



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월18일

(11) 등록번호 10-1529448

(24) 등록일자 2015년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61N 1/30 (2006.01) A61M 37/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7014055(분할)

(22) 출원일자(국제) 2007년03월02일

심사청구일자 2014년05월26일

(85) 번역문제출일자 2014년05월26일

(65) 공개번호 10-2014-0081894

(43) 공개일자 2014년07월01일

(62) 원출원 특허 10-2008-7023591

원출원일자(국제) 2007년03월02일

심사청구일자 2012년02월29일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/005133

(87) 국제공개번호 WO 2007/103070

국제공개일자 2007년09월13일

(30) 우선권주장

60/778,740 2006년03월03일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020000076173 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

온코섹 메디컬 인코포레이티드

미국 (우편번호: 92121) 캘리포니아주 샌디에고  
서머스 리지 로드 9810 스위트 110

(72) 발명자

골드파브 폴

미국 캘리포니아주 샌 디에고 소렌토 밸리 로드  
11494

래버스세이 디트마

미국 캘리포니아주 솔라나 비치 노스 리오스 애버  
뉴 518

(74) 대리인

김명신, 박지하, 이동기

전체 청구항 수 : 총 6 항

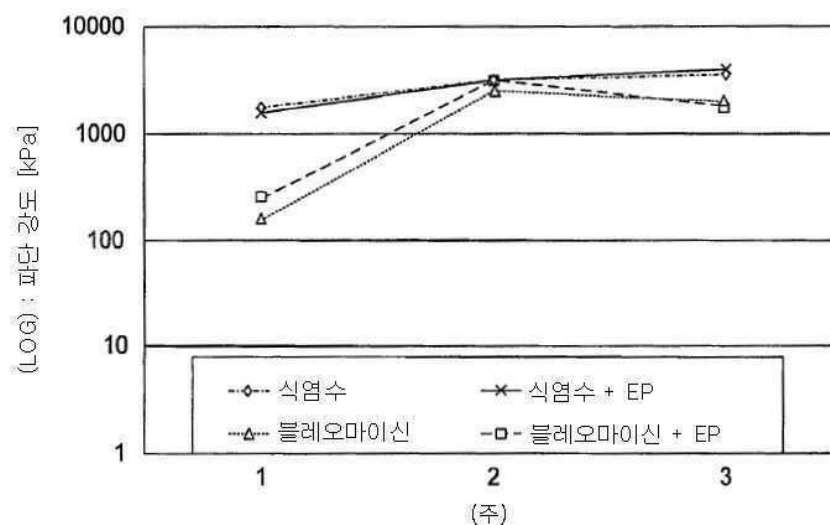
심사관 : 김의태

(54) 발명의 명칭 외과적 절제술 이후에 조직내 남아 있는 미세 잔류 종양을 치료하는 장치

### (57) 요약

본 발명은 암성 조직의 부위 및 근처에서 암의 재발 가능성을 감소시키고 암을 따라 절개된 명백하게 건강한 조직의 양을 감소시키기 위한 암성 종양의 부위 주변의 정상 조직을 치료하고, 종양 재발의 제거 또는 지연에 의해 암 환자에게 실질적으로 유익함을 제공하고 불필요한 상처를 회피하고 이의 기능에 대한 정상 조직을 그대로 두는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

절제된 종양 부위 주변 세포를 포함하는 포유류 조직에서의 치료 시스템으로서,

(a) 일렉트로포레이션 장치와,

(b) 치료물질을 포함하고,

상기 일렉트로포레이션 장치는 적어도 하나의 가변 부피 저장소로부터 유체를 상기 포유류 조직으로 전달할 수 있는 복수 전극들의 적어도 하나의 배열을 포함하되 상기 일렉트로포레이션 장치의 사용 동안에 상기 전극들이 상기 조직에 위치할 때 유체가 전달될 수 있고,

상기 일렉트로포레이션 장치는 상기 배열의 선택된 전극들 사이에 일련의 전기 펄스들을 전달하기 위해 제공되는 복수 전극들의 적어도 하나의 배열을 포함하며,

상기 일렉트로포레이션 장치는 종양 절제 부위 주변의 미리 선정된 변연 조직 내의 모든 조직들에 대해 일렉트로포레이션 펄스를 부여하도록 위치하고,

상기 일렉트로포레이션 장치의 전극들은 가늘고 긴 중공 니들들을 포함하고, 상기 일렉트로포레이션 장치는, 상기 중공 니들의 뾰족한 말단을 커버하고 상기 뾰족한 말단을 통해 상기 중공 니들들로 치료 물질을 송달하기 위한 메카니즘을 제공하기 위한 샤프 커버(sharps cover)를 포함하며,

상기 전극들은 단일 전극 쌍의 가전압(加電壓), 반대 전극 쌍(opposed pairs of electrodes)의 가전압, 순차적으로 상기 전극들의 선택된 부분을 가전압하는 것 및 동시에 상기 전극들의 선택된 부분을 가전압하는 것으로 구성된 군으로부터 선택된 미리 결정된 포맷으로 추가로 가전압되는 것을 특징으로 하는 절제된 종양 부위 주변 세포를 포함하는 포유류 조직에서의 치료 시스템.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 치료 물질은 블레오마이신, 시스플라틴, 폴리펩티드, 항체, RNAi, 안티센스(antisense) 핵산, 치료적으로 활성인 폴리펩티드를 코딩하는 발현성 유전자, 케모킨(chemokine) 및 시토킨(cytokine)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 치료 시스템.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 치료 물질은 상기 포유류 조직의 정맥내 또는 종양내로 송달되는 것을 특징으로 하는 치료 시스템.

#### 청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 RNAi, 안티센스 핵산 및 발현성 유전자는 폴리-L-글루타메이트 용액으로 제제화되는 것을 특징으로 하는 치료 시스템.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 종양 세포는 피부 조직내 암 세포, 포유류의 머리 또는 목에 위치한 암 세포, 및 흑색종 세포로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 치료 시스템.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 일렉트로포레이션 장치는 상기 포유류 조직에 일렉트로포레이션 전기 펄스를 인가하고 상기 일렉트로포레이션 전기 펄스는 1500 V/cm, 1200 V/cm, 800-1500 V/cm, 200-800 V/cm으로 구성된 그룹으로부터 선택된 명목 전기장 강도(nominal field strength)를 갖는 펄스를 포함하는 것을 특징으로 하는 치료 시스템.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 종양 부위 주변의 조직을 치료하기 위한 일렉트로포레이션 시스템(electroporation systems), 장치 및 상기 장치를 사용하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 일렉트로포레이션 펄스(electroporative pulses) 및 항암제로 명확한 비(非)암성 조직(non-cancerous tissues)을 치료함으로써 종양의 용적을 축소시키고 종양 주변의 조직을 그대로 두며 종양 크기 및 재발율을 감소시키는 것에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 하기의 설명은 본 발명을 이해하는데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 이러한 정보는 본원에 청구된 발명에 대한 종래 기술 또는 관련 기술이며, 참고로 특이적이거나 또는 함축된 공보는 종래 기술인 것으로 허용하지 않는다.

[0003] 혈관 질환을 제외하면, 암은 산업화된 국가에서 가장 높은 빈도의 사망 원인이다. 1개의 상대적으로 잘 정의된 조직을 포함하는 암 및 종양을 치료하는 종래에 허용된 실례는 외과적 제거와 조합된 방사선 및 화학요법의 사용을 포함한다. 외과적 절제술이 선택되는 경우, 수술은 통상 가장 효과적인 치료 형태이다. 그러나, 외과적 치료의 효율성은 주요 종양 뿐만 아니라 주요 종양 주변에 종종 존재하는 분기 및 전이암(micrometastases)을 포함하는 악성 조직의 완전한 제거에 좌우된다.

[0004] 주요 종양을 제거하는 경우, 외과적은 또한 종양 주변의 명백한 정상 조직을 절제함으로써 국소 또는 국부 전이 암을 제거할 것이다. 상기 조직을 "변연 조직(margin tissue)"이라 하거나 또는 간단하게 "변연(margin)"이라고 한다. 변연 조직이 제거되는 정도는 외과적의 판단에 따른다. 전형적으로, 전체 종양 주변의 0.5-2 cm 변연이 허용가능하다. 그러나, 더 광범위한 절제가 침습성 종양에서는 통상적이다. 종양 및 변연의 조심스러운 절제 이후에도, 대부분의 종양 형태는 10-40%의 빈도로 재발된다. 재발율은 종양 크기, 종양의 형태 및 위치, 환자의 상태 등을 포함하는 다수의 요인에 따라 좌우된다. 재발율을 감소시키기 위해서, 수술후에 통상 방사선 및/또는 화학요법을 실시한다. 상기 2차 치료에도 불구하고, 재발율은 불쾌하게도 여전히 높다.

[0005] 수술 및 방사선 뿐만 아니라, 다른 국소 종양 제어 방법이 사용되고 있다. 상기는 고주파 열절제술(Radiofrequency (RF) Ablation), 광역학 치료법(Photodynamic Therapy, PDT), 냉동요법(Cryotherapy, CRYO), 화학 - 방사선 요법(Chemo-Radiation, CR), 근접방사선치료(Brachytherapy, BT), 직류전기치료(Galvanotherapy, GT) 등을 포함한다. 수술, RF, PDT, CRYO 및 CR은 종양 및 변연 조직의 완전한 제거 또는 파괴할 수 있으며, 반면에 방사선, BT 및 GT는 치료된 정상 조직을 본래 형태로 남아 있게 하며, 방사선 및 BT는 심각한 반흔(scarring), 섬유증(fibrosis) 및 혈관 및 신경 손상을 일으킬 수 있다. 건강한 조직의 제거, 반흔 및 물리적 손상으로 상당한 흉터 및 신체 일부 및/또는 이의 기능의 물리적 사용의 실질적인 손실을 일으킬 수 있다. 예를 들면, 종양의 파괴 또는 제거를 위한 수술에 대해 상술된 대부분의 보조요법으로 종양 주변의 정상 조직에 비특이적 손상을 일으킨다. 종양의 절개는 혀, 성대, 직장, 음순, 음경을 포함하는 기관으로부터 또는 안면 조직의 미세 근육 및 시각 구조까지 종양이 제거되어야 하므로 기능이 완전히 약해질 수 있다.

[0006] 흉터를 피하고 기능을 보존한 종양 주변 조직에서 상기 암성 세포를 제거하도록 하기 위해서, 본 발명은 종양학 분야에서 여전히 요구되는 수술에 대한 보조요법 또는 선행요법(neo-adjuvant)으로서 종양 주변에 있는 명백하게 건강한 조직을 그대로 두면서 종양, 종양 성장 및 재발율을 감소시키는 장치 및 방법을 제공한다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2000-0076173호 (2000.12.26)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 종양 부위 주변의 조직을 치료하기 위한 일렉트로포레이션 시스템(electroporation systems), 장치 및 상기 장치를 사용하는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0009] 본 발명은 종양학 분야에서 여전히 요구되는 수술에 대한 보조요법 또는 선행요법(neo-adjuvant)으로서 종양, 종양 성장 및 재발율을 감소시키는 장치 및 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0010] 본 발명은 일렉트로포레이션 펄스(electroporative pulses) 및 항암제로 명확한 비(非)암성 조직(non-cancerous tissues)을 치료함으로써 종양의 용적을 축소시키고 종양 주변의 조직을 그대로 두며 종양 크기 및 재발율을 감소시키는 일렉트로포레이션 시스템(electroporation systems) 및 장치를 제공하는데 그 목적이 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0011] **발명의 요약**
- [0012] 제1 실시양태에서, 본 발명은 조직에서 암 세포 성장의 재발 가능성을 감소시키는 방법을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 방법은 전기 에너지의 일렉트로포레이션 펄스 및 약제를 상기 조직의 세포로 제공하는 단계를 포함한다. 관련 실시양태에서, 약제는 일렉트로포레이션 펄스 직전 또는 동시에 조직으로 제공되는 것이 바람직하다.
- [0013] 제2 실시양태에서, 본 발명은 외과적 절제술 이후에 조직에 남아 있는 잔류 암성 세포를 치료하는 방법을 포함한다. 바람직하게, 본 발명은 일렉트로포레이션 전기장에서 미세 결절성 병변(microscopic nodules) 또는 다른 형태의 암성 조직을 약제로 처리함으로써 암이 추가로 퍼지는 것을 제어하기 위해서 제공된다. 관련 실시양태에서, 상기 치료는 종양 제거 이전 또는 이후에 적용된다는 점에서 수술에 대한 보조요법일 수 있다. 특히 암성 세포가 섬유질로 아직 형성되지 않은 몇가지 상황에서, 수술 절차는 사용되지 않을 수 있다. 상기 경우에, EP 치료는 종양을 감소시키고 조직에서 암성 세포의 추가의 성장을 종결 또는 지연시키는 방법을 제공한다. 부가의 관련 실시양태에서, 본 발명의 방법은 블레오마이신(Bleomycin)과 같은 항암제의 효과를 통해서 더 큰 종양의 용적을 축소시키고 건강하거나 정상인 조직 주변으로부터 종양을 용이하게 제거할 수 있도록 종양 조직을 "연화(softening)"시킬 수 있다.
- [0014] 제3 실시양태에서, 본 발명의 방법은 종양 절개 시에 제거되어야 하는 종양 부위 주변의 정상 조직, 예컨대 "변연" 조직의 양을 감소시킴으로써 정상 조직을 그대로 유지할 수 있어서 조직 기능 및 외관의 보유력을 크게 제공한다.
- [0015] 다른 실시양태에서, 본 발명은 요구시에 용이하게 수술가능한 방법으로 절개된 종양 주변의 조직에 일렉트로포레이션 에너지 펄스를 제공할 수 있는 장치를 제공한다. 관련 실시양태에서, 본 발명의 장치는 변연 영역에서 조직의 일렉트로포레이션하기에 충분한 전기장의 처방 및 항암제의 투여를 제공한다. 또한 본 발명 장치의 실시양태는 하기에 제공된다.
- [0016] 본 발명의 다른 특징 및 잇점은 하기의 도면, 상세한 설명 및 첨부된 청구의 범위에 의해서 명확할 것이다.

### 발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따르면, 암성 조직의 부위 및 근처에서 암의 재발 가능성을 감소시킬 수 있고, 암성 종양의 부위 주변의 정상 조직을 치료할 수 있으며, 종양 재발의 제거 또는 지연에 의해서 암 환자에게 실질적으로 유익함을 제공하면서 불필요한 상처를 회피할 수 있는 장점이 있다. 특히, 본 발명은 일렉트로포레이션 펄스(electroporative pulses) 및 항암제로 명확한 비(非)암성 조직(non-cancerous tissues)을 치료함으로써 종양의 용적을 축소시키고 종양 주변의 조직을 그대로 두면서 종양 크기 및 재발율을 감소시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0018] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 처리된 1 이상의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)을 갖는 본 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 수수료를 포함하는 청구시에 미국 특허청에 의해 제공될 것이다.

도 1은 식염수, 식염수 + 일렉트로포레이션, 블레오마이신, 및 블레오마이신 + 일렉트로포레이션으로 생체내에서 처리된 치료된 피부 샘플의 파단점(breaking point of healing skin samples)에 의해서 측정된 창상 강도(wound strength)를 나타내는 그래프이다. 기본적인 지방 및 근 조직이 또한 본 실험에서 치료되었다.

도 2A-2F는 (A) 절개 2일 후 치료되지 않은 조직, (B) 절개 2일 후 식염수 + 일렉트로포레이션으로 치료된 조직, (C) 2주에 식염수 + 일렉트로포레이션, (D) 2주에 블레오마이신 + 일렉트로포레이션, (E) 3주에 식염수 + 일렉트로포레이션, 및 (F) 3주에 블레오마이신 + 일렉트로포레이션 사이의 비교를 나타내는 트리크롬(trichrome) 염색된 조직의 현미경 사진이다.

도 3A-3D는 3주후 피부 절개시 콜라겐 침착의 염색된(트리크롬) 현미경 사진이다. 도 3A 및 3C는 각각 블레오마이신 및 식염수 처리된 피부 조직에 대한 명시야 촬상(bright field images)이며, 도 3B 및 3C는 각각 블레오마이신 및 식염수 처리된 피부 조직을 나타내는 편광 촬상이다.

도 4A-4D는 절개 3주 후에 근조직의 샘플을 나타내는 현미경 사진이다: (A) 식염수, (B) 식염수 + 일렉트로포레이션, (C) 블레오마이신 및 (D) 블레오마이신 + 일렉트로포레이션.

도 5는 전극 니들을 통해 물질의 적하(loading) 또는 분배(dispensing)를 실시하는 플런저 배열(array of plungers)을 올리거나 내리는 섀플(thumb wheel)을 포함하는 핸들을 포함하는 실시양태를 나타내는 본 발명의 장치의 하나의 실시양태의 단면도이다.

도 6은 본 발명의 하나의 실시양태의 확대도를 나타내는 도면이다.

도 7은 본 발명의 장치의 하나의 실시양태의 단면도이며, 플런저는 하우징(50)의 시계 방향 회전(플런저를 올림) 및 시계 반대 방향 회전(플런저를 내림)에 의한 스크류 구동에 의해서 작동된다.

도 8a 및 8b는 본 발명의 하나의 실시양태의 투시도이며, 하우징(50)의 회전은 플런저 배열을 전후로 구동시킬 것이다. 도 8a는 트레이(20)를 갖는 실시양태를 나타내며, 도 8b는 트레이(20)를 갖지 않는 실시양태의 주요 바디(body)를 나타낸다.

도 9는 본 발명의 하나의 실시양태를 나타내는 투시도이며, 플런저 배열은 wing 너트(wing nut)에 의해서 작동된다.

도 10은 기관(22)의 하부면으로부터 다수의 전극 니들 배열의 예를 나타낸다.

도 11a, 11b, 11c 및 11d는 종양을 갖는 시험 동물(A), 종양을 완전히 제거하기 이전에 외과적으로 노출된 종양(B), 종양 제거 후 sham EP(sham EP) 이전에 개방된 창상 베드(open wound bed)(C), 및 치료 3주후 외과적/치료 부위(D)를 나타내는 그룹 2 코호트 동물(Group 2 cohort animals)의 사진이다. 상기 그룹 2에서, 일렉트로포레이션은 실시되지 않았으며, 종양을 통해서 재발된 종양은 완전하게 제거된다.

도 12a, 12b, 12c 및 12d는 종양을 갖는 시험 동물(A), 종양을 완전히 제거하기 이전에 외과적으로 노출된 종양(B), 종양 제거 후 EP로 처리되기 이전에 개방된 창상 베드(C), 및 치료 3주후 외과적/치료 부위(D)를 나타내는 그룹 1 코호트 동물의 사진이다. 블레오마이신-EP 치료로 관찰된 바와 같이, 치료 부위에서 종양이 재발되지 않았다.

도 13a, 13b 및 13c는 종양을 갖는 시험 동물(A), 일부 종양 제거 이후(B), 및 치료 3주후 외과적/치료 부위(C)를 나타내는 그룹 7 코호트 동물의 사진이다. 3주시에 마우스는 종양의 오직 일부만을 제거했음에도 불구하고 종양의 재발을 나타내지 않았다.

도 14a, 14b 및 14c는 종양을 갖는 시험 동물(A), 일부 종양 제거 이후(B), 및 치료 3주후 외과적/치료 부위(C)를 나타내는 그룹 4 코호트 동물의 사진이다. EPT 없이, 종양이 계속 성장한다.

도 15는 표 5에 제시된 데이터의 막대 그래프를 나타낸다. PTE는 일부 종양 절개를 나타내며, CTE는 완전한 종양 절개를 나타내고, Bi.v.는 시험 동물의 정맥으로 투여된 블레오마이신을 의미하며, EP는 일렉트로포레이션을 의미하고, i.t.B는 종양내로 투여된 블레오마이신을 나타내며, PEP는 부분 일렉트로포레이션을 의미한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 바람직한 실시양태의 상세한 설명

당분야의 통상의 지식을 가진 사람이 이해하는 것과 같이, 하기의 설명은 본 발명의 특징의 바람직한 실시양태

[0019]

[0020]

를 상세하게 기술하며, 이는 본 발명의 실제 범위를 단지 설명하는데 있으며 서술한 것은 아니다. 본 발명을 상세하게 기술하기 이전에, 본 발명은 기술된 특정 장치 배열, 시스템 및 방법론에 한정되지 않는 것으로 이해되며, 이들은 가변될 수 있다. 또한, 본원에 사용된 용어는 특정 실시양태를 기술하기 위한 목적으로 사용되며, 첨부된 청구의 범위에 의해서 정의된 본 발명의 범위를 한정하지 않는 것으로 이해된다.

[0021]

## 개요

[0022]

전기화학요법(Electrochemotherapy, ECT)으로 알려져 있는 일렉트로포레이션 요법(Electroporation Therapy, EPT)은 국소 암성 병변 및 종양을 치료하는 방법이다. 상기 방법은 특정 화학요법 약물, 가장 통상적으로는 블레오마이신을 종양내 또는 정맥으로 투여하는 단계를 포함한다. 대부분의 경우에, 일렉트로포레이션(EP)은 이들 전극 배열을 삽입하고 상기 전극으로부터 나오는 펄스된 전기장을 암성 세포로 직접 송달함으로써 실시된다. 펄스 파라미터(pulse parameters)는 통상 하기 범위내에 있다: 전기장 강도(field strength) 200-2000 V/cm; 펄스 길이(pulse length) 0.1-10.0 ms; 펄스 수(pulse number) 2-20; 및 펄스 주파수(pulse frequency) 1-5 Hz. 상기 전기장을 적용함으로써 항암제가 세포로 도입되며 종양 세포막의 침투성이 일렉트로포레이션 부재하에 관찰되는 것보다 약제의 흡수율에 의한 세포독성이 5000배 더 높아진다. EPT는 동물에서 많은 고형 종양 형태 및 사람에서 몇가지 형태의 종양에 대해 효과적인 것이 개시되었다. 사실상, 머리 및 목의 비늘상 세포 암종의 치료를 위한 EPT의 안전성 및 효율을 평가하는 3상 연구를 포함하는 몇가지 임상 연구가 현재 진행중이다. 그러나, 상기 치료 연구는 암성 세포와 동시에 비암성 변연 조직상에서 EPT의 영향을 치료하거나 또는 시험하는 고안 또는 의도는 없었다.

[0023]

EPT는 악성 조직에서보다 정상 조직을 덜 손상시키는 국소 및 국부 종양 제어를 위해서 사용된 수많은 방법 중에서 다소 독특하다. 시험관내 뿐만 아니라 생체내 동물 및 사람 연구로부터의 결과는 약제, 가령 블레오마이신을 사용하는 EPT는 세포자멸(apoptotic) 및 괴사성(necrotic) 기작을 통해 대부분의 종양을 효과적으로 파괴하고 특히 블레오마이신 농도, 투여량 및 펄스 파라미터가 적당한 범위내에 있는 경우 종양 주변의 정상 조직에 작은 효과(염증, 작은 괴사)를 일으킨다. 전형적인 치료로 보정할 수 있는 종양 주위의 변연 조직은 한정되지는 않지만 흉부, 전립선, 혀, 음경, 음순, 직장, 성대, 간, 머리 및 목의 편평세포암종(SCCHN), 피부 및 기타 종양을 포함한다. EPT는 종양이 제거되거나 또는 제거되지 않은 상기 조직에서 실시될 수 있다. 상기 암에서, 환자는 치료가 광범위하게 손상을 일으키지 않으면서 실시되고 국소 재발이 일어나는 조직으로 미세 전이 및 종양 지류의 제거 가능성인 방식으로 상기 조직을 치료함으로써 실질적으로 도움을 받는다. 또한, 본 발명의 방법에 관련하여 이해가능하며, 블레오마이신과 같은 제제와 일렉트로포레이션 치료는 표적 암성 세포에서 측정가능한 선택도를 제공한다. 상기 방법은 또한 특정 질환 상태, 가령 감염되거나 또는 질병에 걸린 세포 또는 세포 그룹은 영향을 받은 세포를 파괴하기 위해 제제에 의해서 표적으로 삼을 수 있는 감염되거나 또는 질병에 걸린 조직의 병소인 매우 국소된 감염성 질환 및 다른 질환 상태에 특이적 활성을 갖는 다른 제제에 의한 치료 방법에 관한 것이다. 상기 경우에, 상기 세포 및 주변 조직의 일렉트로포레이션으로 상기 제제는 감염되거나 또는 질병에 걸린 세포에서 이의 의도된 표적에 도달될 것이며, 경험적으로 관찰된 바와 같이 감염되지 않거나 또는 정상 세포에 있어서 유해한 효과를 갖지 않는다. 비정상 및 정상 세포의 상이한 반응에 기초한 분자 및 세포 기작은 현재 알려져 있지 않다. 또한 본 발명의 방법 및 장치의 사용은 암성 세포의 부위가 영역에 분포되어 있는 질환 상태로 적용가능하지만 수술에 대해 용이하게 보정가능하지 않다. 예를 들면, 미세 또는 중심 질환 부위를 포함하는 안면의 피부 조직은 변연 조직 층을 치료하기 위해서 사용되는 것과 동일한 방식으로 본 발명의 장치로 치료되어 외과에 의해서 실시되는 것보다는 반흔이 실질적으로 더 적다. 그러므로, 본 발명의 방법은 수술에 대한 보조요법 또는 선행요법으로 사용될 수 있다. 특이적으로, 종양 세포는 주변 정상 조직을 따라 일렉트로포레이션됨으로써 질병에 걸린 세포의 성장 및/또는 재발율을 감소시키거나 저해, 종결시키는 기작을 제공함으로써 종양의 용적 축소시키는 방법을 제공한다. 상기 경우에, 종양 조직은 EPT 이전 또는 이후에 제거될 수 있거나, 또는 EPT 이후에 절개되지 않은 상태로 남아 있으며, 상기 경우에, 블레오마이신과 같은 제제의 영향으로 세포자멸 및/또는 괴사성 기작 및 종양의 연화 이후에 추가의 괴사에 의해서 세포 사멸을 제공할 것이다. 주변 정상 조직은 대부분 영향을 받지 않고 남아 있을 것이다.

[0024]

전형적으로, EPT에 의한 종양의 치료는 치료될 조직 1cc당 1 유닛(unit)의 블레오마이신 투여량을 포함하며, 4 유닛/ml의 농도에서 종양내로 주입된다. 상기 전기장은 4 Hz에서 통상 6개의 개별 펄스로 적용되도록 펄스된 전기장이 발생되며, 각각은 6개의 상이한 전기장 배향에 있으며, 각각은 200-2000 V/cm, 통상 600-1500 V/cm, 더 통상 600-1400 V/cm, 좀더 통상 1200-1300 V/cm의 종양의 명목 전기장 강도에서 100 usec 기간 실시된다. 블레오마이신 투여량 또는 농도의 증가 및 표준 파라미터를 넘어선 일렉트로포레이션 펄스의 세기를 증가시킴으로써 정상 조직에 심각한 영향을 줄 것이다. 매우 높은 전기장, 강도 및/또는 펄스 길이에서 EP 자체(예컨대,

블레오마이신 처리 없음)는 비가역적 세포막의 저하를 유도하여 유효 전기장내에 있는 종양 뿐만 아니라 정상 세포 조직의 파괴를 일으킨다. 부가의 관련 실시양태에서, 본 발명의 방법을 실시하는 장치는 US 특허 제 6,528,315호에 기술된 바와 같은 치료제로서 DNA를 주입하는 경우 1-600 V/cm의 펄스된 전기장 강도를 사용하여 작동될 수 있으며, 상기 문헌은 참고문으로 전문이 통합된다. 상기 실시양태에서, DNA는 이상적으로 치료될 종양-함유 조직에 치료적인 항암 효과를 제공하는 폴리펩티드를 코딩한다.

[0025]

유전자, 단백질, 시토킨, 케모킨, 스테로이드, 항체, RNAi 및 안티센스 핵산을 포함하는 다른 제제와 관련하여, 동일한 높은 펄스 파라미터가 사용될 수 있다(예컨대, 예를 들면 800-1500 V/cm 또는 선택적으로 1-600 V/cm, 더 바람직하게 200-600 V/cm, 좀더 바람직하게는 400-600 V/cm). 악성 세포의 성장을 촉진하지 않으면서 상기 제제가 상처 치료를 촉진하는 상기 및 다른 제제가 사용될 수 있는 것으로 이해된다. EPT에서 상기 제제를 사용하는 것과 관련하여, 50 V/cm 이하의 하한 전기장 강도가 사용되어 비정상 조직을 형성하지 않는 미세 병변 및 질병에 걸린 세포를 포함하는 조직내 세포를 일렉트로포레이션한다.

[0026]

상술된 바와 같이, 본 발명의 암 치료에 대한 근거는 하나의 실시양태에서 환자에 있어서 생물학적 스트레스를 감소시키기 위한 종양의 외과적 제거(용량 축소술), 미세전이 및 침습 종양 조직을 근절하기 위한 변연 조직의 외과적 제거, 및 국소, 국부 및 전신 종양을 제어하기 위한 방사선 및/또는 화학요법을 포함한다. 종양 자체의 외과적 제거는 통상 심각한 후유증 없이 환자에 대한 고통을 경감시키고, 다음 단계의 변연 절제술, 방사선 및 화학요법은 환자에게 매우 유해하다. 생리적 및 기계적 기능, 외관, 수명의 질 및 결과는 상기 치료에 의해서 심각한 영향을 받을 수 있다. 그러므로, (a) 본 발명의 방법보다 더 효과적으로 미세전이 및 침습성 종양 조직에 의한 종양 재발의 방지 및 (b) 주변 변연 조직의 손실을 최소화하는 치료 방법과 종양의 외과적 제거를 조합하는 것이 이상적이다. 본 발명에서, 수술 보조요법 또는 선행요법으로서 EPT의 신규한 적용으로 종양의 감소를 달성하고, 종양 재발을 방지하며, 변연 조직을 절개하는데 요구되는 사향을 최소화한다.

[0027]

현재 본 발명의 방법으로 되돌아와서, 본 발명은 절개된 암성 세포의 부위 주변의 정상 조직에서 종양 성장의 재발 가능성을 낮추는 신규한 방법을 제공한다. 즉, 본 발명의 방법은 암 세포, 가령 구별된 조직 부위에서 전형적으로 형성된 암성 세포의 부위 주변의 조직의 "변연"을 치료하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 종양 및 이의 암성 세포를 따라 절개되어야 하는 조직의 양을 감소시키며 방사선 또는 화학요법을 과잉으로 실시하는 단계를 제공한다. 상기 방법은 전기 에너지의 일렉트로포레이션 펄스를 종양 부위 주변 조직으로 적용하는 단계를 포함한다. 일렉트로포레이션 펄스의 적용 뿐만 아니라, 상기 방법은 바람직하게 전기 펄스 이전 또는 동시에 항암제를 포함하는 제제를 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 약제는 생물학적 활성 분자를 포함한다. 예를들면 상기 약제는 발현성 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 가령 예를들면 발현 벡터내 핵산을 포함하며, 시토킨 또는 케모킨, 항체 또는 효소에 대한 유전자 서열을 포함한다. 또다른 예는 안티센스(antisense) DNA 또는 RNA, 또는 간섭 RNA (RNAi)를 포함한다. 선택적으로, 상기 약제는 폴리펩티드 또는 유기 분자 가령, 예를 들면 시토킨, 케모킨, 항체, 시스플라틴(Cisplatin) 또는 블레오마이신, 또는 항암 활성을 갖는 다른 분자를 포함할 수 있다. 또한, 상기에 기술된 화합물이 당분야에 통상의 지식을 가진 사람에게 공지된 바와 같이 약학적 허용가능한 염, 완충제 및 다른 부형제의 조합물을 포함할 수 있는 제제로 처방될 수 있다. 예를 들면, 핵산용 제제는 예를들면 미국 특허 제7,173,116호에 개시된 바와 같이 핵산 및 폴리글루탐산(폴리-L-글루타메이트)를 포함할 수 있으며, 상기 참고문으로 전문이 포함된다.

[0028]

부가의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 종양 부위에서 국소 영역으로 일렉트로포레이션 펄스를 제공할 수 있는 장치를 사용하여 일렉트로포레이션 펄스를 적용하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 장치는 가늘고 긴 니들형 전극 배열을 포함할 수 있다. 선택적 실시양태에서, 요구되는 전기 펄스의 강도 및 항암제 송달 모드에 따라 짧은 비(非)침투 전극 또는 반침투 마이크로니들 전극을 사용할 수 있다. 상기 실시양태에서, 장치는 플러저 및 송달 니들을 요구하지 않고 고안된다. 대신에, 치료 방법은 전극 배열만을 포함하는 일렉트로포레이션 장치를 사용하여 적용될 수 있으며, 상기 배열은 비(非)침투 또는 반침투 전극을 포함한다. 상기 경우에, 약물은 개별의 수단, 가령, 주입기(syringe)에 의해서 송달된다. 본 발명의 장치의 물리적 배열과 관련한 부가의 바람직한 실시양태에서, 치료 방법을 수행하는 동안, 전극은 특정 영역 및 깊이안에서 조직내 세포를 일렉트로포레이션하기에 충분한 전기장 강도 및 에너지를 갖는 전기장을 발생하도록 치료될 조직에 대해서 배치가능하다. 전형적으로, 상기 장치는 종양 절개 부위 주변에(3차원 형태로) 미리 결정된 조직 변연 내의 모든 조직으로 일렉트로포레이션 펄스를 부여하도록 배치될 것이다. 절개된 종양의 크기 및 전극 배열의 크기에 따라서, 주변 변연 조직 층은 하나의 일렉트로포레이션 펄스 적용에서 전체적으로 일렉트로포레이션되거나 또는 에너지 전기장을 일렉트로포레이션할 때 종양 부위 변연 조직을 완전하게 포함하도록 전극 배열의 배치 및 재배

치에 의해서 다수의 일렉트로포레이션 펄스 적용을 요구할 것이다. 몇가지 실시양태에서, 전극은 세포로 일렉트로포레이션될 제제에 대한 송달 니들로서 제공될 수 있으며, 다른 실시양태에서, 상기 제제는 조직내 전극의 투여/배치와 무관하게 조직으로 투여될 수 있다.

[0029]

또한, 본 발명의 방법은 상기 건강한 조직의 상당한 손상 없이 일렉트로포레이션 펄스로 건강한 비(非)암성 조직을 노출시킬 수 있도록, 일렉트로포레이션 펄스에 노출된 이후에 개방된 상처 주위의 건강한 조직의 회복 특성에 있어서 연구가 실시되었다. 하기에 기술되는 바와 같이, 일렉트로포레이션 펄스, 또는 일렉트로포레이션 펄스 및 항암제로 건강한 조직의 치료로 치료된 영역의 세포 및 치료되지 않고/않거나 정상 조직과 유사하게 치료될 개방된 상처로 측정할 수 없는 상당한 효과를 부여한다. 건강한 조직을 실질적인 손실 없이 일렉트로포레이션 펄스로 노출될 수 있기 때문에, 외과가가 건강한 조직의 더 좁은 변연을 절개하도록 종양 주변의 조직의 치료시 일렉트로포레이션의 사용이 가능하다.

[0030]

#### 일반 치료 절차

[0031]

본 발명 방법의 하나의 실시양태는 외과적 상처 변연, 또는 더 일반적으로 종양 변연을 치료하는데 있으며, 상기 방법은 (a) 2차 치료의 여부와 관계없이 종래의 외과적 종양 및 변연 절개와 비교하여 우수한 재발율을 달성하며(예컨대, 재발율이 더 적음); (b) 종래의 외과적 변연 제거와 동일하거나 우수한 재발율을 유지하면서 기능적 조직을 보존하며 변연 조직의 외과적 절제에 대한 필요성을 감소시키거나 또는 제거하며; 및 (c) 종래의 외과적 변연 절개 및 방사선 및 화학요법과 같은 2차 치료와 동일하거나 또는 우수한 재발율을 유지하면서 (변연 절제와 관계 없이) 외과적 종양 절개에 이은 방사선 또는 화학요법의 필요성을 감소시키거나 또는 제거한다.

[0032]

하기의 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로 한정하는 것은 아니다. 본 발명은 사용될 수 있는 전형적인 예이며, 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 공지된 다른 방법은 선택적으로 사용될 수 있다.

[0033]

#### 실시예 I

[0034]

개방된 상처 주위의 명백하게 건강한 조직을 일렉트로포레이션 펄스 및/또는 항암제로 치료

[0035]

대부분의 정상 조직을 포함하는 개방 창상의 영역에서 일렉트로포레이션을 성공적으로 사용하기 위해서, 본 발명자는 항암제를 사용하거나 또는 사용하지 않고 정상 조직의 일렉트로포레이션은 피부, 피하 및 근조직에서 치료 방법에 상당한 영향을 주지 않고 실시될 수 있다는 것을 보여주는 일련의 실험을 실시한다.

[0036]

본 실험에서, 18개의 경피성 절개를 8마리의 피그(pig) 시험 동물 그룹 1-6에서 배근육으로 실시한다. 연구 그룹 1-5에서, 세로 절개를 실시하고 그룹 6은 근 섬유의 세로 방향에 가로지르게 절개한다. 각 절개 부위에서, 용액내 없음, 통상의 식염수, 또는 블레오마이신을 3개의 주입시에 서로로부터 1 cm의 간격으로 1cm의 깊이로 주입하고, 절개 중심에서 서로 3cm로 각각 절개한다. 항암제인 블레오마이신이 사용되어 각 주입은 0.125 ml (4 units/ml 식염수)로 구성된다. 그후 절개는 0.5 cm 직경의 6-니들 전극 배열을 사용하는 펄스 발생기로부터 530 V의 양극 펄스로 각각 100  $\mu$ sec 치료한다(각 펄스에 대한 명목 전기장 강도는 1,233 V/cm임).

[0037]

특히, 8마리의 수컷 요크셔/햄프셔 크로스 스와인(swine)(40-50 kg)을 수술전 5-7일 동안 순응시킨다. 절개 위치는 멸균 수술 마커를 사용하여 등에 표시한다. 각 절개는 5 cm 길이이고, 근육으로 5 mm 깊이로 한다. 표 1에 따라, 그룹 1-5에서 모든 동물은 각각 18개의 세로 절개하며, 그룹 6에서 동물은 가로 절개한다. 각 연구 그룹은 24개의 절개를 포함한다.

#### **표 1**

[0038]

그룹	절개	주입	일렉트로포레이션
그룹 1 (NL)	세로	없음	
그룹 2 (SL)	세로	식염수	
그룹 3 (SEL)	세로	식염수	×
그룹 4 (BL)	세로	블레오마이신	
그룹 5 (BEL)	세로	블레오마이신	×
그룹 6 (BET)	가로	블레오마이신	×

[0039]

식염수 또는 블레오마이신(6U)의 전체 1.5 ml의 부피의 주입물을 절개당 12 부위, 근육에 6부위, 피부에 6부위에 투여한다. 일렉트로포레이션으로 치료된 절개는 0.5 cm 직경, 1.5 cm 길이의 니들 배열을 사용하여 일렉트로포레이션한다. 각 근육 절개면에서, 일렉트로포레이션은 절개의 중심 3 cm에서 3회 제공하며, 각 일렉트로포

레이션 부위는 서로 1 cm 이격되어 있다. 피부는 일렉트로포레이션되지 않았다. 근외막은 4-0 바이크릴 흡수성 차단 봉합사(4-0 Vicryl absorbable interrupted sutures)로 닫는다. 피부는 4-0 나일론 차단 봉합사로 닫는다. 스와인은 수술후 2일, 1주, 2주 또는 3주 후에 희생시킨다. 피부 및 적어도 5 mm 깊이의 기초 근육을 포함하는 조직 표본(histology specimens)은 절개 중심으로부터 수득되며, 10% 중성 완충 포르말린에 즉시 넣는다. 부가의 대조군 표본은 등에 절개되지 않은 피부로부터 수득된다. 염색 및 구획화한 이후에, 피부, 피하 조직 및 근육은 하기 파라미터를 사용하여 0-3 스케일로 조직학적으로 등급을 나눈다: 힐링(Healing), 과립화/섬유증, PMN, 임파구, 조직구(Histiocytes), 괴사(Necrosis), 출혈(Hemorrhage) 및 비정형 세포(Atypical Cells).

[0040] 기계적 시험은 3개의 상이한 시점, 즉 7일, 14일 및 21일에서 절개 중심으로부터 제거된 피부 스트립에서 실시된다. 피부 스트립은 식염수로 적신 거즈로 싸고 0.5 in/분에서 실시되는 100 파운드 하중 셀을 갖는 Instron 900(Instron Corp. Norwood, MA)을 사용하여 절개 파단 강도에 대해서 동일자로 시험한다. 파단 강도는 파단점 이하의 각 절개에 대해서 스트레치(stretch) 대 스트레인(strain)을 플로팅함으로써 측정된다. 피부 절개의 파단 강도는 그룹 1(식염수 또는 블레오마이신이 없음)에서 절개 1주후에 ~1800kPa으로부터 절개 2주후에 ~2500kPa 및 절개 3주후에 ~5000kPa로 경시적으로 증가된다. 식염수의 주입(그룹 2)으로 유사한 결과가 수득된다. 그룹 3(일렉트로포레이션과 함께 식염수 주입)은 그룹 2와 크게 다르지 않으며, 일렉트로포레이션이 파단 강도에 역효과를 일으키지 않는 것을 나타낸다. 1주에, 모두 3개의 블레오마이신으로 치료된 그룹은 모두 3개의 비(非)-블레오마이신 그룹과 비교하여 크게 감소된 파단 강도(예를들면, 90%)를 가지며, 이는 블레오마이신이 피부 상처 치료가 지연되는 것을 나타낸다. 일렉트로포레이션은 그룹 4 및 5가 서로 상당히 다르지 않기 때문에 파단 강도에서 역효과를 갖지 않는다. 2주까지, 그룹 1-5사이의 상당한 차이는 없다. 블레오마이신 및 일렉트로포레이션과 가로 절개는 더 낮은 파단 강도를 나타낸다. 상기 효과는 3주까지 이어지며, 그룹 6은 그룹 1-5보다 상당히 더 낮은 파단 강도를 갖는다.

[0041] 도 1에 개시된 바와 같이, 절개 3주 후에 식염수 단독, 식염수 + 일렉트로포레이션, 블레오마이신 단독 또는 블레오마이신 + 일렉트로포레이션 사이에 실질적인 차이가 없다. 치료된 가로 절개의 강도는 환자에 대한 위협의 관점에서 임상적인 관심을 갖지 않기에 충분하다.

[0042] 조직학적 평가

[0043] 4개의 상이한 시점, 즉 2일, 7일, 14일 및 21일에 피부 및 적어도 5mm의 근육을 포함하는 조직학적 표본은 절개 중심으로부터 취하며, 10% 중성 완충 포르말린에 즉시 넣는다. 조직학적 연구는 7일에 제시된 통계학적으로 상당한 변화(블레오마이신 그룹 단독)를 나타낸다. 모든 비(非)-처리된 조직 및 식염수 주입된 조직은 외관상으로는 정상으로 남아 있다. 21일까지, 모든 블레오마이신 주입된 샘플은 식염수-주입된 대조군과 비교가능하다. 예를들면, 식염수-주입된 조직 샘플 대 식염수-주입되고 일렉트로포레이션된 조직 샘플과 비교하는 경우, 일렉트로포레이션의 효과는 1주에 피부 조직구의 수가 약간 증가되며 2주에 피부 임파구가 감소된다. 피부, 피하 조직 및 근육 치료와 같이 다른 파라미터상에서 일렉트로포레이션의 효과를 갖지 않는다. 또한, 블레오마이신 대 블레오마이신 + EP 처리된 조직 샘플과 비교하여, 2일 또는 1주에서 상당한 차이는 없었다. 2주에, 일렉트로포레이션은 근육 괴사에서 상당한 증가를 나타내지만, 3주까지 차이가 사라진다. 3주에, 일렉트로포레이션은 피부 조직구를 감소시키지만, 치료의 증거로서 근육에서 과립 조직/섬유증의 증가를 나타낸다. 블레오마이신의 존재시에 일렉트로포레이션에 의한 피부, 피하 조직 또는 근육의 치료시에 지속되는 상당한 차이가 없었다.

[0044] 도 2A-2F에 도시된 바와 같이, 비치료된 조직, 식염수 + 일렉트로포레이션 치료된 조직, 및 블레오마이신 + 일렉트로포레이션 치료된 조직 사이에서 비교된 바와 같이 상처 치료는 3주까지 조직학적으로 균등하게 되었다. 특히, 3주까지 식염수 + 일렉트로포레이션은 블레오마이신 + 일렉트로포레이션과 균등하다(E와 F 비교). 2주까지, 식염수 + 일렉트로포레이션은 블레오마이신 + 일렉트로포레이션보다 좀더 향상된 치료를 보인다(C와 A를 비교). 3주까지, 식염수 + 일렉트로포레이션은 2주에 블레오마이신 + 일렉트로포레이션과 균등하다(E와 D 비교).

[0045] 도 3A-3D에 도시된 바와 같이 다른 조직학적 특징에 관련하여, 콜라겐이 치료 중인 상처에 침착되지만, 식염수로 처리된 샘플에서보다 블레오마이신으로 처리된 샘플에 대해서 더 느린 속도로 침착될 것이다. 특히, 일렉트로포레이션 없이, 식염수 처리된 동물에서 절개(C 및 D)는 진피의 콜라겐 섬유와 연결된 암청색 콜라겐 섬유를 나타내며, 블레오마이신으로 처리된 동물의 절개(A 및 B)는 피부 콜라겐과 연결된 더 적은 영역에서 연청색 콜라겐 섬유를 나타낸다. 도 4A-4D에 개시된 바와 같이 3주에 근조직에서 효과와 관련하여, 현미경 사진은 일렉트로포레이션이 식염수 또는 블레오마이신 단독과 비교하여 근조직의 치료시에 상당한 차이를 나타내지 않는다는 것을 나타낸다.

- [0046] 식염수 대 블레오마이신의 존재시 세로 절개 대 가로 절개의 효과를 고려하여, 2일 또는 1주에서 상당한 차이는 없었다. 2주 및 3주에, 상당한 조직학적 차이는 연구된 모두 3개의 조직 층에서 다량의 과립화 조직/섬유화가 있었다. 피부, 피하 조직 및 근육에서, 세로 절개는 상당한 차이가 있는 모든 경우에서 가로 절개보다 더 과립화 조직/섬유증을 갖는다. 상기는 세로 절개가 가로 절개보다 통상 더 잘 회복될 것으로 기대된다. 피부, 피하 조직 및 근육의 치료 점수는 세로 절개와 가로 절개에 대한 상당한 차이는 없다.
- [0047] 요약
- [0048] 근육의 일렉트로포레이션은 2주 및 3주에서 틀림없이 1주이내에도 블레오마이신의 존재 여부에 관계없이 돼지 (porcine)의 진피의 파단 강도에서 상당한 변화는 일어나지 않았다. 그러나, EP의 사용 여부와 관계없이 블레오마이신의 존재는 절개 단독, 또는 식염수 주입과 절개, EP의 사용 여부와 관계없이 치료후 1-2주까지는 돼지 진피의 파단 강도에서 감소와 관련이 있다. 조직학과 관련하여, 조직의 일렉트로포레이션은 피부, 피하 조직 또는 근육의 치료시에 상당한 차이는 없었다. 그러므로, 일렉트로포레이션 요법은 근육 또는 피부의 치료에 상당한 역효과를 주지 않는다. 상기는 EPT가 종양 주위의 조직을 치료하기 위해 사용되는 곳으로 적용되며, 본 발명의 방법은 종양 재발율의 감소에 목적을 둔 상처 변연의 치료시에 외과적 절제 또는 다른 치료 중재에 대한 대체제로 제공된다.
- [0049] 실시예 II
- [0050] 가설 치료 방법
- [0051] 본 발명의 방법 및 장치를 사용하는 수술은 하기 단계를 사용함으로써 절차를 따를 것이다:
- [0052] 1. 주요 종양은 당분야의 통상의 지식을 가진 외과의에 의해서 통상 실시되는 바와 같이 외과적으로 절제될 것이다. 외과의는 1차 종양을 절제하거나 또는 외과적 변연을 절제할 것이다. 선택적으로, 주요 종양은 변연 조직의 열절제의 여부와 관계없이 수많은 열절제 요법 중 하나, 가령, RF (무선 주파수) 열절제, PDT (광역학 치료법), 냉동요법, 화학-방사선 요법, 근접방사선치료 또는 직류전기치료로 열절제될 것이다.
- [0053] 2. 변연 조직의 절제(또는 열절제)와 관계 없이 종양의 외과적 절제(또는 열절제) 이후에, 절제(또는 열절제) 부위 주변의 전체 조직은 블레오마이신 또는 다른 화학요법제 또는 생물학적 약제를 사용하는 EPT에 의해서 처리될 것이다. 약제-EPT 처리는 이론적 고려, 과학적 연구 또는 실제 경험에 따라 외과의에 의해서 결정된 깊이로 실시될 것이다.
- [0054] 변형예 A. 표준 변연을 갖는 종양을 절제하기 위한 방법
- [0055] 1. 본 방법 변형에서, 종양은 표준 변연을 따라 제거된 이후에, 전체 상처 표면(종양 변연 층)은 전형적으로 항암제의 국소 주입을 포함하는 표준 EPT 방법으로 적당한 깊이, 전형적으로 1 cm로 처리된 이후에 장치에 구비된 적어도 하나의 다전극 배열(예를들면, 도 5-10에 개시된 본 발명의 장치의 6개의 니들 배열 또는 다른 전극 배열)을 사용하여 일렉트로포레이션하며, 예를들면 적당한 전압으로 3개 이상의 전기장 배향으로 펄스된다. 전기장 배향은 2개의 반대로 하전된 전극들 사이에 전기 펄스에 의해서 발생하는 전기장의 공간적 지향적 배향을 의미한다. 본 실시양태에서, 방법 변형예 A는 종래의 수술후 2차 치료의 사용(또는 선택적으로 감소된 사용) 없이 실시될 수 있다. 상기 예에서, 본 발명의 방법은 완전한 외과적 변연 절제술 및 2차 치료와 비교하여 균등하거나 또는 양호한 재발율을 달성한다.
- [0056] 2. 종양 변연 층의 EPT 이후에, 목적한다면 환자는 종래의 2차 치료, 예컨대 방사선 또는 화학요법으로 추가로 치료되고, 변연 조직의 EPT 치료가 없는 것과 비교하여 종양 재발에 대한 부가의 가능한 방지를 제공한다.
- [0057] 상기 단계 1 및 2를 실시한 결과는 종래 요법에 대해서 어느 정도 조직 보존 정도를 가지면서 치료율 또는 재발 시간이 개선되었지만, 변연 조직은 그럼에도 불구하고 제거되었다.
- [0058] 변형예 B. 변연 절제 없이 종양을 절제하기 위한 방법
- [0059] 1. 본 변형예 방법, 하기 종양 제거 및 변연 제거의 감소 또는 없음에서, 전체 상처 표면은 전형적으로 항암제의 국소 주입을 포함하는 표준 EPT 방법으로 적당한 깊이, 전형적으로 1 cm로 처리된 이후에 다수의 전극 배열(예를들면, 침부된 도면에 개시된 바와 같이 6개의 니들 배열 또는 다른 전극 배열)을 사용하여 일렉트로포레이션하며, 예를들면 적당한 전압으로 3개 이상의 전기장 배열에서 펄스된다.
- [0060] 2. 상기 프로토콜 및 추가의 종래의 2차 치료 이후에 의도된 결과는 변연 조직 및 잠재적으로 개선된 치료율 또

는 재발 시기의 완전 또는 일부 보존된다.

- [0061] 상기 프로토콜의 선택적 실시양태에서, 종래의 이차 치료가 제공되지 않으며, 변연 조직의 완전 및 일부 보존이 가능하며 치료율 및 재발 시기가 개선되었다.
- [0062] 실시예 III
- [0063] 제1 실시양태에서 절제된 종양의 변연 층을 치료하기에 적당한 일렉트로포레이션 장치의 기술로 되돌아가서, 상기 장치는 변연 층을 통해 균등하게 분포된 항암제, 예컨대 블레오마이신을 변연 조직으로 송달할 수 있었다. 제2 실시양태에서, 상기 장치는 변연 층을 통해 세포를 깊이 1-1.5 cm로 일렉트로포레이션하기에 충분한 전기 에너지의 다수의 펄스를 변연 조직으로 송달할 수 있는 가능성을 제공한다.
- [0064] 제3 실시양태에서, 본 발명의 장치는 변연 층의 실질적인 부분에 일렉트로포레이션 펄스를 송달하며, 전체 변연 층에 일렉트로포레이션 펄스를 제공하여 본 발명의 장치를 한번에 배치되도록(장치 및 종양의 상대 치수에 따름), 본 발명의 장치가 한 곳에 배치될 수 있다.
- [0065] 부가의 실시양태에서, 상기 장치는 선택된 전극 배열들 사이에 일련의 전기 펄스의 송달을 제공하도록 기하학적 배열로 배치된 다수의 전극을 포함한다. 관련 실시양태에서, 상기 장치는 다양한 종양 형태 및 크기를 최적화하고 바람직한 기하학으로 전극 배열을 추가로 제공하는 다수의 형태를 포함할 수 있다.
- [0066] 다른 실시양태에서, 본 발명의 장치의 전극은, 상기 전극이 전극과 항암제 송달 니들로서 작용할 수 있도록 가늘고 긴 중공 니들(elongate hollow needles)을 포함할 수 있다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 장치는 전극을 피복하고 중공 니들로 항암제의 송달 메커니즘을 제공하기 위한 샤프 커버(sharps cover)와, 수술 이전에 전극 멸균을 유지하는 수단을 포함할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 특정 상세로 되돌아가서, 도 5는 치료제 충전 트레이로서 배가된 실질적으로 견고한 샤프 커버(20)를 포함하는 본 발명의 장치(10)를 나타낸다. 커버/트레이(20)는, 목적하는 수준의 치료 물질로 트레이를 충전하기 위한 유체 공급원에 부착하기 위해 피팅되는 형태와 연결할 수 있는 피팅으로 디자인될 수 있는 충전 포트(21)를 추가로 포함한다. 커버/트레이(20)는 본 발명 장치의 메인 바디를 밀착하여 피팅하고 있는데, 이러한 메인 바디 자체는 가늘고 긴 다수의 전극(23) 배열이 통과하는 실질적으로 견고한 기관(22)(전극 각각은 이를 통해 개별적으로 전기 리드(24)에 연결됨)을 포함하고, 상기 전기 리드는 본 발명 장치의 측부 상에서 전기 에너지의 공급원에 부착하기 위한 플러그 또는 연결기(25)에서 종결된다. 기관(22) 및 플러그(25)는 다수의 웰(31)의 배열을 포함하는 메인 바디 기관(30)에 연결된다(도 6 참조). 각 웰은 치료 물질과 같은 물질이 송달될 수 있는 중공 전극/니들을 포함한다.
- [0068] 기관(30)은 다수의 플런저 배열(41)을 포함하는 기관(40)에 피팅된다. 기관(40)은 기관(30)으로 향하고 멀어지는 기관(40)의 이동을 구동할 수 있는 메커니즘에 연결되어, 기관(40)의 플런저(41)의 배열을 기관(30)내로 들어가게 하거나 기관(30)으로부터 추출하게 된다. 하나의 실시양태에서, 기관(40)은 일단(一端)이 기관(40)에 연결된 중심 로드(60)에 의해서 구동되며, 중심 로드의 타단(他端)은 래칫(ratchet) 및 썸 작용 휠(thumb activated wheel, 61)로 구성된다. 관련 실시양태에서, 기관(50)은 중심 로드(60)를 돌려싸거나 밀봉하기 위한 밀봉 지지 구조(enclosing support structure, 63)를 추가로 형성한다. 지지 구조(63)는 사용자 친화적 핸드 그립(64)을 추가로 포함할 수 있다. 작업시에, 작업자는 블레오마이신과 같은 유체 치료제를 목적하는 수준으로 커버/트레이(20)에 채우기 위해 포트(21)를 사용하며, 상기 치료제를 웰(31)로 드로잉하기 위해 썸 휠(61)을 사용한다. 그후 작업자는 지지 구조(63)에 의해서 형성된 핸들을 사용하여 트레이(20)로부터 장치를 제거하고 조직 또는 변연 층에서 적당한 위치에 장치를 놓는다. 그 후 작업자는 전극을 삽입하고 썸 휠(61)을 작동시켜 상기 치료제를 조직으로 투여하고 전극을 활성화시키는데, 상기 장치는 플러그(25)를 통해 전기 에너지의 공급원에 미리 부착되어 있다.
- [0069] 또한, 본 발명의 장치는 동일한 결과를 제공하기 위한 다른 다양한 구성요소들의 배열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 하나의 실시양태에서, 상기 장치는 기관(30)에 부착된 동적 하우징(dynamic housing, 50)을 선택적으로 포함할 수 있다. 선택된 본 발명의 스타일에 따라, 플런저를 올리거나 또는 내리기 위해 썸 휠을 사용하는 대신에 하우징(50)을 시계 방향 또는 시계 반대 방향으로 회전시킬 수 있어, 하우징은 선정 기준에서 동적으로 고려된다. 도 5에 도시된 바와 같은 실시양태에서, 하우징(50)은 회전할 수 있을 지라도 이러한 실시양태에서의 하우징 회전은 핸들 및 썸 휠에 대해 유용성을 제공하지 않는다는 점에서 하우징(50)은 동적이 아니다. 대안으로, 도 7 및 도 8에 도시된 바와 같이, 스크류(70)에 의해서 기관(40)이 기관(30)으로 향하거나 또는 기관(30)으로부터 멀어지도록 작동되는 점에서 하우징은 동적인데, 상기 스크류의 일단은 기관(40)에 부착되어 있고 타

단은 하우징(50)에 부착되며 하우징은 스크류와 맞물림 방식으로 부착되어 있다. 스크류(70)의 나사산(thread)과 상호작용하는 하우징(50) 부분은 하우징(50)의 회전시에 기관(30)으로부터 멀어지거나 또는 기관(30)으로 향하는 기관(40)을 드로잉하는 스크류 나사산(71)으로 형성된다. 작업시에, 작업자는 상술된 바와 같이 제제로 커버/트레이(20)를 채운 후에, 치료될 조직 상에 적당하게 디스크(discoid) 장치를 놓는다. 조직으로 전극을 삽입한 이후에, 장치를 아래로 누르면서 사용자는 기관(30)에 대한 플런저를 이동하는 방향으로 하우징(50)을 회전함으로써 상기 제제를 조직으로 배출시킨다. 그후 작업자는 전극을 활성화시키고, 장치는 전기 에너지의 공급원으로 플러그(25)에 의해서 미리 연결된다.

[0070] 본 발명의 다른 실시양태가 가능하며, 가령 예를들면 플런저(41)를 작동하기 위한 스크류(70)에 부착된 링 너트(80)를 사용한다(도 9 참조). 상기 실시양태에서, 하우징(50)은 스크류 나사산(71)을 포함하지 않지만, 대신에 나사산이 형성된 중심 로드(60)가 통과할 수 있는 매끄러운 보어 패스트(bore past)를 포함한다. 상기 실시양태에서, 작업자는 하우징의 회전을 요구하지 않지만, 링 너트를 요구한다.

[0071] 본 발명의 다른 실시양태가 가능하며, 가령, 플런저 배열을 작동시킬 수 있는 무생물 수단을 사용한다. 예를들면 링 너트, 슝 휠 또는 구동 스크류를 작동하는데 생물 힘을 사용하는 것 보다, 플런저는 모터 구동 플런저에 의해서 작동할 수 있다. 상기 실시양태에서, 모터는 도 6 내지 도 8에 기술된 실시양태와 관련하여, 예를들면 하우징의 양방향 회전을 일으키도록 하는 배열로 하우징(50)과 위치될 수 있다. 모터는 플런저를 올리고 내리도록 작동할 수 있는 슝 휠 실시양태에서 기어로 고정될 수 있다. 또한, 당분야의 통상의 지식을 가진 사람에게 이해될 수 있는 바와 같이, 상기 장치는 플런저가 웰(31)로 다가가거나 또는 웰(31)로부터 멀어지는 최대 지점에 도달할 때 작동자에게 주의를 주는 지시자(indicator)를 포함할 수 있다.

[0072] 추가의 실시양태는 이에 한정되지 않고 펄스 트레인, 지수적 감소 펄스, 스퀘어 펄스 등을 포함하는 임의 형태의 단극 및/또는 양극 펄스의 사용을 포함하는 다양한 가전압(加電壓) 파라미터의 사용을 포함한다. 또한, 본 발명은 10-1500 V/cm의 전기장 강도를 갖는 펄스를 사용할 수 있다. 더욱이, 본 발명은 배열 전극을 개별적으로 가전압하거나 남아 있는 전극들의 조합과 함께 가전압할 수 있는 능력을 고려한다. 예를 들면, 하나의 실시양태에서, 4개의 인접한 전극 중 2개는 포지티브이며, 반대 전극 쌍은 네가티브로 하전되도록 펄스될 수 있다. 상기 펄스는 미국 특허 제5,993,434호 및 제5,702,359호에 기술된 바와 같은 "반대 쌍(opposed pair)"을 제공한다. 다른 펄스 포맷에서, 모든 인접 전극 쌍들이 적어도 한 번에 가전압될 때까지 단일 전극 쌍이 가전압되어 조직으로 일렉트로포레이션 에너지 펄스를 부여할 수 있다. 도면에 도시되지 않았지만, 다양한 실시양태에 개시된 본 발명의 장치는 개별적으로 어드레스되는 전극 니들을 포함하는 것으로 이해된다. 상기가는 가령 샌드위치 기술에 의해서 기관(22)내 전기 리드 연결을 통합시킴으로써 달성될 수 있는데(예컨대, 기관(22)은 2개의 층들 사이에서의 그리드 상에 놓인 전기 리드를 갖춘 2개의 층 구조를 포함할 수 있음), 전기 리드는 전극들로부터 본 발명의 장치의 일측으로 연장되되(리드 24로 나타냄) 다수의 핀 연결기를 갖는 플러그(25)에서 종결된다.

[0073] 실시예 IV

[0074] 본 실시예에서, 일련의 실험이 마우스(mice)에서 실시되며, 종양 재발율은 수술 후 또는 수술 및 EPT 후에 측정된다. 특히, 본 실험은 HT-29 사람의 콜론 카시노마 세포(human colon carcinoma cell)를 피하 주입하고 상기 주입으로부터 발생한 종양의 절제 이후에 누드 마우스에서 외과적 변연 치료에 있어서 EPT의 효과를 밝히기 위한 생체내 연구를 포함한다. 상기 실험은 시험 동물의 치료에 관련하여 인도적 조건(humane conditions)하에 실시된다.

[0075] 실험 교안은 하기와 같다. 4-6주령의 정상 비흉선 누드 암컷 마우스(Normal Athymic Nude female mice)를 각각 6마리씩 8개의 그룹으로 나누고, 단 그룹 1은 10마리로 이루어지고, 그룹 3은 7마리로 이루어진다. HT-29 세포 라인(cell line)은 사람의 콜론 카시노마로부터 유래되며, 마우스에서 공격적으로 급속-성장하는 종양이다. 각 그룹에서 21 게이지 니들 및 주입기를 사용하여  $5 \times 10^6$  세포의 2개의 인접한 점종의 형태로 HT-29 사람의 종양 세포를 동물에 주입한다. HT-29 세포 라인은 ECACC (#HTB-38)로부터 취득되며, 2.2 g/L 중탄산나트륨, 90%, 및 우태혈청(fetal bovine serum), 10%을 함유하도록 조절된 1.5 mM L-글루타민으로 (변형된) 맥코이 5a 배지(McCoy's 5a medium)에서 성장시킨다. 세포는 본 실험에서 사용하기 위해 충분한 세포가 이용될 수 있을 때까지 성장 주기에 따라 세포를 1:2 내지 1:4로 나눈다.

[0076] 점종 이후에, 종양은 점종 부위에서 생성된다. 각 동물에서 종양 부피는 규칙적으로 모니터되고 하기 식을 사용하여 계산된다: 종양 부피 =  $(a^2 \times b/2)$  (여기서, 'a'는 최소 직경이며, 'b'는 'a'에 대해 수직인 최대 직경이다. 종양이 손으로 촉진할 수 있는 날로부터 시작하여 주당 종양이 3번 측정된다. 종양의 크기가 500-1500

mm이 될 때까지 종양을 진행시킨다. 외과적 종양 제거, 부분적 제거, 또는 비(非)제거는 EPT 또는 EPT 없음과 조합하여 실시된다. 본 실험에서, EPT는 블레오마이신 및 일렉트로포레이션(EP)으로 치료하는 것을 의미한다. 실시된 EP는 표준 메드펄서 제너레이터(standard MedPulser generator, Genetronics, Inc. San Diego, CA) 및 1 cm 직경의 1회용 6개의 니들 배열을 갖는 어플리케이터(applicator)를 사용하는 전극 삽입(전극들 사이의 거리는 0.86 cm이고, 1 cm 니들 길이임)당 1개의 펄스 사이클(예컨대, 4 Hz에서 6 펄스)로 실시된다. 각 스퀘어 펄스(square pulse)는 100 usec 기간 및 1500 V의 인가 전압을 갖는다. 블레오마이신의 종양내 주입 이후에 그룹 4-8 및 10 및 11에 있어서, 니들 전극 배열은 니들 배열내에 종양이 포함되도록 하는 방법으로, 또는 최대 크기의 종양인 경우에는 종양 가장자리로 니들이 침투할 수 있도록 니들 전극 배열이 삽입된다. 니들 배열은 종양을 가지고 있는 마우스의 옆구리 표면에 경피에 본질적으로 수직으로 삽입된다. 선택적으로, 종양이 먼저 절개되고 블레오마이신의 정맥 주입후 EP를 실시하는 경우, 니들 전극 배열은 외과적 상처 영역을 포함하여 경피적으로 주입된다(그룹 5-8).

[0077] 블레오마이신이 실험에서 사용되는 경우, 치료될 조직 부피 1cm<sup>3</sup>당 0.25 ml의 투여량으로 지시된 바와 같이 종양 및 변연 조직으로 가능한 균일하게 4U/ml 식염수(1U=1mg)를 주입한다. 선택적으로, 지시된 바와 같이, 블레오마이신의 상응하는 양을 꼬리 혈관으로 주입된다.

[0078] 상기 실험은 각각 6마리 이상의 마우스로 8개의 코호트(cohorts)를 사용한다. 각 코호트를 EP, 블레오마이신, 블레오마이신 대신에 식염수, 완전 종양 절개, 부분 종양 절개, 및 종양 절개 없음으로 조합된 치료 방법으로 실시한다. 표 2 및 표 3은 치료 방법을 기재하고 있다.

표 2

그룹	마우스	절개			블레오마이신 정맥내 주입	EP
		전체 종양 제거	일부 종양 제거	종양을 제거하지 않음		
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			식염수	Sham
	2-2	X			식염수	Sham
	2-3	X			식염수	Sham
	2-4	X			식염수	Sham
	2-5	X			식염수	Sham
	2-6	X			식염수	Sham
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		식염수	Sham
	4-2		X		식염수	Sham
	4-3		X		식염수	Sham
	4-4		X		식염수	Sham
	4-5		X		식염수	Sham
	4-6		X		식염수	Sham

[0079]

[0080] 표 2에 기술된 동물에서 실험에 있어서, 동물을 마취하고 기술된 바와 같이 종양의 제거 또는 일부 제거하고, 블레오마이신 또는 식염수의 정맥 투여한다. 블레오마이신 투여량은 상기에 기술된 바와 같은 종양 크기에 따라 다르다. 3-4분 이후에, 기술된 동물은 EP로 처리되고 상처를 클립 또는 외과적 접착제로 봉합한다. 코호트 1에서, 전체 종양은 외과적으로 제거되며(예를들면 도 12b 및 12c 참조), 상기 동물은 블레오마이신 및 EP로 처리된다. 코호트 2에서, 종양이 동물로부터 제거되지만, 식염수는 블레오마이신 대신에 주입되고 EP는 실시하지

않는다. "삼(sham)" EP 방법은 전극 배열을 조직으로 삽입하지만 전극은 펄스되지 않고 실시된다. 코호트 3에서, 상기 종양은 일부(95% 이상) 제거되고 블레오마이신을 주입하고 일렉트로포레이션한다. 코호트 4에서, 종양은 다시 일부 제거된 후, 식염수를 주입하고 삼 EP를 실시한다.

표 3

그룹	마우스	절개			블레오마이신 종양내 송달	EP
		전체 종양 제거	일부 종양 제거	종양을 제거하지 않음		
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*

[0081]

[0082]

표 3에서, 코호트 동물을 마취하고 상기에 기술된 투여량 및 부피로 블레오마이신 용액을 종양내 투여한다. EP는 약물 투여하고 10분후에 실시하고 15분 후에 종양의 제거 또는 일부 종양 제거를 실시한 후, 상처를 봉합한다. 코호트 8에서, EP는 종양 및 관련 변연 조직의 약 75%에서만 효과적인 일렉트로포레이션이 일어나도록 니들 배열 전극을 배치한다는 점에서 EP가 불완전하게 실시된다(표 3에서 \*로 표시됨). 즉, EP 처리는 종양에 대해서 상쇄된다.

[0083]

상기 실험에 추가하여, 본 발명자들은 종양 조직의 총 컨시스턴시(gross consistency)를 평가하고 이를 조직학적으로 평가하기 위해 EPT 완료와 종양 절개사이의 시간이 증가되었다. 상기 목적을 위하여, 3개의 부가의 코호트 그룹 9, 10 및 11이 사용된다. 실험 방법은 표 4에 개시되었다.

표 4

그룹	마우스	절개 완전한 종양 제거	블레오마이신	EP
9	9-1	X		
	9-2	X		
	9-3	X		
10	10-1	X (at 2hr)	X	X
	10-2	X (at 2hr)	X	X
	10-3	X (at 2hr)	X	X
11	11-1	X (at 24hr)	X	X
	11-2	X (at 24hr)	X	X
	11-3	X (at 24hr)	X	X

[0084]

[0085]

그룹 9의 동물을 마취하고 종양을 완전 절개한다. 종양은 컨시스턴시를 조사하고 이후 조직학적 평가를 위해

포르말린에 보존하고 코호트 10 및 11의 종양 조직으로 한다. 코호트 10의 마취된 동물을 상기에 기술된 투여량 및 부피로 블레오마이신 용액의 종양내 투여를 실시한다. EP는 약제 투여하고 10분 후에 실시한다. 종양은 EP를 실시하고 2시간 후에 절개한다. 코호트 11의 동물은 코호트 10에 기술된 바와 같이 처리하고 단, 이들 종양은 EP 처리를 실시하고 24시간후에 완전히 제거된다. 모든 상처는 상기에 기술된 바와 같이 봉합된다.

#### 결과

상기 코호트 1-8과 관련하여, 본 발명자들은 치료 3주후에 시험 동물에서 종양의 재발율을 조사한다. 표 5 및 도 15에 기술된 바와 같이, 블레오마이신 및 EP가 실시된 대부분의 동물은 종양 재발이 방지된다. (약어의 정의를 위해 도 15 기재 참조).

표 5

그룹	종양 절개			EP	블레오마이신 투여 경로		%효율*
	전부	일부	없음		i.v.	종양내	
1	+			+	+		90
5	+			+		+	100
7		+		+		+	100
6			+	+		+	80
3		+		+	+		67
8			+	+/-**		+	67
2	+			-			0
4		+		-			0

\*% 효율은 치료후에 종양 성장을 경험하지 않은 각 그룹에서 시험 동물의 수에 기초한다.

\*\* +/-는 종양/종양 증으로부터 중심을 벗어나는 치료인 일부 EPT 방법을 나타낸다.

특히, 그룹 1-8은 종양 증 조직의 치료가 치료 부위에서 종양이 재발되는 것을 동물에서 방지할 수 있다는 예기치 못하고 놀라운 효과를 제공할 수 있다는 점을 나타내는 결과를 제공한다. 상기 데이터에서 볼 수 있는 바와 같이, 종양이 완전 제거되거나 또는 일부 제거되는 경우 절개만은 유효하지 않다. 상기는 사람에서 유사한 공격적 종양에 상관되는 종양의 조심스러운 외과적 제거에도 불구하고 종양 부위에 가까운 곳에 침습적 종양 세그먼트 및/또는 미세전이가 남아 있는 사용된 종양 형태의 공격적 특성 때문이다. 사람에서 재발율이 10-40% 범위이고 상기 마우스 실험에서 발견되는 것보다는 높지 않다 하더라도 이는 사람의 외과적 치료법에서 겪는 상황과 유사하다. 중요하게도, 일부 종양 제거의 결과에서 나타나는 바와 같이, 블레오마이신과 EPT의 사용은 모든 종양을 절개하기 위해서 외과적 절차가 실패하더라도 종양 재발에서 상당히 감소되는 것과 관련이 있다. 또한, 투여 경로는 각각 정맥내 및 종양내로의 투여는 유사한 결과가 수득된다는 점에서 효과에 상당한 역할을 하는 것으로 보이지 않는다. 또한, 효능 효과는 블레오마이신-EP 처리의 완료 및 종양 절개 사이의 15분 간격 이후에 제공된다. 상기 데이터는 종양 제거 없이 EP가 일부 실시되는 실험, 예를 들면 유효 전기장은 종양으로부터 중심에서 벗어난다는 점에서 조직에 미세종양 시딩(seeding)을 효과적으로 치료하는 치료 방법을 추가적으로 유지한다. 여기서, EPT에 의해서 발생하는 적어도 미세 영역 효과를 나타내는 67% 효율이다. 상기 실시예에서, EP 없이 블레오마이신 단독 투여를 시험하는 연구 코호트, 또는 반대의 경우(예컨대, 블레오마이신 없이 EP의 처리)에는 EP 처리 없이 블레오마이신 투여가 상당한 항종양 활성을 갖지 않는다고 알려져 있기 때문에 포함하지 않았다.

시험 동물로 도입된 종양 세포와 관련하여, 본 발명자들은 종양을 상대적으로 큰 크기로 성장시킨다. 치료 이전에 시험 동물에서 종양을 나타내는 도 11a, 12a, 13a 및 14a를 참조한다. 도 11b 및 12b는 최종 절개 이전에 노출된 종양을 갖는 단계에서 외과적 종양 제거의 예를 나타낸다. 도 11c, 12c, 13b 및 14b는 블레오마이신-EPT(도 12c) 또는 식염수-삼 EP 처리(도 11c) 이전에 완전한 종양 제거 이후, 또는 식염수-삼 처리(도 14b) 이전에 일부 종양 제거 이후에, 또는 종양내 블레오마이신-EPT 처리 15분 후에(도 13b) 상처의 예를 나타낸다.

도 11d는 완전한 종양 절개 및 식염수-삼 EP 처리 이후에 종양의 재발율을 나타내고, 도 14c는 일부 종양 절개 및 식염수-삼 EP 처리 이후에 종양의 재발율을 나타낸다. 도 12d 및 13c는 종양 절개 및 정맥내 블레오마이신 및 EP 처리, 또는 종양내 블레오마이신 및 EP 처리 후에 연이어 일부 종양 절개 이후에 종양이 존재하지 않는 종양 부위를 나타낸다. 상기 방법은 항암제를 종양내 또는 정맥내로 암을 처리하는 현재의 표준 방법보다 이점

을 갖는다. 약제-EPT 처리 이전 또는 이후에 종양의 절개는 몸이 재흡수되거나 또는 제거되는 종양 부위에서 커다란 괴사량의 형성을 방지하며, 경험학적으로 적어도 몇 주 걸리며, 합병증의 가능성이 증가된다. 약제-EPT 이전 또는 이후의 종양의 제거는 상처 치료를 촉진하고 가능한 합병증을 감소시킨다. 본 발명의 방법에 추가로, 종양내 및 정맥내 약물 주입이 사용될 수 있다.

[0094]

코호트 9-11과 관련하여, 본 발명자들은 종양의 컨시스턴시는 치료후에 경시적으로 점진적으로 변경되는 것이 관찰되었다. 상기 종양은 치료하고 2시간 후에 절개되며(코호트 10) 이의 컨시스턴시가 더 연화되며, 잘 한정되지 않으며, 부종액(edemic fluid)이 누출되며, 상대적으로 혈액은 거의 없다. 치료하고 24시간 후에 절개된 종양(코호트 11)은 액화 괴사(liquefactive necrosis)라고 불리는 컨시스턴시로 완전히 연화된다. 외과적 절개는 종양의 경계가 코호트 9 동물의 고체 종양 조직과 비교하여 부적당하게 한정되기 때문에 다소 어렵다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 또한 코호트 5 및 7로부터 종양이 제거되는 경우 치료하고 15분후에 종양이 연화되는 것이 알려져 있으며, 치료되지 않은 종양의 경우에서보다 잘 구별된 경계로 외과적 제거를 실시하는 것이 약간 더 어렵다는 것이다. 그러나, 코호트 5 및 7은 종양이 재발되는 것을 보이지 않기 때문에 치료 성공율에는 영향을 주지 않는다. 이러한 관찰은 단독으로 사용되거나 또는 다른 항암제 요법과 조합하여 사용될 수 있는 보조요법 또는 종양 부피 제거 요법으로서 EPT와 조합하여 약제, 가령 블레오마이신 또는 다른 항암제의 사용 기회의 입증을 제공한다. 예를 들면, 종양은 블레오마이신-EPT로 처리될 수 있으며, 분해된 종양 물질은 간단한 최소의 침습 방법으로 제거되며, 목적인다면 방사선 또는 화학요법과 같은 종래의 치료, 또는 다른 종양 요법 양상을 실시한다. 액화 종양 물질의 용이한 제거로 특히 큰 종양의 경우에 상처가 빠르게 치료되고 합병증의 발생은 더 적다.

[0095]

본원에 개시하고 청구하는 모든 조성물 및 방법은 본 상세한 설명으로 미루어 보아 과도한 실험없이 제조되고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 실시양태에 의해서 기재하는 반면에, 당업에 통상의 지식을 가진 자들에게는 본 발명의 정신 및 범주에서 벗어나지 않고 여기에 기재된 조성물 및 방법 및 방법의 단계 또는 순서에 변화를 줄 수 있을 것이다. 보다 특히 기재된 실시양태는 단지 실례를 들어 나타냈으며 이에 제한하지 않는다. 당업에 통상의 지식을 가진 자들에게 명백한 모든 유사한 치환 및 변형은 첨부된 청구 범위에 의해 규정된 본 발명의 정신 및 범주 내에 있는 것으로 간주한다.

[0096]

명세서에서 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 공보는 본 발명과 관련된 당업에 통상의 지식 수준을 나타낸다. 또 다른 이점 또는 우선권을 주장한 것을 포함해서 모든 특허, 특허 출원 및 공보는 개개 공보가 특이적으로 및 개별적으로 참고문헌에 혼입한 것으로 나타나는 경우 동일한 내용에 참고문헌을 여기에 통합한다.

[0097]

본원에 예증으로 기재된 본 발명은 여기에 특이적으로 기재되지 않은 구성 요소(들)의 부재하에 실행될 수 있다. 따라서 예를 들어 "포함하는(comprising)", "본질적으로 구성하는(consisting essentially of)" 및 "구성하는(consisting of)"이라는 용어 각각은 다른 두개의 용어와 대체할 수 있다. 사용된 용어 및 표현은 설명을 위해 사용하였으며, 상기 용어 및 표현의 사용은 이에 제한하지는 않고, 전체 또는 이의 부분으로 기재되거나 나타낸 특성의 균등물을 제외하는 것을 암시하지는 않지만 다양한 변형이 청구하는 본 발명의 범주 내에서 가능하다. 따라서 본 발명이 바람직한 실시양태에 의해 특이적으로 개시되었는데도 불구하고, 여기에 기재된 선택적 특성, 변형 및 개념의 다양성은 당업에 통상의 지식을 가진 자들에게 알려져 있을 수 있으며, 상기 변형 및 다양성은 첨부된 청구범위에 의해 규정된 본 발명의 범주내에 있는 것으로 간주한다.

## 부호의 설명

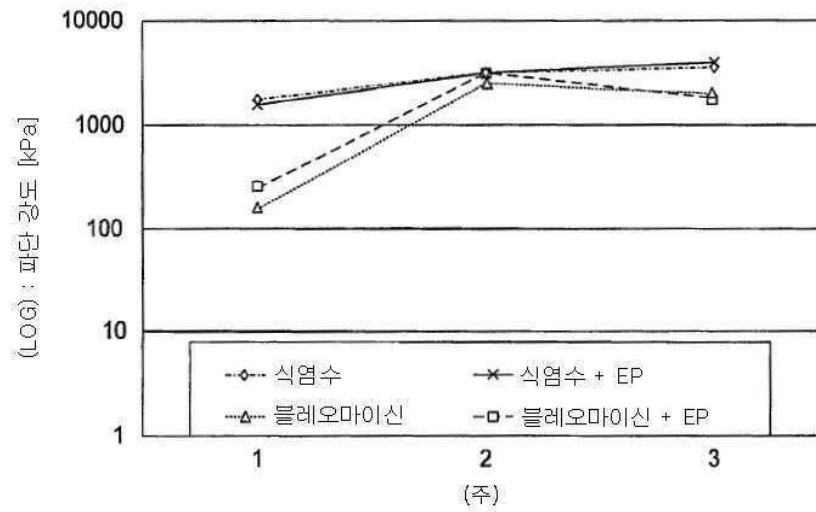
[0098]

20: 커버	21: 충전 포트
22: 기관	23: 전극
24: 전기 리드	25: 플러그
30, 40, 50: 기관	31: 웰
41: 플런저	
60: 중심 로드	61: 씬 휠
63: 지지 구조	64: 핸드그룹
70: 스크류	71: 나사산

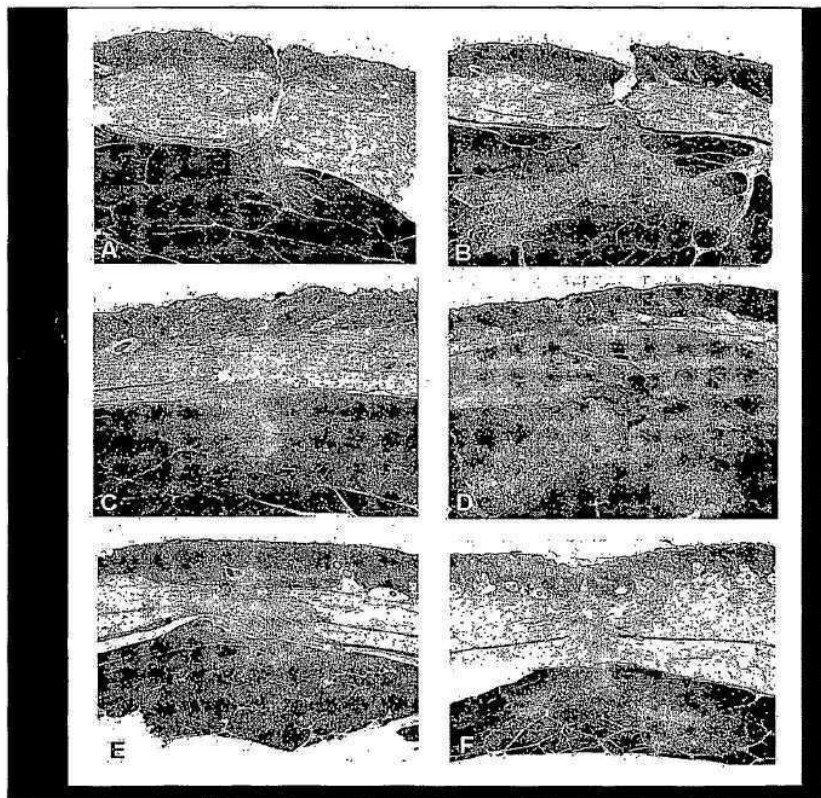
80: 원 너트

도면

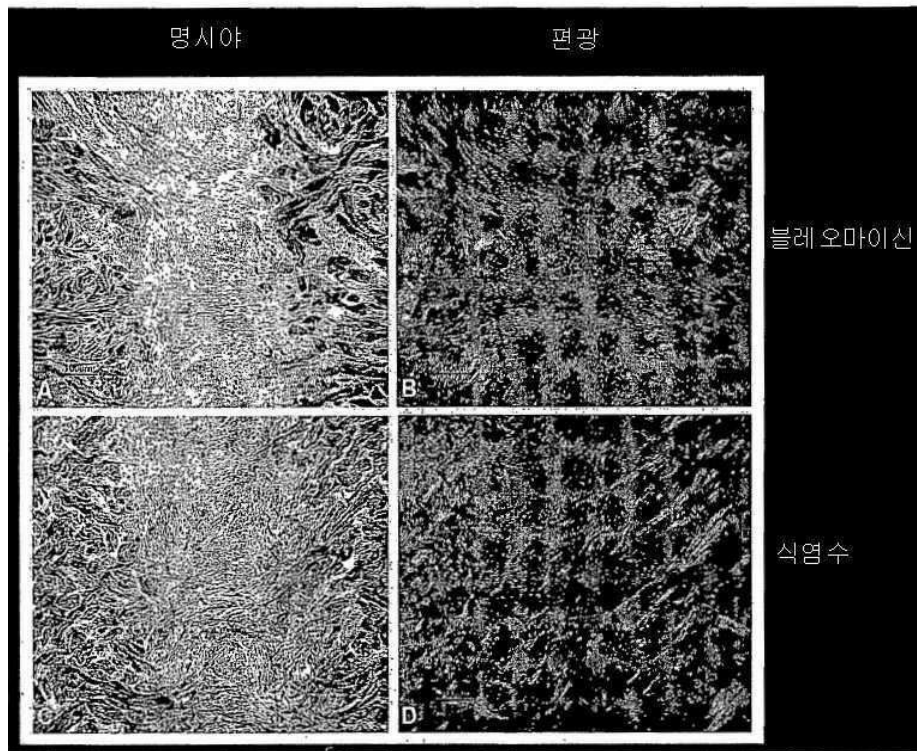
도면1



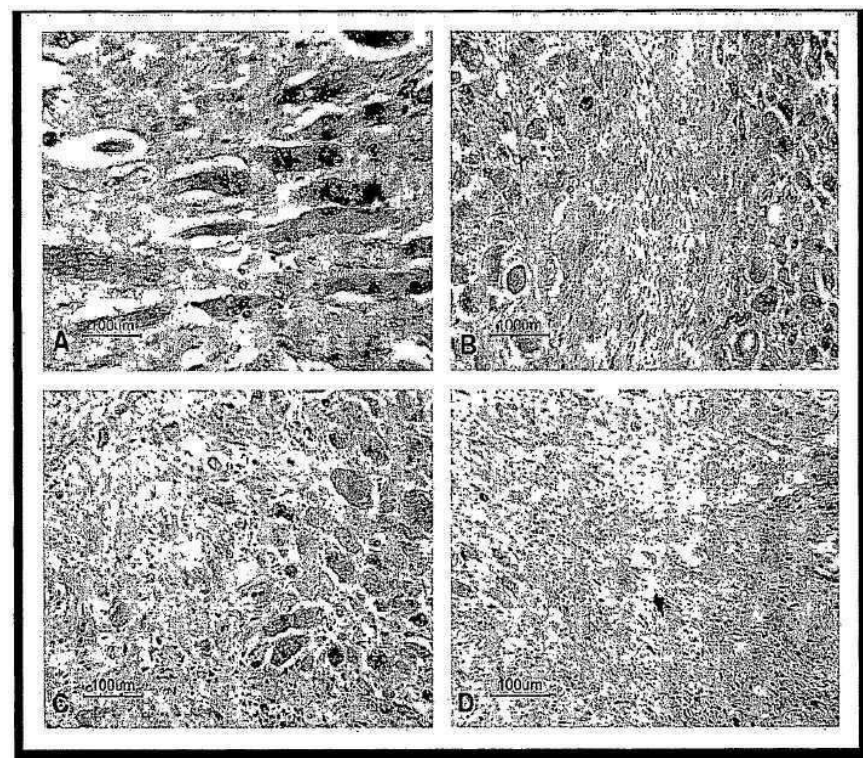
도면2



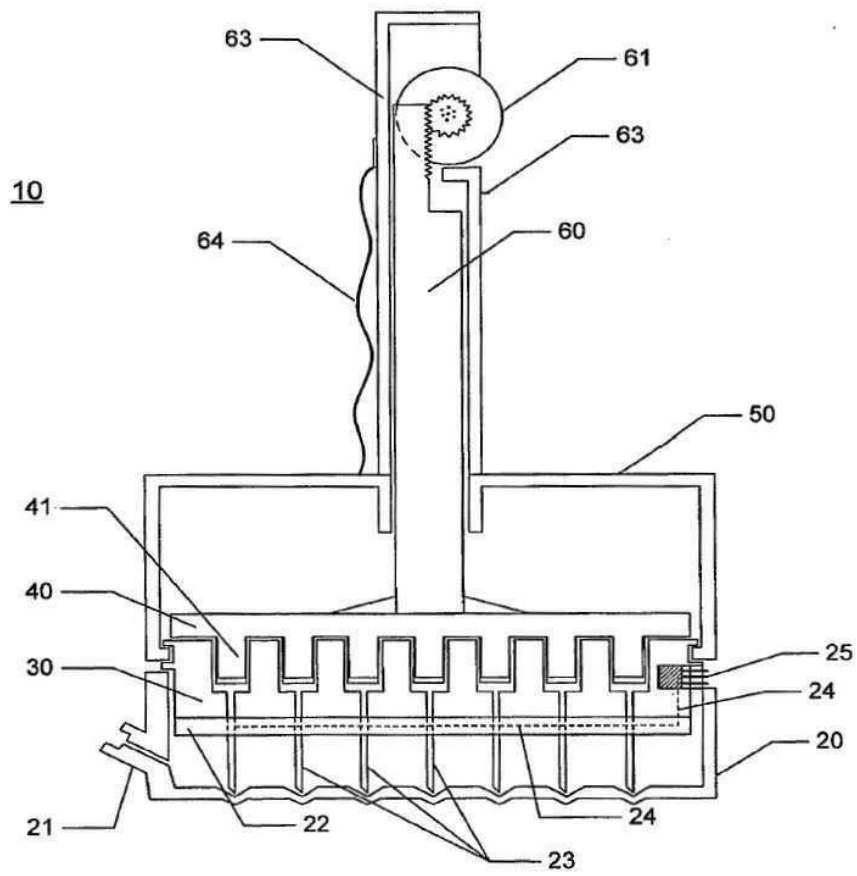
도면3



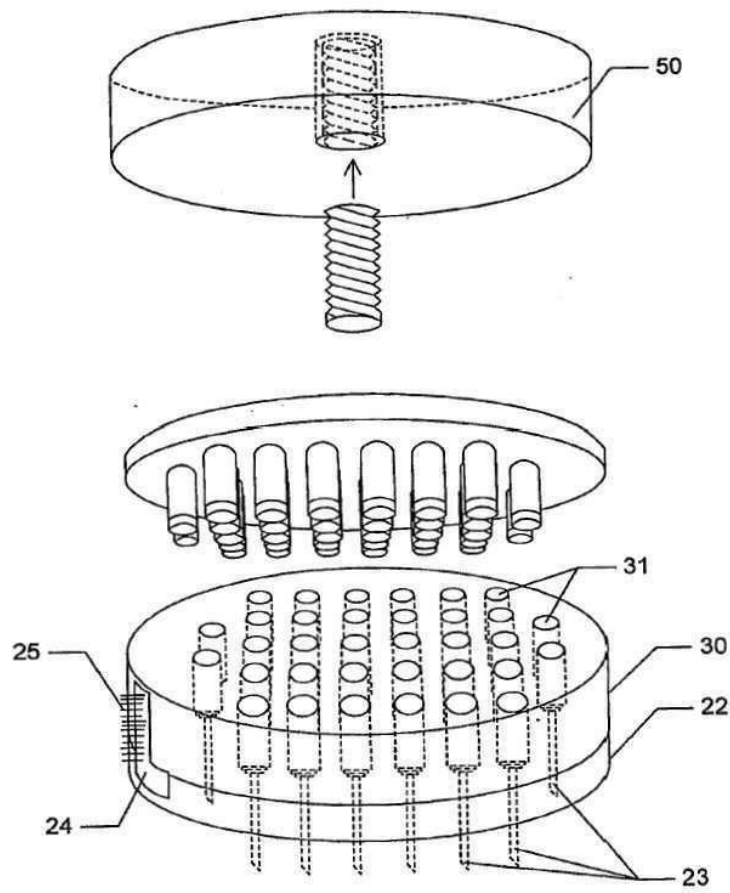
도면4



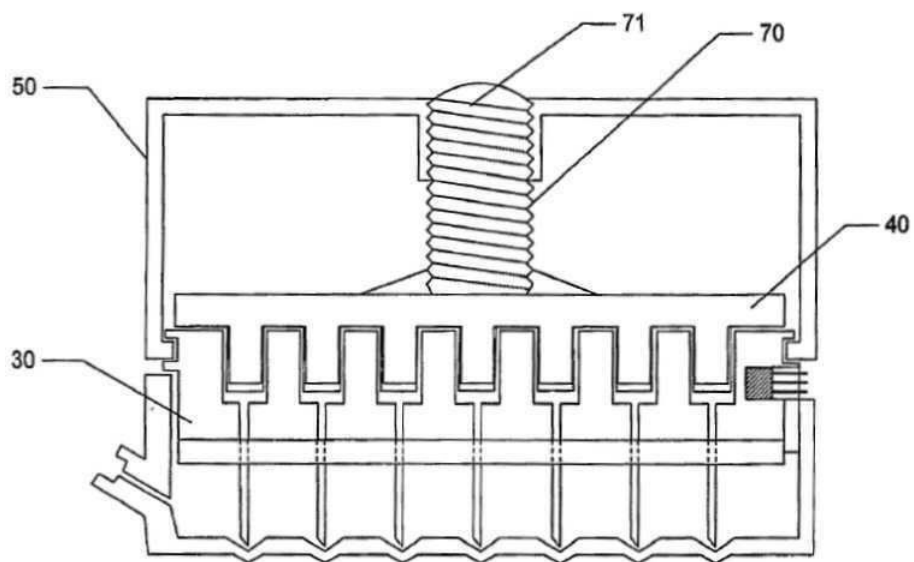
도면5



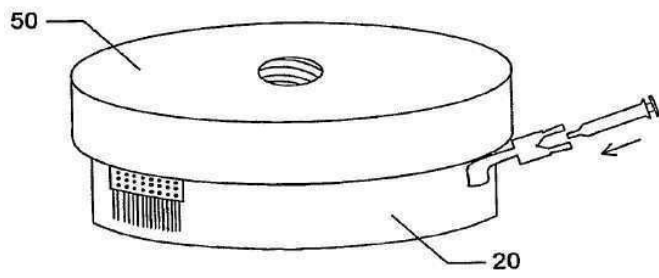
도면6



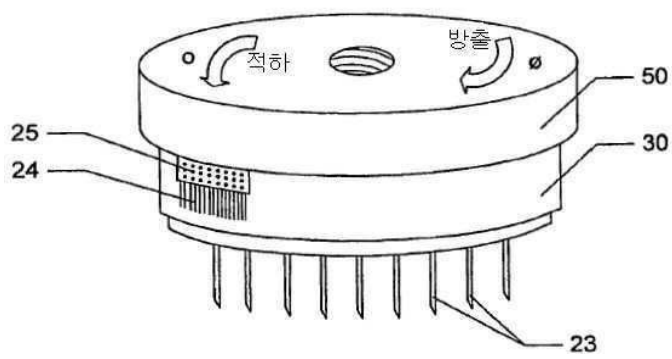
도면7



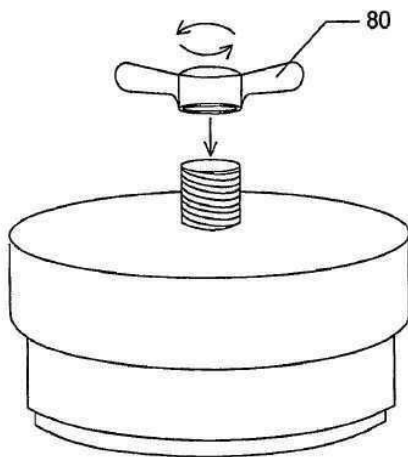
도면8a



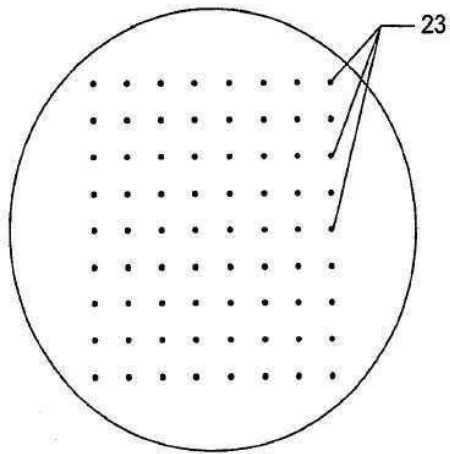
도면8b



도면9



도면10



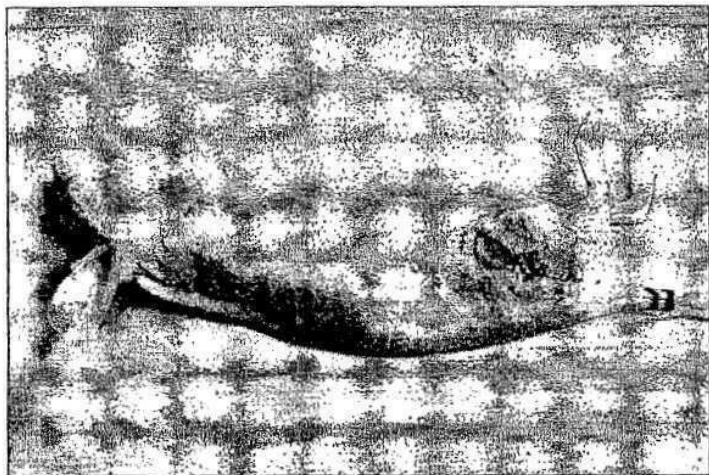
도면11a



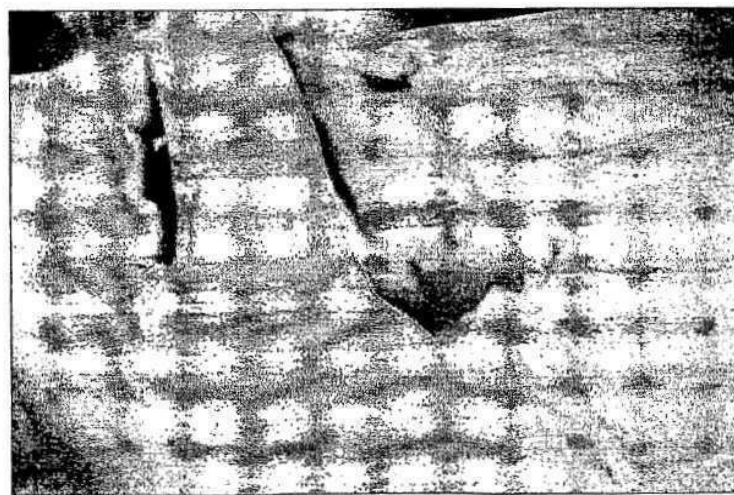
도면11b



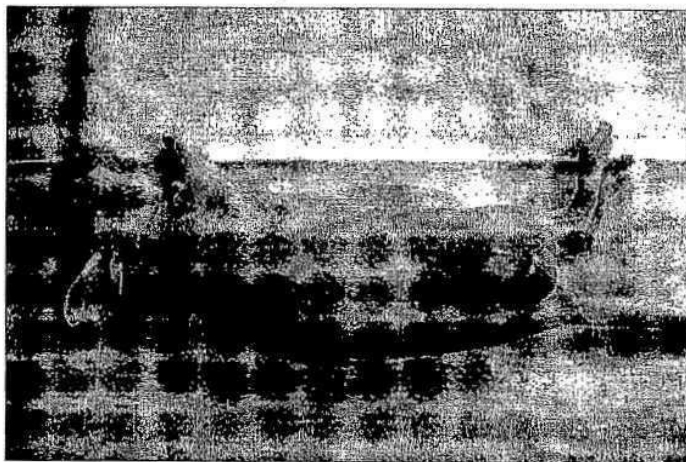
도면11c



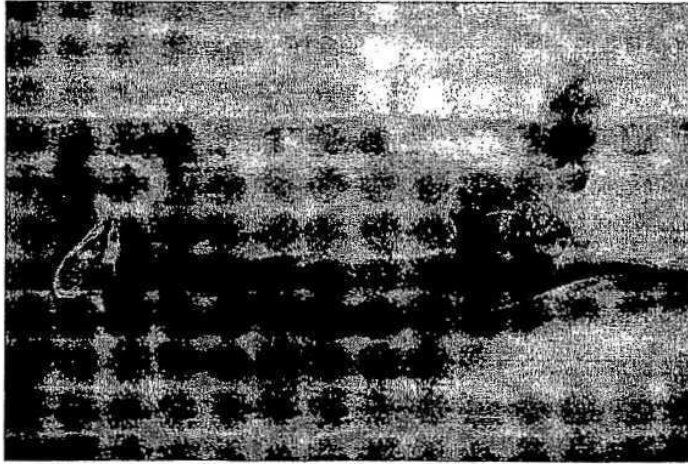
도면11d



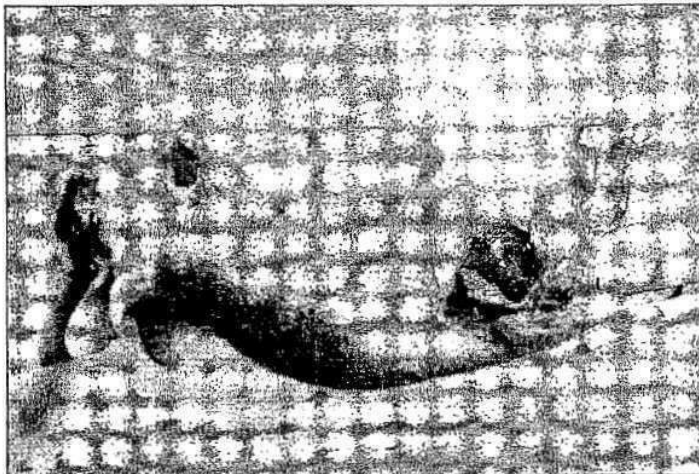
도면12a



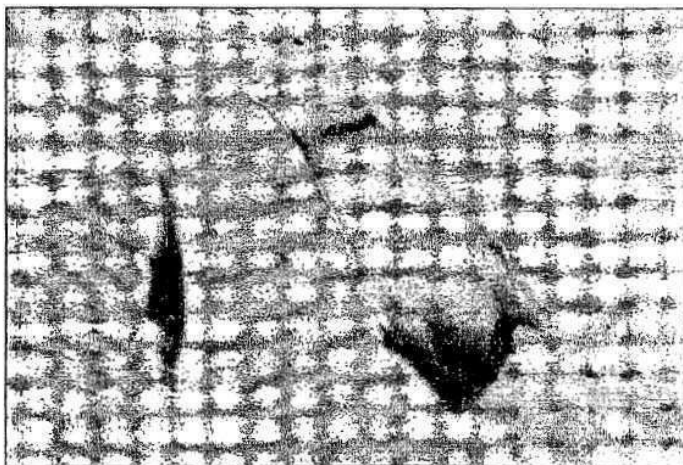
도면12b



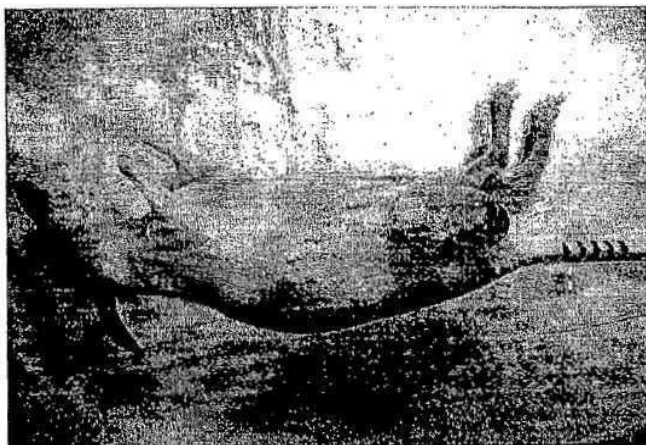
도면12c



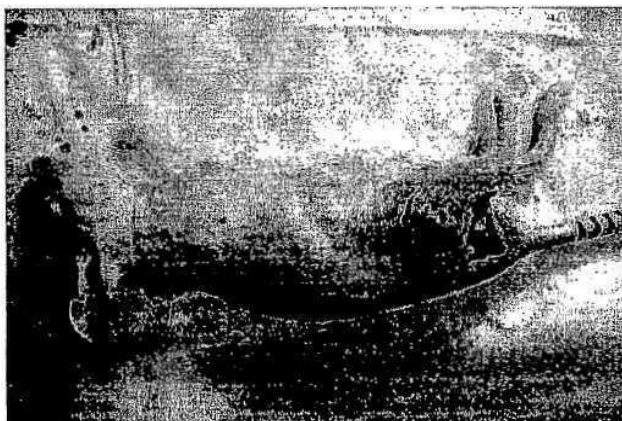
도면12d



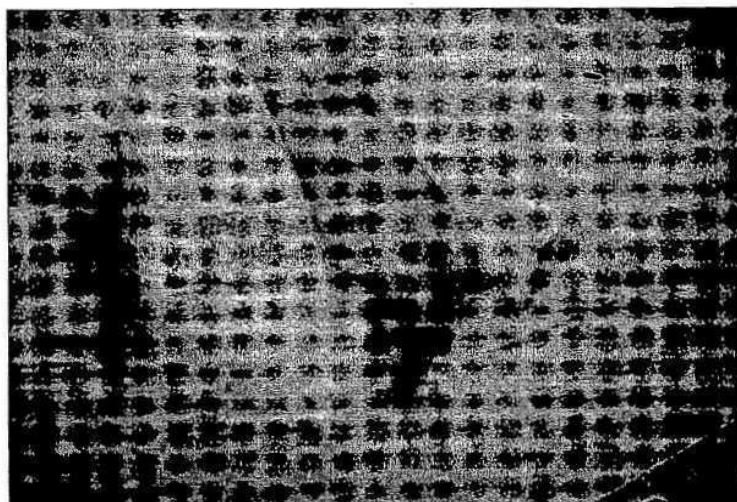
도면13a



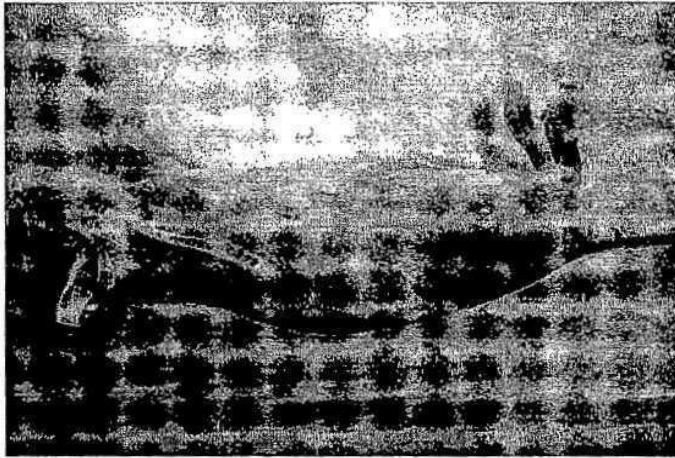
도면13b



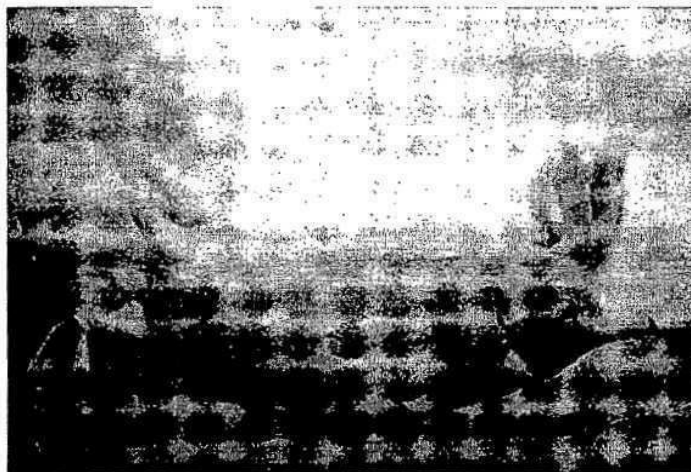
도면13c



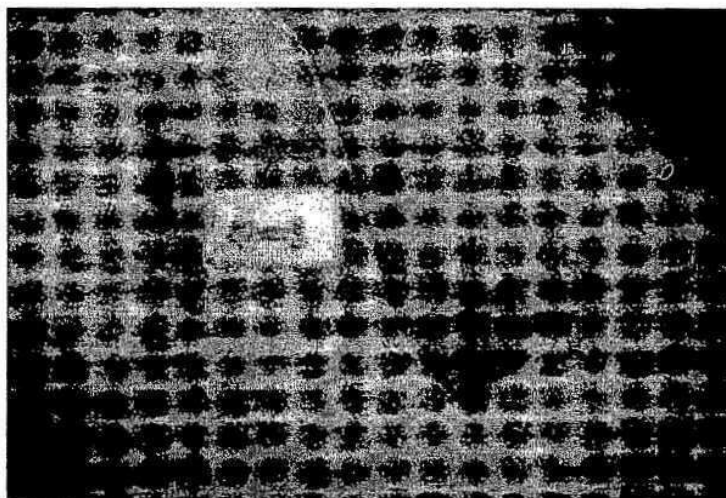
도면14a



도면14b



도면14c



도면15

