

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6896839号  
(P6896839)

(45) 発行日 令和3年6月30日 (2021.6.30)

(24) 登録日 令和3年6月11日 (2021.6.11)

(51) Int.Cl. F 1  
A 6 1 N 1/40 (2006.01) A 6 1 N 1/40

請求項の数 19 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2019-502289 (P2019-502289)	(73) 特許権者	519275847 ノボキア ゲーエムベーパー
(86) (22) 出願日	平成29年4月4日 (2017.4.4)		スイス国 6039 ロート ディー4, パーク 6
(65) 公表番号	特表2019-510606 (P2019-510606A)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(43) 公表日	平成31年4月18日 (2019.4.18)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(86) 国際出願番号	PCT/IB2017/051898	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(87) 国際公開番号	W02017/175116	(72) 発明者	ローザ・シュナイダーマン イスラエル・35012・ハイファ・アハ ロン・ローゼンフェルド・ストリート・1 7/12
(87) 国際公開日	平成29年10月12日 (2017.10.12)		
審査請求日	令和2年3月27日 (2020.3.27)		
(31) 優先権主張番号	62/317,985		
(32) 優先日	平成28年4月4日 (2016.4.4)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍治療電場 (T T F i e l d s) を使用してがん細胞の運動性を低下させる

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的領域におけるがん細胞の拡散を阻害する装置であって、

(i) 第1の方向で標的領域に電場を印加するように、標的領域付近に配置される第1の組の容量結合型電極を通してAC電圧を印加するように構成される、第1の制御可能な出力、及び

(ii) 第2の方向で標的領域に電場を印加するように、標的領域付近に配置される第2の組の容量結合型電極を通してAC電圧を印加するように構成される、第2の制御可能な出力を有するAC信号発生器、並びに

(a) がん細胞の有糸分裂を攪乱する電場を印加するように選択される、第1の周波数及び第1の振幅を有する第1のAC信号が第1の時間間隔で発生するように、第1の制御可能な出力を制御し、

(b) がん細胞の運動性を低下させる電場を印加するように選択される、第2の周波数及び第2の振幅を有し、第2の振幅が第1の振幅より小さい第2のAC信号が第2の時間間隔で発生するように、第1の制御可能な出力を制御し、

(c) がん細胞の有糸分裂を攪乱する電場を印加するように選択される、第3の周波数及び第3の振幅を有する第3のAC信号が第3の時間間隔で発生するように、第2の制御可能な出力を制御し、

(d) がん細胞の運動性を低下させる電場を印加するように選択される、第4の周波数及び第4の振幅を有し、第4の振幅が第3の振幅より小さい第4のAC信号が第4の時間間隔で発生す

10

20

るように、第2の制御可能な出力を制御し、  
(e)治療過程の間、(a)から(d)を交互に連続して繰り返すように構成される制御装置を備える、装置。

【請求項2】

第2の振幅が第1の振幅の75%未満であり、第4の振幅が第3の振幅の75%未満である、請求項1に記載の装置。

【請求項3】

第2の周波数と第1の周波数とが異なり、第4の周波数と第3の周波数とが異なる、請求項1に記載の装置。

【請求項4】

第2の振幅が第1の振幅の75%未満であり、第4の振幅が第3の振幅の75%未満であり、第2の周波数と第1の周波数とが異なり、第4の周波数と第3の周波数とが異なり、第3の周波数が第1の周波数と同じであり、第4の周波数が第2の周波数と同じであり、第1の時間間隔が5秒未満であり、第2の時間間隔が5秒未満であり、第3の時間間隔が5秒未満であり、第4の時間間隔が5秒未満である、請求項1に記載の装置。

【請求項5】

第1の周波数が $200\text{kHz} \pm 10\%$ であり、第2の周波数が $300\text{kHz} \pm 10\%$ であり、第3の周波数が $200\text{kHz} \pm 10\%$ であり、第4の周波数が $300\text{kHz} \pm 10\%$ である、請求項1に記載の装置。

【請求項6】

標的領域におけるがん細胞の拡散を阻害する装置であって、

(a)第1のAC電場を第1の時間間隔で標的領域に印加する工程であって、第1のAC電場が第1の周波数及び第1の振幅を有し、第1のAC電場ががん細胞の有糸分裂を攪乱するように第1の周波数及び第1の振幅が選択される、工程、

(b)第2のAC電場を第2の時間間隔で標的領域に印加する工程であって、第2のAC電場が第2の周波数及び第2の振幅を有し、第2のAC電場ががん細胞の運動性を低下させるように第2の周波数及び第2の振幅が選択され、第2の振幅が第1の振幅より小さい、工程、並びに

(c)治療過程の間、工程(a)及び工程(b)を交互に連続して繰り返す工程  
を実行するよう構成されたAC信号発生器及び制御装置を含む、装置。

【請求項7】

第2の振幅が第1の振幅の75%未満である、請求項6に記載の装置。

【請求項8】

第1の時間間隔が5秒未満であり、第2の時間間隔が5秒未満である、請求項7に記載の装置。

【請求項9】

前記治療過程が少なくとも12時間の継続期間を有する、請求項8に記載の装置。

【請求項10】

第2の周波数と第1の周波数とが異なる、請求項6に記載の装置。

【請求項11】

第1の周波数が $200\text{kHz} \pm 10\%$ であり、第2の周波数が $300\text{kHz} \pm 10\%$ である、請求項6に記載の装置。

【請求項12】

前記治療過程の間に、細胞運動性を阻害する化合物と組み合わせられる、請求項6に記載の装置。

【請求項13】

前記化合物がブメタニドを含む、請求項12に記載の装置。

【請求項14】

第2の振幅が少なくとも $0.6\text{V/cm RMS}$ である、請求項6に記載の装置。

【請求項15】

第2の振幅が第1の振幅の75%未満であり、第2の周波数と第1の周波数とが異なり、第1の時間間隔が5秒未満であり、第2の時間間隔が5秒未満であり、第2の振幅が少なくとも $0.6\text{V}$

10

20

30

40

50

/cm RMSである、請求項6に記載の装置。

【請求項 1 6】

第1のAC電場が、第1の時間間隔の第1の部分の間、第1の方向で標的領域に印加され、第1のAC電場が、第1の時間間隔の第2の部分の間、第2の方向で標的領域に印加され、第1の方向と第2の方向との間の角度が $60^{\circ} \sim 90^{\circ}$ である、請求項6に記載の装置。

【請求項 1 7】

第2のAC電場が、第2の時間間隔の第1の部分の間、第1の方向で標的領域に印加され、第2のAC電場が、第2の時間間隔の第2の部分の間、第2の方向で標的領域に印加される、請求項16に記載の装置。

【請求項 1 8】

第2の周波数と第1の周波数とが異なり、第1の時間間隔が5秒未満であり、第2の時間間隔が5秒未満である、請求項6に記載の装置。

【請求項 1 9】

第1のAC電場の方向が、前記繰り返す工程(a)及び(b)の少なくとも一部の間変更され、第2のAC電場の方向が、前記繰り返す工程(a)及び(b)の少なくとも一部の間変更される、請求項6に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2016年4月4日出願の米国仮出願第62/317,985号の利益を主張するものである。

【背景技術】

【0002】

TTFieldsは、腫瘍を治療するための有効かつFDAの承認を受けた手法である。TTFieldsを使用する治療は、腫瘍を含む標的領域に対し、低強度で中間周波数の交流電場を連続的、非侵襲的に印加することを伴う。以前の研究で、TTFieldsが微小管及びセプチンフィラメントを攪乱することが示されており、その両方が有糸分裂において重要な役割を果たす。

【0003】

Novocure社Optune(登録商標)システムは、TTFieldsを使用して神経膠芽腫を治療するための、現行の最先端技術である。Optune(登録商標)は、患者の体の腫瘍付近に配置される1組の電極(トランスデューサーアレイとも呼ばれる)を使用する。Optune(登録商標)電場発生装置ユニットは、腫瘍を含む標的領域にAC電場を誘導するように、これらの電極にAC信号を印加する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】米国特許第7089054号

【特許文献 2】米国特許第6868289号

【特許文献 3】米国特許第7706890号

【特許文献 4】米国特許第8244345号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

Optune(登録商標)システムは、腫瘍におけるAC電場の強度が1V/cm RMSを超えると最も良好に機能し、電場強度を2~3V/cm RMSに増大させると、概して結果の改善がもたらされる。しかし、熱的な問題点で、標的領域に送達されうるAC電場の強度が制限されることが多い。より具体的には、患者の皮膚は過熱から保護されなければならないため、Optune(登録商標)システムはトランスデューサーアレイの下の温度を検知し、その温度が41℃を

10

20

30

40

50

上回らないように場合によっては電場の強度を低下させる。残念ながら、この温度制御策によってもたらされる安全性及び快適性の利益には欠点に伴う：強度が低下した電場は、有糸分裂を攪乱するにあたって最大強度の電場よりも有効性が低いのである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の一態様は、標的領域におけるがん細胞の拡散を阻害する第1の方法を対象とする。この方法は、(a)第1の周波数及び第1の振幅を有する第1のAC電場を第1の時間間隔で標的領域に印加する工程を含む。第1の周波数及び第1の振幅は、第1のAC電場ががん細胞の有糸分裂を攪乱するように選択される。この方法は、(b)第2の周波数及び第2の振幅を有する第2のAC電場を第2の時間間隔で標的領域に印加する工程も含む。第2の周波数及び第2の振幅は、第2のAC電場ががん細胞の運動性を低下させるように選択され、第2の振幅は第1の振幅より小さい。この方法は、治療過程の間、工程(a)及び工程(b)を交互に連続して繰り返す工程も含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】本明細書に記載される実験のいくつかを実施するのに使用される、ペトリ皿における電極の配置を示す図である。

【図2】2つの異なる細胞株に対するTTFieldsの効果について試験した、細胞遊走率実験の結果を示すグラフである。

【図3】4つの異なる細胞株に対するTTFieldsの効果について試験した、細胞浸潤実験の結果を示すグラフである。

20

【図4】TTFieldsによるU-87神経膠腫阻害の周波数依存性について試験した、細胞浸潤実験の結果を示すグラフである。

【図5】TTFieldsによる神経膠腫がん細胞阻害の方向依存性について試験した、細胞遊走率実験の結果を示すグラフである。

【図6】神経膠腫がん細胞の阻害におけるTTFieldsの有効性をブメタニドの有効性と比較する、細胞浸潤実験の結果を示すグラフである。

【図7】信号発生器及び電極を含む、本発明の実施形態を示す図である。

【図8】図7の実施形態の、信号発生器の出力についてのイベントの第1の順序を示す図である。

30

【図9】図7の実施形態の、信号発生器の出力についてのイベントの更なる順序を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

第1の方法の一部の実施形態では、第2の振幅が第1の振幅の75%未満である。任意選択で、これらの実施形態では、第1の時間間隔が5秒未満であり、第2の時間間隔が5秒未満である。治療過程は少なくとも12時間の継続期間とすることができる。

【0009】

第1の方法の一部の実施形態では、第2の周波数及び第1の周波数が異なる。第1の方法の一部の実施形態では、第1の周波数が $200\text{kHz} \pm 10\%$ であり、第2の周波数が $300\text{kHz} \pm 10\%$ である。

40

【0010】

一部の実施形態では、第1の方法は、治療過程の間に、細胞運動性を阻害する化合物を投与する工程を更に含む。これらの実施形態のいくつかでは、化合物はブメタニドを含む。

【0011】

第1の方法の一部の実施形態では、第2の振幅が少なくとも $0.6\text{V/cm RMS}$ である。

【0012】

第1の方法の一部の実施形態では、第2の振幅が第1の振幅の75%未満であり、第2の周波数及び第1の周波数が異なり、第1の時間間隔が5秒未満であり、第2の時間間隔が5秒未満

50

であり、第2の振幅が少なくとも0.6V/cm RMSである。任意選択で、これらの実施形態では、第1の周波数が200kHz $\pm$ 10%であり、第2の周波数が300kHz $\pm$ 10%である。

【0013】

第1の方法の一部の実施形態では、第1の時間間隔の第1の部分の間、第1のAC電場が第1の方向で標的領域に印加され、第1の時間間隔の第2の部分の間、第1のAC電場が第2の方向で標的領域に印加され、第1の方向と第2の方向の間の角度が60°～90°である。これらの実施形態のいくつかでは、第2の時間間隔の第1の部分の間、第2のAC電場が第1の方向で標的領域に印加され、第2の時間間隔の第2の部分の間、第2のAC電場が第2の方向で標的領域に印加される。これらの実施形態のいくつかでは、第2の振幅が第1の振幅の75%未満である。これらの実施形態のいくつかでは、第2の周波数及び第1の周波数が異なり、第1の時間間隔が5秒未満であり、第2の時間間隔が5秒未満である。

10

【0014】

第1の方法の一部の実施形態では、繰り返し工程の少なくともいくつかの間、第1のAC電場の方向が変更され、繰り返し工程の少なくともいくつかの間、第2のAC電場の方向が変更される。これらの実施形態のいくつかでは、第2の振幅が第1の振幅の75%未満である。これらの実施形態のいくつかでは、第2の周波数及び第1の周波数が異なり、第1の時間間隔が5秒未満であり、第2の時間間隔が5秒未満である。

【0015】

本発明の別の態様は、標的領域におけるがん細胞の拡散を阻害する第2の方法を対象とする。この方法は、(a)第1の周波数及び第1の振幅を有する第1のAC電場を標的領域に印加する工程を含む。第1の周波数及び第1の振幅は、第1のAC電場ががん細胞の有糸分裂を攪乱するように選択される。この方法は、(b)第2の周波数及び第2の振幅を有する第2のAC電場を標的領域に印加する工程も含む。第2の周波数及び第2の振幅は、第2のAC電場ががん細胞の運動性を低下させるように選択される。第2の周波数及び第1の周波数は異なり、第2の振幅は第1の振幅より小さい。

20

【0016】

第2の方法の一部の実施形態では、第2の振幅が第1の振幅の75%未満である。

【0017】

本発明の別の態様は、標的領域におけるがん細胞の拡散を阻害する第1の装置を対象とする。この装置は、(i)第1の方向で標的領域に電場を印加するように、標的領域付近に配置される第1の組の容量結合型電極を通してAC電圧を印加するように構成される、第1の制御可能な出力、及び(ii)第2の方向で標的領域に電場を印加するように、標的領域付近に配置される第2の組の容量結合型電極を通してAC電圧を印加するように構成される、第2の制御可能な出力を有するAC信号発生器を含む。この装置は、(a)第1の周波数及び第1の振幅を有する第1のAC信号が第1の時間間隔で発生するように、第1の制御可能な出力を制御するように構成される制御装置も含む。第1の周波数及び第1の振幅は、がん細胞の有糸分裂を攪乱する電場を印加するように選択される。制御装置は、(b)第2の周波数及び第2の振幅を有する第2のAC信号が第2の時間間隔で発生するように、第1の制御可能な出力を制御するようにも構成される。第2の周波数及び第2の振幅はがん細胞の運動性を低下させる電場を印加するように選択され、第2の振幅は第1の振幅より小さい。制御装置は、(c)第3の周波数及び第3の振幅を有する第3のAC信号が第3の時間間隔で発生するように、第2の制御可能な出力を制御するようにも構成される。第3の周波数及び第3の振幅は、がん細胞の有糸分裂を攪乱する電場を印加するように選択される。制御装置は、(d)第4のAC信号が第4の時間間隔で発生するように、第2の制御可能な出力を制御するようにも構成される。第4のAC信号は、第4の周波数及び第4の振幅を有する。第4の周波数及び第4の振幅はがん細胞の運動性を低下させる電場を印加するように選択され、第4の振幅は第3の振幅より小さい。制御装置は、治療過程の間、(a)から(d)を交互に連続して繰り返すようにも構成される。

30

40

【0018】

第1の装置の一部の実施形態では、第2の振幅が第1の振幅の75%未満であり、第4の振幅

50

が第3の振幅の75%未満である。第1の装置の一部の実施形態では、第2の周波数及び第1の周波数が異なり、第4の周波数及び第3の周波数が異なる。

【0019】

第1の装置の一部の実施形態では、第2の振幅が第1の振幅の75%未満であり、第4の振幅が第3の振幅の75%未満であり、第2の周波数及び第1の周波数が異なり、第4の周波数及び第3の周波数が異なり、第3の周波数が第1の周波数と同じであり、第4の周波数が第2の周波数と同じであり、第1の時間間隔が5秒未満であり、第2の時間間隔が5秒未満であり、第3の時間間隔が5秒未満であり、第4の時間間隔が5秒未満である。

【0020】

第1の装置の一部の実施形態では、第1の周波数が $200\text{kHz} \pm 10\%$ であり、第2の周波数が $300\text{kHz} \pm 10\%$ であり、第3の周波数が $200\text{kHz} \pm 10\%$ であり、第4の周波数が $300\text{kHz} \pm 10\%$ である。

【0021】

神経膠芽腫細胞の、隣接する脳組織に浸潤する能力によって、神経膠芽腫を制御することが困難となっている可能性がある。したがって、神経膠腫がん細胞の運動性を妨げる治療様式を開発すれば、疾患抑制を促進できよう。

【0022】

抗有糸分裂効果を有することに加えて、TTFieldsが、適切な微小管動態を必要とするその他の細胞プロセスに影響を有することを発明者らは決定した。神経膠芽腫の進行に重大な影響を有するこのようなプロセスの1つは細胞運動性である。本出願では、神経膠腫細胞の、遊走及び浸潤特性の両方を含む細胞運動性に対するTTFieldsの効果を立証する。本出願では、標的領域におけるがん細胞にTTFieldsを印加することにより、細胞運動性を低下させる方法及びシステムについても記載する。

【実施例】

【0023】

一連の実験を行って、ヒト神経膠腫細胞の遊走及び浸潤特性を含むこれらの細胞の運動性に対する、TTFieldsの効果を評価した。

【0024】

第1の実験では、in vitroのスクラッチ創傷アッセイを使用して、U-87MG及びA-172神経膠腫細胞の遊走に対するTTFieldsの効果を決定した。この実験では、IBIDI社培養インサートを使用してin vitro創傷アッセイを実施した。高誘電率セラミック( $>5000$ )(Exelis社、Salt Lake City, Utah)で断熱された2対の電極141~142及び143~144を使用して、TTFields( $200\text{kHz}$ 、 $1.75\text{RMS}$ )を印加した。電極対141~142及び143~144は、図1に示す形状で互いに垂直にペトリ皿150内に配置した。標的領域でTTFieldsを発生させるため、電極141~144を、電極141~144に適切なAC信号を印加する改良Novocure社Optune(登録商標)システムに接続した。TTFieldsは1秒ごとに方向を $90^\circ$ 変更した。これは、(a)電極141と142の間に1秒間AC信号を印加し、次いで(b)電極143と144の間に1秒間AC信号を印加し、次いでこの(a)+(b)の順序を実験過程の間繰り返すことにより遂行された。皿150に組み込まれたサーミスタ(図示しない)で温度を測定した。

【0025】

U-87MG及びA-172細胞にスクラッチをつけて画像化した。24時間、時系列で遊走を観察した(Zeiss社axio observer;10対物レンズにより)。12分ごとに位相像を記録した。0時間時点でのスクラッチのベースライン画像、及び14時間後にスクラッチ領域に遊走した細胞について、同じ参照点で検査した。得られた画像を更に評価し、Image Pro Premier(Media Cybernetics社、USA)ソフトウェアを使用して創傷治癒の間の細胞遊走率を定量化した。遊走率の定量分析は、時間に応じて、細胞がスクラッチのへりからスクラッチの中央に向かって移動した総距離として算出して実施した。

【0026】

図2A及び図2Bでは、この第1の実験における定量分析の結果についてまとめている。図2A及び図2Bそれぞれから分かるように、未処理の対照細胞と比較して、TTFields処理され

10

20

30

40

50

たU-87MG(31%)及びA-172(27%)細胞株では細胞遊走率が有意に低下した(平均+SEM; 対照群と比較して\*\*\* $p < 0.001$ , Studentのt検定)。実験を3回繰り返した。これらの結果は、TTFieldsが、様々な神経膠腫細胞株において細胞遊走を妨げることを示している。

#### 【 0 0 2 7 】

第2の実験では、改良ボイデンチャンバーを使用して浸潤アッセイを実施し、U-87MG、A-172、LN-229及びLN-18細胞の浸潤に対するTTFieldsの効果を決定した。マトリゲル(Corning社)でコーティングされたフィルター(直径6.4mm、孔径8 $\mu$ m)を使用した。高誘電率セラミック(200kHz、0.6V/cm RMS)で断熱された垂直な対の電極を用い、Novocure社Inovitroシステムを使用してTTFieldsを印加した。この実験での電極の形状は図1に示す形状と同様であり、電場の方向を1秒ごとに切り替えた(第1の実験で先に記載したように)。高い縦壁を有するInovitroの皿を使用して、トランスウェルを介したTTFieldsの有効な送達を促進した。U-87MG、A-172、LN-229及びLN-18細胞( $2 \times 10^5$ )を血清不含DMEM中で懸濁させ、チャンバーの上側の区画に播種した。下側の区画は10%FBS DMEMを含んでいた。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で24時間インキュベートした後、底部のフィルターに浸潤した細胞を4%PFAで固定し、0.5%クリスタルバイオレット(Sigma社)で染色し、倒立顕微鏡で画像化した(Nikon社eclipse TS100; 上側パネル-対照、下側パネル-TTFields処理された細胞; 対物レンズ $\times 10$ )。ImageJソフトウェア(NIH)を使用して、浸潤した細胞の定量化を実施した。

#### 【 0 0 2 8 】

図3では、この第2の実験における定量化の結果についてまとめている。未処理の対照細胞と比較して、TTFields処理された細胞株全て:U-87MG(54%)、A-172(68%)、LN-229(38%)及びLN-18(55%)で、浸潤した細胞の数が有意に減少した(平均+SEM; 対照群と比較して、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ , Studentのt検定)。これらの結果は、TTFieldsが、様々な神経膠腫細胞株において細胞浸潤を妨げることを示している。この浸潤実験の継続期間(24時間)が、TTFieldsの抗有糸分裂効果に通常必要な継続期間(72時間)より短かったことは注目に値する。この浸潤低下を引き起こした電場強度(すなわち、0.6V/cm RMS)が、TTFieldsの抗有糸分裂効果に通常必要な電場強度(すなわち、1V/cm RMS超)より小さかったことも注目に値するものであった。

#### 【 0 0 2 9 】

U-87神経膠腫がん細胞の浸潤能の、TTFieldsによる阻害の周波数依存性について試験するため、第3の実験を実施した。第2の実験に関して先に記載された改良ボイデンチャンバーを使用して、U-87浸潤アッセイを実施した。第1の実験に関して先に記載されたものと同じ0.6V/cm RMSというわずかな強度、及び同じ方向切り替えを使用して、各種周波数(100、200、300、及び400kHz)でTTFieldsを印加した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で24時間インキュベートした後、底部のフィルターに浸潤した細胞を固定し、第2の実験に関して先に記載されたように画像化及び定量化した。

#### 【 0 0 3 0 】

図4では、この第3の実験における定量化の結果についてまとめている。周波数依存的に試験された4種のTTFieldsの周波数全てにおいて、浸潤した細胞の数が減少(対照に対して)し、浸潤した細胞の数の最大の減少は、周波数300kHzで観察された。おそらく最も注目すべきことに、浸潤能の最大の低下をもたらした周波数は、U-87細胞で最大の抗有糸分裂効果をもたらす周波数200kHz(以前の実験に基づく)と異なっていた。

#### 【 0 0 3 1 】

神経膠腫がん細胞の遊走の、TTFieldsによる阻害の方向依存性について試験するため、第4の実験を実施した。ペトリ皿内に配置された、高誘電率セラミック(>5000)(Exeliss社、Salt Lake City, Utah)で断熱された2対の電極を使用して、TTFields(200kHz、1.75RMS)を印加した。電極対の形状は、図1に示す形状と同様であった。IBIDI培養インサートを使用してin vitro創傷アッセイを実施し、2つのインサートを、1つは電場と平行に、もう1つは電場の方向に対し垂直に各皿に入れた。この実験で必要な各種方向で電場を発生させるため、電極を、電極にAC信号を印加する改良Optune(登録商標)システムに接続した。皿に組み込まれたサーミスタで温度を測定した。

10

20

30

40

50

## 【0032】

A-172細胞に、垂直な2方向にスクラッチをつけて画像化した。上記のように24時間、時系列で遊走を観察した。得られた画像を更に評価し、Image Pro Premier(Media Cybernetics社、USA)ソフトウェアを使用して創傷治癒の間の細胞遊走率を定量化した。遊走率の定量分析は、時間に応じて、細胞がスクラッチのへりからスクラッチの中央に向かって移動した総距離として算出した。

## 【0033】

図5では、この第4の実験における定量分析の結果についてまとめている。細胞遊走率は、対照と比較して、細胞が電場と平行に遊走した場合に有意に低下し(24%)、これは、TTFieldsが異なる2方向から印加され、1秒ごとに切り替えられた場合に得られた低下(27%)と同様であった。興味深いことに、遊走進路に対し垂直な1方向から印加されたTTFieldsで遊走率の最大の低下(39%)が生じ、これは、TTFieldsが2方向又は遊走進路と平行な1方向で印加された場合に得られた低下より有意に大きかった(両群と比較して\*\*\* $p < 0.001$ 、Studentのt検定。実験は3回繰り返した)。これらの結果は、印加された電場の方向が、遊走進路に応じて、遊走率に対して異なる効果を有することを示している。

## 【0034】

神経膠腫細胞の浸潤能の阻害におけるTTFieldsの有効性をブメタニドの有効性と比較するため、第5の実験を実施した。ブメタニドは、心不全を治療するためのスルファミル系のループ利尿薬であり、細胞運動性に作用することが知られている。脳において、ブメタニドはNKCC1カチオン-塩素イオン共輸送体を遮断し、それによりニューロンにおける内部塩素イオン濃度を低下させる。NKCC1は、神経膠腫細胞における $\text{Cl}^-$ 蓄積の主要な経路をもたらし、NKCC1は浸潤プロセスの最前線に局在化しており、ループ利尿薬ブメタニドを使用する薬理的な阻害により、*in vitro*でのトランスウェル遊走が25%~50%阻害される。

## 【0035】

わずかな改良を加えて、第2の実験に関して先に記載されたように浸潤アッセイを実施した。より具体的には、U-87細胞( $2 \times 10^5$ )を血清不含DMEM中で懸濁させ、チャンバーの上側の区画に播種した。下側の区画は10%FBS DMEMを含んでいた。両方の区画が、ブメタニドを濃度200  $\mu\text{M}$  で含んでいた。TTFieldsを上記の通り(200kHz、0.6V/cm RMS)印加した。5% $\text{CO}_2$ インキュベーター内で37℃で24時間インキュベートした後、底部のフィルターに浸潤した細胞を固定し、クリスタルバイオレットで染色し、倒立顕微鏡で画像化した。ImageJソフトウェア(NIH)を使用して、浸潤した細胞の定量化を実施した。

## 【0036】

図6では、この第5の実験における定量化の結果についてまとめている。単独で施用されるTTFields(31%)又はブメタニド(34%)で処理された細胞では、浸潤した細胞の数が有意に減少した(対照群と比較して\*\*\* $p < 0.001$ 、Studentのt検定)。また、注目すべきことに、TTFields及びブメタニド両方を使用する併用処理では、浸潤した細胞の数の相乗的な61%の減少がもたらされ、これは、単独で施用されるTTFields又はブメタニドで得られた減少より有意に大きかった(\*\*\* $p < 0.001$ 、Studentのt検定)。これらの結果は、細胞運動性を阻害する薬物と組み合わせると、低強度TTFieldsに曝露すると、各処理単独と比較して、神経膠腫細胞の浸潤性に対する阻害効果の相乗的な増強がもたされうること示している。より具体的には、TTFieldsをブメタニドと組み合わせると、各処理単独と比較して、有効性の相乗的な増強がもたされた。

## 【0037】

現行型のNovocure社Optune(登録商標)システムは、単一の周波数で標的領域にAC電場を発生させ、その周波数は、標的領域内においてがん細胞の有糸分裂を攪乱するにあたって、電場の有効性を増大させるように前もって選択される。上記に示すように、Optune(登録商標)システムは、患者の皮膚の過熱を防止するため場合により電場の強度を低下させ、それにより電場は有糸分裂を攪乱するための有効性が低下する。下記実施形態は、上記第2及び第3の実験の2つの結果を活用している。より具体的には、下記実施形態は、(1)運動性の低下を引き起こすのに必要な電場強度が、TTFieldsの抗有糸分裂効果に通常必要な



電場強度より小さいこと;及び(2)少なくとも特定の細胞株では、運動性の最大の低下をもたらした周波数が、最大の抗有糸分裂効果をもたらす周波数と異なることを活用している。

#### 【0038】

図7は、信号発生器20及び4つの電極41~44(トランスデューサーアレイとも呼ばれる)を含む、本発明の実施形態を示す。電極41~44は、標的領域50に電場を誘導しうるように配置される。例えば、標的領域がペトリ皿である場合、電極41~44は、がん細胞55を含むペトリ皿の壁と接触して配置されてよい。或いは、標的領域が患者の体の一部である場合、電極41~44は、がん細胞55を含む腫瘍付近の患者の皮膚と接触して配置されてよい。信号発生器20は、2種の出力Q1及びQ2を有する。第1の出力Q1は電極41及び42を通して接続され、第2の出力Q2は電極43及び44を通して接続される。信号発生器20が出力Q1でAC電圧を出力すると、その電圧は電極41、42の間を通して出現し、標的領域50において第1の方向D1に電場を誘導するであろう。信号発生器20が出力Q2でAC電圧を出力すると、その電圧は電極43、44を通して出現し、標的領域50において第2の方向D2に電場を誘導するであろう。温度センサー48は電極41~44で温度を検知し、その温度の情報を、信号発生器20内に含まれる温度センサーインターフェース22に返す。検知された温度が過度に高い場合、制御装置25が信号発生器20の電力段28に、その出力電圧を低下させるように命令して、それにより最終的に温度が下降する。

#### 【0039】

先の段落における図7の描写が、現行型のNovocure社Optune(登録商標)システムの作動と非常に類似していることに留意されたい。しかし、Optune(登録商標)電場発生装置ユニットは常に同じ周波数を出力するため、図7の実施形態はOptune(登録商標)と区別可能である。より具体的には、Optune(登録商標)電場発生装置ユニットは常に、該当のがんに対するその抗有糸分裂効果に基づいて前もって選択された周波数(すなわち、神経膠芽腫の状況では200kHz)を出力する。対照的に、図7の実施形態は、がん細胞の有糸分裂を攪乱するように選択される第1の周波数と、がん細胞の運動性を低下させるように選択される第2の周波数との間で、その出力Q1、Q2の周波数を切り替える。これは、図7の実施形態では、図8~図9に関して後に記載されるように出力Q1及びQ2の周波数及び振幅を制御するために電力段28に適切な制御信号を出力する、制御装置25により遂行される。制御装置25は、当業者にとって明らかであるはずの様々な技術のいずれかを使用して実装されてよい。例には、本明細書に記載される順序を実行するようにプログラムされたマイクロプロセッサ又はマイクロコントローラベースの制御装置、及び本明細書に記載される順序を指揮するように適切な制御信号を発生するハードウェアタイマが含まれるがこれらに限定されない。電力段28のハードウェア実装体は、制御装置25が発生させる制御信号に応答するように構成される。

#### 【0040】

図8は、制御装置25の制御下で電力段28が発生させる出力Q1及びQ2についてのイベントの第1の順序を示す。この順序では電場の方向は切り替えられず、このことは、電力段の出力のうち1つのみ(すなわちQ1又はQ2のいずれか)が必要であり、電極のうち一対のみ(すなわち、41/42又は43/44のいずれか)が必要であることを意味する。図8の下側半分の順序は以下の通りである:まず、 $t_0$ と $t_1$ の間、がん細胞の有糸分裂を攪乱するように選択される第1の周波数で第1のAC電場が標的領域に印加される。次いで、 $t_1$ と $t_2$ の間、がん細胞の運動性を低下させるように選択される第2の周波数で第2のAC電場が標的領域に印加される。次いで、治療過程が終了するまでこの順序が繰り返される。

#### 【0041】

一部の実施形態では、周波数の切り替え(図8の下側半分に示すように)に加えて、信号発生器の出力の振幅も同調して切り替えられる(図8の上側半分に示すように)。これらの実施形態では、制御装置25の制御下で電力段28が発生させる出力についてのイベントの順序は以下の通りである。

#### 【0042】

10

20

30

40

50

工程(a)では、第1のAC電場が、第1の時間間隔(例えば $t_0$ と $t_1$ の間隔)で標的領域に印加される。第1のAC電場は第1の周波数及び第1の振幅を有し、第1の周波数及び第1の振幅は、第1のAC電場ががん細胞の有糸分裂を攪乱するように選択される。工程(b)では、第2のAC電場が、第2の時間間隔(例えば $t_1$ と $t_2$ の間隔)で標的領域に印加される。第2のAC電場は第2の周波数及び第2の振幅を有し、第2の周波数及び第2の振幅は、第2のAC電場ががん細胞の運動性を低下させるように選択される。第2の振幅は第1の振幅より小さい。次いで、これらの工程(a)及び(b)が、治療過程の間、交互に連続して繰り返される。任意選択で、工程(a)と工程(b)の間又は工程(b)と工程(a)の間に更なる中間工程が追加されてよい。例えば、制御装置25が電力段28に、工程(a)及び工程(b)の1つ又は複数の例の間に第3の周波数を出力するように命令してもよい。

10

**【0043】**

上記の通り、第2の振幅(抗運動性期の間)は、第1の振幅(抗有糸分裂期の間)より小さい。しかしこれは、運動性の低下を引き起こすのに必要な電場強度が、TTFieldsの抗有糸分裂効果に通常必要な電場強度より小さいため、問題ではない。また有利には、システムは、抗有糸分裂期(より大きい振幅が必要)の間に電場強度を低下させることなく電極の温度を下降させるため、抗運動性期の間の振幅減少を頼みにすることができる。

**【0044】**

更に、温度上昇が振幅の二乗に比例することによりこの利点は増す。結果として、抗運動性期の間、振幅を $X\%$ 減少させると、その期の間加熱を $(1-X)^2\%$ まで低下させることとなる。例えば、抗運動性期の間、振幅を $2V/cm$ から $1V/cm$ まで減少させると、その期の間加熱を $(1-0.5)^2\%$ まで(すなわち、元の値の4分の1まで)低下させることとなる。抗運動性期及び抗有糸分裂期が同じ継続期間を有するものと仮定すると、この改良により全体の加熱負荷が元の値の $5/8$ まで低下することとなる。

20

**【0045】**

一部の好ましい実施形態では、第2の振幅が第1の振幅の75%未満である。好ましくは、第1の時間間隔及び第2の時間間隔の両方が5秒未満である。これは、攪乱なしに抗有糸分裂効果を持続させるのに重要となりうる。好ましくは、治療過程は少なくとも12時間の継続期間を有する。一部の好ましい実施形態では、第1の周波数及び第2の周波数が異なる。他の実施形態では、第1の周波数及び第2の周波数が同じであってよい(すなわち、抗有糸分裂周波数が抗運動性周波数と一致する細胞株では)。一部の好ましい実施形態では、第1の周波数(すなわち抗有糸分裂周波数)が $200kHz \pm 10\%$ であり、第2の周波数(すなわち抗運動性周波数)が $300kHz \pm 10\%$ である。一部の好ましい実施形態では、抗移動性効果を維持するため、第2の振幅が少なくとも $0.6V/cm$  RMSである。任意選択で、細胞運動性を阻害する化合物(例えば、ブメタニド)が治療過程の間投与されてよい。

30

**【0046】**

一部の実施形態では、有糸分裂を攪乱するのに最適化された第1の周波数と、運動性を低下させるのに最適化された第2の周波数との間で電場の周波数を切り替えるのに加えて、標的領域における電場の方向も2つ以上の方向間で切り替え可能である。図9A及び図9Bは、図7に示す2つの方向D1とD2の間で電場の方向が切り替えられる2つの例を示す。信号発生器20が、電極41と42の間に印加されるその出力Q1を発生させると、電場が方向D1に発生する。信号発生器20が、電極43と44の間に印加されるその出力Q2を発生させると、電場が方向D2に発生する。

40

**【0047】**

図9Aは、このような一実施形態における、制御装置25の制御下で信号発生器20の電力段28が発生させる、出力Q1及びQ2についてのイベントの順序を示す。この順序では、周波数が切り替えられる速度より速い速度で、2つの方向D1とD2の間で方向が切り替えられる。ここでの順序は、周波数及び振幅の両方が互いに同調して切り替えられる図8に関して先に記載された順序と同様である。しかし、図8に関して先に記載された周波数及び振幅の切り替えに加えて、電場の方向も切り替えられる。より具体的には、第1の時間間隔の第1の部分の間(すなわち、 $t_0$ と $t_1$ の間の時間の第1の部分)、第1のAC電場が第1の方向で標的

50

領域に印加され、第1の時間間隔の第2の部分の間(すなわち、 $t_0$ と $t_1$ の間の時間の最後の部分)、第1のAC電場が第2の方向で標的領域に印加される。好ましくは、第1の方向D1と第2の方向D2の間の角度が $60^\circ \sim 90^\circ$ である。(本明細書で使用される、数値による角度の範囲は全て端点を含むことに留意されたい。)

#### 【0048】

一部の実施形態では、第1の時間間隔(抗有糸分裂期に相当)の間に方向を切り替えるのに加えて、第2の時間間隔(抗運動性期に相当)の間にも方向が切り替えられる。これらの実施形態では、第2の時間間隔の第1の部分の間(すなわち、 $t_1$ と $t_2$ の間の時間の第1の部分)、第2のAC電場が第1の方向で標的領域に印加され、第2の時間間隔の第2の部分の間(すなわち、 $t_1$ と $t_2$ の間の時間の最後の部分)、第2のAC電場が第2の方向で標的領域に印加され

10

#### 【0049】

図9Bは、別の実施形態における、制御装置25の制御下で電力段28が発生させる、出力Q1及びQ2についてのイベントの順序を示す。この順序では、周波数が切り替えられる速度より遅い速度で、2つの方向D1とD2の間で方向が切り替えられる。ここでの順序は、周波数及び振幅の両方が互いに同調して切り替えられる図8に関して先に記載された順序と同様である。しかし、図8に関して先に記載された周波数及び振幅の切り替えに加えて、繰り返し工程の少なくともいくつかの間、第1のAC電場の方向が変更され、繰り返し工程の少なくともいくつかの間、第2のAC電場の方向も変更される。図9Bの例では、元の順序が $t_0$ と $t_2$ の間の時間間隔に相当し、その元の順序が治療過程の間繰り返され、第1の繰り返し

20

#### 【0050】

上記の図8～図9に示す順序では、抗有糸分裂期及び抗運動性期が時間に関して互いに排斥することに留意されたい。しかし、代替の実施形態では、これらの期が、部分的に又は完全に、互いに重複してよい。このような実施形態の一例では、以下の2工程(a)及び(b)を同時に実行することとなる:工程(a)では、第1のAC電場が標的領域に印加される。第1のAC電場は、第1のAC電場ががん細胞の有糸分裂を攪乱するように選択される、第1の周波数及び第1の振幅を有する。工程(b)では、第2のAC電場が標的領域に印加される。第2のAC電場は、第2のAC電場ががん細胞の運動性を低下させるように選択される、第2の周波数及び第2の振幅を有する。第2の周波数及び第1の周波数は異なり、第2の振幅は第1の振幅より小さい。工程(a)及び(b)が全て同時に実行される場合、第1及び第2のAC電場は重ね合わせにより足し合わされることとなる。

30

#### 【0051】

一部の実施形態は、原発性腫瘍若しくはその付近、転移、又は転移がん取り込みの可能性が高い器官を、腫瘍細胞の遊走又は浸潤を阻害するように最適に選ばれた周波数の交流電場に曝露することによってがんを治療する方法を対象とする。少なくとも特定の細胞株では、この周波数が、有糸分裂を攪乱するのに必要な周波数と大きく異なる。電場は、Novocure社Optune(登録商標)システム、又は参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7089054号、第6868289号、及び第7706890号に記載される機器を使用して送達されてよい。これらを使用して、GBM又はその他のがん型を治療することができる。電場は優先的な方向で送達されてよく、優先的な方向は切除不能な領域、又は生命維持に必須の器官への進行を防止するように選択されてよい。

40

#### 【0052】

様々ながん型で、細胞(又は目的の細胞に非常に似ている細胞株)をペトリ皿で培養し、細胞を所与の強度及び様々な周波数の交流電場に曝露し、この特定の細胞株での、細胞遊走に対し最大の阻害効果を有する周波数を見つけることにより、特定のがん細胞型の細胞遊走を阻害するのに最適な周波数を決定することができる。電場の効果は、スクラッチアッセイ及び/又は浸潤アッセイにより決定することができる。

50

## 【 0 0 5 3 】

一部の実施形態は、がんを治療する方法を対象とし、それにより腫瘍は、2種の周波数の成分を含む交流電場に曝露される：一方の周波数は細胞分裂を阻害するのに最適な周波数であり、他方の周波数は遊走を阻害するのに最適な周波数である。分裂細胞に損傷を与えるように調整された2種の異なる周波数を組み合わせることが、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8244345号に記載されていることに留意されたい。しかしここでは、周波数の1つが代わりに遊走を防止するように調整される。異なる周波数の信号は順次印加されてもよく、単一の電場に組み合わせられてもよい。電場は、1方向又は複数の異なる方向で送達されてよい。

## 【 0 0 5 4 】

10

本発明は特定の実施形態に関して開示されているが、添付の特許請求の範囲で規定される本発明の領域及び範囲から逸脱することなく、記載される実施形態に対して数多くの改変、修正、及び変更が可能である。したがって、本発明が、記載される実施形態に限定されないが、以下の特許請求の範囲の文言及びその同等物によって規定される全範囲を有することが意図される。

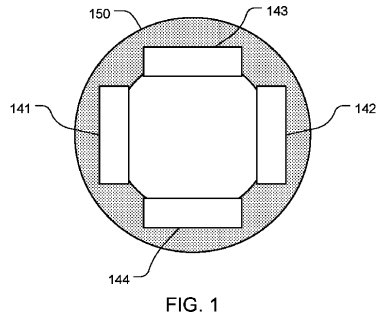
## 【 符号の説明 】

## 【 0 0 5 5 】

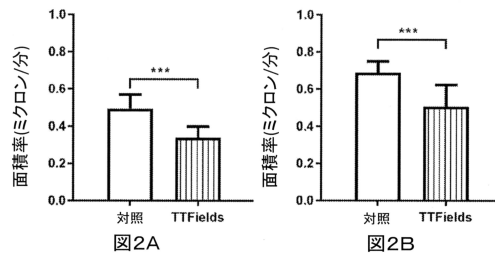
- 20 信号発生器
- 22 温度センサーインターフェース(TSI)
- 25 制御装置
- 28 電力段
- 41～44 電極
- 48 温度センサー
- 50 標的領域
- 55 がん細胞
- 141～144 電極
- 150 ペトリ皿
- Q1、Q2 出力
- D1、D2 方向

20

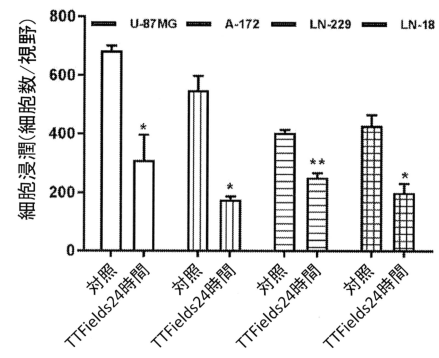
【図 1】



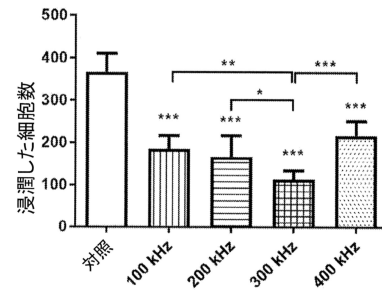
【図 2】



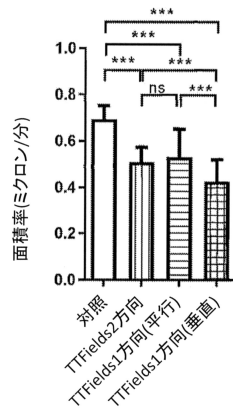
【図 3】



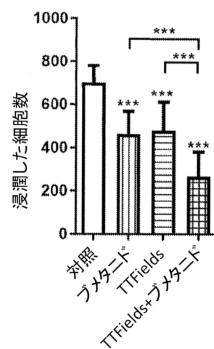
【図 4】



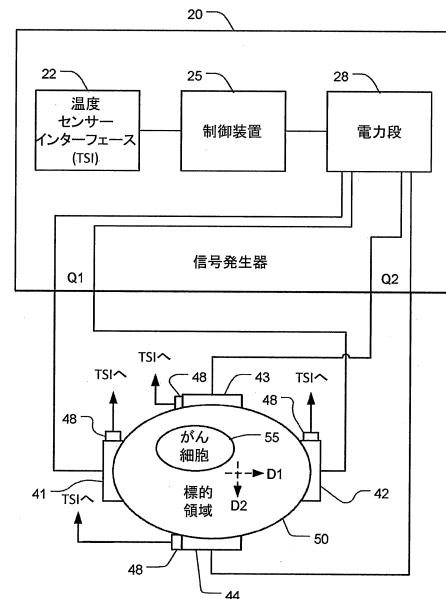
【図 5】



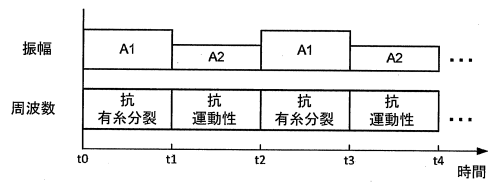
【図 6】



【図 7】



## 【図 8】



## 【図 9】

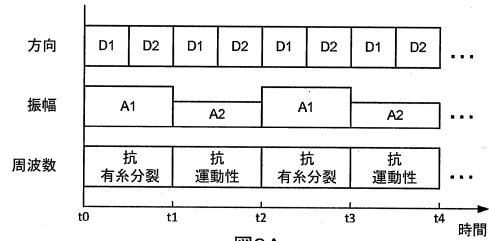


図9A

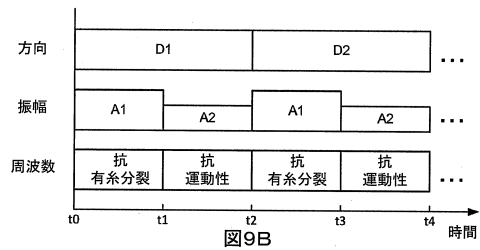


図9B

---

フロントページの続き

(72)発明者 モシェ・ギラディ  
イスラエル・４０６９１・モシャヴ・ヘルート・エイン・ハチェレット・ストリート・ピー・ビー  
・９２

審査官 北川 大地

(56)参考文献 特表２００８－５２５０８０（ＪＰ，Ａ）  
特表２００９－５２０５０９（ＪＰ，Ａ）  
米国特許出願公開第２００７／０２３９２１３（ＵＳ，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)  
A 6 1 N 1 / 4 0  
A 6 1 N 1 / 3 2