



(12) **PATENT**

(11) **344476**

(13) **B1**

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 38/14 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61M 5/19 (2006.01)

A61M 5/20 (2006.01)

A61N 1/32 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20084148	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2007.03.02 PCT/US2007/005133
(22)	Inng.dag	2008.10.01	(85)	Videreføringsdag	2008.10.01
(24)	Løpedag	2007.03.02	(30)	Prioritet	2006.03.03, US, 60/778,740
(41)	Alm.tilgj	2008.11.13			
(45)	Meddelt	2020.01.13			
(73)	Innehaver	OncoSec Medical Incorporated, 5820 Nancy Ridge Drive, CA91212 SAN DIEGO, USA			
(72)	Oppfinner	Paul Goldfarb, 11494 Sorrento Vally Road, CA92121-1318 SAN DIEGO, USA			
		Dietmar Rabussay, 11494 Sorrento Vally Road, CA92121-1318 SAN DIEGO, USA			
(74)	Fullmektig	ONSAGERS AS, Postboks 1813, Vika, 0123 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte og inretning for behandling av mikroskopiske rester av tumorer som er igjen i vev etter kirurgisk fjerning			
(56)	Anførte publikasjoner	US 2005054969 A1 US 2006024358 A1 EP 1142606 A2 Li, S. et al., "Regression of Tumor Growth and Induction of Long-Term Antitumor Memory by Interleukin 12 Electro-Gene Therapy", JNCI: Journal of the National Cancer Institute, Volume 94, Issue 10, 15 May 2002, pages 762–768, Published: 15 May 2002 [Hentet fra Internett 2017.11.06] (https://academic.oup.com/jnci/article/94/10/762/2519724)			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelsen angår behandling av tilsynelatende normalt vev som omgir lokaliseringen til krefttumorer slik at både muligheten til et tilbakefall av kreft på og nær stedet for kreftvev reduseres og for å redusere mengden av tilsynelatende friskt vev som vanligvis blir skåret ut sammen med tumoren. Derved tilveiebringes en hovedsakelig fordel for kreftpasienten ved å eliminere eller forsinke tumortilbakefall og spare normalt vev for dets funksjonalitet og å unngå unødvendig forandring på utseende. Det tilveiebringes kilde for å levere elektroporerende puls, og middel som er i stand til å redusere tumorvekst leveres inn i celler ved å anvende elektroporerende puls.

FREMGANGSMÅTE OG INNRETNING FOR BEHANDLING AV MIKROSKOPISKE RESTTUMORER SOM ER IGJEN I VEV ETTER KIRURGISK FJERNING

5

Denne oppfinnelsen angår elektroporeringsystemer, anordninger og fremgangsmåter til å bruke slike anordninger for å behandle vev som omgir tumorsteder. Mer spesifikt angår denne oppfinnelsen reduksjon av tumormasser, skåning av vev som omgir tumorer og reduksjon av tumormassestørrelse og tilbakefallshyppighet ved å behandle tilsynelatende ikke-kreftrammet vev med elektroporerende pulser og antikreftmidler.

Den følgende beskrivelsen inkluderer informasjon som kan være nyttig til å forstå den foreliggende oppfinnelsen. Dette er ikke en innrømmelse av at slik informasjon er kjent teknikk eller relevant, i forhold til de foreliggende krevde oppfinnelser eller at enhver publikasjon spesifikt eller implisitt referert til er kjent teknikk.

Med unntak av vaskulær sykdom er kreft den hyppigste dødsårsaken i industrialiserte land. Det tradisjonelt aksepterte paradigmet for å behandle kreft og tumorer som omfatter en enkel relativt godt definert vevsmasse har inkludert anvendelse av stråling og kjemoterapi, typisk i sammenheng med kirurgisk fjerning. I tilfeller hvor kirurgisk fjerning er et valg, er kirurgi vanligvis den mest effektive formen for behandling. Effektiviteten til kirurgisk behandling avhenger imidlertid av den fullstendige fjerningen av ondartet vev som omfatter hovedtumormassen så vel som grener og mikrometastaser som ofte er til stede i nærheten av hovedtumoren.

Når hovedtumoren fjernes, forsøker kirurgen alltid å eliminere slike lokale eller regionale mikrometastaser ved å fjerne tilsynelatende normalt vev som omgir tumoren. Dette vevet er referert til som "marginalt vev" eller ganske enkelt som "margin". I hvilken utstrekning marginalt vev er fjernet, er et resultat av kirurgens dømmekraft. Typisk er en margin på 0,5-2 cm rundt hele tumoren akseptabel. Mer utstrakt fjerning er imidlertid ikke uvanlig for invasive tumorer. Til og med etter omhyggelig reseksjon av tumoren og marginen, vender de fleste typer av tumorer tilbake med en frekvens på 10-40%. Tilbakevendingshastigheten avhenger av et flertall av faktorer inkludert tumorstørrelse, type og lokalisering av tumoren, pasientens tilstand, osv. For å redusere graden av tilbakevending, blir kirurgi vanligvis fulgt av stråling og/eller kjemoterapi. Til tross for slike sekundære behandlinger, er tilbakevendingshastigheten fremdeles ukomfortabelt høy.

I tillegg til kirurgi og stråling, er andre metoder til lokal tumorkontroll under
 anvendelse. Disse inkluderer radiofrekvens (RF) -ablasjon, fotodynamisk terapi
 (PDT), kryoterapi (CRYO), kjemostråling (CR), brakyterapi (BT), galvanoterapi
 (GT) og andre. Kirurgi, RF, PDT, CRYO og CR baserer seg på fullstendig fjerning
 5 eller destruksjon av tumoren og marginalt vev mens stråling, BT og GT etterlater
 behandlet normalt vev mer eller mindre intakt, skjønt stråling og BT kan forårsake
 alvorlig arrdannelse, fibrose og vaskulær og nevral skade. I ethvert tilfelle kan
 fjerning, arrdannelse og fysikalsk skade av friskt vev resultere i betydelig
 10 skamfering og betydelig tap av fysisk anvendelse av kroppsdeler og/eller
 funksjonaliteten derav. For eksempel forårsaker de fleste av de ovenfor opplistede
 foreliggende adjuvanser til kirurgi for å ødelegge eller fjerne tumormasser ikke-
 spesifikk skade på normalt vev som omgir tumoren. Utskjæring av en tumormasse
 kan være fullstendig ødeleggende for funksjonen hvor tumorer må fjernes fra
 organer som inkluderer tunge, stemmebånd, rektum, kjønnslepper, penis eller til
 15 fine muskler og visuelle strukturer i ansiktsvev.

For å unngå slik vansiring og for å preservere funksjonen og sikre at vevene som
 omgir tumoren blir klarert for slike kreftceller, der den foreliggende oppfinnelsen
 tilveiebrakt som en adjuvans eller neoadjuvans til kirurgi siden det fremdeles er et
 behov i onkologifaget for en anordning og fremgangsmåte til å skåne tilsynelatende
 20 friskt vev som ligger tilstøtende til tumorer og redusere tumormasse, vekst av
 tumoren og tilbakevendingshastigheter.

Det er tidligere vist anretninger for elektromanipulasjon av kjemiske stoffer in vivo
 relativt til vev og avlevering av kjemiske stoffer til et mål-vev, US2005054969.

Enheter og metoder er gitt for transdermal administrasjon av et farmasøytisk middel
 25 til en pasient med behov derav, tilhører kjent teknikk, US2006024358.

Et apparat og en fremgangsmåte for å implementere og kontrollere en rekke
 minimalt invasive terapier ved behandling av en medisinsk tilstand hos en pasient
 basert på en behandlingsplan tilhører også kjent teknikk fra EP1142606.

Li. S. et al Li, S. et al., "Regression of Tumor Growth and Induction of Long-Term
 30 Antitumor Memory by Interleukin 12 Electro-Gene Therapy" JNCI: Journal of the
 National Cancer Institute, Volume 94, Issue 10, 15 May 2002, pages 762–768, 15
 May 2002 (<https://academic.oup.com/jnci/article/94/10/762/2519724>) viser blant
 annet til elektroporasjon som en teknikk for avlevering av DNA til vev in vivo.

I en første utforming omfatter oppfinnelsen et anticancermiddel for bruk som et
 35 medikament for å redusere tilbakefall av tumorvekst i et pattedyrvev i et pattedyr på
 og rundt en lokalisering i nevnte pattedyr til en utskåret tumor; hvori nevnte middel
 er valgt fra gruppen bestående av bleomycin, cisplatin, et protein, et antistoff,
 RNAi, en antisensenukleinsyre, et uttrykkbart gen som koder for et terapeutisk

aktivt polypeptid, et kjemokin og et cytokine; hvori nevnte middel er for administrering til nevnte vev ved intravenøs injeksjon eller injisert direkte i og rundt nevnte vev enten før eller simultant med administrering av en elektroporerende elektrisk puls til nevnte vev, for derved å avlevere nevnte middel inn i celler i nevnte vev som resulterer i en reduksjon eller eliminering av tumorcellevekst i nevnte vev.

I en preferert utforming omfatter oppfinnelsen anticancermiddelet for bruk som et medikament, hvori nevnte RNAi, antisensnukleinsyre, og uttrykkbare gen er formulert i poly-L-glutamat løsning.

I enda en preferert utforming omfatter oppfinnelsen anticancermiddelet for bruk som et medikament, og for behandling av mikroskopiske residualsulster som gjenstår i nevnte vev etter kirurgisk reseksjon av nevnte tumor; hvor nevnte middel er til administrasjon til nevnte vev tidligere nærliggende og omkring svulsten og inneholdende nevnte residualsulster, før eller samtidig med administrasjon til nevnte vev av minst en elektroporativ elektrisk puls, hvor nærværet av middelet og den elektroporative elektriske puls gir en selektiv behandling av nevnte vev for å drepe residualsulster.

I en preferert utforming omfatter oppfinnelsen anticancermiddelet til bruk som et medikament, hvor den elektroporative elektriske puls har en feltstyrke på 200-2000 V/cm; en pulslengde 0,1-10,0 ms; et pulsnummer 2-20; og en pulsfrekvens 1-5 Hz

Andre trekk og fordeler ved oppfinnelsen vil være klart fra de følgende tegninger, detaljerte beskrivelse og vedlagte krav.

Kort beskrivelse av tegningene

Patentet eller den innleverte søknaden inneholder minst én tegning gitt i farger. Kopier av dette patentet eller patentsøknadspublikasjon med fargetegning(er) vil tilveiebringes av U.S. Patent and Trademark Office ved forespørsel og betaling av de nødvendige omkostninger.

Figur 1 er en graf som viser sårstyrke målt ved bruddpunktet til hudprøver som gror og som er behandlet in vivo med saltløsning alene, saltløsning pluss elektroporering, bleomycin alene og bleomycin pluss elektroporering. Underliggende fett- og muskelvev ble også behandlet i disse eksperimentene.

Figurene 2A-F er mikrografer av trikromfarget vev som viser sammenligning mellom (A) ubehandlet vev på dag 2 etter innsnitt og (B) vev behandlet med saltløsning pluss elektroporering på dag 2 etter innsnitt, (C) saltløsning pluss elektroporering i uke 2, (D) bleomycin pluss elektroporering etter 2 uker, (E) saltløsning pluss elektroporering etter 3 uker og (F) bleomycin pluss elektroporering etter 3 uker.

Figurene **3A-D** er fargede (trikrom) mikrografer av kollagendeponering i hudinnsnitt etter tre uker. Figurene **3A** og **C** er lysfeltbilder for henholdsvis bleomycin- og saltløsningsbehandlet hudvev, mens figurene **3B** og **C** er polariserte lysbilder som viser henholdsvis bleomycin- og saltløsningsbehandlede hudvev.

- 5 Figurene **4A-D** er mikrografer som viser prøver av muskelvev 3 uker etter innsnitt; (**A**) saltløsning alene, (**B**) saltløsning pluss elektroporering, (**C**) bleomycin alene og (**D**) bleomycin pluss elektroporering.

10 Figur **5** er en tverrsnittsf figur av en utforming av anordningen i henhold til oppfinnelsen som viser en utforming som omfatter et håndtak som omfatter et tommelhjul for å heve og senke en oppstilling av nåler som aktiviserer oppladning eller utdeling av et stoff gjennom elektrodenålene.

Figur **6** er en tegning som viser et forstørret riss av en utforming ifølge oppfinnelsen.

- 15 Figur **7** er en tverrsnittstegning av en utforming av anordningen i henhold til oppfinnelsen hvori nålene blir aktivert ved en rotasjonsskrue drevet med klokken (heving av nålene) og mot klokken (senking av nålene) til huset **50**.

20 Figurene **8A** og **B** er perspektivtegninger av en utforming av oppfinnelsen hvori rotasjon av huset **50** vil drive oppstillingen av nåler frem og tilbake. Figur **A** viser utformingen med brettet **20** mens figur **B** viser hovedlegemet til utformingen uten brettet **20**.

Figur **9** er en perspektivtegning som viser en utforming av oppfinnelsen hvori oppstillingen av nåler blir aktivisert ved hjelp av en vingemutter.

Figur **10** viser et eksempel på oppstillingen av et flertall av elektrodenåler fra undersiden av substratet **22**.

- 25 Figurene **11A, B, C** og **D** er fotografier av gruppe 2 kohortdyr som viser testdyret med tumor (**A**), tumoren kirurgisk eksponert før fullstendig tumorfjerning (**B**), det åpne sårleiet etter tumorfjerning men før simulert EP (**C**) og kirurgisk/behandlingsstedet etter 3 uker etter behandling (**D**). Med denne gruppe 2 ble ingen elektroporering utført og tumoren vendte tilbake selv om tumoren var blitt
30 fullstendig fjernet.

Figurene **12A, B, C** og **D** er fotografier av gruppe 1 kohortdyr som viser testdyret med tumor (**A**), tumoren kirurgisk eksponert før fullstendig tumorfjerning (**B**), det åpne sårleiet etter tumorfjerning men før behandling med EP (**C**) og kirurgisk/behandlingsstedet etter 3 uker etter behandling (**D**). Som observert med
35 bleomycin-EP-behandling, vendte ingen tumor tilbake på behandlingsstedet.

Figurene **13A, B og C** er fotografier av gruppe 7 kohortdyr som viser testdyret med tumor (**A**), etter delvis tumorfjerning (**B**) og kirurgisk/behandlingsstedet etter 3 uker etter behandling (**C**). Musen ved 3 uker viste ingen tumortilbakevending selv om tumoren bare var delvis fjernet.

- 5 Figurene **14A, B og C** er fotografier av gruppe 4 kohortdyr som viser testdyret med tumor (**A**), etter delvis tumorfjerning (**B**) og kirurgisk/behandlingsstedet etter 3 uker etter behandling (**C**). Uten EPT fortsatte tumoren å vokse.

- 10 Figur **15** viser en søylegraf av dataene presentert i tabell **V**. PTE refererer seg til delvis tumoreksisjon, CTE refererer seg til fullstendig tumoreksisjon, Bi.v. betyr bleomycin administrert til testdyrene intravenøst, EP betyr elektroporering, i.t.B. refererer seg til bleomycin administrert intratumoralt og PEP betyr delvis elektroporering.

- 15 Som de med kunnskap på området vil forstå, beskriver følgende beskrivelse visse foretrukne utforminger av oppfinnelsen i detalj og er således bare representativ og beskriver ikke oppfinnelsens faktiske område. Før beskrivelse av den foreliggende oppfinnelsen i detalj, er det forstått at oppfinnelsen ikke er begrenset til de spesielle anordningsoppstillinger, systemer og metodologier beskrevet, idet disse kan variere. Det skal også forstås at terminologien brukt heri med den hensikt å beskrive bare spesielle utforminger, ikke er ment å begrense området til oppfinnelsen definert av
20 de vedlagte kravene.

Oversikt

- Elektroporeringsterapi (EPT), også kjent som elektrokjemoterapi (ECT), er en fremgangsmåte til å behandle lokaliserte kreftlesjoner og tumormasser. Metoden omfatter administrering av visse kjemoterapeutiske medikamenter, vanligvis
25 bleomycin, enten intratumoralt eller intravenøst. I de fleste tilfeller blir elektroporering (EP) utført ved å innsette en oppstilling av nålelektroder og levere pulserte elektriske felt som springer ut fra disse elektrodene direkte til kreftcelle-massen. Pulsparametere er generelt innenfor følgende områder: Feltstyrke 200-2000 V/cm; pulslengde 0,1-10,0 ms; pulstantall 2-20; og pulsfrekvens 1-5 Hz. Anvendelse
30 av slike elektriske felt resulterer i permeabilisering av kreftcellemembraner som tillater antikreftmedikamenter å trenge inn i cellene og forårsaker opptil 5000 ganger større cytotoxiskitet på grunn av medikamentopptaket enn det som er observert i fravær av elektroporering. EPT har vist seg å være effektiv mot mange typer av faste tumorer i dyr og flere typer av tumorer hos mennesker. Faktum er at
35 flere kliniske undersøkelser for tiden er pågående, inkludert en fase III-undersøkelse som evaluerer sikkerheten og effektiviteten til EPT for behandling av skvamøse celle-karsinomer i hode og hals. Slike behandlingsundersøkelser er imidlertid ikke konstruert eller ment for å behandle eller teste påvirkningen av EPT på ikke kreftaktig marginalt vev som ligger sammen med kreftcellene.

EPT er noe unik blant de mange metoder som anvendes for lokal og regional tumorkontroll ved at den er langt mindre skadelig for normalt vev enn for ondartet vev. Resultater fra *in vitro* så vel som *in vivo* dyre- og humane undersøkelser indikerer at EPT ved å bruke et medikament så som bleomycin, effektivt ødelegger de fleste tumorer via apoptotiske og nekrotiske mekanismer mens den forårsaker bare en minimal virkning (inflammasjon, minimal nekrose) på normalt vev som omgir tumoren, særlig når bleomycinkonsentrasjonen, doser og pulsparametere er innenfor egnede områder. Det marginale vevet som omgir tumorer som typisk er gunstig å behandle inkluderer, men er ikke begrenset til, de fra organer som inkluderer bryst, prostata, tunge, penis, kjønnslepper, rektum, stemmebånd, lever, skvamøst cellekarsinom i hode og hals (SCCHN), kutane og andre tumorer. EPT kan utføres på slike vev enten tumormassen er blitt fjernet eller ikke. I slike kreftformer ville pasienten hjelpes hovedsakelig ved behandling av vevene på en måte hvor tilheling kan utvikle seg i stor grad uforstyrret og at det er en mulighet til å eliminere mikroskopiske metastaser og tumorforgreninger som trenger inn i vevene og som gir opphav til lokale tilbakefall. Som det også er forståelig med hensyn til metodene i henhold til oppfinnelsen, tilveiebringer elektroporeringsbehandlinger med midler så som bleomycin en målbar grad av selektivitet ved målretting av kreftceller. Denne metodologien er også relevant for behandlinger med andre midler som har spesifikke aktiviteter mot spesielle sykdomstilstander så som meget lokaliserte infeksjøs sykdommer og andre sykdomstilstander hvori det er øyer av infisert eller sykt vev hvori en celle eller gruppe av celler som er infisert eller syke kan målrettes av middelet for å ødelegge de påvirkede cellene. I et slikt tilfelle vil elektroporering av slike celler og omkringliggende vev tillate middelet å nå dets mente mål i de infiserte eller syke cellene, mens det ikke har en ødeleggende virkning på uinfiserte eller normale celler som observert empirisk. De molekylære og cellulære mekanismene som ligger under den forskjellige responsen på henholdsvis unormale og normale celler, er for tiden ukjent. I tillegg er anvendelse av metodene og anordningene i henhold til oppfinnelsen appliserbare til sykdomstilstander hvor steder med kreftceller er fordelt i områder som ikke lett kan utsettes for kirurgi. For eksempel hudvev i ansiktet som inneholder mikroskopiske eller fokale sykdomssteder, kan behandles med anordningen i henhold til oppfinnelsen på samme måte som brukt til å behandle et marginalt vevsleie og resulterer i alt vesentlig i mindre arrdannelse enn det som ville skjedd ved kirurgi. Således kan fremgangsmåtene i henhold til oppfinnelsen anvendes som en adjuvans til kirurgi eller til og med en neoadjuvans. Spesifikt kan celler i tumormassen elektroporeres sammen med omkringliggende normalt vev og derved tilveiebringe en metode til å avsvelle tumormassen ved å tilveiebringe en mekanisme for å hindre, avslutte eller på annen måte redusere vekten og/eller tilbakevendingsgraden av de syke cellene. I et slikt tilfelle kan tumorvev fjernes enten før eller etter EPT, eller kan til og med tillates å forbli uskåret etter EPT, i hvilket tilfelle virkningen av et middel så som bleomycin vil tilveiebringe celledød

ved apoptotiske og/eller nekrotiske mekanismer og mykning av tumorcellemassen etterfulgt av ytterligere nekrose. Normalt vev i nærheten vil i stor grad forbli upåvirket.

Typisk inkluderer behandling av en tumor med EPT en bleomycindose på 1
 5 enhet/cm³ vev som skal behandles, injisert intratumoralt i en konsentrasjon på 4 enheter/ml. Det pulserte feltet blir dannet slik at feltet vanligvis appliseres i seks separate pulser på 4 Hz, en hver i 6 forskjellige feltorienteringer, hver på 1000 μ sek varighet med en nominell feltstyrke ett eller annet sted mellom 200 og 2000 V/cm, men generelt mellom 600 og 1500 V/cm, mer vanlig mellom 600 og 1400 V/cm og
 10 enda mer vanlig mellom 1200 og 1300 V/cm over tumormassen. Økning av bleomycindosen eller konsentrasjonen og økning av intensiteten til den elektroporerende pulsen over standardparametere, kan resultere i mer alvorlige påvirkninger på normalt vev. Ved meget høye feltstyrker og/eller pulslengder, kan EP i seg selv (det vil si for eksempel uten bleomycin) indusere irreversibel
 15 cellemembranødeleggelse, noe som fører til destruksjon av tumor så vel som normalt cellulært vev som ligger innenfor det effektive elektriske feltet. I enda ytterligere beslektede utforminger kan en anordning for å utføre fremgangsmåtene i henhold til oppfinnelsen i seg selv opereres ved å bruke pulserte feltstyrker mellom 1 og 600 V/cm ved injeksjon av DNA som et terapeutisk middel som fremsatt i US
 20 patent nr. 6,528,315, hvis referanse heri er inkorporert i sin helhet ved referanse. I en slik utforming koder DNA ideelt for et polypeptid som tilveiebringer en terapeutisk anti-kreftvirkning på det tumorholdige vevet som blir behandlet.

Med hensyn til andre midler, inkludert gener, proteiner, cytokiner, kjemokiner, steroider, antistoffer, RNAi og antisensnukleinsyrer, kan de samme høye puls-
 25 parameterne anvendes (det vil si for eksempel 800-1500 V/cm eller alternativt, 1-600 V/cm, mer fortrinnsvis 200-600 V/cm og enda mer foretrukket 400-600 V/cm). Det er ytterligere vurdert at disse og ethvert annet middel kan anvendes hvor slike midler fremmer sårheling uten å fremme vekst av ondartede celler. Med hensyn på å anvende slike midler i EPT, kan lavere ende feltstyrker så lave som 50 V/cm
 30 anvendes for å elektroporere celler i vev som inneholder mikroskopiske lesjoner og syke celler hvor vevene ikke har dannet en unormal vevsmasse.

Som nevnt tidligere, involverer den foreliggende rasjonale for kreftterapi i en utforming kirurgisk fjerning av tumormasse ("avsvelling") for å redusere biologisk stress på pasienten, kirurgisk eliminering av marginalt vev for å utsette mikro-
 35 metastaser og invaderende kreftvev og stråling og/eller kjemoterapi for å kontrollere lokal, regional og systemisk spredning av tumoren. Mens kirurgisk fjerning av tumoren i seg selv generelt tilveiebringer lettelse for pasienten, uten alvorlig svekkelse, kan de påfølgende trinnene med marginutskjæring, bestråling og kjemoterapi være meget belastende for pasienten. Fysiologisk og mekanisk
 40 funksjon, utseende, livskvalitet og til og med resultatet kan bli alvorlig påvirket av

disse behandlingene. Derfor vil det være ideelt å kombinere kirurgisk fjerning av tumoren med en behandlingsmetode som (a) forhindrer tumortilbakevending på grunn av mikrometastaser og invasivt tumorvev mer effektivt enn foreliggende metoder og (b) minimalisere tap av det omkringliggende marginale vevet. I den foreliggende oppfinnelsen er ny applikasjon av EPT som en kirurgisk adjuvans eller neoadjuvans tilveiebrakt for å oppnå enten reduksjon av tumormassen, forhindring av tumor-tilbakevending eller minimalisering av behovet for å skjære ut marginalt vev eller begge.

Idet man nå vender seg mot metodene i henhold til oppfinnelsen, er den foreliggende oppfinnelsen ment å tilveiebringe en ny metode til å senke muligheten for tilbakevending av tumorvekst i ellers normalt vev som omgir et sted med utskårne kreftceller. Med andre ord omfatter metoden å behandle "marginer" av vev som omgir et sted med kreftceller så som kreftceller typisk dannet på et atskilt vevssted. I en foretrukket utforming tilveiebringer metoden i henhold til oppfinnelsen reduksjon av mengden av vev som må skjæres ut sammen med tumoren og dens kreftceller og gjør stråling eller kjemoterapi overflødig. Fremgangsmåten omfatter å applisere en elektroporerende puls av elektrisk energi til vevene som omgir tumorstedet. I tillegg til applikasjon av en elektroporerende puls, omfatter metoden ytterligere å tilveiebringe, fortrinnsvis enten før eller samtidig med den elektriske pulsen, en formulering som omfatter et antikreftmedikament. I en foretrukket utforming omfatter et slikt medikament et biologisk aktivt molekyl. For eksempel kan medikamentet omfatte en nukleinsyre som koder et uttrykkbart polypeptid så som for eksempel en nukleinsyre i en ekspresjonsvektor og som omfatter en gensekvens for et cytokin eller kjemokin, antistoff eller enzym. Et annet eksempel omfatter antisens-DNA eller -RNA eller interfererende RNA (RNAi). Alternativt kan medikamentet omfatte et polypeptid eller et organisk molekyl så som for eksempel et cytokin, kjemokin, antistoff, cisplatin eller bleomycin eller ethvert annet molekyl som har antikreftaktivitet. Videre kan enhver av slike forbindelser beskrevet ovenfor administreres i en formulering som kan omfatte enhver kombinasjon av farmasøytisk akseptable salter, buffere og andre eksipienser som er velkjente på området. For eksempel kan formuleringer for nukleinsyrer omfatte for eksempel nevnte nukleinsyre og polyglutaminsyre (poly-L-glutamat) som beskrevet i U.S. patent nr. 7,173,116 som er inkorporert heri i sin helhet ved referanse.

I en ytterligere utforming omfatter fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen å applisere den elektroporerende pulsen ved å bruke en anordning som er i stand til å tilveiebringe slike elektroporerende pulsert til lokaliserte områder på tumorstedet. I en foretrukket utforming kan en slik anordning inkludere en oppstilling av forlengede nålignende elektroder. Alternative utforminger kan anvende korte ikke-penetrerende elektroder eller halvpenetrerende mikronålelektroder, avhengig av

styrken av den elektriske pulsen som er nødvendig og av leveringsmåten til anti-kreftmiddelet. I en slik utforming ville anordningen konstrueres uten behov for et nålstempel og leveringsnåler. I stedet kan behandlingsmetodene anvendes ved å bruke en elektroporeringsanordning som omfatter bare én elektrodeoppstilling, hvor en slik oppstilling omfatter ikke-penetrerende eller halvpenetrerende elektroder. I et slikt tilfelle ville medikamentet leveres ved atskilte midler så som en sprøyte. I en ytterligere foretrukket utforming med hensyn på enhver av de fysiske arrangementene av anordningene i henhold til oppfinnelsen, under utføring av behandlingsprosedyren, er elektrodene posisjonerbare med hensyn på vevene som skal behandles for å danne et elektrisk felt som har en feltstyrke og energi tilstrekkelig til å elektroporere celler i nevnte vev innenfor et spesifisert område og dybde. Typisk vil anordningen posisjoneres for å gi en elektroporerende puls til alle vevene innenfor en forhåndsvalgt margin av vev rundt (i tre dimensjoner) tumor-utskjæringsstedet. Avhengig av størrelsen av den utskårne tumoren og størrelsen på elektrodeoppstillingen, kan det omkringliggende, marginale vevsleiet elektroporeres enten fullstendig i én elektroporerende pulsapplikasjon eller kan kreve et flertall av elektroporerende pulsapplikasjoner ved posisjonering og reposisjonering av elektrodeoppstillingen slik at den fullstendig omfatter tumorstedmarginvevet i de elektroporerende energifeltene. I noen utforminger kan elektrodene tjene som leveringsnåler for middelet som er ment å bli elektroporert inn i cellene, mens i andre utforminger kan middelet administreres til vevet uavhengig av administrering/posisjonering av elektrodene i vevet.

I tillegg, for å være sikker på at metodene i henhold til oppfinnelsen er i stand til å eksponere friskt ikke-kreftvev til elektroporerende pulser uten hovedsakelig å ødelegge nevnte friske vev, ble det utført en undersøkelse på restitusjonsegenskapene til friskt vev som omgir et åpent sår etter eksponering til elektroporerende pulser. Som beskrevet nedenfor, ga behandling av friskt vev med elektroporerende pulser eller elektroporerende pulser og et antikreftmiddel, ingen målbar signifikant virkning på cellene i det behandlede området og de åpne sårene grodde på samme måte som ubehandlet og/eller normalt vev. Siden friskt vev kan eksponeres til den elektroporerende pulsen uten vesentlig ødeleggelse, er anvendelse av elektroporering til behandling av vev som omgir en tumor med den hensikt å tillate kirurgisk å skjære ut en trangere margin av friskt vev, nå mulig.

Generell behandlingsprosedyre

En utforming av metodene i henhold til oppfinnelsen er å behandle kirurgiske sårmarginer eller, mer generelt, tumormarginer og i prosessen (a) oppnå en overlegen tilbakevendingsgrad (det vil si mindre hyppig tilbakevending) sammenlignet med konvensjonell kirurgisk tumor og marginreseksjon med eller uten sekundær behandling; (b) redusere eller eliminere behovet for kirurgisk reseksjon av marginalt vev mens det opprettholdes like eller bedre

tilbakevendingsgrader enn med tradisjonell kirurgisk marginfjerning og således bevare funksjonelt vev; og (c) redusere eller eliminere behovet for stråling eller kjemoterapi etter kirurgisk tumorreseksjon (med eller uten marginreseksjon) mens det opprettholdes lik eller overlegne tilbakevendingsgrader sammenlignet med tradisjonell kirurgisk marginreseksjon og sekundære behandlinger så som for eksempel stråling og kjemoterapi.

De følgende eksemplene er ment å illustrere, men ikke begrense, oppfinnelsen. Mens de er typiske for de som kan anvendes, kan andre prosedyrer kjent for de med kunnskap på området alternativt bli anvendt.

10 Eksempel I

Behandling av tilsynelatende friskt vev som omgir et åpent sår med elektroporeringspulser og/eller antikreftmiddel

For en vellykket anvendelse av elektroporering i områder med åpne sår som omfatter for det meste delvis normalt vev, utførte vi en serie av eksperimenter for å vise at elektroporering av normalt vev, med eller uten antikreftmiddel, kan utføres uten signifikant å påvirke tilhelingsprosessen i kutane, subkutane og muskelvev.

I dette eksperimentet ble atten transkutane innsnitt gjort i de dorsale musklene i hver av åtte grisetestdyr gruppert 1-6. I undersøkelsesgruppene 1-5 ble longitudinale innsnitt gjort, mens i gruppe 6 var innsnittene på tvers av den longitudinale orienteringen av muskelfiberen. På hvert innsnittsted ble enten ingenting, normal saltløsning eller bleomycin injisert slik at innsnittene ble plassert på en 1 cm dybde og med en 1 cm avstand fra hverandre med tre injeksjoner, en på hver side av hvert innsnitt innenfor 3 cm fra hverandre og en i sentrum av innsnittet. Bleomycin, et antikreftmiddel, ble brukt hvori hver injeksjon besto av 0,125 ml (4 enheter/ml saltløsning). Innsnittene ble deretter behandlet med bipolare pulser på 530 V, 100 µsek hver, fra en pulsgenerator som brukte en 6-nålers elektrodeoppstilling på 0,5 cm i diameter (nominell feltstyrke for hver puls var 1233 V/cm).

Spesifikt ble 8 Yorkshire/Hampshire krysset svin (40-50 kg) akklimatisert i 5-7 dager før kirurgi. Innsnittlokaliseringene ble markert på ryggen ved å bruke sterile kirurgiske markører. Hvert innsnitt var 5 cm langt og gjort til en dybde på 5 mm inn i muskelen. Alle dyrene i gruppene 1-5 mottok 18 langsgående innsnitt hver, mens dyrene i gruppe 6 mottok tversgående innsnitt, i henhold til tabell I. Hver undersøkelsesgruppe omfattet 24 innsnitt.

Tabell I

Gruppe	Innsnitt	Injeksjon	Elektroporering
Gruppe 1 (NL)	Langsgående	Ingen	
Gruppe 2 (SL)	Langsgående	Saltløsning	
Gruppe 3 (SEL)	Langsgående	Saltløsning	X
Gruppe 4 (BL)	Langsgående	Bleomycin	
Gruppe 5 (BEL)	Langsgående	Bleomycin	X
Gruppe 6 (BET)	Tversgående	Bleomycin	X

- Injeksjoner med et totalt volum på 1,5 ml saltløsning eller bleomycin (6 U) ble administrert på 12 seter pr innsnitt, 6 i muskelen og 6 i huden. Innsnittene behandlet med elektroporering ble elektroporert ved å bruke en nåloppstilling med nåler som var 0,5 cm i diameter og 1,5 cm lange. På hver side av muskelinnsnittet ble elektroporering gitt 3 ganger i de sentrale 3 cm av innsnittet, hvert elektroporeringssete var 1 cm fra hverandre. Huden ble ikke elektroporert. Epimysium ble lukket med 4-0 vicryl absorberbare avbrutte suturer. Huden ble lukket med 4-0 nylon avbrutte suturer. Svinene ble ofret ved 2 dager, 1 uke, 2 uker eller 3 uker etter kirurgi. Histologiprøver som inneholdt huden og minst 5 mm dybde av underliggende muskel ble tatt fra sentrum av innsnittet og øyeblikkelig plassert i 10 % nøytralt bufret formalin. En ytterligere kontrollprøve ble tatt fra hud uten innsnitt på ryggen. Etter farging og snitting, ble hud, subkutan vev og muskel gradert histologisk på en skala fra 0 til 3 ved å bruke følgende parametere: Tilheling, granulering/fibrose, PMNer, lymfocytter, histiocytter, nekrose, blødning og atypiske celler.
- Mekanisk testing ble utført på striper av hud fjernet fra sentrum av innsnittet på tre forskjellige tidspunkter, nemlig på dagene 7, 14 og 21. Hudstrimler ble pakket i gas bløtt i saltløsning og testet samme dag for innsnittsbruddstyrke ved å bruke en Instron 900 (Instron Corp. Norwood, MA) med en 100 pounds belastningscelle-kjøring på 0,5 tommer/minutt. Bruddstyrke ble bestemt ved å plote strekket mot strekkbelastningen for hvert innsnitt opptil bruddpunktet. Bruddstyrken til hudinnsnittene økte over tid i gruppe 1 (ingen saltløsning eller bleomycin) fra ~1800 kPa etter 1 uke til ~2500 kPa etter 2 uker og ~5000 kPa etter 3 uker etter innsnittet. Injeksjon av saltløsning (gruppe 2) ga lignende resultater. Gruppe 3 (saltløsning med elektroporering) var ikke signifikant forskjellig fra gruppe 2 på noe tidspunkt og angir at elektroporering ikke forårsaket negative virkninger i

bruddstyrken. Etter 1 uke hadde alle tre bleomycinbehandlede grupper signifikant (det vil si 90 %) redusert bruddstyrke sammenlignet med alle de tre ikke-bleomycin-gruppene, noe som angir at bleomycin hadde forsinket hudsårtilheling.

- 5 Elektroporering hadde ingen negativ virkning på bruddstyrke idet gruppene 4 og 5 ikke var signifikant forskjellige fra hverandre. Ved uke 2 var det ingen signifikante forskjeller mellom gruppene 1-5. Bare de tversgående innsnittene med bleomycin og elektroporering utviste lavere bruddstyrker. Denne effekten fortsatte gjennom uke 3 hvor gruppe 6 hadde en signifikant lavere bruddstyrke enn gruppene 1-5.

- 10 Som vist i **figur 1**, var det ingen vesentlig forskjell mellom saltløsning alene, saltløsning pluss elektroporering, bleomycin alene eller bleomycin pluss elektroporering etter tre uker etter innsnitt. Til og med styrken av de tilhelte tversgående innsnittene er tilstrekkelig til ikke å ha noen klinisk bekymring med tanke på risiko for pasienten.

Histologisk evaluering

- 15 Histologiprøver på fire forskjellige tidspunkter, nemlig dagene 2, 7, 14 og 21 som inneholdt hud og minst 5 mm muskel ble tatt fra sentrum av innsnittene og øyeblikkelig plassert i 10 % nøytralt bufret formalin. Histologiske undersøkelser viste statistisk signifikante forandringer (bare bleomycingruppene) som var tilstede på dag 7. Alle ubehandlede vev og saltløsningsinjiserte vev hadde normalt utseende.
- 20 På dag 21 var alle bleomycininjiserte prøver sammenlignbare med saltløsningsinjiserte kontroller. For eksempel ved å sammenligne saltløsningsinjiserte versus saltløsningsinjiserte pluss elektroporerte vevsprøver, var de eneste virkningene av elektroporering en lett økning i antall hudhistiocyter ved 1 uke og en reduksjon i hudlymfocytter ved 2 uker. Det var ingen virkninger av elektroporering på noen av
- 25 de andre parameterne så som tilheling av hud, subkutan vev og muskel. Videre, ved sammenligning av bleomycin versus bleomycin pluss EP-behandlede vevsprøver, var det ingen signifikante forskjeller på dag 2 eller etter 1 uke. Etter 2 uker forårsaket elektroporering en signifikant økning i muskelnekrose, men den forskjellen forsvant etter 3 uker. Etter 3 uker forårsaket elektroporering en
- 30 reduksjon i hudhistiocyter, men vist økt granuleringsvev/fibrose i muskelen, noe som er tegn på tilheling. Det var ingen forsinkede signifikante forskjeller i tilheling av huden, subkutan vev eller muskel forårsaket av elektroporering, til og med i nærvær av bleomycin.

- 35 Som vist i **figurene 2A-F**, ble sårheling sammenlignet mellom ubehandlet vev, saltløsning pluss elektroporeringsbehandlet vev og bleomycin pluss elektroporeringsbehandlet vev, histologisk ekvivalent på uke tre. Spesifikt er i uke tre saltløsning pluss elektroporering ekvivalent til bleomycin pluss elektroporering (sammenlign **E** og **F**). I uke 2 viser saltløsning pluss elektroporering mer avansert tilheling enn bleomycin og elektroporering (sammenlign **C** og **A**). I uke 3 synes

saltløsning pluss elektroporering å være ekvivalent til bleomycin pluss elektroporering i uke 2 (sammenlign **E** og **D**).

Med hensyn til andre histologiske trekk som vist i **figurene 3A-D**, blir kollagen deponert i det tilhørende såret, men kanskje i en lavere grad for bleomycin-behandlede prøver enn prøver behandlet med saltløsning. Spesifikt viser innsnitt i saltløsningsbehandlede dyr (**C** og **D**) uten elektroporering dyp blå kollagenfibere som var en fortsettelse av kollagenfibrene i huden, mens innsnitt av bleomycin-behandlede dyr (**A** og **B**) viser blekblå kollagenfibere med færre kontinuitetssoner med hudkollagen. Med hensyn på virkning, hvis noen på muskelvevet, som vist i **figurene 4A-D**, ved 3 uker angir mikrofrier at elektroporering ikke forårsaker signifikante forskjeller i tilheling av muskelvev sammenlignet med saltløsning eller bleomycin alene.

Ved å vurdere virkningen, hvis noen, av langsgående versus tversgående innsnitt, var det ingen signifikante forskjeller etter 2 dager eller 1 uke i nærvær av saltløsning versus bleomycin. Etter 2 og 3 uker var de eneste signifikante histologiske forskjellene mengden av granuleringsvev/fibrose i alle tre undersøkte vevslag. I hud, subkutan vev og muskel, hadde langsgående innsnitt mer granuleringsvev/fibrose enn tversgående innsnitt i hvert tilfelle hvor det var signifikante forskjeller. Dette er forventet ettersom langsgående innsnitt generelt tilheles bedre enn tversgående innsnitt. Scorene for tilheling av hud, subkutan vev og muskel var ikke signifikant forskjellige for langsgående og tversgående innsnitt.

Oppsummering

Elektroporering av muskelen forårsaket ingen signifikant forandring i bruddstyrken til grisehud i nærvær eller fravær av bleomycin etter ukene 2 og 3 og diskuterbar til og med i uke 1. Imidlertid var nærværet av bleomycin uten hensyn til om EP ble anvendt, assosiert med en reduksjon i bruddstyrken hos grisehud opptil 1-2 uker etter behandling sammenlignet med bare innsnitt, eller med innsnitt injisert med saltløsning, med eller uten EP. Med hensyn til histologi, resulterte elektroporering av vevene i ingen signifikante forskjeller i tilheling av huden, subkutan vev eller muskel. Således har elektroporeringsterapi ingen signifikant negativ virkning på tilheling av muskel eller hud. Dette synes også å være tilfellet der hvor EPT blir brukt for behandling av vev som omgir tumorer og således tilveiebringer metodene i henhold til oppfinnelsen et alternativ til kirurgisk reseksjon eller andre terapeutiske intervensjoner ved behandling av sårmarginer rettet mot å redusere tumortilbakevending.

Eksempel II

Hypotetisk behandlingsregime

Det er vurdert at kirurgi ved å bruke fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen og anordningen generelt vil følge en protokoll som sannsynligvis vil gjennomgå følgende trinn:

1. Hovedtumormassen vil fjernes kirurgisk som vanlig praktisert av en kirurg med kunnskap på området. Kirurgen vil enten fjerne bare den primære tumormassen eller vil også fjerne en kirurgisk margin. Alternativt kan hovedtumoren fjernes ved en av de mange fjernende terapiene så som RF (radiofrekvens) -fjerning, PDT (fotodynamisk terapi), kryoterapi, kjemobestråling, brakyterapi eller til og med galvanoterapi, med eller uten fjerning av marginalt vev.
2. Etter kirurgisk reseksjon (eller fjerning) av tumormassen, med eller uten reseksjon (eller fjerning) av marginalt vev, vil alt vevet som omgir reseksjons (eller fjernings) -setet behandles med EPT ved å anvende bleomycin eller andre kjemoterapeutiske eller biologiske medikamenter. Medikament-EPT-behandling vil utføres til en dybde som bestemt av kirurgen i henhold til teoretiske vurderinger, vitenskapelige undersøkelser eller praktisk erfaring.

Variasjon A. Protokoll for reseksjon av en tumor med standard marginer

1. I denne protokollvariasjonen, etter at tumoren er blitt fjernet sammen med standard marginer, blir hele såroverflaten (tumormarginalt leie) behandlet til en egnet dybde, typisk 1 cm med et standard EPT-regime som typisk omfatter lokal injeksjon av et antikreftmiddel etterfulgt av elektroporering ved å bruke en anordning utstyrt med minst en multielektrodeoppstilling (for eksempel en oppstilling med seks nåler eller et annet elektrodearrangement av en anordning i henhold til oppfinnelsen så som beskrevet i figurene **5-10**) og, for eksempel, pulsering i minst tre feltorienteringer med en egnet spenning. Med feltorienteringer er det ment romlig og retningsorientering av det elektriske feltet dannet ved den elektriske pulsen mellom enhver av to motsatt ladde elektroder. I denne utformingen kan protokollen variasjon A utført uten anvendelse av (eller alternativt en redusert anvendelse av) tradisjonell postkirurgisk sekundær behandling. I et slikt tilfelle er metoden i henhold til oppfinnelsen ment å oppnå like eller bedre tilbakevendingsgrader sammenlignet med fullstendig kirurgisk marginfjerning og sekundær behandling.
2. Etter EPT av tumormarginleiet, kan pasienten hvis ønskelig ytterligere behandles med konvensjonell sekundær behandling så som stråling eller kjemoterapi, og derved tilveiebringe ytterligere potensiell beskyttelse mot

tumortilbakevendelse sammenlignet med ingen EPT-behandling av det marginale vevet.

- Resultatet av å utføre trinnene 1 og 2 ovenfor er ment å omfatte forbedret tilhelingsgrad eller tid for tilbakevendelse med noen grad av preservering av vev over
- 5 konvensjonelle terapier hvor marginalt vev ikke desto mindre ville ha blitt fjernet.

Variasjon B. Protokoll for reseksjon av en tumor uten reseksjon av marginene

1. I denne protokollen for fremgangsmåter i henhold til variasjonen, blir etter tumorfjerning og redusert eller ingen fjerning av marginene, hele såroverflaten behandlet til en egnet dybde, typisk 1 cm med et standard EPT-regime som typisk
- 10 omfatter lokal injeksjon av et antikreftmiddel etterfulgt av elektroporering ved å bruke en multielektrodeoppstilling (for eksempel en oppstilling med seks nåler eller en oppstilling som vist i de vedlagte figurene) og for eksempel pulsering i minst tre feltorienteringer med en egnet spenning.
2. Det mente resultatet etter denne protokollen og ytterligere konvensjonell
- 15 sekundær behandling er fullstendig eller delvis preservering av marginalt vev og potensielt forbedret tilhelingsgrad eller tid for tilbakevending.

I alternative utforminger av ovennevnte protokoller, er ingen tradisjonell sekundær behandling tilveiebrakt, enda er det mente resultatet fullstendig eller delvis preservering av marginalt vev og forbedret tilhelingsgrad eller tid for tilbakefall.

20 Eksempel III

- Hvis vi nå vender oss til en beskrivelse av en elektroporeringsanordning som er egnet for å behandle marginale leier av resekterte tumorer, er en første utforming av anordningen ment å tilveiebringe kapasitet til å levere et antikreftmiddel til det marginale vevet, for eksempel bleomycin, likt fordelt gjennom hele det marginale
- 25 leiet. I en andre utforming tilveiebringer anordningen kapasitet til å levere til det marginale vevet et flertall av pulser med elektrisk energi som er tilstrekkelig til å forårsake elektroporering av celler gjennom det marginale leiet til en dybde på mellom 1 og 1,5 cm.

- I en tredje utforming kan anordningen i henhold til oppfinnelsen tilveiebringe
- 30 levering av elektroporeringspulser til en hoveddel av det marginale leiet, hvis ikke hele det marginale leiet (avhenger av de relative dimensjonene til anordningen og tumoren), med en enkel plassering av anordningen i henhold til oppfinnelsen slik at for å tilveiebringe elektroporerende pulser til hele det marginale leiet, bør anordningen fortrinnsvis bare plasseres en gang.

- 35 I ytterligere utforminger inkluderer anordningen et flertall av elektroder posisjonert i en geometrisk oppstilling for å tilveiebringe levering av en serie av elektriske

pulser mellom selekterte elektroder i oppstillingen. I en relatert utforming kan anordningen omfatte et flertall av fasonger for å tilpasses forskjellige tumorfaser og størrelser og ytterligere tilveiebringe en oppstilling av elektroder i en foretrukket geometri.

- 5 I enda andre utforminger kan elektrodene i anordningen i henhold til oppfinnelsen omfatte forlengede hule nåler slik at elektrodene kan virke både som elektroder og antikreftmiddelleveringsnåler. I en særlig foretrukket utforming kan anordningen inkludere en hette over spissene for å dekke elektrodene og tilveiebringe en mekanisme for å levere antikreftmiddel til de hule nålene og et middel til å holde
10 elektrodene sterile før kirurgi.
- Idet vi nå vender oss til de spesifikke detaljene av anordningen i henhold til oppfinnelsen, viser **figur 5** oppfinnelsens anordning **10** som omfatter en i alt vesentlig stiv spisshet **20** som også fungerer som et fyllebrett for terapeutisk middel. Dekket/brettet **20** omfatter videre en fylleport **21** som kan konstrueres med
15 en tilpasning som kan kobles til enhver type tilpasning for å festes til en fluidkilde for å fylle brettet til et ønsket nivå med terapeutiske stoffer. Hetten/brettet **20** passer tett til hovedlegemet til anordningen i henhold til oppfinnelsen som i seg selv omfatter et i alt vesentlig stivt substrat **22** gjennom hvilket en oppstilling av et flertall av forlengede elektroder **23** passerer og som hver er individuelt koblet til
20 elektriske ledninger **24** som ender på en lateral del av anordningen i en plugg eller kobling **25** for tilfesting til en kilde for elektrisk energi. Substratet **22** og pluggen **25** er koblet til hovedlegemesubstratet **30** som i seg selv omfatter en oppstilling av et flertall av brønner **31** (se **figur 6**). Hver brønn omfatter en hul elektrode/nål gjennom hvilken et stoff så som et terapeutisk stoff kan overføres.
- 25 Tilpasset med substratet **30**, er substrat **40** som omfatter en oppstilling av et flertall av nålestempler **41**. Substratet **40** er koblet til en mekanisme som kan aktivere bevegelsen av substrat **40** mot og vekk fra substratet **30** slik at oppstilling av nålestempler **41** i substratet **40** kan drives inn i eller trekkes vekk fra substratet **30**. I en utforming blir substratet **40** aktivert av en sentral stav **60** koblet til substratet **40**
30 på en ende og i den andre enden konfigurert i en skralle og et tommelaktivert hjul **61**. I en beslektet utforming danner substrat **50** ytterligere en lukkende understøttelsesstruktur **63** for å omgi og lukke den sentrale staven **60**. Understøttelsesstrukturen **63** kan ytterligere omfatte brukervennlig håndtak **64**. Under operasjon vil operatøren bruke port **21** til å fylle dekselet/brettet **20** til et ønsket nivå med et
35 flytende terapeutisk middel så som for eksempel bleomycin og deretter bruke tommelhjulet **61** for å trekke middelet inn i brønnene **31** (**figur 6**). Operatøren vil deretter fjerne anordningen fra brettet **20** ved å bruke håndtaket dannet av understøttelsesstrukturen **63** og plassere anordningen i en egnet posisjon på vevet eller det marginale leiet. Operatøren vil deretter innsette elektrodene, aktivere
40 tommelhjulet **61** for å administrere middelet inn i vevet etterfulgt av aktivering av

elektroden, hvor anordningen tidligere er blitt festet til en kilde for elektrisk energi via pluggen **25**.

Anordningen i henhold til oppfinnelsen kan ytterligere omfatte andre varierende arrangement av komponenter for å tilveiebringe det samme resultatet. For eksempel kan i en utforming anordningen omfatte et eventuelt dynamisk hus **50** festet til substratet **30**. Huset **50** er vurdert som dynamisk og en eventuell basis siden huset kan rotere med klokken og mot klokken for å heve eller senke nålestempelet i stedet for å bruke tommelhjulet, avhengig av hvilken type oppfinnelsen som er valgt. I utforminger så som det vist i **figur 5**, er huset **50** ikke dynamisk ved at selv om huset **50** kan være i stand til å roteres, men for håndtaket og tommelhjulet tjener en slik rotasjon i denne utformingen ingen hensikt. Alternativt, som vist i **figurene 7 og 8**, er huset dynamisk i at substratet **40** blir aktivert mot eller vekk fra substratet **30** med skrue **70** som er festet til en ende av substratet **40** og til huset **50** på den andre enden ved inngrep av nevnte skrue **70**. Delen av huset **50** som interagerer med gjengene i skrue **70** er i seg selv dannet i skruegjenger **71** som ved rotering av huset **50** vil trekke substrat **40** vekk fra eller mot substrat **30**. Under bruk vil operatøren fylle dekslet/brettet **20** med middel som tidligere beskrevet og deretter plassere den skiveformede anordningen egnet på vevet som skal behandles. Etter innsetting av elektrodene i vevet, ville brukeren mens anordningen presses ned, rotere huset **50** i retningen som vil fjerne nålestemplene mot substrat **30** og derved presse middelet inn i vevene. Operatøren vil deretter aktivere elektrodene, under den antakelse at anordningen tidligere er blitt koblet med plugg **25** til en kilde for elektrisk energi.

Enda andre utforminger av oppfinnelsen er mulige så som for eksempel anvendelse av vingemutter **80** festet til skrue **70** for å aktivere nålestemplene **41** (se figur **9**). I en slik utforming vil huset **50** ikke omfatte skruegjenger **71**, men i stedet bare et glatt borehull gjennom hvilket den gjengede sentrale staven **60** kan passere. I en slik utforming vil operatøren ikke behøve å rotere huset, men bare vingemutteren.

Enda andre utforminger av oppfinnelsen er mulige så som anvendelse av døde midler til å aktivere oppstillingen av nålestempler. For eksempel, heller enn å anvende levende kraft til å påvirke en vingemutter, tommelhjul eller skriedriver, kan nålestemplene aktiveres ved et motordrevet stempel. I en slik utforming kan en motor plasseres i anordningen med huset **50** til for eksempel å forårsake bidireksjonal rotasjon av huset med hensyn på utformingen beskrevet i figurene **6-8**. På samme måte kan en motor festes til gear som i tommelhjulutformingen for å aktivere heving og senking av nålestemplene. Ytterligere, som en med vanlig kunnskap på området vil forstå, kan anordningen inkludere indikatorer som tilveiebringer informasjon til operatøren når nålestemplene har nådd sine respektive maksimale bevegelser inn i eller vekk fra brønnene **31**.

Enda andre utforminger inkluderer anvendelse av et utvalg av energiserende parametere inkludert anvendelse av monopolare og/eller bipolare pulser i enhver form inkludert, uten begrensning, tog av pulser, eksponentielt avtakende pulser, firkantpulser, osv. Ytterligere enda kan oppfinnelsen anvende pulser som har en feltstyrke på mellom 10 og 1500 V/cm. Videre vurderer oppfinnelsen kapasiteten til å tilføre energi til hver elektrode i oppstillingen individuelt eller sammen med enhver kombinasjon av de gjenværende elektrodene. For eksempel i en utforming kan enhver av 4 tilstøtende elektroder pulseres slik at to er positive og et motsatt par av elektroder begge er negativt ladde. Slike pulser tilveiebringer "motstående par" pulsering som beskrevet i US patent nr. 5,993,434 og 5,702,359. I enda andre pulserende formater kan enkle par av elektroder bli tilført energi for å gi en elektroporeringspuls av energi til vevet inntil alle tilstøtende par av elektroder er blitt tilført energi minst en gang. Selv om det ikke er vist på figurene, skal det forstås at anordningen i henhold til oppfinnelsen som beskrevet i sine forskjellige utforminger inkluderer individuelt adresserte elektrodennåler. Dette oppnås ved å inkorporere i substrat **22** så som ved sandwich-teknikk (det vil si at substrat **22** kan omfatte to en tolagskonstruksjon med elektriske ledere plassert i et gitter mellom de to lagene) hvor elektrisk ledende forbindelser går fra elektrodene til siden av anordningen (som vist som ledere **24**) og ender i pluggen **25** med evne til å koble flere nåler.

Eksempel IV

I dette eksempelet blir en serie av eksperimenter utført i mus hvor tumortilbakevendingshastighetene ble bestemt etter kirurgi alene eller etter kirurgi og ETP. Spesifikt omfatter dette eksperimentet en *in vivo* undersøkelse for å bestemme effekten av ETP på kirurgisk marginbehandling i nakne mus etter subkutan innføring av HT-29 humane kolonkarsinomceller og reseksjon av tumorene som oppstår fra slik innføring. Eksperimentet ble utført under humane betingelser med hensyn til behandling av testdyrene.

Eksperimentutformingen var som følger. 4-6 uker gamle normale atymiske nakne hunnmus ble plassert i 8 grupper på seks mus hver, bortsett fra gruppe 1 som omfattet 10 dyr og gruppe 3 som omfattet 7 dyr. HT-29-cellelinjen er avledet fra et humant kolonkarsinom og er en aggressiv hurtigvoksende tumor i mus. I hver gruppe mottok dyrene HT-29 humane tumorceller i form av to tilstøtende inokuleringer med 5×10^6 celler ved å bruke en 21 gauge nål og sprøyte. HT-29-cellelinjen ble oppnådd fra ECACC (#HTB-38), dyrket i McCoys 5a-medium (modifisert) med 1,5 mM L-glutamin justert til å inneholde 2,2 g/l natriumbikarbonat, 90 %, og storfosterserum, 10 %. Cellene ble delt 1:2 til 1:4 på vekstsykluser inntil et tilstrekkelig antall celler var tilgjengelige for bruk i dette eksperimentet.

Etter inokulering ble tumorene etablert på inokuleringsstedet. Tumorvolumet i hvert dyr ble regelmessig kontrollert og beregnet ved å bruke formelen: Tumorvolum = $(a^2 \times b/2)$ hvor "a" er den minste diameteren og "b" er den største diameteren perpendikulært på "a". Tumorene ble målt tre ganger i uken med start fra den dagen tumorene kunne kjønnnes ved hjelp av hånden. Tumorene ble tillatt å vokse inntil størrelsen var mellom 500 og 1500 mm³. Kirurgisk fjerning av tumor, delvis fjerning eller ingen fjerning ble så utført i forbindelse med enten EPT eller ingen EPT. I disse eksperimentene betyr ETP behandling med bleomycin og elektroporering (EP). EP, når det ble utført, ble utført med en pulssyklus (det vil si 6 pulser på 4 Hz) pr elektrode som var satt inn ved å bruke en standard MedPulser-generator (Genetronics, Inc. San Diego, CA) og en applikator med en seks nålers oppstilling for engangsbruk på 1 cm i diameter, en avstand mellom elektrodene på 0,86 cm og en 1 cm nållengde. Hver firkantpuls hadde en varighet på 100 µsek og en applisert spenning på 1500 V. For gruppene 4-8 og 10 og 11 ble nålelektrodeoppstillingen etter intratumoral injeksjon av bleomycin innført på en slik måte at det omfatter tumoren med nåleoppstillingen eller, i tilfelle av de største tumorene, slik at nålene penetrerte kanten av tumoren. Nåleoppstillingen ble innsatt perkutant og hovedsakelig perpendikulært på overflaten av museflanken som bærer tumoren. Alternativt, i de tilfellene hvor tumoren ble skåret ut først etterfulgt av i.v. injeksjon av bleomycin og deretter EP, ble nålelektrodeoppstillingen innsatt perkutant på en måte som omfattet det kirurgiske sårarealet (gruppene 5-8).

Der hvor bleomycin ble brukt i eksperimentet, ble det injisert 4 U/ml saltløsning (1 U = 1 mg) så homogent som mulig inn i tumoren og marginale vev, som angitt, med en dose på 0,25 ml/cm³ volum av vev som skal behandles. Alternativt, der hvor det var indikert, ble en tilsvarende mengde av bleomycin injisert i halevenen.

Eksperimentet brukte 8 kohorter på minst 6 mus hver. Hver kohort ble utsatt for et behandlingsregime med en kombinasjon av enhver av EP, bleomycin, saltløsning i stedet for bleomycin, fullstendig tumorutskjæring, delvis tumorutskjæring og ingen tumorutskjæring. Tabellene II og III viser behandlingsregimene.

Tabell II

Gruppe nr.	Mus nr.	Utskjæring			Bleomycin	EP
		Fjerne hele tumoren	Delvis fjerne tumor	Ingen fjerning av tumor		
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			Saltløsning	Imitasjon
	2-2	X			Saltløsning	Imitasjon
	2-3	X			Saltløsning	Imitasjon
	2-4	X			Saltløsning	Imitasjon
	2-5	X			Saltløsning	Imitasjon
	2-6	X			Saltløsning	Imitasjon
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		Saltløsning	Imitasjon
	4-2		X		Saltløsning	Imitasjon
	4-3		X		Saltløsning	Imitasjon
	4-4		X		Saltløsning	Imitasjon
	4-5		X		Saltløsning	Imitasjon
	4-6		X		Saltløsning	Imitasjon

- For eksperimenter på dyr opplistet i tabell **II**, ble dyrene anestesert etterfulgt av fjerning eller delvis fjerning av tumoren som angitt og i sin tur etterfulgt av intravenøs (i.v.) injeksjon av bleomycin eller saltløsning. Bleomycindosen var
- 5 avhengig av tumorstørrelsen som beskrevet ovenfor. Etter 3-4 minutter ble de angitte dyrene behandlet med EP etterfulgt av sårlukking med klips og kirurgisk plaster. I kohort 1 ble hele tumoren kirurgisk fjernet (se for eksempel figurene **12B** og **C**) og dyrene behandlet med bleomycin og EP. I kohort 2 ble tumorene fjernet fra dyrene mens bare saltløsning ble injisert i stedet for bleomycin og ingen EP ble
- 10 utført. Bare en "etterligning" av EP-prosedyren ble utført ved at elektrodeoppstillingen ble innsatt i vevet, men elektrodene ble ikke pulsert. I kohort 3 ble tumorene delvis (minst 95 %) fjernet etterfulgt av bleomycininjeksjon og elektroporering. I kohort 4 ble tumorene igjen delvis fjernet etterfulgt av injeksjon av saltløsning og etterlignet EP.

15 **Tabell III**

Gruppe nr.	Mus nr.	Utskjæring			Bleomycin	EP
		Fjerne hele tumoren	Delvis fjerne tumor	Ingen fjerning av tumor		
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*

I tabell **III** ble kohortdyrene anestisert etterfulgt av intratumoral administrering av bleomycinløsning i en dose og volum som beskrevet ovenfor. EP ble utført 10 minutter etter medikamentadministrering etterfulgt av tumorfjerning eller delvis tumorfjerning 15 minutter senere, i sin tur etterfulgt av sårlukking. I kohort 8 ble EP utført ufullstendig (angitt ved * i tabell **III**) ved at nåloppstillingselektroderne ble plassert slik at effektiv elektroporering bare skjedde i omtrent 75 % av tumoren og

assosiert marginalt vev. Med andre ord var EP-behandlingen forskjøvet med hensyn på tumoren.

- 5 I tillegg til ovennevnte eksperimenter, økte vi også tiden mellom avslutning av EPT og tumorutskjæring for å vurdere både total konsistens av tumorvevet og evaluere det histologisk. For denne hensikten ble tre ytterligere kohorter, gruppene 9, 10 og 11 anvendt. Det eksperimentelle regimet er vist i tabell IV.

Tabell IV

Gruppe nr.	Mus nr.	Utskjæring	Bleomycin	EP
		Fullstendig tumorfjerning		
9	9-1	X		
	9-2	X		
	9-3	X		
10	10-1	X (ved 2 timer)	X	X
	10-2	X (ved 2 timer)	X	X
	10-3	X (ved 2 timer)	X	X
11	11-1	X (ved 24 timer)	X	X
	11-2	X (ved 24 timer)	X	X
	11-3	X (ved 24 timer)	X	X

- 10 Dyrene i gruppe 9 ble anestesert etterfulgt av fullstendig utskjæring av tumorene. Tumorene ble undersøkt for konsistens og preservert i formalin for senere histologisk evaluering, så også tumorvevene i kohortene 10 og 11. Anesteserte dyr i kohort 10 ble utsatt for intratumoral administrering av bleomycinløsning i en dose og volum som beskrevet ovenfor. EP ble utført 10 minutter etter medikament-administrering. Tumorer ble utskåret 2 timer etter EP. Dyrene i kohort 11 ble
- 15 behandlet på samme måte som de i kohort 10 med unntak av at tumorene ble fullstendig fjernet 24 timer etter EP. Alle sår ble lukket som beskrevet ovenfor.

Resultater

Med hensyn på de ovennevnte kohortene 1 til 8, undersøkte vi graden av tilbakevending av tumorene i testdyrene tre uker etter behandling. Som beskrevet i

tabell V og figur 15, ble hoveddelen av dyrene som mottok bleomycin og EP beskyttet fra tumortilbakefall (se beskrivelse av figur 15 for definisjoner av forkortelser deri).

Tabell V

Gruppe nr.	Tumorutskjæring			EP	Administrasjonsrute for bleomycin		% effektivitet*
	fullstendig	delvis	ingen		i.v.	intratumoral	
1	+			+	+		90
5	+			+		+	100
7		+		+		+	100
6			+	+		+	80
3		+		+	+		67
8			+	+/-**		+	67
2	+			-			0
4		+		-			0

5 * % effektivitet basert på antall testdyr i hver gruppe som ikke erfarer tumorvekst etter behandling

** +/- representerer en delvis EPT-prosedyre hvori behandlingen ble forskjøvet fra sentrum av tumor/tumoreiet.

10 Spesifikt tilveiebringer gruppene 1 til 8 resultater som indikerer at behandling av tumorleievev tilveiebringer en uventet og overraskende gunstig virkning til å beskytte dyrene fra tilbakevendende tumorer på behandlingsstedet. Som vist av dataene, er ikke utskjæring alene effektivt, enten tumorene var fullstendig eller delvis fjernet. Dette skyldes sannsynligvis den aggressive naturen til tumortypen som ble anvendt som etterlot invasive tumorsegmenter og/eller mikrometastaser på eller tett ved tumorstedet til tross for omhyggelig kirurgisk fjerning av tumoren som korrelerer med lignende aggressive tumorer hos mennesker. Dette etterligner

15 situasjoner møtt ved human kirurgisk terapi, skjønt tilbakefallsgraden hos mennesker generelt er i området 10 til 40 % og ikke så høy som observert i dette museeksperimentet. Det er viktig, som vist av resultatene til den delvis tumor-

20 fjerningen, at anvendelse av EPT med bleomycin er assosiert med betydelig reduksjon i tumortilbakefall, til og med når den kirurgiske prosedyren mislykkes (i dette tilfellet med hensikt) i å skjære ut hele tumormassen. Videre synes ikke

administrasjonsruten å spille en signifikant rolle på effektiviteten ved at administrering ved henholdsvis i.v. og i.t. produserte lignende resultater. Enda videre, effektivitetsvirkningen ble overraskende tilveiebrakt til og med etter et 15 minutters intervall mellom avslutning av bleomycin-EP-behandling og tumor-
5 utskjæring. Dataene understøtter videre behandlingsmetodene som effektivt behandler mikrotumorutsåing i vevet ved at eksperimentet hvori EP bare var delvis utført uten tumorfjerning, det vil si det effektive elektriske feltet ble forskjøvet fra sentrum av tumoren. Her var det fremdeles 67 % effektivitet som anga at det av minst en mikroregional virkning forårsaket av EPT. I dette eksempelet ble
10 undersøkelseskohorter for testing av bleomycinadministrering alene uten EP eller omvendt (det vil si EP uten bleomycin) ikke inkludert, idet bleomycin-administrering uten EP er kjent for ikke å ha noen signifikant antitumoraktivitet.

Med hensyn på tumorceller innført i testdyrene, tillot vi tumormassene å vokse til en relativt stor størrelse. Se figurene **11A**, **12A**, **13A** og **14A** som representerer
15 tumorer i testdyrene før behandling. Figurene **11B** og **12B** representerer eksempler på kirurgisk tumorfjerning på det stadium hvor tumoren er eksponert før den endelige utskjæringen. Figurene **11C**, **12C**, **13B** og **14B** representerer eksempler på såret etter fullstendig tumorfjerning før bleomycin-EPT (figur **12C**) eller
20 saltløsnings-etterlinings EP-behandling (figur **11C**) eller etter delvis tumorfjerning før saltløsnings-etterligningsbehandling (figur **14B**) eller 15 minutter etter i.t. bleomycin-EPT (figur **13B**).

Figur **11D** viser tilbakevendende tumor etter fullstendig tumorutskjæring og saltløsnings-etterlignings EP-behandling og figur **14C** viser tilbakevendende tumor etter delvis tumorutskjæring og saltløsnings-etterlignings EP-behandling. Figurene
25 **12D** og **13C** viser tumorsteder frie for tumor etter tumorutskjæring og behandling med i.v. bleomycin og EP eller behandling med henholdsvis i.t. bleomycin og EP med påfølgende delvis tumorutskjæring. Disse prosedyrene har fordeler fremfor foreliggende standardprosedyrer som behandler kreftformer med antikreft-
medikament i.t. eller i.v. Utskjæring av tumor, enten før eller etter medikament-
30 EPT-behandling forhindrer dannelse av en stor nekrotisk masse på tumorstedet som kroppen må resorbere eller på annen måte eliminere, som empirisk tar minst flere uker og forsterker muligheten for komplikasjoner. Fjerning av tumoren før eller etter medikament-EPT vil sannsynligvis fremme sårheling og redusere potensielle komplikasjoner. Videre, med denne metoden i henhold til oppfinnelsen, kan både
35 intratumoral og intravenøs injeksjon av medikament anvendes.

Med hensyn til kohortene 9-11, observerte vi at tumorkonsistensen forandret seg progressivt med tid etter behandling. Når tumoren ble utskåret to timer etter
behandling (kohort 10), var dens konsistens mykere, mindre godt definert og den lekket epidemisk væske men relativt lite blod. Tumorer utskåret 24 timer etter
40 behandling (kohort 11) hadde fullstendig myknet til en konsistens som noen ganger

ble referert til som flytende nekrose. På det tidspunktet var kirurgisk utskjæring noe vanskelig fordi grensene til tumoren var dårlig definert sammenlignet med den faste tumorvevsmassene i kohort 9-dyrene. Interessant noterte vi oss også en mykning av tumoren til og med 15 minutter etter behandling når vi fjernet tumoren fra

5 kohortene 5 og 7 som gjorde den noe mer vanskelig å utføre kirurgisk fjerning på med godt definerte grenser enn i tilfelle av ubehandlede tumorer. Dette påvirket imidlertid ikke vellykketheten til behandlingen, siden både kohortene 5 og 7 ikke viste noe tumortilbakefall. Disse observasjonene tilveiebringer bevis for at

10 muligheten til å bruke medikament så som bleomycin eller andre antikreftmidler i kombinasjon med EPT som adjuvans eller tumoravsvellingsterapi som i tillegg kan brukes alene eller sammen med andre kreftterapier. For eksempel kunne en tumor behandles med bleomycin-EPT hvor det desintegreerte tumormaterialet ble fjernet ved en enkel minimal invasiv prosedyre og hvis ønsket, etterfulgt av konvensjonelle

15 Lett fjerning av flytende tumormateriale kan også føre til at såret gror hurtigere og med færre komplikasjoner, spesielt i tilfelle av store tumorer.

Alle sammensetninger og fremgangsmåter beskrevet og krevd heri kan fremstilles og utføres uten unødvendig eksperimentering i lys av den foreliggende beskrivelsen. Mens sammensetningene og metodene i henhold til oppfinnelsen er blitt beskrevet i

20 form av foretrukne utforminger, vil det være klart for de med kunnskap på området at variasjoner kan appliseres til sammensetningene og metodene og trinnene eller i sekvens av trinn i metoden beskrevet heri uten å avvike fra ideen og området til oppfinnelsen. Mer spesifikt skal de beskrevne utformingene vurderes på alle måter bare som illustrerende og ikke begrensende. Alle lignende substitutter og

25 modifikasjoner som er klart for de med kunnskap på området, skal være innenfor ideen og området til oppfinnelsen som definert ved de vedlagte krav.

Alle patenter, patentsøknader og publikasjoner nevnt i beskrivelsen indikerer nivåene til de med vanlig kunnskap på området som oppfinnelsen tilhører. Alle patenter, patentsøknader og publikasjoner inkludert de hvis prioritet eller annen

30 gunstig virkning er krevd, er heri inkorporert ved referanse i samme utstrekning som om hver individuelle publikasjon var spesifikt og individuelt angitt å være inkorporert ved referanse.

Oppfinnelsen som er illustrerende beskrevet heri, kan egnet praktiseres i fravær av ethvert element(er) som ikke spesifikt beskrevet heri. Således, for eksempel, i hvert

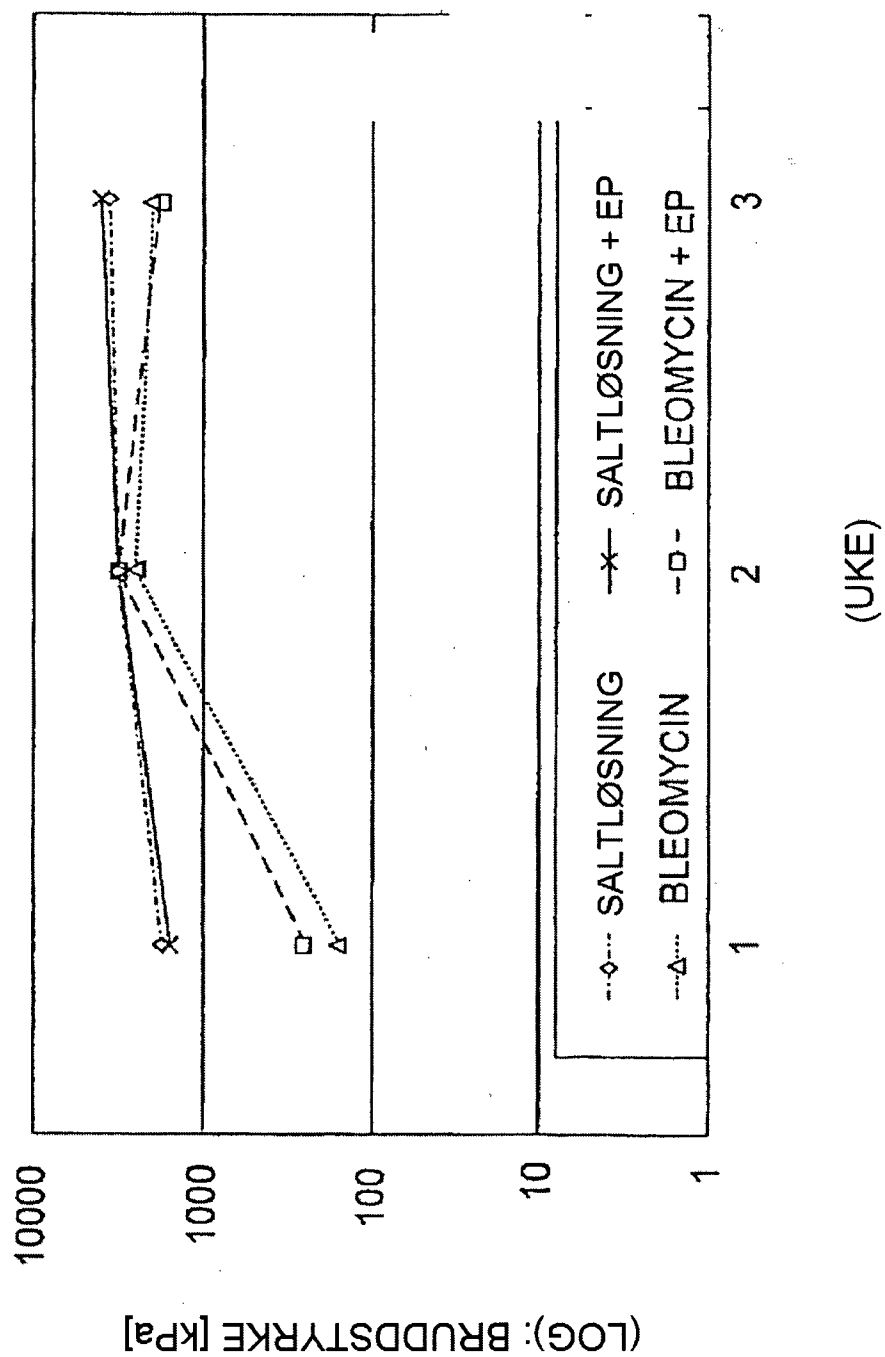
35 tilfelle heri, kan enhver av betegnelse "omfattende", "i alt vesentlig bestående av" og "bestående av" erstattes med hver av de andre to betegnelse. Betegnelse og uttrykkene som er blitt anvendt er brukt som betegnelser ved beskrivelse og ikke for å begrense og det er ingen hensikt at anvendelse av slike betegnelser og uttrykk impliserer at det ekskluderes noen ekvivalenter av trekkene som er vist og beskrevet

40 i sin helhet eller delvis, men det er forstått at forskjellige modifikasjoner er mulige

- innenfor området til oppfinnelsen som er krevd. Således skal det forstås at skjønt den foreliggende oppfinnelsen er blitt spesifikt beskrevet ved foretrukne utforminger og eventuelle trekk, kan modifikasjoner og variasjoner av konseptene beskrevet heri bli brukt av de med kunnskap på området og at slike modifikasjoner og variasjoner er vurdert å være innenfor området til denne oppfinnelsen som definert av de vedlagte krav.
- 5

PATENTKRAV

1. Et anticancermiddel for bruk som et medikament for å redusere tilbakefall av tumorvekst i et pattedyrvev i et pattedyr på og rundt en lokalisering i nevnte pattedyr til en utskåret tumor;
- 5 hvori nevnte middel er valgt fra gruppen bestående av bleomycin, cisplatin, et protein, et antistoff, RNAi, en antisensenukleinsyre, et uttrykkbart gen som koder for et terapeutisk aktivt polypeptid, et kjemokin og et cytokine;
hvor nevnte middel er for administrering til nevnte vev ved intravenøs injeksjon eller injisert direkte i og rundt nevnte vev enten før eller simultant med
10 administrering av en elektroporerende elektrisk puls til nevnte vev, for derved å avlevere nevnte middel inn i celler i nevnte vev som resulterer i en reduksjon eller eliminering av tumorcellevekst i nevnte vev.
2. Anticancermiddelet for bruk som et medikament ifølge krav 1, hvori nevnte RNAi, antisensenukleinsyre, og uttrykkbare gen er formulert i poly-L-glutamat
15 løsning.
3. Anticancermiddelet for bruk som et medikament ifølge krav 1, og for behandling av mikroskopiske residualsulster som gjenstår i nevnte vev etter kirurgisk reseksjon av nevnte tumor;
hvor nevnte middel er til administrasjon til nevnte vev tidligere nærliggende og
20 omkring svulsten og inneholdende nente residualsulster, før eller samtidig med administrasjon til nevnte vev av minst en elektroporativ elektrisk puls,
hvor nærværet av middelet og den elektroporative elektriske puls gir en selektiv behandling av nevnte vev for å drepe residualsulster.
4. Anticancermiddelet til bruk som et medikament ifølge krav 1, hvor den
25 elektroporative elektriske puls har en feltstyrke på 200-2000 V/cm; en pulslengde 0,1-10,0 ms; et pulsnummer 2-20; og en pulsfrekvens 1-5 Hz.

**Fig. 1**

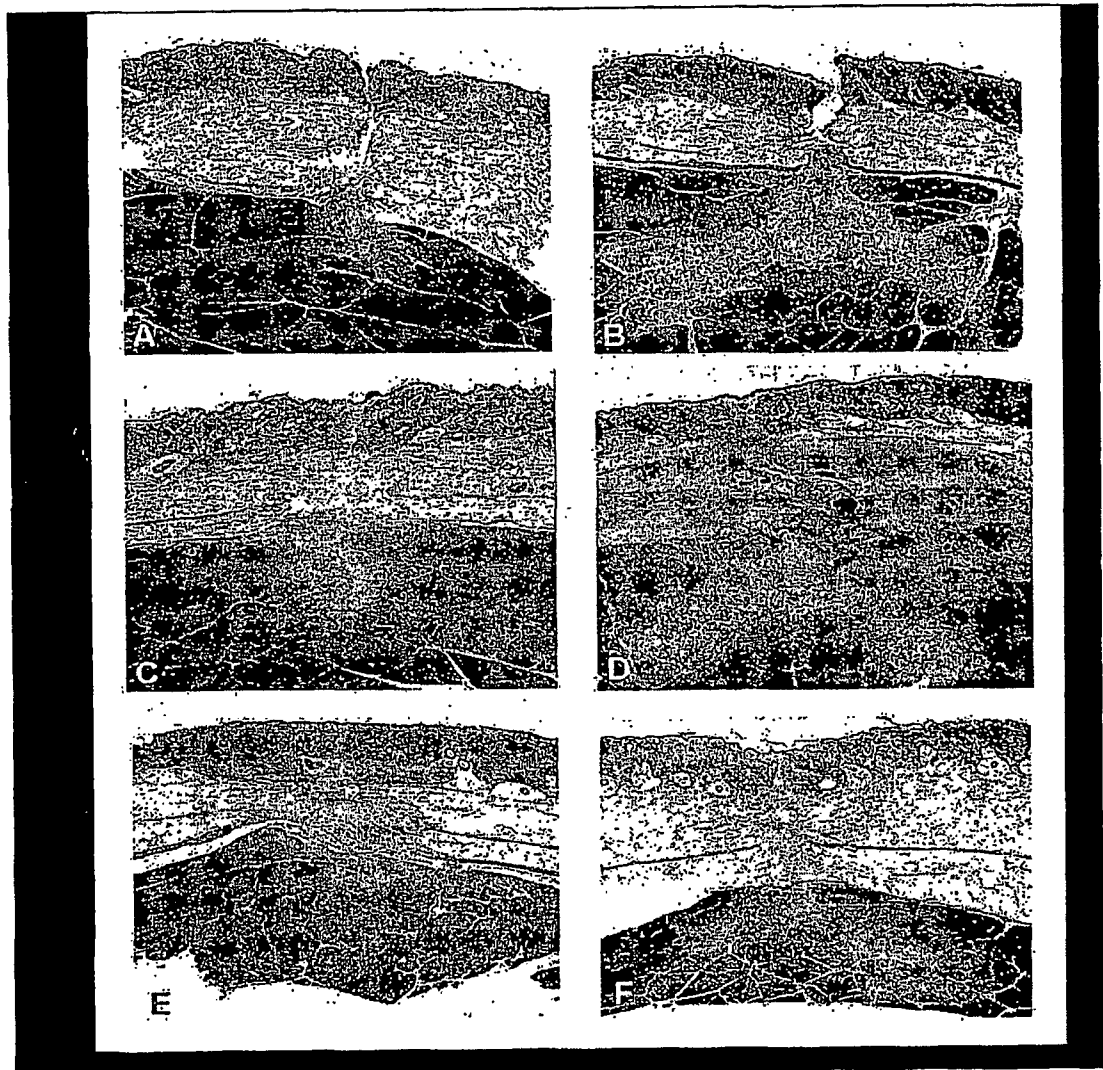
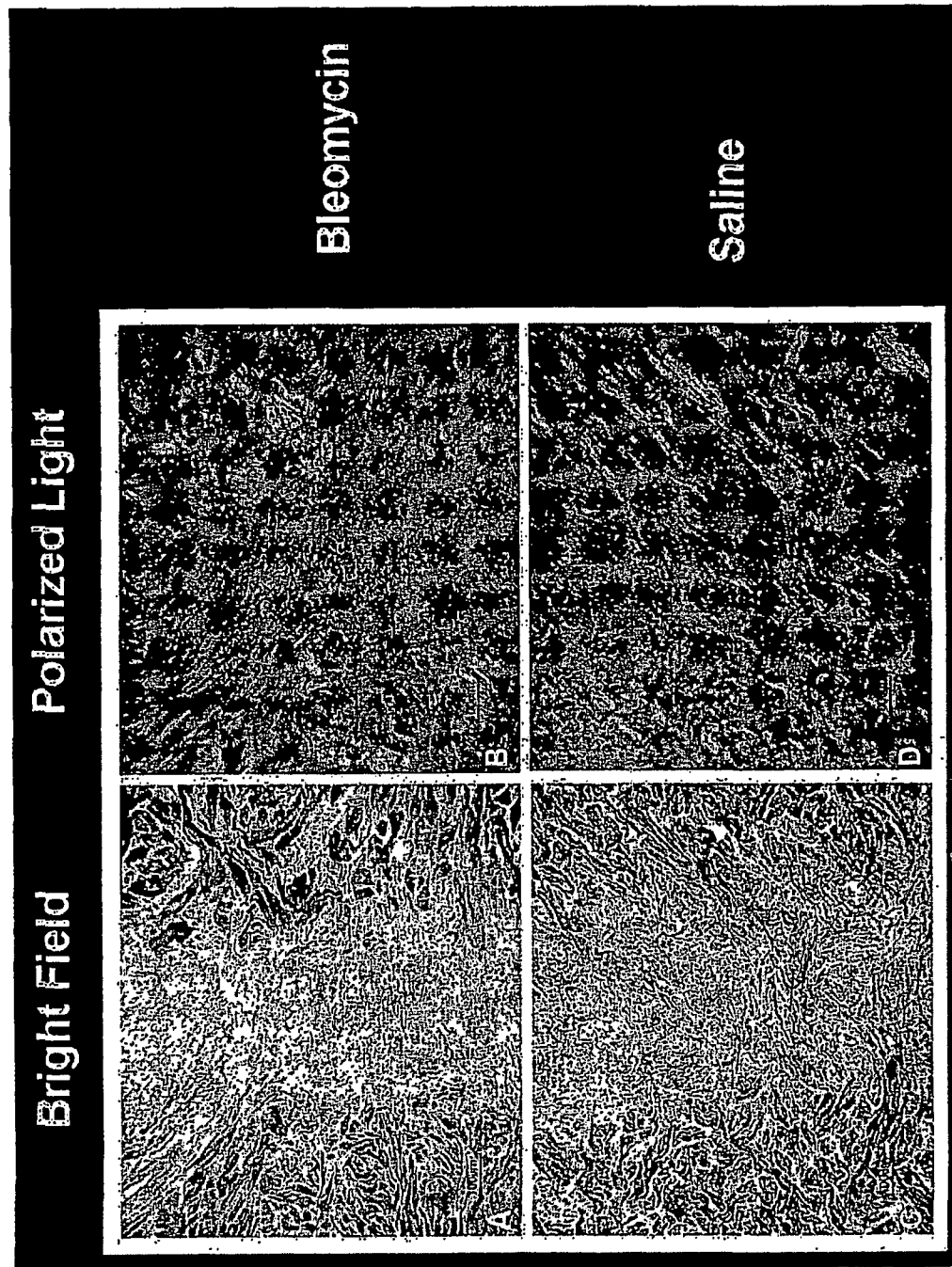
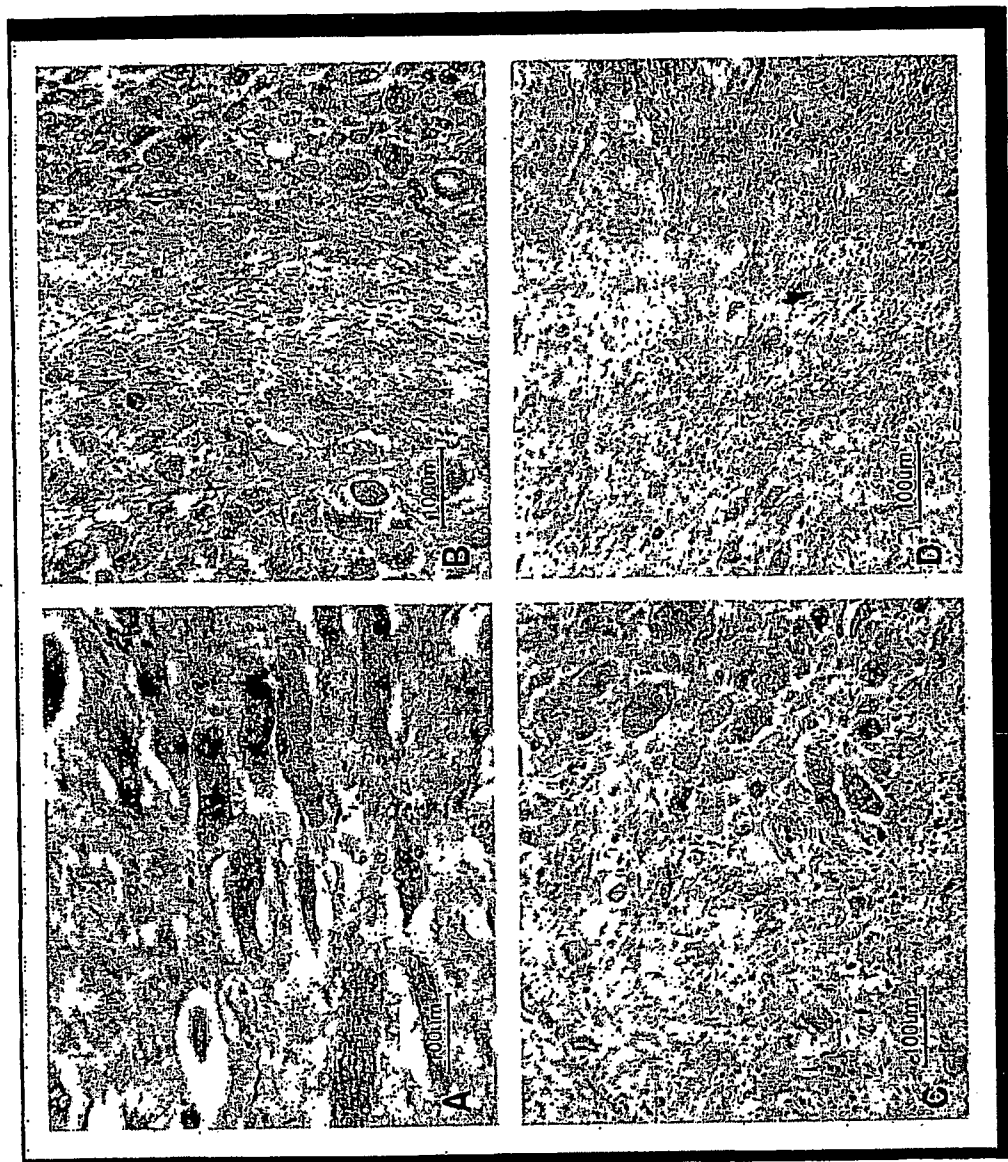
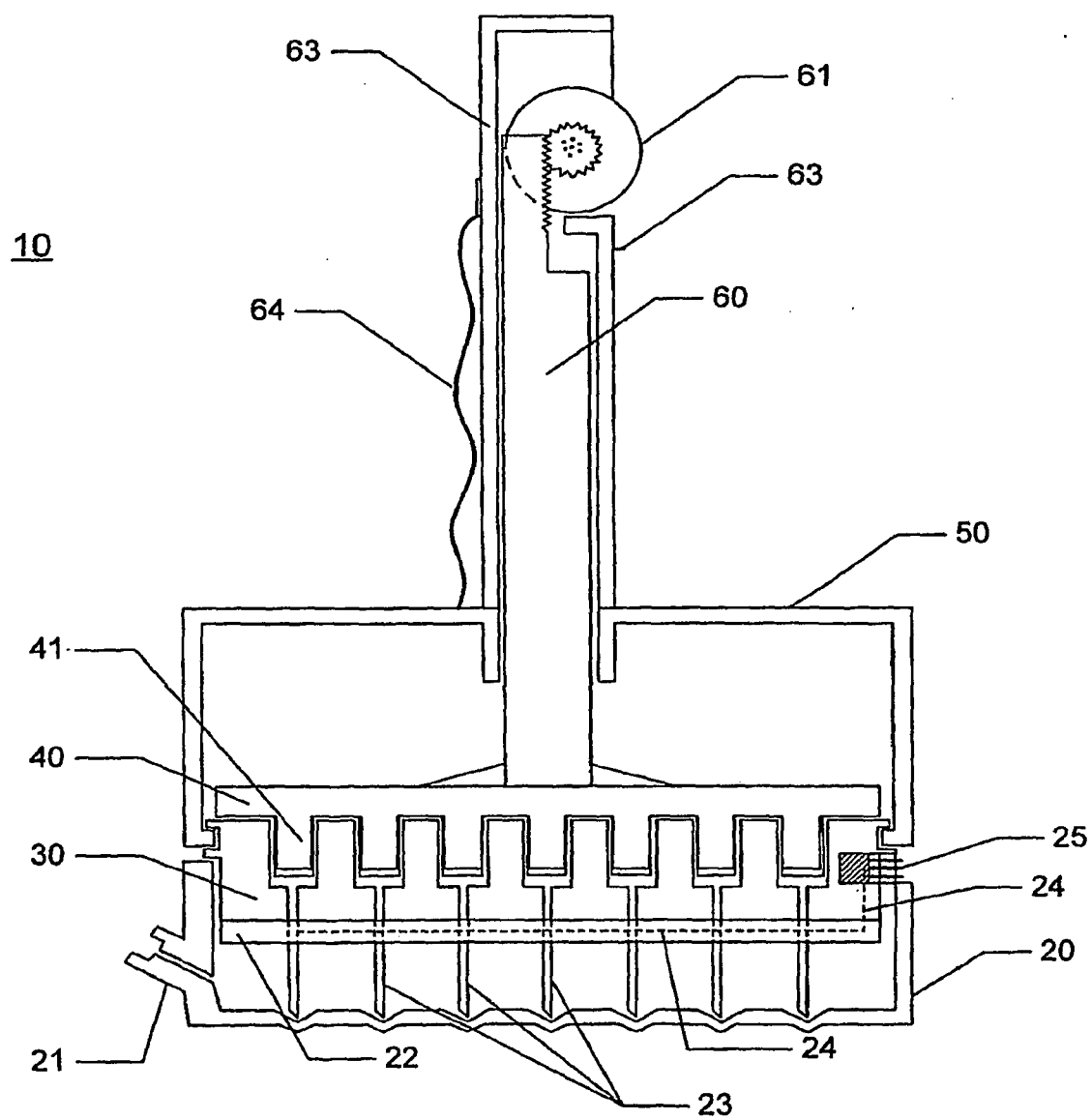


Fig. 2

**Fig. 3**

**Fig. 4**

**Fig. 5**

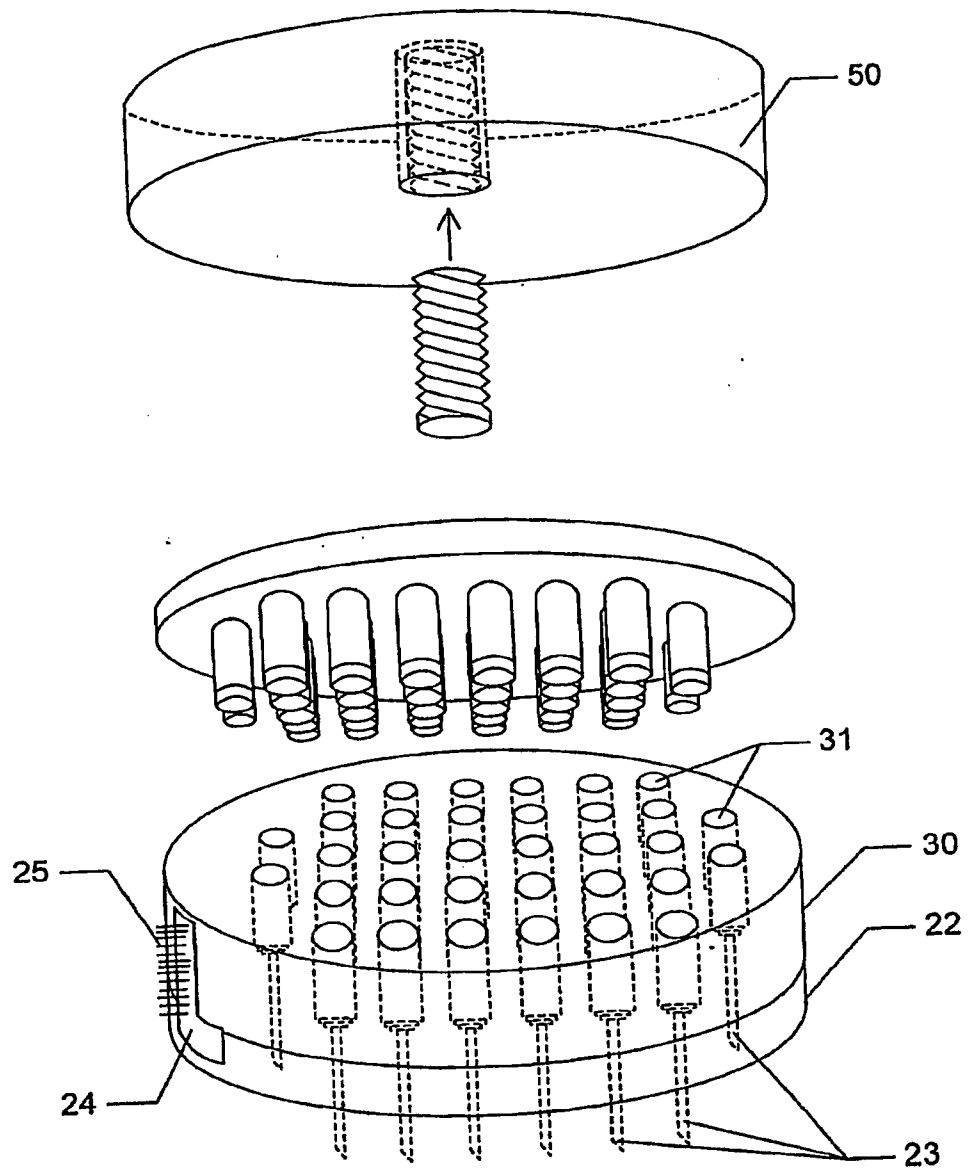
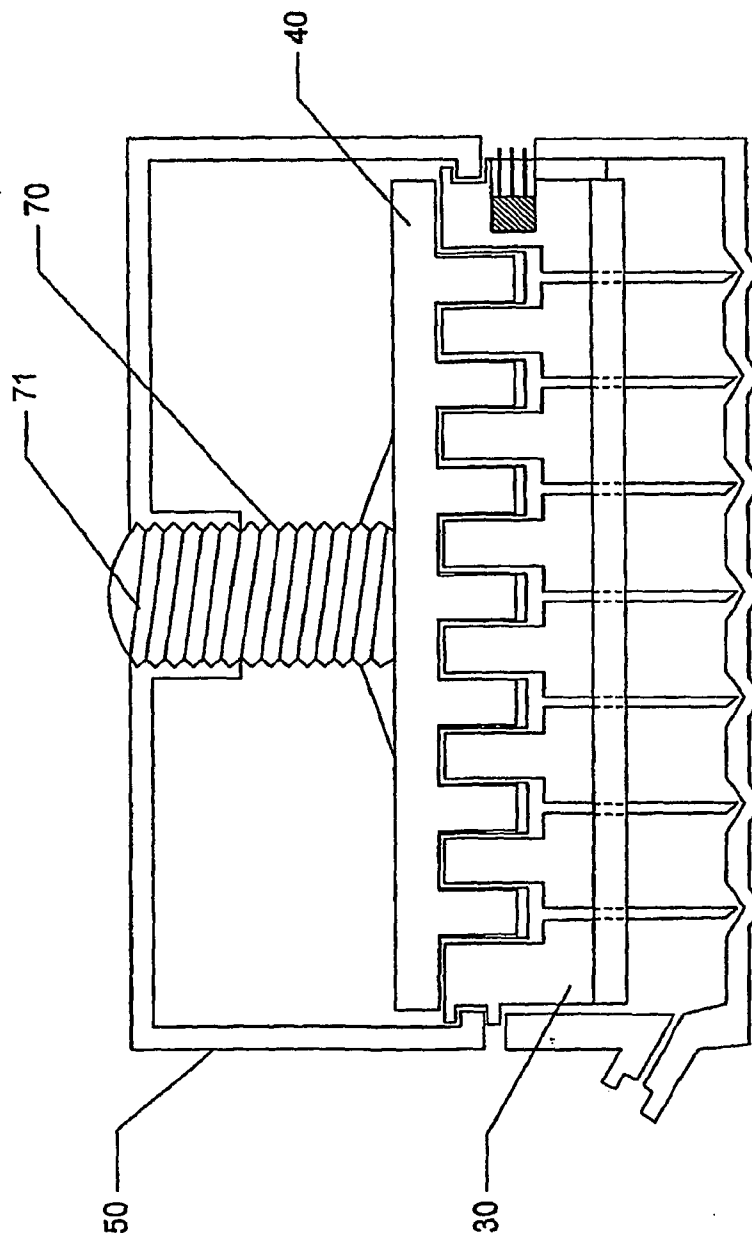
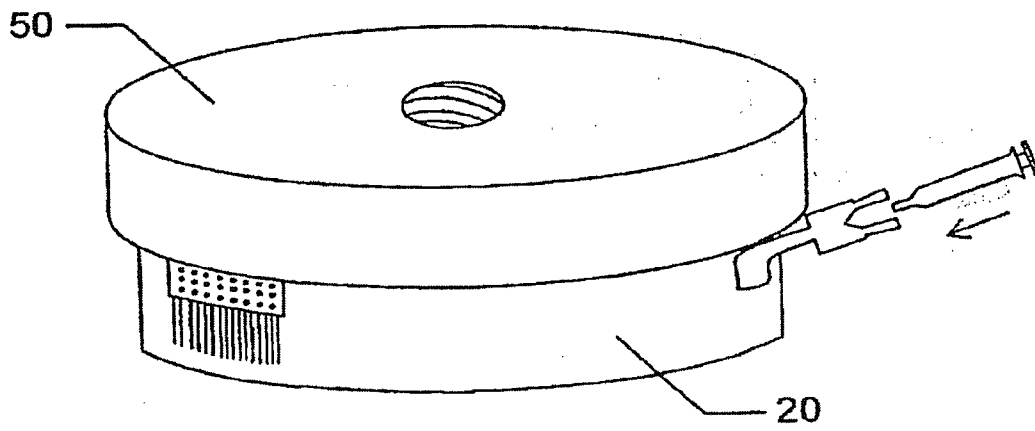
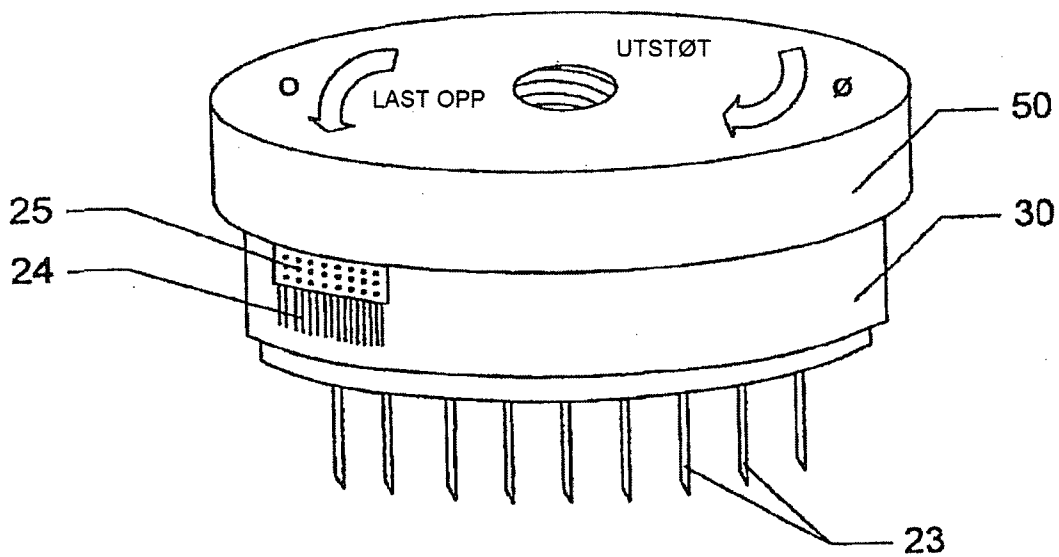


Fig. 6

**Fig. 7**

**Fig. 8A****Fig. 8B**

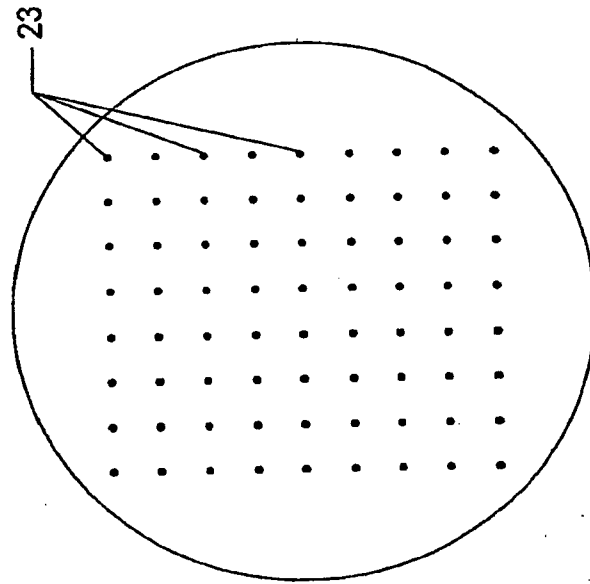


Fig. 10

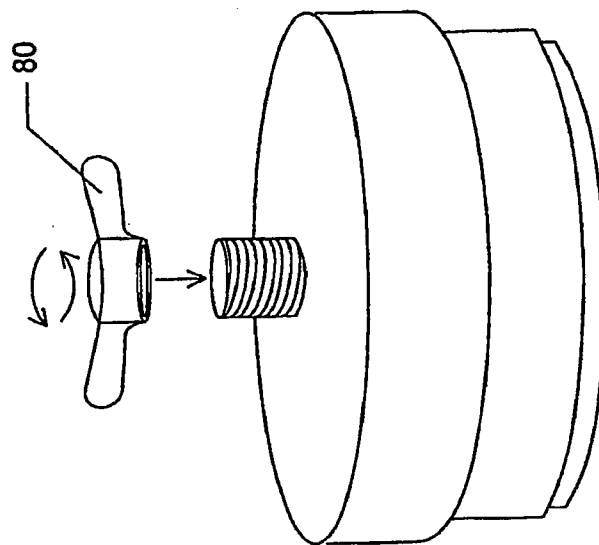


Fig. 9



Fig. 11A



Fig. 11B

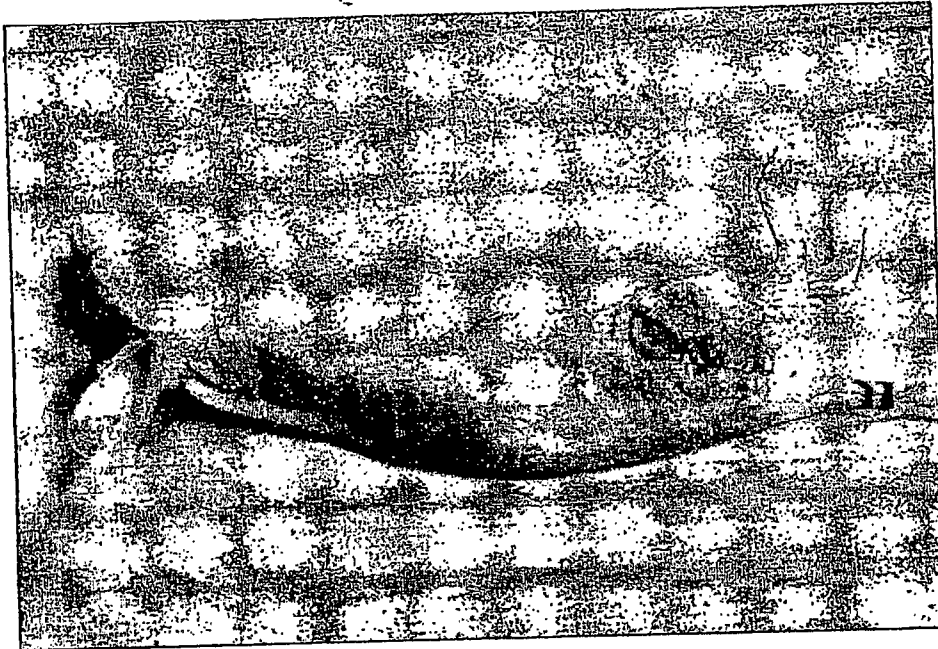


Fig. 11C

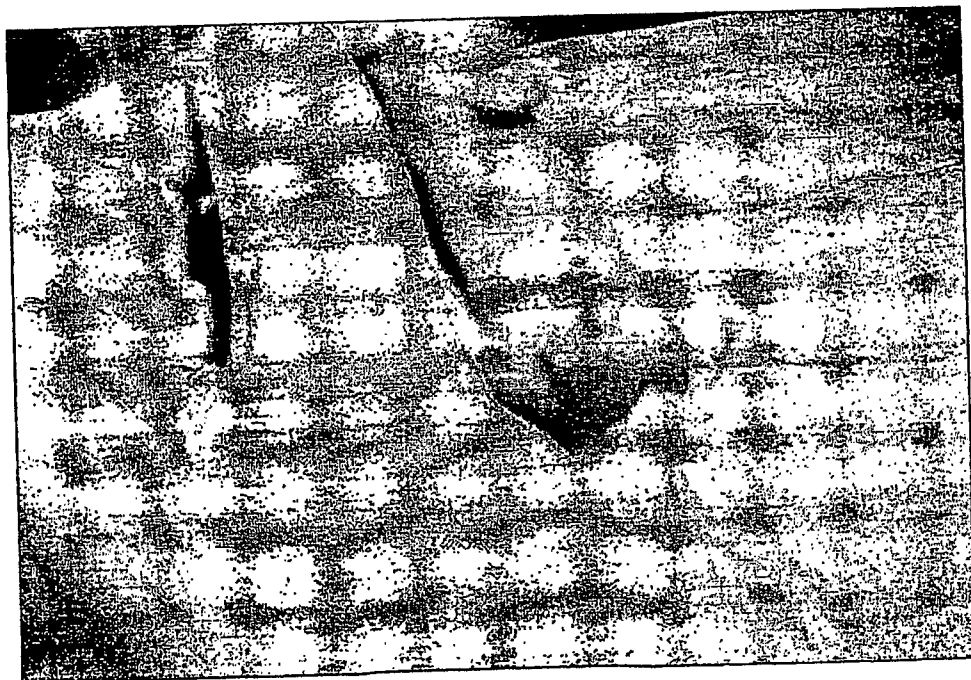


Fig. 11D

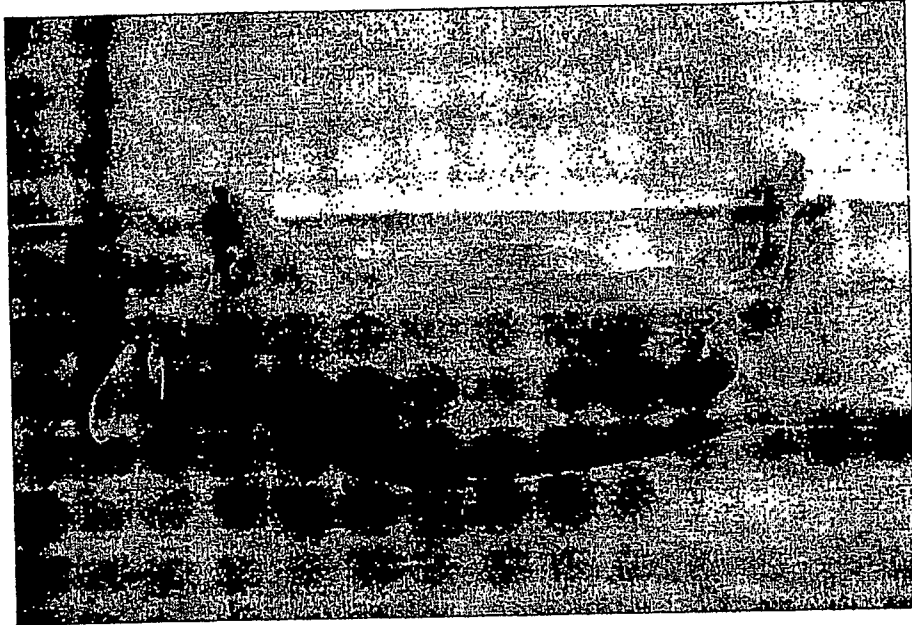


Fig. 12A

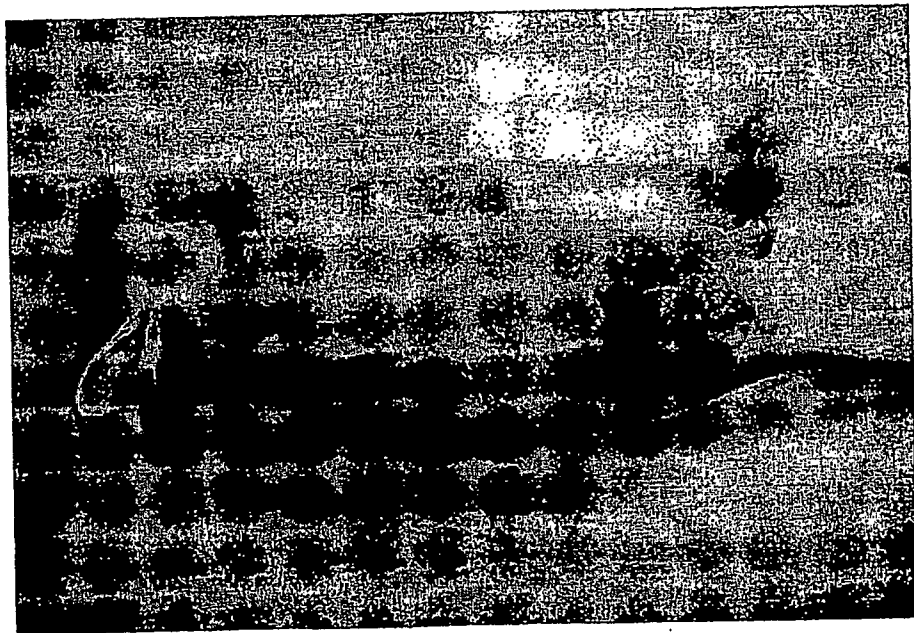


Fig. 12B

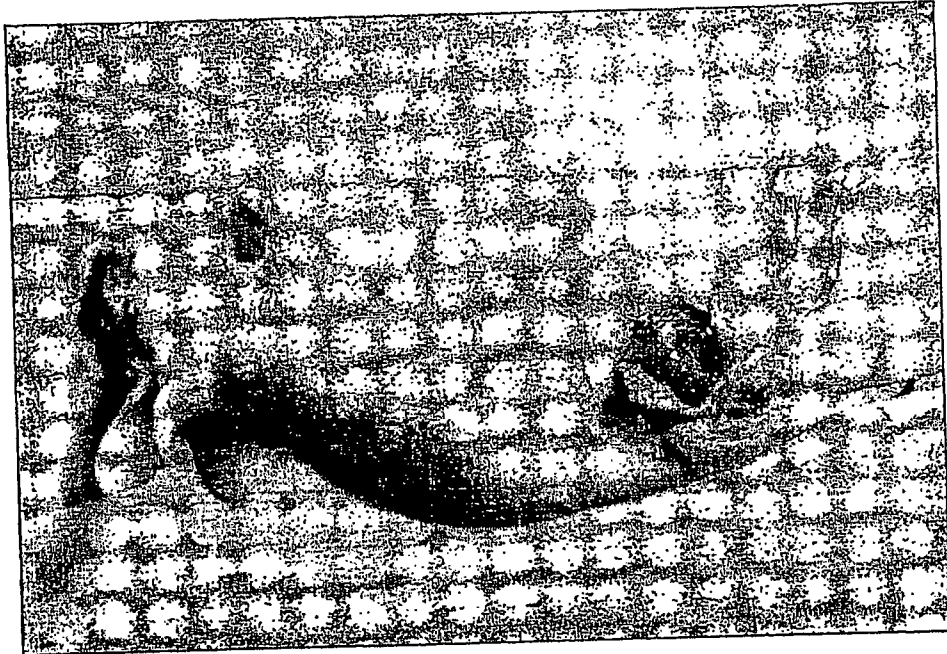


Fig. 12C

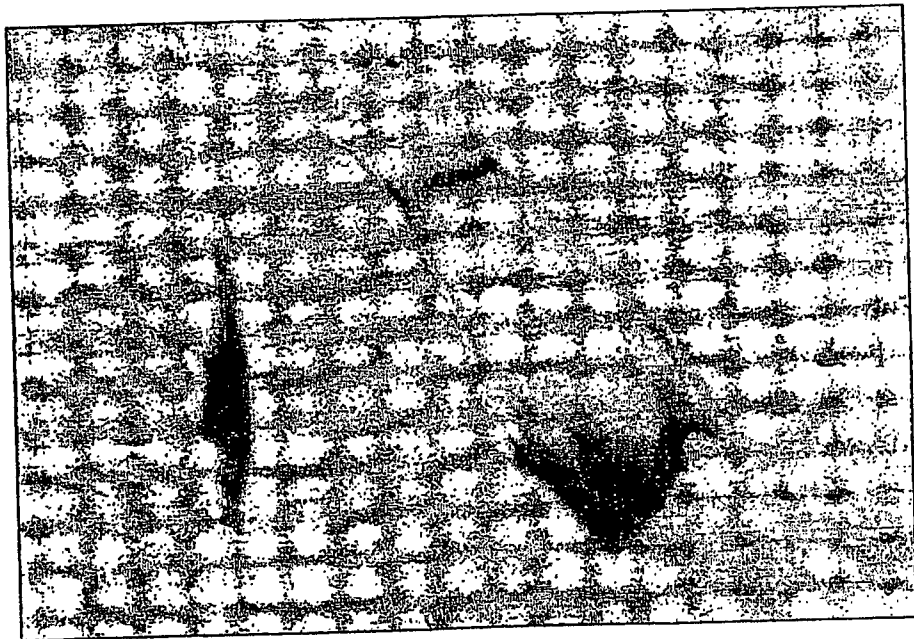


Fig. 12D



Fig. 13A

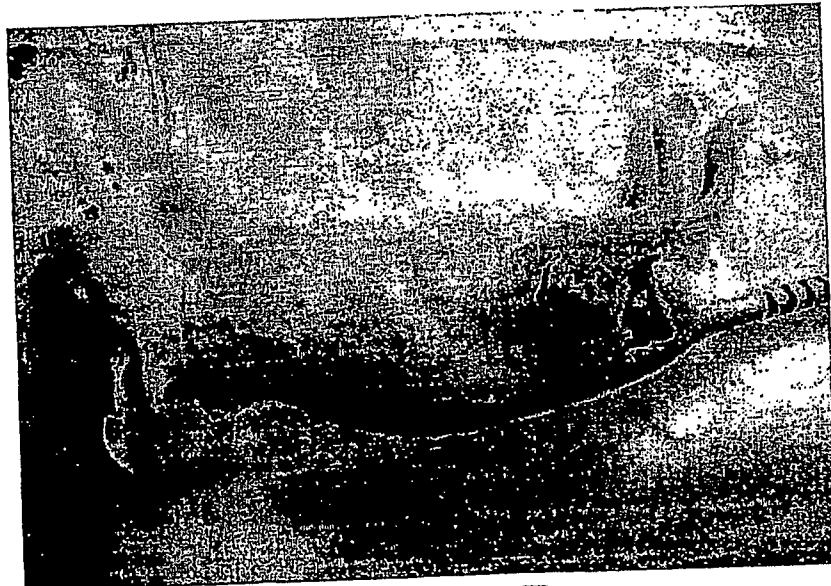


Fig. 13B

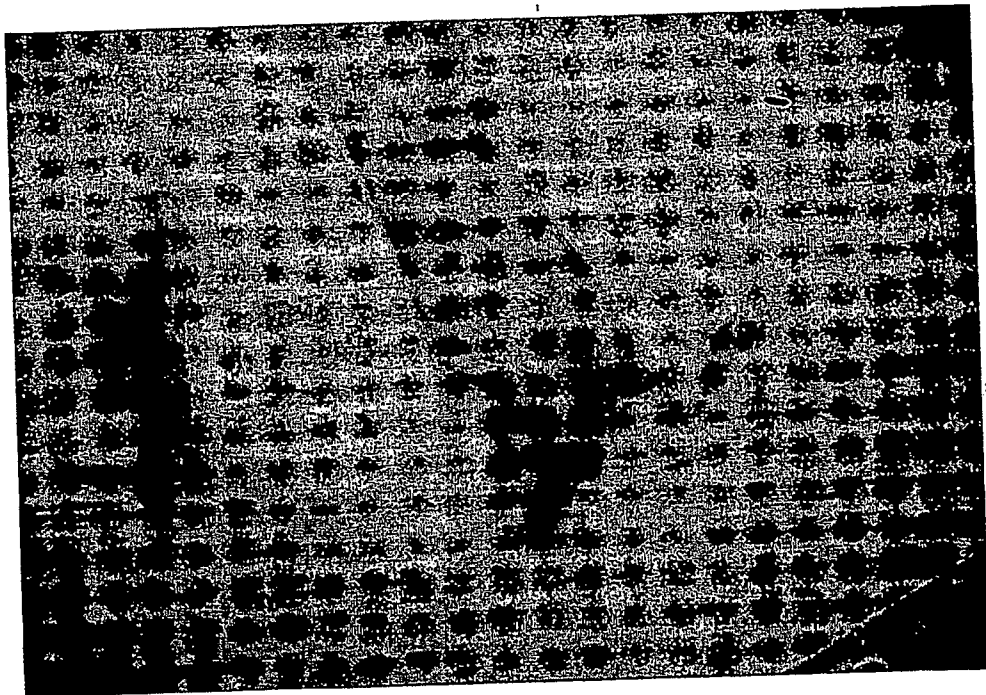


Fig. 13C



Fig. 14A



Fig. 14B

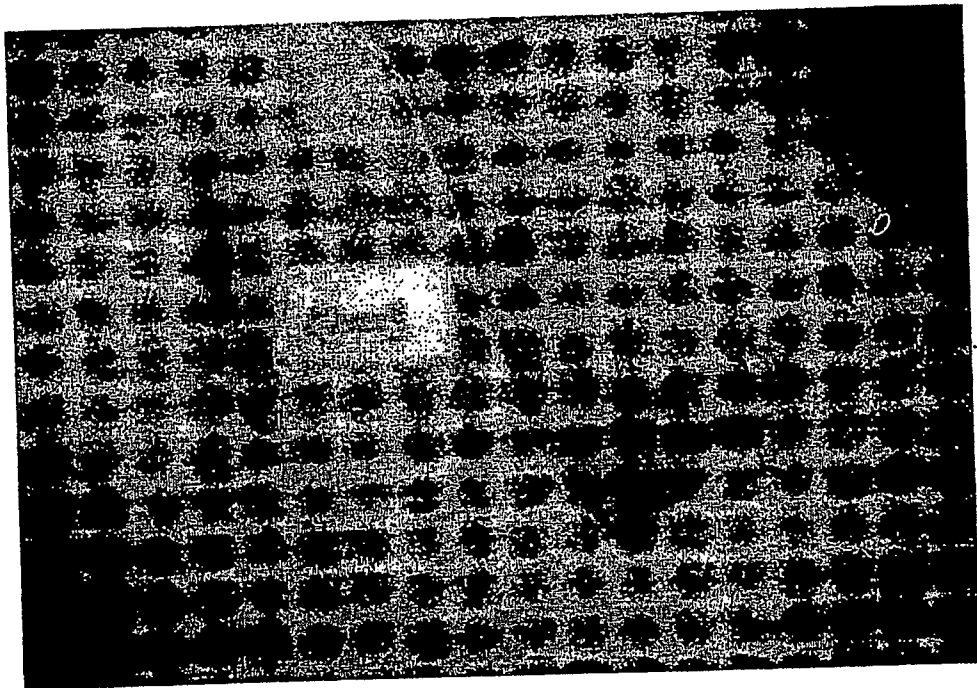
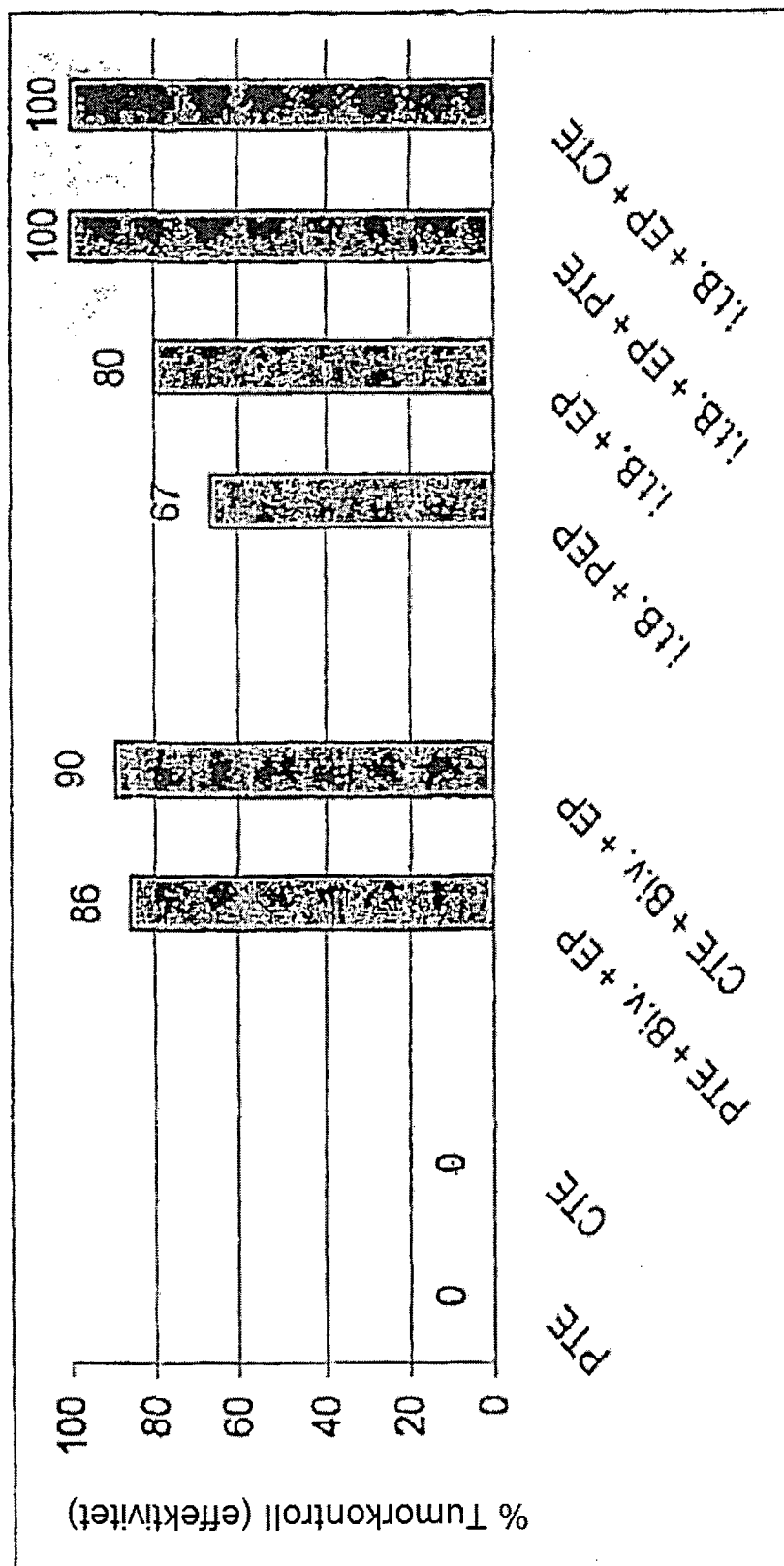
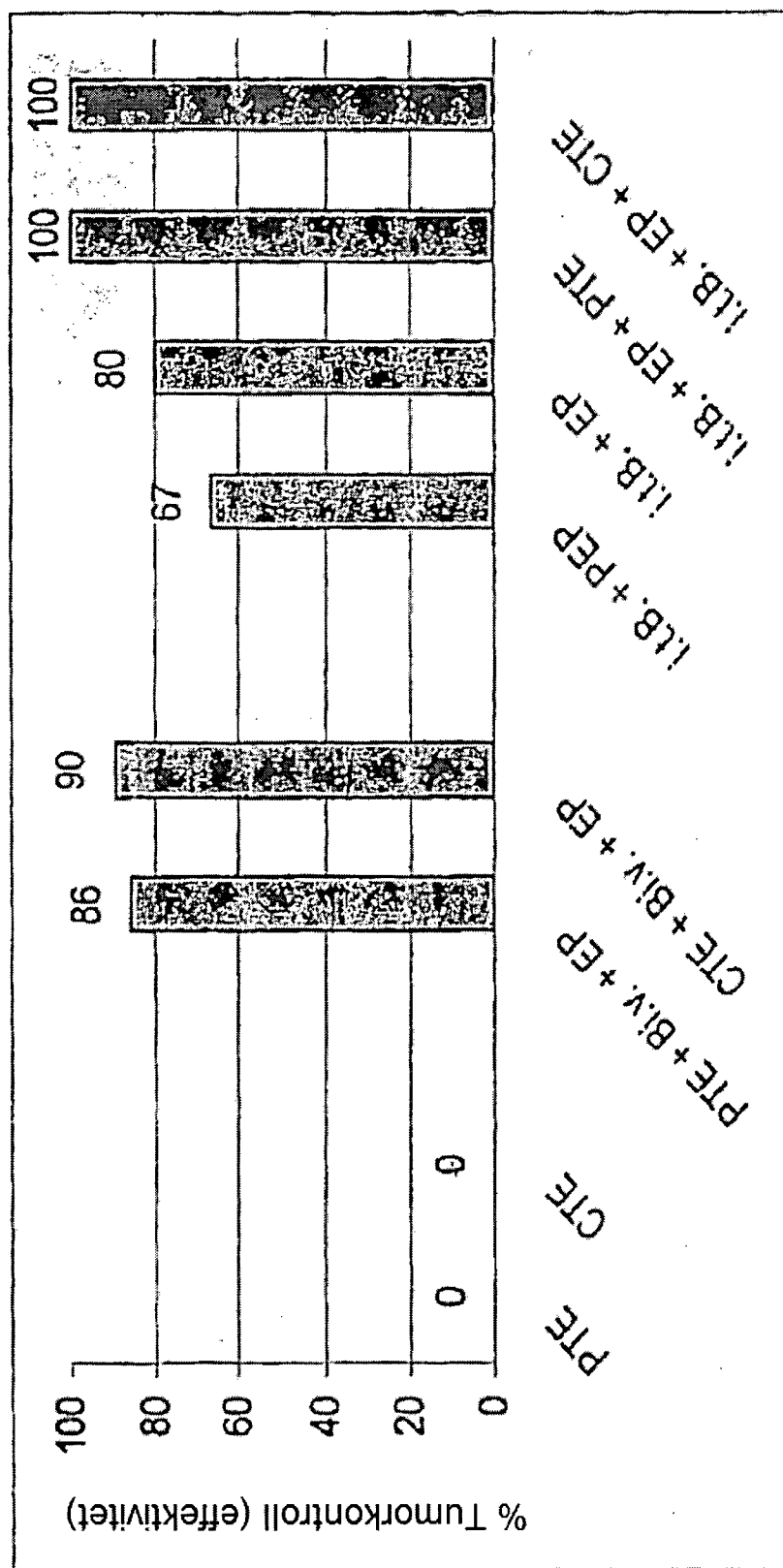


Fig. 14C

**Fig. 15**

**Fig. 15**