



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월08일

(11) 등록번호 10-2805022

(24) 등록일자 2025년05월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61N 1/32 (2006.01) **A61K 9/00** (2006.01)
A61M 37/00 (2006.01) **A61N 1/36** (2006.01)
A61N 1/40 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61N 1/327 (2013.01)
A61K 9/0009 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7009551(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2019년08월22일
 심사청구일자 2024년03월21일
- (85) 번역문제출일자 2024년03월21일
- (65) 공개번호 10-2024-0042240
- (43) 공개일자 2024년04월01일
- (62) 원출원 특허 10-2021-7008509
 원출원일자(국제) 2019년08월22일
 심사청구일자 2021년07월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2019/057091
- (87) 국제공개번호 WO 2020/039390
 국제공개일자 2020년02월27일
- (30) 우선권주장
 62/722,100 2018년08월23일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 US20140039489 A1*
 US7715921 B2*
 US20170281934 A1
 US09020605 B2
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 하계만, 카스텐
 독일 언테르플레이츠펠트 97294, 칼바도스트라
 세 12
 로르, 마리오
 독일 딜렌부르크 35685, 로렌스트라세 1
 (뒷면에 계속)
- (72) 발명자
 하계만, 카스텐
 독일 언테르플레이츠펠트 97294, 칼바도스트라
 세 12
 로르, 마리오
 독일 딜렌부르크 35685, 로렌스트라세 1
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 44 항

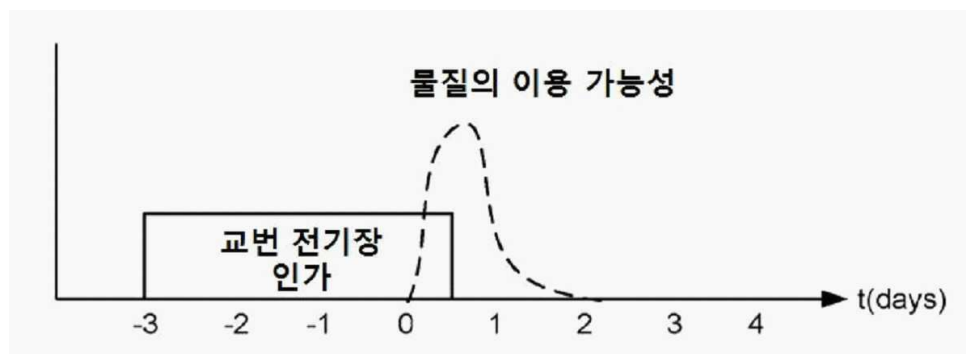
심사관 : 양성연

(54) 발명의 명칭 뇌-혈액 장벽 투과성을 향상시키기 위한 교번 전기장의 이용

(57) 요약

일반적으로 혈액 뇌 장벽을 통과할 수 없는 특정 물질(예 : 큰 분자)은 일정 기간 동안 뇌에 교류 전기장을 적용하여 뇌로 도입될 수 있으며, 여기서 교류 전기장의 주파수는 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시키도록 선택된다. 일부 실시예에서, 교류 전기장의 주파수는 190kHz 미만(예를 들어, 100kHz)이다. 혈액 뇌 장벽의 투과성이 증가하면 물질은 혈액 뇌 장벽을 통과할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61K 9/0085 (2013.01)
A61M 37/00 (2013.01)
A61N 1/325 (2013.01)
A61N 1/36002 (2017.08)
A61N 1/40 (2013.01)
A61M 2037/0007 (2013.01)
A61M 2202/0007 (2013.01)
A61M 2205/054 (2013.01)
A61M 2210/0693 (2013.01)

(73) 특허권자

케슬러, 알무스 에프.
 독일 라이헨베르크 97234, 위르츠가췌 17에이
부렉, 말고르자타
 독일 뷔르츠부르크 97074, 왈더-본-보겔웨이데-스
 트라췌 20
포스터, 캐롤라
 독일 뷔르츠부르크 97070, 플라트너스트라췌 6
브라미, 캐서린
 이스라엘 마탄 45858, 칼라니트 36
헤르슈코비치, 하다스
 이스라엘 키르야트 모츨킨 26137 하차슈모나임
 29/4
볼로신-셀라, 탈리
 이스라엘 킵부츠 지바트 3657900, 킵부츠 지바트
 스트.

(72) 발명자

케슬러, 알무스 에프.
 독일 라이헨베르크 97234, 위르츠가췌 17에이
부렉, 말고르자타
 독일 뷔르츠부르크 97074, 왈더-본-보겔웨이데-스
 트라췌 20
포스터, 캐롤라
 독일 뷔르츠부르크 97070, 플라트너스트라췌 6
브라미, 캐서린
 이스라엘 마탄 45858, 칼라니트 36
헤르슈코비치, 하다스
 이스라엘 키르야트 모츨킨 26137 하차슈모나임
 29/4
볼로신-셀라, 탈리
 이스라엘 킵부츠 지바트 3657900, 킵부츠 지바트
 스트.

명세서

청구범위

청구항 1

피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽(blood brain barrier, BBB)를 통과하여 물질을 전달하는 장치로, 상기 장치는:

제어 입력에 상응하여 시간 간격 동안 교류 전기장을 생성하는 교류 전압 생성기로, 교류 전기장의 제공은 상기 피험체의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시키고;

상기 교류 전압 생성기가 상기 시간 간격 동안 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제어 입력을 제공하도록 프로그래밍된 제어기;를 포함하며,

상기 시간 간격 도과 후 상기 물질이 투여된 상기 피험체에서, 상기 혈액 뇌 장벽의 향상된 투과성이 상기 물질을 상기 혈액 뇌 장벽을 통과하게 하는 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 교류 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공되는 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 시간 간격은 적어도 24시간인 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 시간 간격은 적어도 48시간인 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 교류 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가지는 장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 교류 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공되고, 상기 시간 간격은 적어도 24 시간이고, 상기 교류 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가지는 장치.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 물질은 상기 피험체의 정맥으로 투여되는 장치.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 물질은 상기 피험체 경구로 투여되는 장치.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 피험체의 뇌는 종양이 없는(tumor-free) 장치.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 물질은 질병을 치료하기 위한 약을 포함하는 장치.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 약은 암 치료제, 전염성 질병 치료제, 신경퇴행성 질병 치료제, 자가면역 질환 치료제, 항간질 약제, 뇌수종 약제, 뇌졸중 개입 약제 또는 정신과 약인 장치.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 물질은 뇌 활동 모니터링에 사용되는 장치.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 물질은 뇌 염색제, 리포터 또는 마커인 장치.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 제어기는,

상기 혈액 뇌 장벽이 복원되도록

상기 교류 전압 생성기가 상기 교류 전기장의 생성을 중단하도록 상기 제어 입력을 상기 교류 전압 생성기에 제공하도록 더 프로그램된 장치.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 적어도 4 kDa의 분자량을 가지는 장치.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 적어도 69 kDa의 분자량을 가지는 장치.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 비투과성 혈액 뇌 장벽을 투과하는 것을 방해하는 적어도 하나의 특성을 가지는 장치.

청구항 18

피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽(blood brain barrier, BBB)을 통과하여 물질을 전달하는 장치로, 상기 장치는:

제어 입력에 반응하여 시간 간격 동안 제1 주파수의 교류 전기장을 생성하는 교류 전압 생성기로, 상기 제1 주파수는 190 kHz 미만이고 상기 시간의 간격은 적어도 24시간이며, 상기 시간 간격동안 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교류 전기장을 인가하여 상기 피험체 뇌의 상기 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시키고;

상기 교류 전압 생성기가 상기 시간 간격 동안 상기 제1 주파수의 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제어 입력을 제공하도록 프로그램된 제어기;를 포함하며

상기 시간 간격 도과 후 상기 물질이 투여된 상기 피험체에서, 상기 혈액 뇌 장벽의 향상된 투과성이 상기 물질을 상기 혈액 뇌 장벽을 통과하게 하는 장치.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 제1 주파수는 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수인 장치.

청구항 20

제18항에 있어서,

상기 시간 간격은 적어도 48시간인 장치.

청구항 21

제18항에 있어서,

상기 교류 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가지는 장치.

청구항 22

제18항에 있어서,

상기 교류 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공되고, 상기 교류 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가지는 장치.

청구항 23

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 적어도 4 kDa의 분자량을 가지는 장치.

청구항 24

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 적어도 69 kDa의 분자량을 가지는 장치.

청구항 25

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 비투과성 혈액 뇌 장벽을 투과하는 것을 방해하는 적어도 하나의 특성을 가지는 장치.

청구항 26

피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽(blood brain barrier, BBB)를 통과하여 물질을 전달하는 장치로, 상기 장치는:

제어 입력에 반응하여 시간 간격 동안 교류 전기장을 생성하는 교류 전압 생성기로, 상기 피험체의 뇌는 종양이 없고(tumor-free), 상기 시간 간격 동안 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교류 전기장을 인가하여 상기 피험체의 뇌의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시키고;

상기 교류 전압 생성기가 상기 시간 간격 동안 상기 제1 주파수의 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제어 입력을 제공하도록 프로그램된 제어기;를 포함하며

상기 시간 간격 도과 후 상기 물질이 투여된 상기 피험체에서, 상기 혈액 뇌 장벽의 향상된 투과성이 상기 물질을 상기 혈액 뇌 장벽을 통과하게 하는 장치.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 교류 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공되는 장치.

청구항 28

제26항에 있어서,

상기 시간 간격은 적어도 24시간인 장치.

청구항 29

제26항에 있어서,

상기 시간 간격은 적어도 48시간인 장치.

청구항 30

제26항에 있어서,

상기 교류 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가지는 장치.

청구항 31

제26항에 있어서,

상기 교류 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공되고, 상기 시간 간격은 적어도 24 시간이고, 상기 교류 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가지는 장치.

청구항 32

제26항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 적어도 4 kDa의 분자량을 가지는 장치.

청구항 33

제26항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 적어도 69 kDa의 분자량을 가지는 장치.

청구항 34

제26항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 비투과성 혈액 뇌 장벽을 투과하는 것을 방해하는 적어도 하나의 특성을 가지는 장치.

청구항 35

피험체 뇌의 종양을 치료하고, 상기 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽을 통과하여 물질을 전달하는 장치로, 상기 장치는:

교류 전압 생성기를 포함하며, 교류 전압 생성기는:

입력된 제어 신호에 상응하여 제1 시간 간격 동안 상기 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교류 전기장을 인가하여 상기 피험체의 뇌의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시키고,

적어도 1 주 이상인 제2 시간 간격 동안 상기 피험체의 뇌에 제2 주파수의 교류 전기장을 인가하며, 상기 제2 주파수는 상기 제1 주파수와 상이하고, 상기 제2 주파수의 제2 교류 전기장은 상기 종양을 억제하기에 충분히 큰 강도를 가지며;

상기 교류 전압 생성기가 상기 제1 시간 간격 동안 상기 제1 주파수의 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제

어 입력을 제공하고, 상기 제2 시간 간격 동안 상기 제2 주파수의 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제어 입력을 제공하도록 프로그램된 제어기를 포함하는 장치.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 제1 주파수는 75kHz 및 125kHz 사이인 장치.

청구항 37

제35항에 있어서,

상기 제1 주파수는 50kHz 및 190kHz 사이인 장치.

청구항 38

제37항에 있어서,

상기 제2 주파수는 190kHz 및 210 kHz 사이인 장치.

청구항 39

제35항에 있어서,

상기 제1 시간 간격은 적어도 24시간인 장치.

청구항 40

제35항에 있어서,

상기 제2 시간 간격은 단일하고 중단되지 않은 적어도 한 주의 시간을 포함하는 장치.

청구항 41

제35항에 있어서,

상기 제2 시간 간격은 제2 주파수의 제2 교류 전기장이 상기 피험체의 뇌에 제공되는 복수의 비연속적인 시간 간격을 포함하며, 상기 복수의 비연속적인 시간 간격은 도합하여 적어도 1주인 장치.

청구항 42

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 적어도 4 kDa의 분자량을 가지는 장치.

청구항 43

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 적어도 69 kDa의 분자량을 가지는 장치.

청구항 44

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 물질은 비투과성 혈액 뇌 장벽을 투과하는 것을 방해하는 적어도 하나의 특성을 가지는 장치.

발명의 설명

기술 분야

본 기술은 뇌-혈액 장벽 투과성을 향상시키기 위한 교번 전기장의 이용기술과 관련된다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 일반적으로 대뇌 미세 혈관은 혈액과 뇌 조직 사이의 물질 전달을 엄격하게 조절한다. 대뇌 미세 혈관에 의한 이러한 조절을 혈액-뇌 장벽 (BBB)이라고 하며 뇌 모세 혈관 내피 세포 사이에 형성되는 세포 간 밀착 접합(TJ)에 기인한다. 대뇌 모세 혈관에서 TJ 단백질은 말초 미세 혈관보다 50-100 배 더 많이 발현된다. TJ는 세포질 보조 단백질(ZO-1 및 -2, cingulin, AF-6 및 7H6)과 막 횡단 단백질(claudin 및 occludin)의 복잡한 복합체에 의해 형성된다. 액틴 세포 골격에 연결함으로써 이러한 단백질은 강력한 세포-세포 연결을 형성한다. 대뇌 미세 혈관의 내피를 형성하는 뇌 내피 세포는 물질에 대한 BBB의 저항성의 약 75-80 %를 담당하며, 정상 세포 및 주변 세포와 같은 다른 세포는 나머지 저항을 제공한다.
- [0003] BBB는 모세 혈관 주변의 밀착 접합으로 구성되어 있으며, 일반적으로 미세한 물체와 큰 또는 친수성 분자가 뇌로 확산되는 것을 제한하는 동시에 소수성 분자의 확산을 허용한다 (세포 주위 수송 대신 세포 간 이동).

선행기술문헌

특허문헌

- [0004] (특허문헌 0001) 선행문헌 1: 미국 특허공보 US9020605(2015.04.28.)
- (특허문헌 0002) 선행문헌 2: 미국 특허공보 US7715921(2010.05.11.)
- (특허문헌 0003) 선행문헌 3: 미국 특허출원공개공보 US2017/0281934호(2017.10.05.)
- (특허문헌 0004) 선행문헌 4: 미국 특허출원공개공보 US2002/0182591호(2002.12.05.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 건강한 사람에게 BBB는 해로운 물질 (예 : 박테리아, 바이러스 및 잠재적으로 해로운 거대 또는 친수성 분자)이 뇌로 들어가는 것을 방지하기 때문에 매우 중요한 기능을 한다. 그러나 BBB의 행동이 어려움을 초래하는 상황이 있다. 예를 들어, 환자의 뇌 질환을 치료하기 위해 크거나 친수성인 약물 분자를 전달하는 것이 바람직 할 수 있다. 그러나 BBB가 정상적으로 작동할 때 이러한 약물은 BBB에 의해 뇌로 들어가는 것을 차단한다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명의 어느 한 측면은 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽(blood brain barrier, BBB)를 통과하여 물질을 전달하는 제1 방법과 관련된다. 제1 방법에서 관련 물질은 시간 간격동안 피험체 뇌에 교번 전기장을 인가하여 혈액 뇌 장벽을 건너 제공될 수 있다. 시간 간격동안 피험체의 뇌에 교번 전기장을 인가하는 것은 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시킨다. 물질은 시간 간격이 도과한 후 투여되고, 혈액 뇌 장벽의 향상된 투과성은 혈액 뇌 장벽을 투과하도록 한다.
- [0007] 제1 방법의 몇몇 예에서, 교번 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공된다. 제1 방법의 몇몇 예에서, 시간 간격은 적어도 24시간이다. 제1 방법의 몇몇 예에서, 시간 간격은 적어도 48시간이다. 제1 방법의 몇몇 예에서, 교번 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가진다. 제1 방법의 몇몇 예에서, 교번 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공되고, 시간 간격은 적어도 24 시간이고, 교번 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가진다.
- [0008] 제1 방법의 몇몇 예에서, 물질을 투여하는 단계는 정맥으로 투여된다. 제1 방법의 몇몇 예에서, 물질을 투여하는 단계는 경구로 투여된다. 제1 방법의 몇몇 예에서, 피험체의 뇌는 종양이 없다(tumor-free).
- [0009] 제1 방법의 몇몇 예에서, 물질은 질병을 치료하기 위한 약을 포함한다. 이러한 물질의 일 예로는 암 치료제, 전염성 질병 치료제, 신경퇴행성 질병 치료제, 자가면역 질환 치료제, 항간질 약제, 뇌수종 약제, 뇌졸중 개입 약제 또는 정신과 약이다. 제1 방법의 몇몇 예에서, 물질은 뇌 활동 모니터링에 사용된다. 이러한 물질의 일 예로는 뇌 염색제, 리포터 또는 마커를 포함한다.

- [0010] 상술한 제1 방법의 예들에서, 혈액 뇌 장벽이 복원되도록 상기 교번 전기장의 적용을 중단하는 단계가 더 수행된다.
- [0011] 본 발명의 다른 한 측면은 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽(blood brain barrier, BBB)를 통과하여 물질을 전달하는 제2 방법과 관련된다. 제2 방법에서 관련 물질은 시간 간격동안 피험체 뇌에 교번 전기장을 인가하여 혈액 뇌 장벽을 건너 제공될 수 있고, 제1 주파수는 190 kHz 미만이고 시간의 간격은 적어도 24시간이며, 상기 시간 간격동안 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교번 전기장을 인가하여 상기 피험체 뇌의 상기 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시킨다. 시간 간격 경과 후 물질이 투여되고, 혈액 뇌 장벽의 향상된 상기 투과성은 상기 물질이 상기 혈액 뇌 장벽을 통과하도록 한다.
- [0012] 제2 방법의 몇몇 예에서, 상기 교번 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공된다. 제2 방법의 몇몇 예에서, 시간 간격은 적어도 48시간이다. 제2 방법의 몇몇 예에서, 교번 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가진다. 제2 방법의 몇몇 예에서, 교번 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공되고, 상기 교번 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가진다.
- [0013] 상술한 제2 방법의 예들에서, 상기 혈액 뇌 장벽이 복원되도록 상기 교번 전기장의 적용을 중단하는 단계가 더 수행될 수 있다.
- [0014] 설명된 방법은 종양이 없는 피험체의 혈액 뇌 장벽을 투과하여 물질을 전달하도록 사용될 수 있다. 이러한 경우에, 본 발명의 다른 측면은 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽을 투과하여 물질을 전달하는 제3 방법과 관련된다. 제3 방법에서, 시간 간격동안 종양이 없는 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교번 전기장을 인가하여 관련 물질이 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽을 투과하여 전달될 수 있다. 시간 간격동안 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교번 전기장을 인가하여 상기 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시킨다. 시간 간격동안 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교번 전기장을 제공하여 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시킨다. 시간 간격 도과 후, 물질이 투여되고, 시간 간격 도과 후 물질이 투여되고, 혈액 뇌 장벽의 향상된 투과성은 혈액 뇌 장벽을 투과하도록 한다.
- [0015] 제3 방법의 몇몇 예에서, 교번 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공된다. 제3 방법의 몇몇 예에서, 시간 간격은 적어도 24시간이다. 제3 방법의 몇몇 예에서, 시간 간격은 적어도 48시간이다. 제3 방법의 몇몇 예에서, 교번 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가진다. 제3 방법의 몇몇 예에서, 교번 전기장은 75kHz 및 125kHz 사이의 주파수로 제공되고, 시간 간격은 적어도 24 시간이고, 상기 교번 전기장은 상기 피험체 뇌의 적어도 일 부분에서 적어도 1 V/cm의 장 세기(field strength)를 가진다.
- [0016] 상술한 제3 방법의 예들에서, 혈액 뇌 장벽이 복원되도록 상기 교번 전기장의 적용을 중단하는 단계가 더 수행된다.
- [0017] 여기껏 설명된 방법들은 뇌 종양을 가진 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽을 투과하여 물질을 전달하는데 사용될 수 있다. 이러한 경우, 본 발명의 또다른 측면은 피험체 뇌의 종양을 치료하고, 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽을 통과하여 물질을 전달하는 제4 방법과 관련된다. 제4 방법에서, 제1 시간 간격동안 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교번 전기장을 인가한다. 시간 간격동안 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교번 전기장을 인가하여 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시킨다. 시간 간격 도과 후 물질을 투여하며, 혈액 뇌 장벽의 향상된 투과성은 물질이 혈액 뇌 장벽을 투과하게 한다. 적어도 1 주 이상인 제2 시간 간격 동안 피험체의 뇌에 제2 주파수의 제2 교번 전기장을 인가한다. 제2 주파수는 제1 주파수와 상이하고, 상기 제2 주파수의 제2 교번 전기장은 상기 종양을 억제하기 위해 충분히 큰 강도를 가진다.
- [0018] 제4 방법의 몇몇 예에서, 제1 주파수는 75kHz 및 125kHz 사이이다. 제4 방법의 몇몇 예에서, 제1 주파수는 50kHz 및 190kHz 사이이다. 몇몇 예에서, 제2 주파수는 190kHz 및 210 사이이다.
- [0019] 제4 방법의 몇몇 예에서, 제1 시간 간격은 적어도 24시간이다. 제4 방법의 몇몇 예에서, 제2 시간 간격은 단일한 중단되지 않은 적어도 한 주의 시간을 포함한다. 제4 방법의 다른 몇몇 예에서, 제2 시간 간격은 제2 주파수의 제2 교번 전기장이 피험체의 뇌에 제공되는 복수의 비연속적인 시간 간격을 포함하며, 복수의 비연속적인 시간 간격은 도합하여 적어도 1주이다.
- [0020] 상술한 제4 방법의 예들에서, 혈액 뇌 장벽이 복원되도록 교번 전기장의 적용을 중단하는 단계가 더 수행된다.
- [0021] 몇몇 예에서, 상술한 각 방법들은 적어도 4 kDa의 분자량을 가지는 물질을 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽을 투과하

여 전달하도록 사용된다.

- [0022] 몇몇 예에서, 상술한 각 방법들은 적어도 69 kDa의 분자량을 가지는 물질을 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽을 투과하여 전달하도록 사용된다.
- [0023] 몇몇 예에서, 상술한 각 방법들은 비투과성 BBB를 투과하는 것을 방해하는 적어도 하나의 특성을 물질을 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽을 투과하여 전달하도록 사용된다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 측면은 피험체 신체 내의 종양을 치료하고, 피험체 신체 내의 혈액 뇌 장벽을 투과하여 물질 전달을 촉진하는 제1 장치와 관련된다. 제1 장치는 50 및 190 kHz 사이의 제1 주파수 및 50 및 500 kHz 사이의 제2 주파수 사이에서 동작할 수 있는 AC 전압 생성기를 포함한다. 제2 주파수는 상기 제1 주파수와 상이하다. AC 전압 생성기는 제어 입력을 가지고, AC 전압 생성기는 제어 입력이 제1 상태일 때 제1 주파수를 출력하고, 제어 입력이 제2 상태일 때 상기 제2 주파수를 출력한다. 제1 장치는 (a) AC 전압 생성기가 제2 주파수를 출력하도록 상기 제어 입력을 상기 제2 상태로 형성하고, (b) 제1 주파수로의 전환 요청을 수신하며, (c) 요청 수신 시, AC 전압 생성기가 시간 구간동안 제1 주파수를 출력하도록 제어 입력을 제1 상태로 형성하고, 그리고 (d) 시간 구간 도과후, AC 전압 생성기가 제2 주파수를 출력하도록 제어 입력을 상기 제2 상태로 형성하도록 프로그램된 제어기를 포함한다.
- [0025] 제1 장치의 몇몇 예는 피험체의 신체에 고정되는 전극들의 세트 및 전극들의 세트들과 상기 AC 전압 생성기의 출력을 연결하는 배선을 더 포함한다.
- [0026] 제1 장치의 몇몇 예에서, 제1 주파수는 75kHz 및 125kHz 사이이고, 제2 주파수는 150kHz 및 250kHz 사이이다. 제1 장치의 몇몇 예에서, 시간 간격은 적어도 24시간이다. 제1 장치의 몇몇 예에서, 시간 간격은 적어도 72시간이다. 제1 장치의 몇몇 예에서, 제어기는, 요청 수신 후, 상기 제어 입력을 제1 상태 및 제2 상태 사이에서 전후로 전환하도록 더 프로그램된다.
- [0027] 제1 장치의 몇몇 예에서, AC 전압 생성기는 50 및 500 kHz 사이의 적어도 하나의 추가 주파수에서 동작할 수 있고, AC 전압 생성기는 제어 입력이 적어도 하나의 추가 상태에 있을 때 상기 적어도 하나의 추가 주파수를 출력하고, 상기 제어기는 요청을 수신하기 전에 제2 상태 및 적어도 하나의 추가 상태를 거쳐 제어 입력을 순환시키고, 시간 간격 후에 제 2 상태 및 적어도 하나의 추가 상태를 통해 제어 입력을 순환하도록 프로그래밍된다.
- [0028] 제1 장치의 몇몇 예에서, 장치는 사용자 인터페이스를 더 포함하며, 요청은 상기 사용자 인터페이스를 통해 수신된다. 제1 장치의 몇몇 예에서, 요청은 RF를 통해 수신된다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에 의하면, 교번 전기장을 사용하여 피험체의 혈액 뇌 장벽을 투과하여 물질을 제공할 수 있다는 장점이 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 BBB의 인공 시험관 버전을 생성하기 위해 커버 슬립 및 트랜스 웰 삽입물에서 이모탈라이즈(imortalize)된 뮤린 뇌 모세 혈관 내피 세포(cerebEND)를 성장시킨 시험관 내 실험에 대한 예시적인 설정을 도시한 도면이다.
- 도 2(a) 및 도 2(b)는 인공 BBB에 대한 무결성 및 투과성 테스트의 결과를 각각 묘사한 도면이다.
- 도 3(a) 및 도 3(b)는 인공 BBB의 증가 된 투과성이 세포 사멸로 인한 것이 아니라는 것을 보여주는 데이터를 도시한다.
- 도 4는 생체 내 실험을 위해 랫(rat)의 뇌가 절단된 위치를 묘사한 도면이다.
- 도 5는 랫 뇌의 다른 섹션에서 이 생체 내 실험에 대한 EB 축적을 묘사한 도면이다.
- 도 6은 이 생체 내 실험에 대한 래트 뇌에서의 평균 EB 축적을 모든 섹션에 걸쳐 평균화 한 것을 도시한 도면이다.
- 도 7은 대조 강화 MRI를 사용하여 결정된 바와 같이 생체 내에서 전기장을 번갈아 가며 유도된 랫 뇌의 세 가지 다른 섹션에서 BBB 투과성의 증가를 묘사한 도면이다.

도 8은 조영 증강 MRI를 사용하여 결정된 바와 같이 생체 내에서 전기장을 번갈아 가며 유도된 랫 피질(cortex)에서 BBB 투과성의 증가를 도시한 도면이다.

도 9는 교번 전기장의 적용과 대상에게 물질의 투여 사이의 적절한 타이밍 관계를 묘사한 도면이다.

도 10은 BBB 투과성을 유도하기 위한 제1 주파수 및 세포 독성을 유도하기 위한 제2 주파수를 생성하는 이중 주파수 장치의 블록 다이어그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 출원은 2018년 8월 23일에 출원된 미국 가출원 62/722,100의 혜택을 주장하며, 이는 그 전체가 여기에 참조로 포함된다.
- [0032] 본 출원은 BBB에 의해 일반적으로 차단되는 물질이 BBB를 통과할 수 있도록 교류 전기장을 사용하여 BBB의 투과성을 일시적으로 증가시키는 새로운 접근 방식을 설명한다.
- [0033] 이모털라이즈(imortalize)된 쥐 뇌 모세 혈관 내피 세포(cerebEND)를 커버 슬립 및 트랜스웰 삽입물에서 성장시켜 BBB의 인공 시험관 버전을 생성하는 일련의 시험관 내 실험을 실행했으며, 도 1은 이러한 실험에 대한 설정을 도시한다. 이어서 세포를 24 시간, 48 시간 및 72 시간 동안 교번 전기장(100-300kHz)으로 처리하였다. 교번 전기장의 방향은 2 개의 수직 방향 사이에서 1 초마다 전환되었다(즉, 반복되는 순서로 한 방향으로 1 초, 다른 방향으로 1 초). 다음 효과들이 분석되었다: (a) 세포 형태 (밀착 접합 단백질 Claudin 5 및 ZO-1의 면역 형광 염색); (b) BBB 완전성(경내피 전기 저항(TEER) 사용); 및 (c) BBB 투과성 (유세포 분석을 위해 텍스트란(FITC)에 결합된 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluoresceine isothiocyanate) 사용).
- [0034] 첫 번째 실험 세트에는 세포 형태 및 방향의 시각화, 염색된 단백질의 국소화 시각화가 포함되었다. 이 실험은 교류 전기장의 주파수가 인공 BBB에 어떻게 영향을 미치는지 확인하기 위해 설계되었다. 여기에서 세포를 커버 슬립에서 성장시키고 1.7 V/cm의 전기장 세기로 4 개의 다른 주파수 (100 kHz, 150 kHz, 200 kHz 및 300 kHz)에서 72 시간 동안 교번 전기장을 적용하였다. 교류 전기장의 방향은 두 개의 수직 방향 사이에서 1 초마다 전환되었다. 교류 전기장이 적용되지 않는 대조군(control)도 있었다. Claudin 5, ZO-1 및 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)의 존재를 나타내는 세포 형태 이미지(각각 다른 색상으로 염색됨)를 획득하였다. Claudin 5와 ZO-1은 온전한 BBB의 존재를 나타낸다. 이 일련의 세포 형태 이미지는 100 kHz에서 가장 극적인 효과로 세포 경계에서 세포질로의 밀착 접합 단백질의 비편재화(delocalization)에 의해 교번 전기장이 인공 BBB를 방해한다는 것을 보여주었다.
- [0035] 두 번째 실험 세트에는 세포 형태의 시각화도 포함되었다. 이 실험은 교류 전기장이 적용된 시간이 인공 BBB에 어떻게 영향을 미치는지 확인하기 위해 설계되었다. 내피 세포(endothelial cells)를 커버 슬립에서 성장시키고 100kHz의 주파수에서 교번 전기장을 3 가지 다른 기간(24 시간, 48 시간, 72 시간)과 대조군에 적용하였다. 교류 전기장의 방향은 두 수직 방향 사이에서 1 초마다 전환되었다. Claudin 5 및 DAPI (각각 다른 색상으로 염색됨)의 존재를 묘사하는 세포 형태 이미지를 획득하였다. 이 일련의 세포 형태 이미지(cell morphology images)는 첫 번째 실험 세트와 관련하여 위에서 논의한 현상이 이미 24 시간 후에 보였고 효과가 72 시간 후에 가장 두드러졌다는 것을 보여주었다.
- [0036] 세 번째 실험 세트에는 세포 형태의 시각화도 포함되었다. 이 실험은 내피 세포가 커버슬립 대신 트랜스웰 삽입물에서 성장했다는 점을 제외하면 두 번째 실험 세트와 유사하였다. 결과는 두 번째 실험 세트의 결과와 유사하였다. TJ 단백질의 비편재화는 24 시간 후에 볼 수 있었고 효과는 72 시간 후에 가장 두드러졌다. 위에서 설명한 세 가지 실험은 교번하는 전기장이 세포의 구조적 변화를 일으켜 BBB 투과성을 증가시킬 수 있다는 결론을 뒷받침한다.
- [0037] 도 2(a)와 도 2(b)는 각각 100kHz의 주파수에서 72 시간 동안 교번 전기장을 적용한 후 인공 BBB 및 대조군에 대한 무결성 및 투과성 테스트의 결과를 도시한다(교번 전기장의 방향은 서로 수직인 두 방향 사이에서 1 초마다 전환됨). 보다 구체적으로, 도 2(a)는 경 내피 전기 저항(TEER) 테스트의 결과를 나타내며, 이는 교류 전기장이 인공 BBB의 무결성을 대조군 대비 35 %로 감소시켰음을 나타낸다. 도 2(b)는 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluoresceine isothiocyanate, FITC) 투과성 테스트의 결과를 나타내며, 이는 교번 전기장이 4 kDa 분자량을 갖는 FITC-dextran에 대한 인공 BBB의 투과성을 대조군 대비 110%로 증가시켰음을 도시한다. 이러한 실험은 교번 전기장이 일반적으로 BBB를 통과할 수 없는 분자에 대한 BBB의 투과성을 증가 시킨다는 결론을 뒷받침한다.

- [0038] 종합적으로, 이러한 시험관 내 실험은 충분한 시간 동안 특정 주파수에서 교번 전기장을 적용하면 세포 경계에 서 세포질로의 밀착 접합 단백질 (Claudin 5, ZO-1)의 비편재화가 발생하며, (가장 극적인 효과는 100kHz), BBB의 투과성을 증가시키는 것을 알려준다. 교번 전기장의 효과는 이미 24 시간 후에 나타나며 72 시간 후에 가장 두드러진다. 보다 구체적으로, 교번 전기장을 사용하여 BBB의 투과성을 높인 후 4kDa의 분자가 BBB를 통과할 수 있다.
- [0039] 교번 전기장이 꺼진 후 BBB에 어떤 일이 발생하는지 확인하기 위해 추가 체외 실험을 수행하였다. 이 실험은 세포 형태의 시각화를 사용하여 인공 BBB가 교류 전기장을 중단한 후 어떻게 회복되는지 보여주었다. 이 실험에서 내피 세포(endothelial cells)는 커버 슬립에서 성장하고 72 시간 동안 1.7 V/cm의 전기장 강도에서 100kHz 교번 전기장으로 처리되었다. 교류 전기장의 방향은 두 개의 수직 방향 사이에서 1 초마다 전환되었다. 교번 전기장을 중단한 후 96 시간 동안 세포를 추적하였다. Claudin 5(염색)의 존재를 나타내는 세포 형태 이미지는 24 시간, 48 시간, 72 시간 및 96 시간에 얻어졌다. 이러한 이미지는 24 시간, 48 시간, 72 시간 및 96 시간 이미지에서 세포 경계와 세포질 사이에서 Claudin의 국소화의 점진적인 변화를 보여주었다. 나아가, 그 4 개의 이미지를 대조군에 대한 각각의 이미지 (처음 72 시간 또는 마지막 96 시간 동안 교대 전기장이 적용되지 않음)와 비교한 결과 내피 세포 형태가 중지 후 48 시간 동안 부분적으로 회복되었다는 것이 밝혀졌다. 교대 전기장과 교대 전기장을 중단한 지 96 시간 후에 BBB가 완전히 회복되었다 (즉, 대조군과 유사함).
- [0040] 도 3(a) 및 도 3(b)는 위에서 설명한 인공 BBB의 투과성에서 관찰된 변화가 세포 사멸에 기인하는 것인지 여부를 결정하기 위해 설계된 시험관 내 실험의 결과를 도시한다. 이 실험은 교번 전기장을 72 시간 동안 인가한 후 96 시간 동안 교번 전기장을 가하지 않았을 때의 세포 수 (a)를 교번 전기장이 적용되지 않은 대조군(b)과 비교하여 세포 분열을 테스트하였다. 내피 세포를 커버 슬립에서 성장시키고 72 시간 동안 1.7 V/cm의 전기장 세기로 100 kHz 교번 전기장으로 처리하였다. 교번 전기장의 방향은 두 개의 수직 방향 사이에서 1 초마다 전환되었다. 교번 전기장을 끈 후 96 시간 동안 세포를 추적하였다. 교번 전기장 및 대조군에 대한 ml 당 세포수를 계산하고, 그 결과를 도 3(a) 및 도 3(b) (각각 대조군 및 교류 전기장에 대해)에 나타내었다. 이러한 결과는 교번 전기장을 적용하는 동안 또는 적용 후에 세포 수에 통계적으로 유의한 증가가 없음을 나타내며, 이는 위에서 언급한 BBB 투과성의 변화가 세포 사멸에 기인하지 않은 것을 나타낸다.
- [0041] 또 다른 시험관 내 실험에서는 세포사멸(apoptosis)에 대한 TUNEL 분석을 사용하여 위에서 설명한 인공 BBB의 투과성에서 관찰된 변화가 세포 사멸에 기인하는지 여부를 결정하였다. 이 실험에서 내피 세포는 커버 슬립에서 성장하고 72 시간 동안 1.7 V/cm의 전기장 강도에서 100kHz 교번 전기장으로 처리되었다. 교번 전기장의 방향은 두 개의 수직 방향 사이에서 1 초마다 전환되었다. 대조군에는 교류 전기장이 적용되지 않았다. 세포 사멸 (TUNEL) 및 핵(DAPI) (각각 다른 색으로 염색 됨)을 묘사하는 세포 형태 이미지는 24, 48 및 72 시간 후에 획득되었다. 이들 이미지 중 어느 것도 세포 사멸의 추가 증거를 보여주지 않았는데, 이는 교류 전기장이 세포 사멸을 일으키지 않았음을 나타낸다. 이것은 위에서 언급한 BBB 투과성의 변화가 세포 사멸에 기인하지 않았음을 확인한다.
- [0042] 교번 전기장에 대한 노출로 인한 혈관 투과성의 증가를 정량화하기 위해 쥐에 대한 일련의 생체 내 실험도 실행되었다. 이 실험에서는 혈청 알부민(분자 크기 69kDa)에 대해 매우 높은 친화성을 갖는 아조 염료인 Evans Blue(EB) 염료를 사용하였다. 분자 크기가 크기 때문에 혈청 알부민은 일반적으로 BBB를 통과할 수 없다. 그러나 BBB의 투과성이 충분히 증가하면 일부 혈청 알부민 분자(결합된 EB 염료와 함께)가 BBB를 가로질러 이를 생성한 다음 쥐의 뇌에서 EB를 찾아 검출할 수 있다.
- [0043] 이 일련의 실험에서, 100kHz의 교류 전기장이 쥐의 뇌에 72 시간 동안 적용되었으며, 교류 전기장의 방향은 두 수직 방향 사이에서 1 초마다 전환되었다. 이것은 각 쥐의 머리를 면도하고, 첫 번째 쌍의 용량 결합 전극을 쥐의 머리 상단과 하단에 배치하고, 두 번째 쌍의 용량 결합 전극을 쥐의 머리의 왼쪽과 오른쪽에 배치함으로써 달성되었다. 이어서 100kHz AC 전압을 1 초 동안 상단 및 하단 전극 사이에 적용한 후, 반복되는 순서로 1 초 동안 오른쪽 및 왼쪽 전극 사이에 100kHz AC 전압을 적용하였다.
- [0044] 표 1에 표시된 조건과 시간 동안 EB를 마취하에 꼬리 정맥에 정맥 주사하고(주입하면 EB는 즉시 알부민에 결합) 모든 경우에 EB가 2 시간 동안 순환되도록 한다. 다음 단계가 수행되었다: (a) 식염수를 심장 내 관류; (b) 뇌 슬라이서를 사용하여 뇌를 네 조각으로 나눔 (c) 조각을 사진으로 찍어 염색을 국소화하고 조각의 무게를 측정, (d) TCA 50 % (1 : 3) 및 원심 분리기로 조직 균질화 후 EB 추출 및 (e) 610 nm에서 EB 정량화. 결과는 조직 g 당 EB μ g으로 제공된다.

표 1

Group #	Treatment	# of Rats	Time of EB Injection
1	72 hours 100 kHz fields	3	2h before the end of the 72 h period
2	72 hours 100 kHz fields + 2 hours rest	3	2h after the end of the 72 h period
3	72 hours heat using sham electrodes	3	2h before the end of heat
4	Control (no fields + no heat)	3	Same time as group 1

[0045]

[0046]

실험 중에 그룹 2의 동물 2 마리와 그룹 4의 동물 1 마리가 제외되었다 (처치 중단, 꼬리 정맥에 EB 주입 실패). 교대 전기장으로 처리된 동물 (그룹 1 및 2)간에 차이가 없었으므로 이러한 동물을 함께 그룹화하였다. 유사하게, 가짜 열과 대조군 동물(그룹 3 및 4)간에 차이가 없으므로 이 동물들은 함께 그룹화되었다.

[0047]

쥐의 뇌는 도 4에 표시된 위치에서 뇌 슬라이서를 사용하여 4 개의 조각으로 슬라이스 되었다. 이어서 4 개의 특정 섹션에서 EB 축적을 측정하였다. 또한 이 4 개 섹션 각각에서 전계 강도를 결정하기 위해 컴퓨터 시뮬레이션을 수행하였다. 표 2는 V/cm RMS로 주어진 모든 값과 함께 이 4 개 섹션 각각의 시뮬레이션에서 얻은 전계 강도를 특정한다.

표 2

Section	1	2	3	4
Mean Field Strength	2.7 V/cm	3 V/cm	2.6 V/cm	1.6 V/cm
Media Field Strength	2.5 V/cm	2.6 V/cm	2.4 V/cm	1.6 V/cm

[0048]

[0049]

섹션 1에서 4까지의 EB 축적에 대한 결과는 도 5에 도시되었다. 이러한 결과의 요약은 다음과 같다. (1) 전계 강도가 가장 높은 섹션 1, 2 (전두엽)에서 통계적으로 유의한 증가가 관찰되었다. (통계적으로 유의하지 않은) 작은 증가가 전계 강도가 더 낮은 후방 섹션(3, 4)에서 관찰되었다.

[0050]

도 6은 섹션 1-4 모두에 걸쳐 평균을 얻은 랫 뇌의 평균 EB 축적을 도시한다. 이 결과는 72 시간 동안 번갈아가며 전기장을 처리한 쥐의 뇌에서 EB가 더 많이 축적되는 것으로 나타났으며, 이 결과는 통계적으로 유의미했다 ($p < 0.05$).

[0051]

위에서 설명한 생체내 실험은 다음을 입증한다 : (1) 교번 전기장 적용은 평균 분자 크기가 ~ 69 kDa인 분자의 뇌 조직으로 BBB 통과를 허용한다. (2) BBB의 투과성 증가는 교류 전기장 적용을 종료 한 후 2 시간 동안 유지된다. 그리고 (3) BBB의 증가된 투과성은 뇌의 부분에 따라 다르다. 후자는 뇌의 다양한 부분에 인가된 다양한 전계 강도의 결과일 수 있다. 이러한 실험은 교류 전기장이 일반적으로 비투과성 BBB를 통과할 수 없는 분자에 대한 BBB의 투과성을 증가 시킨다는 결론을 뒷받침한다.

[0052]

다른 세트의 생체 내 실험에서, 5 마리의 랫은 72 시간 동안 100kHz에서 교번 전기장으로 처리되었고, 4 마리의 대조군 랫은 동일한 기간 동안 교번 전기장으로 처리되지 않았다. 72 시간이 지난 후 4kDa의 형광 화합물 TRITC-Dextran을 마취하에 꼬리 정맥에 정맥 주사하고 모든 경우에 2 분 동안 순환시켰다. 그런 다음 뇌를 제거하고, 냉동하고, 단면화하고 형광 스캐너로 스캔하였다. 모든 슬라이드는 동일한 조건으로 스캔되었다. 결과 이미지는 (대조군과 비교하여) 교번 전기장에 노출된 쥐의 뇌 조직에서 형광 4 kDa TRITC-Dextran의 축적 수준이 상당히 높음을 보여 주어 교번 전기장이 BBB의 투과성을 증가 시킨다는 것을 다시 확인한다.

[0053]

또 다른 일련의 생체 내 실험은 가돌리늄 조영제 (Gd-DTPA, Magnetol, MW 547)의 정맥 주사와 함께 Dynamic Contrast Enhanced MRI (DCE-MRI)를 사용하여 수행되었다. 이 실험에서 테스트 랫은 72 시간 동안 100kHz 교번 전기장으로 처리되었고, 대조군 랫은 동일한 기간 동안 교번 전기장으로 처리되지 않았다. 이 72 시간 후, 교류 전기장이 꺼지고, 쥐가 마취되었으며, 일련의 60 T1w MRI 스캔 (각각 28 초의 지속 시간을 갖는 스캔)이 획득되었다. 가돌리늄 조영제는 이 60 회 스캔 중 7 번째에 쥐의 꼬리 정맥에 주입되었다.

[0054]

각 랫에 대한 이미지 분석에는 (1) 각 복셀에 대한 처음 6 개의 T1w MRI 스캔 (즉, 가돌리늄 주입 전 스캔)의

평균을 계산하여 각 복셀에 대한 기준선을 결정하는 단계; (2) 기준선에 대하여 시간 경과에 따른 신호 변화 백분율 (즉, 가돌리늄 축적)을 각 복셀 별로, 연산하는 단계; (3) 뇌를 전방, 중간 및 후방 세그먼트로 분할하는 단계 (4) 세 세그먼트 각각에 대해 각 세그먼트의 모든 복셀에 대한 기준선에 대한 평균 백분율 신호 변화를 생성한 이후, (5) 4 개의 연속 시점 (즉, 4 개의 스캔)을 평균화한다. 마지막으로, 주어진 그룹 내의 모든 쥐의 데이터를 함께 평균화하였다.

[0055] 뇌의 세 부분 (즉, 전방, 중간 및 후방) 각각에 대한 DCE-MRI 실험의 결과는 도 7에 도시되어 있다. 전기장(트레이스 라벨링된 TTFields; $n = 6$)은 대조군 랫트(트레이스 라벨링된 대조군; $n = 3$)보다 상당히 높았다. 더욱이 구별은 뇌의 교류 전기장이 가장 높은 전계 강도를 갖는 부분인 후뇌에서 가장 두드러졌다. 이것으로부터 우리는 교번 전기장이 생체 내에서 BBB의 투과성을 성공적으로 증가시켰다는 결론을 내릴 수 있다.

[0056] BBB의 투과성 증가가 일시적인지 여부를 테스트하기 위해 동일한 테스트 조건을 반복했으며, 교번 전기장 없이 96 시간을 추가하였다. 이 96 시간 후에, 위에서 설명한 동일한 절차(가돌리늄 주사 포함)를 사용하여 일련의 60 T1w MRI 스캔(각 스캔의 지속 시간은 28 초)을 획득하였다. 뇌의 세 부분 각각에 대한 DCE-MRI 실험의 이 부분의 결과는 또한 도 8에 도시되었다. 이 데이터는 72 시간 동안 교번 전기장으로 처리된 쥐의 뇌 조직에 조영제 축적이 있음을 보여준다. 교번 전기장 없이 96 시간(TTFields + 96h로 표시된 트레이스; $n = 7$)은 대조군 랫트(트레이스 라벨링된 대조군 + 96h; $n = 3$)과 크게 다르지 않았다. 이것으로부터 우리는 교번 전기장이 중단된 후에 BBB의 투과성이 정상으로 돌아온다는 결론을 내릴 수 있다.

[0057] 교번 전기장이 랫($n=2$)에 적용되기 전에 동일한 절차를 사용하여 추가로 일련의 60 T1w MRI 스캔(각 스캔의 지속 시간이 28 초임)을 획득하였다. 뇌의 세 부분 (즉, 전방, 중간 및 후방) 각각에 대한 DCE-MRI 실험의 이 부분의 결과도 도 8에 도시되어 있다 ("before"로 표시된 트레이스 참조).

[0058] 도 8은 72 시간의 TTFields($n=6$)에 대한 뇌의 모든 3 개 세그먼트 (즉, 전방, 중간 및 후방)의 평균과 72 시간 동안 TTField가 인가되지 않은 대조군($n = 3$)을 표준 편차 막대와 함께 도시한다. 페어드 t 테스트(paired t test)는 두 그룹을 비교하는 데 사용되었으며 $p < 0.0001$ 이다.

[0059] 교번 전기장을 적용한 후 BBB를 통과할 수 있는 분자의 크기 상한은 아직 결정되지 않았다. 그러나 (a) 분자량이 4kDa 인 FITC-dextran을 사용한 본원에 기재된 시험관 내 실험 및 (b) EB(분자 크기가 ~69kDa인 혈청 알부민에 결합)를 사용하는 본원에 기재된 생체 내 실험에 기초하여, 상한은 약 69kDa 이상인 것으로 보이며 가장 확실하게는 4kDa 이상이다.

[0060] BBB의 투과성을 의지에 따라 가역적으로 증가시킬 수 있다는 의미는 광범위하다. 왜냐하면 일반적으로는 비투과성의 BBB를 통과하는 것을 방해하는 적어도 하나의 특징을 가지는 물질들임에도 불구하고 피험자의 BBB를 통과하여 전달하는 것이 가능하기 때문이다. 이러한 의미의 대부분은 대상 뇌의 BBB를 통해 치료제 및 진단제를 포함하지만 이에 국한되지 않는 물질을 전달하는 것과 관련이 있다.

[0061] 예는 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는다 : BBB를 통해 화학 요법제를 전달하여 암 치료(이 맥락에서 뇌에 대한 약물의 증가 된 투과성을 기반으로 하여 신체의 다른 부분에서 심각한 부작용이 있는 뇌종양 및 전이의 치료를 위한 약물의 용량을 줄일 수 있다); 면역 요법을 위해 BBB를 통해 항체 및/또는 세포 기반 요법 체제 전달; 진단 목적 및 연구(예 : 뇌 활동 모니터링)를 위해 BBB를 통해 조영제 염료, 리포터 및 마커 전달; 감염성 질환을 치료하기 위해 BBB를 통해 항박테리아제(antibacterial agents) 전달; 바이러스 감염을 치료하기 위해 BBB를 통해 항 바이러스제(anti-viral agents) 또는 바이러스 중화 항체(virus neutralizing antibodies) 전달; 기생충을 치료하기 위해 BBB를 통해 항기생충제; BBB를 통해 신경 퇴행성 및 자가 면역 질환을 치료하기 위한 체제 전달; 정신과 약물 전달; 항간질제 전달; 뇌수종 약물 전달; 뇌졸중 중재 및 회복 약물 전달; 뇌에 부족한 화합물을 BBB를 통해 전달하여 해당 화합물이 부족한 상태 치료(예 : 파킨슨 병 치료 등).

[0062] 위에서 설명한 테스트는 시험관 내 및 살아있는 랫에서 수행되었지만 다른 동물 및 인간에서 유사한 결과를 얻을 것으로 예상된다.

[0063] 본원에 기술된 방법은 또한 살아있는 피험자의 뇌에 교류 전기장을 적용함으로써 생체 내 맥락에서 적용될 수 있다. 피험자의 뇌에 전기장을 부과하면 BBB의 투과성이 증가하여 BBB에 의해 일반적으로 차단되거나 방해되는 분자가 통과할 수 있다. 이것은 예를 들어 피험자의 피부 위 또는 아래에 전극을 배치하여 전극의 선택된 하위 집합 사이에 교류(AC) 전압을 적용하면 피험자의 뇌에 교류 전기장을 부과함으로써 달성될 수 있다.

[0064] 예를 들어, 한 쌍의 전극은 피험자의 머리 앞뒤에 위치할 수 있고 두 번째 전극 쌍은 피험자의 머리 오른쪽과 왼쪽에 위치할 수 있다. 일부 실시예에서, 전극은(예를 들어, 전도성 플레이트를 포함하고 또한 전도성 플레이트

트와 대상체의 신체 사이에 배치된 유전체 층을 갖는 전극을 사용함으로써) 대상체의 신체에 용량적(capacitively)으로 결합된다. 그러나 대안적인 실시예에서, 유전체 층은 생략될 수 있으며, 이 경우 전도성 플레이트는 피험자의 신체와 직접 접촉한다. 다른 실시예에서, 전극은 특허의 피부 아래에 피하로 삽입될 수 있다.

[0065] AC 전압 발생기는 첫 번째 기간(예: 1 초) 동안 오른쪽과 왼쪽 전극 사이에 선택된 주파수(예: 100 kHz 또는 50 ~ 190 kHz)에서 AC 전압을 적용하여 교번 전기장을 유도한다. 필드 라인의 가장 중요한 구성 요소는 대상 머리의 가로 축(transverse axis)과 평행하다. 이어서 AC 전압 발생기는 두 번째 기간(예: 1 초) 동안 전면 및 후면 전극 사이에 동일한 주파수(또는 다른 주파수)에서 AC 전압을 적용하여 교번 전기장을 유도한다. 필드 라인은 대상 머리의 시상 축(sagittal axis)과 평행하다. 이 두 단계 순서는 치료 기간 동안 반복된다. 선택적으로, 열 센서가 전극에 포함될 수 있으며, AC 전압 발생기는 전극에서 감지된 온도가 너무 높으면 전극에 적용되는 AC 전압의 진폭을 감소시키도록 구성될 수 있다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 추가 전극 쌍이 추가되고 시퀀스에 포함될 수 있다. 대안적인 실시예에서, 한 쌍의 전극만이 사용되며, 이 경우 필드 라인의 방향은 전환되지 않는다. 이 생체 내 실시예에 대한 임의의 파라미터(예를 들어, 주파수, 전계 강도, 지속 시간, 방향 전환 속도 및 전극의 배치)는 시험관 내 실시예와 관련하여 전술한 바와 같이 변경될 수 있다는 점에 유의한다. 그러나 전기장이 항상 피험자에게 안전하게 유지되도록 생체 내 맥락에서 주의를 기울여야 한다.

[0066] BBB의 투과성을 높이기 위한 다양한 응용이 생체 내 맥락에서 쉽게 구상될 수 있다. 일 예로, 뇌에서 종양 세포(예를 들어, 교모세포종 세포)에 의한 약물 흡수의 국부적인 향상은 화학 요법 또는 다른 항종양제의 투여 전(예를 들어, 72 시간 또는 적어도 24 시간) 및 투여 중에 일정 기간 동안 뇌에 교류 전기장을 적용함으로써 유도될 수 있다.

[0067] 도 9는 교번 전기장의 적용과 살아있는 환자에게 물질을 투여하는 시기 사이의 적절한 관계를 도시한다. 위에서 설명한 데이터터틀을 기반으로 물질이 주어진 시간 $t = 0$ 에 도입되거나 투여된다고 가정하면, 교번 전기장은 주어진 시간 이전(예: $t = 0$ 이전 72 시간)에 시작되고 주어진 시간 이후의 시간 간격(예: $t = 0$ 이후 12 시간까지) 동안 계속될 수 있다. 이 상황에서 BBB의 투과성은 물질이 투여되기 전과 물질이 BBB에 도달하기 전에 증가하기 시작한다. 이렇게 하면 물질이 도착하자마자 BBB를 통과할 수 있다.

[0068] 화학 요법의 맥락에서, 이것은 교번 전기장의 적용을 시작하고 72 시간 후에 화학 요법제를 투여한 다음 추가 시간 간격(예: 화학 요법제 투여 후 12 시간까지) 동안 교번 전기장을 적용하는 것에 해당한다.

[0069] 도 9와 관련하여 위에서 논의된 시간 간격은 중단되지 않거나 바람직하게는 짧은 휴식 시간을 포함할 수 있음을 유의하여야 한다. 예를 들어, 12 시간 간격은 중단되지 않는 단일 12 시간 블록으로 충족될 수 있다. 또는 6 시간 동안 교류 전기장을 적용한 다음 1 시간 휴식을 취한 다음 추가 6 시간 동안 교류 전기장을 적용하여 12 시간 간격을 충족할 수 있다. 유사하게 물질 투여 이전의 72 시간 간격은 선택적으로 휴식으로 중단될 수 있다. 또한 도 9의 맥락에서, 물질이 살아있는 환자에게 투여될 때, 물질의 투여는 정맥 내, 경구, 피하, 척수강 내, 심 실내, 및 복막 내로 투여될 수 있다.

[0070] 일부 바람직한 실시예에서, 교류 전기장의 주파수는 190 kHz 미만(예를 들어, 50 내지 190 kHz 또는 25 내지 190 kHz)이다. 위에서 논의한 실험을 기반으로, 190 kHz 미만의 주파수와 최소 24 시간의 기간을 사용하면 투과율의 변화가 증가한다(해당 범위 밖에서 작동하는 경우에 비해).

[0071] 여기에 기재된 방법은 피험체의 뇌가 종양을 포함할 때 피험체 뇌의 BBB를 가로 질러 물질을 전달하는데 사용될 수 있다. 뇌종양(예를 들어, 교모세포종)을 치료하는 한 가지 기존 접근법은 50 ~ 500 kHz, 바람직하게는 100 ~ 300 kHz의 주파수에서 교번 전기장을 종양에 적용하는 것이다. 교모세포종의 경우 200 kHz가 가장 선호되는 주파수이다. 이러한 주파수에서 교류 전기장을 TFields(tumor treating fields)라고 하고, 미국 특허 6,868,289 및 7,565,205에 설명되어 있으며, 각각은 그 전체가 여기에 참조로 포함된다. 간단히 말해서, 이 두 특허는 유사 분열 동안 분열하는 세포를 파괴하는 것을 설명한다. TFields의 효과는 전기장의 방향이 주기적으로 전환될 때, 종양의 적어도 일부에서 장의 세기가 적어도 1 V/cm 일 때, 그리고 장이 가능한 한 적은 휴식으로 장기간(예를 들어, 몇 주 또는 몇 달) 적용될 때 향상된다.

[0072] 뇌종양이 있는 환자의 경우, TFields로 종양을 치료하고 동일한 환자의 BBB를 통해 물질을 전달하는 것이 바람직한 상황이 발생할 수 있다(예: BBB를 지나 치료적으로 유효한 양의 화학 요법 약물을 섭취하여 종양에 대한 추가 공격 라인을 제공하도록). 일부 상황에서는 단일 주파수의 교류 전기장을 사용하여 종양을 치료하고 BBB의 투과성을 증가시킬 수 있다. 다른 상황에서, 즉, BBB의 투과성을 높이기 위해 개선된 결과를 제공하기 위해 선

택되는 첫 번째 주파수와 TTFields의 항종양 작용에 대한 개선된 결과를 제공하기 위해 선택되는 두 번째 주파수 등과 같이 서로 다른 주파수를 가진 교류 전기장을 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0073] 도 10은 BBB 투과성을 유도하기 위한 제1 주파수와 세포 독성(cytotoxicity)을 유도하기 위한 제2 주파수를 생성하는 장치의 블록 다이어그램이다. 장치는 종래의 Optune[®] 펄드 발생기 유닛과 유사하지만 2 개의 다른 주파수에서 작동할 수 있는 능력을 갖는 AC 전압 발생기(44)를 포함한다. 첫 번째 주파수는 50 ~ 190 kHz이고 두 번째 주파수는 50 ~ 500 kHz이다. 일부 실시예에서, 제1 주파수는 75 kHz 내지 125 kHz이고 제2 주파수는 150 kHz 내지 250 kHz이다.

[0074] 예를 들어, 릴레이를 사용하여 첫 번째 구성 요소 세트 또는 두 번째 구성 요소 세트를 AC 전압을 생성하는 기존 회로로 전환하고 발전기의 작동 주파수를 조정하는 등 두 가지 다른 주파수에서 작동하는 기능이 구현될 수 있다. AC 전압 발생기(44)는 제어 입력의 상태에 따라 제1 주파수 또는 제2 주파수를 출력하도록 구성된다. 제어 입력이 제 1 상태에 있을 때 AC 전압 발생기(44)는 제1 주파수를 출력하고, 제어 입력이 제2 상태에 있을 때 AC 전압 발생기(44)는 제2 주파수를 출력한다. 제어기(42)는 AC 전압 발생기(44)가 제 2 주파수를 출력하도록 제어 입력을 제2 상태로 발생하도록 프로그래밍된다. 제어기(42)는 또한 제1 주파수로의 전환 요청을 수락하도록 프로그래밍된다. 도 10에 도시된 실시예에서, 요청은 푸시 버튼, 터치 스크린 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 종래의 접근법 중 임의의 것을 사용하여 구현될 수 있는 사용자 인터페이스(40)를 통해 제공된다. 대안적인 실시예에서, 요청은 태블릿, 스마트 폰 등에서 RF (예 : Bluetooth, WiFi 등)를 통해 제공될 수 있다.

[0075] 요청을 수신하면, 제어기(42)는 AC 전압 발생기(44)가 시간 간격 (예를 들어, 72 시간) 동안 제1 주파수를 출력하도록 제어입력을 제1 상태로 제공한다. 시간 간격이 경과한 후, 제어기(42)는 제어 입력을 제2 상태로 제공하여 AC 전압 발생기(44)가 제2 주파수를 출력하도록 복귀한다.

[0076] 선택적으로, AC 전압 발생기(44)는 제어 입력의 상태에 따라 하나 이상의 추가 주파수(예를 들어, 제 3 주파수, 제 4 주파수 등)를 출력하도록 구성될 수 있다. 바람직하게는 이들 추가 주파수 각각은 세포 독성을 유도하기 위해 선택된다. 이러한 실시 예에서, 제어기(42)는 요청이 도착하기 전에 AC 전압 발생기(44)가 제2 주파수 및 하나 이상의 추가 주파수를 출력하게 하는 상태를 통해 제어 입력을 순환하도록 프로그래밍 된다. 제어기(42)는 또한 제1 주파수로의 전환 요청을 수락하도록 프로그래밍 된다. 요청을 수신하면, 제어기(42)는 AC 전압 발생기(44)가 시간 간격(예를 들어, 72 시간) 동안 제 1 주파수를 출력하도록 제어 입력을 제1 상태로 제공한다. 시간 간격이 경과한 후, 제어기(42)는 AC 전압 발생기(44)가 제2 주파수 및 하나 이상의 추가 주파수를 출력하게 하는 상태를 통해 제어 입력을 순환시키는 것으로 복귀한다.

[0077] 도 10에 도시된 시스템은 TTFields 및 화학 요법을 포함하는 병용 요법으로 치료중인 종양이 있는 사람에게 특히 유용하다. 이 상황에서 시스템은 최대 세포 독성 효과를 제공하기 위해 두 번째 주파수에서 대부분의 시간을 작동한다. 그러나 사람이 화학 요법을 위해 화학 요법 클리닉을 방문하기 전에, 의료진(또는 사용자)은 사용자 인터페이스(40)를 작동시켜 시스템을 BBB 투과성을 촉진하는 첫 번째 주파수로 전환한다. 이러한 상황에서 사용자 인터페이스의 작동은 예를 들어 화학 요법의 예상 시작 72 시간 전에 수행될 수 있다.

[0078] 대안적으로, 요청을 수신하면(예를 들어, 사용자 인터페이스(40)로부터), 제어기(42)는 제어 입력을 제어하여 AC 전압 발생기(44)가 일정 시간 (예를 들어, 1 시간) 동안 제1 주파수를 출력한 다음 두 번째 주파수와 첫 번째 주파수 사이를 앞뒤로 전환한다(예 : 매시간 전환). 결국(예를 들어, 관련 물질이 환자의 혈류에서 고갈되었을 때), 제어기(42)는 제어 입력을 제어하여 AC 전압 발생기(44)가 제 2 주파수를 출력하도록 복귀한다.

[0079] Optune[®]과 함께 사용되는 종래의 전극과 유사한 전극 세트 (도시 생략)는 AC 전압 발생기 (44)의 출력에 연결된다.

[0080] 위에서 설명한 방법 중 하나와 관련하여 BBB는 교류 전계가 종료된 후 충분한 시간이 경과한 후 원래의 저 투과성 상태로 복구되어야 한다. 이것은 피험자의 안전을 위해 많은 상황에서 중요할 수 있다.

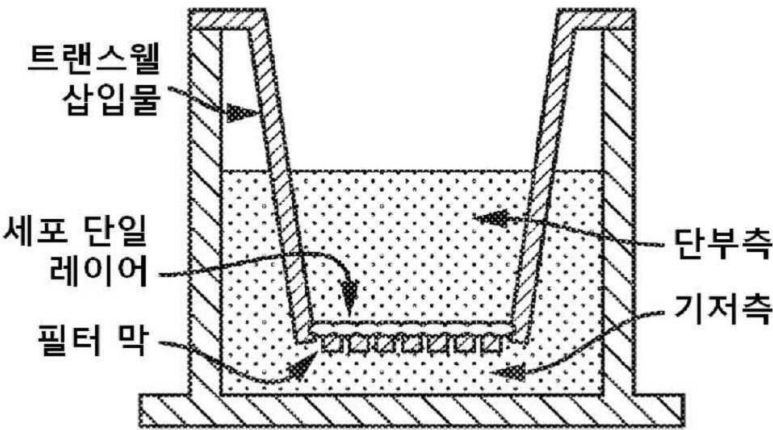
[0081] 본 발명이 특정 실시 예를 참조하여 개시되었지만, 첨부 된 청구 범위에 정의 된 바와 같이 본 발명의 범위 및 범위를 벗어나지 않고 설명 된 실시 예에 대한 다양한 수정, 변경 및 변경이 가능하다. 따라서, 본 발명은 설명 된 실시 예에 제한되지 않고, 다음의 청구 범위의 언어 및 그 균등 물에 의해 정의 된 전체 범위를 갖는 것으로 의도된다.

부호의 설명

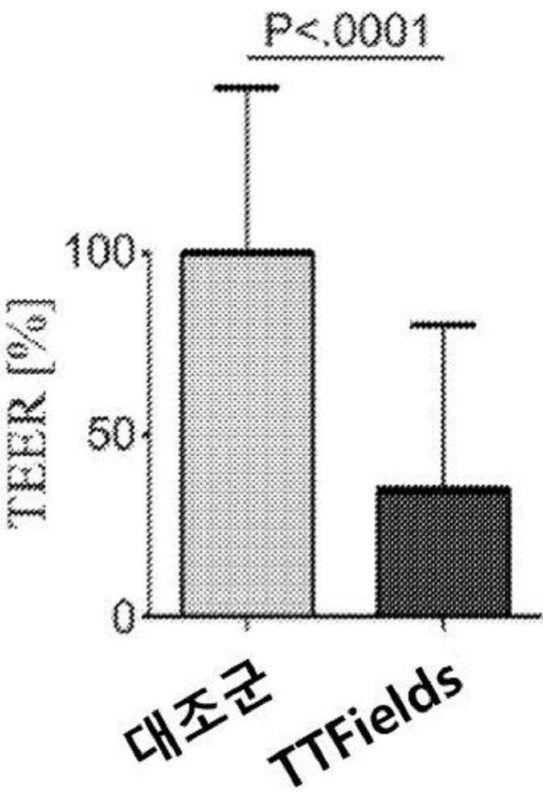
[0082] 40: 사용자 인터페이스
42: 제어기
44: AC 전압 발생기

도면

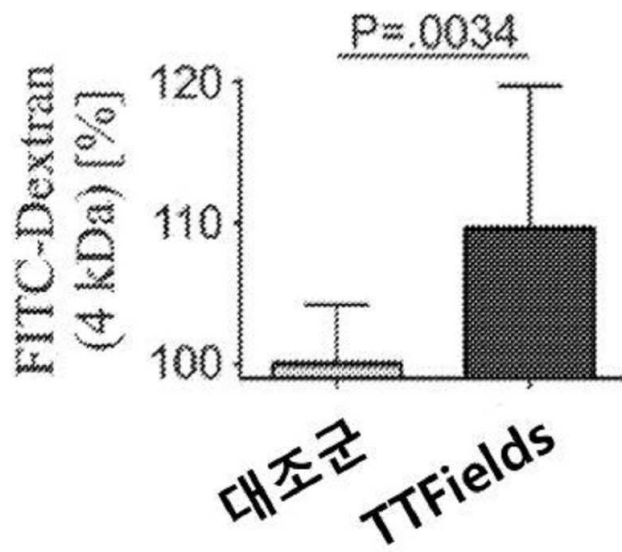
도면1



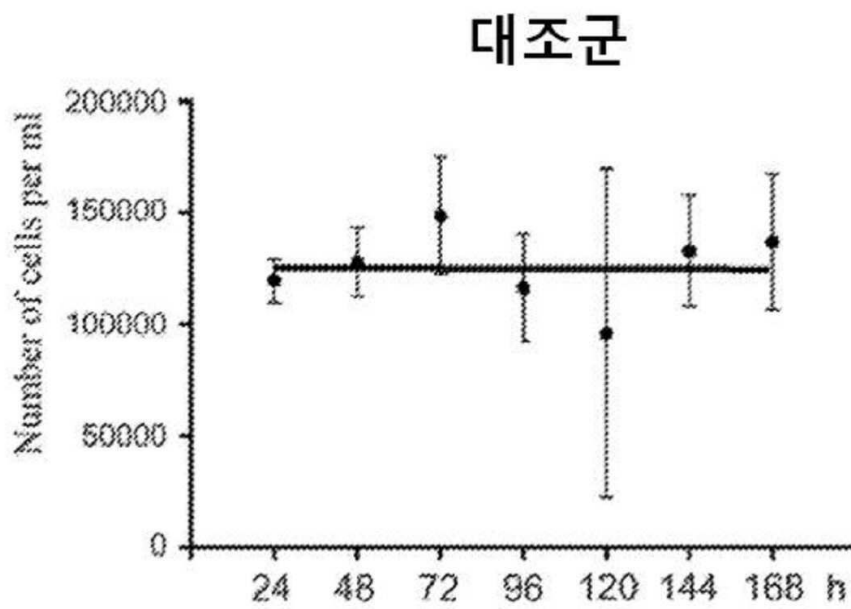
도면2a



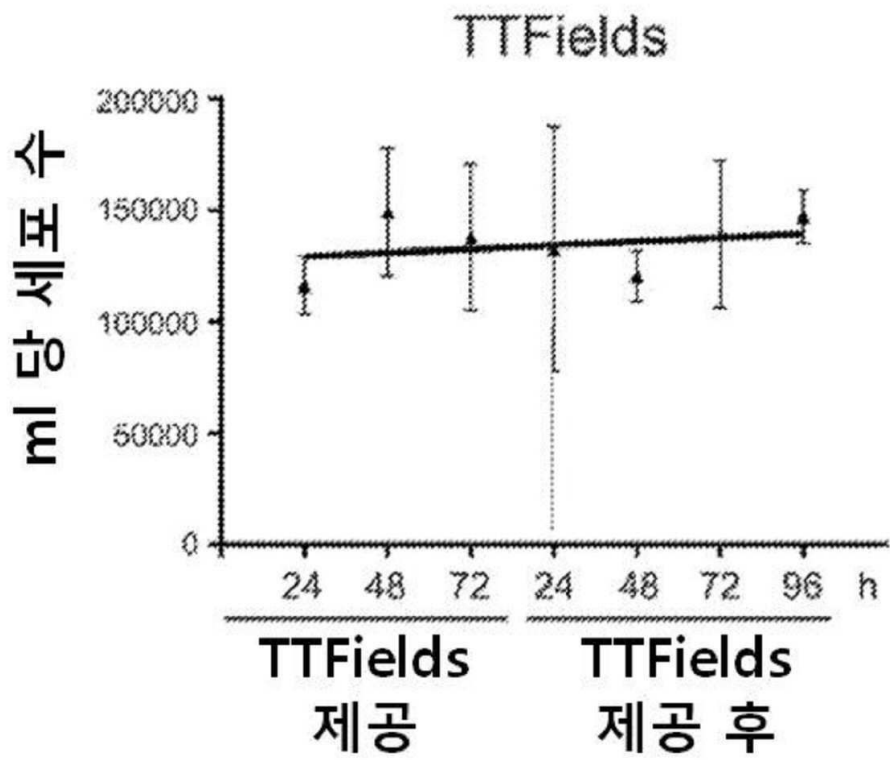
도면2b



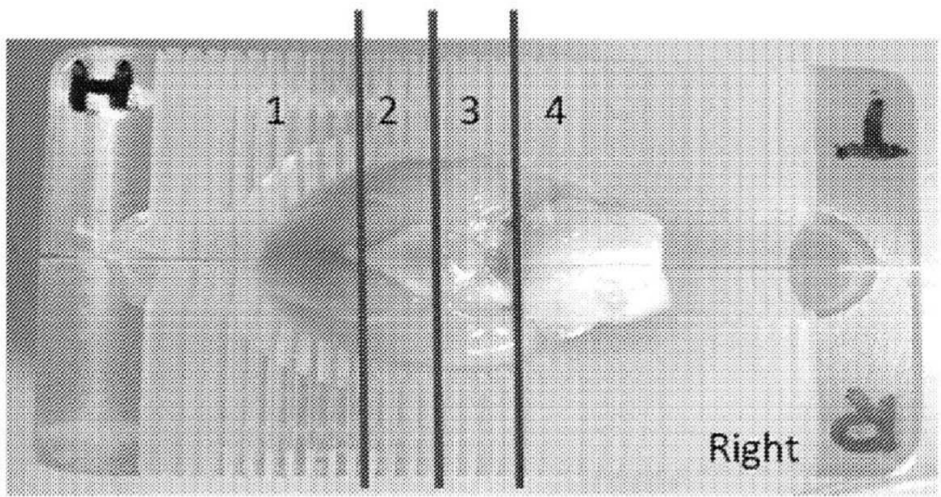
도면3a



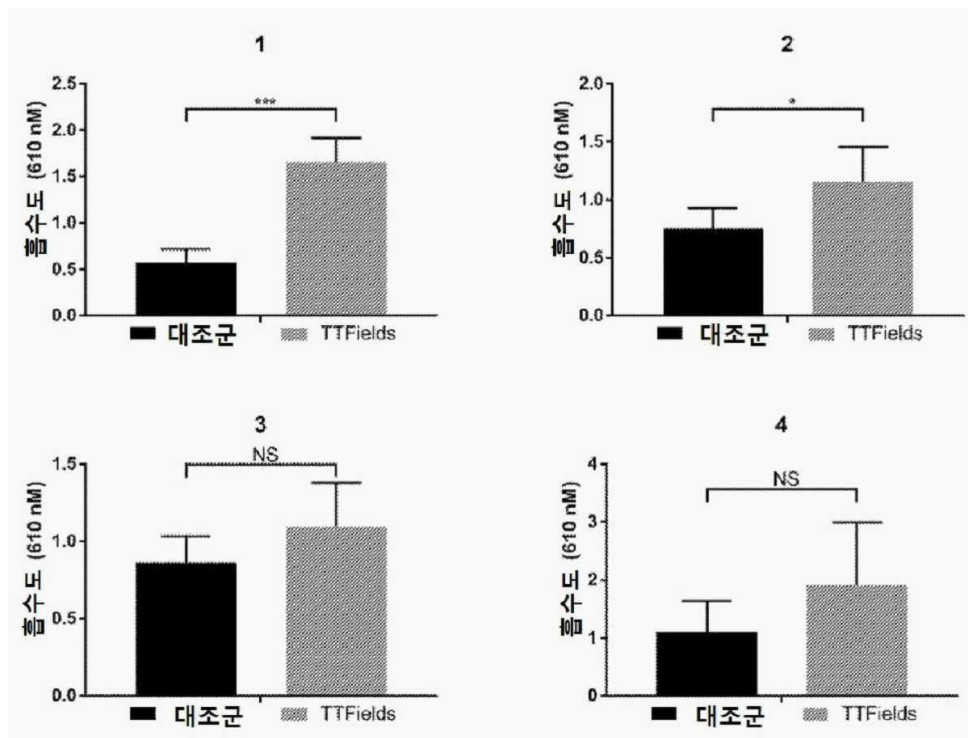
도면3b



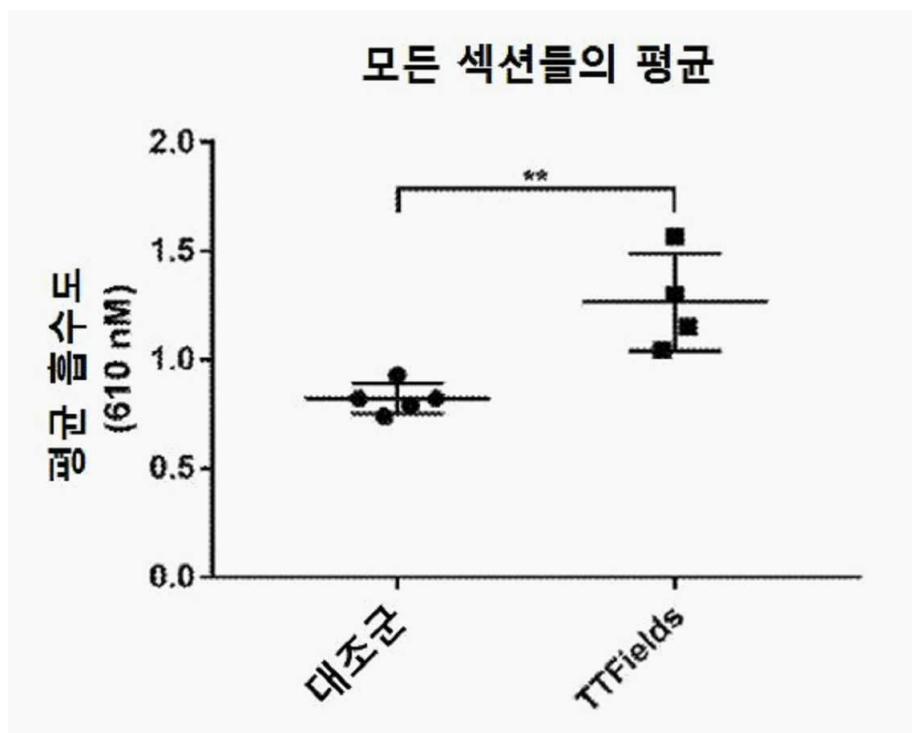
도면4



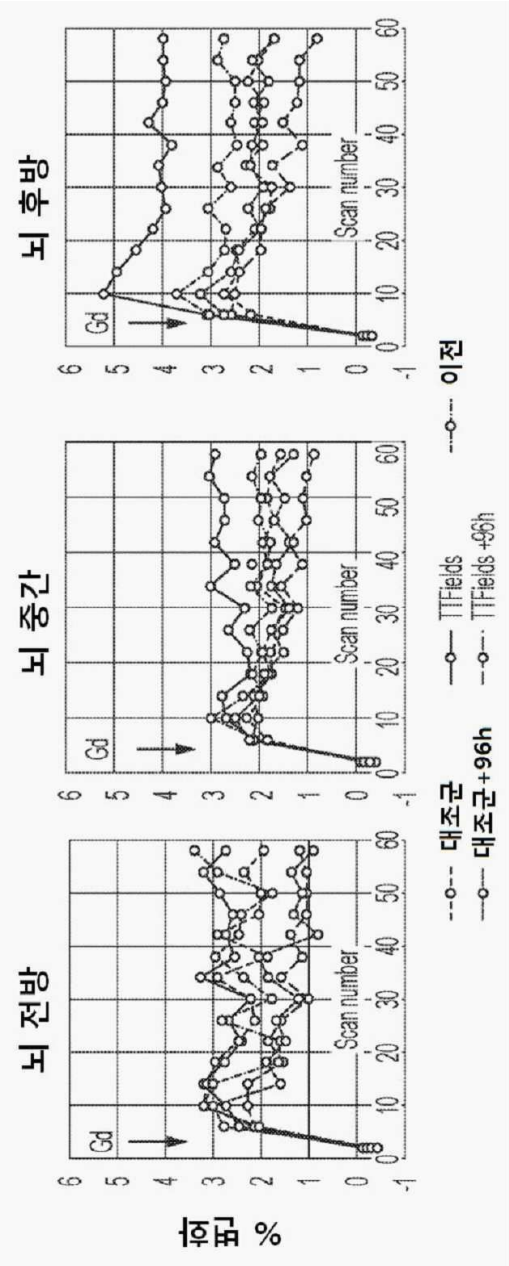
도면5



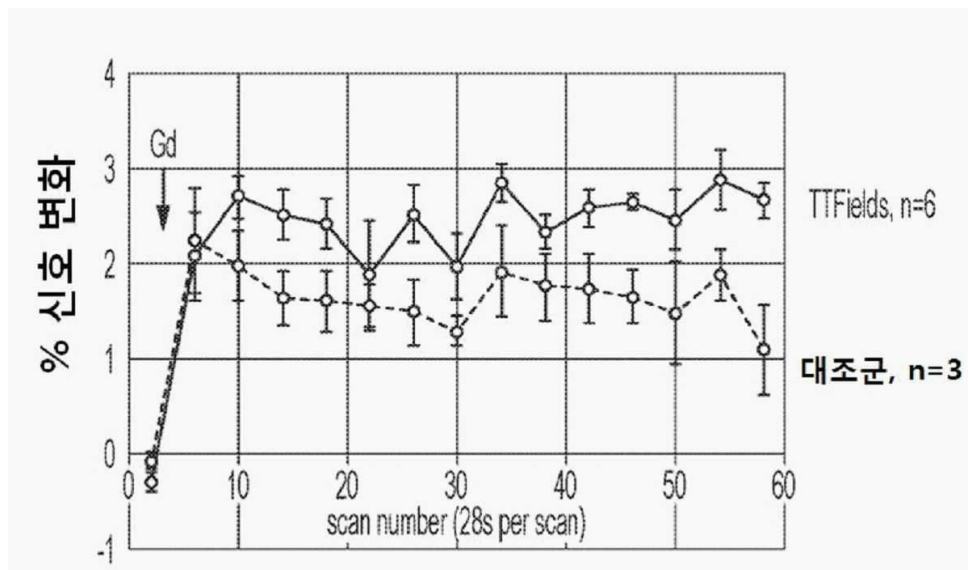
도면6



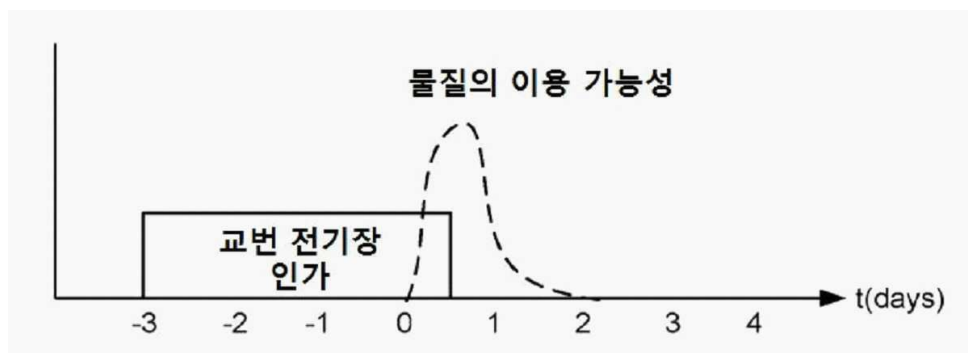
도면7



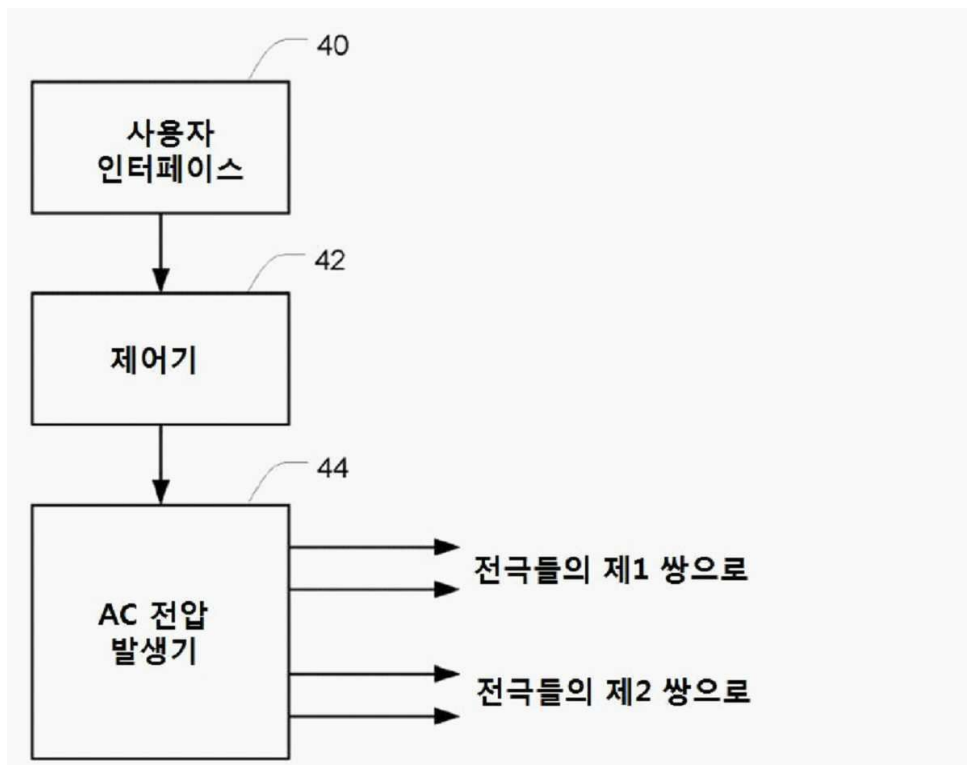
도면8



도면9



도면10



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 26

【변경전】

피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽(blood brain barrier, BBB)를 통과하여 물질을 전달하는 장치로, 상기 장치는:

제어 입력에 상응하여 시간 간격 동안 교류 전기장을 생성하는 교류 전압 생성기로, 상기 대상체의 뇌는 종양이 없고(tumor-free), 상기 시간 간격 동안 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교류 전기장을 인가하여 상기 피험체의 뇌의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시키고;

상기 교류 전압 생성기가 상기 시간 간격 동안 상기 제1 주파수의 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제어 입력을 제공하도록 프로그램된 제어기;를 포함하며

상기 시간 간격 도과 후 상기 물질이 투여된 상기 피험체에서, 상기 혈액 뇌 장벽의 향상된 투과성이 상기 물질을 상기 혈액 뇌 장벽을 통과하게 하는 장치.

【변경후】

피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽(blood brain barrier, BBB)를 통과하여 물질을 전달하는 장치로, 상기 장치는:

제어 입력에 상응하여 시간 간격 동안 교류 전기장을 생성하는 교류 전압 생성기로, 상기 피험체의 뇌는 종양이 없고(tumor-free), 상기 시간 간격 동안 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교류 전기장을 인가하여 상기 피험체의 뇌의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시키고;

상기 교류 전압 생성기가 상기 시간 간격 동안 상기 제1 주파수의 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제어 입력을 제공하도록 프로그램된 제어기;를 포함하며

상기 시간 간격 도과 후 상기 물질이 투여된 상기 피험체에서, 상기 혈액 뇌 장벽의 향상된 투과성이 상기 물질을 상기 혈액 뇌 장벽을 통과하게 하는 장치.

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 35

【변경전】

피험체 뇌의 종양을 치료하고, 상기 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽을 통과하여 물질을 전달하는 장치로, 상기 장치는:

상기 교류 전압 생성기를 포함하며, 교류 전압 생성기는:

입력된 제어 신호에 상응하여 제1 시간 간격 동안 상기 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교류 전기장을 인가하여 상기 피험체의 뇌의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시키고,

적어도 1 주 이상인 제2 시간 간격 동안 상기 피험체의 뇌에 제2 주파수의 교류 전기장을 인가하며, 상기 제2 주파수는 상기 제1 주파수와 상이하고, 상기 제2 주파수의 제2 교류 전기장은 상기 종양을 억제하기에 충분히 큰 강도를 가지며;

상기 교류 전압 생성기가 상기 제1 시간 간격 동안 상기 제1 주파수의 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제어 입력을 제공하고, 상기 제2 시간 간격 동안 상기 제2 주파수의 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제어 입력을 제공하도록 프로그램된 제어기를 포함하는 장치.

【변경후】

피험체 뇌의 종양을 치료하고, 상기 피험체 뇌의 혈액 뇌 장벽을 통과하여 물질을 전달하는 장치로, 상기 장치는:

교류 전압 생성기를 포함하며, 교류 전압 생성기는:

입력된 제어 신호에 상응하여 제1 시간 간격 동안 상기 피험체의 뇌에 제1 주파수의 교류 전기장을 인가하여 상기 피험체의 뇌의 혈액 뇌 장벽의 투과성을 향상시키고,

적어도 1 주 이상인 제2 시간 간격 동안 상기 피험체의 뇌에 제2 주파수의 교류 전기장을 인가하며, 상기 제2 주파수는 상기 제1 주파수와 상이하고, 상기 제2 주파수의 제2 교류 전기장은 상기 종양을 억제하기에 충분히 큰 강도를 가지며;

상기 교류 전압 생성기가 상기 제1 시간 간격 동안 상기 제1 주파수의 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제어 입력을 제공하고, 상기 제2 시간 간격 동안 상기 제2 주파수의 상기 교류 전기장을 생성하도록 상기 제어 입력을 제공하도록 프로그램된 제어기를 포함하는 장치.