



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 272**

51 Int. Cl.:
A61B 18/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00955350 .4**

86 Fecha de presentación : **02.08.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1207797**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.05.2002**

54 Título: **Método y aparato para la electromanipulación intracelular.**

30 Prioridad: **04.08.1999 US 147099 P**
11.04.2000 US 546754

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **Eastern Virginia Medical School of the
Medical College of Hampton Roads
P.O. Box 1980
Norfolk, Virginia 23507, US
Old Dominion University Research Foundation**

72 Inventor/es: **Beebe, Stephen, J.;**
Schoenbach, Karl, H. y
Buescher, E., Stephen

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 300 272 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

Método y aparato para la electromanipulación intracelular.

5 **Antecedentes de la invención**

Las células biológicas consisten en citoplasma rodeado por una membrana. El citoplasma es conductor, la membrana, que está hecha de un bicapa de lípidos, se puede considerar un dieléctrico. La aplicación de campos eléctricos a las células biológicas produce aumento de carga eléctrica en la membrana celular, y por consiguiente un cambio en la diferencia de potencial a través de la membrana. Para células eucariotas la diferencia de potencial transmembrana en condiciones de equilibrio es aproximadamente de 70 mV. Para afectar a los procesos de la membrana por medio de campos eléctricos externos, la amplitud de estos campos ("E") debe ser tal que genere una diferencia de potencial ("V_m") al menos del mismo orden que el potencial de reposo. La amplitud de un campo eléctrico es:

$$15 \quad E = V_m/fa \quad (1)$$

donde a es el radio de la célula y f es un factor de forma que depende de la forma de la célula. Para células esféricas, f es 1.5; para células cilíndricas de longitud l, con hemisferios de diámetro d en cada extremo, el factor de forma es

$$20 \quad f = l/(l-d/3) \quad (2)$$

25 Para una célula biológica con un radio supuesto de alrededor de 5 μm y una forma esférica, el campo eléctrico externo requerido para generar una diferencia de potencial de la misma amplitud que el potencial de reposo a través de la membrana es del orden de 100 V/cm. Debido a su menor tamaño, el campo eléctrico requerido para afectar la permeabilidad de la membrana de bacterias es mucho mayor, del orden de kV/cm.

30 Para campos eléctricos externos de una magnitud tal que el cambio en el potencial de membrana sea del orden del potencial de reposo, la apertura de canales inducida por voltaje en la membrana produce un flujo de iones a través de la membrana. Esto lleva a cambios en la concentración de iones cerca de la membrana celular, y por consiguiente causa estrés en la célula. El estrés dura del orden de milisegundos, y generalmente no produce daño celular permanente. Si la intensidad del campo eléctrico se aumenta tal que la diferencia de potencial a través de la membrana celular alcanza niveles del orden de un voltio, la permeabilidad de la membrana aumenta a un nivel tal que bien la célula necesita de segundos a horas para recuperarse (rotura reversible), o se puede producir la muerte celular. El mecanismo de la rotura de la membrana no se comprende bien. Una hipótesis común es que se generan poros en la membrana. Los poros pueden ser de tamaños que permitan el intercambio de macromoléculas. Si las diferencias de potencial transmembrana son lo suficientemente altas los poros no se cerrarán más. Se ha descrito el uso del efecto de rotura reversible en la electroporación y en la prevención de las incrustaciones biológicas. El efecto irreversible se ha utilizado en la desbacterización de agua y alimentos.

45 El efecto de los campos eléctricos sobre las células biológicas no depende simplemente de la magnitud del campo eléctrico aplicado, sino también de su duración. Esto se puede entender considerando un modelo para el circuito eléctrico equivalente de la célula, mostrado esquemáticamente en la Fig. 1. El modelo mostrado en la Fig. 1 no tiene en cuenta el efecto de las estructuras en el interior de la célula. La célula (en suspensión) se modela mediante una resistencia y una capacitancia. Para la duración de un pulso que es largo comparado con el tiempo de relajación dieléctrico de la suspensión, se puede despreciar el componente capacitivo de la impedancia de la suspensión. Para muchas suspensiones de células y agua de mar (esto es, soluciones acuosas con fuerzas iónicas relativamente altas) el tiempo de relajación dieléctrica es del orden de nanosegundos. La membrana celular se puede modelar como un condensador, el citoplasma como una resistencia. La membrana externa contiene canales a los que afectan la diferencia de potencial aplicada y permiten el flujo de iones a través de la membrana, representado una corriente de fugas. Los canales abiertos por voltaje se pueden modelar como resistencias variables, dependientes de voltaje.

55 Cuando se aplica un pulso de diferencia de potencial a una célula, se acumulan cargas en la membrana y la diferencia de potencial de la membrana aumenta. La constante de tiempo de carga de la membrana celular se puede representar por la ecuación (3):

$$60 \quad \tau = (\rho_1/2 + \rho_2) C r \quad (3)$$

siendo ρ₁ la resistencia del medio de suspensión, por ejemplo agua, siendo ρ₂ la resistencia del citoplasma, C la capacitancia por unidad de área, y r el radio de la célula (célula esférica). Utilizando datos típicos para células, se puede calcular la duración de los pulsos de campo eléctrico requeridos para generar una diferencia de potencial de 1 V a través de la membrana. La energía, W, disipada en la suspensión está dada por:

$$65 \quad W = E^2 \tau / \rho_1 \quad (4)$$

ES 2 300 272 T3

En la Fig. 2 se representan el campo eléctrico y la densidad de energía frente a la duración del pulso para células esféricas de radio de $5 \mu\text{m}$ en una suspensión con una resistencia de $50 \Omega\text{cm}$. Se asume que la resistencia del citoplasma es de $100 \Omega\text{cm}$. Las curvas muestran un mínimo a 150 nsec . Esta es la duración del pulso donde se predice que el aturdimiento o la muerte de este tipo de células biológicas es más eficaz. Se han descrito estudios experimentales que confirman tal mínimo.

Schoenbach, K.H. *et al.*, "The Effect of Pulsed Electric Field on Biological Cells: Experiments and Applications", IEEE Transactions on Plasma Science, 25(2), abril de 1997, pp. 285-292, describe experimentos para explorar el efecto de campos eléctricos pulsados con amplitudes en el rango de 100 V/cm - 100 KV/cm en bacterias y plagas acuáticas. La duración del pulso fue tan corta que el calentamiento de la materia biológica se pudo despreciar (resumen). Para explorar el efecto de campos eléctricos con duraciones de pulso menores que aquellas utilizadas en experimentos anteriores, se utilizaron sistemas de potencia de pulso que permitían que se generaran pulsos de alto voltaje de 60 ns , 300 ns y $2 \mu\text{s}$ de duración. La carga consistía en una suspensión acuosa que contenía los organismos a probar. El medio se colocó en cubetas disponibles comercialmente entre dos electrodos planos de aluminio. Con una distancia mínima de 1 mm , se pudieron obtener campos eléctricos máximos de 100 kV/cm en los sistemas de 60 y 300 ns . Sin embargo, la descarga disruptiva de superficie en la superficie de la suspensión ha limitado el campo máximo a alrededor de 80 kV/cm . No hay divulgación de un agrupamiento de electrodos que comprende al menos un par de agujas capaces de ser insertadas en tejido *in vivo*, conteniendo el tejido las células diana, y siendo capaz de dirigir los pulsos eléctricos ultracortos a dichas células diana *in vivo*.

WO 98/47562 se refiere un aparato de agrupamientos de electrodos que facilita la distribución eficaz de ondas eléctricas, y particularmente la distribución a una región tridimensional predeterminada de tejido en un paciente. Se proporciona un sistema en donde el agrupamiento de electrodos está localizado *in situ* en un paciente. La región de tratamiento predeterminada se puede someter entonces a los efectos de electropermeabilización de los campos eléctricos, que fomenta la introducción de agentes terapéuticos dentro de las células de la región. La onda eléctrica proporcionada por un generador puede ser un pulso que decae exponencialmente, un pulso cuadrado, un tren de pulsos oscilantes unipolares o un tren de pulsos bipolares. La intensidad de campo eléctrico puede estar deseablemente entre 0.2 kV/cm hasta 20 kV/cm , de forma más común de 0.5 kV/cm hasta 3 kV/cm . La duración del pulso puede ser desde 100 nanosegundos hasta 100 milisegundos y puede haber desde 1 hasta 10000 pulsos por segundo. No hay divulgación de pulsos eléctricos que tienen una duración de pulso de no más de un 1 microsegundo y una intensidad de campo eléctrico de más de 10 kV/cm .

Las modificaciones de las células que llevan a la ruptura de la membrana celular pueden llevar a la muerte celular a través de la necrosis, un tipo no fisiológico de destrucción celular. Sería provechoso ser capaz de iniciar la muerte celular a través de apoptosis de una manera selectiva. Esto permitiría la destrucción de las células sin generar el daño no específico a los tejidos circundantes debido a la inflamación y cicatrización que se observa normalmente con la necrosis. La capacidad de modificar selectivamente las células en formas que lleven a apoptosis podría proporcionar un nuevo método para la destrucción selectiva de células/tejido indeseado (por ejemplo, células tumorales, células grasas o células de cartílago) al tiempo que se minimizan los efectos secundarios sobre el tejido circundante.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un aparato para destruir células diana según las reivindicaciones. El pulso de campo eléctrico ultracorto generalmente tiene al menos una amplitud y duración suficientes cuando se aplica como una secuencia de pulsos para modificar estructuras subcelulares en las células diana al menos de una forma transitoria. La amplitud de los pulsos individuales no excede el campo de la rotura irreversible de las células diana. La amplitud y duración de el(los) pulso(s) de campo eléctrico ultracorto(s) se eligen típicamente de modo que sean insuficientes para alterar de forma permanente la permeabilidad de las membranas de superficie de las células diana, por ejemplo, rompiendo las membranas de superficie.

El uso de pulsos de campo eléctrico con duraciones de pulso y tiempos de subida sustancialmente más cortos que los utilizados normalmente en la electroporación convencional proporciona el potencial para métodos no líticos de lesión celular selectiva o ablación fisiológica que se aplicarán a la mayoría de los tipos celulares. Por ejemplo, como ha sugerido la contracción observada en eosinófilos expuestos a uno o más pulsos de campo eléctrico ultracortos, perturbar las estructuras intracelulares puede llevar a la inducción de apoptosis. La inducción localizada de apoptosis se podría utilizar para esculpir tejidos con fines cosméticos o matar selectivamente células tumorales, por ejemplo, para eliminar selectivamente tejidos tales como papilomas y nevos.

El ataque a las subestructuras de las células más que a las membranas de las células puede tener utilidad en tratamientos que implican la destrucción selectiva de células (por ejemplo, células tumorales) sin dañar sustancialmente al tejido(s) circundante(s). La mayoría de las aplicaciones terapéuticas del método del campo eléctrico pulsado requieren que los campos se apliquen a tejidos más que a células individuales. Con los pulsos comparativamente largos que se usan actualmente en tales tratamientos (por ejemplo, de varios cientos de microsegundos de duración), sin embargo, el campo eléctrico parece ser menos eficaz al tratar tejidos comparado con células individuales. Se sabe que aunque el tejido generalizado se puede considerar como un agregado de células, con diferentes tipos de interconexiones célula-célula, la electroporación de tejido consiste en la electroporación de células individuales. Existen dos diferencias principales entre la electroporación de células individuales en una suspensión y la electroporación de tejido. En el tejido, el campo eléctrico local extracelular depende de una manera complicada de muchas células adyacentes. Además, para

tejidos la proporción de volumen extracelular a intracelular normalmente es pequeña, justo lo contrario de la mayoría de las condiciones de electroporación *in vitro*. Esto significa que si el intercambio químico entre los volúmenes intra- y extracelular es la causa principal del estrés celular, y por lo tanto muerte celular, la electroporación de tejidos con pulsos de microsegundos puede ser intrínsecamente menos dañina *in vivo* que la mayoría de las condiciones de electroporación *in vitro*. Puesto que los pulsos ultracortos pueden afectar solo al interior de la célula, se espera que tales pulsos tengan aproximadamente el mismo efecto sobre tejidos que sobre células individuales.

Otra ventaja de usar pulsos ultracortos del tipo empleado en la presente invención es la baja potencia de estos pulsos. Aunque la potencia eléctrica de los pulsos puede ser de varios megavatios, la energía de estos pulsos es con frecuencia tan baja (debido su duración extremadamente corta) que los efectos térmicos se pueden despreciar. El método de la potencia del pulso presente es por lo tanto un método “frío” que permite la modificación de las células a través de efectos eléctricos sin crear ningún efecto térmico sustancial relacionado. Por ejemplo, los efectos térmicos asociados con los pulsos empleados en el presente método típicamente solo generan aumentos de temperatura en el medio o tejido interno del orden de 1-2°C. La capacidad de modificar eléctricamente las células de una manera “fría” es particularmente útil donde el intento es modificar selectivamente estructuras subcelulares dentro de una célula diana sin afectar sustancialmente a la membrana celular.

El aparato según la invención incluye un generador de pulsos capaz de producir una salida de pulsos eléctricos ultracortos y un sistema de distribución capaz de dirigir la salida de pulsos eléctricos a las células diana, por ejemplo, capaz de dirigir selectivamente la salida de pulsos eléctrico a células diana *in vivo* de una manera que evita causar lesiones sustanciales al tejido circundante.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 representa un circuito eléctrico equivalente de una célula en suspensión.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra el campo eléctrico requerido para cargar la membrana de la superficie de una célula a 1 V y la correspondiente densidad de energía frente a la duración del pulso.

La Fig. 3 muestra una célula de leucemia HL-60 y un circuito eléctrico equivalente simplificado de una célula que contiene un núcleo.

La Fig. 4 muestra la curva diferencia de potencial-tiempo para modelado de aplicación de pulsos de campo eléctrico de 60 nsec y 6 μ sec a una célula teórica. La línea de puntos muestra el pulso de diferencia de potencial aplicado, la línea de rayas muestra las diferencias de potencial calculadas a través de la membrana de superficie, la línea sólida gruesa muestra la diferencia de potencial a través de las membranas intracelulares.

La Fig. 5 muestra exámenes microscópicos (aumentos 10X) de neutrófilos humanos teñidos 0, 10, 20 y 30 minutos después de ser sometidos a un pulso de campo eléctrico de 60 nsec, 60 kV/cm (“A4”), sin utilizar un aparato según la invención, en comparación con controles sin tratar (Fresco).

La Fig. 6 muestra exámenes microscópicos (aumentos 10X) de neutrófilos humanos teñidos 0, 10, 20 y 30 minutos después de ser sometidos a un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 40 kV/cm (“B6”), sin utilizar un aparato según la invención, en comparación con controles sin tratar (Fresco).

La Fig. 7 muestra exámenes microscópicos (aumentos 160X) de neutrófilos humanos teñidos inmediatamente después de ser sometidos a un pulso de campo eléctrico de 60 nsec, 60 kV/cm (“A42”), un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 40 kV/cm (“B6”), o un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 60 kV/cm (“B8”) sin utilizar un aparato según la invención.

La Fig. 8 muestra exámenes microscópicos (aumentos 280X) de neutrófilos humanos teñidos inmediatamente después de ser sometidos a un pulso de campo eléctrico de 60 nsec, 60 kV/cm (A4), o un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 40 kV/cm (B6), sin utilizar un aparato según la invención.

La Fig. 9 muestra exámenes microscópicos de neutrófilos humanos teñidos con mieloperoxidasa (aumentos 280X) inmediatamente después de ser sometidos a un pulso de campo eléctrico de 60 nsec, 60 kV/cm (A4), un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 40 kV/cm (B6), o un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 60 kV/cm (B8), sin utilizar un aparato según la invención, en comparación con controles sin tratar (FRESCO).

La Fig. 10 es un gráfico del área nuclear (en píxeles) de las células después de ser sometidas a un pulso de campo eléctrico de 60 nsec, 60 kV/cm (A4), un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 40 kV/cm (B6), o un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 60 kV/cm (B8), sin utilizar un aparato según la invención, en comparación con controles sin tratar (FRESCO).

La Fig. 11 es un gráfico de la densidad absoluta a distancias desde su origen para neutrófilos humanos después de 2 horas de migración en placas rellenas de agarosa en respuesta a estimulación con fMLP bacteriana; los neutrófilos se sometieron a un pulso de campo eléctrico de 60 nsec, 60 kV/cm (A4), un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 40 kV/cm (B6), o un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 60 kV/cm (B8), sin utilizar un aparato según la invención, en comparación con controles sin tratar (FRESCO).

ES 2 300 272 T3

La Fig. 12 es un gráfico de la densidad absoluta a distancias desde su origen para neutrófilos humanos después de 2 horas de migración no estimulada (tampón control) en placas rellenas de agarosa; los neutrófilos se sometieron a un pulso de campo eléctrico de 60 nsec, 60 kV/cm (A4), un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 40 kV/cm (B6), o un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 60 kV/cm (B8), sin utilizar un aparato según la invención, en comparación con controles sin tratar (FRESCO).

La Fig. 13 es un gráfico de la distancia media migrada por neutrófilos humanos en condiciones no estimuladas (tampón control) y estimuladas (fMLP bacteriana) después de ser sometidos a un pulso de campo eléctrico de 60 nsec, 60 kV/cm (A4), un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 40 kV/cm (B6), o un pulso de campo eléctrico de 300 nsec, 60 kV/cm (B8), sin utilizar un aparato según la invención, en comparación con controles sin tratar (FRESCO).

La Fig. 14 es un gráfico que muestra el efecto de exposición de células de leucemia promielocítica HL-60 en fase de crecimiento logarítmico a pulsos de campo eléctrico de duración variable (60 nsec, 2 μ sec, 10 μ sec, ó 200 μ sec).

La Fig. 15 es un gráfico que muestra el efecto de exposición de células de leucemia promielocítica HL-60 en fase de crecimiento estacionario a pulsos de campo eléctrico de duración variable (60 nsec, 2 μ sec, 10 μ sec, ó 200 μ sec).

La Fig. 16 es un gráfico que muestra el porcentaje de apoptosis de células HL-60 como una función del tiempo después de ser sometidas a pulsos IEM de 60 nsec, 60 kV/cm (A4), 300 μ sec, 40 kV/cm (B6) o 300 μ sec, 60 kV/cm (B8).

La Fig. 17 es un gráfico que muestra el porcentaje de necrosis de células HL-60 como una función del tiempo después de ser sometidas a pulsos IEM de 60 nsec, 60 kV/cm (A4), 300 μ sec, 40 kV/cm (B6) o 300 μ sec, 60 kV/cm (B8).

La Fig. 18 es un gráfico que muestra el porcentaje de apoptosis de células HL-60 como una función del tiempo después de ser sometidas a pulsos IEM de 60 nsec, 60 kV/cm (A4), 300 μ sec, 40 kV/cm (B6) o 300 μ sec, 60 kV/cm (B8).

La Fig. 19 es un gráfico que muestra el porcentaje de necrosis de células HL-60 como una función del tiempo después de ser sometidas a pulsos IEM de 60 nsec, 60 kV/cm (A4), 300 μ sec, 40 kV/cm (B6) o 300 μ sec, 60 kV/cm (B8).

La Fig. 20 muestra un esquema de un aparato para modificar células, no según la invención, que incluye un generador de pulsos tipo línea con un interruptor entrehierro puesto en marcha por láser.

La Fig. 21 es un gráfico que muestra su forma de un pulso de campo eléctrico ejemplar (como un gráfico de diferencia de potencial frente al tiempo) que se puede utilizar en los métodos presentes.

La Fig. 22 es un gráfico que muestra un espectro de Fourier (como un gráfico de amplitud en V/Hz frente a frecuencia) del pulso de campo eléctrico mostrado en la Fig. 21.

La Fig. 23 es un gráfico (diferencia de potencial frente a tiempo) que muestra la forma de pulso ejemplar de 60 nsec en comparación con un pulso de 10 microsegundos (10 μ sec).

La Fig. 24 es un gráfico que muestra un espectro de Fourier (como un gráfico de amplitud en V/Hz frente a frecuencia) para los pulsos de 60 nsec y 10 μ sec mostrados en la Fig. 23.

La Fig. 25 es un gráfico que muestra el trazado de la diferencia de potencial frente al tiempo para un pulso eléctrico ultracorto producido por el generador de pulsos ultracortos mostrado en el panel del recuadro; el pulso eléctrico resultante es casi rectangular en forma y alcanza una diferencia de potencial máxima en el rango de 5-6 kV, que cuando se aplica a una suspensión de células a través de electrodos separados 0.1 cm, utilizando un aparato no según la invención, proporciona intensidades eléctricas en el rango de 50-60 kV/cm.

La Fig. 26 muestra exámenes microscópicos de eosinófilos humanos teñidos con calceína (derecha) y mediante el colorante Wright-Giemsa modificado (izquierda). Los paneles superiores muestran la apariencia de los eosinófilos no tratados (control), con tinción negativa de los gránulos intracelulares dentro los eosinófilos teñidos con calceína. Tras 3 (paneles medios) ó 5 (paneles inferiores) pulsos (60 nsec, 53 kV/cm), una subserie de eosinófilos marcados con calceína desarrolla una tinción brillante de los gránulos intracelulares al tiempo que mantienen su marcaje citoplásmico de calceína, lo que indica pérdida de la integridad de la membrana en los gránulos teñidos brillantemente sin pérdida de la integridad de la membrana de superficie (es decir, retención de la tinción citoplásmica de calceína).

La Fig. 27 muestra exámenes microscópicos de los efectos del tratamiento con Triton X-100 en la tinción de calceína libre de gránulos de eosinófilos; FILA SUPERIOR: imágenes de tinción con Wright-Giemsa (arriba) y fluorescente (abajo) de eosinófilos (izquierda), eosinófilos teñidos con calceína-AM (1 μ M) (centro), y eosinófilos incubados durante 5 minutos en Triton X-100 al 0.001% + calceína libre 1 μ M (derecha); FILA INFERIOR: imágenes de tinción con Wright-Giemsa (arriba) y fluorescente (abajo) de eosinófilos tratados con calceína libre 1 μ M + Triton X-100 al 0.005% durante 5 minutos (izquierda), eosinófilos tratados con Triton X-100 al 0.001% + calceína libre 1 μ M duran-

te 5 minutos (centro) y eosinófilos incubados con Triton X-100 al 0.05% + calceína libre 1 μ M durante 5 minutos (derecha).

La Fig. 28 muestra las líneas de un campo eléctrico generado en tejido entre un par de electrodos de aguja insertados en el tejido.

La Fig. 29 muestra un agrupamiento hexagonal de posiciones que se pueden usar para aplicar pulsos de campo eléctrico ultracortos a un área definida de tejido *in vivo*.

10 Descripción detallada

En el circuito equivalente simple mostrado en la Fig. 1, se modeló la célula como un medio homogéneo, conductor rodeado por una membrana dieléctrica. Tener en cuenta las estructuras en las células, tal como el núcleo de la célula en células eucariotas, requiere un modelo más complejo del circuito equivalente. Se pueden utilizar las células de leucemia HL-60 para demostrar la complejidad de las estructuras en el interior de la célula. El núcleo es claramente visible como lo son las estructuras más pequeñas dentro de él, por ejemplo, los nucleolos. Se puede modelar las subestructuras tratando la membrana que rodea el núcleo como un condensador y el interior del núcleo como una resistencia, ambos elementos en serie y en paralelo a la resistencia que describe el citoplasma en el primer circuito equivalente, simplificado (ver, por ejemplo, la Fig. 3). De forma similar, los nucleolos también se pueden describir mediante un arreglo de condensador resistencia en paralelo a la resistencia del núcleo.

Los principios básicos de los circuitos eléctricos indican que los campos eléctricos de baja frecuencia afectarán principalmente la capacitancia mayor, que es la membrana externa. Al aumentar la frecuencia, la membrana externa, sin embargo, se evitará de forma efectiva, y la diferencia de potencial aplicada se mostrará a través de la membrana interna (del núcleo). Este modelo predice que a frecuencias de alrededor de 1 MHz, la diferencia de potencial aplicada debería mostrarse principalmente a través de la membrana del núcleo, más que a través de la membrana externa. Esto significa que sería de esperar que los pulsos más cortos con componentes de frecuencias más altas afecten al núcleo de una célula más que a la membrana de la célula.

Asumiendo que diámetro de las estructuras intracelulares diana, d , es pequeño comparado con el diámetro de la célula, y que las estructuras están situadas en el centro de la célula, la diferencia de potencial a través de la estructura intracelular, V_{is} , se puede modelar según la ecuación:

$$V_{is} = E(t)d = j(t)dp_{is} = dp_{is}(E(t)/\rho_c)\exp(-t/T_c) \quad (5)$$

donde ρ_{is} es la resistencia de la estructura intracelular diana. Se predice que la carga de la membrana intracelular ocurra con una constante de tiempo, T_{is} :

$$T_{is} = c_{is}d/2(\rho_c/2 + \rho_{is}) \quad (6)$$

La diferencia de potencial a través de la membrana de la estructura intracelular, V_{ism} , se da por consiguiente como:

$$V_{ism} = V_{is}(1 - \exp(-t/T_{is})) = dp_{is}(E_0/\rho_c)\exp(-t/T_c)(1 - \exp(-t/T_{is}))[u(0) - u(T)] \quad (7)$$

donde $u(0)$ y $u(T)$ son funciones escalón a $t=0$ y $t=T$.

El desarrollo temporal de la diferencia de potencial aplicada, la diferencia de potencial a través de la membrana de superficie aquella a través de la membrana de la estructura intracelular (ecuación 7) se muestran en la Figura 4 para los parámetros celulares $D=0 \mu\text{m}$, $d=5 \mu\text{m}$, $\rho_c=\rho_n=100 \Omega\text{m}$, $c_m=1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $c_n=0.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, y una duración del pulso de $T=60 \text{ nsec}$. En este caso, se aplica un pulso rectangular, mientras que en las situaciones experimentales, el pulso es más típicamente trapezoidal. Se ha descrito el valor para la capacitancia de la membrana de la superficie externa de la célula en trabajos publicados (ver, por ejemplo, Schwan, *Biophysik*, 1, 190 (1963)) y se asume que la capacitancia de las estructuras intracelulares es bien igual bien la mitad de este valor, dependiendo de la estructura de la membrana intracelular específica. El núcleo está rodeado por dos membranas de bicapa lipídica que forman la envuelta nuclear, mientras que otras estructuras intracelulares (por ejemplo, gránulos intracelulares) pueden tener solo una membrana de bicapa lipídica alrededor de ellos.

ES 2 300 272 T3

A partir de este modelo teórico simple, se puede extraer varias conclusiones:

1. La diferencia de potencial a través de la membrana intracelular puede alcanzar valores del mismo orden que la diferencia de potencial a través de la membrana externa si la duración del pulso es mayor que el tiempo de carga de la membrana intracelular y el tiempo de subida del pulso es pequeño comparado con este tiempo de carga. La importancia de la segunda condición se puede ilustrar considerando la respuesta eléctrica de una célula a dos pulsos con el mismo campo eléctrico, pero bastante diferentes en los tiempos de subida (y duraciones). Se supone que los pulsos eléctricos son similares en forma pero el pulso de duración ultracorta (60 nsec) tiene tiempos de subida y bajada de 10 nsec, mientras que el pulso más largo (6 μ sec) tiene tiempos de subida y bajada de 1 μ sec. Si las dimensiones de las células, capacitancias y resistencias son iguales, el pulso corto, de tiempo de subida rápido da como resultado diferencias de potencial a través de las membranas intracelular y de superficie que son comparables para ambas membranas, mientras que el pulso más largo con el tiempo de subida de microsegundos da como resultado diferencia de potencial casi despreciable a través de la membrana intracelular. La diferencia de potencial a través de la membrana externa para el pulso más largo, sin embargo, alcanza el valor de la diferencia de potencial aplicada, favoreciendo la electroporación de esta membrana. Este efecto se ha usado en aplicaciones médicas donde se usan pulsos en el rango temporal de decenas de microsegundos a milisegundos para facilitar la distribución de drogas y genes a las células.

2. Para alcanzar diferencias de potencial de más de 1 voltio a través de membranas intracelulares, se requieren amplitudes de campo eléctrico en el rango de megavoltio/m en una escala de tiempo del tiempo de carga de la membrana intracelular. Para las estructuras intracelulares con dimensiones características de μ m, capacitancias de membrana del orden de μ F/cm², y resistencias de citoplasma de 100 Ω m, el tiempo de carga (ecuación 6) es menor de 6 nsec. La velocidad de cambio de intensidad del campo eléctrico requerida es por consiguiente $dE/dt > 10^{14}$ voltio/(metro segundo). Solo si se satisfacen ambas condiciones (es decir, amplitud de campo eléctrico grande más velocidades de cambio en el campo eléctrico extremadamente rápidas), se pueden esperar efectos intracelulares.

3. Se espera que la diferencia de potencial a través de las membranas intracelulares sea casi linealmente dependiente del diámetro de la estructura intracelular. Serían de esperar efectos más pronunciados en las estructuras internas más grandes con los mismos parámetros eléctricos.

Alcanzar una diferencia de potencial crítica a través de la membrana intracelular es condición necesaria pero no suficiente para la "electromanipulación intracelular" ("IEM"). Para cambiar las estructuras de la membrana, por ejemplo, abrir defectos de membrana a un tamaño que permita el paso de macromoléculas a través de ellos, se necesita aplicar la diferencia de potencial crítica durante el tiempo suficiente para permitir la expansión de los defectos a un tamaño apropiado. Se han descrito estimaciones de la diferencia de potencial requerida para alcanzar tales efectos en la membrana de superficie, pero no existen tales estimaciones para membranas intracelulares. El modelo descrito aquí por lo tanto solo proporciona condiciones para el inicio de los efectos dependientes de campo eléctrico sobre las membranas intracelulares, y no describe los procesos específicos que suceden en las membranas. Sin embargo, este análisis ilustra claramente que reducir la duración del pulso, o más precisamente, reducir el tiempo de subida del pulso a valores menores que el tiempo de carga para las membranas intracelulares, y aumentar las intensidades del campo eléctrico al rango de megavoltio/m permitiría el ataque preferencial a las membranas intracelulares. El trabajo experimental descrito aquí establece que al menos en ciertos casos, la aplicación de una secuencia de pulsos múltiples ultracortos dentro de un período de tiempo relativamente corto puede amplificar el efecto sobre las estructuras intracelulares sin causar defectos sustanciales en la membrana de la superficie externa.

El método presente típicamente utiliza pulsos de campo eléctrico ultracortos que tienen una amplitud y duración suficientes para modificar estructuras subcelulares en las células diana, al menos cuando se aplican como una secuencia de pulsos ultracortos en un período de tiempo relativamente corto, por ejemplo, una secuencia de 3-5 pulsos ultracortos en un intervalo de tiempo de 10 segundos o menos. La amplitud y duración de cada pulso de campo eléctrico ultracorto se puede elegir de modo que sea insuficiente para alterar la permeabilidad de las membranas de superficie de las células diana, por ejemplo, induciendo poros en las membranas de las células. Las células diana están presentes como parte de un tejido. Cada pulso de campo eléctrico ultracorto tiene una duración de pulso de no más de alrededor de 1 microsegundo y una amplitud de al menos alrededor de 20 kV/cm. Caracterizados de una manera diferente, los pulsos de campo eléctrico ultracortos típicamente tienen una duración de pulso de no más que alrededor de 1 microsegundo y proporcionan una densidad total de energía de al menos alrededor de 75 mJ/cc. Preferiblemente, los pulsos de campo eléctrico ultracortos proporcionan una densidad total de energía de no más de alrededor de 10 J/cc. Más típicamente, la densidad total de energía proporcionada por cada pulso de campo eléctrico ultracorto es de alrededor de 75 mJ/cc hasta alrededor de 2000 mJ/cc y, preferiblemente, alrededor de 100 mJ/cc hasta alrededor de 1000 mJ/cc. En casos en los que se aplican pulsos extremadamente cortos, por ejemplo, pulsos que tienen una duración de alrededor de 10 nanosegundos o menos, la densidad total de energía proporcionada por el pulso de campo eléctrico puede ser sólo del orden de alrededor de 10 a 20 mJ/cc. Además de tener duraciones cortas, los pulsos de campo eléctrico utilizados en los métodos presentes normalmente tienen tiempos de subida de 50 nsec o menos.

La amplitud de un pulso de campo eléctrico (la diferencia de potencial aplicada dividida por la distancia entre los electrodos) es generalmente al menos alrededor de 20 kV/cm, pero no debería exceder el voltaje de ruptura del tejido que incluye las células diana. El voltaje de ruptura aumenta con la disminución de la duración del pulso, y se puede determinar experimentalmente. En las condiciones normalmente empleadas en el método presente, sin embargo, el

voltaje de ruptura en general no excede de 500 kV/cm. Los pulsos de campo eléctrico utilizados en los métodos presentes que tienen duraciones de 10 a 500 nsec típicamente tienen amplitudes de alrededor de 20 kV/cm hasta alrededor de 300 kV/cm.

5 Para minimizar los efectos potenciales en la temperatura media interna del medio (“efectos térmicos”), los pulsos de campo eléctrico generalmente tienen un tiempo de subida rápido y una duración corta. Los pulsos deberían ser preferiblemente de menos de un microsegundo, pero más de 100 picosegundos de duración. La duración normal de un pulso es de alrededor de 1 nanosegundo hasta alrededor de 500 nanosegundos, teniendo los pulsos típicamente una duración de 10 hasta 300 nanosegundos. La duración óptima del pulso variará dependiendo del tipo de
10 célula, tipo de tejido y tratamiento deseado, entre otros factores. El pulso debería ser preferentemente rectangular o trapezoidal, pero también se pueden utilizar otras formas de pulsos. Por ejemplo, para abrir tanto las membranas externas como internas de la célula, se podría combinar un pulso intenso corto con otro pulso menos intenso más largo. Otros ejemplos de formas de pulsos adecuados incluyen pulsos exponenciales que decaen, pulsos unipolares y pulsos bipolares.

15 El tiempo de subida del pulso de campo eléctrico ultracorto es típicamente de no más de alrededor del 20% y, preferiblemente, de no más de alrededor del 10% de la duración del pulso. Por ejemplo, si la duración del pulso es de alrededor de 100 nanosegundos, el tiempo de subida del pulso es preferiblemente de alrededor de 10 nanosegundos o más corto. Para pulsos con duraciones de pulso de alrededor de 400 nanosegundos o más largos, son normales tiempos de subida del pulso de alrededor de 30-40 nanosegundos. Con pulsos que tienen duraciones extremadamente cortas, por ejemplo, un nanosegundo o menos, el tiempo de subida es con frecuencia un porcentaje mayor de la duración del pulso. Por ejemplo, pulsos con una duración de menos de un nanosegundo, pueden tener normalmente un tiempo de subida que es de hasta alrededor del 50% de la duración del pulso.

25 La duración, tiempo de subida y distribución de frecuencias de la transformada de Fourier del pulso están relacionadas. La Figura 24 muestra el espectro de Fourier de un pulso corto (60 nsec) que se extiende al rango de 10 MHz y para un pulso largo (10 microsec) que se extiende hasta el rango de 100 KHz. Con el aumento en la frecuencia (es decir, disminución del tiempo de subida del pulso), la membrana de la superficie externa de la diana se evitará de forma efectiva, y la diferencia de potencial aplicada se mostrará a través de la membrana interna (del núcleo). Este comportamiento se muestra en la Fig. 4, donde se representa la diferencia de potencial a través de la membrana de
30 superficie (externa) y aquella a través de la membrana del núcleo frente a la frecuencia. La Figura 4 predice que a frecuencias de alrededor de 1 MHz, la diferencia de potencial aplicada debería mostrarse principalmente a través de la membrana de estructuras subcelulares, tal como el núcleo, más que a través de la membrana de la superficie externa. Los pulsos de campo eléctrico con una duración de menos de alrededor de 1 microsegundo y tiempos de subida de 40 nanosegundos o menos tienen transformadas de Fourier que incluyen frecuencias de más de 1 MHz con amplitudes sustanciales.

El espectro de Fourier de los pulsos que se utilizan en los métodos presentes puede incluir frecuencias con amplitudes sustanciales de hasta alrededor de 1 GHz. Típicamente, los pulsos utilizados en los métodos presentes tienen espectros de Fourier que incluyen frecuencias por encima de 1 MHz con amplitudes mayores del 50% de la diferencia de potencial máxima en el espectro (de aquí en adelante referido como mayor que “ $V_{MAX}/2$ ”). Preferiblemente, los espectros de Fourier de los pulsos incluyen frecuencias entre 5 y 50 MHz con amplitud mayor que $V_{MAX}/2$. Por ejemplo, un pulso rectangular de 60 nanosegundos tal como el que se muestra en la Fig. 21 tiene un espectro de Fourier que incluye frecuencias con amplitud mayor que $V_{MAX}/2$ hasta alrededor de 10 MHz. Por el contrario, el espectro de
45 Fourier de un pulso rectangular de 10 microsegundos tiene solo frecuencias de esta amplitud hasta alrededor de 200-500 kHz (ver la comparación en las Figs. 23 y 24).

Como se ha indicado anteriormente, para modificar estructuras subcelulares en las células diana puede ser provechoso aplicar una serie de pulsos de campo eléctrico ultracortos en un intervalo de tiempo relativamente corto. Por ejemplo, se ha encontrado que la aplicación de una secuencia de 3 a 5 pulsos de campo eléctrico ultracortos (por ejemplo, pulsos trapezoidales con duraciones de 10-300 nsec y amplitudes de alrededor de 25 a 300 kV/cm) puede ser más eficaz para modificar subestructuras que un pulso individual de la misma amplitud y duración (ver el Ejemplo 9). Por ejemplo, la aplicación de secuencia de multipulsos con aproximadamente un intervalo de un segundo (retraso) entre pulsos puede romper gránulos en los eosinófilos sin daño significativo a la membrana externa de la célula. Donde
55 se emplean secuencias de multipulsos en los métodos presentes, el intervalo de tiempo entre los pulsos subsiguientes puede variar en un amplio rango, por ejemplo, entre 1.0 milisegundos y 100 segundos. Como otro ejemplo, las secuencias de pulsos múltiples con intervalos de tiempo entre pulsos de alrededor de 0.1-3 segundos son bastante adecuadas para iniciar apoptosis. Aunque se pueden utilizar números mayores de pulsos, las secuencias multipulso utilizadas en los métodos presentes típicamente incluyen hasta alrededor de 20 pulsos, que en general están espaciados a intervalos regulares de tiempo. Se pueden obtener resultados adecuados con frecuencia para ciertos tipos de células (por ejemplo, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos T) aplicando 3-5 pulsos de campo eléctrico ultracortos en un período de tiempo relativamente corto, por ejemplo, en un período de tiempo no mayor de alrededor de 5 a 10 segundos. Como se ha indicado anteriormente, la amplitud y duración del pulso de campo eléctrico ultracorto se eligen típicamente de modo que la secuencia de pulsos no altere de forma permanente la permeabilidad de las membranas de superficie de las
65 células diana, por ejemplo, rompiendo las membranas de superficie.

El método presente se puede utilizar para modificar diferentes células. Por ejemplo, las células diana pueden ser cualquiera de diferentes células normales, tal como adipocitos, células de hueso, células vasculares, células muscula-

ES 2 300 272 T3

res, células de cartílago y similares. En algunos casos, la técnica se puede usar para modificar selectivamente ciertos tipos de células en presencia de otras células. Por ejemplo, los parámetros del método presente se pueden ajustar para inducir selectivamente apoptosis en células tumorales *in vivo* (por ejemplo, células de carcinoma, células de sarcoma, o células de papiloma) sin afectar de forma sustancial a las células normales en el tejido circundante. Como otro ejemplo, la técnica se puede utilizar para destruir selectivamente eosinófilos en una mezcla que incluye eosinófilos y neutrófilos (ver, por ejemplo, la Tabla II en el Ejemplo 4 aquí). Los experimentos descritos aquí indican que las técnicas presentes se pueden utilizar para modificar selectivamente células de crecimiento más rápido en presencia de células de crecimiento más lento (por ejemplo, células en fase estacionaria). En otros casos, la selectividad puede estar basada simplemente en limitar espacialmente la aplicación de pulso(s) de campo eléctrico ultracorto(s). Por ejemplo, utilizando una configuración de electrodos apropiada, las células en un área predeterminada del tejido se pueden modificar selectivamente *in vivo* (por ejemplo, a través del inicio de la apoptosis) sin alterar las células en el tejido inmediatamente circundante. Los dispositivos que incorporan tales configuraciones de electrodos se utilizan actualmente con pulsos convencionales de electroporación (pulsos con duración de μsec) para aumentar la distribución de drogas terapéuticas a células en un área predeterminada.

El aparato de la invención se puede usar en un método que se puede utilizar para iniciar apoptosis en células diana aplicando al menos un pulso de campo eléctrico ultracorto con una duración del pulso de no más de alrededor de 1 microsegundo a las células diana. En tales casos, el pulso de campo eléctrico normalmente proporciona una densidad total de energía de al menos alrededor 75 mJ/cm, aunque se pueden utilizar pulsos con menor energía, en particular donde el pulso tiene una duración extremadamente corta y una amplitud relativamente alta o donde se aplican secuencias de pulsos múltiples a las células diana en un intervalo de tiempo relativamente corto, por ejemplo, con un espaciamiento de 1-2 segundos entre los pulsos sucesivos.

Tras la elección de los parámetros correctos, se puede usar el presente método para destruir selectivamente células diana en una mezcla que incluye las células diana y un segundo tipo de células. Por ejemplo, se puede utilizar el método para destruir eosinófilos de forma selectiva en una mezcla que incluye eosinófilos y neutrófilos.

Aparato de electromanipulación intracelular

El método presente típicamente utiliza un aparato para electromanipulación intracelular que incluye un generador de pulsos y un sistema de distribución adaptado para dirigir la salida del pulso eléctrico a las células diana. El generador de pulsos incluye una red formadora de pulsos y un interruptor de alto voltaje. La red formadora de pulsos puede ser un cable de lato voltaje, línea triplaca, o una red formadora de pulsos construida de condensadores e inductores individuales en un arreglo de línea de transmisión. El interruptor de alto voltaje puede ser de forma adecuada un interruptor en estado gaseoso, líquido o sólido. La energía en la red formadora de pulsos se puede almacenar de forma capacitiva, que requiere un interruptor de cerrado para liberar un pulso, o de forma inductiva, que requiere un interruptor de apertura para liberar un pulso. Después de desencadenar el interruptor, se lanza un pulso eléctrico a la carga, es decir, las células diana en forma de tejido. El interruptor se puede hacer funcionar por medio de varios métodos comunes, por ejemplo, de forma óptica o eléctrica. La última se puede alcanzar utilizando un tercer electrodo o mediante sobrevoltaje en el interruptor. Se muestra un ejemplo de un sistema de energía pulsado de cable adecuado, diseñado para generar pulsos ultracortos del tipo utilizado en el método presente en la Fig. 20. La Figura 21 muestra la forma típica de un pulso utilizado en los métodos presentes y el espectro de Fourier correspondiente del pulso se muestra en la Figura 22. Los pulsos de campo eléctrico pueden variar en longitud (“duración”) cambiando la red formadora de pulsos, tal como mediante reducción o aumento de la longitud del cable o la línea triplaca, o utilizando un interruptor que se puede cerrar o abrir. Se describe un ejemplo específico de un aparato adecuado para modificar células mediante electromanipulación intracelular en el Ejemplo 10 aquí.

La “carga”, que incluye las células diana en el tejido está localizada entre dos o más electrodos. Estos electrodos pueden ser de material sólido, alambres, o combinaciones de los mismos. Se conecta un(a) (serie de) electrodo(s) a la conexión de alto voltaje del generador de pulsos, y un(a) segunda (serie de) electrodo(s) se conecta a la conexión de tierra del generador de pulsos de una manera adecuada, por ejemplo, a través de una segunda línea de transmisión o un cable de alto voltaje. El material del electrodo es un conductor, lo más normal metal.

Un generador de pulsos de campo eléctrico ultracortos típico (“generador “USPEF”) incluye una red formadora de pulsos distribuida, un interruptor para permitir la transferencia rápida de energía eléctrica a la carga, y la carga misma (ver, por ejemplo, la Figura 25, recuadro). Si se carga tal red formadora de pulsos hasta 18 kV, y después se libera, esta carga puede producir un pulso de duración ultracorta casi rectangular (ver Figura 25), que cuando se aplica a una carga de 10 Ω , produce una diferencia de potencial máxima de 9 megavoltios. La intensidad de campo eléctrica correspondiente entre dos electrodos separados por 1.0 mm es 90 kV/cm. La potencia eléctrica máxima, V^2/R , que se puede alcanzar en estas condiciones es de 8.1 MW, mientras que la energía (potencia x duración del pulso) transferida a la carga es solo de 0.49 julios. Para un volumen de suspensión de células de 100 μL , la densidad de energía es por lo tanto 4.5 J/cc. Esta transferencia de energía da como resultado un aumento en la temperatura máxima calculado de solo alrededor de 1°K para un pulso individual.

En una forma de realización particularmente útil, el aparato incluye un generador de pulso capaz de producir pulsos eléctricos ultracortos y un sistema de distribución capaz de dirigir selectivamente la salida de pulsos eléctricos a las células diana *in vivo*, por ejemplo, capaz de dirigir selectivamente la salida de pulsos eléctricos a células tumorales *in vivo* de una manera que evita causar lesiones sustanciales al tejido circundante. El generador de pulsos

ES 2 300 272 T3

en un aparato de este tipo es típicamente capaz de generar pulsos eléctricos que tienen una duración de 1 a 500 nanosegundos y amplitudes de al menos 10 kV/cm. El sistema de distribución incluye uno o más pares de electrodos capaces de ser insertados en tejido *in vivo* en forma de una agrupación de electrodos de agujas. En otra configuración, el sistema de distribución incluye al menos un electrodo que es un componente de un catéter. Las configuraciones básicas para sistemas de distribución se describen en WO-A-97/49450. Para su uso en los métodos presentes, tal sistema de distribución no necesita incluir un puerto de infusión para la administración intravascular de una composición farmacéutica.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para asistir al experto en la materia en hacer y usar la misma. No se pretende que los ejemplos de un modo u otro limiten el ámbito de la invención.

Ejemplo 1

IEM de suspensiones de neutrófilos (no es parte de la invención)

Se realizaron experimentos para determinar los efectos de pulsos eléctricos de banda ultra ancha, baja energía, corta duración (Electromanipulación intracelular o "IEM") para inducir muerte celular retrasada, dependiente del tiempo y/o dependiente de la energía/potencia en neutrófilos humanos. Se sometieron grupos de células a pulsos individuales rectangulares que tenían los siguientes parámetros y se compararon con células control no tratadas: A4 - 60 nsec, 60 kV/cm; B6 - 300 nsec, 40 kV/cm; y B8 - 300 nsec, 60 kV/cm.

Las células se tiñeron con calceína-AM, una sonda fluorescente verde que tiñe el citoplasma de células vivas, intactas, y después se expusieron a varios pulsos de IEM. Inmediatamente después de la exposición a IEM, las células se tiñeron con homodímero de bromuro de etidio (EtBr), una sonda fluorescente roja no permeable a la membrana que tiñe el núcleo de las células que muestran daño en la membrana plasmática. Las células se centrifugaron sobre portaobjetos de vidrio (cytospin). Las células se observaron en condiciones para fluorescencia de calceína (panel izquierdo) o EtBr (panel medio) (ver Figs. 5-7). Las imágenes se capturaron, y se marcaron los campos. Las células se tiñeron después con colorante de Wright (panel derecho), se observaron los mismos campos, y se capturaron las imágenes en condiciones para microscopía óptica. Las imágenes se observaron a una amplificación de 10X.

Los neutrófilos humanos recién aislados muestran una duración de la vida limitada y sufren muerte celular durante el cultivo *in vitro*. A tiempo 0 (T0) después de la IEM, solo un pequeño porcentaje de células (2-5%) muestran fluorescencia de EtBr, lo que indica pocas células con la membrana rota (ver la Fig. 5a). Después de 1 hora, se indica un pequeño aumento en el número de células rotas. Las células aparecen como pequeños círculos rosáceos (citoplasma) con puntos purpúreos oscuros (núcleos) dentro de ellos.

Con los parámetros de pulso de A4 a T0 después de la IEM, no se observa aumento en el número de células fluorescente con EtBr, lo que indica que las células están aún intactas (ver Fig. 5). Se produce un pequeño aumento dependiente del tiempo en el número de neutrófilos que muestran fluorescencia de EtBr, indicando un pequeño aumento en la muerte celular. A T30, hay un pequeño aumento en el número de células muertas comparadas con las células control de T30.

Con los parámetros de pulso B6 a T0 después de la IEM, no se observa aumento en el número de fluorescencia de EtBr, lo que indica que las células están aún intactas (ver Fig. 6). Sin embargo, se produce un aumento más rápido en el número de células fluorescentes con EtBr con el tiempo. Obsérvese en B6, a T20 y T30 (panel medio) hay aumentos en el porcentaje de células muertas y en el panel de la derecha, son evidentes aumentos en el número de células lisadas, rotas. Estas aparecen como manchas rosáceas (citoplasma derramado) alrededor de núcleos oscuros. Se observaron resultados similares con el pulso B8.

Ejemplo 2

Modificación selectiva de estructuras subcelulares de neutrófilos

Se examinó la capacidad de la IEM para alterar estructuras subcelulares sin romper la membrana plasmática. Se "modificaron" vesículas que contenían proteasas en los neutrófilos antes de que se "modificara" el núcleo, demostrando de esta manera selectividad para modificar estructuras subcelulares.

Método: Los parámetros de IEM incluyeron sin tratar o control (fresco), A4 (60 nsec, 60 kV/cm), B6 (300 nsec, 40 kV/cm), y B8 (300 nsec, 60 kV/cm). Todas las exposiciones fueron inmediatamente después de la exposición de IEM (T0) y las imágenes fueron a 160X aumentos (Fig. 7) ó 280X aumentos (Figuras 8 y 9).

Resultados: Figura 7. Con condiciones de parámetros de pulso A4 a T0 tras la IEM, no se observó aumento en la fluorescencia con EtBr, lo que indica que las células están aún intactas. Los neutrófilos A4 mostrados están intactos y muestran morfología similar a las células control. El citoplasma muestra fluorescencia (panel izquierdo) y tinción de Wright (panel derecho) relativamente uniformes. Los cambios nucleares son mínimos (tinción púrpura oscuro de núcleos lobulados o irregulares, rodeados por un citoplasma teñido más claro).

ES 2 300 272 T3

Por el contrario, con los parámetros del pulso B6 a T0 tras la IEM, el citoplasma muestra fluorescencia con calceína desigual con “poros” o “agujeros” que muestran la ausencia de fluorescencia (panel izquierdo). La tinción de Wright (panel derecho) también indica “poros” o “agujeros”. La tinción nuclear aparece de alguna manera desigual, con inicios de evidencia de “poros” o “agujeros”.

Con los parámetros del pulso B8 a T0 tras la IEM, la tinción citoplásmica es casi inexistente y la tinción nuclear muestra “poros” o “agujeros” significativos (panel derecho). El control B8 (panel izquierdo, tinción de Wright) muestra los neutrófilos no expuestos a IEM (normal), pero preparados al mismo tiempo que los neutrófilos expuestos a la IEM B8.

B5 (panel derecho, tinción de Wright) muestra condiciones de IEM (300 nsec, 30 kV/cm) entre A4 y B6. Obsérvese cómo los “poros” o “agujeros” empiezan a hacerse evidentes en el citoplasma. El control B5 (panel izquierdo, tinción de Wright) muestra neutrófilos no expuestos a IEM (normal), pero preparados al mismo tiempo que los neutrófilos expuestos a IEM B5.

Figura 8. Los neutrófilos de los parámetros de pulso A4 y B6 se muestran a una amplificación mayor (280X) para mostrar de forma más clara las características citoplásmicas. Los “poros” o “agujeros” están presentes en B6, pero no en A4.

Figura 9. Se muestran los neutrófilos tras la tinción con mieloperoxidasa, que tiñe las vesículas de los neutrófilos que contienen proteasas utilizadas para matar bacterias. La tinción con mieloperoxidasa a T0 en frescos y parámetros A4 de IEM aparece relativamente granular, indicando la presencia de numerosas vesículas pequeñas que contienen proteasas. Con parámetros B6 de IEM, la tinción es más difusa, lo que indica la ruptura de vesículas. Con los parámetros B8 de IEM, la tinción es casi inexistente, indicando que casi todas las vesículas se han roto con las condiciones de energía/potencia más altas.

Ejemplo 3

IEM induce la contracción nuclear en células

Se examinó la capacidad de IEM para inducir contracción nuclear en neutrófilos y células HL-60. La contracción nuclear es una característica típica de la muerte celular por apoptosis (muerte celular programada).

Método: Los parámetros de IEM incluyeron sin tratar o control (fresco), A4 (60 nsec, 60 kV/cm), B6 (300 nsec, 40 kV/cm), y B8 (300 nsec, 60 kV/cm). Las células se tiñeron con tinción de Wright inmediatamente después de ser sometidas al pulso de IEM, los núcleos se ajustaron a la escala gris y se determinó el área de píxeles. Se determinaron los tamaños de los núcleos de 30 a 42 células y se representó cada uno según el área de píxel.

Resultado: Los núcleos de neutrófilos expuestos a los tres parámetros de IEM son significativamente más pequeños que las células control (ver Figura 10). Se determinó el área nuclear media en píxeles para cada condición (condiciones de IEM). En contraste con el control que tenía un área media de píxeles de 15152 ± 338 (30 determinaciones), las células sometidas a un pulso de IEM tenían las siguientes áreas medias en píxeles:

A4 - 11871 ± 324 (30 determinaciones);

B6 - 13814 ± 338 (42 determinaciones); y

B8 - 12147 ± 338 (35 determinaciones).

Las células de leucemia promielocítica HL-60 también mostraron contracción nuclear (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Selectividad de IEM basada en el tipo celular

Se examinaron los parámetros de IEM requeridos para inducir muerte celular en diferentes tipos de células. Se observó que los eosinófilos eran más sensibles a IEM que los neutrófilos.

Método: Los parámetros de IEM incluyeron sin tratar o control (fresco), A4 (60 nsec, 60 kV/cm), B6 (300 nsec, 40 kV/cm), y B8 (300 nsec, 60 kV/cm) así como parámetros de IEM adicionales como se indica. Las preparaciones de neutrófilos humanos incluyen algunos eosinófilos contaminantes, que son más abundantes durante las estaciones de fiebre del heno/alergia (al tiempo de estos estudios). Se determinó el número de eosinófilos como un porcentaje del número de neutrófilos mediante morfología y conteo de células con un microscopio óptico.

ES 2 300 272 T3

Resultado: Al aumentar la energía/potencia de la IEM, el número de eosinófilos presentes inmediatamente después de la IEM desciende significativamente de la población de células sin pérdidas significativas de neutrófilos (ver la Tabla I).

5

TABLA I

	<u>Porta #</u>	<u>nsec</u>	<u>kV/cm</u>	<u>Neutrófilos</u>	<u>Eosinófilos</u>	<u>% eosinófilos</u>
10	Fresco	0	0	183	17	9.0
	A1	60	30	194	6	3.0
	A2	60	40	190	10	5.0
15	A3	60	50	190	10	5.0
	A4	60	60	192	8	4.0
	B5	300	30	188	12	6.0
20	B6	300	40	200	0	0.0
	B7	300	50	200	0	0.0
	B8	300	60	199	1	0.5
25	B9	300	~80	200	0	0.0

30 Ejemplo 5

Efecto de IEM sobre la quimiotaxis (no es parte de la invención)

35 La IEM altera la función de los neutrófilos sin romper la membrana plasmática. Los efectos sobre la quimiotaxis son diferentes que los efectos sobre el movimiento no estimulado, lo que sugiere un efecto selectivo sobre la función de los neutrófilos.

40 *Método:* Los parámetros de IEM incluyeron sin tratar o control (S), A4 (60 nsec, 60 kV/cm), B6 (300 nsec, 40 kV/cm), y B8 (300 nsec, 60 kV/cm). Las células se expusieron a varios parámetros de IEM, se colocaron en pocillos cortados en placas rellenas de agarosa, y después se indujeron a arrastrarse en respuesta a un tampón control (*movimiento no estimulado*) o a un estimulante químico de fMLP bacteriano (*quimiotaxis*). Después de dos horas de movimiento en agarosa, las células se tiñeron y se determinaron la densidad absoluta a distancias del origen y la distancia media migrada por la población de neutrófilos mediante análisis de imagen.

45 *Resultado:* Para la quimiotaxis, hay una relación directa entre energía/potencia y la inhibición de la función de la quimiotaxis; mayor energía/potencia da como resultado aumentos en la inhibición de la quimiotaxis determinada mediante la densidad absoluta a distancias del origen en cada (Fig. 11) y distancia media migrada (Fig. 13). Hubo una inhibición del 61.6%, 62.4%, y 87.8% con los parámetros A4, B6, y B8, respectivamente, como un porcentaje de la migración del control estimulado con fMLP bacteriana, según se determina mediante la distancia media migrada por la población de neutrófilos (ver Tabla II).

50

TABLA II

	<u>Condiciones</u>	<u>Quimiotaxis</u>	<u>% de inhibición de quimiotaxis</u>	<u>Movimiento no estimulado</u>
55	Controles	14.77	-	3.18
60	60 nsec, 180 mJ/ml	5.67	61.6	1.65
	300 nsec, 400 mJ/ml	5.56	62.9	1.98
	300 nsec, 900 mJ/ml	1.86	87.8	2.54

65

ES 2 300 272 T3

Por el contrario, para el movimiento no estimulado parece haber poco efecto entre energía/potencia e inhibición del movimiento (ver Figs. 12 y 13). La relación entre energía/potencia del pulso e inhibición del movimiento no estimulado no está clara. Con los parámetros A4, B6, y B8, respectivamente (ver Tabla II), las células no estimuladas pulsadas mostraron pequeñas cantidades de inhibición de la migración con respecto al control no estimulado.

5

Ejemplo 6

Se examinó el efecto de la IEM sobre la proliferación de células HL-60 en fase de crecimiento logarítmico. La proliferación se inhibió por la IEM como función de la duración del pulso. Estos resultados indican un potencial para la IEM para matar selectivamente células que crecen con rapidez, por ejemplo, células tumorales.

Método: Las células HL-60 se mantuvieron a una densidad de 100-300000 células/ml, condiciones para tiempo de duplicación celular máximo (10-14 h, crecimiento en fase logarítmica). Las células se expusieron a varios parámetros de IEM manteniendo la energía de exposición constante (200-250 mJ/ml) con diferentes duraciones de pulso según se indica. Las células se diluyeron después a 50000 células/ml y se determinó el número de células viables (células que excluyeron el azul tripán; esto es, células vivas) después de 0, 24, y 48 horas usando un hemocitómetro con un microscopía óptica.

Resultados: El número de células viables no fue diferente del control inmediatamente después del tratamiento con IEM (ver Fig. 14). Veinticuatro horas después de la IEM, las células tratadas crecían a tasas similares al control, excepto en las condiciones de los tiempos de pulsos más largos (200 μ sec). Después de 48 horas, la tasa de proliferación de las células expuestas a un pulso de 0.06-10 μ sec empezó a descender, indicando más sucesos de muerte que sucesos de proliferación. Las células expuestas a un pulso de 200 μ sec aumentaron su tasa de proliferación hasta casi la tasa del control.

Ejemplo 7

Efecto de IEM sobre células en fase de crecimiento estacionario

Se examinó el efecto de la IEM sobre la proliferación de células HL-60 en fase de crecimiento estacionario. El crecimiento se aumentó por la IEM como función de la duración del pulso. Estos resultados indican un potencial para condiciones específicas de IEM para fomentar el crecimiento de células que se dividen lentamente.

35

Método: Las células HL-60 se mantuvieron a una densidad de 1-3000000 células/ml durante 3-5 días, condiciones para un tiempo de duplicación mínimo (casi crecimiento en fase estacionaria). Las células se expusieron a varios parámetros de IEM manteniendo la energía de exposición constante (1.7-1.9 J/ml) con diferentes duraciones de pulso según se indica. Las células se diluyeron después da 50000 células/ml y se determinó el número de células viables (células que excluyeron el azul tripán; esto es, células vivas) después de 0, 24, y 48 horas usando un hemocitómetro con microscopía óptica.

Resultados: El número de células viables no fue significativamente diferente del control inmediatamente después del tratamiento con IEM (ver Fig. 15). Después de 24 y 48 horas, las tasas de proliferación eran mayores que el control para células expuestas a un pulso de 0.05 ó 200 μ sec. La tasa de proliferación fue menor que el control para células expuestas a un pulso de 10 μ sec. Se observó que un pulso de duración mínima inhibía la proliferación de células que crecen lentamente.

Ejemplo 8

Apoptosis en células inducida por IEM

Los experimentos descritos en el Ejemplo 3 anteriormente (ver Fig. 10) demostraron que los pulsos de IEM pueden dar como resultado la contracción del núcleo, una señal de la apoptosis. Nuevos datos utilizando marcadores más específicos y definitivos para apoptosis así como para necrosis, apoyan la hipótesis de que los pulsos de IEM inducen apoptosis en neutrófilos y células HL-60.

Método: Los parámetros de IEM incluyen sin tratar o control (fresco), A4 (60 nsec, 60 kV/cm, 216 mJ/cc), B6 (300 nsec, 40 kV/cm, 480 mJ/cc), y B8 (300 nsec, 60 kV/cm, 1.08 J/cc). Se incubaron los neutrófilos o las células HL-60 con anexina V-FITC y homodímero de bromuro de etidio ("EtBr"). La unión a anexina V-FITC se usó como un marcador cuantitativo de apoptosis. La anexina V muestra unión a fosfatidilserina dependiente de calcio. Mientras que la fosfatidilserina está normalmente restringida a la capa interna de la membrana celular en células normales y es por lo tanto inaccesible a la anexina V en solución, las células apoptóticas expresan fosfatidilserina en su capa externa en la membrana, dando como resultado en la unión fácil de anexina V a sus superficies. El EtBr se une al ADN, pero es impermeable a la membrana celular. La fluorescencia de EtBr se da solamente en células que han roto sus membranas. Por lo tanto, las células apoptóticas muestran solo fluorescencia de anexina mientras que las células necróticas muestran fluorescencia por EtBr más o menos fluorescencia de anexina. Las células se exponen a la IEM

y a los tiempos indicados tras la IEM, se evalúan las células mediante microscopía de fluorescencia, se cuentan y se expresan como porcentaje de células que muestran apoptosis y necrosis.

5 *Resultados:* Las células control (neutrófilos humanos) no muestran marcadores significativos para apoptosis o necrosis durante el paso del tiempo del experimento (ver Figs. 16 y 17). Esto indica que estos pulsos no matan la célula mediante rotura de la membrana. Las células HL-60 expuestas a las condiciones de IEM A4, B6, y B8 muestran un aumento de la apoptosis dependiente del tiempo y dependiente de energía o potencia. En A4, B6, y B8, las células empiezan a mostrar los marcadores de apoptosis después de 5, 3, y 1 horas, respectivamente (ver Fig. 16). Mientras las células apoptóticas continúan hacia la muerte celular, se produce necrosis, secundaria a la apoptosis (ver Fig. 17). Esto está indicado mediante la aparición de necrosis solo después de la apoptosis. La necrosis secundaria en un efecto específico *in vitro*. *In vivo*, las células apoptóticas son eliminadas mediante fagocitosis antes de que se produzcan la necrosis e inflamación. Las Figuras 18 y 19 muestran resultados similares para neutrófilos humanos.

15 Ejemplo 9

Efecto del tratamiento de IEM sobre las células teñidas con calceína-AM (no es parte de la invención)

20 La calceína libre es una fluoresceína modificada altamente fluorescente con 6 cargas negativas y 2 positivas que no es penetrante a la membrana. En su forma de éster metílico, calceína-AM, es no fluorescente y permeable a la membrana. Cuando se usa como tinción fluorescente para células, la calceína-AM pasa a través de la membrana y se corta en calceína libre + el residuo de éster metílico por actividades esterasas intracelulares. Esta modificación atrapa la calceína libre en el citoplasma de la célula, y la retención de la calceína libre es un criterio común para la integridad de la membrana de superficie. Además de permanecer atrapada en la célula, la calceína intracelular libre también permanece excluida de otros compartimentos intracelulares unidos a la membrana debido a su naturaleza impenetrable a la membrana (un efecto ilustrado en los eosinófilos marcados con calceína-AM que muestran fluorescencia de calceína citoplásmica libre brillante y “tinción negativa” de sus gránulos intracelulares grandes).

30 Se expusieron alícuotas de una preparación de leucocitos enriquecida en eosinófilos (65% de eosinófilos) a calceína libre 1 μM en HBSSw/o más cantidades crecientes (0%-0.05%) de Triton X-100 (5 minutos, 25°C) y se examinaron microscópicamente. Los eosinófilos expuestos a calceína libre sin Triton no mostraron tinción con calceína consistente con las características de impenetrable a la membrana de la calceína libre. La autofluorescencia roja de los eosinófilos fue fácilmente visible y también era visible en todas las condiciones hasta e incluyendo la exposición a calceína libre + Triton al 0.01%. Sin embargo, en la condición de calceína libre + Triton al 0.01%, eosinófilos ocasionales mostraron un gránulo verde brillante aislado dentro del patrón de autofluorescencia del eosinófilo. En la condición de calceína libre + Triton al 0.05%, la iluminación fluorescente reveló muchas áreas discretas de fluorescencia verde pálida con áreas puntuadas de fluorescencia verde brillante sobrepuestas. Tras la tinción de Wright-Giemsa, estas se reconocieron como núcleos residuales de células totalmente solubilizadas por el detergente (fluorescencia verde pálida) con gránulos eosinofílicos asociados que corresponden exactamente a las áreas puntuadas de fluorescencia brillante (ver Fig. 26). Estos resultados ilustran que los gránulos de eosinófilos tratados con detergente se tiñen de manera brillante con calceína libre, presumiblemente debido a la interacción entre los componentes catiónicos de los gránulos de eosinófilos y la calceína libre aniónica, y son paralelos a los resultados de otros usando anticuerpos marcados con fluoresceína.

50 Los eosinófilos teñidos con calceína-AM atrapan la calceína libre en su citoplasma tras la tinción (izquierda), y la calceína intracelular se excluye de los gránulos grandes de los eosinófilos como se muestra a la izquierda. Sin tratamiento con Triton, la calceína libre es incapaz de teñir el citoplasma de eosinófilos (centro): solo es visible la autofluorescencia de los eosinófilos. Con incubación en Triton al 0.001%, la calceína libre continúa siendo excluida de los eosinófilos, pero tiñe los gránulos finos de un PMN que muestran efectos evidentes del detergente (derecha) (ver Fig. 27). Con el tratamiento con Triton al 0.005% (izquierda), la morfología de algunos eosinófilos sugiere solubilización parcial por el detergente que se acompaña por la tinción brillante de la calceína libre de los gránulos de eosinófilos, y los PMN solubilizados por el detergente muestran unos patrones de tinción muy finos de “arena de calceína” fluorescente. Con el tratamiento de Triton al 0.01% + calceína libre 1 μM (centro), todos los eosinófilos muestran cambios nucleares que sugieren efectos del detergente, y muchos contienen 1-2 gránulos brillantes en un fondo de autofluorescencia roja. Con el tratamiento de Triton al 0.05% + calceína libre 1 μM , solo se ven remanentes nucleares de eosinófilos (derecha, arriba), algunos con gránulos eosinofílicos asociados que son brillantemente fluorescentes con calceína libre (derecha, abajo).

60 En la Figura 25 se ilustra un generador de pulsos típico para producir efectos USPEF, y consiste en una red formadora de pulsos (típicamente un cable coaxial o una línea triplaca), un interruptor y la carga. En el caso de una carga equilibrada (resistencia de la carga = la impedancia de la red formadora de pulso), el pulso de diferencia de potencial a través de la carga tiene una amplitud de la mitad de la diferencia de potencial aplicada a la red formadora de pulsos (para los experimentos descritos, la red formadora de pulsos comprende 5 cables de alto voltaje de 50 Ω en paralelo, que alcanzan la impedancia requerida de 10 Ω para operaciones ajustadas). La duración del pulso es el doble de la longitud del cable o la línea triplaca, dividido por la velocidad de la onda electromagnética en el dieléctrico de la red formadora de pulsos. El interruptor es un entrehierro simple en el aire atmosférico. La diferencia de potencial

ES 2 300 272 T3

de ruptura se fija variando la distancia de la abertura. La carga consiste en los 100 μL de suspensión de células a ser expuestas al USPEF, y cuando se usa solución salina equilibrada de Hanks sin Ca^{++} ni Mg^{++} (HBSSw/o) para resuspender las células, tiene una resistencia eléctrica de 100 Ωcm . La carga se coloca en una cubeta de electroporación (BioRad, Inc., Hercules, CA) construida con electrodos de aluminio en placas paralelas de 1 cm^2 de área y separadas por 0.1 cm, dando como resultado una resistencia de la carga $R = 10 \Omega$.

Se purificaron leucocitos polimorfonucleares (PMN) a partir de sangre heparinizada obtenida de donantes adultos voluntarios, utilizando sedimentación con hypaque-ficoll, sedimentación con dextrano y lisis hipotónica. Estas preparaciones de células eran típicamente 92-95% de PMN, 5-8% de eosinófilos y 1-3% células mononucleares. Tras la purificación, las preparaciones de PMN se marcaron con calceína-AM 1 μM (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) según las directrices del fabricante, se lavaron y ajustaron a $20 \times 10^6/\text{ml}$ en solución salina equilibrada de Hanks sin Ca^{++} ni Mg^{++} (HBSSw/o).

Inmediatamente después de la aplicación de USPEF, las células se retiraron de la cubeta, se diluyeron 1:4 en HBSS con Ca^{++} y Mg^{++} (HBSSw) y se aplicaron a portaobjetos de vidrio (1000 rpm, 5 minutos) utilizando un Cytospin 3 (Shandon Southern, Sewickley, PA). Se prepararon preparaciones múltiples en portaobjetos para cada condición de pulso (1000 rpm, 5 minutos) y se mantuvieron en una caja sellada hasta que se examinaron microscópicamente. Los exámenes microscópicos usaron bien un fotomicroscopio Olympus BH-1 con una cámara digital Kodak DC-120, o un microscopio invertido Olympus IX70 con una cámara de video OlymPix CCD a una magnificación de 100X.

Los experimentos iniciales usaron PMN marcados con calceína-AM para alcanzar el marcaje fluorescente del citoplasma y mostraron que aplicaciones individuales de USPEF de 3.6 ó 5.3 megavoltios/m podrían afectar las distribuciones intracelulares de calceína libre y la morfología teñida con Wright-Giemsa en estas células evaluadas microscópicamente. Aplicaciones múltiples de USPEF indujeron cambios subjetivos tanto en las distribuciones intracelulares de calceína libre como en la morfología de los PMN teñidos con Wright-Giemsa, pero el efecto más impactante se vio en los eosinófilos que contaminaban las preparaciones de PMN. Se vieron células “centelleantes” (células con tinción citoplásmica de calceína más gránulos brillantes fluorescentes localizados centralmente, grandes) con ambas intensidades de campo eléctrico cuando se utilizaron ≥ 3 aplicaciones USPEF (ver Tabla 1). Cuando se examinaron mediante tinción Wright-Giemsa, las células “centelleantes” eran siempre eosinófilos, y con frecuencia aparecían “encogidas” relativas a la apariencia de los eosinófilos de la condición control.

Reconociendo que la tinción intensa de la calceína libre de los gránulos de eosinófilos solo podría ocurrir si la integridad de la membrana de los gránulos se perdía, dos preparaciones de leucocitos ricos en eosinófilos (65% y 87% de eosinófilos) se expusieron a USPEF (60 nsec, 53 kV/cm x3 ó x5) y las células se examinaron microscópicamente (ver Figura 26). Las preparaciones de células control teñidas con calceína-AM mostraron eosinófilos con tinción de calceína libre brillante en el citoplasma y exclusión de la calceína libre de sus gránulos intracelulares.

La Figura 26 muestra células “centelleantes” en una preparación de eosinófilos expuesta a tratamiento de USPEF (60 nsec, 53 kV/cm x3 (medio) y x5 (abajo)). Los eosinófilos control marcados con calceína-AM (arriba) muestran tinción de calceína libre citoplásmica brillante con exclusión de la fluorescencia de los gránulos intracelulares. La aplicación de tratamientos de USPEF múltiples a esta preparación de células da como resultado la aparición de células “centelleantes” con tinción de calceína libre citoplásmica brillante (indicando que la membrana de superficie está intacta) y fluorescencia brillante de algunos gránulos intracelulares, indicando que la calceína libre citoplásmica ha ganado acceso a y marcado los componentes catiónicos intragranulares. Los paneles medios también ilustran la morfología “encogida” de los eosinófilos advertida con frecuencia en las condiciones de 60 nsec, 53 kV/cm x3 y x5. A la derecha hay un eosinófilo de tamaño normal con tinción brillante de calceína libre citoplásmica/gránulos no teñidos, y 3 eosinófilos “encogidos”, todos células “centelleantes” están a la izquierda.

Después de las exposiciones a USPEF en ambas condiciones, el 39% y el 77% (3 exposiciones USPEF), y el 42% y el 58% (5 exposiciones de USPEF) de todas las células tenían características “centelleantes” (tinción citoplásmica de calceína libre intensa más subpoblaciones de gránulos intracelulares brillantemente fluorescentes, centrales) y eran eosinófilos en una tinción de Wright-Giemsa posterior, respectivamente. Considerando el grado de enriquecimiento de eosinófilos en las preparaciones a ensayar, el 76-84% (3 exposiciones USPEF) y el 59-71% (5 exposiciones USPEF) del total de eosinófilos habían adquirido las características “centelleantes” tras estos tratamientos.

Los gránulos de los eosinófilos contienen varias proteínas catiónicas que podrían unirse potencialmente a la calceína libre altamente aniónica si la membrana del gránulo se rompiera, como se muestra en el experimento de solubilización con Triton. Por lo tanto, se concluye que el desarrollo de la morfología “centelleante” en los eosinófilos cargados con calceína-AM tras aplicaciones repetidas de USPEF es el resultado de la formación de poros/rotura selectiva de la membrana de los gránulos de los eosinófilos durante las aplicaciones de USPEF, que permiten a la calceína libre citoplásmica entrar en el gránulo y unirse a los componentes catiónicos del gránulo. Se interpreta esto como una evidencia sólida de que se puede alcanzar la formación de poros/rotura selectiva de las membranas intracelulares sin pérdida de la integridad de la membrana de superficie con aplicaciones de USPEF.

ES 2 300 272 T3

Ejemplo 10

IEM de células de fibrosarcoma de ratón in vitro (no parte de la invención)

5 Se inocularon subcutáneamente ratones inmunocompetentes C57B1/6 de siete a 8 semanas de edad con 1.5×10^6 células de fibrosarcoma de ratón B10.2 en 0.1 ml de PBS utilizando una jeringuilla de 1 cc equipada con una aguja de 27-gauge. El sitio de inyección fue bien en la región del flanco bien en el lomo del animal. Dos a tres semanas más tarde se extirparon los tumores y se cortaron en dos partes a lo largo del eje ecuatorial. Una parte sirvió como control ajustado y la otra parte se expuso a tres pulsos cada uno a 300 nsec y 60 kV/cm (1.08 J/cc).

10 Se colocaron los cortes de tumor (de 0.1 cm de espesor) en una cubeta de electroporación entre dos electrodos separados 0.1 cm y se añadió solución salina equilibrada de Hanks para llenar la cubeta. Estos tejidos se expusieron a pulsos según se indica, se retiraron, y se prepararon para el análisis. Los tejidos se incubaron durante 5 horas a 37°C en medio RPMI con suero bovino fetal al 10%. Los tejidos se fijaron después en formalina tamponada al 15 10% durante 18 horas. Se eliminó el aire de los tejidos utilizando vacío y los tejidos desgaseados se embebieron en parafina. Se prepararon láminas de cuatro micrómetros y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio pretratados con APES al 2% en acetona. Se eliminó la parafina mediante lavados sucesivos en xileno, etanol absoluto, etanol al 95%, etanol al 70%, y PBS. Se incubaron las preparaciones de tejido con proteinasa K (40 ug/ml) durante 15 minutos a 40°C.

20 Las preparaciones de tejido se prepararon para examen de fragmentación de ADN como un marcador para apoptosis utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina de oveja marcado con rodamina (ApoptagTM de Intergen) y microscopía de fluorescencia según el protocolo del fabricante. Las preparaciones se contratiñeron con DAPI. Los núcleos normales se tiñeron de azul por el DAPI y los núcleos apoptóticos se tiñeron de rojo con la rodamina. Se contaron de dos o 25 trescientas células y puntuadas como azules (normales) o rojas (apoptóticas). El índice apoptótico se define como el número de núcleos apoptóticos divididos por el número total de núcleos. Los resultados se muestran en la Tabla IV a continuación.

30 TABLA IV

Apoptosis de fibrosarcoma de ratón tras electromanipulación

	<u>Células totales</u>	<u>Núcleos apoptóticos</u>	<u>% de apoptosis (índice apoptótico)</u>	<u>% medio de apoptosis</u>
<u>Control</u>	257	10	3.9	5.8 ± 0.7
	227	14	6.2	
	248	16	6.5	
	229	20	6.7	
<u>Post-IEM</u>	280	91	32.5	35.0 ± 2.2
	243	96	39.5	
	294	89	30.3	
	258	97	37.6	

55 La Tabla IV ilustra el índice apoptótico (porcentaje de células apoptóticas) en un tumor representativo que se expuso a tres pulsos consecutivos de 300 nsec a 6 kV en comparación con un control sin pulso. Alrededor del 6% de los núcleos del tumor control eran apoptóticos cuando se tomaron las muestras de cuatro secciones diferentes del mismo tumor. Por el contrario, el 35% de núcleos del tumor expuesto a la secuencia de pulsos ultra cortos de alta intensidad eran apoptóticos. Esto representa un aumento de 6 veces en los núcleos apoptóticos después de la 60 exposición a estos pulsos. En un total de 6 tumores de diferentes animales, se observó un aumento de 3-6 veces en los núcleos apoptóticos en tumores expuestos a pulsos de campo eléctrico, aunque el número absoluto de núcleos apoptóticos en tumores no tratados varió del 4% al 30%. No se observaron diferencias entre tejidos tumorales control y tratados cuando se compararon tres pulsos consecutivos a 60 nsec y 6 kV (datos no mostrados). Estos resultados indican que los pulsos ultracortos de alta intensidad pueden inducir apoptosis en tejido tumoral.

65

Ejemplo 11

Tratamiento de IEM de fibrosarcoma de ratón in vivo

5 Los experimentos iniciales con pulsos eléctricos ultracortos se han realizado con células tumorales en cultivo. Para valorar totalmente la potencial eficacia de los pulsos de campo eléctricos ultracortos para el tratamiento de tumores humanos, se utilizarán modelos animales. Los experimentos con células intactas en cultivo indican que la apoptosis es el mecanismo principal para la muerte de las células inducida por pulsos eléctricos ultracortos. Para investigar el potencial para el tratamiento del cáncer en humanos en el futuro, se utilizarán modelos animales para establecer el efecto de los pulsos de campo eléctrico ultracortos en los tumores animales *in vivo*. Los ratones C57BL/6 representan un modelo bien caracterizado y aceptado para evaluar estrategias terapéuticas del cáncer como un precursor necesario para los ensayos clínicos en seres humanos. Esta especie es muy eficaz ya que una línea de células tumorales está derivada para este animal.

15 Para los tumores de fibrosarcoma de ratón, se utilizará el modelo de ratones C57BL/6 inmunocompetentes. Ratones de siete a 8 semanas de edad se inocularán de forma subcutánea o intradérmica con 5×10^6 células de fibrosarcoma de ratón B10.2 en 0.1 ml de solución salina tamponada con fosfato ("PBS") utilizando una jeringuilla de 1 cc equipada con una aguja de 27-gauge. El sitio de la inyección será en el lomo del animal para no interferir con su movimiento o alimentación. Se espera que las masas tumorales se formen durante un período de 6 semanas en una masa de alrededor de 5-10 mm de diámetro. No se permitirá que la masa del tumor resultante supere el 10% del peso corporal antes de ser sometida al tratamiento de pulsos eléctricos ultracortos.

Los ratones con tumores subcutáneos inducidos se dividirán en seis grupos diferentes y en cinco de los grupos los tumores se expondrán a tratamiento de pulsos eléctricos ultracortos *in vivo*. El sexto grupo servirá como grupo control sin tratar para seguir el curso del desarrollo del tumor. Los parámetros de pulso para los cinco tratamientos diferentes se usarán basados en los resultados de los experimentos *ex vivo*. Las condiciones de pulso eléctrico ultracorto para los cinco grupos diferentes se muestran en la Tabla V a continuación.

TABLA V

Condiciones de pulso de IEM para tratamientos de tumores in vivo

	<u>Duración del pulso</u>	<u>Amplitud del pulso</u>	<u>Campo eléctrico medio</u>
Ratones control	NA	NA	NA
Tratamiento 1	1 nsec	50 kV	100 kV/cm
Tratamiento 2	1 nsec	100 kV	200 kV/cm
Tratamiento 3	10 nsec	50 kV	100 kV/cm
Tratamiento 4	60 nsec	50 kV	100 kV/cm
Tratamiento 5	300 nsec	30 kV	60 kV/cm

50 Como se indica mediante los parámetros en la Tabla V, se usarán pulsos eléctricos de corta duración (de nanosegundos a cientos de nanosegundos), alto voltaje (decenas de kilovoltios), baja energía (decenas de milijulios a varios julios), no térmicos. Estos pulsos no dan como resultado la rotura permanente de la membrana plasmática de la célula, pero pueden alterar las estructuras subcelulares tal como el núcleo, mitocondrias y/o vesículas por mecanismo (s) desconocido(s). Los pulsos se administrarán a través de un agrupamiento de electrodos consistente en un par de agujas de acero inoxidable del tamaño de las agujas de acupuntura separadas 5 mm. El par de agujas se insertará en el tumor o en el margen circundante de tejido sano al menos a la profundidad del tumor. La corriente pasará de forma sincrónica a través de pares de agujas opuestos produciendo un campo homogéneo dentro y justo fuera de la sección cruzada definida por las agujas (ver la Figura 28 para una representación del campo eléctrico generado durante el pulso). La densidad de energía es más intensa en el plano unido por las dos agujas y disminuye fuera de este plano. Los pares de agujas estarán energizados en ambas polaridades. El par de agujas se retirará y se volverá a insertar en dos posiciones adicionales de modo que la composición total corresponda aproximadamente a un hexágono regular (ver la Figura 29). El tratamiento del tumor con pulsos secuenciales de cada una de las tres posiciones se refiere aquí como "ciclo de un pulso". El agrupamiento de agujas se insertará en el tejido sano justo rodeando el tumor de modo que el tumor esté contenido dentro del hexágono definido por el agrupamiento. Se administrará un ciclo de un pulso por tumor, a menos que el tumor exceda los límites del agrupamiento, en cuyo caso se administrará un segundo ciclo de un pulso en un agrupamiento compensatorio para abarcar la parte del tumor que no está cubierta por el primer ciclo de pulso. Típicamente, para cada posición en el ciclo de pulso, se aplicarán secuencias de múltiples pulsos al tumor en

ES 2 300 272 T3

un intervalo de tiempo relativamente corto, por ejemplo, se aplicarán secuencias de 5-10 pulsos con un espaciamiento de 1-2 segundos entre pulsos sucesivos en cada posición.

5 Cuando se tratan los tumores con pulsos eléctricos ultracortos *in vivo*, los ratones se colocarán en un sistema con oxígeno y una entrada de isoflurano al 2% para permitir la sedación continuada durante el procedimiento quirúrgico entero. El área alrededor del tumor se afeita con maquinilla eléctrica y se prepara con betadina. Se insertará un agrupamiento de electrodos del tamaño de agujas de acupuntura dentro de o rodeando al tumor y se administrarán pulsos eléctricos ultracortos en un período de tiempo relativamente corto. El tiempo total del procedimiento es de menos de 10 minutos. El ratón se colocará después en una jaula nueva y se espera que se mueva en 2 minutos.

10 Tras la IEM, los animales se seguirán diariamente y el tamaño del tumor se determinará al menos dos veces a la semana durante un período de 4 semanas utilizando un compás calibrador. Al final de este período, los tumores se extirparán y se examinará para la presencia de apoptosis. Se utilizarán varios métodos para el análisis de la apoptosis incluyendo uno o más de los siguientes:

- 15 (1) mediante histología fluorescente para apoptosis;
- (2) para fragmentación de ADN usando marcaje con fluoresceína y microscopía de fluorescencia;
- 20 (3) mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo para unión con anexina V-FITC (necrosis) en tumores después de cortar, y digestión con colagenasa;
- (4) para activación de caspasa utilizando el sustrato fluorescente DEVD-AFC; y
- 25 (5) para activación de caspasa mediante análisis de inmunotransferencia utilizando un anticuerpo de caspasa 3.

A lo largo de esta solicitud se hace referencia a varias publicaciones. Las divulgaciones de estas publicaciones en su totalidad se incorporan por referencia en esta solicitud para describir más completamente el estado de la técnica a la que esta invención se refiere.

30 La invención se ha descrito con referencia a varias formas de realización y técnicas específicas e ilustrativas. Sin embargo, se debe entender que se pueden hacer muchas variaciones y modificaciones al tiempo que permanecen dentro del ámbito de la invención.

35
40
45
50
55
60
65
(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla III. Efectos de tratamientos USPEF en eosinófilos de sangre humana en preparaciones de PMN.

Efecto	Condiciones de USPEF*			
	Nada	36 kV/cm 60 nsec x 1	36 kV/cm 60 nsec x 3	36 kV/cm 60 nsec x 5
		53 kV/cm 60 nsec x 1	53 kV/cm 60 nsec x 3	53 kV/cm 60 nsec x 5
Eosinófilos encogidos	0 ± 0%	0 ± 0%	1 ± 1%	1 ± 1%
(n)	(6)	(3)	(4)	(5)
Células "centelleantes"				
(% de todas las células)	0 ± 0%	2 ± 2%	2 ± 1%	5 ± 2%
(n)	(3)	(3)	(3)	(3)
Eosinófilos				
(% de todas las células)	7 ± 3%	6 ± 2%	7 ± 3%	6 ± 1%
(n)	(3)	(3)	(3)	(3)

* Las exposiciones USPEF múltiples se provocaron manualmente aproximadamente a intervalos de 1 segundo.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para destruir células diana que comprende:

(i) un generador de pulso;

(ii) un agrupamiento de electrodos, el agrupamiento de electrodos que comprende al menos un par de agujas capaces de ser insertadas en tejidos *in vivo*, conteniendo el tejido las células diana, y ser capaces de dirigir los pulsos eléctricos ultracortos a dichas células diana *in vivo*; y

(iii) un sistema de distribución adaptado para comunicar uno o más pulsos eléctricos ultracortos desde el generador de pulsos al agrupamiento de electrodos, **caracterizado** en que el generador de pulsos está configurado para producir dicho uno o más pulsos eléctricos ultracortos que tienen una duración de pulso de no más de 1 microsegundo y una intensidad de campo eléctrico mayor de 10 kV/cm.

2. El aparato de la reivindicación 1, en donde la duración del pulso es de al menos 100 picosegundos.

3. El aparato de la reivindicación 1 en donde la duración del pulso es de 1 a 500 nanosegundos.

4. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el generador de pulso se configura para producir pulsos eléctricos ultracortos de intensidad de campo eléctrico de al menos 20 kV/cm.

5. El aparato de la reivindicación 4, en donde el generador de pulsos se configura para producir un pulso de intensidad de campo eléctrico de no más de 200 kV/cm.

6. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el generador de pulso se configura para producir cada pulso eléctrico ultracorto con una densidad total de energía de 75 mJ/cc hasta 2000 mJ/cc.

7. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el generador de pulso se configura para producir cada pulso eléctrico ultracorto tal que tiene un espectro de Fourier que incluye frecuencias entre 1 MHz y 1 GHz.

8. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el generador de pulsos se configura para producir cada pulso eléctrico ultracorto tal que el pulso tiene un tiempo de subida que no es más del 20% de la duración del pulso.

9. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el generador de pulso se configura para producir cada pulso eléctrico ultracorto tal que tiene un tiempo de subida de no más de 40 nsec.

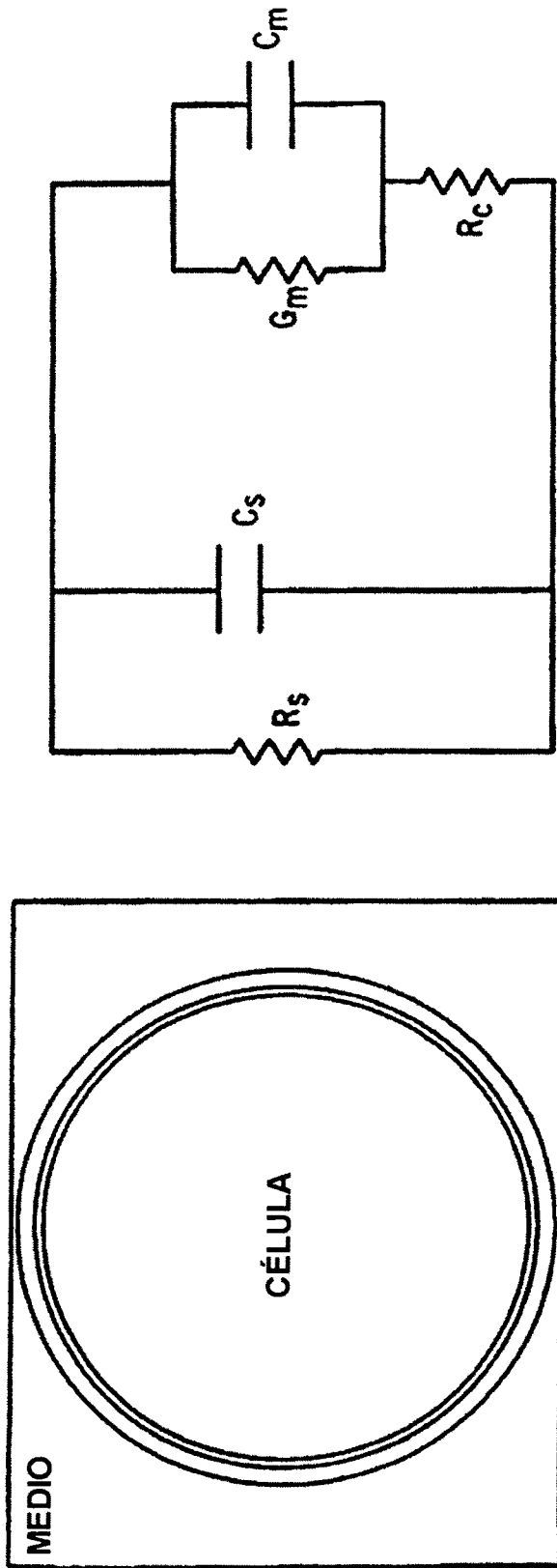


FIG. 1

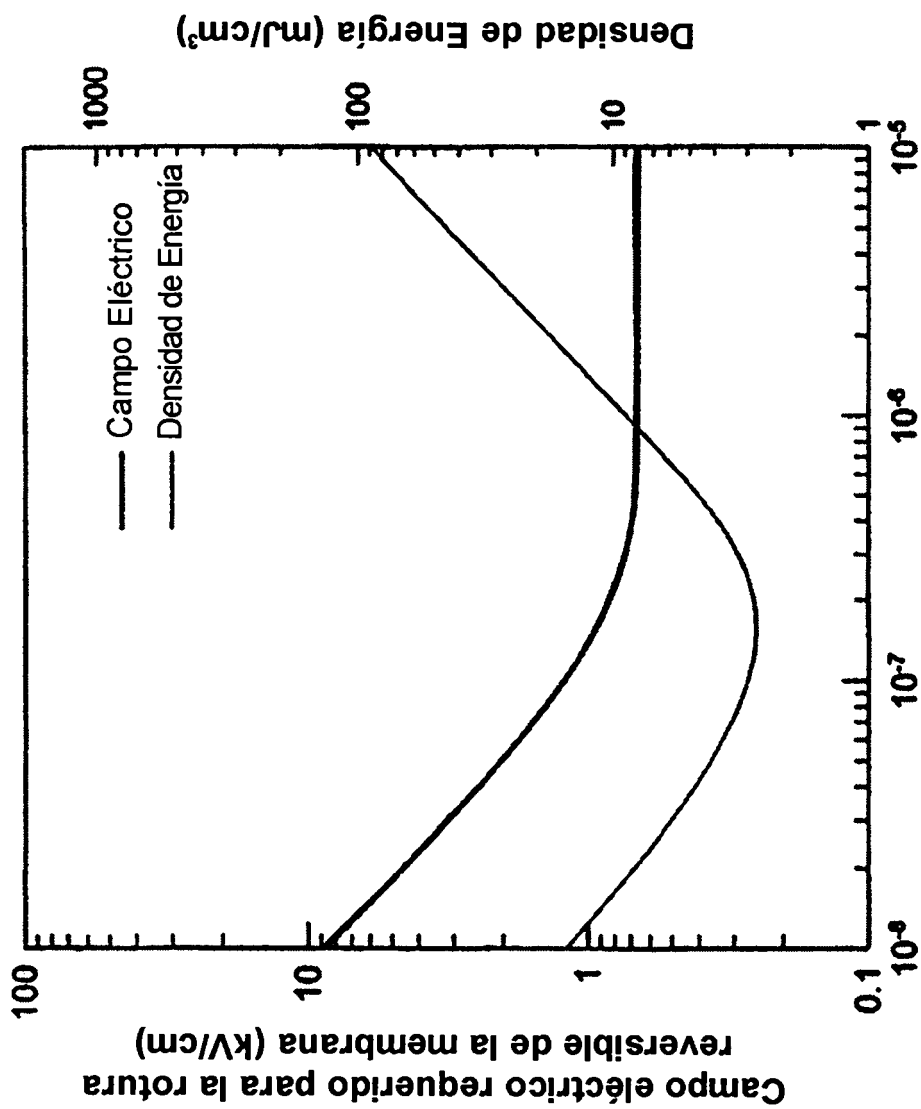


FIG. 2
 ($\rho_p = 50 \Omega \cdot \text{cm}$, $\rho_c = 100 \Omega \cdot \text{cm}$, $a = 10 \mu\text{m}$, $\tau_c = 125 \text{ ns}$)

FIG. 3a

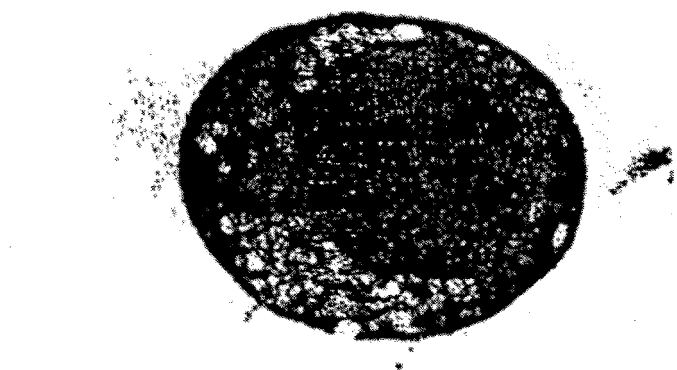


FIG. 3b

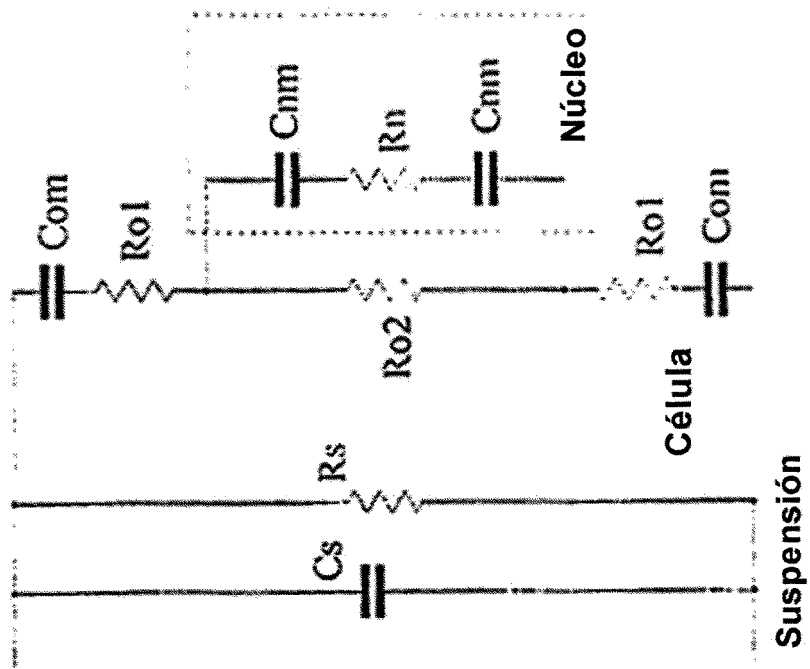


FIG. 4

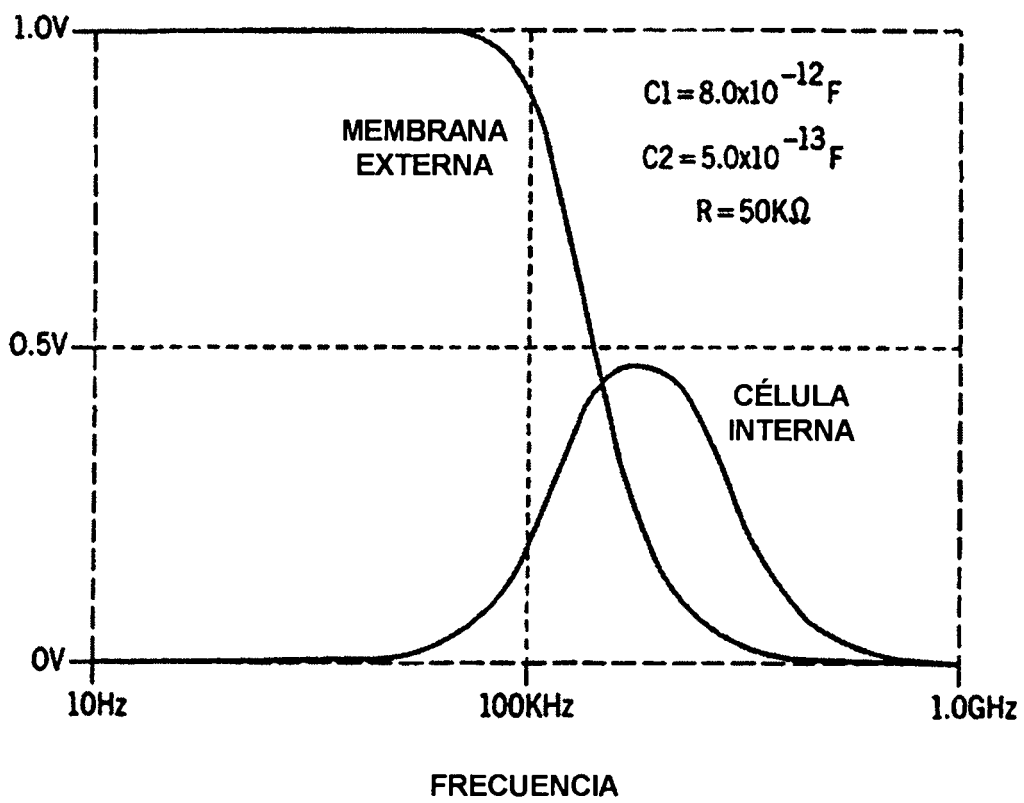
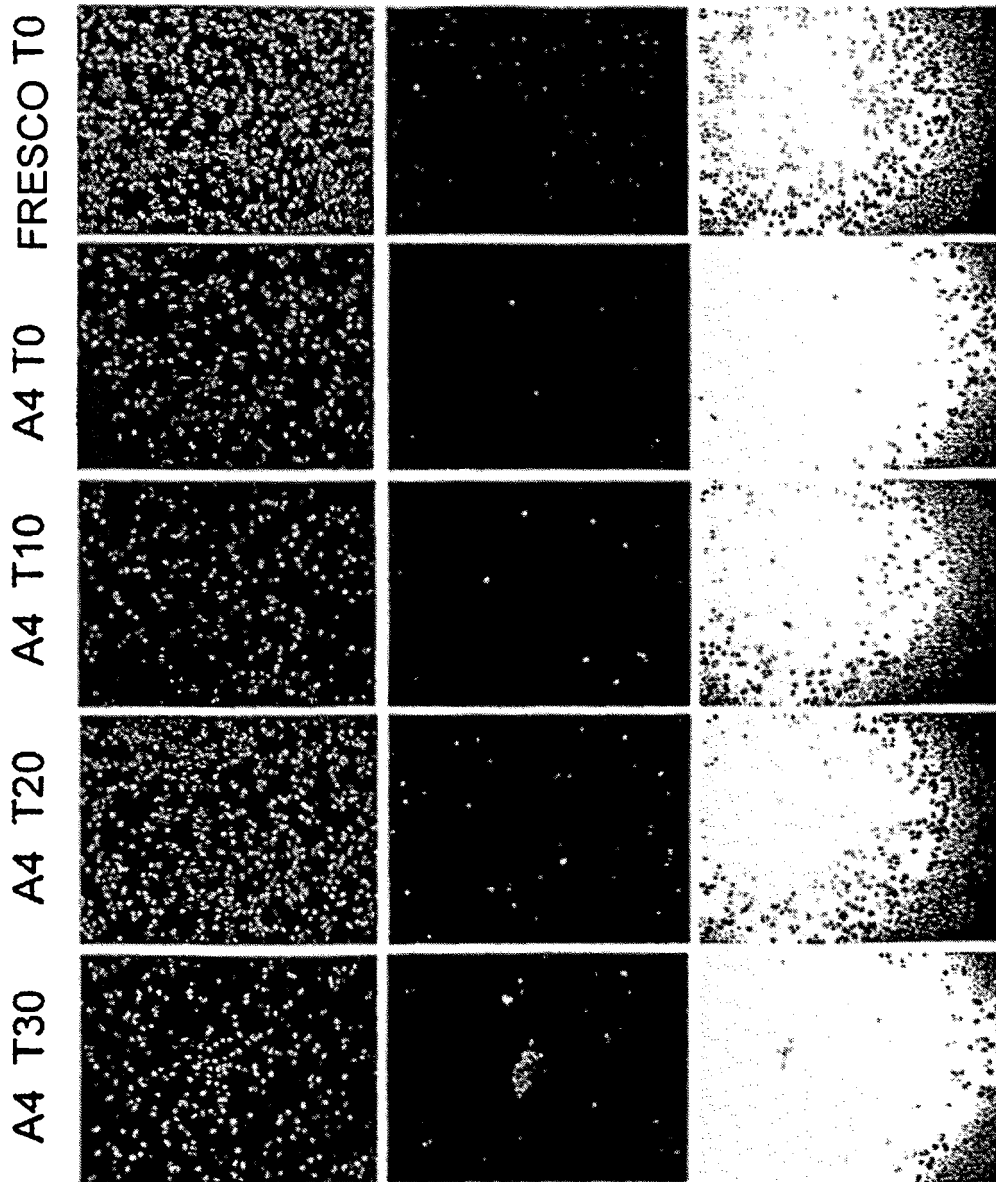


FIG. 5

EXPERIMENTO 15_6_99



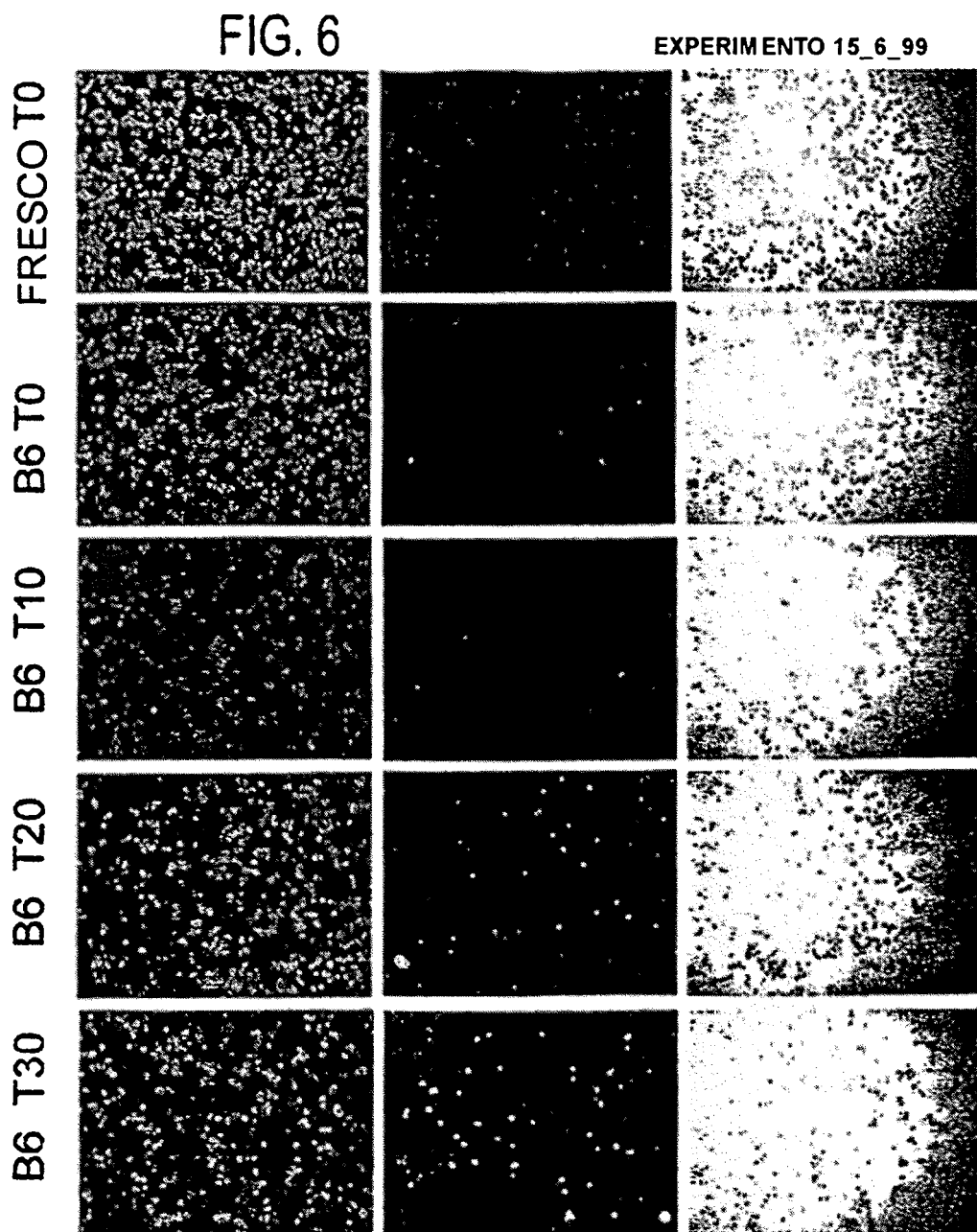


FIG. 7

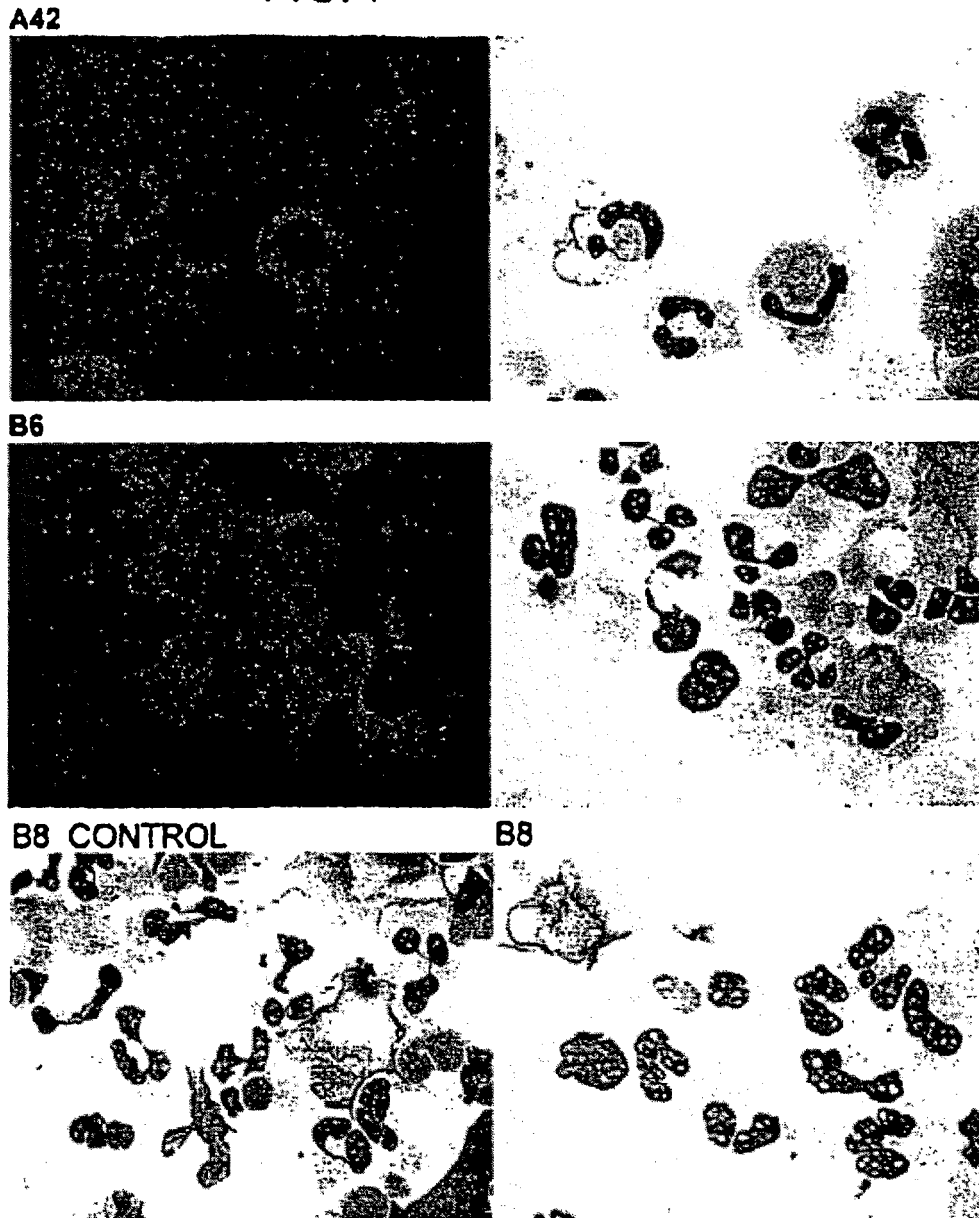


FIG. 8

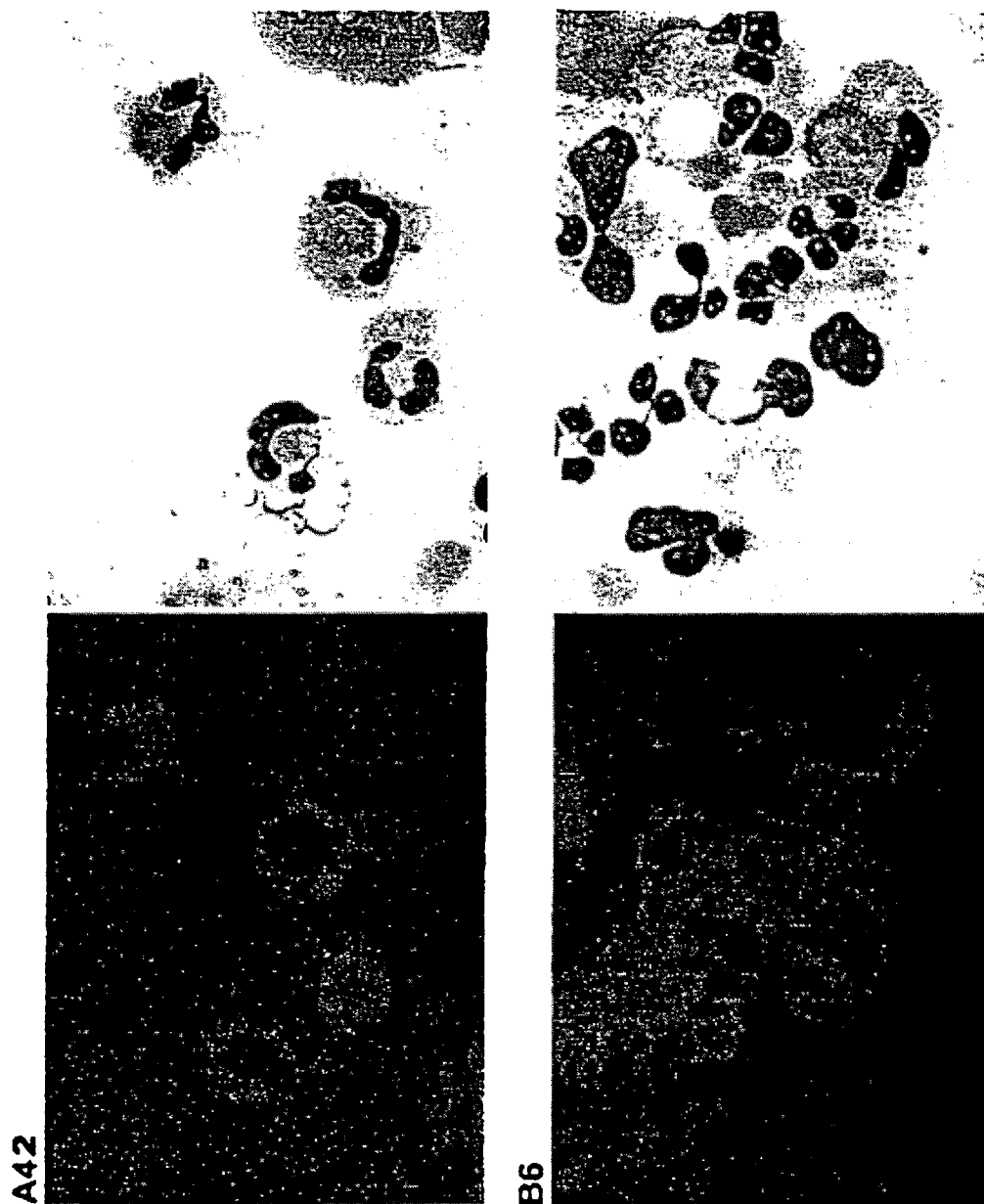
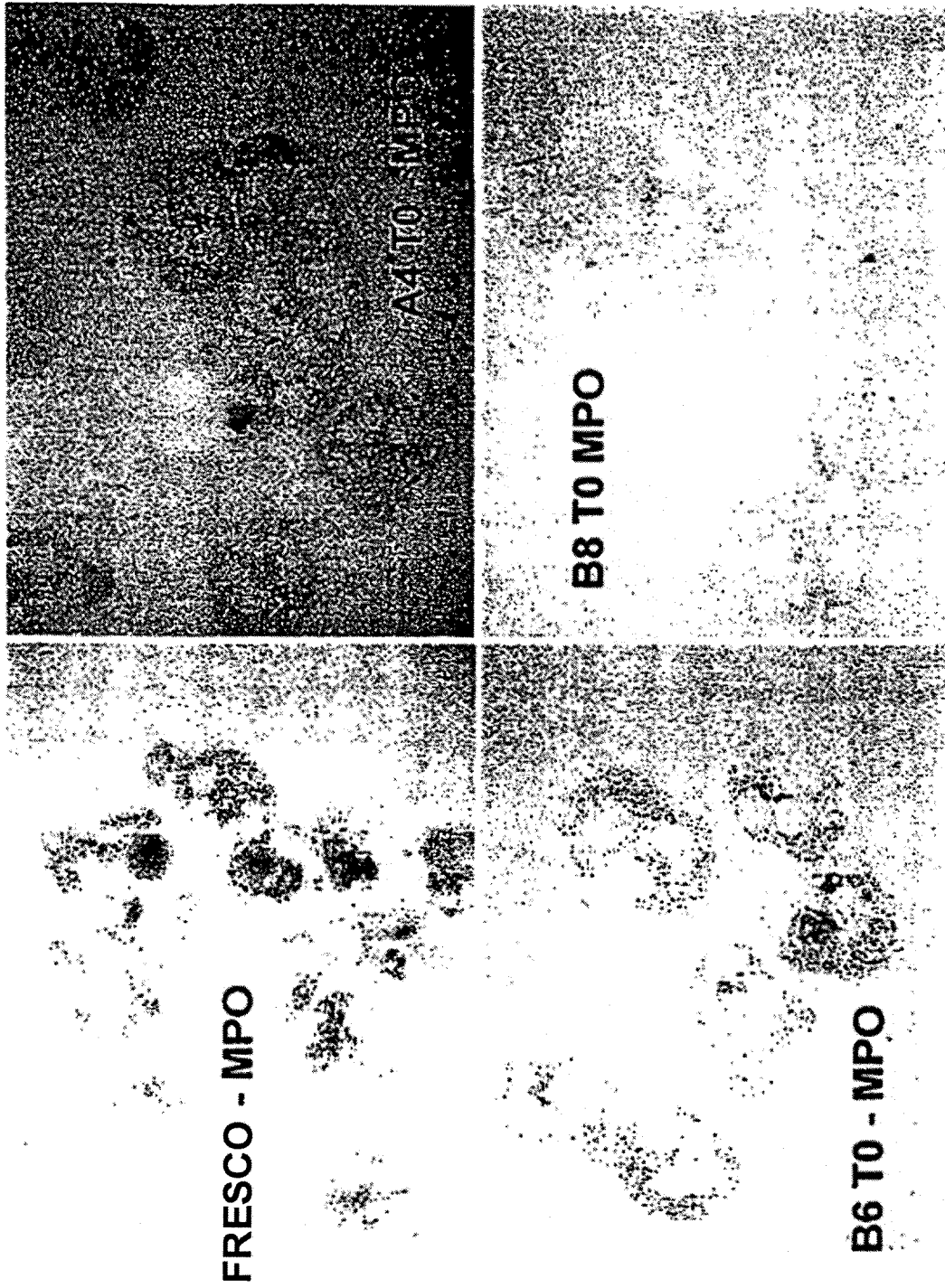


FIG. 9



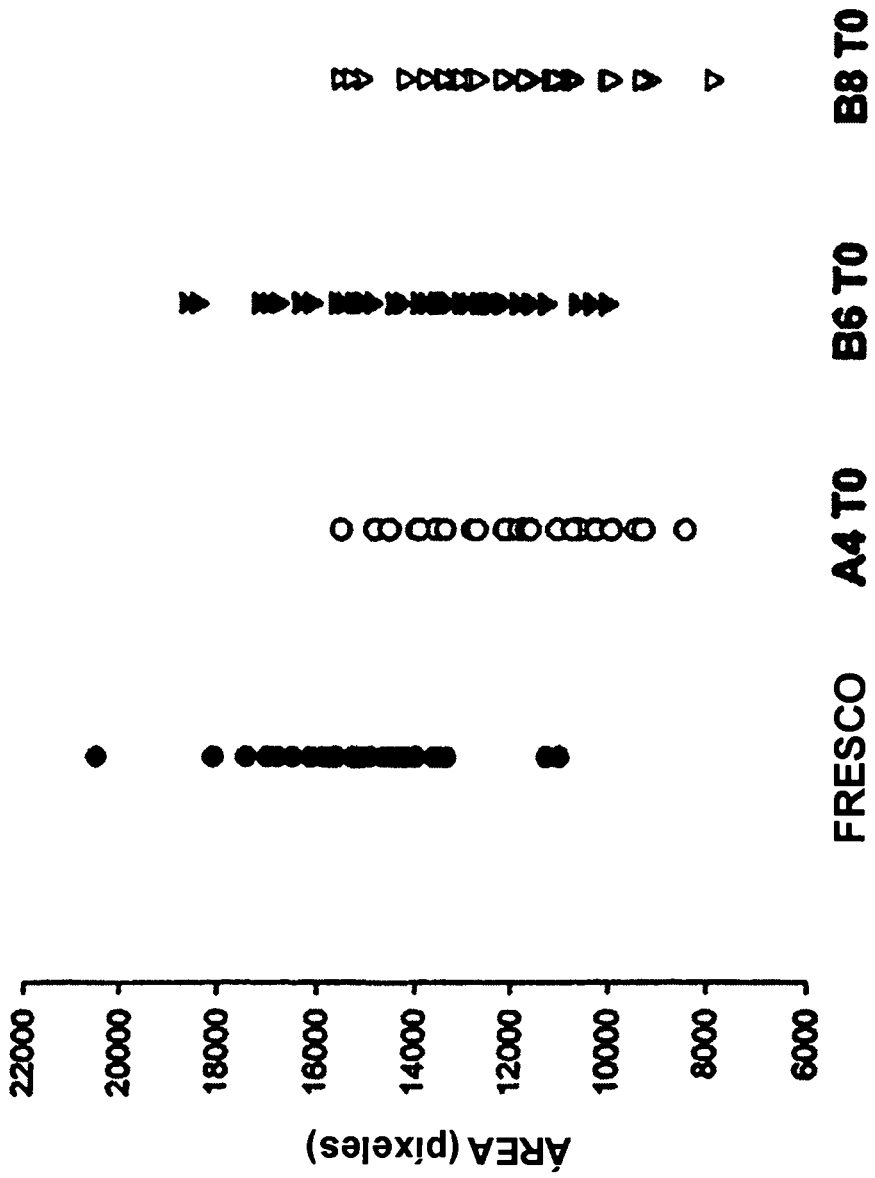


FIG. 10

FIG. 11

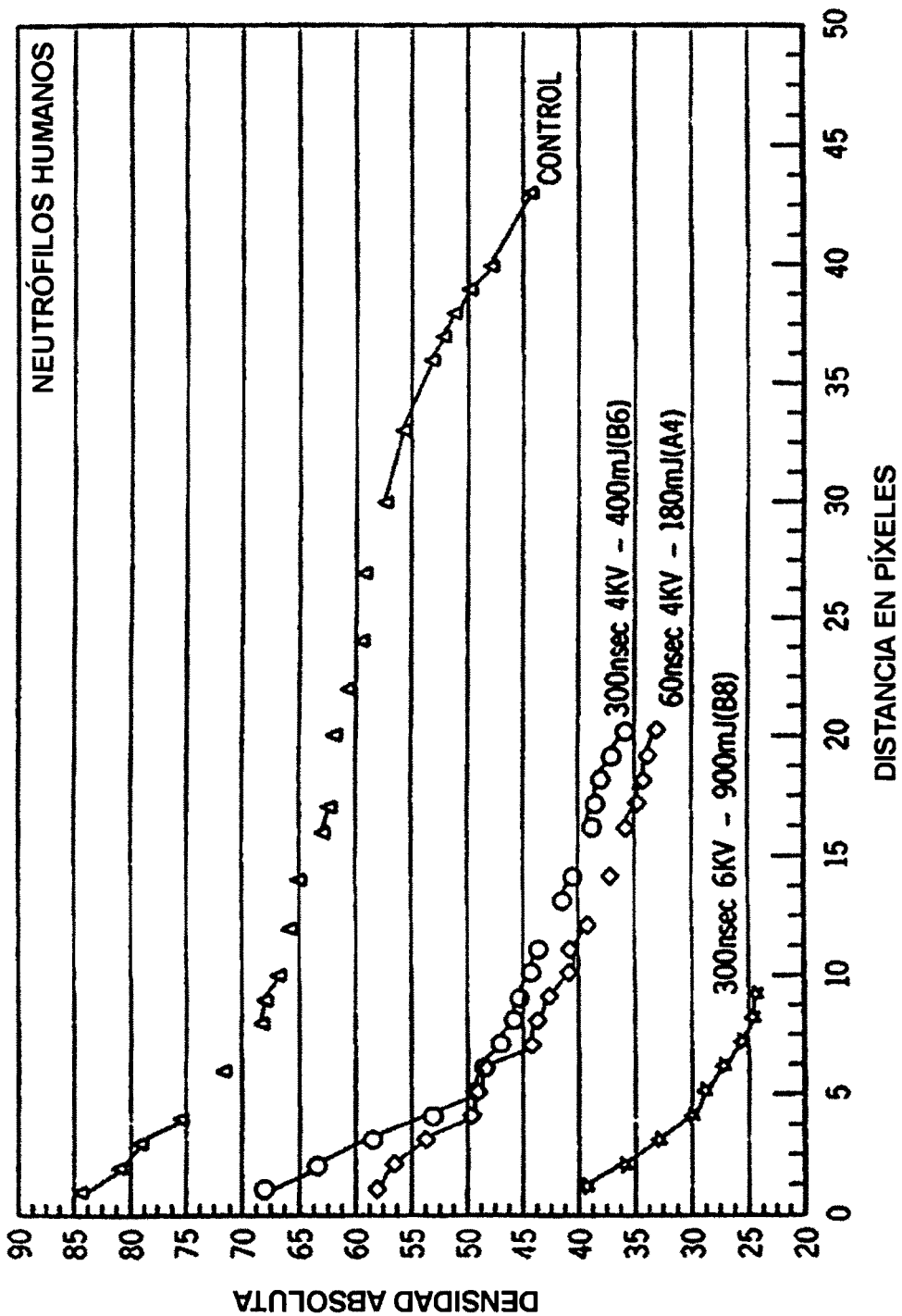
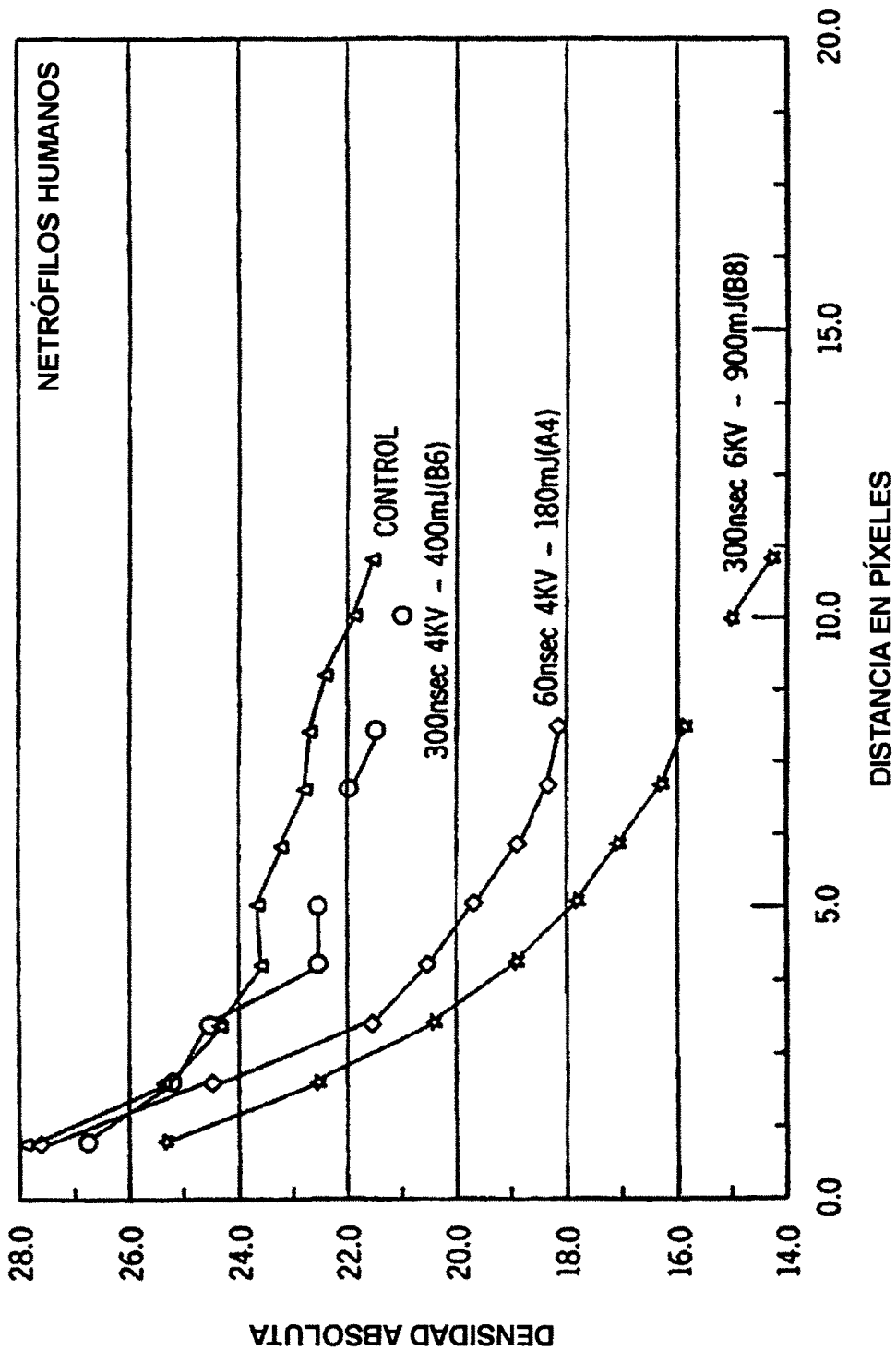


FIG. 12



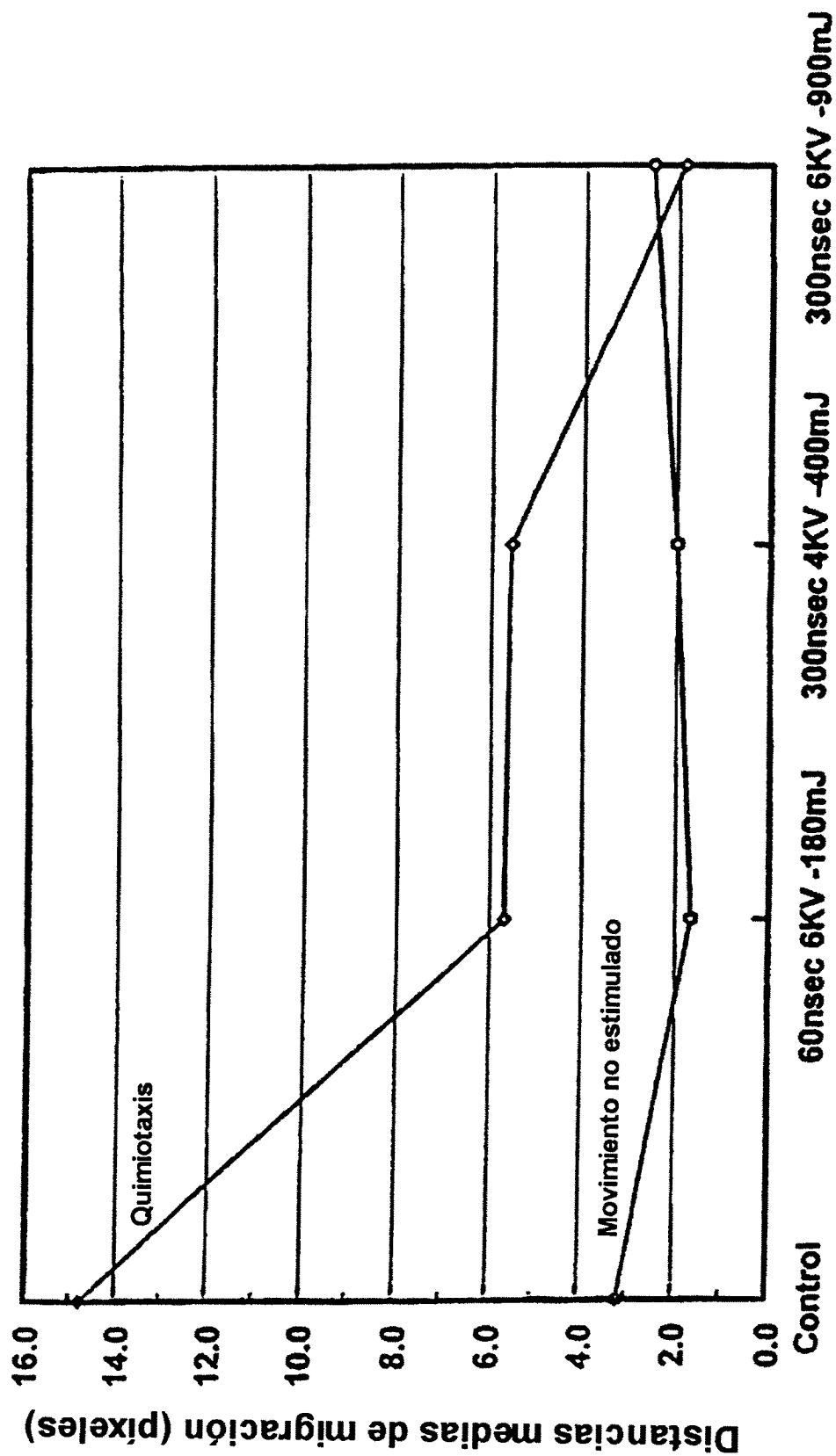


FIG. 13 Condiciones del pulso de potencia

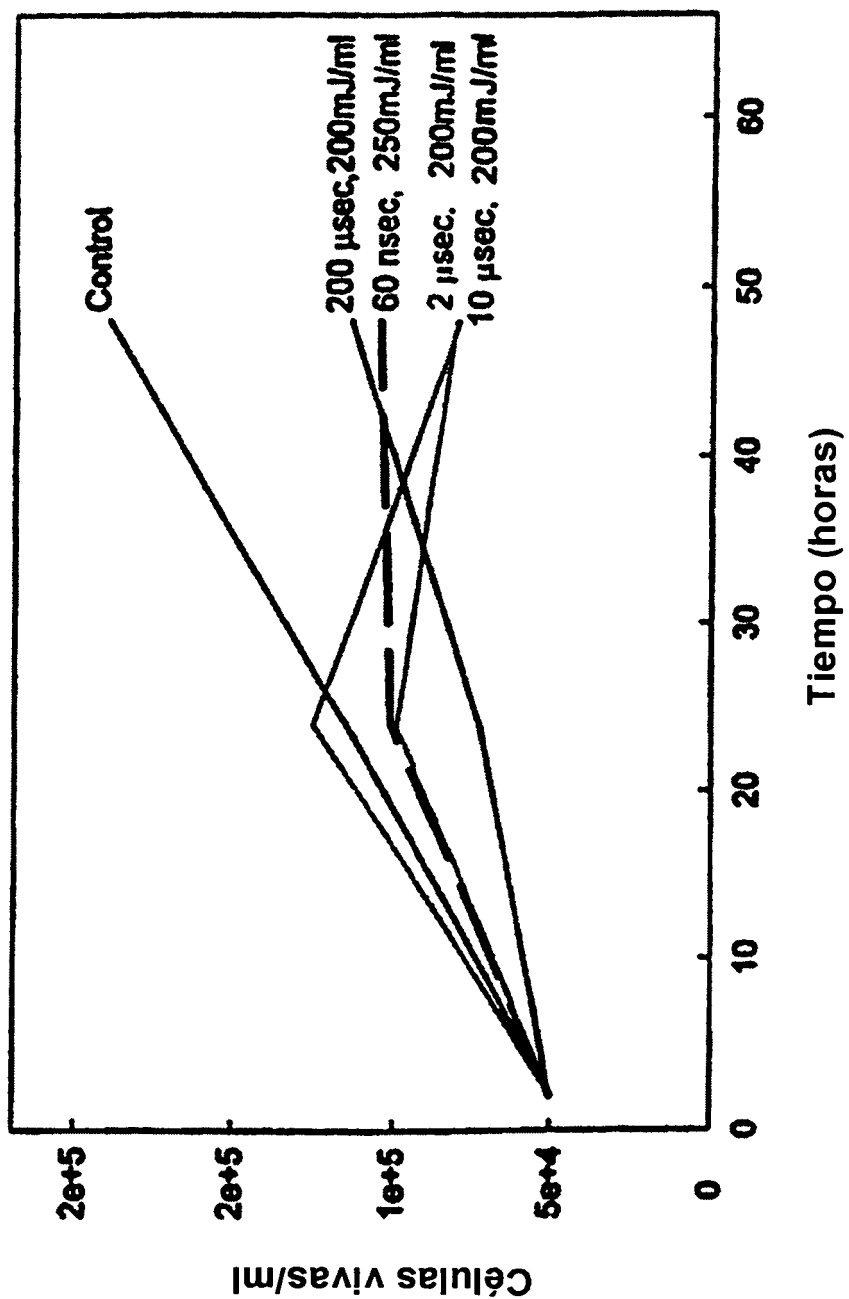


FIG. 14

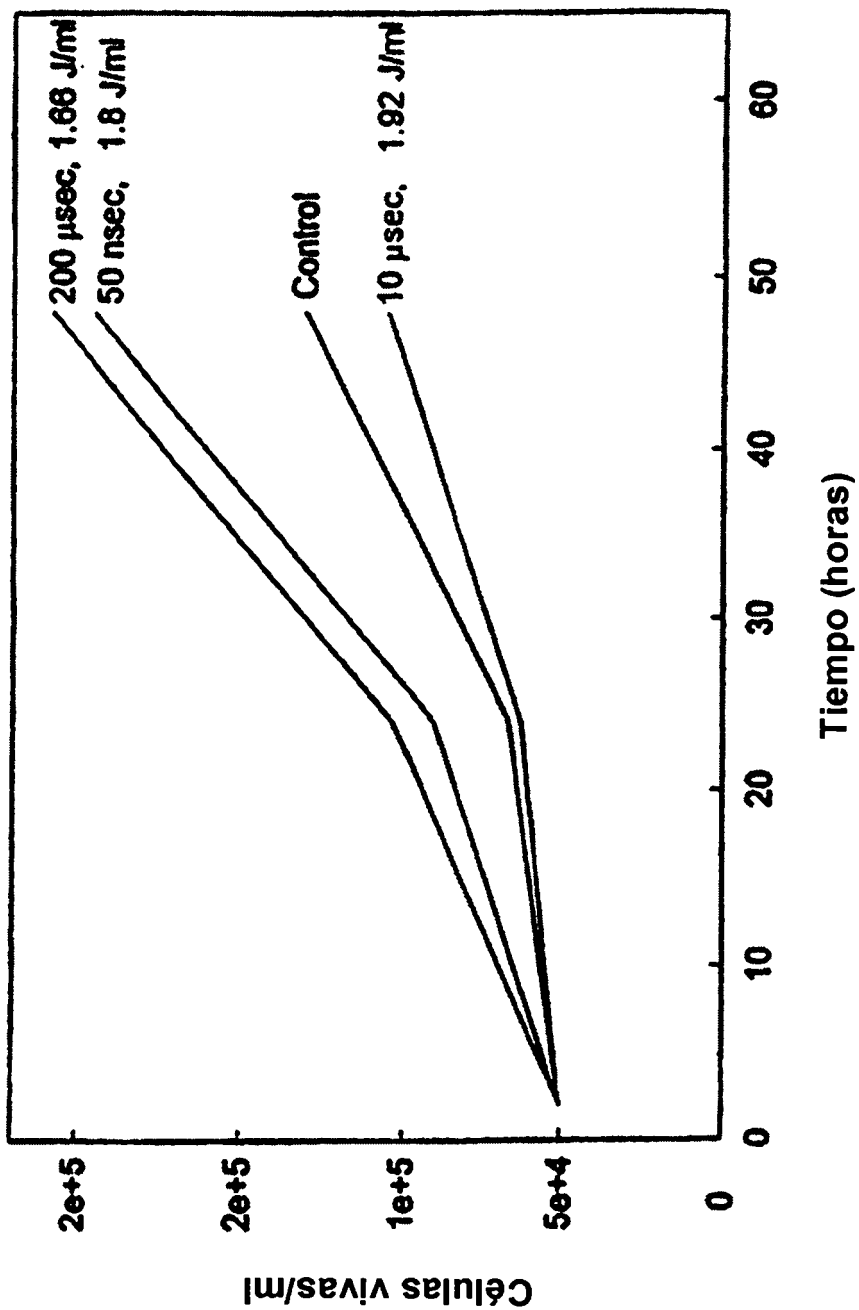


FIG. 15

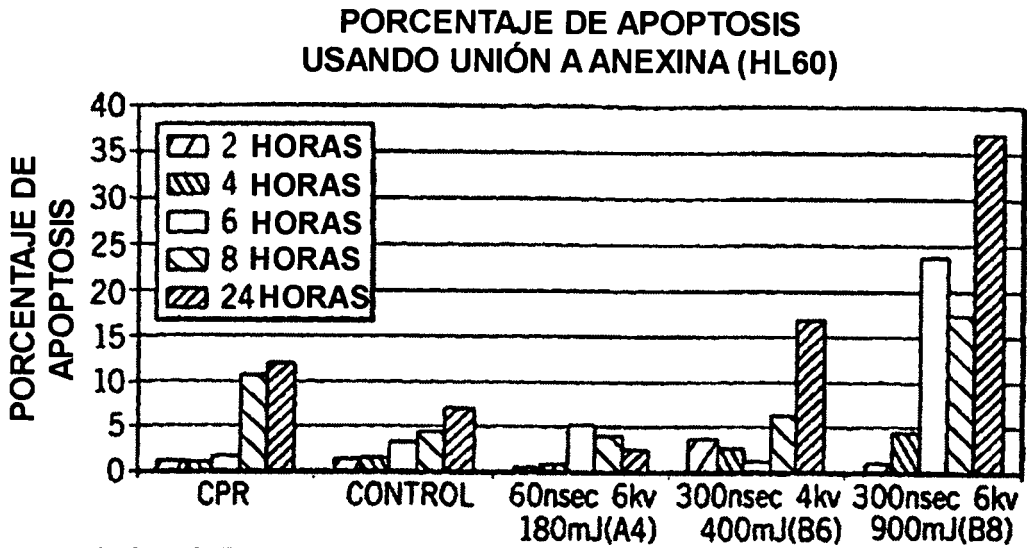


FIG. 16 **CONDICIONES DEL PULSO DE POTENCIA**

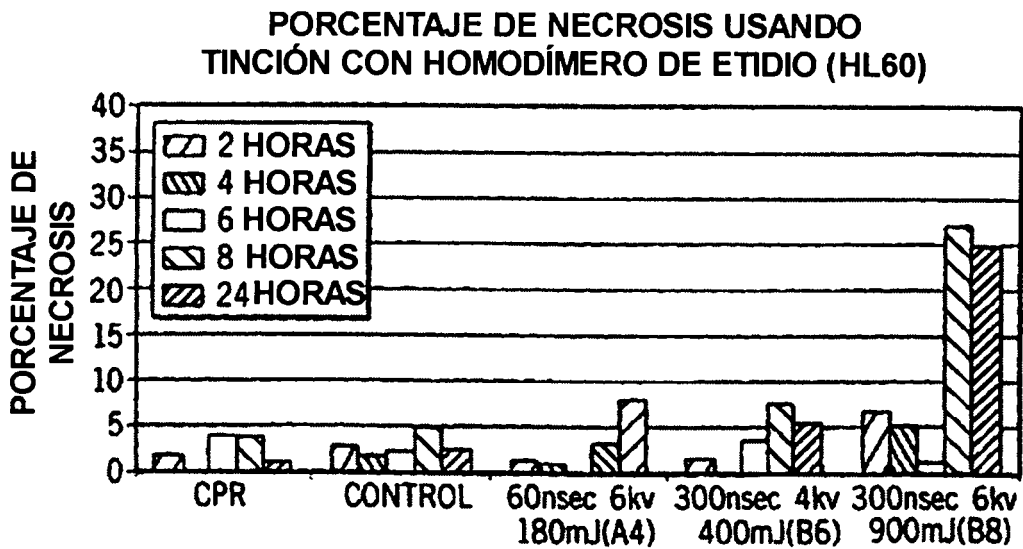


FIG. 17 **CONDICIONES DEL PULSO DE POTENCIA**

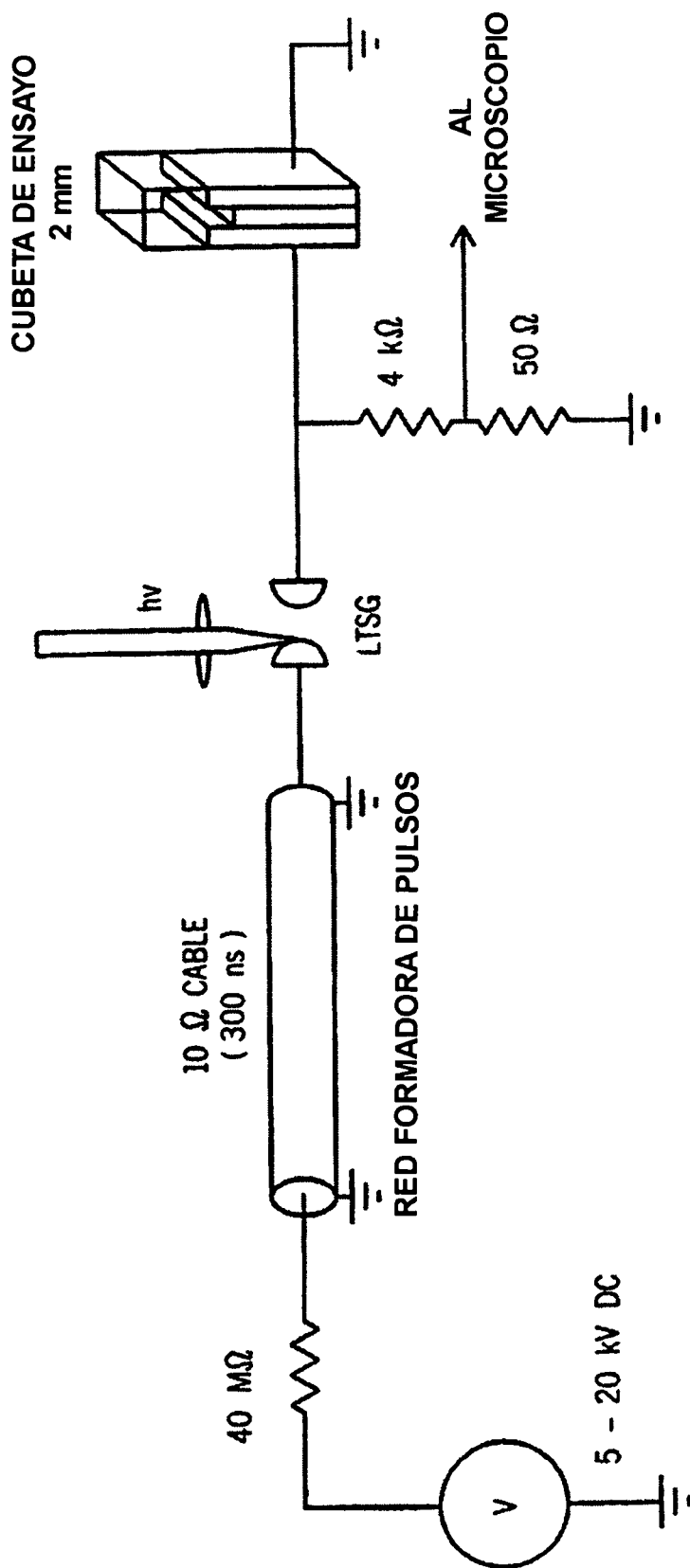
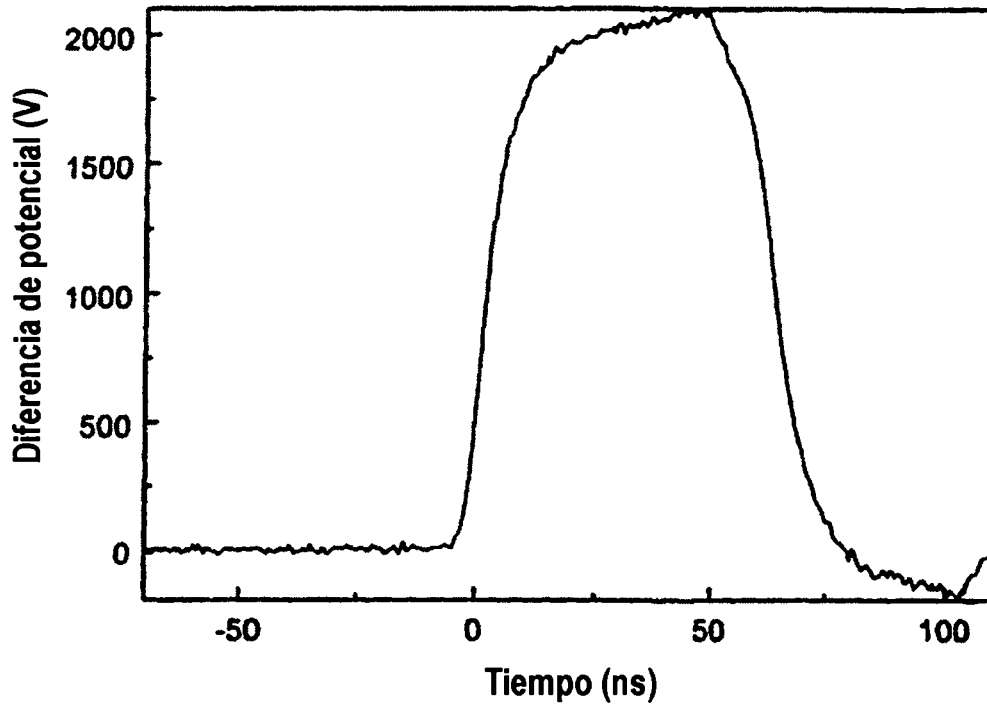


FIG. 20

FIG. 21



Amplitud del pulso: $\tau = 60 \text{ ns}$

Diferencia de potencial: $V_{\max} = 10 \text{ kV}$

Carga: $R = 10 \ \Omega \rightarrow I_{\max} = 1 \text{ kA}$

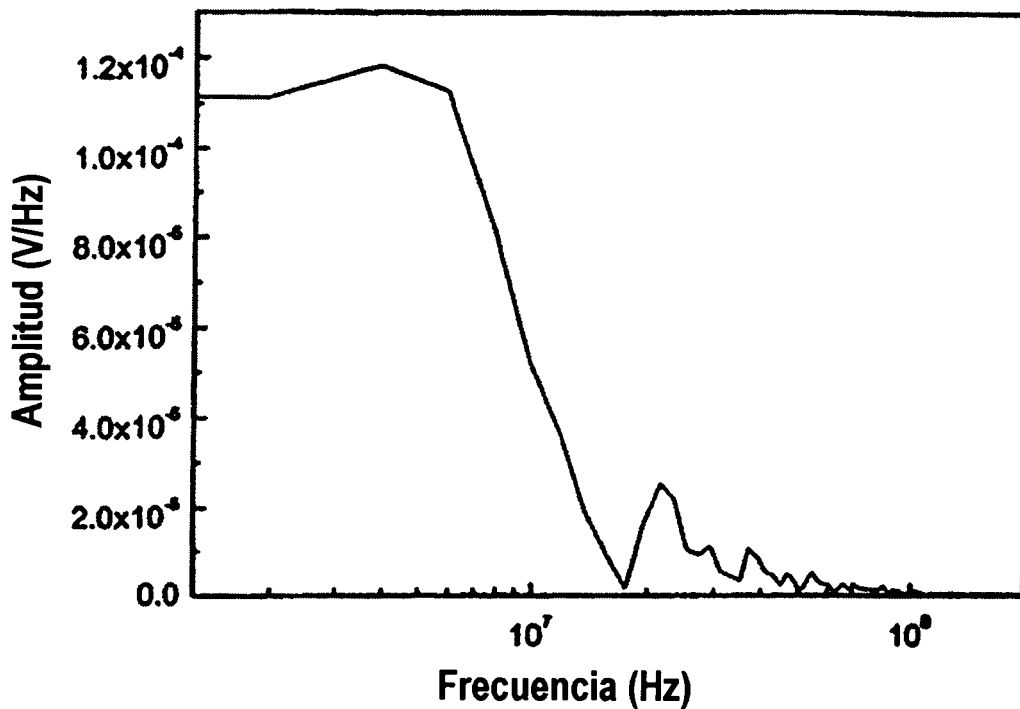
Potencia: $P_{\max} = 10 \text{ MW}$

Energía: $En_{\max} = 0.6 \text{ J}$

Densidad de energía: $W_{\max} = 6 \text{ J/ml}$

Aumento de temperatura: $\Delta T_{\max} = 1.5 \text{ K}$

FIG. 22



Amplitud del pulso: $\tau = 60 \text{ ns}$
Diferencia de potencial: $V_{\text{max}} = 10 \text{ kV}$
Carga: $R = 10 \ \Omega \rightarrow I_{\text{max}} = 1 \text{ kA}$
Potencia: $P_{\text{max}} = 10 \text{ MW}$
Energía: $E_{\text{nmax}} = 0.6 \text{ J}$

Densidad de energía: $W_{\text{max}} = 6 \text{ J/ml}$
Aumento de temperatura: $\Delta T_{\text{max}} = 1.5 \text{ K}$

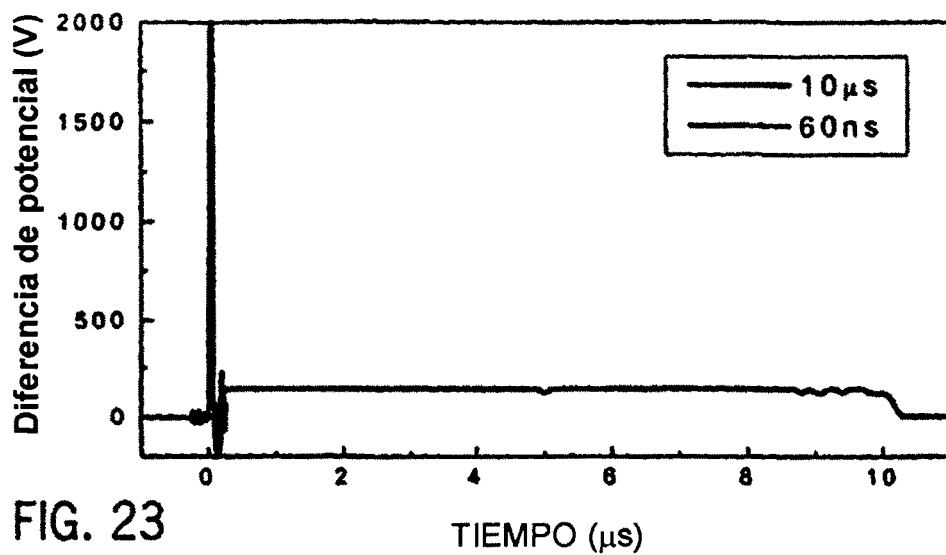


FIG. 23

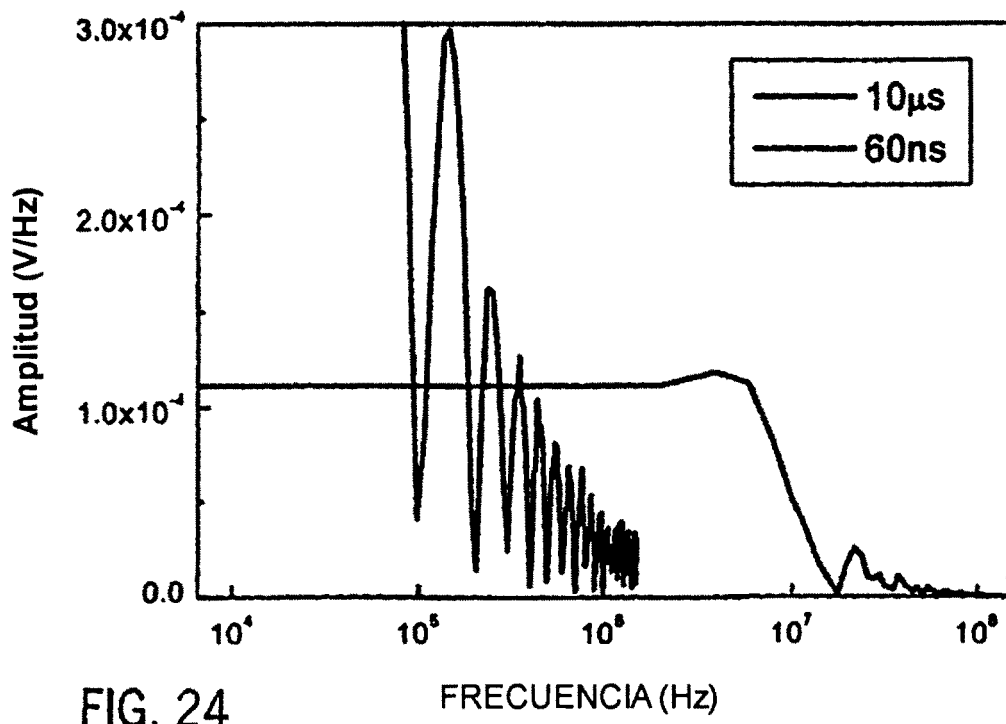


FIG. 24

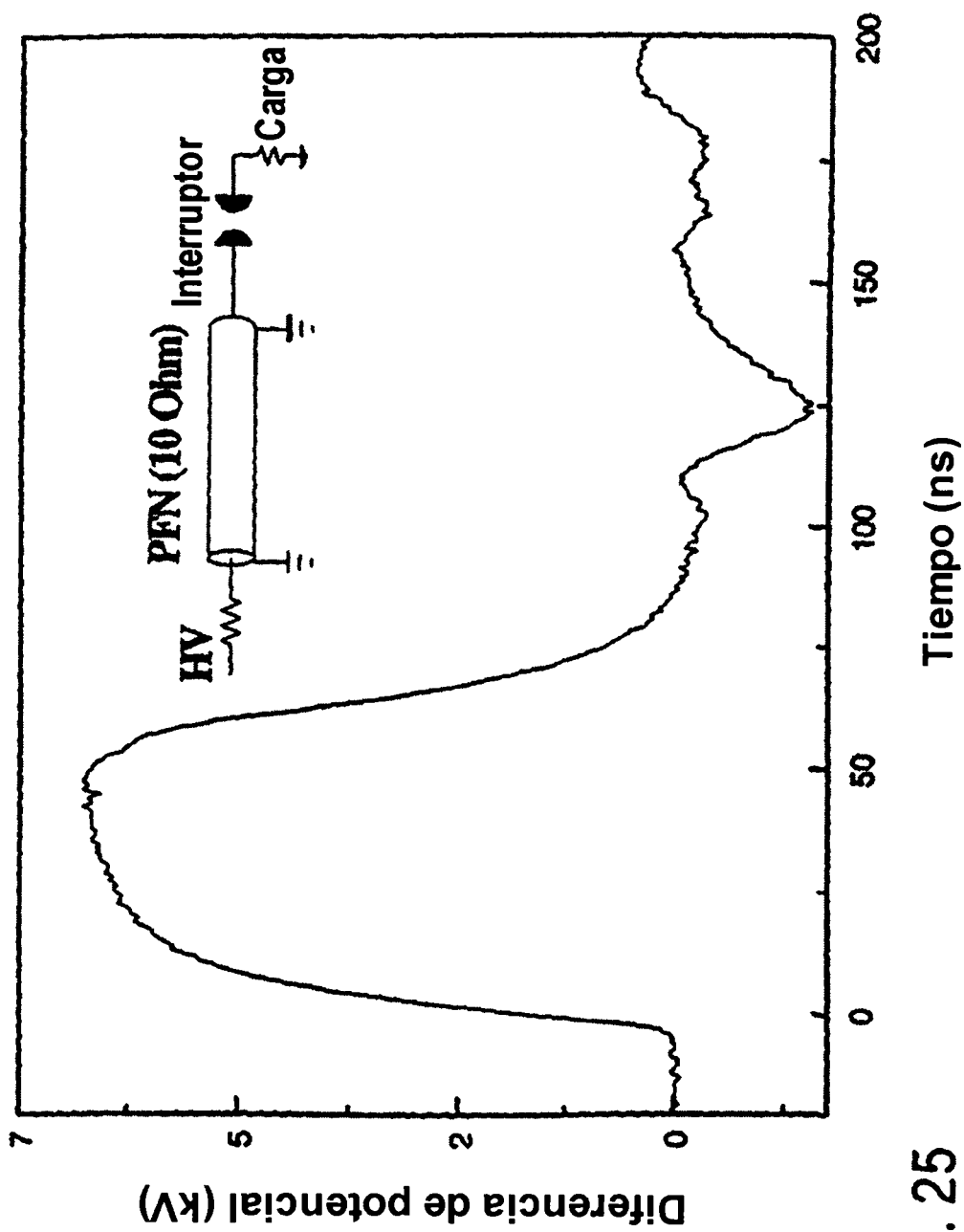
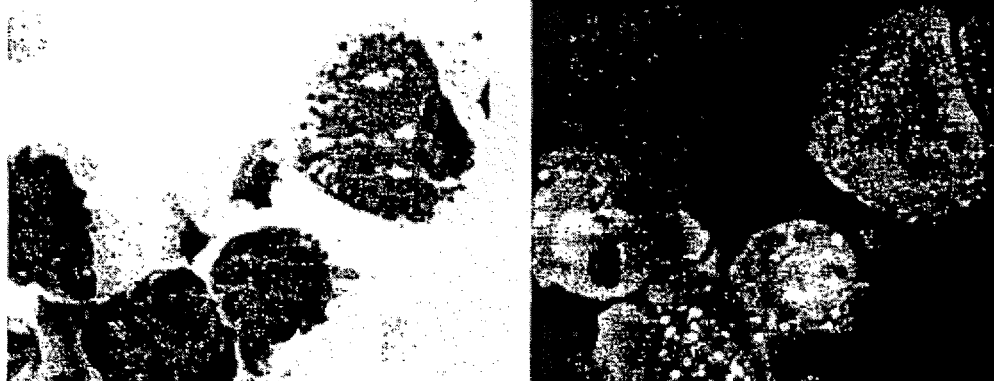


FIG. 25

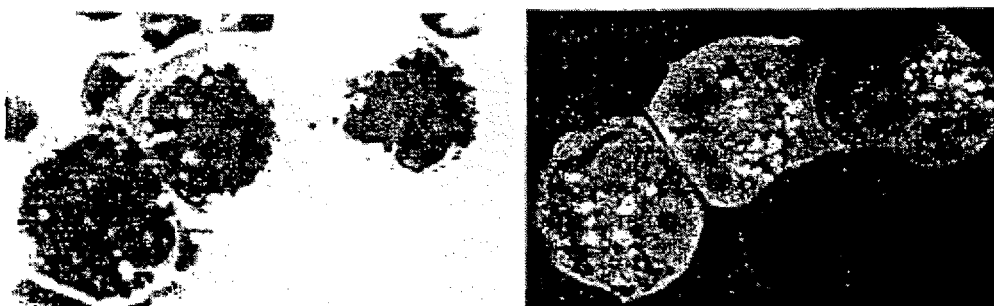
FIG. 26



CONTROL



60 ns, 5.3 MV/m x 3



60 ns, 5.3 MV/m x 5

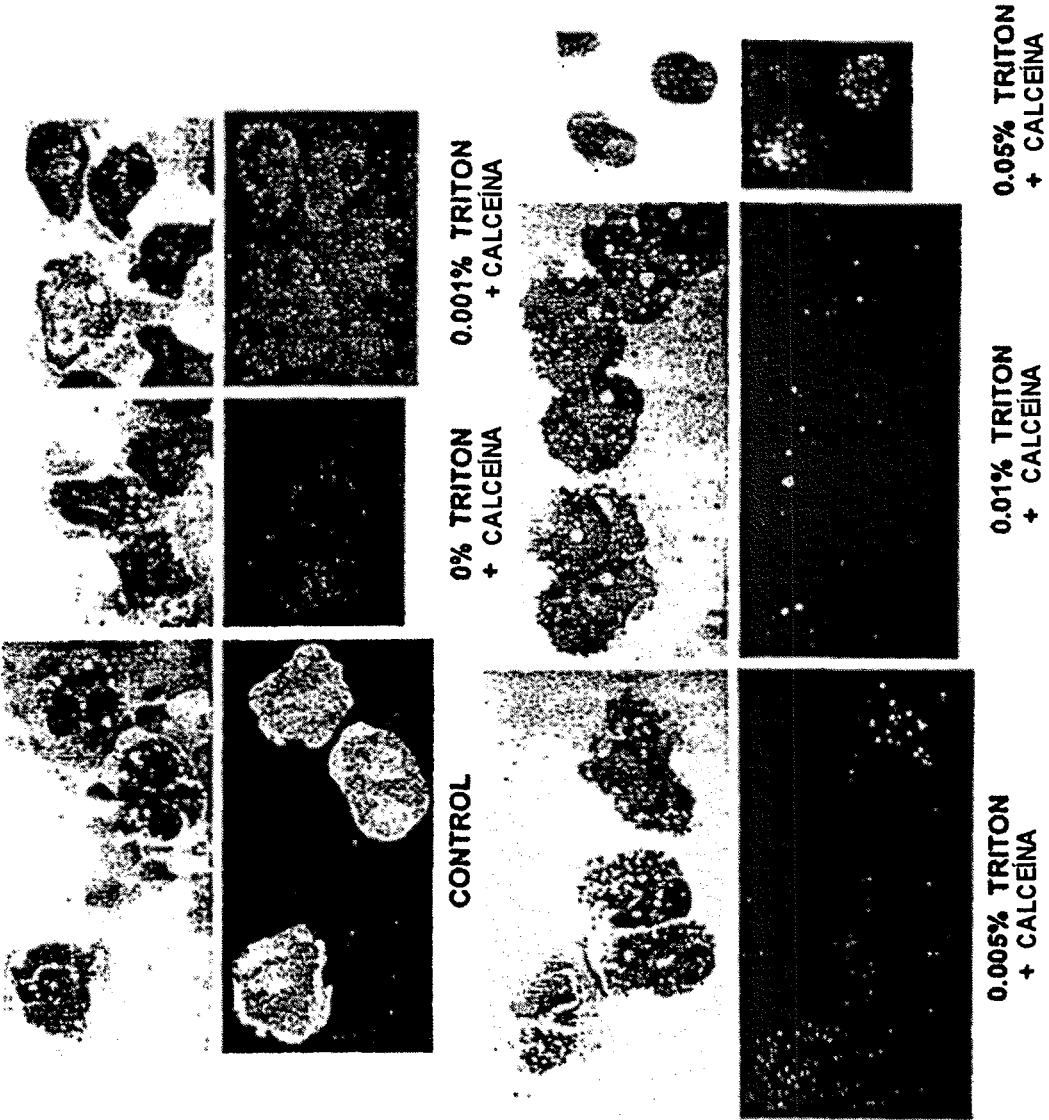


FIG. 27

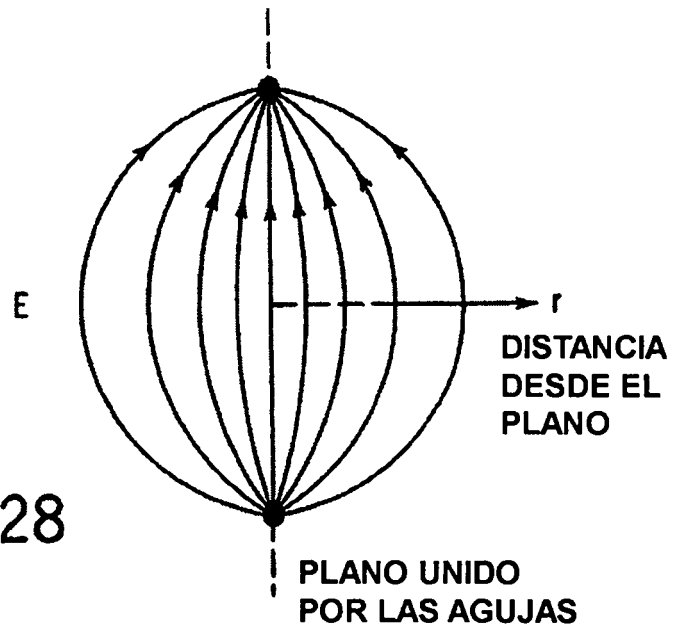


FIG. 28

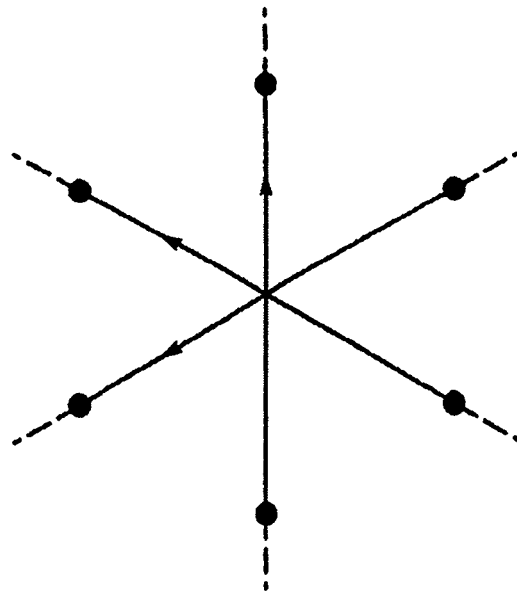


FIG. 29