

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040433**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.01

(51) Int. Cl. *A61N 1/18* (2006.01)
A61N 1/32 (2006.01)

(21) Номер заявки
201990788

(22) Дата подачи заявки
2017.09.22

(54) СПОСОБ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ АДИПОЦИТОВ В АДИПОЗНОЙ ТКАНИ

(31) **62/398,932; 62/480,180**

(56) US-A1-20030149451
US-A1-20140277219
US-A1-20050182462
US-A1-20110190659
US-A1-20060293725
US-A1-20110112520

(32) **2016.09.23; 2017.03.31**

(33) **US**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/US2017/052970**

(87) **WO 2018/057900 2018.03.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНОВИО ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Фишер Пол, Бродерик Кейт, Маккой
Джей (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу электропорации адипоцитов в адипозном слое ткани, включающему обеспечение первого электрода, соединенного с дистальным концом первой планки, при этом первая планка соединена с рамой, где первый электрод имеет первую контактную поверхность, и при этом первая контактная поверхность имеет первый периметр; обеспечение второго электрода, соединенного с дистальным концом второй планки, при этом вторая планка соединена с рамой, где второй электрод имеет вторую контактную поверхность, и при этом вторая контактная поверхность имеет второй периметр; получение складки ткани; размещение складки ткани между первой контактной поверхностью и второй контактной поверхностью таким образом, чтобы неизолированная часть первой контактной поверхности находилась в контакте с первой стороной складки, а неизолированная часть второй контактной поверхности находилась в контакте со второй стороной складки, с образованием, таким образом, зоны обработки между неизолированными частями первой и второй контактных поверхностей, где неизолированные части расположены между дистальными концами соответствующих планок и изолированными частями, и при этом ткань, размещаемая в зоне обработки, включает адипозный слой ткани; инъекцию агента в адипозный слой; расположение агента в зоне обработки; и подачу электрического сигнала на первый электрод и второй электрод, где электрический сигнал включает один или несколько электрических импульсов, имеющих электрический потенциал, достаточный для электропорации адипоцитов в адипозном слое ткани, тем самым повышая проницаемость клеточных мембран адипоцитов для введения агента в адипоциты. Изобретение обеспечивает минимально инвазивную трансфекцию адипозной ткани *in vivo* посредством электропорации.

B1**040433****040433****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/398932, поданной 23 сентября 2016 г. под названием "Method and Device for Minimally Invasive In Vivo Transfection of Adipose Tissue Using Electroporation" ("Способ и устройство для минимально инвазивной трансфекции адипозной ткани in vivo посредством электропорации"), и 62/480180, поданной 31 марта 2017 г. под названием "Method and Device for Minimally Invasive In Vivo Transfection of Adipose Tissue Using Electroporation" ("Способ и устройство для минимально инвазивной трансфекции адипозной ткани in vivo посредством электропорации"), каждая из которых в полном объеме включена в данный документ.

Область техники

Это изобретение относится к способу и устройству для минимально инвазивной трансфекции адипозной ткани in vivo посредством электропорации.

Уровень техники

В 1970-е было сделано открытие, что электрические поля можно использовать для создания пор в клетках, не вызывая перманентное повреждение клетки. Это открытие сделало возможным введение крупных молекул, ионов и воды в цитоплазму клетки через клеточную стенку. В некоторых случаях электропорацию можно применять при местном лечении, например при лечении рака головы и шеи, для введения химических веществ и других соединений в опухоль. Во время этих процедур пациент может находиться или не находиться под общим наркозом, чтобы минимизировать боль и непроизвольные мышечные сокращения.

Скелетные мышцы являются хорошо изученной мишенью для опосредованной электропорацией (ЭП) доставки ДНК in vivo. Миоциты способны вырабатывать и секретировать белки в течение длительных периодов времени, и было неоднократно продемонстрировано, что ДНК-вакцинация в мышцы, усиленная ЭП, способна генерировать иммунный ответ. Кожа является другой популярной мишенью для ЭП; к ней легко получить доступ и она содержит большое количество разных иммунных клеток. Природная иммунная функция кожи и высокая скорость обновления клеток, как правило, приводят к быстрым, сильным гуморальным ответам на доставку ДНК, усиленную ЭП. Однако применения, связанные с ЭП-доставкой ДНК в мышцы, осложняются неравномерной толщиной подкожно-жировой клетчатки, что не позволяет применять подход "один размер для всех", так как разная толщина слоя подкожно-жировой клетчатки приводит к разной глубине проникновения иглы в мышечную ткань.

Исторически сложилось, что адипозную ткань рассматривали как инертную ткань, используемую главным образом для запасания энергии в форме липидных капель. Следовательно, ДНК-процедуры, усиленные ЭП, не были направлены на этот конкретный слой ткани. Однако последние исследования показали, что подкожно-жировая клетчатка в действительности выполняет много динамических ролей. Адипозная ткань содержит много стволовых клеток и иммунных клеток и функционирует как эндокринный орган, секретируя многочисленные гормоны, передает множество локальных сигналов и содержит развитую сеть капилляров. Любые попытки осуществления трансфекции адипозной ткани in vivo были ограничены хирургическими методами, которые требовали от исполнителя иссечения и физического удаления образцов кожи пациента для обеспечения контакта непосредственно с адипозной тканью. Эти варианты обработки являются в высшей степени инвазивными и не подходят для клинических устройств.

Сущность изобретения

Способ электропорации адипоцитов в адипозном слое ткани, включающий обеспечение первого электрода, соединенного с дистальным концом первой планки, при этом первая планка соединена с рамой, где первый электрод имеет первую контактную поверхность, и при этом первая контактная поверхность имеет первый периметр;

обеспечение второго электрода, соединенного с дистальным концом второй планки, при этом вторая планка соединена с рамой, где второй электрод имеет вторую контактную поверхность, и при этом вторая контактная поверхность имеет второй периметр;

получение складки ткани;

размещение складки ткани между первой контактной поверхностью и второй контактной поверхностью таким образом, чтобы неизолированная часть первой контактной поверхности находилась в контакте с первой стороной складки, а неизолированная часть второй контактной поверхности находилась в контакте со второй стороной складки, с образованием, таким образом, зоны обработки между неизолированными частями первой и второй контактных поверхностей, где неизолированные части расположены между дистальными концами соответствующих планок и изолированными частями, и при этом ткань, размещаемая в зоне обработки, включает адипозный слой ткани;

инъекцию агента в адипозный слой;

расположение агента в зоне обработки; и

подачу электрического сигнала на первый электрод и второй электрод, где электрический сигнал включает один или несколько электрических импульсов, имеющих электрический потенциал, достаточный для электропорации адипоцитов в адипозном слое ткани, тем самым повышая проницаемость клеточных мембран адипоцитов для введения агента в адипоциты.

В одном из вариантов осуществления изобретения складка ткани, размещаемая в зоне обработки, не

включает скелетные мышцы.

Согласно изобретению, получение складки ткани дополнительно включает получение кожного слоя, адипозного слоя и гладкомышечного слоя в складке ткани.

При этом инъекция включает инъекцию заданного количества агента в адипозный слой складки ткани перед подачей электрического сигнала на первый электрод и второй электрод.

Далее подача электрического импульса на первый электрод и второй электрод дополнительно включает

создание электрического поля в складке ткани;

концентрацию электрического поля в адипозном слое, тем самым создавая область трансфекции, которая имеет по существу сферическую или эллипсоидную форму в адипозном слое.

Согласно изобретению, подача одного или более электрических импульсов включает подачу одного или более электрических импульсов с потенциалом от 5 до 1000 В.

При этом подача одного или более электрических импульсов включает подачу каждого одного или более электрических импульсов длительностью приблизительно от 100 мкс до 100 мс.

Предпочтительно подача одного или более электрических импульсов включает подачу от 1 импульса до приблизительно 10 импульсов.

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна из первой контактной поверхности и второй контактной поверхности содержит множество выходящих из нее выступов.

При этом каждый выступ имеет по существу пирамидальную форму.

Электропорационное устройство для электропорации адипоцитов в адипозном слое ткани содержит раму, имеющую первую планку и вторую планку, исходящие из нее;

первый электрод, соединенный с дистальным концом первой рамы, при этом первый электрод имеет первую контактную поверхность, определяющую первый периметр;

второй электрод, соединенный с дистальным концом второй рамы, при этом второй электрод имеет вторую контактную поверхность, определяющую второй периметр, и

генератор сигналов, выполненный с возможностью подачи электропорационного сигнала на первый и второй электроды,

при этом первая контактная поверхность и вторая контактная поверхность обращены одна к другой и определяют зону обработки между ними для подачи электрического сигнала на складку ткани для повышения проницаемости клеточных мембран в складке ткани, где каждая из первой и второй контактных поверхностей имеет электрически изолированную часть и неизолированную часть, при этом неизолированная часть расположена между дистальным концом соответствующей планки и изолированной частью;

при этом первый и второй электроды выполнены так, чтобы зажимать складку ткани таким образом, чтобы размещаемая в зоне обработки ткань включала кожный слой, адипозный слой и гладкомышечный слой.

Предпочтительно электропорационное устройство по изобретению дополнительно содержит ручной аппликатор, который поддерживает раму, при этом ручной аппликатор содержит регулировочный механизм, соединенный с первой и второй планками, где регулировочный механизм выполнен таким образом, чтобы пользователь мог манипулировать расстоянием между первой и второй контактными поверхностями.

В одном из вариантов осуществления изобретения каждый из первого и второго электродов содержит слой изоляционного материала, который обеспечивает изолированную часть соответствующей первой и второй контактных поверхностей.

В дополнительном варианте осуществления изобретения электропорационное устройство дополнительно содержит первую и вторую оболочки, которые определяют соответствующие слои изоляционного материала, где первая и вторая оболочки присоединены к концевым частям первого и второго электродов.

В одном из вариантов осуществления изобретения электропорационное устройство дополнительно содержит третий электрод, имеющий третью контактную поверхность, выполненную с возможностью контакта со складкой ткани, при этом третий электрод расположен между первым и вторым электродами так, чтобы третий электрод не находился в непосредственном контакте с первым электродом или вторым электродом, при этом третья контактная поверхность выполнена с возможностью подачи электропорационного сигнала на складку ткани.

При этом третий электрод может представлять собой пластинчатый электрод, выполненный таким образом, чтобы третья контактная поверхность контактировала с верхней частью складки ткани.

Альтернативно третий электрод представляет собой игольчатый электрод, выполненный таким образом, чтобы проникать в складку ткани и проходить в адипозный слой.

Электропорационное устройство по изобретению может дополнительно содержать инъекционное устройство для инъекции предварительно отмеренного количества агента в жировую ткань, где инъекционное устройство содержит

резервуар, выполненный с возможностью содержания в нем заданного количества агента; и

иглу, где игла представляет собой инъекционную иглу, исходящую из резервуара и находящуюся с ним в жидкостном соединении, при этом игла выполнена с возможностью инъекции предварительно от-

меренного количества агента в адипозный слой.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 приведено схематическое изображение электропорационного устройства согласно настоящему изобретению.

На фиг. 2 приведен альтернативный вариант реализации электропорационного устройства.

На фиг. 3 приведен вид в разрезе, сделанном вдоль линии 3-3 с фиг. 2.

На фиг. 4 приведено перспективное изображение пластинчатого электрода.

На фиг. 5 приведено перспективное изображение альтернативного варианта реализации пластинчатого электрода.

На фиг. 6 приведена карта распределения электрического поля, иллюстрирующая применение пластинчатого электрода с фиг. 5 к складке ткани.

На фиг. 7 приведена карта распределения электрического поля, иллюстрирующая применение пластинчатого электрода с фиг. 4 к складке ткани.

На фиг. 8 приведено перспективное изображение схемы из двух пластинчатых электродов, применяемой к складке ткани.

На фиг. 9 приведено моделирование электрического поля схемы, проиллюстрированной на фиг. 8.

На фиг. 10 приведена карта плотности электрического тока для схемы, проиллюстрированной на фиг. 8.

На фиг. 11 приведено перспективное изображение схемы из трех электродов с иглой, применяемой к складке ткани.

На фиг. 12 приведено моделирование электрического поля схемы, проиллюстрированной на фиг. 11.

На фиг. 13 приведена карта плотности электрического тока для схемы, проиллюстрированной на фиг. 11.

На фиг. 14 приведено перспективное изображение схемы из трех пластинчатых электродов, применяемой к складке ткани.

На фиг. 15 приведено моделирование электрического поля схемы, проиллюстрированной на фиг. 14.

На фиг. 16 приведена карта плотности электрического тока для схемы, проиллюстрированной на фиг. 14.

Фиг. 17. Данные по жировой подушке морских свинок. Плазма: ЗФБ при 0,5 мг/мл, 250 мкл. Электрические параметры: 200 В, 3 импульса, длительность 100 мс, задержка 200 мс. Зеленые участки соответствуют клеткам, экспрессирующим ЗФБ. Толщина среза ткани составляет 100 мкм.

Фиг. 18 - фиг. 17 в большем увеличении.

Фиг. 19. Данные по адипозной ткани морских свинок. Отдельные адипоциты, экспрессирующие ЗФБ вокруг границы клеток, окружающей не экспрессирующую внутреннюю часть, в которой находятся липидные капли. Трансфицированы многочисленные отдельные клетки. Плазма: ЗФБ при 0,5 мг/мл, 250 мкл. Электрические параметры: 200 В, 3 импульса, длительность 100 мс, задержка 200 мс.

Фиг. 20. Данные по адипозной ткани кроликов. Зеленый цвет=экспрессия ЗФБ. Красный цвет=липид (краситель масляный красный О). Синий цвет=клеточные ядра (краситель DAPI). Плазма: ЗФБ при 0,5 мг/мл, 250 мкл. Электрические параметры: 200 В, 3 импульса, длительность 100 мс, задержка 200 мс.

Фиг. 21. Конфокальные изображения адипозной ткани морских свинок. Многие клеточные ядра не связаны ни с одним из трансфицированных участков. ЗФБ экспрессируется со всех сторон клетки. Плазма: ЗФБ при 0,5 мг/мл, 250 мкл. Электрические параметры: 200 В, 3 импульса, длительность 100 мс, задержка 200 мс.

Фиг. 22. Трансфицированная площадь существенно не меняется при объеме инъекции приблизительно от 50 до 200 мкл. Плазма: красный флуоресцентный белок (КФБ) при 0,5 мг/мл, 250 мкл. Электрические параметры: 200 В, 3 импульса, длительность 100 мс, задержка 200 мс.

Фиг. 23. Многократные инъекции с последующим однократным актом электропорации. Четко виден каждый участок инъекции. Цифры указывают порядок проведения инъекции. Плазма: ЗФБ при 0,5 мг/мл, 250 мкл. Электрические параметры: 200 В, 3 импульса, длительность 100 мс, задержка 200 мс.

Фиг. 24. При варьировании интенсивности и числа импульсов можно получать более яркий сигнал ЗФБ (больше трансфицированных клеток). Плазма: ЗФБ при 0,5 мг/мл, 250 мкл. Электрические параметры: 200 В, 3 импульса, длительность 100 мс, задержка 200 мс.

Фиг. 25. Доставка dMAb в адипозную ткань посредством ЭП. Предварительная обработка гиалуронидазой за 2 ч до ЭП ДНК. Плазма=rGX9249. Стелками указаны первая и вторая обработка соответственно. По оси X отложены сутки от последней обработки. Обработка 1:1 мг общей ДНК, 200 В, 3 импульса, длительность 100 мс. Обработка 2:2 мг общей ДНК, 75 В, 8 импульсов, длительность 100 мс.

Фиг. 26. Такое же исследование, что и на фиг. 25, иллюстрирующее концентрацию dMAb для отдельных морских свинок. К животным, выделенным красным, применяли быстрые импульсы (задержка 100 мс) вместо импульсов с задержкой 1 с.

Фиг. 27. Инсулиновая игла и безыгольный шприц -распределение жидкости в адипозной ткани. Краситель=метиленовый голубой. Без ЭП.

Фиг. 28. Ферментативное расщепление адипозной ткани (предварительно обработанной ферментом) улучшает распределение жидкости. Краситель=метиленовый голубой.

Фиг. 29 и 30. Оптимизация ЭП. Графики изменения сопротивления (фиг. 29) и тока (фиг. 30) при увеличении числа импульсов. Также следует отметить изменчивость при обработке 100 В вследствие мышечных судорог. Длительность импульса=100 мс. Задержка импульса=100 мс.

Фиг. 31. Сравнение иммуногенности. Электропорация ДНК в адипозную ткань и кожу на боку. Параметры: напряжение и объем обработки.

Фиг. 32. 3D-компьютерная модель системы ткань-электрод. Неинвазивная ЭП со складкой ткани между двумя пластинчатыми электродами.

Фиг. 33. 3D-компьютерная модель другой системы ткань-электрод. Инвазивная ЭП с применением параллельных игольчатых электродов, вставляемых непосредственно в ткань.

Фиг. 34. Смоделированное распределение электрического поля в разных типах тканей для игольчатой (вверху) и пластинчатой (внизу) конфигураций электродов с применением напряжения возбуждения 200 В. Гистограммы (слева направо: адипозная ткань, мышцы, кожа) иллюстрируют количественную оценку распределения электрического поля в каждом типе ткани для электрических полей более 50 В/см. На изображении справа показано распределение электрического поля, используемое в количественном анализе, с указанием границ и подписями для кожи (К), адипозной ткани (А) и мышц (М). Каждый сегмент масштабной метки (белый или черный) имеет длину 10 мм, а общая длина масштабной метки составляет 20 мм.

Фиг. 35. Инъекция красителя в подкожную жировую подушку морских свинок. А. Неповрежденная жировая подушка после однократной 100 мкл инъекции. В. Участок однократной инъекции, разрезанный вдоль сагиттальной плоскости, чтобы показать распределение жидкости в ткани. С. Неповрежденная жировая подушка после пяти 50 мкл инъекций. Стрелками указаны места инъекций.

Фиг. 36. Процедура ЭП адипозной ткани, где показано следующее.

А. Выбранная межлопаточная область перед применением электродов.

В. Участок обработки, зажатый между двумя неинвазивными пластинчатыми электродами.

С. Вид сзади на зажатый участок обработки.

Фиг. 37. Вверху: распределение экспрессии репортерной ЗФБ-конструкции (зеленый цвет) в неповрежденных жировых подушках морских свинок после неинвазивной ЭП адипозной ткани в диапазоне от 50 до 200 В.

Внизу: Сравнение флуоресцентного сигнала в участке обработки для морских свинок, которые получали инъекцию плазмидной ДНК без ЭП (слева) или посредством 200 В ЭП адипозной ткани (справа). Маркерами указаны коллагеновые септы (*), ЗФБ-экспрессирующие адипоциты (наконечники стрелок) и области высокой аутофлуоресценции (стрелки). Масштабные метки соответствуют 10 мм (вверху) или 100 мкм (внизу).

Фиг. 38. Неповрежденную жировую подушку морских свинок после ЭП адипозной ткани при 200 В (слева) использовали для дополнительного гистологического анализа, при этом пунктирной линией обозначена плоскость среза. (Справа.) Срез с левой стороны делали вдоль пунктирной линии, получая гистологические срезы толщиной 100 мкм. На ЗФБ (зеленый цвет) накладывается яркое цветное изображение неокрашенной ткани. Масштабные метки соответствуют 10 мм (слева) и 1 мм (справа).

Фиг. 39. Конфокальное изображение, иллюстрирующее экспрессию ЗФБ (зеленый цвет) и ядра (синий цвет) в одной фокальной плоскости (средняя колонка) и в двух разных 3D перспективах (две правые колонки).

Фиг. 40. Кинетика генной экспрессии и гистологические изменения после ЭП адипозной ткани при 200 В. Масштабные метки для экспрессии ЗФБ (вверху) соответствуют 10 мм, а масштабные метки для окрашенных Н&Е (окраска гематоксилином и эозином) срезов (внизу) соответствуют 200 мкм.

Фиг. 41 и 42. Ответ антител морских свинок на ЭП адипозной ткани и интрадермальную (ИД)-ЭП вакцинацию плазмидной ДНК, кодирующей антиген гриппа. Морских свинок вакцинировали на 0 неделе, 3 неделе, 6 неделе и 21 неделе 25 мкг плазмиды.

Фиг. 41. Кинетика гуморальной иммуногенности для разных методов ЭП-обработки адипозной ткани морских свинок с ИД-ЭП (кожа) для сравнения (n=4).

Фиг. 42. Те же данные по иммуногенности, сгруппированные по значению ЭП-напряжения (n=8 для адипозной ткани при ВН и адипозной ткани при НН, n=4 для кожи). Данные представлены в виде средних геометрических значений титров $\pm$ стандартная погрешность. Параметры ЭП-обработки адипозной ткани обозначены как ВН=высокое напряжение (200 В), НН=низкое напряжение (50 В), а в случае графика на фиг. 41 число участков инъекции ДНК указано цифрой (1 или 5).

Фиг. 43. Т-клеточный иммунный ответ морских свинок на ЭП адипозной ткани и ИД-ЭП вакцинацию плазмидной ДНК, кодирующей антиген гриппа. Морских свинок вакцинировали на 0 неделе, 3 неделе, 6 неделе и 21 неделе 25 мкг плазмиды, а через 18 суток после конечной вакцинации проводили анализ ELISPOT. Приведены результаты для пептидного пула 1. Группы обработки разделены по участку ЭП (кожа или адипозная ткань), а варианты ЭП-обработки адипозной ткани дополнительно разделены по напряжению (ВН=200 В, НН=50 В) и числу участков инъекции плазмиды (1 или 5). Данные представле-

ны в виде средних геометрических значений $\pm$ стандартная погрешность ($n=4$).

На фиг. 44 приведено перспективное изображение альтернативного варианта реализации пластинчатых электродов, соединенных с электропорационным устройством.

На фиг. 45 приведено изображение электропорационного устройства с фиг. 44, применяемого на испытуемом субъекте.

Фиг. 46-48. Все электрические данные, в частности данные по току (фиг. 46), данные по напряжению (фиг. 47) и данные по сопротивлению (фиг. 48), усреднены по применению как изолированного, так и неизолированного штангенциркуля на четырех морских свинках.

Подробное описание иллюстративных вариантов реализации

Авторы изобретения разработали электропорационное устройство и способ для нацеливания на и трансфекции адипозного слоя ткани *in vivo* минимально инвазивным образом. В частности, при обработке используется множество пластинчатых электродов в сочетании с инъекционным механизмом для обработки участка ткани некоторым объемом агента, который может быть предварительно отмерен, затем создания электрического поля в этом участке ткани с возможностью нацеливания на адипозный слой, обеспечивая электропорацию соответствующих адипоцитов.

1) Определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области техники. В случае противоречия приоритет имеет настоящий документ, включая определения. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы на практике или при проверке настоящего изобретения. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упоминаемые в данном документе, в полном объеме включены посредством ссылки. Описанные в данном документе материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не подразумевают ограничения.

В контексте данного документа подразумевается, что термины "содержит(ат)", "включает(ют)", "имеющий", "имеет", "может" и их варианты являются открытыми переходными фразами, терминами или словами, которые не исключают возможности наличия дополнительных действий или структур. Формы единственного числа включают отсылки к множественному числу, если иное четко не следует из контекста. В настоящем изобретении также предусмотрены другие варианты реализации, "содержащие", "состоящие из" и "состоящие преимущественно из" представленных в данном документе вариантов реализации или элементов, приведенных явным образом или нет.

В контексте данного документа термин "около", применяемый к одному или более представляющим интерес значениям, относится к значению, сходному с указанным эталонным значением. В определенных аспектах термин "около" относится к диапазону значений, который находится в пределах 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее в любом направлении (больше или меньше) от указанного эталонного значения, если не указано иное или если иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% возможного значения).

"Агент" может означать полипептид, полинуклеотид, малую молекулу или любую их комбинацию. Агент может представлять собой последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию, как подробно описано в PCT/US 2014/070188, которая включена в данный документ посредством ссылки. "Агент" может означать композицию, содержащую полипептид, полинуклеотид, малую молекулу или любую их комбинацию. Композиция может содержать последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию, как подробно описано в PCT/US 2014/070188, которая включена в данный документ посредством ссылки. Агент может быть приготовлен, например, в воде или буфере. Буфер может представлять собой, например, раствор цитрата и хлорида натрия (SSC) или фосфатно-буферный солевой раствор (ФСБ). Ионное содержимое буферов может повышать проводимость, приводя к увеличению тока в ткани-мишени. Концентрация приготовленного полинуклеотида может составлять от 1 мкг до 20 мг/мл. Концентрация приготовленного полинуклеотида может составлять, например, 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 мкг/мл; 1, 10, 15 или 20 мг/мл.

"Антитело" может означать антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, или его фрагменты, или производные, включая Fab, F(ab')₂, Fd и одноцепочечные антитела и их производные. Антитело может представлять собой антитело, выделенное из образца сыворотки млекопитающего, поликлональное антитело, прошедшее аффинную очистку антитело или их смеси, которые проявляют достаточную специфичность связывания с необходимым эпитопом или полученной из него последовательностью. Антитело может представлять собой синтетическое антитело, описанное в данном документе.

В контексте данного документа "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела, содержащей антигенсвязывающий участок или варибельную область. Эта часть не содержит константные домены тяжелой цепи (т.е. CH2, CH3 или CH4 в зависимости от изотипа антитела) Fc-области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются этим, фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты Fab'-SH, фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fd, фрагменты Fv, диатела, одноцепочечные молекулы Fv (scFv), одноцепочечные полипептиды, содержащие только один варибельный домен

легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR переменного домена легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну переменную область тяжелой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR переменной области тяжелой цепи.

В контексте данного документа "фрагмент" означает последовательность нуклеиновой кислоты или ее часть, которая кодирует полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего. Фрагменты могут представлять собой фрагменты ДНК, выбранные по меньшей мере из одной из различных нуклеотидных последовательностей, которые кодируют приведенные ниже белковые фрагменты. "Фрагмент" также может относиться к полипептидной последовательности или ее части, которая способна вызывать иммунный ответ у млекопитающего.

В контексте данного документа "пептид", "белок" или "полипептид" могут означать связанную последовательность аминокислот и могут быть природными, синтетическими или модификацией или комбинацией природных и синтетических.

В контексте данного документа "полинуклеотид", или "олигонуклеотид", или "нуклеиновая кислота" означает по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанные вместе. Полинуклеотид может быть одноцепочечным или двухцепочечным или может содержать части как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. Полинуклеотид может представлять собой ДНК, как геномную, так и кДНК, РНК или гибрид. Полинуклеотид может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов и комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин, изогуанин и синтетические или неприродные нуклеотиды и нуклеозиды. Полинуклеотиды могут быть получены методами химического синтеза или рекомбинантными методами.

В контексте данного документа "субъект" может означать млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой человека, шимпанзе, морскую свинку, свинью, макака, собаку, кошку, лошадь, корову, мышь, крысу или другого отличного от человека примата.

В контексте данного документа термин "вариант", используемый в отношении нуклеиновой кислоты, означает (i) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (ii) последовательность, комплементарную указанной нуклеотидной последовательности, или ее часть; (iii) нуклеиновую кислоту, которая является по существу идентичной указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементарной последовательности; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в жестких условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементарной последовательностью или последовательностями, по существу идентичными им.

"Вариант" может быть дополнительно определен как пептид или полипептид, который отличается по аминокислотной последовательности за счет вставки, делеции или консервативной замены аминокислот, но сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Типовые примеры "биологической активности" включают способность связываться специфическим антителом или стимулировать иммунный ответ. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая является по существу идентичной указанному белку с аминокислотной последовательностью, который сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Консервативные замены аминокислот, т.е. замещение аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей), известны в данной области техники как включающие, как правило, незначительные изменения. Эти незначительные изменения можно частично определить на основании индекса гидропатичности аминокислот, как известно в данной области техники (Kyte et al., J. Mol. Biol. 1982, 157, 105-132). Индекс гидропатичности аминокислоты основан на оценке ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты с аналогичными индексами гидропатичности можно взаимно заменять с сохранением функции белка. В одном аспекте проводят замену аминокислот, имеющих индекс гидропатичности ± 2 . Гидрофильность аминокислот также можно использовать для определения замен, которые привели бы к получению белков, сохраняющих биологическую функцию. Оценка гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитывать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, что является полезным показателем, который, как сообщалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Замена аминокислот, имеющих аналогичные значения гидрофильности, может приводить к получению пептидов, сохраняющих биологическую активность, например иммуногенность, как известно в данной области техники. Замены можно проводить с аминокислотами, имеющими значения гидрофильности в пределах ± 2 относительно друг друга. Как на индекс гидрофобности, так и на значение гидрофильности аминокислот влияет конкретный тип боковой цепи этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением понятно, что аминокислотные замены, совместимые с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот, и в частности боковых цепей этих аминокислот, что проявляется в гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и других свойствах.

Вариант может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по существу идентичной на протяжении всей длины последовательности всего гена или ее части. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной на протяжении всей длины последовательности гена или ее части.

Вариант может представлять собой аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной на протяжении всей длины аминокислотной последовательности или ее части. Аминокислотная последовательность может быть на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной на протяжении всей длины аминокислотной последовательности или ее части.

В контексте данного документа "вектор" означает последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может представлять собой вирусный вектор, бактериофаг, бактериальную искусственную хромосому или дрожжевую искусственную хромосому. Вектор может представлять собой ДНК-или РНК-вектор. Вектор может представлять собой самореплицирующийся внехромосомный вектор и предпочтительно является плазмидой ДНК.

В случае перечисления в данном документе числовых диапазонов явным образом и с той же степенью точности подразумевается и каждое промежуточное число. Например, в случае диапазона 6-9, кроме чисел 6 и 9, подразумеваются числа 7 и 8, а в случае диапазона 6,0-7,0 явным образом подразумеваются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

II) Электропорационное устройство.

Данное изобретение относится к электропорационному устройству, включающему в себя аппликационное устройство, содержащее множество неинвазивных пластинчатых электродов. Электропорационное устройство также может содержать блок питания, подающий электропорационный сигнал на пластинчатые электроды, при этом, когда электроды находятся в электрическом контакте с биологическим образцом, электропорационный сигнал, подаваемый на электроды, поглощается, главным образом, адипозным слоем ткани с созданием электрического поля в целевом адипозном слое. Это электрическое поле вызывает электропорацию клеточных стенок соответствующих адипоцитов, тем самым повышая проницаемость клеточных мембран и обеспечивая возможность, например, введения в клетки агента. Как проиллюстрировано на фиг. 1, электропорационное устройство 10 согласно настоящему изобретению содержит корпус 14, содержащий генератор 18 электропорационного (ЭП) сигнала, съемный аппликатор 22, соединенный с корпусом 14, инъекционное устройство 26 для инъекции заданного объема агента, такого как липиды, в адипозный слой образца перед электропорацией.

Как показано на фиг. 1, ручной аппликатор 22 согласно настоящему изобретению содержит раму 30, первый электрод 34, соединенный с рамой 30, при этом первый электрод 34 имеет первую контактную поверхность 38, и второй электрод 42, соединенный с рамой 30, при этом второй электрод 42 имеет вторую контактную поверхность 46 таким образом, что первая контактная поверхность 38 и вторая контактная поверхность 46 обращены друг к другу и практически выровнены. Во время применения аппликатора 22 выполнен таким образом, чтобы пользователь мог манипулировать рамой 30, изменяя расстояние между первой контактной поверхностью 38 и второй контактной поверхностью 46. В контексте этого описания расстояние между первой контактной поверхностью 38 и второй контактной поверхностью 46 называется в данном документе "электродным расстоянием 50".

Рама 30 аппликатора 22 содержит основание 54 и множество упругих планок 58, каждая из которых исходит из основания 54, образуя соответствующий дистальный конец 62. В собранном состоянии каждый дистальный конец 62 выполнен с возможностью крепления к нему соответствующего одного из первого и второго электродов 34, 42. В проиллюстрированном варианте реализации планки 58 выполнены так, чтобы пользователь мог осуществлять упругую деформацию планок 58, позволяя перемещаться дистальным концам 62 и их соответствующим электродам 34, 42. Соответствующие электроды 34, 42 могут перемещаться, например, независимо относительно друг друга или в тандеме. В проиллюстрированном варианте реализации рама 30 содержит две планки 58 (фиг. 1); однако в альтернативных вариантах реализации рама 30 может содержать больше или меньше планок 58 для поддержания того количества электродов, которое нужно для обработки необходимой целевой ткани.

Как проиллюстрировано на фиг. 2, альтернативный вариант реализации аппликатора 22' содержит раму 30', имеющую три планки 58a', 58b', 58c', исходящие из нее. В частности, рама 30' содержит две противоположные планки 58a', 58b', выполненные с возможностью поддержания первого и второго электродов 34, 42 так, чтобы первая контактная поверхность 38 и вторая контактная поверхность 46 были практически выровнены друг с другом. Рама 30' также содержит третью планку 58c', выполненную с возможностью поддержания третьего электрода 66' так, чтобы третья контактная поверхность 68' третьего электрода 66' размещалась перпендикулярно первой и второй контактным поверхностям 38', 46'. В альтернативном варианте аппликатора 22' электродное расстояние 50' определяется как расстояние между первой контактной поверхностью 38' и второй контактной поверхностью 46' (т.е. расстояние между двумя контактными поверхностями, обращенными друг к другу).

Аппликатор 22 также содержит регулировочный механизм 56 для фиксации или в противоположном случае изменения электродного расстояния 50 при подготовке к обработке и во время нее. Регулировочный механизм 56 содержит стержень 70, проходящий между и находящийся в резьбовом соединении с обеими планками 58 рамы 30, так, что вращение стержня 70 по отношению к планкам 58 в первом направлении приводит к сужению электродного расстояния 50. И наоборот, вращение стержня 70 по отношению к планкам 58 во втором направлении, противоположном первому направлению, приводит к увеличению электродного расстояния 50. В проиллюстрированном варианте реализации стержень 70 вы-

полнен так, чтобы электродное расстояние 50 оставалось фиксированным, если стержень 70 не вращается пользователем (т.е. резьба не может вращаться в обратном направлении). В альтернативных вариантах реализации регулировочный механизм 56 может содержать защелку (не показана), которая может находиться в разомкнутой конфигурации, когда электродное расстояние 50 регулируется пользователем, и в замкнутой конфигурации, когда электродное расстояние 50 фиксировано. В других вариантах реализации регулировочный механизм 56 может включать любую форму регулировочного механизма, известную в данной области техники и не описанную в данном документе.

Аппликатор 22 также может содержать датчик 74, функционально соединенный с генератором 18 сигналов и выполненный с возможностью определения электродного расстояния 50 во время работы устройства 10. Во время применения датчик 74 посылает сигналы с указанием текущего электродного расстояния 50 на генератор 18 сигналов. В некоторых вариантах реализации датчик 74 может включать датчик сопротивления, оптический датчик и т.п., соединенный с рамой 30 аппликатора 22. В проиллюстрированном варианте реализации датчик 74 подает сигналы на генератор 18 сигналов, что позволяет генератору 18 записывать данные электродного расстояния 50 и автоматически компенсировать разницу в электродном расстоянии 50 во время обработки. В альтернативных вариантах реализации датчик 74 может выводить данные по расстоянию на дисплей (не показан), что позволяет пользователю вручную компенсировать электродное расстояние 50. В других вариантах реализации аппликатор 22 может быть выполнен так, чтобы пользователь мог вводить заданное электродное расстояние 50 в генератор 18 сигналов, после чего аппликатор 22 будет автоматически регулировать электроды 34, 42, чтобы получить необходимое электродное расстояние 50. В других вариантах реализации датчик может быть механическим, а электродное расстояние 50 будет определяться по шкале, и т.д.

Как проиллюстрировано на фиг. 4, первый пластинчатый электрод 34 аппликатора 22 имеет первую контактную поверхность 38, выполненную с возможностью прямого контакта с целевой тканью. Первый пластинчатый электрод 34 может иметь любую форму. Это может быть, например, прямоугольная форма. Первый пластинчатый электрод 34 также имеет первый периметр 78, проходящий вокруг и определяющий размер контактной поверхности 38. Во время применения первый пластинчатый электрод 34 находится в функциональном соединении с генератором 18 сигналов и выполнен с возможностью вхождения в контакт и создания электропроводности с образцом ткани во время обработки. Таким образом, пластинчатый электрод 34 способен подавать электропорационные сигналы, создаваемые генератором 18 сигналов, на целевую ткань. Пластинчатый электрод 34 также способен регистрировать параметры в целевой ткани, такие как импеданс, напряжение, ток и т.п., и передавать эту информацию назад на генератор 18 сигналов для диагностики и обратной связи. В проиллюстрированном варианте реализации первая контактная поверхность 38 первого пластинчатого электрода 34 является по существу плоской; однако в альтернативных вариантах реализации первая контактная поверхность 38 может иметь криволинейный контур. В других вариантах реализации первая контактная поверхность 38 может иметь любую форму или размер, направленные на максимизацию находящейся в контакте площади поверхности между электродом 34 и целевой тканью. В других вариантах реализации аппликатор может содержать множество электродов 34, каждый из которых содержит первую контактную поверхность 38, имеющую специально подобранные размер и форму, чтобы соответствовать конкретному участку на теле пациента или исследуемого субъекта. В других вариантах реализации размер и форму электродов можно использовать для фокусирования распределения электрического поля в целевом образце. В других вариантах реализации первая контактная поверхность 38 может содержать сформированные на ней узор или насечку. В других вариантах реализации на первую контактную поверхность 38 может быть нанесено покрытие или клейкое вещество для улучшения проводимости или сцепления между электродом 34 и целевой тканью.

Фиг. 5 и 6 проиллюстрирован альтернативный вариант реализации пластинчатого электрода 34". Пластинчатый электрод 34" является по существу аналогичным описанному выше пластинчатому электроду 34 и функционирует таким же образом. Поэтому в данном документе подробно будут описаны только различия между двумя электродами 34", 34. Как наилучшим образом проиллюстрировано на фиг. 5, контактная поверхность 38" пластинчатого электрода 34" содержит основание 54" и множество выступов 58", каждый из которых проходит по существу нормально относительно основания 54", создавая глубину выступания 64", с образованием дистального конца 62". Во время применения выступы 58" пластинчатого электрода 34" вдавливаются в целевую ткань, не прокалывая ее, что позволяет выступам 58" повреждать и изменять верхний слой кожи, улучшая распределение электрического поля в целевой ткани (сравните фиг. 6 и фиг. 7) и также улучшая сцепление. В частности, выступы 58" увеличивают амплитуду электрического поля, создаваемого в целевой ткани при заданном входном напряжении. Хотя все выступы 58" в проиллюстрированном варианте реализации создают одинаковую глубину выступания 64", понятно, что каждый выступ 58" может иметь свой размер, необходимый для обеспечения желаемой проводимости и сцепления с целевой тканью. Дополнительно проиллюстрированный вариант реализации включает глубину выступания 64", составляющую приблизительно 500, 600, 700, 800, 900 мкм, 1, 1,5, 2, 2,5 и 3 мм.

В проиллюстрированном варианте реализации каждый выступ 58" электрода 34" имеет по существу пирамидальную форму. Каждый пирамидальный выступ может иметь основание размером прибли-

тельно 500/500 мкм, 600/600 мкм, 700/700 мкм, 800/800 мкм, 900/900 мкм, 1/1 мм, 1,5/1,5 мм, 2/2 мм, 2,5/2,5 мм, 3/3 мм. В альтернативных вариантах реализации каждый пирамидальный выступ также может иметь не квадратное основание. В альтернативных вариантах реализации каждый пирамидальный выступ 58" может иметь другие формы и быть выполнен с возможностью деформировать целевую ткань, не прокалывая целевую ткань, во время работы. Например, выступы 58" могут иметь цилиндрическую, прямоугольную, коническую, усеченно-коническую или усеченно-пирамидальную форму. Кроме того, каждый выступ 58" может иметь ширину, например, приблизительно 500, 600, 700, 800, 900 мкм, 1, 1,5, 2, 2,5 или 3 мм.

В дополнительных вариантах реализации каждый выступ 58" может быть выполнен с возможностью прокалывания целевой ткани. Например, такие выступы 58" могут содержать иглу (не показана), исходящую из основания 54". В других вариантах реализации такие выступы 58" могут быть выполнены в форме гиподермической иглы, троакарной иглы и т.п. В других вариантах реализации такие выступы 58" могут иметь тупой конец или плоский конец. В других вариантах реализации каждый выступ 58" может иметь форму, отличную от других выступов 58" на том же электроде.

Как проиллюстрировано на фиг. 5, выступы 58" электрода 34" равномерно расположены на основании 58" пластинчатого электрода 34" в форме прямоугольной матрицы. В альтернативных вариантах реализации выступы 58" могут располагаться согласно любой схеме, необходимой для обеспечения необходимой проводимости и сцепления с целевой тканью. Например, выступы 58" могут располагаться концентрическими кольцами (не показаны) или согласно другой схеме.

Фиг. 44 и 45 проиллюстрирован альтернативный вариант реализации пластинчатого электрода 34". Пластинчатый электрод 34" является по существу аналогичным описанному выше пластинчатому электроду 34 и функционирует таким же образом. Поэтому в данном документе подробно будут описаны только различия между двумя электродами 34", 34. Как наилучшим образом проиллюстрировано на фиг. 44, контактная поверхность 38" пластинчатого электрода 34" содержит одну или более неизолированных частей 500, при этом контактная поверхность 38" создает первое сопротивление с целевой тканью, когда находится в контакте с ней, и одну или более изолированных частей 504, при этом контактная поверхность 38" создает второе сопротивление с целевой тканью, когда находится в контакте с ней, которое больше, чем первое сопротивление. Во время применения взаимодействие неизолированных и изолированных частей 500", 504" контактной поверхности 38" с целевой тканью влияет на полученное электрическое поле, прикладываемое к целевой ткани. В частности, за счет изоляции по меньшей мере части контактной поверхности 38" электрода 34" электрод 34" лучше фокусирует электрическое поле между адипозным слоем целевой ткани, тем самым снижая объем мышечных судорог и боль, испытываемую пациентом. Иными словами, альтернативный вариант пластинчатого электрода 34" снижает количество тока, проходящего через мышцы, по сравнению с пластинчатым электродом такой же формы и размера, который не имеет изолированной части (смотрите фиг. 46-48; где показана разница между "изолированным штангенциркулем", в котором присутствует по меньшей мере одна изолированная часть 504", и не-изолированным штангенциркулем, в котором отсутствует изолированная часть 504").

Как проиллюстрировано на фиг. 44 и 45, изолированная часть 504" пластинчатого электрода 34" содержит слой изоляционного материала 508", расположенный между контактной поверхностью 38" и целевой тканью для повышения сопротивления между ними (см. фиг. 45). В проиллюстрированном варианте реализации электрод 34" содержит оболочку 512", выполненную из изоляционного материала 508", которую можно съемным образом размещать поверх по меньшей мере части электрода 34". В зависимости от размера и формы оболочки 512" можно осуществлять покрытие изоляционным материалом 508" контактных поверхностей 38" разных размеров и форм. В других вариантах реализации изоляционный материал 508" можно наносить на контактную поверхность 38" электрода 34" (например, в виде покрытия). В других вариантах реализации изоляционный материал 508" можно наносить на контактную поверхность 38" с помощью удаляемого клея (не показано).

Второй пластинчатый электрод 42 является по существу аналогичным первому пластинчатому электроду 34 и функционирует таким же образом. Второй пластинчатый электрод 42 содержит вторую контактную поверхность 46, имеющую второй периметр 60, определяющий размер второй контактной поверхности 46. Поэтому подробное описание второго пластинчатого электрода 42 будет опущено в данном документе. Хотя в проиллюстрированном варианте реализации показано, что второй пластинчатый электрод 42 имеет такие же размер и форму, что и первый электрод 34, понятно, что второй электрод 42 может отличаться по размеру и форме от первого электрода 34. Кроме того, вторая контактная поверхность 46 второго электрода 42 может иметь размер и форму, отличные от первой контактной поверхности 38 первого электрода 34. В других вариантах реализации один пластинчатый электрод может содержать выступы 58", тогда как другой электрод может не содержать их. Кроме того, один пластинчатый электрод может содержать изолированную часть 504", тогда как другой электрод может не содержать ее.

Как проиллюстрировано на фиг. 1, устройство 10 может дополнительно содержать инъекционное устройство 26 для инъекции агента в целевую ткань в необходимом месте. В частности, инъекционное устройство 26 содержит резервуар 82, выполненный с возможностью содержания в нем заданного объема агента, инъекционную иглу 86, исходящую из резервуара 82 и находящуюся с ним в жидкостном со-

единении с образованием дистального конца 90. Во время применения пользователь вставляет инъекционную иглу 86 в целевую ткань так, чтобы дистальный конец 90 располагался на необходимой глубине (т.е. в адипозном слое 104; см. фиг. 11). Затем пользователь может инъектировать жидкость, содержащуюся в резервуаре 82, через иглу 86, из дистального конца 90 в необходимую ткань. Хотя проиллюстрированное инъекционное устройство 26 содержит гиподермическую иглу (т.е. инсулиновую иглу), понятно, что в альтернативных вариантах реализации можно использовать безыгольный шприц или другие формы инъекции.

Кроме того, в некоторых вариантах реализации игла 86 инъекционного устройства 26 может находиться в функциональном соединении с генератором 18 сигналов и может служить в качестве электрода аналогично с первым и вторым пластинчатыми электродами 34, 42 (см. фиг. 1). В таких вариантах реализации генератор 18 сигналов может как посылать сигнал обработки на иглу 86, так и получать информацию, такую как импеданс, ток и т.п., обратно на генератор 18 сигналов в целях диагностики и обратной связи.

Инъекционное устройство 26 также может содержать ограничитель глубины (не показан), чтобы регулировать положение дистального конца 90 в образце ткани. Во время применения ограничитель глубины может быть установлен на заданную глубину так, чтобы ограничитель глубины предотвращал проникновение дистального конца 90 иглы 86 за пределы необходимой глубины в ткани. В некоторых вариантах реализации ограничитель глубины может содержать жесткий фиксатор, определяющий направляющее отверстие. В таких вариантах реализации длина направляющего отверстия определяет глубину, на которую игла проникает в целевую ткань. В других вариантах реализации ограничитель глубины может также содержать электрический соединитель для электрического соединения иглы 86 и импульсным генератором 18.

III) Обработка адипозного слоя.

Вышеописанное устройство можно использовать в различных терапевтических способах, предназначенных для трансфекции адипозной ткани агентом посредством электропорации. Каждый вариант обработки или "схема" обеспечивает гибкость в отношении размера, формы и характеристик полученного электрического поля, создаваемого в образце ткани. Каждая схема также обеспечивает различные уровни инвазивности.

а) Двухэлектродная схема.

Для применения обработки посредством двухэлектродной схемы обработки пользователь сначала получает пациента с учетом участка или области, которые они хотят обработать (далее по тексту "область ткани 100"). В контексте этого описания область ткани 100 может включать ткань кожи, содержащую, например, один или более из кожного слоя 104, адипозного слоя 108 и гладкомышечного слоя 112.

Кожный слой.

Кожный слой может включать две части: внешнюю часть эпидермиса и часть дермы, с которой эпидермис может быть соединен. Под дермой может находиться подкожный слой, который может содержать ареоллярную и адипозную ткани. Волокна дермы могут проходить вниз в подкожный слой и соединять подкожный слой с кожным слоем. Подкожный слой может быть соединен с подлежащими тканями и органами.

Эпидермис.

Эпидермис может состоять из многослойного плоского эпителия и содержать кератиноциты, меланоциты и не пигментированные гранулярные дендроциты (например, клетки Лангерганса и клетки Гринштейна). Кератиноциты могут быть упорядочены в несколько слоев. Число слоев может зависеть от месторасположения на теле. Например там, где существует большая подверженность трению, эпидермис может иметь много слоев, например пять слоев. Например там, где подверженность трению небольшая, эпидермис может иметь менее пяти слоев. Эпидермис может иметь один или более из следующих слоев: базальный слой, шиловидный слой, зернистый слой, блестящий слой и/или роговой слой.

Дерма.

Дерма может состоять из соединительной ткани, которая соединяет коллагеновые и эластические волокна. Дерма может быть толстой или тонкой в зависимости от месторасположения на теле. Например, дерма может быть толще на ладонях и подошвах, но тоньше на веках. Дерма может содержать кровеносные сосуды, нервы, железы и волосные фолликулы. Дерма может иметь папиллярную область или слой, который может состоять из рыхлой соединительной ткани, которая содержит тонкие эластические волокна. Папиллярная область также может иметь дермальные сосочки, которые выдаются в эпидермис. Эти сосочки могут содержать капилляры, осязательные тельца (или тельца Мейснера), которые представляют собой нервные окончания, чувствительные к прикосновениям. Дермальные сосочки могут приводить к неровностям на вышележащем эпидермисе.

Оставшаяся часть дермы может представлять собой ретикулярную область или слой. Эта область может содержать плотно упакованную соединительную ткань и пучки коллагеновых и грубых эластичных волокон. Переменная толщина ретикулярной области может отвечать, по меньшей мере частично, за разницу в толщине кожи.

Адипозный слой.

Адипозный слой ткани может находиться в форме рыхлой соединительной ткани, в которой адипоциты запасают жир. Цитоплазма и ядро адипоцита могут быть смещены к краю клетки каплей жира в клетке. Каждый адипоцит может быть окружен коллагеновой базальной мембраной для структурной поддержки и может находиться в контакте с капилляром. Кластеры адипоцитов могут содержаться в "долях", которые могут удерживаться вместе коллагеновыми септами. Адипозную ткань можно обнаружить везде, где есть рыхлая соединительная ткань. Адипозная ткань может находиться в подкожном слое под кожей.

Гладкомышечный слой.

Гладкомышечный слой может быть расположен в стенках полых внутренних структур, таких как, например, кровеносные сосуды. Гладкие мышцы также могут быть соединены с волосными фолликулами. Гладкомышечный слой представляет собой гладкую, произвольно сокращающуюся мышечную ткань, на которую могут влиять вегетативная нервная система и некоторые гормоны. Гладкомышечный слой представляет собой тип мышечного слоя, отличный от ткани сердечных мышц и ткани скелетных мышц. Скелетные мышцы присоединены в основном к костям и могут заставлять двигаться части скелета. Скелетные мышцы также являются полосатыми, так как полосы или чередующиеся светлые и темные лентообразные структуры хорошо видны при изучении ткани под микроскопом, и произвольно сокращающимися, вследствие чего их можно сознательно заставлять сокращаться и расслабляться. Сердечная мышечная ткань является полосатой и произвольно сокращающейся и образует большую часть стенок сердца.

После выбора участка для обработки пользователь берет инъекционное устройство 26 и вставляет иглу 86 в область ткани 100 так, чтобы дистальный конец 90 размещался в адипозном слое 108. Затем пользователь инъецирует определенный объем агента, необязательно предварительно отмеренный объем агента, в адипозный слой 108 области ткани 100, создавая участок инъекции 116. После завершения инъекции пользователь удаляет иглу 86 из области ткани 100.

После удаления иглы 86 пользователь берет часть области ткани 100, содержащую участок инъекции 116, и создает на ней складку 120. Ткань берут так, чтобы ткань, составляющая складку 120, была ограничена кожным слоем 104, адипозным слоем 108 и гладкомышечным слоем 112. В складку 120 не входят скелетные мышцы (не показано). Получаемая в результате складка 120 включает первую сторону 124, вторую сторону 128, противоположную первой стороне 124, и верхнюю часть 132, проходящую между первой стороной 124 и второй стороной 128. (фиг. 8). Складка 120 также определяет толщину складки 134, определяемую как расстояние между первой стороной 124 и второй стороной 128.

После получения складки 120 пользователь манипулирует рамой 30 или регулировочным механизмом 67 аппликатора 22, пока электродное расстояние 50 не будет немного большим, чем толщина складки 134. Затем пользователь размещает аппликатор 22 так, чтобы каждый электрод 34, 42 находился с противоположных сторон складки 120 с обращенными внутрь контактными поверхностями 38, 46 (смотрите фиг. 9). В частности, пользователь размещает аппликатор 22 так, чтобы первая контактная поверхность 38 первого пластинчатого электрода 34 находилась в контакте с первой стороной 124 складки 120, а вторая контактная поверхность 46 второго пластинчатого электрода 42 находилась в контакте со второй стороной 128 складки 120, создавая между ними зону обработки 136. После размещения пользователь может увеличивать или уменьшать электродное расстояние 50, чтобы эффективным образом зажать складку 120 между двумя электродами 34, 42.

В контексте этого описания зона обработки 136 определяется как объем пространства, расположенного между первым и вторым электродами 34, 42 и определяемого с двух сторон первой и второй контактными поверхностями 38, 46, а с остальных сторон определяемого условным барьером, проходящим между первым периметром 78 первой контактной поверхности 38 и вторым периметром 60 второй контактной поверхности 46 (см. фиг. 8-10). Таким образом, после того как пользователь располагает первый и второй электроды 34, 42 с противоположных сторон складки 120, зона обработки 136 описанной в настоящем документе обработки будет включать в себя по меньшей мере часть складки 120 и по меньшей мере часть участка инъекции 116. В проиллюстрированном варианте реализации ткань, расположенная в зоне обработки 136, ограничена во время обработки кожным слоем 104, адипозным слоем 108 и гладкомышечным слоем 112. Зона обработки 136 не включает в себя скелетные мышцы.

Хотя проиллюстрированный вариант реализации иллюстрирует контактные поверхности 38, 42 электродов 34, 42 размещенными в непосредственном контакте со складкой 120, понятно, что можно использовать проводящий гель (не показан) или другие вещества для улучшения электрического сообщения между электродами 34, 42 и складкой 120.

После того, как электроды 34, 42 размещены, датчик 74 аппликатора 22 определяет электродное расстояние 50 и передает эту информацию на генератор 18 сигналов, позволяя ему устанавливать соответствующие параметры электропорационного сигнала 150. Генератор 18 сигналов также может подавать тестовый сигнал (т.е. импульс низкого напряжения), при этом получаемые ток и напряжение могут регистрироваться электродами 34, 42 и впоследствии использоваться генератором 18 сигналов для расчета импеданса обрабатываемой ткани. Кроме того, данные, зарегистрированные электродами 34, 42 во

время тестового сигнала, также можно использовать для подтверждения успешной подачи импульсов. Для этого генератор 18 сигналов определяет, поддерживается ли ток в течение длительности импульса, и если времена не совпадают (т.е. пропущено более одной или двух точек сбора данных), то импульсы можно считать неполными. В частности, по меньшей мере одно из напряжения импульса 158, длины импульса 162, числа импульсов и/или задержки импульса 166 электропорационного сигнала можно, по меньшей мере, частично определить по электродному расстоянию 50 (описано ниже). В проиллюстрированном варианте реализации электродное расстояние 50 определяется автоматически датчиком 74 аппликатора 22. Однако в альтернативных вариантах реализации пользователь может вручную измерять электродное расстояние 50 и вводить электродное расстояние 50 в устройство 10.

В проиллюстрированном варианте реализации электропорационный сигнал 150 состоит из серии электрических "импульсов 154", при этом каждый импульс 154 доставляется при заданном напряжении импульса 158 и имеет заданную длину импульса 162. Кроме того, каждый отдельный импульс 154 разделен во времени с ближайшими импульсами 154 задержкой импульса 166. (фиг. 26). В проиллюстрированном варианте реализации электропорационный сигнал включает напряжение импульса 158, составляющее приблизительно от 50 В приблизительно до 200 В. В другом варианте реализации сигнал может включать напряжение импульса 158 приблизительно от 5 В приблизительно до 10 В. В других вариантах реализации сигнал может включать напряжение импульса 158 приблизительно 1 кВ. Кроме того, проиллюстрированная длина импульса 162 при электропорации составляет приблизительно 100, 200 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 мкс, 1, 10, 50, 75 и 100 мс. Кроме того, задержка импульса 166 при электропорации составляет приблизительно 1, 50, 100, 500 мс и 1 с. Кроме того, каждый электропорационный сигнал включает в себя приблизительно от 1 импульса приблизительно до 10 импульсов. Вместе, в некоторых вариантах реализации электропорационный сигнал 150 может включать в себя 3 импульса приблизительно при 200 В длиной приблизительно 100 мс с задержкой между импульсами 200 мс. В других вариантах реализации электропорационный сигнал 150 может включать в себя 3 импульса приблизительно при 50 В длиной приблизительно 100 мс с задержкой между импульсами 200 мс. В других вариантах реализации электропорационный сигнал 150 может включать в себя 10 импульсов приблизительно при 50 В длиной приблизительно 100 мс с задержкой между импульсами в 1 с. В других вариантах реализации электропорационный сигнал 150 может включать в себя 8 импульсов при 75 В длиной приблизительно 100 мс с задержкой между импульсами приблизительно 100 мс. В других вариантах реализации электропорационный сигнал 150 может включать в себя 3 импульса приблизительно от 500 В приблизительно до 1000 В длиной приблизительно от 10 мкс приблизительно до 100 мкс с задержкой между импульсами приблизительно от 100 мс до 1 с. В других вариантах реализации электропорационный сигнал может включать в себя один импульс.

После установки параметров электропорационного сигнала генератор 18 сигналов устройства 10 подает необходимый сигнал на первый и второй электроды 34, 42 так, чтобы первый электрод 34 действовал как один из положительного электрода или отрицательного электрода, в то время как второй электрод 42 действовал как другой из положительного электрода или отрицательного электрода. В частности, генератор 18 сигналов может регулировать параметры электропорационного сигнала 150 по меньшей мере частично в зависимости от зарегистрированной величины импеданса и электродного расстояния 50. После получения электропорационного сигнала электроды 34, 42 сериями подают сигнал на складку 120, создавая в ней электрическое поле (фиг. 9 и 10). Полученное электрическое поле сконцентрировано в адипозном слое 108, создавая область трансфекции в пределах складки 120. В частности, электрическое поле может создавать область трансфекции, которая имеет по существу сферическую или эллипсоидную форму. Однако в альтернативных вариантах реализации размер и форма области трансфекции могут, по меньшей мере, частично зависеть от распределения электрического поля в целевой ткани, а также местоположения и количества агента, который был введен в целевую ткань. Кроме того, ток свободно течет через нижележащий мышечный слой 112 и является относительно низким вблизи участка инъекции 116 по сравнению с аналогичной обработкой, проводимой с помощью конфигураций с проникающим игольчатым электродом, обычно используемых для подкожной или внутримышечной электропорационной доставки. Такие характеристики электрического поля являются потенциально благоприятными для тех видов обработки, при которых нежелателен иммунный ответ.

После завершения электропорации электроды 34, 42 можно удалять из складки 120.

б) Трехэлектродная схема с иглой.

Для применения обработки посредством трехэлектродной схемы обработки пользователь сначала получает пациента с учетом области ткани 100, которую они хотят обработать. В контексте этого описания область ткани 100 может включать ткань кожи, содержащую, например, один или более из кожного слоя 104, адипозного слоя 108 и гладкомышечного слоя 112, как более подробно описано выше. После выбора области ткани 100 пользователь берет часть области ткани 100 и создает на ней складку 120. В частности, пользователь берет часть области ткани 110, создавая складку ткани 120, которая содержит кожный слой 104, адипозный слой 108 и гладкомышечный слой 112. В складку 120 не входят скелетные мышцы. Кроме того, получаемая в результате складка ткани 120 включает первую сторону 124, вторую сторону 128, противоположную первой стороне 124, и верхнюю часть 132, проходящую между первой

стороной 124 и второй стороной 128. Складка 120 также определяет толщину складки 134, определяемую как расстояние между первой стороной 124 и второй стороной 128.

После подготовки складки 120 пользователь берет инъекционное устройство 26 и продольно вводит иглу 86 в складку 120 по существу параллельно первой стороне 124 и второй стороне 128. Затем пользователь вводит предварительно отмеренный объем агента в адипозный слой 108 области ткани 100, создавая участок инъекции 116. После завершения инъекции пользователь не удаляет иглу 86 из области ткани 100.

После создания участка инъекции 116 и с иглой 86, все еще находящейся в ткани 100, пользователь манипулирует рамой 30 или регулировочным механизмом 56 аппликатора 22, пока электродное расстояние 50 не будет немного большим, чем толщина складки 134. Затем пользователь размещает аппликатор 22 так, чтобы каждый электрод 34, 42 находился с противоположных сторон складки 120 (см. фиг. 11-13). В частности, пользователь размещает аппликатор 22 так, чтобы первая контактная поверхность 38 первого пластинчатого электрода 34 находилась в контакте с первой стороной 124 складки 120, а вторая контактная поверхность 46 второго пластинчатого электрода 42 находилась в контакте со второй стороной 128 складки 120, создавая между ними зону обработки 136 (описано выше; см. фиг. 11-13).

Хотя проиллюстрированный вариант реализации иллюстрирует контактные поверхности 38, 46 электродов 34, 42 размещенными в непосредственном контакте со складкой 120, понятно, что можно использовать проводящий гель (не показан) или другие вещества для улучшения электрического сообщения между электродами 34, 42 и складкой 120.

После того, как электроды 34, 42 размещены, датчик 74 аппликатора 22 определяет электродное расстояние 50 и устанавливает соответствующие параметры электропорационного сигнала (описано выше). Генератор 18 сигналов также может подавать тестовый сигнал (описано выше), при этом получаемые ток и напряжение могут регистрироваться электродами 34, 42 или иглой 86 и впоследствии использоваться генератором 18 сигналов для расчета импеданса обрабатываемой ткани. В проиллюстрированном варианте реализации электропорационный сигнал 150 состоит из серии электрических импульсов 154, при этом каждый импульс 154 подается при заданном напряжении импульса 158 и имеет заданную длину импульса 162. Кроме того, каждый отдельный импульс 154 разделен во времени с ближайшими импульсами 154 задержкой импульса 166 (см. фиг. 26). В проиллюстрированном варианте реализации электропорационный сигнал включает напряжение импульса 158, составляющее приблизительно от 5 В приблизительно до 500 В. Напряжение импульса может составлять, например, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 В. Кроме того, проиллюстрированная длина импульса 162 при электропорации составляет приблизительно от 1 мкс приблизительно до 100 мс. Кроме того, задержка импульса 166 при электропорации составляет приблизительно от 10 мс приблизительно до 1 с. Кроме того, каждый электропорационный сигнал включает в себя приблизительно от 1 приблизительно до 10 импульсов. В альтернативных вариантах реализации параметры электропорационного сигнала 150 можно менять, чтобы обеспечить оптимальные условия для разных агентов. Параметры сигналов можно корректировать в зависимости от применяемого агента, степени трансфекции и необходимого повреждения ткани. Например, для конструкций dMAb в целом требуется более низкое напряжение, меньшая длительность импульса и большая задержка между импульсами, тогда как для ДНК-вакцин в целом требуется более высокое напряжение, меньшая задержка и более длительные импульсы.

После установки параметров электропорационного сигнала генератор 18 сигналов устройства 10 подает электропорационный сигнал на первый электрод 34, второй электрод 42 и иглу 86 так, чтобы игла 86 действовала как один из положительного электрода или отрицательного электрода, в то время как первый и второй электроды 34, 42 вместе действовали как другой из положительного электрода или отрицательного электрода. После получения электропорационного сигнала электроды 34, 42 и игла 86 сериями подают сигнал на складку 120, создавая в ней электрическое поле (фиг. 12 и 13). Полученное электрическое поле сконцентрировано в адипозном слое 108 вокруг иглы 86, при этом его напряженность уменьшается в радиальном направлении от нее. Электрическое поле также создает область трансфекции, которая идет вдоль иглы и имеет очень удлиненную эллипсоидную форму. Кроме того, электрический ток имеет наибольшее значение вокруг иглы 86.

После завершения электропорации электроды 34, 42 и иглу 86 можно удалять из складки 120.

с) Трехпластинчатая схема.

Для применения обработки посредством трехпластинчатой схемы пользователь сначала получает пациента с учетом области ткани 100, которую они хотят обработать. В контексте этого описания область ткани 100 может включать ткань кожи, содержащую, например, один или более из кожного слоя 104, адипозного слоя 108 и гладкомышечного слоя 112, как более подробно описано выше. После выбора участка для обработки пользователь берет инъекционное устройство 26 и вставляет иглу 86 в область ткани 100 так, чтобы дистальный конец 90 размещался в адипозном слое 108. Затем пользователь вводит предварительно отмеренный объем агента в адипозный слой 108 области ткани 108, создавая участок инъекции 116. После завершения инъекции пользователь удаляет иглу 86 из области ткани 100.

После удаления иглы 86 пользователь берет часть области ткани 100, содержащую участок инъекции 116, и создает складку 120, которая содержит участок инъекции 116, кожный слой 104, адипозный

слой 108 и гладкомышечный слой 112. В складку 120 не входят скелетные мышцы. Кроме того, получаемая в результате складка ткани 120 включает первую сторону 124, вторую сторону 128, противоположную первой стороне 124, и верхнюю часть 132, проходящую между первой стороной 124 и второй стороной 128 складки 120. Складка 120 также определяет толщину складки 134, определяемую как расстояние между первой стороной 124 и второй стороной 128.

После подготовки складки 120 пользователь манипулирует рамой 30' или регулировочным механизмом 56' аппликатора 22', пока электродное расстояние 50' не будет немного большим, чем толщина складки 134. Пользователь размещает аппликатор 22' так, чтобы первая контактная поверхность 38' первого пластинчатого электрода 34' находилась в контакте с первой стороной 124 складки 120, а вторая контактная поверхность 46' второго пластинчатого электрода 42' находилась в контакте со второй стороной 128 складки 120, создавая между ними зону обработки 136 (описано выше). Пользователь также размещает третий пластинчатый электрод 66' так, чтобы третья контактная поверхность 68' находилась в контакте с верхней частью 132 складки 120 и в целом размещалась между первым и вторым электродами 34', 42' (см. фиг. 14-16) так, чтобы третий пластинчатый электрод 66' не находился в непосредственном контакте с первым или вторым электродами 34', 42'.

Хотя проиллюстрированный вариант реализации иллюстрирует контактные поверхности 38', 46', 68' электродов 34', 42', 66' размещенными в непосредственном контакте со складкой 120, понятно, что можно использовать контактный или проводящий гель (не показан) или другие вещества для улучшения электрического сообщения между электродами 34', 42', 66' и складкой 120.

После того, как электроды 34', 42', 66' размещены, датчик 74' аппликатора 22' определяет электродное расстояние 50 между первым и вторым электродами 34', 42' и устанавливает соответствующие параметры электропорационного сигнала (описано выше). Генератор 18 сигналов также может подавать тестовый сигнал (описано выше), при этом получаемые ток и напряжение могут регистрироваться электродами 34', 42', 66' и впоследствии использоваться генератором 18 сигналов для расчета импеданса обрабатываемой ткани. В проиллюстрированном варианте реализации электропорационный сигнал состоит из серии электрических "импульсов 154", при этом каждый импульс 154 подается при заданном напряжении импульса 158 и имеет заданную длину импульса 162. Кроме того, каждый отдельный импульс 154 разделен во времени с ближайшими импульсами 154 задержкой импульса 166 (см. фиг. 26). В проиллюстрированном варианте реализации электропорационный сигнал включает напряжение импульса 158, составляющее приблизительно от 5 В приблизительно до 500 В. Кроме того, проиллюстрированная длина импульса 162 при электропорации составляет приблизительно от 1 мкс приблизительно до 100 мс. Кроме того, задержка импульса 166 при электропорации составляет приблизительно от 10 мс приблизительно до 1 с. Кроме того, каждый электропорационный сигнал включает в себя приблизительно от 1 приблизительно до 10 импульсов.

После установки параметров электропорационного сигнала устройство 10 подает электропорационный сигнал на первый, второй и третий электроды 34', 42', 66' так, чтобы первый и второй электроды 34', 42' действовали как один из положительного электрода и отрицательного электрода, в то время как третий электрод 66' действовал как другой из положительного электрода и отрицательного электрода. После получения электропорационного сигнала электроды 34', 42', 66' сериями подают сигнал на складку 120, создавая в ней электрическое поле (фиг. 15 и 16). Полученное электрическое поле является наиболее сильным непосредственно под третьим пластинчатым электродом 66', а его напряженность уменьшается с увеличением глубины ткани. Кроме того, электрический ток является сильным в кожном слое 104 и намного слабее в адипозном слое 108, создавая необходимый баланс между сильным электрическим полем, в то же время поддерживая меньший ток в участке инъекции. Такие электрические поля в целом являются оптимальными для инъекций ДНК в неглубокий слой подкожно-жировой клетчатки.

После завершения электропорации электроды 34', 42', 66' можно удалять из складки 120.

IV) Примеры.

Пример 1. Экспериментальные результаты.

Проводили обработку *in vivo* подкожных жировых подушек самок морских свинок линии Хартли, используя разные варианты вышеописанной обработки. Во время эксперимента пользователь сбрасывал шерсть возле участка обработки вблизи загривка морской свинки. После этого использовали крем для удаления волос, чтобы полностью удалить какую-либо оставшуюся щетину с участка обработки. Потом проводили инъекцию плазмид в адипозный слой участка обработки, используя инсулиновый шприц, создавая участок инъекции. Затем проводили манипуляции с участком инъекции и тканью кожи в участке обработки, отделяя кожный, адипозный и гладкомышечный слои от скелетных мышц. Затем полученную в результате складку кожи размещали между парой пластинчатых электродов, в которой каждый электрод имел соответствующую контактную поверхность, покрытую проводящим гелем. И наконец, на пластинчатые электроды подавали электрические импульсы, при этом один пластинчатый электрод действовал как положительный электрод, а другой пластинчатый электрод действовал как отрицательный электрод. После завершения обработки брали образцы ткани с участка обработки для анализа (см. фиг. 17-30).

Исследования с инъекциями красителя продемонстрировали, что вводимое вещество преимущественно проходит вниз по коллагеновым септам, окружающим адипозные доли, и эти данные согласова-

лись с профилем трансфекции ЗФБ. Чтобы продемонстрировать срез кодируемых белков, проводили нацеленную на адипозную ткань ЭП-обработку, используя ДНК, кодирующую моноклональные антитела (dMAb), что приводило к выявляемым системным уровням белка. И, наконец, было показано, что нацеленная на адипозную ткань ЭП-ДНК-вакцинация плазмиды, кодирующей нуклеопротеин HN1, является иммуногенной. По сравнению с традиционными внутримышечными путями нацеленная на адипозную ткань, ЭП-ДНК-вакцинация может обеспечивать преимущества в отношении переносимости благодаря применению более низкого напряжения, менее глубоких инъекций и неинвазивных электродов.

При большем увеличении можно видеть характерный для адипоцитов рисунок в виде "сот" яркого зеленого цвета вследствие наличия многочисленных трансфицированных адипоцитов. Также была заметна ярко-зеленая коллагеновая септа в виде сплошных зеленых линий, проходящих через сеть адипоцитов. См. фиг. 18, где зеленая трансфицированная область соответствует объему ткани, зажатому между пластинчатыми электродами. Большее увеличение среза адипозной ткани позволило выявить множество отдельных адипоцитов. Внутренняя часть каждой клетки не имеет яркого цвета, так как липидные капли не экспрессируют белок. Фактически зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ) находится вокруг краев каждой клетки, где происходит синтез, выработка, перенос и модификация белка (см. фиг. 17, 18 и 19).

Эта технология также была опробована на кроликах (на подкожно-жировой клетчатке в основании шеи). См. фиг. 20, где краситель масляный красный О выделяет липидные капли, а также наблюдаются зеленые кольца ЗФБ, окружающие трансфицированные клетки. Ядра показаны в синем цвете.

Конфокальные изображения трансфицированной адипозной ткани морских свинок показывают, что выработка и экспрессия белка происходит вокруг всей границы клеток. Многочисленные более мелкие клетки, окружающие адипоциты, не экспрессируют ЗФБ, что согласуется со степенью специфичности в отношении адипоцитов (см. фиг. 21).

Объем инъекции может быть уменьшен от около 200 до 50 мкл, что не влияет на размер трансфицированной области (см. фиг. 22). Проведение многократных инъекций с последующей однократной ЭП может быть вариантом повышения числа трансфицированных клеток (см. фиг. 23). Снижение напряжения и увеличение числа импульсов может улучшить сигнал ЗФБ с возможностью определения большего количества трансфицированных клеток. Обработка 80 В вызывала заметно более слабые мышечные судороги по сравнению с обработкой 200 В (см. фиг. 24). dMAb вырабатывались у морских свинок на пиковых уровнях около 1000 нг/мл после второй обработки адипозной ткани. Первую обработку проводили, используя неоптимизированные параметры (см. фиг. 25).

Морские свинки, получавшие быстрые импульсы, вырабатывали больше dMAb, чем морские свинки, получавшие импульсы с большей задержкой между импульсами, составлявшей 1 с (см. фиг. 26). Безыгольная инъекция приводила к более равномерному распределению ДНК по ткани и трансфекции большего количества клеток. См. фиг. 27. Ферментативное расщепление ткани улучшало распределение жидкости по ткани (см. фиг. 28). При увеличении числа импульсов снижается электрическое сопротивление. При 25 В ток было практически невозможно зарегистрировать (см. фиг. 30). При 100 В мышечные судороги были достаточно интенсивными, приводя к флуктуациям в электрических данных (см. фиг. 29).

Пример 2. Иммуногенность.

Проводили обработку *in vivo* пяти экспериментальных групп, которые все получали одинаковую дозу ДНК. В этом эксперименте в одной группе проводили интрадермальную ЭП, чтобы она служила в качестве группы положительного контроля. В остальных четырех группах проводили обработку адипозного слоя ткани, используя различные комбинации высокого или низкого напряжения и большого или малого объема инъекции. Напряжение импульса в четырех группах обработки адипозной ткани варьировалось приблизительно от 50 В приблизительно до 200 В, тогда как параметры инъекции варьировались приблизительно от 100 мкл в одном участке до пяти инъекций по 50 мкл в каждом участке. Для каждой инъекции плазмиды разводили, чтобы увеличить объем, не меняя общую дозу ДНК.

Как проиллюстрировано на фиг. 31, группы обработки адипозной ткани, обработанные с применением высокого напряжения и большого объема инъекции, имели более сильный и быстрый гуморальный иммунный ответ (т.е. конечный титр), чем любая другая группа, включая интрадермально обработанную группу. Сила этого ответа продолжала возрастать в течение 6 недель. Оба варианта обработки с применением низкого напряжения (т.е. с большим и малым объемом) демонстрировали небольшой ответ или отсутствие ответа через 3 недели и слабый ответ или отсутствие ответа через 6 недель.

Оказалось, что как объем инъекции ДНК, так и напряжение ЭП влияют на иммунный ответ в адипозной ткани. Большой объем агента, вводимого в ткань соответствует повышению вероятности контакта между клетками и агентами. Повышение объема может помочь решить проблемы, связанные с введением приготовленной в водном растворе ДНК в адипозную ткань. Кроме того, чем больше напряжение ЭП, тем больше клеток могут подвергаться ЭП. Более того, любое повреждение ткани в результате применения более высокого напряжения может способствовать индукции иммунного ответа и ассоциированных клеток.

Пример 3. Материалы и методы для примеров 4-9.

Для моделирования разных условий ЭП создавали две тканевые модели в виде 3D CAD объектов в SolidWorks 2013 (SolidWorks Corp., Concord, MA, USA). Обе модели состояли из трех электрически изо-

тропных слоев: кожа, адипозная ткань и мышцы. Роговой слой не был включен в эти модели, так как напряжение уже 50 В будет пермеабиллизировать роговой слой в течение микросекунд, после чего его вклад в общее сопротивление тканей станет пренебрежимо малым. Толщина рогового слоя порядка 20 мкм, а очень тонкие слои могут приводить к появлению артефактов в анализе методом конечных элементов. Чтобы смоделировать ткань, зажатую между двумя пластинчатыми электродами, создавали складчатую геометрию ткани, а два геометрических элемента в форме пластинчатых электродов с плоскостью контакта, равной 400 м², размещали с противоположных сторон складки (фиг. 32). Чтобы смоделировать проникающие игольчатые электроды в той же самой ткани, создавали плоскую геометрию ткани, а два геометрических элемента в форме 19 мм иглы 22-го калибра помещали внутри ткани с межэлектродным расстоянием 10 мм и глубиной проникновения 18 мм (фиг. 33).

Два объекта ткань-электрод экспортировали в ANSYS Maxwell 2015.2 (программное обеспечение ANSYS, Canonsburg, PA, USA) для анализа методом конечных элементов. Значения электрической проводимости для каждого типа ткани брали на основании литературных значений и считали постоянными. Значения проводимости и общие размеры ткани, используемые в этих моделях, перечислены в табл. 1. На один электрод подавали напряжение возбуждения, тогда как другому электроду было приписано нулевое значение напряжения, а поперечные сечения, разделяющие электроды на две части в аналитической плоскости x-y создавали, чтобы визуализировать напряженность электрического поля.

Таблица 1

Материал	Проводимость, См/м	Толщина (складка), мм	Толщина (плоская), мм
Кожа	0,25	1	1
Адипозная ткань	0,05	10	5
Мышечная ткань	0,3	1	35
Нержавеющая сталь	$1,1 \times 10^6$	н/д	н/д

*Толщина измерена на плоскости, разделяющей эти электроды

Животные.

Все исследования на животных проводили по протоколам, утвержденным институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию. Для всех исследований *in vivo* использовали самок морских свинок линии Хартли. Обработку и сбор крови проводили, когда животных держали под общим наркозом, обеспечиваемым вдыхаемым изофлураном. Подкожные инъекции проводили в межлопаточные подкожные жировые подушки (расположенные на загривке), используя инсулиновую иглу 29-го калибра в ориентации параллельно к линии спины. Для проведения посмертных исследований морских свинок сначала вводили в общий наркоз, а затем гуманно умерщвляли путем внутрисердечной инъекции пентобарбитала.

Плазмиды.

В исследованиях генной экспрессии использовали плазмидную ДНК, кодирующую зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ). Иммунные исследования проводили, используя плазмидную ДНК, кодирующую полноразмерный нуклеопротеин (NP) вируса гриппа А (H1N1, A/Пуэрто-Рико/8). Все плазмидные препараты готовили в солевом растворе буфера на основе цитрата натрия с конечной концентрацией буфера 1X.

Исследования инъекций красителя.

Метиленовый голубой (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) растворяли в деионизированной воде в концентрации 0,5 мг/мл. В случае инъекций в одном участке морских свинок подкожно инъецировали 100 мкл раствора метиленового голубого. В случае инъекций в нескольких участках проводили пять отдельных 50 мкл инъекций, разнесенных приблизительно на 5 мм. После инъекции всю жировую подушку плотно зажимали между двумя пластинчатыми электродами, чтобы симулировать полный протокол обработки. Животных незамедлительно умерщвляли и проводили визуализацию неповрежденных жировых подушек, а затем их рассекали вдоль сагиттальной плоскости и снова визуализировали, чтобы оценить распределение красителя в ткани.

Общая процедура ЭП-обработки адипозной ткани.

Участки обработки обривали и очищали. ЭП-обработку адипозной ткани проводили на подкожной жировой подушке в межлопаточной области, тогда как обработку кожи проводили на боку. В случае обработки адипозной ткани ее зажимали между двумя пальцами, чтобы изолировать жировую подушку, и вводили ДНК, используя инсулиновую иглу 29-го калибра в ориентации параллельно к линии спины. Непосредственно после инъекции ДНК два пластинчатых электрода, присоединенные к противоположным губкам штангенциркуля, покрывали проводящим гелем и использовали, чтобы зажать ткань, окру-

жающую место инъекции, а импульсы подавали, используя блок управления Elgen 1000 (Inovio Pharmaceuticals, San Diego, CA). В случае ИД-ЭП-обработки ДНК вводили интрадермально с последующей незамедлительной электропорацией, используя устройство для поверхностной электропорации (ПЭП), состоящее из 4×4 матрицы игольчатых электродов.

Визуализация при увеличении и гистологический анализ.

В исследованиях с зеленым флуоресцентным белком (ЗФБ) ЭП адипозной ткани проводили с применением ЗФБ-плазмиды, а неповрежденные жировые подушки удаляли в заранее определенные моменты времени и визуализировали с помощью системы визуализации FluorChem R (ProteinSimple, San Jose, CA, USA). Затем жировые подушки замораживали и вырезали образцы размерами приблизительно 10×10 мм из трансфицированной области жировой подушки и делали криосрезы толщиной 30 мкм вдоль поперечной плоскости, чтобы оценить глубину трансфекции, или вдоль фронтальной плоскости, чтобы оценить горизонтальное распределение трансфицированных клеток. Некоторые срезы фиксировали в 4% формалине, очищали в ксилене, окрашивали DAPI или Hoechst 3342 (Life Technologies, Carlsbad, CA) и покрывали пленкой, используя Fluoromount (eBioscience, San Diego, CA). Другие срезы фиксировали в формалине, очищали в ксилене, окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и покрывали пленкой, используя Permount (VWR, Radnor, PA, USA). Окрашенные H&E срезы визуализировали в светлом поле, используя микроскоп Olympus BX51 (Olympus, Center Valley, PA), оснащенный камерой MicroPublisher 3.3 (QImaging, Surrey, BC, Canada). Флуоресцентные изображения получали с помощью камеры Retiga 3000 (QImaging, Surrey, BC, Canada). Конфокальные изображения получали в виде многопанельной и автоматически сшитой серии z-срезов цельной ткани с высоким разрешением, используя лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss, Jena, Germany), и дополнительно обрабатывали изображения, используя программное обеспечение Zen 2012 (Carl Zeiss) и IMARIS (Bitplane, Belfast, UK).

Экспрессия ЗФБ и клеточная кинетика.

ЭП адипозной ткани проводили на 14 морских свинках, используя 100 мкг плазмид, кодирующих ЗФБ, и следующие параметры ЭП: 200 В, 3 импульса, длительность 100 мс и задержка между импульсами 100 мс. В качестве контроля морских свинок обрабатывали ЭП, но не вводили плазмиды, а две дополнительные морские свинки получали инъекции плазмид, но их не обрабатывали ЭП. Контрольных животных умерщвляли через 3 суток после обработки, а обработанных морских свинок умерщвляли, спустя некоторый интервал (n=2) после обработки в диапазоне от 3 ч до 14 суток после обработки, а также в долгосрочной динамике на 60 сутки. Жировые подушки визуализировали неповрежденными в отношении экспрессии ЗФБ, а затем делали срезы и окрашивали H&E, чтобы визуализировать признаки клеточной инфильтрации в участке обработки.

Исследования иммуногенности. Морских свинок обрабатывали 25 мкг NP ДНК. Четыре группы морских свинок (n=4) подвергали ЭП-обработке адипозной ткани, как описано выше, и каждая группа получала либо одну 100 мкл инъекцию ДНК, либо пять отдельных 50 мкл инъекций с последующей однократной ЭП-обработкой, состоящей из трех 100 мс прямоугольных импульсов с задержкой между импульсами 200 мс. Морские свинки, которых вакцинировали путем ИД-ЭП с помощью ПЭП-устройства (n=3), служили в качестве группы сравнения в этом исследовании, так как ранее было показано, что этот метод позволяет трансфицировать эпидермальные клетки, но не подкожные адипоциты. Группы ЭП-обработки адипозной ткани были следующими: ЭП высокого напряжения с 1 участком инъекции (ВН-1), ЭП высокого напряжения с 5 участками инъекции (ВН-5), ЭП низкого напряжения с 1 участком инъекции (НН-1) и ЭП низкого напряжения с 5 участками инъекции (НН-5). В случае морских свинок, которые получали по 5 инъекций, однократную процедуру ЭП проводили непосредственно после последней инъекции. Общая доза плазмидной ДНК была идентичной для всех групп. Дизайн исследования проиллюстрирован в табл. 2. Каждые три недели на протяжении исследования брали по 300 мкл крови и хранили плазму при -20°C до проведения анализа. Обработку проводили на 0 неделе, 3 неделе и 6 неделе исследования непосредственно после сбора крови. На 21 неделе исследования все животные получали дополнительную дозу, а через 18 дней брали по 3 мл крови и выделяли моноклеарные клетки периферической крови для анализа ELISpot.

Таблица 2

Группа	n	Место лечение	Инъекции	Напряжение, В	Общим объем, мкл	Общая доза ДНК, мкг
HV-1	4	Апидозная ткань	1	200	100	25
LV-1	4	Апидозная ткань	1	50	100	25
LV-5	4	Апидозная ткань	5	50	250	25
HV-5	4	Апидозная ткань	5	200	250	25
ID-EP	3	Кожа	1	50	50	25

Сыворотку ИФА от вакцинированных морских свинок анализировали, используя ферментный иммуносорбентный анализ (ИФА). ИФА проводили, используя 96-луночные планшеты (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), покрытые в течение ночи 100 мкл/лунку 0,3 мкг/мл антигена pNP (Sino Biological, Beijing, China) в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (ФСБ) (VWR). Планшеты промывали, блокировали ФСБ, содержащим 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma-Aldrich) и 0,05% Твин-20 (Sigma-Aldrich) при 150 мкл/лунку, при 37°C, а затем снова промывали. Сыворотку серийно разводили от 1:50 до 1:2952450 в ФСБ, содержащем 1% БСА и 0,05% Твин-20 (буфер для разведения образцов) при 100 мкл/лунку, и инкубировали в течение двух часов при 37°C. Затем планшеты промывали, а конъюгированный с пероксидазой хрена козий IgG против антигена морских свинок (Sigma-Aldrich) разводили 1:10 000 буфером для разведения образцов и добавляли в каждую лунку при 100 мкл/лунку в течение одного часа при 37°C. Планшеты промывали и добавляли в каждую лунку раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) (VWR) при 100 мкл/лунку, а образование цвета останавливали с помощью раствора стоп-реагента для ТМБ (VWR) через 6 мин. Значения поглощения на 450 нм в каждой лунке определяли, используя планшет-ридер SpectraMax PLUS 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), а предельное значение для положительного титра рассчитывали, как описано в Frey, et al., где среднее поглощение и стандартное отклонение для отрицательного контроля (в данном случае - образцов до иммунизации) использовали для расчета предельных значений поглощения. Конечные титры использовали для получения всех представленных результатов ИФА.

ELISpot.

На 21 неделе иммунного исследования вакцинированные морские свинки получали дополнительную дозу, а через 18 дней брали по 3 мл периферической крови и собирали ее в ЭДТА-пробирки для проведения ELISpot для интерферона гамма (IFN- γ) с применением ранее разработанных в лаборатории методов. Кровь разводили 1:1 HBSS и центрифугировали в градиенте Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). Лейкоцитарные пленки собирали и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 живых клеток/мл в среде R10 и высевали при плотности 1×10^5 клеток/лунку в 96-луночные планшеты Millipore IP, покрытые в течение ночи 5 мкг/мл первичного анти-IFN- γ антитела (V-E4), и блокировали 1X ФСБ, содержащим 10% (мас./об.) сахарозы и 2% (мас./об.) БСА. МКПК, в трех повторностях, инкубировали в течение 18 ч либо с конканавалином А (ConA), либо с одним из трех пептидных пулов разных антигенов NP, которые по полученным ранее данным являются иммуностимулирующими. После промывания для удаления клеток в каждую лунку добавляли по 0,2 мкг биотинилированного вторичного анти-IFN- γ антитела (N-G3) и оставляли для инкубации на 2 ч. Затем лунки промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата для выявляющего реагента BCIP/NBT в течение 15 мин. Планшеты визуализировали, используя планшет-ридер CTL-Immunospot S6 ELISPOT, а программное обеспечение CTL-Immunospot использовали для обработки и подсчета пятен. Для каждого животного число пятен нормировали путем вычитания числа нестимулированных клеток.

Статистические методы.

Для сравнения данных ИФА по титрам групп ЭП-обработки адипозной ткани проводили факториальный дисперсионный анализ повторных измерений ANOVA для логарифмически преобразованных данных по титрам, полученных во все моменты времени, используя в качестве факторов напряжение ЭП, число участков инъекций и неделю обработки. Для сравнения данных ИФА по титрам между всеми вариантами обработки данные стратифицировали по моменту времени, а затем проводили однофакторный дисперсионный анализ ANOVA для логарифмически преобразованных данных, используя в качестве фактора группу обработки, а попарное сравнение проводили, используя апостериорный критерий Тьюки, если F-критерий был значимым. Ошибку II рода минимизировали, и в данном случае не проводили кор-

ректировку для множественного сравнения. Данные ELISpot анализировали сначала в группах ЭП-обработки адипозной ткани, используя факториальный дисперсионный анализ ANOVA, где факторами служили напряжение ЭП и число участков обработки. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA проводили, чтобы сравнить данные ИФА для всех групп обработки, включая ИД-ЭП. Предельное значение для значимости определяли как $p < 0,05$, а все данные для статистически незначимых трендов и разниц сопровождалось p -значениями.

Пример 4. Анализ методом конечных элементов и оптимизация параметров.

Чтобы понять электрические свойства адипозной ткани с точки зрения перспективы в отношении ЭП, проводили анализ методом конечных элементов. Это позволило получить количественную оценку прогнозного распределения электрического поля в каждом представляющем интерес типе ткани (в данном случае - кожной, мышечной и адипозной), которое определяет диапазоны напряжения, подходящие для ЭП в адипозной ткани, при применении схемы электродов, проиллюстрированной на фиг. 32. Анализ методом конечных элементов в плоскости x - y показывает, что стандартные игольчатые электроды создавали одинаково сильный градиент электрических полей в коже, адипозной ткани и мышцах (фиг. 34, вверху), тогда как пластинчатые электроды создавали более равномерное электрическое поле практически исключительно в адипозной ткани (фиг. 34, внизу). По прогнозам игольчатые электроды могут обеспечивать напряженности полей выше 350 В/см в 12-14% каждой ткани, тогда как приблизительно к половине ткани приложено поле напряженностью менее 150 В/см. По прогнозам пластинчатые электроды могут создавать электрические поля от 150 В/см до 350 В/см в 95% обрабатываемой адипозной ткани, а в мышечной ткани не прикладывается электрическое поле выше 100 В/см. В этих моделях пластинчатые электроды создавали электрические поля ниже 150 В/см в 87% кожи.

Анализ методом конечных элементов позволяет предположить, что неинвазивные пластинчатые электроды активно концентрируют электрическое поле в адипозной ткани, действуя противоположно игольчатым электродам, которые обеспечивают одинаковое электрическое поле вне зависимости от ткани, в которую их вводят. Кроме того, поле, создаваемое пластинчатыми электродами, является более равномерным по сравнению с игольчатыми электродами.

В анализе методом конечных элементов для каждого типа ткани предполагалась постоянная электрическая проводимость.

Недавно полученные данные позволяют предположить, что проводимость по сути является функцией напряженности электрического поля и, следовательно, динамически меняется во время ЭП. Однако эти динамические модели были подтверждены только для кожной, мышечной и опухолевой тканей, поэтому выбрали постоянную проводимость, чтобы избежать каких-либо допущений, которые могут привести к переоценке распределения электрического поля. Кроме того, предположили, что не заземленный жировой слой, расположенный непосредственно под электродами и ограничивающий ток в подлежащую мышечную ткань, был сжат до толщины 1 мм. Это предположение было сделано, чтобы избежать переоценки изолирующей способности адипозной ткани, хотя в реальности подлежащий жир вероятно намного толще даже когда электроды плотно закреплены на месте. Результаты моделирования можно рассматривать как "наихудший" сценарий, а подтверждение модели динамической проводимости в адипозной ткани вероятно увеличит прогнозную напряженность электрического поля в жировой ткани.

Для последующих экспериментов были выбраны пластинчатые электроды на основании их превосходящих характеристик распределения электрического поля в адипозной ткани, минимизации электрического поля в других типах тканей и неинвазивной природы устройства. Оптимизированный прототип пластинчатого электрода можно применять в клинических условиях, а данные, полученные в этом анализе методом конечных элементов, можно экстраполировать на более плотные и толстые адипозные области у людей.

Пример 5. Исследования инъекций красителя.

Хотя гидродинамические свойства болюсных ВМ или ИД инъекций хорошо изучены, распределение жидкости в подкожно-жировой клетчатке *in vivo* было менее выясненным. Кроме того, было неизвестно физическое влияние на распределение жидкости сжатия места инъекции между пластинчатыми электродами. Эту динамику изучали в исследованиях с инъекциями красителя, которые проводили, чтобы получить визуализацию распределения введенной жидкости в жировой ткани. После инъекции и сжатия штангенциркулем краситель был виден в жировых подушках в форме удлинённых цилиндров (фиг. 35, вверху слева). После рассечения жира краситель сохранялся в основном в коллагеновых септах, разделяющих адипозные доли (фиг. 35, вверху справа). Голубой краситель оставался в жировой подушке, при этом в надлежащем кожном слое или подлежащем мышечном слое краситель присутствовал в малом количестве или отсутствовал. Так как краситель не проходил через ткань после зажатия между электродами, такой же анализ с красителем проводили для случая с несколькими участками инъекции с целью повышения распределения ДНК в адипозной ткани. Когда проводили пять отдельных 50 мкл инъекций, а затем зажимали ткань между пластинчатыми электродами, пять отдельных участков инъекций оставались видимыми, хотя некоторые были менее яркими по сравнению с другими (фиг. 35 внизу). После рассечения каждый отдельный участок инъекции имел аналогичное распределение красителя в адипозной ткани, при этом краситель был сконцентрирован вдоль коллагеновых септ.

Исследования с красителем позволяют предположить, что множество вводимого вещества контактирует с дермой, но за пределами жировой подушки не наблюдалось генной экспрессии. Эти наблюдения согласуются с анализом методом конечных элементов, который предполагает, что электрические поля с достаточной напряженностью, чтобы обеспечивать трансфекцию, создаются практически исключительно в адипозной ткани. Когда проводили несколько инъекций некоторые участки были более яркими, чем другие, что может быть связано со слиянием близлежащих участков инъекций при сжатии между пластинчатыми электродами. Наиболее сильное окрашивание красителем проявлялось вдоль коллагеновых септ, разделяющих адипозные доли, и в действительности, большое количество трансфицированных адипоцитов было сгруппировано вокруг этих септ. Вероятно электрический ток и раствор ДНК первично проходят по этим коллагеновым септам, а трансфекция адипозной ткани происходит, когда раствор ДНК выходит из этих каналов и контактирует с близлежащими адипоцитами перед ЭП.

На клеточном уровне в участке инъекции находилось большое количество трансфицированных адипоцитов, которые легко различимы по своему большому размеру, характерной глобулярной форме и уникальному "кольцеобразному" профилю генной экспрессии, связанному с тем, что центр каждой клетки занят липидной каплей. Обработка оказалась немного избирательной в отношении адипоцитов, так как несмотря на большое количество других типов клеток, находящихся в пространстве между адипоцитами, ЗФБ экспрессировался только вокруг адипоцитов. Вероятно, это связано с предрасположенностью ЭП к преимущественной трансфекции более крупных клеток при меньших напряженностях полей. Адипоциты являются глобулярными клетками очень большого диаметра (50-100 мкм), и возможно, что их форма и диаметр делают их более восприимчивыми к ЭП, чем другие, менее крупные типы клеток. В адипозной ткани также содержится множество иммунных клеток, эндотелиальных клеток, стволовых клеток и фибробластов, поэтому отсутствие повсеместной трансфекции этих типов клеток было несколько неожиданным.

Пример 6. Трансфекция адипоцитов *in vivo*.

Чтобы оценить экспрессию *in vivo* репортерной конструкции в адипозной ткани, в жировые подушки морских свинок вводили плазмиды, кодирующие ЗФБ, и электропорировали напряжением в диапазоне от 50 до 200 В, используя неинвазивные пластинчатые электроды, описанные в разделе с описанием общей процедуры ЭП-обработки адипозной ткани в примере 3. Участок обработки и процедура ЭП-фиксации приведены на фиг. 36. Через трое суток после проведения этой обработки удаляли неповрежденные жировые подушки и визуализировали с большим увеличением на тканевом уровне. ЗФБ экспрессировался исключительно в участке инъекции в подкожных жировых подушках в области длиной приблизительно 5-10 мм и шириной 1-2 мм, при этом не наблюдалось видимой разницы в области или интенсивности сигнала между исследуемыми значениями напряжения ЭП (фиг. 37, сверху). У животных, получавших инъекцию плазмид без ЭП адипозной ткани, экспрессии ЗФБ не было выявлено. На микроскопическом клеточном уровне адипоциты были различимы благодаря своему большому диаметру (50-100 мкм) и характерной глобулярной форме вследствие нахождения в центре объема клетки липидной капли (фиг. 37 внизу). Жировые подушки морских свинок, подвергнутых ЭП адипозной ткани, содержали многочисленные ЗФБ-экспрессирующие адипоциты, которые были легко различимы по резким флуоресцентным очертаниям. Наблюдались области сильной, диффузной аутофлуоресценции, расположенные во внеклеточном пространстве между адипоцитами, и также яркой флуоресценцией характеризовались коллагеновые септы. У морских свинок, получавших инъекцию плазмидной ДНК без ЭП адипозной ткани, отсутствовали ЗФБ-экспрессирующие адипоциты или области сильной аутофлуоресценции, а коллагеновые септы были видимыми, но менее яркими. Проводили дополнительный гистологический анализ, чтобы визуализировать распределение репортерной конструкции в глубине жировой подушки. Наиболее сильный и устойчивый сигнал ЗФБ был локализован в адипоцитах, смежных с коллагеновыми септами, разделяющими адипозные доли (фиг. 38). В надлежащем кожном слое ЗФБ не выявлялся. Генная экспрессия была выявляемой на глубине нескольких миллиметров жировой подушки и в целом согласовалась с распределением жидкости, наблюдаемым в исследованиях с инъекцией красителя. Конфокальные изображения с высоким разрешением позволили выявить, что ЗФБ экспрессировался в виде отчетливых точек, окружающих каждый трансфицированный адипоцит (фиг. 39). Экспрессия ЗФБ не была связана с многочисленными ядрами, окружающими адипоциты и находящимися между ними, которые свидетельствуют о наличии популяции более мелких вторичных клеток в адипозной ткани. Эта популяция включает преадипоциты, фибробласты и эндотелиальные клетки.

Пример 7. Кинетика генной экспрессии и гистологический анализ.

Чтобы исследовать кинетику репортерной конструкции в популяции адипоцитов, проводили исследование временной динамики, в котором образцы обработанных жировых подушек вырезали, готовили срезы и анализировали в определенные моменты времени после 200 В ЭП адипозной ткани неинвазивными пластинчатыми электродами. Генная экспрессия была измеряема уже через 24 ч после ЭП-обработки адипозной ткани, при этом экспрессия поддерживалась в течение 60 суток проведения наблюдений (фиг. 40 сверху). В течение первых 7 суток не наблюдалось четкой количественной разницы в интенсивности или распределении флуоресценции ЗФБ. Сигнал становился более диффузным, начиная с 14 суток, а на 60 сутки был еще слабее и более диффузным. Каждый отдельный участок экспрессии ЗФБ

имел диаметр порядка 10 мм. Гистологические изменения, наблюдаемые посредством окрашивания срезов адипозной ткани H&E, после ЭП адипозной ткани были заметны, начиная с 3 суток, продолжались до 14 суток и большей частью исчезали к 60 суткам (фиг. 40, внизу). Выявляемая разница в тканевой физиологии через 3 или 24 ч после обработки отсутствовала. В эти ранние моменты времени адипоциты были четко выражены, липидные капли определялись в виде пустот вследствие очищения ксиленом, а коллагеновые септы были видимы благодаря более темному окрашиванию эозином и многочисленным ядрам. Начиная с 3 суток и в продолжение 60 суток наблюдения, коллагеновые септы в участке обработки были заметно ярче, вероятно, вследствие визуализации большого числа ядер из инфильтрирующих клеток. В областях, где коллагеновые септы были более яркими, внеклеточное пространство вокруг адипоцитов также было заполнено большим количеством клеток. Эти гистологические изменения были наиболее выражены между 3 и 7 сутками после обработки, а через 60 суток инфильтрация во внеклеточное пространство была умеренной, и плотность клеток в коллагеновых септах оставалась повышенной, но менее выраженной.

Было показано, что адипозная ткань способна поддерживать быструю и продолжительную генную экспрессию после однократной ЭП-обработки адипозной ткани. До 3 суток после обработки отсутствовали гистологические признаки клеточной инфильтрации, даже несмотря на то, что генная экспрессия была сильной уже через 24 ч после обработки. Однако эта кинетика может отличаться от ЗФБ для высокоиммуногенного антигена. Оказалось, что ЭП адипозной ткани главным образом обеспечивает трансфекцию адипоцитов, что позволяет предположить, что иммуногенность обусловлена в основном антигенами, вырабатываемыми адипоцитами. Небольшое число адипоцитов (20-60 клеток) можно избирательно трансфицировать *in vivo* путем прямого применения ЭП к хирургически обнаженной адипозной ткани с применением электродов в виде щипцов с поверхностной площадью контакта приблизительно $0,065 \text{ см}^2$. В данном случае применяли неинвазивную методику ЭП для трансфекции большого числа адипоцитов, используя пластинчатые электроды с приблизительно в 100 раз большей площадью поверхности.

Пример 8. Гуморальная иммуногенность.

Чтобы оценить пригодность адипозной ткани в качестве целевой ткани для ДНК-вакцинации и возможность генерации иммунного ответа, морских свинок иммунизировали конструкцией, экспрессирующей антиген нуклеопротеина вируса гриппа (PR8), применяя ЭП адипозной ткани или ИД-ЭП в качестве сравнения, и измеряли титры связывания с помощью ИФА. Экспериментальные группы ЭП адипозной ткани включали ЭП высокого напряжения с 1 участком инъекции (ВН-1), ЭП высокого напряжения с 5 участками инъекции (ВН-5), ЭП низкого напряжения с 1 участком инъекции (НН-1) и ЭП низкого напряжения с 5 участками инъекции (НН-5). Все морские свинки получали одинаковую дозу ДНК. ВН ЭП адипозной ткани и ИД-ЭП приводили к аналогичной кинетике ответа антител, но НН ЭП-обработка адипозной ткани приводила к высоковариабельным и в целом меньшим ответам антител по сравнению с ВН ЭП адипозной ткани или ИД-ЭП (фиг. 41). Разницу в титрах между четырьмя разными видами ЭП-обработки адипозной ткани оценивали, используя факториальный дисперсионный анализ повторных измерений ANOVA. Основное влияние на титры оказывали напряжение ($p=0,0062$) и момент времени ($p=0,0065$), но не число участков инъекций ($p=0,16$). Оказалось, что несколько участков инъекции обеспечивают более быстрое появление гуморальной иммунности, но взаимосвязь между числом участков инъекции и временем не была значимой ($p=0,13$). Простой анализ основных эффектов выявил, что разница в титрах между ВН и НН вариантами ЭП-обработки адипозной ткани была значимой, начиная с 6 недели ($0,0056 < p < 0,039$). Разница в титрах между ВН ЭП адипозной ткани и ИД-ЭП отсутствовала в любой момент времени ($0,31 < p < 0,79$), а ИД-ЭП в целом обеспечивала более высокие титры, чем НН ЭП адипозной ткани во все моменты времени ($0,075 < p < 0,12$). Отсутствие значимой разницы между ИД-ЭП и НН ЭП адипозной ткани потенциально может быть связано с числом повторностей для ИД-ЭП в этом исследовании ($n=3$). Введение ДНК-вакцины, доставляемой в адипозную ткань посредством ЭП, индуцировало сильные гуморальные ответы. Было показано, что гуморальный иммунный ответ после ДНК-вакцинации путем ЭП адипозной ткани зависит как от напряжения, так и от пространственного распределения, при этом высокое напряжение является важным для достижения быстрых и сильных ответов антител. Впервые было продемонстрировано, что трансфицированные адипоциты могут вызывать иммунный ответ. Наблюдали сильную зависимость от напряжения, несмотря на отсутствие зависимости от напряжения разницы в генной экспрессии. Было предположено сильное влияние наличия нескольких участков обработки, так как в этом случае больше клеток контактирует с плазмидами.

Пример 9. Клеточная иммуногенность.

Чтобы исследовать клеточную часть иммунного ответа, проводили анализ ELISpot периферической крови от морских свинок. Для ВН-1 ($n=3$), ВН-5 ($n=2$) и ИД-ЭП ($n=2$) было меньше повторностей в результате меньшего числа жизнеспособных клеток. В группе НН-5 ($n=3$) одна морская свинка погибла по невыясненным причинам на ранней стадии исследования. Все вакцинированные морские свинки вырабатывали IFN- γ в ответ на все три пептидных пула, а также на ConA. Пептидный пул 1, который был наиболее иммуногенным, использовали для дополнительного анализа (фиг. 43). Число пятен было аналогичным в группах ИД-ЭП и ВН ЭП адипозной ткани и демонстрировало тенденцию к снижению в случае НН ЭП адипозной ткани, в частности НН-1 вызывал самый слабый клеточный иммунный ответ. В груп-

пах ЭП-обработки адипозной ткани факториальный дисперсионный анализ повторных измерений ANOVA не выявил значимой разницы в логарифмически преобразованных данных числа пятен для напряжения ($p=0,15$) или числа участков инъекции ($p=0,26$), и между этими двумя факторами не было взаимосвязи ($p=0,39$). Однофакторный дисперсионный сравнительный анализ ANOVA всех групп обработки, включая ИД-ЭП, не продемонстрировал значимой разницы в логарифмически преобразованных данных числа пятен ($p=0,31$).

ЭП адипозной ткани была способна вызывать такой же клеточный иммунный ответ, что и ИД-ЭП, и хотя разница между группами не была значимой вследствие малого количества повторностей и высокой вариабельности, число пятен демонстрировало тенденцию к снижению у морских свинок, обработанных при наименьшем напряжении, и только с одним участком инъекции. Эти данные подтверждают зависимость иммуногенности ЭП адипозной ткани как от напряжения ЭП, так и от распределения ДНК, и позволяют предположить, что параметры электропорации и распределение ДНК в ткани являются важными факторами, которые можно независимо подбирать для улучшения иммунных ответов.

Зависимость ответа антител от напряжения имеет два ключевых фактора.

Во-первых, более высокие значения напряжения дают более сильное электрическое поле, поэтому может быть трансфицировано большее количество клеток. Было показано, что эффективность трансфекции и иммунные ответы зависят от напряжения в других тканях, таких как кожа и мышцы. Однако результаты исследований оптимизации показали, что эффективная трансфекция может происходить даже при низких напряжениях, поэтому, маловероятно, что это является единственным объяснением. Второе объяснение зависимости ответа антител от напряжения состоит в том, что для более высокого напряжения требуется больший электрический ток, который приводит к повреждению или раздражению тканей вследствие резистивного нагревания. Хотя участки обработки не имели внешних признаков повреждения, гистологический анализ показал наличие заметной клеточной инфильтрации в адипозной ткани, начиная с 3 суток после обработки. Ранее предполагалось, что ЭП имеет адъювантный эффект. Следовательно, наблюдаемая клеточная инфильтрация, возможно, связана с умеренным термическим повреждением, вызываемым ЭП, и играет роль в повышении иммунного ответа при высоких напряжениях. Хотя 200 В - это значение, аналогичное применяемому при ВМ ЭП-ДНК-вакцинации, ток никогда не превышал 1 А, что также аналогично ВМ-ЭП. Следовательно, аналогичное количество электрической энергии распределяется по большей площади поверхности ($6,25 \text{ см}^2$) по сравнению с типовой 19-дюймовой иглой 22 калибра ($0,88 \text{ см}^2$), поэтому плотность энергии на поверхности электрода должна быть приблизительно в 7 раз ниже при ЭП-ДНК-обработке адипозной ткани по сравнению с ВМ-ЭП.

Умеренный положительный эффект увеличения числа участков инъекции ДНК на иммуногенность, вероятно, связан с увеличением числа клеток, находящихся в контакте с ДНК, перед ЭП. Было продемонстрировано отсутствие видимого преимущества для генной экспрессии при увеличении объема инъекции в одном участке более 50 мкл, поэтому одинаковую дозу ДНК распределяли по 5 разным участкам, вводя в каждый по 50 мкл ДНК. Тот факт, что наличие нескольких участков обработки может обеспечивать преимущество в иммуногенности по сравнению с одним участком с обработкой такой же дозой, в частности в ранние моменты времени, обеспечивает свидетельство того, что ЭП-ДНК-вакцинация адипозной ткани может приносить прямую пользу за счет большего количества контактирующих с ДНК адипоцитов.

Эти результаты позволяют предположить, что иммунный ответ можно усиливать, привлекая большее количество адипоцитов и обеспечивая оптимальные параметры электропорации. Другие факторы, такие как длительность импульса, число импульсов, задержка между импульсами и концентрация ДНК, также все могут влиять на иммунный ответ. Было показано, что ИД-ЭП снижает необходимую дозу, но эти иммунные данные показывают, что ЭП адипозной ткани была способна генерировать аналогичные по силе иммунные ответы с такой же дозой ИД-ЭП. Адипозная ткань имеет потенциал принимать намного большие дозы ИД-ЭП, аналогично с мышцами, без отрицательных последствий в отношении переносимости и инвазивности, связанных с ВМ-ЭП. Эти примеры демонстрируют, что нацеленная на адипозную ткань ДНК-вакцина становится иммуногенной после оптимизации параметров доставки ДНК и электропорации. Этот подход обеспечивает быстрые и продолжительные иммунные ответы и не требует применения инвазивных игольчатых электродов. При фиксированной дозе ДНК амплитуда и начало иммунного ответа улучшаются в зависимости от напряжения электропорации и при увеличении числа участков инъекции. Нацеленная на адипозную ткань ДНК-вакцинация обеспечивает потенциальные преимущества в виде безопасности, хорошей переносимости и легкости в применении по сравнению с ВМ введением и не имеет недостатков ИД-обработки, связанных с ограничениями дозировки или клеточным обновлением.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ электропорации адипоцитов в адипозном слое ткани, включающий обеспечение первого электрода, соединенного с дистальным концом первой планки, при этом первая планка соединена с рамой, где первый электрод имеет первую контактную поверхность, и при этом

первая контактная поверхность имеет первый периметр;

обеспечение второго электрода, соединенного с дистальным концом второй планки, при этом вторая планка соединена с рамой, где второй электрод имеет вторую контактную поверхность, и при этом вторая контактная поверхность имеет второй периметр;

получение складки ткани;

размещение складки ткани между первой контактной поверхностью и второй контактной поверхностью таким образом, чтобы неизолированная часть первой контактной поверхности находилась в контакте с первой стороной складки, а неизолированная часть второй контактной поверхности находилась в контакте со второй стороной складки, с образованием, таким образом, зоны обработки между неизолированными частями первой и второй контактных поверхностей, где неизолированные части расположены между дистальными концами соответствующих планок и изолированными частями, и при этом ткань, размещаемая в зоне обработки, включает адипозный слой ткани;

инъекцию агента в адипозный слой;

расположение агента в зоне обработки; и

подачу электрического сигнала на первый электрод и второй электрод, где электрический сигнал включает один или несколько электрических импульсов, имеющих электрический потенциал, достаточный для электропороции адипоцитов в адипозном слое ткани, тем самым повышая проницаемость клеточных мембран адипоцитов для введения агента в адипоциты.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что складка ткани, размещаемая в зоне обработки, не включает скелетные мышцы.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что получение складки ткани дополнительно включает получение кожного слоя, адипозного слоя и гладкомышечного слоя в складке ткани.

4. Способ по п.3, где инъекция включает инъекцию заданного количества агента в адипозный слой складки ткани перед подачей электрического сигнала на первый электрод и второй электрод.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что подача электрического импульса на первый электрод и второй электрод дополнительно включает

создание электрического поля в складке ткани; и

концентрацию электрического поля в адипозном слое, тем самым создавая область трансфекции, которая имеет по существу сферическую или эллипсоидную форму в адипозном слое.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что подача одного или более электрических импульсов включает подачу одного или более электрических импульсов с потенциалом от 5 до 1000 В.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что подача одного или более электрических импульсов включает подачу каждого одного или более электрических импульсов длительностью приблизительно от 100 мкс до 100 мс.

8. Способ по п.5, отличающийся тем, что подача одного или более электрических импульсов включает подачу от 1 импульса до приблизительно 10 импульсов.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из первой контактной поверхности и второй контактной поверхности содержит множество выходящих из нее выступов.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что каждый выступ имеет по существу пирамидальную форму.

11. Электропорационное устройство для электропороции адипоцитов в адипозном слое ткани, содержащее

раму, имеющую первую и вторую планки, исходящие из нее;

первый электрод, соединенный с дистальным концом первой рамы, при этом первый электрод имеет первую контактную поверхность, определяющую первый периметр;

второй электрод, соединенный с дистальным концом второй рамы, при этом второй электрод имеет вторую контактную поверхность, определяющую второй периметр, и

генератор сигналов, выполненный с возможностью подачи электропорационного сигнала на первый и второй электроды,

при этом первая контактная поверхность и вторая контактная поверхность обращены одна к другой и определяют зону обработки между ними для подачи электрического сигнала на складку ткани для повышения проницаемости клеточных мембран в складке ткани, где каждая из первой и второй контактных поверхностей имеет электрически изолированную часть и неизолированную часть, при этом неизолированная часть расположена между дистальным концом соответствующей планки и изолированной частью; и

при этом первый и второй электроды выполнены так, чтобы зажимать складку ткани таким образом, чтобы размещаемая в зоне обработки ткань включала кожный слой, адипозный слой и гладкомышечный слой.

12. Электропорационное устройство по п.11, дополнительно содержащее ручной аппликатор, который поддерживает раму, при этом ручной аппликатор содержит регулировочный механизм, соединенный с первой и второй планками, где регулировочный механизм выполнен таким образом, чтобы пользователь мог манипулировать расстоянием между первой и второй контактными поверхностями.

13. Электропорационное устройство по п.11, где каждый из первого и второго электродов содержит слой изоляционного материала, который обеспечивает изолированную часть соответствующей первой и

второй контактных поверхностей.

14. Электропорационное устройство по п.13, дополнительно содержащее первую и вторую оболочки, которые определяют соответствующие слои изоляционного материала, где первая и вторая оболочки присоединены к концевым частям первого и второго электродов.

15. Электропорационное устройство по п.11, дополнительно содержащее третий электрод, имеющий третью контактную поверхность, выполненную с возможностью контакта со складкой ткани, при этом третий электрод расположен между первым и вторым электродами так, чтобы третий электрод не находился в непосредственном контакте с первым электродом или вторым электродом, при этом третья контактная поверхность выполнена с возможностью подачи электропорационного сигнала на складку ткани.

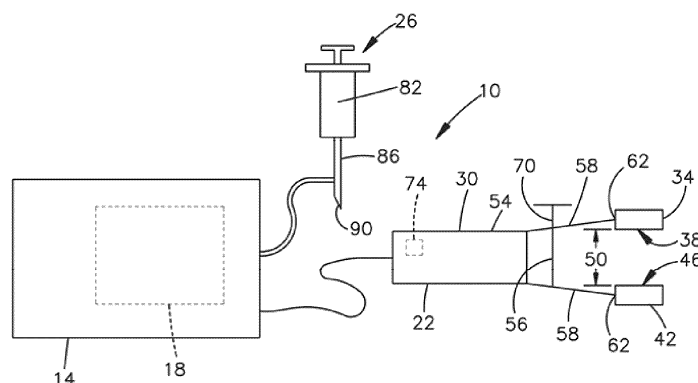
16. Электропорационное устройство по п.15, где третий электрод представляет собой пластинчатый электрод, выполненный таким образом, чтобы третья контактная поверхность контактировала с верхней частью складки ткани.

17. Электропорационное устройство по п.15, где третий электрод представляет собой игольчатый электрод, выполненный таким образом, чтобы проникать в складку ткани и проходить в адипозный слой.

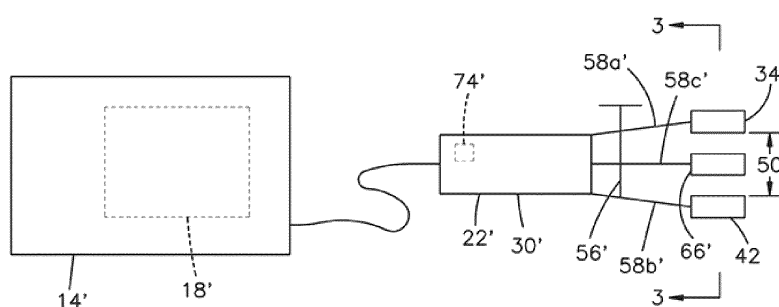
18. Электропорационное устройство по п.17, дополнительно содержащее инъекционное устройство для инъекции предварительно отмеренного количества агента в жировую ткань, где инъекционное устройство содержит

резервуар, выполненный с возможностью содержания в нем заданного количества агента; и

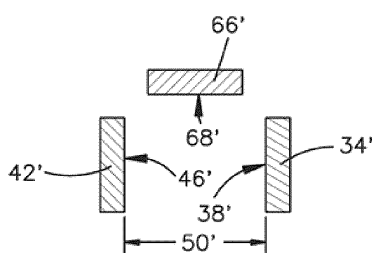
иглу, где игла представляет собой инъекционную иглу, исходящую из резервуара и находящуюся с ним в жидкостном соединении, при этом игла выполнена с возможностью инъекции предварительно отмеренного количества агента в адипозный слой.



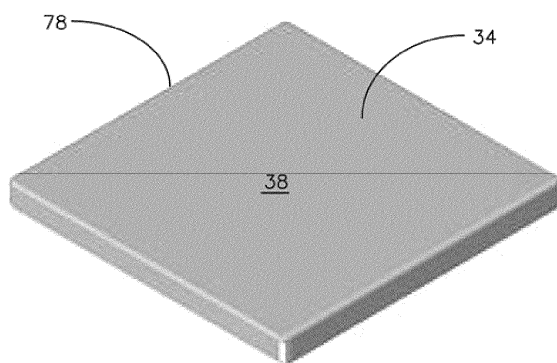
Фиг. 1



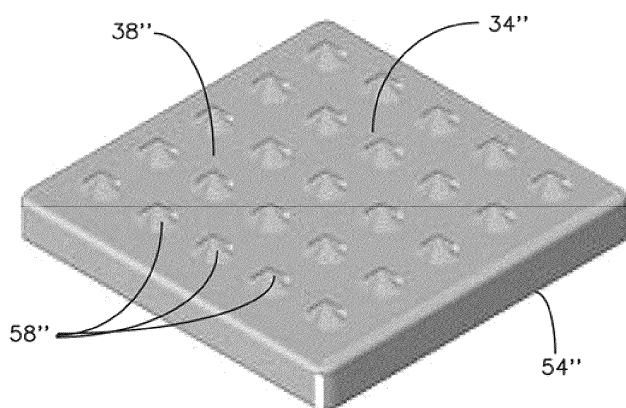
Фиг. 2



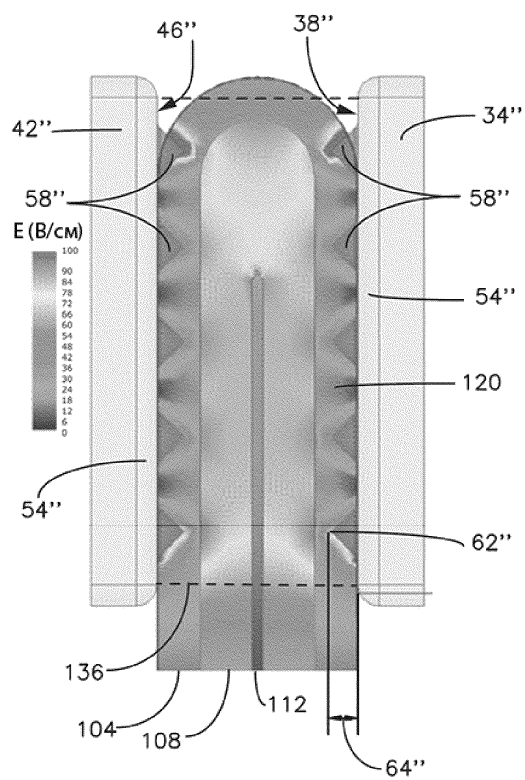
Фиг. 3



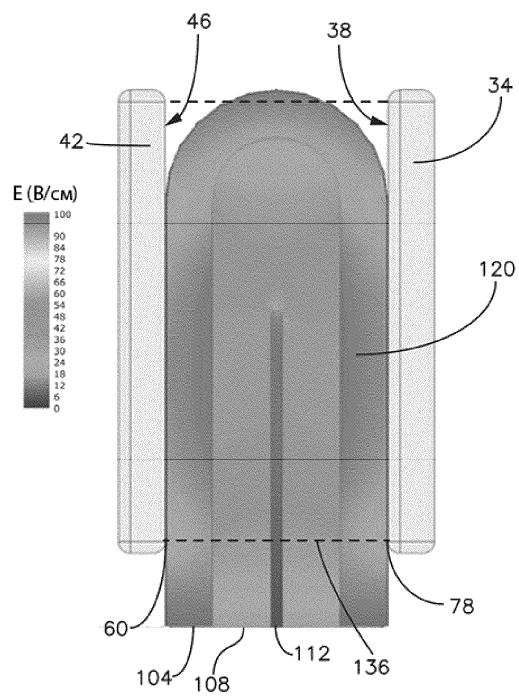
Фиг. 4



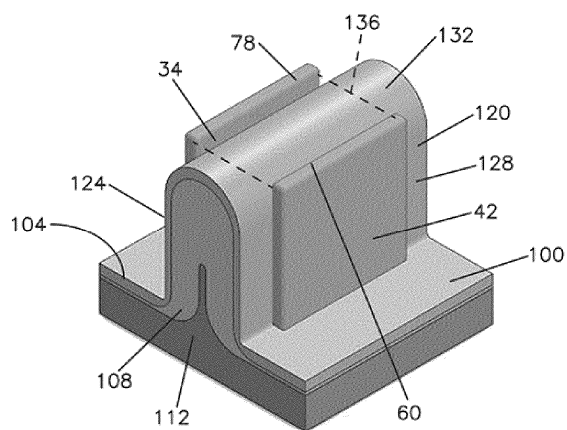
Фиг. 5



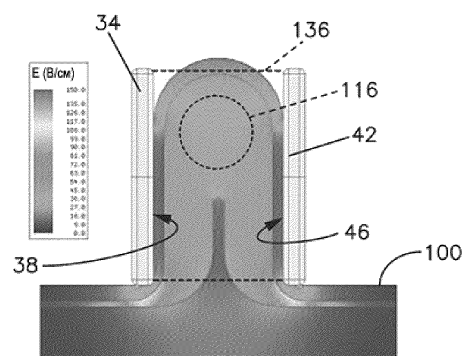
Фиг. 6



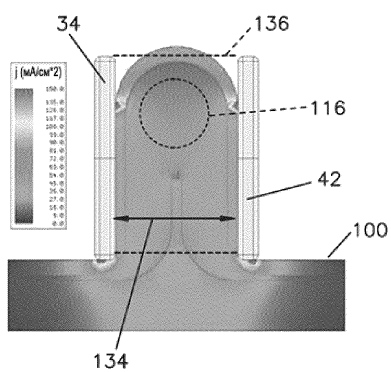
Фиг. 7



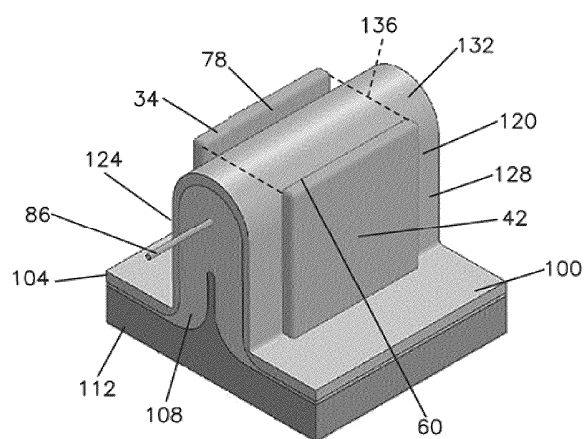
Фиг. 8



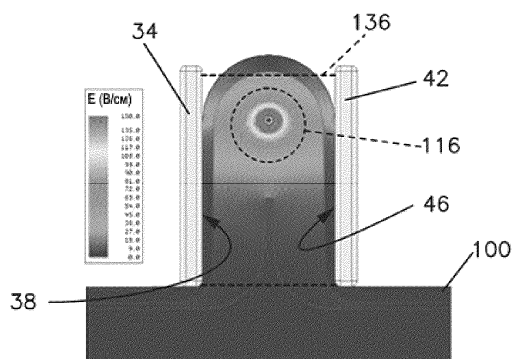
Фиг. 9



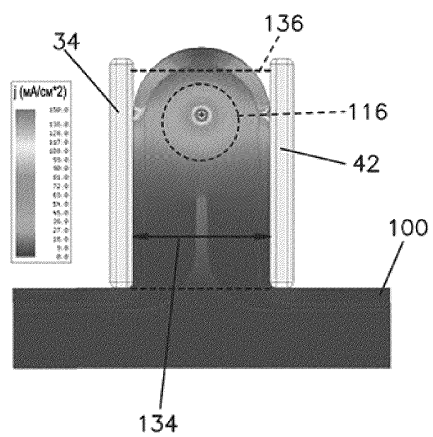
Фиг. 10



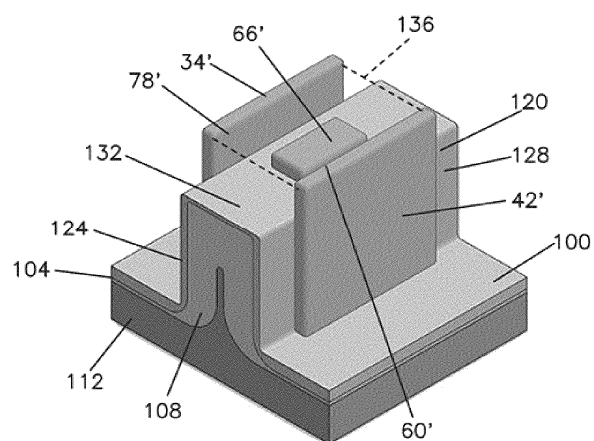
Фиг. 11



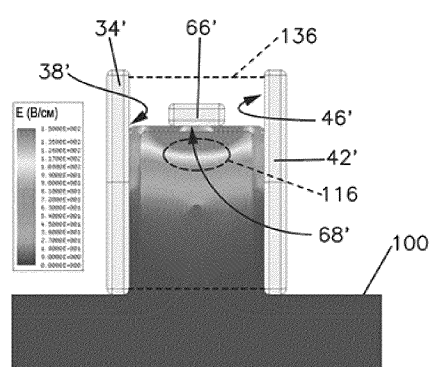
Фиг. 12



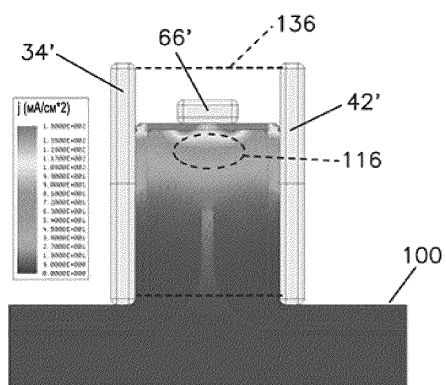
Фиг. 13



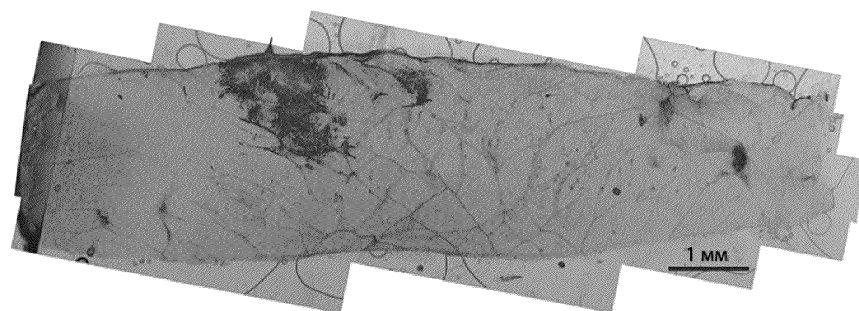
Фиг. 14



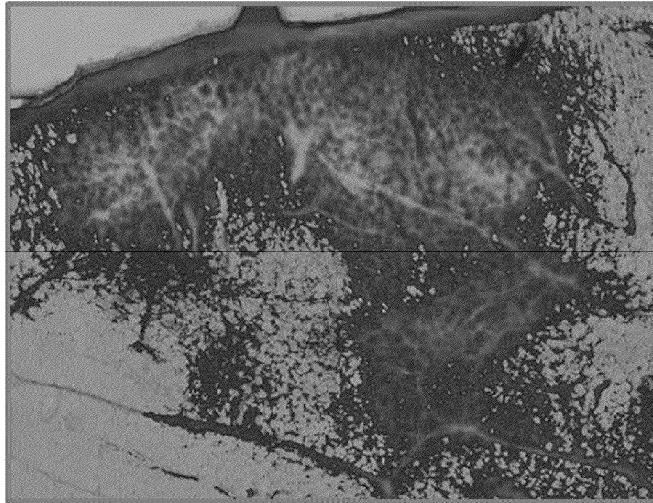
Фиг. 15



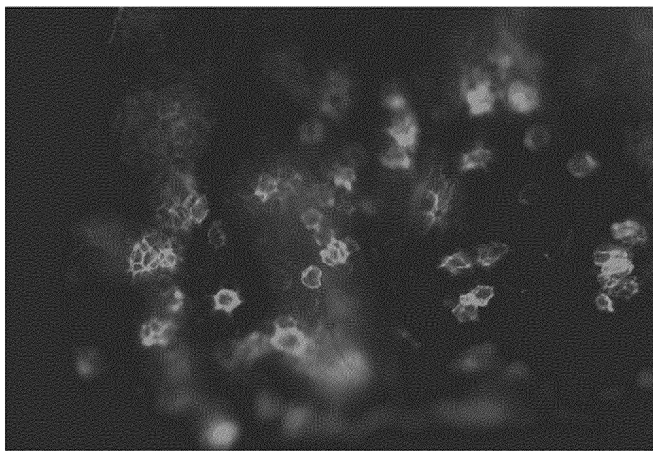
Фиг. 16



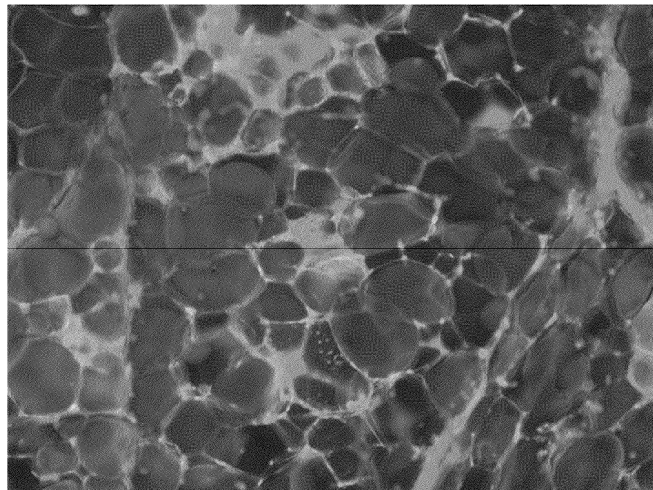
Фиг. 17



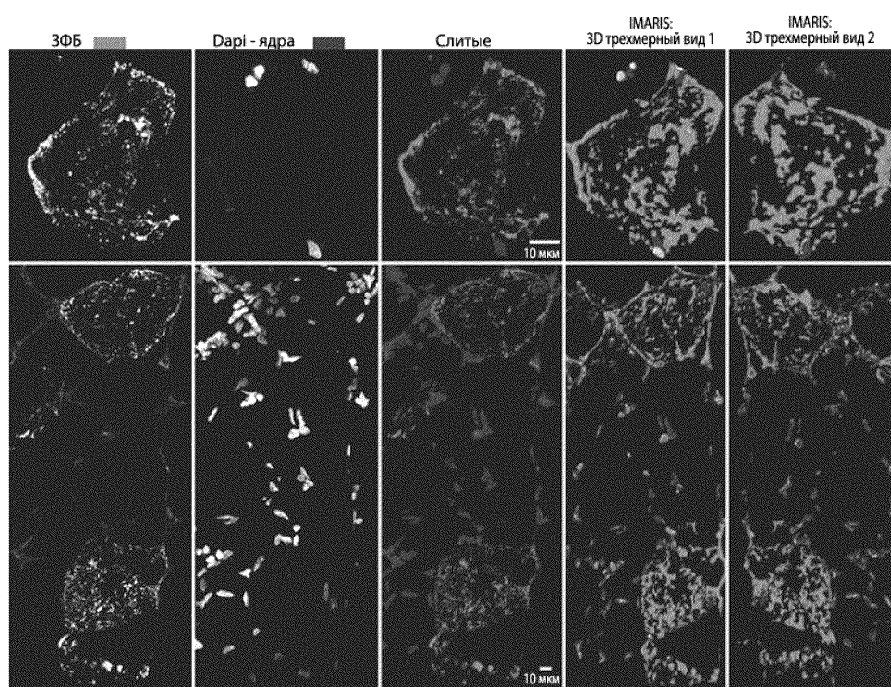
Фиг. 18



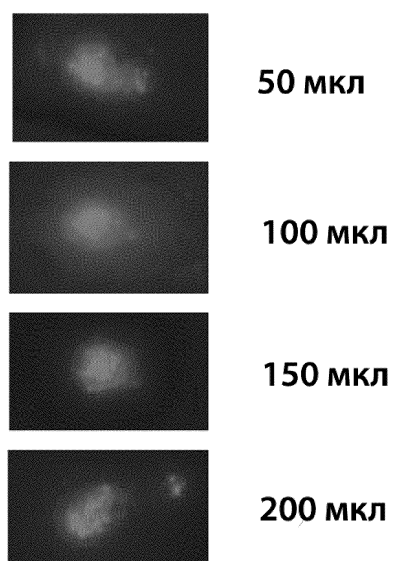
Фиг. 19



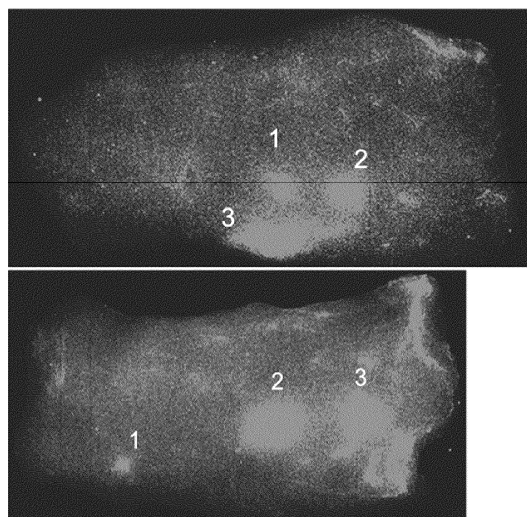
Фиг. 20



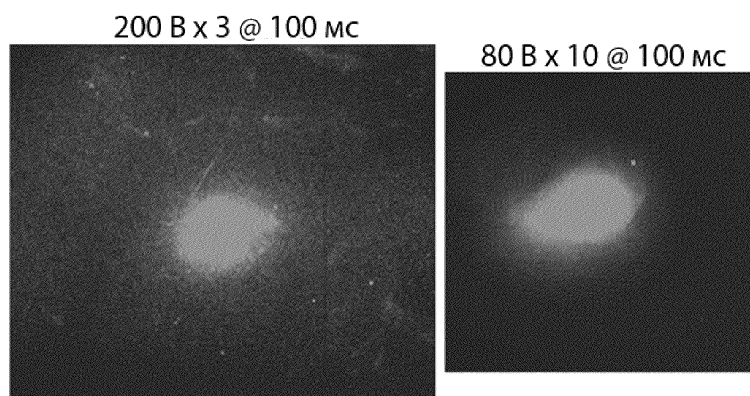
Фиг. 21



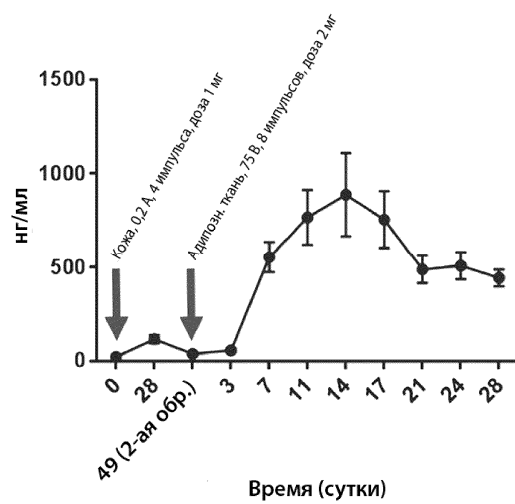
Фиг. 22



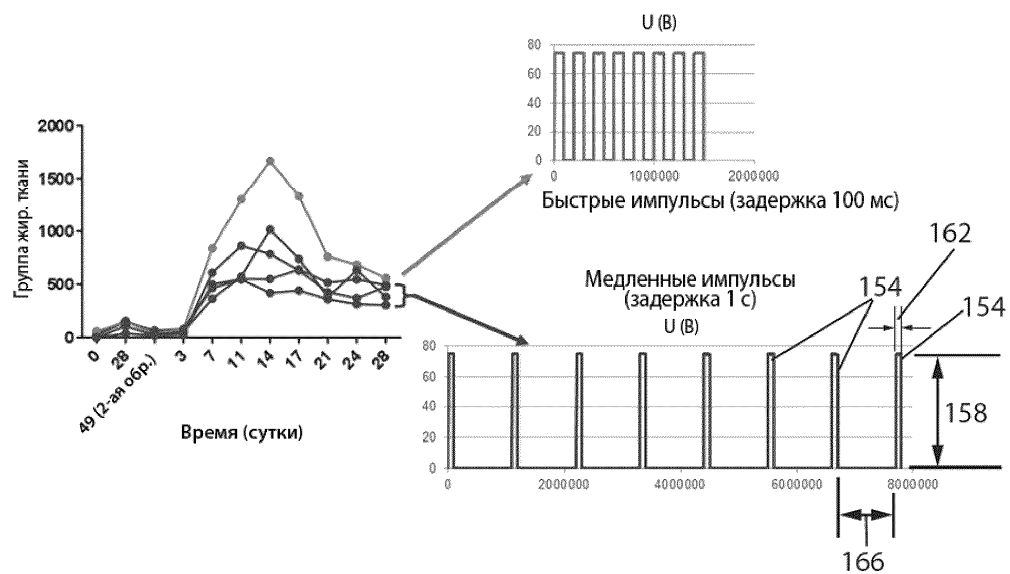
Фиг. 23



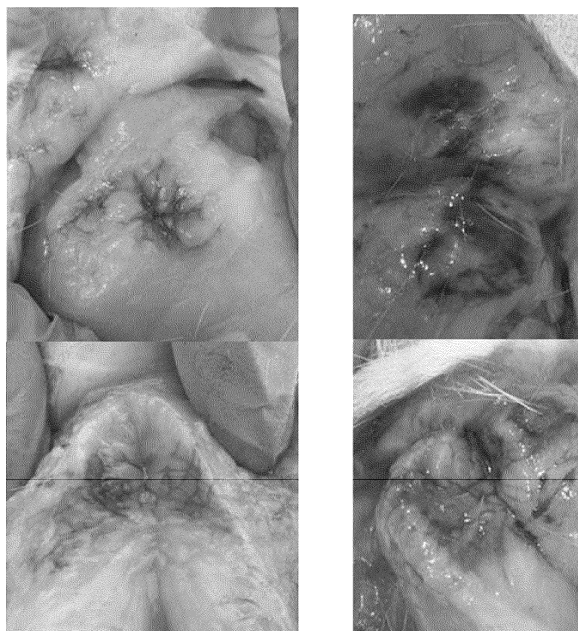
Фиг. 24



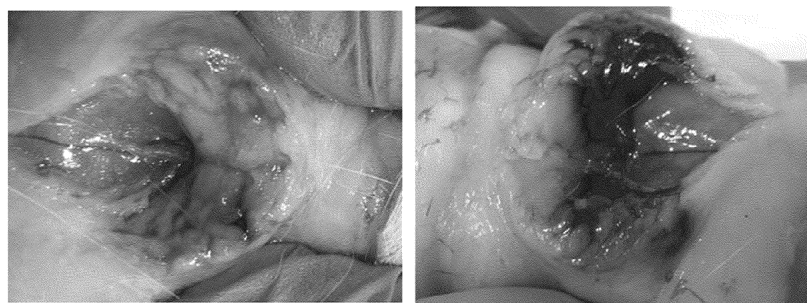
Фиг. 25



Фиг. 26

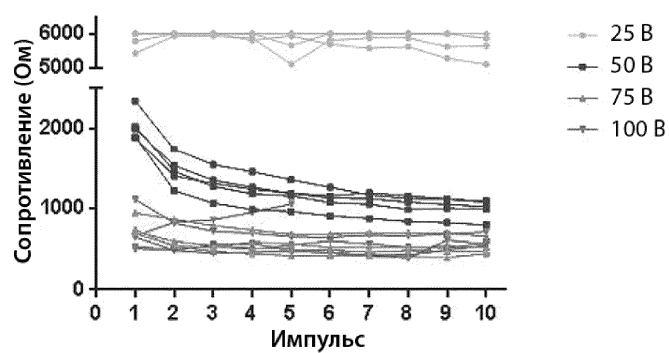


Фиг. 27



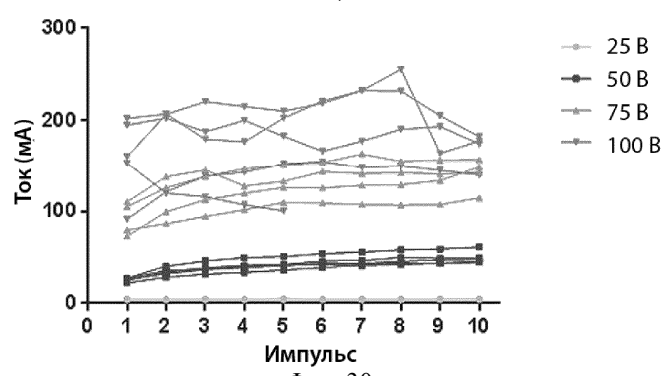
Фиг. 28

Сопротивление, на импульс

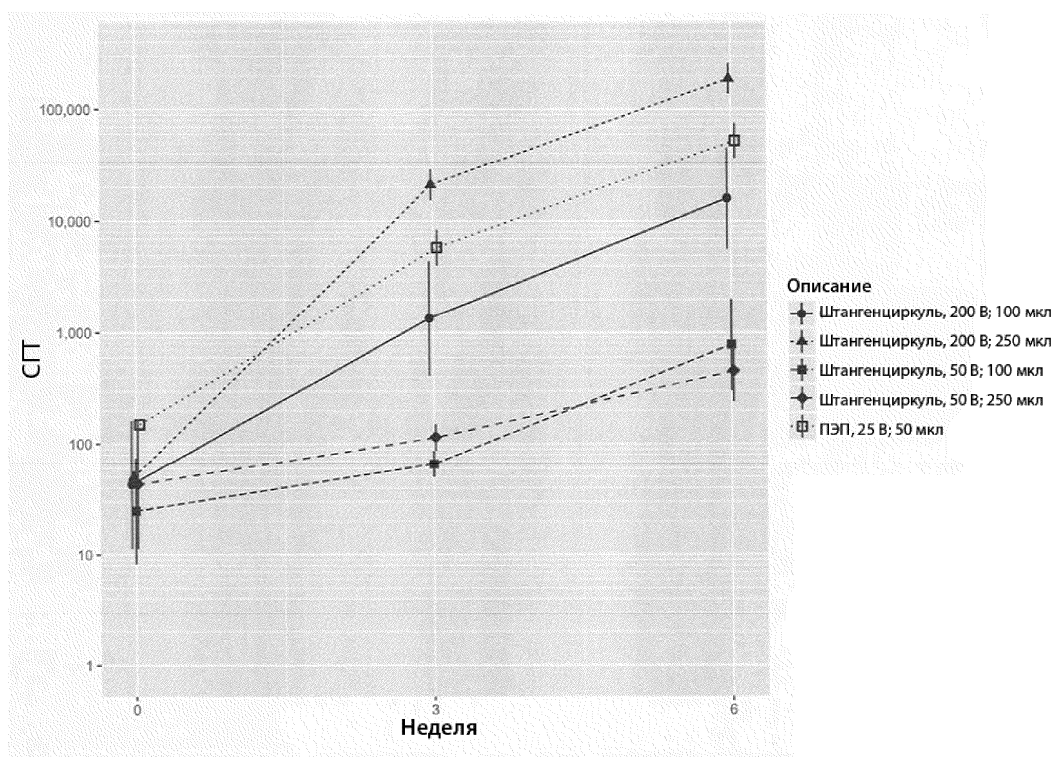


Фиг. 29

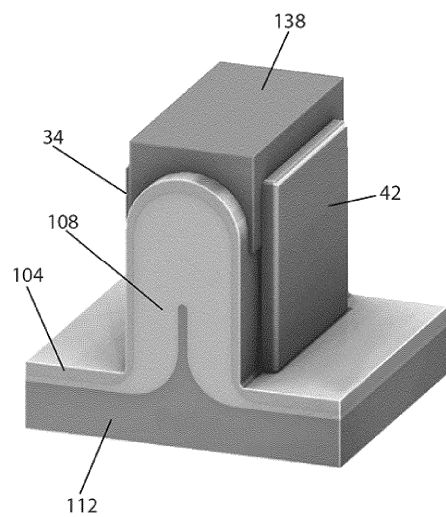
Ток, на импульс



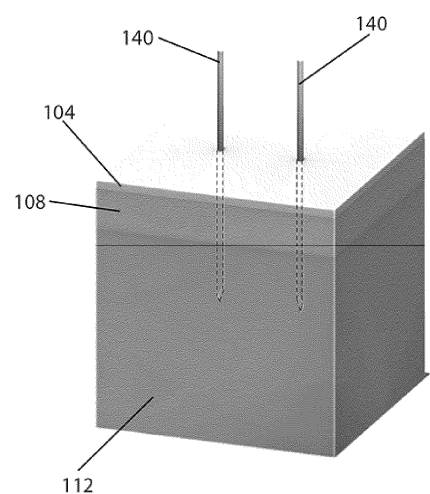
Фиг. 30



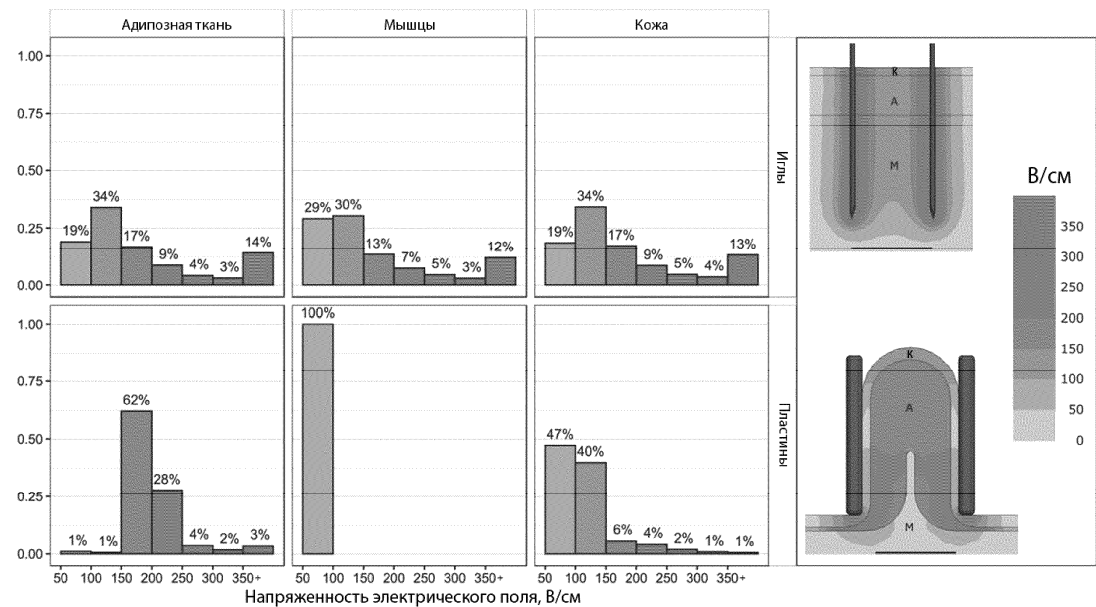
Фиг. 31



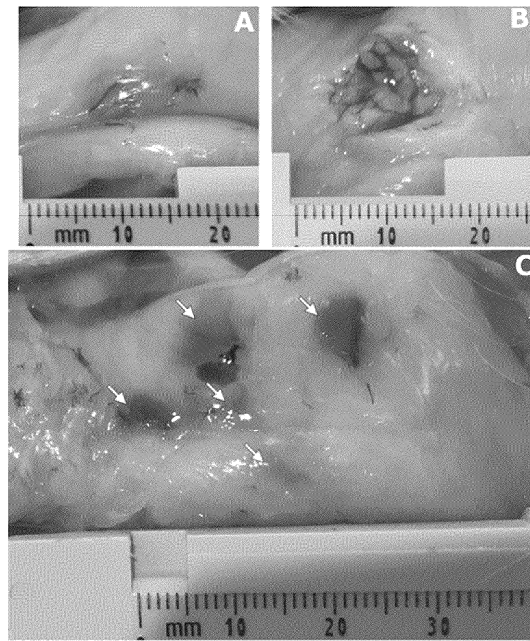
Фиг. 32



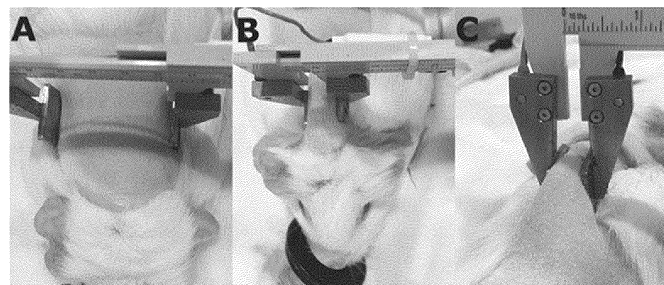
Фиг. 33



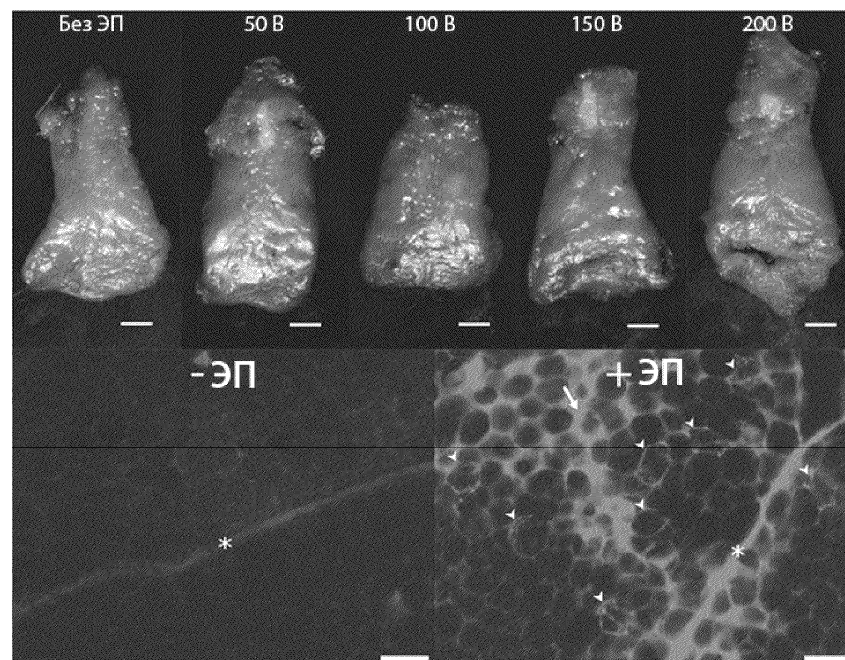
Фиг. 34



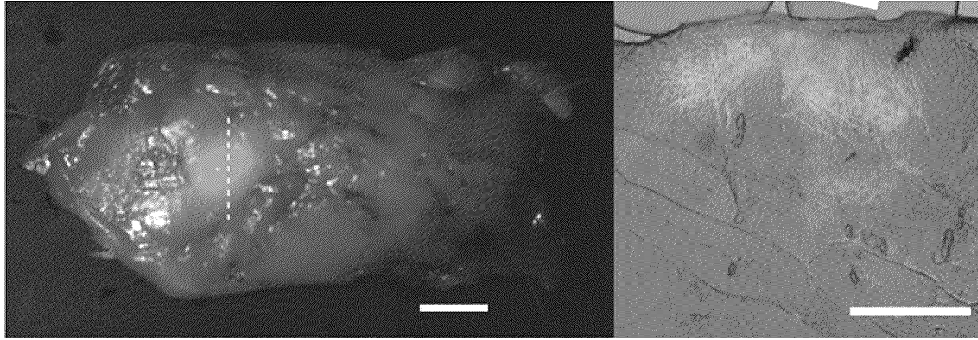
Фиг. 35



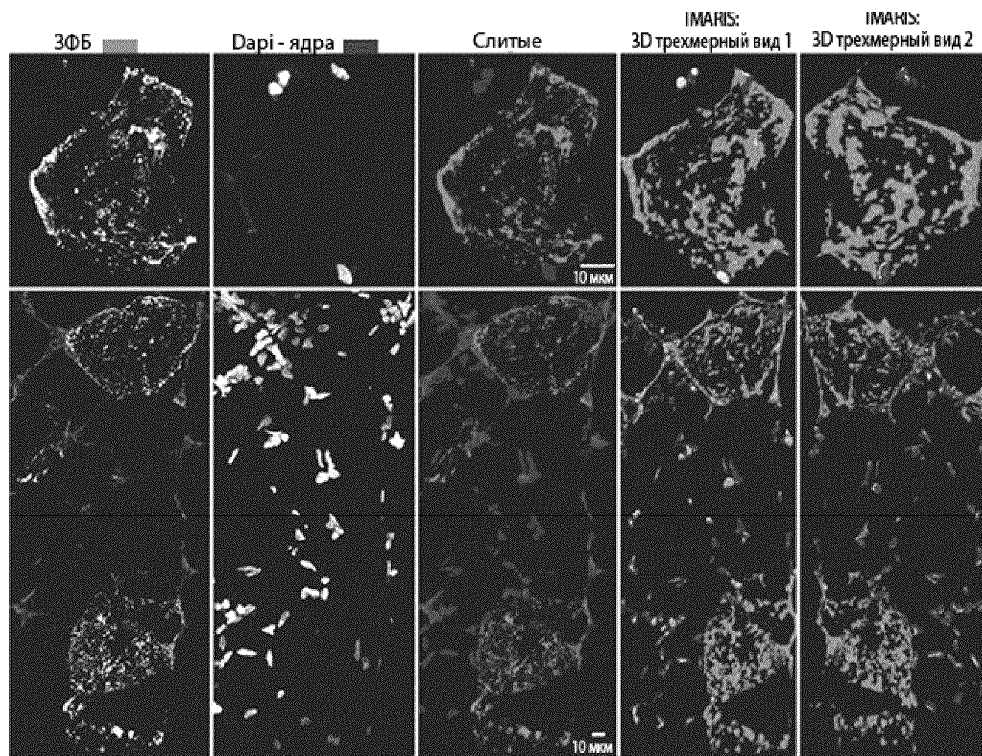
Фиг. 36



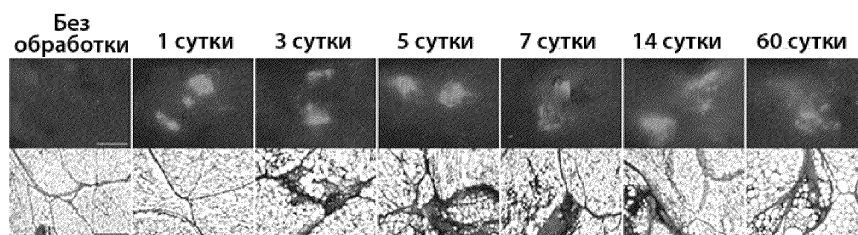
Фиг. 37



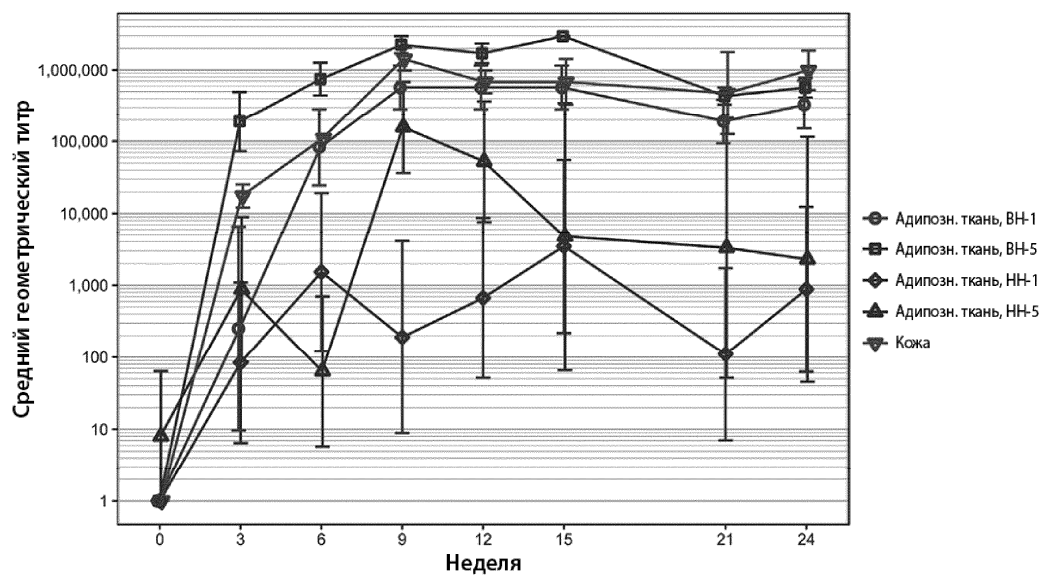
Фиг. 38



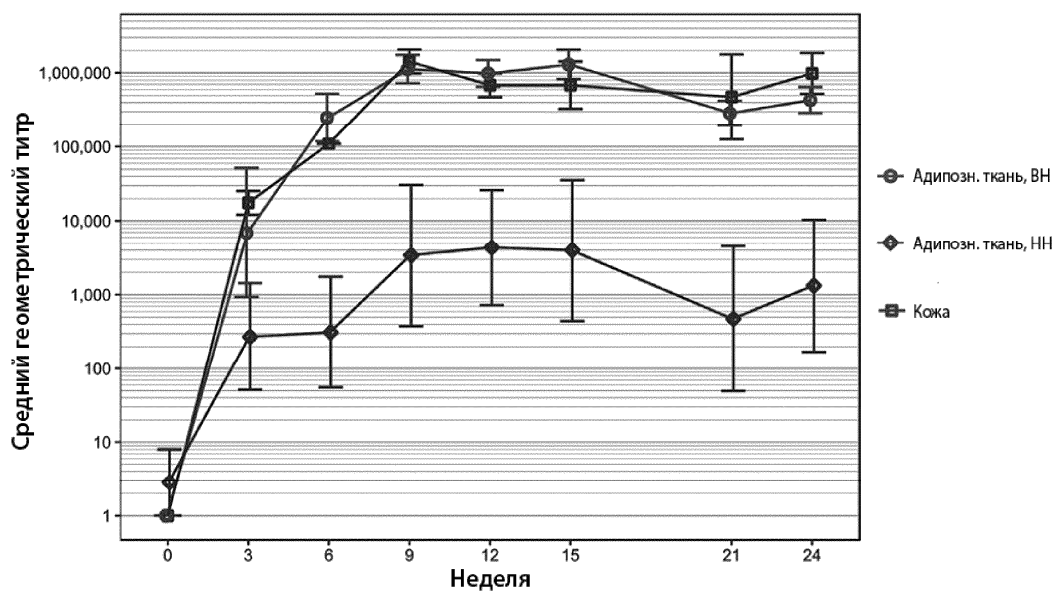
Фиг. 39



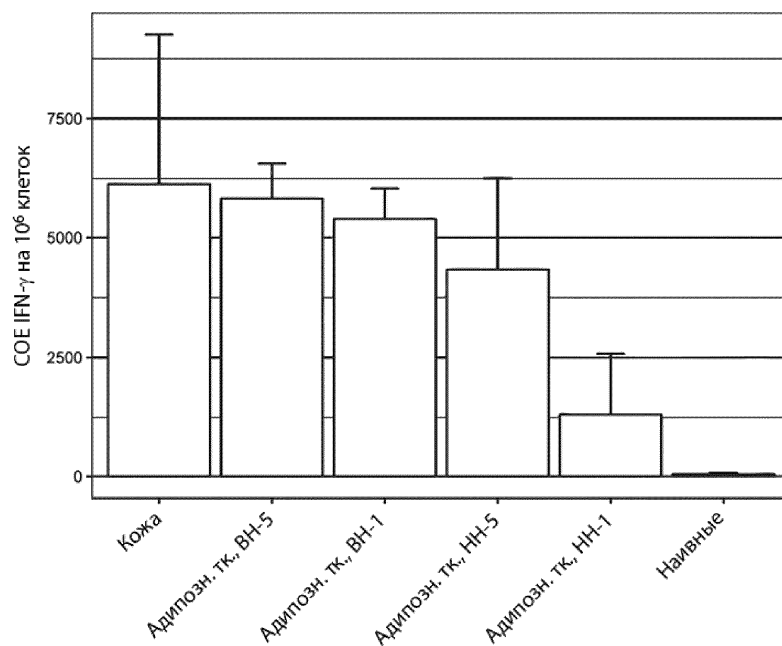
Фиг. 40



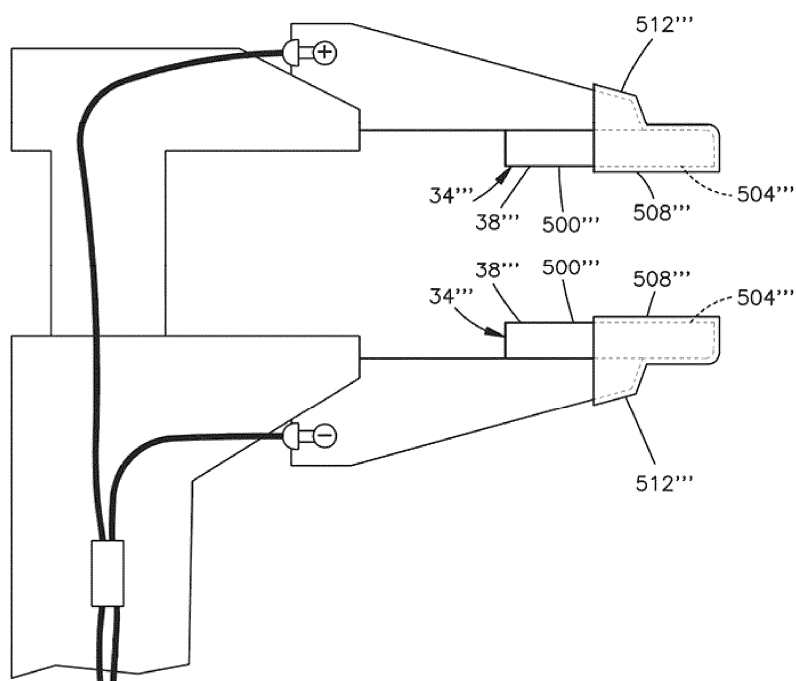
Фиг. 41



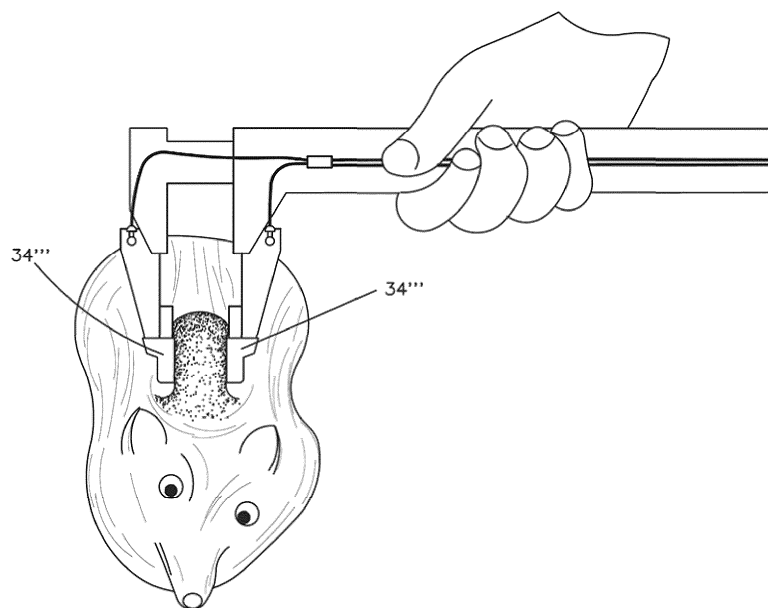
Фиг. 42



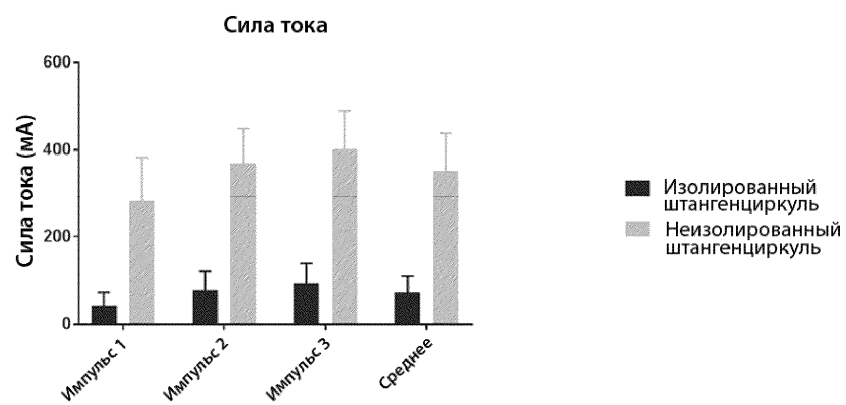
Фиг. 43



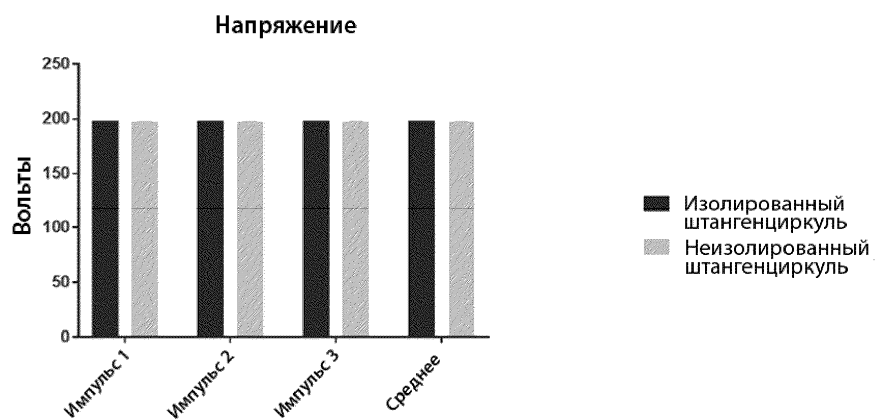
Фиг. 44



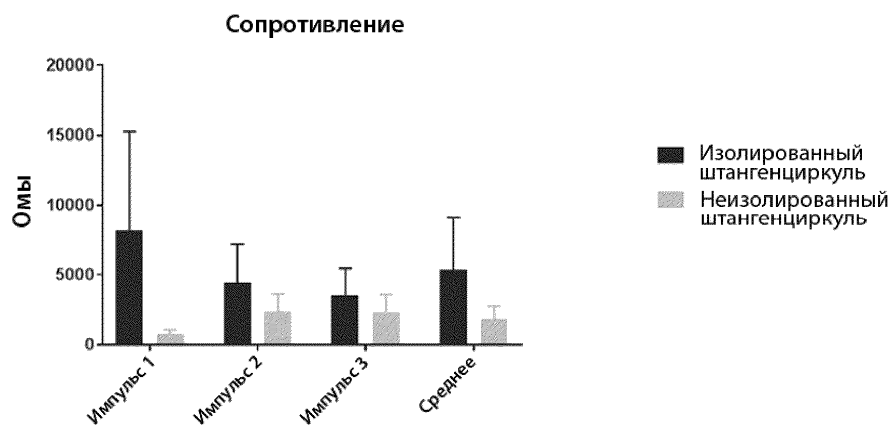
Фиг. 45



Фиг. 46



Фиг. 47



Фиг. 48

