

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 993 941**

(51) Int. Cl.:

A61N 1/32 (2006.01)

A61N 1/04 (2006.01)

A61B 5/053 (2011.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2007 E 18198349 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3524316**

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

(30) Prioridad:

**17.10.2006 US 852149 P
10.10.2007 US 978982 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.01.2025

(73) Titular/es:

**INOVIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.00%)
660 W. Germantown Pike Suite 110
Plymouth Meeting, PA 19462, US**

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 993 941 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivos de electroporación para la electroporación de células en mamíferos

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con un sistema de electroporación configurado para suministrar un pulso de energía a un tejido deseado de un mamífero para producir una corriente constante *in vivo* similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. La presente divulgación se relaciona, entre otras cosas, con dispositivos de electroporación y su uso para facilitar la introducción de biomoléculas en células de un tejido seleccionado de un mamífero, preferentemente piel.

Antecedentes de la invención

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

15 15 La piel ha evolucionado para proteger no sólo actuando como barrera física, sino también por su papel en el sistema inmunitario. Como primera línea de defensa del huésped contra los agentes patógenos, la piel está bien equipada para la vigilancia inmunitaria. Por ejemplo, en comparación con muchos otros tejidos, la epidermis de la piel contiene una elevada población de células de Langerhans, que son células dendríticas ("CD") inmaduras muy potentes. Así pues, dirigir los antígenos a la epidermis de la piel debería ser capaz de inducir eficazmente respuestas inmunitarias 20 potentes. Sin embargo, la barrera que supone la capa córnea (1.1.1) de la epidermis (1.1) (véase la **Figura 1**) tiende a impedir la entrada efectiva de antígenos en la epidermis. Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígenos en la piel. La elevada población de DC en la piel hace que la inmunización intradérmica ("ID") sea una vía atractiva.

25 25 *Tecnología de transferencia de plásmidos in vivo*, particularmente en lo que se relaciona con la transferencia de plásmidos a tejido o células intradérmicas ("ID") o subcutáneas ("SC"), ha tenido tradicionalmente un alcance limitado debido a que los niveles de expresión *in vivo* resultantes de la transferencia de ADN desnudo (plásmido) han sido bajos, con sólo fracciones de los conseguidos por medio de transferencia de genes virales. Las dosis de plásmido que pueden administrarse en un volumen adaptado para la ID o la SC son pequeñas en comparación con las dosis que 30 pueden utilizarse en inyecciones intramusculares ("IM"). Numerosos investigadores han señalado los problemas toxicológicos y de seguridad que plantea la inyección de virus como vectores de ADN en animales y seres humanos (Frederickson, et al., Mol.). *Ther.* 8: 8-10 (2003)). En consecuencia, la inyección directa de ADN plasmídico se ha convertido en una técnica de administración deseada; sin embargo, la administración eficiente en las células y los 35 niveles de expresión de proteínas han sido un reto. Las células musculares esqueléticas han proporcionado una diana principal para la transferencia directa de plásmidos para vacunas de ADN y otras aplicaciones (Prud'homme, et al., *Curr.* Gene Ther. 6: 243-273 (2006)).

40 Un avance reciente para la administración de plásmidos *in vivo* ha sido el de la electroporación ("EP"). La EP se utiliza para transportar una gran variedad de moléculas: desde iones a fármacos, colorantes, trazadores, anticuerpos y oligonucleótidos, pasando por ARN y ADN (Gehl, *Acta Physiol Scand.*) 177: 437-447 (2003)). Este proceso expone el tejido objetivo a un breve pulso de campo eléctrico que induce poros temporales y reversibles en la membrana celular.

45 40 Durante el periodo de desestabilización de la membrana, moléculas tales como los plásmidos pueden obtener acceso intracelular. Anteriormente, se ha demostrado que las mejoras en el proceso de EP aumentan la eficacia de la transferencia y reducen la cantidad de plásmido necesaria para generar niveles específicos de antígenos *in vivo* mediante el uso de un dispositivo de corriente constante (Draghia-Akli y Smith, página 245 en *Gene Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategies*, N. S. Templeton y D. D. Lasic, eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York. (2003),

45 45 La mejora de la administración de plásmidos por medio de EP permite utilizar el tejido inyectado como biorreactor para la alta producción y secreción de proteínas en el torrente sanguíneo, y/o la presentación de antígenos. Los niveles de expresión aumentan hasta en dos o tres órdenes de magnitud con respecto a la inyección de plásmido sola, hasta niveles comparables a los de la administración de genes mediada por adenovirus y, en algunos casos, pueden alcanzar rangos fisiológicos.

50 50 La electroporación se ha convertido en una herramienta útil para la investigación básica, con aplicación en el área de la transferencia de genes y la vacunación con ADN. La electroporación se ha utilizado con éxito para transfectar células tumorales tras la inyección de plásmidos o para administrar el fármaco antitumoral bleomicina a tumores cutáneos y subcutáneos en humanos. La electroporación se ha utilizado en ratones, ratas, perros y cerdos para administrar genes terapéuticos que codifican para diversas hormonas, citoquinas, enzimas o antígenos. Los numerosos tejidos y órganos a los que se ha dirigido incluyen hígado, ojo, testículos, músculo cardíaco, músculo liso, tumores en diferentes localizaciones y músculo esquelético.

Uno de los retos de la EP de piel en grandes mamíferos y humanos es la variación individual del espesor de la piel, así como la variación del espesor de la piel entre diferentes regiones anatómicas. Por ejemplo, el espesor de la piel a

- nivel del deltoides en los seres humanos es de aproximadamente 2 milímetros ("mm"), mientras que a nivel supraescapular es de aproximadamente 2,6 mm, en la cintura es de aproximadamente 1,7-1,9 mm y en el muslo es de aproximadamente 1,6-1,7 mm. La piel es sensible, por lo que también hay que adaptar el calibre y la configuración de los electrodos para que resulten lo menos molestos posible. Mientras que para fines terapéuticos a veces es aceptable un cierto grado de incomodidad para los pacientes durante la terapia, se ha sugerido que para la vacunación profiláctica sólo puede utilizarse un procedimiento relativamente indoloro. La configuración y las características de la matriz de electrodos, así como los patrones de impulsos del dispositivo, deben adaptarse a este reto. Se sabe que el campo eléctrico uniforme máximo se genera durante la electroporación desde aproximadamente 2 mm más allá de la punta de un electrodo hasta un punto situado a un tercio del electrodo desde su punta.
- 5 La patente estadounidense 7.245.963 por Draghia-Akli, et al. describe sistemas de electrodos modulares y su uso para facilitar la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El sistema modular de electrodos comprende una pluralidad de electrodos de aguja; una aguja hipodérmica; un conector eléctrico que proporciona un enlace conductor desde un controlador de impulsos de corriente constante programable a la pluralidad de electrodos de aguja; y una fuente de energía. Un operador puede agarrar la pluralidad de electrodos de aguja que están montados en una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Las biomoléculas son entonces enviadas a través de la aguja hipodérmica dentro del tejido seleccionado. El controlador de impulsos de corriente constante programable se activa y se aplica un impulso eléctrico de corriente constante a la pluralidad de electrodos de aguja. El impulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la macromolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos.
- 10 15 La publicación de la patente de los Estados Unidos 2005/0052630 enviada por Smith, et al. describe un dispositivo de electroporación que se puede utilizar para facilitar eficazmente la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado de un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electrocinético ("dispositivo EKD") cuyo funcionamiento se especifica por medio de un software o firmware. El dispositivo EKD produce una serie de patrones programables de impulsos de corriente constante entre los electrodos de una matriz basados en el control y la introducción de los parámetros de los impulsos por parte del usuario, y permite el almacenamiento y la adquisición de datos de forma de onda de corriente. El dispositivo de electroporación también comprende un disco de electrodos reemplazable que tiene una matriz de electrodos de aguja, un canal de inyección central para una aguja de inyección y un disco guía extraíble.
- 20 25 30 35 35 Las matrices de electrodos y los procedimientos descritos en Patente de EE.UU. Núm. 7.245.963 y Patente de EE.UU. Pub.. 2005/0052630 están adaptados para penetrar en profundidad no sólo en tejidos tales como el músculo, sino también en otros tejidos u órganos. Debido a la configuración de la matriz de electrodos, la aguja de inyección (para enviar la biomolécula elegida) también se inserta completamente en el órgano diana, y la inyección se administra perpendicularmente al tema diana, en el área predelineada por los electrodos. Los electrodos descritos en la Patente de EE.UU. Núm. 7.245.963 y Patente de EE.UU. Pub. 2005/005263 son preferentemente de 20 mm de longitud y calibre 21. El documento WO 2005/025669 A2 desvela un dispositivo de electroporación que se utiliza para facilitar eficazmente la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado de un cuerpo o planta. El documento WO 01/07583 A1 desvela un análisis de células/tejidos por medio de una electroporación controlada.
- 40 45 En términos generales, la electroporación es el uso de un pulso de campo eléctrico transmembrana para inducir vías microscópicas (poros) en una biomembrana. Estos poros se llaman comúnmente "electroporos". Su presencia permite que las biomoléculas, los iones y el agua pasen de un lado a otro de la membrana. Así, la electroporación se ha utilizado para introducir fármacos, ADN u otras moléculas en tejidos multicelulares, y puede resultar eficaz para el tratamiento de ciertas enfermedades. Sin embargo, el uso de la EP en organismos vivos presenta varios problemas, incluyendo la muerte celular que provoca el calor generado y la incapacidad de los electroporos para volver a cerrarse. Los efectos beneficiosos del fármaco o la biomolécula son extremadamente limitados en los procedimientos EP, en los que se produce un calentamiento excesivo de las células y su muerte.
- Para comprender mejor el proceso de electroporación, es importante observar algunas ecuaciones sencillas. Cuando se aplica una diferencia de potencial (voltaje) a través de los electrodos implantados en un tejido, se genera un campo eléctrico ("E"), que es el voltaje aplicado ("V") dividido por la distancia ("d") entre los electrodos.
- $$E = V/d$$
- 50 55 60 La intensidad del campo eléctrico E ha sido un valor muy importante a la hora de formular protocolos de electroporación para el suministro de un fármaco o biomolécula en la célula del individuo. La intensidad del campo es inversamente proporcional a la distancia entre los electrodos, en el sentido de que, dada una tensión, la intensidad del campo aumenta a medida que disminuye la distancia entre los electrodos. Sin embargo, una advertencia es que se puede generar un campo eléctrico en un tejido con electrodos aislados (es decir, no es necesario el flujo de iones para crear un campo eléctrico). Aunque no queremos atarnos a la teoría, se cree que el flujo de iones abre los electroporos y permite el movimiento de moléculas hacia el interior de las células de un individuo durante la electroporación. El flujo de carga eléctrica en un conductor o medio entre dos puntos que tienen una diferencia de potencial se denomina corriente. La corriente entre electrodos se consigue por medio de los iones o partículas cargadas de los tejidos, que pueden variar entre tejidos y pacientes. Además, el flujo de iones conductores en el tejido puede cambiar entre los electrodos desde el principio del pulso eléctrico hasta el final del mismo.

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

$$R = V/I$$

La resistencia en el tejido entre dos electrodos varía en función de las partículas cargadas presentes en el mismo. Así, 5 la resistencia en el tejido cambia desde el principio del pulso eléctrico hasta el final del mismo.

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

$$W = I^2 R t$$

A grandes rasgos, se colocan electrodos metálicos o dieléctricos en contacto con tejidos y se imponen pulsos cortos de tensiones predeterminadas sobre los electrodos iniciando a las células a abrir transitoriamente los poros de membrana. Los protocolos descritos actualmente para la electroporación se definen en términos de las intensidades 15 de campo resultantes E , que dependen de pulsos cortos de voltaje proporcionales a la distancia entre los electrodos, e independientemente de la corriente o de la resistencia del tejido. Por consiguiente, no se puede determinar la resistencia o el calentamiento del tejido electroporado, lo que conduce a un éxito variable con diferentes protocolos de electroporación de voltaje pulsado. Ciertamente, la diferencia en las amplitudes límite superiores de un pulso de tensión entre los protocolos de electroporación que facilitan una electroporación eficaz y los protocolos de 20 electroporación que provocan la muerte de las células es muy pequeña. Además, se ha observado una correlación definitiva entre la muerte de las células y el calentamiento de las mismas provocado por las amplitudes límite superiores de los pulsos cortos de tensión. Por lo tanto, el sobrecalentamiento de las células entre los electrodos es la causa principal de la ineficacia de cualquier protocolo de pulsación de voltaje de electroporación. Además, la 25 corriente entre los electrodos es el principal factor determinante de la eficacia de cualquier protocolo de pulsación, y no el voltaje a través de los electrodos.

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

$$Q = It$$

Si la corriente no es constante, Q representa la integral de tiempo de I. A este respecto, las partículas cargadas, ya 30 sean iones o moléculas, se comportan de manera similar. Por ejemplo, cuando se depositan iones de plata en un electrodo para definir la unidad estándar de carga eléctrica (el culombio), sólo tiene importancia la carga, tal como se ha definido anteriormente. Para generar una corriente debe haber una tensión mínima, pero la cantidad de iones depositados no puede determinarse a partir de una tensión predeterminada. Por consiguiente, la cantidad de partículas cargadas suministradas a las células en un electroporador no puede deducirse de la tensión impuesta a los electrodos.

35 La eficacia de la electroporación está limitada por el hecho de que existe un valor umbral para la intensidad del pulso por debajo del cual no se produce la electroporación, y un límite superior por encima del cual se destruyen las células. Las pruebas experimentales demuestran que la diferencia entre los límites superior e inferior es tan pequeña que es muy difícil diseñar protocolos de pulsación eficaces sin una experimentación excesiva. Esto dificulta el uso de la técnica, sobre todo cuando se trata de tejidos que intrínsecamente tienen una composición celular no homogénea, tales como la piel -células de la epidermis y la dermis de diferente espesor y número de estratos, grasa, fascia, vasos sanguíneos de diferentes dimensiones, desde capilares a pequeños vasos-; sólo un verdadero dispositivo controlado 40 por software capaz de analizar instantáneamente las condiciones instantáneas variables de un individuo a otro y entre lugares de la superficie de la piel de cada individuo y adaptar la salida a las condiciones específicas cumpliría estos requisitos. Además, el electrodo debe adaptarse a la morfología de la piel y evitar daños tisulares y hemorragias.

45 Las referencias dirigidas a un aparato de electroporación ilustran la utilidad tanto de un aparato de electrodos como de un procedimiento *in vivo* de electroporación. En consecuencia, hay muchas patentes estadounidenses que reivindican electrodos específicos o procedimientos de electroporación. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. 6.302.874 a Zhang, et al. describe un procedimiento y un aparato para la administración tópica asistida eléctricamente de agentes para aplicaciones cosméticas. La patente estadounidense 5,676,646 a Hofmann, et al. enseña un aparato de electroporación de flujo continuo para implantar moléculas en células sanguíneas vivas de un paciente. Las patentes estadounidenses 6,241,701 a Hofmann, et al. y 6,233,482 a Hofmann, et al. describen un procedimiento y un aparato 50 para la administración de fármacos y genes mediada por electroporación. Más concretamente, describen un procedimiento y un aparato de terapia de electroporación ("TEP") para tratar tumores con una combinación de electroporación y un agente quimioterapéutico para producir la regresión de tumores *in vivo*. La patente estadounidense 6,216,034 a Hofmann, et al. describe un procedimiento de programación de una matriz de electrodos de aguja para terapia de electroporación de tejido. La patente estadounidense 6,208,893 a Hofmann, et al. describe 55 un aparato de electroporación con una plantilla de electrodos conectiva. La patente estadounidense 6,192,270 a

Hofmann, et al. describe un conjunto de electrodos para un aparato y un procedimiento de administración molecular trans-superficial. La patente estadounidense 6.181.964 a Hofmann, et al. describe un aparato y un procedimiento mínimamente invasivos para electroporar fármacos y genes en tejidos. La patente estadounidense 6,150,148 a Nanda, et al. describe un aparato de electroporación para el control de la temperatura durante el proceso, por medio de la generación y aplicación de un campo eléctrico de acuerdo con un esquema de pulsación y perfil de temperatura especificado por el usuario. La patente estadounidense 6,120,493 a Hofmann, et al. describe un procedimiento para la introducción de agentes terapéuticos mediante el uso de un aparato de electroporación de campo eléctrico. La patente estadounidense 6,096,020 a Hofmann, et al. describe un procedimiento y aparato de electroporación para generar y aplicar un campo eléctrico de acuerdo con un esquema de pulsación especificado por el usuario. La patente de EE.UU. 6.068.650 a Hofmann, et al. describe un procedimiento de aplicación selectiva de configuraciones de conjuntos de agujas para terapia de electroporación *in vivo*, y la patente de EE.UU. 5.702.359 a Hofmann, et al. describe un aparato de electrodos para la aplicación de electroporación a una porción del cuerpo de un paciente con un elemento sensor para detectar una distancia entre los electrodos y generar una señal de distancia proporcional a la distancia entre dichos electrodos, y medios que responden a dicha señal de distancia para aplicar pulsos de señal eléctrica de alta amplitud a los electrodos proporcionales a la distancia entre dichos electrodos. La publicación de patente estadounidense 2005/0070841 de Mathiesen, et al. desvela un dispositivo de electroporación y un aparato de inyección. Los dispositivos utilizados en combinación con los novedosos electrodos cutáneos aquí presentados y empleados en los experimentos descritos en la presente memoria descriptiva se reivindican en Publicación de Patente de EE.UU. 2004/0167458 y Publicación de Patente de EE.UU.. 2005/0052630.

20 Recientemente se ha informado de avances en la mejora de la expresión de plásmidos *in vivo* y el logro de niveles fisiológicos de una proteína secretada por medio de electroporación (Draghia-Akli, et al., Technology in Cancer Research & Treatment 1:365-371 (2002)). Los estudios demuestran que la inyección de un plásmido que expresa la hormona liberadora de la hormona del crecimiento ("HLHC"), seguida de electroporación, es escalable y representa un enfoque para producir de forma estable proteínas secretadas para el tratamiento de grandes mamíferos (Draghia-Akli, et al., Journal of Animal Science 81:2301-2310 (2003); Draghia-Akli, et al., FASEB J 17:526-528 (2003)). Sin embargo, se necesitan mejoras adicionales en las técnicas de electroporación, en particular para la electroporación cutánea eficaz con fines de vacunación y terapia génica, y la electroporación con invasividad y dolor reducidos.

Investigadores anteriores han utilizado dispositivos de electroporación para la transferencia de ADN plasmídico que se basan conceptualmente en sistemas de voltaje constante, mediante el uso de un voltaje predeterminado entre los electrodos. Dado que la impedancia entre los electrodos incrustados en un tejido puede variar de un caso a otro, o de un tejido a otro, un voltaje predeterminado no produce una corriente predeterminada. Un impulso de tensión predeterminado provoca un aumento no regulado de la corriente que fluye a través de un tejido muscular durante la duración del impulso, además de la pérdida de la función de onda cuadrada perfecta. Por el contrario, una fuente de corriente constante mantiene realmente una corriente constante con función de onda cuadrada a través del tejido muscular. Sin embargo, los dispositivos de electroporación comerciales existentes no tienen el firmware diseñado para permitir la medición de la cantidad exacta de corriente a la que se exponen las células. La corriente no regulada generada con los dispositivos de electroporación convencionales puede generar cantidades de calor en los tejidos que pueden matar fácilmente las células. Por ejemplo, un pulso electrónico típico de 50 milisegundos (ms) con una corriente media de 5 amperios ("A", o "Amp") a través de una impedancia de carga típica de 25 ohmios ("Ω") puede elevar teóricamente la temperatura en el tejido 7,5 °C, lo que es suficiente para matar las células. La física de las lesiones tisulares causadas por descargas eléctricas es revisada por Lee, et al. (Lee, et al., Annu. Rev. Biomed. Eng 2:477-509.:477-509 (2000)). Por lo tanto, es necesario evitar los problemas tecnológicos asociados con la electroporación a tensión constante, proporcionando un medio para controlar eficazmente la cantidad de electricidad suministrada a las células y lograr así una electroporación eficaz, limitando al mismo tiempo la destrucción de las células.

Las dificultades presentes en muchos electrodos provienen del hecho de que la energía del pulso se concentra en el centro de la matriz, el punto en el que se deposita el material a transfectar. Como resultado, la distribución espacial del suministro de energía adquiere un carácter muy poco uniforme. Por lo tanto, sólo se electropora una fracción de las células del volumen abarcado por el conjunto de electrodos. Por lo tanto, en algunas aplicaciones también existe la necesidad de proporcionar un medio para controlar eficazmente la dosis de electricidad suministrada a las células en el espacio interelectrodo por medio del control preciso del flujo iónico que incide en los conductos de las membranas celulares. Además, los electrodos existentes en el mercado para aplicaciones en grandes animales y seres humanos no suelen permitir la identificación de las células dendríticas ni la orientación de SC, ya que suelen ser demasiado largos, de un calibre inadecuado y con una orientación de bisel incorrecta. Así, existe la necesidad de ciertas aplicaciones para un electroporador cutáneo, facilitando la entrega *in vivo* de una biomolécula, tal como un plásmido, en tejido cutáneo, por ejemplo, espacios ID o SC en un animal.

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

Además, los dispositivos de electroporación que utilizan matrices de agujas reemplazables invasivas de la piel y el músculo como electrodos para suministrar la corriente eléctrica requieren el mantenimiento de condiciones estériles cuando se produce el reemplazo de la matriz de agujas. Esto es necesario tanto desde el punto de vista de la práctica médica como del cumplimiento de la normativa. Al mismo tiempo, se necesita un electrodo cutáneo desechable que permita reducir los costes de producción y su uso en la vacunación masiva, tanto con fines terapéuticos como profilácticos. Por lo tanto, también existe la necesidad de proporcionar un disco de electrodos cutáneos que permita una fácil sustitución de la matriz cutánea de agujas.

Sumario de la invención

La invención está definida a través de las reivindicaciones adjuntas. Los aspectos, las realizaciones y los ejemplos divulgados de la presente divulgación que no entran en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención y se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

La presente invención proporciona un sistema de electroporación configurado para suministrar un pulso de energía a un tejido deseado de un mamífero para producir una corriente constante *in vivo* similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario, que comprende:

(i) un conjunto de mango que comprende:

un mango;

una matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5) con una pluralidad de electrodos (6.2.4) montados en una estructura de soporte en una disposición espacial; y

un controlador en comunicación con la matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5), que controla el suministro del impulso de energía a través de los electrodos (6.2.4); y

un mecanismo de retroalimentación; y

(ii) un sistema de embalaje para el almacenamiento estéril de una pluralidad de matrices de electrodos (6.1.3, 6.2.5), caracterizado porque:

la matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5) es desechable y está conectada de forma desmontable al conjunto de mango de manera que, cuando está conectada al conjunto de mango, los electrodos (6.2.4) reciben el impulso de energía del conjunto de mango y lo administran al tejido deseado;

al menos uno de la pluralidad de electrodos (6.2.4) está dispuesto para ser neutro durante la administración del pulso de energía y está dispuesto para medir la impedancia en el tejido deseado y comunicar dicha impedancia al mecanismo de retroalimentación durante la administración del pulso; y

el mecanismo de retroalimentación está configurado para recibir la impedancia medida y ajustar en respuesta el pulso de energía suministrado por el conjunto de mango para mantener la corriente constante.

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan dispositivos de electroporación que efectúan la electroporación en tejido de un mamífero suministrando una corriente constante al tejido, siendo el tejido preferentemente tejido cutáneo. En algunas realizaciones, los dispositivos de electroporación están configurados para

suministrar a un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía que produce una corriente constante similar a una corriente preestablecida introducida por un usuario. El dispositivo de electroporación comprende un componente de electroporación y un conjunto de electrodos cutáneos. El componente de electroporación es capaz de suministrar el pulso de energía que produce la corriente constante en el tejido deseado, e incluye un mecanismo de retroalimentación. El conjunto de electrodos cutáneos incluye una matriz de electrodos que tiene una pluralidad de

electrodos cutáneos en una disposición espacial, en la que el conjunto de electrodos cutáneos recibe el pulso de energía del componente de electroporación y lo administra al tejido deseado a través de los electrodos cutáneos. Al menos uno de la pluralidad de electrodos cutáneos es neutro durante la administración del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al componente de electroporación. El mecanismo de retroalimentación puede recibir la impedancia medida y puede ajustar el pulso de energía suministrado por el componente de electroporación para mantener la corriente constante.

En un aspecto de la presente invención, el conjunto de mango de electroporación está configurado para suministrar un pulso de energía a un tejido deseado de un mamífero para producir una corriente constante en el tejido deseado similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. El conjunto de mango que comprende una matriz de electrodos cutáneos con una pluralidad de electrodos cutáneos en una disposición espacial, en la que al menos uno

de los electrodos cutáneos es neutro durante la administración del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado; un controlador en comunicación con la matriz de electrodos cutáneos, que controla la administración del pulso de energía a través de los electrodos cutáneos; y un medio para realizar un mecanismo de retroalimentación, en el que el mecanismo de retroalimentación se realiza por medio de software o hardware, que recibe la impedancia

medida del electrodo cutáneo neutro y ajusta el pulso de energía administrado, si es necesario, para mantener la corriente constante.

En un aspecto de la presente divulgación, pero que no forma parte de la invención, son procedimientos de uso de los dispositivos de electroporación de la presente invención para administrar biomoléculas a células de un tejido de un mamífero. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden el uso de los dispositivos de electroporación cutánea descritos en la presente memoria descriptiva para suministrar el pulso de energía al tejido cutáneo deseado para producir la corriente constante similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. Los procedimientos incluyen: insertar una pluralidad de electrodos cutáneos de aguja en el tejido cutáneo sin penetrar sustancialmente un tejido muscular; y aplicar el pulso de energía a la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja para suministrar una corriente igual a la corriente preestablecida en el tejido cutáneo; y medir la impedancia del tejido cutáneo con uno neutro de la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja y utilizar un mecanismo de retroalimentación en el dispositivo de electroporación para ajustar el pulso de energía aplicado en respuesta a la impedancia medida para mantener constante la corriente suministrada al tejido cutáneo.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, pero no parte de la invención, son procedimientos que comprenden las etapas de: proporcionar un conjunto de electrodos cutáneos que tiene una pluralidad de electrodos cutáneos de aguja, el conjunto de electrodos cutáneos en comunicación eléctrica con un generador de forma de onda de corriente; poner en contacto el tejido cutáneo de un mamífero con la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja sin penetrar sustancialmente un tejido muscular del mamífero; y aplicar un pulso eléctrico de energía desde el generador de forma de onda de corriente a la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja durante un tiempo y en condiciones eficaces para exponer el tejido cutáneo puesto en contacto a una corriente sustancialmente constante.

Breve descripción de los dibujos

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

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

La figura 2A muestra un diagrama de sistema de una realización preferente de los dispositivos EP descritos en la presente memoria descriptiva.

La figura 2B muestra un ejemplo de un controlador con puede formar parte de los dispositivos EP descritos en la presente memoria descriptiva.

La Figura 2C muestra un ejemplo de una grabación de secuencia de pulsos real descargada al final de la secuencia de pulsos, mediante el uso del dispositivo de EP cutánea como generador de pulsos, y la matriz de electrodos cutáneos descrita para administrar los pulsos eléctricos tras la inyección de la formulación plasmídica en las capas ID y SC de la piel en un cerdo de 25 kg: ("2.1") muestra el nombre del archivo que se ha descargado a través del puerto de infrarrojos en un ordenador personal o dispositivo portátil; ("2.2") muestra el número de individuo, tal y como se ha introducido directamente en el dispositivo de electroerosión cutánea a través del teclado numérico, como condición previa antes de que pudiera iniciarse el proceso de electroerosión; ("2.3") muestra las características de los pulsos eléctricos seleccionados por el operador, incluido el número de pulsos en la secuencia de pulsos, el tiempo de espera antes y entre pulsos (en segundos, "s"), la anchura del pulso (en milisegundos, "ms"), la amplitud de la corriente del pulso (en amperios, "A"); ("2..4") muestra la carga eléctrica de cada electrodo durante cada pulso - para cada uno de los electrodos cutáneos 1, 2, 3 es posible cualquiera de las siguientes posiciones: positivo, "pos"; negativo, "neg"; o apagado "off" - el electrodo o electrodos "off" están importando información de vuelta al dispositivo antes, durante y después de cada pulso ("retroalimentación"); ("2.5") muestra el amperaje real ("A"), el voltaje ("V") y la resistencia del tejido cutáneo, Z, en la zona de inyección ("Ohmios") durante cada pulso de la secuencia de pulsos; como la retroalimentación se produce cada 0,1-0,2 ms (y en este caso los pulsos tenían una duración de 52 ms), sólo se ha incluido una pequeña proporción del archivo de retroalimentación, a modo de ejemplo;

La figura 3 muestra un ejemplo de la visualización gráfica de los datos descargados cuando se utiliza un electrodo cutáneo de suministro de impulsos eléctricos por el dispositivo de EP cutánea. El gráfico representa tanto el voltaje ("3.1.1") como la corriente ("3.1.2") medidos por el dispositivo de EP cutánea en el pulso 1 ("3.1") así como el voltaje ("3.2.1") y la corriente ("3.2.2") medidos por el dispositivo de EP cutánea en el pulso 2 ("3.2"). La resistencia del tejido (medida durante los pulsos eléctricos) también se muestra para el pulso 1 ("3.3") y el pulso 2 ("3.4");

La figura 4 muestra un ejemplo de la visualización gráfica de los datos descargados cuando se utiliza una gran matriz de electrodos de suministro de pulsos eléctricos por el dispositivo de EP cutánea a la piel. El gráfico describe tanto el voltaje ("4.1.1") como la corriente ("4.1.2") como se mide por medio del dispositivo de EP cutánea en Pulso 1 ("4.1"), el voltaje ("4.2.1") y la corriente ("4.2.2") como se mide por medio del dispositivo de EP cutánea en Pulso 2 ("4.2"), y el voltaje ("4.3.1") y la corriente ("4.3.2") como se mide por medio del dispositivo de EP cutánea en Pulso

3 ("4.3"). La resistencia del tejido (medida durante los pulsos eléctricos) también se muestra para el pulso 1 ("4.4"), pulso 2 ("4.5") y pulso 3 ("4.6");

5 **La figura 5** muestra una representación esquemática de una matriz de electrodos cutáneos, incluyendo características detalladas: ("5.1") vista lateral que muestra la longitud y el ángulo del extremo de inserción de una única aguja-electrodo; ("5.2") vista frontal que muestra los ángulos y grados del punto de revere-trochar; ("5.3") notas que indican las especificaciones de la aguja-electrodo;

10 **La figura 6** muestra una representación visual ("6.1") y esquemática ("6.2") del mango del electrodo cutáneo: ("6.1.1") disparador utilizado para activar la comprobación de la impedancia y, a continuación, la secuencia de electroporación; ("6.1.2") "DEL" verde o rojo cuando el dispositivo de electroporación cutánea está listo para tratar o durante un error, respectivamente; ("6.1.3") matriz de electrodos cutáneos bloqueada en su sitio; ("6.1.4") cable que contiene cables individuales y señales entre el mango de electroporación cutánea y la unidad del dispositivo de electroporación cutánea; ("6.1.5") cables individuales cuyo detalle se representa en el diagrama de cableado eléctrico de la **Figura 8**; ("6.2.1") esquema del disparador; ("6.2.2") esquema del DEL; ("6.2.3") esquema que representa el reborde elevado en el haz de electrodos cutáneos utilizado para facilitar la expulsión del mango del electrodo cutáneo tras la finalización de la secuencia de impulsos de electroporación; ("6.2.4") esquema de los electrodos de aguja del haz de electrodos cutáneos; ("6.2.5") esquema de vista lateral del haz de electrodos cutáneos bloqueado en su sitio en el mango; ("6.2.6") esquema del brazo de bloqueo y el retén (en el mango); ("6.2.7") esquema que muestra los enchufes dentro del mango del electrodo cutáneo utilizados para recibir y hacer contacto para la conexión del circuito; ("6.2.8") esquema que muestra el cable que aloja los cables individuales cuyo detalle se muestra en la **Figura 8**;

15

La figura 7 muestra la matriz de electrodos cutáneos montada en el mango: ("7.1") Esquema en vista lateral de los enchufes individuales para recibir y realizar la conexión eléctrica entre los electrodos de aguja individuales de la matriz de electrodos cutáneos y el mango del electrodo cutáneo;

La Figura 8 muestra el diagrama de cableado eléctrico para el conjunto de matriz y mango;

25 **La figura 9** muestra la representación esquemática del contenedor de envasado plegable en forma de concha de almeja de la matriz de electrodos multipiel que permite la carga estéril del mango entre los individuos de tratamiento: ("9.1") tapa; ("9.2") base, incluidos los pocillos individuales diseñados a medida para alojar conjuntos; ("9.3") vista lateral de los pocillos; y

30 **Figura 10** muestra los niveles medios de expresión de PVF en animales a los que se inyectaron diferentes cantidades del plásmido pSP5-12-PVF y se electroporaron con el dispositivo de EP cutánea mediante el uso de la matriz de electrodos cutáneos y las condiciones de EP específicas de la piel (MC), en comparación con los electrodos y las condiciones empleadas habitualmente para la administración del plásmido al músculo esquelético (MG).

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

35 **La Figura 12** muestra un gráfico de los niveles de expresión de FAES (pg/mL/kg) a lo largo de 11 días desde el momento de la electroporación mediante el uso de los respectivos plásmidos que expresan FAES.

La figura 13 muestra un gráfico de los niveles de expresión de FAES en el día 11 para varias muestras junto con los resultados de ELISA relacionados (en dilución media de anticuerpos).

40 **La Figura 14** muestra un gráfico de los niveles de expresión de IGF-I (mg/mL) a lo largo de 11 días desde el momento de la electroporación mediante el uso de los respectivos plásmidos que expresan IGF-I.

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

45 **La figura 16** muestra un gráfico con los niveles de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (FAES) detectados en suero porcino a los 4-11 días de la administración de pFAES. Los animales recibieron la misma dosis de plásmido (1 mg), en una formulación concentrada (a 10 mg/mL) o en una formulación normal (a 2mg/mL) ($n=5$ /grupo). Los datos se muestran como respuestas medias del grupo \pm SEM.

50 **La figura 17** ilustra el diseño de estudios con primates no humanos: La Fig 17A muestra que los macacos Rhesus fueron inmunizados dos veces con una dosis baja (0,2 mg por antígeno) de inmunógenos del VIH-1 y de IL-12 rhesus codificada por plásmido en las semanas 0 y 4; y a continuación inmunizados dos veces con una dosis más alta (1,0 mg por antígeno) en las semanas 8 y 12. Se recogieron muestras de sangre aproximadamente cada dos semanas para realizar ensayos inmunológicos. Se realizaron ELISpots dos semanas después de cada inmunización y ELISAs en las semanas 0, 4, 8, 12, 18. La Fig. 17B muestra un diagrama de la matriz de electrodos cutáneos y el mango. La EP cutánea consiste en una matriz de un solo uso que tiene 3 electrodos de acero inoxidable, calibre 26, de 3-5 mm

55

de longitud. La matriz está fijada al mango aplicador del dispositivo; el procedimiento de EP puede iniciarse pulsando el botón de disparo del mango aplicador.

La figura 18 muestra un gráfico que muestra respuestas inmunitarias celulares mejoradas a inmunógenos de VIH-1 con coinyección ID/SC de IL-12 codificada en plásmido seguida de EP. Se realizaron ELISpots de IFNy dos semanas después de cada inmunización. Las respuestas a *env* se representan como barras blancas y *gag* se representan como barras negras con los datos mostrados como respuestas medias de grupos apilados ± SEM.

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

La Figura 20 muestra un gráfico que muestra la inducción de la respuesta celular mediada por T_{H1} y no por T_{H2} tras la inmunización ID/SC de VIH-1 *gag*, *env* y plásmido rhIL-12. Se realizó un ELISpot de IL-4 en la semana 10 para evaluar la inducción de una respuesta T_{H2} específica *gag* o *env*. Las respuestas a *env* se representan como barras blancas y *gag* se representan como barras negras con los datos mostrados como respuestas medias de grupos apilados ± SEM.

La figura 21 muestra un gráfico que muestra la inducción de los anticuerpos p24 (**21A**) y gp160 (**21B**). Se recogió suero en las semanas 0, 4, 8, 12 y 18. Se determinaron los títulos de anticuerpos *Gag* y *env* por medio de ELISA de p24 y gp160, respectivamente, en los grupos inmunizados con ID/SC e ID/SC+EP. Los datos se muestran como respuestas medias del grupo ± SEM.

La figura 22 muestra gráficos de barras que muestran la expresión de FAES medida en diferentes músculos de ratones. A los ratones se les inyectó 10 µg del plásmido C5-12-FAES en el músculo tibial anterior (TA) o en el músculo gastrocnemio (G) y EP tras un retraso de 4s u 80s. También se inyectaron ratones con 10 µg pf de plásmido C5-12-FAES sin EP (sin EP). Los niveles séricos de FAES fueron superiores en los ratones inyectados con músculo TA y músculo G en comparación con los ratones de control que recibieron el plásmido sin EP (*P < 1,3 E-21). Los ratones inyectados con el casete de expresión sin el plásmido de la columna vertebral (NC) y a continuación electroporados tenían niveles de FAES más altos que el grupo NC sin EP. Sin embargo, los grupos NC fueron significativamente inferiores a los ratones a los que se administró C5-12-FAES en el músculo idéntico (NC 4s en comparación con TA 4s **P < 0,008; NC 80s en comparación con TA 80s ***P < 0,004). Los ratones inyectados en el músculo TA producen una mayor expresión que los animales inyectados en el músculo G y la reducción del retraso entre la inyección y la EP en el músculo TA de 80s a 4s no afectó a la expresión.

La Figura 23 muestra gráficos de barras que muestran la expresión media de PVF cuantificada en ratones tras la inyección intramuscular (IM) o intradérmica (ID) de 50 µg de plásmido CMV-EGFP a concentraciones de 2 mg/mL o 10 mg/mL en un volumen total de 25 o 5 µL, respectivamente. La expresión de PVF fue mayor en los grupos a los que se administró una concentración de 10 mg/mL en comparación con los animales a los que se administró una concentración de 2 mg/mL (ID e IM, *P = 0,01), aunque los lugares de inyección ID e IM dieron resultados globales similares cuando se compararon entre sí.

La figura 24 muestra gráficos de barras que muestran la expresión de FAES, que fue impulsada por el promotor ubicuo CMV, medida en diferentes músculos de ratones bajo varios ajustes de corriente. Se probó la formulación del plásmido: solución salina, solución salina + SLG, agua o agua + SLG. La formulación salina + SLG al 0,1A en el músculo TA produjo la expresión más alta. Los animales que recibieron plásmido formulado en agua y electroporación a 0,2A presentaron niveles de FAES significativamente más bajos que los que recibieron 0,1A para el mismo músculo (*P < 0,05 para TA y **P < 0,001 para G). Cuando se utilizó agua + SLG como formulación del plásmido, las diferencias en los niveles séricos de FAES no fueron significativas para el músculo TA, pero sí para el músculo G (**P < 0,04).

Figura 25 muestra los títulos de anticuerpos anti-FAES medidos 14 días después del tratamiento, que fueron más altos en los ratones tratados con 0,1A de corriente en el músculo G cuando el plásmido se formuló en (A) solución salina + SLG y en el músculo TA cuando se formuló en (B) agua + SLG.

La figura 26 muestra un esquema de una realización de una matriz de contactos de relé.

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

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

50 Descripción detallada de las realizaciones preferentes

Las siguientes definiciones abreviadas, o acortadas, se dan para ayudar a la comprensión de las realizaciones preferentes de la presente invención. Las definiciones abreviadas que se ofrecen en la presente memoria descriptiva no son en modo alguno exhaustivas ni contradictorias con las definiciones tal como se entienden en la materia o con el significado de los diccionarios. Las definiciones abreviadas se dan en la presente memoria descriptiva para complementar o definir más claramente las definiciones conocidas en la técnica.

El término "corriente constante", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, describe una corriente que recibe o experimenta un tejido, o las células que definen dicho tejido, durante la duración de un impulso eléctrico administrado al mismo tejido. El impulso eléctrico se administra desde los dispositivos de electroporación descritos en la presente memoria. Esta corriente permanece a un amperaje constante en dicho tejido durante la vida de un pulso eléctrico porque el dispositivo de electroporación proporcionado en la presente memoria tiene un elemento de retroalimentación, preferentemente con retroalimentación instantánea. El elemento de retroalimentación puede medir la resistencia del tejido (o células) a lo largo de la duración del pulso y hacer que el dispositivo de electroporación altere su salida de energía eléctrica (por ejemplo, aumentar el voltaje) para que la corriente en el mismo tejido permanezca constante a lo largo del pulso eléctrico (del orden de microsegundos), y de pulso a pulso. En algunas 5 realizaciones, el elemento de retroalimentación comprende un controlador.

El término "retroalimentación de corriente" o "retroalimentación" se pueden usar indistintamente y pueden significar la respuesta activa de los dispositivos de electroporación proporcionados, que comprende la medición de la corriente en el tejido entre los electrodos y la alteración de la salida de energía suministrada por el dispositivo EP en consecuencia con el fin de mantener la corriente a un nivel constante. El usuario preajusta este nivel constante antes de iniciar una secuencia de impulsos o un tratamiento eléctrico. Preferentemente, la retroalimentación puede ser llevada a cabo por el componente de electroporación, por ejemplo, el controlador, del dispositivo de electroporación cutáneo, dado que el circuito eléctrico es capaz de monitorizar continuamente la corriente en el tejido entre los electrodos y comparar esa corriente monitorizada (o corriente dentro del tejido) con una corriente preestablecida y llevar a cabo continuamente ajustes de salida de energía para mantener la corriente monitorizada en los niveles preestablecidos. En algunas 10 realizaciones, el bucle de realimentación puede ser instantáneo, dado que se trata de una realimentación analógica en bucle cerrado.

El término "biomolécula", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con secuencias de ácido nucleico, proteínas, lípidos, microburbujas (por ejemplo, vesículas cargadas con fármacos) y productos farmacéuticos.

Los términos "electroporación", "electropermeabilización" o "mejora electrocinética" ("EP"), como se utilizan indistintamente en la presente memoria descriptiva, significa el uso de un pulso de campo eléctrico transmembrana para inducir vías microscópicas (poros) en una biomembrana; su presencia permite que biomoléculas tales como plásmidos, oligonucleótidos, ARNip, fármacos, iones y agua pasen de un lado a otro de la membrana celular.

El término "corriente descentralizada", como se utiliza en la presente memoria descriptiva para definir el patrón de corrientes eléctricas suministradas desde las diversas matrices de electrodos de aguja de los dispositivos de electroporación descritos en la presente memoria descriptiva, en los que los patrones minimizan, o preferentemente eliminan, la aparición de estrés térmico relacionado con la electroporación en cualquier área del tejido que se 30 electropora.

El término "región cutánea" (o "tejido cutáneo") tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva se refiere al tejido cutáneo, dermis, subdermis y capas o espacios intradérmicos ("ID"), intracutáneos, subcutáneos ("SC"). La 35 región cutánea no incluye el tejido muscular.

El término "sin penetrar sustancialmente" como se utiliza en la presente memoria descriptiva se relaciona con la penetración de no más de aproximadamente 1 mm a 2 mm por un objeto (*por ejemplo*, aguja) de interés, y preferentemente no más de aproximadamente 5 mm.

El término "mecanismo de retroalimentación", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con 40 un proceso realizado por software o hardware (o firmware), cuyo proceso recibe y compara la impedancia del tejido deseado (antes, durante y/o después de la entrega del pulso de energía) con un valor presente, preferentemente actual, y ajusta el pulso de energía entregado para alcanzar el valor preestablecido. El término "impedancia", se utiliza en la presente memoria descriptiva cuando se discute del mecanismo de retroalimentación y se puede convertir en un valor de corriente de acuerdo con la ley de Ohm, para de este modo permitir comparaciones con la corriente preestablecida. En una realización preferente, el "mecanismo de retroalimentación" se realiza por medio de un circuito analógico de bucle cerrado.

Un aspecto de la presente invención está relacionado con los dispositivos de electroporación de la presente invención y su capacidad para suministrar un pulso de energía a un tejido deseado de un mamífero y mantener una corriente constante en el mismo, siendo el tejido preferentemente intradérmico o un tejido subcutáneo. Preferentemente, los 50 dispositivos de electroporación son dispositivos de electroporación cutánea ("dispositivos de EP cutánea"). Los dispositivos de EP cutánea pueden penetrar preferentemente en el tejido cutáneo sin penetrar sustancialmente en un tejido muscular durante la EP. Los dispositivos suministran el pulso de energía a través de electrodos de aguja cutáneos que pueden penetrar en el tejido cutáneo, *por ejemplo*, intradérmico y subcutáneo, y suministrar el pulso de energía y mantener la corriente constante en el tejido durante la duración del pulso de energía y todo el proceso de electroporación. La capacidad de respuesta del dispositivo de electroporación cutánea descrito actualmente, que mantiene la corriente constante en el tejido tratado, se consigue por medio de un mecanismo de retroalimentación en el dispositivo de electroporación cutánea, que evita el calentamiento de un tejido y reduce el daño tisular, el dolor y contribuye al éxito general de la tecnología de electroporación cutánea proporcionada. El mecanismo de retroalimentación es una funcionalidad de cierto software o hardware (o firmware) descrito aquí, y preferentemente es 55

una funcionalidad del hardware. En las realizaciones en las que el mecanismo de retroalimentación forma parte del software, dicho software está en comunicación digital con el controlador que controla el funcionamiento del dispositivo de EP cutánea y realiza las acciones de recibir la impedancia del electrodo cutáneo neutro y comparar la impedancia con la corriente preestablecida y ajustar el pulso de energía suministrado al tejido deseado para mantener una corriente constante en el tejido.

En una realización de la presente invención, se proporcionan dispositivos de electroporación configurados para suministrar a un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía que produce una corriente constante similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. El dispositivo de electroporación comprende un componente de electroporación y un conjunto de electrodos cutáneos. El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos de electroporación cutánea, que incluyen: controlador, generador de forma de onda de corriente, probador de impedancia, registrador de forma de onda, elemento de entrada, elemento de informe de estado, puerto de comunicación, componente de memoria, fuente de alimentación e interruptor de alimentación. En algunas realizaciones, el componente de electroporación puede funcionar como un elemento de los dispositivos de EP cutánea, y los otros elementos son elementos (o componentes) separados en comunicación con el componente de electroporación. En algunas realizaciones, el componente de electroporación puede funcionar como más de un elemento de los dispositivos de EP cutánea, que pueden estar en comunicación con aún otros elementos de los dispositivos de EP cutánea separados del componente de electroporación. La presente divulgación no está limitada a que los elementos de los dispositivos de EP cutánea existan como partes de un dispositivo electromecánico o mecánico, ya que los elementos pueden funcionar como un dispositivo o como elementos separados en comunicación entre sí. El componente de electroporación es capaz de suministrar el pulso de energía que produce la corriente constante en el tejido deseado, e incluye un mecanismo de retroalimentación. El conjunto de electrodos cutáneos incluye una matriz de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos cutáneos en una disposición espacial, en la que el conjunto de electrodos cutáneos recibe el pulso de energía del componente de electroporación y lo administra al tejido deseado a través de los electrodos cutáneos. Al menos uno de la pluralidad de electrodos cutáneos es neutro durante la administración del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al componente de electroporación. El mecanismo de retroalimentación puede recibir la impedancia medida y puede ajustar el pulso de energía suministrado por el componente de electroporación para mantener la corriente constante. En algunas realizaciones, el tejido deseado es tejido cutáneo, y preferentemente tejido subcutáneo o tejido intradérmico.

La Figura 2A muestra un diagrama de sistema de una realización preferente de los dispositivos EP proporcionados en la presente memoria descriptiva. Los principales elementos funcionales de los dispositivos EP se muestran en el diagrama, pero sólo con fines ilustrativos, ya que no todos los elementos funcionales son necesarios para todas las realizaciones. Cada elemento se describe en términos de su funcionalidad de hardware. Las secuencias de eventos habilitadas por el hardware pueden controlarse por medio de software, como se describe en la presente memoria descriptiva. En este ejemplo, el elemento central del dispositivo es el controlador. Un ejemplo de controlador se puede ver en el esquema mostrado en la Figura 2B, que es un microcontrolador, que en algunas realizaciones es un Texas Instruments msp430F149 o Motorola 68HC908AZ60A. Los expertos en ingeniería eléctrica conocen otros controladores alternativos que pueden sustituir fácilmente a los ejemplos ilustrativos anteriores.

En algunas realizaciones, los electrodos cutáneos son electrodos de aguja, varillas conductoras o áreas de película conductora, y preferentemente electrodos de aguja. Preferentemente, los electrodos de aguja son capaces de entrar en contacto con un tejido intradérmico o subcutáneo sin penetrar sustancialmente un tejido muscular. En algunas realizaciones, los electrodos cutáneos pueden montarse sobre una base, que puede ser de material plástico, formando un disco de electrodos cutáneos reemplazable o intercambiable con una matriz de electrodos cutáneos (o matriz cutánea o matriz de agujas cutáneas) que puede utilizarse en asociación con los dispositivos de EP cutáneo descritos en la presente memoria descriptiva. En algunas realizaciones, los electrodos cutáneos pueden tener una longitud de 1 mm a 20 mm; de 1 mm a 12 mm; de 2 mm a 10 mm; de 2 mm a 7 mm; o de aproximadamente 5 mm. En algunas realizaciones, el electrodo cutáneo puede ser de calibre 22 a 28; de calibre 23 a 27; de calibre 24 a 27, o de calibre 26 aproximadamente. Preferentemente, el electrodo cutáneo tiene una longitud aproximada de 5 mm y un calibre de 26. En algunas realizaciones, el electrodo cutáneo es la única parte del dispositivo de EP cutánea que realmente toca la piel del paciente (para evitar la contaminación cruzada). Se puede administrar una formulación de vacuna en la zona seleccionada, la zona rodeada por la matriz cutánea y los electrodos cutáneos insertados en la piel. La matriz cutánea crea preferentemente una presión uniforme alrededor de los electrodos cutáneos insertados en la piel, y ayuda así a generar un campo eléctrico uniforme durante el proceso de EP en la zona objetivo.

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

- En algunas realizaciones, la pluralidad de electrodos cutáneos puede suministrar el pulso de energía en un patrón descentralizado. En algunas realizaciones, la pluralidad de electrodos cutáneos puede suministrar el pulso de energía en el patrón descentralizado a través del control de los electrodos cutáneos bajo una secuencia programada, y la secuencia programada es introducida por un usuario al componente de electroporación. En algunas realizaciones, la secuencia programada comprende una pluralidad de pulsos administrados en secuencia, en la que cada pulso de la pluralidad de pulsos es administrado por al menos dos electrodos cutáneos activos con un electrodo neutro que mide la impedancia, y en la que un pulso subsiguiente de la pluralidad de pulsos es administrado por uno diferente de al menos dos electrodos cutáneos activos con un electrodo cutáneo neutro que mide la impedancia.
- En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación se realiza por medio de hardware o software. Preferentemente, el mecanismo de retroalimentación se realiza por medio de un circuito analógico de bucle cerrado. Preferentemente, esta realimentación se produce cada 50 µs, 20 µs, 10 µs o 1 µs, pero es preferentemente una realimentación en tiempo real o instantánea (*es decir*, sustancialmente instantánea de acuerdo con determinan las técnicas disponibles para determinar el tiempo de respuesta). En algunas realizaciones, el electrodo neutro mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al mecanismo de retroalimentación, y el mecanismo de retroalimentación responde a la impedancia y ajusta el pulso de energía para mantener la corriente constante en un valor similar a la corriente preestablecida. En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación mantiene la corriente constante de forma continua e instantánea durante la entrega del pulso de energía.
- En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación cutánea también incluye un controlador que recibe las entradas del usuario y controla el componente de electroporación para suministrar el pulso de energía de acuerdo con las entradas. En algunas realizaciones, el controlador puede recibir las entradas del usuario y controlar el componente de electroporación para suministrar el pulso de energía de acuerdo con las entradas. Preferentemente, el controlador es un microcontrolador de un solo chip.
- En algunas realizaciones, un elemento del dispositivo de EP cutánea es el controlador, que puede ser responsable de controlar diversos dispositivos periféricos conectados a él o asociados al mismo. El controlador se encarga de gestionar el procedimiento de electroporación, que incluye operaciones como: (1) generar la secuencia de disparo de electroporación o el patrón de impulsos de corriente constante para el conjunto de electrodos controlando el generador de forma de onda de corriente; (2) realizar pruebas de impedancia para determinar si se debe realizar la electroporación; (3) detectar y procesar los comandos del usuario; (4) proporcionar al usuario información de estado; (5) transmitir datos de electroporación a un dispositivo electrónico externo a través del puerto de comunicaciones; y (6) guardar y recuperar datos de electroporación (por ejemplo, curvas de tensión y corriente) en y desde la memoria. El controlador puede funcionar por medio de una aplicación de software o firmware, que permite al usuario introducir los parámetros de pulso deseados y la secuencia programada (incluida la secuencia de disparo de los electrodos) y controlar el funcionamiento del dispositivo de electroerosión cutánea.
- En algunas realizaciones, el controlador incluye o está programado mediante el uso de un software que procesa eficientemente la información procedente tanto de un usuario como del tejido que está siendo sometido a una EP cutánea y controla la salida de energía eléctrica para suministrar al tejido una corriente constante. Programado puede incluir cualquiera de una serie de parámetros de pulso que se preseleccionan antes de la electroporación, incluyendo la corriente preestablecida, la secuencia programada (de la secuencia de disparo del electrodo), la duración del pulso, el número de pulsos (en tren de pulsos), el error permisible alrededor de la corriente preestablecida. Este proceso de recibir y procesar entradas y factorizar las mismas para decidir la salida eléctrica puede ocurrir dentro de la duración de un pulso eléctrico, y puede ocurrir, preferentemente, dentro de 1 milisegundo (ms), más preferentemente 100 microsegundos (µs), y más preferentemente dentro de 10 µs, y aún más preferentemente dentro de 1 µs. En algunas realizaciones, este proceso ocurre en tiempo real o instantáneamente.
- En un ejemplo de funcionamiento de los dispositivos de EP cutánea descritos en la presente memoria descriptiva, el controlador puede suministrar pulsos de energía de acuerdo con una secuencia programada estableciendo al menos la corriente constante deseada a la de la corriente preestablecida. En una realización, un circuito analógico de retroalimentación de bucle cerrado mantiene continuamente la corriente constante deseada ajustando el voltaje aplicado a través de los electrodos a medida que cambia la resistencia del tejido diana, preferentemente la piel. El controlador puede finalizar el pulso cuando se ha cumplido la duración del pulso ajustando la corriente de salida deseada a cero. Cuando finaliza la secuencia de pulsos, el controlador puede revisar los datos de la forma de onda y alertar al usuario si la corriente en el tejido deseado estaba fuera de una ventana de error en torno a la corriente preestablecida durante la secuencia de electroporación.
- El controlador puede ser un microcontrolador de un solo chip, preferentemente un procesador que tenga una o más de las siguientes propiedades: E/S abundantes, periféricos a bordo, bajo consumo de energía y amplia capacidad de memoria. En algunas realizaciones, el controlador comprende un procesador Texas Instruments msp430F149. El software puede dirigir los pasos del procedimiento de electroporación, y puede dirigir los pasos en conjunción con el hardware, y es preferentemente firmware porque reside permanentemente dentro y se ejecuta desde el microcontrolador de un solo chip. En algunas realizaciones, el software ejecuta un algoritmo que incluye la recepción de una entrada del usuario del dispositivo, la recepción de información de los electrodos de aguja sobre la resistencia en el tejido receptor del pulso, o la corriente en el mismo, y el ajuste de la salida eléctrica basado en las entradas recibidas dentro de la duración de cada pulso eléctrico.

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación de la piel también incluye un generador de forma de onda de corriente en comunicación con el componente de electroporación y en comunicación eléctrica con el conjunto de electrodos de la piel; el generador de forma de onda de corriente que genera una forma de onda de tren de pulsos de corriente para la entrega a través del conjunto de electrodos de la piel. En algunas realizaciones, el usuario introduce una secuencia programada en el componente de electroporación, que comunica la secuencia programada al generador de forma de onda de corriente; en el que el generador de forma de onda de corriente es capaz de generar la forma de onda del tren de impulsos de corriente de acuerdo con la secuencia programada proporcionada. Preferentemente, el generador de forma de onda de corriente es un circuito analógico de transistor de potencia. El generador de forma de onda de corriente puede generar una forma de onda de tren de impulsos de corriente que pasa a través de los electrodos de la matriz de electrodos de acuerdo con la secuencia programada. El tren de pulsos es preferentemente de forma cuadrada y el número de pulsos está limitado por el software o firmware, y preferentemente de 1 a 10 pulsos, y más preferentemente de 2 a 5 pulsos, y más preferentemente de 2 a 3 pulsos. Se aplica un impulso a cada conjunto de electrodos. En algunas realizaciones, un pulso tiene una duración de 20 ms a 52 ms y se produce a una frecuencia de 1 Hz. La amplitud del tren de impulsos es programable por el operador y oscila entre 0,1 Amperios (A o Amp) y 1,5 A en incrementos de 0,1 A. En una realización para la presente invención, la amplitud del impulso es inferior a 0,4 A, y preferentemente entre 0,1 y 0,2 A (véanse las Figuras 2 y 3). La amplitud del tren de impulsos puede adaptarse en función de la resistencia tisular individual, tanto entre individuos como al dirigirse a distintas áreas del cuerpo, preferentemente tejido cutáneo, de un mismo individuo. El generador de forma de onda de corriente puede comprender un circuito analógico general de transistor de potencia, que puede funcionar bajo la dirección del controlador.

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación cutánea también incluye un comprobador de impedancia capaz de comprobar el establecimiento de una conexión eléctrica entre los electrodos cutáneos y el tejido deseado. El comprobador de impedancia puede utilizarse para determinar si los circuitos de los dispositivos EP cutánea han establecido una conexión eléctrica adecuada con el tejido. Esta prueba verifica que los electrodos cutáneos insertados han establecido una buena conexión con el mango, y que los electrodos cutáneos también tienen una buena conexión con el tejido. El tratamiento EP puede ir precedido de una prueba de impedancia. Si alguna de las mediciones de impedancia cae fuera de un intervalo programable de resistencia (medido en Ohmios, Ω), la prueba de impedancia falla y no se inicia la secuencia de electroporación. Véase el flujo funcional de electroporación en la Figura 27A, en particular el cuadro de decisión 27A.10, que puede provocar un retraso de disparo si no se habilita la impedancia (en otras palabras, no se establece un contacto eléctrico entre los electrodos y el tejido deseado).

La prueba de impedancia es una característica programable por el operador, controlada por software o firmware que puede desactivarse durante la operación. El comprobador de impedancia puede estar compuesto por circuitos analógicos generales de amplificador operacional que funcionan de acuerdo con las instrucciones del controlador.

El comprobador de impedancia puede funcionar como una característica de seguridad en el dispositivo de EP cutánea. Puede indicar, por ejemplo, si todos los electrodos han penetrado en el mismo tejido y puede establecerse un circuito. Los electrodos en contacto con el aire, especialmente el aire seco, tienen una resistencia extremadamente alta. Si se inicia la electroporación y uno o más electrodos no han penetrado en el tejido (una posibilidad real cuando se trata de electrodos cutáneos y procedimientos de EP cutánea), las tensiones resultantes de los electrodos pueden ser de miles de voltios, lo que podría tener consecuencias letales o perjudiciales para el individuo y también dañar el dispositivo de EP cutánea. Por este motivo, puede implementarse una protección contra sobrecargas de tensión para evitar tensiones excesivas en los electrodos. En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación incluye una característica de seguridad, siendo la característica de seguridad un tope de voltaje que impide que el dispositivo suministre el pulso de energía al tejido cuando el ajuste al pulso de energía produciría un voltaje superior al tope de voltaje. Independientemente de la carga eléctrica (por ejemplo aire, piel o tejido muscular), la protección contra sobretensión puede activarse (o puede dispararse el tapón de seguridad) si V_{ij} supera los 200V durante un periodo no superior a 1 ms. V_{ij} es la tensión a través del electrodo i y j en el que i, j = 1 a 5. Si se activa la protección contra sobretensión (o se dispara el capuchón de seguridad), V_{ij} pasa a aproximadamente 0 V hasta que se dispara el siguiente impulso de electroporación. Cuando el dispositivo de EP cutánea está apagado, el voltaje a través de cualquier par de electrodos preferentemente no supera los 10 V.

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación cutánea también incluye un registrador de forma de onda en comunicación con el componente de electroporación. Preferentemente, el registrador de forma de onda es capaz de registrar las formas de onda de tensión y corriente de electroporación de forma continua durante la entrega del pulso de energía. Más preferentemente, el registrador de formas de onda es capaz de registrar formas de onda de voltaje y corriente de electroporación a una velocidad de 2000 muestras por segundo. El registrador de forma de onda, al muestrear y monitorizar los parámetros del procedimiento de electroporación, permite al usuario recibir y procesar posibles problemas y ajustar la configuración en caso de que un procedimiento de electroporación falle o no consiga los resultados deseados. Una frecuencia de muestreo ejemplar es de 2000 muestras por segundo, aproximadamente 104 muestras para cada uno de los 2-3 pulsos de corriente de 52 milisegundos (ms). Un período de muestreo total ejemplar es de 2208 ms con un muestreo que comienza aproximadamente 50 ms antes de que se dispare el primer pulso y se detiene unos 50 ms después del último pulso en un patrón de 2 pulsos. Las formas de onda de tensión y corriente pueden cuantificarse en una representación digital de 12 bits con una linealidad de ± 1 bit menos significativo ("BMS"). La resolución de la forma de onda de corriente debe ser preferentemente de al menos 10 miliamperios (mA) y la resolución de la forma de onda de tensión debe ser preferentemente de al menos 1,0 V. El registrador de forma

de onda puede estar compuesto por circuitos analógicos generales de amplificador operacional y un convertidor analógico a digital ("A/D") adecuado para su uso con el controlador. En la **Figura 2C** se tabula un ejemplo de la característica del registrador de forma de onda para la administración cutánea de formulaciones de ADN (consulte "**2.5**").

- 5 En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación cutánea también incluye un dispositivo de entrada en comunicación directa con el usuario y el componente de electroporación, el dispositivo de entrada capaz de recibir comandos de entrada y comunicar los comandos de entrada al componente de electroporación. Preferentemente, el dispositivo de entrada es un teclado numérico o una pantalla táctil. En un ejemplo, los parámetros de funcionamiento de los dispositivos de EP cutánea pueden ser introducidos por un operador a través de un teclado numérico (tal como, por ejemplo, Grayhill 88AB2). En una realización preferente, los números introducidos en el teclado se muestran en una pantalla de cristal líquido ("PCL"). Los parámetros típicos que pueden programarse son la corriente de impulso de electroporación, la activación/desactivación de la prueba de impedancia y el retardo de disparo de la electroporación. Las funciones relacionadas con el teclado también pueden ser dirigidas por el controlador. Un ejemplo de la información que es útil para la electroporación mediante el uso de uno de los dispositivos de EP cutánea descritos incluye: número de identificación del individuo, número de pulso en secuencia, tiempo de preeespera (segundos, s, seg), anchura de pulso (ms), corriente de pulso (Amp), y el patrón de conmutación para los electrodos de aguja de la matriz de electrodos cutánea (el número de identificación del individuo, así como todas las condiciones de electroporación se registran automáticamente y están disponibles para su análisis). En la **Figura 2C** se da un ejemplo de la información útil para la electroporación mediante el uso de uno de los dispositivos de EP cutánea descritos (obsérvese que el número de identificación del individuo, así como todas las condiciones de electroporación se registran automáticamente y están disponibles para su análisis).

En algunas realizaciones, los dispositivos de electroporación cutánea pueden incluir además un elemento de informe de estado para mostrar o notificar de otro modo al operador el estado del sistema. En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación cutánea incluye también un elemento de informe de estado en comunicación con el componente de electroporación. Preferentemente, el elemento de notificación de estado es un panel de visualización de información, una notificación sonora, un diodo emisor de luz o una combinación de los mismos. El elemento de informe de estado puede informar de la confirmación de la generación del impulso de energía y la entrega de la corriente constante. Estos elementos de información de estado pueden incluir un panel de visualización de información, como una pantalla de cristal líquido ("PCL") (por ejemplo, Lumex LCM-S02004DSF). La pantalla PCL es preferentemente del tipo de visualización de caracteres y es preferentemente capaz de mostrar 4 líneas de 20 caracteres cada una. La pantalla PCL también está equipada preferentemente con una luz de fondo que puede encenderse y apagarse por medio de un interruptor basculante. La información de estado también puede ser proporcionada por una notificación audible, tal como un zumbador (por ejemplo, CUI CEP-2202AS) que suena en varios tonos. Cada tono tiene preferentemente un significado diferente, controlado por el software o firmware. Por ejemplo, el volumen del zumbador puede tener 3 ajustes programables y oscilar aproximadamente entre 60 y 80 dB a una distancia de 1 metro del zumbador. El intervalo de niveles de presión sonora sólo se da como referencia. El nivel sonoro se considera aceptable si es audible en un entorno ruidoso (por ejemplo, una granja o un complejo militar) si se ajusta a su nivel más alto y no es demasiado alto en un entorno tranquilo (por ejemplo, una oficina) si se ajusta a su nivel más bajo. Además, el DISPOSITIVO EP PIEL puede estar equipado con un diodo emisor de luz ("DEL") (como, Lumex SSI-LXR1612ID, o cualquier DEL rojo de montaje en panel) para designar si la unidad está encendida o apagada.

Preferentemente, los elementos de información de estado incluyen una confirmación visual de la generación satisfactoria de un campo eléctrico en la pantalla PCL tras la finalización de la secuencia de impulsos eléctricos. En una realización, después de cada proceso de electroporación (o secuencia de electroporación), la pantalla PCL mostrará una lista de tres o cinco números, ya sea "1" o "0", uno para cada uno de los pulsos de la secuencia de electroporación. Un "0" indica que el pulso era normal y un "1" indica que el pulso era anormal. Más concretamente, cada pulso debe alcanzar al menos el 90% de la corriente ajustada para ser descrito como normal o se mostrará un "0" en la pantalla PCL. Si un pulso determinado alcanza menos del 90% de la corriente ajustada, el pulso es anormal y se mostrará un "1". Además, se muestran la corriente mínima y media de los impulsos anómalos. Por ejemplo, para una secuencia de electroporación de cinco pulsos ajustada a una corriente de 0,5 Amperios, si los pulsos 3 y 5 alcanzan sólo 0,4 Amperios y 0,3 Amperios, respectivamente, se mostrará "0 0 1 0 1" así como "Low: 60% promedio 80%".

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación cutánea también incluye un puerto de comunicación en comunicación con el componente de electroporación. En algunas realizaciones, el puerto de comunicaciones que se puede utilizar para cargar datos de forma de onda de electroporación a un dispositivo electrónico externo, tal como un ordenador personal de mano (por ejemplo, "OP de bolsillo"), asistente digital personal ("ADP") u ordenador personal ("OP"), con fines de visualización. Preferentemente, el puerto de comunicaciones es un puerto de comunicaciones serie óptico, tal como un puerto de infrarrojos ("IR") (como, Transceptor: ACTiSYS ACT-IR220LN115, o Zilog ZHX1201; Codificador: Microchip MCP2120, o TI TIR1000).

60 En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación cutánea también incluye un componente de memoria en comunicación con el componente de electroporación. El componente de memoria puede almacenar datos de forma de onda de electroporación y parámetros de funcionamiento. Preferentemente, el componente de memoria (tal como,

por ejemplo, Atmel AT45DB321B o AT45DB321C-TU) es no volátil, lo que significa que conserva sus datos aunque el dispositivo de EP cutánea esté apagado. Para conservar la memoria, los datos de forma de onda de electroporación sólo pueden guardarse en la memoria durante los períodos activos del tren de impulsos de electroporación. Durante los períodos inactivos, los datos muestreados sólo pueden almacenarse en la memoria si alguna de las formas de onda supera un umbral especificado. Por ejemplo, estos umbrales pueden ser un umbral de tensión de 2 V y un umbral de corriente de 10 mA. Los datos almacenados en la memoria durante los períodos inactivos del tren de impulsos actual se pueden marcar con una marca de tiempo para que el índice de tiempo de los datos se conozca una vez reconstruidas las formas de onda. Se puede prever el almacenamiento de hasta 40 muestras (20 ms) de datos que se producen durante los períodos inactivos del tren de impulsos. El almacenamiento puede limitarse a 20 ms porque el software puede especificar que el resto de la secuencia de electroporación se aborte si cualquiera de los umbrales se supera durante un periodo acumulado de más de 20 ms. Un conjunto de datos de forma de onda de electroporación requiere unos 2 kB de memoria cuando se aplica la técnica de compresión anterior. El componente de memoria de los dispositivos EP cutánea contiene preferentemente memoria suficiente para guardar al menos 8000 pulsos (cada pulso se almacena por separado).

En algunas realizaciones, el dispositivo de electroporación cutánea también incluye una fuente de energía en comunicación con el componente de electroporación. Preferentemente, la fuente de energía es una batería, y más preferentemente, una batería tal como una batería de iones de litio, de níquel metal hidruro, de plomo ácido o de níquel cadmio. En algunas realizaciones, la fuente de alimentación es preferentemente una batería (tal como, por ejemplo, dos 6V Panasonic LC-R064R5P 4.5Ah, dos 6V génesis NP7-6 6V 7.0 Ah) y es responsable de suministrar energía a cada uno de los circuitos de los dispositivos EP cutánea. Estos circuitos incluyen una fuente de alimentación de baja tensión y baja capacidad de potencia para el controlador y sus periféricos, una fuente de alimentación de baja tensión y baja capacidad de potencia para el comprobador de impedancia y una fuente de alimentación de alta capacidad de potencia para el generador de forma de onda de corriente. El interruptor de alimentación (tal como el E-Switch R5CBLKBLKEF0 o cualquier interruptor basculante DPDT de 10 A para montaje en panel) controla la alimentación de los dispositivos EP cutánea y puede estar encendido o apagado. En la posición de apagado, todas las conexiones eléctricas al conjunto de electrodos son eléctricamente neutras en los 5 segundos siguientes al apagado.

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

En algunas realizaciones, los dispositivos de EP cutánea también incluyen un conjunto de mango de electrodo cutáneo. Preferentemente, el conjunto de mango incluye tres elementos: una matriz de electrodos cutáneos (preferentemente, una matriz de electrodos de aguja cutánea), un indicador de estado para informar del estado del dispositivo de EP cutánea y un interruptor activador. La matriz puede incluir cualquier número de electrodos de aguja en una o más disposiciones espaciales diferentes, y preferentemente incluir un número impar de electrodos y también preferentemente un número menor de electrodos, preferentemente 7 electrodos o menos. En una realización preferente, la matriz de electrodos cutáneos de aguja es circular y comprende tres electrodos cutáneos de aguja colocados en una formación isósceles, con los lados grandes de 5 mm y la base pequeña de 3 mm; se cree que esta colocación es importante para el patrón de impulsos y la generación de campo eléctrico y, en consecuencia, para la calidad de la EP cutánea. El estado del dispositivo de electroerosión cutánea se indica preferentemente en el mango por medio de indicadores de estado, tales como uno o más DEL, que pueden ser de distintos colores y estar programados para parpadear intermitentemente para indicar los distintos pasos de la secuencia de disparo de los electrodos. El interruptor activador del conjunto de mango se utiliza preferentemente para iniciar varias etapas de la secuencia de disparo de los electrodos ("6.1.1").

En algunas realizaciones, el conjunto de mango es inalámbrico y puede operarse remotamente desde el componente de electroporación (o controlador). El conjunto de mango inalámbrico puede recibir información del componente de electroporación (o controlador), incluyendo la secuencia programada y los parámetros del pulso, y suministrar un pulso de energía al tejido deseado y mantener la corriente constante en el mismo tejido. El conjunto de mango inalámbrico puede incluir una batería interna o un condensador que mantiene una carga eléctrica para su funcionamiento. Preferentemente, el conjunto de mango inalámbrico incluirá el mecanismo de retroalimentación, preferentemente el circuito analógico de bucle cerrado. El conjunto de mango inalámbrico puede acoplarse con el componente de electroporación e intercambiar información y proporcionar una o más de las funcionalidades de los dispositivos de EP cutánea descritos en la presente memoria descriptiva.

En algunas realizaciones, la matriz de electrodos es desecharable y está conectada de forma extraíble al conjunto de electrodos cutáneos. Preferentemente, la matriz de electrodos desecharable es un disco de electrodos cutáneos, y más preferentemente, el disco de electrodos cutáneos es esterilizable.

En una realización de la presente invención, los dispositivos de EP cutánea incluyen un disco de electrodo cutáneo reemplazable que puede montarse de forma extraíble en el conjunto de mango. En una realización preferente, el disco de electrodos cutáneos reemplazable está montado en el conjunto del mango del dispositivo de EP cutánea. **Figuras 6.1 y 6.2** representan la vista lateral de la matriz de electrodos ("6.2.3" y "6.2.5"). En las **Figuras 6.1 y 6.2**, el disco de electrodos tiene una pluralidad de electrodos cutáneos de aguja montados sobre una estructura de soporte en una disposición espacial para penetrar en el tejido seleccionado, en particular la piel. En una realización preferente, la disposición espacial es una matriz de piel circular. Los electrodos cutáneos individuales de la matriz de agujas del lado del mango del disco de electrodos cutáneos están despuntados y desbarbados para su inserción en los accesorios de contacto eléctrico complementarios del mango. Preferentemente, el mango aloja un conector eléctrico desde los electrodos cutáneos de aguja hasta el generador de impulsos o el dispositivo de EP cutánea.

En una realización preferente, los electrodos cutáneos de aguja en el conjunto de electrodos cutáneos del dispositivo de EP cutánea así como en el disco de electrodos cutáneos reemplazable están en una matriz circular. En otra realización preferente, la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja consta de tres electrodos cutáneos de aguja. En una realización preferente adicional, el centro de los tres electrodos cutáneos de aguja cae en un arreglo circular en la forma de una formación inscrita por 2 lados de 5 mm y una base pequeña de 3 mm.

En una realización preferente, los electrodos cutáneos de aguja se almacenan estériles en un sistema de envasado específico (**Figura 9**) que permite el cambio rápido de la matriz de electrodos cutáneos entre los individuos tratados, mientras se mantiene estéril cada matriz de electrodos cutáneos.

En algunas realizaciones, se proporciona una secuencia programada para el funcionamiento de los dispositivos EP cutánea, que controla si cada electrodo de la matriz de agujas cutáneas puede funcionar como un electrodo positivo, negativo o neutro. Por ejemplo, como se muestra en la **Figura 2C**, en una secuencia programada cada electrodo puede funcionar como una posición positiva, negativa o apagada. La secuencia completa de la **Figura 2C** se representa en la que los electrodos 1 a 3 se convierten sucesivamente en el electrodo positivo, con dos electrodos de carga negativa en vértices opuestos del conjunto de piel ("2,4" - segunda columna), o un electrodo apagado, uno positivo y otro negativo ("2,4" - cuarta columna).

En algunas realizaciones, el componente de electroporación comprende un controlador; un generador de forma de onda en comunicación electrónica con el controlador; un registrador de forma de onda en comunicación electrónica con el controlador; y una batería conectada eléctricamente al generador de forma de onda. El controlador puede recibir una entrada del usuario, ordenar al generador de forma de onda que suministre el pulso de energía al tejido deseado de acuerdo con la entrada, y comunicar datos al registrador de forma de onda de acuerdo con el pulso de energía suministrado; y en el que la batería envía una carga eléctrica al generador de forma de onda, siendo la batería de iones de litio, níquel metal hidruro, plomo ácido o níquel cadmio. Preferentemente, el dispositivo es portátil. El dispositivo portátil puede funcionar con una batería y es adecuado para la vacunación masiva con fines terapéuticos o de vacunación.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, pero que no forman parte de la invención, son procedimientos de uso de los dispositivos de electroporación cutánea descritos en la presente memoria descriptiva para suministrar el pulso de energía al tejido cutáneo deseado para producir la corriente constante similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. Los procedimientos incluyen: insertar una pluralidad de electrodos cutáneos de aguja en el tejido cutáneo sin penetrar sustancialmente un tejido muscular; y aplicar el pulso de energía a la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja para suministrar una corriente igual a la corriente preestablecida en el tejido cutáneo; y medir la impedancia del tejido cutáneo con uno neutro de la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja y utilizar un mecanismo de retroalimentación en el dispositivo de electroporación para ajustar el pulso de energía aplicado en respuesta a la impedancia medida para mantener constante la corriente suministrada al tejido cutáneo. En un ejemplo de una realización preferente, los procedimientos de uso de los dispositivos de EP cutánea incluyen progresar a través de una secuencia funcional de electroporación como la representada en el diagrama de flujo proporcionado en las Figuras 27A y 27B. En particular, el 27B. 10 en la Fig. 27B muestra una ampliación del paso "producir impulso de corriente" y representa el mecanismo de realimentación, que preferentemente se realiza por medio de un circuito analógico de bucle cerrado y funciona en tiempo real (o instantáneamente).

En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen además medir la impedancia antes de aplicar el pulso de energía para determinar si se establece contacto eléctrico entre el tejido cutáneo deseado y los electrodos cutáneos de aguja. En algunas realizaciones, los procedimientos de la divulgación se utilizan para colocar al menos una vacuna de ADN en contacto con dicho tejido intradérmico o subcutáneo.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente divulgación incluyen registrar datos compilados por el dispositivo de electroporación a partir de la entrega del pulso de energía al tejido cutáneo deseado.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, pero no parte de la invención, son procedimientos que comprenden las etapas de: proporcionar un conjunto de electrodos cutáneos que tiene una pluralidad de electrodos cutáneos de aguja, el conjunto de electrodos cutáneos en comunicación eléctrica con un generador de forma de onda de corriente; poner en contacto el tejido cutáneo de un mamífero con la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja sin penetrar sustancialmente un tejido muscular del mamífero; y aplicar un pulso eléctrico de energía desde el

generador de forma de onda de corriente a la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja durante un tiempo y en condiciones eficaces para exponer el tejido cutáneo puesto en contacto a una corriente sustancialmente constante.

En algunas realizaciones, el paso de aplicar el pulso eléctrico de energía comprende: medir la impedancia en el tejido cutáneo contactado con uno neutro de la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja; y comunicar la impedancia medida a un mecanismo de retroalimentación en comunicación eléctrica con el generador de forma de onda de corriente, en el que el mecanismo de retroalimentación ajusta el pulso de energía suministrado desde el generador de forma de onda de corriente en respuesta a la impedancia medida para mantener la corriente sustancialmente constante. En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación se lleva a cabo por medio de un circuito analógico de bucle cerrado que forma parte del dispositivo de electroporación, y los pasos de medición y comunicación se realizan instantáneamente durante toda la duración del pulso de energía.

Un aspecto de la presente invención pertenece a los dispositivos de EP cutánea, que permiten la electroporación *in vivo* de biomoléculas, por ejemplo plásmidos de ADN, en tejido cutáneo o células cutáneas deseados. En algunas realizaciones, los dispositivos de EP cutánea proporcionan un campo eléctrico de corriente constante a un tejido cutáneo de interés a través de una matriz de agujas de electrodos cutáneos y facilitan la introducción de una biomolécula en las células del tejido cutáneo seleccionado, preferentemente tejido subcutáneo (SC) y/o intradérmico (ID). Los dispositivos EP cutánea producen una forma de onda de tren de impulsos de corriente que pasa a través de los electrodos de la matriz de agujas de electrodos cutáneos de acuerdo con una secuencia programada y que se puede supervisar y registrar durante el procedimiento. Los electrodos de aguja son capaces de entrar en contacto con el tejido de la piel, como el tejido SC o ID, sin penetrar sustancialmente un tejido muscular. Los dispositivos de EP cutánea producen una forma de onda de tren de impulsos de corriente que pasa a través de los electrodos cutáneos de la matriz cutánea de acuerdo con una secuencia programada y puede monitorizarse y registrarse durante el procedimiento (véase **Figura 2C**). Los electrodos cutáneos de aguja son capaces de entrar en contacto con tejido intradérmico o subcutáneo sin penetrar sustancialmente un tejido muscular.

Las Patente de EE.UU. Núm. 7.245.963 y Patente de EE.UU. Pub.. 2005/0052630 desvelan diagramas de sistema de ciertos componentes de electroporación que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención, en la que son adaptables en o como parte de los dispositivos de electroporación cutánea. Cada elemento se describe en él en términos de la funcionalidad de hardware de dicho elemento. Las secuencias de eventos que son habilitadas por el hardware son controladas por software o firmware o combinación de ambos, como se describe en la presente memoria descriptiva.

En algunas realizaciones, el componente de electroporación del dispositivo de EP cutánea comprende una matriz de relé de conexión de electrodos, que puede facilitar la secuencia programada y operar el disparo de los electrodos en el conjunto de electrodos cutáneos. La matriz de relés puede controlar cada uno de los electrodos, preferentemente los de aguja, de modo que cada electrodo se encuentre en uno de los cinco estados siguientes: apagado, baja tensión positiva, entrada de medición de impedancia, alta tensión positiva y alta tensión negativa (reguladora). En una realización, la matriz de relés incluye 11 relés de doble polo y doble tiro (DPDT) que crean una matriz de commutación. 10 de esos relés se controlan por medio de un conjunto de registros de desplazamiento conectados al puerto de interfaz periférica serie (IPS) como puerto IPS a paralelo. La entrada de esclavo IPS, salida de maestro (SIMO) se conecta al pin Data-In de ambos registros de desplazamiento 74VHC595 (o equivalente aprobado). El 74VHC595 tiene 2 entradas de reloj. La señal clack de la interfaz de comunicación serie universal síncrona/asíncrona (UCLK) se conecta a los pasadores de entrada del reloj del registro de desplazamiento (RRD) de los registros utilizados para desplazar los datos al registro. Los pasadores de entrada/salida de propósito general (ESPG) independientes van a las entradas de reloj del registro de almacenamiento (RRA) utilizadas para sincronizar los datos del registro de desplazamiento, en paralelo, en el registro de salida. El resultado es que los mismos datos en serie se desplazan a ambos registros de desplazamiento, pero a continuación los datos sólo se sincronizan en el registro de salida del que va a cambiar.

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

Hay 3 conjuntos de relés en la matriz de contactos. En la figura 26 se muestra un ejemplo de matriz de contactos de relé. El primer conjunto es en realidad 1 relé DPDT. Un conjunto de contactos conmuta el carril positivo de la tensión de baja tensión, de medición de impedancia, a la salida de la alimentación de 200 V. El otro conjunto de contactos del mismo relé conmuta el carril negativo entre el circuito de medición de impedancia y el circuito de regulación de corriente de impulsos. Así, la posición de este relé ajusta tanto el carril positivo como el negativo para hacer un pulso de corriente, o para hacer una medición de impedancia. El siguiente conjunto de relés es el de 5 relés de polaridad. Estos relés, uno para cada electrodo, cambian la polaridad de ese electrodo al carril positivo o negativo. El último conjunto de relés es solo un conjunto en línea de contactos para permitir a cada contacto ser separado como ninguno, positivo ni negativo. Para mejorar la vida útil de los contactos de los relés, la matriz sólo sirve para conectar la carga a los electrodos adecuados de la forma deseada. A continuación, los circuitos de impulsos o de impedancia transmiten

tensión o corriente a la carga. La tensión o la corriente se eliminan antes de que se abra cualquier contacto. Dado que los contactos no comutan cuando se aplica corriente, su vida útil puede prolongarse considerablemente.

Un ejemplo de pulso de corriente producido por los dispositivos de EP cutánea se muestra en la **Figura 3.1 y 3.2**. **Figura 3.1 y 3.2** muestra la forma de onda de cada pulso de corriente. Los parámetros de la forma de onda son:

Periodo (t_p): $1000 \text{ ms} \pm 250 \mu\text{s}$.

Tiempo de subida (t_r): $20 \mu\text{s}$ máximo.

Tiempo de asentamiento (t_s): $20 \mu\text{s}$ máximo.

Ancho de pulso (t_w): $52 \text{ ms} \pm 100 \mu\text{s}$.

10 Tiempo de caída (t_f): $20 \mu\text{s}$ máximo.

Corriente nominal (I_n): $I_n \in (0,1\text{A}, 0,2\text{A}, 0,3\text{A}... 1,5\text{A}) \pm 10\%$ de I_n durante t_h y con $R_l \leq 100\Omega$. R_l es la resistencia de carga entre cualquiera de los 3 conjuntos de electrodos mostrados en las figuras 3.3 y 3.4. En la **Figura 3.1 y 3.2** sólo se especifica la forma de onda de la corriente. La forma de la onda de tensión depende de la impedancia vista por los electrodos mientras se dispara el impulso de corriente (durante t_h). La forma de onda de tensión no se especifica durante t_h ya que la impedancia es desconocida durante este periodo. La tensión a través de cualquier electrodo fijado durante t_f es 0V.

Aunque no se quiere estar atado por la teoría, se cree que la electroporación hace uso de las mismas estructuras y fuerza un alto flujo iónico a través de estas estructuras y abriendo o agrandando los conductos. Se colocan electrodos metálicos o dieléctricos en contacto con los tejidos y se les imponen tensiones predeterminadas, proporcionales a la distancia entre los electrodos. Los protocolos utilizados para la electroporación se definen en términos de las intensidades de campo resultantes, de acuerdo con la fórmula $E=V/d$, en la que ("E") es el campo, ("V") es el voltaje impuesto y ("d") es la distancia entre los electrodos.

La intensidad del campo eléctrico E ha sido un valor importante al formular protocolos de electroporación para el suministro de un fármaco o biomolécula en la célula del individuo. En consecuencia, es posible calcular cualquier intensidad de campo eléctrico para una variedad de protocolos aplicando un pulso de voltaje predeterminado que es proporcional a la distancia entre electrodos. Sin embargo, una advertencia es que se puede generar un campo eléctrico en un tejido con electrodos aislados (es decir, no es necesario el flujo de iones para crear un campo eléctrico). Aunque sin querer atarse a la teoría, es la corriente la que es necesaria para el éxito de la EP, no el campo eléctrico *per se*. La activación del generador de forma de onda de corriente del dispositivo de EP cutánea distribuirá un impulso eléctrico de corriente constante a la pluralidad de electrodos cutáneos de aguja de forma que se produzca un evento de EP descentralizado en una zona en la que no se desarrolle punto de solapamiento de EP congruentes. La permeabilidad de las células en la zona de EP descentralizada aumenta y la biomolécula se introduce en la célula del individuo sin sobrecalentarse ni dañar la célula o el tejido.

Un aspecto de la presente invención pertenece a dispositivos de EP cutánea para introducir biomoléculas en una o más células de un animal, en particular piel, con fines de ID o vacunación de SC. Preferentemente, los dispositivos de EP cutánea introducen las biomoléculas en el tejido cutáneo, tal como el tejido SC o ID, suministrando y manteniendo una corriente constante en el mismo tejido durante toda la duración del pulso eléctrico suministrado. En algunas realizaciones, el mango del conjunto del mango del electrodo cutáneo no es conductor y está diseñado para proporcionar al usuario un medio fácil para implantar el conjunto del electrodo cutáneo de aguja en un tejido seleccionado, en particular la piel. La utilización de discos de electrodos cutáneos de aguja desechables con soportes a presión en el mango permite al usuario acoplar y desacoplar rápidamente los discos de electrodos cutáneos de aguja, y permite un cambio rápido (y estéril) entre los individuos tratados. La fuente de energía de los dispositivos de EP cutánea puede utilizar baterías para su uso sobre el terreno, en el que el acceso y el uso de una toma de corriente eléctrica u otra fuente de energía es peligroso o inconveniente, como por ejemplo en una vacunación masiva durante un ataque bioterrorista.

Las biomoléculas para administración en células de tejido cutáneo, tal como tejido SC e ID, incluyen plásmidos de ADN, vacunas de ADN (las vacunas de ADN y los plásmidos de ADN no son mutuamente excluyentes), genes, fármacos terapéuticos u otros agentes, ya sean agentes complementarios o potenciadores. Preferentemente, las biomoléculas son plásmidos de ADN que pueden expresarse en las células del tejido cutáneo diana, y las biomoléculas para la administración de EP cutáneas pueden incluir más de una biomolécula. En algunas realizaciones, las biomoléculas son plásmidos de ADN que

Los plásmidos de ADN utilizados con la presente invención pueden ser aquellos útiles para la terapia génica, es decir, la transferencia de genes seleccionados a un hospedador con el fin de prevenir, mejorar o curar un estado de lesión o enfermedad. Los plásmidos de ADN pueden expresar el gen de interés en el mamífero que utiliza los dispositivos de EP cutánea para mejorar los síntomas de una enfermedad, reducir la patogénesis de la enfermedad, eliminar la causa raíz de la enfermedad o prevenir la aparición de la enfermedad. El gen codificante en el plásmido de

ADN puede ser un gen heterólogo obtenido de una fuente exógena. La terapia génica puede aplicarse a enfermedades de origen genético, tales como la fibrosis quística o la distrofia muscular. La terapia génica también puede aplicarse al tratamiento de tumores. Preferentemente, los genes de los plásmidos de ADN codifican una hormona liberadora de la hormona del crecimiento o un factor de crecimiento insulínico-I, ya sean formas sintéticas o naturales o fragmentos funcionales o de longitud completa de los mismos.

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

10 Ejemplos de fármacos que pueden utilizarse como biomoléculas para su administración al tejido cutáneo por medio de EP cutánea incluyen agentes quimioterapéuticos que tienen un efecto antitumoral o citotóxico, incluyendo bleomicina, neocarcinostatina, suramina, doxorrubicina, carboplatino, taxol, mitomicina C y cisplatino. Otros agentes quimioterapéuticos son conocidos por los expertos en la materia y pueden encontrarse en referencias como The Merck Index. Además, los agentes que ayudan a la entrega transmembrana ("agentes de entrega") también se contemplan como biomoléculas para la entrega y pueden incluir: N-alquilmelamida y benzoato de para-cloro mercurio. En las realizaciones en las que las biomoléculas son plásmidos de ADN o vacunas de ADN, otra biomolécula para administrar junto con los plásmidos de ADN o las vacunas de ADN, antes o después de ellos, es uno o más plásmidos de ADN o vacunas de ADN adicionales. En las realizaciones en las que las biomoléculas son plásmidos de ADN o vacunas de ADN destinadas a expresar proteínas diana que provocan una respuesta inmunitaria, otra biomolécula para administrar junto con, antes de o después de los plásmidos de ADN o las vacunas de ADN es uno o más genes de proteínas que potencian aún más la respuesta inmunitaria contra dichas proteínas diana. Ejemplos de estos genes son los que codifican otras citoquinas y linfoquinas como el interferón alfa, el interferón gamma, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), el TNF α , el TNF β , el GM-CSF, el factor de crecimiento epidérmico (FCE), la IL-1, la IL-2, la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-10, la IL-12, la IL-18, el MHC, el CD80, el CD86 y la IL-15, incluida la IL-15 con la secuencia señal eliminada y opcionalmente el péptido señal de la IgE. Otros genes que pueden ser útiles incluyen aquellos que codifican MCP-1, MIP-1 \square , MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, IL-7, IL-22, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor del TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IKB, Inactive NIK, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta al interferón, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y sus fragmentos funcionales.

35 Los dispositivos de EP cutánea pueden incluir cualquier número de electrodos, tales como una matriz de tres electrodos dispuestos en un patrón diferente, que puede verse en la Figura 11. La distancia L se elige de forma que la intensidad de la energía en el punto B sea un tercio de la del punto A. Después de tres impulsos (1 a 2, 2 a 3 y 3 a 1), el punto B ha recibido una dosis acumulada igual a la del punto A. A medida que aumenta el número de electrodos del conjunto, la distancia L necesaria para obtener una distribución uniforme de la energía se alarga proporcionalmente. L = k x n en la que n es el número de electrodos, y k es una constante de proporcionalidad. Así, seleccionando un mayor número de electrodos se puede abarcar un mayor volumen de tejido. El número óptimo de electrodos cutáneos elegidos puede depender del volumen del material a transfectar y de su dispersión entre la inyección y la electroporación.

Ejemplos

45 La presente invención se ilustra aún más por medio de los ejemplos siguientes. Se debe entender que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferentes de la invención, se dan únicamente a título ilustrativo.

Preferentemente, las formulaciones de ADN para su uso con los dispositivos de EP cutánea descritos en la presente memoria descriptiva tienen altas concentraciones de ADN, preferentemente concentraciones que incluyen cantidades de gramos de ADN en pequeños volúmenes que son óptimos para la administración a la piel, preferentemente pequeño volumen de inyección, idealmente 25-200 microlitros (μ L). En algunas realizaciones, las formulaciones de ADN tienen altas concentraciones de ADN, tales como 1 mg/ml o más (mg de ADN/volumen de formulación). Más preferentemente, la formulación de ADN tiene una concentración de ADN que proporciona cantidades de gramos de ADN en 200 μ L de fórmula, y más preferentemente cantidades de gramos de ADN en 100 μ L de fórmula.

55 Los plásmidos de ADN para su uso con los dispositivos de EP cutánea de la presente invención se pueden formular o fabricar mediante el uso de una combinación de dispositivos y técnicas conocidos, pero preferentemente se fabrican mediante el uso de una técnica de fabricación de plásmidos optimizada que se describe en una Solicitud provisional de los Estados Unidos Núm. de serie 60/939,792., la cual fue presentada el 23 de mayo de 2007 comúnmente bajo licencia y copendiente. En algunos ejemplos, los plásmidos de ADN utilizados en estos estudios se pueden formular a concentraciones superiores o iguales a 10 mg/mL. Las técnicas de fabricación también incluyen o incorporan diversos dispositivos y protocolos que son comúnmente conocidos por aquellos con habilidades ordinarias en la técnica, además de los descritos en la EE.UU. Núm. de serie 60/939792 incluidos los descritos en una patente comúnmente

bajo licencia, Patente estadounidense 7.238.522, expedida el 3 de julio de 2007. Las altas concentraciones de plásmidos utilizadas con los dispositivos de EP cutánea y las técnicas de administración aquí descritas permiten la administración de plásmidos en el espacio ID/SC en un volumen razonablemente bajo y ayuda a potenciar los efectos de expresión e inmunización.

5 **Ejemplo 1. Funcionamiento del dispositivo electrocinético ("dispositivo de EP cutánea") para la electroporación cutánea**

En primer lugar, se enciende la alimentación del dispositivo de EP cutánea. El firmware permanece en estado de reposo hasta que se recibe una entrada del usuario. Para iniciar una secuencia de electroporación, se introduce una contraseña para obtener un aviso introductorio en la pantalla PCL. En este punto, se pulsa el interruptor activador del conjunto de la empuñadura. A continuación, el usuario introduce un número, preferentemente un número de identificación del individuo, que se registra con los datos de cada pulso almacenados para su posterior descarga. El número se introduce preferentemente por medio de un teclado numérico. La formulación de la biomolécula se administra como una inyección ID o SC en un volumen de inyección razonablemente pequeño, idealmente 25-200 litros de piel y la matriz de electrodos cutáneos se inserta en la piel para rodear completamente el área de inyección que se visualiza fácilmente. A continuación, se pide al usuario, por medio de un "bip" del zumbador, que pulse el interruptor de activación para continuar la secuencia de electroporación. Tras pulsar el interruptor de activación, el firmware establece si el comprobador de impedancias está activado o no. Si el comprobador de impedancias está activado, el software realiza inmediatamente una serie de mediciones de impedancia. El firmware comprueba la impedancia entre electrodos con una tensión continua baja.

10 Una vez insertados los electrodos en el tejido diana, y durante la comprobación de la impedancia, el procesador comprueba la conductividad del tejido a nivel del electrodo. Esto se hace para garantizar que los electrodos entran en contacto eléctrico con el tejido diana del paciente. Estas mediciones se realizan en cuestión de segundos con tiempo suficiente para lograr lecturas precisas, a menudo menos de 2 segundos. Durante la prueba de impedancia, se enciende un DEL rojo en el conjunto del mango. Si falla alguna de las mediciones de impedancia, sonará un largo "bip" de error, el DEL del mango permanecerá en rojo, la pantalla PCL mostrará el error y el firmware volverá al estado de reposo.

15 Si todas las mediciones pasan, se emite un breve "bip", se enciende un DEL verde en el conjunto del mango y la pantalla indica al usuario que pulse el interruptor de activación para continuar. El firmware espera a que se vuelva a pulsar el interruptor de activación de la manilla para continuar la secuencia. Si se pulsa cualquier tecla del teclado en este momento, sonará un "bip" largo de error y la unidad volverá al estado de reposo.

20 El firmware ejecuta la secuencia de cocción de acuerdo con lo proscrito por el programa de pulsación seleccionado. Durante el suministro de cada impulso eléctrico o pulso de energía, el dispositivo de EP ajusta continuamente su salida en función de la resistencia medida en el tejido diana, por ejemplo la piel, para mantener la corriente deseada. En esencia, el procesador inicia la secuencia de impulsos ajustando el nivel de corriente de salida deseado al de un valor 25 de corriente preestablecido introducido por un usuario. Un bucle de realimentación de hardware (*es decir*, un circuito analógico de bucle cerrado) mantiene continuamente la corriente de salida deseada ajustando el voltaje aplicado a través de los electrodos a medida que cambia la resistencia del tejido diana. Durante el suministro del pulso de energía, el procesador registra la forma de onda del pulso. El procesador finaliza el pulso cuando se ha cumplido la duración 30 del pulso ajustando la corriente de salida deseada a cero en ese momento. Cuando finaliza la secuencia de pulsos, el procesador revisa los datos de la forma de onda y alerta al operador si la corriente no estaba dentro de los parámetros establecidos durante la secuencia de electroporación; de este modo, informa al usuario de si la secuencia de electroporación o el tratamiento han sido defectuosos o no.

35 Cuando la secuencia EP se completa con éxito, el dispositivo de EP cutánea vuelve al estado de reposo. Una vez finalizada la secuencia de impulsos eléctricos, la pantalla PCL confirma visualmente que el campo eléctrico se ha generado correctamente. Despues de cada secuencia, la pantalla PCL mostrará una lista de tres o cinco números, "1" o "0", uno para cada uno de los pulsos de la secuencia de electroporación. Un "0" indica que el pulso era normal y un "1" indica que el pulso era anormal. Más concretamente, cada pulso debe alcanzar al menos el 90% de la corriente 40 ajustada para ser descrito como normal o se mostrará un "0" en la pantalla PCL. Si un pulso determinado alcanza menos del 90% de la corriente ajustada, el pulso es anormal y se mostrará un "1". Además, se muestran la corriente mínima y media de los impulsos anómalos. Por ejemplo, para una secuencia de electroporación de cinco pulsos 45 ajustada a una corriente de 0,5 Amperios, si los pulsos 3 y 5 alcanzan sólo 0,4 Amperios y 0,3 Amperios, respectivamente, se mostrará "0 0 1 0 1" así como "Low: 60% promedio 80% Este mecanismo de control es esencial cuando se administran vacunas para aplicaciones terapéuticas o profilácticas. Si la administración de la vacuna es 50 inadecuada, existe una alta probabilidad de que no se consigan las respuestas de anticuerpos o celulares necesarias para el tratamiento o la protección, y el individuo corre el riesgo de desarrollar la enfermedad (Roth et al., 2005).

55 **Ejemplo 2. Adquisición y almacenamiento de datos**

El software o firmware del dispositivo de EP cutánea permite la adquisición de datos en tiempo real y su almacenamiento en memoria no volátil. La Figura 2C ilustra una primera porción de datos que pueden recogerse durante el proceso de electroporación. La primera sección de la cabecera del archivo contiene el nombre del

5 archivo ("2.1") y el número de animal ("2.2"). Los datos en columnas ("2.3") describen el pulso en secuencia, el tiempo de espera antes de pulsar, el ancho de pulso y la corriente de pulso para cada uno de los tres electrodos. La figura 2.4 ilustra una segunda porción de datos, que identifica la configuración de cada electrodo durante una secuencia de impulsos determinada. La figura 2.5 ilustra una versión formateada de una tercera porción de datos brutos para la misma electroporación. El archivo se descarga desde el dispositivo de EP cutánea como un archivo CSV de Microsoft Excel. Los datos se copian y pegan en una plantilla de hoja de cálculo de Microsoft Excel. Las columnas de la hoja de cálculo representan la tensión (V) y la corriente (Amperios) medidas durante el pulso de electroporación, así como la resistencia tisular calculada (Ohmios). Los datos descargados tras utilizar electrodos más pequeños en la piel de los cerdos arrojaron casi el doble de resistencia cutánea que tras utilizar electrodos más grandes (de 700 Ω a 2200 Ω).

10

Ejemplo 3. Diseño de plásmidos, procedimientos de administración y estudio experimental en cerdos

15 *Construcción del plásmido.* pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA) utilizado en los experimentos descritos en la presente memoria descriptiva, codifica una variante desplazada al rojo de la PVF de tipo salvaje que se ha optimizado para una fluorescencia más brillante y una mayor expresión en células de mamífero (máximo de excitación = 488 nm; máximo de emisión = 507 nm.) pEGFP-N1 codifica la variante GFPmut1 que contiene la sustitución de doble aminoácido de Phe-64 por Leu y de Ser-65 por Thr. La secuencia codificante del gen EGFP contiene más de 190 cambios de base silenciosos que corresponden a las preferencias humanas de uso de codones. Las secuencias que flanquean EGFP se han convertido en un sitio de iniciación de la traducción consenso Kozak para aumentar aún más la eficiencia de la traducción en células eucariotas. Las señales de poliadenilación SV40 situadas aguas abajo del gen EGFP dirigen el procesamiento adecuado del extremo 3' del ARNm EGFP. La columna vertebral del vector también contiene un origen SV40 para la replicación en células de mamíferos que expresan el antígeno T SV40. Un casete de resistencia a la neomicina (neor), compuesto por el promotor temprano del SV40, el gen de resistencia a la neomicina/kanamicina de Tn5 y señales de poliadenilación del gen de la timidina quinasa del Herpes simplex, permite seleccionar células eucariotas transfectadas de forma estable mediante el uso de G418. Un promotor bacteriano aguas arriba de este casete expresa la resistencia a la kanamicina en E. coli. La columna vertebral de pEGFP-N1 también proporciona un origen de replicación pUC 19 para la propagación en E. coli y un origen f1 para la producción de ADN monocatenario.

20

25

30 *Condiciones de electroporación* En todos los experimentos se utilizaron pulsos de onda cuadrada. Las condiciones de electroporación se indican individualmente para cada experimento. En todos los casos, se utilizó una corriente constante de 0,1 - 0,4 amperios, con 2 o 3 pulsos, durante 20 o 52 milisegundos/pulso, y con un segundo entre pulsos. El dispositivo de electroporación de la piel de control (utilizado anteriormente para administrar biomoléculas al músculo esquelético) contenía una matriz circular (1 cm de diámetro) de cinco electrodos de aguja de acero inoxidable macizo de calibre 21 igualmente espaciados, montados sobre un material no conductor. Los electrodos de electroporación cutánea consisten en tres electrodos de aguja maciza de acero inoxidable de calibre 26 en forma de triángulo isósceles (dos lados largos de 5 mm de longitud y el lado corto de 3 mm), montados sobre material no conductor.

35

40 *Inyección intramuscular de ADN plasmídico en cerdos.* En los estudios PVF se utilizaron cerdos híbridos jóvenes de sexo mixto, de tres a seis semanas de edad, con pesos comprendidos entre 15 y 40 kg. Los animales se alojaron en corrales individuales con acceso *ad libitum* a comida y agua. Las preparaciones de plásmidos libres de endotoxinas se diluyeron en agua estéril y se formularon al 1% peso/peso con poli-L-glutamato de bajo peso molecular purificado por HPLC (MW medio 10.900). El día 0 del experimento, se sujetó manualmente a los animales y se les inyectó directamente la solución de plásmido de PVF ID y/o SC como se ha descrito. Se colocó un tatuaje a 2 cm del centro en la esquina superior izquierda de un cuadrado en el que el punto de inyección se situó en el centro del cuadrado, de forma que cada punto de inyección pudiera identificarse y diseccionarse fácilmente. Se evitaron todos los vasos sanguíneos superficiales importantes a la hora de encontrar un punto de inyección adecuado.

45

50 *Colección de pieles.* Los cerdos fueron desangrados y se identificaron los puntos de inyección. En cada punto de inyección se disecó inmediatamente un área cuadrada de 2,5 cm de piel, tejido subcutáneo y una pequeña cantidad de músculo subyacente. La zona disecada se observó en una sala oscura mediante el uso de una luz ultravioleta de 365 nm de longitud de onda.

55 *Análisis fotográfico de la zona de expresión.* Las muestras que mostraron suficiente fluorescencia se fotografiaron con una cámara digital. Las muestras sin fluorescencia o con fluorescencia muy débil no se fotografiaron. La fluorescencia fue puntuada en una escala de 0 a 5 por tres observadores ciegos al tratamiento. Cero asignado a las que no tenían fluorescencia, 1 a las que se observó una fluorescencia muy leve pero no se fotografiaron, y de 3 a 5 evaluadas a partir de la fluorescencia fotografiada. Las muestras se guardaron para el examen histológico.

Ejemplo 4. Estudio comparativo

55 Se tabularon los datos de todas las condiciones probadas. La figura 10 presenta únicamente las condiciones cuyas puntuaciones medias fueron superiores o iguales a 2, mientras que la puntuación máxima posible es 5 (para la explicación de la puntuación, consulte el párrafo [0099]). Como muestran los datos, los mejores resultados globales se han obtenido mediante el uso de la matriz cutánea específica de la piel (primera fila, Figura 10). Aunque el siguiente grupo (segunda fila, Figura 10) tiene la misma puntuación numérica, hay que señalar que para la matriz cutánea

("MC") sólo se utilizaron 50 µg de plásmido formulado en 50 µL, mientras que con la matriz grande ("MG") se utilizó una cantidad doble, 100 µg de plásmido formulado en 100 µL. Además, mediante el uso de las condiciones optimizadas para la matriz de electrodos cutáneos, el tiempo de procedimiento se redujo sustancialmente: el tiempo de procedimiento observado entre la inyección y la EP es de 4 segundos (véase la cuarta columna, **Figura 10**) cuando se utiliza la MC, y de 80 segundos cuando se utiliza la MG. Se ensayaron muchas otras condiciones de dosis de plásmido, volumen de formulación, tiempo de retardo, amplitud de corriente y longitud de pulso, que se presentan en la **Figura 10**. Como regla general, se observó que un volumen menor (soluciones más concentradas), con una dosis adecuada de plásmido, daba mejores resultados.

Ejemplo 5 comparación de la administración intradérmica con la intramuscular en cerdos

- Se comparó la administración y expresión de dosis concentradas de plásmido CMV-HLHC y CMV-FAES administradas por vía intradérmica (ID) o intramuscular (IM) en cerdos. Los resultados demostraron qué procedimiento de administración produce la mayor expresión en cerdos mediante el uso de ambas proteínas secretadas (FAES, HLHC), así como probando la inmunogenicidad de FAES en cerdos por primera vez.
- Los animales se alojaron individualmente y se aclimataron durante 7 días. El día 0 del estudio, los animales fueron pesados y sangrados, y a continuación anestesiados. A los cerdos (n=4/grupo) se les inyectó 1 mg de CMV-FAES y CMV-HLHC + 0,1% de sal sódica de poli-L-glutamato a distintas concentraciones e intensidades de corriente (Tabla 1). Después de 4 seg, se electroporó a los animales mediante el uso del dispositivo de electroporación CELLECTRA™ (VGX Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA 19422) ((5 agujas, pulsos de 52 milisegundos, 1 segundo entre pulsos, 3 pulsos totales) con corriente variable (0,1 a 0,5 Amp). Se dejó que los cerdos se recuperaran de la anestesia y se les vigiló durante 24 horas para garantizar su total recuperación. Se tomó nota de todos los animales que no se recuperaron completamente en las 2 o 3 horas posteriores al tratamiento. Se pesó a los cerdos y se les sangró los días 2, 4, 7, 9 y 11. La comida y el agua estuvieron disponibles ad libitum durante todo el estudio. Se extrajo sangre para FAES, ELISA de anticuerpos de FAES, HLHC e IGF-I.

Tabla 1. Sumario del grupo experimental.

Grupo	Plásmido	Dosis	Volumen de inyección	IM o ID	Corriente del EP	n=
1	CMV-FAES	10 mg/mL	100 µL	ID	0,2 amperios	4
	CMV-HLHC					
2	CMV-FAES	2 mg/mL	500 µL	ID	0,2 amperios	4
	CMV-HLHC					
3	CMV-FAES	10 mg/mL	100 µL	IM	0,5 amperios	4
	CMV-HLHC					
4	CMV-FAES	2 mg/mL	500 µL	IM	0,5 amperios	4
	CMV-HLHC					
5	CMV-FAES	2 mg/mL	500 µL	IM	0,4 amperios	4
	CMV-HLHC					
6	CMV-FAES	2 mg/mL	500 µL	IM	0,3 amperios	4
	CMV-HLHC					
7	CMV-FAES	10 mg/mL	100 µL	1M	0,1 amperios	4
	CMV-HLHC					

- La expresión de FAES se midió en muestras de suero mediante el uso de un kit quimioluminiscente Phospha-Light Chemiluminescent Reporter Assay Kit (Applied Biosystems, Bedford, MA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como se ve en la **Figura 12**. El límite inferior de detección del ensayo es de 3 pg/mL. Los niveles de FAES fueron superiores en los grupos a los que se administró plásmido diluido frente al plásmido concentrado en animales injectados IM electroporados a 0,5 Amp (43% superiores, *P = 0,024). Se encontraron niveles muy bajos de proteína FAES detectable en el suero de los animales injectados ID.

La FAES utilizada en este estudio es una proteína humana y, por tanto, provoca una respuesta inmunitaria en cerdos. Se realizó la medición de la respuesta de anticuerpos por medio de un ELISA, y los resultados pueden verse en el gráfico de la figura 13. La respuesta de anticuerpos en muestras de suero en el día 11 se graficó con los resultados de FAES en suero en el día 11. Las muestras concentradas de plásmidos produjeron uno de los títulos medios de anticuerpos más elevados.

La expresión de HLHC se midió mediante el uso de una hormona corriente abajo en el eje HLHC, el factor de crecimiento similar a la insulina I o IGF-I. Los resultados pueden verse en el gráfico mostrado en la Figura 14. La IGF-I es una proteína más estable en el suero y se puede medir fácilmente mediante el uso de un kit IGF-I RIA. Los niveles séricos de IGF-I en el día 11 tras la inyección fueron superiores en el grupo al que se administró el plásmido IM no concentrado (D-IM-0,5 A) en comparación con el grupo al que se administró el plásmido IM concentrado (C-IM-0,5 A).

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

La expresión de IGF-I fue mayor en los animales injectados IM y electroporados con una intensidad de corriente de 0,5 Amperios. Las intensidades de corriente más bajas dieron niveles de expresión más bajos, pero el pequeño número de animales hizo que la diferencia no fuera estadísticamente diferente.

Ejemplo 6 estudios EP cutáneos en cerdos

Materiales y procedimientos

Animales

En los estudios preliminares se utilizaron cerdos híbridos jóvenes de género mixto, de tres a seis semanas de edad, con pesos entre 25 y 40 kg (n=5/grupo). Los animales se alojaron en Stillmeadow, Inc., Sugarland, TX, de acuerdo con las normas de la American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care. Los animales se alojaron en grupos en corrales con acceso *ad libitum* a comida y agua. Los animales fueron aclimatados durante 5 días antes del inicio de los experimentos.

Plásmidos

En los experimentos 1 y 2 se utilizaron pEGFP-N1 o pSEAP-2 Basic Vector (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), respectivamente. La pEGFP-N1, utilizada en el experimento 1 (Exp.1), codifica una variante desplazada al rojo de la proteína verde fluorescente (PVF) de tipo salvaje que se ha optimizado para una fluorescencia más brillante y una mayor expresión en células de mamífero (máximo de excitación = 488 nm; máximo de emisión = 507 nm). Un promotor ubicuo de citomegalovirus (CMV) impulsaba la expresión de una fosfatasa alcalina embrionaria secretada (FAES) en el vector básico pSEAP-2; este plásmido se utilizó en el experimento porcino 2 (Exp.2). Los plásmidos se obtuvieron por medio de un kit comercial (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, EE.UU.). Los niveles de endotoxinas fueron inferiores a 0,01 EU/μg, medidos por Kinetic Chromagenic LAL (Endosafe, Charleston, SC). Las preparaciones de plásmidos se diluyeron en agua estéril y se formularon al 1% peso/peso con sal sódica de poli-L-glutamato (MW=10,5 kDa de media) (Sigma, St. Louis, MO), purificada posteriormente por HPLC en VGX Pharmaceuticals, Immune Therapeutics Division (The Woodlands, TX).

Administración intradérmica/Subcutánea (ID/SC) de plásmidos y electroporación (EP).

En el día 0 de Exp. 1, se pesaron los animales y se anestesiaron con isoflurano (5% de inducción, 2-3% de mantenimiento). Se rasuraron y limpianon cuidadosamente dos puntos de 3" x 3" en cada flanco. Se marcaron bloques de una pulgada con tinta de tatuaje para su posterior identificación. Cada inyección de plásmido se administró en el centro del bloque. Los animales recibieron inyecciones ID/SC; en diversas condiciones de EP (véase más adelante), se variaron los volúmenes y las dosis de inyección: dosis de plásmido, volumen de inyección (50μg/50μL, 50μg/100μL, 100μg/100μL y 200μg/100μL), amplitud de corriente y longitud de pulso y un observador independiente, ciego a las identidades de los grupos de tratamiento, puntuó las biopsias de la zona tratada. Se tomaron fotografías de secciones de piel disecadas y se midió la fluorescencia 5 días después de la inyección. Se calculó una puntuación numérica basada en el área de distribución y la intensidad de la fluorescencia, en comparación con la muestra con mayor expresión (0 = sin fluorescencia, sin distribución; 5 = fluorescencia más brillante, mayor distribución). Se utilizaron pulsos de onda cuadrada en todos los experimentos, y se administraron mediante el uso de un dispositivo de EP cutánea, el dispositivo CELLECTRA™ (VGX Pharmaceuticals, Immune Therapeutics Division, The Woodlands, TX), que puede suministrar una corriente constante adaptativa (corriente constante de acuerdo con la experimenta el tejido subyacente). En todos los casos, los parámetros de corriente constante adaptativa se situaron entre 0,1 y 0,4 amperios, con 2 o 3 pulsos, durante 20 milisegundos/pulso o 52 milisegundos/pulso, y con un segundo entre pulsos.

En Exp. se utilizaron dos tipos de matrices. 1: la matriz de electrodos utilizada anteriormente para la EP intramuscular (IM), que es una matriz circular (1 cm de diámetro) de cinco electrodos de aguja de acero inoxidable macizo de calibre 21 espaciados por igual, montados sobre un material no conductor; los electrodos de aguja cutáneos ID/SC consisten en tres electrodos de aguja de acero inoxidable macizo de calibre 26, de 3 mm de longitud, colocados en formación

de triángulo isósceles (dos lados largos de 5 mm de longitud y el lado corto de 3 mm de longitud), montados sobre material no conductor (véase también la Figura 17B).

- En Exp. 2, se inyectó a los animales ID/SC y piel EP con 1 mg de pSEAP, como preparación estándar de plásmido a 2 mg/mL (500 µL, similar a una inyección IM), o como preparación concentrada de plásmido a 10 mg/mL (100 µL), y se midió la expresión de FAES hasta 11 días después de la administración del plásmido.

Extracción de sangre y ensayo FAES

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

Las muestras de suero se descongelaron y se analizaron 50 µL para la actividad FAES mediante el uso del kit Phospho-Light Chemiluminescent Reporter Assay (Applied Biosystems, Bedford, MA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El límite inferior de detección del ensayo es de 3 pg/mL. Las muestras de suero más concentradas se diluyeron 1:10 en suero de ratón antes de analizar la actividad FAES. Todas las muestras se leyeron mediante el uso del luminómetro LUMIstar Galaxy (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania).

Resultados

Exp. 1.

Las puntuaciones de PVF más altas se obtuvieron mediante el uso de tanto la matriz de electrodos de aguja cutánea como el electrodo IM. Sin embargo, los resultados óptimos con el electrodo IM requirieron utilizar el doble de dosis de plásmido a idéntica concentración, 100 µg de plásmido formulado en 100 µL frente a sólo 50 µg de plásmido formulado en 50 µL con la matriz de electrodos de aguja cutánea (**Figura 15**). Además, mediante el uso de los 0,2 amperios, 2 pulsos, 52 ms/pulso, 1 segundo entre pulsos, que determinamos que eran las condiciones optimizadas para la EP cutánea, el tiempo de procedimiento se redujo sustancialmente: el tiempo de procedimiento es de sólo 4-5 segundos cuando se utiliza el dispositivo de EP cutánea, y de 80 segundos cuando se utiliza el conjunto IM. Como regla general, se observó que un volumen menor (soluciones más concentradas), con una dosis adecuada de plásmido, daba mejores resultados.

Exp. 2

Los cerdos se trataron mediante el uso de las condiciones determinadas en el experimento anterior como óptimas para la administración del plásmido ID/SC junto con la EP cutánea, es decir, 0,2 amperios, 2 pulsos, 52 ms/pulso, 1 s entre pulsos. Se administró a los animales la misma cantidad de plásmido, 1 mg de pSEAP, mediante el uso de la formulación de pequeño volumen, o un volumen habitual para inyecciones IM+EP. Se obtuvieron valores de FAES más altos mediante el uso de la preparación concentrada de plásmido, y volúmenes de inyección más bajos (**Figura 16**), P < 0,05. Estas condiciones se validaron posteriormente en los experimentos con primates no humanos.

Ejemplo 7 experimentos con primates

Los macacos Rhesus fueron inmunizados dos veces con una dosis baja de ADN (0,2mg/antígeno) y a continuación inmunizados tres veces con una dosis alta de ADN (1,0mg/antígeno) por medio de inyección ID/SC seguida de EP cutánea. Las dos dosis bajas de inmunización dieron lugar a respuestas inmunitarias celulares débiles, determinadas por medio de IFNy ELISpot, tanto en el grupo ID/SC solo como en el grupo ID/SC inyectado seguido de EP cutánea (ID/SC+EP). Sin embargo, un aumento de la dosis de ADN aumentó las respuestas a 1.000 SFU/10⁶ PBMC en el grupo ID/SC después de 3 inmunizaciones. El grupo ID+EP tenía un 50% más de células productoras de IFNy que el grupo ID/SC. La mejora de la inmunogenicidad en el grupo ID/SC+EP también se observó en las respuestas de células T de memoria, ya que el grupo ID/SC+EP tenía el doble de células productoras de IFNy específicas de antígeno que el grupo ID/SC. La inmunización ID/SC por sí sola no dio lugar a una producción significativa de títulos de anticuerpos gag o env (título final <50). Sin embargo, la administración del plásmido con EP dio lugar a títulos finales máximos de gag de 8800 y de env de 1600. Por último, la co-inmunización de rhIL-12 codificada en plásmido también dio lugar a una respuesta inmune polarizada T_H1 de acuerdo con se determinó por medio de un ensayo ELISpot de IL-4.

Materiales y procedimientos

Animales

Los macacos Rhesus (*Macaca mulatto*), fueron alojados individualmente en BIOQUAL, Inc. (Rockville, MD), de acuerdo con las normas de la Asociación Americana para la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio, con acceso *ad libitum* a comida y agua. Se dejó que los animales se aclimataran durante al menos 30 días en cuarentena antes de cualquier experimento.

Plásmidos

En este estudio se utilizaron los plásmidos pGag4Y, pEY2E1-B y WLV104. El pGag4Y contiene un casete de expresión que codifica para una proteína *gag* del VIH. El gen *Gag4Y* se subclonó en el vector de expresión, pVax (Invitrogen, Carlsbad, CA), para su posterior estudio. pEY-2E1-B contiene un casete de expresión que codifica para la envoltura del VIH clado B. WLV104M es un plásmido que codifica un gen IL-12 rhesus. Los plásmidos se obtuvieron por medio de un kit comercial (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, EE.UU.). Los niveles de endotoxinas fueron inferiores a 0,01 EU/ μ g, medidos por Kinetic Chromogenic LAL (Endosafe, Charleston, SC). Las preparaciones de plásmidos se diluyeron en agua estéril y se formularon al 1% peso/peso con sal sódica de poli-L-glutamato (MW=10,5 kDa de media) (Sigma, St. Louis, MO), purificada posteriormente por HPLC en VGX Pharmaceuticals, Immune Therapeutics Division, The Woodlands, TX.

10 Inmunización.

Las vacunas de ADN del VIH se administraron ID/SC en primates no humanos con ($n = 3$ /grupo) y sin ($n = 3$ /grupo) EP, mediante el uso del dispositivo de EP de corriente constante adaptable CELLECTRA™ (como en el Ejemplo 3, anterior) y matrices de electrodos de aguja cutánea. Las inmunizaciones se realizaron con cuatro semanas de intervalo y se sangró a los animales cada dos semanas para medir las respuestas de anticuerpos y células T. Las dos primeras inmunizaciones administraron 0,2 mg de cada uno de los dos antígenos del VIH, (*gag* y *env*) y plásmido que expresa IL-12 como adyuvante, en un volumen de 200 μ L, repartido en 2 puntos de inyección ID/SC por animal. Las dos inmunizaciones subsiguientes se realizaron mediante el uso de 1mg de cada vacuna contra el VIH y plásmidos de IL-12 (3mg en total) a la concentración más alta de plásmidos (10 mg/mL) para lograr la dosis más alta de plásmidos en un volumen idéntico al de las dos inmunizaciones anteriores. Las condiciones de electroporación fueron 0,2 amperios de corriente constante, 2 pulsos, 52 ms de longitud de pulso con 1 segundo entre pulsos.

Recogida de sangre

Los animales se sangraron cada dos semanas durante la duración del estudio. Se recogieron 10 ml de sangre en tubos con EDTA. Las PBMC se aislaron por medio de centrifugación estándar con Ficoll y a continuación se resuspendieron en medio de cultivo completo (RPMI 1640 con 2mM/L de L-glutamina suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina y 55 μ M/L de β -mercaptoetanol). Los glóbulos rojos se lisaron con amortiguador de lisis ACK (Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ).

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se revistieron placas de noventa y seis pocillos durante la noche con 100ng/pocillo de VIH-1 IIIB p24 o gp120 recombinante (ImmunoDiagnostics, Woburn, MA) para determinar las respuestas de VIH *gag* y *env* respectivamente. 30 Las placas revestidas con 100ng/pocillo de albúmina de suero bovino sirvieron de control negativo. Las placas se bloquearon con BSA-PBST al 3% durante 1 hora a 37°C. A continuación, se incubaron las placas con diluciones seriadas cuádruples de suero durante 1 hora a 37°C. A continuación, se añadió a las placas anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano anti-IgG de cabra a una dilución de 1:10.000 (MP Biomedicals, Aurora, OH) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se utilizó tetrametilbencidina (R&D systems, Minneapolis, MN) para revelar las placas y se detuvieron las reacciones con 2N H₂SO₄. A continuación se midieron las densidades ópticas (DO).

Los títulos de punto final de IgG se definieron como la dilución recíproca de suero que dio lugar a valores de DO que eran mayores que dos veces el valor de DO medio de los pocillos de BSA.

Ensayo inmunoenzimático (ELISpot)

Se realizaron ELISpot mediante el uso de anticuerpos de captura y detección de IFNy o IL-4 (MabTech, Suecia). Las 40 respuestas específicas al antígeno se determinaron restando el número de manchas en los pocillos de control negativo de los pocillos que contenían péptidos. Los resultados se muestran como el valor medio (puntos/millón de esplenocitos) obtenido para pocillos triplicados.

Análisis Estadístico

Los datos se analizan mediante el uso del software Prism Graphpad, y se expresan como medias ± SEM.

45 Diseño del estudio con primates no humanos

Los macacos rhesus se inmunizaron con constructos optimizados de VIH-1 *gag* y *env* y IL-12 rhesus codificada por plásmido de acuerdo con el diseño especificado en la Figura 17A; el dispositivo usado en los experimentos con cerdos también se usó en los primates no humanos (Figura 17B). Tres animales fueron inmunizados por medio de inyección ID/SC y tres animales fueron inmunizados con inyección ID/SC seguida de electroporación cutánea (ID/SC+EP). Los 50 animales fueron inmunizados cinco veces en las semanas 0, 4, 8, 12 y 16. Se recogió sangre cada dos semanas y se realizaron ensayos ELISpot dos semanas después de cada inmunización, mientras que los ensayos ELISA se realizaron cuatro semanas después de cada inmunización.

Análisis ELISpot

La inducción de la respuesta inmunitaria celular después de cada inmunización se determinó por medio de IFNy ELISpot (**Figura 18**). Tras una inmunización de dosis baja de 0,2 mg por antígeno, tanto el grupo ID/SC como el ID/SC+EP presentaron respuestas muy débiles (72 ± 11 SFU/ 10^6 PBMCs y 85 ± 34 SFU/ 10^6 PBMCs, respectivamente). Una segunda inmunización de dosis baja duplicó el número de células productoras de IFNy en el grupo ID/SC (173 ± 77 SFU/ 10^6 PBMCs) y triplicó la respuesta en el grupo ID/SC+EP (287 ± 34 SFU/ 10^6 PBMCs). Habiendo observado una respuesta celular muy débil tras las dos inmunizaciones a dosis bajas, utilizamos una dosis más alta (1mg por antígeno) de ADN para las tres inmunizaciones siguientes. La respuesta inmunitaria no aumentó significativamente con la tercera inmunización en el grupo ID/SC (176 ± 72 SFU/ 10^6 PBMCs). Sin embargo, el grupo ID/SC+EP aumentó con la dosis más alta hasta duplicar la cantidad de células productoras de IFNy específicas de antígeno (383 ± 162 SFU/ 10^6 PBMC). Los animales fueron inmunizados por cuarta vez con la dosis de 1 mg de ADN. Se observó un aumento del triple en la respuesta de IFNy en el grupo ID/SC en comparación con la inmunización anterior (376 ± 210 SFU/ 10^6 PBMCs). Al igual que con la tercera inmunización, la administración de la dosis alta de ADN con EP cutánea dio lugar a una duplicación de la respuesta de IFNy (1466 ± 762 SFU/ 10^6 PBMCs). Estos altos niveles de respuesta específica al antígeno se mantuvieron durante la inmunización final (1453 ± 873 SFU/ 10^6 PBMCs). La última inmunización duplicó aún más la cantidad de células productoras de IFNy en el grupo ID/SC (927 ± 191 SFU/ 10^6 PBMCs).

Respuestas de las células T de memoria

La inducción de una respuesta de células T de memoria robusta es un aspecto importante del éxito de una vacuna. Para evaluar la población de células T de memoria inducida por las inmunizaciones con ADN ID/SC, se realizó un análisis ELISpot 10 semanas después de la última vacunación con ADN (**Figura 19**). El grupo ID/SC+EP tuvo una respuesta de memoria de IFNy que fue el doble de la magnitud del grupo ID/SC (998 ± 290 y 449 ± 108 SFU/ 10^6 PBMCs, respectivamente).

T_H2 Respuestas de células T

Los estudios que utilizan pistola génica para inmunizaciones cutáneas han demostrado la inducción de respuestas de células T con sesgo T_H2. Sin embargo, se ha demostrado que este sesgo podría invertirse a una respuesta T_H1 si también se administrara la proteína IL-12. Se realizó la administración conjunta de IL-12 rhesus en una inmunización de ADN ID para determinar si su administración conjunta conduciría a una inducción de la respuesta sesgada T_H1 (**Figura 20**). La inducción de respuestas T_H2 específicas de antígeno se determinó por medio de un ensayo ELISpot de IL-4 10 semanas después de la inmunización final. Todos los animales del grupo ID/SC solo tuvieron una respuesta negativa a la IL-4 (>50 SFU/ 10^6 PBMCs) y solo un animal del grupo ID/SC+EP tuvo una respuesta positiva a la IL-4 (136 SFU/ 10^6 PBMCs), lo que sugiere una respuesta predominante T_H1.

Respuestas humorales

Un punto débil de las inmunizaciones con ADN reside en su incapacidad para inducir respuestas de anticuerpos en primates no humanos y en estudios clínicos en humanos. La habilidad de cada grupo de inducir tanto HIV-1 gag como títulos específicos de anticuerpos env a antígenos recombinantes p24 y gp160 fue determinada por medio de un ensayo ELISA (**Figura 21**). Para ambos antígenos, el grupo ID/SC no mostró títulos de anticuerpos significativos (título final <50). El grupo ID/SC+EP desarrolló un bajo nivel de anticuerpos tras la segunda inmunización de dosis baja (título final: 100 ± 50). Sin embargo, se observó una mayor inducción de anticuerpos tras aumentar la dosis de ADN administrada en la tercera inmunización con la dosis alta de ADN (2220 ± 1000). Los títulos de anticuerpos aumentaron hasta la cuarta inmunización (8800 ± 4000). Las respuestas de anticuerpos env también reflejaron los resultados que observamos con el antígeno gag, con el grupo ID/SC teniendo títulos bajos (<50 título final) y el grupo ID/SC+EP alcanzando un título final máximo de 1600 ± 800 .

IM frente a ID/Electroporación SC

Los macacos rhesus se inmunizaron tres veces con las mismas construcciones de VIH gag, env y rhIL-12 (como se discutió, anteriormente) a 1,0mg/mL por medio de inmunización IM. Al comparar la inducción de respuestas inmunitarias celulares, tanto la vía IM como la ID/SC presentaron niveles similares de células productoras de IFNy tras las dos primeras inmunizaciones. Por el contrario, la inmunización por medio de ID/SC+EP dio lugar a niveles elevados de títulos de anticuerpos contra el VIH gag tras una inmunización de dosis alta en comparación con IM+EP. Después de dos inmunizaciones, el grupo ID/SC+EP tenía títulos de gag del VIH que duplicaban los del grupo IM+EP. En estos experimentos, utilizamos electrodos de aguja cutánea para la administración en el compartimento ID/SC, y comparamos la respuesta inmunitaria resultante con las conseguidas tras IM+EP (véase **Tabla 1**).

Tabla 1. Comparación de las respuestas inmunitarias inducidas por electroporación por vía IM o ID/SC. Se muestran los resultados de IFNy ELISpot y HIV gag ELISA tomados tras 3 inmunizaciones con dosis altas (1,0 mg/antígeno).

	IM	ID	ID-EP	ID-EP
ELISPOT				

Total de respuestas gag y env				
(SFU/10 ⁶ PBMCs)				
1	136 ± 51	95 ± 38	482 ± 181	635 ± 171
2	223 ± 76	376 ± 210	1924 ± 4171	466 ± 762
3	2042 ± 311	927 ± 191	5300 ± 3781	465 ± 762
ELISA				
Título final Gag				
1	<50	<50	150	2200
2	<50	<50	4800	8800
3	<50	<50	12800	2150

Ejemplo 8 vacunación con ADN en ratones por medio de EP cutáneo**A. Constructos plásmidos**

5 Un promotor ubicuo de citomegalovirus (CMV) o un promotor sintético específico de músculo (SPc5-12) impulsa la expresión de fosfatasa alcalina embrionaria secretada humana (FAES) en el vector básico pSEAP-2 utilizado en los experimentos de ratón 1 y 3 (Exp. 1 y Exp. 3). En los experimentos con genes informadores también se ha utilizado una variante en rojo del plásmido de tipo salvaje de la proteína verde fluorescente (PVF), pEGFP-N1, que se ha optimizado para obtener una fluorescencia más brillante y una mayor expresión en células de mamífero (máximo de excitación = 488 nm; máximo de emisión = 507 nm) (Exp. 2). Los plásmidos se obtuvieron mediante el uso de un kit comercial (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). Los niveles de endotoxinas fueron inferiores a 0,01 EU/μg, medidos por Kinetic Chromogenic LAL (Endosafe, Charleston, SC). Las construcciones de consenso de HA y NA se generaron analizando secuencias de virus primarios de 16 virus H5 que han resultado mortales para el ser humano en los últimos años, y de más de 40 virus N1 humanos. Estas secuencias se descargaron de la base de datos de secuencias de la gripe del Laboratorio Nacional de Los Álamos. Tras generar las secuencias consenso, las construcciones se optimizaron para su expresión en mamíferos, incluyendo la adición de una secuencia Kozak, la optimización de codones y la optimización del ARN. A continuación, estas construcciones se subclonaron en el vector pVAX (Invitrogen, Carlsbad, CA). A menos que se indique lo contrario, las preparaciones de plásmidos se diluyeron en agua estéril y se formularon al 1% peso/peso con sal sódica de poli-L-glutamato (SLG) (MW=10,5 kDa promedio) (Sigma, St. Louis, MO), purificada posteriormente por HPLC en VGX Pharmaceuticals, Immune Therapeutics Division (The Woodlands, TX).

B. Experimentos con genes indicadores en ratones

Este estudio probó la entrega y expresión de plásmidos que expresan FAES o EGFP para determinar qué parámetros de electroporación (corriente efectiva más baja), tiempo de retraso (tiempo entre la inyección y el inicio de la electroporación), formulación y músculo diana impactan en la expresión y los niveles de anticuerpos. Los animales fueron electroporados mediante el uso del dispositivo de EP cutánea CELLECTRA™ (incluyendo el uso de 3 electrodos de calibre 26) con corriente y tiempo de retardo variables para la inyección IM o ID.

En un primer experimento (Exp. 1), se inyectaron grupos de ratones C57B16 (n=10/grupo) con 10 μg de un plásmido que expresaba FAES bajo el control de un promotor sintético específico del músculo (pSPc5-12-FAES) en el músculo tibial anterior (TA) o gastrocnemio (G) con un tiempo de retardo de 4 u 80 segundos y 0,1 A de corriente constante. Un grupo de control recibió el plásmido en la AT sin EP (Sin EP). Otros grupos de animales recibieron en concentración equimolar un casete de expresión sin columna vertebral plasmídica (NC), pero con idéntico promotor, transgén y señal de poliadenilación 3', en músculos TA y G con y sin EP.

En el segundo experimento (Exp. 2), se inyectaron grupos de ratones (n=4) con 50 μg de pCMV-EGFP, en un volumen total de 5 o 25 μl, respectivamente, para una concentración final del plásmido de 10 mg/mL o 2 mg/mL, por vía IM o ID. Se tomaron fotografías de secciones disecadas de piel y músculo y se midió la fluorescencia 5 días después de la inyección. El área tratada fue puntuada por un observador independiente que no conocía la identidad de los grupos de tratamiento. Se calculó una puntuación numérica basada en el área de distribución y la intensidad de la fluorescencia, en comparación con la muestra con mayor expresión (0 = sin fluorescencia, sin distribución; 5 = fluorescencia más brillante, mayor distribución).

40 En el tercer experimento con ratones (Exp. 3), se utilizaron 16 grupos x 5 ratones por grupo para un total de 80 ratones (**TABLA 2**). Se inyectó a ratones (n=5/grupo) 50 μg de CMV-FAES (a 10 mg/mL) con distintas formulaciones (solución

salina, solución salina + 1% de SLG, agua, agua + 1% de SLG) e intensidades de corriente. Los animales fueron electroporados con 4 segundos de retardo con corriente variable (0,1A a 0,2A) para inyección IM en el músculo TA o G.

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

Grupo	Formulación	Concentración (mg/ml)	Dosis total ($\mu\text{g}/\text{animal}$)	ID-EP	n
1	Salina	10	50	0,2	5
2	Salina	10	50	0,1	5
3	Salina	10	50	0,2	5
4	Salina	10	50	0,1	5
5	Salina + SLG	10	50	0,2	5
6	Salina + SLG	10	50	0,1	5
7	Salina + SLG	10	50	0,2	5
8	Salina + SLG	10	50	0,1	5
9	Agua	10	50	0,2	5
10	Agua	10	50	0,1	5
11	Agua	10	50	0,2	5
12	Agua	10	50	0,1	5
13	Aqua + SLG	10	50	0,2	5
14	Aqua + SLG	10	50	0,1	5
15	Aqua + SLG	10	50	0,2	5
16	Aqua + SLG	10	50	0,1	5

En todos los casos, los animales se aclimataron durante 3 días, se pesaron y se marcaron en la oreja. La comida y el agua estuvieron disponibles *ad libitum* durante todo el experimento. El día 0 del estudio se pesaron, sangraron y anestesiaron los animales mediante el uso de la combinación de anestésicos para roedores - xilacina (37,5 mg/mL; 0,05 mL/30 gramos de peso corporal), ketamina (1,9 mg/mL; 0,016 mL/10 gramos de peso corporal), acepromacina (0,37 mg/mL; 0,025 mL/15 gramos de peso corporal), se administró el plásmido por diseño y se electroporó. Para Exp. 1 y 3, la sangre se extrajo por medio de una hemorragia retroorbitaria y se dejó coagular. Toda la sangre recogida se centrifugó para aislar el suero y el plasma y, a continuación, se alicuotó en tubos en hielo para los ensayos de FAES y ELISA anti-FAES, tal como se había realizado anteriormente con pequeñas modificaciones. Despues del día 14, todos los animales fueron desangrados bajo plano quirúrgico de anestesia.

15 C. Análisis

Recogida de sangre

En los días 0, 4, 7 y 11, se pesaron los ratones y se recogió sangre por medio de sangrado retroorbital en tubos de microcentrifuga, respectivamente. La sangre se dejó coagular de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3000xg durante 10 minutos y el suero se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

20 Ensayo FAES

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

ELISA indirecto FAES

La inmunogenicidad a la proteína FAES humana se midió en ratones mediante el uso del siguiente procedimiento modificado. Las placas Nunc Maxisorb (Rochester, NY) se revistieron con fosfatasa alcalina placentaria humana purificada en PBS (100 µl que contenían 100 nanogramos/pocillo de fosfatasa alcalina placentaria humana (Sigma)) durante una noche a 4 °C. Se decantaron las placas y se lavaron tres veces. Las placas se decantaron y se lavaron tres veces. Las placas se bloquearon con BSA al 1% (Sigma) en Tween 20 al 0,05% en PBS (solución de bloqueo) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras de suero se diluyeron 1:100 seguidas de diluciones seriadas de 1:4 en BSA al 1% (Sigma) en Tween 20 al 0,05% en PBS en placas de dilución separadas. La solución en bloque se decantó de las placas. Se añadieron 100 µl de suero problema diluido a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Las diluciones de suero se decantaron y se lavaron tres veces. El anticuerpo secundario se diluyó (conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante) 1:1000 en 1% de BSA en 0,05% de Tween 20 en PBS y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Las placas se decantaron y se lavaron. Se añadieron 100 µl de sustrato de o-fenilendiamina (OFD) por pocillo (0,67mg/mL) en amortiguador de ácido cítrico 0,1M y se incubaron 8 min; se añadieron 100 µl de 1 M H₂SO₄ para detener la reacción. La absorbancia se midió a 490 nm en el lector de placas Spectramax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

15 **D. Resultados en ratones**

La expresión de FAES depende del músculo diana

La expresión se incrementó si la inyección del plásmido que expresa FAES se administra en el músculo TA (Figura 22) frente al músculo G, tanto a los 80s como a los 4s de desfase entre la inyección y la EP mediante el uso del dispositivo de EP cutánea. Cuando se injectó el plásmido SPc5-12-FAES en el músculo TA, los niveles séricos de FAES fueron 285 veces superiores a los de los animales de control que recibieron el plásmido en ausencia de EP ($P < 1,3$ E-21); no se observaron diferencias entre los 80s y los 4s de retardo para el músculo TA (357 ± 6 vs. $357 \pm 6,2$ pg/mL/g). $357 \pm 6,2$ pg/mL/g); la inyección en condiciones idénticas en el músculo G dio lugar a niveles de FAES de 90 a 182 veces superiores a los controles (G 80s frente a controles sin EP, $P < 0,003$; G 4s frente a controles sin EP, $P < 7,7$ E-06). Cuando se injectaron fragmentos de plásmido que sólo contenían los casetes de expresión en el TA y el G (sin columna vertebral (NC), pero con idéntico promotor, transgén y señal de poliadenilación 3') en una formulación equimolar, los niveles de expresión fueron 210-250 veces superiores a los controles que no recibieron IM+EP (80s frente a no EP, $P < 1,8$ E-08; 4s frente a no EP, $P < 3,8$ E-05). La expresión de FAES en el grupo TA 80s fue un 24% mayor que en el grupo NC 80s ($P < 0,008$), mientras que en el grupo TA 4s fue un 37% mayor que en el grupo NC 4s ($P < 0,004$). Los dos grupos a los que se administró C5-12-FAES y NC sin EP (No EP) mostraron una expresión de FAES insignificante.

Expresión PVF

La expresión de PVF se visualizó tras una disección cuidadosa del lugar de inyección y fue puntuada por un observador cegado a los grupos de tratamiento. Las puntuaciones de PVF fueron mayores en los grupos a los que se administró plásmido concentrado tanto en los animales injectados con ID ($4,63 \pm 0,24$ frente a $3,25 \pm 0,14$, $P = 0,01$) como con IM ($4,75 \pm 0,14$ frente a $3 \pm 0,54$, $P = 0,01$) frente a los animales injectados con plásmido no concentrado (Figura 23). En estos estudios, las formulaciones concentradas (hasta 10 mg/mL) se asociaron con una mayor expresión global. Basándose en los resultados de este experimento, se utilizaron plásmidos a una concentración de 10 mg/mL en Exp. 3.

La expresión de la FAES depende de la formulación y de la intensidad de la corriente

40 Las diferencias en los niveles de FAES se evaluaron cuando el transgén FAES está bajo el control de un promotor ubicuo (frente a un promotor específico de músculo como el utilizado en Exp. 1). En consonancia con los experimentos anteriores, la expresión aumentó si el procedimiento de inyección del plásmido-EP se realiza en el músculo TA (Figura 24) frente al músculo G ($P = 0,05$). En este experimento concreto, la formulación salina + SLG dio lugar a niveles séricos de FAES superiores a los de la formulación salina ($41,1 \pm 7,9$ pg/mL/g frente a $31,0 \pm 5,9$ pg/mL/g, respectivamente), aunque esto no alcanzó significación estadística debido a la elevada variabilidad intragrupo. En general, los animales electroporados con una corriente de 0,1A mostraron una expresión de FAES ligeramente superior a la de los animales que recibieron una formulación de plásmido SLG idéntica, administrada con una corriente constante de 0,2A. No obstante, los animales que recibieron el plásmido 0,2A formulado en agua presentaron niveles de FAES significativamente más bajos que los que recibieron 0,1A para el mismo músculo ($P < 0,05$ para TA y $P < 0,001$ para G). Cuando se añadió SLG a la formulación acuosa, las diferencias no fueron significativas para el músculo TA, pero se mantuvieron para el músculo G ($P < 0,04$).

Inducción de anticuerpos anti-FAES

55 La formulación del plásmido FAES con solución salina + SLG produjo una mayor expresión de proteína, sin embargo, los títulos de anticuerpos anti-FAES fueron menores cuando se compararon con animales injectados con plásmido FAES formulado en agua + SLG (Figura 25), aunque esto no alcanzó significación estadística debido a la alta variabilidad intragrupo.

Ejemplo 9 comparación de la administración intradérmica con la intramuscular en primates

Sueros PRIMATE			
A/Vietnam/2003/04 Títulos IH en RBC de caballo al 1			
Grupo	PRIMATE ID	Grupo de estudio	Título IH semana 6
	4497	C	80
H5 + M2	4498	C	80
IM CELLECTRA™	4499	C	40
1 mg por plásmido	4500	C	80
	4501	C	<20
	4520	D	160
H5 + M2	4521	D	80
ID CELLECTRA™	4522	D	160
1 mg por plásmido	4523	D	40
	4534	D	160
	4508	G	160
H5 + env + 2 VPH	4510	G	<20
IM solo	4511	G	<20
1 mg por plásmido	4512	G	<20
	4513	G	<20
	4529	H	<20
control negativo	4530	H	<20
	4531	H	<20
	4532	H	<20
	4533	H	<20
	H5 ref.		
	sueros		1600

Constructos de ADN

1	VIH Env Clado A	
2	VIH Env Clado C	
3	VIH Env Clado D	
4		Mordaza para el VIH
5		VIH Pol
6		Gripe H5
7		Gripe NA
8	Gripe M2 NP	

9	HPV 16 E6/E7					
10	HPV 16 E6/E7					
11		IL 12				
Grupos de estudio	Construcciones de ADN ADN	No de animales	Ruta de Admin IM	Dosis	ID total (mg)/AI	
A	1+2+3+4+5+11 ADN	5	CELLLECTRA™ ID	1 mg/Const	6	
B	1+2+3+4+5+11	5	CELLLECTRA™ IM	1 mg/Const	6	
C	ADN 6+9	5	CELLLECTRA™ ID	1 mg/Const	2	
D	ADN 6+9	5	CELLLECTRA™ IM	1 mg/Const	2	
E	ADN 7+8+10	5	CELLLECTRA™ ID	1 mg/Const	3	
F	ADN 7+8+10	5	CELLLECTRA™	1 mg/Const	3	
G	ADN 1+6+9+10	5	Jeringa IM	1 mg/Const	4	
H	Control negativo	5	N/A		0	
	Total	40				

En estos estudios se inmunizaron macacos Rhesus. Los animales fueron aclimatados durante 2 meses antes del inicio de los experimentos. El estudio avanzó del siguiente modo: Semana 0 - se realizó la 1^a inmunización (administración de dosis de plásmido) y hemorragia basal; Semana 2 se realizó hemorragia; Semana 3 se realizó la 2^a inmunización (administración de dosis de plásmido); Semana 5 se realizó hemorragia; Semana 6 se realizó la 3^a inmunización (administración de dosis de plásmido) y hemorragia; Semana 8 se realizó hemorragia.

Todos los plásmidos se formularon a 10 mg/mL en agua para inyección + 1% SLG, como se describe en ejemplos anteriores, más arriba, y se mezclaron en una única solución POR GRUPO(S) DE ESTUDIO (Grupos A-H, en la tabla anterior). Se calculó el volumen de inyección correcto para cada grupo designado IM CELLLECTRA™ ID CELLLECTRA™ e IM Jeringa. Para la administración ID, si el volumen de inyección requerido superaba los 100 µL por punto, la formulación se dividía en varios puntos de inyección (2, 3 ó 6 en función de cuántos mg totales de vacuna se administrarán). Los animales que recibieron la(s) inyección(es) IM recibieron toda la formulación en un solo sitio.

El dispositivo de corriente constante adaptativa CELLLECTRA™ utilizado en los experimentos con cerdos y en los experimentos no humanos descritos en los Ejemplos, anteriormente, también se utilizó en estos experimentos con primates no humanos. Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: Para los grupos de inyección IM y electroporación, las condiciones fueron: 0,5 amperios, 52 mseg/pulso, tres pulsos, 4 s de retardo entre la inyección del plásmido y la electroporación. Para los grupos ID inyección y electroporación, las condiciones fueron: 0,2 amperios, 52 mseg/pulso, tres pulsos, 4 s de retardo entre la inyección del plásmido y la electroporación.

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH) - los sueros de mono se trataron con enzima destructora de receptores (EDR) diluyendo una parte de suero con tres partes de enzima y se incubaron durante la noche en baño de agua a 37°C. La enzima se inactivó por medio de incubación de 30 minutos a 56°C seguida de la adición de seis partes de PBS para una dilución final de 1/10. Los ensayos de IH se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en V, mediante el uso de cuatro unidades HA de virus y un 1% de hematíes de caballo. Los datos aquí presentados son los resultados tras la segunda inmunización (hemorragia recogida antes de la tercera inmunización).

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de electroporación configurado para suministrar un pulso de energía a un tejido deseado de un mamífero para producir una corriente constante *in vivo* similar a una corriente preestablecida introducida por un usuario, que comprende:
 - 5 (i) un conjunto de mango que comprende:
un mango;
una matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5) con una pluralidad de electrodos (6.2.4) montados en una estructura de soporte en una disposición espacial; y
un controlador en comunicación con la matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5), que controla el suministro del impulso de energía a través de los electrodos (6.2.4); y
un mecanismo de retroalimentación; y
(ii) un sistema de envasado para el almacenamiento estéril de una pluralidad de conjuntos de electrodos (6.1.3, 6.2.5),
caracterizado en que:
la matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5) es desechable y está conectada de forma desmontable al conjunto de mango de manera que, cuando está conectada al conjunto de mango, los electrodos (6.2.4) reciben el impulso de energía del conjunto de mango y lo administran al tejido deseado;
al menos uno de la pluralidad de electrodos (6.2.4) está dispuesto para ser neutro durante la administración del pulso de energía y está dispuesto para medir la impedancia en el tejido deseado y comunicar dicha impedancia al mecanismo de retroalimentación durante la administración del pulso; y
el mecanismo de retroalimentación está configurado para recibir la impedancia medida y ajustar en respuesta el pulso de energía suministrado por el conjunto de mango para mantener la corriente constante.
 - 10 2. El sistema de electroporación de la reivindicación 1, en el que el conjunto de mango aloja un conector eléctrico de los electrodos (6.2.4) al controlador.
 - 15 3. El sistema de electroporación de cualquier reivindicación precedente, en el que el sistema de envasado es un recipiente de envasado plegable en forma de concha de almeja que permite la carga estéril del mango entre los individuos de tratamiento.
 - 20 4. El sistema de electroporación de la reivindicación 3, en el que el recipiente de envasado plegable en forma de concha de almeja comprende una tapa (9.1) y una base (9.2) que incluye pocillos individuales (9.3) diseñados para alojar conjuntos de electrodos (6.1.3, 6.2.5).
 - 25 5. El sistema de electroporación de la reivindicación 1, en el que la matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5) es una matriz de agujas (6.1.3, 6.2.5) que comprende electrodos de piel de aguja (6.2.4), y los electrodos individuales (6.2.4) en la matriz de agujas (6.1.3, 6.2.5) en el lado del mango de la estructura de soporte son de punta roma y desbarbados para su inserción en accesorios de contacto eléctrico complementarios (7.1) en el mango.
 - 30 6. El sistema de electroporación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mango comprende soportes a presión para la conexión con cada matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5), lo que permite un cambio rápido y estéril de las guías de electrodos (6.1.3, 6.2.5) entre los individuos tratados.
 - 35 7. El sistema de electroporación de cualquier reivindicación anterior, en el que la matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5) es circular.
 - 40 8. El sistema de electroporación de la reivindicación 7, en el que la matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5) comprende tres electrodos cutáneos de aguja (6.2.4) colocados en una formación isósceles, con los lados grandes de 5 mm y la base pequeña de 3 mm.
 - 45 9. El sistema de electroporación de la reivindicación 1, en el que los electrodos están adaptados para entrar en contacto con el tejido deseado, y el tejido deseado es tejido subcutáneo o tejido intradérmico.
 10. El sistema de electroporación de la reivindicación 9, en el que los electrodos (6.2.4) son electrodos de aguja (6.2.4).
 11. El sistema de electroporación de la reivindicación 10, en el que los electrodos de aguja (6.2.4) están adaptados para entrar en contacto con un tejido intradérmico o subcutáneo sin penetrar en un tejido muscular.
 12. El sistema de electroporación de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la matriz de electrodos (6.1.3, 6.2.5) comprende al menos tres electrodos (6.2.4).
 - 50 13. El sistema de electroporación de la reivindicación 12, en el que los tres electrodos (6.2.4) tienen una disposición espacial que es un triángulo, opcionalmente en el que el triángulo es un triángulo isósceles.

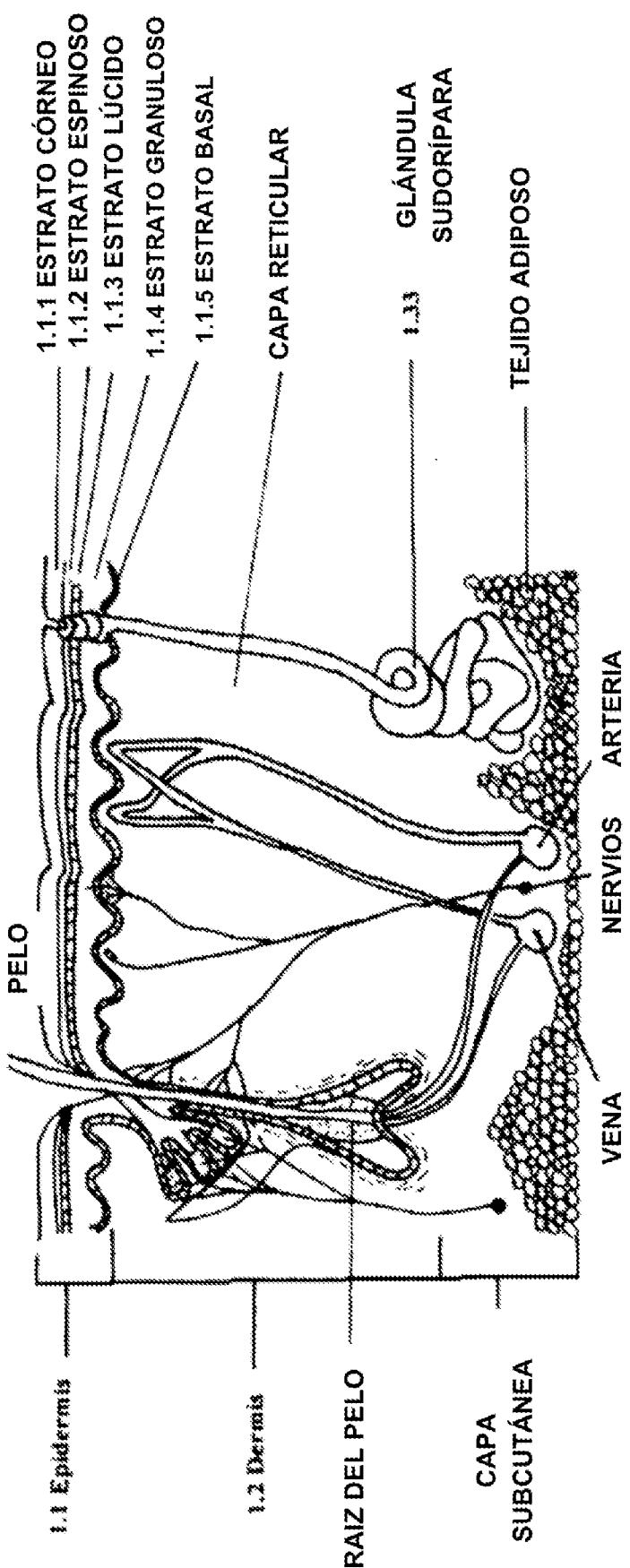
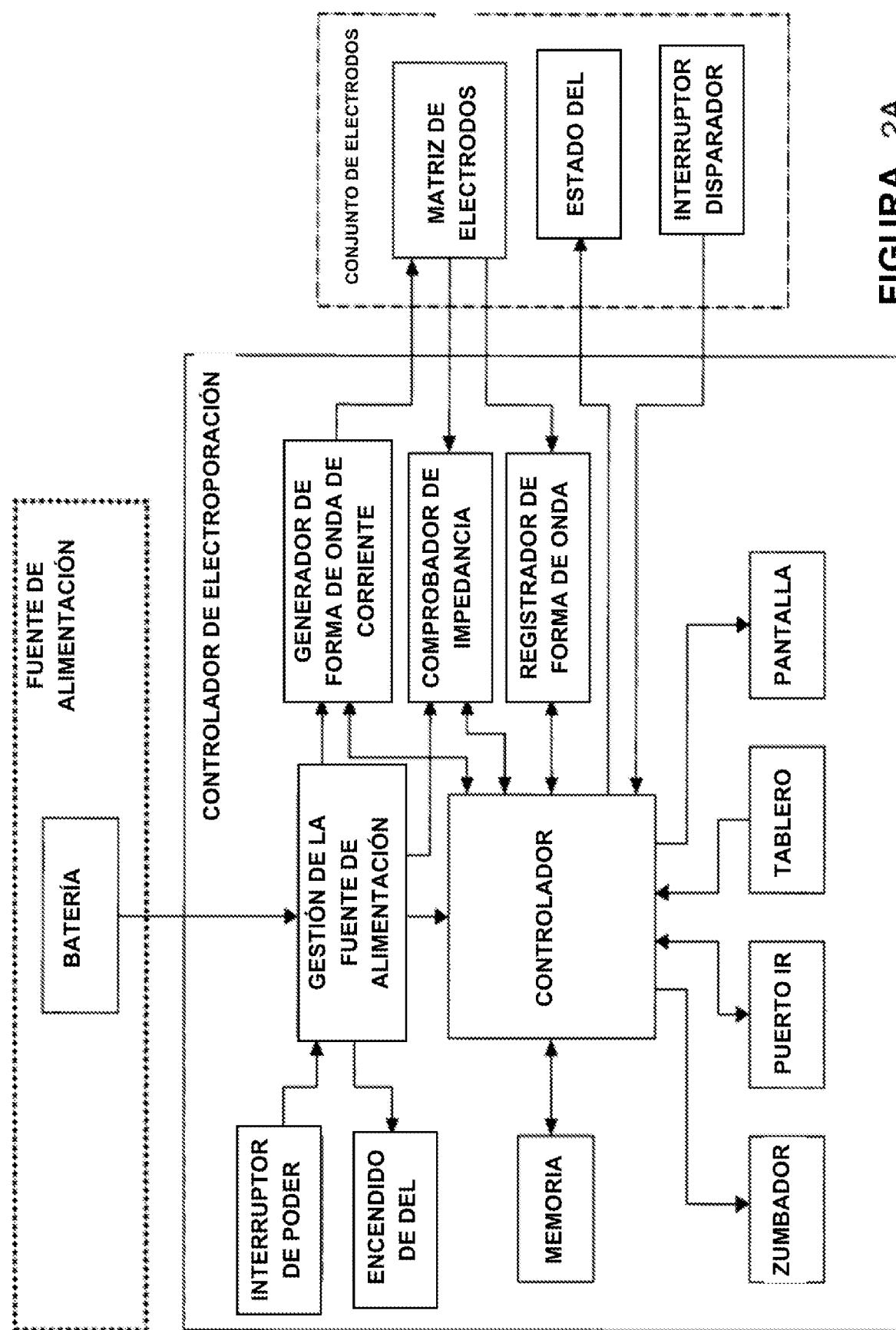


FIGURA 1

**FIGURA 2A**

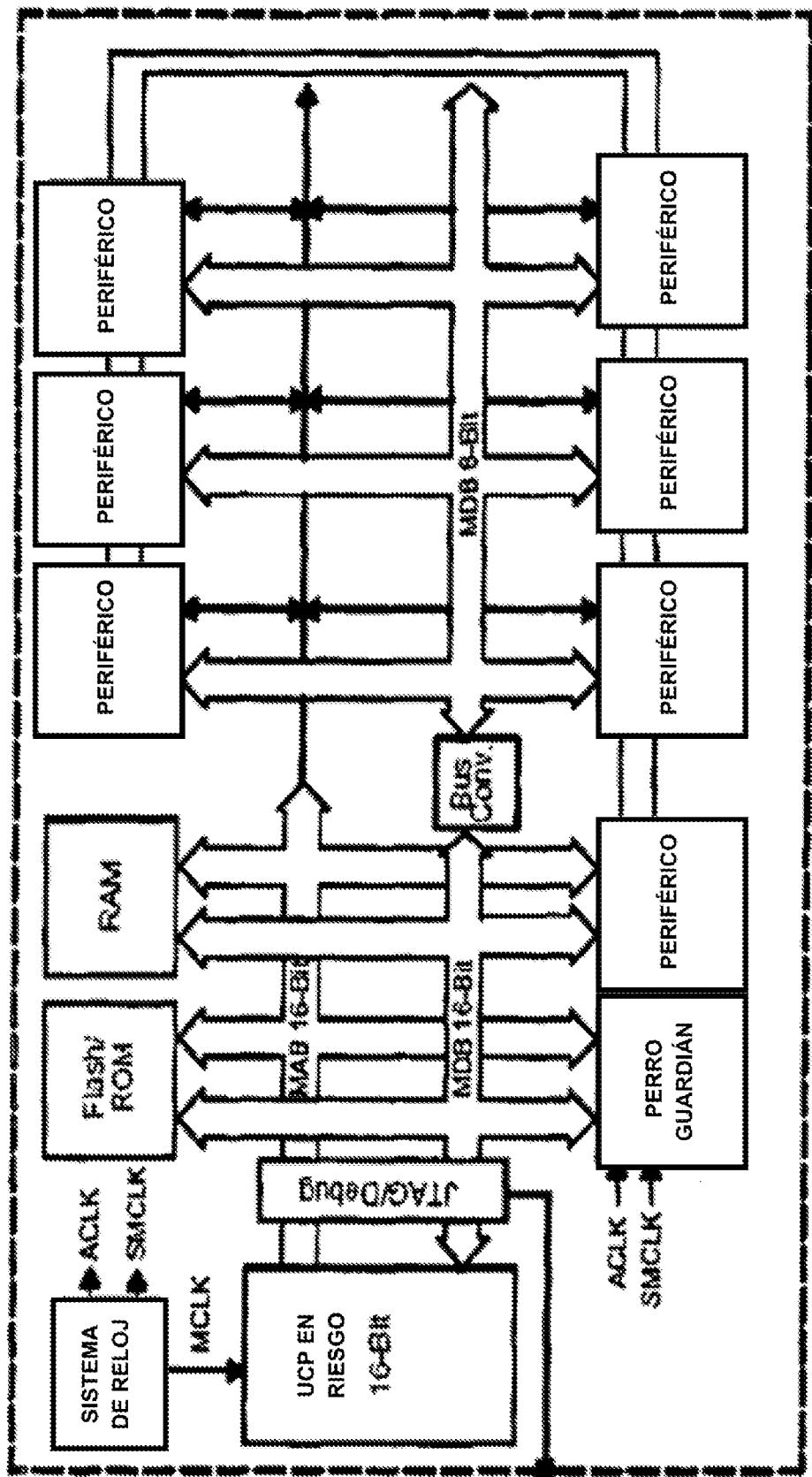


FIGURA 2B

2.1	Nombre del archivo:	06032210_06_06_26_15_26_43.CVS		
2.2	Número del animal:	32210		
2.3	Pulso en la secuencia:	1	2	
	Pre-espresa (s):	4	1	
	Amplitud de pulso (ms):	52	52	
	Corriente de pulso (A):	0.1	0.1	
2.4	Electrodo 1:	POS	OFF	
	Electrodo 2:	NEG	POS	
	Electrodo 3:	NEG	NEG	
2.5		Voltaje (V)	Corriente (A)	Voltaje (V)
		4.54	0	3.37
		4.49	0	3.42
		4.59	0	3.42
		154.08	0.1	143.63
		157.0	0.1	172.35
		159.84	0.1	192.23
		161.06	0.1	197.36
		161.85	0.03	197.7
		160.82	0.1	197.51
		159.98	0.09	197.61
		159.01	0.1	197.36
		157.88	0.1	197.61
		156.86	0.1	196.09
		156.23	0.1	194.43
		155.01	0.09	191.45
		154.57	0.1	187.35
2.6			Voltaje (V)	Corriente (A)
			21[Ohms]	22[Ohms]
			0	0
			3.42	0
			0	0
			1540.8459	1435.1583
			1575.8424	1723.2277
			1538.2402	2135.6316
			1619.4336	1973.4627
			1795.9116	1976.3623
			1638.0392	2194.3117
			1777.4692	2195.4227
			1829.941	1973.4627
			1575.7423	2195.4227
			1568.4432	1960.7039
			1562.1438	1944.0556
			1772.142	1914.3086
			1545.5454	1873.3127

FIGURA 2C

PULSO 1

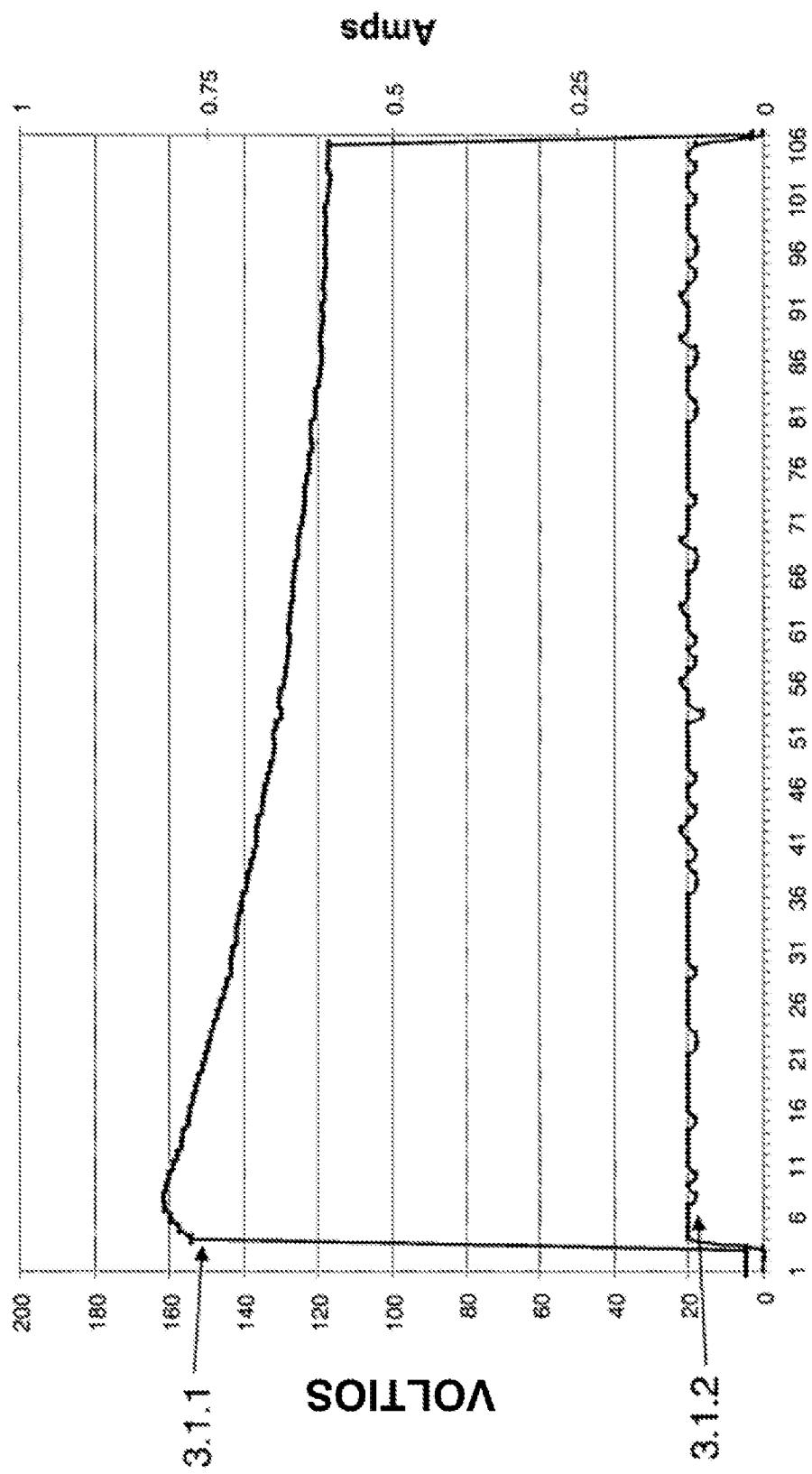


FIGURA 3.1

PULSO 2

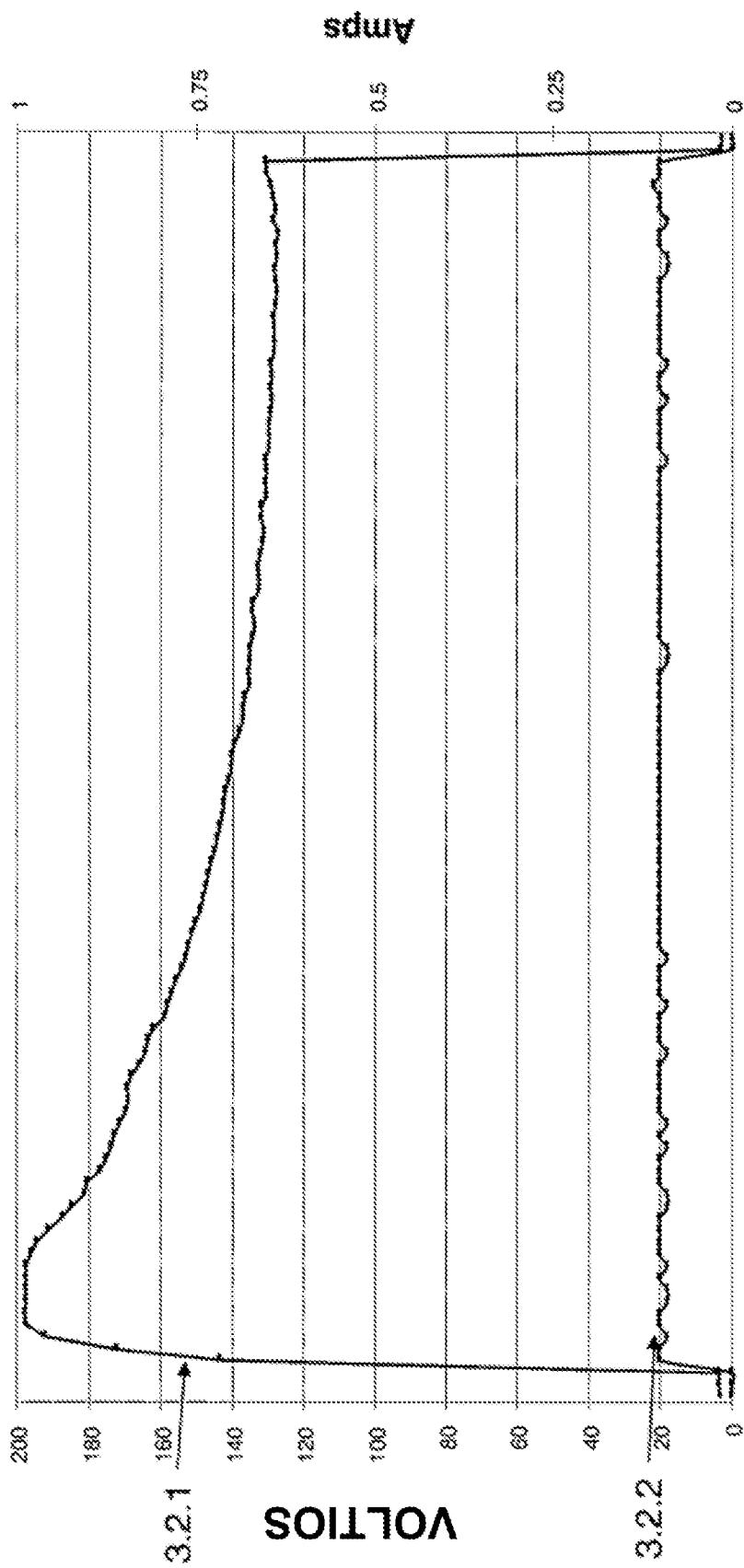


FIGURA 3.2

ES 2 993 941 T3

PULSO 1 Z

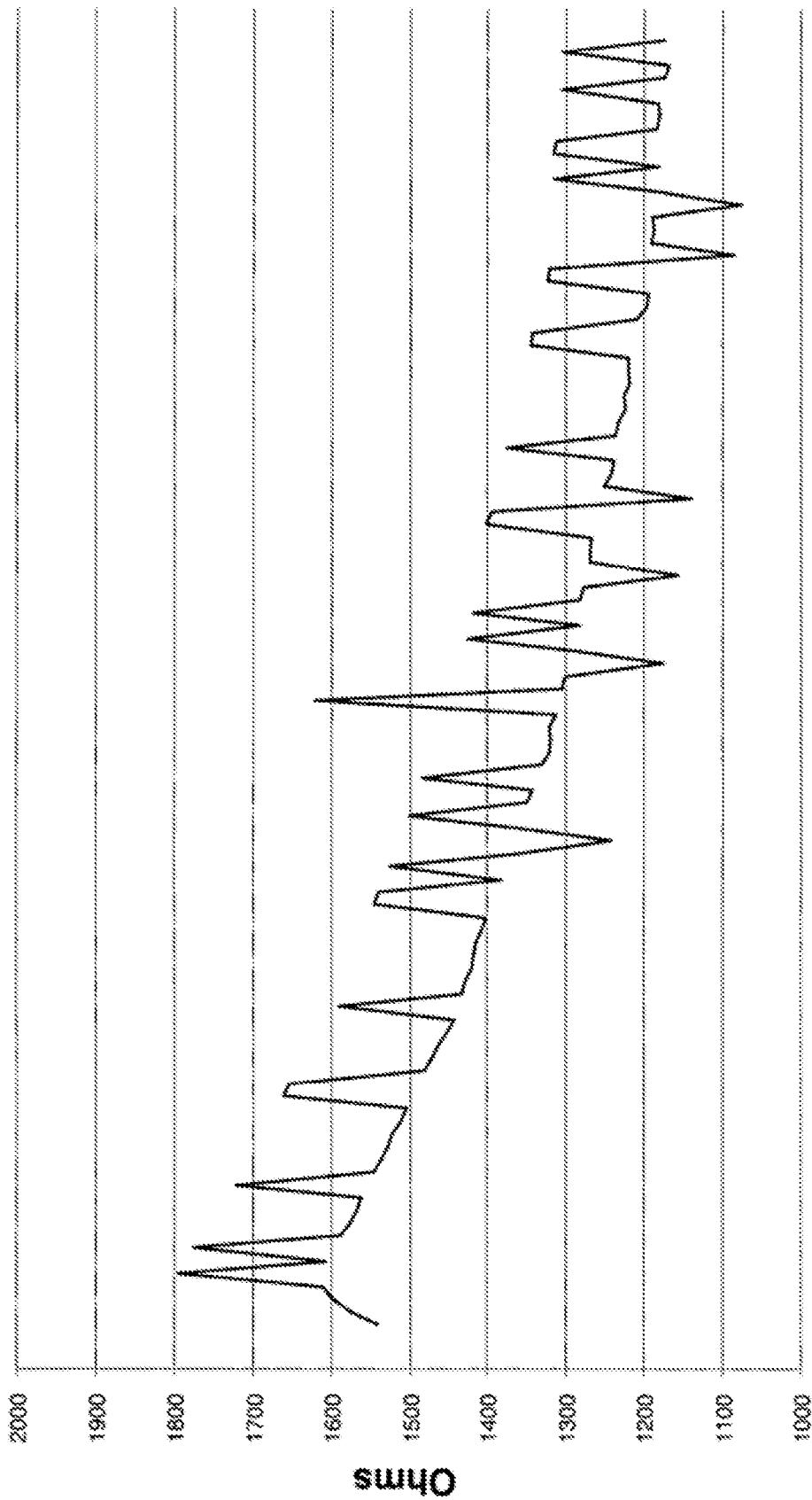


FIGURA 3.3

PULSO 2 Z

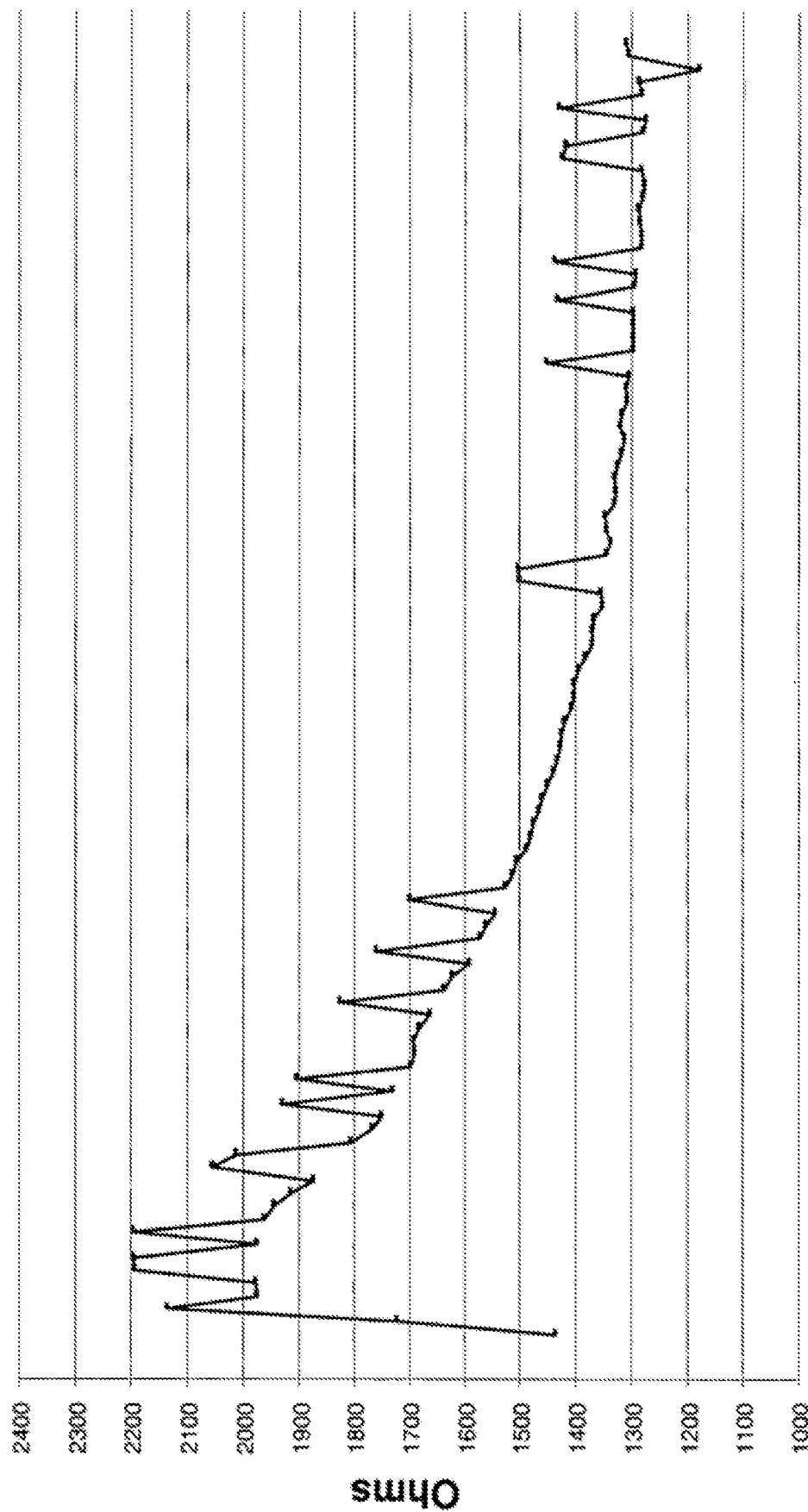


FIGURA 3.4

PULSO 1

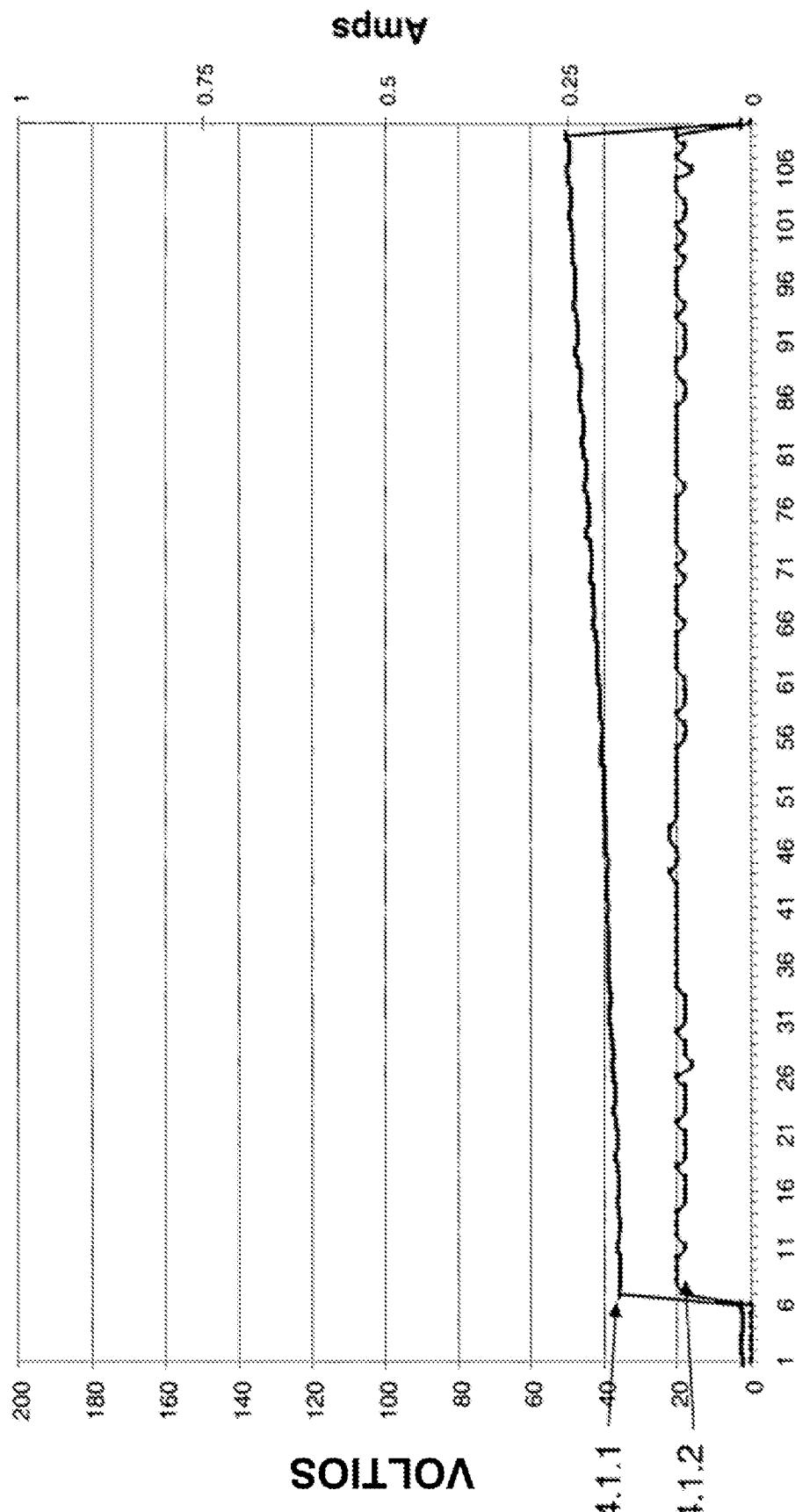


FIGURA 4.1

PULSO 2

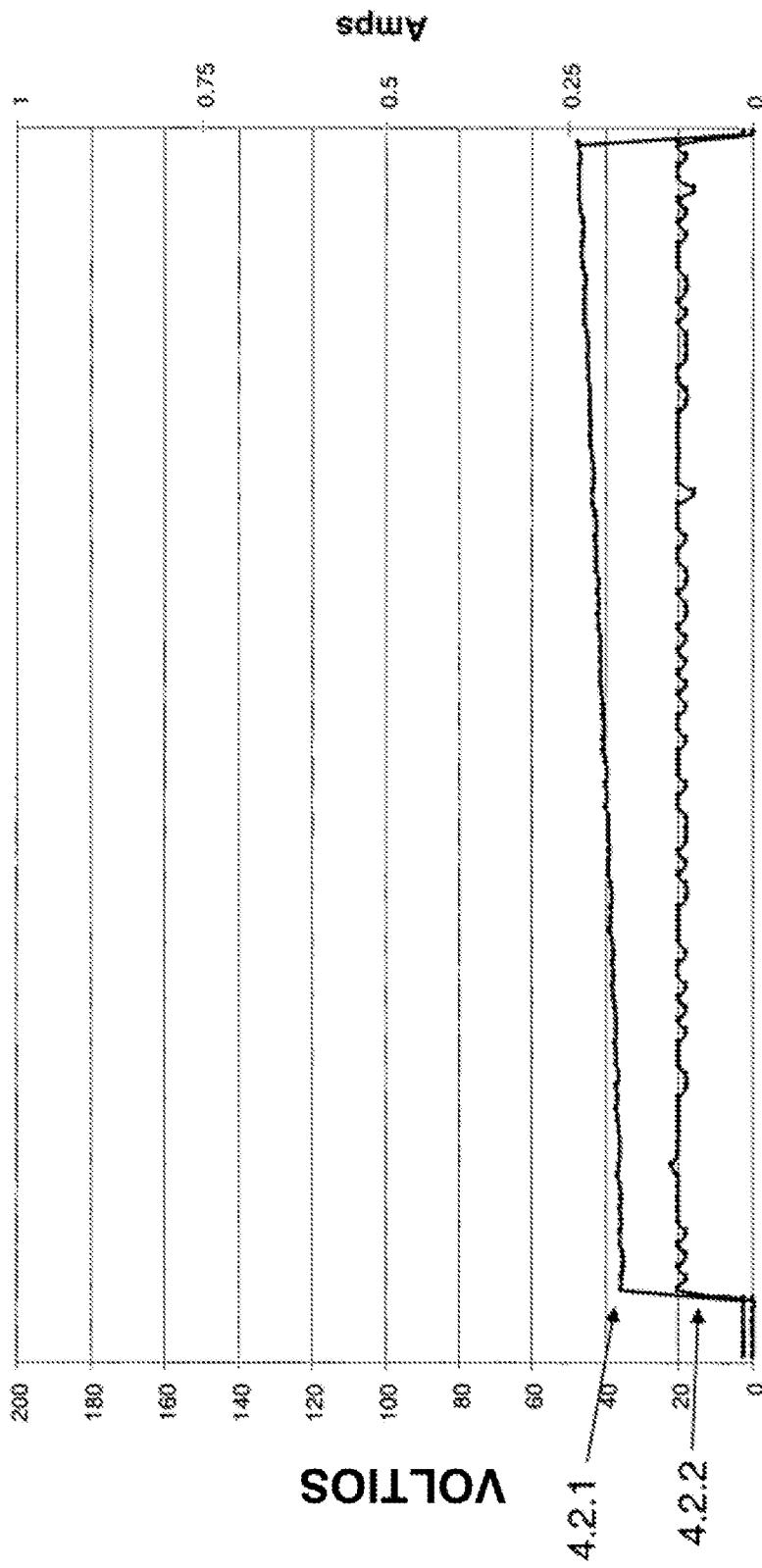


FIGURA 4.2

PULSO 3

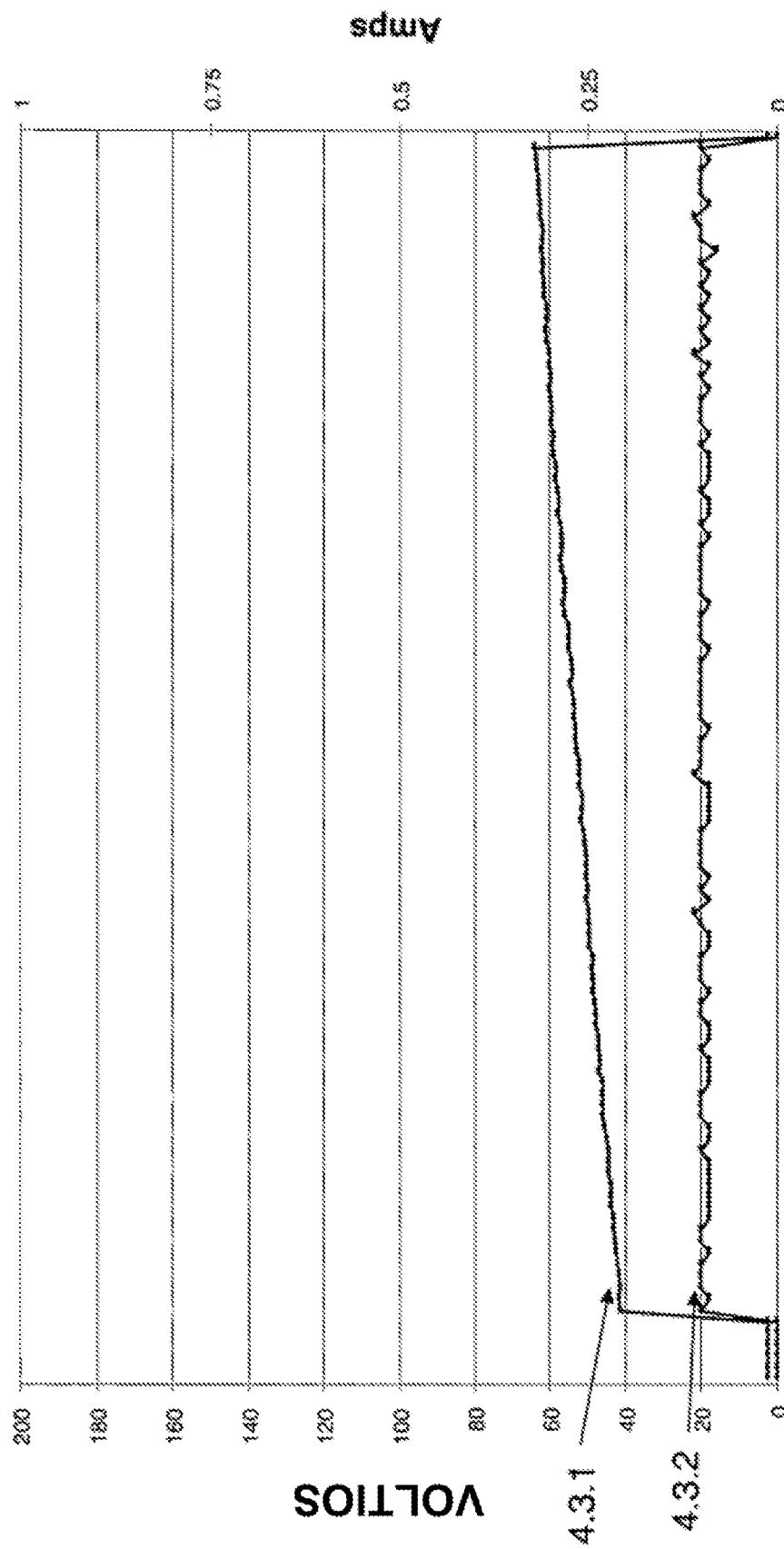


FIGURA 4.3

PULSO 1 Z

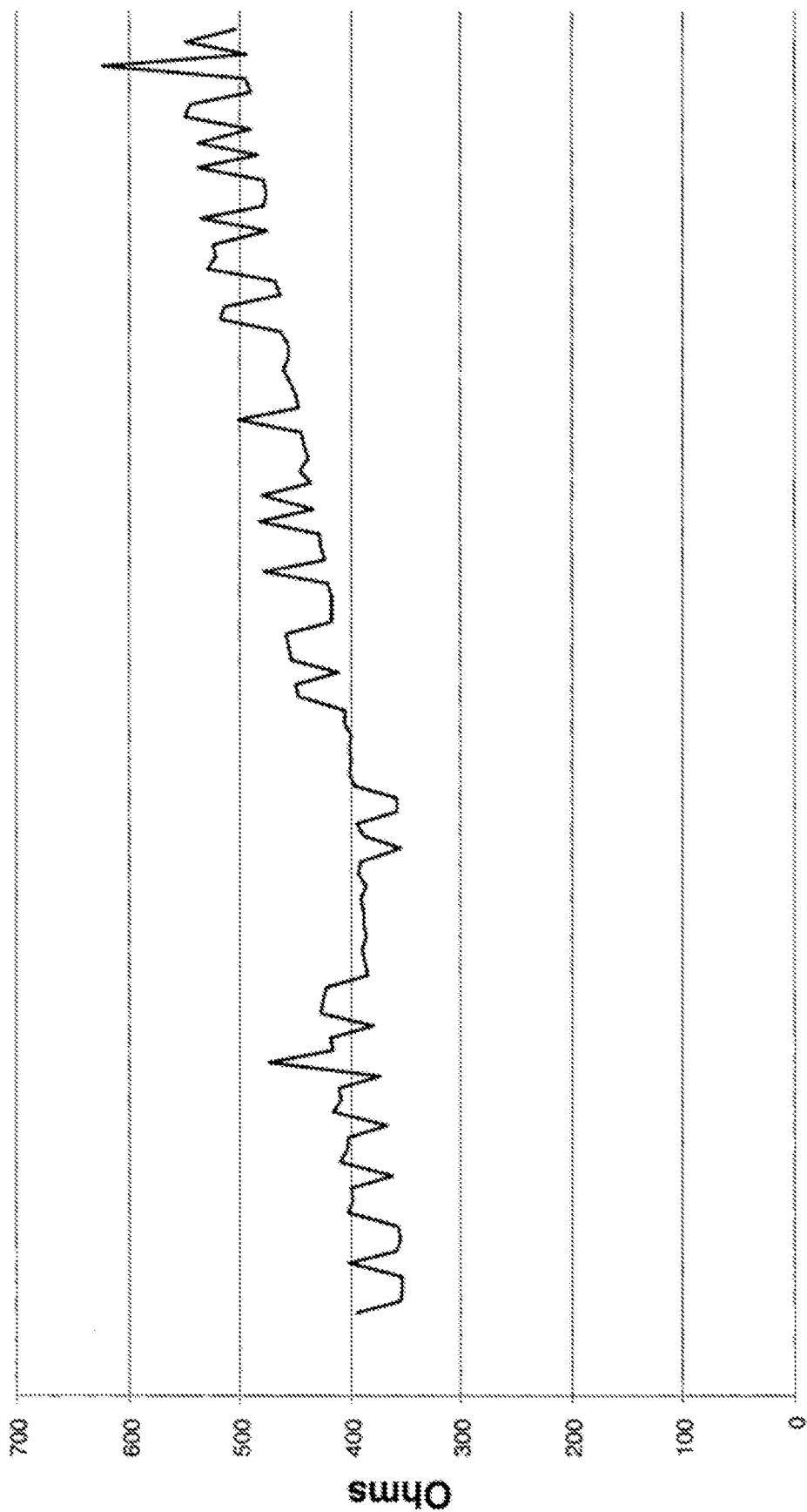


FIGURA 4.4

PULSO 2 Z

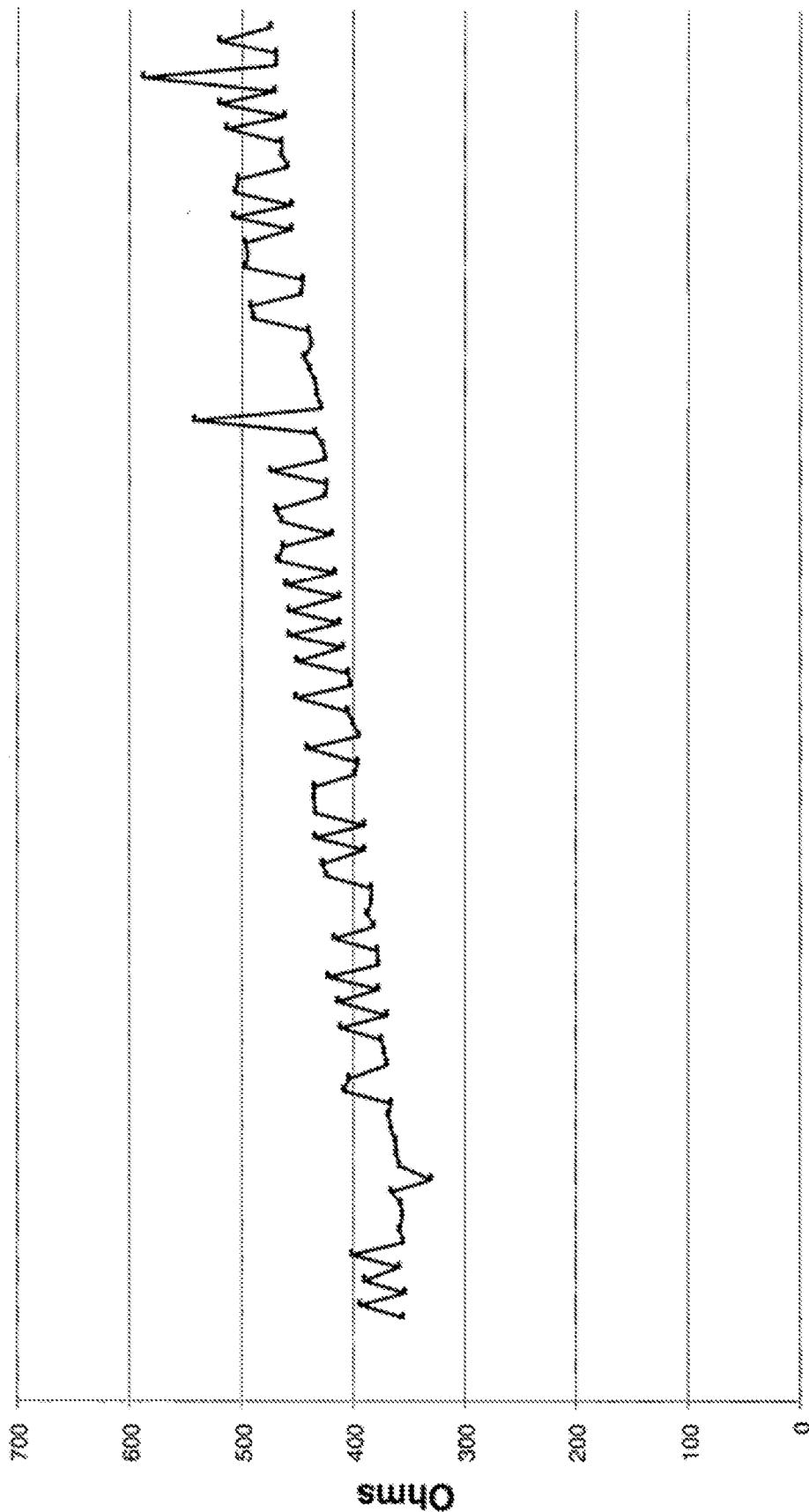


FIGURA 4.5

PULSO 3 Z

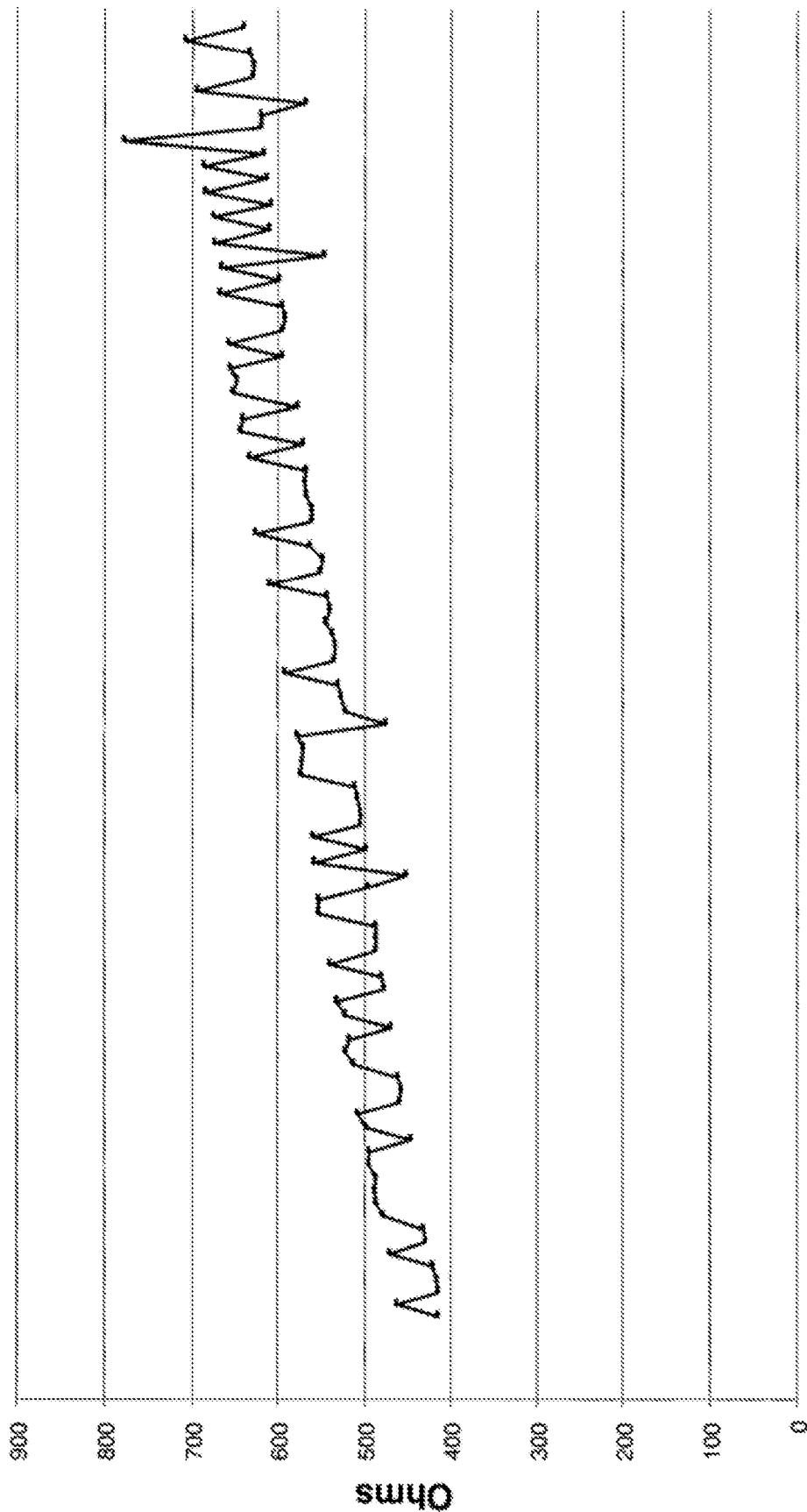
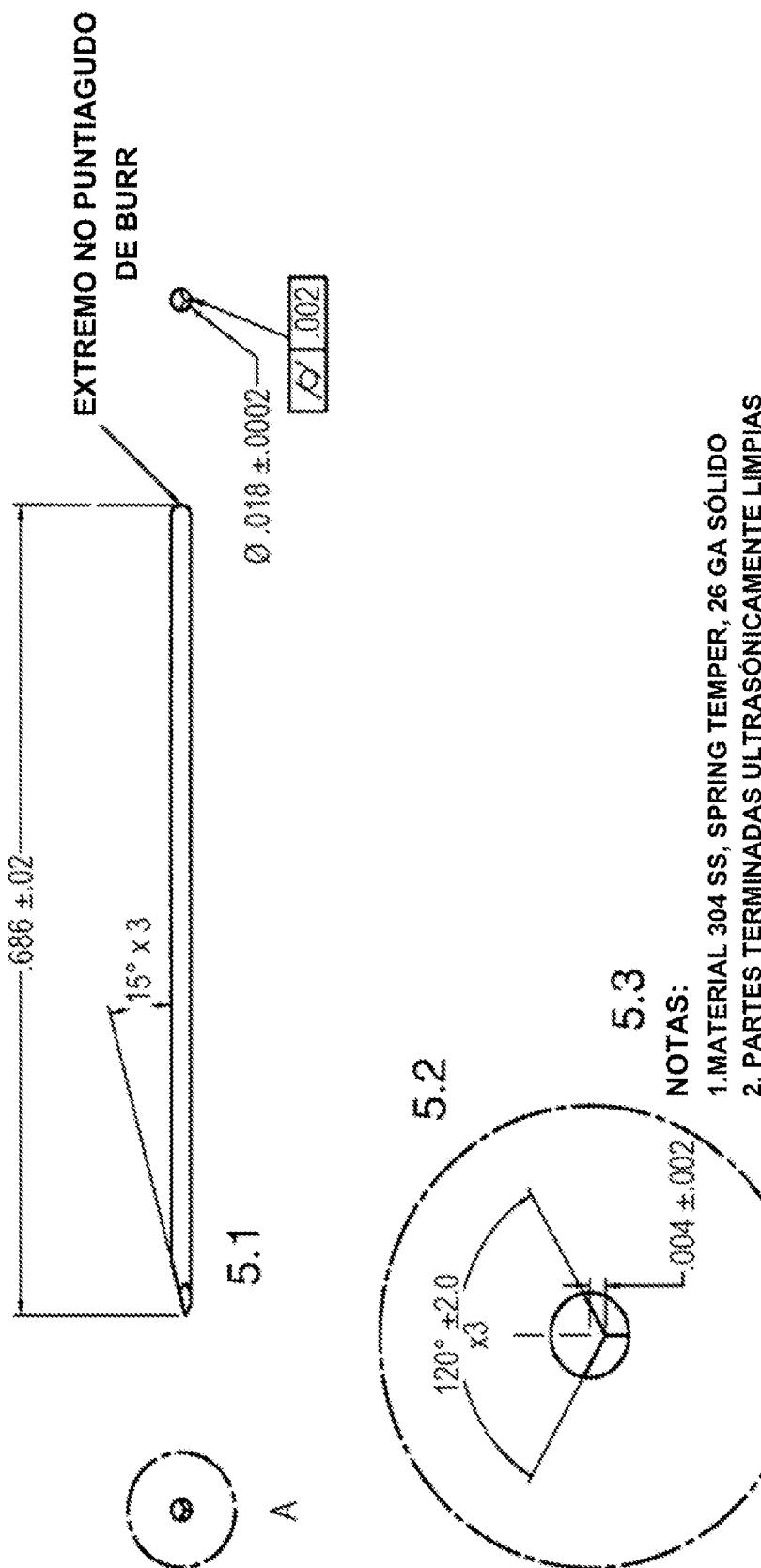


FIGURA 4.6

**FIGURA 5**

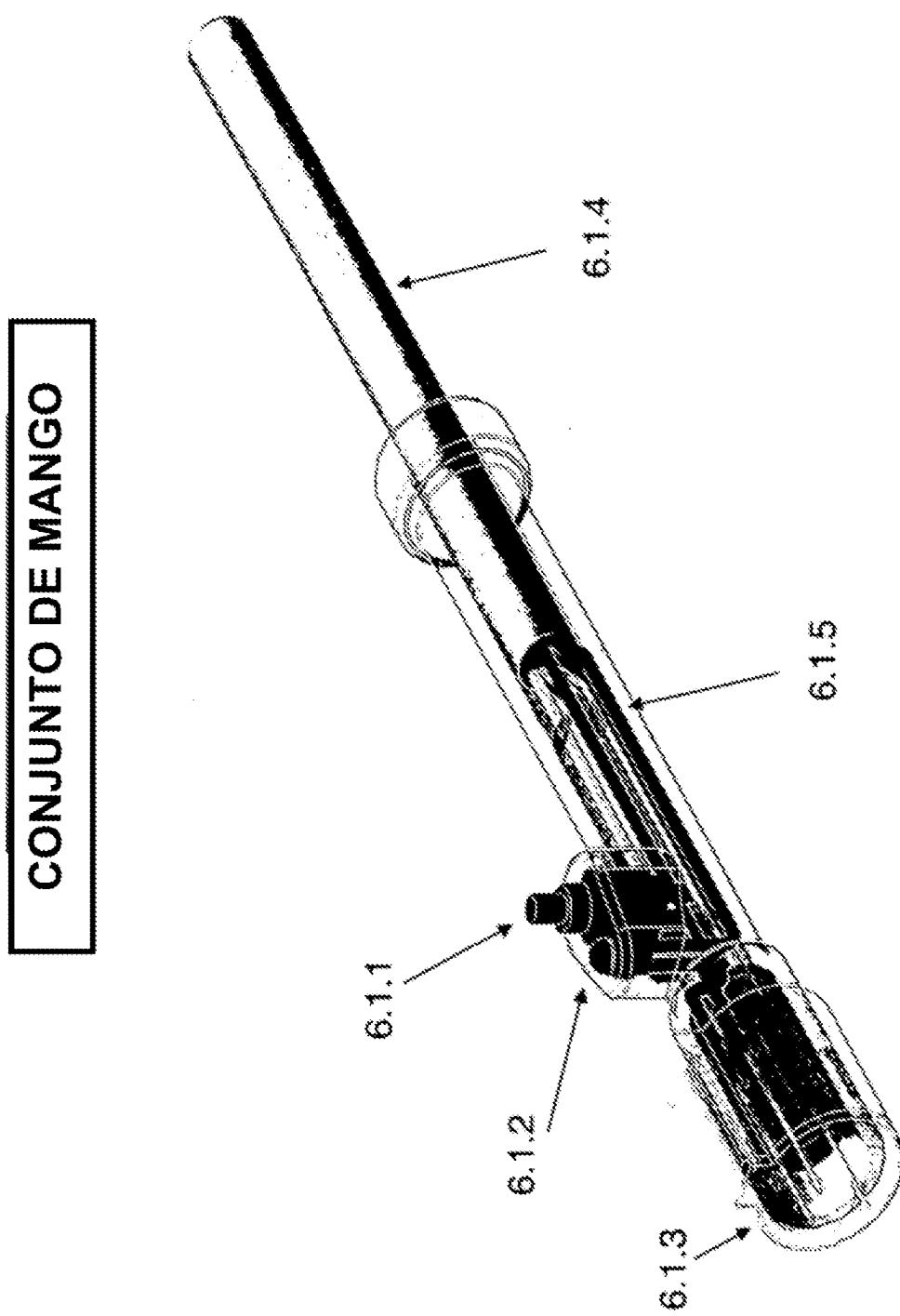


FIGURA 6.1

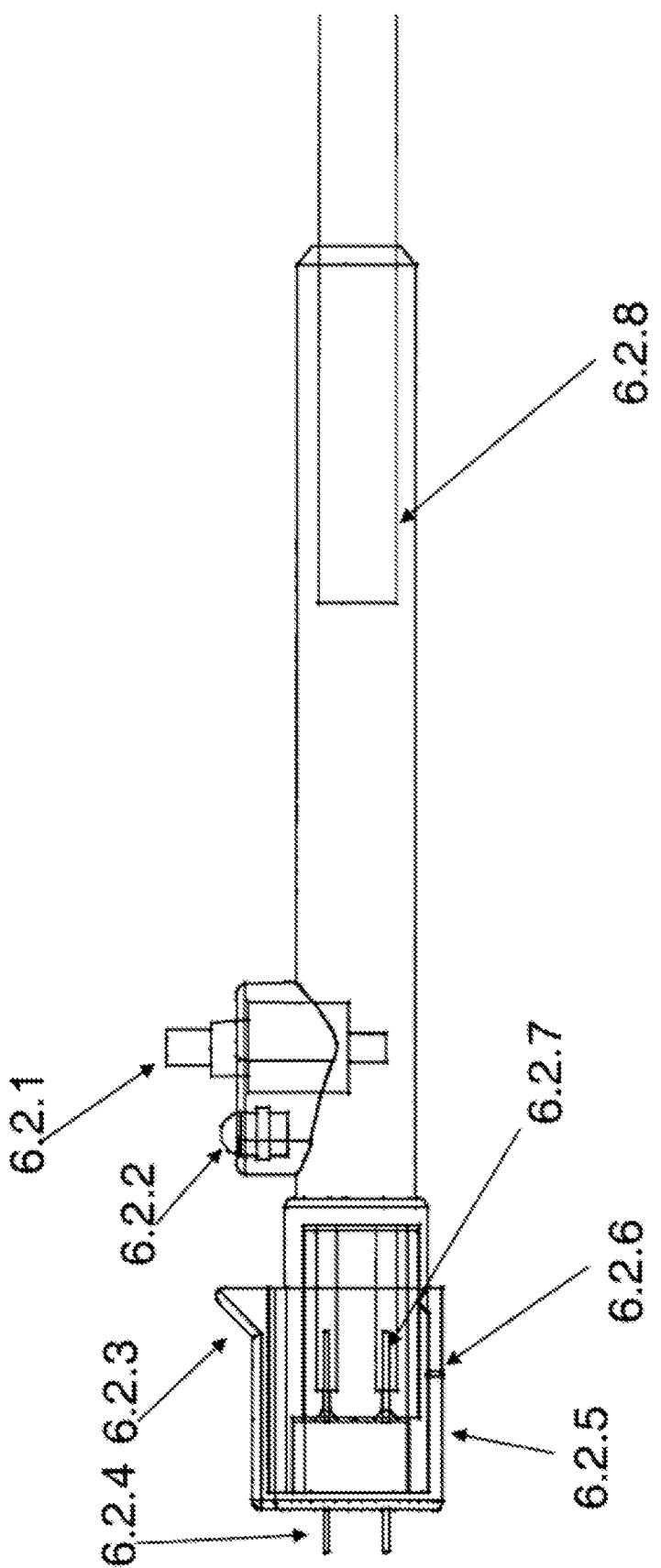


FIGURA 6.2

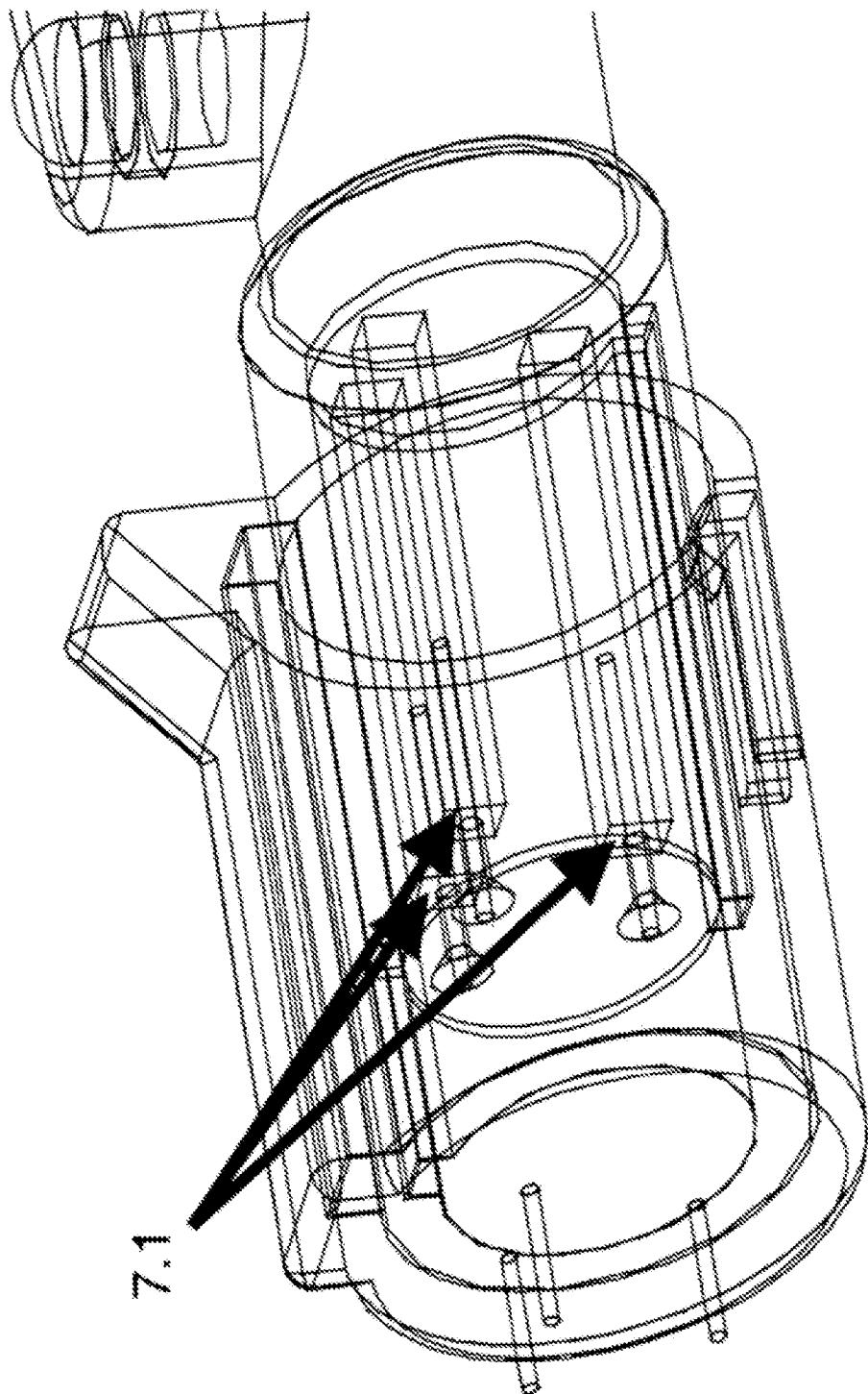
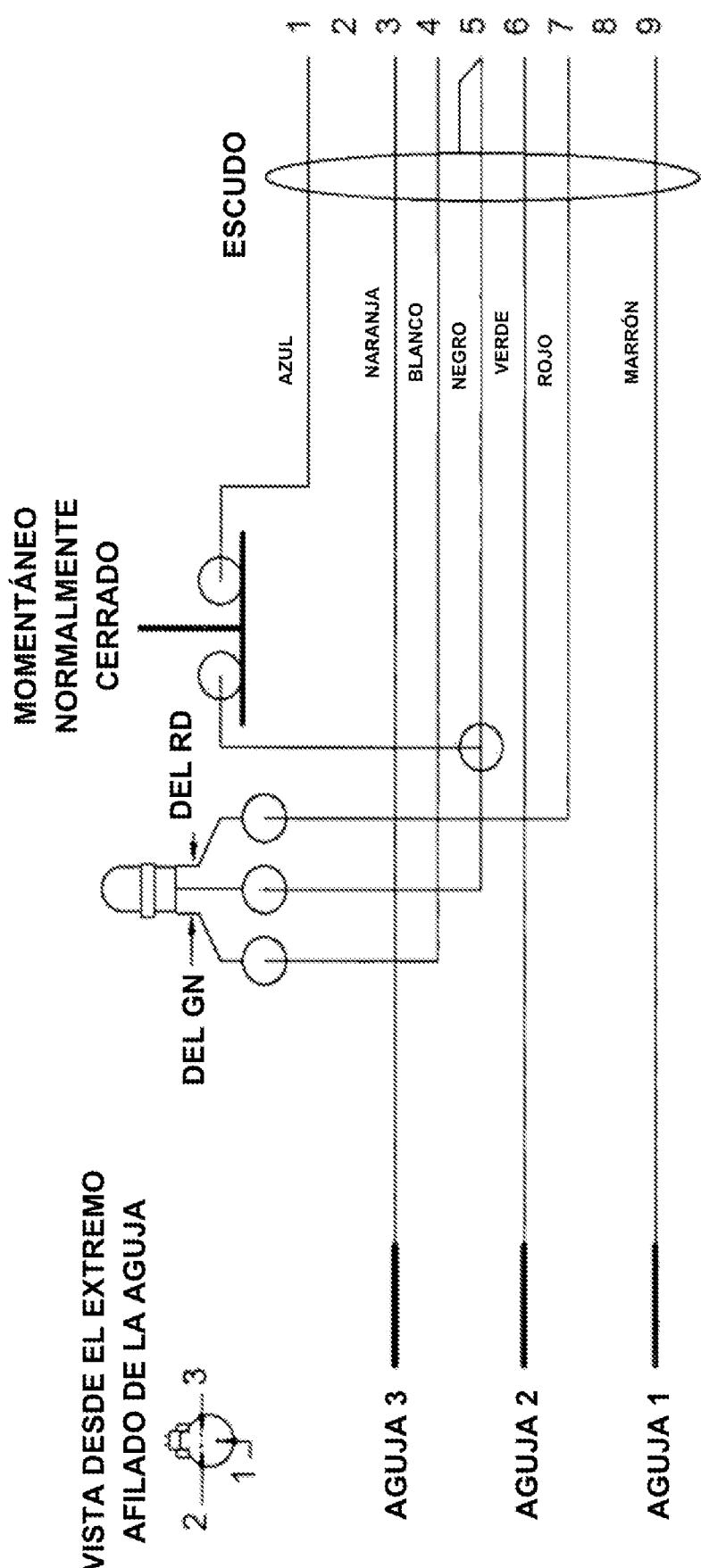


FIGURA 7

**FIGURA 8**

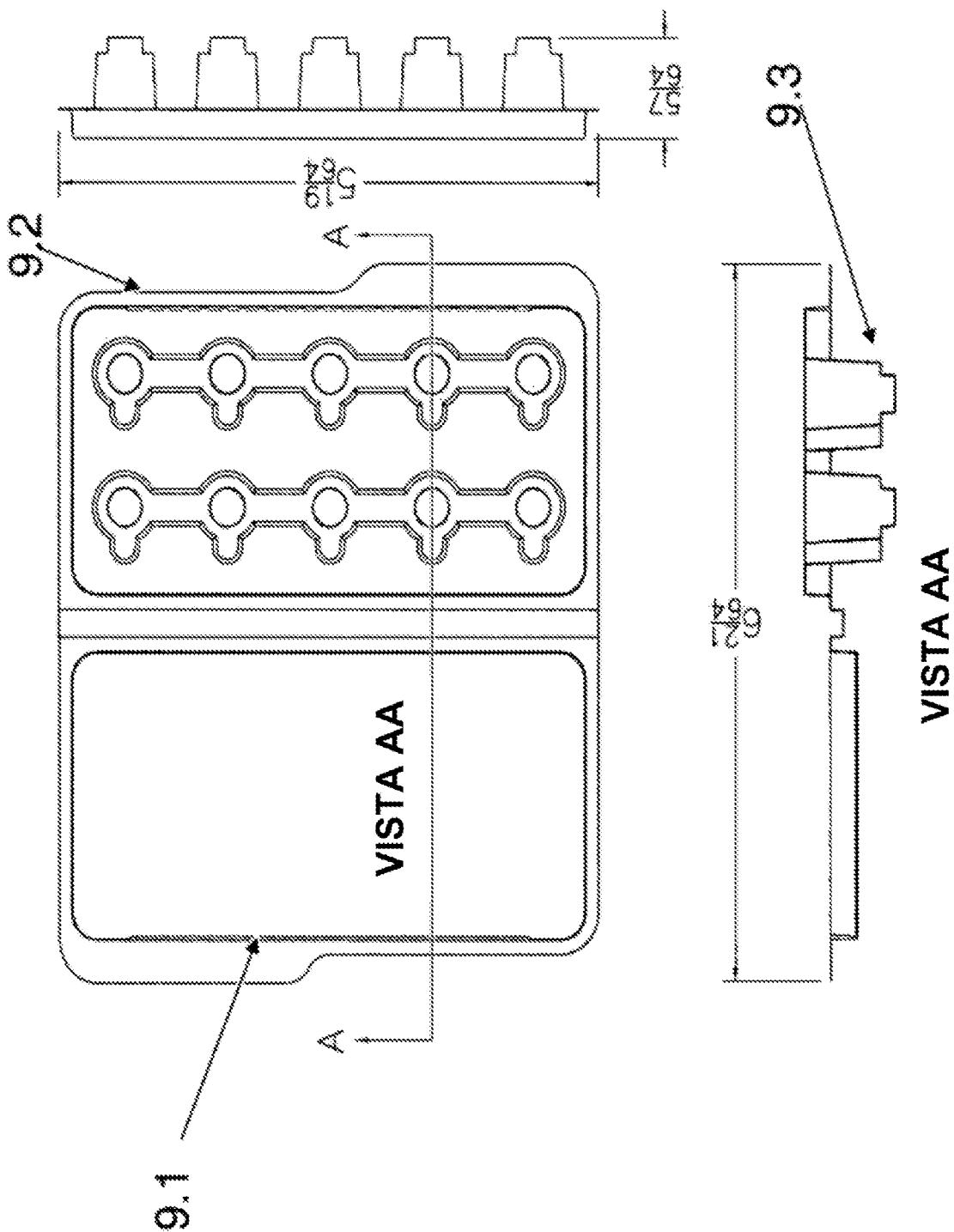


FIGURA 9

DOSIS (μg)	VOLUMEN (μL)	CORRIENTE	RETARDO	MANGO	PULSO	PUNTUACIÓN	SE MEDIA
50	50	0,2A	4	MC	20ms	5,00	0,00
100	100	0,2A	80	MG	20ms	5,00	0,00
100	100	0,2A	4	MG	20ms	4,33	0,24
200	100	0,1A	4	MG	52ms	4,17	0,17
100	100	0,1A	4	MG	20ms	4,00	0,00
200	100	0,4A	80	MG	52ms	3,67	0,33
100	50	0,2A	4	MG	52ms	3,33	0,33
50	50	0,2A	4	MC	52ms	3,00	0,00
100	100	0,1A	80	MG	52ms	2,83	0,17
200	100	0,4A	80	MG	20ms	2,83	0,17
50	50	0,2A	80	MC	20ms	2,67	0,17
100	200	0,1A	80	MG	20ms	2,33	0,33
200	100	0,6A	80	MG	52ms	2,17	0,17
100	50	0,1A	80	MC	52ms	2,00	0,00
50	50	0,6A	80	MC	20ms	2,00	0,00
50	50	0,2A	80	MG	20ms	2,00	0,00
100	200	0,2A	80	MG	20ms	2,00	0,00
100	100	0,1A	4	MG	20ms	2,00	0,00
200	100	0,1A	4	MG	20ms	2,00	0,00
200	100	0,2A	4	MG	52ms	2,00	0,00

FIGURA 10

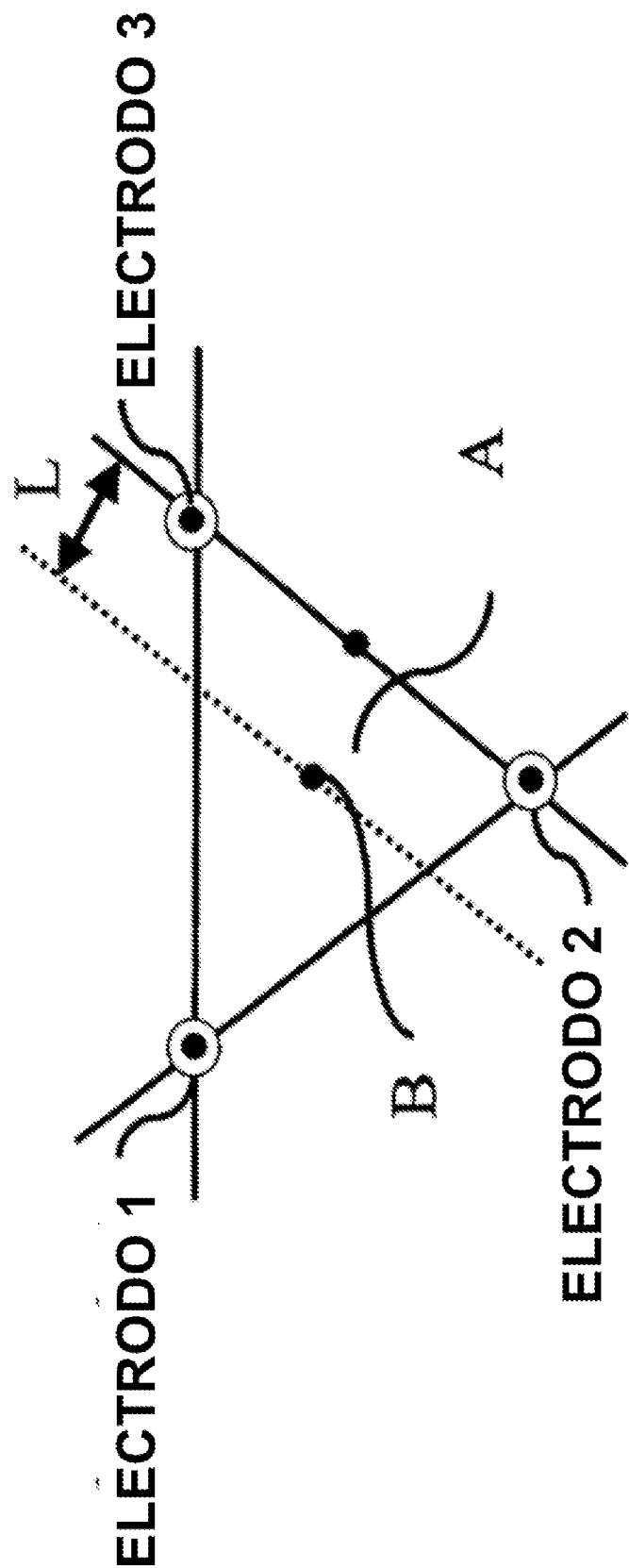


FIGURA 11

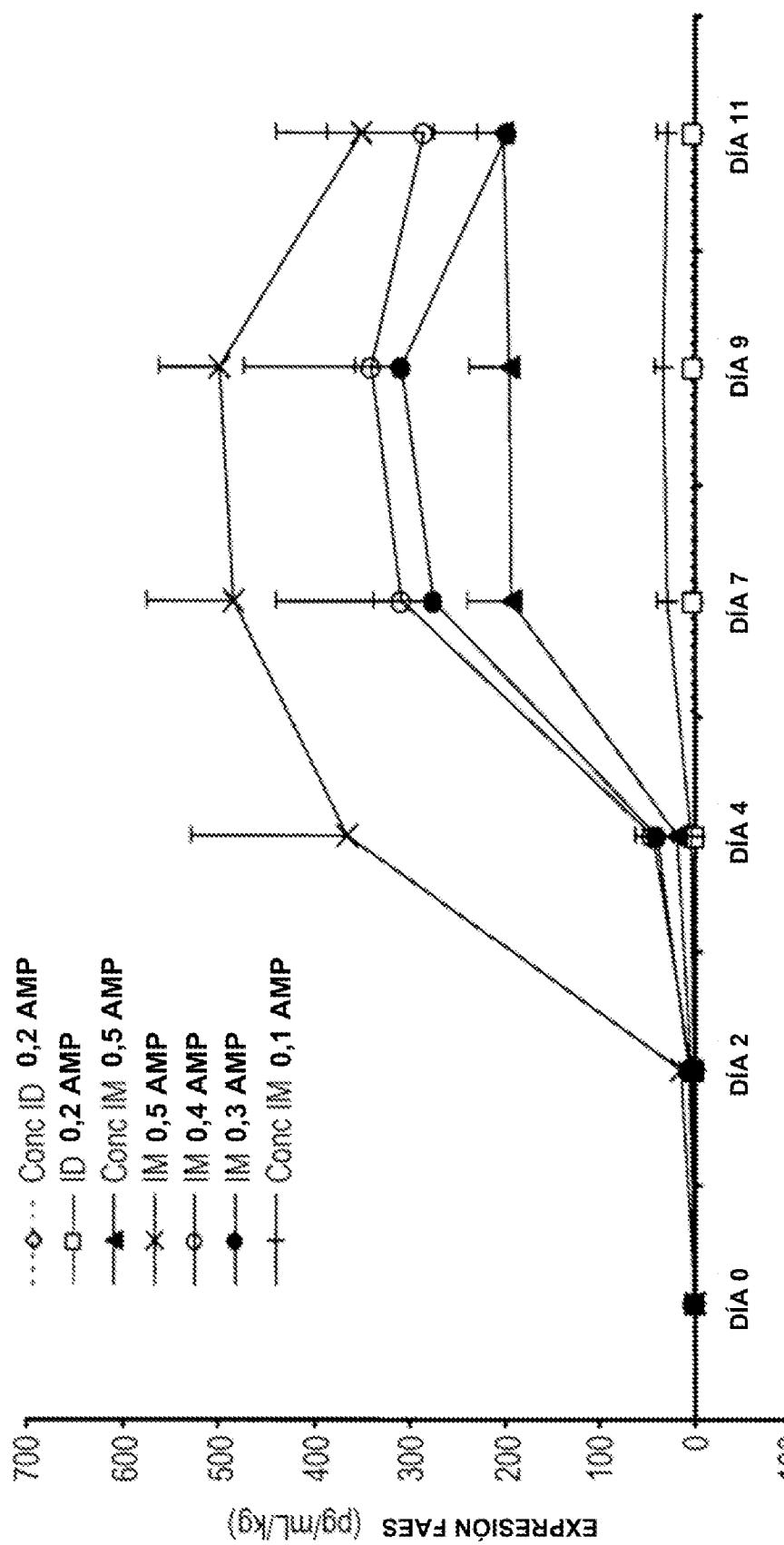
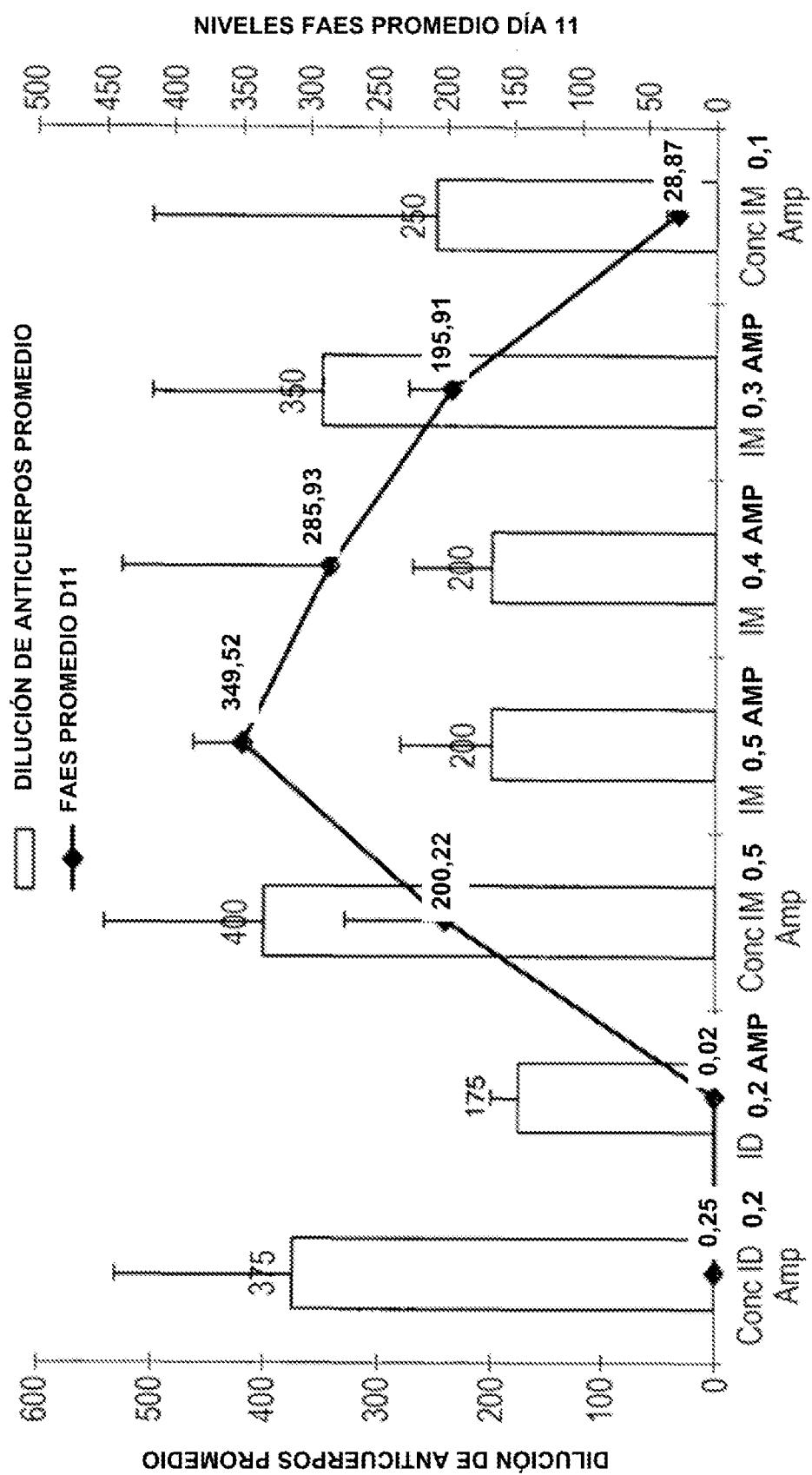


FIGURA 12

**FIGURA 13**

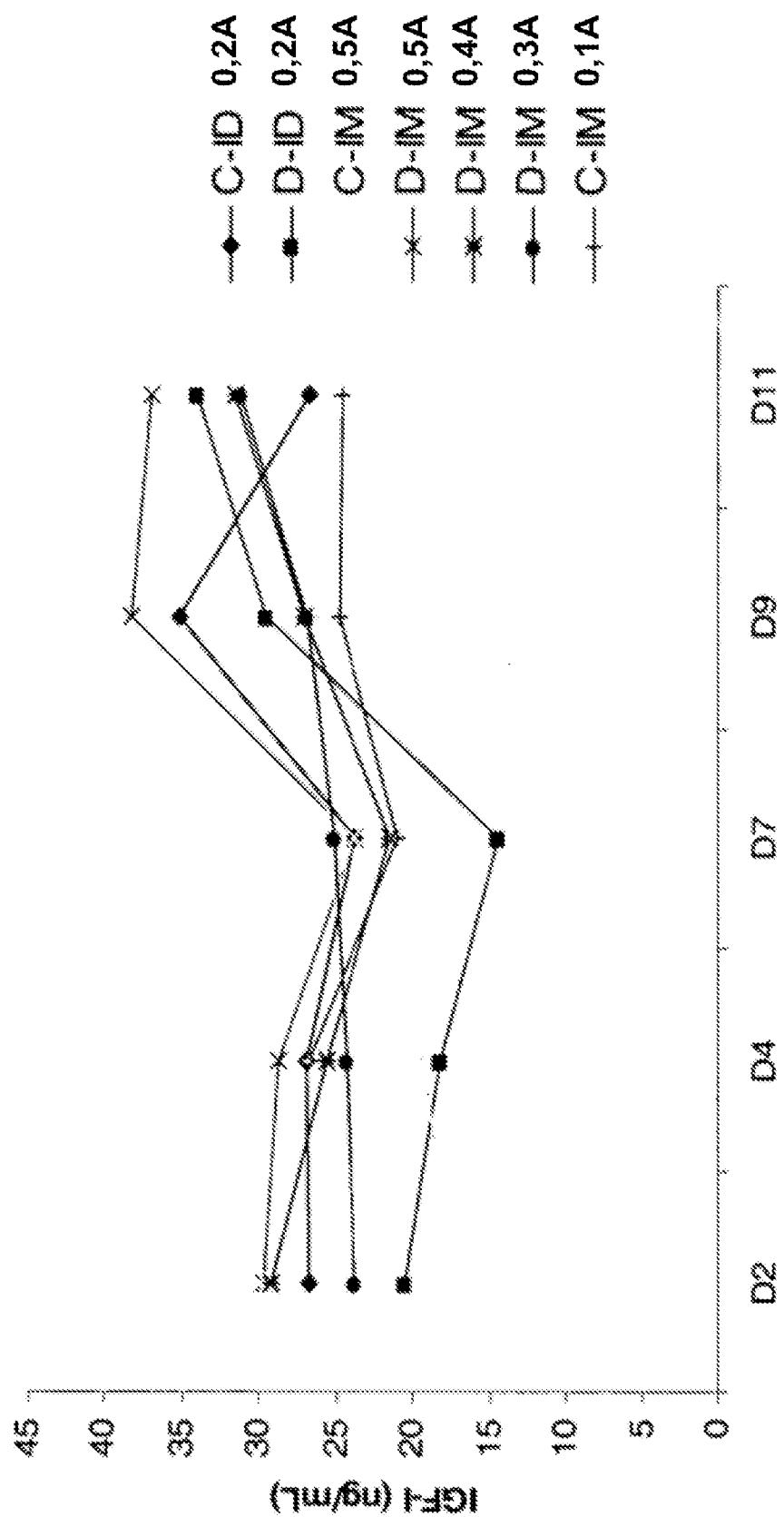
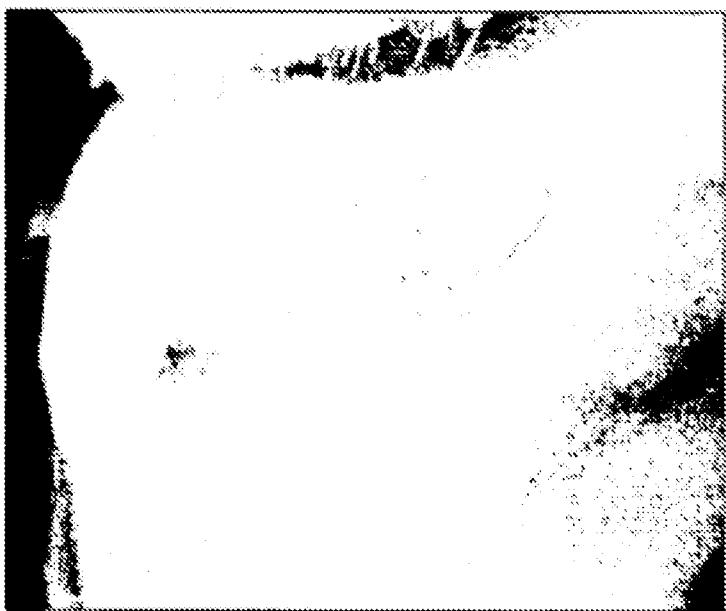


FIGURA 14

FIGURA 15

50 μ g/50 μ L, EP CUTÁNEA



100 μ g/100 μ L, EP IM



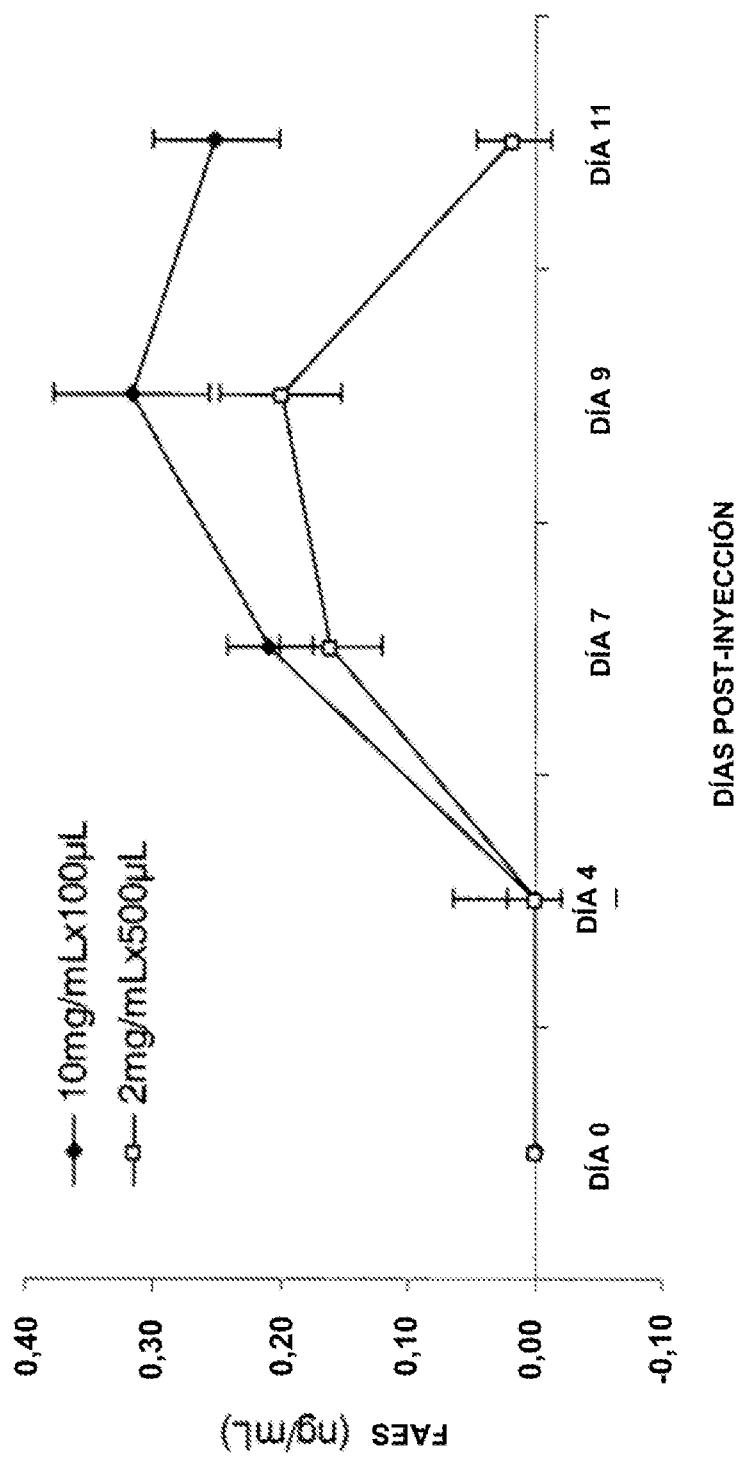
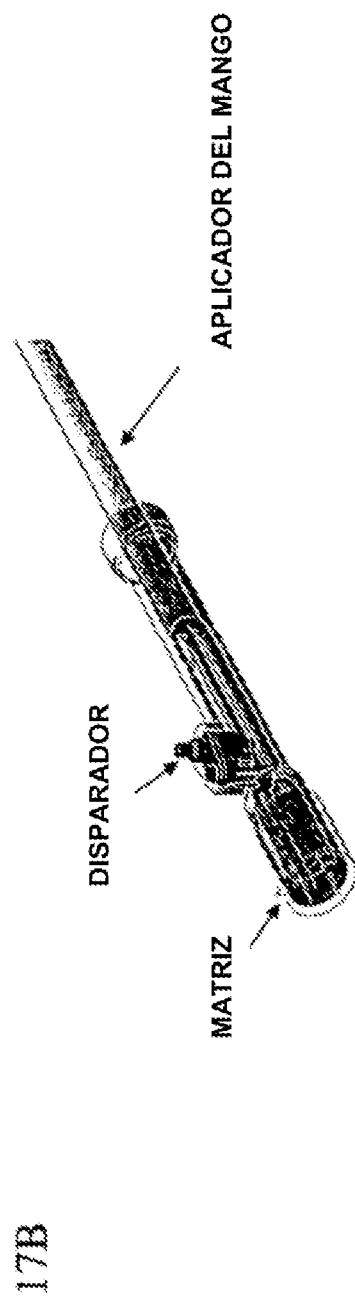
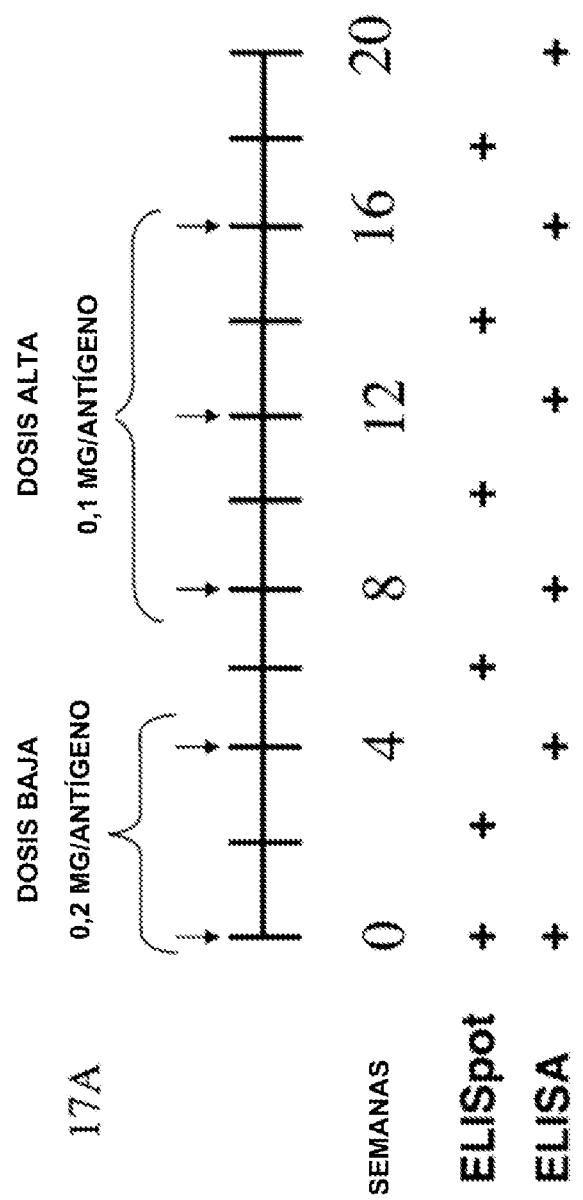


FIGURA 16

**FIGURA 17**

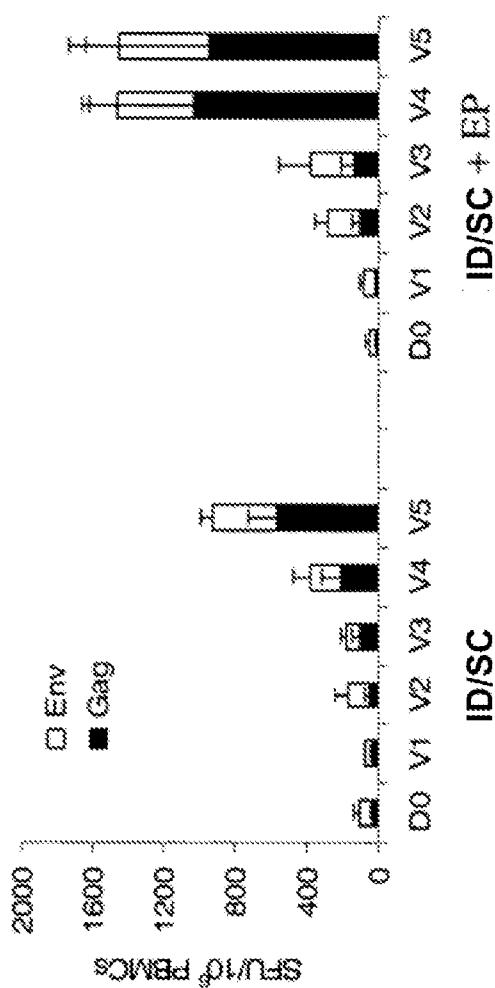


FIGURA 18

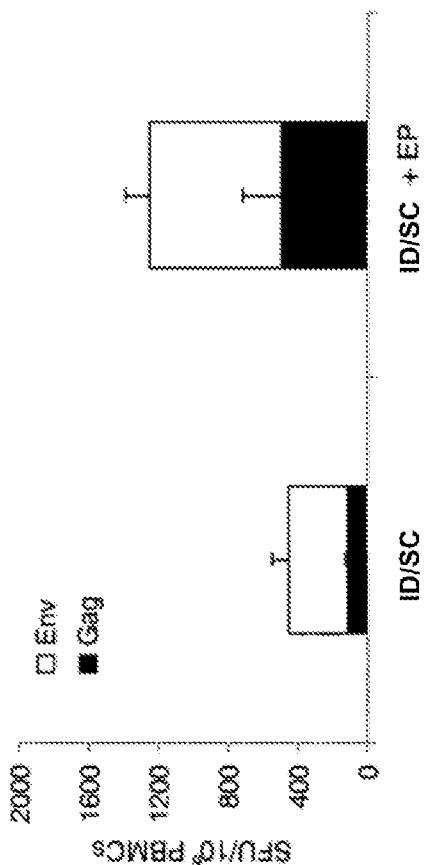


FIGURA 19

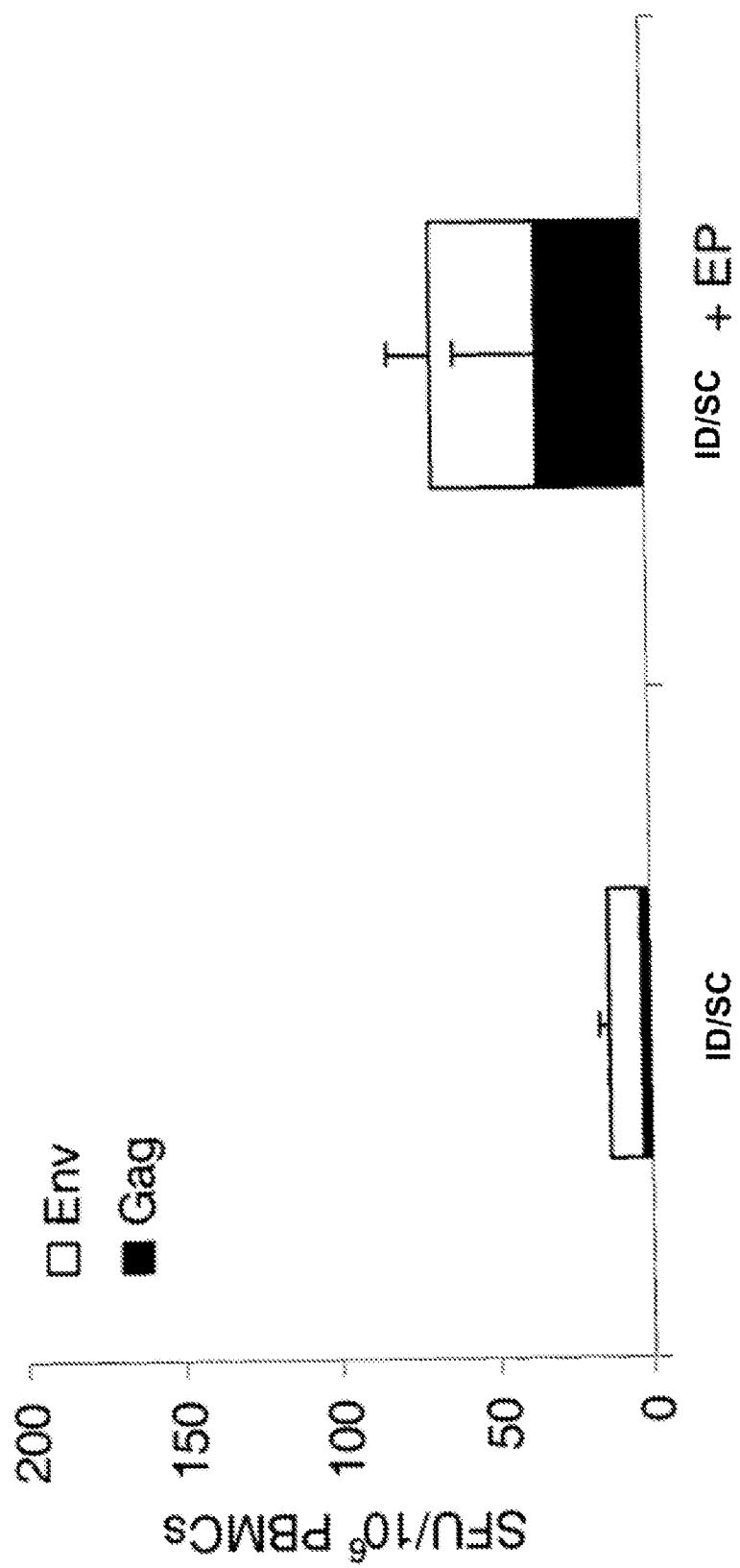
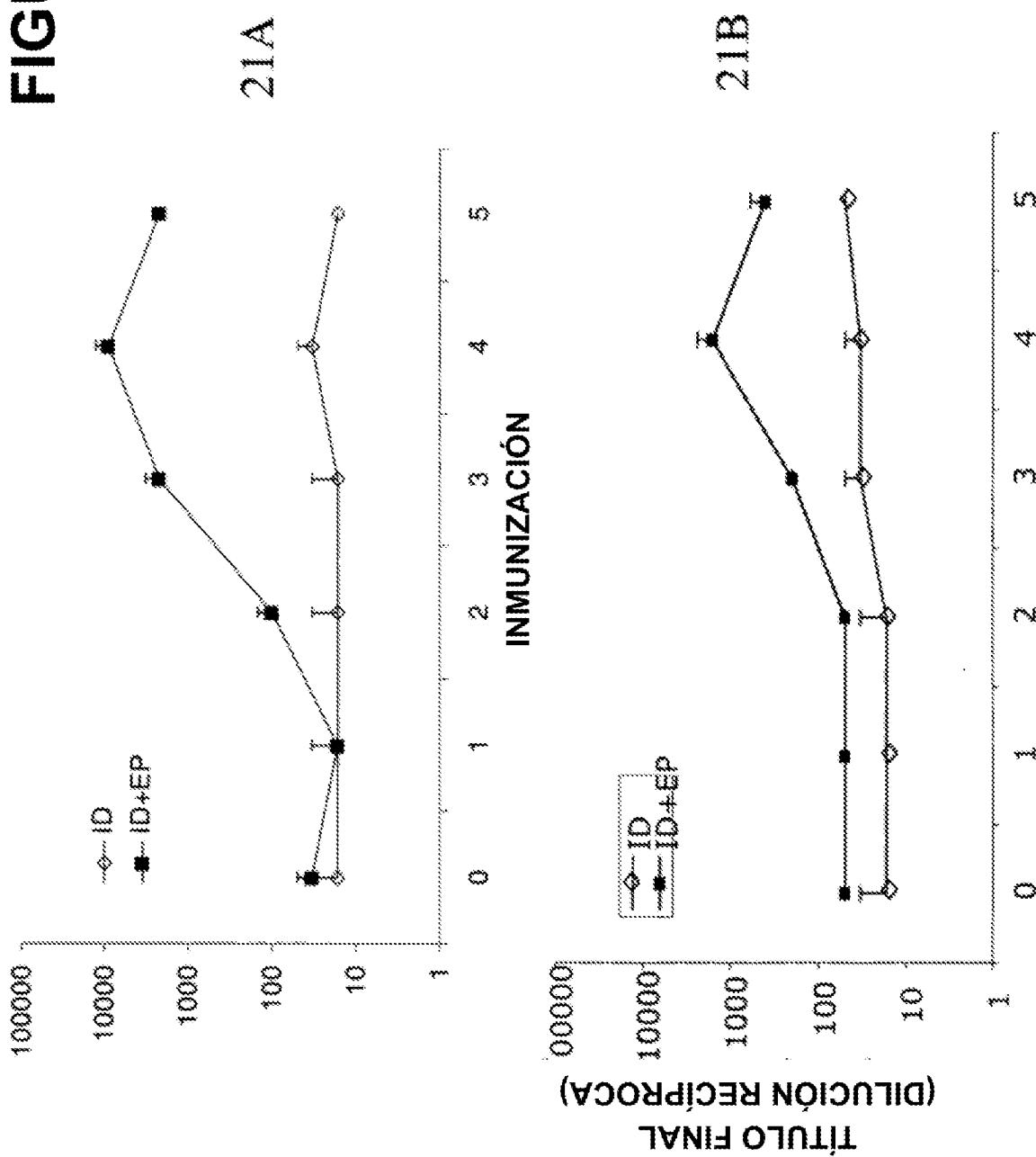


FIGURA 20

FIGURA 21

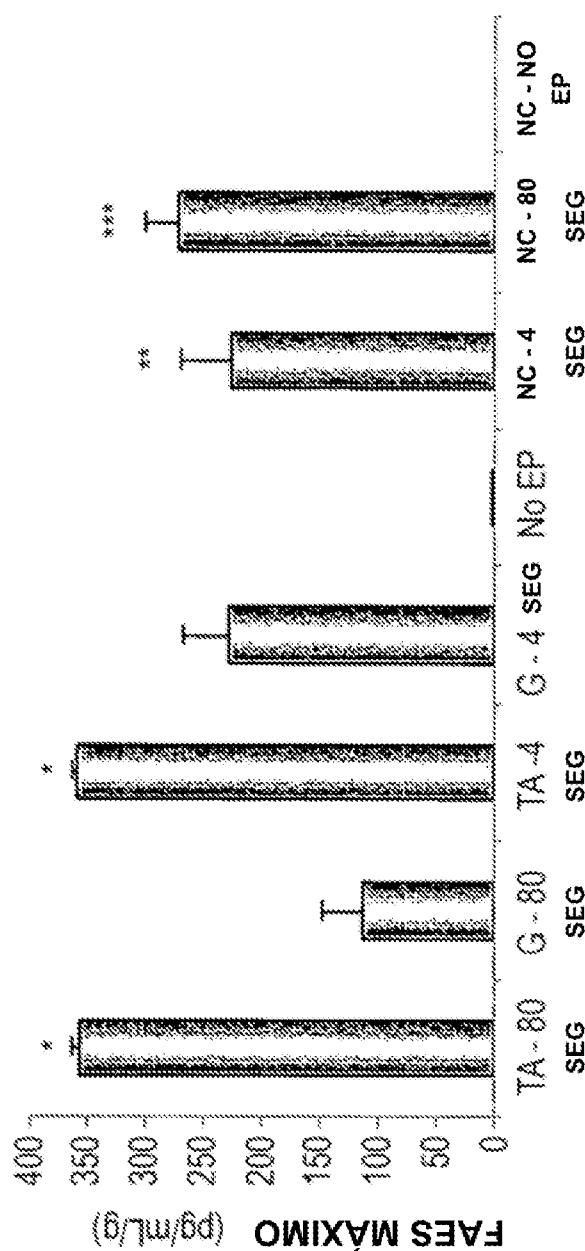


FIGURA 22

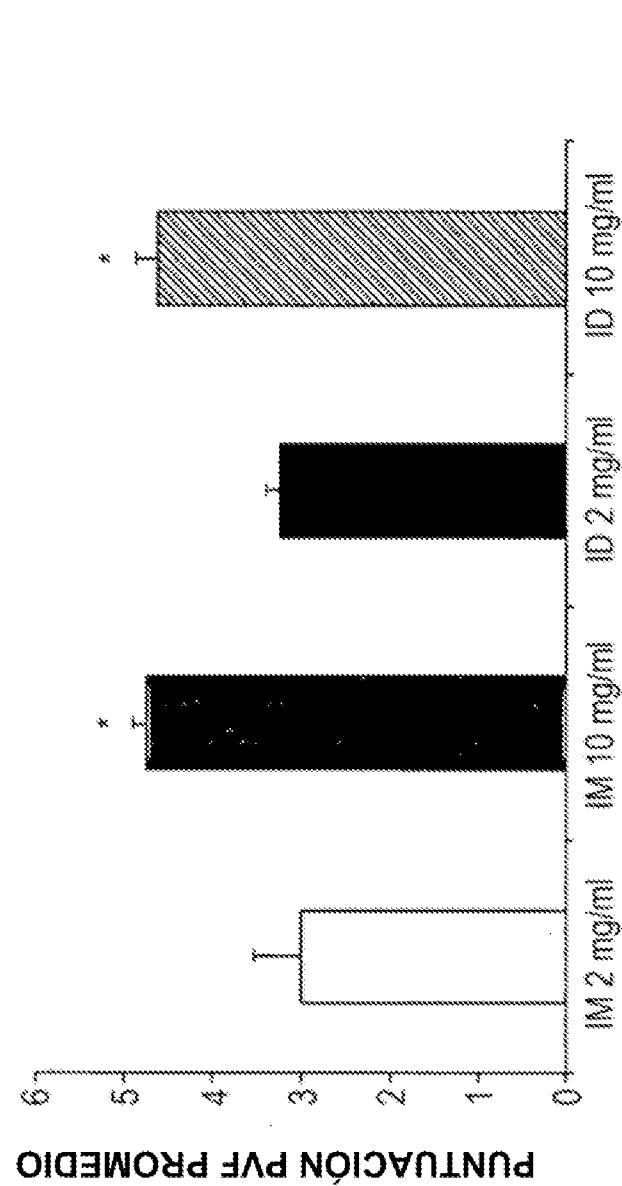
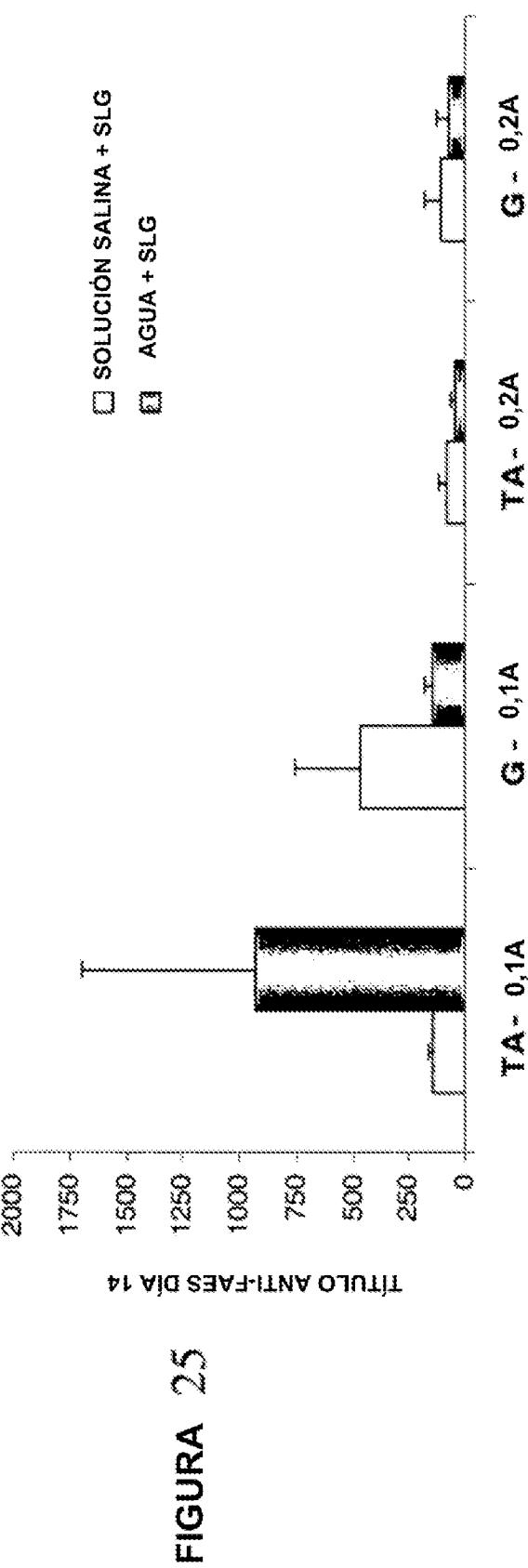
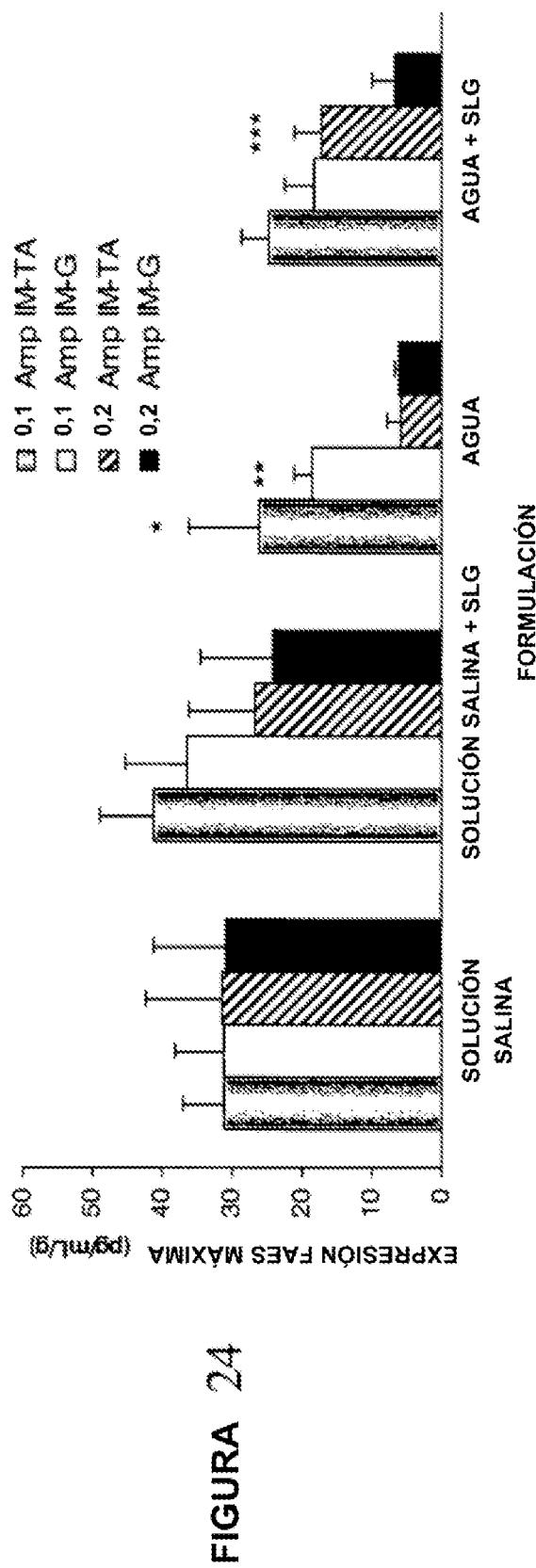
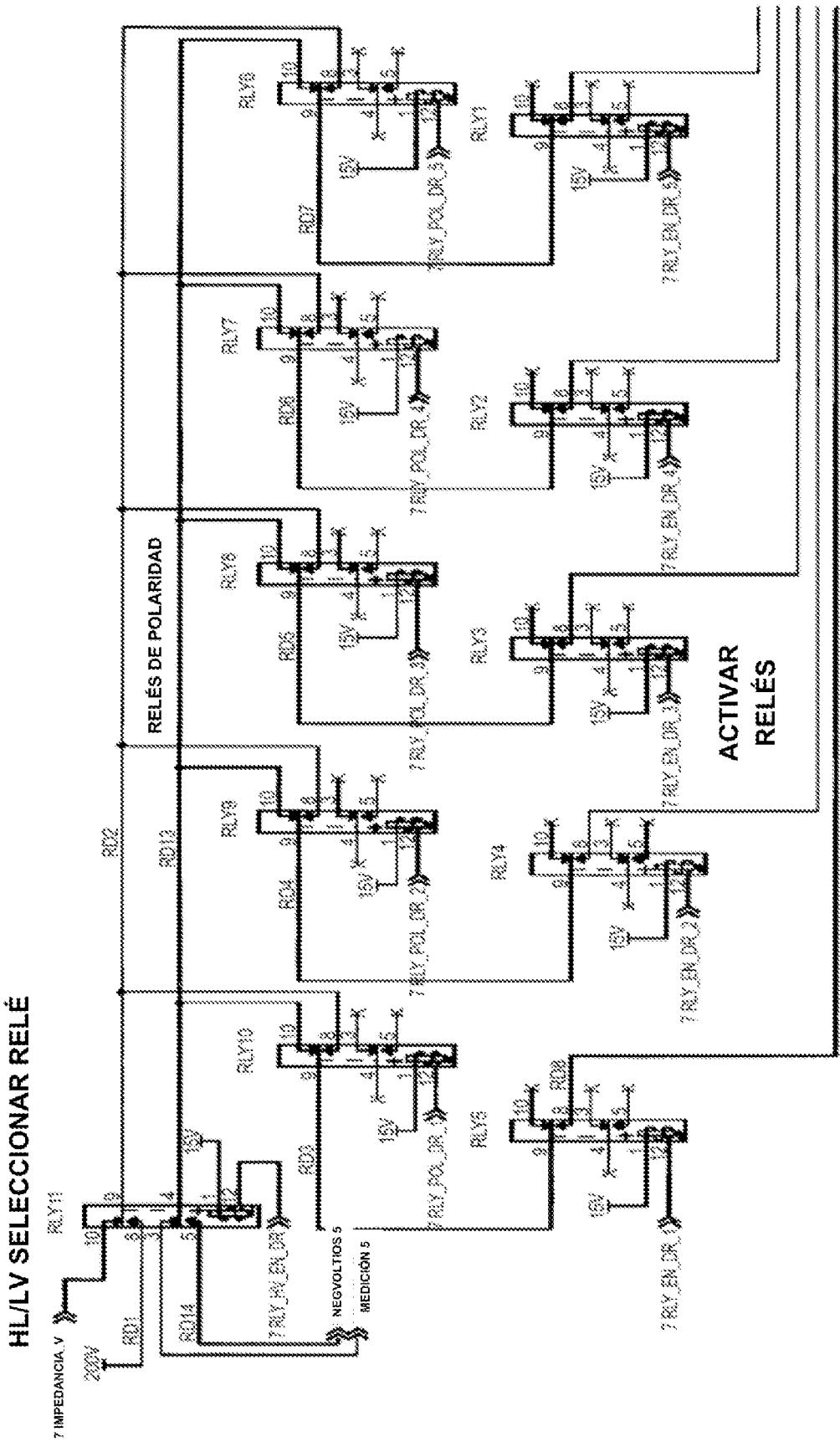


FIGURA 23





HACIA LOS
ELECTRODOS

FIGURA 26

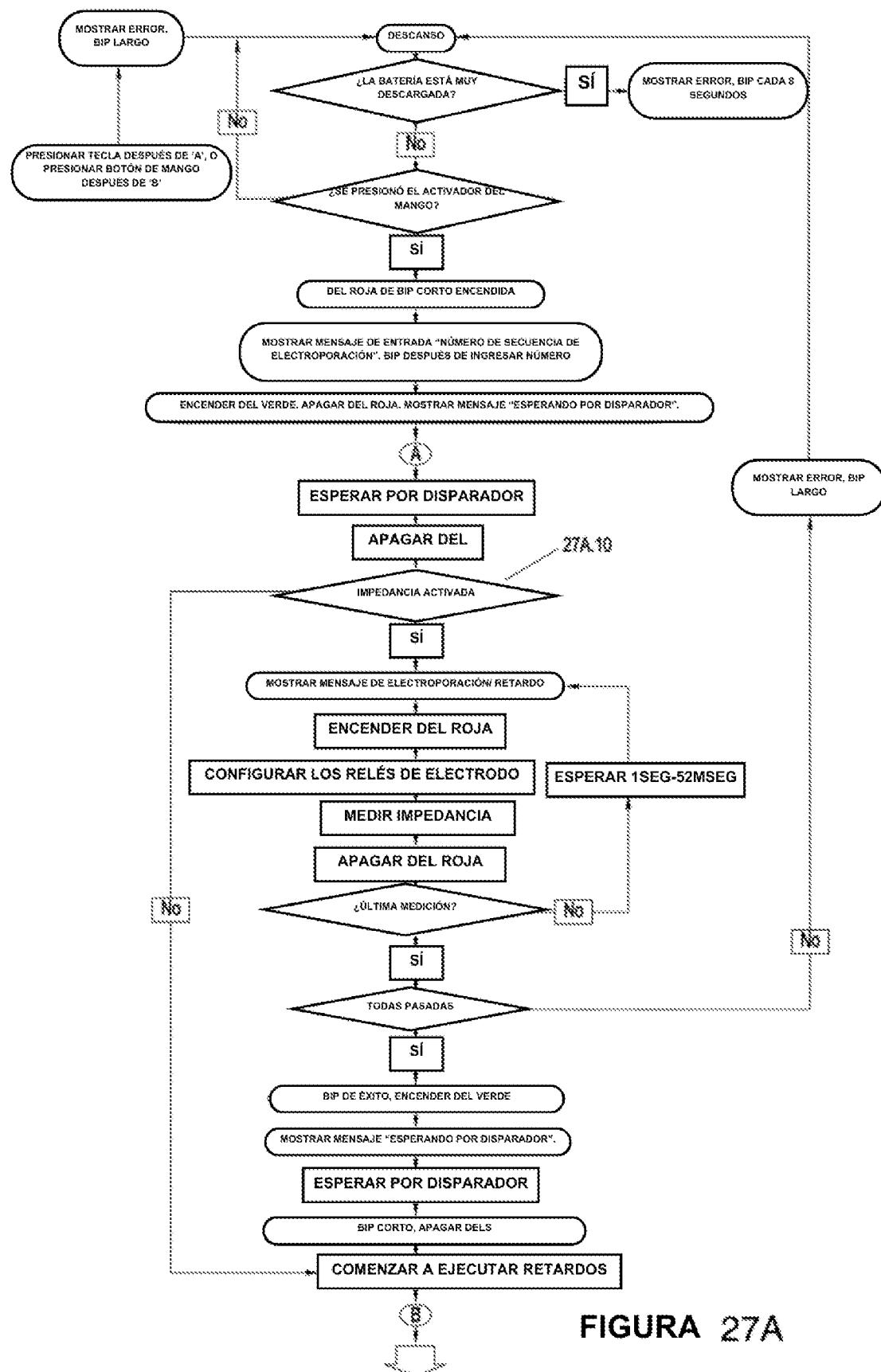


FIGURA 27A

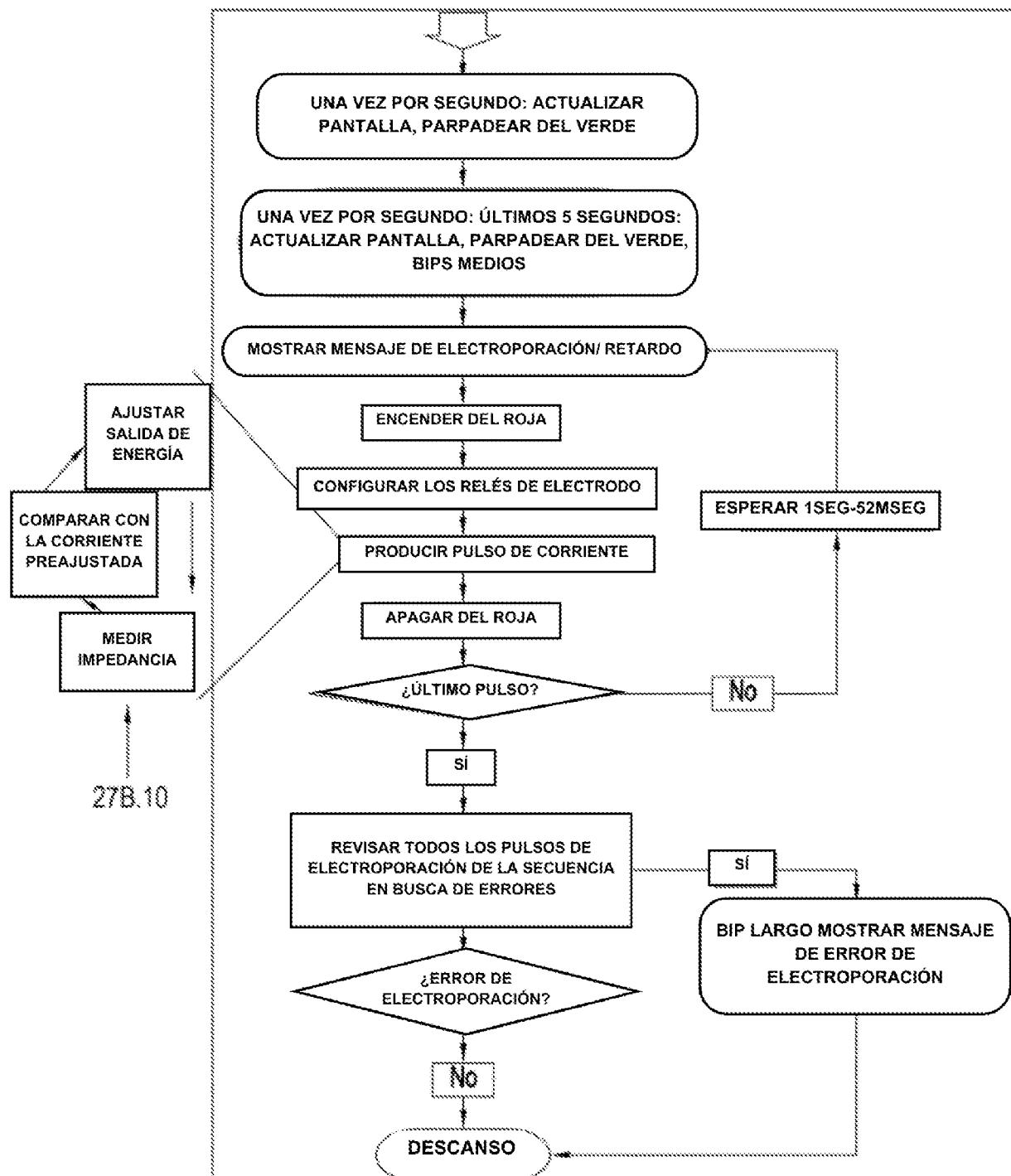


FIGURA 27B