



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101426550 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 31

(21) 申请号 200780014313. 0

(22) 申请日 2007. 03. 02

(30) 优先权数据

60/778, 740 2006. 03. 03 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 10. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/005133 2007. 03. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02007/103070 EN 2007. 09. 13

(73) 专利权人 基因特伦尼克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 保罗·戈德法布 戴尔特墨·拉布塞

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 章社杲 张英

(51) Int. Cl.

A61N 1/30 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1187145 A, 1998. 07. 08,

US 2005/0054969 A1, 2005. 03. 10,

US 2006/0024358 A1, 2006. 02. 02,

审查员 董洪梅

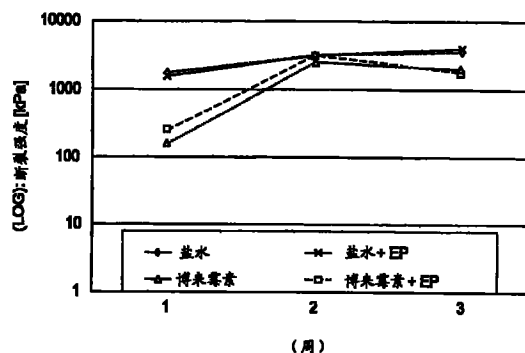
权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 16 页

### (54) 发明名称

用于治疗在外科切除术后残留在组织中的微小残余肿瘤的方法和装置

### (57) 摘要

本发明涉及对癌性肿瘤部位周围的明显正常组织进行治疗以降低癌性组织部位上及附近的癌症复发的概率, 以及减少通常连同肿瘤一起被切除的明显健康组织的量, 从而通过消除或延迟肿瘤复发以及不损害正常组织来获得其功能并避免不必要的损形, 从而为癌症患者提供显著的益处。



1. 一种用于治疗哺乳动物组织的系统,所述哺乳动物组织包括切除的肿瘤部位周围的细胞,所述系统包括:

- (a) 电穿孔装置;以及
- (b) 治疗性物质,

其特征在于,所述电穿孔装置包括至少一个多电极的阵列,以在阵列的所选电极之间提供一系列电脉冲的递送,所述电穿孔装置被定位以将电穿孔脉冲传递至肿瘤切除部位周围的预选择边缘组织内的所有组织,当所述电极在使用所述装置的过程中定位在所述组织中时,所述电极能够将流体体积从至少一个可变容积的容器中引至所述组织,所述电穿孔装置的电极包括细长的中空针,所述电穿孔装置还包括兼作治疗剂装载托盘的有棱角的盖以覆盖所述电极并提供将治疗性物质递送到中空针的机构,其中,以预定方式进一步为所述电极供能,所述预定方式选自由为单电极对供能、为相反电极对供能、顺序地为所述电极的选定部分供能、以及同时为所述电极的选定部分供能组成的组。

2. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述治疗性物质选自由博来霉素、顺铂、多肽、抗体、RNAi、反义核酸、编码治疗活性多肽的可表达基因、趋化因子、以及细胞因子组成的组。

3. 根据权利要求2所述的系统,其中,将所述治疗性物质通过静脉内或瘤内递送到所述哺乳动物组织中。

4. 根据权利要求2所述的系统,其中,所述RNAi、反义核酸、以及可表达基因是在聚-L-谷氨酸溶液中配制的。

5. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述肿瘤细胞选自由皮肤组织中的癌细胞、位于哺乳动物的头部或颈部的癌细胞、以及黑色素瘤细胞组成的组。

6. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述电穿孔装置将电穿孔的电脉冲施加于所述组织,所述电穿孔的电脉冲包括具有额定场强的脉冲,其中所述额定场强选自由1500V/cm、1200V/cm、在800和1500V/cm之间、在200和800V/cm之间组成的组。

7. 一种用于治疗哺乳动物中切除肿瘤部位周围的组织床的装置,包括:

- (a) 主体基体,包括多个孔的阵列;
- (b) 多个电极的阵列,包括通过其中运送流体介质的腔,所述主体基体的每个孔中包括所述电极,所述多个电极的阵列以几何阵列定位,以在阵列的所选电极之间提供一系列电脉冲的递送,以将电穿孔脉冲传递至肿瘤切除部位周围的预选择边缘组织内的所有组织;
- (c) 多个隔室的阵列,所述隔室能够容纳流体介质并与所述腔流体连通;
- (d) 多个活塞的阵列,包括在基体中,所述基体与所述主体基体装配在一起,其中每一个活塞适合于所述隔室并能够可滑动地可调节定位于所述隔室中;
- (e) 致动器,用于可滑动地调节所述活塞的位置;
- (f) 电能源,可连接于所述电极,用于将电穿孔的电脉冲赋予所述电极;以及
- (g) 有棱角的盖,所述盖兼作治疗剂装载托盘并覆盖所述电极阵列并提供将所述流体介质递送到所述电极中的机构,所述盖良好地适配于所述主体基体。

8. 根据权利要求7所述的装置,其中,所述致动器是指轮。

9. 根据权利要求7所述的装置,其中,所述致动器是翼形螺母。

10. 根据权利要求7所述的装置,其中,所述致动器是电动机。

11. 根据权利要求7所述的装置,其中,所述致动器是螺杆传动的。

## 用于治疗在外科切除术后残留在组织中的微小残余肿瘤的方法和装置

### 技术领域

[0001] 本发明涉及电穿孔系统、装置以及利用这种装置来治疗肿瘤周围部位的组织的方法。更具体地,本发明涉及通过用电穿孔的脉冲和抗癌剂治疗明显的非癌性组织来减少肿瘤块的体积 (debulking tumor mass)、不损害 (sparing) 肿瘤周围的组织、以及降低肿瘤块尺寸和复发率。

### 背景技术

[0002] 以下描述包括可有利于理解本发明的信息。然而,并不是承认,任何这样的信息对于要求保护的本发明而言是现有技术或与本发明有关,或任何明确或间接地提及的出版物是现有技术。

[0003] 在工业化国家中,除血管疾病之外,癌症是死亡的最常见原因。传统上公认的用于治疗癌症和肿瘤 (其包括单个相对轮廓分明的组织块 (tissue mass)) 的方案 (paradigm) 包括通常与外科切除联合使用的放疗和化疗。在外科切除术是一种选择的情况下,外科手术通常是最有效的治疗形式。然而,外科治疗的效果取决于恶性组织的完全去除,该恶性组织包括主肿瘤块以及经常存在于主肿瘤 (main tumor) 附近的分支和微转移。

[0004] 当去除主肿瘤时,外科医生还试图通过切除肿瘤周围的明显正常组织来消除这样的局部或区域微转移。这种组织称作“边缘组织”或简单地称作“边缘”。在何种程度上去除边缘组织取决于外科医生的判断。通常,整个肿瘤周围 0.5-2cm 的边缘是可以接受的。然而,对于侵袭性肿瘤,更广泛的切除并不罕见。甚至是在仔细切除肿瘤和边缘以后,大多数类型的肿瘤还是会以 10-40% 的频率复发。复发率取决于多种因素,包括肿瘤大小、肿瘤的类型和位置、患者的状况等。为了降低复发率,外科手术后通常会进行放疗和 / 或化疗。尽管进行这些后续治疗 (secondary treatment), 但复发率仍然令人不安地较高。

[0005] 除外科手术和放射以外,还使用局部肿瘤控制的其他方法。这些方法包括射频 (RF) 消融、光动力学疗法 (PDT)、冷冻疗法 (CRYO)、化放疗 (CR)、近距离治疗 (BT)、直流电疗法 (GT), 以及其他方法。外科手术、RF、PDT、CRYO 以及 CR 依赖于肿瘤和边缘组织的完全去除或破坏,而放射、BT、以及 GT 留下或多或少的完整的经治疗的正常组织,虽然辐射和 BT 会引起严重的瘢痕、纤维化以及血管和神经损伤。在任何情况下,健康组织的去除、瘢痕、以及身体 (物理) 损伤可以导致显著的损形和显著的身体部位和 / 或其功能的生理用途 (physical use) 的丧失。例如,大多数以上列出的目前用于破坏或去除肿瘤块的外科手术的辅助方法会引起对肿瘤周围的正常组织的非特异性损伤。在肿瘤块的切除可以导致必须从器官去除肿瘤处的功能完全减弱 (debilitating), 其中上述器官包括舌、声带、直肠、唇、阴茎、或导致面部组织的精细肌肉 (fine muscle) 和视觉结构的完全减弱。

[0006] 为了避免上述损形并保持功能以及确保从肿瘤周围的组织清除上述癌细胞,本发明提供了外科手术的辅助方法或新辅助方法,因为在肿瘤学领域仍然需要不损害 (sparing) 相邻于肿瘤的明显健康组织并减小肿瘤块、肿瘤的生长,以及复发率的装置和方

法,。

## 发明内容

[0007] 在第一种实施方式中,本发明包括一种降低组织中癌细胞生长的复发的概率的方法。在一种优选实施方式中,该方法包括向所述组织的细胞提供电能电穿孔脉冲和药物。在一种相关的实施方式中,优选在电穿孔脉冲前立即向组织提供药物或同时向组织提供药物。

[0008] 在第二种实施方式中,本发明包括一种在外科切除术后治疗残留在组织中的残余癌细胞的方法。优选地,本发明提供了通过使得微小的结节 (nodule) 或其他形式的癌性组织在电穿孔电场中经受到药物的处理来控制癌症的进一步扩散。在一种相关的实施方式中,这样的治疗可以是外科手术的辅助方法,因为它可以在肿瘤去除之前或以后施用。在一些情况下,尤其是在癌细胞还未形成纤维块 (fibrous mass) 的情况下,不可以采用任何手术程序。在这样的情况下,EP 治疗提供了一种减小肿瘤块并终止或延迟癌细胞在组织中的进一步生长的方法。在一种进一步相关的实施方式中,本发明的方法提供了较大肿瘤块的减积术 (或减积治疗,debulking),其中通过抗癌剂 (如博来霉素) 的作用,来‘软化’肿瘤组织,以便更容易从周围的健康或正常组织去除肿瘤块。

[0009] 在第三种实施方式中,本发明的方法减少了在切除肿瘤时必须去除的肿瘤部位周围的正常组织 (即“边缘”组织) 的量,从而不损害正常组织并因此在更大程度上保留组织功能和外观。

[0010] 在其他的实施方式中,本发明提供了一种器械,其能够在需要时并以容易操作的方式为切除肿瘤周围的组织提供所述电穿孔能量脉冲。在相关的实施方式中,本发明的装置用于给予抗癌剂以及给予足以在边缘区域引起组织电穿孔的电场。下文提供了本发明装置的另外的实施方式。

[0011] 根据以下附图、详细描述、以及所附权利要求,本发明的其他特征和优点将是显而易见的。

## 附图说明

[0012] 本专利或申请文件包括至少一幅彩色附图。在提出要求并支付必要的费用以后,美国专利商标局将提供本专利或专利申请出版物的具有彩色附图的副本。

[0013] 图 1 是示出了伤口强度的图表,其是通过愈合中的皮肤样本的断裂点 (breaking point) 而测得,其中对该愈合中的皮肤样本在体内进行下述处理:单独用盐水、盐水加电穿孔、单独用博来霉素、以及博来霉素加电穿孔。在这些实验中还处理了下层脂肪 (underlying fat) 和肌肉组织。

[0014] 图 2A-F 是三色染色组织的显微照片,其示出了 (A) 未处理的切开后第二天的组织与下述组织之间的对比:(B) 切开后第二天的用盐水加电穿孔处理的组织;(C) 在第二周盐水加电穿孔处理;(D) 在第二周博来霉素加电穿孔处理;(E) 在第三周盐水加电穿孔处理;以及 (F) 在第三周博来霉素加电穿孔处理。

[0015] 图 3A-D 是在三周后,皮肤切口处的胶原沉积的染色 (三色) 显微照片。图 3A 和图 3C 分别是博来霉素和盐水处理的皮肤组织的明场像,而图 3B 和图 3C 是分别示出博来霉

素和盐水处理的皮肤组织的偏振光图像。

[0016] 图 4A-D 是示出切开后第三周的肌肉组织样本的显微照片 ;(A) 单独用盐水, (B) 盐水加电穿孔, (C) 单独用博来霉素, 以及 (D) 博来霉素加电穿孔。

[0017] 图 5 是本发明的装置的一种实施方式的横断面图, 其示出了一种包括手柄的实施方式, 该手柄包括用来升高和降低活塞阵列的指轮 (或压轮, thumb wheel), 其中活塞推动通过电极针 (electrode

[0018] needle) 的物质的装载或分配。

[0019] 图 6 示出了本发明的一种实施方式的分解图。

[0020] 图 7 是本发明的装置的一种实施方式的横断面图, 其中活塞是由螺杆来推动的, 而螺杆是通过壳体 50 的顺时针方向 (升高活塞) 和逆时针方向 (降低活塞) 旋转加以驱动的。

[0021] 图 8A 和 B 是本发明的一种实施方式的透视图, 其中壳体 50 的旋转将往复地驱动活塞阵列。图 A 示出具有托盘 20 的实施方式而图 B 则示出没有托盘 20 的实施方式的主体。

[0022] 图 9 是透视图, 其示出了本发明的一种借助于翼形螺母来推动活塞阵列的实施方式。

[0023] 图 10 示出了来自基体 22 下侧的多个电极针的阵列的一个实例。

[0024] 图 11A、B、C、以及 D 是示出了具有肿瘤 (A)、具有在完全切除肿瘤前外科暴露的肿瘤 (B)、具有在肿瘤切除后但在假 (sham) EP 处理前的开放性伤口床 (open wound bed) (C)、以及具有在治疗 3 周后的外科 / 治疗部位 (D) 的试验动物的第 2 组同龄组动物的照片。对于此第 2 组, 没有进行电穿孔, 并且即使已完全切除肿瘤, 肿瘤仍然复发。

[0025] 图 12A、B、C、以及 D 是示出了具有肿瘤 (A)、具有在完全切除肿瘤前外科暴露的肿瘤 (B)、具有在肿瘤切除后但在用 EP 进行治疗前的开放性伤口床 (C)、以及具有在治疗 3 周后的外科 / 治疗部位 (D) 的试验动物的第 1 组同龄组动物的照片。如用博来霉素 -EP 治疗所观察到的, 在治疗部位没有肿瘤复发。

[0026] 图 13A、B、以及 C 是示出了具有肿瘤 (A) ; 部分肿瘤切除以后 (B) ; 以及具有在治疗 3 周后的外科 / 治疗部位 (C) 的试验动物的第 7 组同龄组动物的照片。即使仅部分地切除肿瘤, 小鼠在第 3 周也未显示任何肿瘤复发。

[0027] 图 14A、B、以及 C 是示出了具有肿瘤 (A)、部分肿瘤切除后 (B)、以及具有在治疗 3 周后的外科 / 治疗部位 (C) 的试验动物的第 4 组同龄组动物的照片。在没有进行 EPT 的情况下, 肿瘤继续生长。

[0028] 图 15 示出了表 V 中所列数据的柱状图。PTE 是指部分肿瘤切除, CTE 是指完全肿瘤切除, Bi. v. 是指静脉内给予试验动物的博来霉素, EP 是指电穿孔, i. t. B 是指瘤内给予的博来霉素, 以及 PEP 是指局部电穿孔。

## 具体实施方式

[0029] 如本领域技术人员会明了的, 以下描述详细描述了本发明的某些优选实施方式, 因此其仅是说明性的而并非描述本发明的实际范围。在详细描述本发明以前, 应当明了, 本发明并不限于所描述的特定的装置安排、系统, 以及方法, 因为这些可以变化。还应当明了, 本文所使用的术语仅是为了描述特定的实施方式, 而不是用来限制本发明的范围, 本发明

的范围由所附权利要求所限定。

#### [0030] 概述

[0031] 电穿孔疗法 (EPT), 也称作电化学疗法 (ECT), 是一种用来治疗局部癌性病变和肿瘤块的方法。该方法包括瘤内或静脉内给予某些化疗药物, 最常用博来霉素。在大多数情况下, 电穿孔 (EP) 是通过插入针电极阵列并将从这些电极发射出来的脉冲电场直接递送至肿瘤细胞块来实施的。脉冲参数通常在以下范围内: 场强 200-2000V/cm; 脉冲长度 0.1-10.0ms; 脉冲数 2-20; 以及脉冲频率 1-5Hz。施加上述电场会导致肿瘤细胞膜的透性化, 这使抗癌药物可以进入细胞, 并且与在没有电穿孔的条件下所观测到的情况相比, 由于药物的摄取而引起高达 5000 倍的细胞毒性。研究表明, EPT 可有效抵抗动物的许多类型的实体肿瘤以及人类的若干类型的肿瘤。事实上, 目前若干临床研究正在进行中, 包括评价 EPT 用于治疗头颈部鳞状细胞癌的安全性和效力的 III 期研究。然而, 这种治疗研究并没有被设计为或用来治疗或试验 EPT 对与癌细胞共同存在的非癌性边缘组织的影响。

[0032] 在用于局部和区域肿瘤控制的许多方法中, EPT 有点独特, 因为它对正常组织的损害远小于对恶性组织的损害。动物和人的体外和体内研究的结果表明, 借助于凋亡和坏死机制, 使用如博来霉素之类的药物的 EPT 可有效地破坏大多数肿瘤, 而对肿瘤周围的正常组织仅引起较小的作用 (炎症、少量坏死), 特别是当博来霉素的浓度、剂量、以及脉冲参数在适当的范围内时。通常可经受 (amenable) 治疗的肿瘤周围的边缘组织包括但不限于以下器官, 包括乳房、前列腺、舌、阴茎、唇 (阴唇)、直肠、声带、肝、头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)、皮肤和其他肿瘤。无论肿瘤块是否已经被切除都可以对这样的组织进行 EPT。在这样的癌症中, 通过以在很大程度上不受损地进行愈合并且可以消除微小转移和会引起局部复发的延伸到组织中的肿瘤分支的方式来治疗组织将显著有利于患者。正如相对于本发明的方法也是可理解的, 具有诸如博来霉素的药剂的电穿孔治疗可提供在靶向癌细胞中的可测量的选择性的程度。这种方法学还与用具有抵抗特定疾病状态的比活 (specific activities) 的其他药剂进行治疗有关, 如高度局部化的 (localized) 传染病和其他疾病状态 (其中存在感染或病变组织的病灶), 其中药剂可以靶向于被感染的或病变的细胞或细胞团 (group of cell) 以破坏受到侵袭的细胞。在这样的情况下, 上述细胞和周围组织的电穿孔将使药剂达到受感染或病变细胞中的期望的靶标, 而且对未感染或正常细胞没有有害影响 (如经验上所观察到的)。异常和正常细胞的不同应答的分子和细胞机制目前是未知的。另外, 本发明的方法和装置适用于癌细胞的部位分布对于外科手术不容易修复的区域的疾病状态。例如, 可以以与治疗边缘组织床相同的方式, 用本发明的装置来治疗包含微小或局灶性疾病部位的面部皮肤组织, 这样的方式导致引起的瘢痕显著小于 (少于) 由外科手术引起的瘢痕。因此, 本发明的方法可以用作外科手术的辅助方法或甚至是新辅助方法。具体地说, 可以连通周围正常组织一起对肿瘤块的细胞进行电穿孔, 从而提供一种使肿瘤块减小体积 (debulking) 的方法, 提供一种阻止、终止或以另外的方式降低病变细胞的生长和 / 或复发率的机制。在这样的情况下, 可以在 EPT 之前或之后去除肿瘤组织, 或甚至可以在 EPT 之后允许不切除肿瘤组织, 在这样的情况下, 药剂 (如博来霉素) 的效应将通过凋亡和 / 或坏死机制使得细胞死亡并软化肿瘤细胞块 (tumor cell mass), 接着进一步坏死。附近的正常组织将在很大程度上保持不受侵袭。

[0033] 通常, 用 EPT 治疗肿瘤包括 1 单位 /ccm 待治疗组织的博来霉素剂量, 以 4 单位 /

ml 的浓度瘤内注射。产生脉冲场以使得通常以 6 个分离的 4Hz 脉冲施加该场,每一个在 6 个不同的场方向,每一个具有 100μsec 持续时间,以 200 和 2000V/cm 之间任一点,但通常在 600 和 1500V/cm 之间,更经常在 600 和 1400V/cm 之间,以及甚至更经常在 1200-1300V/cm 之间的额定场强穿过肿瘤块。增加博来霉素剂量或浓度以及增加电穿孔脉冲的强度超过标准参数可以导致对正常组织的更严重的影响。在非常高的场强和 / 或脉冲长度下,EP 本身 (即,例如,没有博来霉素) 可以诱导不可逆的细胞膜变质,导致落入有效电场内的肿瘤以及正常细胞组织的破坏。在进一步相关的实施方式中,当注射 DNA 作为治疗药剂时 (如在美国专利 6,528,315 中所陈述的,其以引用方式结合于本文),可以利用 1-600V/cm 之间的脉冲场强来操作用于实施本发明的方法的装置本身。在这样的实施方式中,DNA 理想地编码对于待治疗的包含肿瘤的组织具有治疗性抗癌效应的多肽。

[0034] 对于其他药剂,包括基因、蛋白质、细胞因子、趋化因子、类固醇、抗体、RNAi、以及反义核酸,可以使用同样高的脉冲参数 (即,例如,800-1500V/cm 或,可替换地,1-600V/cm,更优选 200 至 600V/cm,以及进一步更优选 400-600V/cm)。进一步预料到,可以使用这些和任何其他药剂,其中这样的药剂可促进伤口愈合而并不促进恶性细胞的生长。就在 EPT 中使用上述药剂而言,可以使用低至 50V/cm 的低端场强以在含有微小病变和病变细胞的组织内对细胞进行电穿孔,其中所述组织还未形成异常的组织块。

[0035] 如前所述,在一种实施方式中,本发明的癌症疗法的理论基础涉及外科切除肿瘤块 (‘减积术’) 以降低患者的生物压力,外科消除边缘组织以根除微转移和侵入的肿瘤组织,并用放疗和 / 或化疗来控制肿瘤的局部、区域和全身扩散。虽然外科切除肿瘤本身通常可解除患者的病痛,没有严重的后遗症,但随后的边缘切除、放疗和化疗步骤对于患者可能是非常有害的。这些治疗会严重影响生理和机械功能、外观、生活质量以及最终结果。因此,理想的是,将肿瘤的外科切除与一种治疗方法结合,该治疗方法 (a) 比目前的方法更有效地防止由于微转移和侵袭性肿瘤组织导致的肿瘤复发,以及 (b) 使周围边缘组织的损失降至最小。在本发明中,提供了 EPT 作为外科辅助方法或新辅助方法的新用途,以减小肿瘤块、防止肿瘤复发、并使需要切除的边缘组织降至最少或二者。

[0036] 现在开始描述本发明的方法,本发明目的是提供了一种用来在切除的癌细胞部位周围的正常组织中降低肿瘤复发的概率的新方法。换言之,本发明的方法包括治疗癌细胞部位周围的组织“边缘”,这样的癌细胞通常形成在不同 (distinct) 组织部位。在一种优选实施方式中,本发明的方法可以减少必须连同肿瘤以及其癌细胞一起被切除的组织的量并使放疗或化疗变得多余。该方法包括将电能电穿孔脉冲施加于肿瘤部位周围的组织。除了施加电穿孔脉冲外,该方法进一步包括提供 (优先在电脉冲以前或同时) 一种包含抗癌药物的制剂 (formulation)。在一种优选实施方式中,上述药物包括生物活性分子。例如,该药物可以包括编码可表达的多肽的核酸,如,在表达性载体中并且包括用于细胞因子或趋化因子、抗体、或酶的基因序列的核酸。另一个实例包括反义 DNA 或 RNA、或干扰 RNA (RNAi)。可替换地,该药物可以包括多肽或有机分子,如细胞因子、趋化因子、抗体、顺铂或博来霉素、或任何具有抗癌活性的其他分子。此外,上述披露的任何化合物可以以制剂的形式给药,其中所述制剂可以包括本领域公知的药用盐、缓冲剂以及其他赋形剂的任何组合 (如在本领域公知的)。例如,对于核酸的制剂可以包括例如所述核酸和聚谷氨酸 (聚-L-谷氨酸),如在美国专利 7,173,116 中所描述的,其全部内容以引用方式结合于本文。

[0037] 在一种进一步的实施方式中,本发明的方法包括利用能够将电穿孔脉冲施加于肿瘤部位的局部区域的装置来施加上述电穿孔脉冲。在一种优选实施方式中,这样的装置可以包括细长针状电极的阵列。取决于所需要的电脉冲的强度以及取决于抗癌剂的递送方式,可替换的实施方式可以使用短的非穿透性电极或半穿透性微针电极。在这样的实施方式中,该装置将被设计为不需要活塞和递送针。代之以,可以利用仅包括电极阵列的电穿孔装置来实施该治疗方法,这种阵列包括非穿透性或半穿透性电极。在这样的情况下,将通过独立的装置(如注射器)来递送药物。在一种进一步优选的实施方式中,关于本发明装置的任何物理构造,在治疗过程的实施中,电极可相对于待治疗的组织加以定位以产生具有足以在特定区域和深度内电穿孔所述组织中的细胞的场强和能量的电场。通常,该装置将被定位以将电穿孔脉冲传递至肿瘤切除部位周围(三维)的预选择边缘组织内的所有组织。取决于切除肿瘤的大小和电极阵列的大小,可以通过完整地施加一次电穿孔脉冲来电穿孔周围的边缘组织,或通过定位和重新定位电极阵列以将肿瘤部位边缘组织完全包围在电穿孔能量场中而需要多次施加电穿孔脉冲。在一些实施方式中,电极可以作为将要通过电穿孔进入细胞的药剂的递送针,而在其他实施方式中,对组织给予药剂可以独立于电极在组织中的给予/定位。

[0038] 另外,为了确保本发明的方法能够将健康的非癌性组织暴露于电穿孔脉冲而并未显著损害所述健康组织,对在暴露于电穿孔脉冲后的开放性创伤周围的健康组织的恢复特性进行了研究。如下文所披露的,用电穿孔脉冲、或电穿孔脉冲和抗癌剂对健康组织的治疗对于治疗区域的细胞并没有可测量的显著影响,并且愈合的开放性创伤类似于未经治疗的和/或正常的组织。因为可以使健康组织暴露于电穿孔脉冲而没有显著的损害,所以在肿瘤周围的组织的治疗中使用电穿孔使得外科医生达到切除健康组织的更窄的边缘的目的成为可能。

#### [0039] 一般治疗过程

[0040] 本发明的方法的一种实施方式是治疗外科伤口边缘,或更一般地是肿瘤的边缘,并且在该方法中(a)与具有或没有后续治疗的常规外科肿瘤和边缘切除术相比,实现优异的复发率(即,较小频率的复发);(b)降低或消除对外科切除边缘组织的需要,同时保持与传统外科边缘切除相同或更好的复发率,因而保护功能组织;以及(c)减少或消除外科肿瘤切除术(有或没有边缘切除)以后对放疗或化疗的需要,同时保持与传统的外科边缘切除和后续治疗(如放疗以及化疗)相同的或优异的复发率。

[0041] 以下实施例是用来举例说明而不是限制本发明。虽然它们是可以使用的那些实施例的代表,但可以可替换地使用本领域技术人员已知的其他过程。

#### [0042] 实施例 I

##### [0043] 用电穿孔脉冲和/或抗癌剂治疗开放性创伤周围的明显健康组织

[0044] 为了在包括大部分正常组织的开放性创伤区域成功地使用电穿孔,我们进行了一系列的实验以表明可以实施正常组织的电穿孔(有或没有抗癌剂)而不会对皮肤、皮下以及肌肉组织中的愈合过程产生显著影响。

[0045] 在此实验中,在分为1-6组的8只猪试验动物的每只的背肌中形成18个经皮切口。在第1-5研究组中,形成纵向切口,而在第6组中切口方向横向于肌纤维的纵向。在每个切口部位,不进行任何注射,注射生理盐水、或注射溶液中的博来霉素,以使得注射物



位于 1cm 的深度并且三次注射彼此间隔 1cm, 在每个切口的每一侧有一个注射物 (彼此在 3cm 内) 并且一个注射物在切口中心。使用了博来霉素 (一种抗癌剂), 其中每次注射包括 0.125ml (4 单位 /ml 盐水)。然后利用直径为 0.5cm 的 6 针电极阵列 (每个脉冲的额定场强是 1, 233V/cm) 借助于来自脉冲发生器的双极脉冲 (530V, 每个脉冲 100  $\mu$  sec) 对切口进行处理。

[0046] 具体地说, 在外科手术前, 使得 8 只雄性 Yorkshire/Hampshire 杂交猪 (40-50kg) 适应环境 5-7 天。利用无菌手术标记物 (surgical marker) 在背上标记切口位置。每个切口是 5cm 长并在肌肉中的深度为 5mm。在第 1-5 组中的所有动物均接受 18 个纵向切口, 而在第 6 组中的动物接受横向切口, 与表 I 一致。每个研究组包括 24 个切口。

[0047] 表 I

[0048]

| 组           | 切口 | 注射物  | 电穿孔 |
|-------------|----|------|-----|
| 第 1 组 (NL)  | 纵向 | 无    |     |
| 第 2 组 (SL)  | 纵向 | 盐水   |     |
| 第 3 组 (SEL) | 纵向 | 盐水   | X   |
| 第 4 组 (BL)  | 纵向 | 博来霉素 |     |
| 第 5 组 (BEL) | 纵向 | 博来霉素 | X   |
| 第 6 组 (BET) | 横向 | 博来霉素 | X   |

[0049] 在每个切口的 12 个部位上注射总体积为 1.5ml 的盐水或博来霉素 (6U), 6 个部位在肌肉中以及 6 个部位在皮肤中。利用直径为 0.5cm, 1.5cm 长的针阵列, 对用电穿孔治疗的切口进行电穿孔。在肌肉切口的每一侧, 在切口中心 3cm 处进行 3 次电穿孔, 每个电穿孔部位与其他部位相隔 1cm。对皮肤没有进行电穿孔。用 4-0 Vicryl 可吸收间断缝合线闭合肌外膜。用 4-0 尼龙间断缝合线闭合皮肤。在术后的第 2 天、第 1 周、第 2 周、或第 3 周将猪处死。从切口中心获取包含皮肤和至少 5mm 深度的下层肌肉 (underlying muscle) 的组织学样本, 并立即放置在 10% 中性缓冲福尔马林中。另外的对照样本获自背上的未切开的皮肤。在染色和切片以后, 利用以下参数将皮肤、皮下组织、以及肌肉在 0-3 级的范围内进行组织学分级: 愈合、肉芽形成 / 纤维化、PMN's、淋巴细胞、组织细胞、坏死、出血以及非典型细胞。

[0050] 在三个不同时间点, 即第 7、14、以及 21 天, 对从切口中心切除的皮肤条进行机械试验。浸泡在盐水中的纱布包裹皮肤条并在同一天利用 Instron 900 (Instron Corp. Norwood, MA) 测试切口断裂强度, 其中使用 100 磅的测力仪 (load cell), 以 0.5 in/min 运行。通过对每个切口直到断裂点的伸长与应变作图来确定断裂强度。在第 1 组 (没有盐水或博来霉素) 中, 皮肤切口的断裂强度随时间而增加: 从切开后的第 1 周的 ~ 1800kPa 到第 2 周的 ~ 2500kPa 以及第 3 周的 ~ 5000kPa。注射盐水 (第 2 组) 产生类似的结果。第 3 组 (注射盐水连同电穿孔) 在任何时候并不显著地不同于第 2 组, 这表明电穿孔对断裂强度并没有引起不利的影响。在第 1 周, 与所有三个不使用博来霉素的组相比, 所有三个使用博来霉素治疗的组具有显著 (即, 90%) 降低的断裂强度, 这表明博来霉素已延迟了皮肤的伤口愈合。因为第 4 组和第 5 组彼此没有显著的不同, 所以电穿孔对于断裂强度没有不利的影响。第 2 周后, 在第 1-5 组之间没有显著差异。只有用博来霉素和电穿孔的横向切口呈现更低的断裂强度。这种效应持续至第 3 周, 其中第 6 组比第 1-5 组具有显著更低的断裂强度。

[0051] 如图 1 所示,切开后三周,在单独用盐水、盐水加电穿孔、单独用博来霉素、或博来霉素加电穿孔之间没有显著差异。甚至愈合的横向切口的强度足以对于患者不会在风险方面成为临床上的担忧。

#### [0052] 组织学评价

[0053] 在四个不同时间点,即,第 2、7、14、以及 21 天,从切口中心获取包含皮肤和至少 5mm 肌肉的组织学样本并立即放入 10% 中性缓冲福尔马林中。组织学研究表明,在第 7 天出现统计学意义上的显著变化(仅仅是博来霉素组)。所有未处理的组织和注射盐水的组织的外观仍保持正常。到第 21 天,将所有注射博来霉素的样本与注射盐水的对照比较。例如,当将注射盐水与注射盐水加电穿孔的组织样本进行比较时,电穿孔的效果仅为在 1 周内皮肤组织细胞的数量稍微增加以及在 2 周内皮肤淋巴细胞减少。电穿孔对任何其他参数,如皮肤、皮下组织以及肌肉的愈合没有影响。此外,当将博来霉素与博来霉素加 EP 处理的组织样本进行比较时,在第 2 天或第 1 周没有显著差异。在 2 周内,电穿孔引起肌肉坏死显著增加,但该差异到第 3 周消失。在 3 周内,电穿孔引起皮肤组织细胞的减少,但显示出肌肉中的肉芽组织/纤维化增加,证明了愈合。甚至在有博来霉素存在的情况下由电穿孔引起的皮肤、皮下组织或肌肉的愈合并没有持续的显著差异。

[0054] 如图 2A-F 所示,当在未处理的组织、盐水加电穿孔处理的组织、以及博来霉素加电穿孔处理的组织之间进行比较时,到第三周,伤口愈合变得组织学上等效。具体地说,到第三周,盐水加电穿孔等效于博来霉素加电穿孔(比较 E 和 F)。到第 2 周,盐水加电穿孔比博来霉素和电穿孔显示出更好的愈合(比较 C 和 A)。到第 3 周,盐水加电穿孔表现出等效于在第 2 周的博来霉素加电穿孔(比较 E 和 D)。

[0055] 如图 3A-D 所示,对于其他组织学特征,胶原沉积在愈合中的伤口,但对于博来霉素处理的样本具有比用盐水处理的样本更慢的速率。具体地说,在没有电穿孔的情况下,在由盐水治疗的动物中的切口(C 和 D)显示出与真皮的胶原纤维连续的深蓝色胶原纤维,而博来霉素治疗的动物的切口(A 和 B)则显示出具有较少的与皮肤胶原连续区域的淡蓝色胶原纤维。关于对肌肉组织的效果(如果有的话),如图 4A-D 所示,显微照片表明,在 3 周内,与单独使用盐水或单独使用博来霉素相比,电穿孔并不引起肌肉组织愈合的显著差异。

[0056] 考虑纵向与横向切口的效果(如果有的话),在存在盐水与博来霉素对比的情况下,在 2 天或 1 周内没有显著差异。在 2 周和 3 周内,仅有的显著组织学差异在于在研究的全部三个组织层中肉芽组织/纤维化的数量上。在各种情况下,在皮肤、皮下组织以及肌肉中,纵向切口比横向切口具有更多的肉芽组织/纤维化,其中存在显著差异。这可以预料到纵向切口通常比横向切口愈合更好。对于纵向和横向切口来说,皮肤、皮下组织以及肌肉的愈合的得分并没有显著差异。

#### [0057] 总结

[0058] 在存在或不存在博来霉素的情况下,在第 2 和第 3 周以及可论证地甚至第 1 周内,肌肉的电穿孔并没有引起猪真皮断裂强度的显著改变。然而,仅与切口相比、或与用盐水注射的切口(在进行或不进行 EP 的情况下)相比,博来霉素的存在(与是否使用 EP 无关)与猪真皮断裂强度的降低相关,直到治疗后 1-2 周。关于组织学,组织的电穿孔并没有导致皮肤、皮下组织或肌肉的愈合的显著差异。因此,电穿孔疗法并不会对肌肉或皮肤的愈合带来显著不利的影响。这似乎也适用于利用 EPT 来治疗肿瘤周围组织的情况,因此,在旨

在降低肿瘤复发的创伤边缘治疗中,本发明的方法提供了一种外科切除术或其他干预治疗的可替代方法。

[0059] 实施例 II

[0060] 假设的治疗方案

[0061] 设想,利用本发明的方法和装置的外科手术通常将遵循可能采用以下步骤的方案:

[0062] 1. 如本领域外科医生所通常实施的,手术切除主肿瘤块。外科医生将仅切除主要的(primary)肿瘤块或还将切除手术边缘。可替换地,可以通过许多消融疗法中的一种来消融主肿瘤,如 RF(射频)消融、PDT(光动力学疗法)、冷冻疗法、化放疗、近程放射治疗、或甚至是电疗法,并且消融或不消融边缘组织。

[0063] 2. 在外科切除(或消融)肿瘤块以后,在进行或不进行边缘组织的切除(或消融)的情况下,将通过 EPT 并采用博来霉素或其他化疗或生物学药物来治疗切除(或消融)部位周围的整个组织。药物-EPT 治疗将进行到由外科医生根据理论考虑、科学研究、或实践经验所确定的深度。

[0064] 变型 A. 对于切除具有标准边缘的肿瘤的方案

[0065] 1. 在此规程变化中,在已连同标准边缘切除肿瘤以后,用标准 EPT 方案治疗整个创伤表面(肿瘤边缘床)至适当深度,通常为 1cm,其中上述标准 EPT 方案通常包括局部注射抗癌剂,接着利用至少一个多电极阵列装备的装置(例如,6 针阵列或本发明装置的其他电极的布置,如图 5-10 所示)进行电穿孔,然后,例如,在适当的电压下在至少三个场方向(orientation)发送脉冲。场定向是指由任何两个带相反电荷的电极之间的电脉冲所产生的电场的空间和方向上的定向。在此实施方式中,方案变型 A 可以在没有使用(或可替换地减少使用)传统的手术后的后续治疗的情况下进行。在这样的情况下,本发明的方法是意在实现与完全手术边缘切除以及后续治疗相比,具有相同的或更好的复发率。

[0066] 2. 在肿瘤边缘床的 EPT 以后,如果需要的话,可以用常规的后续治疗(如放疗或化疗)来进一步治疗患者,从而与没有 EPT 治疗的边缘组织相比,提供另外的潜在保护以抵抗肿瘤复发。

[0067] 实施上述步骤 1 和步骤 2 的结果是意在包括相对于常规疗法而言,在一定程度上保留组织的情况下,改善的治愈率或复发时间,尽管边缘组织还是会被切除。

[0068] 变型 B. 对于不切除边缘的切除肿瘤的方案

[0069] 1. 在此方案变型方法中,在肿瘤切除以及减少的或没有边缘切除以后,用标准 EPT 方案治疗整个伤口表面至适当深度,通常为 1cm,其中上述标准 EPT 方案通常包括局部注射抗癌剂,接着利用多电极阵列(例如,6 针阵列或如附图所示的阵列)进行电穿孔,并且,例如,在适当电压下在至少三个场方向上发送脉冲。

[0070] 2. 在这种规程和另外的常规后续治疗以后,期望的结果是完全或部分保留边缘组织并潜在地改善了治愈率或复发时间。

[0071] 在上述规程的可替换的实施方式中,没有提供传统的后续治疗,然而所期望的结果还是完全或部分保留边缘组织以及改善的治愈率或复发时间。

[0072] 实施例 III

[0073] 现在开始描述适合于治疗切除的肿瘤的边缘床的电穿孔装置,在第一种实施方式

中,该装置用来提供将抗癌剂(例如博来霉素)递送到边缘组织并均匀分布遍及边缘床的能力。在第二种实施方式中,该装置用来提供将电能的多个脉冲递送到边缘组织的能力,其中电能的多个脉冲足以引起整个边缘床的细胞的电穿孔至 1 和 1.5cm 之间的深度。

[0074] 在第三种实施方式中,本发明的装置可以将电穿孔脉冲递送到边缘床的大部分(substantial portion),如果没有递送到全部边缘床(取决于装置和肿瘤的相对尺寸),则通过个别(single)放置本发明的装置从而将电穿孔脉冲提供到整个边缘床,该装置应优选仅需要放置一次。

[0075] 在其他实施方式中,该装置包括以几何阵列定位的多个电极,以在阵列的所选电极之间提供一系列电脉冲的递送。在一种相关的实施方式中,该装置可以包括多种形状以容纳各种肿瘤形状和尺寸并进一步以优选的几何形状提供电极阵列。

[0076] 在另外其他的实施方式中,本发明的装置的电极可以包括细长的中空针,以使得该电极可以既作为电极又是抗癌剂递送针。在一种特别优选的实施方式中,本发明的装置可以包括有棱角的盖(sharps cover)以覆盖电极并提供将抗癌剂递送到中空针的机构以及一种用于在外科手术前保持电极无菌的装置。

[0077] 现在开始描述本发明的装置的具体细节,图 5 示出了本发明的装置 10,其包括基本上刚性的有棱角的盖 20,该盖兼作(doubles as)治疗剂装载托盘。该盖/托盘 20 进一步包括装料口 21,其可以被设计为具有能够任何所期望类型的用于连接到流体源的配件相连接的配件,其中流体源用于填充托盘以达到所期望水平的治疗性物质。盖/托盘 20 良好地(snuggly)适配于本发明装置的主体,其本身包括基本上为刚性的基体 22,多个细长电极 23 的阵列穿过该基板,并且各自独立地连接至电导线 24,该导电线在装置的侧面部分终止于用于附着连接于电能源的插头或连接器 25。将基体 22 和插头 25 连接于主体基体 30,其本身包括多个孔 31 的阵列(参见图 6)。每个孔包括中空电极/针,通过中空电极/针可以传递物质(如治疗性物质)。

[0078] 与基体 30 装配的是基体 40,其包括多个活塞 41 的阵列。基体 40 连接于一机械装置,其可以推动基底 40 朝向和远离基体 30 的移动,以驱动基体 40 的活塞 41 的阵列进入或抽离基体 30。在一种实施方式中,通过中心杆 60 来驱动基体 40,其中中心杆 60 的一端连接于基体 40 并且另一端被构造为棘爪(ratchet)和拇指起动的棘轮(thumb activated wheel)61。在一种相关的实施方式中,基体 50 进一步形成封闭的支撑结构 63 以包围和封闭中心杆 60。该支撑结构 63 可以进一步包括用户友好的手柄 64。在操作中,操作者将使用装料口 21 来用流体的治疗性药剂(如博来霉素)将盖/托盘 20 填充至所期望的水平,然后使用指轮(或压轮)61 将药剂吸入孔 31 中(图 6)。然后,操作者利用由支撑结构 63 形成的手柄从托盘 20 移走该装置,并将该装置放置在组织或边缘床上的适当位置。然后,操作者插入电极,起动指轮 61 以将药剂给予组织然后激活电极,该装置事先已经通过插头 25 连接于电能源。

[0079] 本发明的装置可以进一步包括部件的其他各种安排以提供相同的结果。例如,在一种实施方式中,该装置可以包括连接于基体 30 的、可选地是动态的壳体 50。因为取决于本发明所选的式样,在可选的基础上,壳体 50 被认为是动态的,壳体可以顺时针方向和逆时针方向旋转以升高和降低活塞而不是利用指轮。在如图 5 所示的实施方式中,壳体 50 并不是动态的,因为虽然壳体 50 可以旋转,但对于手柄和指轮来说,此实施方式中的这样的

旋转没有用处。可替换地,如图 7 和图 8 所描绘的,壳体是动态的,因为通过螺杆 70 驱动基体 40 朝向或远离基体 30,其中螺杆 70 在一端连接于基体 40 并在另一端通过所述螺杆 70 的接合而连接于壳体 50。与螺杆 70 的螺丝互相作用的壳体 50 部分本身形成螺纹 71,其通过壳体 50 的旋转将使得基体 40 远离或朝向基体 30 移动。在操作中,操作者将如先前所描述的用药剂填装盖/托盘 20,然后将圆盘状装置适当地放置在待治疗的组织上。在将电极插入组织中以后,在向下压该装置的同时,使用者将以使活塞朝向基体 30 移动并从而将药剂推入组织中的方向旋转壳体 50。然后操作者将激活电极,假设该装置已事先通过插头 25 连接于电能源。

[0080] 本发明的其他实施方式是可能的,如使用连接于螺杆 70 的翼形螺母 80 来驱动活塞 41(参见图 9)。在这样的实施方式中,壳体 50 将不包括螺纹 71 而取而代之的是仅包括平滑的钻孔(smoothbore),带有螺纹的中心杆 60 可以通过该平滑的钻孔。在这样的实施方式中,操作者将不需要旋转壳体而仅需旋转翼形螺母。

[0081] 本发明的其他实施方式是可能的,如使用非人力(或不活动的, inanimate)方式来推动活塞阵列。例如,不是采用人力(或活动的力, animate force)来操作翼形螺母、指轮、或驱动螺杆,可以通过电动活塞来驱动活塞。在这样的实施方式中,例如,对于在图 6-8 中所披露的实施方式,可以将电动机放置在具有壳体 50 的布置中,以引起壳体的双向旋转。同样,可以将电动机附着于齿轮(如在指轮的实施方式中)以驱动活塞的升高和降低。另外,如本领域技术人员将明了的,该装置可以包括指示器用来在活塞已达到它们相应的进入或离开孔 31 的最大行程时提示操作者。

[0082] 更进一步的实施方式包括使用各种各样的供能参数(energizingparameter),其包括使用任何形式的单极和/或双极脉冲,包括但不限于脉冲、指数式衰减脉冲、矩形脉冲等的系列(train)。更进一步,本发明可以使用场强在 10 和 1500V/cm 之间的脉冲。此外,本发明设想了为单独地或与剩余电极的任何组合一起的阵列的每个电极供能的能力。例如,在一种实施方式中,可以对任何 4 个相邻电极施加脉冲,以致两个电极是带正电荷而相反对的电极均带负电荷。这样的脉冲发生可提供“相反对”脉冲发生,如在美国专利第 5,993,434 和 5,702,359 号中所披露的。在其他脉冲发生形式中,可以为单对电极供能以将电穿孔脉冲的能量赋予组织,直到为所有相邻对电极供能至少一次。虽然在图中未示出,但应当明了,本发明的装置(如在其各种实施方式中所披露的)包括单独呈送(individually addressed)的电极针。这是通过结合在基体 22 中来实现的,如通过夹层技术(即,基体 22 可以包括两层结构,导电线被放置在两层之间的格栅中),导电线连接是从电极到装置的侧面(如导线 24 所示),并终止于具有多个引脚连接器容量的插头 25。

#### [0083] 实施例 IV

[0084] 在此实施例中,在小鼠中进行了一系列实验,其中在单独实施外科手术后或在实施外科手术和 EPT 后测定肿瘤复发率。具体地说,本实验包括一项体内研究,以确定在裸鼠中,在皮下引入 HT-29 人结肠癌细胞以及切除由这样的引入所产生的肿瘤以后,EPT 对手术边缘治疗的效果。对于试验动物的处理,该实验是在人道的条件下进行的。

[0085] 实验设计如下。将 4-6 周龄的正常无胸腺雌性裸鼠分为 8 组,除第 1 组包括 10 只动物和第 3 组包括 7 只动物之外,每组为 6 只小鼠。HT-29 细胞系来自人结肠癌并且在小鼠中是一种侵袭性的快速生长的肿瘤。每组中,利用 21 号计量注射针和注射器以两

个相邻接种物 ( $5 \times 10^6$  细胞) 的形式使动物接受 HT-29 人肿瘤细胞。HT-29 细胞系获自 ECACC (#HTB-38), 在包含 90% 的 2.2g/L 碳酸氢钠, 以及 10% 的小牛血清的含有 1.5mM L-谷氨酰胺的 McCoy's 5a 培养基中 (改进的) 中调节其生长。细胞被在生长周期中分化为 1:2 至 1:4, 直到获得了足够用于此实验的细胞。

[0086] 接种后, 肿瘤被固定在接种部位。定期监测每只动物的肿瘤体积并利用以下公式进行计算: 肿瘤体积 =  $(a^2 \times b/2)$ , 式中 'a' 是最小直径而 'b' 是垂直于 'a' 的最大直径。从可用手触知肿瘤之日起每周测量肿瘤三次。使肿瘤不断生长直到大小为 500 到 1500 立方毫米之间。然后在进行 EPT 或不进行 EPT 的情况下, 进行外科肿瘤切除、部分切除、或不切除。在这些实验中, EPT 是指用博来霉素和电穿孔 (EP) 进行治疗。在实施 EP 的情况下, 利用每个电极插入物一个脉冲周期 (即, 4Hz 的 6 个脉冲), 利用标准的 MedPulser 发生器 (Genetronics, Inc. San Diego, CA) 和具有直径为 1cm、电极之间的距离为 0.86cm, 以及针长度为 1cm 的一次性六针阵列的施加器 (applicator) 来进行 EP。每个矩形脉冲具有 100usec 的持续时间和 1500V 的施加电压。对于第 4-8 组以及第 10 和 11 组, 在瘤内注射博来霉素以后, 以这样的方式插入针电极阵列: 即将肿瘤包围在针阵列内, 或在最大肿瘤的情况下, 将针穿透肿瘤的边缘。经皮插入针阵列并且基本上垂直于携带肿瘤的小鼠的胁腹 (侧腹, flank) 表面。可替换地, 在首先切除肿瘤、接着 i. v. 注射博来霉素然后进行 EP 的情况下, 经皮插入针电极阵列包围手术创伤区域 (第 5-8 组)。

[0087] 在实验中使用博来霉素的情况下, 将它以 4U/ml 盐水 (1U = 1mg) 并尽可能均匀地, 如所指出的, 以  $0.25\text{ml}/\text{cm}^3$  待治疗组织的体积的剂量注入肿瘤和边缘组织。可替换地, 在指定的情况下, 将相应量的博来霉素注入尾静脉。

[0088] 实验使用 8 个同龄组, 每组至少 6 只小鼠。每个同龄组经受的治疗方案是任何下述的任意组合: EP、博来霉素、以盐水代替博来霉素、肿瘤完全切除、肿瘤部分切除、以及不切除肿瘤。表 II 和表 III 披露了该治疗方案。

[0089] 表 II

[0090]

| 组# | 小鼠#  | 切除         |            |           | 博来霉素      | EP |
|----|------|------------|------------|-----------|-----------|----|
|    |      | 切除整个<br>肿瘤 | 部分切除<br>肿瘤 | 不切除<br>肿瘤 | 静脉内<br>递送 |    |
| 1  | 1-1  | X          |            |           | X         | X  |
|    | 1-2  | X          |            |           | X         | X  |
|    | 1-3  | X          |            |           | X         | X  |
|    | 1-4  | X          |            |           | X         | X  |
|    | 1-5  | X          |            |           | X         | X  |
|    | 1-6  | X          |            |           | X         | X  |
|    | 1-7  | X          |            |           | X         | X  |
|    | 1-8  | X          |            |           | X         | X  |
|    | 1-9  | X          |            |           | X         | X  |
|    | 1-10 | X          |            |           | X         | X  |
| 2  | 2-1  | X          |            |           | 盐水        | 盐水 |
|    | 2-2  | X          |            |           | 盐水        | 盐水 |
|    | 2-3  | X          |            |           | 盐水        | 盐水 |
|    | 2-4  | X          |            |           | 盐水        | 盐水 |
|    | 2-5  | X          |            |           | 盐水        | 盐水 |
|    | 2-6  | X          |            |           | 盐水        | 盐水 |
| 3  | 3-1  |            | X          |           | X         | X  |
|    | 3-2  |            | X          |           | X         | X  |
|    | 3-3  |            | X          |           | X         | X  |
|    | 3-4  |            | X          |           | X         | X  |
|    | 3-5  |            | X          |           | X         | X  |
|    | 3-6  |            | X          |           | X         | X  |
|    | 3-7  |            | X          |           | X         | X  |
| 4  | 4-1  |            | X          |           | 盐水        | 盐水 |
|    | 4-2  |            | X          |           | 盐水        | 盐水 |
|    | 4-3  |            | X          |           | 盐水        | 盐水 |
|    | 4-4  |            | X          |           | 盐水        | 盐水 |
|    | 4-5  |            | X          |           | 盐水        | 盐水 |
|    | 4-6  |            | X          |           | 盐水        | 盐水 |

[0091] 对表 II 所列的动物进行实验,将动物麻醉,接着切除或部分切除肿瘤(如指定的),接着静脉内(i. v.)注射博来霉素或盐水。如上所述,博来霉素的剂量取决于如上所述的肿瘤的大小。在 3 至 4 分钟以后,用 EP 治疗指定的动物,接着用钳子和外科粘合剂闭合伤口。在第 1 同龄组中,外科切除整个肿瘤(参见,例如图 12B 和图 12C),并用博来霉素和 EP 对动物进行治疗。在第 2 同龄组中,从动物中切除肿瘤,但仅注射盐水而不是博来霉素并且不进行 EP。仅实施“假”EP 过程,其中电极阵列插入肿瘤中但没有对电极施加脉冲。在第 3 同龄组中,部分地(至少 95%)切除肿瘤,接着是注射博来霉素和电穿孔。在第 4 同龄组中,仍是部分切除肿瘤,接着是盐水注射和假 EP 处理。

[0092] 表 III

[0093]

| 组# | 小鼠# | 切除         |            |           | 博来霉素<br>静脉内<br>递送 | EP |
|----|-----|------------|------------|-----------|-------------------|----|
|    |     | 切除整个<br>肿瘤 | 部分切除<br>肿瘤 | 不切除<br>肿瘤 |                   |    |
| 5  | 5-1 | X          |            |           | X                 | X  |
|    | 5-2 | X          |            |           | X                 | X  |
|    | 5-3 | X          |            |           | X                 | X  |
|    | 5-4 | X          |            |           | X                 | X  |
|    | 5-5 | X          |            |           | X                 | X  |
|    | 5-6 | X          |            |           | X                 | X  |
| 6  | 6-1 |            |            | X         | X                 | X  |
|    | 6-2 |            |            | X         | X                 | X  |
|    | 6-3 |            |            | X         | X                 | X  |
|    | 6-4 |            |            | X         | X                 | X  |
|    | 6-5 |            |            | X         | X                 | X  |
|    | 6-6 |            |            | X         | X                 | X  |
| 7  | 7-1 |            | X          |           | X                 | X  |
|    | 7-2 |            | X          |           | X                 | X  |
|    | 7-3 |            | X          |           | X                 | X  |
|    | 7-4 |            | X          |           | X                 | X  |
|    | 7-5 |            | X          |           | X                 | X  |
|    | 7-6 |            | X          |           | X                 | X  |
| 8  | 8-1 |            |            | X         | X                 | X* |
|    | 8-2 |            |            | X         | X                 | X* |
|    | 8-3 |            |            | X         | X                 | X* |
|    | 8-4 |            |            | X         | X                 | X* |
|    | 8-5 |            |            | X         | X                 | X* |
|    | 8-6 |            |            | X         | X                 | X* |

[0094] 在表 III 中,将同龄组动物麻醉,接着以如上所述的剂量和体积进行瘤内给予博来霉素溶液。在给予药物以后进行 EP10 分钟,接着 15 分钟过后切除肿瘤或部分切除肿瘤,然后进行伤口闭合。在第 8 同龄组中,不完全地进行 EP(由表 III 中的 \* 表示),其中针阵列电极被如此放置以使得有效电穿孔仅发生在约 75% 的肿瘤和伴随的边缘组织中。换言之,EP 治疗对于肿瘤来说是偏移的(offset)。

[0095] 除上述实验之外,我们还增加了完成 EPT 和肿瘤切除之间的时间以估计肿瘤组织的大体质地(gross consistency)并对它进行组织学评价。出于这个目的,使用了三个另外的同龄组第 9、10、和 11 组。在表 IV 中示出了实验方案。

[0096] 表 IV

[0097]



| 组# | 小鼠#  | 切除          | 博来霉素 | EP |
|----|------|-------------|------|----|
|    |      | 完全肿瘤切除      |      |    |
| 9  | 9-1  | X           |      |    |
|    | 9-2  | X           |      |    |
|    | 9-3  | X           |      |    |
| 10 | 10-1 | X (在 2 小时)  | X    | X  |
|    | 10-2 | X (在 2 小时)  | X    | X  |
|    | 10-3 | X (在 2 小时)  | X    | X  |
| 11 | 11-1 | X (在 24 小时) | X    | X  |
|    | 11-2 | X (在 24 小时) | X    | X  |
|    | 11-3 | X (在 24 小时) | X    | X  |

[0098] 麻醉第 9 组动物,接着完全切除肿瘤。检查肿瘤的质地并保存在福尔马林中以供以后的组织学评估,如同第 10 和 11 同龄组的肿瘤组织那样。对第 10 同龄组的经麻醉的动物以如上所述的剂量和容积进行瘤内给予博来霉素溶液。在药物给予后 10 分钟进行 EP。在 EP 后 2 小时,切除肿瘤。如在第 10 同龄组中那样治疗第 11 同龄组的动物,不同之处在于,在 EP 后 24 小时完全切除它们的肿瘤。如上所述,闭合所有伤口。

#### [0099] 结果

[0100] 针对上述第 1 至 8 同龄组,在治疗后三周,我们检查了试验动物的肿瘤复发率。如表 V 和图 15 所披露的,接受博来霉素和 EP 的大多数动物避免了肿瘤复发(参见图 15 中的缩写所定义的描述)。

[0101] 表 V

[0102]

| 组# | 肿瘤切除 |    |    | EP    | 给予博来霉素的途径 |    | %效果* |
|----|------|----|----|-------|-----------|----|------|
|    | 完全   | 部分 | 没有 |       | i.v.      | 瘤内 |      |
| 1  | +    |    |    | +     | +         |    | 90   |
| 5  | +    |    |    | +     |           | +  | 100  |
| 7  |      | +  |    | +     |           | +  | 100  |
| 6  |      |    | +  | +     |           | +  | 80   |
| 3  |      | +  |    | +     | +         |    | 67   |
| 8  |      |    | +  | +/-** |           | +  | 67   |
| 2  | +    |    |    | -     |           |    | 0    |
| 4  |      | +  |    | -     |           |    | 0    |

[0103] \*%效果是基于每组中在治疗后没有发生肿瘤生长的试验动物的数目

[0104] \*\*+/- 表示部分 EPT 过程,其中治疗偏离肿瘤 / 肿瘤床。

[0105] 具体地说,第 1-8 组提供的结果表明,对肿瘤床组织的治疗在治疗部位保护动物免受肿瘤复发方面提供了意想不到的和惊人的益处。如数据所示,无论是完全切除或是部分切除肿瘤,仅仅使用切除并不是有效的。这可能是由于所使用肿瘤类型的侵袭性特性,尽管仔细地外科切除了与人类中类似的侵袭性肿瘤有关的肿瘤,其仍在肿瘤部位或附近留下侵袭性瘤片段和 / 或微转移。这种情况在人的手术治疗中也会遇到,虽然在人类中的复发率通常在 10 至 40% 的范围内,而不是如在此小鼠实验中所观察到的那样高。重

要的是,如由部分肿瘤切除的结果所呈现的,利用使用博来霉素的 EPT 伴随着肿瘤复发的显著降低,即使手术过程未能(在这种情况下是故意的)切除全部肿瘤块。此外,给药途径似乎对于效果并没有起到重要作用,因为分别通过 i. v. 和 i. t. 给予可产生类似的结果。另外,甚至在完成博来霉素-EP 治疗和肿瘤切除之间 15 分钟间隔以后,可惊人地提供效能效果(efficacy effect)。数据进一步支持可有效治疗接种(seed in)在组织中的微小肿瘤的该治疗方法,其中在实验中仅部分地进行 EP 而没有肿瘤切除,即有效电场是偏离肿瘤的。在这种情况下,仍然有 67% 的效果,这表明至少存在由 EPT 引起的微局部效果(microregional effect)。在此实例研究中,并没有包括用于试验单独给予博来霉素而不进行 EP 或相反(即,仅进行 EP 而没有博来霉素)的同龄组,因为已知给予博来霉素而不进行 EP 没有显著的抗肿瘤活性。

[0106] 对于引入试验动物中的肿瘤细胞,我们使得肿瘤块可以生长到相对较大尺寸。参见示出了治疗前试验动物中的肿瘤的图 11A、12A、13A 以及 14A。图 11B 和 12B 表示最终切除前在暴露肿瘤的阶段的外科肿瘤切除的实例。图 11C、12C、13B、以及 14B 表示在完全切除肿瘤后并在博来霉素-EPT 前(图 12C)或盐水-假 EP 治疗前(图 11C)、或在部分肿瘤切除后并在盐水-假治疗前(图 14B)、或在 i. t. 博来霉素-EPT 后 15 分钟(图 13B)的创伤的实例。

[0107] 图 11D 示出了在完全切除肿瘤和盐水-假 EP 治疗以后的复发肿瘤,图 14C 示出了在部分切除肿瘤和盐水-假 EP 治疗以后的复发肿瘤。图 12D 和 13C 分别示出了在切除肿瘤以及用 i. v. 博来霉素和 EP 治疗后、或用 i. t. 博来霉素和 EP 并随后部分切除肿瘤后的没有肿瘤的肿瘤部位。这些过程优于目前的用 i. t. 或 i. v. 抗癌药物来治疗癌症的标准过程。在药物-EPT 治疗以前或以后切除肿瘤可防止在肿瘤部位形成大的坏死块(necrotic mass),身体必须吸收或消除上述坏死块,凭经验其至少需要几周并增大了并发症的概率。在药物-EPT 以前或以后切除肿瘤可能会促进伤口愈合并减少潜在的并发症。另外,采用本发明的方法,可以使用瘤内和静脉注射药物。

[0108] 对于第 9-11 同龄组,我们观测到,在治疗以后肿瘤的质地(consistency)会随时间逐渐变化。当治疗后两小时切除肿瘤时(第 10 同龄组),其质地会更软、轮廓不是很分明的并且它渗漏出水肿液体但相对地几乎没有血液。在治疗后 24 小时切除的肿瘤(第 11 同龄组)已完全软化成有时被称作液化性坏死的质地。在该时间点手术切除有些困难,因为与第 9 同龄组动物的实体肿瘤组织块相比,肿瘤的边界轮廓是不清晰的。有趣的是,当我们从第 5 和 7 同龄组切除肿瘤时,甚至在治疗后 15 分钟我们就观察到肿瘤的软化,其使得与未治疗肿瘤的情况相比,实施具有轮廓分明的边界的手术切除更困难一些。然而,这并不影响该治疗的成功,因为第 5 和 7 同龄组均没有呈现肿瘤复发。这些观察结果提供了使用药物,如博来霉素或其他抗癌剂,并与作为辅助方法的 EPT 或肿瘤减积治疗(其可以另外单独使用或连同其他癌症治疗一起使用)结合的机会的证据。例如,可以用博来霉素-EPT 治疗肿瘤,通过简单的微创过程除去崩解的肿瘤物质,并且如果需要的话,接着进行常规治疗(如放疗或化疗)或其他肿瘤治疗方式。液化肿瘤物质的容易除去还使得伤口可以更快地愈合并具有更少的并发症,尤其是在较大肿瘤的情况下。

[0109] 根据本发明披露的内容,本文披露和要求的所有组合物和方法可以在没有过度实验的情况下加以制备和实施。虽然通过优选实施方式描述了本发明的组合物和方法,但对

于本领域技术人员来说,在不偏离本发明的精神和范围下,可以对本发明的组合物和方法以及本文所描述方法的步骤或步骤顺序可以进行改变是显而易见的。更具体地说,所描述的实施方式仅是说明性的而不是限制性的。对本领域技术人员来说,所有类似的替换和改进被认为是在如由所附权利要求所限定的本发明的精神和范围内。

[0110] 在本说明书中提及的所有专利、专利申请、以及出版物代表了本发明所属领域的技术人员的水平。所有专利、专利申请、以及出版物(包括那些要求对其优先权或另一权益的专利、专利申请、以及出版物)以引用方式结合于本文,就像特定地且个别地指出每一份个别的出版物结合于本文。

[0111] 可以在没有本文未具体披露的任何要素的情况下,适当地实施本文所描述的发明。因此,例如,在本文的每种情况下,术语“包含”、“基本包含”、以及“包括”的任何一个可以用其他两个术语的任何一个来代替。已采用的术语和措词是用作描述而不是限制的术语,因此使用这样的术语和措词并不意味着排除全部或部分示出的和描述的特点的任何等同替代物,而是应当明了在所要求的发明的范围内各种改进是可能的。因此,应当明了,虽然已通过优选实施方式和可选的特征具体地披露了本发明,但本领域技术人员可以利用本文所披露构思的改进和变化,并且这样的改进和变化被认为是包含在如所附权利要求所限定的本发明的范围内。

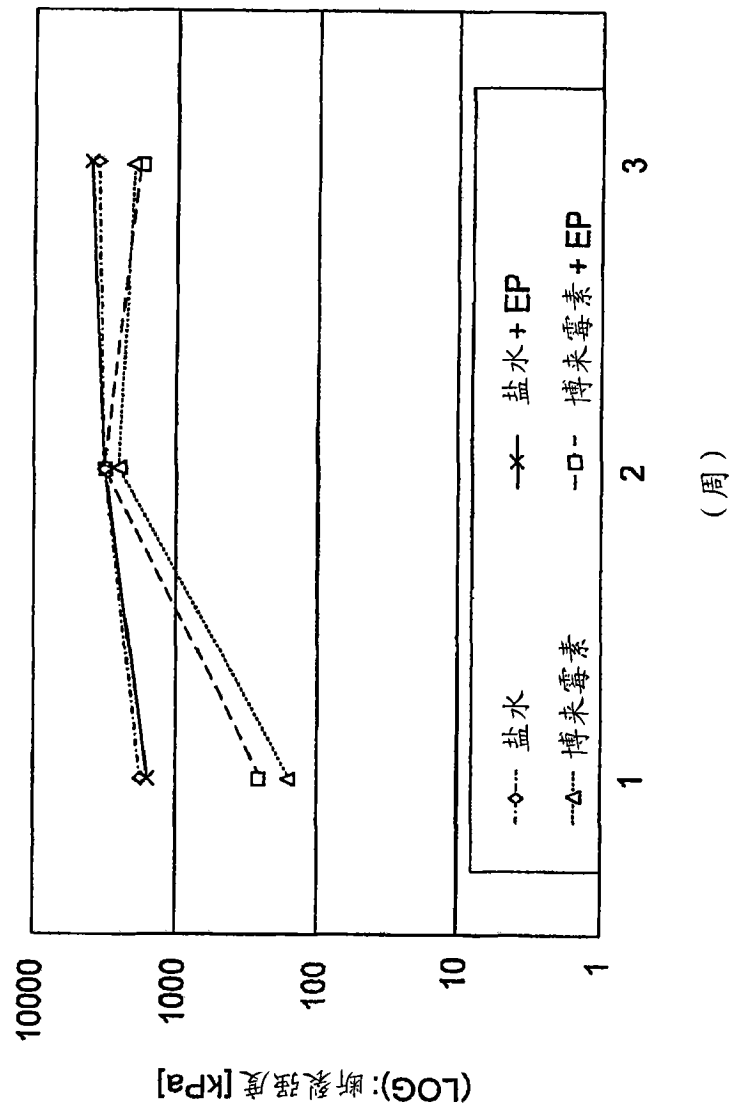


图 1

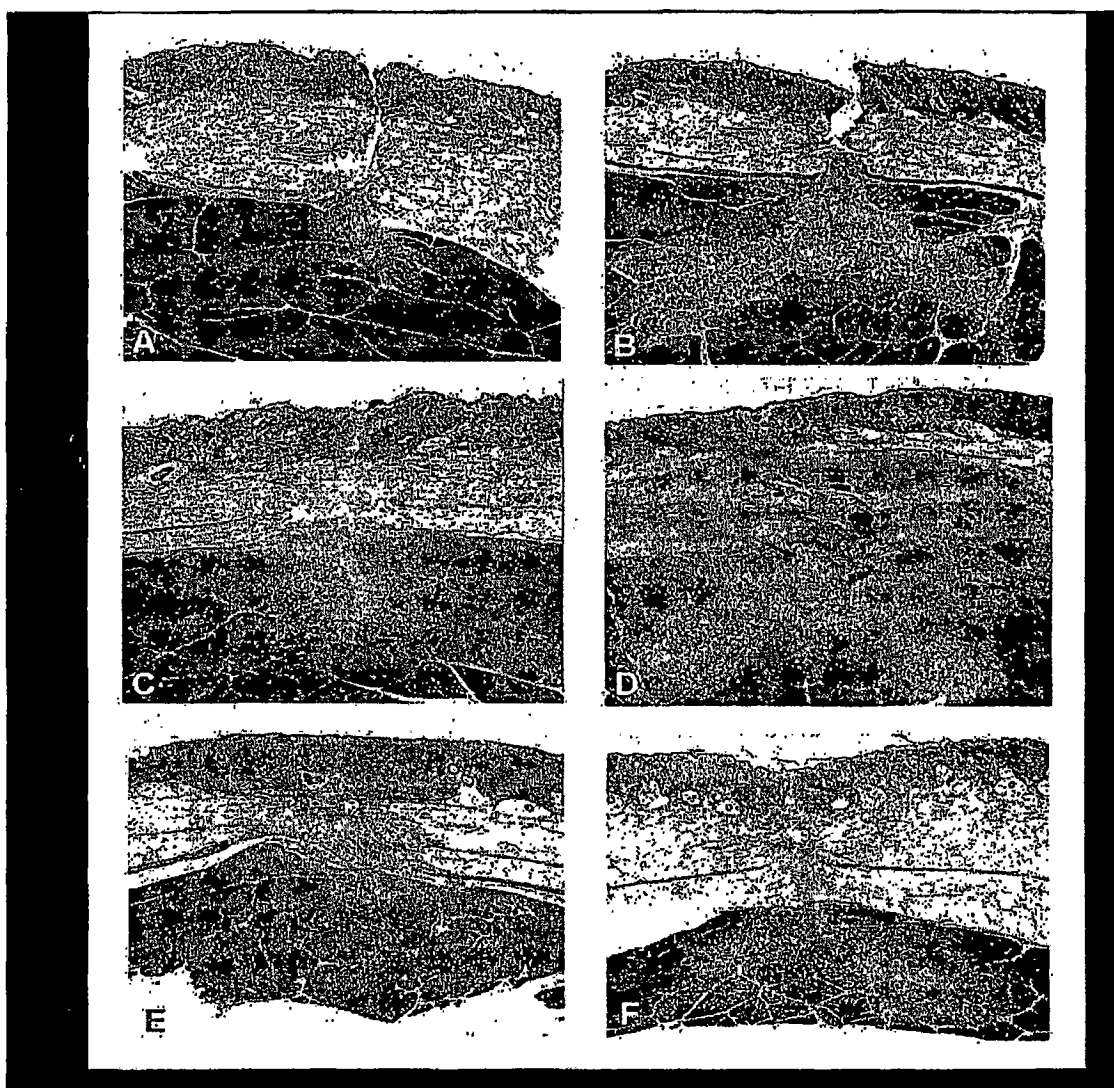


图 2

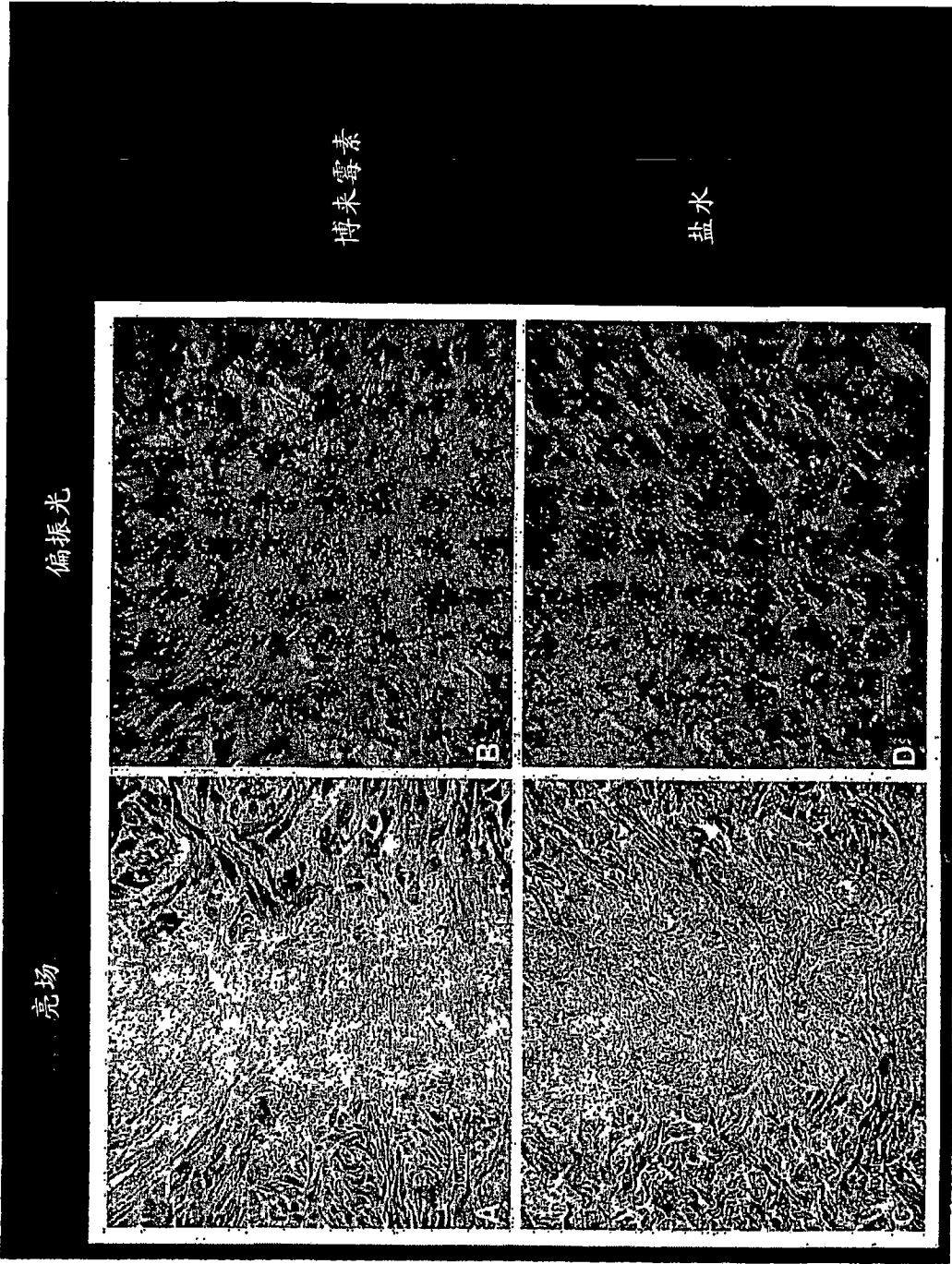


图 3

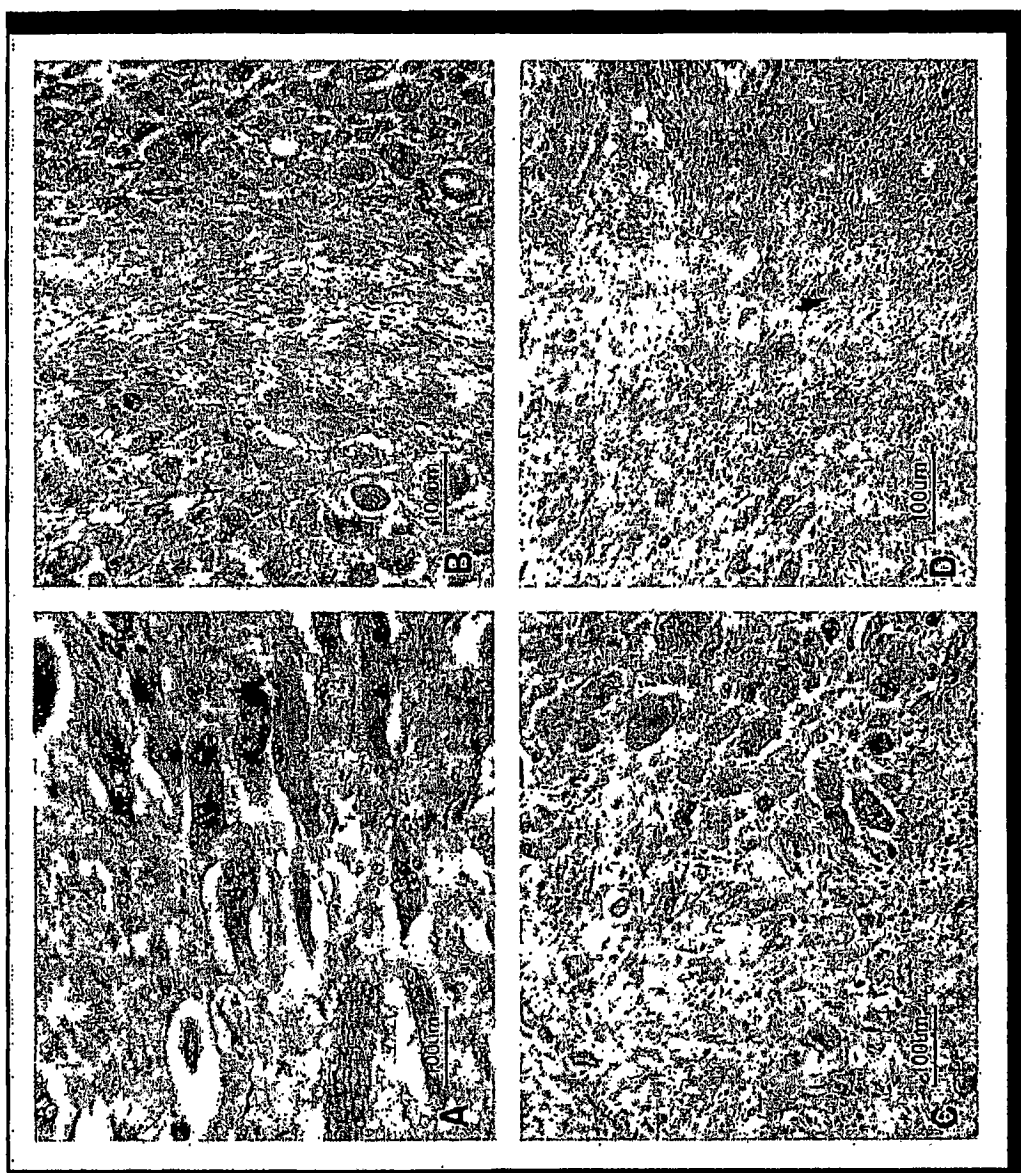


图 4

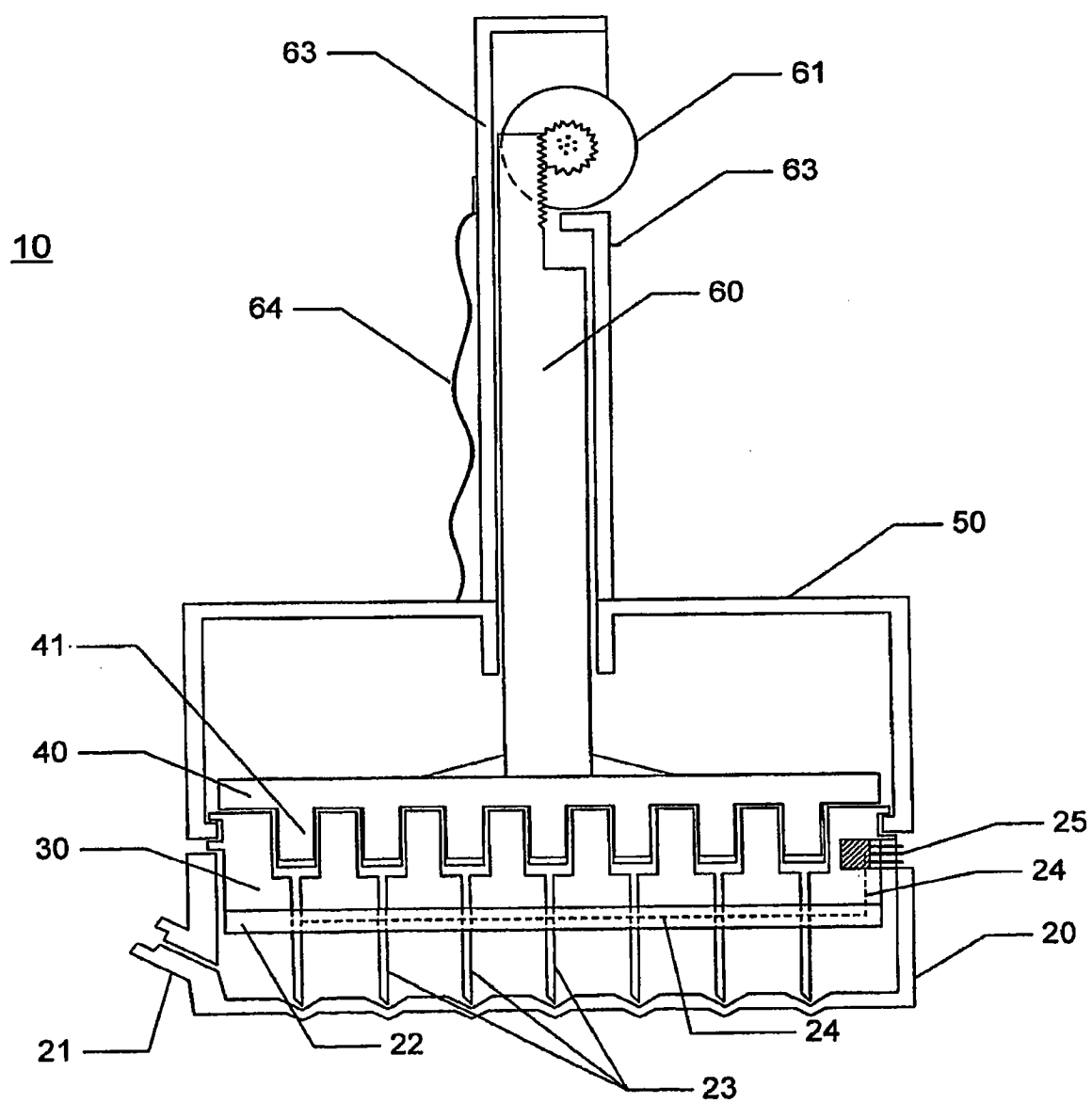


图 5



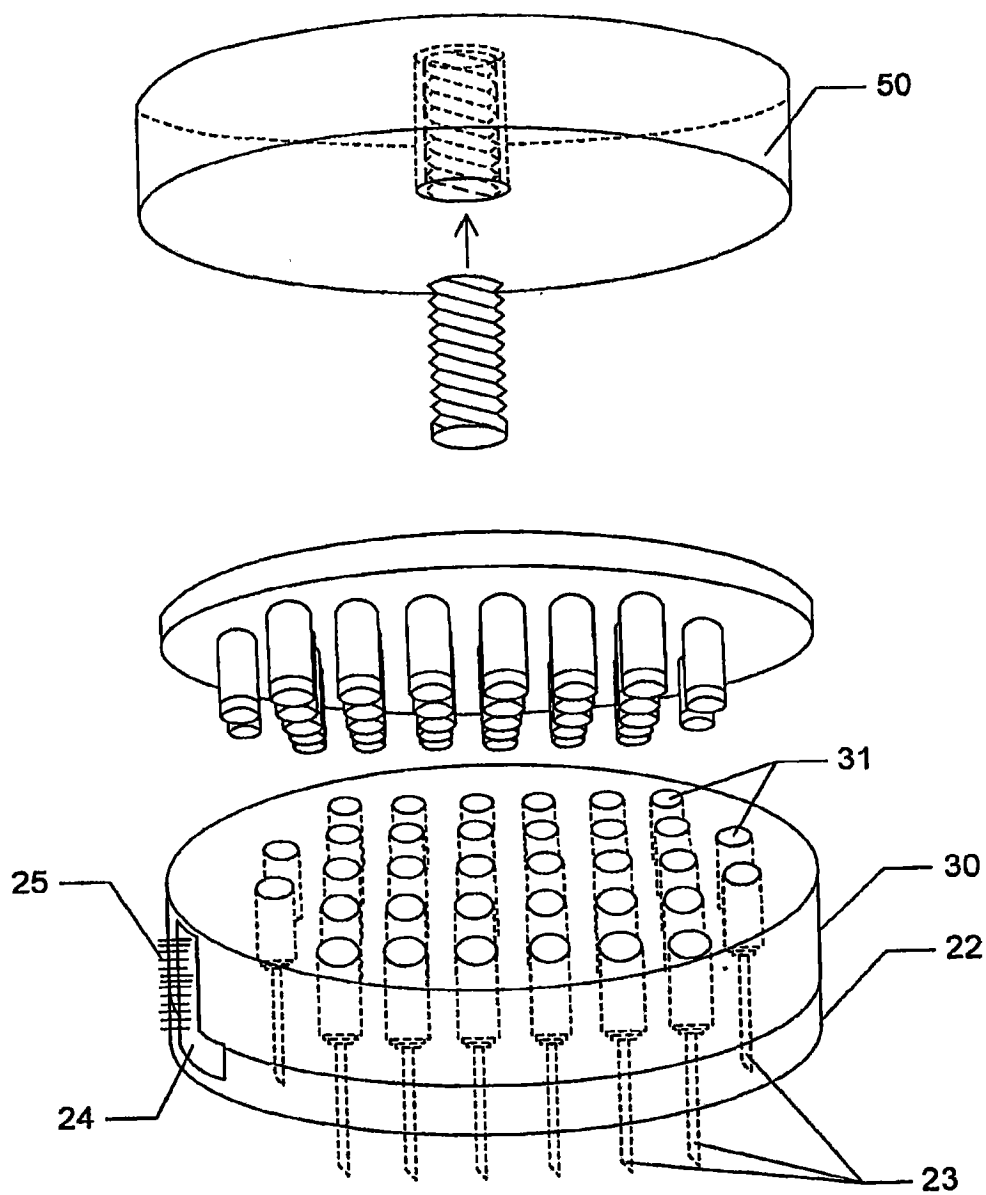


图 6

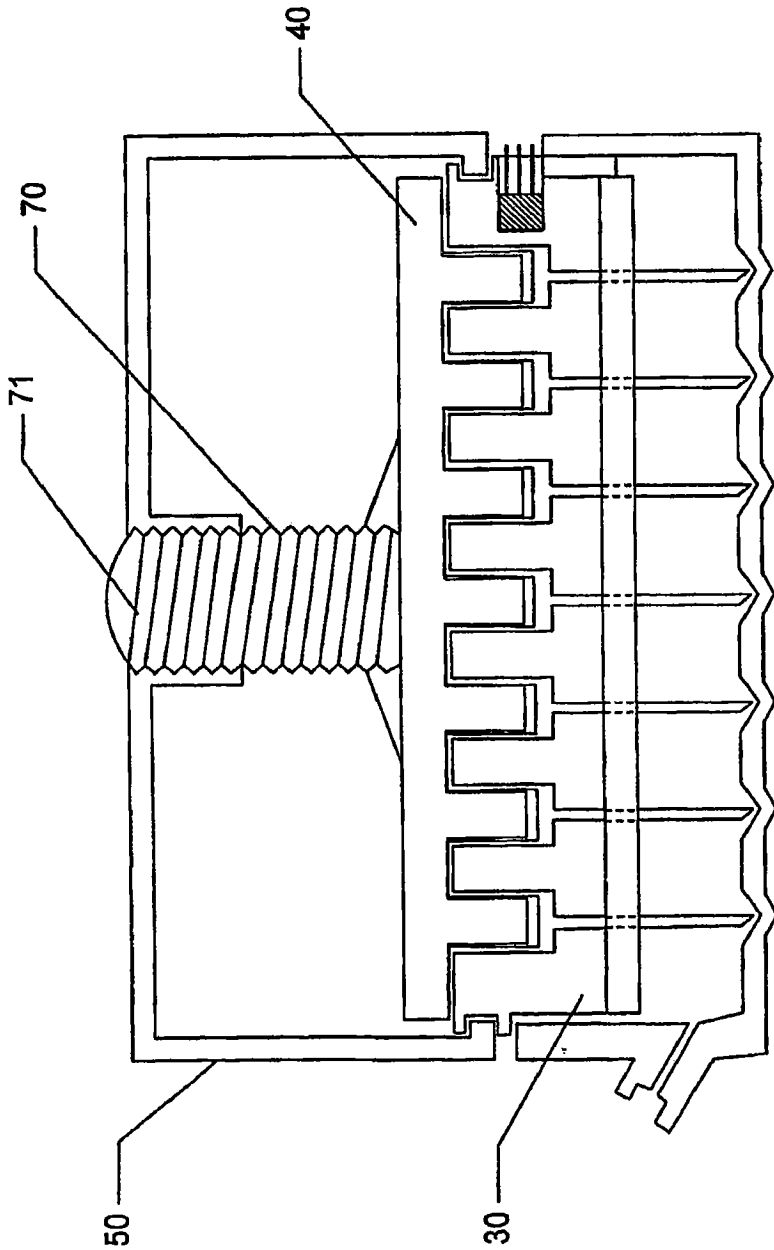


图 7

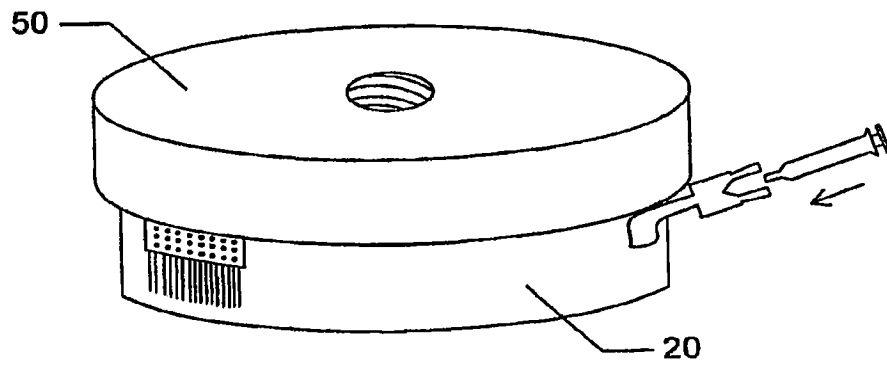


图 8A

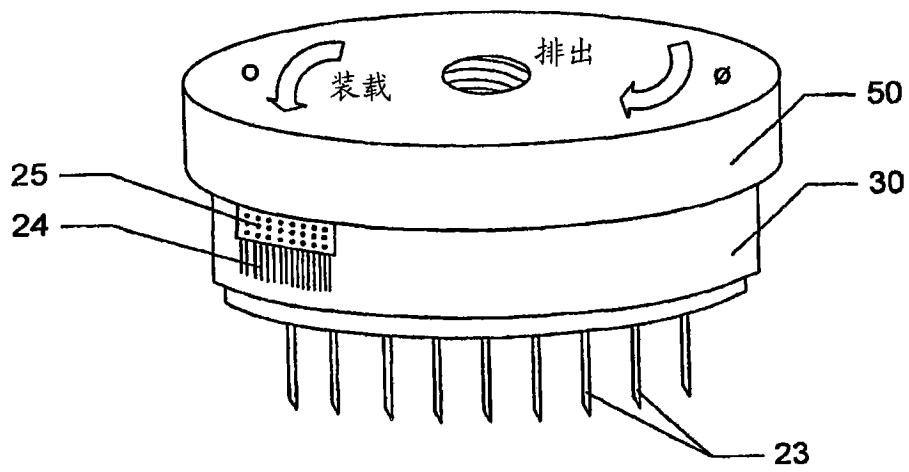


图 8B

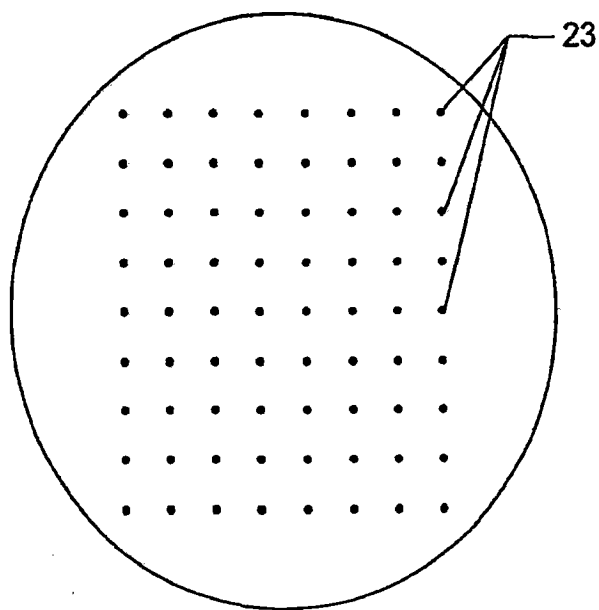


图 10

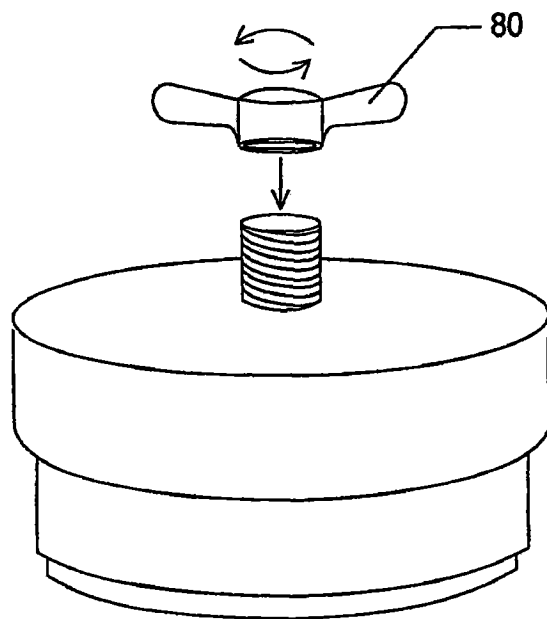


图 9



图 11A



图 11B

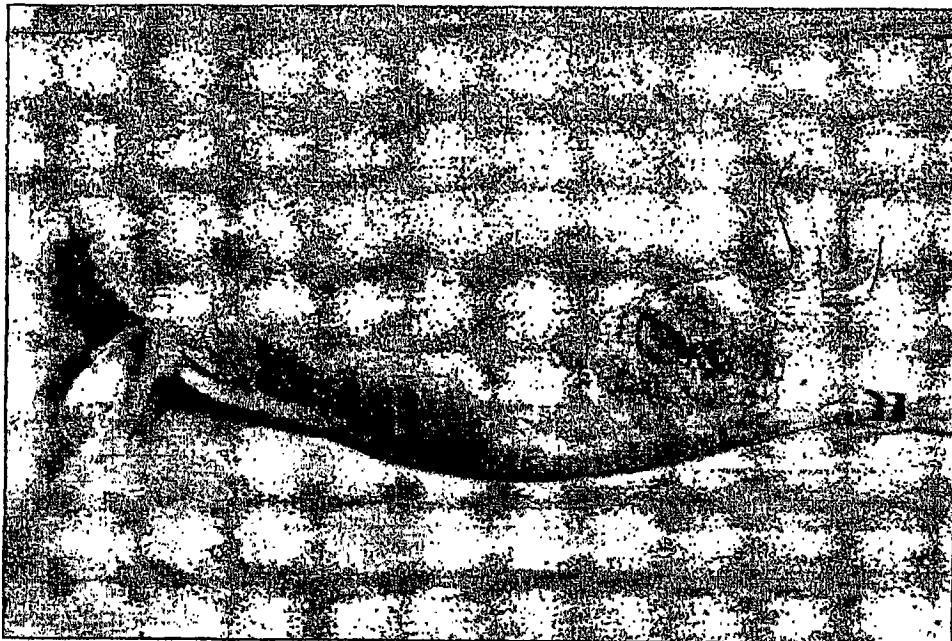


图 11C

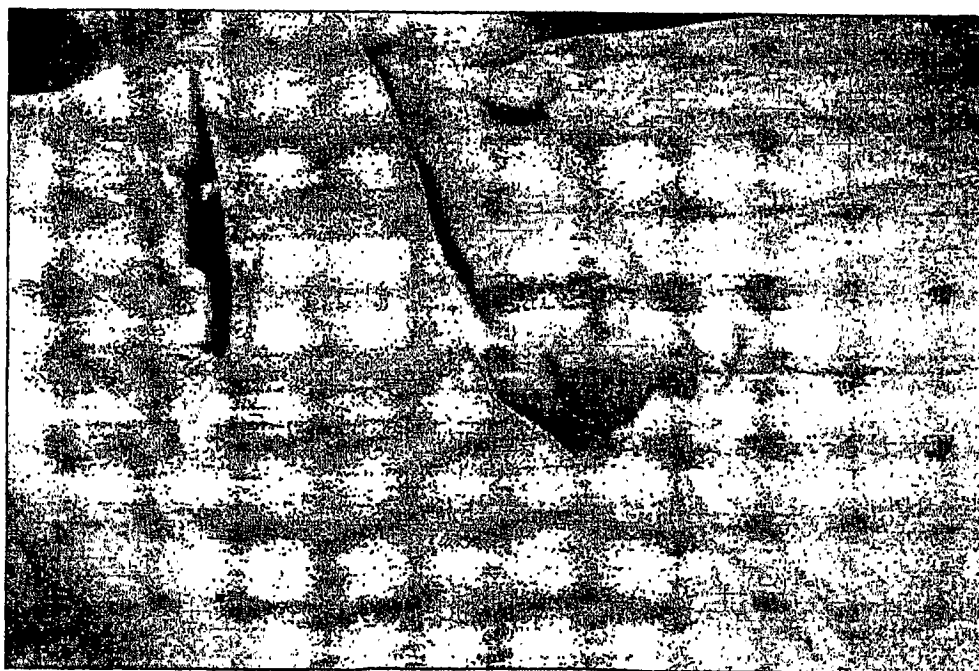


图 11D



图 12A



图 12B

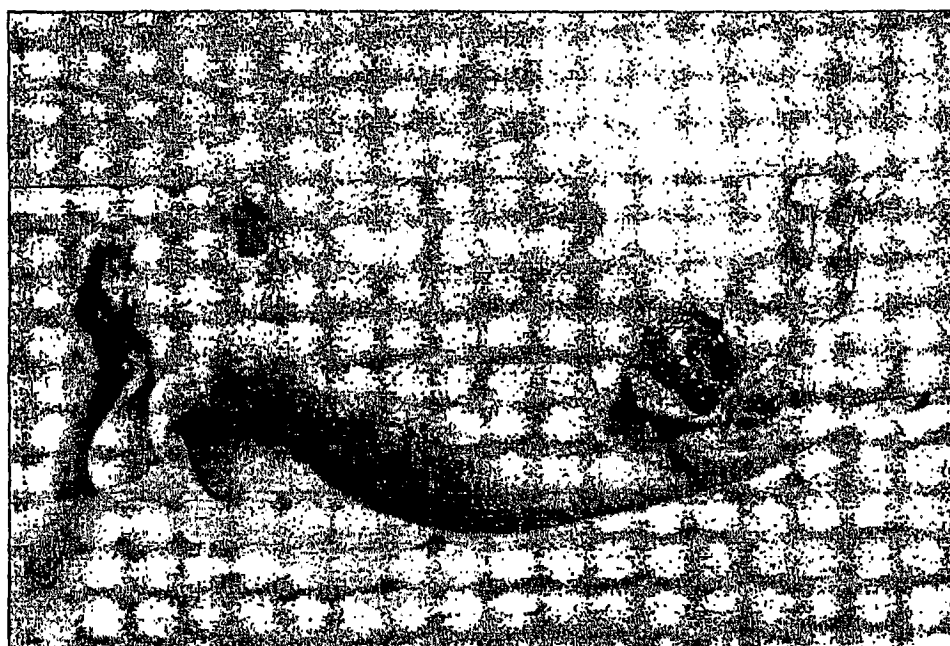


图 12C

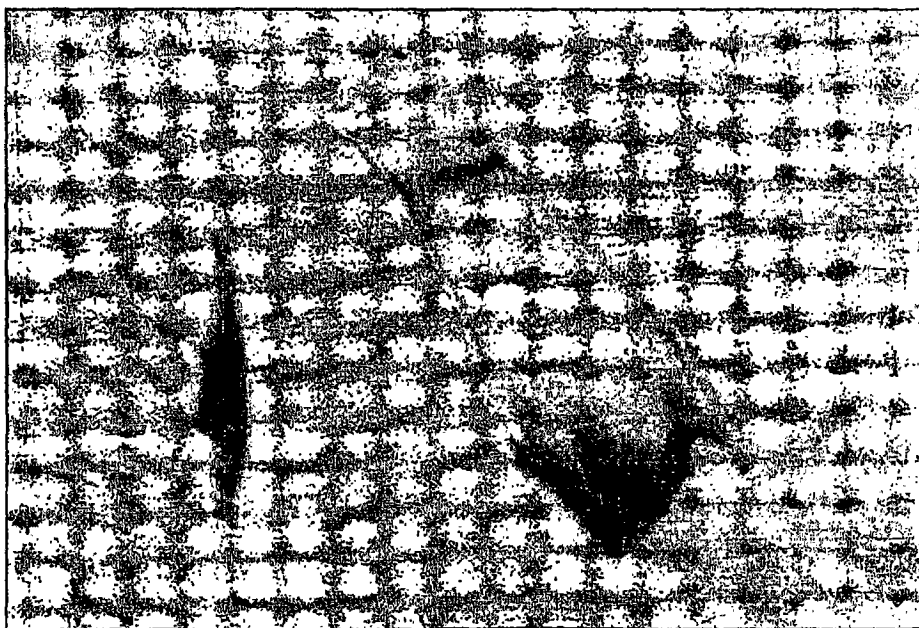


图 12D



图 13A





图 13B

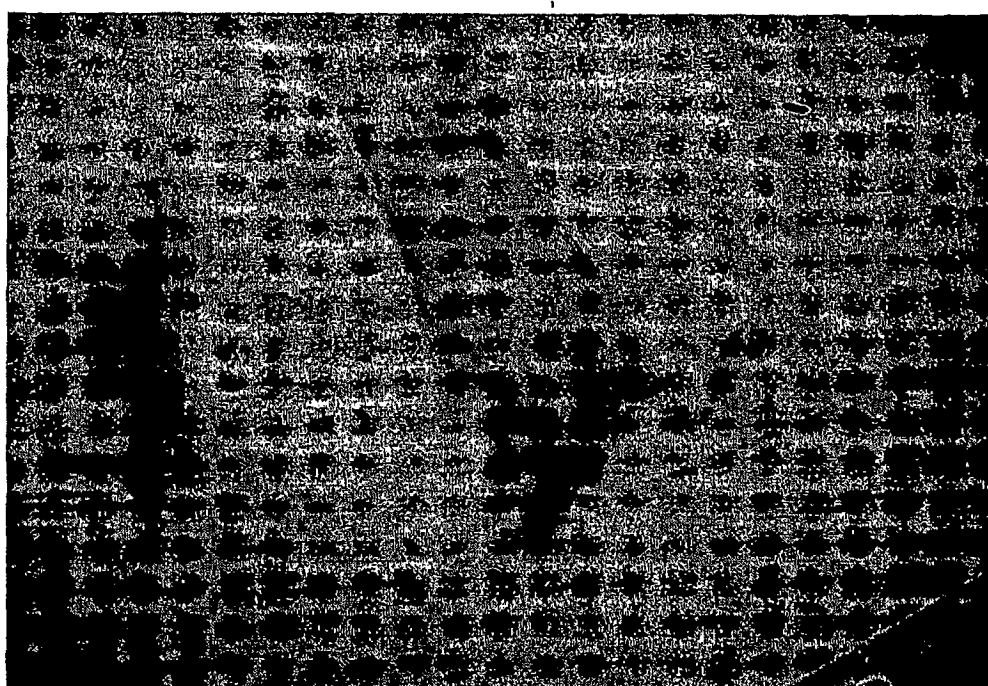


图 13C



图 14A



图 14B

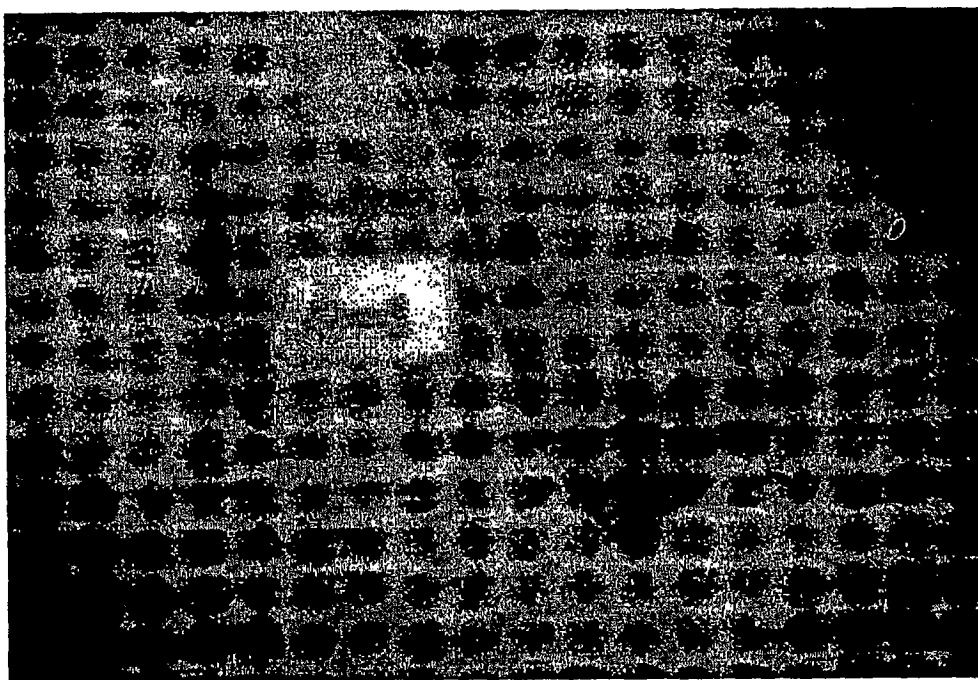


图 14C

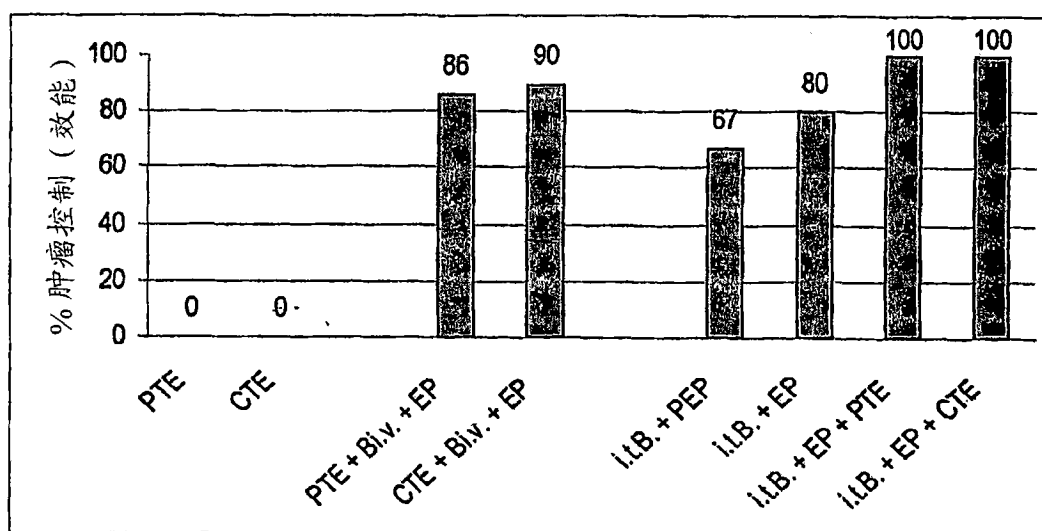


图 15