por porción superior se entiende aquí la longitud de la aguja que está en contacto con la superficie y los tejidos dérmicos. Comúnmente, el pulso eléctrico en el proceso de electroporación es notable debido al hecho de que el pulso que se envía entre dos electrodos alargados expuestos crea un campo eléctrico y una corriente eléctrica a través de toda la profundidad de la carne penetrada por dichos electrodos. Dado que los tejidos de la piel poseen importantes células sensoriales nerviosas, actualmente se entiende que la sensación de choque eléctrico en las regiones del tejido externo es sustancial. Esta sensación típicamente desagradable es un inconveniente para la aceptación y el uso generalizados de la electroporación en aplicaciones tales como la vacunación. Asimismo, suponiendo que cualquier sensación de descarga eléctrica esté directamente relacionada con el área del tejido o el volumen sujeto a la corriente eléctrica de cierta fuerza, entonces razonablemente parecería, dado que la electroporación efectiva en un mamífero es posible usando solo una aguja, como lo muestran los inventores actuales en la solicitud de patente pendiente de tramitación n.º 11/894.653, que usa conjuntos de electrodos de aguja

espaciados hace que un área de tejido mucho mayor esté sujeta al pulso eléctrico y, en consecuencia, a la excitación de las células nerviosas sensoriales que es necesaria. Si bien se conoce un sistema de electroporación que utiliza una sola aguja y un electrodo de anillo de la publicación de solicitud de patente US 2006/0084938, existe la necesidad en las técnicas para encontrar configuraciones de diseño para administrar pulsos electroporativos mientras se reduce la excitación de la superficie del tejido y las células nerviosas basadas en la piel.

Respecto a la notable sensación del pulso electroporativo de energía eléctrica, el nivel de sensación también se debe en parte al diseño y, por lo general, a la naturaleza de los electrodos utilizados. Por ejemplo, los electrodos se construyen típicamente en varias configuraciones tales como, por ejemplo, calibradores, electrodos de meandro y conjuntos de agujas no invasivas para administrar un pulso eléctrico a la superficie de la piel y los tejidos subyacentes cerca de la piel, y las matrices de agujas alargadas y penetrantes para suministrar pulsos eléctricos a los tejidos profundos. La colocación de electrodos directamente sobre la piel o la perforación a través de la misma coloca el electrodo en áreas del tejido donde la sensibilidad al dolor a través de la estimulación nerviosa es muy pronunciada. Por lo tanto, sin un mecanismo para disminuir la corriente y la densidad de corriente en las áreas de tejido que tienen una alta concentración de terminaciones nerviosas sensoriales, la sensación de shock probablemente se mantendrá.

Por lo tanto, todavía existe una necesidad en la técnica de métodos de electroporación, electrodos y sistemas que pueden proporcionar la capacidad de medir de manera cuantificable el volumen de tejido que realmente se somete a electroporación, así como proporcionar una reducción sustancial de la energía eléctrica dirigida en los tejidos que contienen células sensoriales del nervio para proporcionar la posibilidad de reducir la excitación de la célula sensorial durante el suministro asistido por electroporación de una sustancia terapéutica.

#### Sumario de la invención

Volviendo ahora a las ventajas de la presente invención, se describe un aparato para realizar el suministro asistido por electroporación a tejidos *in vivo* de un mamífero de sustancias terapéuticas que incluyen secuencias de ácido nucleico expresables que codifican polipéptidos terapéuticos, o formas terapéuticas de ácidos nucleicos, o derivados de los mismos. En una realización preferida, el aparato se puede usar para suministrar directamente a las células secuencias de ADN unidas a un promotor y capaces de expresar el polipéptido codificado por el mismo. En otras realizaciones preferidas alternativas, el aparato se puede usar para administrar sustancias terapéuticas que comprenden cualquiera de ARN, ARNi, ARNsi, microARN, y ARNsh. Las sustancias terapéuticas pueden incluir además secuencias de ácido nucleico expresables que codifican citocinas, hormonas y otras moléculas funcionales útiles en el tratamiento terapéutico de trastornos y enfermedades.

La presente divulgación también describe un método *in vivo*, utilizando campos eléctricos pulsados para administrar agentes terapéuticos a las células de la piel, incluyendo compartimentos dérmicos y musculares subyacentes de la piel para tratamientos locales y sistémicos. En una realización particularmente preferida de la presente invención, se proporciona un método *in vivo* para introducir un agente terapéutico en tejidos y células corporales, tales como células dentro de la dermis y células musculares, particularmente células musculares en la dermis y células musculares esqueléticas ubicadas en tejidos más profundos. Los agentes terapéuticos contemplados para su uso con el método de la invención incluyen ácido nucleico desnudo o formulado, incluyendo ARNi, ARNsi, microARN, y ARNsh, polipéptidos y agentes quimioterapéuticos, y otros agentes terapéuticos que pueden emplearse directamente como agentes paliativos (es decir, aquellos que ejercen directamente un efecto terapéutico), o como agentes con un efecto menos directo (por ejemplo, genes que codifican polipéptidos que provocan una respuesta inmune).

El aparato de la invención proporciona la capacidad de suministrar al tejido *in vivo* un pulso electroporativo de energía eléctrica que comprende una alta densidad de corriente en y cerca del sitio de tratamiento de tejido que experimenta la electroporación y, simultáneamente, un campo eléctrico no electroporativo que tiene una densidad de corriente proporcionalmente reducida o difusa que se aleja de dicho sitio de tratamiento del tejido. Específicamente, como se describe en este documento, el aparato de la invención comprende un único electrodo de aguja que penetra en el tejido y un correspondiente contraelectrodo de anillo, descritos adicionalmente a continuación, que comprende una estructura plana y generalmente circular u ovoide situada espacialmente con respecto al electrodo alargado, de modo que el electrodo alargado es preferentemente central y perpendicular a la superficie del electrodo de anillo plano como se muestra en la figura 2. La forma real del electrodo de "anillo" puede comprender geometrías variables tales como, por ejemplo, redonda, ovoide, triangular, cuadrada, rectangular, pentagonal, hexagonal, etc.

En otra realización, el único electrodo alargado central tiene un extremo distal que perfora el tejido y un extremo proximal montado en un sustrato. El electrodo alargado puede ser sólido o tubular, en este último caso, dicho electrodo es capaz de suministrar una sustancia fluida a través del mismo. En realizaciones alternativas, la configuración tubular puede comprender una aguja hipodérmica fenestrada (es decir, los puertos para expulsar la sustancia fluida están a lo largo de los lados de la aguja) o, en una realización alternativa particularmente preferida, el electrodo tubular puede comprender una aguja fenestrada en la que no hay una abertura en la punta de la aguja tubular. En tal disposición, los medios fluidos expresados a través del tubo no se expulsarán por la punta de la aguja, sino exclusivamente a través de los puertos laterales. En una realización adicional, los puertos laterales se colocan en el electrodo alargado a lo largo de al menos la porción distal de 0,1 a 1,5 cm del tubo que conduce eléctricamente. En una realización relacionada, las aberturas que forman la multiplicidad de puertos laterales proporcionan la sorprendente capacidad de

distribución uniforme de la sustancia inyectada en los tejidos destinados a someterse a la electroporación, donde el diámetro de dichas aberturas es menor que aproximadamente 120 micrómetros y está presente en número generalmente entre 10 y 100, preferiblemente entre 20 y 60 e incluso más preferiblemente entre 20 y 40 aberturas por 1 cm de longitud de electrodo. Esta disposición proporciona la capacidad de aplicar fácilmente una fuerza/presión constante sobre el fluido, como, por ejemplo, aplicando presión con el pulgar sobre el émbolo de una jeringa en comunicación fluida con la aguja, y mantener una distribución aproximadamente uniforme en el tejido a lo largo de toda la parte fenestrada de la aguja.

En todavía realizaciones adicionales relacionadas, el electrodo de aguja no se coloca en una posición estática o fija con respecto al electrodo de anillo. En vez de esto, el electrodo de aguja alargado puede unirse a un depósito tal como una jeringa hipodérmica o similar, a través del sustrato en el extremo superior del electrodo, en el que el depósito y el electrodo de aguja se pueden mover en un plano perpendicular al plano de la superficie del electrodo de anillo, de manera que el depósito y el electrodo pueden moverse mediante un mecanismo de accionamiento para mover la aguja/depósito desde una primera posición hasta una segunda posición respecto al electrodo de anillo. La primera posición comprende una posición de reposo en la que la punta de la aguja del electrodo ya no se encuentra hacia el plano de la superficie del electrodo de anillo (es decir, la superficie destinada a entrar en contacto con el tejido) que el plano del electrodo de anillo. En tal posición, la aguja no entra en contacto con el tejido. La segunda posición comprende una posición extendida en la que la punta de la aguja se encuentra a una distancia de entre 0,5 y 4,0 cm del plano del electrodo de anillo en la dirección del tejido que, por lo tanto, colocaría la punta de la aguja en una posición de entre 0,5 y 4,0 cm en el tejido cuando el electrodo de anillo está en contacto con la superficie del tejido.

Con respecto a las realizaciones de electrodos tubulares del electrodo de aguja alargado, el electrodo es capaz de pasar medio fluido, tal como la sustancia de inyección, desde un depósito a través de los puertos del electrodo (es decir, puertos en la punta de la aguja o alternativamente puertos fenestrados. La conexión se puede realizar mediante cualquier número de métodos, tal como, por ejemplo, cuando el sustrato en el extremo del electrodo comprende un buje de plástico y un mecanismo de bloqueo de una aguja hipodérmica típica. En una realización adicional, dicho electrodo alargado tiene una superficie eléctricamente no conductora a lo largo de dicho electrodo que se extiende desde el soporte del sustrato de la aguja hasta entre 2,5 y 0,1 cm desde el extremo distal de la aguja. En una realización preferente adicional, cuando dicho electrodo está en contacto con los tejidos corporales, la corriente eléctrica no se transmitirá desde el electrodo a los tejidos a lo largo de la sección del electrodo que tiene una superficie no conductora. En una realización relacionada adicional, la superficie no conductora puede comprender cualquier tipo de sustancia eléctricamente inerte. En una realización particularmente preferida, el material que comprende la superficie no conductora puede, como comprenderá un experto en la técnica, ser seleccionado de cualquier material que sea biocompatible y no conductor tal como, por ejemplo, paraleno, epoxi, caucho, plástico, Teflon™, y similares.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, el electrodo de "anillo" comprende varios atributos útiles. En una primera realización, el electrodo tiene generalmente una forma de anillo u ovoide, y un área de superficie de electrodo que tiene una colocación de simetría relativamente uniforme con respecto al electrodo de aguja central. En una realización preferida, el electrodo de anillo destinado a entrar en contacto con la piel tiene un área de superficie de al menos aproximadamente 2,5 cm<sup>2</sup> o más. En una realización relacionada adicional, el área de superficie del electrodo de anillo es proporcional al área de superficie de la porción eléctricamente conductora del electrodo alargado para proporcionar diferencias sustanciales en las densidades de corriente entre dichos electrodos cuando se envía un pulso eléctrico entre los electrodos de anillo y alargado. Específicamente, la densidad de corriente en la superficie del electrodo de aguja alargada ( $I_E$ ) está relacionada con la densidad de corriente en la superficie del electrodo de anillo  $I_R$  descrita por la fórmula:

$$I_E/I_R=(A_R/A_E)$$

donde  $I_E$  es la densidad de corriente (amperios/cm<sup>2</sup>) en el electrodo alargado que se expresa como una relación del área de superficie del electrodo de anillo ( $A_R$ ) sobre el área de superficie del electrodo alargado ( $A_E$ ) e  $I_R$  es la densidad de corriente en amperios/cm<sup>2</sup> en el electrodo de anillo. Por lo tanto, por ejemplo, si la corriente es de 0,5 amperios y el área de superficie del electrodo alargado es de 0,20 cm<sup>2</sup> y el área de superficie del electrodo de anillo es de 20 cm<sup>2</sup>, entonces la densidad media de corriente en la superficie del electrodo de anillo es 0,0125 amperios/cm<sup>2</sup> y la densidad media de corriente en el electrodo de aguja es de 1,25 amperios/cm<sup>2</sup> durante la duración del pulso de electroporación. El área de superficie expuesta del electrodo alargado anterior se calcula para una aguja de calibre 23 con un diámetro nominal de 0,64 mm y una longitud sin aislamiento de 1,0 cm de la siguiente manera:

$$\text{Área de superficie} = (\text{Longitud}) \times (\text{Circunferencia}) = (1 \text{ cm}) \times (2\pi R) = (1 \text{ cm}) \times (2) \times (3,14159) \times (0,032 \text{ cm}) = 0,20 \text{ cm}^2$$

5 En una realización preferida adicional, la presencia de dicha superficie no conductora en dicho electrodo alargado proporciona la orientación o el enfoque de una corriente eléctrica de una densidad suficiente para provocar la electroporación de las células en la proximidad de la porción distal de dicho electrodo alargado. En dicha realización, la electroporación de las células tiene lugar preferiblemente en áreas que rodean dicha porción conductora de dicho electrodo y se extienden en dicho tejido hacia el electrodo de anillo hasta una distancia en la que una densidad de corriente reducida es incapaz de soportar suficiente energía eléctrica para provocar la poración celular. En otras palabras, el área del tejido que se está sometiendo a la electroporación es el área que rodea inmediatamente el área eléctricamente conductora en la aguja alargada y en el tejido lateralmente y hacia arriba desde la misma (es decir, hacia la superficie del tejido) hacia el electrodo de anillo para una distancia de al menos entre 0,0 y 0,5 cm, dependiendo de la fuerza del pulso de energía electroporativa. A medida que la distancia desde dicho electrodo alargado aumenta hacia el electrodo de anillo, la intensidad del campo eléctrico y la densidad de corriente se vuelven demasiado bajas para causar la electroporación. En una realización preferida adicional, la sensación de electricidad, cuya sensación está relacionada con la densidad de la corriente eléctrica, es probable que disminuya mucho en el tejido o la superficie de la piel debido a la densidad de corriente reducida. Asimismo, dado que los tejidos celulares como la piel y los tejidos musculares (es decir, epidermis, dermis, subdermis, músculo) poseen una conductividad media, ahora se puede determinar experimentalmente el volumen del tejido sometido a un pulso eléctrico que tiene una intensidad de campo y densidad de campo suficientes para electroporar células desde el electrodo de la aguja hasta el tejido a una distancia determinada. Este avance permite que el volumen/la dosis del fármaco se distribuya en un volumen de tejido definible predeterminado con el resultado del tratamiento deseado.

25 En otra realización relacionada, el electrodo de anillo está diseñado como un electrodo de anillo "dividido" que proporciona la capacidad de monitorizar la colocación correcta del electrodo sobre la superficie de la piel antes de enviar un pulso electroporativo. Específicamente, el anillo se puede aislar eléctricamente en dos o más partes, preferiblemente en dos mitades eléctricamente iguales. Esta disposición permite colocar el electrodo contra la superficie del tejido y generar una señal eléctrica sensorial para detectar la resistencia entre la superficie del electrodo y la superficie del tejido. Una vez que el sensor determina que el electrodo está correctamente en contacto con la superficie del tejido, calculada por las resistencias relativas entre cada mitad del electrodo y la superficie del tejido, las dos mitades del electrodo de anillo se ponen en comunicación eléctrica entre sí, el electrodo de aguja alargado desplegado en el tejido y un pulso electroporativo entregado al tejido *in vivo*. Esta realización proporciona la garantía de que el efecto de la impedancia eléctrica del tejido sea uniforme con respecto al electrodo de anillo antes de administrar un pulso electroporativo. En una aplicación alternativa y/o simultánea con un sensor de impedancia de anillo dividido, el dispositivo de la invención puede incluir además un sensor de presión asociado con el electrodo de anillo. En esta realización, el sensor de presión permite determinar un nivel predeterminado de presión que el usuario debe colocar con respecto al contacto del dispositivo sobre la superficie del tejido de un sujeto antes de que el aparato sea pulsado. La detección de la presión permite al usuario del dispositivo saber cuándo se ha colocado correctamente el dispositivo con respecto a la superficie del tejido para mantener un buen contacto eléctrico para un pulso de energía electroporativa.

40 En otra realización, el aparato de la invención puede proporcionar la manipulación de la superficie del tejido a retirar contra el aparato para hacer contacto consistente con la superficie del tejido. En esta realización, el aparato puede estar equipado con una disposición de ventosa formada como un diafragma flexible que comprende la sección central del electrodo de anillo. En esta realización, el diafragma tiene la forma de una ventosa como en una pistola de dardos de juguete, la circunferencia externa en conexión sellable con la circunferencia interna del anillo. Realizaciones relacionadas adicionales proporcionan asistencia para la generación de succión activa de la ventosa, que puede incluir una tracción activada por resorte de la ventosa ligeramente hacia fuera del plano del electrodo de anillo, de manera que cuando el anillo se presiona contra un tejido de la superficie, el tejido se presiona hacia arriba en el rebaje de la ventosa. Tras la colocación del tejido en el rebaje de la ventosa, el electrodo de aguja alargado se puede conducir a través del diafragma de la ventosa y en el tejido hasta la profundidad deseada.

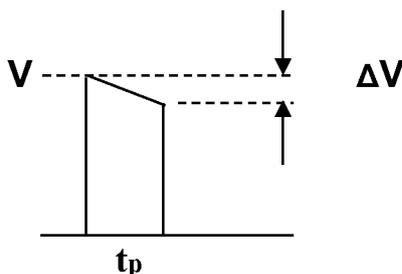
55 En otra realización más, el aparato de la invención proporciona la detección del tipo de tejido en el que se coloca el electrodo alargado. En una realización preferida, el dispositivo de la invención a través de su electrodo alargado está equipado con un sensor capaz de medir la impedancia del tejido cuando la aguja se inserta en dicho tejido. Por lo tanto, por ejemplo, a medida que el electrodo pasa de un tipo de tejido a otro, tal como, por ejemplo, el tejido adiposo al tejido muscular profundo, la impedancia detectada por los cambios del electrodo proporciona una indicación directa de que el electrodo ha pasado de un tipo de tejido, por ejemplo, tejido adiposo, a otro tipo, es decir, el músculo.

60 En una realización relacionada particularmente preferida, el dispositivo de la invención es programable para establecer el suministro de una sustancia terapéutica fluida a través de los puertos laterales en el electrodo en una posición predeterminada dentro de un tipo de tejido. Por lo tanto, por ejemplo, el dispositivo puede suministrar sustancias después de que la punta del electrodo haya pasado entre 0,5 y 1,5 cm más allá, o más profundo, que una interfaz de tipo de tejido, es decir, una vez que la aguja ha pasado más allá de la interfaz del tejido muscular/adiposo, por ejemplo, la sustancia a electroporar puede ser expulsada hacia el tejido muscular. En una realización particularmente preferida en la que se pretende que el inyectado se administre al tejido muscular, el líquido no se expulsa hasta que la punta

del electrodo de aguja alargada haya pasado la interfaz del tejido muscular/adiposo y entre en el tejido muscular entre 0,5 y 1,5 cm. Alternativamente, se puede programar cualquier profundidad de penetración de modo que la ubicación específica de suministro en el tejido de las sustancias se pueda predetermined. Por ejemplo, puede ser deseable, dependiendo de la indicación, entregarse al tejido dérmico, al tejido adiposo, o al tejido muscular. Por lo tanto, es otra realización que el sensor se puede usar para indicar la ubicación de la aguja penetrante para el suministro de sustancias y pulsos electroporativos a cualquier profundidad de tejido.

En más realizaciones adicionales, el dispositivo de la invención tiene una disposición novedosa de componentes eléctricos de tal manera que el dispositivo es portátil y se puede usar sin unirlo a una fuente fija de energía eléctrica, tal como un toma de pared. En una realización preferida, el dispositivo de la invención posee al menos un condensador que tiene un potencial de capacitancia nominal de 2000 uF (microFaradios). En una realización preferida adicional, el condensador puede cargarse a un valor de hasta 200 voltios antes de enviar descargas de energía desde dicho condensador a los electrodos. En una realización preferida adicional, el circuito está diseñado para sobrecargar relativamente el condensador y luego, tras la descarga del condensador, usar un circuito de tensión regulada que permita un pulso de tensión constante o un pulso de onda cuadrada relativamente limpio a lo largo del período de pulso para el paciente, incluso aunque la tensión del condensador disminuya debido a la disipación de carga del condensador a través de los electrodos y el tejido tratado. Por consiguiente, dicha disposición permite simular un pulso de corriente constante, aunque es la descarga de tensión la que está regulada. Por "tensión regulada" se entiende una salida de tensión regulada a la baja durante el pulso del condensador que está por debajo de la tensión a la que se carga el condensador, como se muestra en la figura 6. El uso de una tensión tan baja permite que la tensión del pulso permanezca en una salida constante durante la descarga del condensador. La caída de tensión durante el pulso (delta V) se aproxima mediante la siguiente fórmula, donde "i" es la corriente en el tejido que se está tratando, "Q" es la carga en el condensador que tiene una capacidad máxima de "C", y t es la longitud del pulso.

$$i = dQ/dt \cong C \Delta V/t_p$$



Por lo tanto, el pulso de salida de tensión regulada se establece por debajo de la tensión máxima V menos la caída esperada de ΔV a través del pulso (o tren de pulsos), de modo que cada pulso es una onda cuadrada relativamente limpia, lo que proporciona una tensión sustancialmente constante al tejido. Dado que se ha determinado que la impedancia tisular observada entre el electrodo alargado y el electrodo de anillo es bastante constante a lo largo del pulso administrado (particularmente en lo que respecta a los pulsos destinados al uso electroporativo de agentes terapéuticos en las células), la tensión sustancialmente constante dará como resultado una corriente sustancialmente constante en el tejido a lo largo de la longitud del pulso.

En otras realizaciones adicionales, los circuitos eléctricos permiten que el condensador se cargue a través de una fuente de energía eléctrica fija, tal como una fuente de corriente alterna directamente o por inducción, o mediante una unidad del tipo de carga de batería.

En otra realización más, la carga eléctrica colocada en el electrodo alargado es el polo con carga negativa, mientras que el electrodo de anillo es el polo con carga positiva. Por carga negativa se entiende que los electrones emiten, mientras que por carga positiva se entiende que los electrones son atraídos a los mismos. Este aspecto proporciona la característica novedosa de proporcionar para minimizar la contaminación positiva de iones metálicos en los tejidos corporales a partir de los iones metálicos que se generan a partir del electrodo positivo. Como se describe en el presente documento, se ha encontrado que la eliminación de iones tiene lugar casi exclusivamente en el polo positivo. Específicamente, el metal se desprende esencialmente solo del electrodo positivo durante la electroporación. Por lo tanto, la presente invención proporciona la capacidad de proporcionar un pulso eléctrico electroporativo de energía a los tejidos corporales mientras minimiza la contaminación del ambiente biológico con iones metálicos potencialmente tóxicos. Aunque los iones son capaces de desprenderse del electrodo de anillo proporcional a la intensidad de la corriente y la duración del pulso, los iones metálicos que se desprenden de la superficie de la piel deben permanecer fuera de la barrera cutánea y del entorno biológico del cuerpo.

En la presente divulgación, también se discute un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que comprende la aplicación de un campo eléctrico pulsado a las células dentro de los tejidos corporales, particularmente las células dérmicas y/o musculares del sujeto, sustancialmente de manera contemporánea con la aplicación de un

agente inductor de respuesta inmune a dichos tejidos corporales, de tal manera que el agente inductor de la respuesta inmune se introduce en dichas células, induciendo así en el sujeto una respuesta inmune.

5 En la presente divulgación, también se discute un método para la aplicación terapéutica de la electroporación a células dentro de ciertos tejidos, tal como las células musculares dentro de la dermis y las células musculares esqueléticas subyacentes de un sujeto para introducir un efecto metabólico o sistémico en el receptor. Por ejemplo, los métodos contemplados incluyen tratamientos de terapia génica en los que se administra a un mamífero un gen que codifica una citocina o quimiocina u hormona u otro polipéptido que tiene un efecto terapéutico directo.

10 Otra realización más contempla un kit de electrodos para uso junto con terapia de electroporación, dicho kit tiene un conjunto de electrodo de anillo, dicho conjunto comprende un electrodo de anillo y un electrodo central alargado, dicho conjunto está diseñado para conectarse a un dispositivo para manejar dicho anillo y conjunto de electrodo alargado y usarlo con una fuente de inyección de fluido y una fuente de energía eléctrica.

15 En algunas realizaciones, el diseño del dispositivo de la presente invención se puede adaptar para su uso en la vacunación o el tratamiento de animales domésticos de origen ganadero/alimento, como el ganado, ovejas, cabras y caballos. En esta realización, el electrodo de anillo está diseñado con una multiplicidad de cortas proyecciones eléctricamente conductoras sobre el mismo. Dichas proyecciones proporcionan tanto la relación de área de superficie total requerida con el electrodo de aguja y permiten un contacto adecuado con el tejido de la superficie de la piel, permitiendo las proyecciones que el electrodo de anillo/superficie penetre en el pelaje del animal, piel, pelo, o abrigo de lana.

#### Breve descripción de las figuras

25 Esta memoria descriptiva contiene al menos una figura ejecutada en color. Copias de la misma con dibujos en color se proporcionarán mediante petición y bajo pago de la tasa necesaria.

30 La figura 1 muestra un dibujo esquemático de un sistema de dispositivo de electroporación 10 que comprende un electrodo en forma de anillo 99 (aquí el anillo se representa como de forma ovoide), un dispositivo portátil de mano 100 que soporta el electrodo de anillo y su conjunto, una unidad de carga 101 para cargar un condensador (C) que está en comunicación eléctrica con dicho conjunto de electrodo de anillo, un software operado por ordenador 102 para establecer parámetros de pulso y monitorizar y registrar condiciones de pulsos, y calidad de carga impartida a dicho condensador, que ordenador es alimentado por una fuente de energía de corriente alterna externa 103 o alternativamente, una batería de CC (no mostrada).

35 La figura 2 es un dibujo en perspectiva de un ejemplo de la disposición espacial relativa entre los electrodos alargado 120 y de anillo 200. Específicamente, el electrodo alargado 120 se coloca en un plano perpendicular con respecto al electrodo de anillo 200, de manera que el electrodo alargado 120 se encuentra a lo largo de un eje central al electrodo de anillo 200 y está en comunicación fluida con un depósito 140. El electrodo alargado 120 comprende además una sección 130 que no es conductora de la corriente eléctrica. La figura representa además el sustrato 121 que comprende el extremo proximal del electrodo alargado, así como un sustrato de soporte 201 para soportar el electrodo de anillo.

40 Las figuras 3A, B y C son dibujos relacionados que muestran en la figura 3A una representación en sección transversal del anillo y el electrodo alargado en el tejido. Específicamente, el electrodo de anillo 200 se muestra acoplado con la superficie del tejido 15, con el electrodo alargado 120 que tiene una sección aislada 130 en dicho tejido. Se representan líneas de fuerza teóricas 310 debido a un pulso de energía electroporativa típico que se concentra a una densidad de corriente más alta en el electrodo alargado 120 y menos concentrado en la superficie del electrodo de anillo 200. La figura 3B muestra una vista en primer plano de la aguja alargada 120 con una multiplicidad de orificios 150 en la región distal de dicha aguja 120. La figura muestra, además, la expulsión 140 de dichos orificios 150 y líneas teóricas de fuerza eléctrica 310. La figura 3C es una vista desde arriba que representa líneas teóricas de la fuerza eléctrica 310 que irradian desde el electrodo central de aguja de alta densidad de corriente 120 al electrodo de anillo de baja densidad de corriente 200.

45 Las figuras 4A y B son dibujos en perspectiva que muestran realizaciones de electrodos de anillo divididos en los que un electrodo de anillo está dividido físicamente en dos mitades con un pequeño espacio de aire 152 entre las mismas (figura 4A) o que está dividido físicamente pero conectado por un sustrato no conductor 160. En estas realizaciones, cada mitad del anillo se puede aislar electrónicamente entre sí.

50 Las figuras 5A, B, C y D son dibujos planos que representan el lado del electrodo 155 de los electrodos de anillo dividido montados en el sustrato de soporte 156 para varias formas útiles de un electrodo de anillo dividido.

55 La figura 6 es un gráfico que muestra un potencial de tensión regulada generado al cargar un condensador a un potencial de tensión más alto que el empleado en realidad durante el pulso con el fin de obtener una descarga de tensión relativamente plana o constante.

60 La figura 7 es un dibujo esquemático de una forma probable de un bolo electroporado de sustancia administrada que usa el sistema de electrodo de anillo de la presente invención.

65 La figura 8 es un dibujo en sección transversal del soporte del electrodo de anillo 201 que cubre el electrodo de anillo 200 con una ventosa 210 de aspiración plegable situada en el centro. Según se representa, la ventosa 210 en esta realización está conectada al resorte 215 que soporta el soporte elevador 220 en una relación deslizable a una porción de cualquiera de los alojamientos del conjunto 205.

Las figuras 9A, B, C, D, E y F representan fotografías de tinción de proteína fluorescente verde (GFP) en color superpuestas contra una representación de la colocación de un anillo de área de superficie de 25 cc y un electrodo de aguja que muestra que el foco real de energía electroporativa en el tejido, como lo muestra la tinción de GFP que corresponde al resultado esperado teóricamente descrito en la figura 7 que depende de la intensidad de campo y la densidad de corriente correspondiente del pulso. En las figuras 9A (tinción de GFP) y 9B (GFP y campo de luz visible) se muestran resultados en tejido muscular de conejo utilizando un pulso nominal de 289 mAmp/64 voltios. La figura 9C muestra un pulso nominal de 384 mAmp/81 voltios en el que un mayor volumen de tejido que en la figura 9A ha sufrido un pulso de electroporación. En la figura 9D se muestra la tinción de GFP después de un pulso nominal de 579 mAmp/103 voltios que muestra un volumen de tejido aún mayor que experimenta electroporación, y en las figuras 9E (tinción de GFP) y 9F (GFP y campo de luz visible) se muestran con tinción de GFP después de un pulso nominal de 758 mAmp/138 voltios de electroporación de volumen de tejido aún mayor.

Las figuras 10A y B son fotografías en color que muestran GFP (figura 10A) y GFP y luz visible combinadas (figura 10B) donde el tejido se sometió a un pulso de 189 mAmp/58 voltios usando un electrodo de anillo que tiene un área de superficie de 2,5 cc. Como se muestra, el volumen de tejido se limita al tejido que rodea la aguja alargada. Las figuras 11A y B muestran dibujos esquemáticos que ilustran el posicionamiento de aberturas a lo largo de la porción eléctricamente conductora del árbol de electrodo tubular alargado. Las aberturas pueden ser de entre 20 y 120 micrómetros de diámetro. Según se representa, las aberturas están espaciadas a lo largo de la longitud de la aguja (figura 11A) y a 90 grados entre sí alrededor de la circunferencia del árbol de la aguja (figura 11B).

La figura 12 es una fotografía en color que muestra una tinción de GFP mixta con luz visible y fluorescente en el tejido muscular después de la dispersión de la inyección de GFP a través de aberturas de 60 micrómetros. Como se observó, la distribución de la sustancia inyectable se dispersa de manera uniforme sobre la trayectoria de la aguja en el tejido muscular.

Las figuras 13A y B son dibujos en perspectiva de las realizaciones del anillo diseñadas para usarse en la entrega de pulsos electroporativos al cabello, piel, o lana cubierta de animales de manada domésticos. De acuerdo con la invención, el anillo 301, ya sea redondo, ovoide, dividido o no, está equipado con una pluralidad de proyecciones eléctricamente conductoras 300 que pueden penetrar un cabello, piel, o abrigo de lana para entrar en contacto con la superficie de la piel del animal.

Las figuras 14A, B y C son gráficas que representan la detección de interfaces de tipo de tejido divergentes, específicamente, tejido adiposo o de grasa y tejido muscular. En la figura 14A, En la figura 14B, En la figura 14C.

Las figuras 15 A, B, C y D son diagramas pictóricos que muestran el proceso de detección de tipos de tejido seguido de la conducción simultánea de la aguja en el tejido mientras se inyecta la sustancia inyectable. La figura 15A muestra que los electrodos utilizados para detectar en esta configuración están en la aguja de inyección. Específicamente, el electrodo 400 está aislado eléctricamente de la punta de la aguja que actúa como electrodo de retorno 401.

Las figuras 16A-E son fotografías de tinción de GFP que muestran la electroporación exitosa de tejido muscular animal usando el electrodo de anillo que tiene una pluralidad de proyecciones. Cada foto sucesiva es la de cortes de tejido adyacentes.

Las figuras 17A, B, C y D son diagramas que muestran ejemplos de construcción de agujas útiles para detectar la resistencia del tejido para determinar las interfaces del tejido. En la figura 17A, la punta de una aguja de jeringa típica puede construirse, en la que la sección de punta actúa como un polo eléctricamente conductor, mientras que un segundo polo eléctricamente conductor está revestido alrededor del electrodo de punta con un material aislante entre los mismos. En la figura 17B, se representa una disposición de doble aguja en la que la aguja central del sistema actual es en realidad dos tubos de suministro muy separados y cada uno puede actuar como electrodos individuales. En las figuras 17C y D, se representan dos formatos de diseño adicionales para un sistema de electrodo central doble. En la figura 17C, los electrodos representados pueden tener aislamiento para enfocar la detección solo en la región por la que pasan los extremos de los electrodos, mientras que en la figura 17D, los electrodos no solo poseen una porción aislada, sino también puertos fenestrados según los elementos de la invención actualmente descritos.

Las figuras 18A y B son gráficos que muestran en la figura 18A los resultados de la expresión del plásmido gWiz-SEAP, un plásmido que codifica la fosfatasa alcalina secretada, después de la electroporación en tejidos de conejo utilizando los métodos y dispositivos de la invención, a saber, el uso de un electrodo de anillo plano y un electrodo de anillo con proyecciones (electrodo de peine). También se muestran el control negativo y el control positivo utilizando un dispositivo elgen. En la figura 18B, se muestra la inducción de anticuerpos anti-HBsAg en conejos para los mismos electrodos usando las mismas condiciones de administración.

#### Descripción detallada de la invención

Volviendo ahora a otras realizaciones de la presente invención, tal y como se utilizan en el presente documento, "biocompatible" o "material biocompatible" significa un material que es adecuado para la introducción en el cuerpo humano con fines terapéuticos. Por ejemplo, con respecto a los electrodos y materiales tales como el aislamiento utilizado para cubrir las superficies conductoras eléctricas, dicho recubrimiento comprende materiales que son inertes y no provocan irritación o alergia en el tejido de un mamífero.

Tal y como se usa en el presente documento, "sustancia de inyección" significa cualquier composición inyectable de un agente terapéutico para ser administrada a un tejido objetivo. Como se ha descrito en el presente documento, los agentes terapéuticos que comprenden sustancias inyectables contempladas para su uso en la práctica de la presente

invencción incluyen ácidos nucleicos, polipéptidos, agentes quimioterapéuticos y similares sin limitación, como cualquier ácido nucleico descrito a lo largo de esta patente, así como secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos, tal como, por ejemplo, codificando IL-2, IL-12, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, PSA, PSMA, PAP, MUC-1, Her-2, NS 3 y 4, etc., y ácidos nucleicos que comprenden ARN, ADN, ARNi, ARNsi, micro ARN, y shARN. Para los fines de esta patente, la sustancia inyectable también puede incluir el ADN que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) y otras sustancias utilizadas para visualizar la ubicación de los materiales inyectados en el tejido. Las sustancias inyectables pueden incluir además formulaciones farmacéuticas que comprenden sales, excipientes, y otros materiales para tamponado aceptable, como entenderán los expertos en las técnicas farmacéuticas.

Como se usa en este documento con respecto a la aplicación de un pulso electroporativo de energía eléctrica en un tejido concomitante con una sustancia inyectable, el término "sustancialmente de manera contemporánea" significa que el pulso eléctrico y la sustancia de inyección se entregan al tejido razonablemente cerca en el tiempo. Preferentemente, la sustancia inyectable se administra antes o simultáneamente con un pulso electroporativo de energía eléctrica. Al aplicar múltiples pulsos eléctricos, La sustancia inyectable puede administrarse antes o después de cada uno de los pulsos, o en cualquier momento entre los pulsos eléctricos.

Tal y como se usa en el presente documento, los términos "impulso", "pulso", "impulso eléctrico", "pulso eléctrico", "pulso eléctrico", "electro-pulso" y sus variaciones gramaticales son intercambiables y se refieren a un estímulo eléctrico. Aunque los diversos términos se usan frecuentemente aquí en singular, las formas singulares de los términos incluyen pulsos múltiples. Los pulsos eléctricos preferidos son campos eléctricos pulsados aplicados a los fines de la poración reversible de las membranas celulares. El pulso puede ser unipolar, bipolar, exponencial o de onda cuadrada u otra forma. Los pulsos eléctricos contemplados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen aquellos pulsos de suficiente tensión, corriente, densidad de corriente, y duración y frecuencia para causar la electroporación en lugares específicos dentro de un tejido corporal.

#### El sistema de electrodo de anillo

El dispositivo de la invención comprende un sistema de electrodo para realizar la electroporación de células *in vivo*. En una realización preferida, el sistema comprende (1) un electrodo positivo generalmente en forma de anillo u ovoide, (2) un electrodo negativo de aguja única perforante de tejido alargado que comprende una porción conductora y una no conductora del mismo, dicho electrodo de aguja única colocado de manera que se extienda a lo largo de un eje central de dicho electrodo de anillo y perpendicular al plano del electrodo de anillo de tal manera que la corriente eléctrica pueda dirigirse a un área de superficie limitada del electrodo en una porción distal de dicho electrodo de aguja, (3) un mecanismo para conducir el electrodo de una sola aguja hacia el tejido, (4) un mecanismo para inyectar un fluido que contiene una cantidad efectiva de un agente terapéutico a través de dicho electrodo de aguja alargado, y (5) una fuente de energía eléctrica para cargar un condensador cuya descarga comprende al menos un pulso eléctrico, preferiblemente, un pulso de tensión regulado de onda cuadrada, para entregar un pulso electroporativo de energía eléctrica a los electrodos.

Un ejemplo de las realizaciones generales de la presente invención se muestra en la figura 1. Específicamente, el sistema 10 incluye un alojamiento portátil manipulable a mano 100 que está asociado con el electrodo de anillo/aguja, una unidad de carga 101, un sistema de software informático 102, y una fuente de energía eléctrica 103. Esta fuente de energía 103 puede ser A/C o C/C.

El elemento de alojamiento 100, además comprende conductores, el cual puede ser operado mecánicamente usando levas, engranajes, y/o palancas, o por medios inanimados como un motor eléctrico, para conducir el único electrodo alargado desde una posición inicial hasta una posición terminal, cuyo movimiento del electrodo puede estar entre un desplazamiento de aproximadamente entre 0,5 y 4 cm. En una realización preferida, el único electrodo alargado 120 (figura 2) actúa también como una aguja de inyección. Por ende, al menos una parte de la aguja de inyección 120 debe estar formada por un material que posea las cualidades de un conductor eléctrico. En una realización preferida, el conductor manipula la aguja alargada impulsando el propio depósito que está unido a la aguja. En una realización preferida adicional, el conductor manipula el cuerpo de una jeringa de manera que la jeringa se lleva con la combinación de electrodo/aguja de inyección desde la posición inicial hasta la posición terminal.

En realizaciones particularmente preferidas, el electrodo de aguja puede modificarse para proporcionar el suministro radial de una sustancia de inyección, por ejemplo, proporcionando una o más aberturas dispuestas a lo largo de su longitud y proximales a la punta de la aguja (es decir, una aguja fenestrada), en la que dichas aberturas están en comunicación fluida con el interior hueco de la aguja de inyección. La aguja 120 puede estar formada por un metal biocompatible tal como acero inoxidable, oro, plata, etc. En una realización preferida adicional, El electrodo alargado 120 puede diseñarse para que no tenga un puerto en la punta de la aguja en contraste con las agujas de jeringa típicas. En dicha realización, los puertos (aberturas) están ubicados solo alrededor de la porción eléctricamente conductora del árbol del electrodo, de modo que el fluido expulsado se dirija al tejido directamente en el área destinada a administrar un pulso electroporativo de energía eléctrica como se muestra en la figura 3B. En contraste con las agujas fenestradas típicas (en el que el fluido expulsado fluye predominantemente por el puerto ubicado en la punta de la aguja, si está presente, o alternativamente a través de los orificios laterales superior o primero contactados por el fluido expresado a lo largo de la trayectoria de la aguja debido a la dinámica del fluido, como es bien entendido por

los expertos en las técnicas hidrológicas), las agujas fenestradas de la presente invención, debido al rango de tamaño de las aberturas y la eliminación de la abertura de la punta, proporcionan una distribución uniforme del fluido a través de dichas aberturas a lo largo de toda la longitud de la aguja que tiene dichos orificios utilizando solo presiones nominales para inyectar las sustancias de inyección de fluido. Por presiones nominales se entiende que la presión requerida para expulsar el fluido de electrodos que tienen un tamaño de micrómetros es solo la presión típicamente requerida durante la inyección de una sustancia a través de una aguja hipodérmica estándar. Este sorprendente hallazgo se logra al dimensionar las aberturas a lo largo del árbol de la aguja hasta un diámetro en el rango de micrómetros, así como incluir una multiplicidad de tales aberturas que van desde 10 a 100, más preferiblemente entre 20 y 60 y aún más preferiblemente entre 20 y 40 aberturas de este tipo por 1 cm de longitud de aguja/electrodo eléctricamente conductor. Preferentemente, el diámetro de la abertura para obtener una expresión uniforme del fluido a través de cada temperatura es de entre 20 y 120 micrómetros, más preferiblemente entre 30 y 100 micrómetros, e incluso más preferiblemente entre 30 y 80 micrómetros. Los diámetros específicos incluyen 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 micrómetros y cualquier diámetro incremental entre los mismos. Los números de aberturas son preferiblemente al menos 20/cm, más preferiblemente al menos 30/cm y aún más preferiblemente al menos 40/cm de longitud de electrodo conductor eléctrico. Como se muestra en las figuras 11A y B, una multiplicidad de aberturas de tamaño micrométrico se pueden espaciar a lo largo del árbol de la aguja y para su distribución cilíndrica, según se representa en la figura 11B, las aberturas se pueden espaciar alrededor de la circunferencia de la aguja en ángulos de 90 grados, de modo que 4 aberturas se oponen entre sí como se muestra o se pueden espaciar alrededor de la circunferencia de la aguja a 60 grados para obtener más aberturas por longitud de aguja. Aún más, las aberturas pueden formarse en el árbol de la aguja en una configuración en espiral, de modo que cuando, por ejemplo, se emplea una colocación en sección transversal de 60 grados de las aberturas, las aberturas no están en la misma sección transversal de la aguja, sino que están escalonadas fuera de un plano de sección transversal, de modo que la formación de las aberturas a lo largo del eje de la aguja está en un formato en espiral. Como se describe más adelante en la figura 12, los resultados de un experimento de GFP muestran una distribución consistente sobre la trayectoria de la aguja del material expresado como lo indica la localización cilíndrica de la GFP. En este experimento, el volumen transfectado se midió a 1,2 cm<sup>3</sup>, habiendo sido sometido el tejido a dos pulsos sucesivos de 60 milisegundos, 98 V, 768 mAmp entregados con una separación de 200 milisegundos.

El electrodo de aguja única tiene una porción aislada 130 que no es eléctricamente conductora. En una realización preferida adicional, la porción no conductora puede proporcionarse mediante un revestimiento de aislamiento tal como un plástico biocompatible, paraleno, Teflon™, epoxi u otro material que no permita que la corriente pase. Aún más, la porción no conductora de dicho electrodo alargado se encuentra en dicho electrodo a lo largo de su región proximal. Específicamente, el electrodo alargado tendrá una superficie no conductora entre el extremo proximal, (que se encuentra en comunicación fluida con un depósito que contiene una sustancia inyectable para ser administrada a los tejidos corporales) y termina entre 0,1 cm y 2,5 cm desde el extremo distal del electrodo.

En una realización adicional, el electrodo en forma de anillo 200 puede formarse en cualquier forma plana que tenga simetría, incluyendo pero no limitado a, un anillo circular, un círculo de rosquilla, una rosquilla ovalada, un anillo rectangular, una rosquilla de triángulo isósceles, una rosquilla de triángulo equilátero, una rosquilla cuadrada, una rosquilla rectangular, una rosquilla pentagonal, y una rosquilla hexagonal o similar, como se muestra, por ejemplo, en las figuras 5A-D siempre que el electrodo se forme en un plano, sea generalmente simétrico (es decir, tenga una forma que se pueda reconocer como que tiene una forma que se puede dividir de manera uniforme en dos porciones conductoras eléctricamente relativamente iguales), y sea conductor al menos en un lado del plano (es decir, el lado orientado hacia la superficie del cuerpo contra el cual se coloca el electrodo), además, teniendo el electrodo un área central con respecto a la estructura de anillo que está vacía de material eléctricamente conductor tal como un hueco u orificio o, alternativamente, un material no conductor, tal como, por ejemplo, un material flexible tal como caucho o silicio. Cuando dicho material flexible esté presente, dicho material puede además diseñarse para que actúe como una ventosa para hacer que el tejido de la superficie se estire hacia fuera de la superficie del tejido. En realizaciones adicionales, el área vacía o no conductora que forma el centro del anillo permite que el electrodo alargado pase a través del mismo, ya sea a través de un vacío y directamente en contacto con un tejido de la superficie, o alternativamente, a través de dicho material de ventosa elástico y luego en contacto con dicho tejido.

En otro atributo, el electrodo de anillo está diseñado de modo que se pueda aislar eléctricamente en dos mitades. Específicamente, el anillo puede fabricarse como dos mitades separadas o puede comprender dos mitades conectadas entre sí por un sustrato no conductor (consulte las figuras 4A y B). En este aspecto, las mitades del electrodo de anillo pueden estar aisladas eléctricamente entre sí, lo que permite que la disposición eléctrica utilice el electrodo para controlar la calidad del contacto eléctrico del electrodo de anillo con la superficie del tejido. Un experto en las técnicas eléctricas puede comprender fácilmente las disposiciones eléctricas específicas para llevar a cabo el contacto de detección. En operación, por ejemplo, el electrodo de anillo del aparato de la invención se presiona contra la piel. El circuito del sistema de electrodos de anillo incluye conductores eléctricos a cada mitad del anillo partido y se puede realizar una verificación de impedancia para cada mitad con respecto a la corriente detectada o, alternativamente, resistencia, medida entre el electrodo y el tejido de la superficie al enviar una señal eléctrica nominal a través de cada mitad del electrodo. Si el electrodo de anillo se coloca correctamente contra la superficie del tejido, la resistencia o corriente medida en cada mitad será esencialmente la misma, lo que indica que el usuario ha aplicado el electrodo de anillo y el dispositivo a la superficie del tejido de manera uniforme, de modo que cuando el único electrodo alargado se introduce en el tejido y el pulso eléctrico enviado entre los electrodos alargados y de anillo, el

flujo de corriente entre el electrodo alargado y las dos mitades del anillo dividido será equivalente. Se pueden usar numerosas formas de electrodo de anillo dividido, incluyendo, por ejemplo, las formas representadas en las figuras 5A-D.

5 Con respecto a las realizaciones en las que el área vacía en el centro del electrodo de anillo comprende un caucho u otro material no conductor flexible para actuar como una ventosa, la superficie del tejido puede introducirse en la ventosa mediante un mecanismo de succión que hace que el tejido se arrastre contra el material elástico, lo que proporciona un contacto más cercano y constante del tejido con el electrodo para soportar una conductividad eléctrica constante entre las superficies del tejido y el electrodo de anillo. La aproximación del tejido contra la ventosa proporciona además un mantenimiento consistente en la profundidad de la administración de sustancias inyectables entre los diferentes sujetos tratados. Cuando el tejido se aproxima contra la succión, la aguja alargada se puede conducir a través del caucho de la ventosa y en el tejido hasta una profundidad predeterminada constante.

15 Tal y como se muestra en la figura 8, por ejemplo, se puede incorporar un mecanismo en el conjunto de electrodo de anillo que comprende la ventosa de succión elástica 210 en conexión sellable con el sustrato 201 del electrodo de anillo. Específicamente, por ejemplo, se puede conectar un sustrato elevador 220 cargado por resorte 215 en relación deslizable con el sustrato de alojamiento de conjunto 205 al electrodo de anillo para ayudar a la tracción hacia fuera (desde la superficie del tejido) de la ventosa que en uso proporcionará el empuje hacia fuera del tejido de la superficie.

20 En una realización preferida, el electrodo alargado está en comunicación fluida en su extremo proximal a un depósito que contiene una sustancia de inyección. En una realización preferente adicional, el aparato de la invención incluye un mecanismo de accionamiento para accionar el electrodo alargado y, opcionalmente, dicho depósito unido al mismo desde una posición inicial a una posición terminal en relación con dicho alojamiento y electrodo de anillo. Preferentemente, la longitud del recorrido del electrodo alargado accionado puede ser de entre 0,5 y 4 cm. Para realizaciones que comprenden una ventosa, la aguja se dirige para perforar a través de la ventosa y hacia el tejido.

30 En otra realización concomitante y/o alternativa, el sistema de electrodo de anillo puede comprender un sensor de presión asociado con el electrodo de anillo, ya que un experto en la técnica eléctrica y mecánica entenderá cómo realizarlo. En esta realización, un sensor de presión está dispuesto de tal manera que cuando el electrodo de anillo se presiona contra la superficie del tejido, el sensor medirá la presión física aplicada al dispositivo contra dicho tejido. Si el valor de presión es suficiente, el dispositivo será capaz de activar el envío de un pulso electroporativo de energía eléctrica a los electrodos. En realizaciones preferidas, la presión requerida para la activación del dispositivo puede estar entre 0,5 y 1 lbs/pulgada cuadrada (3,44 y 6,88 kPa). Como comprenderá un experto en las técnicas respectivas, el aparato de la invención incluye software para medir dicha presión para determinar la cantidad de fuerza física colocada en el electrodo de anillo contra la superficie del tejido. Debe entenderse que la aplicación de dicha fuerza física está destinada a ayudar a un buen contacto eléctrico entre el electrodo de anillo y la superficie del tejido. Para realizaciones que comprenden una ventosa, dicha presión también ayuda a la función de la ventosa, de modo que cuando se activa la succión, el tejido se retirará fácilmente contra dicha ventosa.

40 En más realizaciones adicionales, la presente invención proporciona una capacidad hasta ahora no descubierta para evitar el desprendimiento de iones metálicos potencialmente tóxicos en los tejidos de un mamífero cuando se usan electrodos de penetración de tejido de acero inoxidable estándar. Si bien se sabe que el uso de electrodos de acero inoxidable recubiertos de oro proporcionará una eliminación de los metales pesados tóxicos presentes en el acero inoxidable en los tejidos como se describe en la solicitud de patente US 10/516.757, el uso de oro no es tan deseado como el acero inoxidable debido al coste adicional del oro, así como a la aplicación de oro a un electrodo. Asombrosamente, como se describe en el presente documento, el acero inoxidable se puede utilizar en electrodos de penetración de tejidos donde, como en el presente caso, solo hay un electrodo que penetra en el tejido y un contraelectrodo correspondiente que no penetra en el tejido. En este caso, el electrodo de penetración de acero inoxidable arrojará cantidades mínimas de iones metálicos en el tejido si dicho electrodo actúa como el electrodo con carga negativa mientras que el electrodo que no penetra en el tejido, tal como el electrodo de anillo aquí descrito, actúa como el electrodo positivo.

55 En experimentos de los inventores actuales, agujas de inyección hipodérmicas de acero inoxidable estándar, establecidas como el electrodo negativo o positivo, fueron probadas contra un electrodo de oro, también se establece como el electrodo negativo o positivo, en salina fisiológica. Cuando el electrodo de oro se estableció como el negativo y el electrodo de acero inoxidable se estableció como el positivo, los iones metálicos encontrados en la solución después de dos pulsos de electroporación de 60 milisegundos de una corriente de 400 mAmp y 40 voltios fueron los siguientes: Manganeso 0,035 ppm (partes por millón), Níquel 0,200 ppm, Molibdeno menos de 0,003 ppm, Cromo 0,413 ppm, y hierro 0,977 ppm. En contraste, cuando el electrodo de oro se estableció como positivo y el electrodo de acero inoxidable se estableció como negativo en las mismas condiciones, prácticamente no se detectaron iones metálicos detectables en solución, es decir, en cada caso, si el manganeso, níquel, molibdeno, cromo o hierro, se observaron menos de 0,003 ppm.

65 En una realización preferida adicional, el área de superficie del electrodo de anillo es proporcional al área de superficie del electrodo alargado. Generalmente, la relación entre el área de superficie del electrodo de anillo y el área de superficie del electrodo de aguja es al menos 5:1, respectivamente. Preferentemente, la relación de las áreas

superficiales del anillo al electrodo alargado está entre 10:1 a 1000:1. Las proporciones de 10:1 son preferibles para el uso en sujetos humanos, mientras que una proporción entre 5:1 y 10:1 es aceptable para el uso en animales de rebaño. En realizaciones relacionadas, el electrodo de anillo puede tener un área de superficie de entre 1 cm<sup>2</sup> y 100 cm<sup>2</sup> y la porción eléctricamente conductora del electrodo alargado puede tener una longitud de entre 0,01 cm y 3,0 cm. Para electrodos alargados que tienen dicho rango de dimensión lineal, las áreas de superficie correspondientes a tales longitudes dependen del calibre de los electrodos (es decir, sus respectivos diámetros exteriores). Como se muestra en el siguiente Anexo A, las áreas de superficie de los electrodos alargados se delimitan con la fórmula: Área = CL = πDL para calcular, donde D es el diámetro y L es la longitud expuesta:

10

		Programación A						
Calibre de aguja	Dia (mm)	Longitud conductora (cm)						
		0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	
	20	0,91	0,14	0,29	0,43	0,57	0,71	0,86
	21	0,82	0,13	0,26	0,39	0,52	0,64	0,77
	22	0,72	0,11	0,23	0,34	0,45	0,57	0,68
	23	0,64	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60
	24	0,57	0,09	0,18	0,27	0,36	0,45	0,54
	25	0,51	0,08	0,16	0,24	0,32	0,40	0,48
	26	0,46	0,07	0,14	0,22	0,29	0,36	0,43
	27	0,41	0,06	0,13	0,19	0,26	0,32	0,39
	28	0,36	0,06	0,11	0,17	0,23	0,28	0,34

Los números en negrita en la tabla son área en cm<sup>2</sup>

Con respecto a la lista anterior de áreas de superficie de los electrodos alargados útiles, en una realización particularmente preferida, el calibre de la aguja del electrodo puede estar entre 22 y 24 calibres que van desde aproximadamente 0,1 a 0,6 cm<sup>2</sup> hasta una profundidad de inserción de hasta 4,0 cm.

15

Con respecto a las relaciones de área de superficie de los electrodos alargados y de anillo anteriores, tales relaciones se correlacionan con la densidad de corriente en la que la relación entre los electrodos de anillo y alargados se describe mediante la siguiente fórmula como se señaló anteriormente:

20

$$A_R/A_E = I_E/I_R$$

donde A<sub>R</sub> es el área de superficie del electrodo de anillo, A<sub>E</sub> es el área de superficie del electrodo alargado, I<sub>E</sub> es la densidad de corriente promedio en el electrodo alargado, e I<sub>R</sub> es la densidad de corriente promedio en el electrodo de anillo. Por lo tanto, para cualquier área de superficie dada de los electrodos alargados y de anillo, las relaciones son directamente proporcionales a la densidad de corriente observable en las superficies alargada y de los electrodos de anillo. En una realización preferida adicional, la relación entre la densidad de corriente promedio del electrodo de anillo y el electrodo alargado expuesto tiene la intención de tener un valor entre 1000:1 y 50:1, más preferiblemente entre 200:1 a 100:1. Asimismo, dichas relaciones de valores están directamente asociadas con la obtención de energías eléctricas electroporativas cerca del electrodo alargado, mientras que se obtienen energías eléctricas no electroporativas más cercanas al electrodo de anillo. Tales relaciones proporcionan además una corriente disminuida disponible para excitar las células nerviosas sensoriales y, por lo tanto, proporcionan una disminución potencial de la sensación de choque eléctrico en los tejidos de la superficie cerca del electrodo de anillo. Este es particularmente el caso cuando se suministran pulsos de energía eléctrica que tienen una corriente nominal de entre 0,01 Amp y 1,0 Amp (de pulso de descarga de corriente constante).

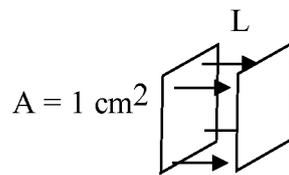
35

Como es comprensible para un experto en la técnica, la diferencia en el área de superficie de los electrodos alargados y de anillo proporciona una condición mientras se pulsa donde la densidad de la corriente eléctrica no es uniforme en todo el volumen de tejido que se encuentra entre los electrodos. Específicamente, la densidad de corriente es muy alta en la porción no aislada del electrodo alargado (al menos lo suficientemente alta como para proporcionar la electroporación de las células adyacentes o cerca del electrodo) y sustancialmente más baja en la superficie del electrodo de anillo como se muestra en las figuras 3A, B y C. En una realización particularmente preferida, donde el conjunto del electrodo de anillo está diseñado con su electrodo de anillo imbuido de simetría en un extremo y la porción conductora del electrodo alargado en el otro extremo, la corriente establecida en el tejido a cualquier distancia dada entre el anillo y el electrodo alargado en un plano dado perpendicular al electrodo alargado, en gran parte debido a la forma simétrica del electrodo de anillo, tendrá la misma densidad de corriente. Asimismo, la densidad de corriente disminuye de manera relativamente uniforme en el tejido en cada medida incremental hacia el electrodo de anillo. Por

45

lo tanto, esencialmente todo el tejido en un plano dado en el tejido alrededor y que se extiende hacia el tejido desde el electrodo alargado experimentará la misma densidad de corriente más baja que la densidad en el electrodo alargado. Aún más, el área del tejido que se pretende someter a la electroporación es ese tejido a lo largo del recorrido de la aguja en la región conductora del electrodo alargado y se extiende hacia el tejido a una distancia suficiente para convertirse en electroporado (es decir, al menos algunas de las células que se encuentran entre al menos 0 y 0,5 cm desde el recorrido de la aguja a lo largo de la porción del electrodo que no está aislada están sujetas a electroporación, dependiendo de la intensidad del campo local). La distancia al tejido desde la trayectoria de la aguja donde ocurrirá la electroporación depende de la energía del pulso utilizada, así como de otros factores. Cuanto mayor sea la intensidad de campo del pulso, más lejos en el tejido hacia el electrodo de anillo será el punto de umbral para que se produzca la electroporación.

Con respecto al fenómeno de la intensidad de campo en lo que se refiere a la electroporación de tejidos intactos en la presente invención, una forma de visualizar la "Densidad actual" en relación con la "Fuerza de campo" es la siguiente. Para la condición teórica de dos placas paralelas de área  $1 \text{ cm}^2$  y un potencial de 100 voltios a través de las mismas, y además separadas por una longitud  $L = 1 \text{ cm}$ , como se muestra abajo;



las líneas de campo eléctrico y la dirección de la corriente eléctrica están ilustradas por las flechas. Para electrodos de placas paralelas, la intensidad de campo promedio entre las placas es  $V/l = 100 \text{ voltios}/1 \text{ cm} = 100 \text{ V/cm}$ . La corriente entre las placas depende de la impedancia del tejido entre las mismas. Si esta impedancia es, digamos, 100 ohmios, entonces la corriente entre las placas es  $I = V/R = 100/100 = 1,0 \text{ Amp}$ . Esto daría como resultado una densidad de corriente de  $I/A = 1000 \text{ mAmps}/1 \text{ cm}^2$ . Para diferentes configuraciones de electrodos y diferentes impedancias tisulares, la relación entre la intensidad de campo y la densidad actual diferirá; sin embargo, variarán aproximadamente en proporción entre sí. En la configuración de un electrodo alargado y un electrodo de anillo, la medida de la densidad de corriente se puede usar más fácilmente para determinar la electroporación efectiva. Este umbral se ha medido experimentalmente en músculo de conejo para que esté cerca de  $300 \text{ mAmps/cm}^2$ . Los tejidos que experimentan densidades de corriente por encima del umbral serán electroporados y los tejidos por debajo del umbral, no. Al determinar el límite dentro de una región tridimensional de tejido que representa este umbral, el volumen y la forma dentro de este límite pueden predecirse para electroporación.

Como se muestra en las figuras 9A a F, el volumen de tejido expuesto a un pulso de energía electroporativo se puede marcar esencialmente sin propagar la energía electroporativa más allá de una distancia/volumen de tejido medible. En la figura 9A, el dispositivo de la invención prototipo se probó en el músculo del cuádriceps de la pata de conejo blanco de Nueva Zelanda pulsado a una medición real de 289 mAmps que se correlaciona con un pulso de 64 V, en la figura 9C, se electroporó un volumen de tejido mayor utilizando una medición real de 384 mAmps que se correlaciona con un pulso de 81 V. En la figura 9D se electroporó un volumen de tejido aún mayor usando 579 mAmps en correlación con un pulso de 103 V, y en la figura 9E se electroporó un volumen de tejido aún mayor a 758 mAmps medido en correlación con 138 V. En las figuras 9B y F, tanto la fluorescencia de GFP sola como la de GFP y las fotos de luz visible, se muestran que muestran el comportamiento de propagación de la zona de tratamiento en el tejido muscular. En cada uno de estos experimentos (figuras 9A, B, C, E y F) 280 ul (microlitros) de volumen de GFP que codifica la solución de ADN plasmídico se inyectó en el músculo de conejo seguido inmediatamente por el pulso requerido. En la figura 9D, solo se utilizaron 70 ul de ADN de GFP para mostrar que la electroporación abarcará todo el volumen de tejido que contiene ADN de GFP (es decir, saturación de inyectado no alcanzada). Por lo tanto, en la figura 9d, el volumen electroporado real medido es más pequeño (consulte la Tabla II) que en las figuras 9B y E, aunque en la figura 9B el volumen inyectado fue aproximadamente 2/3 más y la energía eléctrica fue menor, mientras que en la figura 9E el volumen inyectado fue aproximadamente 2/3 más y la energía eléctrica fue mayor. El área de superficie conductora del electrodo de anillo para este experimento fue de aproximadamente  $25 \text{ cm}^2$  y el área de superficie conductora del electrodo alargado fue de aproximadamente  $0,22 \text{ cm}^2$ .

El área de superficie del electrodo de anillo está correlacionada con la densidad de corriente como se muestra en la Tabla I a continuación. La Tabla I muestra las figuras de un sistema equipado con un electrodo de anillo ovoide que tiene un área de superficie de  $25 \text{ cm}^2$  y varias intensidades de campo aplicadas.

Tabla I

Superficie del electrodo alargado (EE) (cm <sup>2</sup> )	Superficie del electrodo de anillo (RE) (cm <sup>2</sup> )	Relación de área de superficie	Carga aplicada (voltios)	Corriente de electrodo (mA)	Densidad de corriente en EE (mA/cm <sup>2</sup> )	Densidad de corriente en RE (mA/cm <sup>2</sup> )	Fuerza de campo EE calculada (V/cm) en una relación de 1,4	Fuerza de campo RE calculada (V/cm) a una relación de 1,4
0,22	25	>100	25	86	391	3,4	34	0,29
0,22	25	>100	50	171	777	6,8	68	0,60
0,22	25	>100	100	342	1554	13,7	136	1,20
0,22	25	>100	150	514	2336	20,6	205	1,81
0,22	25	>100	200	689	3132	27,6	275	2,42
0,44	(Eigen)	na	50	500	1136	na	100	na

Nota: La corriente del electrodo se basa en la impedancia nominal del tejido según la fórmula  $I = V/R$  de  $292 \Omega$  (calculado como un promedio de las mediciones de impedancia obtenidas para el tejido entre  $231 \Omega$  -  $380 \Omega$ )

La Tabla I muestra los cálculos de la densidad de corriente en los electrodos de anillo (RE) y alargados (EE). En estos cálculos, para el electrodo alargado, se usó el promedio de áreas de superficie de agujas hipodérmicas entre una aguja de calibre 22 (0,7 mm OD  $\hat{A}$  0,4 mm ID) y una aguja de calibre 23 (0,64 mm. OD  $\hat{A}$  0,1 mm ID). Específicamente, las diferentes agujas de calibre tienen las siguientes dimensiones:

22 ga, 0,028"OD x 25,4 = 0,71 mm  
 23 ga, 0,025"OD x 25,4 = 0,64 mm

donde  $\text{Área} = CL = \pi DL = 3,14159 \times 0,07 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} = 0,22 \text{ cm}^2$  (aguja de calibre 22, de la longitud total de la aguja, el 1 cm distal se utilizó en los cálculos, ya que es esa porción del electrodo que no estaba aislada). El área de una aguja de calibre 23 es, por ejemplo, 0,20  $\text{cm}^2$ .

Se pueden usar otras agujas de calibre tales como, por ejemplo, 24 ga, 0,022"OD x 25,4 = 0,56 mm, 25 ga, 0,020"OD x 25,4 = 0,51 mm, and 26 ga, 0,018"OD x 25,4 = 0,46 mm. Para cada uno, se puede generar el mismo tipo de relaciones para la densidad de corriente, sin embargo, no se muestran aquí.

La Tabla I también muestra las densidades de corriente para un dispositivo de electroporación (el dispositivo de electroporación de Elgen, Inovio Biomedical Corp., San Diego, como se divulga en la solicitud de patente US número de serie 10/612.304, presentada el 3 de julio de 2003, e incorporada aquí como referencia en su totalidad) que utiliza dos electrodos de aguja de 2 cm de longitud de calibre 22 con un área de superficie, de 0,44  $\text{cm}^2$ , (todos 2 cm no aislados), teniendo así un área de superficie más alta que en el electrodo alargado de la presente invención. Con respecto al cálculo del dispositivo de Elgen, está claro que la intensidad de campo nominal entre dos electrodos alargados paralelos no aislados a una distancia de 0,5 cm permanece en un valor alto (aproximadamente 100 V/cm) capaz de generar una estimulación nerviosa sustancial mientras que la intensidad de campo en el electrodo de anillo invención instantánea es del orden de 1/50-ésimo de ese valor (entre 0,29 y 2,42 V/cm).

La intensidad de campo aplicada (V/cm) se puede interpretar como voltios entre la aguja y los electrodos de anillo a una distancia más cercana (calculada arbitrariamente a 1 cm) entre los mismos. Por ejemplo, la distancia entre los electrodos del dispositivo de la invención puede oscilar entre al menos 1 y 4 cm, con 4 cm medidos entre la punta de la aguja y el borde exterior más lejano del electrodo de anillo (aquí calculado para un electrodo de anillo de 25  $\text{cm}^2$  descrito anteriormente). La "intensidad de campo" exacta en V/cm entre los electrodos alargados y de anillo no puede calcularse fácilmente porque la intensidad de campo no es constante entre los electrodos, sino que disminuye desde el electrodo alargado hacia la superficie del electrodo de anillo que tiene un perfil lateral amplio. Sin embargo, dicho cálculo puede hacerse para un sistema que emplea electrodos paralelos, como en el dispositivo de Elgen. En tal dispositivo, la densidad de corriente ( $\text{mA/cm}^2$ ) y la intensidad de campo se pueden determinar porque los electrodos representan fuentes paralelas bien definidas de corriente eléctrica, y debido a la naturaleza uniforme del campo (simulando dos placas de electrodos paralelos). Esta proporción o relación se puede usar para estimar una intensidad de campo equivalente para la disposición de electrodo de anillo, en el punto más fuerte al lado de la aguja. Esta relación se calcula, por ejemplo, de la siguiente manera. Una descarga de 50 V a través de los electrodos del dispositivo de Elgen con una separación de 0,5 cm da como resultado una intensidad de campo de 100 V/cm. El uso de un valor de impedancia para tejido de 100  $\Omega$  entre los dos electrodos del dispositivo de Elgen se obtiene a través de la fórmula  $I = V/R = 50/100 = 500 \text{ mA}$ . El uso de dos agujas de calibre 22 de 2 cm de longitud y un área de superficie de aproximadamente 0,44  $\text{cm}^2$  da como resultado una densidad de corriente de  $I/A = 500 \text{ mA}/0,44 = 1136 \text{ mA/cm}^2$ . Por lo tanto, la relación entre la densidad de corriente (1136  $\text{mA/cm}^2$ ) y la intensidad de campo (100 V/cm) es 11,4. Este valor se refleja en la Tabla I.

Los datos en la Tabla I muestran, por lo tanto, que con un sistema de electrodo de anillo de la presente invención, la densidad de corriente y la intensidad de campo en V/cm se pueden reducir a un valor marginal en áreas del tejido corporal, a saber, los tejidos de la piel que contienen células nerviosas sensoriales. A una tensión aplicada de 50 voltios, la V/cm experimentada en el electrodo de anillo es de solo 0,61, mientras que una tensión aplicada de 100 V da como resultado una V/cm en el electrodo de anillo de solo 1,2 V/cm. Incluso cuando la tensión aplicada es tan alta como 200, la V/cm en el electrodo de anillo es de solo 2,4 voltios. En contraste, aplicando solo 50 V a través de la técnica anterior, el dispositivo de Elgen experimenta una V/cm de 100 en ambos electrodos. Simplemente reduciendo el área de la porción eléctricamente conductora de las agujas alargadas en una disposición de electrodos de Elgen u otra similar, tal como se describe en cualquiera de las patentes US 6.041.252, 6.278.895 y 7.245963, por ejemplo, al agregar aislamiento a una parte de los electrodos no se reducirá la V/cm, pero de hecho puede aumentarla. Por lo tanto, el uso de aislamiento en el electrodo central de la presente invención es sustancialmente diferente al aplicado en electrodos de penetración de tejido anteriores.

Ejemplos adicionales de la presente invención en los que se usan dimensiones de electrodo de anillo más pequeñas, tal como donde el área de superficie del electrodo de anillo es de 2,5  $\text{cm}^2$ , se ha demostrado que proporcionan el mismo control sobre el volumen de tejido destinado a la electroporación. Con realizaciones de electrodo de anillo en las que el anillo tiene un diámetro relativamente pequeño, la corriente se dirige menos lateralmente a través del tejido y más a lo largo de la proximidad del electrodo alargado, similar a un sistema de una sola aguja sin anillo, tal como se describe en la solicitud de patente US en trámite número de serie 11/804.703. Como se divulga en las figuras 10A y B, un experimento en el músculo cuádriceps de conejo blanco de NZ que utiliza un ajuste de 200 mA (medido 189 mA y 58

V) da como resultado un volumen de tejido estrecho que se electroporó. Aquí, la densidad de corriente promedio en el electrodo alargado se calculó en  $189 \text{ mA}/0,22 \text{ cm}^2 = 859 \text{ mA}/\text{cm}^2$  y la densidad de corriente promedio en el electrodo de anillo en  $189 \text{ mA}/25 \text{ cm}^2 = 7,6 \text{ mA}/\text{cm}^2$ . Por lo tanto, si el electrodo de anillo es pequeño o de mayor dimensión, el volumen de tejido que experimenta la electroporación puede predeterminarse experimentalmente, tal como midiendo la expresión de GFP en el tejido y correlacionando el volumen del tejido electroporado con el volumen de inyección/concentración de sustancia terapéutica.

Realizaciones adicionales del dispositivo de la invención incluyen la capacidad de medir el volumen de tejido que experimenta la electroporación. Este aspecto proporciona una ventaja sustancial sobre los sistemas de electroporación anteriores, ya que ahora es posible predeterminar el volumen de tejido que se expondrá a un pulso electroporativo de energía eléctrica. Por lo tanto, la cantidad de sustancia administrada se puede dosificar a un volumen de tejido predeterminado sometido a electroporación. Como se describe en este documento, el sistema de electrodo de anillo proporciona una corriente variable entre los electrodos alargados y de anillo. Esta disposición permite que la energía de la electroporación se propague en el tejido desde el electrodo alargado hasta una distancia promedio predeterminada y, por consiguiente, un volumen de tejido medible (se conoce la longitud de la porción eléctricamente conductora del electrodo alargado, la distancia desde el electrodo a la que se ha producido la electroporación como determinable por cálculo y por experimentación empírica previa). Ambos deben correlacionarse como se muestra aquí. Dado que las líneas de fuerza de cualquier pulso eléctrico se dirigen generalmente hacia fuera desde una posición central o de núcleo y hacia arriba desde la porción eléctricamente conductora del electrodo alargado al electrodo de anillo posicionado lateralmente, el volumen de tejido electroporado real será generalmente cilíndrico o incluso cónico, en forma de copa o cuenco, como se muestra en la figura 7. Asimismo, la distancia en el tejido en que se propaga la energía electroporativa, depende de la fuerza del pulso eléctrico y de la resistencia natural del tejido biológico. En una realización preferida, se puede utilizar cualquier nivel de pulso de energía eléctrica que tenga un valor de entre 1 y 200 V o, alternativamente, calculado para corriente constante, un amperaje en el electrodo alargado de entre 0,01 y 1,0 amperios.

El cálculo de la distancia en el tejido de que una intensidad de campo eléctrico será suficiente para transportar células y, en consecuencia, el volumen de tejido sometido a dicha intensidad de campo, se puede lograr empíricamente midiendo la cantidad de tejido sujeto a la expresión de GFP. Como se muestra en la Tabla II, el volumen de tejido afectado no se correlaciona con la fórmula clásica para calcular un volumen de cilindro o cono. En vez de esto, el volumen afectado depende de la resistencia del tejido biológico y otros parámetros físicos. Además, el volumen sometido a electroporación es altamente sensible al volumen de plásmido codificante de GFP inyectado en el tejido. Como se muestra también en la Tabla II, donde se inyecta una cuarta parte del volumen (70 ul vs 280 ul), el volumen de tejido que experimenta la electroporación es claramente mayor que la región infundida con una concentración suficiente de plásmido GFP. Esto se puede calcular dado que la mayor corriente utilizada (579 mA frente a 384 mA) causa solo aproximadamente la mitad del volumen del tejido que expresa GFP, mientras que, si se usó una cantidad de GFP suficiente para inundar el tejido (es decir, 280 ul), el volumen de tejido que experimenta la expresión de GFP estaría entre 1,4 y 1,9  $\text{cm}^3$ . Por lo tanto, los cálculos empíricos para el volumen de tejido electroporado deben realizarse utilizando un volumen de plásmido GFP, u otro indicador similar, suficiente para inundar completamente el área del tejido que se está probando.

Tabla II

Volumen de bolo inyectado de GFP de concentración equivalente	Corriente eléctrica (mA)	Tensión eléctrica (voltios)	Longitud del electrodo alargado (cm)	Radio máximo de electroporación determinado empíricamente (cm)	Volumen de tejido real ( $\text{cm}^3$ )%	Cilindro de volumen de tejido #	Cono de volumen de tejido \$
280 ul	189	58	2,0	0,1 (anillo pequeño)*	0,1	0,1	0,03
280 ul	289	64	2,0	0,4 (anillo grande)*	0,4	1,0	0,3
280 ul	384	81	2,0	0,5 (anillo grande)*	1,4	1,6	0,5
70 ul	579	103	2,0	0,5 (anillo grande)*	0,9	1,6	0,5
280 ul	758	138	2,0	1,0 (anillo grande)*	1,9	6,3	2,1

Cifras redondeadas al 1/10 más cercano. \*anillo pequeño =  $2,5 \text{ cm}^2$ , \*\*anillo grande =  $25,0 \text{ cm}^2$ , # Teórico basado en la fórmula clásica  $V = bh = (\pi \times r^2)h$ ; \$ Volumen teórico basado en la fórmula para el volumen del cono  $V = 1/3\pi \times r^2h$ ; % de volumen real calculado utilizando todos los cortes de tejido con tinción de GFP.

Con la capacidad de determinar el volumen probable de tejido sometido a electroporación, ahora se puede alinear el volumen/concentración de sustancia que se administrará con el volumen de células en el tejido que está disponible para absorber dicha sustancia directamente por las células poradas temporalmente. Esta ventaja permite una correcta dosificación y evitar la sobredosis o infradosis y prevenir el desperdicio de materiales terapéuticos. En otras palabras, la presente invención proporciona la capacidad de administrar una "dosis efectiva" calculada de, por ejemplo, un ácido nucleico expresable basado en el conocimiento del volumen de células expuestas a un pulso electroporativo de

cualquier intensidad de campo nominal y de corriente dada, y el conocimiento del volumen de material entregado que puede ser absorbido completamente por dicho volumen celular.

El aparato de la presente invención comprende además un mecanismo para proporcionar una carga de energía eléctrica suficiente para provocar la electroporación en el tejido. En una realización preferida adicional, dicho mecanismo comprende un condensador situado en dicho aparato que tiene una capacidad de entre 1000 y 2.200 uF (microfaradios). El condensador se puede colocar en la carcasa del dispositivo, tal como, por ejemplo, en la porción que comprende una carcasa manipulable a mano, y en comunicación eléctrica con los electrodos y la fuente de energía eléctrica. En otra realización preferida, la fuente de energía eléctrica puede ser una fuente externa, como una corriente alterna estacionaria (toma de pared) o un banco de baterías. Asimismo, el condensador se puede activar por adelantado a una capacitancia predeterminada según lo deseado para el parámetro de tratamiento específico que se utilizará en cualquier régimen de tratamiento particular al cargarlo con una unidad de carga que a su vez se puede activar a través de la fuente externa de energía. En una realización particularmente preferida, el condensador se carga hasta 200 voltios.

#### Componentes de circuitos

Un circuito de control eléctrico (no mostrado) está conectado a la aguja 120 del electrodo alargado y al electrodo 200 en forma de anillo para producir los pulsos eléctricos deseados enviados desde el condensador, causando electroporación y entrega de electroporación aumentada de la sustancia inyectada a las células en el tejido objetivo.

El circuito electrónico puede comprender una batería, típicamente entre 1,5 y 9 voltios, un condensador que puede almacenar suficiente energía y tensión para que pueda suministrar la tensión de salida de electroporación deseado para la duración de salida deseada, y un circuito de control que carga el condensador a la tensión correcta y controla la tensión y la duración del pulso de salida.

En un ejemplo de realización, la disposición de circuitos proporciona la carga potencial electrónica de un condensador a una tensión que, cuando se descarga durante un período de tiempo establecido, proporciona pulsos de energía electrónica suficientes para electroporar las células *in situ*. La descarga del condensador se puede regular para proporcionar una descarga bipolar o una descarga monopolar. Por ejemplo, la descarga en una disposición monopolar se puede regular para proporcionar el mantenimiento de un pulso de tensión establecido durante el período de tiempo del pulso. Específicamente, en una realización en la que el dispositivo está configurado para generar 100 voltios por 100 milisegundos, por ejemplo, el pulso tendrá una forma de onda como se muestra en la figura 6. En esta disposición, el dispositivo está equipado con un condensador capaz de suministrar, por ejemplo, 1 amperio por 100 milisegundos, y al final de este pulso, debe permanecer por encima de 100 voltios para que un regulador de tensión que usa la tensión del condensador para hacer que la salida de 100 voltios no caiga fuera de la regulación. A modo de ejemplo, en una realización, el dispositivo de la invención puede comprender un condensador de 1000 microFaradios. Como es bien comprensible por un experto en las técnicas eléctricas, la ecuación  $V \times C = Q$  describe la energía necesaria para obtener una salida de 100 voltios donde V es voltios, C es microFaradios, y Q es Culombios. Específicamente, para obtener una descarga con un potencial constante regulado de 100 V en el pulso de 100 milisegundos, la carga de tensión al condensador debe ser de 200 voltios, es decir,  $V = 200$ ,  $C = 2200$ ,  $Q = 0,44$  basado en la fórmula  $Q = CV$ . En una variación de esta realización, podría haber una sucesión de dos o más pulsos, al final de la cual la tensión del condensador todavía está por encima de los 100 voltios, para que la salida no se salga de la regulación de ninguno de los pulsos dentro de la sucesión.

Se puede usar prácticamente cualquier valor de condensador para un circuito empleado en el dispositivo de la presente invención. Por ejemplo, un condensador de 100 uF (microFaradios) utilizado para descargar 0,1 culombios de carga eléctrica requiere que el condensador se cargue a 1000 voltios por encima de la tensión objetivo regulada para el paciente. Como alternativa, la misma descarga se puede lograr con un condensador de 10.000 uF cargado a solo 10 voltios por encima de la tensión objetivo regulada. En el caso de la presente invención, en una realización, se puede usar un condensador que tenga una capacitancia de aproximadamente 2000 a 4000 uF que en tal caso proporcionará un pulso de 100 milisegundos de 100 voltios. La tensión requerida para suministrar el pulso mencionado es de aproximadamente 150 voltios, dependiendo de la impedancia del tejido entre los electrodos.

En una realización del dispositivo de la invención, el circuito comprende 1) un microprocesador para controlar el proceso de carga y descarga, y para administrar un circuito de control y seguridad; 2) un circuito de carga controlado por el microprocesador y que lleva el condensador a la tensión correcta calculada para el período de tiempo de pulso de electroporación deseado, en el que cuando el condensador alcanza el potencial de tensión deseado, el microprocesador apaga el circuito de carga; 3) el condensador de carga; 4) un regulador lineal controlado por el microprocesador que puede encenderse y apagarse rápidamente para que pueda suministrar pulsos de tensión y duración programados en el microprocesador; 5) circuitos de seguridad y monitorización que protegen el circuito contra el abuso y también comprueban y garantizan que la tensión solo aparece en la salida cuando se solicita, por seguridad.

En otras realizaciones relacionadas, el circuito de carga puede comprender un regulador de retorno limitado de corriente. En tal circuito, la tensión de regulación se establece en un valor más alto que el requerido para cualquier nivel de tensión utilizado para electroporar el tejido. El límite de corriente permite la optimización de la vida útil de una

batería. Si la carga se toma de una batería demasiado rápido, la vida útil de la batería se reduce significativamente. Para maximizar la vida de la batería, el límite de corriente en el regulador está configurado para tiempos de carga cortos. En el caso de una batería de 9 voltios, por ejemplo, la corriente óptima es de aproximadamente 200 mA, y para 100 voltios, salida de electroporación de 120 milisegundos. En este caso, los tiempos de carga son de unos 15 segundos.

En realizaciones adicionales, el condensador se carga a una tensión óptima requerida por el regulador lineal, como una relación de carga a voltios ( $V_{\text{salida}}$ ) como en la siguiente fórmula,  $(1+4,5 t) + 10$  voltios, donde  $V_{\text{salida}}$  es la tensión de salida de la electroporación y  $t$  es la duración total del pulso de electroporación (es decir, la suma de los tiempos para todos los pulsos de salida de la electroporación). Al cargar el condensador a la tensión descrita por esta ecuación, el circuito tiene una cantidad mínima de energía perdida que no se entrega al proceso de electroporación.

En otra realización, se puede usar un regulador lineal de banda ancha en el que la referencia de tensión utilizada para determinar la tensión de salida es suministrada por un circuito de modulación de ancho de pulso dentro de un microprocesador. Cuando el circuito está apagado, el ciclo de trabajo de modulación de ancho de pulso derivado del microprocesador es cero. Para la duración del pulso de electroporación, la salida de modulación de ancho de pulso del microprocesador se establece en un valor correspondiente al valor regulado deseado, es decir, el valor promedio multiplicado por la ganancia del regulador que es igual al valor de salida de pulso. Al final del pulso de electroporación deseado, la salida de modulación de ancho de pulso se pone nuevamente a cero.

En realizaciones adicionales, los circuitos del dispositivo de la invención comprenden circuitos de seguridad y de monitorización. Un interruptor de seguridad en este circuito puede apagar la salida en caso de cualquier fallo detectado. En esta realización, el microprocesador mide la tensión de salida antes de que se aplique el pulso a los electrodos. El procesador luego mide la magnitud de la tensión del pulso de salida durante el pulso. En una realización preferida, la medición de tensión debe estar dentro del 10 % de la salida de tensión deseada. El microprocesador mide además la corriente del pulso y también mide la tensión al final del pulso para verificar que el pulso terminó correctamente. Con respecto a cada una de las condiciones probadas mencionadas anteriormente, si alguna de estas condiciones no están dentro de los parámetros especificados, la capacidad del dispositivo de pulsar se termina y se informa al usuario de un error del sistema. Los tipos de fallos pueden ser: cortocircuito de salida, tensión de salida incorrecto, período de salida demasiado largo, y similares.

En más realizaciones adicionales, el microprocesador de control contiene capacidad de programación de software, incluyendo parámetros para las entradas analógicas a digitales, y las líneas de control para cargar y descargar el condensador de almacenamiento para administrar el circuito como se describe. El circuito del dispositivo incluye además EEPROM (memoria de solo lectura programable y borrrable eléctricamente) para permitir al usuario, mediante el uso de una interfaz de ordenador, cambiar el tiempo de pulso y los ajustes grabados en el software, cambiando así las duraciones y niveles del pulso de salida. En realizaciones adicionales, los valores de salida para la pulsación se pueden guardar incluso si se elimina la alimentación de la placa. Los valores se verifican sumados para no permitir que valores erróneos controlen las salidas.

La forma de onda de la señal eléctrica proporcionada por la fuente de energía eléctrica puede ser un pulso en descomposición exponencial, un pulso cuadrado, un pulso unipolar o tren de pulsos, un pulso bipolar oscilante, o una combinación de cualquiera de estas formas de pulso. La intensidad de campo eléctrico nominal puede ser de aproximadamente 10 V/cm a aproximadamente 200 V/cm correspondiente a la corriente de aproximadamente 0,05 amperios y 1,0 amperios, respectivamente. Se pueden emplear muchas energías de pulso específicas diferentes, tal como, por ejemplo, 10 V/cm, 15 V/cm, 20 V/cm, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 y 200 V/cm. Cada una de dichas tensiones de pulsos e intensidades de campo tienen una densidad de corriente correspondiente en cada uno de los electrodos alargados y anulares y volúmenes correspondientes de tejido que estarán sujetos a pulsos de electricidad suficientes para electroporar las células.

La duración del pulso puede ser de aproximadamente 10 microsegundos a aproximadamente 100 milisegundos. En particular, se pueden usar rangos y tiempos específicos tales como, por ejemplo, 10 milisegundos, 20 ms, 30 ms, 40 ms, 50 ms, 60 ms, 70 ms, 80 ms y 90 ms. También puede haber cualquier número deseado de pulsos, típicamente uno a 100 pulsos, más típicamente 2 a 6 pulsos, aún más usualmente de 2 a 4 pulsos. El intervalo de tiempo entre pulsos puede ser cualquier tiempo deseado, tal como un segundo o menos, más típicamente 10 milisegundos o menos. Aún más usualmente, 5 milisegundos o menos. La forma de onda, la intensidad del campo eléctrico y la duración del pulso también pueden depender del tipo de células y del tipo de moléculas que ingresarán a las células a través de electroporación. Cada forma de onda de pulso tiene ventajas particulares; los pulsos de forma de onda cuadrada proporcionan mayores eficiencias en el transporte de compuestos a células de mamíferos en comparación con los pulsos de forma de onda de decaimiento exponencial. Preferentemente, la forma de onda utilizada es un pulso monopolar exponencial o de onda cuadrada.

Además del conjunto del electrodo de anillo y los componentes del circuito de asistencia como se describe anteriormente, el aparato de la invención puede tener una variedad de funcionalidades adicionales. Por ejemplo, el aparato puede tener una pantalla de datos para indicar la función del aparato y los ajustes de estado, los diversos ajustes de parámetros de pulso incluyendo, por ejemplo, tensión, capacitancia, duración del pulso, retardo de tiempo

entre pulsos, tipo de onda de pulso, número de pulso(s) aplicado(s), y parámetros del pulso(s) aplicado(s) (por ejemplo, tensión, capacitancia, duración del pulso, tipo de onda de pulso, número de pulsos), o combinaciones de los mismos. Tal visualización puede ser visual, audible, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un solo "pitido" audible puede indicar que el "aparato está listo", dos "pitidos" audibles pueden indicar que un pulso se ha aplicado correctamente y tres "pitidos" audibles pueden indicar un mal funcionamiento o que el pulso no se aplicó o se aplicó incorrectamente. Las visualizaciones visuales incluyen visualizaciones alfanuméricas analógicas o digitales (por ejemplo, LCD, LED y similares), como en relojes, y además puede incluir medios de iluminación para visualización con poca luz, por ejemplo, por luz blanca, retroiluminación electroluminiscente para LCD o lámparas electroluminiscentes (es decir, INDIGLO.TM.), o por diversas composiciones de iluminación fluorescentes o radioactivas, y similares.

Las funciones adicionales "fáciles de usar" incluyen medios de control como el software para controlar los pulsos eléctricos, así como medios para ajustar los parámetros (por ejemplo, por pulsador, pomo, interruptor de palanca, dial y similares) incluyendo, por ejemplo, duración del pulso, tensión, capacitancia, fuerza de campo, número, tipo de onda, y similares. Medios de ajuste, configuración, almacenamiento o recuperación de uno o más parámetros de pulso también se incluyen aquí. Tales medios incluyen controles electrónicos mecánicos tradicionales (por ejemplo, un interruptor selector que controla cada parámetro en el que el interruptor tiene una pluralidad de configuraciones; ajustes de longitud de pulso ejemplares, 5 mseg, 10 mseg, 25 mseg, 35 mseg, 50 mseg, por ejemplo) así como un control de chip (por ejemplo, tipos de obleas de silicio comúnmente utilizados en la industria informática) que está controlado, por ejemplo, por una interfaz de pulsador, como en relojes, por ejemplo. Un chip, opcionalmente extraíble del aparato, también se contemplan los ajustes programables por el usuario y/o el fabricante para el control de los diversos parámetros de pulso establecidos en este documento. La capacidad de almacenamiento de tal chip es suficiente para proporcionar un control preciso prácticamente ilimitado de los diversos parámetros, así como el almacenamiento de diferentes ajustes de parámetros de pulso para diferentes composiciones, usuarios y similares. Como cada una de las diversas funcionalidades electrónicas de la invención, el aparato descrito aquí puede ser controlado o administrado por un chip de ordenador, un chip ofrece la opción de incorporar software adicionalmente, si se desea, Dicho software opcionalmente programable por el usuario.

Además de los atributos fáciles de usar descritos anteriormente, el aparato de la invención proporciona controles de seguridad. Por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona además un medio para evitar la aplicación de una tensión de pulso excesiva, duración, intensidad de campo y/o número de pulsos. Cualquier medio que interrumpa o altere pasiva o activamente el circuito eléctrico, incluyendo fusibles, interruptores automáticos y similares, o dispositivos que monitorizan activamente los diversos parámetros de pulso e interrumpen o alteran el circuito eléctrico para evitar el exceso de tensión del pulso, duración, fuerza de campo, el número de pulsos que se aplican pueden incorporarse en la trayectoria del circuito. Los expertos en la técnica de los dispositivos eléctricos sabrán cómo incorporar dichas características, así como otros elementos de protección que evitan la aplicación de un exceso de tensión de pulso, duración, intensidad de campo o número.

La presente invención proporciona además un método avanzado para realizar la inyección de agente terapéutico desde la aguja central del dispositivo en los tejidos diana. Específicamente, el dispositivo de la invención, equipado con controladores y accionadores para conducir la aguja de inyección en el tejido y para inyectar el agente terapéutico desde un depósito a través de la aguja, está diseñado para detectar el tipo de tejido por el que entra la aguja, esencialmente determinando puntos de interfaz entre los tipos de tejidos. Esto permite expresamente al usuario del dispositivo entregar con confianza la sustancia en tejidos específicos. Históricamente, se han administrado vacunas a los músculos subcutáneos mediante inyección manual para lograr respuestas inmunitarias adecuadas. Sin embargo, si la vacuna se deposita en la capa grasa (tejido adiposo) sobre el músculo, la inmunidad resultante puede verse comprometida y llevar a un título demasiado bajo para combatir la infección para la terapia para la cual fue diseñada la vacuna. Es bien sabido que las agujas de diferente longitud son necesarias para llegar a los tejidos musculares en los seres humanos. Sin un entrenamiento médico adecuado, las agujas de longitud incorrecta pueden ser utilizadas incorrectamente. Incluso para muchos dispositivos de inyección automatizados de 1a generación, la entrega adecuada no se puede lograr simplemente porque no se tiene ninguna forma de determinar la inserción correcta de la aguja para la entrega a tejidos específicos como el tejido muscular. En la presente invención, el dispositivo es capaz de detectar y determinar cuándo la aguja de inyección entra en el tejido muscular después de lo cual se inicia la inyección de la sustancia terapéutica. En una realización preferida, la detección se realiza midiendo la impedancia eléctrica del tejido a medida que la aguja entra en la superficie del tejido. A medida que la aguja se inserta en el tejido, la impedancia del tejido se mide en pequeños incrementos utilizando pequeños, pulsos eléctricos altamente tolerables de un voltio o menos (incluso es probable que sean imperceptibles). La impedancia cambiará de acuerdo con las características de cada tipo de tejido y la profundidad de inserción. En general, la impedancia del tejido muscular es menor que la de los tejidos dérmicos y adiposos. Como se alcanza una zona de menor resistencia, la resistencia cae en consecuencia. La naturaleza de las lecturas de resistencia se puede aplicar contra una base de datos de tipos de tejidos a partir de datos históricos y, mediante dicha comparación, establecer el tipo de tejido y la interfaz de cada inyección específica, en el presente caso, la interfaz entre el tejido adiposo y el tejido muscular. En una realización preferida, el dispositivo puede diseñarse para que no comience la administración del agente terapéutico desde el depósito hasta que la aguja haya viajado al músculo una pequeña distancia. Esto permite una zona de amortiguación razonable del músculo en cuyo punto la inyección puede comenzar de manera segura en el tipo de tejido deseado. En una realización preferida, la inyección del agente terapéutico se inicia después de la entrada del tejido muscular detectado y se continúa mientras se inserta la aguja para dar lugar a una inyección uniforme en una distancia fija, preferiblemente alrededor de 1 cm,

dando como resultado una columna de fármaco en el tejido circundante alrededor de la aguja. Esta es una condición ideal para una mayor electroporación, ya que la cantidad máxima de fármaco está cerca del electrodo y en el tejido objetivo. Se pueden utilizar métodos alternativos para medir el grosor del tejido, incluidas señales de alta frecuencia administradas a través de sondas y sensores ultrasónicos similares, por mencionar solo dos.

5 La metodología de detección del tipo de tejido de la presente invención se describe en las figuras 14A, B y C y más abajo. En breve, durante la inserción de la aguja, se envían pulsos de baja tensión (aproximadamente 1 V o menos) o de baja corriente a través de la aguja de inserción con pequeños movimientos incrementales (0,1 mm hasta un incremento de la longitud de inserción de 2 mm). La detección se puede programar para detectar una longitud de recorrido total de aproximadamente 2 cm. En la presente invención, la aguja central puede ser construida para poseer dos polos eléctricos, es decir, un cable positivo y otro negativo) colocados cerca del extremo de la aguja. Específicamente, la propia aguja puede actuar como un polo, mientras que el segundo polo se fija en una segunda ubicación cercana, como se muestra en la figura 15A, a los elementos 400 y 401. La figura 17A es una representación detallada en la que la aguja está construida con dos cables eléctricos A y C separados por un material aislante B. 10 Alternativamente, la detección de tejido se puede realizar en otro formato en el que la aguja central es en realidad dos agujas de inyección paralelas muy separadas (como se muestra en las figuras 17B, C y D). En esta disposición, las agujas individuales pueden actuar como electrodos separados para detectar resistencias tisulares. Asimismo, en dicha configuración, mientras que durante la detección de tejidos, los electrodos son de polaridad opuesta, durante la etapa de electroporación, las dos agujas pueden pulsarse tanto en la misma polaridad como en la polaridad opuesta será el electrodo de anillo. Aún más, esta metodología de detección de interfaces de tejido es aplicable a cualquier sistema que emplee electroporación donde el tipo de tejido buscado para el suministro de sustancias terapéuticas sea crítico para su eficacia. Los ácidos nucleicos son de este tipo terapéutico. El ADN debe ser entregado en las células del compartimento muscular, a diferencia del tejido adiposo, para funcionar correctamente. Por lo tanto, el uso de la metodología de detección de tejidos de la presente invención es aplicable a los usos con dispositivos de 20 electroporación que emplean al menos un tubo de suministro que penetra en el tejido. Cuando se emplea una sola aguja, debe ser diseñado con dos polos de electrodo. Cuando se utiliza más de una aguja perforadora de tejido, se pueden usar agujas separadas para la detección del tipo de tejido. En cualquier caso, los electrodos de entrega/detección pueden tener puertos de aislamiento y fenestrados.

30 Los pulsos eléctricos que se usan para detectar la resistencia del tejido solo deben ser lo suficientemente largos para permitir un muestreo preciso de la tensión y la corriente a partir de la cual se puede calcular la impedancia utilizando la ley de Ohm ( $V=IR$ ; V es voltios, I es corriente en amperios y R es resistencia en ohmios). Una longitud de pulso de 20 ms puede satisfacer estos requisitos para una tasa de inserción de aguja típica. Si las sondas se insertan en una sustancia infinita uniforme, la resistencia disminuirá asintóticamente con la profundidad de la resistencia característica del material, con una pequeña influencia del diámetro de la aguja y la conductividad. Las capas de tejido se comportan de esta manera como se ve en la figura 14A, donde se insertaron sondas en una capa de grasa de cerdo que inicialmente mide aproximadamente 1700 ohmios y se descompone a aproximadamente 300 ohmios. Una segunda curva en la figura 14A muestra agujas insertadas en una capa de músculo de cerdo y muestra una impedancia más baja que decae hasta cerca de 100 ohmios. Estas mediciones se obtuvieron utilizando una aguja de calibre 21, 40 de 2 pulgadas (5,08 cm) y medida en incrementos de 2 mm desde la superficie del tejido hasta una profundidad de 24 mm. El pulso de prueba fue de 100 V a 20 ms por cada incremento. La representación gráfica de la detección a través de una capa de tipo tejido múltiple, de manera que la aguja pasa a través de una capa de grasa seguida por los músculos subyacentes, que dan como resultado curvas que inicialmente coinciden con la de la grasa, pero pronto transita a la curva asociada con el músculo. La figura 14B agrega curvas desde inserciones a través de capas de grasa de 4 mm de grosor seguidas de tejido muscular utilizando los mismos parámetros de medición y pulso que los anteriores. Observe que a medida que se alcanza la impedancia más baja del músculo, las mediciones pasan rápidamente de la curva de grasa a la curva de músculo. Se realizó un experimento similar en carne de res no viable utilizando un dispositivo automatizado de inserción de agujas con pulsos de medición generados en incrementos definidos. Se utilizaron pulsos de 10 V con una duración de 50 mseg para medir la corriente generada en incrementos de aproximadamente 0,2 mm a lo largo de una inserción continua de la aguja. La figura 14C muestra curvas o zonas similares para la grasa pura y el músculo. La grasa pura inicialmente lee aproximadamente 2500  $\Omega$  y se descompone a aproximadamente 1000  $\Omega$  a una profundidad de inserción de 5 mm a 10 mm. El músculo puro inicialmente lee entre 1000 y 2000  $\Omega$ , pero decae rápidamente a 500  $\Omega$  por 5 mm de profundidad de inserción y aproximadamente a 250  $\Omega$  más allá de 15 mm de profundidad de inserción. Este gráfico muestra que es posible utilizar datos históricos para espesores de grasa para determinar la posición óptima en la que se determina que se ha pasado una interfaz de tejido (en particular, la interfaz de tejido adiposo/músculo) y que la inyección puede comenzar en el tejido deseado. 55

El dispositivo de la invención puede programarse para comenzar la inyección del agente terapéutico utilizando información de detección del tipo de tejido de varias maneras. Por ejemplo, la inyección puede iniciarse después de la detección que indica que hay una disminución de la resistencia a una lectura igual a la de la curva muscular, dando como resultado el suministro de sustancia a una distancia relativamente grande en el tejido muscular desde la interfaz muscular/adiposa real. Como alternativa, los valores de resistencia basados en la profundidad que se correlacionarían con el músculo o que se correlacionan con una caída rápida en la resistencia inconsistente con las desintegraciones asintóticas se pueden usar como la señal a la cual comenzar la inyección. Una vez que la transición al músculo se determina mediante cualquiera de los métodos anteriores de sensibilidad adecuada, el proceso de inyección comienza con una de las secuencias descritas anteriormente. Las medidas de resistencia ya no son necesarias ni se realizan si 65

se desea una inserción adicional, simplemente introduciendo la aguja en los tejidos, si se desea, mientras se inyecta el terapéutico.

Aún más, ya que el aparato de la invención incluye realizaciones tales como detección de interfaz de tejido, el dispositivo puede incluir accionadores mecánicos animados o inanimados/impulsados por motor para impulsar independientemente la aguja alargada hacia adelante en el tejido a tratar sin conducir simultáneamente la sustancia de inyección a través de la aguja tubular. En particular, los conductores pueden conducir la aguja en el tejido, mientras que el software se emplea para detectar la resistencia eléctrica en el tejido en la punta de la aguja. En las figuras 15A-D se proporciona un diagrama pictórico de esta metodología. En la figura 15A, el aparato está configurado para detectar interfaces de tejido, ya que el accionador para impulsar la aguja dirige la aguja hacia el tejido. En la figura 15B, cuando la aguja pasa la interfaz del tejido, el software dirige al aparato para que continúe introduciendo la aguja en el tejido a una distancia predeterminada más allá de la interfaz del tejido detectado. En 15C, cuando los sensores detectan que se ha pasado la interfaz del tejido, el aparato, como apreciará un experto en la técnica, puede programarse para comenzar a inyectar la sustancia de inyección a medida que la aguja se mueve más hacia una posición terminal dentro del tejido (figura 15D), lo que proporciona una sustancia de inyección distribuida de manera relativamente uniforme. Este aspecto requiere que el aparato en esta posición tenga la capacidad de empujar simultáneamente la aguja hacia el interior del tejido esta vez simultáneamente con la inyección de la sustancia que se administrará en los tejidos.

Con respecto al electrodo de anillo, como se mencionó anteriormente en la figura 13, el electrodo puede estar diseñado específicamente para su uso en la cría de animales. Específicamente, como los animales de manada, como el ganado, ovejas, cabras y caballos, tienen pelo, pelaje, o cuerpo cubierto de lana, el electrodo de anillo diseñado para entrar en contacto con la superficie de la piel no será útil sin tener que afeitar la piel del animal antes de tratar al animal. Dado que tal requerimiento es problemático en grandes operaciones de rebaño, afeitar la piel no es una opción. Por lo tanto, la presente invención proporciona un diseño alternativo para el electrodo de anillo. En una realización preferida de la invención, el electrodo de anillo para uso animal puede diseñarse con una pluralidad de pequeñas proyecciones de perforación cortas que no pueden ser empujadas contra la piel del animal/pelo/lana y encontrar sus partes terminales en contacto con la piel a través de la cubierta de piel. De acuerdo con los diversos elementos de la presente invención, la relación entre el área de superficie de la porción conductora de la aguja de perforación del tejido central y el área de superficie total de las puntas de las proyecciones debe mantenerse entre al menos 1:5 y 1:10, respectivamente.

Tal y como se muestra en la figura 13, el electrodo de anillo que comprende una multiplicidad de proyecciones es capaz de electroporar animales cubiertos de piel. Como se muestra en las figuras 16A a E, la electroporación es extensa. Las figuras 16A a E son cortes adyacentes de tejido muscular electroporado usando el electrodo de anillo que tiene dichas proyecciones y usando 758 mAmps, 138 voltios, y una relación de área de superficie de electrodo de la disposición de electrodo de aguja: área de proyección en la que dicha relación era de al menos 1:5. En este experimento, se inyectaron 30 µg de gWiz-GFP en 300 µl de solución salina en el músculo cuádriceps de conejo, seguido de electroporación. Los conejos se sacrificaron el día 5 y las muestras de músculo se sometieron a seccionamiento a espesores de 1,25 mm y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Estos resultados son comparables a los que se muestran en las figuras 9E y F usando las mismas condiciones de pulso.

La electroporación llevada a cabo anteriormente también se realizó en animales para probar la expresión de SEAP y la respuesta inmune al antígeno de la hepatitis B endodizado por plasma. Como se muestra en la figura 18A, se realizó un experimento de electroporación usando el electrodo de anillo, un electrodo de anillo de peine y un dispositivo de electroporación de dos agujas (Elgen, Genetronics, Inc. San Diego, CA), como se indica, la electroporación y la expresión de SEAP resultante son comparables para cada uno de los anillos, anillo de peine y Elgen. El plásmido gWiz-SEAP se inyectó a 200 µg en 300 µl de solución salina. El control tenía inyección solo sin electroporación. Los parámetros de pulsación para cada uno fueron los siguientes, Peine: 600 mA, 2 p x 60 ms; Anillo: 600 mA, 2 p x 60 ms; Elgen: 400 mA, 2 px 60 ms. En la figura 18B, la expresión de IgG anti-HB se probó observando los títulos de punto final. El plásmido gWiz-HBsAg se inyectó utilizando 300 µg de plásmido en 300 µl de solución salina con una inmunización inicial en el día 0 seguido de un refuerzo en el día 30. Como se indica, todos los experimentos de prueba muestran que la presente invención, ya sea utilizando un electrodo de anillo liso o un electrodo de peine, funciona muy bien.

## Métodos

Se proporcionan métodos *in vivo* para introducir un agente terapéutico en tejidos corporales subdérmicos y más profundos, células musculares especialmente estriadas y/o lisas, dentro de estos tejidos. Dichos métodos comprenden la aplicación de un campo eléctrico pulsado a dichos tejidos que contienen células de manera sustancialmente contemporánea con la aplicación de dicha sustancia de suministro a dichos tejidos, de tal manera que dicha sustancia de suministro se introduzca en dichas células.

Un método para la introducción de ácido nucleico en las células de la dermis y el músculo, preferiblemente humano, se proporciona administrando el ácido nucleico al tejido objetivo y aplicando al menos un pulso eléctrico a la región seleccionada. El pulso eléctrico es de suficiente tensión y duración para causar la electroporación, de modo que el ácido nucleico puede penetrar en las células y el polipéptido codificado para expresarse como una molécula

transgénica. La expresión biológica del componente de ácido nucleico da como resultado la transcripción y la traducción del gen administrado, de modo que las células seleccionadas sintetizan el producto génico de novo. Las aplicaciones terapéuticas incluyen, por ejemplo, el aumento de genes faltantes o poco expresados; la expresión de genes que tienen un valor terapéutico (por ejemplo, inhibir la acción de productos genéticos dañinos al expresar un receptor para unirse al producto de un gen sobreexpresado); la expresión de los genes, el producto del cual provoca una respuesta inmune deseada; y similares.

Como se entenderá por los expertos en la materia, la expresión eficiente de un ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico generalmente requiere que la secuencia de ácido nucleico esté asociada operativamente con una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras incluyen promotores, potenciadores, y similares. Como apreciarán los expertos en la técnica, incluso cuando una secuencia promotora está asociada operativamente con el ácido nucleico terapéutico, la expresión puede aumentarse adicionalmente asociando operativamente un elemento potenciador o similar.

Puede ser deseable modular la expresión de un gen en una célula mediante la introducción de una molécula mediante el método de la invención. El término "modular" prevé la supresión de la expresión de un gen cuando se sobreexpresa, o el aumento de la expresión cuando es subexpresado. Cuando un trastorno de proliferación celular está asociado con la expresión de un gen, por ejemplo, se pueden usar secuencias de ácido nucleico que interfieren con la expresión del gen en el nivel de traducción. Este enfoque utiliza, por ejemplo, ácido nucleico antisentido, ribozimas, o agentes triples para bloquear la transcripción o traducción de un ARNm específico, ya sea mediante el enmascaramiento de ese ARNm con un ácido nucleico antisentido o un agente triplex, o mediante su segmentación con una ribozima.

Los ácidos nucleicos contemplados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen ADN desnudo, ARN desnudo, ADN plasmídico desnudo, ya sea superenrollado o lineal, ARNi, ARNsi, microARN, y ARNh<sub>c</sub> y ADN o ARN encapsulado (por ejemplo, en liposomas, microesferas, o similares). Como se entenderá por los expertos en la materia, también pueden emplearse partículas o moléculas mezcladas con plásmido para "condensar" la molécula de ADN.

Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias a al menos una porción de una molécula de ARNm específica (ver, por ejemplo, Weintraub, Scientific American, 262:40, 1990) o cualquier otra secuencia de ácido nucleico. En la célula, los ácidos nucleicos antisentido hibridan con el ARNm correspondiente, formando una molécula bicatenaria. Los ácidos nucleicos antisentido interfieren con la traducción del ARNm, ya que la célula no traducirá un ARNm de doble cadena. Se prefieren oligómeros antisentido de aproximadamente 15 nucleótidos, ya que son fáciles de sintetizar y es menos probable que causen efectos perjudiciales que las moléculas más grandes cuando se introducen en la célula objetivo. El uso de métodos antisentido para inhibir la traducción *in vitro* de genes es bien conocido en la técnica (ver, por ejemplo, Marcus-Sakura, Anal. Biochem., 172:289, 1988).

El uso de un oligonucleótido para detener la transcripción se conoce como la estrategia triple ya que el oligómero se enrolla alrededor del ADN de doble hélice, formando una hélice de tres hilos. Por lo tanto, estos compuestos triples pueden diseñarse para reconocer un sitio único en un gen elegido (Maher, et al., Antisense Res. and Dev., 1(3):277-281, 1991; Helene, C., Anticancer Drug Design, 6(6):569, 1991). Por consiguiente, la electroporación de ácidos nucleicos útiles para la formación de triplex también se contempla dentro del alcance de la presente invención.

Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otros ARN monocatenarios de manera análoga a las endonucleasas de restricción de ADN. A través de la modificación de secuencias de nucleótidos que codifican estos ARN, es posible diseñar moléculas que reconocen secuencias específicas de nucleótidos en una molécula de ARN y escindirlas (Cech, J. Amer. Med. Assn., 260:3030, 1988). Una ventaja importante de este enfoque es que solo los ARNm con secuencias particulares se inactivan porque los ribosomas son específicos de la secuencia.

Hay dos tipos básicos de ribozimas, a saber, tipo tetrahimena (Hasselhoff, Nature, 334:585, 1988) y tipo "cabeza de martillo". Las ribozimas de tipo tetrahimena reconocen secuencias que tienen cuatro bases de longitud, mientras que las ribozimas tipo cabeza de martillo reconocen secuencias de bases en el rango de 11-18 bases de longitud. Cuanto más larga sea la secuencia de reconocimiento, mayor es la probabilidad de que la secuencia se produzca exclusivamente en las especies de ARNm objetivo. Por consiguiente, las ribozimas de tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas de tipo tetrahymena para inactivar una especie de ARNm específica y las secuencias de reconocimiento basadas en 18 son preferibles a las secuencias de reconocimiento más cortas.

La presente divulgación también proporciona métodos de terapia génica para el tratamiento de trastornos proliferativos o inmunológicos de células mediados por un gen particular o su ausencia. El término "trastorno de proliferación celular" denota poblaciones de células malignas y no malignas que a menudo parecen diferir del tejido circundante tanto morfológicamente como genotípicamente. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de un sentido específico o polinucleótido antisentido en las células que tienen el trastorno. El suministro de polinucleótidos se puede lograr utilizando un vector de expresión recombinante como un virus quimérico, o el polinucleótido se puede administrar como ADN "desnudo", por ejemplo.

Las secuencias de polinucleótidos de la invención son secuencias de ADN o ARN que tienen un efecto terapéutico

después de ser absorbidas por una célula. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN de doble cadena (por ejemplo, plásmido, cósmido, fago, viral, YACS, BACS, otros cromosomas artificiales, y similares) o ADN o ARN monocatenario. Los ácidos nucleicos pueden ser no complejos (es decir, "desnudos") o complejados (por ejemplo, con agentes químicos tales como lípidos (por ejemplo, catiónicos), dendrímeros, u otros políplexos que facilitan la penetración del ADN en los tejidos y a través de las membranas celulares, y similares). El ADN también se puede encapsular o formular con complejos de proteínas.

Ejemplos de polinucleótidos que son a su vez terapéuticos son el ADN y el ARN antisentido; ADN que codifica un ARN antisentido; o ADN que codifica para ARNt o ARNr para reemplazar moléculas endógenas defectuosas o deficientes, y similares. Los polinucleótidos de la invención también pueden codificar polipéptidos terapéuticos. Tal y como se usa en el presente documento, "polipéptido" se entiende como cualquier producto de traducción de un polinucleótido independientemente de su tamaño, ya sea glicosilado o modificado de otro modo, o no. Los polipéptidos terapéuticos incluyen, como ejemplo primario, aquellos polipéptidos que pueden compensar las especies defectuosas o deficientes en un animal, o aquellos que actúan a través de efectos tóxicos para limitar o eliminar las células dañinas del cuerpo.

También se incluyen los polinucleótidos que codifican las enzimas y proteínas metabólicas, tales como compuestos de coagulación de la sangre (por ejemplo, Factor VII, VIII o IX), y similares.

En la presente divulgación, se proporcionan métodos para inducir una respuesta inmune en un sujeto. Los métodos de esta realización comprenden la aplicación de un campo eléctrico pulsado a la dermis y a las células musculares subyacentes del sujeto sustancialmente de manera contemporánea con la aplicación de un agente inductor de la respuesta inmune a la dermis y/o células musculares, de tal manera que el agente inductor de la respuesta inmune se introduce en las células, induciendo así en el sujeto una respuesta inmune. Tal y como se usa en el presente documento, "agente inductor de la respuesta inmune" significa cualquier agente, que tras la introducción en la dermis y/o células musculares de un sujeto, resulta en una respuesta inmune, si tal respuesta es una respuesta celular, respuesta humoral, o ambas. Los agentes inductores de la respuesta inmunitaria contemplados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen ácidos nucleicos expresables y polipéptidos.

El ADN y el ARNm expresables pueden suministrarse a las células para formar allí un producto de traducción de polipéptido. Si los ácidos nucleicos están asociados operativamente con las secuencias reguladoras apropiadas, se puede lograr una síntesis mejorada de la proteína codificada. Los polipéptidos codificados en ADN o ARN contemplados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen inmunizar polipéptidos, proteínas derivadas de patógenos, factores de coagulación de la sangre, hormonas peptídicas, y similares. Las hormonas peptídicas incluyen, por ejemplo, calcitonina (CT), hormona paratiroidea (PTH), eritropoyetina (Epo), insulina, citocinas, hormona de crecimiento, factores de crecimiento, y similares. Las linfocinas contempladas para su uso en la práctica de la presente invención incluyen el factor de necrosis tumoral, interleuquinas 1, 2 y 3, linfotóxina, factor activador de macrófagos, factor de inhibición de migración, factor estimulante de colonias, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma y sus subtipos. Los factores de coagulación de la sangre contemplados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen el factor VIII o el factor IX.

Cuando el ADN o ARNm entregado a las células codifica un péptido inmunizante, los métodos de la invención se pueden aplicar para lograr una inmunidad mejorada y más efectiva contra agentes infecciosos, incluyendo bacterias, virus intracelulares, células tumorales, y similares. Los polinucleótidos terapéuticos utilizados con la invención también pueden codificar polipéptidos que confieren inmunidad, que pueden actuar como inmunógenos endógenos (es decir, polipéptidos que contienen antígenos) para provocar una respuesta inmune humoral, una respuesta del agente inductor de la respuesta inmune celular, o ambos. Se describen métodos para inducir tales respuestas y dirigirse a células específicas para respuestas específicas, por ejemplo, en la patente US n.º 5.589.466. Los polinucleótidos empleados de acuerdo con la presente invención también pueden codificar un anticuerpo. En este sentido, el término "anticuerpo" abarca inmunoglobulina completa de cualquier clase, anticuerpos quiméricos y anticuerpos híbridos con especificidades de antígeno o epítipo duales o múltiples, y fragmentos, tales como F(ab).sub.2, Fab', Fab, y similares, incluyendo sus fragmentos híbridos. También se incluyen dentro del significado de "anticuerpo" los conjugados de tales fragmentos, y las llamadas proteínas de unión a antígeno (anticuerpos de cadena única) como se describe, por ejemplo, en la patente US n.º 4.704.692.

Por lo tanto, se puede introducir un polinucleótido aislado que codifica regiones variables de un anticuerpo, de acuerdo con los métodos de la presente invención, para permitir que el sujeto tratado produzca anticuerpos in situ. Para una metodología ilustrativa relacionada con la obtención de polinucleótidos que codifican anticuerpos, ver Ward et al. Nature, 341:544-546 (1989); Gillies et al., Biotechnol. 7:799-804 (1989). El anticuerpo a su vez ejerce un efecto terapéutico, por ejemplo, mediante la unión de un antígeno de superficie asociado con un patógeno. Como alternativa, los anticuerpos codificados pueden ser anticuerpos antiidiotípicos (anticuerpos que se unen a otros anticuerpos) como se describe, por ejemplo, en la patente US n.º 4.699.880. Tales anticuerpos antiidiotípicos podrían unirse a anticuerpos endógenos o extraños en un individuo tratado, mejorando o previniendo así las condiciones patológicas asociadas con una respuesta inmune, (por ejemplo, en el contexto de una enfermedad autoinmune como el lupus y similares).

Actualmente se prefiere que las secuencias polinucleotídicas utilizadas codifiquen polipéptidos terapéuticos o inmunogénicos. Estas secuencias de polinucleótidos se pueden usar en asociación con otras secuencias de

polinucleótidos que codifican proteínas reguladoras que controlan la expresión de los polipéptidos terapéuticos o inmunogénicos. La(s) proteína(s) reguladora(s) empleada(s) puede(n) actuar de muchas maneras regulatorias conocidas por los expertos en la técnica, tal como uniéndose al ADN para regular su transcripción, uniéndose al ARN mensajero para aumentar o disminuir su estabilidad o eficiencia de traducción, y similares.

El material polinucleotídico suministrado a las células *in vivo* puede tomar cualquier número de formas, y la presente invención no se limita a ningún polinucleótido particular que codifique para cualquier polipéptido particular. Los plásmidos que contienen genes que codifican un gran número de péptidos y antígenos o inmunógenos fisiológicamente activos se contemplan para su uso en la práctica de la presente invención y los expertos en la técnica pueden obtenerlos fácilmente.

Varios vectores virales también pueden utilizarse en la práctica de la presente invención e incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia, virus de ARN, y similares. Actualmente se prefiere que el virus sea un virus de ARN tal como un retrovirus. Preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un solo gen extraño incluyen, pero no se limitan a: virus de leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus de sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV) y virus de sarcoma de Rous (RSV). Cuando el sujeto es un humano, se puede usar un vector como el virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), o similar. Un número de vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que puedan identificarse las células transducidas. En otras realizaciones, el vector puede comprender una construcción de ácido nucleico lineal que contiene solo un promotor y una secuencia génica para expresarse en la célula después de la introducción por los métodos del aparato de la invención.

Los péptidos o polipéptidos terapéuticos también pueden incluirse en los métodos terapéuticos. Por ejemplo, los agentes inmunomoduladores y otros modificadores de la respuesta biológica pueden administrarse para su incorporación por una célula. Tal y como se usa en el presente documento, el término "modificadores de la respuesta biológica" abarca sustancias que participan en la modificación de la respuesta inmune. Los ejemplos de modificadores de la respuesta inmune incluyen compuestos tales como linfocinas, y similares. Las linfocinas incluyen, por ejemplo, factor de necrosis tumoral, varias interleuquinas, por ejemplo, por ejemplo, IL-1, 2 y 3, linfotóxina, factor activador de macrófagos, factor de inhibición de migración, factor estimulante de colonias, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma y sus subtipos.

De acuerdo con otra realización de la presente divulgación, se proporcionan kits de electrodos para uso en conjunto con terapia de electroporación, cada kit contiene los componentes de los electrodos descritos aquí. Por ejemplo, en un aspecto, se proporciona un kit de electrodo que comprende un sistema de electrodo de anillo que incluye un conjunto de electrodo de anillo en el que dicho conjunto tiene una aguja de inyección alargada central, que comprende opcionalmente uno o más orificios dispuestos a lo largo de su longitud y próximos a la punta de la aguja, en el que los orificios están en comunicación fluida con el interior hueco de la aguja de inyección, teniendo dicha aguja de inyección alargada una porción distal eléctricamente conductora de la misma. Asimismo, dicho kit de electrodos puede equiparse con cualquiera de los distintos diseños y dimensiones de electrodos de anillo, incluyendo aquellos electrodos de anillo compatibles con el uso en piel humana o en animales cubiertos de piel.

Ejemplo I Estudio de conejo para mostrar el enfoque de la electroporación al tejido

En este ejemplo, la eficacia de un sistema de electrodo de anillo para la administración intramuscular electroporativa se demostró mediante la expresión del ADN plasmídico de la proteína fluorada verde (GFP) en el músculo cuádriceps de conejo.

Específicamente, se trataron conejos adultos blancos de Nueva Zelanda (n = 2) en los músculos del cuádriceps con inyecciones de 200 µl (microlitro) de plásmido-ADN que codifica la proteína GFP y una profundidad de penetración de la aguja de 1,6 cm utilizando el electrodo alargado como la aguja de administración. El experimento se dividió entre sistemas de electrodos de anillo que incorporan realizaciones alternativas, específicamente:

El primer conejo recibió 4 inyecciones (una en cada una de las partes superior e inferior de los músculos del cuádriceps izquierdo y derecho) utilizando una aguja de inyección de 22 g o una inyección de 23 g como el electrodo alargado. Una de las cuatro inyecciones utilizó dos agujas paralelas no aisladas de 22 g en el dispositivo de Elgen (sin electrodo de anillo). En las tres inyecciones restantes, el electrodo de anillo era un electrodo de cobre ovoide con un área de superficie de 10 cm<sup>2</sup>. La sección superior del electrodo de la aguja de administración se recubrió con un epoxi curado ultravioleta (Loctite 4304) dejando aproximadamente 0,8-1,0 cm de metal expuesto en la punta distal de la aguja para la conducción del electrodo en el tejido biológico para enfocar la corriente eléctrica solo en la sección objetivo del músculo. Se unió un cable de electrodo a una sección suficiente de la aguja proximal en la base de la aguja de la jeringa para permitir la comunicación eléctrica con el generador de pulso eléctrico.

El segundo conejo recibió 4 inyecciones, cada una en las partes superior e inferior del músculo cuádriceps derecho e izquierdo usando una aguja de inyección de 22 g o 23 g. El aislamiento se colocó en la aguja de inyección utilizando una funda introductora de 22 g, dejando aproximadamente 0,8 cm de metal expuesto en la punta distal de la aguja

para la conducción del electrodo en el tejido biológico, para enfocar la corriente eléctrica solo en la sección específica del músculo. La base de la aguja también se conectó al generador de pulsos como en la primera prueba de conejo. El electrodo de anillo era un electrodo de anillo de cobre ovoide con un área de superficie de 20 cm<sup>2</sup>. La configuración experimental fue como se muestra en la Tabla III.

5

Tabla III

Conejo	Sitio de entrega		Tamaño del electrodo de entrega	Tipo de aislamiento	Área de electrodo de suministro no aislado	Área de electrodo de anillo	Tensión de pulso (V)
	Q izquierda (superior/inferior)	Q derecho (arriba/abajo)					
1	U		23 g	funda de 22 g	8 mm	10 cm <sup>2</sup>	110
1	L		23 g	funda de 22 g	8 mm	10 cm <sup>2</sup>	54
1		U	22 g	epoxi	8 mm	10 cm <sup>2</sup>	54
1		L	Dos 22 g	N/A		n/a	54
2	U		23 g	funda de 22 g	8 mm	20 cm <sup>2</sup>	54
2	L		23 g	funda de 22 g	8 mm	20 cm <sup>2</sup>	106
2		U	22 g	epoxi	8 mm	20 cm <sup>2</sup>	106
2		L	Un 23 g	N/A		n/a	106

Q es igual al músculo del cuádriceps

Para llevar a cabo la electroporación, un generador Inovio Elgen modelo 1000 (Genetronics, Inc., San Diego, Ca) se usó y se aplicó un gel de electrodo estándar (gel de conductividad Lectron II) a la superficie del electrodo de anillo en contacto con la superficie de la piel del animal de prueba. El generador de pulsos Elgen se configuró para entregar dos pulsos de 60 ms de duración separados por un intervalo de 250 ms (4 Hz) entre la aguja y los electrodos de anillo. La amplitud del pulso se rige por aprox. 400 mA de corriente máxima, o 50 V o 100 V de tensión máxima. La corriente y la tensión alcanzadas en el tejido se midieron y registraron, y las impedancias aparentes del tejido se calcularon como se describe en la Tabla IV.

10

15

Tabla IV

Control de resistencia de datos 100 Ω	Voltios	I (mA)	R (Ω)
	44	382	114
	44	381	115
Datos 1 - 1LU - 10 cm <sup>2</sup> , SH, 110 V			
	105	382	273
	110	382	286
Control de resistencia de datos 100 Ω	Voltios	I (mA)	R (Ω)

(continuación)

Datos 2 - ILL - 10 cm2, SH, 54V	53	140	380
	53	151	351
Datos 3 - 1RU - 10 cm2, UV, 54 V	53	97	548
	53	112	474
Datos 4 - 1RL - 2 Ndls, CTRL, 54 V	51	385	133
	50	386	128
Datos 5 - 612LU - 20 cm2, SH, 54V	53	153	347
	53	167	318
Datos 6 - 612LL - 20 cm2, SH, 106V	92	386	237
	90	386	231
Datos 7 - 612RU - 20 cm2, UV, 106V	98	385	254
	95	385	245
Datos 8 - 612RL - 20 cm2, CTRL, 106 V	78	387	200
	76	385	198
clave: LU = Músculo cuádriceps superior izquierdo; LL = Músculo cuádriceps inferior izquierdo; RU = Músculo cuádriceps superior derecho; RL = Músculo cuádriceps inferior derecho; SH = Funda blindada; UV = Epoxi UV blindado; 2 agujas = ELGEN estándar; 10 cm2 = Placa de electrodo pequeño; 20 cm2 = Placa de electrodo grande			

- 5 Al calcular los parámetros de pulsos, un experto en la técnica reconocerá la variación en las tensiones reales enviadas en los pulsos en comparación con el valor establecido en el dial del instrumento, por ejemplo, 53 V a diferencia de 54 V. Esta variación se debe a las sensibilidades específicas de la electrónica del instrumento. En cualquier caso, el promedio de las impedancias del tejido durante la electroporación se calculó a partir de los datos de salida de la electroporación como se muestra en la Tabla IV. Los promedios calculados están cerca de los valores verdaderos dada la forma del pulso, es decir, una onda cuadrada monopolar (no mostrada), fue bastante plana con respecto a la caída de corriente y tensión y solo una ligera disminución en la impedancia a lo largo de cada pulso.
- 10 De las diversas observaciones con respecto al uso del sistema de electrodo de anillo de la presente invención, un fenómeno es claro, es decir, que cuanto mayor sea la superficie del electrodo de anillo, cuanto menor es la impedancia aparente del tejido, mientras que otros parámetros son los siguientes: una mayor tensión está asociada con una menor impedancia aparente del tejido, el aislamiento del electrodo de aguja aumenta la impedancia aparente del tejido, el aislamiento de resina epoxi tenía una impedancia más alta que el revestimiento de plástico, y la impedancia del sistema
- 15 de electrodo de anillo indicaba una impedancia aparente más alta del tejido que para el sistema de electrodo de aguja desnuda del dispositivo de Elgen.
- 20 El dispositivo de Elgen con dos agujas de aproximadamente 2 cm de longitud y separadas por aproximadamente 0,4 cm da como resultado una impedancia aparente del tejido de entre 100 y 200 ohmios. La aguja única con configuración de anillo que utiliza una aguja de calibre 23 de punta expuesta de 1 cm y un anillo de superficie de entre 20 y 40 cm<sup>2</sup> da como resultado una impedancia aparente del tejido de entre 200 y 350 ohmios, como se muestra en el conjunto de datos del 5 al 8 en la Tabla IV. El significado de esto es que la impedancia aparente del tejido utiliza el aparato de la invención en lugar de usar un electrodo alargado de doble inserción del dispositivo de Elgen, u otra matriz similar de electrodos de inserción doble, es que la impedancia observada es solo ligeramente mayor con el sistema de electrodo
- 25 de anillo. Por lo tanto, todas las cosas son iguales entre un sistema de doble aguja y el aparato de electrodo de anillo de la invención, el aparato de la invención proporciona de manera única un diferencial en la densidad de corriente

suficiente para la poración de las células permitiendo el enfoque de la energía del pulso solo en un área enfocada del tejido.

5 Volviendo ahora a los resultados de la expresión génica GFP, los conejos de prueba se anestesiaron con administración intravenosa de quetamina/zilazina durante el procedimiento de electroporación, se dejó incubarse durante aproximadamente tres días para permitir la expresión del gen GFP, luego se sacrificó con una inyección intravenosa de pentobarbital, después de lo cual se extrajo el músculo del cuádriceps del animal y se cortó en rodajas, fue examinado y fotografiado bajo iluminación fluoroscópica y/o visible. En cada músculo probado, la expresión de GFP estaba claramente presente. La huella de la aguja era claramente visible en la mayoría de las imágenes, mostrando una buena colocalización del material inyectado y el procedimiento de electroporación. Por ejemplo, la tensión más baja (53 voltios) dio una buena expresión de GFP con una corriente medida a 100 mA. En contraste, los ajustes de electroporación de 50 a 100 voltios con el dispositivo de Elgen de electrodo de aguja doble se entregan normalmente entre 400 mA y 1 amperio o más. Por lo tanto, en la confirmación de la presente invención, se requiere menos energía (baja corriente, alta impedancia) como resultado de aislar la porción proximal del electrodo alargado y colocar un contraelectrodo grande en la superficie de la piel, lo que hace que la energía electroporativa se concentre cerca de la parte no aislada de la aguja alargada en el tejido muscular profundo, en lugar de estar cerca y entre dos electrodos de aguja que perforan la piel y el músculo subyacente. En otras palabras, la electroporación se enfoca lejos de la piel, de modo que la sensación de electricidad debe ser mínima en la piel debido a la densidad de corriente sustancialmente menor en la piel. En las figuras 9A a F se muestran ejemplos como se discutió anteriormente de los resultados observados en todos los experimentos de expresión de GFP examinados. Las figuras 9B y F muestran un campo de fluorescencia y una fluorescencia mixta y luz visible. Como es claramente visible, la electroporación se ha localizado en el tejido muscular profundo.

Sensibilidad.

25 En más realizaciones adicionales, a medida que aumenta la superficie del electrodo de anillo, la sensación en los tejidos superficiales debe disminuir. Basado en la discusión previa sobre densidades actuales, el electrodo de anillo puede estar en cualquier lugar entre 5 y 1000 veces el área de superficie del electrodo alargado dentro de las realizaciones preferidas. Por lo tanto, como el dolor se piensa principalmente que es una función de la densidad de corriente, la sensación en el electrodo de anillo probablemente se reduce significativamente en comparación con la sensación que causaría un electrodo alargado.

35 Todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la vista de la presente divulgación. Aunque las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento. Más específicamente, las realizaciones descritas han de considerarse en todos los aspectos solo como ilustrativas y no restrictivas.

40 Todas las patentes, las solicitudes de patente y las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a los que se refiere la invención.

45 La invención descrita ilustrativamente en el presente documento de manera adecuada puede ponerse en práctica en ausencia de cualquier elemento(s) no descrito(s) específicamente en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, en cada caso en el presente documento cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en", y "que consiste en" pueden ser reemplazados por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no existe ninguna intención de que el uso de tales términos y expresiones implique la exclusión de equivalentes de las características mostradas y descritas en su totalidad o en parte, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de electroporación (10) para suministrar una molécula en células de un mamífero, que comprende:
  - a) un electrodo de anillo plano geométrico (301) con una multiplicidad de proyecciones eléctricamente conductoras (300) sobre el mismo;
  - b) un electrodo alargado de perforación de tejido (120) que tiene un extremo proximal y un extremo distal, teniendo dicho electrodo alargado (120) una porción no conductora del mismo, estando colocada dicha porción no conductora entre dicho extremo proximal y entre aproximadamente 2,5 y al menos 0,1 cm desde el extremo distal, comprendiendo dicha porción no conductora un recubrimiento aislante en dicho electrodo alargado (120) o un material no conductor;
  - c) una carcasa asociada con dichos electrodos de anillo (301) y alargado (120), cubriendo dicha carcasa circuitos electrónicos en comunicación eléctrica con dichos electrodos de anillo (301) y alargado (120), en donde el circuito electrónico está configurado para proporcionar pulsos eléctricos entre dichos electrodos de anillo (301) y alargado (120), al menos un condensador en comunicación eléctrica con dicho circuito, y un accionador para accionar dicho electrodo alargado (120) en un movimiento lineal de una longitud de recorrido entre 0,5 y 4 cm;
  - d) una unidad de carga para cargar dicho condensador; y
  - e) un ordenador en comunicación eléctrica con dicha unidad de carga, comprendiendo dicho ordenador un software capaz de realizar funciones de programación para dicho sistema.
2. El sistema de la reivindicación 1, en donde dicho electrodo de anillo (301) se puede aislar eléctricamente en dos mitades eléctricamente conductoras.
3. El sistema de la reivindicación 2, que comprende además un circuito para detectar resistencia eléctrica entre cada una de dichas mitades de dicho electrodo de anillo (301) y una superficie de tejido.
4. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además un circuito para detectar una presión aplicada a dicho electrodo de anillo (301) contra una superficie de tejido.
5. El sistema de la reivindicación 1, en donde dicho electrodo de anillo (301) tiene una forma geométrica seleccionada del grupo que consiste en una rosquilla, oval, círculo de rosquilla, rosquilla de triángulo isósceles, rosquilla de triángulo equilátero, una rosquilla cuadrada, rosquilla rectangular, una rosquilla pentagonal y una rosquilla hexagonal.
6. El sistema de la reivindicación 5, en donde dicho electrodo de anillo (301) tiene un área superficial para conducir una corriente proporcional a un área superficial de dicho electrodo alargado (120), dicha relación de áreas de superficie de los electrodos de anillo (301):alargado (120) seleccionadas del grupo que consiste en 5:1, 10:1, 100:1 y 1000:1.
7. El sistema de la reivindicación 1, en donde dicho electrodo alargado (120) es tubular y capaz de canalizar un medio fluido desde dicho extremo proximal a dicho extremo distal, estando dicho extremo proximal en comunicación fluida con un depósito.
8. El sistema de la reivindicación 7, en donde dicho extremo distal comprende una pluralidad de aberturas situadas a lo largo de una longitud de dicho electrodo alargado (120), comprendiendo dicha longitud entre aproximadamente 1,0 y 1,5 cm de dicha porción distal de dicho electrodo alargado (120).
9. El sistema de la reivindicación 8, en donde dichas aberturas tienen un diámetro seleccionado del grupo que consiste en 120 micrómetros, 100 micrómetros, 90 micrómetros, 80 micrómetros, 70 micrómetros, 60 micrómetros, 50 micrómetros, 40 micrómetros, 30 micrómetros y 20 micrómetros y en donde el número de dicha pluralidad de aberturas se selecciona del grupo de entre 10 y 100 aberturas por centímetro y entre 20 y 60 aberturas por centímetro de longitud del electrodo alargado eléctricamente conductor y en donde dicho accionador se selecciona de un motor, un accionador accionado mecánicamente y un accionador accionado animadamente y en donde dicho accionador es capaz de accionar tanto el movimiento lineal de dicho electrodo alargado como un medio fluido desde un depósito a través de un lumen en dicho electrodo alargado (120) a y hacia fuera de una pluralidad de puertos en un porción distal de dicho electrodo alargado (120).
10. El sistema de la reivindicación 9, en donde dicho pulso crea una presión que permite que dicho medio fluido pase a través de cada abertura a una dinámica de flujo equivalente, de manera que se expulsa un volumen uniforme de fluido alrededor del electrodo alargado (120).
11. El sistema de la reivindicación 1, en donde dicho electrodo alargado (120) es un electrodo negativo.
12. El sistema de electroporación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el sistema es un sistema de electrodo de densidad de corriente variable para electroporación *in vivo*.
13. El sistema de electrodo de densidad de corriente variable de la reivindicación 12, en donde dicho electrodo de anillo (301) tiene un área superficial de entre 1 cm<sup>2</sup> y 100 cm<sup>2</sup>.

14. El sistema de la reivindicación 1, en donde dicho aislamiento se selecciona de un grupo que consiste en plástico, parafeno, politetrafluoroetileno y epoxi.

5 15. El sistema de la reivindicación 12, en donde dicho electrodo de anillo (301) está cargado con una carga positiva y en donde dicho electrodo de aguja alargado (120) está cargado con una carga negativa.

10 16. El sistema de la reivindicación 15, en donde dicho electrodo alargado con carga negativa (120) da como resultado un desprendimiento insignificante de iones metálicos de dicho electrodo alargado (120) en dicho tejido corporal al descargar un pulso electroporativo en dicho tejido.

15 17. El sistema de la reivindicación 8, en donde dichas aberturas tienen un diámetro seleccionado del grupo que consiste en 120 micrómetros, 100 micrómetros, 90 micrómetros, 80 micrómetros, 70 micrómetros, 60 micrómetros, 50 micrómetros, 40 micrómetros, 30 micrómetros y 20 micrómetros.

20 18. El sistema de la reivindicación 8, en donde el número de dicha pluralidad de aberturas se selecciona del grupo de entre 10 y 100 por centímetro y entre 20 y 60 aberturas por centímetro de la longitud del electrodo alargado eléctricamente conductor (120).

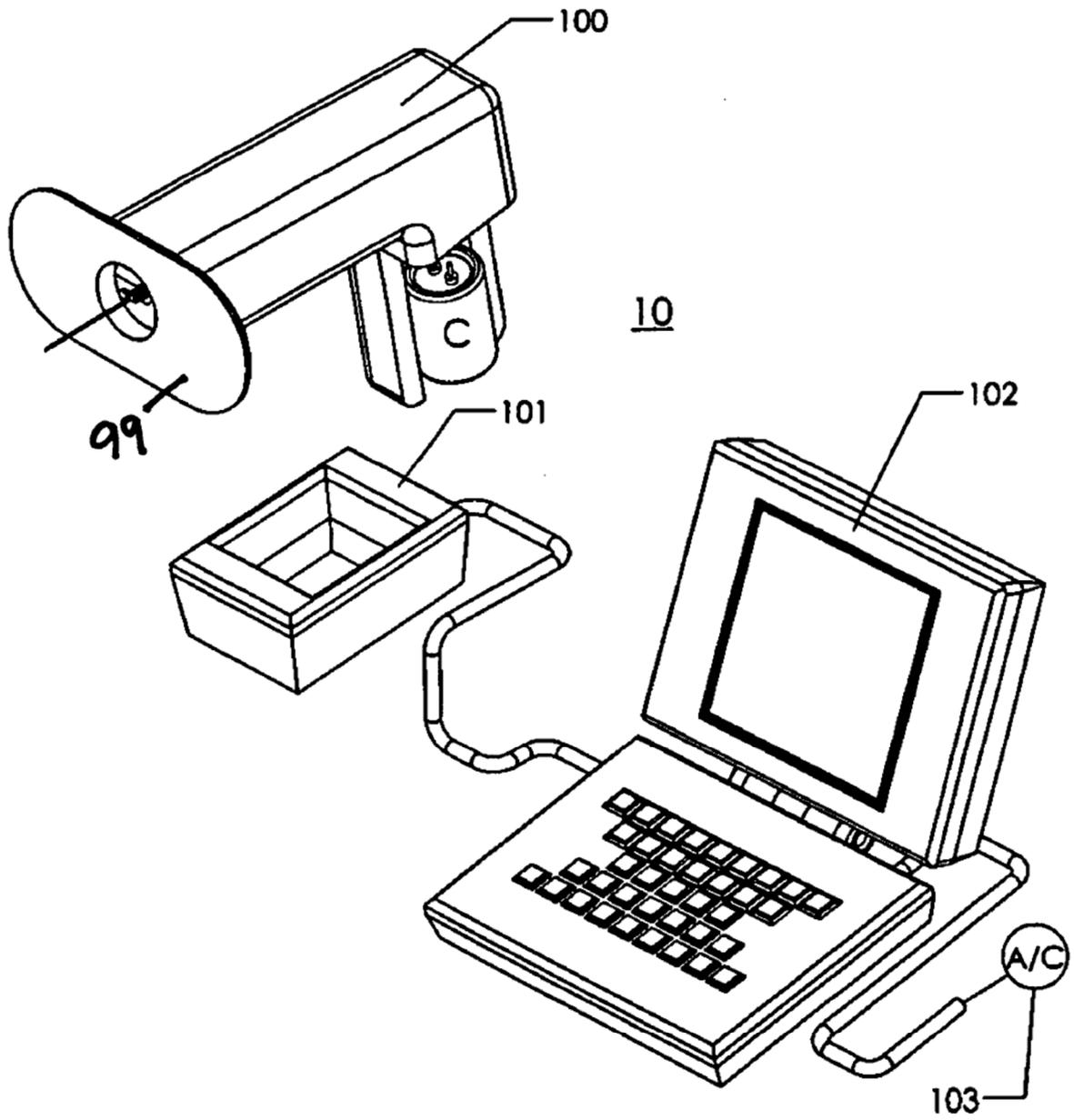
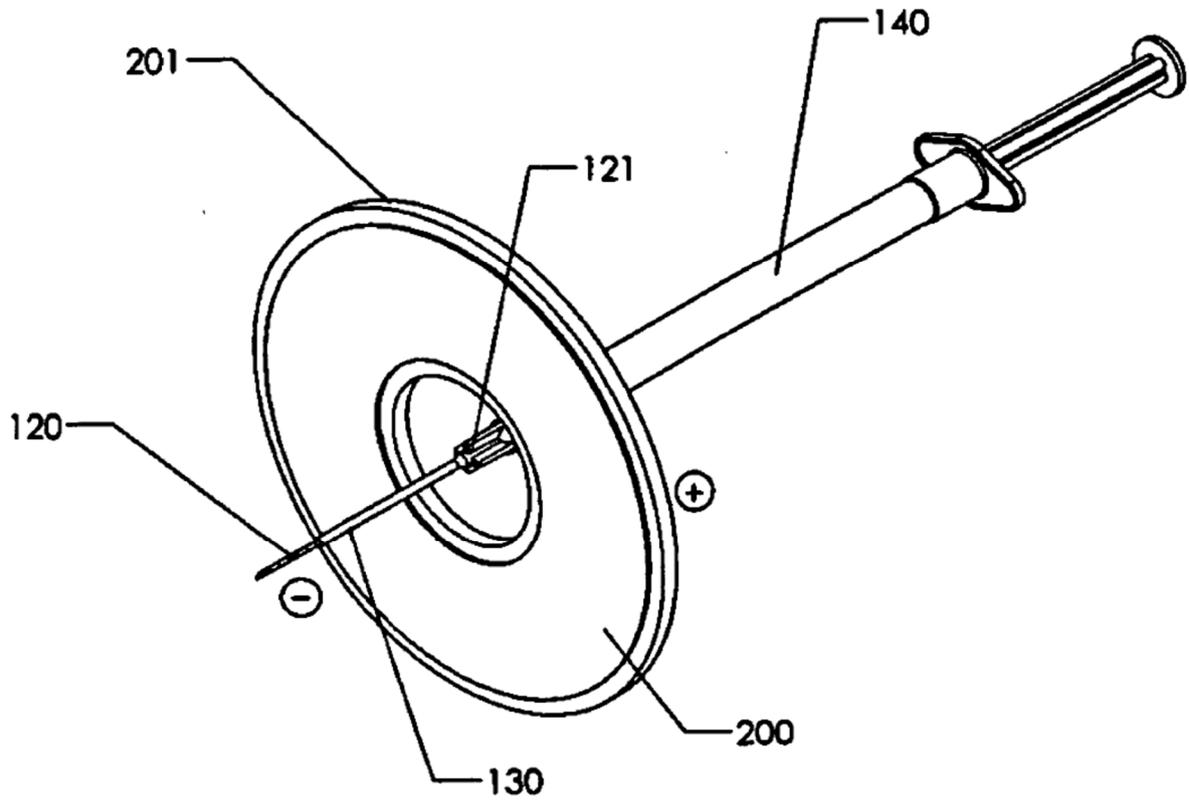
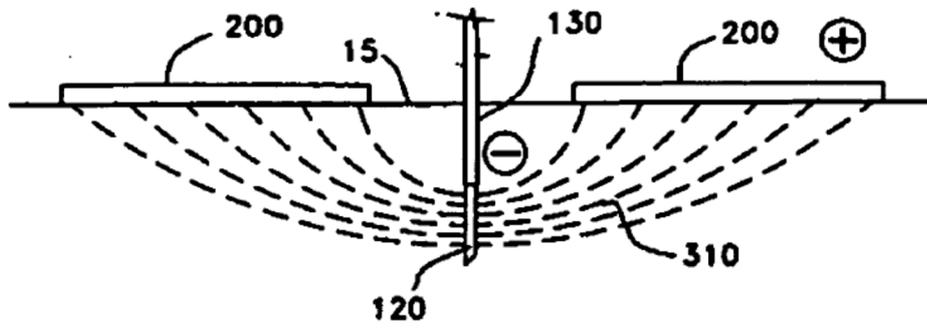


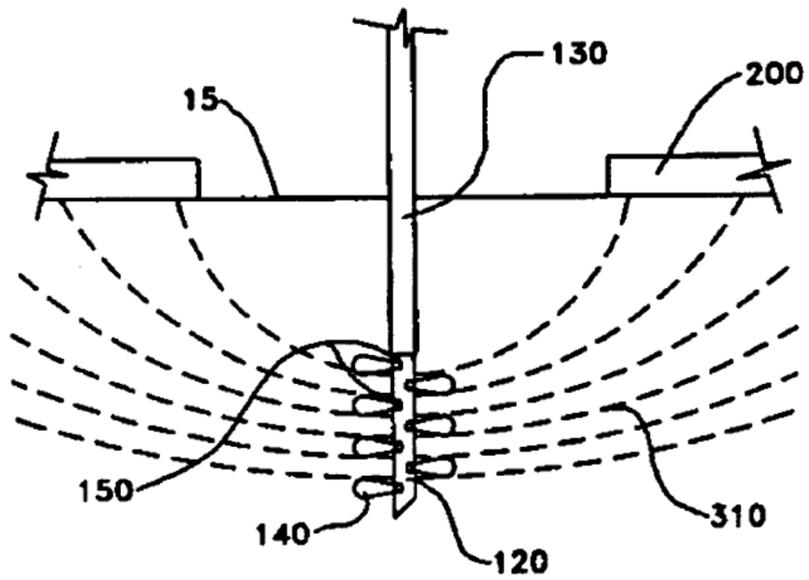
Fig. 1



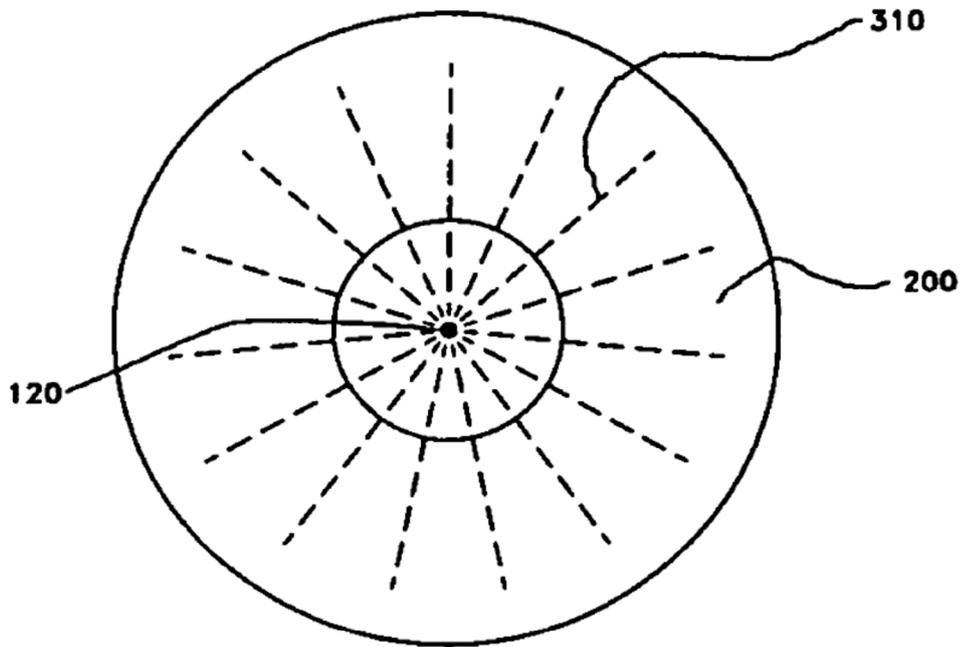
**Fig. 2**



**Fig.3A**

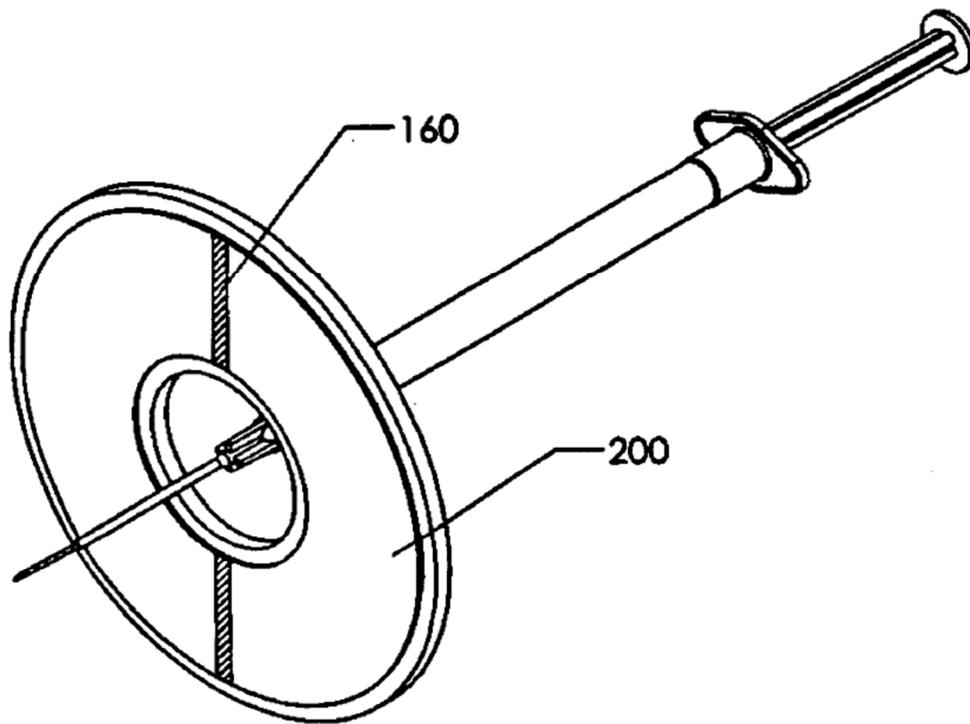
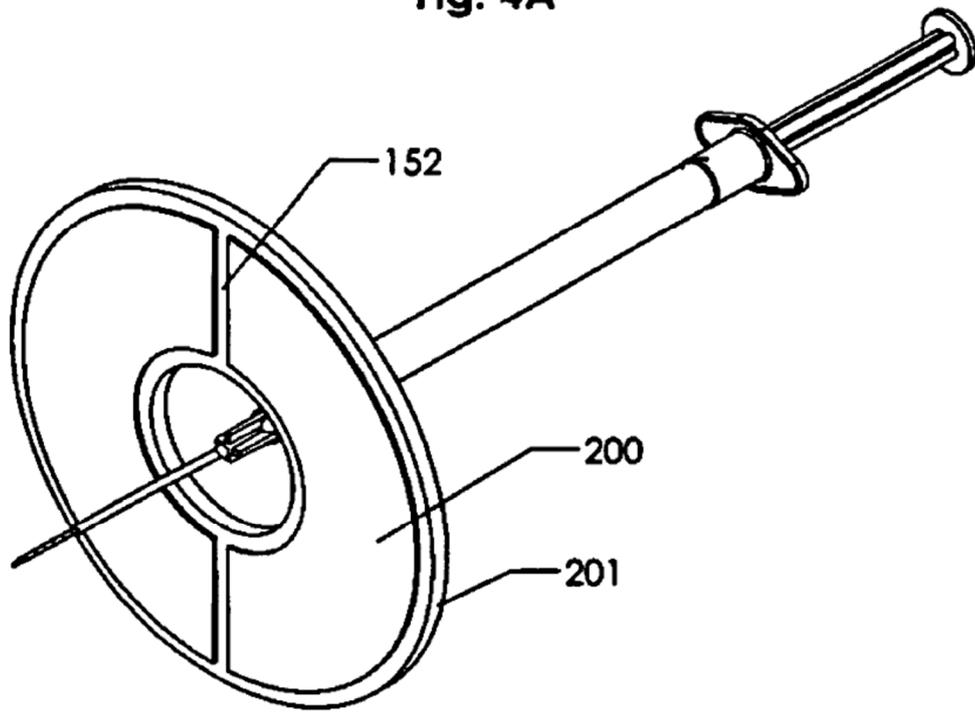


**Fig.3B**

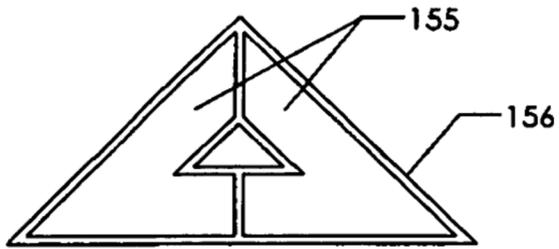


**Fig.3C**

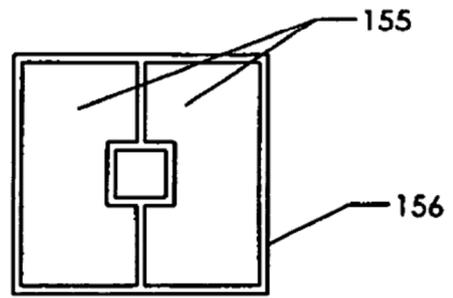
**Fig. 4A**



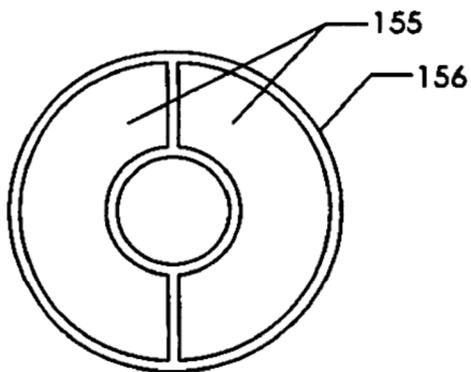
**Fig.4B**



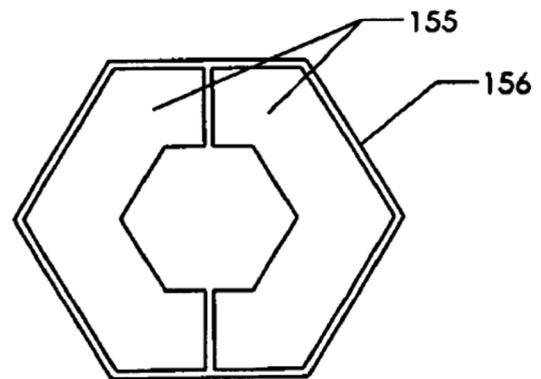
**Fig.5A**



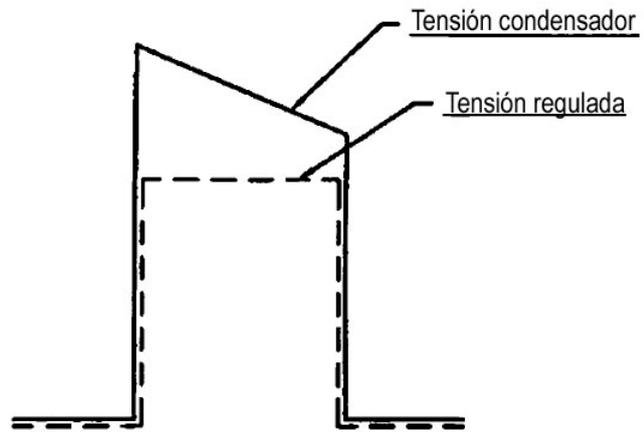
**Fig.5B**



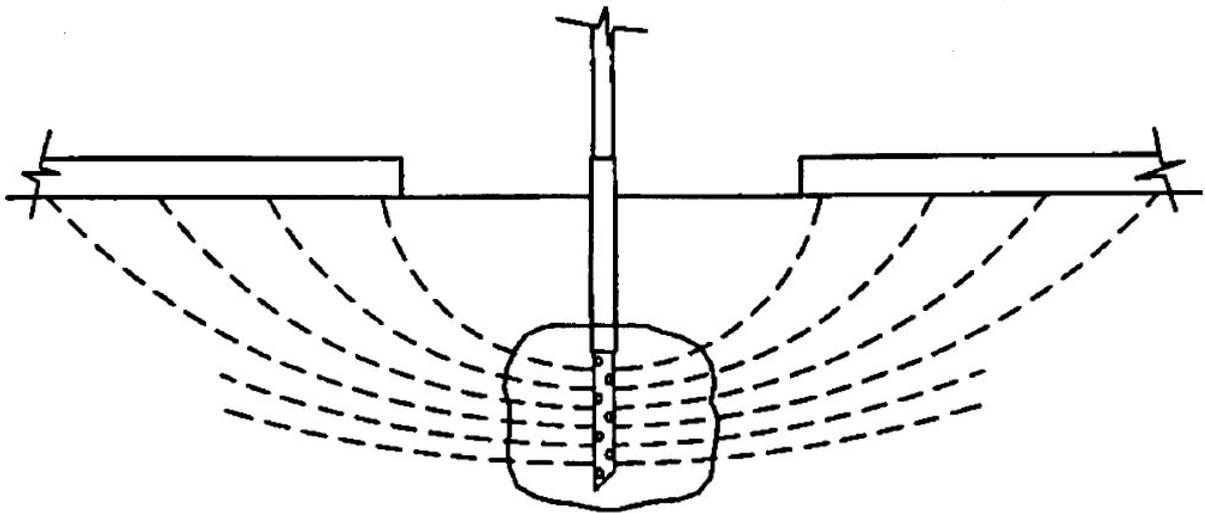
**Fig.5C**



**Fig.5D**



**Fig.6**



**Fig.7**

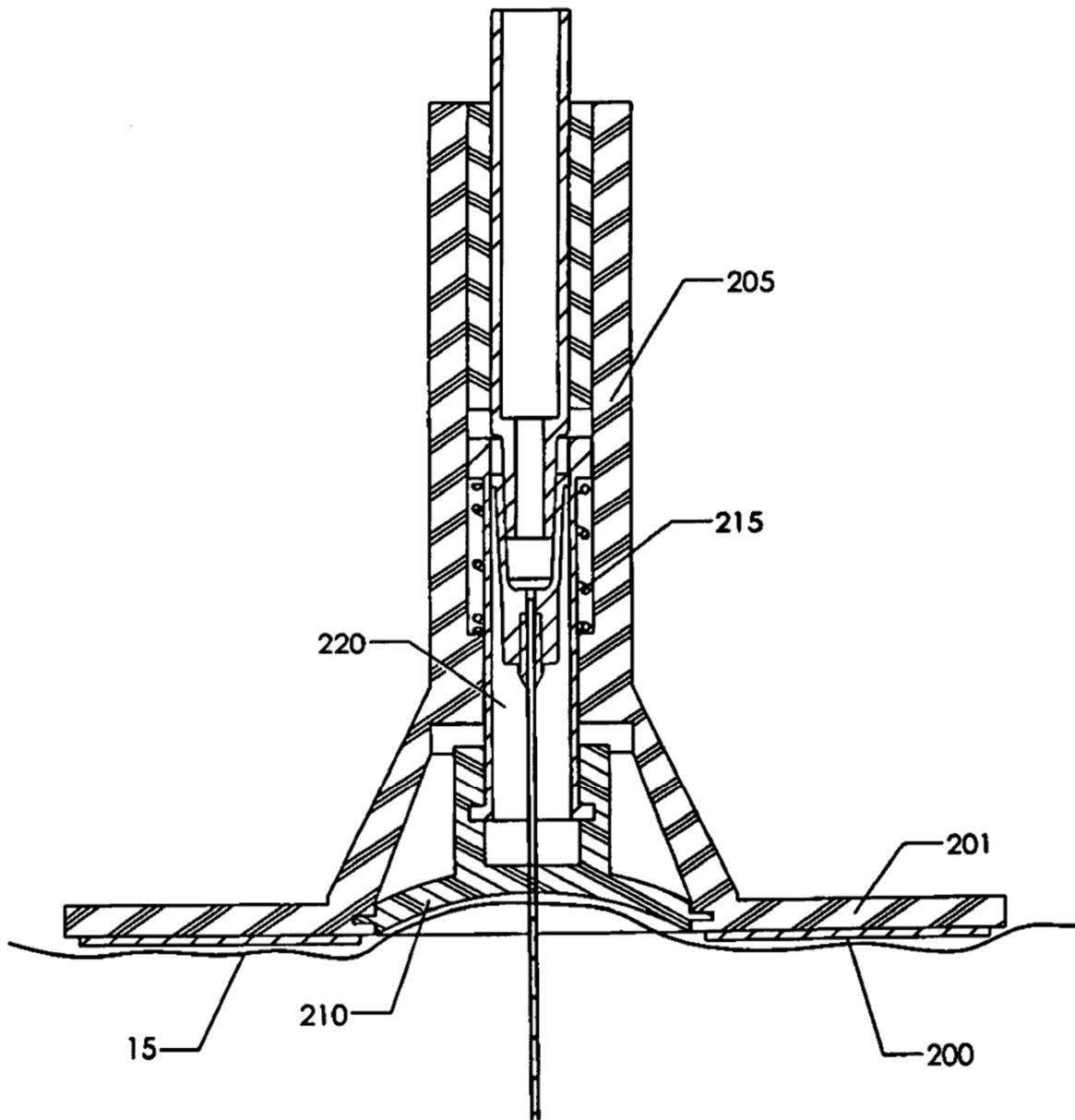
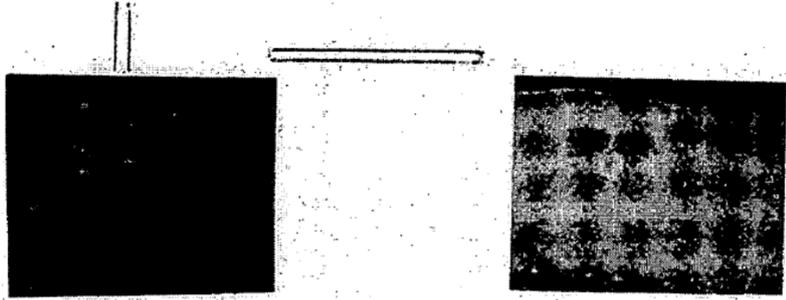


Fig.8

**Fig.9A**

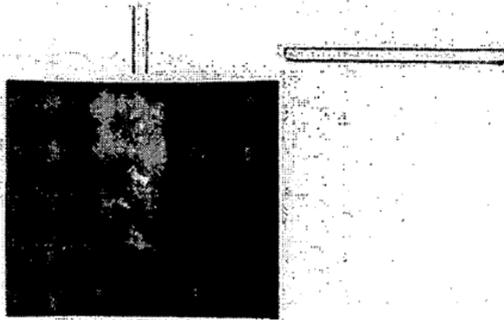
289mA  
64V



**Fig.9B**

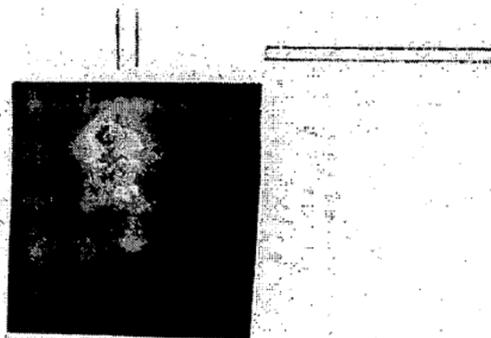
**Fig.9C**

384mA  
81v



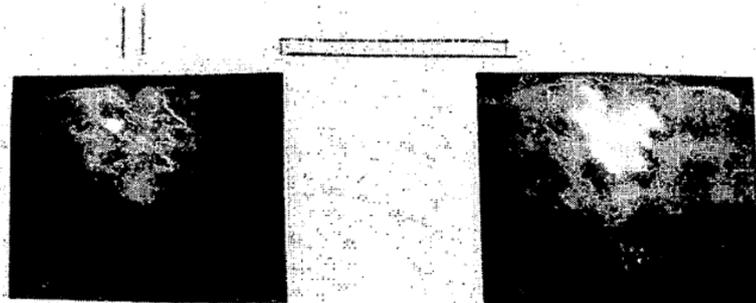
**Fig.9D**

579mA  
103v



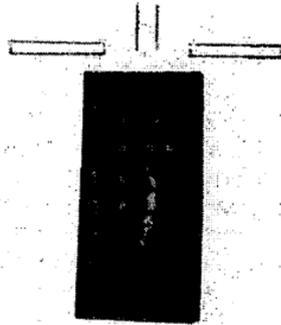
**Fig.9E**

758mA  
138v



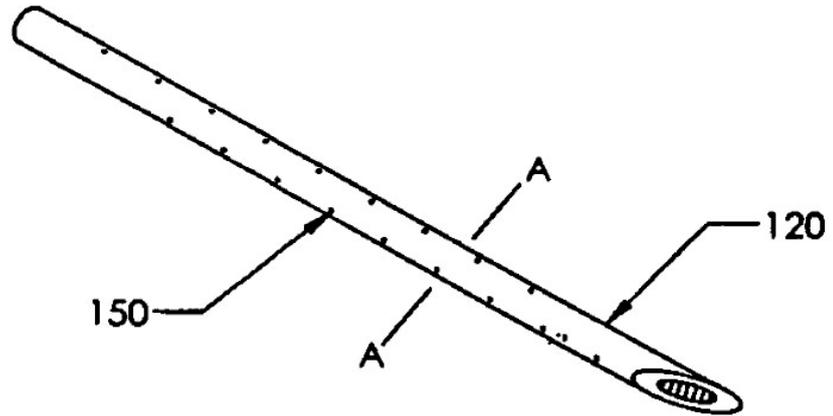
**Fig.9F**

**Fig. 10A**  
189mA  
58v

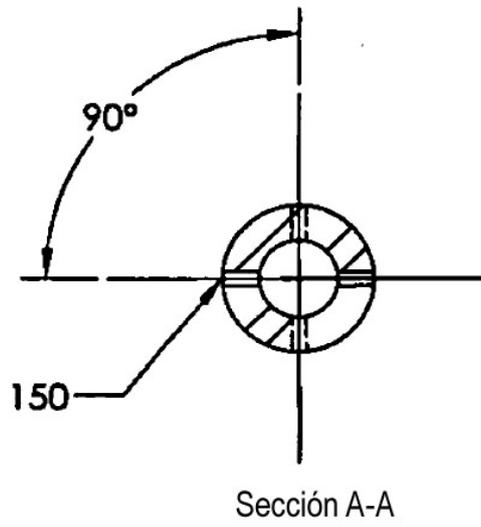


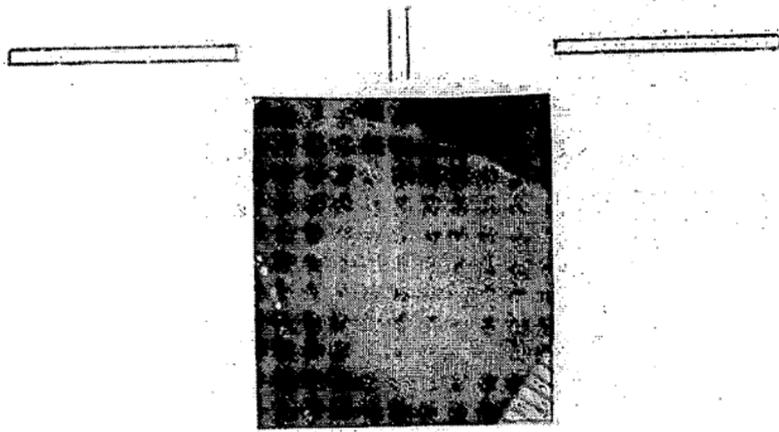
**Fig. 10B**

**Fig.11A**



**Fig.11B**





**Fig.12**

Figura 13A

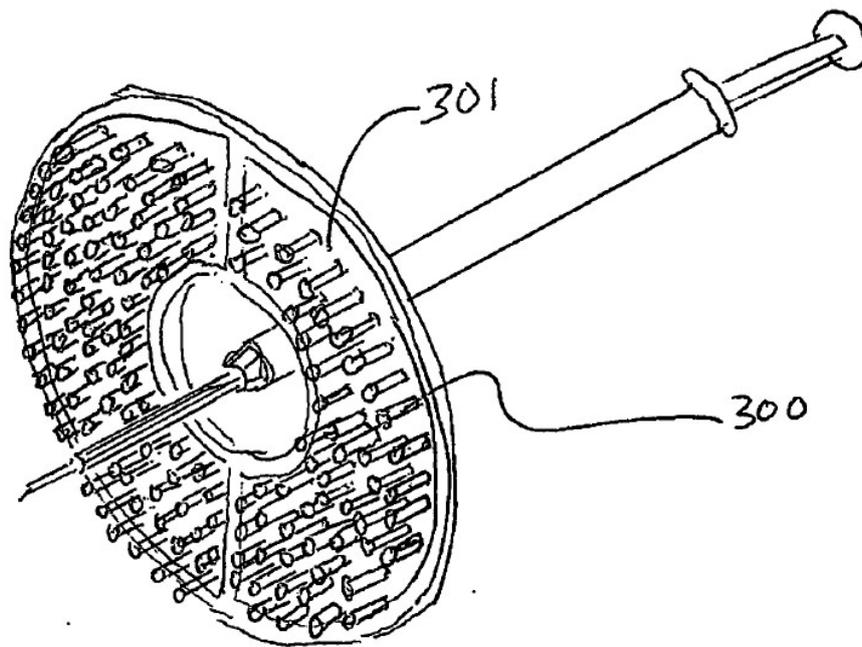


Figura 13B

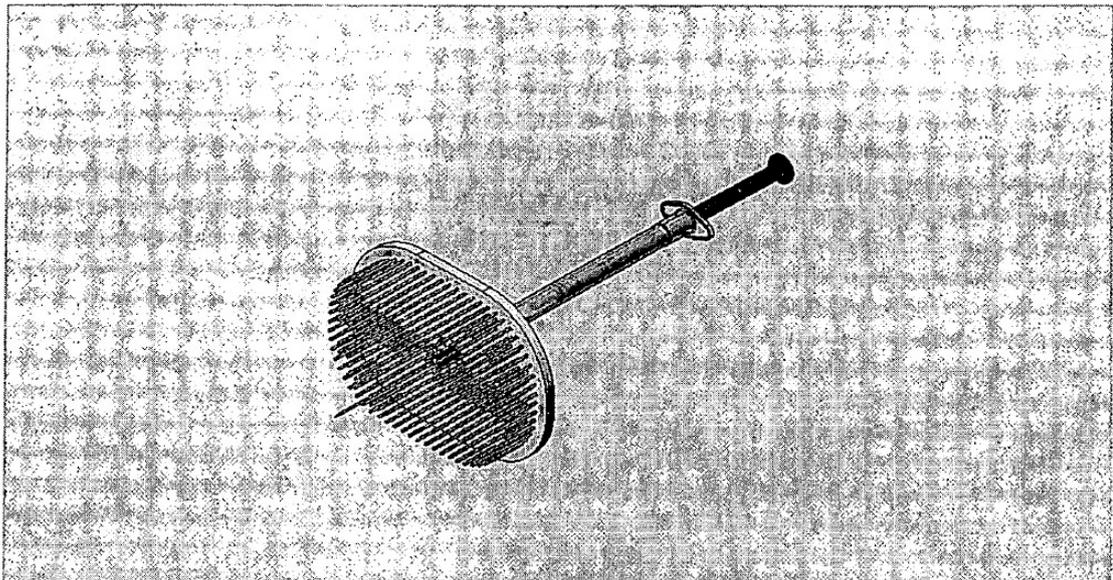


Figura 14A

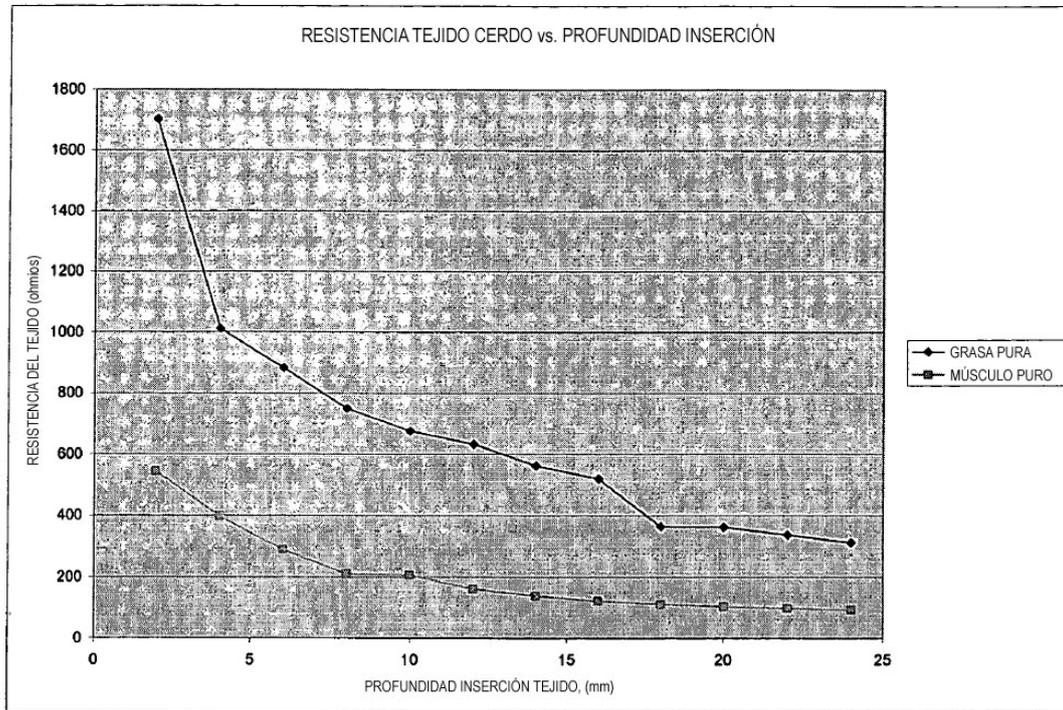


Figura 14B

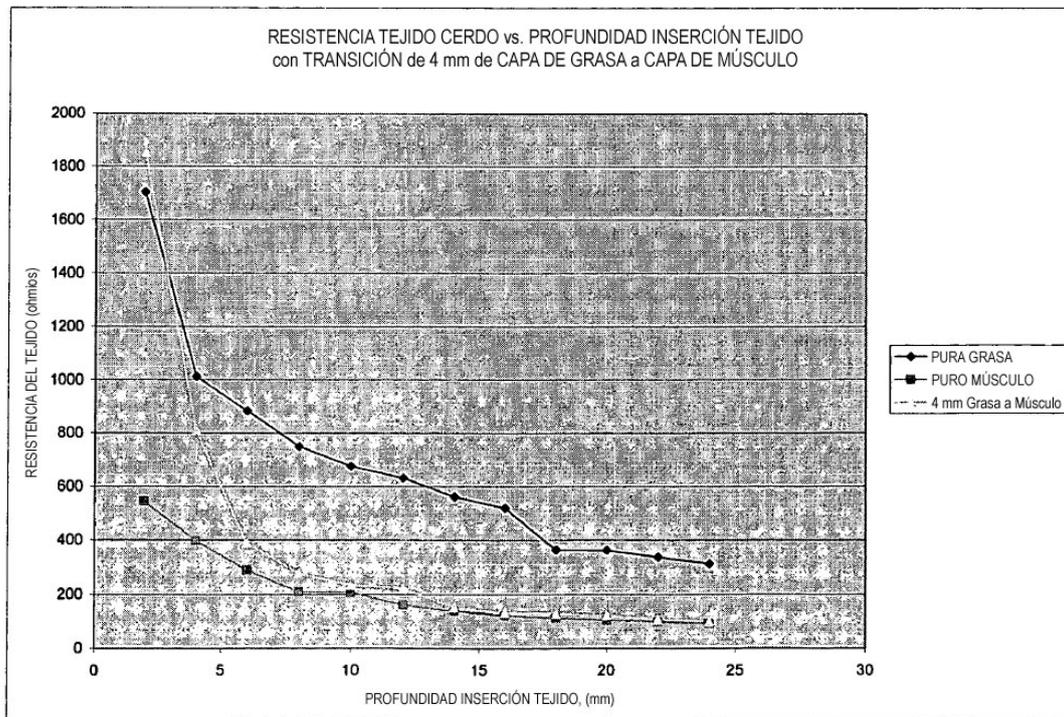


Figura 14C

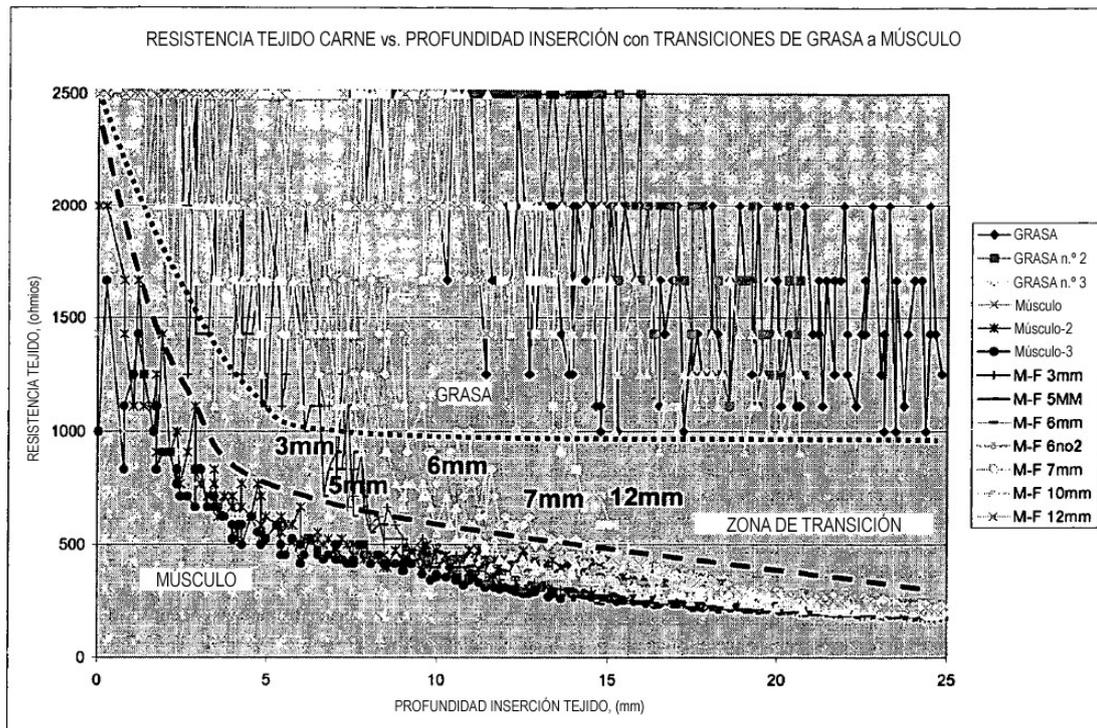


Fig. 15A

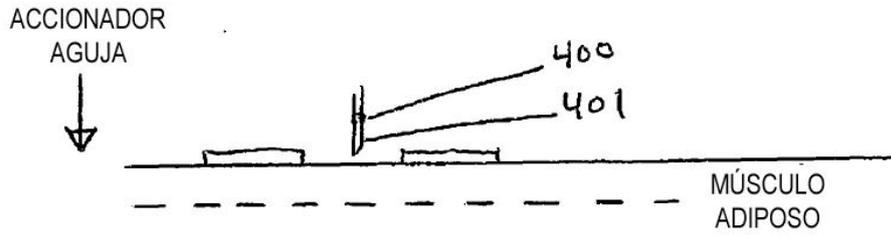


Fig. 15B

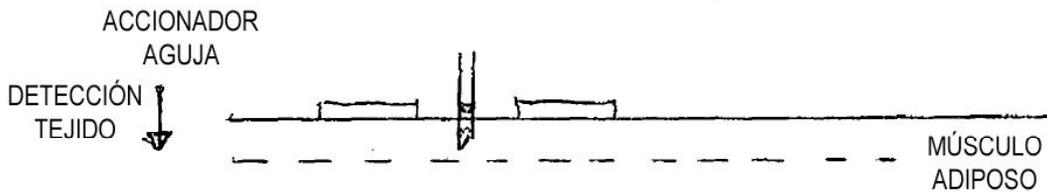


Fig. 15C

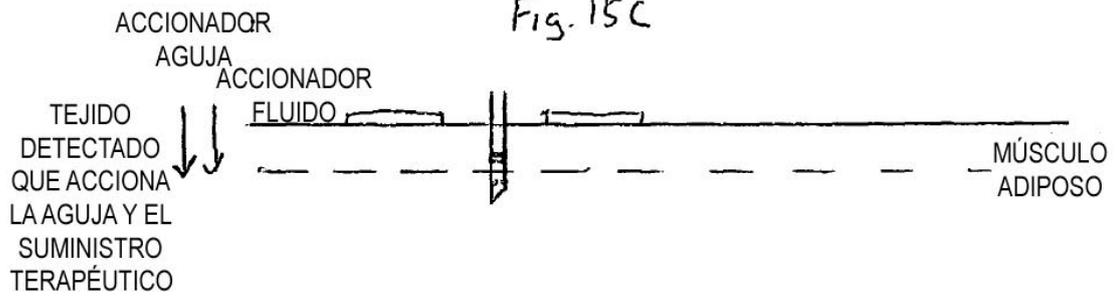


Fig. 15D

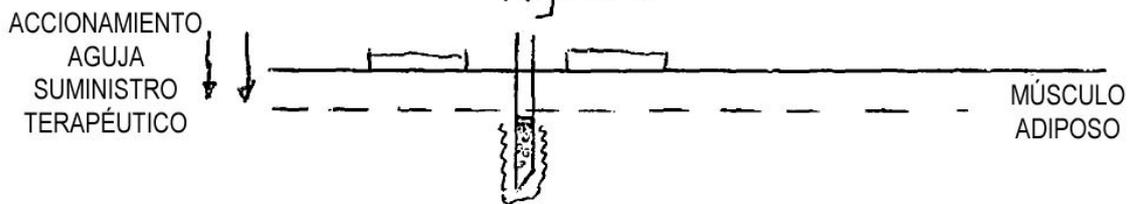


Figura 16

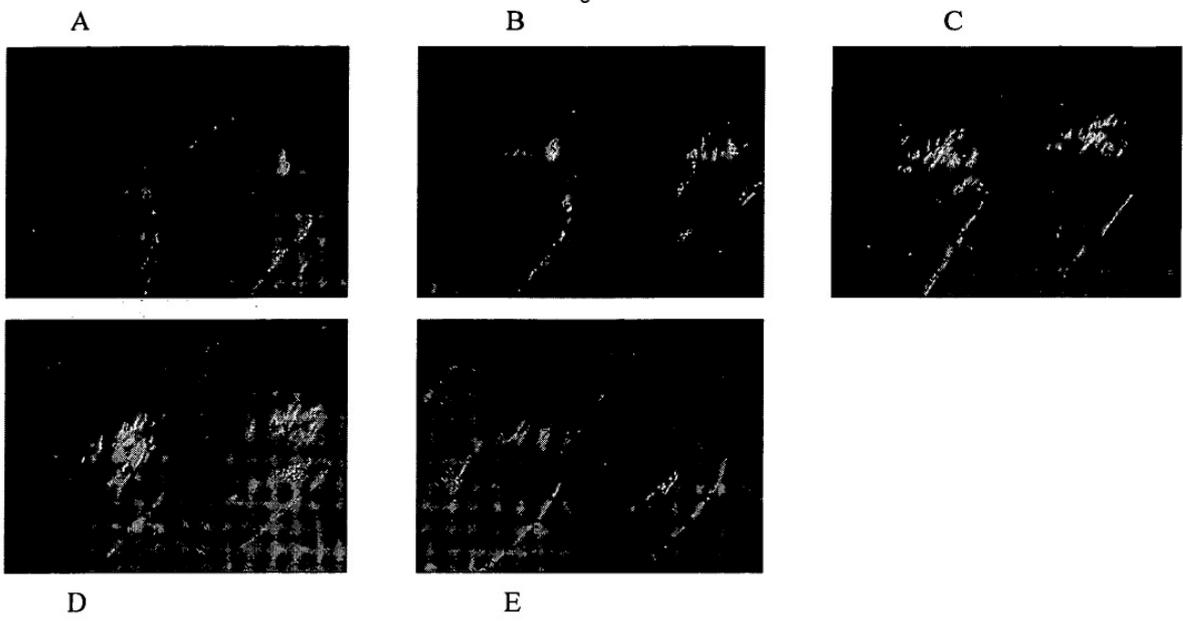


Figura 17A

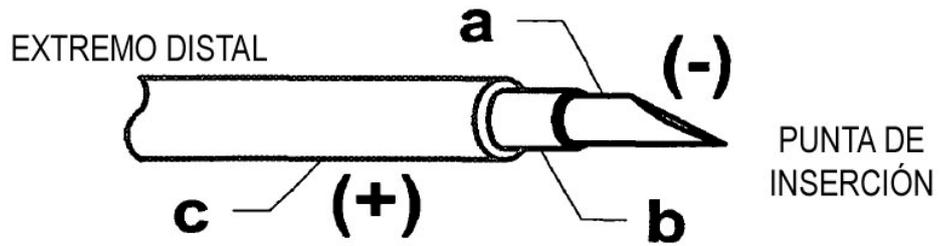


Figura 17B

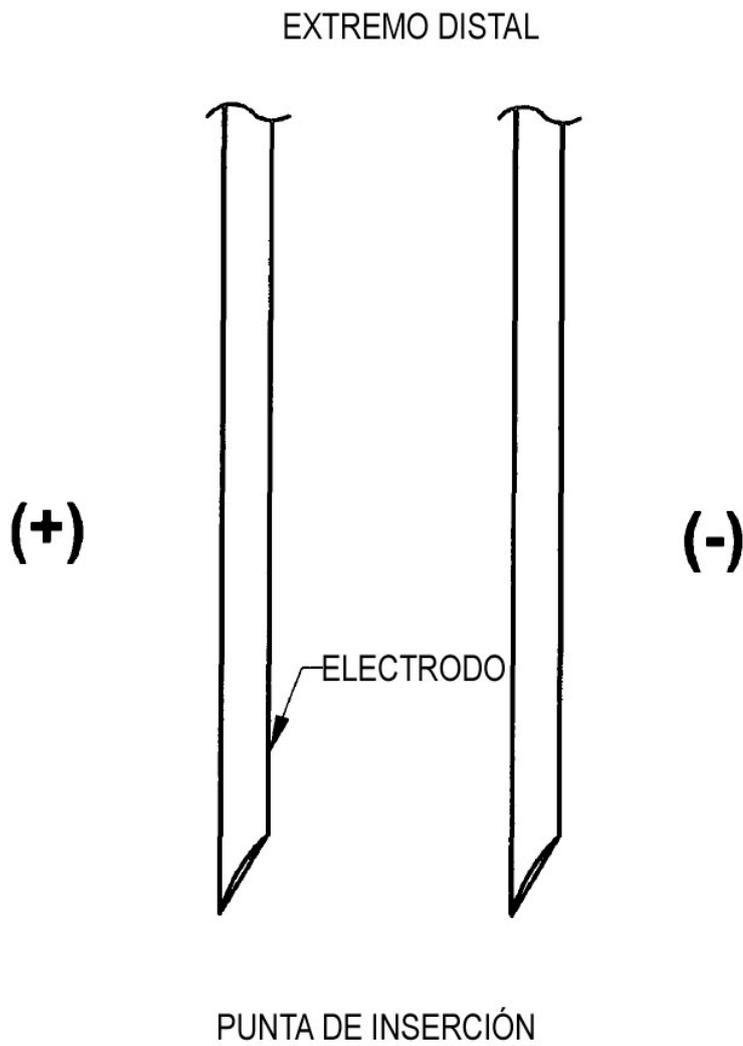


Figura 17C

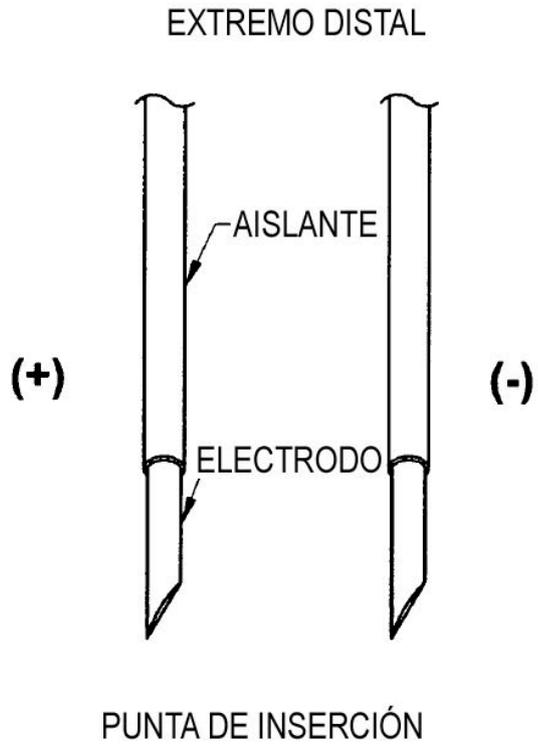


Figura 17D

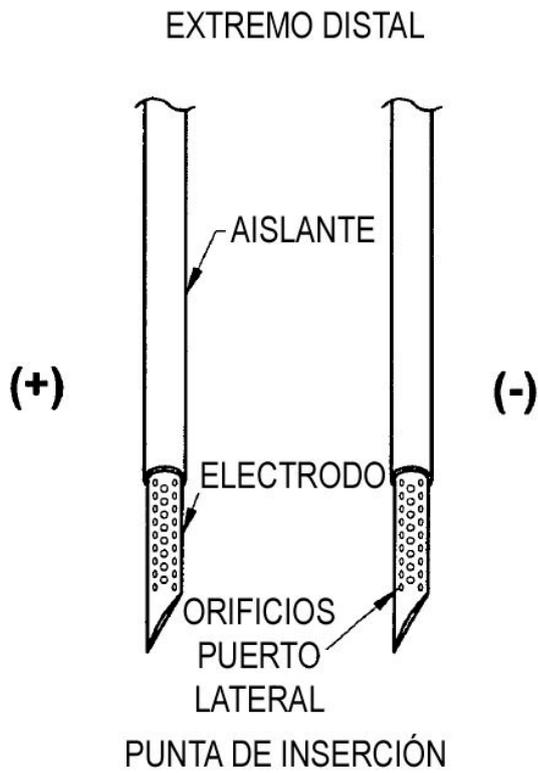


Figura 18A

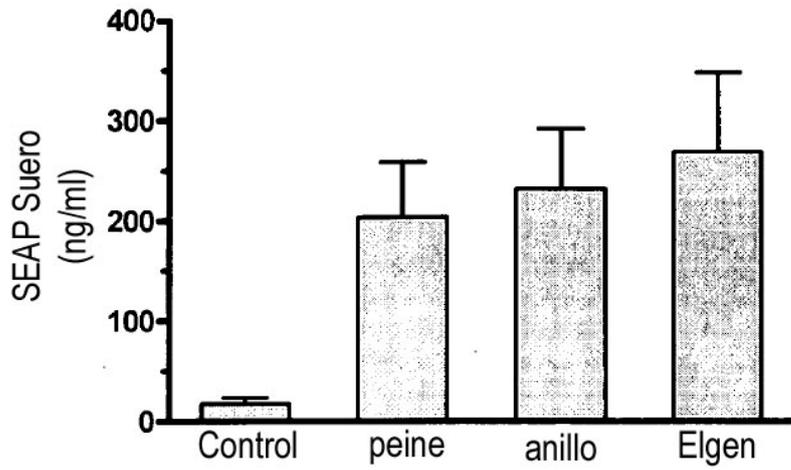


Figura 18B

