



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108744262 A

(43)申请公布日 2018.11.06

(21)申请号 201810705618.6

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(22)申请日 2011.11.23

代理人 贺淑东

(30)优先权数据

61/416,686 2010.11.23 US

61/417,157 2010.11.24 US

61/454,115 2011.03.18 US

61/475,594 2011.04.14 US

61/475,858 2011.04.15 US

61/483,437 2011.05.06 US

(51)Int.Cl.

A61M 37/00(2006.01)

A61M 5/14(2006.01)

A61M 5/142(2006.01)

A61M 5/32(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

201180065642.4 2011.11.23

(71)申请人 普莱萨格生命科学公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 理查德·克林霍弗 詹森·弗雷泽

马克·格恩雷

权利要求书1页 说明书70页 附图17页

(54)发明名称

用于实体递送的治疗方法和组合物

(57)摘要

本文描述了一种给药装置,其包含针阵列、一种或多种流体药剂和至少一种水凝胶。该装置可同时沿各自的轴递送多种流体药剂至组织中。水凝胶的使用导致流体药剂的受限递送。药剂的受限递送还可通过将药物植入物沉积到组织中来实现。随后可评价药剂对组织的效果。此外,本发明涉及通过体内递送治疗剂来治疗肌病,以及报道组织在评价候选药物、检测和表征抗性中的应用。

1. 一种给药装置,其包含
 - (a) 定位为用于在组织内沿平行轴递送多种流体药剂的针阵列;以及
 - (b) 一种或多种流体药剂和水凝胶,其中所述药剂调配成在递送至所述组织后在所述组织中分散的程度低于缺乏所述水凝胶的相同流体药剂。
2. 如权利要求1所述的给药装置,进一步包含与所述针阵列相关联的致动器,并且所述流体药剂经由所述致动器进行分配。
3. 如权利要求1所述的给药装置,其中所述致动器包括柱塞。
4. 如权利要求1所述的给药装置,其中所述致动器包括泵。
5. 如权利要求1所述的给药装置,其中所述针阵列包含约1个至约1,000个针。
6. 如权利要求1所述的给药装置,其中所述针阵列包含约2个至约1,000个针。
7. 如权利要求1所述的给药装置,其中所述针阵列包含约5个至约1,000个针。
8. 如权利要求1所述的给药装置,其中所述流体药剂包含至少一种指示剂颗粒。
9. 如权利要求8所述的给药装置,其中所述指示剂颗粒选自金属颗粒、荧光染料、量子点、量子条形码、放射摄影造影剂、磁共振成像造影剂、阳性对照和阴性对照。
10. 如权利要求8所述的给药装置,其中所述指示剂颗粒包含染料。

用于实体递送的治疗方法和组合物

本申请是2011年11月23日提交的发明名称为“用于实体递送的治疗方法和组合物”的第201180065642.4号(国际申请号PCT/US2011/062128)中国专利申请的分案申请。

相关申请信息

[0001] 本申请根据35U.S.C.第119(e)条要求于2010年11月23日提交的美国临时申请61/416,686、于2010年11月24日提交的美国临时申请61/417,157、于2011年3月18日提交的美国临时申请61/454,115、于2011年5月6日提交的美国临时申请61/483,437、于2011年4月15日提交的美国临时申请61/475,858和于2011年4月14日提交的美国临时申请61/475,594的优先权;这些申请的内容通过引用完整并入。

技术领域

[0002] 总的来说,本文所公开的实施方案涉及用于将治疗剂引入生物组织以及随后对其进行评价的装置和方法,尤其涉及用于将多种药剂同时引入体内组织的装置和方法。

背景技术

[0003] 许多癌症相关的药剂正处于临床前及临床试验阶段,并在任何特定时间接受评价;然而,其中的大多数将无法取得进展。事实上,据估计超过90%的癌症相关治疗在I期或II期临床试验评价中将会失败。III期试验中的失败率几乎为50%,从发现直至通过III期试验,新药研发的成本为8亿美元至17亿美元,并且可能要花费8至10年时间。

[0004] 此外,许多受试者甚至对已显示为有效的标准药物无应答。由于目前还不是很了解或不容易评价的原因,一些受试个体对标准药物治疗无应答。肿瘤学领域的一个重大挑战是排除对候选药物具有细胞自主抗性的受试个体的药物选择,以降低发生不必要的副作用且无伴随益处的风险。一个相关的问题是许多肿瘤学候选药物需要过量的全身浓度以期在肿瘤部位达到期望的浓度,在许多低血管化的肿瘤中药物渗透较差使得这一问题更加复杂(Tunggal等人,1999Clin.Canc.Res.5:1583)。

[0005] 而且,过度活跃的致癌信号传导途径驱动癌症的发生、发展和维持。在一些情况下,癌细胞可能变得依赖于高度激活的信号,以致于对此信号进行药物抑制将导致肿瘤细胞死亡。这种依赖促使癌细胞重新发出(rewire)信号,发生赋予抗药性的突变,并最终在靶向抑制剂的存在下生长旺盛。结果,靶向药物显示有限的临床疗效。在该领域需要有效策略来对抗肿瘤的可塑性,是靶向整个途径而不是单个致癌蛋白质。而且,对在全途径分析中所鉴定的多个靶标的确认需要平行筛选多种候选治疗剂的能力。由于体外模型不能再现组织或肿瘤的体内环境中的信号传导,相对快速且便宜的体外筛选方法已导致候选药物在临床试验中的高失败率。因此,需要可有效评价各种候选药剂对癌症中所激活的信号传导途径各种组分的效果的体内筛选模型。

[0006] 杜氏肌营养不良(Duchenne Muscular Dystrophy,DMD)是肌肉营养不良中的最常见和严重的形式,也可从有效的药物筛选及递送中获益。杜氏肌营养不良(DMD)是由于缺乏肌养蛋白(dystrophin)而引起的,肌养蛋白是将肌纤维的细胞骨架与胞外基质相连接的多

蛋白质复合物(肌养蛋白相关的糖蛋白复合物(DAG))的组分。若缺乏肌养蛋白,该复合物在功能上受损,从而导致横纹肌纤维、心肌纤维和平滑肌纤维变性,且肌肉逐渐被脂肪和结缔组织所替代。DMD的临床过程是严重的且进行性的:受影响的个体可在出生时根据肌肉酶的高血清水平诊断出来,他们5岁前表现为肌无力,接着丧失独立行走的能力,并最终在青少年晚期或二十岁出头死于呼吸衰竭或心肌病。本领域中存在对肌肉疾病和病症如肌营养不良和少肌症进行治疗的需求。此外,全身施用例如血管内施用另外一些有前景的药剂是无效的,并且会导致不必要的全身副作用。因此,局部给药的治疗方法是有益的。

[0007] 本领域显然需要用于测试和递送候选药剂以及用于鉴定使受试个体受益的可能性增加的药剂的改良装置和方法。本发明满足了这些需求及类似的需求,并提供了其它相关的益处。

发明内容

[0008] 本发明一方面提供了一种给药装置,其包含(a)定位为用于在组织内沿平行轴递送多种流体药剂的针阵列;和(b)一种或多种流体药剂和水凝胶,其中该药剂调配为在递送至组织后在组织中分散的程度低于缺乏水凝胶的相同流体药剂。在某些进一步的实施方案中,该给药装置包含与针阵列相关联的致动器,流体药剂经由致动器分配。该致动器可包括柱塞或泵。

[0009] 该给药装置可包含1、2、3、4、5、6、7、8、8、10、15、20、30、50、100个或更多个针。在某些实施方案中,针阵列包含约1至约1,000个针。在某些其它实施方案中,针阵列包含约2至约1,000个针。在某些其它实施方案中,针阵列包含约5至约1,000个针。

[0010] 在一些实施方案中,流体药剂可包含至少一种指示剂颗粒。在一些进一步的实施方案中,指示剂颗粒选自金属颗粒、荧光染料、量子点、量子条形码、放射摄影造影剂、磁共振成像造影剂、阳性对照和阴性对照。在一些更进一步的实施方案中,指示剂颗粒包含染料。染料可以是荧光染料。在一些其它的实施方案中,流体药剂包含抗癌剂、抗炎剂、抗感染剂、再生剂、松弛剂、细胞凋亡抑制剂、细胞凋亡诱导剂、抗凝血剂、皮肤病药物、生长刺激剂、血管扩张剂、血管收缩剂(vasorestricting agent)、镇痛剂、抗过敏剂或其组合。在一些进一步的实施方案中,流体药剂包含抗癌剂。

[0011] 根据某些实施方案,组织来自于动物。在某些其它的实施方案中,组织来自于人。在一些实施方案中,组织是或疑似是癌性的、发炎的、感染的、萎缩的、麻木的、癫痫的(in seizure)或凝结的。在进一步的实施方案中,组织是或疑似是癌性的。在更进一步的实施方案中,组织是肿瘤。

[0012] 某些实施方案考虑采用水凝胶来控制流体药剂的递送。在一些实施方案中,所述水凝胶包含胶原蛋白。在一些实施方案中,所述水凝胶包含聚乙二醇(PEG)。PEG的分子量可以是至少500。在进一步的实施方案中,PEG的分子量为4,000-8,000。在另一个进一步的实施方案中,PEG的分子量为8,000-45,000。在一些实施方案中,所述水凝胶包含乳酸-乙醇酸共聚物。在某些另外的实施方案中,所述水凝胶包含聚己内酯。水凝胶可包含具有两种不同分子量范围的至少一种聚合物的二元混合物。在一些实施方案中,水凝胶是PEG。在进一步的实施方案中,两种不同的分子量范围包括500-2,000和4,000-8,000。在另一个进一步的实施方案中,两种不同的分子量范围包括4,000-8,000和10,000-45,000。在又一个进一步

的实施方案中,两种不同的分子量范围包括2,000-4,000和8,000-20,000。水凝胶在干燥状态下可具有至少20gf/cm²的抗张强度。在进一步的实施方案中,水凝胶在干燥状态下具有20-120gf/cm²的抗张强度。在一些实施方案中,水凝胶在水合状态下可具有至少5gf/cm²的抗张强度。在进一步的实施方案中,水凝胶在水合状态下具有5-15gf/cm²的抗张强度。

[0013] 在一些实施方案中,流体药剂和水凝胶在组织内沿平行轴递送。流体药剂的扩散速率可由水凝胶的孔径来控制。在一些实施方案中,孔径范围为约50nm至500μm。

[0014] 在一些实施方案中,该给药装置进一步包含一个或多个储器,每个储器与所述针中的各自一个流体连通。给药装置可具有两个或更多个、五个或更多个或十个或更多个储器,每个储器与所述针中的各自一个流体连通。每个储器可包含相同或不同的流体药剂。在一个实施方案中,所述储器都不包含与任何其它储器中的药剂相同的流体药剂。在另一实施方案中,所述储器中的至少两个包含相同的流体药剂。在进一步的实施方案中,不同储器中的相同流体药剂的浓度是不同的。在又一实施方案中,所述储器中的至少一个包含至少两种流体药剂。

[0015] 所述针可以是多孔针。在一些实施方案中,所述一个或多个针中的至少一个沿其长度包含多个口(ports)。在进一步的实施方案中,多个口的分布密度与其各自距针尖端的距离负相关。在另一个进一步的实施方案中,多个口中每一个的尺寸与其各自距针尖端的距离负相关。另一方面,针可能对于流体药剂是不可透过的。针既不是由多孔材料制成的,沿其长度也不具有孔。在一些实施方案中,给药装置可进一步包含一个或多个多孔管。多孔管可包含流体药剂和水凝胶。多孔管的孔径可控制流体药剂的扩散速率。

[0016] 本发明的另一方面是提供一种将候选药剂递送到动物组织中的方法,该方法包括:(a)经由包含针的给药装置将至少一种包含水凝胶的药物组合物沉积到组织中;以及(b)将该药物组合物分配到组织中,其中该药物组合物包含一种或多种候选药剂,并且其中该药物组合物在组织中分散的程度低于缺乏水凝胶的相同药物组合物。本发明的又一方面是一种将候选药剂递送到动物组织中的方法,该方法包括:(a)用一个或多个包含一种或多种候选药剂的药物植入物装填包含针的给药装置;以及(b)使用所述给药装置将所述一个或多个药物植入物插入组织中。该给药装置可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、100个或更多个针。在某些进一步的实施方案中,给药装置包含致动器。致动器可以是柱塞或泵。给药装置可包含至少一个储器。在一些实施方案中,给药装置包含2个或更多个储器,每个储器与所述针中的各自一个连通。在其它实施方案中,给药装置包含5个或更多个储器,每个储器与所述针中的各自一个连通。在其它实施方案中,给药装置包含10个或更多个储器,每个储器与所述针中的各自一个连通。每个储器中的候选药剂可以是相同或不同的。在一些实施方案中,所述储器都不包含与任何其它储器中的药剂相同的候选药剂。在一些其它的实施方案中,所述储器中的至少两个包含相同的候选药剂。在进一步的实施方案中,不同储器中的相同流体药剂的浓度是不同的。在又一些其它的实施方案中,所述储器中的至少一个包含两种或更多种候选药剂。插入到组织中的候选药剂的数目可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、50、100种或更多。在一些实施方案中,候选药剂在与递送轴共轴的、大致为柱形的区域内分配。在一些其它实施方案中,候选药剂在组织内沿平行轴分配。在一些其它实施方案中,候选药剂以系统可检测的浓度或以低于系统可检测浓度的浓度递送。动物可以是人、小鼠、大鼠或狗。

[0017] 某些实施方案考虑使用指示剂颗粒。在一些实施方案中,候选药剂包含至少一种指示剂颗粒。在一些进一步的实施方案中,指示剂颗粒选自金属颗粒、荧光染料、量子点、量子条形码、放射摄影造影剂、磁共振成像造影剂、阳性对照和阴性对照。在另一个进一步的实施方案中,指示剂颗粒是荧光染料。在更进一步的实施方案中,可在组织内对荧光染料进行成像,从而监测候选药剂的分布(disbursement)。各实施方案中的候选药剂可包含抗癌剂、抗炎剂、抗感染剂、再生剂、松弛剂、细胞凋亡抑制剂、细胞凋亡诱导剂、抗凝血剂、皮肤病药物、生长刺激剂、血管扩张剂、血管收缩剂、镇痛剂、抗过敏剂、基因调节剂、RNAi分子或其组合。在进一步的实施方案中,候选药剂包含抗癌剂。组织可来自人或小鼠。在一些实施方案中,组织是或疑似是癌性的。在进一步的实施方案中,组织是肿瘤。在更进一步的实施方案中,肿瘤选自良性肿瘤和恶性肿瘤。

[0018] 某些实施方案考虑用水凝胶来控制候选药剂的递送。在一些实施方案中,所述水凝胶包含胶原蛋白。在一些实施方案中,所述水凝胶包含聚乙二醇(PEG)。PEG的分子量可为至少500。在进一步的实施方案中,PEG的分子量为4,000-8,000。在另一个进一步的实施方案中,PEG的分子量为8,000-45,000。在一些实施方案中,所述水凝胶包含乳酸-乙醇酸共聚物。在一些另外的实施方案中,所述水凝胶包含聚己内酯。在一些实施方案中,将一种或多种候选药剂和水凝胶装填到多孔管中,然后将其插入组织中。在一些实施方案中,针包括多孔针。在其它实施方案中,针对于药物组合物和候选药剂是不可透过的。水凝胶可包含具有两种不同分子量范围的至少一种聚合物的二元混合物。在一些实施方案中,水凝胶是PEG。在进一步的实施方案中,两种不同的分子量范围包括500-2,000和4,000-8,000。在另一个进一步的实施方案中,两种不同的分子量范围包括2,000-4,000和8,000-20,000。在又一个进一步的实施方案中,两种不同的分子量范围包括4,000-8,000和10,000-45,000。水凝胶在干燥状态下可具有至少20gf/cm²的抗张强度。在进一步的实施方案中,水凝胶在干燥状态下具有20-120gf/cm²的抗张强度。在一些实施方案中,水凝胶在水合状态下可具有至少5gf/cm²的抗张强度。在进一步的实施方案中,水凝胶在水合状态下具有5-15gf/cm²的抗张强度。

[0019] 在一些实施方案中,流体药剂和水凝胶在组织内沿平行轴递送。流体药剂的扩散速率可由水凝胶的孔径来控制。在一些实施方案中,孔径范围为约50nm至500μm。

[0020] 某些进一步的实施方案考虑采用染料来检测生物学功能的激活和失活。在一个实施方案中,药物组合物包含染料。染料使生物学功能的激活和失活得以检测。生物学功能是途径、酶的活性、基因的表达、药物敏感性、抗药性、基因的转录、与基因相关的RNA分子的翻译或肽合成。在一些实施方案中,生物学功能与癌症、退行性疾病、炎症、代谢、细胞凋亡或免疫应答有关。在进一步的实施方案中,生物学功能与癌症有关。在更进一步的实施方案中,生物学功能是细胞凋亡途径,并且所述染料报道细胞凋亡。可通过测定荧光来进行检测。在一些实施方案中,可对染料进行成像,从而允许检测生物学功能的激活或失活。在进一步的实施方案中,根据成像的结果可预测治疗剂潜在的治疗价值。在另一实施方案中,根据成像可量化生物学功能的激活或失活。

[0021] 在一些实施方案中,药物植入物包含允许药物在组织内持续或延时释放的生物可降解的惰性粘合剂。药物植入物包含至少一种固体形式的候选药剂。在一些实施方案中,候选药剂在一分钟到六周的一段时间内释放。一个或多个药物植入物中的每一个可具有小于

约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1mm的直径。每个针可配置为用于接受1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20个或更多个所述药物植入物。可向组织中插入多个药物植入物，如2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个。

[0022] 某些实施方案涉及评价所述一种或多种候选药剂对组织的效果。某些实施方案进一步包括以下选项之一：(i) 基于所述评价选择至少一种所述药剂；(ii) 基于所述评价取消对至少一种所述药剂的选择；和(iii) 基于所述评价将至少两种所述药剂按优先级排序(prioritizing)。在一些实施方案中，可在已将一种或多种候选药剂预先递送到组织的方法中评价一种或多种流体药剂对组织的效果。在一些实施方案中，评价包括在引入所述一种或多种候选药剂之后分析至少一部分预切除的组织。在某些其它的实施方案中，评价包括在引入所述一种或多种候选药剂之后分析至少一部分预切除的组织。在某些进一步的实施方案中，切除或预切除可在引入所述一种或多种候选药剂后的一天到六周内进行。在一些实施方案中，评价包括对组织进行成像。成像包括放射摄影成像、磁共振成像、正电子发射断层显像和生物光子成像。在某些实施方案中，成像发生在引入所述一种或多种候选药剂之前、期间或之后。在某些实施方案中，评价包括检测改变的生理状态。

[0023] 一方面，本发明提供了一种使用报道组织筛选候选药剂的方法，包括以下步骤：a) 产生在途径调节时能产生可检测信号的报道细胞系；b) 由所述报道细胞系构建报道组织；和c) 通过使用针阵列将所述多种候选药剂递送至所述报道组织，并检测所述可检测信号，来评估多种候选药剂对所述报道组织的功效。在一些实施方案中，报道组织包括异种移植的肿瘤。调节可包括激活，或者可包括抑制。在一些实施方案中，多种候选药剂中的每一种包含选自基因治疗剂、化疗剂、小分子、抗体、蛋白质、小干扰RNA、微小RNA、反义RNA、核酶、可检测标记物、治疗性蛋白质、治疗性细胞、细胞因子、抗体-药物偶联物、抗体、多肽和拟肽(peptidomimetic)的药剂。在一些进一步的实施方案中，候选药剂包括抗癌剂。多种候选药剂中的每一种可以在水凝胶内。报道细胞系可包含展现出萤光素酶基活性的基因捕获陷阱(gene trap)。此外，报道细胞系可包含与内源性启动子相关联的报道基因。可检测信号可包含荧光。在一些实施方案中，荧光由荧光蛋白产生，该荧光蛋白选自GFP、BFP、CFP、YFP、EGFP、EYFP、Venus、Citrine、phiYFP、copGFP、CGFP、ECFP、Cerulean、CyPet、T-Sapphire、Emerald、YPet、AcGFP1、AmCyan、AsRed2、dsRed、dsRed2、dsRed-Express、EBFP、HcRed、ZsGreen、ZsYellow、J-Red、TurboGFP、Kusabira Orange、Midoriishi Cyan、mOrange、DsRed-单体、mStrawberry、mRFP1、tdTomato、mCherry、mPlum和mRaspberry。在进一步的实施方案中，所述荧光蛋白是GFP。此外，可检测信号可包括由酶反应所生成的可检测产物。在一些其它实施方案中，酶选自：过氧化物酶、碱性磷酸酶、半乳糖苷酶、萤光素酶和内酰胺酶。在进一步的实施方案中，酶是萤光素酶。在一些实施方案中，评估包括在注射后对所述报道组织进行成像以观测所述可检测信号。在一些实施方案中，该方法进一步包括在成像之前切除报道组织并任选地对其进行切片的步骤。在一些其它实施方案中，该方法进一步包括在成像之前预先切除报道组织并任选地对其进行切片的步骤。

[0024] 另一方面，本发明提供了一种确定实体组织内对药剂的响应的方法，包括以下步骤：a) 获取能在信号传导途径调节时产生可检测信号的报道细胞系的实体组织；b) 将多种治疗剂递送至所述实体组织；和c) 检测所述可检测信号以确定对一种或多种所述治疗剂的响应。在一些实施方案中，该方法进一步包括由步骤(a)的报道细胞系产生在所述信号传导

途径调节时能产生第二可检测信号的报道细胞系的步骤。第一可检测信号可指示信号传导途径的激活,而第二可检测信号可指示信号传导途径的抑制。在一些实施方案中,该方法进一步包括分离细胞的步骤,该细胞先前响应于所述一种或多种治疗剂而产生所述第二可检测信号,但现在响应于所述一种或多种治疗剂而产生所述第一可检测信号。在一些实施方案中,该方法进一步包括分离细胞的步骤,该细胞先前响应于所述一种或多种治疗剂而产生所述可检测信号,但现在不再产生所述可检测信号。在一些实施方案中,该方法进一步包括以下步骤:对至少一种来自所述分离的细胞的核酸进行测序,以确定对一种或多种所述治疗剂的响应的变化的遗传基础。所述至少一种核酸可以是基因组DNA或信使RNA。调节可包括激活或抑制。获取可包括工程化构建实体组织,后者可包括肿瘤或异种移植的肿瘤。可检测信号可包括选自生色团、荧光团、荧光蛋白、磷光染料、串联染料、颗粒、半抗原、放射性同位素和酶(包括萤光素酶)的化学发光底物的分子。

[0025] 又一方面,本发明提供一种用于确定对药物的体内响应的遗传基础的方法,包括以下步骤:a)将药物递送至由在途径调节时产生可检测信号的报道细胞系衍生的报道组织;b)分离所述报道组织内响应于所述药物而显示出所述可检测信号的细胞群;和c)对所述细胞群的至少一种核酸进行测序以确定药物响应的遗传基础。测序可包括高通量测序。该方法可进一步包括全基因组扩增的步骤,或基因组DNA扣除杂交的步骤,该基因组DNA来自不会响应于药物显示出可检测信号的细胞群。

[0026] 又一方面,本发明提供了一种用于确定对癌症治疗的抗性的方法,包括以下步骤:a)对在途径调节时能产生可检测信号的报道组织施用多种癌症治疗;b)分离所述报道组织内响应于所述多种癌症治疗中的一种或多种而显示出所述可检测信号的细胞群;和c)对来自该细胞群的至少一种核酸进行测序,从而确定对选定的癌症治疗的抗性。施用可包括用针阵列进行注射。调节可包括激活或抑制。分离可包括细胞分选。测序可包括高通量测序。

[0027] 在进一步的方面,本发明提供了一种产生报道细胞系的方法,包括以下步骤:a)获取包含活跃信号传导途径的细胞系;b)用基因捕获载体将报道基因随机整合到所述细胞系的基因组中的多个位置;c)分离响应于所述信号传导途径的抑制剂而表达该报道基因的细胞群;和d)由所选细胞生产报道细胞系。该方法在步骤c后可进一步包括进行第二轮选择以分离响应于所述信号传导途径的第二抑制剂而另外表达该报道基因的细胞的步骤。该方法在步骤b后可进一步包括除去组成型表达该报道基因的细胞的步骤。在一些实施方案中,细胞系是癌细胞系。在一些实施方案中,信号传导途径选自Akt途径、PI3K途径、MEK途径、mTOR途径、EGF途径或Ras途径。在一些实施方案中,抑制剂选自Gefitinib、MK-2206和PD325901。报道基因可以是基于萤光素酶的报道基因。

[0028] 另一方面,本发明提供了一种用于确定对癌症治疗的抗性的方法,包括以下步骤:a)对在途径调节时能产生可检测信号的报道组织施用多种癌症治疗;b)分离所述报道组织内响应于所述多种癌症治疗中的一种或多种而显示出所述可检测信号的细胞群;和c)评估基因的拷贝数,从而确定对选定癌症治疗的抗性。

[0029] 另一方面,本发明涉及治疗肌病。在一个实施方案中,提供了一种局部递送用于治疗受试者的肌肉疾病或病症的疗法的方法,包括使用包含多个针的针阵列装置向所述受试者的组织同时体内施用治疗剂。该疗法可包括基因替代疗法、微小RNA疗法、RNAi疗法、抗体疗法和适体疗法。肌肉疾病或病症可选自:杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良(Becker

muscular dystrophy)、肢带型肌营养不良 (Limb Girdle muscular dystrophy)、面肩肱型肌营养不良 (facioscapulohumeral muscular dystrophy)、先天性肌营养不良、眼咽型肌营养不良 (oculopharyngeal muscular dystrophy)、远端型肌营养不良、埃-德型肌营养不良 (Emery-Dreifuss muscular dystrophy)、肌萎缩、X染色体连锁型脊髓延髓肌肉萎缩症 (spinal-bulbar muscular atrophy, SBMA)、恶病质、营养不良、结核病、麻风病、糖尿病、肾脏疾病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、癌症、终末期肾衰竭、烧伤、糖尿病、充血性心力衰竭、少肌症、肺气肿、骨软化症或心肌病。针可包括多孔针或药剂不可透过的针。在一些实施方案中, 针配置为通过肌肉内注射进行递送。在一些实施方案中, 基因或基因替代治疗剂被递送到超过1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的单肢大肌纤维中。组织可以是脑、肝、肺、肾、前列腺、卵巢、脾脏、淋巴、甲状腺、胰腺、心脏、肌肉、肠、喉、食道或胃组织。在进一步的实施方案中, 肌肉是骨骼肌、平滑肌或心肌。在一些实施方案中, 基因替代治疗剂包含腺病毒、单纯疱疹病毒 (HSV)、杆状病毒、腺相关病毒 (AAV)、重组腺相关病毒 (rAAV)、逆转录病毒或慢病毒。

[0030] 另一方面, 提供了一种将选定基因在体内递送至受试者肌肉组织的方法, 所述方法包括: (a) 提供包含病毒载体的病毒, 所述病毒载体包含与能够指导所述选定基因的体内转录和翻译的控制元件有效连接的所述选定基因; 和 (b) 使用包含多个针的针阵列装置将所述病毒在体内引入所述肌肉组织。在一些实施方案中, 受试者可以是非人灵长类动物、小鼠、狗、大鼠、兔、猪、绵羊、马、牛、山羊、沙鼠、仓鼠、豚鼠或人。在某些实施方案中, 基因可包含肌养蛋白。在某些进一步的实施方案中, 基因可包含编码蛋白质的肌养蛋白小基因或该肌养蛋白小基因的互补序列, 其中该蛋白质包含: (a) 肌养蛋白蛋白质的N-端结构域或肌养蛋白蛋白质的修饰的N-端结构域; (b) 肌养蛋白蛋白质的五个杆状重复序列; (c) 肌养蛋白基因的H1结构域和肌养蛋白蛋白质的H4结构域; 和 (d) 肌养蛋白蛋白质的富含半胱氨酸的结构域, 其中所述核苷酸序列具有少于5,000个核苷酸。在一些实施方案中, 编码肌生成抑制蛋白 (myostatin) 抑制剂。在一些进一步的实施方案中, 肌生成抑制蛋白抑制剂是肌生成抑制蛋白前肽、滤泡素抑制素、其它滤泡素抑制素样蛋白质、FLRG或GASP-1。在一些实施方案中, 该基因与一个或多个控制元件有效连接。在一些进一步的实施方案中, 所述一个或多个控制元件中的每一个选自: AAV反向末端重复序列、逆转录病毒长末端重复序列、巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、CMV增强子、 β -肌动蛋白启动子、 α -肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、肌特异性肌酸激酶 (MCK) 启动子和MCK增强子。在一些实施方案中, 其中AAV选自: AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10和AAV-11。在进一步的实施方案中, AAV是AAV-6。在一些实施方案中, 基因替代治疗剂包含干细胞。在进一步的实施方案中, 干细胞是胚胎干细胞、成体干细胞或诱导多能干细胞。在一些实施方案中, 针包含至少一个多孔针。在一些实施方案中, 针可包含至少两个多孔针。

援引并入

[0031] 本说明书中所提到的所有出版物、专利和专利申请通过引用以同样程度并入本文, 犹如每个单独的出版物、专利或专利申请特别地和单独地被指出为通过引用而并入。

附图说明

[0032] 本发明的新特征在随附的权利要求中具体阐述。通过参考以下阐述了利用本发明

原理的说明性实施方案的详细描述和附图,将更好地理解本发明的特征和优点,在附图中:

- [0033] 图1示出了一种向动物中的肿瘤施用候选药剂的方法。
- [0034] 图2是根据各实施方案用于向生物组织注射治疗剂的针阵列组件的示意图。
- [0035] 图3是根据一个实施方案的递送组件的图解视图。
- [0036] 图4显示了根据一个实施方案的针阵列的图。
- [0037] 图5显示了根据另一个实施方案的递送组件的元件。
- [0038] 图6图解显示了说明本发明原理的肿瘤的一部分。
- [0039] 图7是根据一个实施方案的数据处理系统的图示。
- [0040] 图8示出了经由多孔针施用了多柔比星的淋巴瘤的切片。
- [0041] 图9示出了在多个肿瘤深度处空间受限的细胞杀伤的显微镜成像。
- [0042] 图10示出了将四种不同量的荧光染料空间受限地注入肿瘤的荧光显微镜成像。
- [0043] 图11示出了人髓母细胞瘤样品中对音猬因子(Hedgehog)途径拮抗作用的离体响应。
- [0044] 图12示出了空间受限注射后的肿瘤杀伤。
- [0045] 图13示出了注射了载体或Shh拮抗剂的小鼠的存活情况。
- [0046] 图14示出了注射了多柔比星和对照的小鼠肿瘤的荧光成像。
- [0047] 图15示出了肿瘤中空间受限的慢病毒表达。
- [0048] 图16示出了肿瘤中的KIF11shRNA注射。
- [0049] 图17示出了肿瘤中响应于shRNA注射的细胞死亡。
- [0050] 图18示出了利用报道细胞系来评价候选治疗剂功效的方法的方案。
- [0051] 图19示出了利用报道细胞系来确定治疗抗性的遗传基础的方法的方案。
- [0052] 图20示出了用于产生报道细胞系的选择策略。A:被感染的细胞(10^7),AKT活性系; B:无捕获陷阱,途径捕获陷阱(10^5)以及组成型活性捕获陷阱;C:途径捕获陷阱,脱靶捕获陷阱(100)以及无捕获陷阱;D:途径捕获陷阱(1-10)以及脱靶捕获陷阱。
- [0053] 图21描绘了本发明的多孔针阵列。
- [0054] 图22显示了染料、药物和慢病毒的局部递送。
- [0055] 图23显示了采用多孔针阵列筛选化合物的合并策略(pooling strategy)。
- [0056] 图24显示多孔针介导的GSK3抑制剂注射诱导了肿瘤中 β -联蛋白驱动的萤光素酶活性。其中A.7针阵列头设计。红点和蓝点分别标记GSK3抑制剂BIO和CHIR99021的位置。B.注射测试药剂24小时后活小鼠体内萤光素酶激活的成像。红色和黑色箭头分别标记BIO和CHIR99021的位置。注射BIO导致强烈的但空间受限的信号。C.同一肿瘤的厚切片,证明萤光素酶信号传导模式在肿瘤的中心维持。该试验重复3次。

发明详述

概述

[0057] 本发明提供了用于将流体药剂空间受限地递送至实体组织的装置和方法。本发明的特征在于水凝胶连同针阵列一起使用,以通过经水凝胶的孔扩散来递送流体药剂,从而允许通过改变诸如孔径等参数来控制递送。递送参数如定位和递送速率的控制治疗及诊断应用中具有许多优点。

[0058] 在一些优选的实施方案中,利用精确定位的递送针阵列将包含水凝胶和一种或多

种流体药剂的组合物沿平行轴插入实体组织内,该递送针阵列与致动器模块如柱塞或泵耦合,从而允许各自含有不同流体药剂的多种组合物在组织内沿平行轴受控插入。在一些情况下,插入后通过穿过水凝胶基质中的孔扩散而发生被动递送。

[0059] 在一些实施方案中,给药装置进一步包含一个或多个储器,每个储器与所述针中的各自一个流体连通。给药装置可具有两个或更多个、五个或更多个或十个或更多个储器,每个储器与所述针中的各自一个流体连通。每个储器中可包含相同或不同的流体药剂。在一个实施方案中,所述储器都不包含与任何其它储器中的药剂相同的流体药剂。在另一实施方案中,所述储器中的至少两个包含相同的流体药剂。在进一步的实施方案中,不同储器中的相同流体药剂的浓度是不同的。在又一实施方案中,所述储器中的至少一个包含至少两种流体药剂。

[0060] 在一些优选的实施方案中,利用递送装置如针将一种或多种水凝胶组合物插入生物体的靶组织中。在一些情况下,超过1、2、3、4、5、6、10、20、50、100或1,000个针排成阵列,使得这些针将多种组合物递送至组织内的多个平行区域。插入后,两种或更多种水凝胶可以占据组织中的平行柱状区,这些柱状区取决于针的尺寸、形状和配置。在一些优选的情况下,利用孔径和扩散速率将经由这些管的实体递送限制于组织内的柱状区。在一些优选的实施方案中,递送通过多孔针的孔而发生。一个或多个多孔针可配置成阵列用于平行递送。在一些其它优选的实施方案中,将具有或不具有水凝胶的流体药剂装填于多孔管中,然后将其插入组织内。流体药剂的递送由多孔管的孔径控制。

[0061] 空间限制允许在组织中对多种候选治疗剂进行平行筛选,以及通过在组织中跨轴引入每种候选治疗剂来控制组织异质性。在某些实施方案中,选定的组织区域是受试者实体组织的一部分,并且在某些进一步的实施方案中,受试者是临床前模型或人类受试者之一。在某些其它实施方案中,该方法包括在引入之后切除至少该部分组织。在某些其它实施方案中,该方法包括在引入之后预切除至少该部分组织。某些进一步的实施方案包括在切除前对组织进行成像、在切除的同时对组织进行成像和在切除后对组织进行成像中的至少一种。在某些其它实施方案中,切除包括在引入一种或多种流体药剂后某一选定的时间段切除至少该部分组织。选定的时间段可以为约2至96小时。在某些实施方案中,选定的时间段为超过一周的一段时间。在切除后,空间受限地递送多种候选药剂可允许对药剂的相对功效进行离体分析。

[0062] 本文公开的一些实施方案涉及一种将流体相药剂受限递送至实体组织的方法。此选择性递送不必为了在期望的实体组织中达到治疗有效的浓度而需要过量的治疗剂或候选药剂的全身浓度,从而避免了对无关组织产生临床上有害的毒性,还避免了不良的副作用。可以以系统可检测的浓度或低于系统可检测浓度的浓度递送流体药剂以达到期望的效果。

[0063] 在一些实施方案中,本方法涉及测试和递送癌症药剂,其中多种候选治疗剂沿肿瘤的平行轴递送。此类方法允许对候选肿瘤学药物进行有效的临床前研究和临床研究,并有助于鉴定具有使受试个体受益的较高可能性的治疗剂。本发明提供了在评价癌症治疗中有用的方法,并且允许将疾病细胞可能对其有抗性的候选药物从筛选程序或治疗方案中早期排除。

[0064] 在一些实施方案中,可在已将一种或多种流体药剂预先递送到肿瘤的方法中评价

一种或多种候选药剂对肿瘤的效果。在一些实施方案中,评价包括在引入所述一种或多种候选药剂之后分析至少一部分预切除的组织。在某些其它实施方案中,评价包括在引入所述一种或多种候选药剂之后预切除肿瘤的至少一部分。在某些进一步的实施方案中,切除或预切除可在引入所述一种或多种候选药剂后的一天到六周内进行。在一些实施方案中,评价包括对肿瘤进行成像。成像包括放射摄影成像、磁共振成像、正电子发射断层显像和生物光子成像。在某些实施方案中,成像发生在引入所述一种或多种候选药剂之前、期间或之后。在某些实施方案中,评价包括检测改变的生理状态。此外,本发明提供了在体内对候选药剂的筛选,其相比无法精确复制活生物体内实体组织微环境的体外方法具有优势。

[0065] 本发明涉及在活肿瘤中针对药物进行多路化疗药物功效研究(multiplexed chemotherapy drug efficacy studies)的方法。

[0066] 本发明的方法相对于在体外细胞培养模型中进行筛选具有优势,因为体外模型对药物的响应方式不同于在癌症的正常动物模型或患者中生长的肿瘤。因此,基于体外模型来决定是否继续进行药物研发以进入临床或用于对患者癌症进行治疗性干预是有缺陷的。相反,本发明提供了用于在活的人肿瘤环境下或在癌症动物模型的环境下同时测试多种潜在抗癌剂的方法。

[0067] 在一些实施方案中,利用能够使药棒平行插入肿瘤内的导引针的阵列头,将单独制备的包含抗癌剂或测试剂的药物植入物分布在实体组织内。注射装置可使药物植入物通过导引针插入肿瘤中。药物植入物可包含固体杆或棒,并且可优选地包含固体形式的药剂。在一些情况下,药物植入物包含允许药物在组织内持续或延时释放的生物可降解的惰性粘合剂。

[0068] 在一些实施方案中,药物植入物具有小于约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1mm的直径。针阵列头可配置为容纳约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、100、200、300、400个或超过1,000个药物植入物。多个药物植入物可捆束在一起形成一束药物植入物,其中该束具有适合用针进行注射的直径。

[0069] 在一些实施方案中,注射装置包括配置为将一个或多个药物植入物通过针推送到实体组织内的柱塞。在一些实施方案中,实体组织包括肿瘤。

[0070] 插入到肿瘤后,药剂可在一分钟到六周的一段时间内从一个或多个药物植入物中释放出来,以使肿瘤的离散部分以空间受限的方式单独地暴露于每种药物。

[0071] 由于采用本发明的方法沿平行轴向肿瘤深处或沿肿瘤的z轴插入药物,因此可横跨药棒的插入路径(与其垂直或正交)制作肿瘤的切片,以便能对每一插入药物邻近区域的肿瘤响应进行分析,从而允许在活肿瘤环境下对药物功效进行多路分析。

[0072] 在本发明的一些实施方案中,利用载体装置如针将一个或多个药物植入物插入组织中。在一些优选的实施方案中,利用针阵列,如PCT/US2008/073212(在此通过引用完整并入)中描述的针阵列,将多个药物植入物沿组织的平行轴插入。

[0073] 在一些情况下,多个针附接于多个致动器,该致动器与多个储器中的多个药物植入物或药物植入物束相耦合,使得下压柱塞导致药物植入物排出,或者导致药物植入物注射到组织中。在某些进一步的实施方案中,多个柱塞中的柱塞在各自的第二端可操作地耦合在一起以便可以同时下压。

[0074] 植入物可以部分或完全陷入组织中。经由针将植入物插入组织可有助于植入物沉

积到组织中。可通过下压与针相关联的柱塞使植入物进一步沉积到组织中。

[0075] 一旦植入物已沉积到组织中,植入物就可溶解并扩散到组织中。扩散速率可受植入物体积的影响,或者可受是否存在用于降低植入物在组织内的溶解速率的惰性粘合剂的影响。药剂可在约一分钟至约一个月、约一小时至约六周、约12小时至约72小时、约24小时至约48小时、约一周至两周、约两周至三周或约三周至四周的一段时间内扩散到组织中。

[0076] 本发明提供产生包含报道细胞的体内组织模型的方法,该报道细胞响应于信号传导途径的特异性调节而发出可检测信号。可采用几种方法产生用于构建组织模型的代表细胞,例如基因捕获技术或使用与内源性启动子相关联的报道基因。两种策略的优势均在于它们因报道基因整合到内源性基因组位点内而报道天然细胞途径。与内源性启动子相关联的报道基因的应用可通过引入能表达由已知启动子或转录因子效应元件控制的目标报道基因序列(萤光素酶、GFP等)的载体而产生。例如,叉头(forkhead)效应元件(也称为胰岛素效应元件)已用于追踪AKT途径的激活状态。重要的是,对AKT的抑制激活了受此启动子控制的基因的转录。报道细胞可以在因携带磷酸酶和张力蛋白同源物基因(PTEN)失活突变而导致高AKT途径状态和低背景萤光素酶信号的细胞类型中生成。虽然此方法需要针对每种目标癌症途径鉴定和构建不同的途径特异性载体,但使用异位表达的启动子是上述基因捕获方法的一种低风险、可行的替代方法。

[0077] 在该方法的一些实施方案中,报道基因被整合到细胞系的致癌途径内的基因中,致使报道基因在当致癌途径被抑制时得到激活。包含整合到基因组位点内的报道基因的细胞被称为报道细胞系。报道组织是指包含报道细胞的实体组织。报道组织可由报道细胞系生成,例如通过将来自报道细胞系的细胞引入动物如小鼠,并让细胞发展成为实体瘤。由报道细胞系衍生的报道组织(例如肿瘤)的细胞可在致癌途径被抑制时产生可检测信号,从而为筛选治疗癌症的候选方法提供有用的体内或体外平台。

[0078] 在一些实施方案中,报道组织连同针阵列一起使用,以对候选治疗剂进行多路分析。针阵列可用于例如递送多种治疗剂,或者可用于施用多种癌症治疗。PCT/US2008/073212中描述了使用针阵列进行递送的装置和方法,该申请在此通过引用完整并入。针阵列可含有多于2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30个、多于100个或多于1,000个针。这些针可配置为用于递送相同的药剂,或者一个或多个针可配置为用于递送不同的药剂。针可与共同的致动器如柱塞或泵耦合,从而使得在激活致动器时能够从全部针同时注射。在一些实施方案中,针配置为在组织内沿平行轴递送其各自的内容物。这种递送可以空间受限的方式发生,其中通过多个针递送多种药剂对每个针而言局限于组织内的一个柱状区。在一些实施方案中,通过使用一个或多个多孔管来实现空间受限的递送,其中候选药剂通过穿过管孔扩散而被递送至组织。在一些实施方案中,多孔管包含多孔聚合物如聚砜。在一些实施方案中,候选药剂包含聚合物基质如水凝胶,其中候选药剂的扩散速率及程度因聚合物基质的存在而降低。本发明的报道组织内的细胞可通过发出指示致癌途径被给定药剂所抑制的可检测信号而响应候选药剂的递送。多种药剂的空间受限递送可允许对多种药剂的效果进行辨别。此外,沿组织内的柱状区递送药剂可控制该组织不同区域中不均一的细胞行为。

[0079] 图18提供了本发明的一种方法的示意图,其中通过从细胞池1中选择来产生报道细胞系2。可根据报道基因响应于已知途径调节剂(例如,抑制致癌信号传导途径的药物)的激活来选择细胞。报道细胞系2可用于生成具有由报道细胞系衍生的肿瘤4的异种移植小鼠

3.异种移植的肿瘤4可充当用于筛选在治疗癌症中有用的候选治疗剂的平台。在一些实施方案中,针阵列5用于在异种移植的肿瘤内沿平行轴递送多种候选治疗剂。使用针阵列递送可以是空间受限的,使得递送区域6彼此不同。可以切除肿瘤,并且可任选地对切除的肿瘤7进行切片和成像以评价各候选治疗剂的相对功效。

[0080] 在一些实施方案中,报道组织用于确定对治疗方法的抗性的基础。可将报道基因导入受已知致癌途径特异性效应元件控制的基因中,从而生成可产生能指示活跃途径状态的可检测信号的细胞系。随后可采用基因捕获技术选择在途径抑制时能产生可检测信号的细胞。报道细胞系针对途径激活与途径抑制可产生不同的信号(例如,以不同波长发射)。可将来自此细胞系的细胞异种移植到动物模型如小鼠中,以产生差异性报道致癌途径的激活和抑制状态的报道组织。在一些实施方案中,差异性报道致癌途径的激活(“开启”)和抑制(“关闭”)状态的报道组织用于筛选候选治疗剂,并且可用于指示对先前成功的治疗剂的抗性的产生,其中在持续施用治疗剂期间信号从途径“关闭”状态到途径“开启”状态的转换指示抗性的产生。可分离对治疗产生抗性的细胞,并进一步对其进行表征以确定该抗性的遗传基础。

[0081] 图19示出了本发明的一种方法的方案,其中报道细胞系可用于确定对癌症治疗方法的抗性的基础。在一些实施方案中,由细胞池1生成报道细胞系2,并且这一细胞系可用于产生具有由报道细胞系2衍生的异种移植肿瘤4的小鼠3。在一些实施方案中,报道细胞系在致癌途径被抑制时产生报道信号。报道细胞系可产生两种可区分的信号(例如,两种可区分的波长的荧光),以指示途径的激活与抑制状态。在一些实施方案中,报道细胞系在致癌途径被激活时产生报道信号。针阵列5可连同报道组织4一起使用,以确定导致途径激活或抑制的化合物。针阵列可用于在组织的平行区域内递送多种药剂,并允许通过沿组织内的轴递送来控制组织的异质性。一旦已知由报道细胞系衍生的报道组织的细胞对药剂显示响应,该报道组织或类似地由报道细胞系衍生的其它报道组织可用于鉴定对药剂停止响应的一种或多种细胞8。可分离该细胞并进行克隆扩增9,并且可通过获取这些细胞的基因组序列谱10来确定对药剂的抗性的遗传基础。

[0082] 在一些实施方案中,通过对来自在施用治疗剂时显示出可检测信号的细胞的基因组DNA进行测序来确定对治疗剂的响应的遗传基础。对基因组DNA进行测序可包括高通量测序。高通量测序的方法是本领域已知的,并在本文中进一步详细地描述。在一些实施方案中,在测序前对基因组DNA进行全基因组扩增。

[0083] 在一些实施方案中,使用报道细胞产生可用于确定组织对各种流体药剂的响应的报道组织。报道组织包含多种报道细胞。可利用针阵列将多种流体药剂递送至报道组织。报道组织可显示疾病或病症的特征,或者可以是正常的。响应可采取信号传导途径的激活、信号传导途径的抑制或另一种改变的生理状态的形式。在一些实施方案中,该方法可用于确定药物的副作用。改变的生理状态可以是与实体组织中(在一些实施方案中,实体瘤中)(包括区域内)或生物样品中的条件、过程、途径、动态结构、状态或其它活性直接相关的任何可检测参数,该参数允许检测来自受试者或生物来源的生物样品中(例如,相对于适当的对照以统计上显著的方式可测量地改变的)结构或功能的变化。本发明的方法因此部分地涉及此种相关性,其中改变的生理状态的指示物可以是例如细胞或生物化学活性,进一步的非限制性实例包括细胞活力、细胞增殖、细胞凋亡、对于抗生长信号的细胞抗性、细胞运动性、

结缔组织降解酶的细胞表达或加工 (elaboration)、血管发生的细胞募集或本文提供的其它标准。

[0084] 改变的生理状态可进一步涉及任何条件或功能,其中与实体组织功能直接或间接相关的任何结构或活性已相对于对照或标准以统计上显著的方式发生变化,并且可能源于实体组织成分与引入的药剂之间的直接或间接的相互作用,或源于由于中间体(该中间体可能是由于此类相互作用而形成的,包括代谢物、分解代谢物、底物、前体、辅因子等)之间的相互作用而发生的结构或功能变化。此外,改变的生理状态包括但不限于在受试者或生物来源的一些或全部细胞或组织中(在一些实施方案中是在实体组织的一些或全部细胞中,以及在一些实施方案中是在肿瘤如实体组织中的实体瘤的一些或全部细胞中)改变的信号转导、呼吸、代谢、遗传、生物合成或其它生物化学或生物物理活性。作为非限制性实例,改变的生物信号转导、细胞活力、细胞增殖、细胞凋亡、对于抗生长信号的细胞抗性、细胞运动性、结缔组织降解酶的细胞表达或加工、血管发生的细胞募集或其它标准,包括凋亡途径的诱导以及细胞内非典型化学和生物化学交联物质的形成,无论是通过酶机制还是通过非酶机制,均可被视为指示改变的生理状态。

[0085] 本发明包括利用针阵列装置进行局部递送以治疗疾病的方法。示例性装置在PCT/US2008/073212中有所描述,该申请通过引用完整并入本文。

[0086] 人类杜氏肌营养不良 (DMD) 是由肌养蛋白基因突变导致的肌养蛋白缺乏而引起的致命性的、X染色体连锁的、隐性的肌病。DMD影响骨骼肌和心肌,其特征为进行性肌肉萎缩,导致移动能力快速衰退,并最终导致全瘫和死亡。

[0087] 本发明涉及基因替代治疗剂,该术语是指提升组织功能例如肌肉功能的基因或基因产物。基因替代治疗剂可通过恢复患有导致组织功能丧失的遗传障碍的受试者的机能来提升组织功能,或者其可增强健康受试者的组织功能。在一些实施方案中,组织功能的效应物可增强衰老过程中已丧失的组织功能。

[0088] 本发明的一些实施方案提供了治疗肌肉疾病或病症的方法,包括对受试者受影响的组织内的邻近区域同时施用基因替代疗法。

[0089] 在其它实施方案中,本发明提供了向受试者局部递送基因替代疗法的方法,包括 a) 提供包含基因替代治疗剂的治疗剂,和 b) 利用包含多个针的针阵列装置将所述治疗剂局部递送至所述受试者的组织。

[0090] 本发明还提供了在体内向肌肉组织递送选定的基因的方法,所述方法包括: (a) 提供包含腺相关病毒 (AAV) 载体的重组AAV病毒体,所述AAV载体包含与能够引导所述选定基因的体内转录与翻译的控制元件有效连接的所述选定基因;和 (b) 利用包含多个针的针阵列装置在体内将所述重组AAV病毒体导入所述肌肉组织中。

[0091] 在一些实施方案中,针配置为用于通过肌肉内注射进行递送。

[0092] 在一些实施方案中,利用多孔针递送装置在受试者如cxmd狗中实现治疗性AAV载体向肢体中的全功能肌群肌肉中的大规模递送。可采用本发明的AAV6病毒在患有肌肉营养不良的动物中实现肌养蛋白的表达。基因替代治疗剂递送可使医师或高级执业护士能够将携带肌养蛋白基因的AAV6导入到单肢或躯干一侧的全部大肌纤维中的超过1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%中。一个小型医生团队(每位医生对不同的身体部位进行操作)可在一个镇静期内递送完整的基因治疗。

靶组织

[0093] 在一些实施方案中,本发明举例说明了一种用于在实体组织中筛选候选治疗剂的系统。实体组织是医学领域公知的,并且可包括任何粘着性的(cohesive)、空间上离散的非流体限定的解剖学区室,该区室实质上是多细胞、细胞间、组织和/或器官结构的产物,例如这样一种三维限定的区室,该区室可包含结构完整性或者由相关联的结缔组织产生其结构完整性,并且可通过薄膜(例如,脑膜、围心膜、胸膜、粘膜、基底膜、网膜、器官包覆膜等)与其它身体区域隔开。实体组织的非限制性实例可包括脑、肝、肺、肾、前列腺、卵巢、脾脏、淋巴结(包括扁桃体)、甲状腺、胰腺、心脏、骨骼肌、肠、喉、食道和胃。这些及其它实体组织的解剖学位置、形态学性质、组织学特征及其有创和/或无创获取对熟悉相关技术的人员来说都是熟知的。在一些实施方案中,组织是正常的。在一些实施方案中,组织是或疑似是癌性的、发炎的、感染的、萎缩的、麻木的、癫痫的或凝结的。在一些实施方案中,组织是或疑似是癌性的。在一些实施方案中,组织是癌性的。

[0094] 在一个优选的实施方案中,本方法针对癌症,并且靶组织包含肿瘤(可以是良性或恶性的),并且包含至少一种选自前列腺癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、肺癌细胞、脑癌细胞和卵巢癌细胞的癌细胞。在某些实施方案中,肿瘤包括选自腺瘤、腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、小细胞癌、大细胞未分化癌、软骨肉瘤和纤维肉瘤的癌症。已针对这些及其它癌症类型制定了本领域公认的临床诊断标准,比如美国国家癌症研究所(Bethesda,MD,USA)所公布的那些标准,或如DeVita,Hellman和Rosenberg的Cancer:Principles and Practice of Oncology(2008,Lippincott,Williams and Wilkins,Philadelphia/Ovid,New York);Pizzo和Poplack,Principles and Practice of 25Pediatric Oncology(第4版,2001,Lippincott,Williams and Wilkins,Philadelphia/Ovid,New York);以及Vogelstein和Kinzler,The Genetic Basis of Human Cancer(第2版,2002,McGraw Hill Professional,New York)中描述的那些标准。对特定癌症进行分型和表征的其它非限制性实例在例如Ignatiadis等人(2008PathobioL 75:104);Curr.Drug Discov.Technol.5:9)和Auman等人(2008Drug Metab.Rev.40:303)中有所描述。在某些实施方案中,选定的组织区域是受试者肿瘤的一部分,并且在某些进一步的实施方案中,受试者是临床前模型和人类患者之一。

[0095] 某些优选的实施方案涉及本身为人类受试者的受试者或生物来源,例如已根据本领域公认的临床诊断标准被诊断为患有癌症或具有发展为或罹患癌症的风险的患者,所述临床诊断标准如美国国家癌症研究所(Bethesda,MD,USA)的标准或如DeVita,Hellman和Rosenberg的Cancer:Principles and Practice of Oncology(2008,Lippincott,Williams and Wilkins,Philadelphia/Ovid,New York);Pizzo和Poplack,Principles and Practice of Pediatric Oncology(第4版,2001,Lippincott,Williams and Wilkins,Philadelphia/Ovid,New York);以及Vogelstein和Kinzler,The Genetic Basis of Human Cancer(第2版,2002,McGraw Hill Professional,New York)中描述的标准。某些实施方案涉及已知根据此类标准没有罹患、发展或获得癌症的风险的人类患者。

[0096] 某些其它实施方案涉及非人类受试者或生物来源,例如非人灵长类动物,如猕猴、黑猩猩、大猩猩、长尾黑颞猴、猩猩、狒狒,或其它非人灵长类动物,包括可能本领域已知可作为临床前模型(包括实体瘤和/或其它癌症的临床前模型)的非人类受试者。某些其它实

施方案涉及本身为哺乳动物的非人类受试者,例如小鼠、大鼠、兔、猪、绵羊、马、牛、山羊、沙鼠、仓鼠、豚鼠或其它哺乳动物;许多此类哺乳动物可以是本领域已知可作为某些疾病或病症(包括实体瘤和/或其它癌症)的临床前模型的受试者(例如,Talmdage等人,2007Am.J.Pathol.170:793;Kerbel,2003Canc.Biol.Therap.2(4Suppl 1):S134;Man等人,2007Canc.Met.Rev.26:737;Cespedes等人,2006Clin.Transl Oncol.8:318)。然而,并非意在如此限制实施方案的范围,也考虑其它实施方案,其中受试者或生物来源可以是非哺乳类脊椎动物,例如另一种高等脊椎动物,或禽类、两栖动物或爬行类物种,或另一种受试者或生物来源。转基因动物是非人类动物,其中该动物的一种或多种细胞包含非内源性的(即异源性的)核酸,并且该核酸作为染色体外元件存在于其一部分细胞中,或稳定地整合到其种系DNA中(即,其大多数或全部细胞的基因组序列中)。在本发明的某些实施方案中,可以针对转基因动物的组织。在一些实施方案中,实体组织是通过将一种生物体的一种或多种细胞(例如,培养的人类癌细胞)引入非人类模式生物中而产生的异种移植体。

[0097] 本发明的方法适用于向多种实体组织施用治疗剂;因此该方法具有医学和兽医学用途。在一些实施方案中,动物是宠物、陪伴动物、守护动物、役用动物、种畜、服务动物、竞技动物、农场动物、放牧动物或实验动物。

[0098] 在一些实施方案中,受试者是临床前动物模型。在一些优选的实施方案中,受试者是小鼠模型或大鼠模型之一。临床前模型可以是作为异种移植或异种移植术(这两个术语可互换使用,是指活细胞、组织或器官从一个物种向另一个物种的移植)的受体的动物模型。在一些优选的情况下,临床前模型是一种或多种可发展为肿瘤的癌细胞的受体。受体临床前模型可以是免疫受损的动物如SCID小鼠或裸鼠。无胸腺裸鼠是一种来源于具有基因突变的品系的实验小鼠,该基因突变引起胸腺退化或缺如,从而导致免疫系统因T细胞数大大减少而被抑制。临床前模型中的免疫受损状态可能是遗传异常的结果,或者可能是药物治疗抑制了免疫系统功能的结果。免疫抑制药物或免疫抑制剂是抑制或阻止免疫系统活性的药物。免疫抑制药物的非限制性实例包括糖皮质激素;细胞抑制剂;烷化剂;抗代谢物,包括叶酸类似物如甲氨蝶呤,和嘌呤类似物如硫唑嘌呤和巯嘌呤;硫唑嘌呤和巯嘌呤;细胞毒性抗生素,包括放线菌素D、蒽环类、丝裂霉素C、博来霉素和光神霉素;针对免疫系统元件的多克隆和单克隆抗体;和作用于抑免蛋白的药物,包括环孢菌素、他克莫司、伏环孢素和其它钙调磷酸酶抑制剂,和西罗莫司;干扰素、阿片类药物,TNF-结合蛋白质、麦考酚酯和芬戈莫德(fingolimod)。

[0099] 在一些实施方案中,实体组织是软组织。软组织的非限制性实例包括肌肉、脂肪、皮肤、肌腱、韧带、血液和神经组织。可通过从受试者或生物来源获得血液样品、活检标本、组织外植体、器官培养物、生物流体或任何其它组织或细胞制备物来提供生物样品。

[0100] 受试者或生物来源可以是人或非人类动物、转基因或克隆或组织工程化(包括通过使用干细胞)的生物体、原代细胞培养物或适合培养的细胞系,所述细胞系包括但不限于可包含染色体整合的或附加型的重组核酸序列的遗传工程细胞系、已永生化或可永生化的细胞系、体细胞杂合细胞系、已分化或可分化的细胞系、转化细胞系等。在本发明的一些实施方案中,受试者或生物来源可能疑似患有恶性病症或具有患恶性病症的风险,并且在本发明的一些实施方案中,可能已知受试者或生物来源没有罹患此类疾病的风险或不存在此类疾病。

流体药剂

[0101] 在某些实施方案中,流体药剂包括选自以下各项的药剂:(a) 基因治疗剂;(b) 化疗剂;(c) 小分子;(d) 抗体;(e) 蛋白质;(f) 小干扰RNA及其编码多核苷酸中的一种;(g) 反义RNA及其编码多核苷酸中的一种;(h) 核酶及其编码多核苷酸中的一种;(i) 可检测标记物;(j) 治疗性蛋白质、多肽和拟肽中的一种;和(k) 微小RNA(miRNA)。在某些进一步的实施方案中,可检测标记物选自放射性标记物、放射线不透性标记物、荧光标记物、比色标记物、染料、酶标记物、GCMS标记物、抗生物素蛋白和生物素。在某些实施方案中,药剂选自(i) 包含至少一个有效连接的启动子的基因治疗剂;(ii) 包含至少一个有效连接的启动子的编码小干扰RNA的多核苷酸;(iii) 包含至少一个有效连接的启动子的编码反义RNA的多核苷酸;和(iv) 包含至少一个有效连接的启动子的编码核酶的多核苷酸。在某些进一步的实施方案中,有效连接的启动子选自组成型启动子和调节型启动子。在某些更进一步的实施方案中,调节型启动子选自诱导型启动子、严密调节的启动子和组织特异性启动子。

[0102] 候选药剂或候选化合物是指可递送至靶组织的水溶液、混合物或胶体中的任何流体或分子。当用于指代从针递送的药剂时,术语流体在广义上解读为能够流经此类针的任何物质,包括液体、气体、胶体、悬浮的固体等。

[0103] 对候选肿瘤学药剂的选择是相关领域技术人员所理解和可决定的(参见例如Berkow等人编,The Merck Manual,第16版,Merck and Co.,Rahway,N.J.,1992;Goodman等人编,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第10版,Pergamon Press,Inc.,Elmsford,N.Y.,(2001);De Vita,Hellman,and Rosenberg's Cancer:Principles and Practice of Oncology(2008,Lippincott,Williams and Wilkins,Philadelphia/Ovid,New York);Pizzo和Poplack,Principles and Practice of Pediatric Oncology(第4版,2001,Lippincott,Williams and Wilkins,Philadelphia/Ovid,New York);Avery's Drug Treatment:Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics,第3版,ADIS Press,LTD.,Williams and Wilkins,Baltimore,MD.(1987),Ebadi,Pharmacology,Little,Brown and Co.,Boston,(1985);Osolci等人编,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1990);Katzung,Basic and Clinical Pharmacology,Appleton and Lange,Norwalk,CT(1992))。候选药剂可选自披露了试验治疗剂名录的资源,例如美国国立卫生研究院(Bethesda,MD),其在“ClinicalTrials.gov”网站上维护一个涵盖正在进行和计划进行的临床试验的数据库。

[0104] 在筛选方法中使用以及在为了将候选药剂研发成治疗剂如用于治疗实体瘤的治疗剂而对其进行评定的方法中使用的候选药剂可以作为化合物、组合物或分子的“文库”或集合而提供。此类分子通常包括在本领域中称为“小分子”且具有小于 10^5 道尔顿、小于 10^4 道尔顿或小于 10^3 道尔顿的分子量的化合物。

[0105] 例如,受试化合物文库的多个成员可作为候选药剂导入具有已知肿瘤类型的肿瘤的一个或多个受试者体内已知肿瘤类型的实体瘤区域,这通过将每种候选药剂在每个受试者体内沿所述区域内的轴分配到多个位置来实现,并且在一段选定的时间(例如,时间范围、最短时间段或特定时间段)后,可对已导入候选药剂的实体瘤区域进行成像或将其从每个受试者中移除,并且通过检测每种药剂对区域内各自位置的作用(如果有的话),例如通

过确定与用本文所提供的对照药剂(该对照药剂不产生作用(阴性对照)或产生易检测的作用(阳性对照))进行治疗的区域内的位置相比是否存在如本文所提供的改变的生理状态,来比较每个区域。

[0106] 候选药剂进一步可作为组合文库的成员来提供,该组合文库可包含按照在多个反应容器中进行的多个预定化学反应而制备的合成药剂。例如,可采用一种或多种固相合成、记载的随机混合方法和记载的反应裂解技术(其允许给定成分可示踪地经历反应条件的多种排列和/或组合)来制备各种起始化合物。所得的产物包括可进行筛查、随后可进行迭代选择及合成程序的文库,如合成的组合肽库(参见例如PCT/US91/08694、PCT/US91/04666,它们通过引用完整并入本文),或其它可包括本文所提供的小分子的组合物(参见例如PCT/US94/08542、EP 0774464、U.S.5,798,035、U.S.5,789,172、U.S.5,751,629,它们通过引用完整并入本文)。本领域普通技术人员将会理解,根据本公开内容,可按照已确立的程序制备各种不同的此类文库,并测试它们对线粒体功能变化的指示物的影响。

[0107] 其它候选药剂可以是蛋白质(包括治疗性蛋白质)、肽、拟肽、多肽和基因治疗剂(例如,含有治疗性基因或编码治疗性产物的多核苷酸(包括小干扰RNA(siRNA)、核酶和反义RNA的编码序列)的质粒、病毒载体、人工染色体等),在某些进一步的实施方案中,该基因治疗剂可包含有效连接的启动子,如组成型启动子或调节型启动子如诱导型启动子(例如,IPTG诱导型)、严密调节的启动子(例如,在缺乏其同源诱导物或去阻遏物情况下不允许或几乎不允许可检测的转录发生的启动子)或组织特异性启动子。用于制备、测试和使用这些药剂或相关药剂的方法是本领域已知的。参见例如Ausubel(编),*Current Protocols in Molecular Biology*(2007 John Wiley&Sons,NY);Rosenzweig和Nabel(编),*Current Protocols in Human Genetics*(特别是其中的第13章,“Delivery Systems for Gene Therapy”,2008 John Wiley&Sons,NY);Abell,*Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics*,1997Elsevier,NY。

[0108] 其它候选药剂可以是抗体,包括天然存在的、免疫引起的、嵌合的、人源化的、重组的和其它工程化的抗原特异性免疫球蛋白以及人工生成的抗原结合片段及其衍生物,如单链抗体、微抗体、Fab片段、抗体/药物偶联物、双特异性抗体等。参见例如Coligan等人(编),*Current Protocols in Immunology*(2007 John Wiley&Sons,NY);Harlow和Lane,*Antibodies:A Laboratory Manual*(1988 Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY);Harlow和Lane,*Using Antibodies*(1999 Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY)。

[0109] 用于治疗用途的药学上可接受的载体是药学领域所熟知的,并且在例如 Remingtons Pharmaceutical Sciences.Mack Publishing Co.(A.R.Gennaro编.1985)中有所描述。例如,可使用生理pH下的无菌盐水和磷酸盐缓冲盐水。在药物组合物中可提供防腐剂、稳定剂、染料和其它辅助剂。例如,可添加苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸的酯作为防腐剂(同上,1449页)。此外,可使用抗氧化剂和悬浮剂(同上)。“药学上可接受的盐”是指药物化合物与有机酸或无机酸(酸加成盐)或有机碱或无机碱(碱加成盐)相结合而产生的该化合物的盐。考虑用于本发明的药剂(包括药物)可以以游离碱或盐的形式使用,这两种形式都被认为涵盖在本发明某些实施方案的范围内。

[0110] 含有一种或多种药剂的药物组合物可以是允许将该组合物施用于受试者的任何

形式。根据一些实施方案,组合物为液体形式,并且其给药途径包括如本文所述向实体组织施用。本文使用的术语肠胃外包括经皮或皮下注射,和肌肉内、髓内、胸骨内(intrasternal)技术。

[0111] 药物组合物配置成使其中所含的活性成分在向受试者如人类受试者施用该组合物时是可生物利用的。待向受试者施用的组合物可采用一个或多个剂量或剂量单位的形式,其中例如预先测量的流体体积可包含单个剂量单位,并且含有一种或多种液体形式的组合物(例如药物)的容器可容纳多个剂量单位。一剂药物包含全部或一部分治疗有效量的特定药物,该药物将以某种方式、并在一段足以达到或维持期望的药物浓度范围(如实体组织中紧邻递送针处的期望药物浓度范围)的时间内施用,并且其中包含一个剂量的药物的绝对量将根据药物、受试者、实体组织和熟练从业者基于医学和药学及相关领域的状况将会熟悉的其它标准而变化。在某些实施方案中,可施用至少两个剂量的药物,而在某些其它的实施方案中,可施用3、4、5、6、7、8、9、10个或更多的剂量。

[0112] 本文使用的液体药物组合物,无论是溶液形式、悬液形式还是其它类似的形式,可包含一种或多种以下助剂:无菌稀释剂如注射用水、盐溶液、生理盐水、林格氏溶液、盐水溶液(例如,生理盐水,或等渗、低渗或高渗的氯化钠)、可充当溶剂或悬浮介质的非挥发油如合成的甘油单酯或甘油二酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗菌剂如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和用于调节张力的试剂如氯化钠或右旋糖。肠胃外制剂可封装于由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。在一些实施方案中,生理盐水是助剂。可注射的药物组合物可以是无菌的。也可期望在制剂中包含其它组分,如递送载体,包括但不限于铝盐、油包水型乳剂、生物可降解的油状载体、水包油型乳剂、生物可降解的微囊、水凝胶和脂质体。

[0113] 虽然本发明的药物组合物中可使用本领域普通技术人员已知的任何合适的载体,但载体的类型将根据给药方式以及是否需要常规的持续药物释放而变化。对于肠胃外给药,如药物的补充注射,载体可包含水、盐水、酒精、脂肪、蜡或缓冲液。生物可降解的微球(例如,聚乳酸半乳糖交酯(poly(lactic galactide)))也可用作本发明药物组合物的载体。合适的生物可降解的微球在例如美国专利4,897,268和5,075,109中公开。在一些实施方案中,微球可大于约25微米,而其它实施方案并非如此限定,而是考虑其它尺寸。

[0114] 药物组合物也可含有稀释剂如缓冲液、抗氧化剂如抗坏血酸、低分子量(少于约10个残基)多肽、蛋白质、氨基酸、碳水化合物(包括葡萄糖、蔗糖或糊精)、螯合剂如EDTA、谷胱甘肽和其它稳定剂和赋形剂。中性缓冲盐水或与非特异性血清白蛋白混合的盐水是合适的示例性稀释剂。在一些实施方案中,采用合适的赋形剂溶液(如蔗糖)作为稀释剂将药剂(如治疗性药物或候选药物)制备成冻干产物。

[0115] 某些实施方案考虑将多种药物、候选药物、显像剂、位置标记物、功效指示剂和适当的对照组合在实体组织如实体瘤中沿平行轴直接递送到多个空间受限的位置,在一段期望的时间间隔后切除经治疗的组织,并评价或分析该组织的治疗效果。功效指示剂可以是例如可检测的指示化合物、纳米颗粒、纳米结构或其它包含提供可指示细胞生理状态的可检测信号的报告分子的组合物,如活体染料(例如台盼蓝)、比色pH指示剂、可根据多种细胞生理参数(例如,pH、细胞内 Ca^{2+} 浓度或其它生理学相关离子浓度、线粒体膜电位、质膜电

位等,参见Haugland,The Handbook:A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies (第10版) 2005,Invitrogen Corp.,Carlsbad,CA) 中的任一种显示出不同荧光的荧光化合物、酶底物、特异性寡核苷酸探针、报道基因等等。对照组合物可以是例如先前已证明不会导致统计学上显著的生理状态变化的阴性对照,如假注射液、盐水、DMSO或其它载体或缓冲液对照、非活性对照体、混杂肽或核苷酸等;和先前已证明会导致统计学上显著的生理状态变化的阳性对照,如经FDA批准的治疗性化合物。

[0116] 在一些实施方案中,流体药剂进一步包含染料。可在将药物组合物施用到实体组织后对染料进行成像,以观测存在于相同药物组合物中的治疗剂的分布和活性。在一些实施方案中,染料是荧光染料。在一些实施方案中,染料是放射性染料。

[0117] 在一些实施方案中,流体药剂包含位置标记物。位置标记物是已知的,作为非限制性实例包括荧光量子点、印度墨水、金属珠或塑料珠、染料、染色剂、肿瘤涂料 (Veiseh等人, 2007Canc.Res.67:6882) 或其它位置标记物,并且可能在期望位置导入。标记物可包括任何随后可定位的可检测信号来源,其可以是可见信号、光学信号、比色信号、染料、酶信号、GCMS标记物、抗生物素蛋白、生物素、放射性(包括放射性的放射性标记物和射线不可透的)信号、荧光信号或其它可检测信号。

[0118] 可检测的标记物因此包含独特的且易于鉴别的气相色谱/质谱 (GCMS) 标记物分子。许多此类GCMS标记物分子是本领域已知的,并且可选为单独使用或与可检测的标识部分组合使用。举例说明而非限制,可将一个、两个或多个此类GCMS标记物的各种不同组合以允许每个储器的内容物基于独特的GCMS“签名”而被鉴别的方式添加到本文描述的装置的单个存储器中,从而允许随后从注射区域回收的任何样品能追溯至其起始针以用于鉴别目的。GCMS标记物的实例包括 α, α, α -三氟甲苯、 α -甲基苯乙烯、邻茴香胺、多种不同的可卡因类似物中的任一种,或其它在限定条件下具有容易识别的GCMS签名的GCMS标记物化合物,例如,如从SPEX CertiPrep Inc. (Metuchen,NJ) 或SigmaAldrich (St.Louis,MO) 获得的,包括Supelco® 2005气相色谱目录中描述的并可从SigmaAldrich获得的Supelco® 产品。

多孔管

[0119] 在一些实施方案中,本方法提供了利用一个或多个多孔管向组织施用流体药剂。流体药剂通过穿过多孔管的孔扩散而与组织接触。本申请的装置和方法中使用的多孔管可以是空心的,或者可以均匀地包含多孔材料。多孔管适用于包含、储存、施用、递送和运输内容物。内容物可以是包含一种或多种治疗剂的药物组合物。单个空心 and/或 多孔管内的治疗剂可以是相同的或者可以是不同类型的治疗剂的混合物。在多个空心 and/或 多孔管内,每个管可含有与另一管相同的治疗剂,或者含有与另一管不同的治疗剂。在一些实施方案中,每个空心 and/或 多孔管包含与多个管中的所有其它管包含的治疗剂不同的独特治疗剂。

[0120] 空心 and/或 多孔管可与能支持这些管的且有利于药物递送的框架相连。该空心 and/或 多孔管是可以从框架上拆下的。与框架相连的空心和/或 多孔管的数目和空间定向可根据受试者的药物递送需求而改变。

[0121] 空心 and/或 多孔管由管材料制成。管材料适用于包含、储存、施用、递送和运输流体药剂。内容物可以是包含一种或多种治疗剂的药物组合物。在一些实施方案中,管材料对酸基本为惰性的。在一些实施方案中,管材料对碱基本为惰性的。在一些实施方案中,管材料对酸和碱基本为惰性的。在一些实施方案中,管材料在水中是不可溶的。在一些实施方案

中,管材料在有机溶剂中是不可溶的。在一些实施方案中,管材料在有机溶剂中基本上是不可溶的。在一些实施方案中,管材料在非卤化有机溶剂中是不可溶的。在一些实施方案中,管材料在非卤化有机溶剂中基本上是不可溶的。

[0122] 管材料是生物相容的。管材料基本上在生理学上是非活性的,不会引发生理学事件。管材料不会引起实体组织内的炎症、免疫应答、感染或任何其它类型的排斥。在一些实施方案中,管材料是生物可降解的。在一些实施方案中,管材料在实体组织内随着时间推移而分解。管材料是耐热的,并且管可在用于受试者之前在高压灭菌锅中灭菌。

[0123] 管材料适合于成形为管,但也适合于在置入实体组织中时保留管形。管材料适合以清洁的方式打碎、切割、切开、分开或分离,并且可在置于实体组织后被打碎、切割、切开、分开或分离。在一些实施方案中,管材料是易裂开的。

[0124] 在一些实施方案中,管材料是聚合物材料。在一些实施方案中,管材料是共聚物材料。在一些实施方案中,管材料是交联聚合物或共聚物。管材料的非限制性实例包括聚砜、聚胺、聚酰胺、聚碳酸酯、聚氨基甲酸酯、聚氨酯、聚酯、聚醚、聚烯烃、聚芳烃材料。在一些实施方案中,管材料是聚砜。

[0125] 可通过多种途径实现由聚合物制备空心管。这些途径被称为湿法成形、干法成形或融化成形工艺。融化成形包括加热聚合物至超过其熔点,并将其通过设计为形成空心管的孔口(通常称为模具)而挤出。一旦被挤出,融化物经由淬火而冷却,这使聚合物固化成细管。在干法成形工艺中,将聚合物溶液通过期望的孔口挤出,并注入加热的柱体中,该柱体使溶剂蒸发并随后形成管。在湿膜成形工艺中,将聚合物溶液通过孔口挤出并在非聚合物溶剂中淬火,从而导致聚合物凝固形成管。在上述成形工艺中,湿膜成形能够容易地生产空心多孔管。采用的具体成形工艺将取决于所用的聚合物和期望的空心管类型。

[0126] 在一些实施方案中,管材料包含多个孔。管的内容物可经由这些孔从管扩散到实体组织中。从多孔管到实体组织的扩散速率可受孔径的影响,例如,较大的孔导致较高的扩散速率。在一些实施方案中,管材料是可透过性的。在一些实施方案中,多孔管是可透过性的。

[0127] 有效药剂朝较低的化学势方向,即朝装置的外表面扩散。在装置的外表面,平衡再次建立。有效药剂的稳态通量将根据斐克扩散定律建立。药物通过扩散穿过材料的速率一般取决于药物在其中的溶解度以及多孔壁的厚度。对多孔管材料的选择可取决于待递送的具体流体药剂。

[0128] 在生产多孔材料时,孔的尺寸受到聚合物的溶剂强度的影响。溶剂强度的快速降低通常倾向于诱使小液滴分散于连续的聚合物相内。溶剂强度的缓慢降低使得聚合物基质内的成核位点允许形成更大的孔。在这样的情况下,溶剂强度的降低必须足够快以使膜的结构固化(set)。

[0129] 在生产多孔聚合物时改变多孔网状物的孔隙率和容积的另一种方式是改变聚合物溶液的浓度。较低的浓度倾向于促使形成较大的孔和较大的孔隙容积。然而,溶剂中可存在多高的聚合物浓度是有限制的(通常不超过45%w/w)。否则,聚合物将成为连续溶剂相中的分散相,从而消除了多孔网络。另一种获得多孔管状膜的方法是通过冷却引起聚合物溶液的快速相转化。

[0130] 在优选的实施方案中,平均孔径是约50nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、

600nm、700nm、800nm、900nm、1 μ m、2 μ m、3 μ m、5 μ m、10 μ m、20 μ m、30 μ m、50 μ m、100 μ m或500 μ m。一个管的所有孔可以为大致相同的孔径。在一些实施方案中,一个管的每个孔具有与该管的所有其它孔的孔径无关的孔径。在多个多孔管中,所有孔可具有大致相同的孔径,或者每个孔可具有与该多个多孔管的所有其它孔的尺寸无关的尺寸。

[0131] 在一个多孔管内,孔径的差异可高达5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、125%、150%、200%、300%、400%、500%、750%或1,000%。在一个多孔管内,孔径的差异可高达约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约75%、约80%、约90%、约100%、约125%、约150%、约200%、约300%、约400%、约500%、约750%或约1,000%。

[0132] 孔径可影响扩散速率,并且可调整孔径以影响扩散速率。出于影响扩散速率的目的,可生成具有预设的平均孔径的多孔管。不同的治疗剂药物组合物可以以不同的速率从多孔管扩散,扩散速率部分地受到药物组合物、治疗剂和多孔管材料的物理与化学性质的影响。可生成具有不同平均孔径的多孔管,并经实验使用以找到对于特定药物组合物或治疗剂而言能提供期望的扩散速率的孔径。

[0133] 在多个管中,所有管可具有大致相同的管长度,或者每个管可具有与该多个管中所有其它管的管长度无关的管长度。管具有某一直径。在多个管中,所有管可具有大致相同的直径,或者每个管可具有与该多个管中所有其它管的直径无关的直径。管具有某一壁厚。在多个管中,所有管可具有大致相同的壁厚,或者每个管可具有与该多个管中所有其它管的壁厚无关的壁厚。

[0134] 多孔管具有顶端和底端。在一些实施方案中,整个管含有流体药剂如药物组合物或治疗剂。在一些实施方案中,底端含有流体药剂如药物组合物或治疗剂,而顶端不含流体药剂如药物组合物或治疗剂。

[0135] 管的底端可附接至适合于协助将内容物施用到实体组织中的装置。管的底端可连接至例如针、口(port)、导管、静脉置管或其它适合于将药物组合物递送到实体组织的装置。在一些实施方案中,该装置(例如,针)适合刺入实体组织。

[0136] 管的顶端可附接至适合于协助将内容物施用到实体组织中的装置。管的顶端可连接至例如柱塞、泵、活塞或其它适合于提供足以将药物组合物递送到实体组织的压力的装置,或本文所述的任何此类装置。

[0137] 管可装填、包装或装有流体药剂。管可在使用之前即时装填,或者可装填、储存和运输。多孔管的任一端或两端可在装填有流体药剂之后密封。在一些情况下,多孔管的一端或两端可在装填流体药剂(例如通过将管浸泡于流体药剂中一段延长的时间)之前密封。

[0138] 管的窄直径和形状允许通过毛细管作用进行方便的装填。一个管或多个管可浸入流体药物组合物中,于是药物组合物可被吸入管中。在密闭环境中,对药物组合物施加正压力导致有更大量的药物组合物装填到管中;因此,可容易地且可靠地控制管中药物制剂的量。

[0139] 管的多孔性可允许通过将管浸入流体药物组合物浴中进行方便的装填。药物组合物例如可通过孔或经由管材料的渗透性扩散到管中。扩散到管中的药物组合物的量可受到例如外部压力、孔径、渗透性、管长度、浴的深度、浴的量、在浴中保持的时间长度和管材料的影响。

[0140] 装填于空心和/或多孔管中的药物组合物包含一种或多种治疗剂。与本发明相容的治疗剂的非限制性实例在本文其它部分详细说明,包括抗癌剂、抗炎剂、抗感染剂、再生剂、松弛剂、细胞凋亡抑制剂、细胞凋亡诱导剂、抗凝血剂、皮肤病药物、生长刺激剂、血管扩张剂、血管收缩剂、镇痛剂、抗过敏剂和本文描述的任何治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是抗癌剂。

水凝胶

[0141] 水凝胶在2010年7月29日公布的、名称为“Nucleic Acid Hydrogel via Rolling Circle Amplification”的、Luo、Lee等人的美国专利申请20100189794中有所描述,该申请通过引用完整并入本文。

[0142] 在一些实施方案中,将包含水凝胶的组合物递送到组织。水凝胶对降低药物制剂在实体组织中的扩散或分散速率是有效的。在一些实施方案中,含有水凝胶的药物组合物在实体组织中的分散程度低于缺乏水凝胶的类似药物组合物。在一些实施方案中,含有水凝胶的药物组合物在实体组织中的分散比缺乏水凝胶的类似药物组合物更慢。水凝胶可以是一种聚合物或两种或多种聚合物的混合物。在一些实施方案中,水凝胶具有。在一些实施方案中,水凝胶包含具有两种不同分子量范围的至少一种聚合物的二元混合物。在一些实施方案中,水凝胶是PEG。在进一步的实施方案中,两种不同的分子量范围包括500-2,000和4,000-8,000。在另一个进一步的实施方案中,两种不同的分子量范围包括2,000-4,000和8,000-20,000。在另一个进一步的实施方案中,两种不同的分子量范围包括4,000-8,000和10,000-45,000。通过调整二元体系的分子量和比例,可控制流体药剂的扩散速率。

[0143] 另一种用于表征水凝胶的特性为抗张强度。水凝胶在干燥状态下可具有至少20gf/cm²的抗张强度。在进一步的实施方案中,水凝胶在干燥状态下具有20-120gf/cm²的抗张强度。在一些实施方案中,水凝胶在水合状态下可具有至少5gf/cm²的抗张强度。在进一步的实施方案中,水凝胶在水合状态下具有5-15gf/cm²的抗张强度。

[0144] 水凝胶的含量可以为药物组合物的约1%至约99%。在一些实施方案中,水凝胶的含量为药物组合物的约0.1%、约0.2%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、约1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%、约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%、约3%、约3.1%、约3.2%、约3.3%、约3.4%、约3.5%、约3.6%、约3.7%、约3.8%、约3.9%、约4%、约4.1%、约4.2%、约4.3%、约4.4%、约4.5%、约4.6%、约4.7%、约4.8%、约4.9%、约5%、约5.5%、约6%、约6.5%、约7%、约7.5%、约8%、约8.5%、约9%、约9.5%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、约40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%、约50%、约51%、约52%、约53%、约54%、约55%、约56%、约57%、约58%、约59%、约60%、约61%、约62%、约63%、约64%、约65%、约66%、约67%、约68%、约69%、约70%、约71%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%。

[0145] 水凝胶可以是多孔的。适合于生物学应用的示例性多孔水凝胶在美国专利4,014,335中有所描述,该专利通过引用完整并入本文。这些材料包括交联聚乙烯醇、聚烯烃或聚氯乙烯或交联明胶;再生的、不溶性的、不易腐蚀的纤维素、酰化纤维素、酯化纤维素、醋酸丙酸纤维素、醋酸丁酸纤维素、醋酸邻苯二甲酸纤维素、醋酸二乙基氨基乙酸纤维素、聚氨酯、聚碳酸酯和由聚阳离子修饰的不溶性胶原蛋白和聚阴离子修饰的不溶性胶原蛋白共沉淀形成的多微孔聚合物。

[0146] 在一些实施方案中,水凝胶包含胶原蛋白。胶原蛋白来源的非限制性实例包括Engelbreth-Holm-Swarm鼠肉瘤基膜、牛跟腱、牛鼻中隔、牛气管软骨、小牛皮、鸡肋软骨、人肺、人胎盘、袋鼠尾巴、小鼠胸骨和大鼠尾腱。在一些情况下,胶原蛋白可占水凝胶的超过0.1%、0.2%、0.5%、0.7%、1%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2%或5%。在一些情况下,可使用重组胶原蛋白。几种胶原蛋白来源在美国专利申请US20070254041中有所描述。可使用不溶于水的胶原蛋白材料,并且其可来源于天然的组织来源(例如,相对于人类受体或其它患者是异种的、同种异体的或自体的)或经重组制备。根据胶原蛋白的氨基酸序列、碳水化合物含量和存在或不存在二硫键交联,可将其再细分为几种不同类型。I型和III型胶原蛋白是两种最常见的胶原蛋白亚型。I型胶原蛋白存在于皮肤、腱和骨骼中,而III型胶原蛋白主要发现于皮肤中。本发明的组合物中使用的胶原蛋白可从皮肤、骨骼、腱或软骨中获得,并通过本领域及行业内所熟知的方法进行纯化。或者,胶原蛋白可购自商业来源。本发明中优选使用I型牛胶原蛋白。

[0147] 胶原蛋白可以是无端肽胶原蛋白和/或端肽胶原蛋白。更进一步地,可使用非纤维状和纤维状胶原蛋白中的任一种或两种。非纤维状胶原蛋白是已溶解而未重构成其天然纤维形式的胶原蛋白。

[0148] 合适的胶原蛋白产物是可商业获得的,包括来自例如Kensley Nash Corporation (Exton, Pa.), 其由牛皮制造被称为semed F的纤维状胶原蛋白。来源于牛皮的胶原蛋白材料还可由Integra Life Science Holding Corporation (Plainsboro, N.J.) 制造。天然来源的或重组的人胶原蛋白材料也适合在本发明中使用。举例来说,重组人胶原蛋白产品可从Fibrogen, Inc. (San Francisco, Calif.) 获得。例如,加入本发明组合物中的固体微粒胶原蛋白可以是完整的或重构的纤维的形式,或为随机成形的颗粒。

[0149] 胶原蛋白可在室温下溶解于水中以形成水溶液,但在37℃经过聚合形成凝胶。Miyata在美国专利4,164,559中记载,已经很好地确定了胶原蛋白的化学、分子结构和生化性质(Annual Review of Biophysics and Bioengineering, Vol. 3, pp. 231-253, 1974)。胶原蛋白是结缔组织如角膜、皮肤等的主要蛋白质,并且可通过用蛋白水解酶(不是胶原酶)如胃蛋白酶处理来将其溶解并进行纯化。经溶解的胶原蛋白是缺少端肽的、相对便宜的、非抗原性的并且可用作生物医学材料。酶溶解的天然胶原蛋白在酸性pH中是可溶的,但在生理pH和37℃下聚合形成凝胶。

[0150] 在其它实施方案中,在本领域已知的多种制剂中,水凝胶包含聚乙二醇(PEG)。PEG水凝胶中可以存在的聚合物的非限制性实例包括聚乳酸(PLA)、乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)和聚己内酯(PCL)。这些共聚物的一些实例包括PLA-PEG-PLA、PLGA-PEG-PLA和mPEG-b-PCL(1200)-b-PEG(6000)-b-PCL(1200)共聚物。PEG的分子量可以是至少500。在进一步的实施方案中,PEG的分子量为4,000-8,000。在另一个进一步的实施方案中,PEG的分子量为8,

000-45,000。PLGA是一种由于其生物可降解性和生物相容性而在许多食品和药品管理局(FDA)批准的治疗装置中使用的共聚物。PLGA是通过两种不同单体的随机开环共聚而合成的,该单体为乙醇酸和乳酸的环状二聚物(1,4-二氧杂环己烷-2,5-二酮)。根据用于聚合的丙交酯与乙交酯的比例,可获得不同形式的PLGA:这些形式通常以使用的单体比例来确定(例如,PLGA 75:25确定了一种组成为75%的乳酸和25%的乙醇酸的共聚物)。所有PLGA都是无定形的而不是结晶的,并且显示40-60℃的玻璃化转变温度。用PLGA进行药物递送或生物材料应用具有极低的全身毒性。PLA是一种生物可降解的、热塑性的、脂肪族的聚酯,来源于可再生资源如玉米淀粉、木薯粉产品或甘蔗。PCL是一种具有60℃左右的低熔点和约-60℃的玻璃化转变温度的生物可降解的聚酯。PCL是使用催化剂如辛酸亚锡通过 ϵ -己内酯的开环聚合而制备的。PCL是经FDA批准的可用于人体的材料,植入后经历缓慢降解。

药物植入物

[0151] 在一些实施方案中,本发明涉及在活肿瘤中使用药物植入物以进行多路化疗药物功效研究的方法。本发明的方法较之在体外细胞培养模型中筛选具有优势,因为体外模型对药物的响应方式不同于在癌症的完好动物模型中或患者中生长的肿瘤。因此,基于体外模型来决定是否继续进行药物研发以进入临床或用于对患者癌症进行治疗性干预是存在缺陷的。相反,本发明提供了用于在活的人肿瘤环境下或在癌症动物模型的环境下同时测试多种潜在抗癌剂的方法。

[0152] 在一些实施方案中,利用能够使药棒平行插入肿瘤内的导引针的阵列头,将单独制备的包含抗癌剂或测试剂的药物植入物分配在实体组织内。注射装置可使药物植入物通过导引针插入肿瘤中。药物植入物可包含固体杆或棒,并且可优选包含固体形式的药剂。在一些情况下,药物植入物包含允许药物在组织内持续或延时释放的生物可降解的惰性粘合剂。

[0153] 在一些实施方案中,药物植入物具有小于约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1mm的直径。针阵列头可配置为容纳约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、100、200、300、400个或超过1,000个药物植入物。多个药物植入物可捆束在一起形成一束药物植入物,其中该束具有适合用针进行注射的直径。

[0154] 在一些实施方案中,注射装置包括配置用于将一个或多个药物植入物通过针推送到实体组织内的柱塞。在一些实施方案中,实体组织包括肿瘤。

[0155] 插入肿瘤后,药剂可在一分钟至六周的一段时间内从一个或多个药物植入物中释放出来,以使肿瘤的离散部分以空间受限的方式单独地暴露于每种药物。

[0156] 由于采用本发明的方法沿平行轴向肿瘤深处或沿肿瘤的z轴插入药物,因此可横跨药棒的插入路径(与其垂直或正交)制作肿瘤的切片,以便能对每一插入药物的邻近区域内的肿瘤响应进行分析,从而能够在活肿瘤环境下对药物功效进行多路分析。或者,可平行于体平面插入药物。

[0157] 在本发明的一些实施方案中,利用载体装置如针将一个或多个药物植入物插入组织中。在一些优选的实施方案中,利用本发明的针阵列将多个药物植入物沿组织的平行轴插入。

[0158] 在一些情况下,多个针附接于多个致动器,而致动器与多个储器中的多个药物植入物或药物植入物束相耦合,使得下压柱塞导致药物植入物排出,或者导致药物植入物注

射到组织中。在某些进一步的实施方案中,该多个柱塞中的柱塞在各自的第二端可操作地耦合在一起以便可以同时下压。

[0159] 植入物可以部分或完全陷入组织中。经由针将植入物插入组织内可促使植入物沉积到组织中。可通过下压与针相关联的柱塞使植入物进一步沉积到组织中。

[0160] 一旦植入物已沉积到组织中,植入物就可溶解并扩散到组织中。扩散速率可受植入物体积的影响,或者可受是否存在用于降低植入物在组织内的溶解速率的惰性粘合剂的影响。药剂可在约一分钟至约一个月、约一小时至约六周、约12小时至约72小时、约24小时至约48小时、约一周至两周、约两周至三周或约三周至四周的一段时间内扩散到组织中。

递送装置和方法

[0161] 图1示出了利用针和药物植入物将候选药剂递送到组织。将针3插入组织,下压柱塞1将药物植入物2注射到组织中。插入组织后,候选药剂4例如通过扩散被递送到组织。

[0162] 在一些实施方案中,利用载体装置如针将一个或多个多孔管插入组织内。在一些优选的实施方案中,利用针阵列,如PCT/US2008/073212中描述的针阵列,将多个多孔管沿组织的平行轴插入,该申请在此通过引用完整并入。

[0163] 在一些情况下,多个针附接于多个致动器,致动器与多个储器中的多个多孔管或多孔管束相耦合,使得下压柱塞导致多孔管排出,或者导致多孔管被注入组织内。在某些进一步的实施方案中,该多个柱塞中的柱塞在各自的第二端可操作地耦合在一起以便可以同时下压。某些更进一步的实施方案包含配置为以选择性可变速率下压该多个柱塞中的所有柱塞的柱塞驱动器。在其它实施方案中,该多个致动器中的每一个包含多个流体传输线中的一个,该流体传输线具有第一端和第二端,该多个流体传输线中的每一个的第一端与该多个储器中的各自一个储器耦合。在其它实施方案中,该装置包含流体压力源,并且该多个致动器中的每一个包含该流体压力源与该多个储器中的各自一个储器之间的流体耦合。在进一步的实施方案中,流体压力源包含压缩器、真空贮器、蠕动泵、主缸、微流体泵和阀中的至少一个。

[0164] 在另一个实施方案中,多个针中的每一个包含沿其长度分布的多个口。多孔管中的流体药剂可经由这些口与实体组织扩散连通,从而使得流体药剂在插入针的持续时间内递送至组织。这一应用可用于控制被动递送的持续时间。在一些情况下,多孔管的一端可以是开放的,并且配置为使得向此端施加压力可决定流体药剂从多孔管递送的速率。

[0165] 口可以沿着针不同地配置。在某些实施方案中,多个口中的每一个的尺寸与其各自距针尖端的距离负相关。在某些其它的实施方案中,多个口的分布密度与其各自距针尖端的距离负相关。在某些其它的实施方案中,多个口沿针的长度以螺旋图样分布。在某些其它的实施方案中,多个口成对地排列在针的相对两侧,每对口沿针的长度相对于邻近的成对孔旋转90度。

[0166] 管可部分地或完全陷入组织中。管可以是空心的,或者可以均匀地包含多孔材料。将管经由针插入组织中可有助于将管置于组织内。可通过下压与针相关联的柱塞将管进一步置于组织中。

[0167] 将管置于组织中后,可将管打碎、切割、切开、分开或分离以将管的顶端从管的底端移去。底端仍然置于组织中,而顶端则从组织中移去。在一些实施方案中,管的底端含有治疗剂,而管的顶端不含治疗剂。在一些实施方案中,管的底端和顶管都含有治疗剂。

[0168] 一旦管已置入组织内,管的内容物(例如,药物组合物或治疗剂)就可从管扩散到组织中。扩散速率可受到管的孔隙率的影响。内容物可在约一分钟至约一个月、约一小时至约一周、约12小时至约72小时或约24小时至约48小时的一段时间内通过管材料扩散到组织中。

[0169] 参见图2,显示了针阵列组件100,其包括多个针112、含多孔管的多个储器114、多个递送致动器如本实例中的柱塞116和控制器102。多个针112中的每一个都相对于该多个针中的其它针固定到位,并且柱塞也可操作地耦合,以便固定到位并可同时致动。多个针112中的每一个与多个储器114中的各自一个流体连通,并且多个柱塞中的每一个包含第一端,该第一端定位于多个储器114中的各自一个中。控制器102与多个柱塞116中的每一个的第二端可操作地耦合。控制器配置为在速度、距离和移动方向方面控制柱塞在储器内的致动。

[0170] 储器114内的每个多孔管可填充有不同的药剂,或一些或全部多孔管可填充有相同的药剂。多个柱塞116在第二方向上的移动在各自的储器114中产生正压力或超压力,从而经由各自的针112推出储器的内容物。

[0171] 在这种配置中,相对少量的多种治疗剂可同时直接插入实体组织106的区域中以供评价和分析。在插入后,多孔管内的流体药剂通过被动扩散释放到周围组织。在一些实施方案中,递送到组织的治疗剂的量少于每针1 μ L。对组织106以及对递送到组织106的不同治疗剂的功效的评价可用于例如为随后的临床试验筛选潜在的治疗剂,或用于基于治疗剂在组织106中的相对功效作出受试者特异性的治疗决定。

[0172] 根据各种实施方案,可使用任何数目的针。例如,可使用少至一个、两个或三个的针,而根据一些实施方案,可使用超过一千个针。

[0173] 图3是根据另一实施方案的递送组件150的图解视图。递送组件150包括针阵列152、插入器组件190、致动器组件156、驱动器组件158、控制组件240和框架162。框架162提供了一个基本上为刚性的结构,组件150的其它元件与之耦合。

[0174] 针阵列152包含多个针筒166和针模块168。在所示的实施方案中,针模块168与框架162集成在一起。多个针筒166中的每一个在第一端170处耦合在各自的针孔174(在针模块168内延伸)内,并且包含腔室176,在该示出的实施方案中,腔室176具有0.15mm的标称直径,且其基本上延伸达针筒166的整个长度。每个针筒166包括位于靠近第一端170的区域中的储器178,位于靠近第二端的区域中的针120,以及位于针筒166第二端的尖端124。在所示的实施方案中,尖端124逐渐变细成为一个点。

[0175] 每个递送针120设置有沿其长度分布的多个口122。多个针筒166中的每一个和各自的针120的长度根据实施方案不同而变化。在一个实施方案中,每个针筒166的长度超过15cm,而根据其它实施方案,每个针筒的长度分别超过10cm、为5cm至10cm和优选超过2cm。同样地,根据各种实施方案,多个递送针120中的每一个设置有口122沿其间隔开来的各自针筒166部分,其长度超过0.1cm、超过2cm、超过4cm和超过8cm。

[0176] 如图3所示,插入器组件190在各自的插入器孔190内包含多个与插入器模块192耦合的插入器针140,该插入器孔190在其内部延伸,其结构与针筒166在针模块168中的布置相对应,使得多个针筒166中的每一个可定位于多个插入器针140中的各自一个内。插入器组件190在针筒166内在第一位置(其中针筒166中的每一个只有尖端124从多个插入器针

140中的各自一个延伸)到第二位置(其中针筒166中的每一个的第二端从各自的插入器针140延伸一段足以清除各自的递送针120的所有口122的距离)之间是可轴向滑动的。

[0177] 根据一个实施方案,提供了垫片,其配置为放置在插入器模块192和针模块168之间,尺寸为使得当插入器模块和针模块均与垫片接合时,插入器模块保持在第一位置。除去垫片则允许插入器模块192和针模块168彼此相对运动,从而允许插入器模块相对于针模块移位到第二位置。

[0178] 如图所示,致动器组件156包含多个柱塞200,柱塞200在各自的的第一端204与柱塞模块206耦合,其结构与针筒166和插入器针140的布置相对应,使得多个柱塞200中的每一个的第二端208可定位于多个针筒166中的各自一个的储器178内。在多个柱塞200的每一个的第二端208处提供了一个O形环210以密封地接合各自的腔室176的壁。致动器组件156也包含致动器212,致动器212与致动器模块214耦合,致动器模块214又与柱塞模块206刚性耦合。在所示的实施方案中,致动器212包含测微器装置220,如本领域所熟知的,测微器装置220具有套管222、圆筒224和主轴228。圆筒224与框架162刚性耦合,而主轴228与致动器模块214可旋转地耦合,以便控制致动器模块相对于框架162的平移运动。测微器装置以0.01mm的增量标有刻度,套管222每旋转一圈主轴移动0.5mm,且最大行程为15mm。因此,套管的每次完全旋转使多个柱塞中的每一个在各自的针筒166的腔室178内移动0.5mm,并且每次旋转排出约 0.0001cm^3 体积或0.1nL。因此,鉴于15mm的最大行程为,多个针120的每一个的最大分配容积约为3nL。

[0179] 驱动器组件158包含如本领域所熟知的步进马达230,并且马达230含有马达壳体232、与马达230的转子耦合的马达轴234和如本领域所熟知的其它元件。马达壳体232与框架162刚性耦合,而马达轴234与测微器装置的套管222可滑动地耦合,同时可与其旋转锁定,例如经由花键耦合。因此,来自马达轴234的旋转力被传输到套管222,而套管的轴向移动不受马达轴限制。此类耦合是机械领域所熟知的。示例性实施方案的步进马达230配置为将每个旋转分为125个步幅。因此,马达230的每个增量旋转步幅使套管旋转约 3° ,使每个储器178排出约0.8pL的体积。

[0180] 控制器组件160包括控制器240和控制线缆242,控制线缆242从控制器延伸到步进马达230。

[0181] 控制马达轴234的旋转方向、速度和程度的信号以此类马达所属领域熟知的方式从控制器240经由控制线缆242传输到步进马达230。根据一个实施方案,控制器是可控的。用户可控控制器从而通过选择旋转速度来控制从递送针120的递送速度,在一些情况下,通过选择马达的部分和完全旋转数来递送多孔管的容积。根据另一实施方案,控制器是人工操作的,以使得用户可实时控制马达230的旋转速率和方向。根据第三实施方案,可省去驱动器和控制器组件,用户可通过手动旋转致动器组件212的套管222来控制递送。

[0182] 可以多种方式完成对储器178的装料。例如,可提供装料容器,其包含多个杯体或隔室,其布置与针筒166的布置相对应。用户首先将一种选定的流体药剂或药剂组合放置在每个杯体的多孔管材料内。图3的递送组件150放置成如图所示针筒指向下方,并且致动器212的主轴228完全延伸。下降框架162直至针120完全浸入各自的杯的内容物中。然后控制马达230使其往相反方向旋转,向内拉主轴228并向上拉柱塞200。这便在储器178内产生了相对于周围环境的负压力,从而经由针口122将内容物吸入针筒166。当储器充分填充时,停

止旋转马达,并且从装料容器撤出针阵列152。

[0183] 根据一个实施方案,为了递送填充物,针阵列152的每个针筒166定位在插入器组件190的各自一个插入器针140内,以使得针120的尖端178从插入器针140伸出。递送组件190然后放置成与受试者的靶组织区域轴向对齐,并轴向平移使得针120的尖端刺入受试者的皮肤。递送组件190的轴向平移持续到针筒166的尖端124已刺入靶组织区域内一段选定的距离为止。插入器组件190然后保持在该位置,而框架162及与之耦合的元件继续轴向移动,使得针120延伸进入靶组织区。

[0184] 当针120正确定位时,停止递送组件190的移动,并使框架162相对于受试者保持在原位。然后控制步进马达230以正向旋转套管222,以便使主轴228延伸,进而驱动柱塞200进入针筒166并在各自的储器178中产生超压,从而将内容物经由递送针120的口122从储器推送靶组织区域。

[0185] 递送可在几秒钟内进行,或者可在相对较低的超压下延续数分钟或数小时,以使储器的内容物被周围组织完全吸收。根据参考图5所描述的实施方案,可以控制步进马达230以足够快地旋转转子,从而在少于一秒的时间内将柱塞200下压全部的15mm,或者足够慢地旋转马达,一次旋转可花费数小时。

[0186] 现在转到图4,根据另一实施方案,示出了递送组件270的元件。针模块272包含穿过其延伸的、以密集的阵列排布的很多个针穴274。针筒166以各种长度和各种口数目、尺寸和间距来单独提供。

[0187] 在使用中,用户选择多个针以用于特定程序,并且选择特定的针筒166,以针对特定程序选定的排布将每个针筒放置在针模块的多个穴274中的各自一个中。用户可能仅需要少量的针;如一至五个,或者可能需要数百个或数千个针。此外,针筒166可具有不同的长度和构造。针可在多孔管内预先装填有流体药剂。用户至少部分地根据如受试者体内靶组织区的尺寸、形状和位置,期望的靶组织区内流体分布密度,靶组织的渗透性等因素,来选择针模块272中针筒166的排布及其各自的长度和构造。

[0188] 前面实施方案的递送致动器已描述为柱塞。然而,可使用任何合适的致动器来控制从储器递送至针的治疗剂的量。例如,可利用流体压力(如通过压缩空气或压缩液体而产生的)控制经由多孔管和针递送至生物组织的区域的治疗剂的量。

[0189] 现在参见图5,根据另一实施方案,示出了递送组件300。递送组件300包括多个针筒302,针筒302包括各自的储器178和针120。流体连接器312使针筒302与歧管304流体连通。可通过阀310的操作使流体压力源306和流体真空源308各自与歧管304流体连通。

[0190] 根据图5的实施方案,针筒302不是彼此相对固定的,而是可以单个安放到例如靶组织区域内。可通过将递送针120放入选定的流体如治疗剂或各自的治疗剂中来填充储器,并且流体真空源放置成与歧管流体连通,往储器内吸入负压,从而将药剂吸入针内。用户然后将针120定位于靶组织区域。当它们全部就位时,给歧管304增压,从而迫使流体从每个针筒166的储器经由各自的递送针的口122排出。虽然图5显示了简单的流体回路,但应当理解,在实践中这样的回路可包含阀、调压器、蠕动泵、微流体泵、真空贮器、压缩器、控制器等中的任一种,所有这些都是本领域熟知的,并且普通技术人员有能力针对指定应用进行选择 and 配置。

筛选候选药剂

[0191] 本发明的药物递送装置可用于通过将一种或多种填充有一种或多种治疗剂的多孔组合物沉积于受试者的组织中而向受试者施用治疗剂或候选治疗剂的方法。多种候选治疗剂的空间受限递送允许平行评价药剂对实体组织如肿瘤的效果。

[0192] 多孔组合物内的流体药剂可含有可用于监测对治疗剂的响应的染料。染料可以是位置标记物,或者其可被选择用于例如通过荧光来报道成像时生物学功能的激活或失活。这种方法使实验者能对治疗剂对于目标生理系统的影响作出直接评价。

[0193] 可通过评价细胞或组织的生物学功能改变来对治疗剂或候选治疗剂的效果进行检测。在一些实施方案中,生物学功能是途径、酶的活性、基因的表达、基因的转录、与基因相关的RNA分子的翻译或肽合成。在一些实施方案中,生物学功能与癌症、退行性疾病、炎症、新陈代谢、细胞凋亡或免疫应答相关。在一些实施方案中,生物学功能与癌症相关。在一些实施方案中,途径是癌途径。在一些实施方案中,酶与癌症相关。在一些实施方案中,基因与癌症相关。在一些实施方案中,途径是细胞凋亡途径,并且染料报道细胞凋亡。

[0194] 在一些实施方案中,基因是ABL1、ABL2、ACSL3、AF15Q14、AF1Q、AF3p21、AF5q31、AKAP9、AKT1、AKT2、ALK、AL017、APC、ARHGEF12、ARHH、ARNT、ASPSR1、ASXL1、ATF1、ATIC、ATM、BCL10、BCL11A、BCL11B、BCL2、BCL3、BCL5、BCL6、BCL7A、BCL9、BCR、BHD、BIRC3、BLM、BMPR1A、BRAF、BRCA1、BRCA2、BRD3、BRD4、BRIP1、BTG1、BUB1B、C12orf9、C15orf21、CANT1、CARD11、CARS、CBFA2T1、CBFA2T3、CBFB、CBL、CBLB、CBLC、CCND1、CCND2、CCND3、CD74、CD79A、CD79B、CDH1、CDH11、CDK4、CDK6、CDKN2A-p14ARF、CDKN2A-p16 (INK4a)、CDKN2C、CDX2、CEBPA、CEP1、CHCHD7、CHEK2、CHIC2、CHN1、CIC、CLTC、CLTCL1、CMKOR1、COL1A1、COPEB、COX6C、CREB1、CREB3L2、CREBBP、CRLF2、CRTC3、CTNNB1、CYLD、D10S170、DDB2、DDIT3、DDX10、DDX5、DDX6、DEK、DICER1、DUX4、EGFR、EIF4A2、ELF4、ELK4、ELKS、ELL、ELN、EML4、EP300、EPS15、ERBB2、ERCC2、ERCC3、ERCC4、ERCC5、ERG、ETV1、ETV4、ETV5、ETV6、EVI1、EWSR1、EXT1、EXT2、EZH2、FACL6、FANCA、FANCC、FANCD2、FANCE、FANCF、FANCG、FBXW7、FCGR2B、FEV、FGFR1、FGFR10P、FGFR2、FGFR3、FH、FIP1L1、FLI1、FLT3、FNBP1、FOXO1A、FOXO3A、FOXP1、FSTL3、FUS、FVT1、GAS7、GATA1、GATA2、GATA3、GMPS、GNAQ、GNAS、GOLGA5、GOPC、GPC3、GPHN、GRAF、HCMOGT-1、HEAB、HEI10、HERPUD1、HIP1、HIST1H4I、HLF、HLXB9、HMGA1、HMGA2、HNRNPA2B1、HOOK3、HOXA11、HOXA13、HOXA9、HOXC11、HOXC13、HOXD11、HOXD13、HRAS、HRPT2、HSPCA、HSPCB、IDH1、IDH2、IGH@、IGK@、IGL@、IKZF1、IL2、IL21R、IL6ST、IRF4、IRTA1、ITK、JAK1、JAK2、JAK3、JAZF1、JUN、KDM5A、KDM5C、KDM6A、KDR、KIAA1549、KIT、KLK2、KRAS、KTN1、LAF4、LASP1、LCK、LCP1、LCX、LHFP、LIFR、LM01、LM02、LPP、LYL1、MADH4、MAF、MAFB、MALT1、MAML2、MAP2K4、MDM2、MDM4、MDS1、MDS2、MECT1、MEN1、MET、MHC2TA、MITF、MKL1、MLF1、MLH1、MLL、MLLT1、MLLT10、MLLT2、MLLT3、MLLT4、MLLT6、MLLT7、MN1、MPL、MSF、MSH2、MSH6、MSI2、MSN、MTCP1、MUC1、MUTYH、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、MYH11、MYH9、MYST4、NACA、NBS1、NCOA1、NCOA2、NCOA4、NF1、NF2、NFIB、NFKB2、NIN、NONO、NOTCH1、NOTCH2、NPM1、NR4A3、NRAS、NSD1、NTRK1、NTRK3、NUMA1、NUP214、NUP98、NUT、OLIG2、OMD、P2RY8、PAFAH1B2、PALB2、PAX3、PAX5、PAX7、PAX8、PBX1、PCM1、PCSK7、PDE4DIP、PDGFB、PDGFRA、PDGFRB、PER1、PHOX2B、PICALM、PIK3CA、PIK3R1、PIM1、PLAG1、PML、PMS1、PMS2、PMX1、PNUTL1、POU2AF1、POU5F1、PPARG、PRCC、PRDM16、PRF1、PRKAR1A、PR01073、PSIP2、PTCH、PTEN、PTPN11、RAB5EP、RAD51L1、RAF1、RANBP17、RAP1GDS1、RARA、RB1、RBM15、RECQL4、REL、RET、ROS1、RPL22、RPN1、RUNX1、RUNXBP2、SBDS、SDH5、SDHB、

SDHC、SDHD、SEPT6、SET、SETD2、SFPQ、SFRS3、SH3GL1、SIL、SLC45A3、SMARCA4、SMARCB1、SMO、SOCS1、SRGAP3、SS18、SS18L1、SSH3BP1、SSX1、SSX2、SSX4、STK11、STL、SUFU、SUZ12、SYK、TAF15、TAL1、TAL2、TCEA1、TCF1、TCF12、TCF3、TCL1A、TCL6、TET2、TFE3、TFEB、TFG、TFPT、TFRC、THRAP3、TIF1、TLX1、TLX3TMPRSS2、TNFAIP3、TNFRSF17、TNFRSF6、TOP1、TP53、TPM3、TPM4、TPR、TRA@、TRB@、TRD@、TRIM27、TRIM33、TRIP11、TSC1、TSC2、TSHR、TTL、USP6、VHL、WAS、WHSC1、WHSC1L1、WRN、WT1、WTX、XPA、XPC、ZNF145、ZNF198、ZNF278、ZNF331、ZNF384、ZNF521、ZNF9、mTOR、MEK、PI3K、HIF、IGF1R、GLS1或ZNFN1A1。在一些实施方案中,途径与任一上述基因相关。在一些实施方案中,肽合成中的肽是任一上述基因的基因产物。

[0195] 在一些实施方案中,靶组织不呈现疾病的特征,而染料可用于评价单个组织对一种或多种化合物的响应。在一些情况下,可以施用一种或多种化合物以在组织内产生改变的生理状态。改变的生理状态可以是与实体组织中(在一些实施方案中是实体瘤中)(包括区域内)或生物样品中的条件、过程、途径、动态结构、状态或其它活性直接相关的任何可检测参数,该参数允许检测来自受试者或生物来源的生物样品中(例如,相对于适当的对照以统计上显著的方式可测量地改变的)结构或功能的变化。本发明的方法因此部分地涉及此种相关性,其中改变的生理状态的指示物可以是,例如细胞或生物化学活性,作为进一步的非限制性实例,包括细胞活力、细胞增殖、细胞凋亡、对于抗生长信号的细胞抗性、细胞运动性、结缔组织降解酶的细胞表达或加工、血管发生的细胞募集或本文提供的其它标准。

[0196] 改变的生理状态可进一步涉及任何状态或功能,其中与实体组织功能直接或间接相关的任何结构或活性相对于对照或标准已经以统计学上显著的方式发生变化,并且可能源于实体组织成分与引入的药剂之间的直接或间接的相互作用,或源于由于此类相互作用而形成的中间体(包括代谢物、分解代谢物、底物、前体、辅因子等)之间的相互作用而发生的结构或功能变化。此外,改变的生理状态可包括受试者或生物来源的一些或全部细胞或组织中(在一些实施方案中是在实体组织的一些或全部细胞中,以及在一些实施方案中是在肿瘤如实体组织中的实体瘤的一些或全部细胞中)改变的信号转导、呼吸、代谢、遗传、生物合成或其它生物化学或生物物理学活性。作为非限制性实例,改变的生物信号转导、细胞活力、细胞增殖、细胞凋亡、对于抗生长信号的细胞抗性、细胞运动性、结缔组织降解酶的细胞表达或加工、血管发生的细胞募集或其它标准,包括凋亡途径的诱导以及细胞内非典型化学和生物化学交联物质的形成,无论是通过酶机制还是通过非酶机制形成的,都可被视为指示改变的生理状态。

[0197] 根据一个实施方案,随后将已向其中递送多种治疗剂的实体组织从受试者体内切除并进行评价。例如,在靶组织是癌性肿瘤的情况下,注射到其中的多种药剂可包括正在研究其对此类肿瘤的功效或作用的一些药剂。通过体内注射各种药剂,然后在去除肿瘤之前等待一段选定的时间,可研究药剂对原位肿瘤的效果。这保留了肿瘤的微环境,从而将这种方法与现有的离体或体外治疗评价方法区分开来。随着时间的推移,每种药剂以或大或小的程度从其递送轴向外渗透,这取决于如周围组织的密度、药剂的粘度和组成、各自药剂对组织的湿润性等因素。通常来说,药剂扩散于其中的组织部分是与各自己的递送轴共轴的、大致为柱形的区域。

[0198] 根据各种实施方案,组织区域在切除前保留在原位一段时间。例如,通常认为递送后48-72小时的一段时间对于肿瘤显示可检测的响应一般是足够的。在其它情况下,等待期

可能是数小时、数天或数周。根据一些实施方案,在插入针之前采用已知方法对组织区域进行成像以精确定位组织的靶区域。可在将多种药剂递送至组织区域之前和之后反复对该区域进行成像。

[0199] 在一些实施方案中,可沿着基本垂直于(例如,垂直的或偏离垂线多达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35度或更多)平行轴的平行平面将切除的组织切成多个连续的组织切片,以便通过多种已知的组织学、组织化学、免疫组织学、组织病理学、显微检查(包括形态测定分析和/或三维重建)、细胞学、生物化学、药理学、分子生物学、免疫化学、成像或其它分析技术中的任一种进行分析,这些技术是相关领域技术人员已知的。参见例如Bancroft和Gamble, *Theory and Practice of Histological Techniques* (第6版) 2007 Churchill Livingstone, Oxford, UK; Kieman, *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*, 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 和M.A. Hayat (编著), *Cancer Imaging-Vols. 1 and 2*, 2007 Academic Press, NY, 其中每一篇均通过引用完整并入本文。可在将分配器针插入实体组织之前、期间或之后进行成像。

[0200] 根据其它实施方案,在组织的一部分被切除后,将多种药剂经由针阵列的多个针中的各自针递送到该组织部分。

[0201] 现参见图6,在注射程序和随后的切除术后,示出了肿瘤的一部分320。已沿基本上垂直于递送轴的平面将肿瘤320切成多个切片322。柱形递送区324限定了各自药剂的渗透区域,并且垂直于切片322的平面而延伸。

[0202] 对用户而言,区域324中有许多可能不容易检测到,因此在所注射的药剂之间,在相距较远的位置通常至少有两种容易检测的位置标记物324a、324b。用户然后可铺上其上每个递送轴的位置都已得到标记的模板,将指示的模板标记物位置与指定切片322的可检测的位置标记物324a、324b对齐,从而确定其余的递送区域324的位置。位置标记物324a、324b可以是用户可检测的任何组合物。各种示例性位置标记物在本文其它部分详细描述。根据一个实施方案,选择位置标记物,使之能抵抗向周围组织内的渗透和扩散并保持浓缩在如324a所示的狭窄的柱形区中,以便在注射程序后的一段延长的时间内是可检测的,并且为定位模板提供精确的指导。

[0203] 除了位置标记物以外,在所注射的药剂之间还可以有对照药剂。例如,阴性对照可包含在其它药剂中用作载体的物质,而阳性对照可包含大多数或全部在其它递送轴单独递送的药剂的化合物。

[0204] 在对肿瘤320进行切片以后,如下文更详细描述,用户对肿瘤320的多个切片322的递送区324进行选定的测定。本文公开的装置和方法的一个优点是,除了评价给定药剂对肿瘤的功效以外,还可对药剂在各递送区域324处的功效进行评价和比较。此外,可垂直地和水平地评价给定药剂对肿瘤各个部分的效果。通过将药剂在切片322a的递送区域324c中的效果与例如其在切片322b和322c的相同区域324c中的效果进行比较,可以区分该药剂对垂直方向上可能出现的不同组织组成的效果。类似地,可在阵列中的几个递送轴如324c和324d处递送相同的药剂,然后可比较指定切片322中的那些位置处的相对效果,从而提供了水平上的差异。如本领域所熟知的,生物组织甚至在相对较小的距离内也很少是同质的。给定药剂可能对肿瘤的一些组织结构基本上无效果,但另一方面可能对其它结构非常有效。

如上所述,可检测和评价此类差异化效果。

[0205] 可评价的另一个有价值的方面是多种药剂在组织内它们所相互作用的区域中的效果。递送区域324e和324f比其它递送区域隔得更近,导致各自的药剂在区域324ef中相互作用,在区域324ef处各自的递送区域重叠。

[0206] 根据某些本文考虑的实施方案,可通过检测本文提供的改变的生理状态,包括通过评估癌细胞所特有的多个生物学参数(如Hanahan和Weinberg (2000Cell 100:57)以及其中引用的参考文献所综述的)中的任一个,来鉴定候选药剂的功效。其中公开了用于测定候选药剂对癌细胞所展现的一种或多种性状的效果的方法,该性状可通过本领域已知的、用于测定以下一个或多个方面的多种技术中的任一种来检测:(i) 规避细胞凋亡的能力,(ii) 生长信号自给能力的获得,(iii) 对生长抑制信号的不敏感性,(iv) 组织侵入和转移表型的获得,(v) 无限复制潜能,和(vi) 持续的血管发生。本领域技术人员熟悉多种用于检测是否存在这些生理状态改变的方法,这些方法可能适合于特定的已切除的肿瘤系统。参见例如Bonificano等人(编)Current Protocols in Cell Biology,2007John Wiley&Sons,NY; Ausubel等人(编)Current Protocols in Molecular Biology,2007John Wiley&Sons,NY; Coligan等人(编),Current Protocols in Immunology,2007John Wiley&Sons,NY; Robinson等人(编),Current Protocols in Cytometry,2007John Wiley&Sons,NY。为鉴定改变的生理状态而可以测定的参数的非限制性实例包括对细胞活力、细胞分裂、细胞凋亡、坏死、细胞表面标记物表达、细胞激活状态、胞外基质(ECM)组分或ECM降解酶的细胞加工、形态测定分析、细胞过程的延长或缩短、细胞骨架重组、改变的基因表达进行的测定,例如通过免疫组织化学的原位杂交(例如,Shibata等人,2002J.Anat.200:309)、细胞内磷蛋白定位(例如,Gavet等人,1998J Cell Sci 111:3333)等。

[0207] 如本文所述,对改变的生理状态的至少一个指示物的水平测定还可用于对受试者群体是否有资格参与临床试验进行分类(stratify)。可以考虑这些实施方案和相关的实施方案,因为它们有效地提供了可在比现有情况更早的研发阶段评价候选治疗化合物的优点。例如,在II期研究之前确立生物标记物参数(其可作为排除受试者的基础)不是目前的标准临床试验操作,然而,本文所述的实施方案即使在缺乏已确立的生物标记物标准的情况下,例如,在I期或II期,也可提供有用的结果。因此,预期通过实施某些本文公开的实施方案,可比以前的情况更早地在实体瘤肿瘤学药物开发计划中获得关于候选药剂性质的相关信息,包括采用以下方式:该方式能够时间有效地和成本有效地允许从临床试验中排除基于特定候选药剂无应答者结果能够预期无响应或无受益的受试者。

[0208] 例如,根据如本文所述测定的改变的生理状态的至少一种指示物的水平对受试者群体进行分类,可提供有用的标记物,将该标记物与在癌症受试者中使用的任何候选治疗剂的功效相关联,和/或将受试者分类为应答者、无应答者或可能应答者。

[0209] 在一些实施方案中,该方法在药物筛选和药物开发中是有用的,如在临床前动物模型中用于鉴定和功能性表征潜在的新治疗剂。例如,可在瘤内施用多种siRNA,并且可比较它们降低期望的靶基因的表达的相对能力。其它相似的实施方案可用于临床环境中,例如用于“取消选择”在特殊肿瘤中无效果的已知治疗剂,或将其排除在考虑之外,从而通过避免可能与施用无效治疗方案有关的时间损失或不期望的副作用,来有利地推进对受试者的治疗管理。

[0210] 一些实施方案包括其中实体组织包含肿瘤的那些实施方案,其中可对实体瘤进行药剂递送,和/或可从实体瘤进行样品采集。熟悉本领域的人员根据本文公开内容将会理解,在实施本文所述的某些实施方案的过程中,选择的肿瘤区域可包含本文所述装置的针所插入、引入或以其它方式接触肿瘤的部位。该区域可基于任何数目的方式进行选择,包括基于可在针插入、引入或接触步骤之前、期间或之后进行的成像,或基于从受试者切除实体组织之前、期间或之后进行的成像,或基于其它标准,包括但不限于解剖学位置、外科手术过程中的可达性、血管化程度或其它标准。

报道细胞系的产生

[0211] 本发明提供了产生报道细胞系的方法,其中细胞发出指示信号传导途径调节的可检测信号。在一些实施方案中,报道细胞系包括癌细胞系和整合的指示致癌途径的调节的报道子(reporter)。在一些实施方案中,使用显示萤光素酶基活性的基因捕获陷阱来产生报道细胞系。报道子可报道致癌途径的抑制。在一些实施方案中,本发明涉及使用报道细胞系和报道组织来提供响应于信号传导途径的调节的可检测信号。可采用选择过程来产生基因捕获陷阱衍生的萤光素酶基活性状态的报道子。所得到的报道细胞响应于对特定致癌途径的抑制产生稳定的阳性信号(例如,电磁辐射的发射)。一个明确的发现是,癌途径的激活状态作为转录输出反映出来,因为相比于正常组织,在癌基因活性肿瘤中特定几组基因被上调和下调。本文所述的基因捕获陷阱通过将报道子引入内源性基因(其中天然启动子、增强子、绝缘子和微小-RNA调节表达)中而反映出原始肿瘤生物学。当与适当的药物选择策略结合时,基因捕获载体能允许快速分离肿瘤细胞,该肿瘤细胞在报道子整合到针对每种目标途径抑制剂响应最强烈的内源基因后表达捕获的报道子。因此,一种载体适合具有任何激活的目标致癌途径的任何肿瘤细胞类型。

[0212] 在一些实施方案中,可检测信号包括荧光蛋白,其非限制性实例包括GFP、BFP、CFP、YFP、EGFP、EYFP、Venus、Citrine、phiYFP、copGFP、CGFP、ECFP、Cerulean、CyPet、T-Sapphire、Emerald、YPet、AcGFP1、AmCyan、AsRed2、dsRed、dsRed2、dsRed-Express、EBFP、HcRed、ZsGreen、ZsYellow、J-Red、TurboGFP、Kusabira Orange、Midoriishi Cyan、mOrange、DsRed单体、mStrawberry、mRFP1、tdTomato、mCherry、mPlum和mRaspberry。

[0213] 在一些实施方案中,可检测信号包括酶反应的可检测产物。可通过本领域已知的方法检测其反应产物的酶的非限制性实例包括过氧化物酶、碱性磷酸酶、半乳糖苷酶、萤光素酶和内酰胺酶。

[0214] 在一些实施方案中,报道细胞系包括癌细胞系。癌细胞系的非限制性实例包括来源于前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、脑癌和卵巢癌的细胞系。在某些实施方案中,癌细胞系来源于选自腺瘤、腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、小细胞癌、大细胞未分化癌、软骨肉瘤和纤维肉瘤的癌。可使用已知具有EGF受体的激活突变(例如HCC827肺癌)、RAS的激活突变(例如A549肺癌、HCT-116结肠癌)或PI3K的激活突变(HCT-116结肠癌、MCF7乳腺癌、T47D乳腺癌)或肿瘤抑制基因PTEN的失活突变(MDA-MB-468乳腺癌、EVSA-T乳腺癌)的乳腺、肺和结肠肿瘤系。

[0215] 可在本方法中使用的常用细胞系的不完全列表包括:293-T、3T3细胞、721、9L、A2780、A2780ADR、A2780cis、A172、A20、A253、A431、A-549、ALC、B16、B35、BCP-1细胞、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR 293、BxPC3、C3H-10T1/2、C6/36、Ca1-27、CHO、COR-L23、COR-L23/

CPR、COR-L23/5010、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CML T1、CMT、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、EL4、EM2、EM3、EMT6/AR1、EMT6/AR10.0、FM3、H1299、H69、HB54、HB55、HCA2、HEK-293、HeLa、Hepa1c1c7、HL-60、HMEC、HT-29、Jurkat、JY细胞、K562细胞、Ku812、KCL22、KG1、KY01、LNCap、Ma-Me11-48、MC-38、MCF-7、MCF-10A、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MDCK II、MDCK II、MOR/0.2R、MONO-MAC 6、MTD-1A、MyEnd、NCI-H69/CPR、NCI-H69/LX10、NCI-H69/LX20、NCI-H69/LX4、NIH-3T3、NALM-1、NW-145、OPCN/OPCT细胞系、Peer、PNT-1A/PNT 2、RenCa、RIN-5F、RMA/RMAS、Saos-2细胞、Sf-9、SkBr3、T2、T-47D、T84、THP1细胞系、U373、U87、U937、VCaP、Vero细胞、WM39、WT-49、X63、YAC-1、YAR。

[0216] 可将报道子入细胞系以产生报道细胞系。报道子是指在激活时产生可检测信号的生物元件。在一些实施方案中，用优化的基因捕获载体转导肿瘤细胞系，并使其经历选择过程，以产生癌途径特异性报道细胞。例如，报道细胞系可检测EGF、PI3K-AKT或RAS途径抑制。一些实施方案涉及包含位于编码报道子和选择性标记（例如Neo）的基因侧翼的剪接受体和剪接供体序列的无启动子（apromoterless）捕获盒。当整合到基因中时，报道子的表达受内源性启动子、增强子和绝缘子的调节。因此，报道子的活性精确地指示内源基因的表达。

[0217] 报道子可产生可直接检测的（例如荧光蛋白）或可间接检测的（例如酶）信号。检测包括但不限于辐射计数、目视观察、用分光光度计测量、荧光激发后进行可视化。有众多的可检测部分是本领域技术人员已知的，包括但不限于颗粒、荧光团、半抗原、酶及其比色的、荧光的和化学发光的底物，以及其它在RICHARD P. HAUGLAND, MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH PRODUCTS (第10版, CD-ROM, 2005年9月) 中描述的标记物。

[0218] 报道分子包括但不限于发色团、荧光团、荧光蛋白、磷光染料、串联染料、颗粒、半抗原、酶和放射性同位素。荧光蛋白的非限制性实例包括绿色荧光蛋白 (GFP) 和藻胆蛋白及其衍生物。能产生化学发光的酶及其适当的底物也可在本文所述的报道分子中使用。此类酶包括但不限于天然和重组形式的萤光素酶和水母发光蛋白（例如萤火虫萤光素酶、海肾萤光素酶、Gaussia萤光素酶）。此外，磷酸酶、糖苷酶和氧化酶的能产生化学发光的底物，如包含稳定的二氧杂环丁烷、鲁米诺、异鲁米诺和吡啶酯的那些底物，也可在本文所述的报道分子中使用。

[0219] 在一些实施方案中，使用Gaussia萤光素酶。Gaussia萤光素酶可经工程化为人源化的、膜锚定的和细胞外显示的。萤光素酶的使用允许在萤光素酶底物如腔肠素的存在下，对活动物中的报道子活性进行实时可视化。

[0220] 报道子的细胞表面表达有利于检测，并且也可用于体外选择。在由于途径抑制而上调的基因内发生的捕获事件导致产生萤光素酶阳性细胞，可根据它们发出的荧光采用诸如流动辅助细胞分选 (FACS) 等方法分离该阳性细胞。

[0221] 本发明提供了用于产生报道细胞系的、基于选择的方法。在一些实施方案中，采用已知途径抑制剂的亚致死浓度进行选择。可分别采用吉非替尼（易瑞沙）、MK-2206和PD325901来选择EGF、PI3K-AKT和Ras途径抑制剂响应性报道子。

[0222] 在一些实施方案中，可使用在结构上与初始选择步骤中使用的抑制剂无关的、目标致癌途径的第二抑制剂，通过反向筛选步骤来去除与目标致癌途径的抑制无关的、对选择过程中使用的药剂的脱靶活性产生响应的基因捕获陷阱。可以克隆并扩充保持响应于第

二抑制剂发生报道子诱导型表达的细胞用于进一步分析。在一些实施方案中,通过本领域已知的基于PCR的方法实现对捕获的基因的鉴定。

[0223] 在一些实施方案中,采用选择策略在体内产生基因捕获陷阱,其中在引入报道构建体后将细胞异种移植至动物模型中。异种移植之后,癌细胞可在动物模型中形成肿瘤,并且该肿瘤可作为测试细胞对途径抑制的体内响应的基础。之后可以分离(如通过FACS)那些在体内肿瘤环境中响应一种或多种已知途径抑制剂的细胞,并开发作为报道细胞系使用。

[0224] 可产生报道细胞系以指示途径“开启”和“关闭”两种状态。在一些实施方案中,产生的第一报道细胞系响应于信号传导途径的调节而产生可检测信号,而第二报道细胞系由第一报道细胞系产生,其中第二报道细胞系在所述信号传导途径调节时产生第二可检测信号。在一些实施方案中,第一可检测信号指示信号传导途径的激活,而第二可检测信号指示信号传导途径的抑制。

组织模型

[0225] 在一些实施方案中,本发明举例说明了一种用于在报道组织中筛选候选治疗剂的系统。可使用报道细胞系在动物模型中产生报道组织。在一些实施方案中,动物模型是小鼠模型或大鼠模型之一。该动物模型可以是异种移植或异种移植术(这两个术语可互换使用,是指活细胞、组织或器官从一个物种向另一个物种的移植)的受体。在一些实施方案中,报道组织是通过将一种或多种报道细胞异种移植到免疫受损的动物如SCID小鼠或裸鼠中而产生的肿瘤。无胸腺裸鼠是来自具有基因突变的品系的实验小鼠,该基因突变导致胸腺退化或缺如,从而导致免疫系统因T细胞数大大减少而受到抑制。临床前模型中的免疫受损状态可能是遗传异常的结果,或者可能是药物治疗抑制了免疫系统功能的结果。

[0226] 模型中的肿瘤细胞移植可在多个部位(皮下、腹内、乳腺脂肪垫、肝内、肺内、颅内和心内)进行,以模拟原发性和转移性肿瘤定位。还可进行肿瘤球体的移植。通过将肿瘤移植到所述哺乳动物来获得异种移植的肿瘤,所述肿瘤选自新鲜手术标本、肿瘤细胞系、来自实体瘤的细胞、癌细胞球体和从在宿主动物体内传代的肿瘤获得的肿瘤块。

[0227] 免疫抑制药物或免疫抑制剂是抑制或阻止免疫系统活性的药物。免疫抑制药物的非限制性实例包括糖皮质激素;细胞抑制剂;烷化剂;抗代谢物,包括叶酸类似物如甲氨蝶呤,以及嘌呤类似物如硫唑嘌呤和巯嘌呤;硫唑嘌呤和巯嘌呤;细胞毒性抗生素,包括放线菌素D、蒽环类、丝裂霉素C、博来霉素和光神霉素;针对免疫系统元件的多克隆和单克隆抗体;以及作用于抑免蛋白的药物,包括环孢菌素、他克莫司、伏环孢素和其它钙调磷酸酶抑制剂,和西罗莫司;干扰素、阿片类药物、TNF-结合蛋白质、麦考酚酯和芬戈莫德。

[0228] 报道组织可包括显示或不显示疾病或病症的特征的实体组织。报道组织可以是在组织支架上工程化的人造组织。

[0229] 报道组织可以包括任何实体组织。实体组织是医学领域熟知的,并且可包括任何粘着性的、空间上离散的非流体限定的解剖学区室,该区室实质上是多细胞、细胞间、组织和/或器官结构的产物,如这样一种三维限定的区室,该区室可包含结构完整性或者由相关联的结缔组织产生其结构完整性,并且可通过薄膜(例如,脑膜、围心膜、胸膜、粘膜、基底膜、网膜、器官包覆膜等)与其它身体区域隔开。实体组织的非限制性实例可包括脑、肝、肺、肾、前列腺、卵巢、脾脏、淋巴结(包括扁桃体)、甲状腺、胰腺、心脏、骨骼肌、肠、喉、食道和胃。这些及其它实体组织的解剖学位置、形态学性质、组织学特征及其有创和/或无创获取

对于熟悉相关技术的人员来说都是熟知的。在一些实施方案中,组织是或疑似是癌性的、发炎的、感染的、萎缩的、麻木的、癫痫的或凝结的。在一些实施方案中,组织是或疑似是癌性的。在一些实施方案中,组织是癌性的。

[0230] 某些实施方案涉及组织的一种生物来源,它是人类受试者,如根据本领域公认的临床诊断标准已经诊断为患有癌症,或具有发展或罹患癌症的风险的患者,所述临床诊断标准如美国国家癌症研究所 (Bethesda, MD, USA) 所公布的标准或如 DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology (2008, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia/Ovid, New York); Pizzo 和 Poplack, Principles and Practice of Pediatric Oncology (第4版, 2001, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia/Ovid, New York); 以及 Vogelstein 和 Kinzler, The Genetic Basis of Human Cancer (第2版, 2002, McGraw Hill Professional, New York) 中所述的标准; 某些实施方案涉及根据该标准得知没有罹患、发展或获得癌症的风险的人类受试者。

[0231] 可通过获得血液样品、活检标本、组织外植体、器官培养物、生物流体或来自受试者或生物来源的任何其它组织或细胞制备物来提供生物样品。

[0232] 某些其它实施方案涉及用于组织移植的非人类受体,例如非人灵长类动物,如猕猴、黑猩猩、大猩猩、长尾黑颞猴、猩猩、狒狒或其它非人灵长类动物,包括本领域可能已知可作为临床前模型的这类非人类受试者,包括实体瘤和/或其它癌症的临床前模型。某些其它实施方案涉及一种非人类受试者,它是哺乳动物,例如,小鼠、大鼠、兔、猪、绵羊、马、牛、山羊、沙鼠、仓鼠、豚鼠或其它哺乳动物; 许多这类哺乳动物可以是本领域已知可作为某些疾病或病症 (包括实体瘤和/或其它癌症) 的临床前模型的受试者 (例如, Talmadge 等人, 2007 Am. J. Pathol. 170:793; Kerbel, 2003 Canc. Biol. Therap. 2 (4 Suppl 1):S134; Man 等人, 2007 Canc. Met. Rev. 26:737; Cespedes 等人, 2006 Clin. Transl. Oncol. 8:318)。然而,并非意在如此限制实施方案的范围,也考虑其它实施方案,其中受试者或生物来源可以是非哺乳类脊椎动物,例如另一种高等脊椎动物或禽类、两栖类或爬行类物种,或另一种受试者或生物来源。转基因动物是非人类动物,其中该动物的一种或多种细胞包含非内源性的 (即异源性的) 核酸,并且该核酸作为染色体外元件存在于其一部分细胞中,或稳定地整合到其种系 DNA 中 (即,其大部分或全部细胞的基因组序列中)。在本发明的某些实施方案中,可以针对转基因动物。

药剂的筛选

[0233] 在一些实施方案中,报道组织与针阵列装置结合使用,以获得来源于癌症体内模型的不同候选药剂的疗效数据。该策略避免了对用于体内测试的遗传工程小鼠的需求。为了解释肿瘤异质性,针迹穿透至组织深处以确保能对肿瘤的多个区域进行取样。该方法防止了局部假阳性或假阴性结果。可在候选药剂递送后收获组织并任选地将其切片,使得能够确认靶标触及 (target engagement), 并采用标准组织学和免疫组织化学评估肿瘤增殖和细胞凋亡。多孔针阵列与高保真度、高灵敏度的基因捕获陷阱衍生的癌基因途径报道子的成功结合提供了一种体内验证平台。

[0234] 在一些实施方案中,针阵列药物递送装置可用于向报道组织模型平行施用一种或多种候选治疗剂。报道组织模型可以由报道细胞系产生的异种移植肿瘤。可通过递送处于可降低药剂在组织内的扩散的水凝胶中的药剂来实现多种候选治疗剂从针阵列装置向

肿瘤的空间受限递送。

[0235] 在一些实施方案中,本发明提供了一种利用报道组织筛选候选治疗剂的方法,包括以下步骤:a)产生在途径调节时能产生可检测信号的报道细胞系;b)由所述报道细胞系构建报道组织;以及c)通过使用针阵列将多种候选治疗剂递送至所述报道组织,并检测所述可检测信号,来评估所述多种候选治疗剂对所述报道组织的功效。

[0236] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用于确定对药物的体内响应的遗传基础的方法,包括以下步骤:a)产生在途径调节时能产生可检测信号的报道细胞系;b)由所述报道细胞系构建报道组织;c)将药物递送至所述报道组织;d)分离所述报道组织内响应于所述药物而显示出所述可检测信号的细胞群;以及e)对所述细胞群的基因组DNA进行测序以确定药物响应的遗传基础。

[0237] 在一些实施方案中,由报道细胞系生长成异种移植肿瘤,直至其达到能与多孔针阵列装置注射相兼容的尺寸。异种移植肿瘤可生长至约0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.5、1.6、1.7或2.0cm³。之后可用针阵列在几何限定的位置对肿瘤进行注射。可在注射后的一段选定时间后将肿瘤切除、固定和切片,该时间段可以超过1、2、3、4、5、10、15、24、36或48小时或超过1周。

[0238] 可通过评估由报道细胞系和源于该细胞系的组织模型产生的一种或多种可检测信号来对治疗剂或候选治疗剂的效果进行检测。在一些实施方案中,一种或多种可检测信号指示生物途径的调节。在一些实施方案中,调节包括激活。在一些实施方案中,调节包括抑制。在一些实施方案中,生物途径是癌症相关途径或致癌途径。

[0239] 在一些实施方案中,可检测信号报道了基因的激活或抑制,该基因可以是选自 ABL1、ABL2、ACSL3、AF15Q14、AF1Q、AF3p21、AF5q31、AKAP9、AKT1、AKT2、ALK、AL017、APC、ARHGEF12、ARHH、ARNT、ASPCR1、ASXL1、ATF1、ATIC、ATM、BCL10、BCL11A、BCL11B、BCL2、BCL3、BCL5、BCL6、BCL7A、BCL9、BCR、BHD、BIRC3、BLM、BMPR1A、BRAF、BRCA1、BRCA2、BRD3、BRD4、BRIP1、BTG1、BUB1B、C12orf9、C15orf21、CANT1、CARD11、CARS、CBFA2T1、CBFA2T3、CBFB、CBL、CBLB、CBLG、CCND1、CCND2、CCND3、CD74、CD79A、CD79B、CDH1、CDH11、CDK4、CDK6、CDKN2A-p14ARF、CDKN2A-p16 (INK4a)、CDKN2C、CDX2、CEBPA、CEP1、CHCHD7、CHEK2、CHIC2、CHN1、CIC、CLTC、CLTCL1、CMKOR1、COL1A1、COPEB、COX6C、CREB1、CREB3L2、CREBBP、CRLF2、CRT3、CTNNB1、CYLD、D10S170、DDB2、DDIT3、DDX10、DDX5、DDX6、DEK、DICER1、DUX4、EGFR、EIF4A2、ELF4、ELK4、ELKS、ELL、ELN、EML4、EP300、EPS15、ERBB2、ERCC2、ERCC3、ERCC4、ERCC5、ERG、ETV1、ETV4、ETV5、ETV6、EVI1、EWSR1、EXT1、EXT2、EZH2、FACL6、FANCA、FANCC、FANCD2、FANCE、FANCF、FANCG、FBXW7、FCGR2B、FEV、FGFR1、FGFR10P、FGFR2、FGFR3、FH、FIP1L1、FLI1、FLT3、FNBP1、FOXL2、FOXO1A、FOXO3A、FOXP1、FSTL3、FUS、FVT1、GAS7、GATA1、GATA2、GATA3、GMPS、GNAQ、GNAS、GOLGA5、GOPC、GPC3、GPHN、GRAF、HCMOGT-1、HEAB、HEI10、HERPUD1、HIP1、HIST1H4I、HLF、HLXB9、HMGA1、HMGA2、HNRNPA2B1、HOOX3、HOXA11、HOXA13、HOXA9、HOXC11、HOXC13、HOXD11、HOXD13、HRAS、HRPT2、HSPCA、HSPCB、IDH1、IDH2、IGH@、IGK@、IGL@、IKZF1、IL2、IL21R、IL6ST、IRF4、IRTA1、ITK、JAK1、JAK2、JAK3、JAZF1、JUN、KDM5A、KDM5C、KDM6A、KDR、KIAA1549、KIT、KLK2、KRAS、KTN1、LAF4、LASP1、LCK、LCP1、LCX、LHFP、LIFR、LMO1、LMO2、LPP、LYL1、MADH4、MAF、MAFB、MALT1、MAML2、MAP2K4、MDM2、MDM4、MDS1、MDS2、MECT1、MEN1、MET、MHC2TA、MITF、MKL1、MLF1、MLH1、MLL、MLLT1、MLLT10、MLLT2、MLLT3、MLLT4、MLLT6、

MLLT7、MN1、MPL、MSF、MSH2、MSH6、MSI2、MSN、MTCP1、MUC1、MUTYH、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、MYH11、MYH9、MYST4、NACA、NBS1、NCOA1、NCOA2、NCOA4、NF1、NF2、NFIB、NFKB2、NIN、NONO、NOTCH1、NOTCH2、NPM1、NR4A3、NRAS、NSD1、NTRK1、NTRK3、NUMA1、NUP214、NUP98、NUT、OLIG2、OMD、P2RY8、PAFAH1B2、PALB2、PAX3、PAX5、PAX7、PAX8、PBX1、PCM1、PCSK7、PDE4DIP、PDGFB、PDGFRA、PDGFRB、PER1、PHOX2B、PICALM、PIK3CA、PIK3R1、PIM1、PLAG1、PML、PMS1、PMS2、PMX1、PNUTL1、POU2AF1、POU5F1、PPARG、PRCC、PRDM16、PRF1、PRKAR1A、PRO1073、PSIP2、PTCH、PTEN、PTPN11、RAB5EP、RAD51L1、RAF1、RANBP17、RAP1GDS1、RARA、RB1、RBM15、RECQL4、REL、RET、ROS1、RPL22、RPN1、RUNX1、RUNXBP2、SBDS、SDH5、SDHB、SDHC、SDHD、SEPT6、SET、SETD2、SFPQ、SFRS3、SH3GL1、SIL、SLC45A3、SMARCA4、SMARCB1、SMO、SOCS1、SRGAP3、SS18、SS18L1、SSH3BP1、SSX1、SSX2、SSX4、STK11、STL、SUFU、SUZ12、SYK、TAF15、TAL1、TAL2、TCEA1、TCF1、TCF12、TCF3、TCL1A、TCL6、TET2、TFE3、TFEB、TFG、TFPT、TFRC、THRAP3、TIF1、TLX1、TLX3TMPRSS2、TNFAIP3、TNFRSF17、TNFRSF6、TOP1、TP53、TPM3、TPM4、TPR、TRA@、TRB@、TRD@、TRIM27、TRIM33、TRIP11、TSC1、TSC2、TSHR、TTL、USP6、VHL、WAS、WHSC1、WHSC1L1、WRN、WT1、WTX、XPA、XPC、ZNF145、ZNF198、ZNF278、ZNF331、ZNF384、ZNF521、ZNF9、mTOR、MEK、PI3K、HIF、IGF1R、GLS1或ZNFN1A1的基因。在一些实施方案中,途径与任一上述基因相关。在一些实施方案中,可检测信号报道了基因的产物,如多肽或蛋白质。

[0240] 根据一个实施方案,使用组织模型评估治疗剂在治疗癌症中的功效。在一些实施方案中,随后将已向其中递送多种治疗剂的实体组织从受试者体内切除并进行评价。例如,在靶组织是癌性肿瘤的情况下,注射到其中的多种药剂可包括正在研究其对此类肿瘤的功效或作用的一些药剂。通过体内注射各种药剂,然后在去除肿瘤之前等待一段选定的时间,可通过评估由报道组织中的报道细胞所发出的信号来研究药剂对原位肿瘤的效果。本发明提供了在天然肿瘤微环境中的筛选方法,从而使其与现有的离体或体外治疗评价方法区分开来。随着时间的推移,每种药剂以或大或小的程度从其递送轴向外渗透,这取决于如周围组织的密度、药剂的粘度和组成、各自药剂对组织的湿润性等因素。通常来说,药剂扩散于其中的组织部分是与各自己的递送轴共轴的、大致为柱形的区域。

[0241] 根据各种实施方案,组织区域在切除前保留在原位一段时间。例如,通常认为递送后48-72小时的一段时间对于肿瘤显示出可检测的响应一般是足够的。等待时间可以是数小时、数天或数周。根据一些实施方案,在插入针之前采用已知方法对组织区域进行成像以精确定位组织的靶区域。可在将多种药剂递送至组织区域之前和之后反复对该区域进行成像。

[0242] 在一些实施方案中,沿着基本垂直于(例如,垂直的或偏离垂线多达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35度或更多)平行轴的平行平面将切除的组织切成多个连续的组织切片,以便通过多种已知的组织学、组织化学、免疫组织学、组织病理学、显微检查(包括形态测定分析和/或三维重建)、细胞学、生物化学、药理学、分子生物学、免疫化学、成像或其它分析技术中的任一种进行分析,这些技术是相关领域技术人员已知的。参见,例如,Bancroft和Gamble,Theory and Practice of Histological Techniques(第6版)2007Churchill Livingstone,Oxford,UK;Kiemann,Histological and Histochemical Methods:Theory and Practice,2001Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;和M.A.Hayat(编著),Cancer Imaging-Vols.1and 2,2007Academic

Press, NY, 其中的每一篇通过引用完整并入本文。可在将分配器针插入实体组织之前、期间或之后进行成像。在一些实施方案中, 成像包括检测由报道细胞系响应于途径调节而产生的可检测信号。

[0243] 如本文所述, 对改变的生理状态的至少一个指示物的水平测定还可用于对受试者群体是否有资格参与临床试验进行分类。可以考虑这些实施方案和相关的实施方案, 因为它们有效地提供了可在比现有情况更早的研发阶段评价候选治疗化合物的优点。例如, 在II期研究之前确立生物标记物参数(其可作为排除受试者的基础)不是目前的标准临床试验操作, 然而, 本文所述的实施方案即使在缺乏已确立的生物标记物标准的情况下, 例如, 在I期或II期, 也可提供有用的结果。因此, 预期通过实施某些本文公开的实施方案, 可比以前的情况更早地在实体瘤肿瘤学药物开发计划中获得关于候选药剂性质的相关信息, 包括采用以下方式: 该方式能够时间有效地和成本有效地允许从临床试验中排除基于特定候选药剂无应答者结果能够预期无响应或无受益的受试者。

[0244] 例如, 根据如本文所述测定的改变的生理状态的至少一个指示物的水平对受试者群体进行分类, 可提供有用的标记物, 将该标记物与在癌症受试者中使用的任何候选治疗剂的功效相关联, 和/或将受试者分类为应答者、无应答者或可能应答者。

[0245] 在一些实施方案中, 该方法在药物筛选和药物开发中是有用的, 如在临床前动物模型中鉴定和功能性表征潜在的新治疗剂。例如, 可以瘤内施用多种siRNA, 并且可以比较它们降低期望的靶基因的表达的相对能力。其它相似的实施方案可用于临床环境中, 例如, 用来“取消选择”在特定肿瘤中无效果的已知治疗剂, 或将其排除在考虑之外, 从而通过避免可能与施用无效治疗方案相关的时间损失和不期望的副作用来有利地推进受试者的治疗管理。

[0246] 在一些实施方案中, 渗透或透过涉及实体组织中紧邻用于引入(不包括灌注(经由任何血管进入和分散))药剂的针的药剂滞留区域, 并且可包括药剂在细胞外隙或胞外基质中的滞留, 或药剂与细胞膜相结合或在细胞内的滞留。渗透可与物理化学效应不同, 后者是指由针的插入或流体注射本身所引起的或由药剂所致的非生物机械或化学组织破坏所引起的、显微镜下可检测到的组织的机械破坏(例如, 细胞膜的损伤或细胞-细胞接合的瓦解)。药理作用包括作为药剂的分子作用机理的结果而可检测的、细胞或组织生理状态的统计学显著的改变, 例如, 细胞骨架重组、细胞过程的延长或缩短, 或使用多种已知的细胞学、生物化学、分子生物学或其它读取技术中的任一种可检测的生物信号转导的证据。对连续切片的比较可允许区分组织学上检测到的作用的性质。

[0247] 候选治疗剂的合并或去卷积(deconvolution)策略在图6中显示。在一些实施方案中, 采用注射到空间受限的肿瘤亚部分内的合并的试剂集进行初级筛选。对导致阳性报道信号的合并池进行去卷积, 并且对单独组分进行再筛选以鉴定引起途径抑制的药剂。

确定途径调节

[0248] 在一些实施方案中, 考虑可使用已知技术对实体组织中的靶区域进行成像以评价药剂的效果。成像可以通过任何合适的过程或方法来进行, 包括, 例如, 放射摄影成像、磁共振成像、正电子发射断层显像、生物光子成像等。在一些实施方案中, 可在递送过程之前、期间和之后反复对靶区域进行成像。在一些实施方案中, 成像发生在从受试者切除组织模型(源于报道细胞系)之前、期间和/或之后。

[0249] 成像后,可通过本领域技术人员已知的方法对报道信号的水平进行量化。报道信号的观测和/或量化结果可用于作出有关治疗剂的应用和功效的知情(informed)研究和卫生保健决定。可基于此观测结果作出的决定的非限制性实例包括流体体积质量控制、位置追踪和药物生物分布。可在低等哺乳动物例如小鼠中进行此类实验,以提供可用于作出关于潜在治疗剂在人体内的活性的知情预测的报道信号。该类型的动物研究可用于避免由于在受控环境而非天然环境中进行细胞内药效研究而引起的内在不确定性和不准确性。

[0250] 荧光信号的量化可通过本领域已知的任何方法来实现。荧光信号可与标准或对照进行比较以确定生物途径的上调或下调。这类观测结果可用于作出关于候选药物的治疗价值的预测。

确定治疗抗性

[0251] 在一些实施方案中,本发明提供了一种确定实体组织内对药剂的响应的方法,包括以下步骤:a)产生在信号传导途径调节时能产生可检测信号的报道细胞系;b)获得由所述报道细胞系衍生的报道组织;c)将多种治疗剂递送至所述实体组织;以及d)检测所述可检测信号以确定对一种或多种所述治疗剂的响应。在一些实施方案中,该方法还包括以下步骤:分离先前响应于所述一种或多种治疗剂而产生所述可检测信号、但现在不再产生所述可检测信号的细胞。在一些实施方案中,报道细胞系产生两种可检测信号以指示信号传导途径的两种不同状态(例如,“开启”或“关闭”),该方法还包括以下步骤:分离先前响应于所述一种或多种治疗剂而产生第二可检测信号、但现在响应于所述一种或多种治疗剂而产生第一可检测信号的细胞。所分离的细胞可经过基因组DNA测序以确定对一种或多种治疗剂的响应的改变的遗传基础。

[0252] 在一些实施方案,本发明提供一种用于确定对癌症治疗的抗性的方法,包括以下步骤:a)产生在途径调节时能产生可检测信号的报道细胞系;b)由所述报道细胞系构建报道组织;c)对所述报道组织施用多种癌症治疗;d)分离所述报道组织内响应于该多种癌症治疗中的选定治疗而显示出所述可检测信号的细胞群;e)由所述分离的细胞群构建第二报道组织;f)对第二报道组织施用所述选定的癌症治疗;g)分离不再响应于选定的癌症治疗显示出所述可检测信号的第二细胞群;以及h)对来自第二细胞群的基因组DNA进行测序,从而确定对选定的癌症治疗的抗性。在一些实施方案中,本发明涉及一种用于确定对癌症治疗的抗性的方法,包括以下步骤:产生在途径调节时能产生可检测信号的报道细胞系;由所述报道细胞系构建报道组织;对所述报道组织施用多种治疗剂;以及分离所述报道组织内显示出所述可检测信号的细胞群。该调节可包括激活或抑制。分离可包括细胞分选。该方法可进一步包括对所述显示出所述可检测信号的细胞群进行全基因组测序,并确定对一种或多种所述治疗剂的抗性的遗传基础。

[0253] 可采用本领域已知的细胞分选技术,如FACS(荧光激活细胞分选术)来分离细胞群。可使用分选仪(例如,使用从Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose Calif. 获得的分选仪;还可参见美国专利5,627,037、5,030,002和5,137,809)通过FACS对细胞进行分选。当细胞通过分选仪时,激光束激发荧光化合物,同时检测器对通过的细胞进行计数,并通过检测荧光来确定荧光化合物是否与细胞连接。可对每个细胞上结合的标记物的量进行量化和分析以表征该样品。分选仪还可使细胞转向,并将被结合蛋白质结合的细胞与未被结合蛋白质结合的细胞分离。可对分离的细胞进行培养和/或表征。

测序

[0254] 在测序之前,可通过扩增来富集多核苷酸。同样,可通过全基因组扩增来富集基因组。本文中可用于扩增DNA区域的PCR技术的实例包括但不限于定量PCR、定量荧光PCR (QF-PCR)、多重荧光PCR (MF-PCR)、实时PCR (RT-PCR)、单细胞PCR、限制性片段长度多态性PCR (PCR-RFLP)、PCR-RFLP/RT-PCR-RFLP、热启动PCR、巢式PCR、原位聚合酶群落 (polonony) PCR、原位滚环扩增 (RCA)、桥式PCR、picotiter PCR和乳液PCR。其它合适的扩增方法包括但不限于连接酶链反应 (LCR)、转录扩增、自持序列复制、靶多核苷酸序列的选择性扩增、共有序列引物聚合酶链反应 (CP-PCR)、任意引物聚合酶链反应 (AP-PCR)、简并寡核苷酸引物PCR (DOP-PCR) 和基于核酸的序列扩增 (NABSA)。可用于扩增特定多态基因座的其它扩增方法包括在美国专利5,242,794、5,494,810、4,988,617和6,582,938中描述的那些方法。本发明的一些实施方案以聚合酶链反应 (PCR) 来描述,而在一些实施方案中,扩增方法可以是,例如,自持序列反应、连接酶链反应、cDNA末端快速扩增、聚合酶链反应和连接酶链反应、Q- β 噬菌体扩增、链置换扩增或剪接重叠延伸聚合酶链反应。

[0255] 在测序之前,可通过扣除杂交来富集目标DNA样品。扣除杂交方法是本领域已知的,并在美国专利5,935,788和5,599,672中有所描述。通常,在扣除杂交方法中,将来自第一DNA池的DNA或cDNA链与由第二DNA池产生的DNA或mRNA杂交,并通过酶或色谱手段将cDNA-mRNA杂合体或DNA双链体去除。剩余的扣除DNA然后可用于进一步分析,如测序。

[0256] 在一些实施方案中,基于一个或多个对照多核苷酸的测序结果评估测序错误率。在一些实施方案中,使用测序平台,其中该测序平台是从自单末端读取产生至少75bp的大规模平行测序平台。在一些实施方案中,大规模平行测序平台从单末端读取产生至少100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500bp或多于2000bp。

[0257] 在本发明中有用的方法是基于对数百万个片段的大规模平行测序,其中利用随机片段化的基因组DNA向平面的光学透明表面的附着和固相扩增产生具有数百万个簇的高密度测序流动池,每个簇含有约1000个拷贝的模板/平方厘米。使用四色DNA合成测序技术对这些模板进行测序。参见由Illumina, Inc., San Diego Calif提供的产品。还可参见在2003年1月30日公布的、Balasubramanian等人的、名称为“Arrayed polynucleotides and their use in genome analysis”的US 2003/0022207。使用这类方法,将两种独特的衔接子与每个DNA片段连接,之后使用PCR对其进行扩增。

[0258] 在桥式扩增过程中,流动池表面覆盖有与在样品制备阶段连接的衔接子的序列相对应的单链寡核苷酸。单链的、衔接子连接的片段结合到暴露于聚合酶延伸试剂的流动池的表面上。当连接的片段的自由端/远端“桥接”于表面上的互补寡核苷酸上时发生引发。反复的变性和延伸导致单分子在整个流动池表面数百万个独特位置上的局部扩增。之后将含有数百万个独特簇的流动池加载至测序装置中,进行延伸和成像的自动循环。测序的第一个循环由以下步骤组成:首先,加入一种荧光核苷酸,随后对整个流动池进行高分辨率成像。这些图像代表对第一种碱基所采集的数据。任何高于背景的信号确定了簇的物理位置,而荧光发射确定了四种碱基中的哪一种掺入了该位置。重复该循环,一次一个碱基,产生一系列图像,每个图像代表特定簇的单碱基延伸。用随着时间推移辨别发射颜色的算法推导出碱基判定 (Base calls)。

[0259] 在配对末端测序中,对标准单读取DNA文库制备的简单修改有助于在一次配对末端读取过程中读取每个簇的正向和反向模板链。在一些实施方案中,大规模平行测序平台从一个配对末端读取产生至少150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、2000、3000、5000bp或超过10,000bp。

[0260] 在一些实施方案中,采用DNA聚合酶在其互补链合成时对单个DNA模板中的序列信息进行成像。依次插入核苷酸;仅需要区别连续掺入的时间分辨率。在每个成功掺入事件后,测量荧光信号,随后通过光漂白清零(null)。该方法适用于大规模平行方式。该技术允许通过装备有全内反射照明(这可降低背景荧光)的传统显微镜观察单分子荧光。对石英载玻片的表面进行化学处理以特异性地锚定DNA模板,同时防止游离核苷酸的非特异性结合,并且将塑性流动池附于该表面以更换溶液。DNA模板寡核苷酸与荧光标记的引物杂交,并且经由链霉亲和素和生物素结合至该表面,其具有足以分辨单分子的低表面密度。准备好的模板通过其荧光标记进行检测,记录其位置以便将来作为参考,并对标记物进行光漂白。之后清洗流动池内外的标记的核苷三磷酸和DNA聚合酶,同时监测DNA模板的已知位置的荧光情况。该技术使用消散波显微镜技术和单对荧光共振能量转移(spFRET)的结合来消除不必要的噪声。供体荧光团仅在福斯特半径内激发受体,因此,有效地产生了极高分辨率的近场源。因为该荧光团对的福斯特半径为5nm,所以该方法的空间分辨率超过衍射极限50倍,并且超过常规近场显微镜术一个数量级。

[0261] 确定来自本样品的基因组DNA的身份的另一种方法称作直接线性分析(DLA),在Chan等人的“DNA Mapping Using Microfluidic Stretching and Single-Molecule Detection of Fluorescent Site-Specific Tags,”Genome Research 14:1137-1146 (2004)中有所描述。在该方法中,微流体装置用于在与具有单荧光团敏感性的多色检测系统相耦合的拉伸流中延伸DNA分子。用荧光bisPNA(肽核酸)标记物在序列特异性基序位点处标记双链DNA分子。DNA分子然后在微流体装置中延伸并在流体流中被驱动通过共聚焦荧光检测器。DLA可提供沿着单个DNA分子的多个特异性序列基序的空间位置,并且每分钟可分析成千个单独的分子。

[0262] 高通量测序可包括合成测序、连接测序和超深测序。

[0263] 可使用与核酸标记物上的测序元件互补的测序引物来启动合成测序。该方法包括在聚合酶反应中在标记的核苷酸或核苷酸类似物掺入互补核酸序列的生长链时(实时)或之后立即(基本上实时)检测每个核苷酸的身份。在标记的核苷酸成功掺入后,通过本领域已知的方法测量信号,然后清零。合成测序方法的实例在公开号为2003/0044781、2006/0024711、2006/0024678和2005/0100932的美国申请中有所描述。可用于标记在合成测序中使用的核苷酸或核苷酸类似物的标记物的实例包括但不限于,生色团、荧光部分、酶、抗原、重金属、磁探针、染料、磷光基团、放射性物质、化学发光部分、散射或荧光纳米粒子、拉曼信号生成部分和电化学检测部分。合成测序每小时可产生至少1,000、至少5,000、至少10,000、至少20,000、30,000、至少40,000、至少50,000、至少100,000或至少500,000次读取。此类读取每次读取可具有至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少120个或至少150个碱基。

[0264] 另一种测序方法包括将扩增的区域与互补于LST中的序列元件的引物杂交。该杂交复合体与聚合酶、ATP硫酸化酶、萤光素酶、腺苷三磷酸双磷酸酶和底物萤光素和腺苷-

5'-酰硫酸一同孵育。然后,依次加入与碱基A、C、G和T(U)相对应的脱氧核苷三磷酸。每个碱基掺入伴随着焦磷酸的释放,硫酸化酶将焦磷酸转化为ATP,这推动了氧化萤光素的合成和可见光的释放。由于焦磷酸的释放与掺入的碱基数是等摩尔的,所以发出的光与任一步中加入的核苷酸数成比例。重复该过程直至确定整个序列。另一种测序方法包括通过连接方案(简并连接)的四色测序,该方案包括锚定引物与四个位置之一进行杂交。之后进行锚定引物与荧光染料标记的简并九聚物群体的酶连接反应。在任一给定的循环中,所用的九聚物群体是使得其位置之一的确认与连接于该九聚物的荧光团的身份相关联的结构。鉴于连接酶辨别查询位置上的互补性,荧光信号允许推断碱基的身份。在进行连接和四色成像之后,锚定引物:九聚物复合物脱离并开始新的循环。在进行连接后对序列信息进行成像的方法是本领域已知的。

[0265] 序号为09/572,530的美国专利申请描述了用于对核酸分子进行测序的零模式波导。该方法包括提供核酸聚合酶和靶核苷酸分子的复合物,二者在适合于在活性位点处添加与靶核苷酸互补的核苷酸类似物的位置上彼此定向。在接近活性位点处提供多种类型的核苷酸类似物,其中每种类型的核苷酸类似物与靶核苷酸中的不同核苷酸是互补的,使得添加的核苷酸类似物为随后的核苷酸类似物添加做好准备。鉴定因聚合步骤而在活性位点添加的核苷酸类似物。重复提供多个核酸类似物、聚合和鉴定的步骤,以便确定靶核酸的序列。采用零模式波导进行鉴定添加到靶核酸的核苷酸类似物的步骤。

[0266] 在一些实施方案中,高通量测序包括超深测序的使用,如Marguiles等人,Nature 437 (7057):376-80 (2005)中所述。简单地说,将扩增子稀释并与微珠混合,以使得每个微珠捕获扩增材料的单个分子。然后扩增每个微珠上的DNA分子以产生数百万个依然与微珠结合的序列拷贝。这种扩增可通过PCR发生。可将每个微珠置于单独的孔内,该孔可以是(任选地可寻址的)皮升大小的孔。在一些实施方案中,每个微珠被捕获至油乳液中的PCR反应混合物的小滴内,在每个小滴内发生PCR扩增。微珠上的扩增导致每个微珠携带与之连接的、原扩增子的至少一百万、至少五百万或至少一千万个拷贝。最后,将微珠置于高度平行合成测序机器中,该机器在单次4小时运行中产生超过400,000次读取(每次读取~100)。可采用的超深测序的其它方法在以下参考文献中描述:Hong,S,等人,Nat.Biotechnol.22(4):435-9 (2004);Bennett,B.等人,Pharmacogenomics 6(4):373-82 (2005);Shendure,P.等人,Science 309(5741):1728-32 (2005)。

基因替代治疗剂

[0267] 在本发明的实施方案中,基因替代治疗剂可包含干细胞或载体如腺病毒、单纯疱疹病毒(HSV)、杆状病毒、腺相关病毒(AAV)、重组腺相关病毒(rAAV)、逆转录病毒和慢病毒中的一种或多种。rAAV可包含rAAV基因组,该基因组中含有一个或多个位于编码一种或多种基因替代治疗剂的多核苷酸侧翼的AAV反向末端重复序列(ITR)。

[0268] 术语载体是指任何能够将基因序列转入细胞内的物质,如质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、脂质体、DNA-病毒偶联物、RNA/DNA寡核苷酸、病毒、细菌等。因此,该术语包括克隆和表达载体,以及病毒和非病毒载体。通过将靶分子连接至载体上可使载体靶向至特定细胞。靶向分子是对于目标细胞或组织类型具有特异性的任何分子,包括,例如,配体、抗体、糖、受体或其它结合分子。本发明还意在包括发挥同等功能的其它形式的载体。

[0269] 本发明的rAAV基因组缺乏AAV rep和cap DNA。rAAV基因组中的AAV DNA可来自于

可由其得到重组病毒的任何AAV血清型,包括但不限于,AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10和AAV-11。在一些实施方案中,AAV DNA来源于AAV血清型AAV-6。AAV血清型基因组的核苷酸序列是本领域已知的。例如,GenBank登录号NC_002077中提供了AAV-1的完整基因组;GenBank登录号NC_001401中提供了AAV-2的完整基因组;GenBank登录号NC_1829中提供了AAV-3的完整基因组;GenBank登录号NC_001829中提供了AAV-4的完整基因组;GenBank登录号AF085716中提供了AAV-5的完整基因组;GenBank登录号NC_001862中提供了AAV-6的完整基因组;GenBank登录号AX753246和AX753249中提供了AAV-7和AAV-8基因组的至少一部分。AAV载体是指来源于包括人AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、禽AAV、avian AAV等腺相关病毒血清型的载体,以及来源于一种以上AAV血清型的载体(杂合AAV载体)。例如,杂合AAV载体可包含来源于AAV-1和AAV-2二者的DNA序列。

[0270] 重组AAV载体质粒是指一种类型的重组AAV载体,其中该载体包含质粒。对于AAV载体,通常5'和3' ITR位于选定的异源核苷酸序列的侧翼。AAV载体还可包括转录序列,如聚腺苷化位点,以及选择性标记或报道基因、增强子序列和其它允许转录诱导的控制元件。这类控制元件在下文更加充分地描述。此外,为了生产病毒颗粒,可将AAV载体稳定地引入一个细胞系或多个细胞系中。这种细胞系通常被称为AAV包装细胞系。

[0271] 如本文所用的,术语重组AAV、重组AAV颗粒或重组AAV病毒体被定义为由包裹(即,用蛋白质外壳包围)异源核苷酸序列(该异源核苷酸序列在5'和3'端又侧接AAV ITR)的AAV蛋白质壳体组成的感染性复制缺陷型病毒。在这一点上,可将单链AAV核酸分子(有义链/编码链或反义链/反编码链,这些术语与通常所定义的相同)包装至AAV病毒体内;有义链和反义链二者具有同等的感染性。当重组AAV DNA等于病毒基因组全长(约5,000个核苷酸)或小于其50%时,也可将其作为双链发夹样DNA包装至AAV病毒体中。这种病毒体也是具有完全感染性的。

[0272] 用于构建重组AAV的许多技术是本领域已知的。参见,例如,美国专利5,173,414, Lebkowski等人,Mol Cell Biol 18,3988-3996[1988];Carter B J,Current Opinion in Biotechnology 3,533-539[1992];Muzyczka N(前面引用的);以及Zhou等人,J.Exp.Med.179,1867-1875[1994];Xiao等人,J.Virol.72,2224-32[1998]。

[0273] 载体可包含控制元件或调节元件,这些术语是启动子序列、聚腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节区域、复制起点、内部核糖体进入位点("IRES")、增强子等的统称,它们共同提供编码序列在受体细胞中的复制、转录和翻译。并非总是需要存在所有这些控制序列,只要选定的编码序列在合适的宿主细胞中能够复制、转录和翻译即可。控制元件可以是顺式作用的,也可以对反式作用因子具有响应性。根据调节的性质,启动子可以是组成型的或调节型的。启动子的实例为SP6、T4、T7、SV40早期启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)类固醇诱导型启动子、莫洛尼鼠白血病毒(MMLV)启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子、肌肉肌酸激酶(MCK)启动子、肌球蛋白启动子、 α -肌动蛋白启动子等等。或者,可包括上述启动子的修饰形式乃至合成肌肉启动子(Li等人,Nat Biotechnol 17,241-245,[1999])。最后,启动子可以是内源性AAV启动子或AAV反向末端重复序列(ITR)。

[0274] 一种产生包装细胞的方法是构建能稳定表达所有生产AAV颗粒所必需的成分的细

胞系。例如,将包含缺乏AAV rep和cap基因的rAAV基因组的质粒(或多个质粒)、与rAAV基因组分离的AAV rep和cap基因以及选择性标记如新霉素抗性基因整合至细胞基因组中。AAV基因组曾经通过诸如GC加尾(Samulski等人,1982,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,79:2077-2081)、添加含有限制性内切核酸酶切割位点的合成连接序列(Laughlin等人,1983,Gene,23:65-73)或直接平端连接(Senapathy和Carter,1984,J.Biol.Chem.,259:4661-4666)等程序引入到细菌质粒中。然后用辅助病毒如腺病毒感染包装细胞系。该方法的优势在于细胞是可选择的并且适用于rAAV的大规模生产。合适方法的其它实例采用腺病毒或杆状病毒而不是质粒将rAAV基因组和/或rep和cap基因引入到包装细胞中。

[0275] 生产rAAV的一般原则在例如Carter,1992,Current Opinions in Biotechnology,1533-539;和Muzyczka,1992,Curr.Topics in Microbial.and Immunol.,158:97-129中进行了综述。以下文献中描述了多种方法:Ratschin等人,Mol.Cell.Biol.4:2072(1984);Hermonat等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6466(1984);Tratschin等人,Mol.Cell.Biol.5:3251(1985);McLaughlin等人,J.Virol.,62:1963(1988);和Lebkowski等人,1988Mol.Cell.Biol.,7:349(1988);Samulski等人(1989,J.Virol.,63:3822-3828);美国专利5,173,414;WO 95/13365及其相应的美国专利5,658,776;WO 95/13392;WO 96/17947;PCT/US98/18600;Samulski等人(1989,J.Virol.,63:3822-3828);美国专利5,173,414;WO 95/13365及其相应的美国专利5,658,776;WO 95/13392;WO 96/17947;PCT/US98/18600;WO 97/09441(PCT/US96/14423);WO 97/08298(PCT/US96/13872);WO 97/21825(PCT/US96/20777);WO 97/06243(PCT/FR96/01064);WO 99/11764;Perrin等人,Gene Therapy 4:609-615;Clark等人(1996)Gene Therapy3:1124-1132;美国专利5,786,211;美国专利5,871,982;以及美国专利6,258,595。

[0276] 对于本发明而言,用于产生rAAV病毒体的合适的宿主细胞包括能够用作或已经用作异源DNA分子的受体的微生物、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。该术语包括已转染的原始细胞的后代。因此,本文所用的宿主细胞通常是指已经用外源DNA序列转染的细胞。在本发明的实践中,来自稳定的人细胞系293(很容易获得,例如通过美国典型培养物保藏中心,登录号ATCC CRL1573)的细胞是优选的。特别地,人细胞系293是已用5型腺病毒DNA片段转化(Graham等人(1977)J.Gen.Virol.36:59)并表达腺病毒E1a和E1b基因(Aiello等人(1979)Virology 94:460)的人胚肾细胞系。293细胞系很容易进行转染,并提供了一个在其中产生rAAV病毒体的特别便捷的平台。

[0277] AAV rep编码区是指本领域公认的、编码复制蛋白Rep 78、Rep 68、Rep 52和Rep 40的AAV基因组区域。这些Rep表达产物已显示具有许多功能,包括AAV的DNA复制起点的识别、结合和切割、DNA解旋酶活性以及从AAV(或其它异源性)启动子开始的转录的调节。全体Rep表达产物是复制AAV基因组所需要的。关于AAV rep编码区的描述,参见,例如,Muzyczka,N.(1992)Current Topics in Microbiol.and Immunol.158:97-129;和Kotin,R.M.(1994)Human Gene Therapy 5:793-801。AAV rep编码区的合适的同源物包括人疱疹病毒6(HHV-6)rep基因,还已知该基因能介导AAV-2DNA复制(Thomson等人,(1994)Virology 204:304-311)。

[0278] AAV cap编码区是指本领域公认的、编码衣壳蛋白VP1、VP2和VP3或其功能性同源物的AAV基因组区域。这些Cap表达产物提供了包装病毒基因组所需要的所有包装功能。关

于AAV cap编码区的描述,参见,例如,Muzyczka,N.和Kotin,R.M. (同上)。在AAV表达载体转染之前或与之同时,通过用AAV辅助构建体转染宿主细胞而将AAV辅助功能引入宿主细胞内。AAV辅助构建体因此用于至少提供AAV rep和/或cap基因的瞬时表达,以弥补丢失的、对于生产性AAV感染必需的AAV功能。AAV辅助构建体缺乏AAV ITR,并且不能复制或包装自己。这些构建体可以是质粒、噬菌体、转座子、粘粒、病毒或病毒体的形式。已经描述了许多AAV辅助构建体,如编码Rep和Cap表达产物的常用质粒pAAV/Ad和p1M29+45。参见,例如, Samulski等人(1989) J.Virol.63:3822-3828;和McCarty等人(1991) J.Virol.65:2936-2945。已经描述了许多编码Rep和/或Cap表达产物的其它载体。参见,例如,美国专利5,139,941。AAV表达载体和AAV辅助构建体都可以构建成含有一种或多种任选的选择性标记。合适的标记包括当已用含有该选择性标记的核酸构建体转染的细胞在合适的选择性培养基上生长时赋予该细胞抗生素抗性或敏感性、颜色或改变其抗原特性的基因。在本发明实践中有用的几种选择性标记基因包括潮霉素B抗性基因(编码氨基糖苷磷酸转移酶 (APH)),其通过赋予对G418(可从Sigma,St.Louis,Mo.获得)的抗性而允许在哺乳动物细胞中进行选择。其它合适的标记是本领域技术人员已知的。

[0279] 必须使得含有上述AAV表达载体的宿主细胞能够提供AAV辅助功能,以便复制和用壳体包裹侧翼为AAV ITR的核苷酸序列以产生rAAV病毒体。AAV辅助功能通常是AAV衍生的编码序列,该编码序列可以表达从而提供AAV基因产物,该基因产物又能对生产性AAV复制起反式作用。本文采用AAV辅助功能来补充从AAV表达载体中丢失的必需的AAV功能。因此,AAV辅助功能包括主要的AAV ORF(即rep和cap编码区)或其功能性同源物中的一种或两种。

[0280] 为了产生rAAV病毒体,还必须使得宿主细胞(或包装细胞)能够提供非AAV衍生的功能或附属功能。这类方法在本领域中是已知的,并且在美国专利5,858,351中公开。

[0281] 在本发明的方法中施用的rAAV的滴度将随例如特定的rAAV、给药方式、治疗目的、个体以及被靶向的细胞类型而改变,并且可通过本领域的标准方法来确定。rAAV的滴度可以是每ml约 1×10^6 、约 1×10^7 、约 1×10^8 、约 1×10^9 、约 1×10^{10} 、约 1×10^{11} 、约 1×10^{12} 、约 1×10^{13} 至约 1×10^{14} 或更多的DNA酶抗性颗粒(DRP)。剂量还可以病毒基因组(vg)的单位来表示。

[0282] 可通过本领域的标准方法如通过柱色谱法或氯化铯梯度法来纯化rAAV。用于从辅助病毒中纯化rAAV载体的方法是本领域已知的,并且包括在以下文献中公开的方法,例如,Clark等人, Hum. Gene Ther., 10 (6):1031-1039 (1999); Schenpp和Clark, Methods Mol. Med., 69427-443 (2002); 美国专利6,566,118和WO 98/09657。

[0283] 在另一个实施方案中,本发明涉及包含本发明的rAAV的组合物的递送。这些组合物可用于增强肌肉和/或改善肌肉功能。在一些实施方案中,本发明的组合物包含编码感兴趣的肌生成抑制蛋白抑制剂的rAAV。在其它实施方案中,本发明的组合物可包含两种或更多种编码不同的感兴趣的肌生成抑制蛋白抑制剂的rAAV。在进一步的实施方案中,组合物包含编码一种或多种肌养蛋白的rAAV。

[0284] 在一些实施方案中,基因替代治疗剂包含一种或多种干细胞。干细胞是可分化为多种细胞类型的多能或多潜能细胞。干细胞还包括可转分化为至少一种其它细胞类型的细胞。前体细胞或祖细胞可以是特定分化途径中能够分化成更成熟的细胞的任何细胞。分化的细胞是在正常生理条件下不能分化成更成熟的细胞的细胞。同样,术语前体细胞群是指

一组能够发育成更成熟的细胞的细胞。前体细胞群可包含全能细胞、多能细胞和干细胞谱系受限的细胞(即,能够发育成少于全部造血细胞谱系的细胞,或例如仅发育成红细胞谱系的细胞)。干细胞可以是多能干细胞或全能干细胞。如本文所用的,术语全能细胞是指能够发育成所有细胞谱系的细胞。类似地,术语全能细胞群是指能够发育成所有细胞谱系的细胞的组合。又如本文所用的,术语多能细胞是指能够发育成多种(但不是所有)谱系并且至少能够发育为所有造血细胞谱系(例如,淋巴、红细胞和血小板谱系)的细胞。例如,多能细胞与全能细胞的区别可在于其具有发育成除了内皮细胞之外的所有细胞谱系的能力。多能细胞群是指能够发育成少于所有细胞谱系但至少可发育成所有造血细胞谱系的细胞的组合。同样,全能细胞或全能细胞组合的发育低于多能细胞或多能细胞组合。如本文所用的,术语发育、分化和成熟都是指细胞从具有分化为至少两种不同细胞谱系的潜能的阶段到变为特化细胞的进展。对于本申请而言,这些术语可交换使用。

[0285] 干细胞通常分为几种类型:在胚胎中发现的胚胎干细胞(ESC),在胚后期组织中发现的成体干细胞,和已从成体类型去分化为胚胎型状态的诱导多能干细胞(iPSC)。成体干细胞是从胚胎组织或成体组织中提取的,大部分在其可分化成的细胞类型方面具有限制。虽然与ESC相比它们具有有限的分化能力,但是成体干细胞可稳定地发挥作用,并且已表明可分化成一些组织类型。Pittenger等人(1999) Science 284 (2):143-147以及Huard等人(2004) Curr.Opin.Biotechnol.15 (5):419-23。

[0286] 干细胞或前体细胞包括但不限于,例如,外周血干细胞(PBSC)、从骨髓中分离的干细胞(骨髓细胞;BMC)、从脂肪组织中分离的干细胞;间充质干细胞(MSC)、从脐带血、月经流体(menstrual fluid)中分离的干细胞、心脏衍生的细胞、胚胎干细胞、CD30+细胞、CD34+细胞、CD34⁺细胞、CD9+细胞、CD29+细胞、CD44+细胞、CD45+细胞、CD49+细胞、CD54+细胞、CD56+细胞、CD59+细胞、CD71+细胞、CD90+细胞(如CD90.1+或CD90.2+细胞)、CD105+细胞、CD133+细胞、CD135+(flt-3+)细胞、CD140a+细胞、CD146+(m^c-18+)细胞、ABCG2+细胞、CD144+细胞、胎肝激酶1+细胞、Stro-1+细胞、CD117+(c-kit+)细胞、巢蛋白+细胞、PSA-NCAM+细胞、CD30+细胞、p75神经营养蛋白+(neurotrophin+)细胞、CD106+细胞、CD120a+细胞、CD124+细胞、CD166+细胞、干细胞因子+(SCF+)细胞、Sca-1+细胞、SH2+细胞、SH3+细胞、HLA(如HLA-ABC细胞)、骨形态发生蛋白蛋白质+(BMP)细胞(如BMP2+和BMP4+细胞)、Gap43+细胞、胶质细胞原纤维酸性蛋白⁺1(GFAP+)细胞、髓鞘碱性蛋白+(MBP+)细胞、04+细胞、01+细胞、突触泡蛋白+细胞、碱性磷酸酶+细胞、cripto+(TDGF-1+)细胞、足萼蛋白+细胞、硫酸化蛋白聚糖+细胞(如甲烷硅基化的硫酸角蛋白蛋白聚糖+细胞)、阶段特异性胚胎抗原+(如SSEA-1、-3和-4)细胞、TRA-1-60+细胞、TRA-1-81+细胞、骨钙蛋白+细胞、基质gla蛋白+细胞、骨桥蛋白⁺1细胞、Thy1+细胞、II型胶原蛋白+细胞、IV型胶原蛋白+细胞、脂肪酸转运蛋白+细胞和 β -整联蛋白+细胞。

[0287] 本发明提供了采用重组AAV病毒体将选定的基因成功转移至肌肉细胞或组织。该方法允许将重组AAV病毒体直接体内注射(例如通过肌肉内注射)至肌肉组织,以及允许肌细胞的体外转导,随后可将该肌细胞引入受试者体内用于治疗。分化的肌肉细胞和组织为基因治疗提供所需的靶标,因为它们容易接近并且是非分裂的。然而,本发明还发现了未分化的肌细胞如成肌细胞的用途,它们可在体外被转导并随后引入受试者体内。肌肉内注射可采用针阵列装置来完成。

替代基因

[0288] 在本发明的实施方案中,基因替代治疗剂用来提供替代基因,从而治疗其中根本病因是受试者相应基因中的缺陷,和/或其中基因的替代将对受试者有益的疾病或病症。采用本发明的方法可以替代一个或多个基因。

[0289] 在一些实施方案中,替代基因编码生物功能性微肌养蛋白。编码微肌养蛋白的基因可以小于5kb。重要的是,微肌养蛋白可以保护肌肉免于出现营养不良病理和症状。

[0290] 编码微肌养蛋白的基因可被称为肌养蛋白小基因,该术语包括由在人肌养蛋白DNA的中心杆状结构域中的大量缺失和在C-端结构域中的大量缺失而产生的肌养蛋白构建体。此外,肌养蛋白小基因可含有修饰的N-端结构域,其中原蛋白质翻译起始密码子ATG周围的DNA序列被修饰。修饰的序列增强了小肌养蛋白蛋白质的合成。或者,肌养蛋白小基因可以是杂合基因,其中一些结构域被来自肌营养相关蛋白(utrophin)或血影蛋白基因的同源结构域所替代(Tinsley等人,Nature 360,591-593[1992];Koenig等人,Cell 53,219-216[1988])。尤其是,肌营养相关蛋白与肌养蛋白在结构和功能上高度同源,所以它们的主要结构域应是可交换的(Tinsley等人,Nature.384,349-353[1996];Deconinck等人,Nat Med.3,1216-21[1997];Rafael等人,Nat Genet.19,79-82[1998])。例如,在肌养蛋白小基因中,肌养蛋白的N-端和/或C-端结构域可被肌营养相关蛋白的对应部分所替代。同样地,中心杆状结构域可由来自肌营养相关蛋白或血影蛋白基因的杆状重复序列组成。肌养蛋白小基因小于AAV病毒载体的5kb的包装极限。此外,以与本发明所述的肌养蛋白小基因相似的方式构建肌营养相关蛋白的小基因也是合理的。由于一些DMD患者完全缺乏肌养蛋白蛋白质,所以肌养蛋白小基因产物可能是新抗原。肌养蛋白结构域被肌营养相关蛋白的结构域所替代可降低免疫应答。

[0291] 肌养蛋白小基因可包含肌养蛋白基因的N-端序列、肌养蛋白基因的C-端富含半胱氨酸(CR)结构域、至少肌养蛋白基因的铰链HI和H4以及至少4个杆状重复序列。杆状重复序列可选自肌养蛋白、肌营养相关蛋白或血影蛋白基因的杆状重复序列,优选地选自肌养蛋白基因的24个杆状重复序列,且最优选地选自肌养蛋白基因的杆状重复序列R1、R2、R3、R22、R23和R24。可以修饰肌养蛋白小基因的N-端以提高表达效率,而不影响基因产物的功能性。例如,肌养蛋白基因的翻译起始ATG密码子周围的原始序列可被Kozak序列所替代以提高蛋白质合成的效率。在本发明的一个实施方案中,编码序列的上游三个核苷酸可从“AAA”变为“CCA”,并且编码序列中的第四个核苷酸可从“C”变为“G”。此外,一部分或整个N-端可被肌营养相关蛋白基因的对应部分所替代。同样地,肌养蛋白小基因的CR结构域也可被肌营养相关蛋白基因的对应部分所替代。

[0292] 在一些实施方案中,替代基因编码额外一个或多个拷贝的肌生成抑制蛋白抑制剂,或肌生成抑制蛋白抑制剂的增强形式。肌生成抑制蛋白抑制剂可包括天然肌生成抑制蛋白抑制剂的野生型或突变形式,其非限制性实例包括肌生成抑制蛋白前肽、滤泡素抑制素、FLRG和GASP-1。

[0293] 本发明的肌生成抑制蛋白抑制剂可以是肽或多肽。该蛋白质可通过结合肌生成抑制蛋白(McPherron等人,Nature,387(6628):83-90(1997))或通过结合肌生成抑制蛋白受体激活蛋白IIb(McPherron等人,Nat.Genet.,22(3):260-264(1999))而抑制肌生成抑制蛋白。通过与肌生成抑制蛋白结合而抑制肌生成抑制蛋白的蛋白质的实例为肌生成抑制蛋白

前肽、滤泡素抑制素 (Shimasaki 等人, 美国专利 5,041,538)、其它滤泡素抑制素样蛋白质 (美国专利 5,942,420; 6,410,232; 6,537,966; 和 6,953,662)、FLRG (Hill 等人, J.Biol.Chem., 277 (43):40735-40741 (2002)) 以及 GASP-1 (Hill 等人, Mol Endocrinol, 17: 1144-1154 (2003))。作为本发明的肌生成抑制蛋白抑制剂的蛋白质可以是蛋白质片段或可以是嵌合(即,融合)蛋白。

[0294] 本发明的其它合适的替代基因包括,例如,用于肌聚糖缺陷中的替代和用 IGF-1 或突变 SODI 干扰策略治疗肌萎缩性侧索硬化 (ALS) 患者的肌聚糖。

[0295] 替代基因的表达可由大量调节元件控制,这些调节元件包括但不限于,AAV 反向末端重复序列 (ITR)、逆转录病毒长末端重复序列 (LTR)、巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子和/或增强子、CMV 增强子和鸡 β -肌动蛋白启动子、 α -肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、肌特异性肌酸激酶 (MCK) 启动子和/或增强子等等。或者,还可采用上述启动子的修饰形式和合成的肌肉启动子。

[0296] 本发明的控制元件包括启动子区域、聚腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节域、复制起点、内部核糖体进入位点 (“IRES”)、增强子等等,它们共同提供编码序列在受体细胞中的复制、转录和翻译。并非总是需要存在所有这些控制元件,只要选定的编码序列在合适的宿主细胞中能够复制、转录和翻译即可。

[0297] 术语启动子区域在本文中以其一般含义使用,是指包含 DNA 调节序列的核苷酸区域,其中该调节序列来源于能够结合 RNA 聚合酶并启动下游 (3'-方向) 编码序列的转录的基因。

[0298] 有效连接是指元件的一种排列,其中如此描述的组件配置为能够行使其正常功能。因此,与编码序列有效连接的控制元件能够实现编码序列的表达。控制元件无需与编码序列相邻,只要它们发挥指导其表达的作用即可。因此,例如,不翻译但是转录的间插序列可以存在于启动子序列与编码序列之间,而仍可认为该启动子序列与编码序列有效连接。

[0299] 诸如肌特异性和诱导型启动子、增强子等控制元件可以在本发明的方法中使用。此类控制元件包括但不限于来源于肌动蛋白和肌球蛋白基因家族的控制元件,如来自 myoD 基因家族的控制元件 (Weintraub 等人 (1991) Science 251:761-766); 肌细胞特异性增强子结合因子 MEF-2 (Cserjesi 和 Olson (1991) Mol.Cell Biol. 11:4854-4862); 来源于人骨骼肌动蛋白基因 (Muscat 等人 (1987) Mol.Cell Biol. 7:4089-4099) 和心脏肌动蛋白基因的控制元件; 肌肉肌酸激酶序列元件 (Johnson 等人 (1989) Mol.Cell Biol. 9:3393-3399) 和鼠肌酸激酶增强子 (mCK) 元件; 来源于骨骼快缩肌钙蛋白 C 基因、慢缩心脏肌钙蛋白 C 基因和慢缩肌钙蛋白 I 基因的控制元件; 低氧诱导型核因子 (Semenza 等人 (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:5680-5684; Semenza 等人, J.Biol.Chem. 269:23757-23763); 类固醇诱导型元件和启动子,如糖皮质激素响应元件 (GRE) (Mader 和 White (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5603-5607); 针对 RU486 诱导的融合共有元件; 以及提供四环素调节基因表达的元件 (Dhawan 等人 (1995) Somat.Cell.Mol.Genet. 21:233-240; Shockett 等人 (1995) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:6522-6526)。

[0300] 在一些实施方案中,编码肌肉功能的一种或多种效应物的多核苷酸与在靶细胞中具有功能性的转录控制 DNA (如启动子 DNA) 和聚腺苷酸化信号序列 DNA 有效地连接以形成基因盒。该基因盒还可包括内含子序列以促进 RNA 转录物在哺乳动物细胞中表达时的加工。

或者,rAAV基因组中的多核苷酸是肌肉功能RNA的效应物或可编码肌肉功能效应物的RNA。该RNA可以是反义RNA、核酶、小干扰RNA(RNAi)或通过抑制肌肉功能的负调节基因的表达而实现肌肉功能的适体(例如,肌生成抑制蛋白或其受体激活蛋白IIB)。其它抑制表达的模式包括但不限于,针对翻译起始位点的反义RNA和可与DNA结合并防止DNA解旋和转录的RNA。作为另一实例,商业供应商如Ambion Inc.(Austin,Tex.)、Dharmacon Inc.(Lafayette, Colo.)、InvivoGen(San Diego,Calif.)和Molecular Research Laboratories,LLC(Herndon,Va.)生产定制的siRNA分子。此外,市售试剂盒可用于产生定制的siRNA分子,如SILENCERTM siRNA构建试剂盒(Ambion Inc.,Austin,Tex.)和opsiRNA系统(InvivoGen, San Diego,Calif.)。

疾病和病症

[0301] 本发明的方法可用于治疗肌肉疾病或病症如肌肉萎缩性疾病。术语肌肉萎缩性疾病泛指导致肌肉功能减退的状况。

[0302] 肌肉萎缩性疾病通常可分为三类:(1)肌营养不良;(2)炎性肌病;(3)肌萎缩。用本发明的方法治疗的肌营养不良包括,例如,杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良和肢带型肌营养不良。肌营养不良是遗传性的、进行性的,并且每种类型都会导致一种特有的、选择性的肌无力模式。其它肌营养不良包括面肩肱型肌营养不良、先天性肌营养不良、眼咽型肌营养不良、远端型肌营养不良和埃-德型肌营养不良。

[0303] 杜氏肌营养不良和贝克肌营养不良是相似的,因为这两种营养不良具有相似的肌无力和残疾模式,并以相同的方式遗传。通常,需要对杜氏肌营养不良和贝克肌营养不良进行治疗的受试者具有行走障碍,并且最终变为轮椅依赖的。通常,区分杜氏肌营养不良与贝克肌营养不良的任意方式取决于患病个体在16岁时是否仍能够行走。患有杜氏肌营养不良的个体到其青少年期通常只能坐轮椅。更具体地,与罹患贝克肌营养不良的个体相比,罹患杜氏肌营养不良的个体的肌肉活检将显示出更多致残变化。

[0304] 杜氏肌营养不良和贝克肌营养不良是由于相同基因的缺陷或突变而致,该缺陷或突变使得肌肉纤维能产生肌养蛋白。肌养蛋白基因编码一种大的427kD蛋白质,该蛋白质的作用是将胞外基质与肌肉纤维细胞骨架连接。肌养蛋白上的氨基末端与接触骨骼肌收缩装置的丝状肌动蛋白结合,而靠近羧基端的富含半胱氨酸的结构域与定位于与构成肌养蛋白糖蛋白复合物(DGC)的其它膜蛋白相连的纤维膜上的营养不良聚糖蛋白结合。肌养蛋白表达的缺乏导致DGC成员的相伴减少。现在认为肌养蛋白的损失和产生的DGC复合物损害骨骼肌膜的完整性,骨骼肌膜在收缩活动的反复循环后遭受损害。进一步认为膜损害导致肌酸激酶释放,刺激钙流入,并且诱导免疫T细胞、巨噬细胞和肥大细胞的募集,最终导致肌纤维坏死。在杜氏肌营养不良患者中这些细胞的再生能力耗尽,从而让位于积累的纤维化和脂肪沉积物,这加剧了肌肉萎缩过程。

[0305] 肢带型肌营养不良包括至少10种不同的遗传性病症,其可进一步分为两类:常染色体显性(LGMD 1)综合征和常染色体隐性(LGMD2)综合征。大部分肢带型肌营养不良的症状通常开始于从童年期开始到成年早期的骨盆肌无力。随后在接下来的20-30年里有肩无力发作,并进展为显著的运动能力丧失或轮椅依赖。

[0306] 尚未发现导致大部分常染色体显性肢带型肌营养不良的缺陷基因,但已将这些疾病与多种染色体中的突变联系在一起。例如,LGMD1A型营养不良已与染色体5联系在一起。

此外, LGMD 1B型营养不良已与染色体1联系在一起。其它已与常染色体显性肢带型肌营养不良联系起来的染色体包括染色体3和7。几种常染色体隐性肢带型肌营养不良是由于肌养蛋白相关的糖蛋白(即, 肌聚糖)中的突变而导致的。

[0307] 另一个实施方案包括利用本发明的方法治疗炎性肌病。炎性肌病是横纹骨骼肌的疾病或异常状况。大多数炎性肌病的病因都是未知的。通常认为炎性肌病是由自身免疫反应引起的, 身体自身的免疫系统通过自身免疫反应攻击肌细胞。用来治疗的炎性肌病的实例可包括多肌炎和皮肌炎。

[0308] 多肌炎的症状包括肌肉炎症和肌肉压痛。症状的发作可能是急性的, 但病况通常进展缓慢, 如果不治疗可能会损害受试者行走的能力。

[0309] 需要治疗皮肌炎的受试者与患有多肌炎的受试者具有相似的症状, 但另外显现出特有的皮疹体征。具体地说, 紫色或暗红色皮疹突然出现在受试者的面部、眼睑及其指甲周围区域、指关节、肘、膝盖、胸部和背部上。皮肌炎通常发生在四十几岁后期至六十几岁初期的成年个体中或5-15岁的儿童中。

[0310] 在一些实施方案中, 可利用本发明的方法治疗肌萎缩。肌萎缩可能是诸如癌性恶病质、AIDS恶病质或心脏恶病质等病症或病况的结果。恶病质通常与脂肪组织和骨骼肌质量二者的大量损失(可达总体重的30%)相关, 这种损失可以作为许多疾病如癌症、AIDS和慢性心力衰竭的副作用而发生。脂肪组织和骨骼肌质量的损失可导致厌食、早饱、疲劳、全身肌无力、肌肉功能减退和进行性肌肉萎缩。

[0311] 受试者中的肌肉萎缩性疾病可能是该受试者患有以下疾病的结果: 肌营养不良、肌萎缩、X-染色体连锁型脊髓延髓肌肉萎缩症(SBMA)、恶病质、营养不良、结核病、麻风病、糖尿病、肾脏疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、癌症、终末期肾衰竭、烧伤、糖尿病、充血性心力衰竭、少肌症、肺气肿、骨软化症或心肌病。

[0312] 在另一个实施方案中, 肌肉萎缩性疾病是由于感染肠病毒、EB病毒、带状疱疹病毒、HIV、锥虫、流感病毒、柯萨奇病毒、立克次氏体、旋毛虫、血吸虫或分枝杆菌引起的。

[0313] 少肌症是折磨老年人和慢性病患者的致衰弱性疾病, 其特征为肌肉质量和功能的损失, 可通过本发明的方法治疗, 等等。此外, 其它情况和状况与肌肉萎缩性病症相关, 并且可导致肌肉萎缩性病症。例如, 研究已表明在慢性腰背痛的重症病例中存在椎旁肌萎缩。

[0314] 考虑用本发明方法治疗的疾病或病症的其它非限制性实例包括其中肌肉受到不利影响的神经退行性疾病/病症(例如, 肌萎缩性侧索硬化、多发性硬化和脊髓性肌萎缩)、少肌症、恶病质、肥胖、II型糖尿病、庞皮病和溶酶体贮积症。

基因治疗的靶组织

[0315] 在一些实施方案中, 本公开内容举例说明了将基因替代治疗剂引入肌肉组织(可与术语肌肉交换使用)或肌细胞的方法, 术语肌细胞是指来源于肌肉的一个细胞或一群细胞, 包括但不限于来源于骨骼肌、平滑肌(例如, 来自消化道、膀胱和血管)和心肌的细胞和组织。术语肌细胞包括体外和体内的肌细胞。因此, 例如, 对于本发明而言, 分离的心肌细胞将构成肌细胞, 就像存在于受试者体内肌肉组织中的肌细胞一样。还包括由分化的和未分化的肌肉细胞如肌细胞(如肌管)、分裂及分化的成肌细胞、心肌细胞和心脏成肌细胞衍生的肌细胞和肌肉组织。

[0316] 组织通常是医学领域所熟知的, 并且可包括任何粘着性的、空间上离散的非流体

限定的解剖学区室,该区室实质上是多细胞、细胞间、组织和/或器官结构的产物,如这样一种三维限定的区室,该区室可包含结构完整性或者由相关联的结缔组织产生其结构完整性,并且可通过薄膜(例如,脑膜、围心膜、胸膜、粘膜、基底膜、网膜、器官包覆膜等)与其它身体区域隔开。实体组织的非限制性实例可包括脑、肝、肺、肾、前列腺、卵巢、脾脏、淋巴结(包括扁桃体)、甲状腺、胰腺、心脏、骨骼肌、肠、喉、食道和胃。这些及其它实体组织的解剖学位置、形态学性质、组织学特征及其有创和/或无创获取对熟悉相关技术的人员来说都是熟知的。在一些实施方案中,组织是正常的。在一些实施方案中,组织是或疑似是癌性的、发炎的、感染的、萎缩的、麻木的、癫痫的或凝结的。在一些实施方案中,组织受到或疑似受到肌肉疾病或病症的影响。在一些实施方案中,组织受到肌肉疾病或病症的影响。

基因治疗的受试者

[0317] 在某些实施方案中,受试者是临床前模型和人类受试者之一。受试者可以是哺乳动物,即哺乳动物纲的任何成员,包括但不限于,人类和非人灵长类动物如黑猩猩和其它猿和猴物种;农场动物,如牛、绵羊、猪、山羊和马;家养哺乳动物,如狗和猫;实验动物,包括啮齿类动物,如小鼠、大鼠和豚鼠,等等。该术语并不限定特定的年龄或性别。因此,意在涵盖成年和新生受试者以及胎儿,无论是雄性还是雌性。

[0318] 在一些实施方案中,受试者是犬类临床前模型,如野生型狗或cxmd狗。AAV载体向狗的骨骼肌内的有效渗透和递送采用免疫抑制方案来实现,该免疫抑制方案在单独的肌肉内AAV注射之后允许在野生型狗和cxmd狗体内延长转基因表达方面是有效的。

[0319] 在一些实施方案中,受试者是临床前动物模型。在一些实施方案中,受试者是小鼠模型或大鼠模型之一。临床前模型可以是作为异种移植或异种移植术(这两个术语可互换使用,是指活细胞、组织或器官从一个物种向另一个物种的移植)的受体的动物模型。在一些优选的情况下,临床前模型是一种或多种可发展为肿瘤的癌细胞的受体。受体临床前模型可以是免疫受损的动物,如SCID小鼠或裸鼠。无胸腺裸鼠是来自具有基因突变的品系的实验小鼠,该基因突变导致胸腺退化或缺如,从而导致免疫系统因T细胞数大大减少而受到抑制。在临床前模型中的免疫受损状态可能是遗传异常的结果,或者可能是药物治疗抑制了免疫系统功能的结果。免疫抑制药物或免疫抑制剂是抑制或阻止免疫系统活性的药物。免疫抑制药物的非限制性实例包括糖皮质激素;细胞抑制剂;烷化剂;抗代谢物,包括叶酸类似物如甲氨蝶呤,和嘌呤类似物如硫唑嘌呤和巯嘌呤;硫唑嘌呤和巯嘌呤;细胞毒性抗生素,包括放线菌素D、蒽环类、丝裂霉素C、博来霉素和光神霉素;针对免疫系统元件的多克隆和单克隆抗体;以及作用于抑免蛋白的药物,包括环孢菌素、他克莫司、伏环孢素和其它钙调磷酸酶抑制剂,和西罗莫司;干扰素、阿片类药物、TNF-结合蛋白质、麦考酚酯和芬戈莫德。

[0320] 某些其它实施方案涉及非人类受试者或生物来源,例如,非人灵长类动物,如猕猴、黑猩猩、大猩猩、长尾黑颞猴、猩猩、狒狒或其它非人灵长类动物,包括本领域可能已知可作为临床前模型的这类非人类受试者,包括实体瘤和/或其它癌症的临床前模型。某些其它实施方案涉及一种非人类受试者,它是哺乳动物,例如,小鼠、狗、大鼠、兔、猪、绵羊、马、牛、山羊、沙鼠、仓鼠、豚鼠或其它哺乳动物;许多这样的哺乳动物可以是本领域已知可作为某些疾病或病症(包括实体瘤和/或其它癌症)的临床前模型的受试者(例如,Talmdge等人,2007Am.J.Pathol.170:793;Kerbel,2003Canc.Biol.Therap.2(4Suppl 1):S134;Man等

人,2007Canc.Met.Rev.26:737;Cespedes等人,2006Clin.Transl Oncol.8:318)。然而,并非意在如此限制实施方案的范围,也考虑其它实施方案,其中受试者或生物来源可以是非哺乳类脊椎动物,例如另一种高等脊椎动物或禽类、两栖类或爬行类物种,或另一种受试者或生物来源。转基因动物是非人类动物,其中该动物的一种或多种细胞包括非内源性的(即,异源性的)核酸,并且该核酸作为染色体外元件而存在于其一部分细胞中,或稳定地整合到其种系DNA中(即,其大部分或全部细胞的基因组序列中)。在本发明的某些实施方案中,可以针对转基因动物的组织。在一些实施方案中,实体组织是通过将一种生物体的一种或多种细胞(例如,培养的人类癌细胞或原发性人类癌细胞)引入非人类模式生物中而产生的异种移植体。

[0321] 本发明的方法适合于向多种组织施用基因替代治疗剂;因此该方法具有医学和兽医学用途。在一些实施方案中,动物是宠物、陪伴动物、守护动物、役用动物、种畜、服务动物、竞技动物、农场动物、放牧动物或实验动物。

[0322] 受试者或生物来源可以是人类或非人类动物、转基因的或克隆的或组织工程化的(包括通过使用干细胞)生物体、原代细胞培养物或适合培养的细胞系,包括但不限于可包含染色体整合的或游离型的重组核酸序列的遗传工程细胞系、已永生化或可永生化的细胞系、体细胞杂合细胞系、已分化的或可分化的细胞系、已转化的细胞系等。在本发明的一些实施方案中,受试者或生物来源可能疑似患有恶性疾病或肌肉疾病或病症或具有患有此类疾病的风险,并且在本发明的一些实施方案中,可能已知受试者或生物来源没有患此类疾病的风险或不存在此类疾病。

制剂

[0323] 流体药剂或基因替代治疗剂可包含药学上可接受的载体,载体的实例是药学领域所熟知的,并且在例如Remingtons Pharmaceutical Sciences.Mack Publishing Co.(A.R.Gennaro edit.1985)中有所描述。例如,可使用生理pH下的无菌盐水和磷酸盐缓冲盐水。药物组合物中可含有防腐剂、稳定剂、染料和其它辅助剂。例如,可添加苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯作为防腐剂。此外,可使用抗氧化剂和悬浮剂。药学上可接受的盐是指药物化合物与有机酸或无机酸(酸加成盐)或有机或无机碱(碱加成盐)相结合而产生的该化合物的盐。考虑用于本发明的药剂(包括药物)可以以游离碱或盐的形式使用,这两种形式都被认为涵盖在本发明某些实施方案的范围内。

[0324] 药剂可以为允许将其施用于受试者的任何形式。根据一些实施方案,药剂将为液体形式,并且其给药途径将包括如本文所述的向组织施用。本文所用的术语肠胃外包括但不限于经皮或皮下注射以及肌肉内、髓内和胸骨内技术。

[0325] 本文所使用的液体药物组合物,无论是溶液形式、悬液形式还是其它类似的形式,可包含一种或多种以下助剂:无菌稀释剂如注射用水、盐溶液、生理盐水、林格氏溶液、盐水溶液(例如,生理盐水,或等渗、低渗或高渗的氯化钠)、可充当溶剂或悬浮介质的非挥发油如合成的甘油单酯或甘油二酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗菌剂如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的试剂如氯化钠或右旋糖。肠胃外制剂可封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。在一些实施方案中,生理盐水是助剂。可注射的药物组合物可以是无菌的。也可期望在制剂中包含其它成分,如递送载

体,包括但不限于铝盐、油包水型乳剂、生物可降解的油载体、水包油型乳剂、生物可降解的微囊、水凝胶和脂质体。

[0326] 虽然本发明的药物组合物中可使用本领域普通技术人员已知的任何合适的载体,但载体的类型将根据给药方式以及是否也需要常规的持续药物释放而变化。对于肠胃外给药,如药物的补充注射,载体可包含水、盐水、酒精、脂肪、蜡或缓冲液。生物可降解的微球(例如,聚乳酸半乳糖交酯)也可用作本发明药物组合物的载体。合适的生物可降解的微球在例如美国专利4,897,268和5,075,109中公开。在一些实施方案中,微球可大于约25微米,而其它实施方案并未如此限定,而是考虑其它尺寸。

[0327] 药物组合物也可含有稀释剂如缓冲剂、抗氧化剂如抗坏血酸、低分子量(少于约10个残基)多肽、蛋白质、氨基酸、碳水化合物(包括葡萄糖、蔗糖或糊精)、螯合剂如EDTA、谷胱甘肽和其它稳定剂和赋形剂。中性缓冲盐水或与非特异性血清白蛋白混合的盐水是合适的示例性稀释剂。在一些实施方案中,采用合适的赋形剂溶液(如蔗糖)作为稀释剂将药剂(如治疗性药物或候选药物)制备成冻干产物。

[0328] 在一些实施方案中,药物组合物还包含水凝胶。水凝胶对于降低药物制剂在实体组织中的扩散或分散速率是有效的。在一些实施方案中,含有水凝胶的药物组合物在实体组织中的分散程度低于缺乏水凝胶的类似药物组合物。在一些实施方案中,含有水凝胶的药物组合物在实体组织中的分散比缺乏水凝胶的类似药物组合物更慢。

[0329] 水凝胶的含量可以是药物组合物的约1%至约99%。在一些实施方案中,水凝胶的含量是药物组合物的约0.1%、约0.2%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、约1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%、约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%、约3%、约3.1%、约3.2%、约3.3%、约3.4%、约3.5%、约3.6%、约3.7%、约3.8%、约3.9%、约4%、约4.1%、约4.2%、约4.3%、约4.4%、约4.5%、约4.6%、约4.7%、约4.8%、约4.9%、约5%、约5.5%、约6%、约6.5%、约7%、约7.5%、约8%、约8.5%、约9%、约9.5%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、约40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%、约50%、约51%、约52%、约53%、约54%、约55%、约56%、约57%、约58%、约59%、约60%、约61%、约62%、约63%、约64%、约65%、约66%、约67%、约68%、约69%、约70%、约71%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%。

[0330] 适合于生物学应用的示例性多孔材料在美国专利4,014,335中有所描述,其通过引用完整并入本文。这些材料包括但不限于,交联聚乙烯醇、聚烯烃或聚氯乙烯或交联明胶;再生的、不溶性的、不易腐蚀的纤维素、酰化纤维素、酯化纤维素、醋酸丙酸纤维素、醋酸丁酸纤维素、醋酸邻苯二甲酸纤维素、醋酸二乙基氨基乙酸纤维素;聚氨酯、聚碳酸酯和由聚阳离子修饰的不溶性胶原蛋白和聚阴离子修饰的不溶性胶原蛋白共沉淀形成的多微孔聚合物。

[0331] 在一些实施方案中,水凝胶包含胶原蛋白。胶原蛋白来源的非限制性实例包括 Engelbreth-Holm-Swarm 鼠肉瘤基膜、牛跟腱、牛鼻中隔、牛气管软骨、小牛皮、鸡肋软骨、人肺、人胎盘、袋鼠尾巴、小鼠胸骨和大鼠尾腱。胶原蛋白可占水凝胶的超过 0.1%、0.2%、0.5%、0.7%、1%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2% 或 5%。可使用重组胶原蛋白。在美国专利申请 US20070254041 中描述了几种胶原蛋白的来源。可使用不溶于水的胶原蛋白材料,并且其可来源于天然组织来源(例如,相对于人类受体或其他患者是异种的、同种异体的或自体的)或经重组制备。根据胶原蛋白的氨基酸序列、碳水化合物含量和存在或不存在二硫键交联,可将其再细分为几种不同类型。I 型和 III 型胶原蛋白是两种最常见的胶原蛋白亚型。I 型胶原蛋白存在于皮肤、腱和骨骼中,而 III 型胶原蛋白主要发现于皮肤中。本发明的组合物中使用的胶原蛋白可从皮肤、骨骼、腱或软骨中获得,并且通过本领域和行业内所熟知的方法进行纯化。或者,胶原蛋白可购自商业来源。在本发明中优选使用 I 型牛胶原蛋白。

[0332] 胶原蛋白可以是无端肽胶原蛋白和/或端肽胶原蛋白。更进一步地,可使用非纤维状胶原蛋白和纤维状胶原蛋白中的任一种或两种。非纤维状胶原蛋白是已溶解而未重构成其天然纤维形式的胶原蛋白。

[0333] 合适的胶原蛋白产物可商业获得,包括来自例如 Kensey Nash Corporation (Exton, Pa.), 其由牛皮制造被称为 samed F 的纤维状胶原蛋白。来源于牛皮的胶原蛋白材料还可由 Integra Life Science Holding Corporation (Plainsboro, N.J.) 制造。天然来源的或重组的人胶原蛋白材料也适合在本发明中使用。举例来说,重组人胶原蛋白产物可从 Fibrogen, Inc. (San Francisco, Calif.) 获得。例如,加入本发明组合物中的固体颗粒胶原蛋白可以是完整的或重构的纤维的形式,或随机成形的颗粒。

[0334] 胶原蛋白可在室温下溶解于水中以形成水溶液,但在 37 度经聚合形成凝胶。Miyata 在美国专利 4,164,559 中记载,已经很好地确定了胶原蛋白的化学、分子结构和生化性质 (Annual Review of Biophysics and Bioengineering, Vol. 3, pp. 231-253, 1974)。胶原蛋白是结缔组织如角膜、皮肤等的主要蛋白质,并且可通过用蛋白水解酶(不是胶原酶)如胃蛋白酶处理来将其溶解并进行纯化。经溶解的胶原蛋白是缺少端肽的、相对便宜的、非抗原性的并且可用作生物医学材料。酶溶解的天然胶原蛋白在酸性 pH 中是可溶的,但在生理 pH 和 37 度下聚合形成凝胶。

[0335] 在其它实施方案中,在本领域已知的多种制剂中,水凝胶包含聚乙二醇 (PEG)。PEG 水凝胶中可以存在的聚合物的非限制性实例包括聚乳酸 (PLA)、乳酸-乙醇酸共聚物 (PLGA) 和聚己内酯 (PCL)。这些共聚物的一些实例包括 PLA-PEG-PLA、PLGA-PEG-PLA 和 mPEG-b-PCL (1200)-b-PEG (6000)-b-PCL (1200) 共聚物。PLGA 是一种由于其生物可降解性和生物相容性而在许多食品和药品管理局 (FDA) 批准的治疗装置中使用的共聚物。PLGA 是通过两种不同单体的随机开环共聚而合成的,该单体为乙醇酸和乳酸的环状二聚物 (1,4-二氧杂环-2,5-己二酮)。根据用于聚合的丙交酯与乙交酯的比例,可以获得不同形式的 PLGA: 这些形式通常以使用的单体比例来确定(例如,PLGA 75:25 确定了一种组成为 75% 的乳酸和 25% 的乙醇酸的共聚物)。所有 PLGA 都是无定形的而不是结晶的,并且显示 40-60 度的玻璃化转变温度。用 PLGA 进行药物递送或生物材料应用具有极低的全身毒性。PLA 是一种生物可降解的、热塑性的、脂肪族的聚酯,来源于可再生资源如玉米淀粉、木薯粉产品或甘蔗。PCL 是一种具有约 60°C 的低熔点和约 -60°C 的玻璃化转变温度的生物可降解的聚酯。PCL 是使用催化剂如

辛酸亚锡通过 ϵ -己内酯的开环聚合而制备的。PCL是经FDA批准的可用于人体的材料,植入后会经历缓慢降解。

给药和施用

[0336] 本发明的包含空心管和/或多孔管的药物递送装置可用于通过将装填有一种或多种治疗剂的一个或多个多孔管置于受试者组织中而向受试者施用治疗性或候选治疗剂的方法。管可部分地或全部地陷入组织中。将管经由针插入组织中可有助于将管置于组织。可通过下压与针相关联的柱塞将管进一步置于组织中。

[0337] 将管置于组织中后,可将管打碎、切割、切开、分开或分离以将管的顶端从管的底端移去。在一些实施方案中,管的底端含有治疗剂,而管的顶端不含治疗剂。在一些实施方案中,管的底端和顶端都含有治疗剂。

[0338] 一旦管已置入组织内,管的内容物(例如,药物组合物或治疗剂)就可从管扩散至组织中。该过程在图1中示出。扩散速度可受到管的孔隙率的影响。内含物可在约一分钟至约一个月、约一小时至约一周、约12小时至约72小时或约24小时至约48小时的一段时间内通过管材料扩散到组织中。

[0339] 如果管的内容物含有染料,则可对组织内的染料进行成像以监测治疗剂的分布或活性。可以选择染料,以便例如通过荧光来报道成像时生物学功能的激活或失活。该过程允许实验者能对治疗剂对于目标生理系统的影响做出直接评估。

[0340] 通常,可采用本领域已知的体内或体外转导技术将rAAV病毒体引入肌细胞。如果在体外转导,则从受试者中取出所需受体肌细胞,用rAAV病毒体进行转导,并将其再次引入受试者体内。或者,可以使用同源或异源肌细胞,其中这些细胞在受试者体内将不产生不适当的免疫应答。

[0341] 已描述了用于将转导的细胞递送及引入受试者体内的合适的方法。例如,可通过以下方式在体外转导细胞:将重组AAV病毒体和肌细胞相组合,例如在合适的介质中,并使用常规技术如DNA印迹法和/或PCR或通过使用选择性标记来筛选携带目标DNA的那些细胞。然后可将转导的细胞配制到药物组合物中,并通过各种不同的技术将该组合物引入到受试者体内,如通过肌肉内注射、静脉内注射、皮下注射和腹膜内注射,或通过使用如针阵列装置注入平滑肌和心肌内。

[0342] 对于体内递送,可将rAAV病毒体配制到药物组合物中,并且通常将进行肠胃外给药,例如,通过直接肌肉内注射到骨骼肌或心肌内。药物组合物将包含足以产生治疗有效量的目标蛋白质的遗传物质,即,足以降低或改善所考虑的疾病状态的症状的量,或足以提供期望的益处的量。药物组合物还将含有药学上可接受的赋形剂。此类赋形剂包括其本身不会诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体并可施用而不产生过度毒性的任何物质。药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体如水、盐水、甘油和乙醇。

[0343] 合适的剂量将取决于所治疗的哺乳动物、待治疗的受试者的年龄和一般病况、所治疗的病况的严重性、所考虑的特定治疗性蛋白质、给药方式以及其它因素。合适的有效量可由本领域技术人员容易地确定。因此,治疗有效量将落在可通过临床试验确定的相对宽的范围内。例如,对于体内注射,即,直接向骨骼肌或心肌内的注射,治疗有效剂量将处于约 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 或 10^{15} 个rAAV病毒体的数量级。对于体外转导,将递送至肌细胞中的rAAV病毒体的有效量将处于 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 或 10^{13} 个rAAV病毒体

的数量级。药物组合物中转导细胞的量将从约 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 或 10^{10} 个肌细胞起。当把转导的细胞引入血管平滑肌时,较低的剂量可能是合适的。本领域普通技术人员可通过建立剂量响应曲线的常规试验很容易地确定其它有效剂量。

[0344] 剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。此外,可对受试者酌情施用尽可能多的剂量。本领域技术人员可以很容易地确定适当的剂量数。

基因治疗方法

[0345] 动物模型、麻醉和免疫抑制:野生型研究用狗可以是本发明的受试者。针阵列可与局部麻醉(如采用利多卡因)或全身麻醉一起使用。全身麻醉可涉及布托啡诺、地西洋/氯胺酮、异丙酚和异氟烷,并且可通过本领域已知的方法监测动物。通过从载体注射前2天开始,以7.5mg/kg一天两次口服环孢菌素(CSP)——一种钙调磷酸酶抑制剂——并持续至第6周,以及从第0天直至实验结束以5mg/kg的剂量一天两次皮下施用吗替麦考酚酯(MMF)——一种抗代谢物,来对狗进行免疫抑制。

[0346] 针的制造:在本发明的实施方案中可使用从距针尖端0.5mm处起有5mm多孔区域的30mm长的针。针可由外径为0.46mm、内径为0.25mm的手术级不锈钢管组成,孔的直径可以是0.15mm并且间隔0.25mm。这些孔可通过电火花加工(EDM)来形成。可将不锈钢管旋转焊接以密封尖端,并且尖端可磨成最大法兰角(flange angle)为48度的铅笔尖端,且尖端偏离中心不超过0.06mm。可通过在显微镜下依据标准操作程序目视检测尺寸、长度、尖端几何形状、孔径和孔分布来对定制的多孔针进行内部质量控制(QC)。

[0347] 阵列头的设计和制造:可将用于狗肌肉注射的针阵列头制成与用于小鼠模型肿瘤研究的针、管和泵相兼容。设计可使电路中的连接数最小化,并使内径沿着流体路径的突然变化最小化,从而使流体中的气泡形成和湍流最小化。阵列头的集合部(hub)可由医学级聚砜类聚合物制成,将具有大致 3×9 cm的卵圆形和1-1.5cm的高度以便于操作。可通过集合部将针适配并保持在轴向开口内,然后可使用医学级粘合剂将其固定,最后可对所有阵列头进行质量控制、包装和灭菌。

[0348] 注射泵:诸如Harvard Apparatus PHD Ultra注射泵的泵可用于对抗小于约1000psi的背压,以约0.0001 μ l/hr至221ml/hr的流速递送精确的体积。500 μ l的注射器可用于递送约1.5nl/min至约1.6ml/min。直径约为0.25mm且壁厚约为1.6mm的聚氯乙烯(PVC)管适合于以所需速率递送流体。可针对耐溶剂性和对FDA批准和人类临床应用的适合性来选择管材料。

[0349] 输注浓度、体积和速率:本发明的针可在约1、2、3、4、5、6或10分钟或小于约30秒内递送25、50、75、100、150、200或250 μ l体积的Hank缓冲盐溶液中的 5×10^{11} 载体基因组。每块肌肉可接受单一多孔针注射。可将不可吸收缝线置于注射部位作为标记。

[0350] 肌肉活检和组织分析:可在不同时间点获得肌肉活检样品以评估例如因子IX的表达。可将肌肉组织包埋在O.C.T.介质(Tissue-Tek, Hatfield, PA)中,并可制成连续冷冻切片以采用苏木精和伊红-荧光桃红(H&E)染色进行组织学评价;用于检测犬因子IX的表达,其中可使用兔抗犬因子IX(Affinity Biologicals, Ontario, 加拿大)作为第一抗体。从缓冲液注射部位采集的肌肉活检样品可作为阴性对照。可在1cm²的面积内对表达cFIX的肌肉纤维进行计数,计算cFIX阳性肌肉纤维的百分比,并在不同递送方案之间进行比较。

数据采集和分析

[0351] 在一些实施方案中,考虑可使用已知技术对实体组织中的靶区域进行成像以评价药剂的效果。成像可以通过任何合适的过程或方法进行,包括,例如,放射摄影成像、磁共振成像、正电子发射断层显像、生物光子成像等。在一些实施方案中,在递送过程之前、期间或之后可反复对靶区域进行成像。

[0352] 成像后,可通过本领域技术人员已知的方法对报道信号的水平进行量化。报道信号的观测和/或量化结果可用于作出有关治疗剂的应用和功效的知情研究和卫生保健决定。可基于此观测结果作出的决定的非限制性实例包括流体体积质量控制、位置追踪和药物生物分布。可在低等哺乳动物例如小鼠中进行此类实验,以提供可用于作出关于潜在治疗剂在人体内的活性的知情预测的报道信号。该类型的动物研究可用于避免由于在受控环境而非天然环境中进行细胞内药效研究而引起的内在不确定性和不准确性。

[0353] 荧光信号的量化可通过本领域已知的任何方法来实现。荧光信号可与标准或对照进行比较以确定生物途径的上调或下调。此类观测结果可用于作出关于候选药物的治疗价值的预测。

[0354] 根据图7的实施方案,数据处理系统350用于执行或指导操作,包括处理器354和存储器356。处理器354通过地址/数据总线360与存储器356进行通讯,并且还与针阵列组件362以及对象扫描装置364进行通讯。根据一个实施方案,对象扫描装置364用于辅助将针阵列组件362的针放置在受试者体内,以及采用成像技术如放射摄影成像或核医学试验对靶组织区域进行无创分析。处理器354可以商业购得或是定制的微处理器、微控制器、信号处理器等。存储器356可包括含有用于实现功能性电路和模块的软件和数据的任何存储装置和/或存储介质。

[0355] 存储器356可任意地包括用于数据处理系统的几类软件和数据,例如,举例而言,操作系统366、应用程序368、输入/输出装置驱动器370和数据372。应用程序368是根据一些实施方案实现电路和模块的各种特征的示例性程序,而数据372代表应用程序368、操作系统366、输入/输出装置驱动器370和其它可驻留于存储器356中的软件程序所使用的静态和动态数据。

[0356] 根据各种实施方案,数据处理系统350可包含数个模块,包括阵列控制器376、扫描仪控制器378等。模块可配置为单模块或另行配置为执行本文所述的操作的其它模块。例如,阵列控制器376可配置为通过控制致动器116而控制图2的针阵列组件100,从而控制治疗剂从储器114经由针112的释放。扫描仪控制器378可配置为控制对象扫描装置364。

[0357] 在一些实施方案中,在引入一种药剂或多种药剂后对实体组织中改变的生理状态的检测包括检测药剂通过实体组织的渗透程度,检测组织中药剂的吸收程度,检测药剂对组织的物理化学作用,和/或检测药剂对组织的药理作用。对药物在实体组织中的渗透或透过的测定(包括荧光测定)是本领域已知的,并且已有描述(例如,Kerr等人,1987Canc.Chemother.Pharmacol.19:1及其中引用的参考文献;Nederman等人,1981In Vitro 17:290;Durand,1981Canc.Res.41:3495;Durand,1989JNCI 81:146;Tunggal等人,1999Clin.Canc.Res.5:1583),并且可根据本公开内容进一步配置,例如,通过检测组织学连续切片中在切除和切片之前已经与目标药剂共同施用到实体组织中的可检测标记。

[0358] 在此类实施方案中,渗透或透过涉及实体组织中紧邻用于引入(不包括灌注(经由任何血管进入和分散))药剂的针的药剂滞留区域,并且可包括药剂在细胞外隙或胞外基质

中的滞留,或药剂与细胞膜相结合或在细胞内的滞留。渗透可与物理化学效应不同,后者是指由针的插入或流体注射本身所引起的或由药剂所致的非生物机械或化学组织破坏所引起的、显微镜下可检测到的组织的机械破坏(例如,细胞膜的损伤或细胞-细胞接合的瓦解)。药理作用包括作为药剂的分子作用机理的结果而可检测的、细胞或组织生理状态的统计学显著的改变,例如,细胞骨架重组、细胞过程的延长或缩短,或使用多种已知的细胞学、生物化学、分子生物学或其它读取技术中的任一种可检测的生物信号转导的证据。对连续切片的比较可允许区分组织学上检测到的作用的性质。

[0359] 在本发明的一些优选实施方案中,利用多孔针阵列在组织内沿平行轴沉积包含水凝胶和多种候选治疗剂的多种组合物。在一些情况下,组合物还包含染料,染料可用于指示例如位置、渗透、信号传导途径的状态或向细胞内的递送。在一些优选的实施方案中,组织是肿瘤。肿瘤可在递送多种组合物后切除并切片,并且可采用亮视野或荧光显微镜术对单独的切片进行成像,以确定例如多种候选治疗剂的相对功效。

本发明提供了包括但不限于以下实施方案:

1. 一种给药装置,其包含
 - (a) 定位为用于在组织内沿平行轴递送多种流体药剂的针阵列;以及
 - (b) 一种或多种流体药剂和水凝胶,其中所述药剂调配成在递送至所述组织后在所述组织中分散的程度低于缺乏所述水凝胶的相同流体药剂。
2. 如实施方案1所述的给药装置,进一步包含与所述针阵列相关联的致动器,并且所述流体药剂经由所述致动器进行分配。
3. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述致动器包括柱塞。
4. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述致动器包括泵。
5. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述针阵列包含约1个至约1,000个针。
6. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述针阵列包含约2个至约1,000个针。
7. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述针阵列包含约5个至约1,000个针。
8. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述流体药剂包含至少一种指示剂颗粒。
9. 如实施方案8所述的给药装置,其中所述指示剂颗粒选自金属颗粒、荧光染料、量子点、量子条形码、放射摄影造影剂、磁共振成像造影剂、阳性对照和阴性对照。
10. 如实施方案8所述的给药装置,其中所述指示剂颗粒包含染料。
11. 如实施方案10所述的给药装置,其中所述染料是荧光的。
12. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述组织来自动物。
13. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述组织来自人。
14. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述流体药剂包含抗癌剂、抗炎剂、抗感染剂、再生剂、松弛剂、细胞凋亡抑制剂、细胞凋亡诱导剂、抗凝血剂、皮肤病药物、生长刺激剂、血管扩张剂、血管收缩剂、镇痛剂、抗过敏剂或其组合。
15. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述流体药剂包含抗癌剂。
16. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述组织是或疑似是癌性的、发炎的、感染的、萎缩的、麻木的、癫痫的或凝结的。
17. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述组织是或疑似是癌性的。
18. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述组织是肿瘤。

19. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述肿瘤选自良性肿瘤和恶性肿瘤。
20. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述水凝胶包含具有两种不同分子量范围的至少一种聚合物的二元混合物。
21. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述水凝胶在干燥状态下具有至少20gf/cm²的抗张强度。
22. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述水凝胶在干燥状态下具有20-120gf/cm²的抗张强度。
23. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述水凝胶在水合状态下具有至少5gf/cm²的抗张强度。
24. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述水凝胶在水合状态下具有5-15gf/cm²的抗张强度。
25. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述水凝胶包含胶原蛋白。
26. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述水凝胶包含聚乙二醇(PEG)。
27. 如实施方案26所述的给药装置,其中所述PEG的分子量至少为500。
28. 如实施方案27所述的给药装置,其中所述PEG的分子量为4,000-8,000。
29. 如实施方案27所述的给药装置,其中所述PEG的分子量为8,000-45,000。
30. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述水凝胶包含乳酸-乙醇酸共聚物。
31. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述水凝胶包含聚己内酯。
32. 如实施方案20所述的给药装置,其中所述至少一种聚合物包含PEG。
33. 如实施方案20所述的给药装置,其中所述两种不同的分子量范围包括500-2,000和4,000-8,000。
34. 如实施方案20所述的给药装置,其中所述两种不同的分子量范围包括2,000-4,000和8,000-20,000。
35. 如实施方案20所述的给药装置,其中所述两种不同的分子量范围包括2,000-8,000和10,000-45,000。
36. 如实施方案20所述的给药装置,其中所述两种不同的分子量范围包括4,000-8,000和10,000-45,000。
37. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述流体药剂和所述水凝胶在所述组织内沿着平行轴递送。
38. 如实施方案1所述的给药装置,其中所述流体药剂的扩散速率通过所述水凝胶的孔径来控制。
39. 如实施方案38所述的给药装置,其中所述孔径的范围为约50nm至500μm。
40. 如实施方案1所述的给药装置,进一步包含一个或多个储器,每个储器与所述针中的各自一个流体连通。
41. 如实施方案1所述的给药装置,进一步包含两个或更多个储器,每个储器与所述针中的各自一个流体连通。
42. 如实施方案1所述的给药装置,进一步包含五个或更多个储器,每个储器与所述针中的各自一个流体连通。
43. 如实施方案41或42所述的给药装置,其中所述储器都不包含与任何其它储器中的

药剂相同的流体药剂。

44. 如实施方案41或42所述的给药装置,其中所述储器中的至少两个包含相同的流体药剂。

45. 如实施方案44所述的给药装置,其中在不同储器中的所述相同流体药剂的浓度是不同的。

46. 如实施方案40-42所述的给药装置,其中所述储器中的至少一个包含至少两种流体药剂。

47. 一种将候选药剂递送至动物组织中的方法,该方法包括:

(a) 经由包含针的给药装置将至少一种包含水凝胶的药物组合物沉积到所述组织中;以及

(b) 将所述药物组合物分配到所述组织中,其中所述药物组合物包含一种或多种候选药剂,并且其中所述药物组合物在组织中分散的程度低于缺乏水凝胶的相同药物组合物。

48. 一种将候选药剂递送至动物组织中的方法,该方法包括:

(a) 用一个或多个包含一种或多种候选药剂的药物植入物装填包含针的给药装置;以及

(b) 使用所述给药装置将所述一个或多个药物植入物插入所述组织中。

49. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述给药装置包含2个或更多个针。

50. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述给药装置包含5个或更多个针。

51. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述给药装置包含致动器。

52. 如实施方案51所述的方法,其中所述致动器包括柱塞。

53. 如实施方案51所述的方法,其中所述致动器包括泵。

54. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述给药装置包含2个或更多个储器,每个储器与所述针中的各自一个连通。

55. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述给药装置包含5个或更多个储器,每个储器与所述针中的各自一个连通。

56. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述给药装置包含10个或更多个储器,每个储器与所述针中的各自一个连通。

57. 如实施方案54-56所述的方法,其中所述储器都不包含与任何其它储器中的药剂相同的候选药剂。

58. 如实施方案54-56所述的方法,其中所述储器中的至少两个包含相同的候选药剂。

59. 如实施方案58所述的方法,其中在不同储器中的所述相同流体药剂的浓度是不同的。

60. 如实施方案54-56所述的方法,其中所述储器中的至少一个包含两种或更多种候选药剂。

61. 如实施方案47或48所述的方法,包含2种或更多种候选药剂。

62. 如实施方案47或48所述的方法,包含5种或更多种候选药剂。

63. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述候选药剂在与所述递送轴共轴的、大致为柱形的区域内分配。

64. 如实施方案61或62所述的方法,其中所述候选药剂在组织内沿平行轴分配。

65. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述候选药剂以系统可检测浓度或以低于系统可检测浓度的浓度递送。

66. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述候选药剂包含至少一种指示剂颗粒。

67. 如实施方案66所述的方法,其中所述指示剂颗粒选自金属颗粒、荧光染料、量子点、量子条形码、放射摄影造影剂、磁共振成像造影剂、阳性对照和阴性对照。

68. 如实施方案67所述的方法,其中所述指示剂颗粒是荧光染料。

69. 如实施方案68所述的方法,进一步包括对所述组织内的所述荧光染料进行成像,从而监测所述候选药剂的分布的步骤。

70. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述动物是人。

71. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述动物是小鼠、大鼠或狗。

72. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述一种或多种候选药剂包含抗癌剂、抗炎剂、抗感染剂、再生剂、松弛剂、细胞凋亡抑制剂、细胞凋亡诱导剂、抗凝血剂、皮肤病药物、生长刺激剂、血管扩张剂、血管收缩剂、基因调节剂、镇痛剂、抗过敏剂、RNAi分子或其组合。

73. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述一种或多种候选药剂包含抗癌剂。

74. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述组织是或疑似是癌性的。

75. 如实施方案47或48所述的方法,其中所述组织是肿瘤。

76. 如实施方案75所述的方法,其中所述肿瘤选自良性肿瘤和恶性肿瘤。

77. 如实施方案47所述的方法,其中所述水凝胶包含胶原蛋白。

78. 如实施方案47所述的方法,其中所述水凝胶包含聚乙二醇(PEG)。

79. 如实施方案47所述的方法,其中所述水凝胶包含乳酸-乙醇酸共聚物。

80. 如实施方案47所述的方法,其中所述水凝胶包含聚己内酯。

81. 如实施方案47所述的方法,其中所述药物组合物进一步包含染料。

82. 如实施方案81所述的方法,其中所述染料允许检测生物学功能的激活和失活。

83. 如实施方案82所述的方法,其中所述生物学功能是途径、酶的活性、基因的表达、药物敏感性、抗药性、基因的转录、与基因相关的RNA分子的翻译或肽合成。

84. 如实施方案82所述的方法,其中所述生物学功能与癌症、退行性疾病、炎症、代谢、细胞凋亡或免疫应答相关。

85. 如实施方案82所述的方法,其中所述生物学功能与癌症相关。

86. 如实施方案82所述的方法,其中所述生物学功能是细胞凋亡途径,而所述染料报道细胞凋亡。

87. 如实施方案82所述的方法,其中通过测定荧光进行所述检测。

88. 如实施方案82所述的方法,进一步包括对所述染料进行成像,从而检测所述生物学功能的激活或失活的步骤。

89. 如实施方案88所述的方法,进一步包括根据所述成像的结果来预测所述治疗剂的潜在治疗价值的步骤。

90. 如实施方案88所述的方法,进一步包括量化所述生物学功能的激活或失活的步骤。

91. 如实施方案48所述的方法,其中所述一个或多个药物植入物中的每一个都包含允许药物在所述组织内持续或延时释放的生物可降解的惰性粘合剂。

92. 如实施方案48所述的方法,其中所述药物植入物包含至少一种固体形式的候选药

剂。

93. 如实施方案48所述的方法,其中所述候选药剂在一分钟至六周的一段时间内释放。

94. 如实施方案48所述的方法,其中所述一个或多个药物植入物中的每一个具有小于约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1mm的直径。

95. 如实施方案48所述的方法,其中所述每个针配置为用于接受一个或多个所述药物植入物。

96. 如实施方案48所述的方法,其中所述每个针配置为用于接受两个或更多个所述药物植入物。

97. 如实施方案48所述的方法,其中所述每个针配置为用于接受五个或更多个所述药物植入物。

98. 如实施方案48所述的方法,包含两个或更多个药物植入物。

99. 如实施方案48所述的方法,包含五个或更多个药物植入物。

100. 如实施方案47或48所述的方法,进一步包括评价所述一种或多种候选药剂对所述组织的效果。

101. 如实施方案100所述的方法,其中所述评价包括在引入所述一种或多种候选药剂后切除所述组织的至少一部分。

102. 如实施方案100所述的方法,其中所述评价包括在引入所述一种或多种候选药剂后对至少一部分预切除的所述组织进行分析。

103. 如实施方案101或102所述的方法,其中在引入所述一种或多种候选药剂后的一天到六周内进行所述切除或预切除。

104. 如实施方案100所述的方法,其中所述评价包括对所述组织进行成像。

105. 如实施方案104所述的方法,其中所述成像包括放射摄影成像、磁共振成像、正电子发射断层显像和生物光子成像。

106. 如实施方案104所述的方法,其中所述成像发生在引入所述一种或多种候选药剂之前、期间或之后。

107. 如实施方案100所述的方法,其中所述评价包括检测改变的生理状态。

108. 如实施方案100所述的方法,进一步包括以下步骤之一:(i) 基于所述评价选择至少一种所述药剂;(ii) 基于所述评价取消对至少一种所述药剂的选择;以及(iii) 基于所述评价将至少两种所述药剂按优先级排序。

109. 一种使用报道组织评价多种候选药剂的方法,包括以下步骤:

a. 产生在途径调节时能产生可检测信号的报道细胞;

b. 由所述报道细胞构建报道组织;以及

c. 通过用针阵列装置将所述候选药剂递送至所述报道组织内的区域,并检测所述报道细胞内的所述可检测信号,来评估所述候选药剂对所述报道组织内的所述报道细胞的效果。

110. 如实施方案109所述的方法,其中所述针阵列装置包含约2个至约100个针。

111. 如实施方案109所述的方法,其中所述针阵列装置包含5个至约100个针。

112. 如实施方案109所述的方法,其中所述报道细胞是癌细胞。

113. 如实施方案109所述的方法,其中所述报道组织包含异种移植的肿瘤。

114. 如实施方案109所述的方法,其中所述调节包括激活。
115. 如实施方案109所述的方法,其中所述调节包括抑制。
116. 如实施方案109所述的方法,其中所述候选药剂包含选自基因治疗剂、化疗剂、小分子、抗体、蛋白质、小干扰RNA、反义RNA、核酶、可检测标记物、治疗性蛋白质、治疗性细胞、细胞因子、抗体-药物偶联物、抗体、多肽、拟肽和微小RNA的药剂。
117. 如实施方案109所述的方法,其中所述候选药剂包含抗癌剂。
118. 如实施方案109所述的方法,其中每种所述候选药剂都处于水凝胶内。
119. 如实施方案109所述的方法,其中所述报道细胞包含展现出萤光素酶活性的基因捕获陷阱。
120. 如实施方案109所述的方法,其中所述报道细胞包含与内源性启动子相关联的报道基因。
121. 如实施方案109所述的方法,其中所述报道基因包含基于萤光素酶的报道基因和基于GFP的报道基因,所述途径包含AKT途径,并且所述内源性启动子包含磷酸酶和张力蛋白同源物基因。
122. 如实施方案109所述的方法,其中所述可检测信号包含荧光。
123. 如实施方案122所述的方法,其中所述荧光由选自GFP、BFP、CFP、YFP、EGFP、EYFP、Venus、Citrine、phiYFP、copGFP、CGFP、ECFP、Cerulean、CyPet、T-Sapphire、Emerald、YPet、AcGFP1、AmCyan、AsRed2、dsRed、dsRed2、dsRed-Express、EBFP、HcRed、ZsGreen、ZsYellow、J-Red、TurboGFP、Kusabira Orange、Midoriishi Cyan、mOrange、DsRed-单体、mStrawberry、mRFP1、tdTomato、mCherry、mPlum和mRaspberry的荧光蛋白产生。
124. 如实施方案123所述的方法,其中所述荧光蛋白是GFP。
125. 如实施方案109所述的方法,其中所述可检测信号包含来自酶反应的可检测产物。
126. 如实施方案125所述的方法,其中所述酶选自:过氧化物酶、碱性磷酸酶、半乳糖苷酶、萤光素酶和内酰胺酶。
127. 如实施方案125所述的方法,其中所述酶是萤光素酶。
128. 如实施方案109所述的方法,其中所述评估包括在递送之后对所述报道组织进行成像以观测所述可检测信号。
129. 如实施方案128所述的方法,进一步包括在所述成像之前切除所述报道组织的步骤。
130. 如实施方案129所述的方法,进一步包括在成像之前将所述切除的报道组织进行切片的步骤。
131. 如实施方案109所述的方法,进一步包括由步骤(a)的报道细胞系产生在所述信号传导途径调节时能产生第二可检测信号的报道细胞系的步骤。
132. 如实施方案131所述的方法,其中第一可检测信号指示所述信号传导途径的激活,而所述第二可检测信号指示所述信号传导途径的抑制。
133. 如实施方案131所述的方法,其中第一可检测信号指示所述信号传导途径的抑制,而所述第二可检测信号指示所述信号传导途径的激活。
134. 如实施方案132或133所述的方法,进一步包括分离先前响应于所述候选药剂而产生所述第二可检测信号但现在响应于所述候选药剂而产生所述第一可检测信号的细胞的

步骤。

135. 如实施方案109所述的方法,进一步包括分离先前响应于所述候选药剂而产生所述可检测信号但现在不再产生所述可检测信号的细胞的步骤。

136. 如实施方案134或135所述的方法,进一步包括以下步骤:对所分离的细胞的至少一种核酸进行测序,以确定对所述候选药剂的响应的变化的遗传基础。

137. 如实施方案136所述的方法,其中所述测序包括高通量测序。

138. 如实施方案136所述的方法,其中所述核酸包括基因组DNA。

139. 如实施方案136所述的方法,其中所述核酸包括信使RNA。

140. 一种用于确定对癌症治疗的抗性的方法,包括以下步骤:

- a. 对在途径调节时能产生可检测信号的报道组织施用多种癌症治疗;
- b. 分离所述报道组织内响应于所述多种癌症治疗中的一种或多种而显示出所述可检测信号的细胞群;以及
- c. 对来自所述细胞群的至少一种核酸进行测序,从而确定对所选定的癌症治疗的抗性。

141. 一种用于确定对癌症治疗的抗性的方法,包括以下步骤:

- a. 对在途径调节时能产生可检测信号的报道组织施用多种癌症治疗;
- b. 分离所述报道组织内响应于所述多种癌症治疗中的一种或多种而显示出所述可检测信号的细胞群;以及
- c. 评估基因的拷贝数,从而确定对所选定的癌症治疗的抗性。

142. 如实施方案140或141所述的方法,其中所述施用多种癌症治疗包括用针阵列进行注射。

143. 如实施方案140或141所述的方法,其中所述调节包括激活。

144. 如实施方案140或141所述的方法,其中所述调节包括抑制。

145. 如实施方案140或141所述的方法,其中所述分离包括细胞分选。

146. 如实施方案140所述的方法,其中所述测序包括高通量测序。

147. 如实施方案140所述的方法,其中所述核酸包括基因组DNA。

148. 如实施方案140所述的方法,其中所述核酸包括信使RNA。

149. 一种局部递送用于治疗受试者肌肉疾病或病症的疗法的方法,包括使用含有多个针的针阵列装置向所述受试者的组织同时体内施用治疗剂。

150. 一种将选定基因体内递送至受试者肌肉组织的方法,所述方法包括:(a) 提供包含病毒载体的病毒,所述病毒载体包含与能够指导所述选定基因的体内转录和翻译的控制元件有效连接的所述选定基因;以及(b) 使用含有多个针的针阵列装置将所述病毒在体内引入所述肌肉组织。

151. 如实施方案149所述的方法,其中所述疗法包括基因替代疗法、微小RNA疗法、RNAi疗法、抗体疗法和适体疗法。

152. 如实施方案149所述的方法,其中所述疗法是基因替代疗法。

153. 如实施方案149所述的方法,其中所述肌肉疾病或病症选自:杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良、肢带型肌营养不良、面肩肱型肌营养不良、先天性肌营养不良、眼咽型肌营养不良、远端型肌营养不良、埃-德型肌营养不良、肌萎缩、X-染色体连锁型脊髓延

髓肌肉萎缩症 (SBMA)、恶病质、营养不良、结核病、麻风病、糖尿病、肾脏疾病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、癌症、终末期肾衰竭、烧伤、糖尿病、充血性心力衰竭、少肌症、肺气肿、骨软化症或心肌病。

154. 如实施方案149所述的方法,其中所述肌肉疾病或病症是肌肉萎缩性疾病。

155. 如实施方案149所述的方法,其中所述肌肉疾病或病症是杜氏肌营养不良。

156. 如实施方案149所述的方法,其中所述肌肉疾病或病症是少肌症。

157. 如实施方案149或150所述的方法,其中所述针配置为用于通过肌肉内注射进行递送。

158. 如实施方案152或150所述的方法,其中将所述基因或基因替代治疗剂递送到超过1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的单肢大肌纤维中。

159. 如实施方案149所述的方法,其中所述组织是脑、肝、肺、肾、前列腺、卵巢、脾脏、淋巴、甲状腺、胰腺、心脏、肌肉、肠、喉、食道或胃组织。

160. 如实施方案149所述的方法,其中所述组织是肌肉组织。

161. 如实施方案150或160所述的方法,其中所述肌肉组织是骨骼肌、平滑肌或心肌。

162. 如实施方案149或150所述的方法,其中所述受试者是非人灵长类动物、小鼠、狗、大鼠、兔、猪、绵羊、马、牛、山羊、沙鼠、仓鼠、豚鼠或人。

163. 如实施方案149或150所述的方法,其中所述受试者是狗。

164. 如实施方案149或150所述的方法,其中所述受试者是人。

165. 如实施方案150或152所述的方法,其中所述基因包含肌养蛋白。

166. 如实施方案150或152所述的方法,其中所述基因包含编码蛋白质的肌养蛋白小基因或该肌养蛋白小基因的互补序列,其中所述蛋白质包含:

(a) 肌养蛋白蛋白质的N-端结构域或肌养蛋白蛋白质的修饰的N-端结构域;

(b) 所述肌养蛋白蛋白质的五个杆状重复序列;

(c) 肌养蛋白基因的H1结构域和肌养蛋白蛋白质的H4结构域;以及

(d) 所述肌养蛋白蛋白质的富含半胱氨酸的结构域,其中所述核苷酸序列具有少于5,000个核苷酸。

167. 如实施方案150或152所述的方法,其中所述基因编码肌生成抑制蛋白抑制剂。

168. 如实施方案167所述的方法,其中所述肌生成抑制蛋白抑制剂是肌生成抑制蛋白前肽、滤泡素抑制素、其它滤泡素抑制素样蛋白质、FLRG或GASP-1。

169. 如实施方案150或152所述的方法,其中所述基因与一个或多个控制元件有效连接。

170. 如实施方案169所述的方法,其中所述一个或多个控制元件中的每一个选自: AAV 反向末端重复序列、逆转录病毒长末端重复序列、巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、CMV 增强子、 β -肌动蛋白启动子、 α -肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、肌特异性肌酸激酶 (MCK) 启动子和MCK增强子。

171. 如实施方案170所述的方法,其中至少一个控制元件是MCK启动子。

172. 如实施方案152所述的方法,其中所述基因替代治疗剂包含腺病毒、单纯疱疹病毒 (HSV)、杆状病毒、腺相关病毒 (AAV)、重组腺相关病毒 (rAAV)、逆转录病毒或慢病毒。

173. 如实施方案172所述的方法,其中所述基因替代治疗剂包含AAV。

174. 如实施方案150所述的方法,其中所述病毒载体包含逆转录病毒。
175. 如实施方案150所述的方法,其中所述病毒载体包含慢病毒。
176. 如实施方案150所述的方法,其中所述病毒载体包含重组腺相关病毒。
177. 如实施方案150或173所述的方法,其中所述AAV选自:AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10和AAV-11。
178. 如实施方案177所述的方法,其中所述AAV为AAV-6。
179. 如实施方案152所述的方法,其中所述基因替代治疗剂包含干细胞。
180. 如实施方案179所述的方法,其中所述干细胞是胚胎干细胞、成体干细胞或诱导多能干细胞。

实施例

实施例1:染料在多种肿瘤深度的空间受限递送

[0360] 使用本方法的多孔管将多柔比星递送至淋巴瘤。然后将肿瘤切除并切片。图8示出了用荧光和亮视野显微镜术成像的肿瘤切片。这些图像表明,多柔比星荧光与亮视野图像中可辨别的死细胞区域重叠。多柔比星荧光与死细胞的区域局限于肿瘤切片内的一个范围,反映了空间受限的多柔比星递送。图9示出了来自不同深度的三个肿瘤横截面切片,并且证明了图8所示的局限递送延伸至各肿瘤深度。在横跨所示的三个肿瘤深度的局部区域观察到细胞死亡。

[0361] 用针阵列注射四种不同体积的荧光染料来检测空间受限递送。在肿瘤内沿着四个平行轴注射染料。图10示出了这些注射的荧光显微镜成像以及所导致的荧光染料的空间受限分布(上图)。注射剂为A) 10 μ L; B) 7.5 μ L; C) 5 μ L; 和D) 2.5 μ L。下面的图描述了每次注射的相对分布面积,这是来自不同肿瘤深度的15个切片的平均值。

[0362] 图14描述了采用根据本方法的不同指示染料来监测化合物的空间受限递送以及所导致的对肿瘤区域的局部效应。向小鼠肿瘤注射1. 多柔比星和2. 对照。图A示出了染料在640nm的激发和在800nm的发光。图B示出了多柔比星在500nm激发和在600nm发光后观察到的多柔比星信号(3.)。图C示出了染料在640nm激发和720nm发光后观察到的细胞凋亡信号(4.)。结果表明细胞凋亡与接受多柔比星的区域重叠,但不与对照区域重叠,这证明了空间受限的药物递送和肿瘤细胞杀伤。

实施例2:体内和体外分析的对比

[0363] 在体内和体外检测音猬因子(Shh)拮抗剂,并将结果进行比较。图11示出了在人髓母细胞瘤样品中对音猬因子途径拮抗作用的体外响应。髓母细胞瘤细胞取自3名患者并在体外进行培养。对取自3名患者的样品MB1-MB3检测Shh拮抗剂效果,与本研究的阳性对照相比其显示无响应。柱A) 显示了1 μ M SHH拮抗剂注射;柱B) 为5 μ M SHH拮抗剂注射;而柱C) 为阳性对照注射。

[0364] 与图11中所示的体外实验的结果不同,图12示出了Shh拮抗剂体内注射到肿瘤的响应。采用本发明的方法将Shh拮抗剂以空间受限的方式注射到肿瘤中,并通过荧光显微镜术进行可视化。图12示出了A) 胱天蛋白酶3和B) Gli1的局部阳性信号的亮视野显微镜成像,说明了在两种情况下的空间受限的肿瘤杀伤。

[0365] 图12中所示的体内实验的结果预测Shh拮抗剂将对癌症小鼠模型具有积极效果。

在本实验中使用的颅内髓母细胞瘤模型(条件Patched1无效)小鼠发展为具有早期发病和100%外显率的髓母细胞瘤。于是,每天对小鼠注射20mg/kg的A)载体+IPI-926(n=12)或B)仅载体(n=11)。监测小鼠的存活情况50天,结果示于图13中。实验表明,给予IPI-926药物的小鼠与对照小鼠相比具有显著增加的存活率。本实验的结果证明了Shh拮抗作用确实影响体内癌症进展,这是由图12的体内实验预测,而不是由图11的体外实验预测的。

实施例3:核酸的空间受限递送

[0366] 采用本方法检测核酸分子的空间受限递送。向HT29结肠肿瘤异种移植体注射携带能驱动GFP表达的启动子的慢病毒。图15示出了空间受限注射表达GFP的慢病毒后整个肿瘤切片的荧光显微镜成像。图A显示GFP表达局限于注射区域。图B示出了病毒输注区域的放大图。

[0367] 然后将该方法用于空间受限的RNA干扰(RNAi)。将慢病毒内的小发夹RNAi(shRNA)构建体局部递送至小鼠肿瘤。shRNA针对于KIF11——肿瘤细胞有丝分裂的一个必需基因。还使用了无敲减(knockdown)能力的对照构建体。单独注射GFP病毒作为一个附加对照。将这三种构建体注射在肿瘤内的三个不同位置,并观察局部效应。在所有三种情况下,细胞凋亡报道子近红外标记的膜联蛋白5(Visen)与这些构建体一起注射。注射后,将肿瘤切除、切片并通过荧光显微镜术进行可视化以观察细胞凋亡报道子。

[0368] 图16显示了该分析的结果,显示了1.KIF11shRNA与细胞凋亡报道子;2.对照病毒与细胞凋亡报道子;及3.GFP病毒与细胞凋亡报道子。在四种肿瘤深度进行扫描:500微米;1,000微米;1,500微米;和2,000微米。只有接受KIF11shRNA的区域显示细胞凋亡阳性结果,这表明肿瘤细胞杀伤与KIF11的敲减相关,并且空间局限于接受KIF11shRNA构建体的区域。

[0369] 还在图17中示出了空间受限的肿瘤细胞杀伤。对小鼠肿瘤注射1.KIF11shRNA;2.对照;3.KIF11shRNA和细胞凋亡染料(近红外标记的膜联蛋白5);4.对照;及5.对照和细胞凋亡染料。将肿瘤切除、切片,并通过荧光显微镜术进行可视化。结果表明KIF11shRNA的空间受限递送导致用细胞凋亡染料可观察到的信号,而对照却不然。当施用KIF11或对照构建体而不施用细胞凋亡染料时,未观察到背景信号。

实施例4:评估肿瘤模型/多孔针阵列的兼容性

[0370] 所有潜在细胞系在无胸腺裸鼠中都可生长为异种移植肿瘤,并且评估它与通过针阵列装置进行的注射的兼容性。可采用已知具有EGF受体激活突变(如HCC827肺癌)、RAS激活突变(如A549肺癌、HCT-116结肠癌)或PI3K激活突变(HCT-116结肠癌、MCF7乳腺癌、T47D乳腺癌),或具有肿瘤抑制基因PTEN失活突变(MDA-MB-468乳腺癌、EVSA-T乳腺癌)的乳腺、肺和结肠肿瘤系。可使用的细胞系包括A2058黑素瘤(braf、pten)、LnCAP前列腺癌(kras、pten)、H2122肺癌(kras、stk11)和MCF7乳腺癌(pik3ca、cdkn2a)。为了最接近于肿瘤细胞所源自的组织环境,在可能的情况下可对肿瘤模型进行同位移植。

[0371] 肿瘤的特征如增长速率、尺寸、形状、对称性、实体性(solidity)以及可接近性都影响可通过针阵列头将药剂递送至肿瘤亚部分的容易程度。迄今为止,已发现大部分异种移植肿瘤(>80%)与注射是兼容的。然而,一些肿瘤具有妨碍阵列注射的特征(例如大的瘤内囊肿)。为了避免产生在我们的平台上最终不可用的报道系所耗费的时间和资源的潜在浪费,可使每种肿瘤类型生长为异种移植肿瘤,直至其达到能与通过多孔针阵列装置进行的注射相兼容的尺寸($\sim 1.0-1.5\text{mm}^3$)。然后可在五个几何限定的部位对肿瘤注射近红外示

踪染料。24小时后,将肿瘤切除,用福尔马林固定,并用振动切片机进行切片。之后可在IVIS成像系统(Caliper LifeSciences, Inc.)上对200微米厚的切片进行分析,以评估注入的示踪染料的生物分布。如果肿瘤获取率(take rate)超过50%,并且在所有五个注射部位都能清楚地观察到染料的空间受限分布(<400个垂直于注射柱的细胞层),则认为该肿瘤系与我们的平台相兼容并可用于产生癌症途径特异性报道模型。

实施例5:报道细胞系的产生

[0372] 可用优化的基因捕获载体来转导肿瘤细胞系,并且对其实施定制的选择方案以产生健康的(robust)癌症途径特异性报道细胞。所用的载体含有一个无启动子捕获盒,该捕获盒由位于编码Gaussia萤光素酶(报道子)和Neo(选择标记)的基因侧翼的剪接受体和剪接供体序列组成。当整合到基因内时,Gaussia萤光素酶报道子的表达由内源性启动子、增强子和绝缘子调节。因此,报道子的活性精确地指示了内源性基因的表达。Gaussia萤光素酶理想地适合于体内肿瘤平台。其非常明亮(高于萤火虫萤光素酶100-1000倍)并且是不依赖于ATP的。已经工程构建了人源化的、膜锚定的且细胞外显示的Gaussia萤光素酶(Xactagen, LLC)。该工程化萤光素酶保留了高闪活性并且对于辉光应用也是稳定的。就体内成像而言,膜锚定的Gaussia萤光素酶已被证明胜过天然分泌型Gaussia萤光素酶,从而允许在引入萤光素酶底物腔肠素(coelenterazine)后对活动物体内的途径抑制事件进行实时可视化。这种形式的萤光素酶的细胞表面表达还有助于体外选择策略。在由于途径抑制而高度上调的基因内发生的捕获事件可导致萤光素酶阳性细胞产生,可通过诸如流动辅助流式分选(FACS)等方法分离该细胞。

[0373] 基于选择的报道细胞系产生策略在图20中示出。可将基因捕获载体作为包装的慢病毒颗粒引入大的AKT活性细胞群中。细胞可经过基于萤光素酶的选择。第一轮排除了组成型表达萤光素酶的捕获陷阱(trap)。接着,将细胞暴露于AKT抑制剂并进行第二轮选择。此轮可选择响应于抑制剂而表达萤光素酶的细胞,并排除在功能性基因中不具有捕获陷阱的细胞。最后一轮选择用结构上无关的AKT抑制剂选择途径特异性捕获陷阱,并且排除对与AKT途径无关的分子特异性活性发生响应的捕获陷阱。

[0374] 亚致死浓度的吉非替尼(易瑞沙)、MK-2206和PD325901可分别用于选择EGF、PI3K-AKT和Ras途径抑制剂响应性报道子。可从药物后选择中去除细胞,以使对目标捕获陷阱的潜在生长抑制作用最小化。该选择策略还考虑了诱导型基因捕获陷阱对选择过程中使用的药剂的脱靶活性产生响应,这与目标致癌途径的抑制无关。利用第二种结构上无关的途径抑制剂对原始合并的阳性诱导型报道细胞群进行反向筛选可去除这些脱靶基因捕获陷阱。可以克隆并扩充保持响应于第二抑制剂发生萤光素酶诱导型表达的细胞,用于进一步分析。

实施例6:报道组织的筛选及体内和离体分析的对比

[0375] 可使用根据响应于途径抑制的强信号强度而选择的报道细胞系在Nu/Nu(裸)无胸腺小鼠内建立同位异种移植体。可使肿瘤生长,直至它们的直径大约为1.5-2cm。可将阳性对照途径抑制剂(如AKT、MEK或EGFR抑制剂)装填至多孔针阵列装置的五个针之一中。作为附加的阳性对照,还可使用经验证能有效沉默化AKT、MEK和EGFR的RNAi药剂(主要为慢病毒shRNA载体)。可装填途径惰性试剂作为阴性对照。可将测试化合物装填至其余的针内。使用多孔针阵列进行的染料的空间受限注射在图21中示出。如图22所示,已使用多孔针阵列装

置将化合物和慢病毒载体成功地递送至肿瘤的空间受限部分。

[0376] 装填该系统,直至样品从多孔针中挤出。可将针头插入已麻醉的小鼠的肿瘤中,并可在5分钟的过程中注射7微升的药物+近红外示踪染料以防止沿着针迹发生回流。肿瘤注射后1小时,可对小鼠注射腔肠素(7.7mg/kg),立即并在接下来的6个小时内每小时使用IVIS检查肿瘤由诱导的萤光素酶表达所导致的光发射。可采用Living Image软件将光发射量化为光子/分钟。在6小时期限的最后,可切除肿瘤并用IVIS进行再分析以评估体内与离体读数之间的信号强度差异(如果有的话)。该实验可在多个异种移植的小鼠中进行。

[0377] 虽然本文已经显示并描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员显而易见的是,这类实施方案仅通过举例的方式提供。本领域技术人员现在将会想到不偏离本发明的众多更改、改变和替换。应当理解,本文所述的本发明实施方案的各种备选方案可用于实施本发明。意在用以下权利要求限定本发明的范围,并且在此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等效物。

实施例7:多孔针介导的GSK3抑制剂注射在肿瘤中诱导 β -联蛋白驱动的萤光素酶活性

[0378] 在该实施例中,我们使用已良好表征的 β -联蛋白报道子,其响应于WNT途径激活而表达萤光素酶(图24)。具有这种报道子的肿瘤细胞在裸鼠胁部生长为异种移植肿瘤。在不存在WNT刺激或暴露于能抑制 β -联蛋白负调节物(如GSK3b)的药物的情况下,这些肿瘤中 β -联蛋白的活性状态将非常低。因此,我们利用该模型来测试我们是否能够在注射两种不同的GSK3抑制剂的肿瘤中检测到 β -联蛋白报道子的局灶性激活。使用7针-多孔针阵列平行注射两种GSK3抑制剂,并与五种途径惰性测试药剂的注射进行比较。注射之后,将动物放回笼内24h,之后腹膜内注射萤光素。在Xenogen IVIS上对活动物进行的成像显示出与GSK3抑制剂的精确位置相对应的两个明显的萤光素酶活性区域(图24)。在其它五个注射部位未观察到高于背景的信号。暴露于萤光素的肿瘤厚切片也证明了由GSK3抑制诱导的萤光素酶活性的空间受限区域。获得明显的(discreet)萤光素酶信号非重叠区域的能力与将我们的体内多重比较分析放大至数百个样品以供在癌症动物模型中进行综合筛选命中跟踪的潜能是一致的。我们坚信利用基因捕获陷阱衍生的途径报道子将会得到可与之相比的结果。

[0379] 虽然本文已经显示并描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员显而易见的是,这类实施方案仅通过举例的方式提供。本领域技术人员现在将会想到不偏离本发明的众多更改、改变和替换。应当理解,本文所述的本发明实施方案的各种备选方案可用于实施本发明。意在用以下权利要求限定本发明的范围,并且在此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等价物。

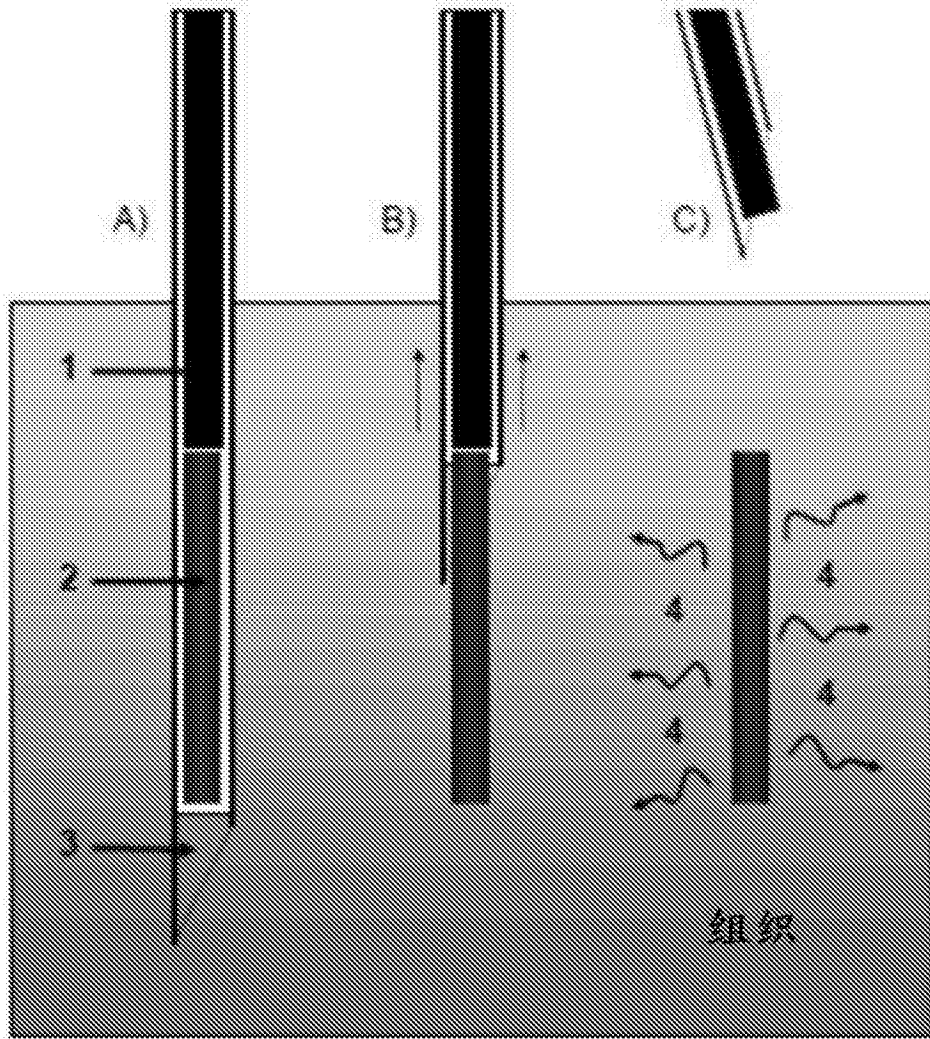


图1

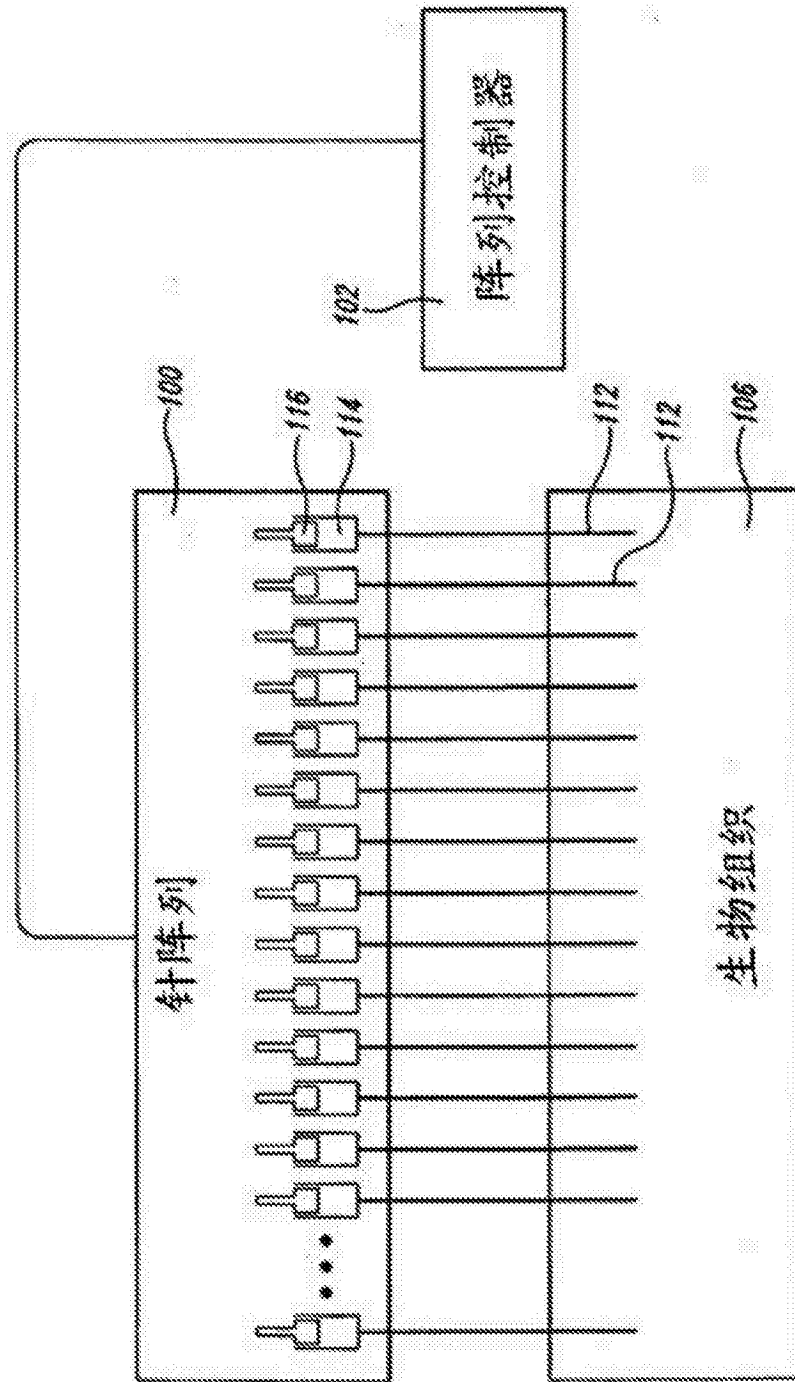


图2

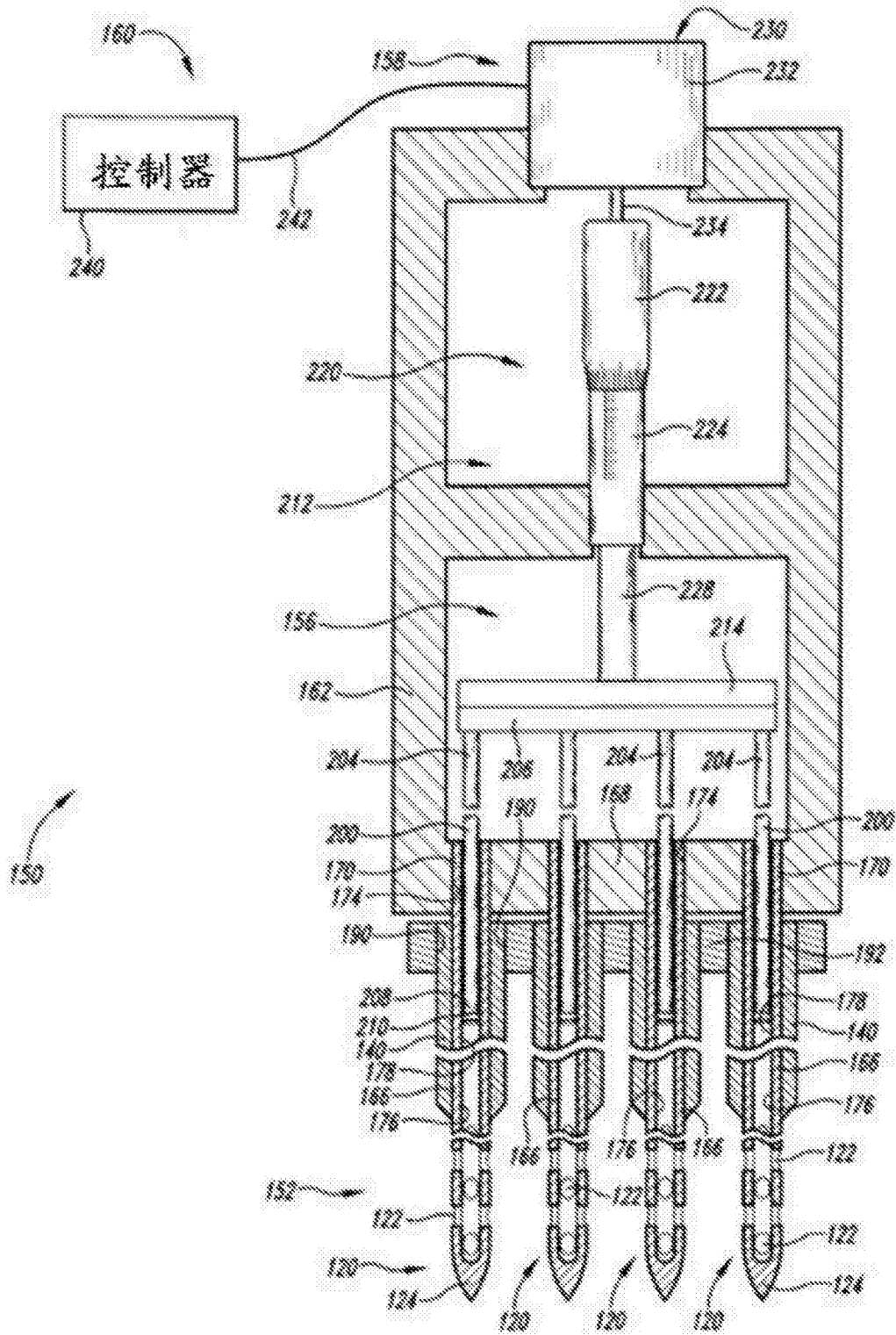


图3

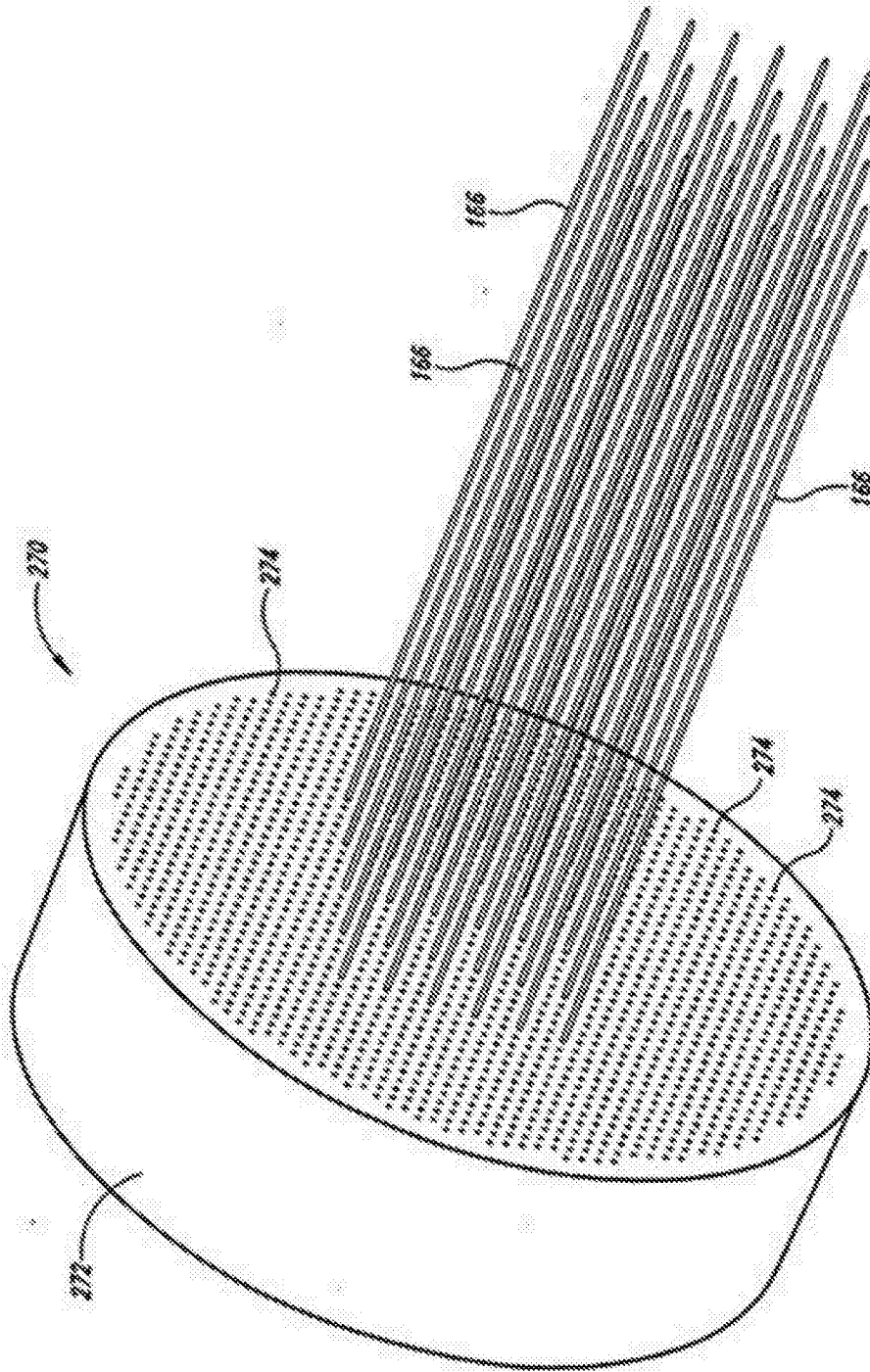


图4

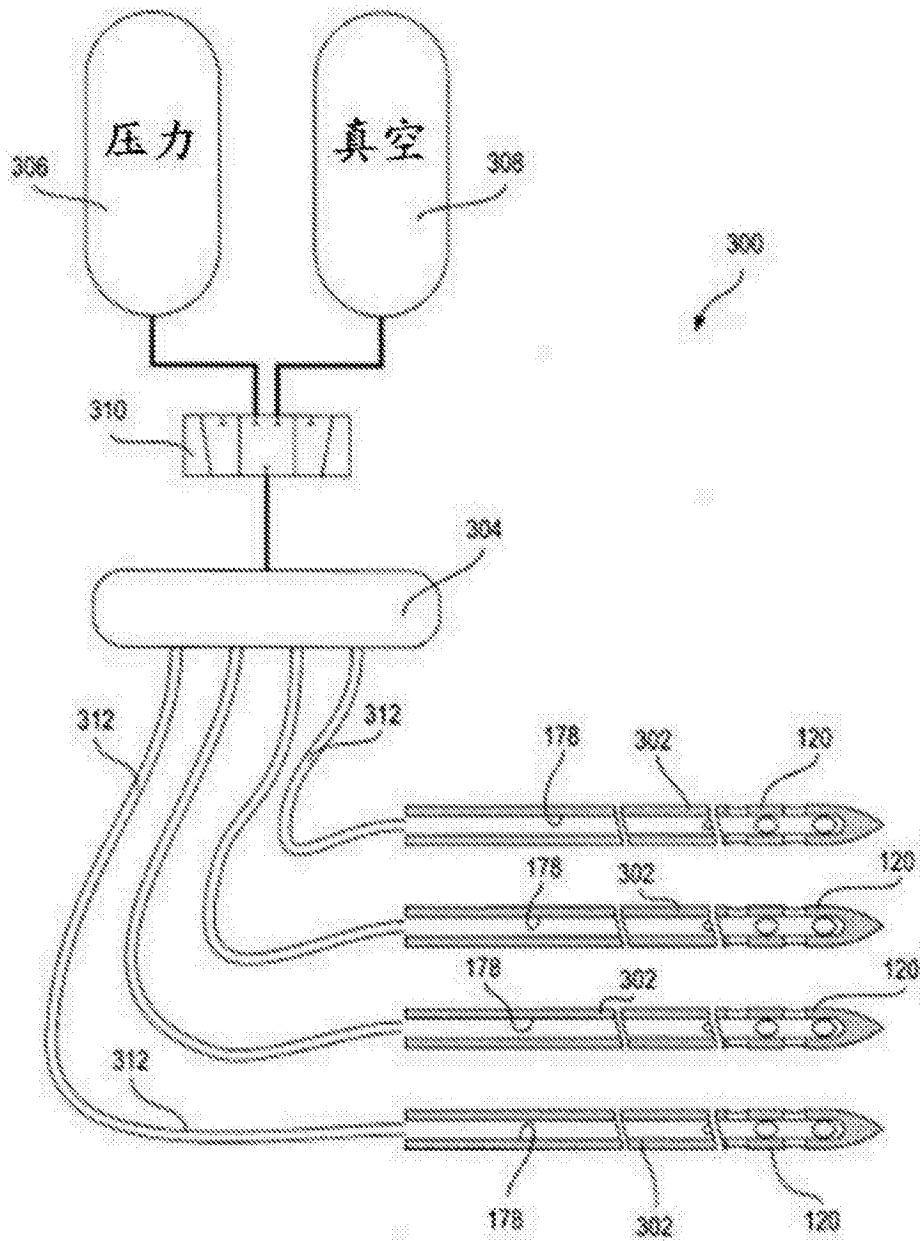


图5

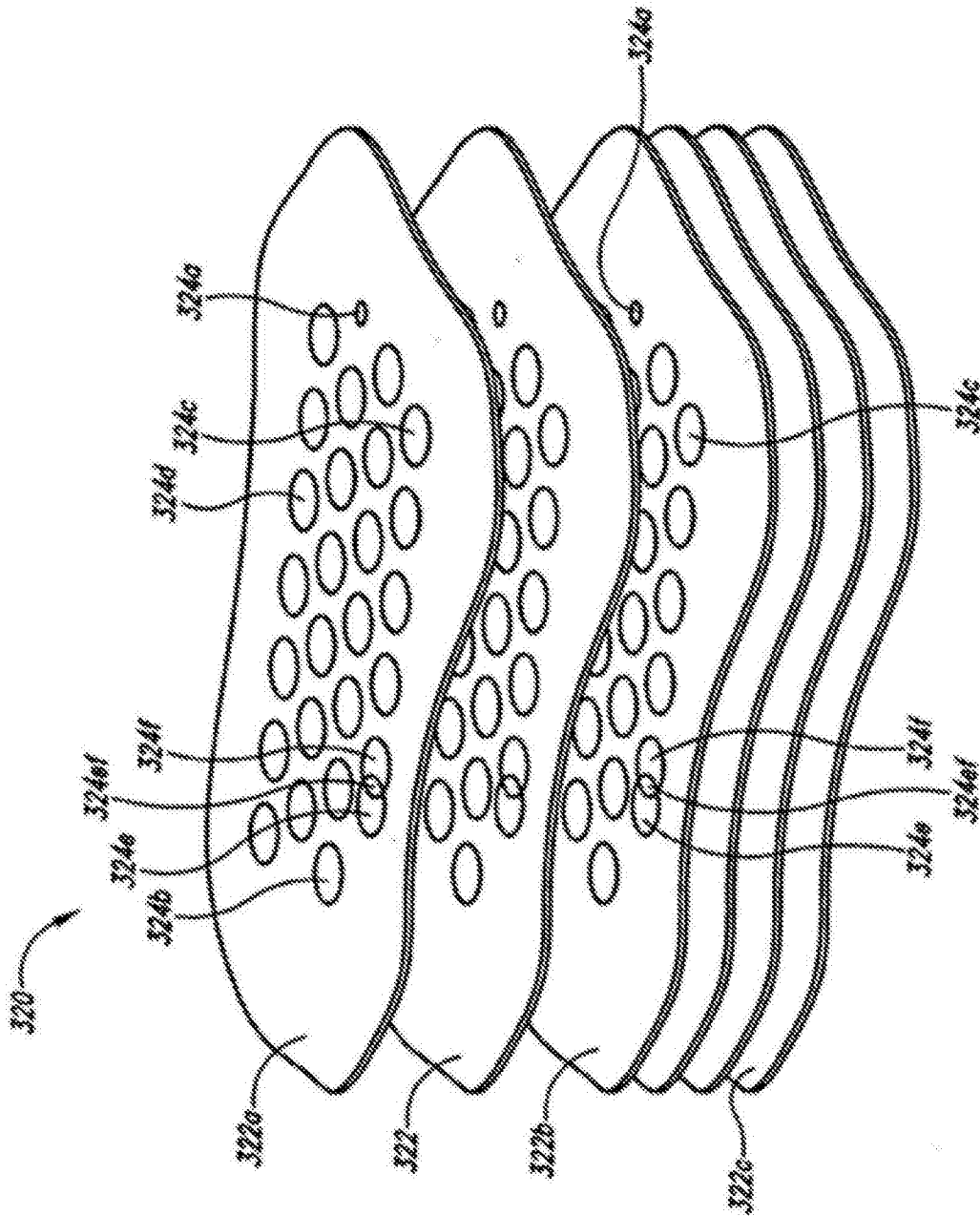


图6

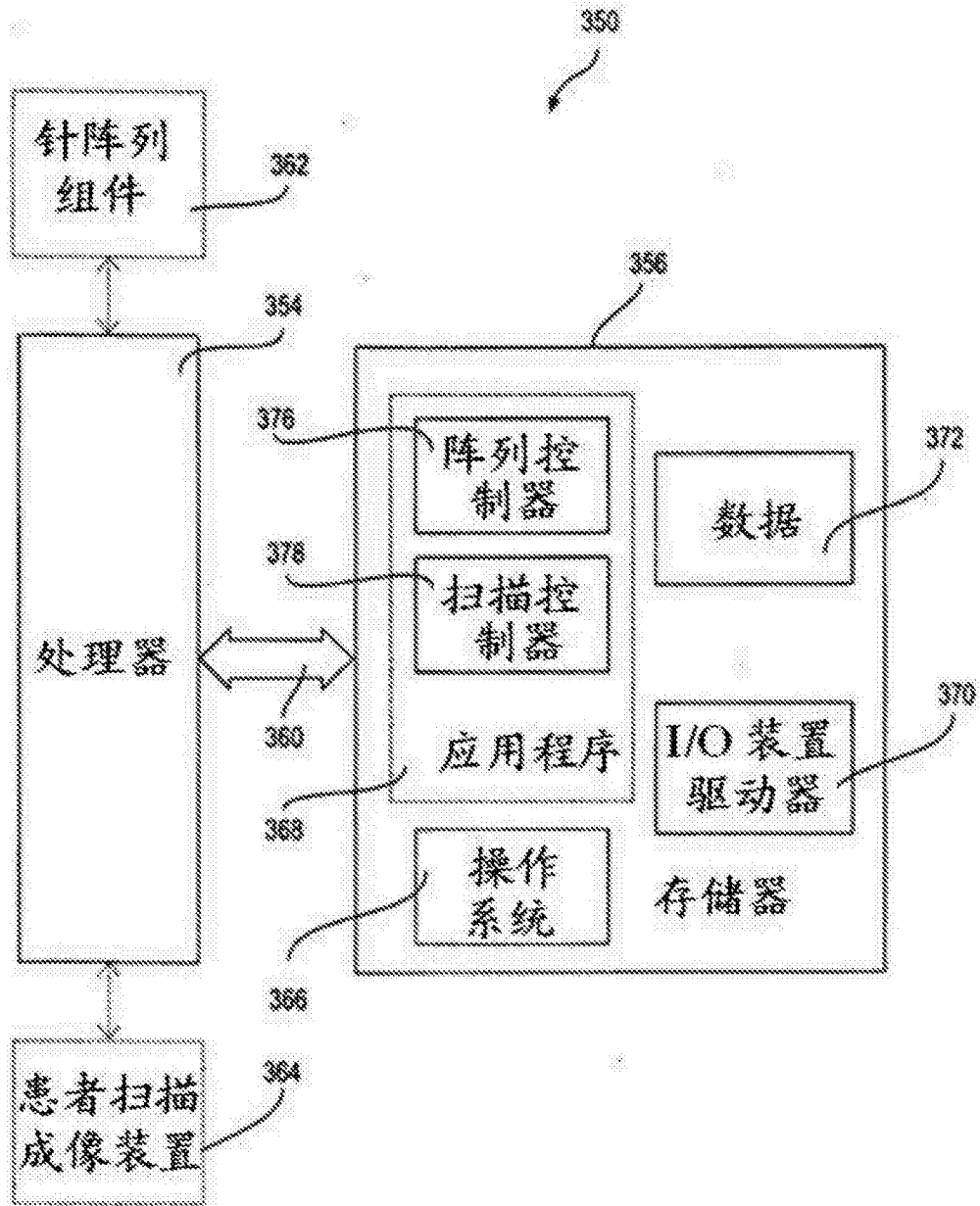


图7

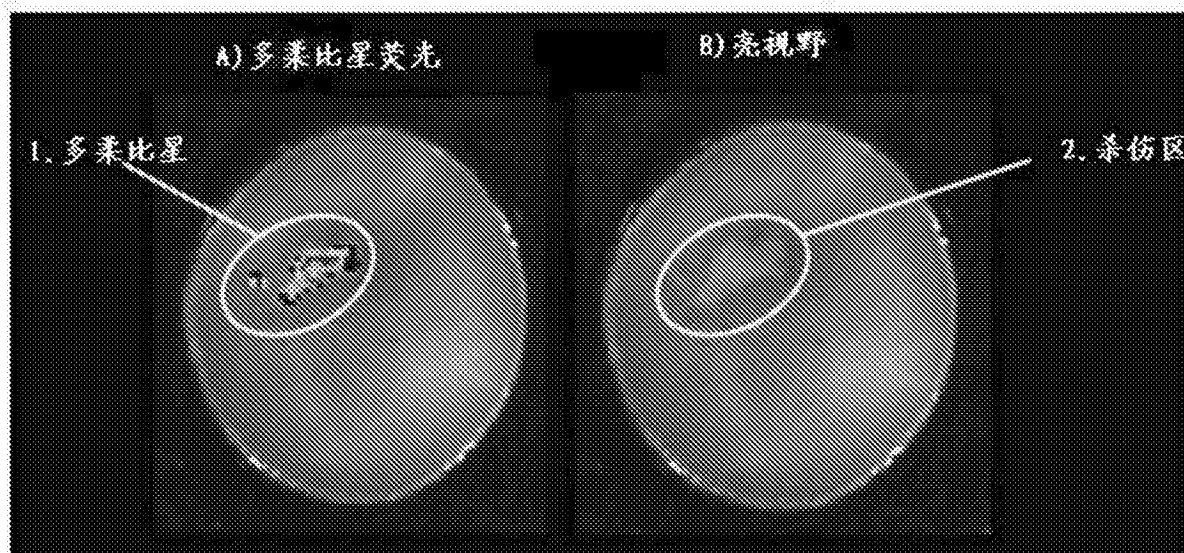


图8

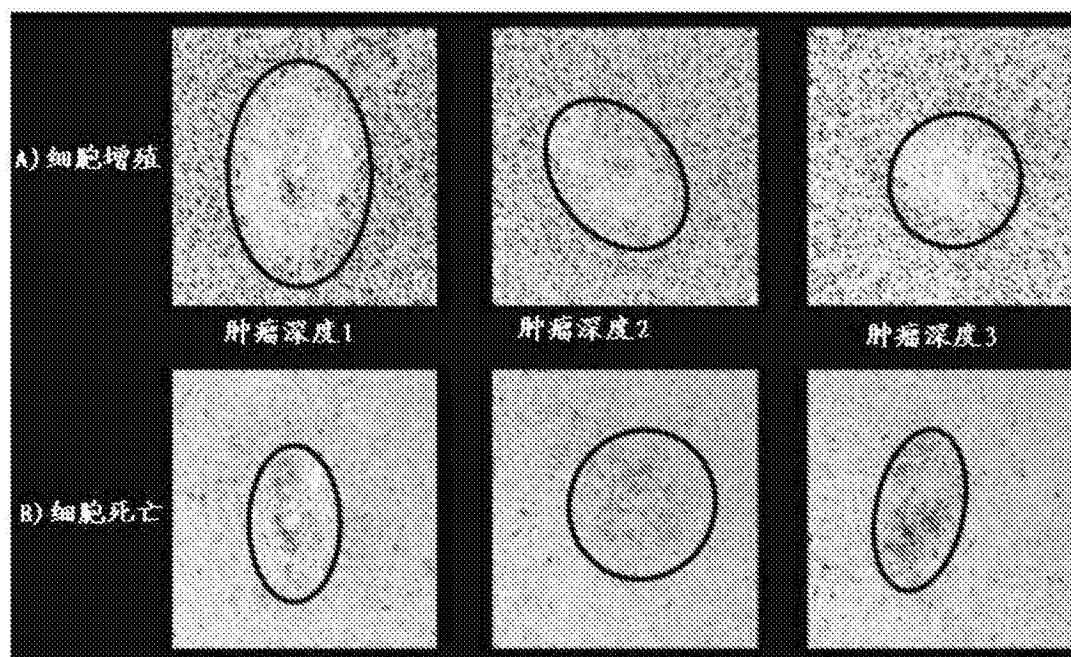


图9

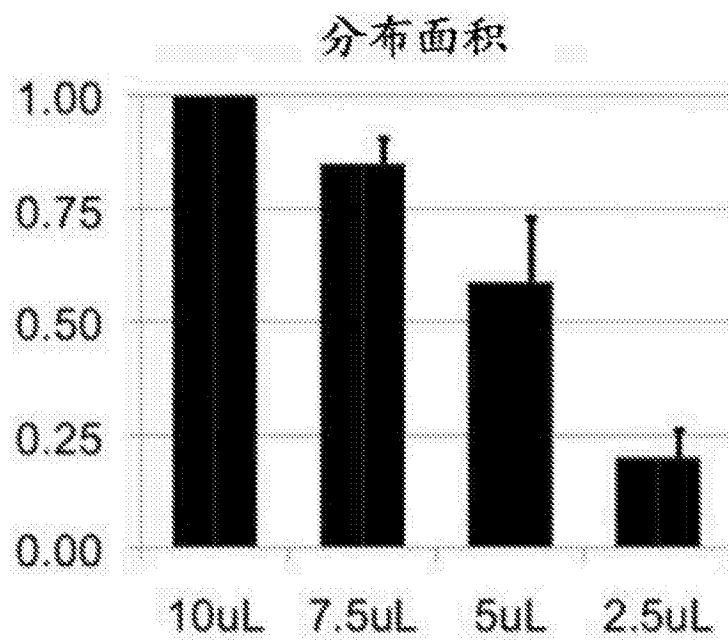
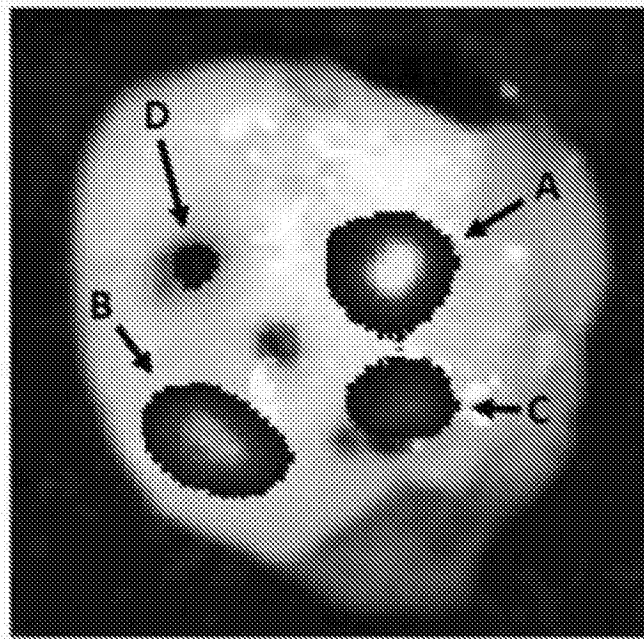


图10

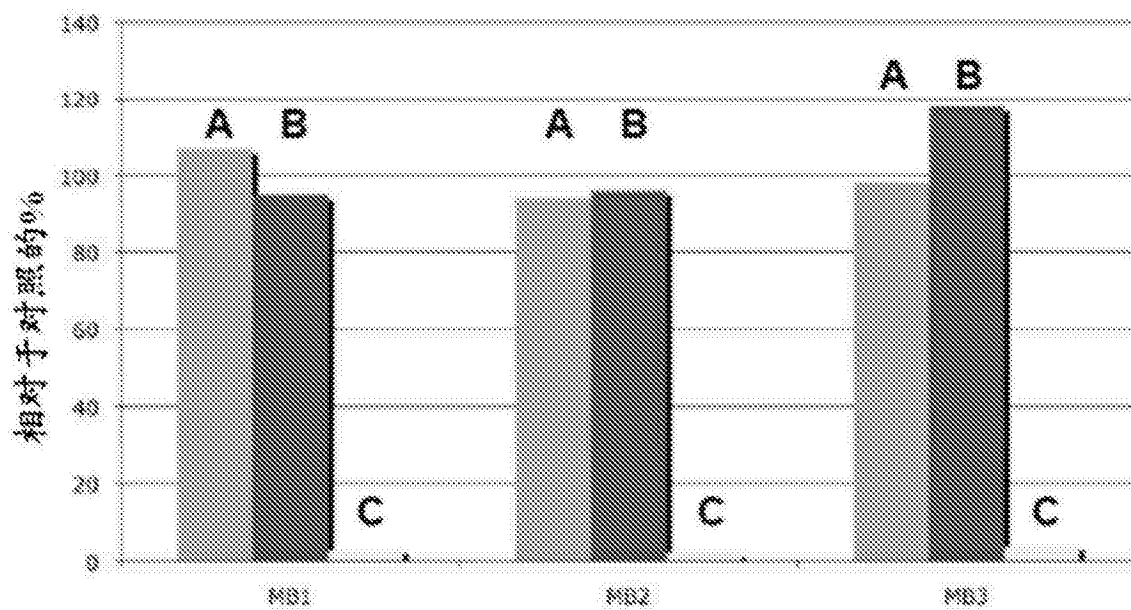


图11

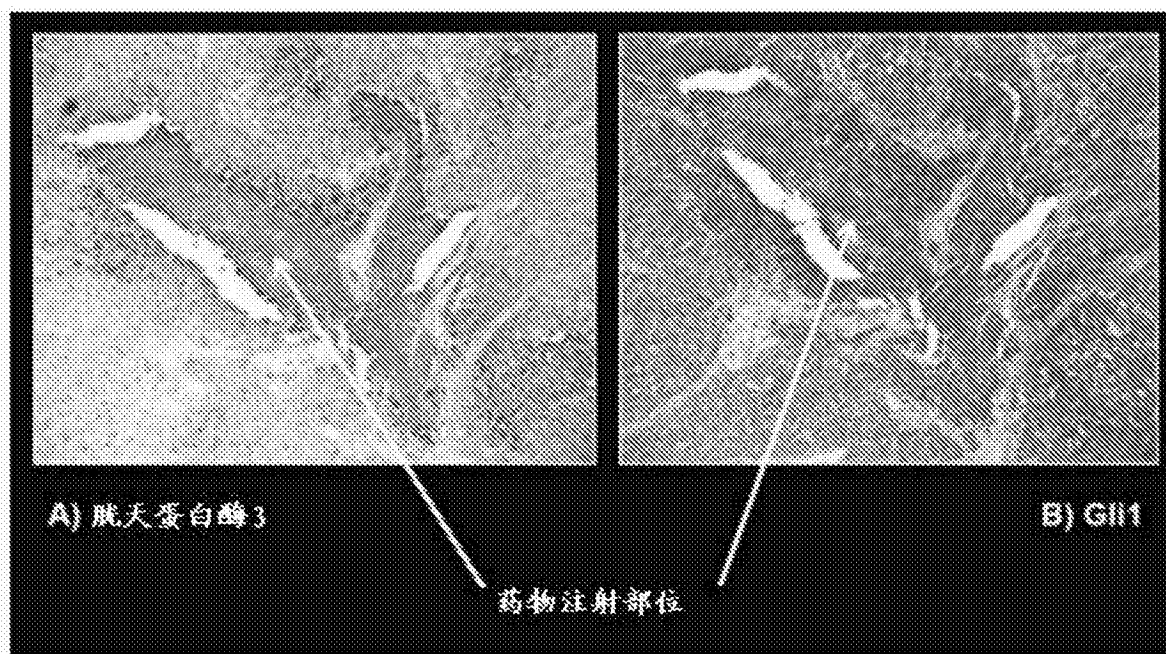


图12

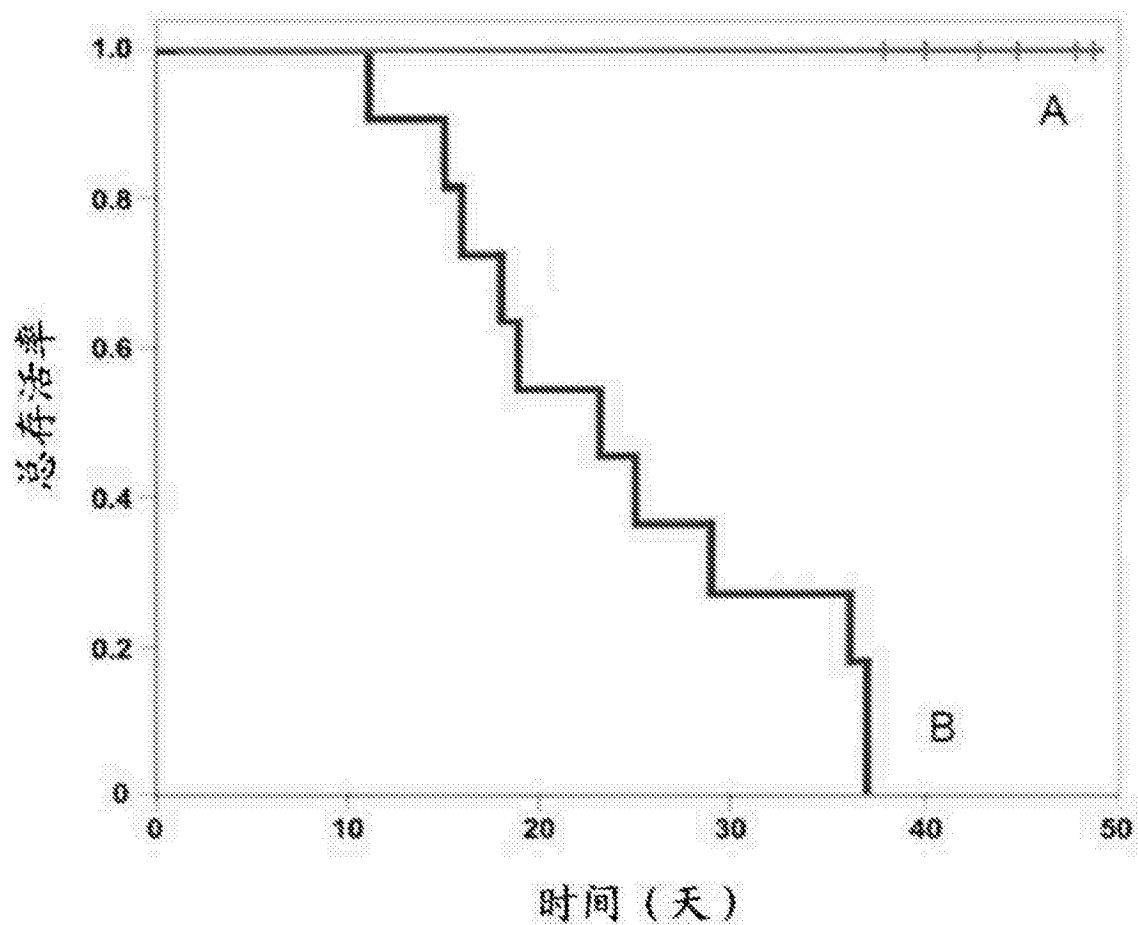


图13

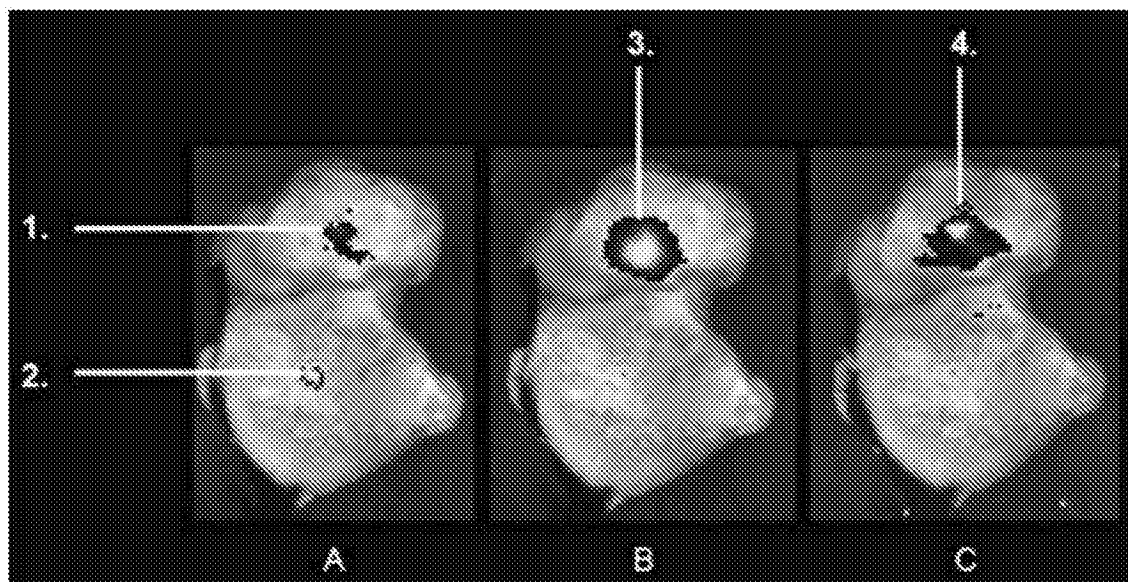


图14

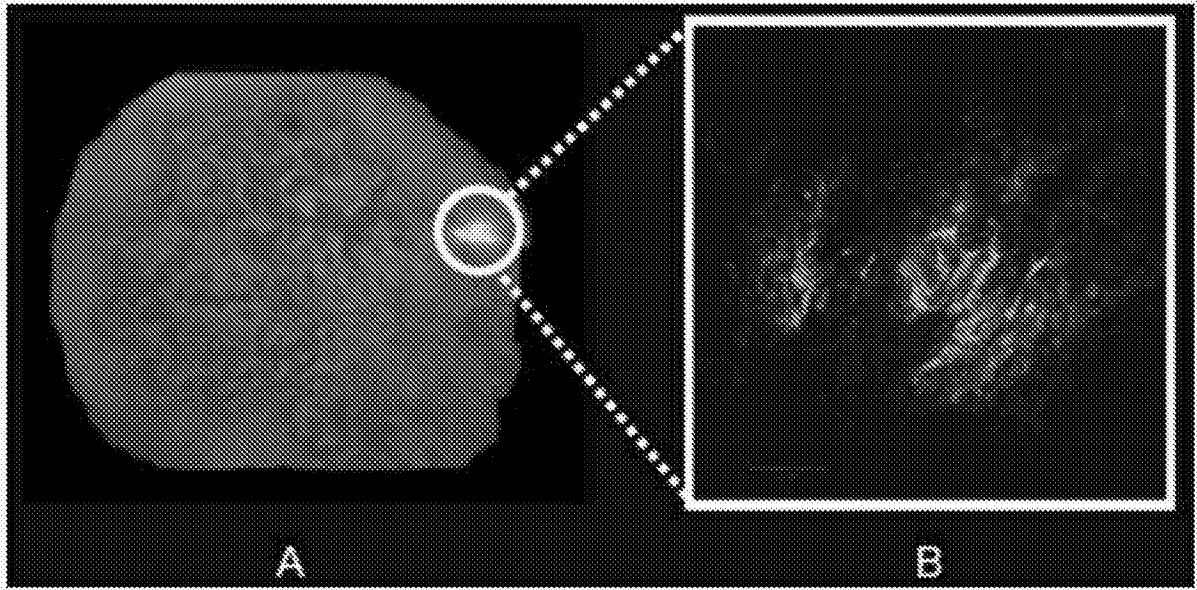


图15

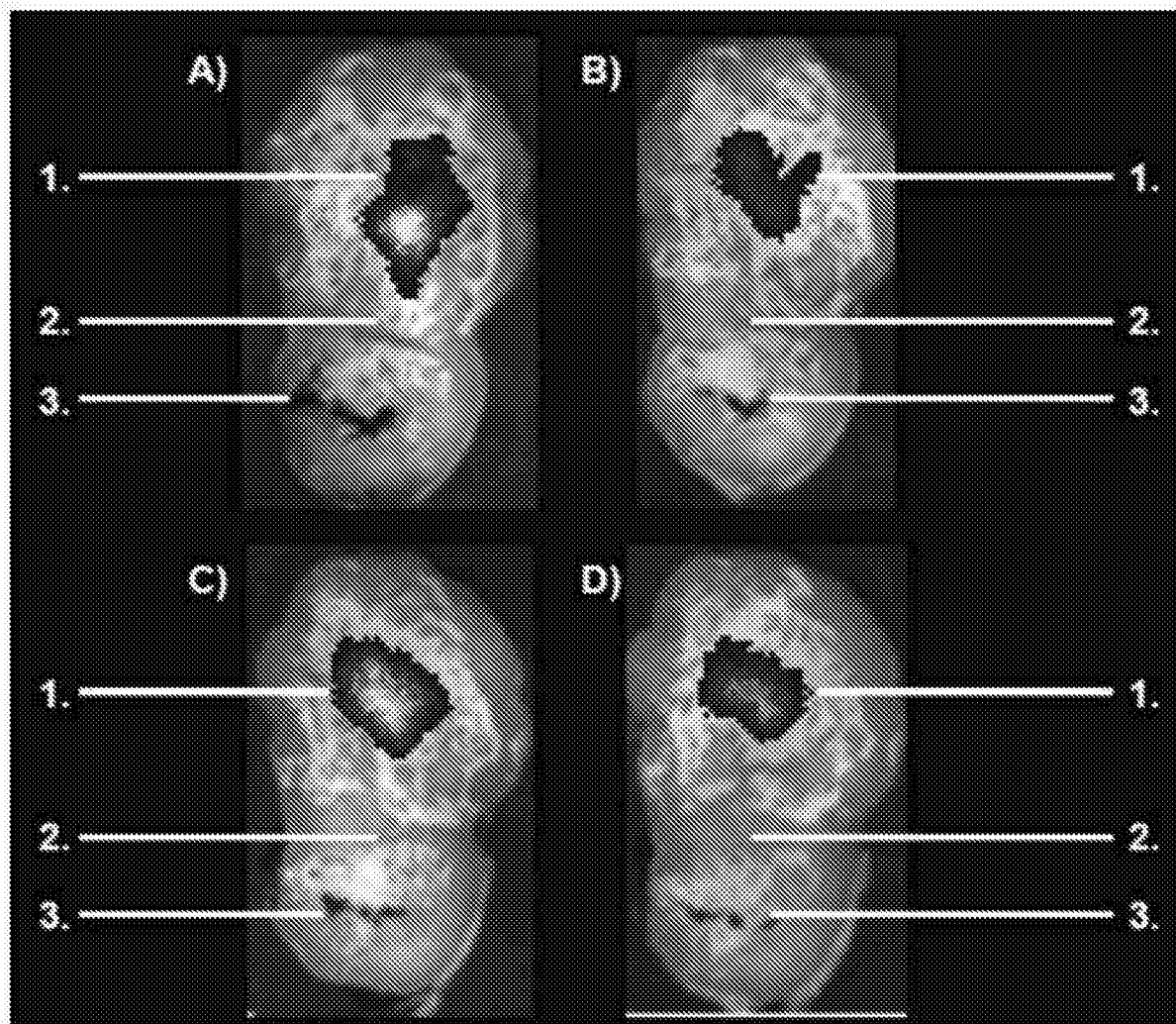


图16

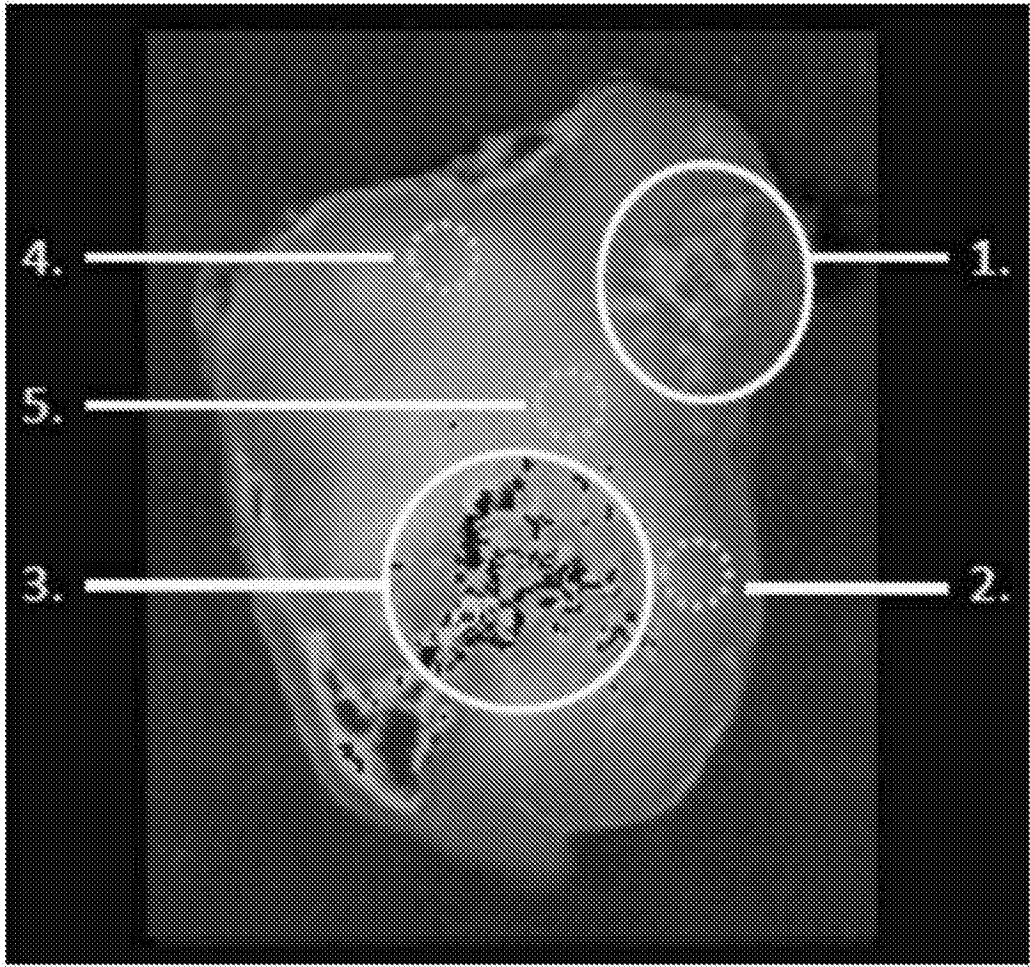


图17

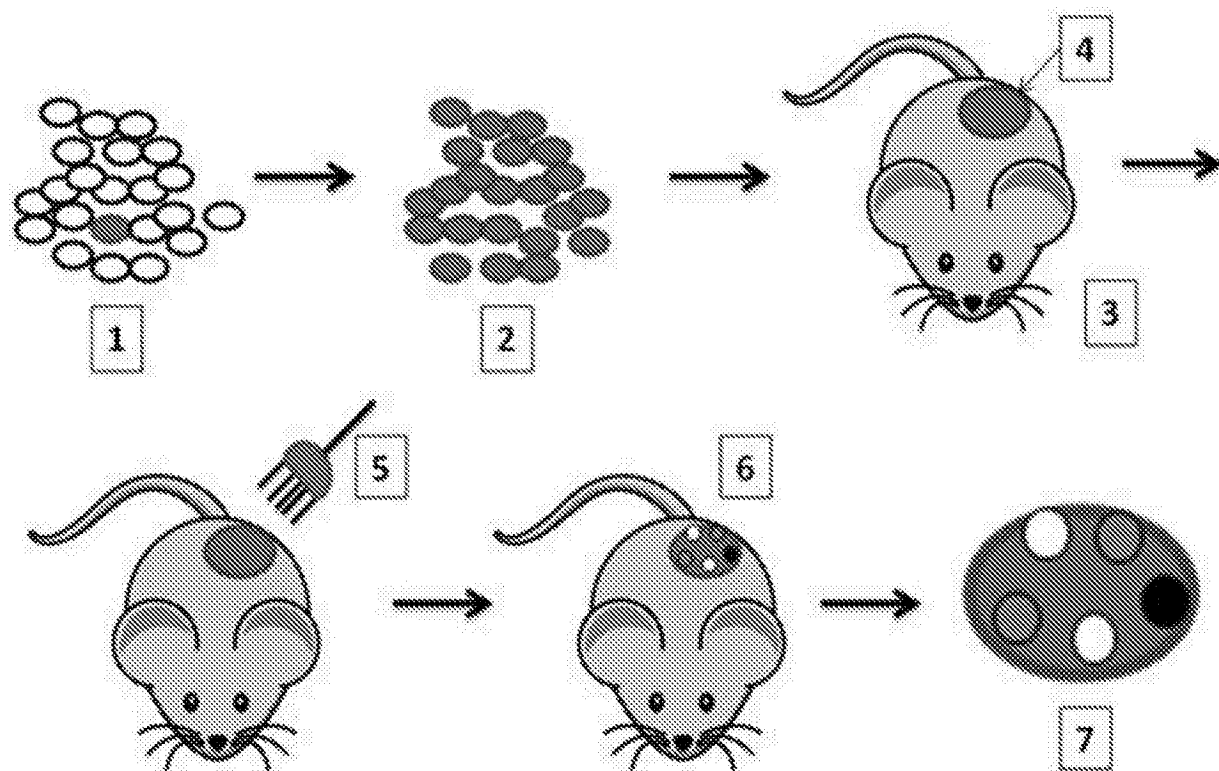


图18

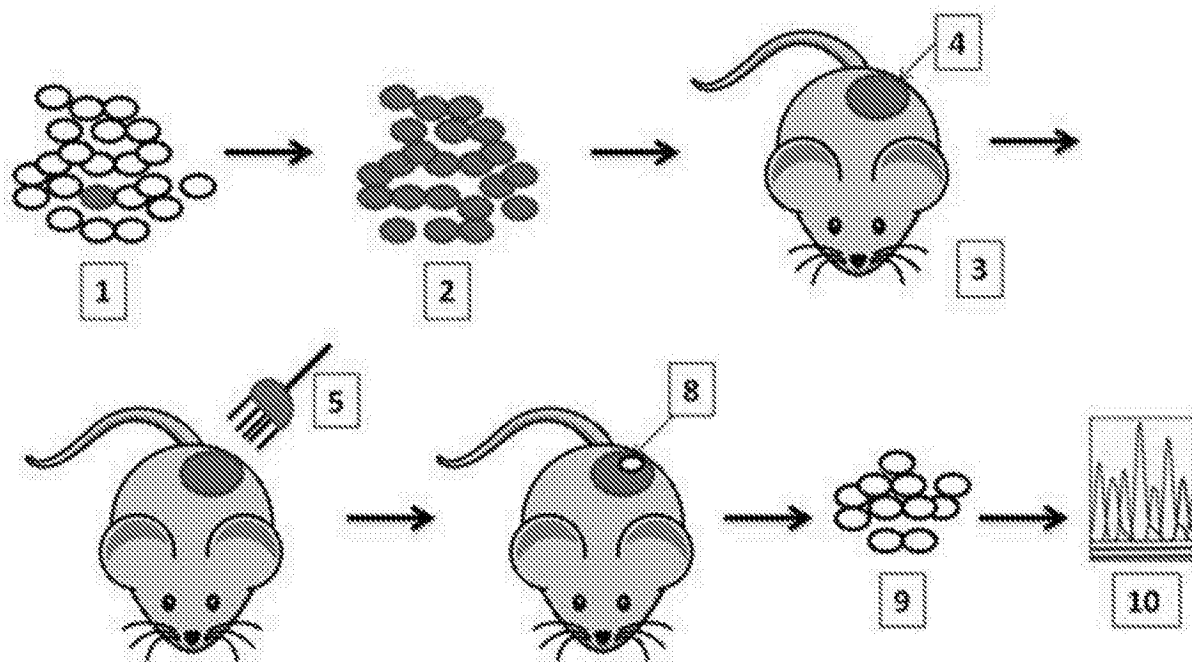


图19

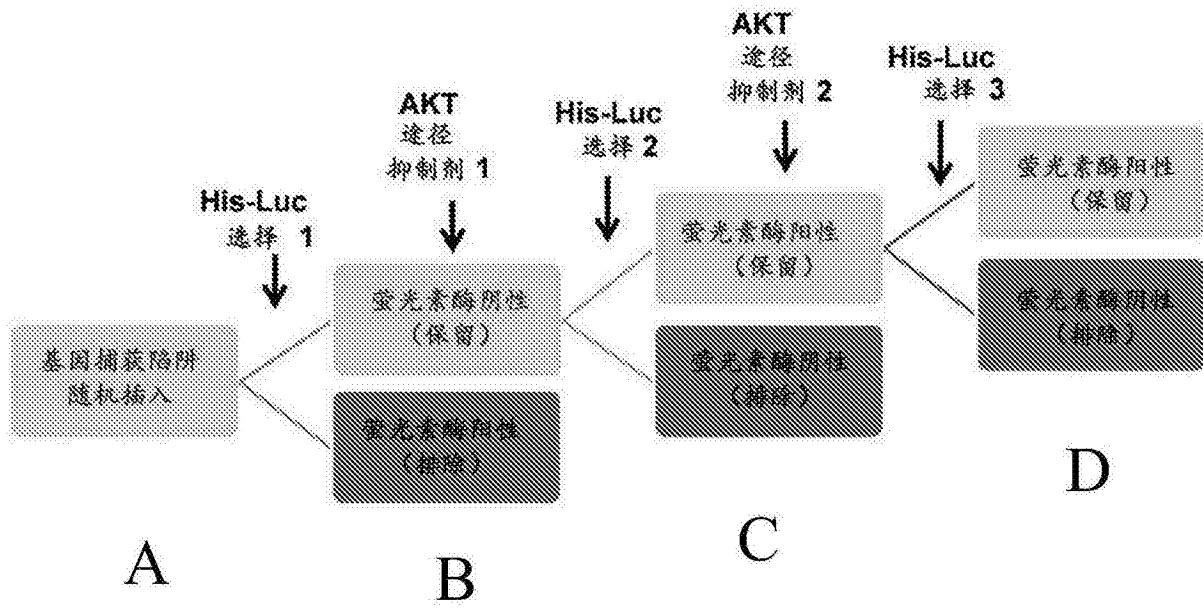


图20

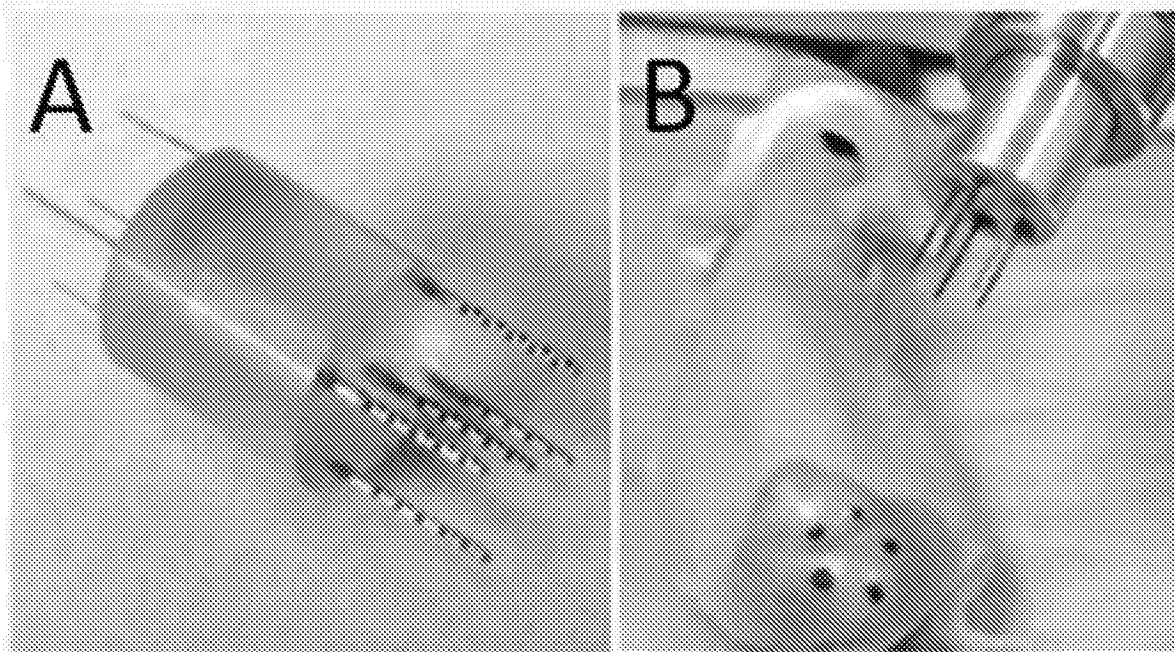


图21

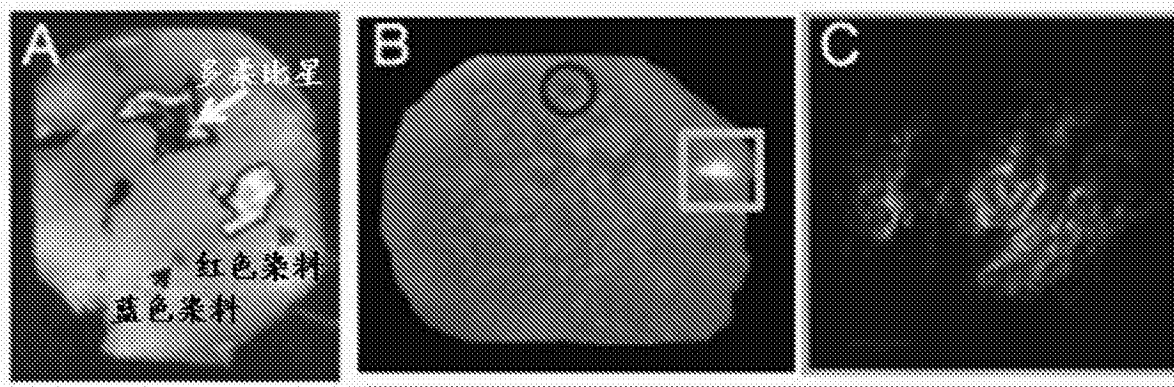


图22

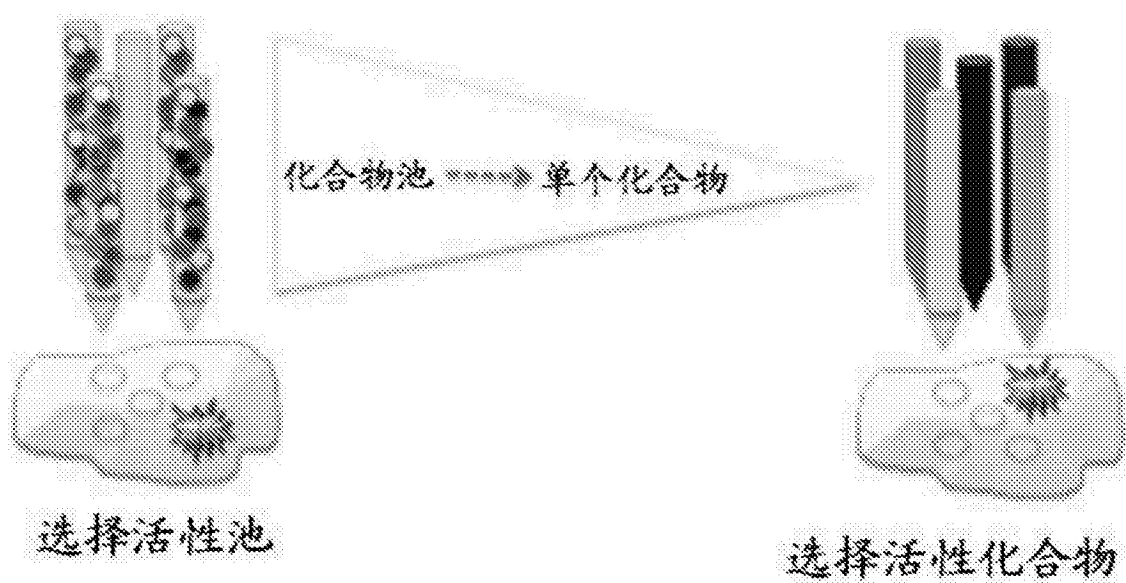


图23

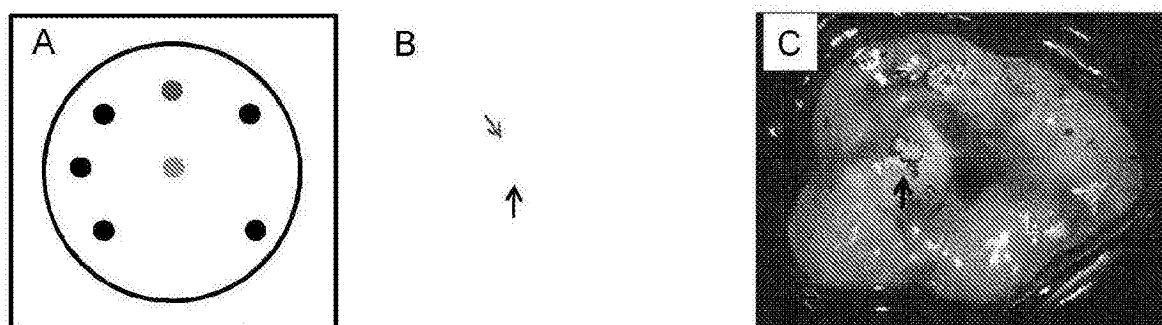


图24