



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104023760 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201280053003. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 10. 26

A61M 1/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/553, 003 2011. 10. 28 US

61/680, 847 2012. 08. 08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 04. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/062313 2012. 10. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/063530 EN 2013. 05. 02

(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 詹森·弗雷泽 理查德·克林霍弗

马克·格恩雷

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 王思琪 郑霞

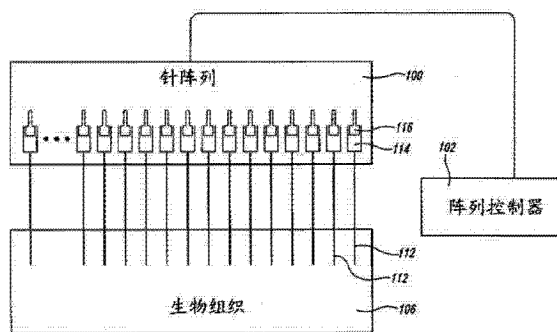
权利要求书6页 说明书36页 附图16页

(54) 发明名称

药物递送方法

(57) 摘要

本文描述了用于将药剂体内递送至实体组织以便评价功效的方法和装置。一种方法包括将针从实体组织中退出和将药剂注入实体组织；另一种方法包括使用多个微透析探针将药剂递送至实体组织。



1. 一种将多种药剂递送至受试者的实体组织的方法,其包括:
 - (a) 将多个微透析探针插入所述实体组织;和
 - (b) 通过所述多个微透析探针将所述多种药剂递送至所述实体组织。
2. 一种将一种或多种药剂递送至受试者的实体组织的方法,其包括:
 - (a) 将一个或多个针插入所述实体组织;和
 - (b) 通过将所述一个或多个针从所述实体组织中退出并将所述一种或多种药剂注入所述实体组织,而将所述一种或多种药剂递送至所述实体组织。
3. 一种将两种或更多种药剂递送至受试者的实体组织的方法,其包括:(a) 向所述受试者全身施用所述两种或更多种药剂中的至少一种;和 (b) 用至少一个微透析探针或至少一个针将所述两种或更多种药剂中的至少一种递送至所述实体组织,其中 (a) 中施用的所述药剂不同于 (b) 中递送的所述药剂。
4. 如权利要求 1、2 或 3 中的任一项所述的方法,其进一步包括评价所述药剂对所述实体组织的效果。
5. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其中当使用时所述微透析探针中的至少一个是 Y 型的。
6. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其中当使用时所述微透析探针中的至少一个是线形的。
7. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其中通过使所述药剂流过所述微透析探针而将所述药剂递送至所述实体组织。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述药剂的流速是至少约 $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$ 。
9. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述药剂的流速为约 $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$ 至约 $5 \mu\text{l}/\text{min}$ 。
10. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述药剂的流速为约 $1 \mu\text{l}/\text{min}$ 至约 $2 \mu\text{l}/\text{min}$ 。
11. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述药剂的流速为约 $1 \mu\text{l}/\text{min}$ 。
12. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述药剂以连续的方式流过所述微透析探针。
13. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述流动用蠕动泵进行。
14. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述流动跨越预定的时间段。
15. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述预定的时间段为至少约一小时。
16. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述预定的时间段为约一小时至约一年。
17. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂中的至少一种以多个剂量递送至所述实体组织的相同区域。
18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述多个剂量中的任意两个被选定的时间段分隔开。
19. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述选定的时间段为至少约 10 分钟。
20. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述选定的时间段为约一小时至约三个月。
21. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂包含化疗剂。
22. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂包含小分子药剂。
23. 如权利要求 22 所述的方法,其中所述小分子药剂的分子量小于 10^3 道尔顿。
24. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂包含干扰 RNA 活性的药剂。

25. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂包含基因治疗剂。
26. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂包含选自蛋白质、肽、拟肽、抗体、小分子、编码小干扰 RNA 的多核苷酸、编码反义 RNA 的多核苷酸或编码核酶的多核苷酸的药剂。
27. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂包含荧光染料。
28. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中两种或更多种药剂同时递送至所述实体组织内的相同区域。
29. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中两种或更多种药剂相继递送至所述实体组织内的相同区域。
30. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中两种或更多种药剂递送至所述实体组织内的不同区域。
31. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中至少一种药剂以不同浓度递送至所述实体组织内的不同区域。
32. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述实体组织包含肿瘤。
33. 如权利要求 32 所述的方法,其中所述肿瘤选自良性肿瘤和恶性肿瘤。
34. 如权利要求 32 所述的方法,其中所述肿瘤选自原发性肿瘤、侵袭性肿瘤和转移性肿瘤。
35. 如权利要求 32 所述的方法,其中所述肿瘤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。
36. 如权利要求 32 所述的方法,其中所述肿瘤包括选自腺瘤、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。
37. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述实体组织选自脑、肝、肺、肾、前列腺、卵巢、脾、淋巴结、甲状腺、胰腺、心脏、骨骼肌、肠、喉、食管和胃。
38. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述评价在体外进行。
39. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述评价在体内进行。
40. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述评价包括组织学切片。
41. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述评价包括当不是全身递送时,检测所述药剂中的每一种在所述实体组织的不同区域中的活性或毒性,或活性或毒性的缺乏。
42. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述评价包括当不是全身递送时,检测所述药剂中的至少两种在所述实体组织的相同区域中的活性或毒性。
43. 如权利要求 42 所述的方法,其中所述活性或毒性是协同的。
44. 如权利要求 42 所述的方法,其中所述活性或毒性是加成的。
45. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述评价包括对所述实体组织进行成像。
46. 如权利要求 45 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或生物光子成像。
47. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述成像在引入所述药剂期间或之后进行。
48. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述评价包括收集并分析至少一种分析物,其选自肿瘤细胞死亡、细胞信号改变或增殖 / 有丝分裂改变的生物标志物、递送至实体组织的药剂和递送至实体组织的药剂的代谢物。

49. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述评价包括检测所述药剂对所述实体组织的增殖梯度或多种微环境的效果。

50. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中至少一部分跨越所述实体组织的所述微透析探针包含半透膜。

51. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其进一步包括对插入位点进行标记。

52. 如权利要求 51 所述的方法,其中所述插入位点用至少一种位置标记物进行标记。

53. 如权利要求 52 所述的方法,其中所述至少一种位置标记物包含染料。

54. 如权利要求 53 所述的方法,其中将所述染料和至少一种另外的药剂递送至所述实体组织内的相同区域。

55. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述插入由阵列引导器引导。

56. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述插入用针阵列装置进行。

57. 如权利要求 56 所述的方法,其中所述针阵列装置包含至少两个针。

58. 如权利要求 56 所述的方法,其中所述针阵列装置包含至少五个针。

59. 如权利要求 56 所述的方法,其中所述针阵列装置包含至少十个针。

60. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其中所述微透析探针包含至少三个微透析探针。

61. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其中所述微透析探针包含至少五个微透析探针。

62. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其中所述微透析探针包含至少十个微透析探针。

63. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中当存在两个或更多个针或微透析探针时,所述微透析探针中的每一个或所述针中的每一个含有不同的药剂。

64. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中当存在两个或更多个针或微透析探针时,所述微透析探针或针中的至少两个各自含有不同浓度的相同药剂。

65. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂沿轴递送至所述实体组织。

66. 如权利要求 65 所述的方法,其中所述轴是所述实体组织内的多个平行轴中的一个。

67. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述药剂中的至少一种是癌症治疗剂。

68. 如权利要求 67 所述的方法,其中所述评价包括检测递送所述癌症治疗剂后的细胞凋亡。

69. 如权利要求 68 所述的方法,其中所述细胞凋亡在离递送位点 5mm 以内的区域中检测到。

70. 如权利要求 69 所述的方法,其中如果与不含所述药剂的对照相比观察到少于 20% 的细胞凋亡,则从进一步的评价中取消对所述癌症治疗剂的选择。

71. 如权利要求 69 所述的方法,其中如果与不含所述药剂的对照相比观察到少于 80% 的细胞凋亡,则从进一步的评价中取消对所述癌症治疗剂的选择。

72. 如权利要求 69 所述的方法,其中如果与不含所述药剂的对照相比观察到多于 50% 的细胞凋亡,则选择所述癌症治疗剂进行进一步评价。

73. 如权利要求 69 所述的方法,其中如果与不含所述药剂的对照相比观察到多于 80% 的细胞凋亡,则选择所述癌症治疗剂进行进一步评价。

74. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述退出一个或多个针和注射一种或多种药剂同

时进行。

75. 如权利要求 2 所述的方法,其中注射一种或多种药剂的速率为至少约 $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$ 。

76. 如权利要求 2 所述的方法,其中注射一种或多种药剂的速率为约 $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$ 至约 $10 \mu\text{l}/\text{min}$ 。

77. 如权利要求 2 所述的方法,其中注射一种或多种药剂的速率为约 $0.5 \mu\text{l}/\text{min}$ 。

78. 如权利要求 2 所述的方法,其中注射一种或多种药剂的速率为约 $1 \mu\text{l}/\text{min}$ 。

79. 如权利要求 2 所述的方法,其中退出一个或多个针的速率为至少约 $0.1\text{mm}/\text{min}$ 。

80. 如权利要求 2 所述的方法,其中退出一个或多个针的速率为约 $0.1\text{mm}/\text{min}$ 至约 $5\text{mm}/\text{min}$ 。

81. 如权利要求 2 所述的方法,其中退出一个或多个针的速率为约 $0.5\text{mm}/\text{min}$ 。

82. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述一个或多个针包含至少三个针。

83. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述一个或多个针包含至少五个针。

84. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述一个或多个针包含至少十个针。

85. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述一个或多个针包含端口 (end-port) 针。

86. 如权利要求 2 所述的方法,其进一步包括一个或多个储器,每一个储器与所述一个或多个针中的单独一个流体连通。

87. 如权利要求 2 所述的方法,其进一步包括两个或更多个储器,每一个储器与所述一个或多个针中的一个流体连通。

88. 如权利要求 2 所述的方法,其进一步包括五个或更多个储器,每一个储器与所述一个或多个针中的一个流体连通。

89. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂在所述实体组织外是 (i) 检测不到的,或者 (ii) 如果在所述实体组织外能检测到,那么所述药剂以低于最小有效剂量的量存在。

90. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂以低于在所述实体组织中产生可检测效果所需的最小剂量的量引入。

91. 如权利要求 1、2 和 3 中的任一项所述的方法,其中所述药剂以治疗有效浓度存在于所述实体组织中。

92. 如权利要求 3 所述的方法,其中在 (a) 中施用的所述至少一种药剂以低于治疗有效浓度存在于体循环中。

93. 如权利要求 3 所述的方法,其中在 (b) 中递送的至少一种药剂以不同浓度递送至所述实体组织的不同区域。

94. 如权利要求 3 所述的方法,其中在 (b) 中递送的至少一种药剂以多个剂量递送至所述实体组织的相同区域。

95. 如权利要求 3 所述的方法,其中 (a) 中递送的药剂选自抗血管生成剂、激酶抑制剂、优先在癌细胞中表达的代谢途径靶标的抑制剂、抗体或抗体药物偶联物,或表观遗传修饰剂。

96. 如权利要求 3 所述的方法,其中 (b) 中递送的药剂包含小干扰 RNA 多核苷酸或反义 RNA 多核苷酸。

97. 如权利要求 92 所述的方法,其中步骤 (a) 中的所述药剂和步骤 (b) 中的所述药剂

对所述实体组织具有协同效应。

98. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述受试者是动物。

99. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述受试者是人。

100. 如权利要求 98 或 99 所述的方法,其进一步包括以下之一:(i) 基于所述评价,选择所述药剂中的至少一种,(ii) 基于所述评价,取消对所述药剂中的至少一种的选择,和(iii) 基于所述评价,对所述药剂中的至少两种进行优先排序。

101. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述受试者是多个受试者中的一个。

102. 如权利要求 101 所述的方法,其进一步包括以下之一:(i) 基于所述评价,选择所述多个受试者中的至少一个,(ii) 基于所述评价,取消对所述多个受试者中的至少一个的选择,和(iii) 基于所述评价,对所述多个受试者中的至少两个进行优先排序。

103. 一种将多种药剂递送至受试者的实体组织的装置,其包含多个微透析探针。

104. 如权利要求 103 所述的装置,其进一步包括多个针,每一个针配置成接纳所述多个微透析探针中的一个。

105. 如权利要求 104 所述的装置,其进一步包含至少一个控制器,该控制器可操作地耦接至所述多个针。

106. 如权利要求 103 所述的装置,其中所述控制器是计算机系统。

107. 如权利要求 103 所述的装置,包含至少 3 个微透析探针。

108. 如权利要求 103 所述的装置,包含至少 4 个微透析探针。

109. 如权利要求 103 所述的装置,包含至少 5 个微透析探针。

110. 如权利要求 103 所述的装置,包含至少 6 个微透析探针。

111. 如权利要求 103 所述的装置,包含至少 10 个微透析探针。

112. 如权利要求 104 所述的装置,其包含至少 3 个针。

113. 如权利要求 104 所述的装置,其包含至少 4 个针。

114. 如权利要求 104 所述的装置,其包含至少 5 个针。

115. 如权利要求 104 所述的装置,其包含至少 6 个针。

116. 如权利要求 104 所述的装置,其包含至少 10 个针。

117. 如权利要求 104 所述的装置,其进一步包含用来引导所述多个针插入所述实体组织的引导装置。

118. 一种装置,其包含具有第一多个孔的顶部区块,该孔的大小允许针穿过所述顶部区块,以及具有第二多个孔的底部区块,该孔的大小允许针穿过所述底部区块,其中所述顶部和底部区块处于基本平行的布置,并且其中所述第一和第二多个孔被定位为允许一个或多个针以基本垂直于两个区块平面的路径穿过所述顶部区块和所述底部区块中的孔。

119. 如权利要求 118 所述的装置,其进一步包含至少一个可调节支腿,其中所述至少一个可调节支腿附接于所述底部区块上。

120. 如权利要求 119 所述的装置,其包含四个可调节支腿。

121. 如权利要求 119 所述的装置,其中所述至少一个可调节支腿在垂直和水平方向上是可调节的。

122. 如权利要求 118 所述的装置,其中所述底部区块是固定的。

123. 如权利要求 118 所述的装置,其中所述顶部区块相对于所述底部区块垂直移动。

124. 如权利要求 118 所述的装置,其中所述顶部区块沿着附接于所述底部区块上的导杆移动。

125. 如权利要求 118 所述的装置,其进一步包括控制所述顶部区块的垂直移动的驱动机构。

126. 如权利要求 118 所述的装置,其中所述第一和第二多个孔以基本平行的行布置。

127. 如权利要求 118 所述的装置,进一步包含至少一个针,其中所述第一多个孔中的至少一个和所述第二多个孔中的至少一个被配置成接纳所述至少一个针。

128. 如权利要求 127 所述的装置,其中控制附件附接于所述至少一个针。

129. 如权利要求 128 所述的装置,其中所述控制附件使所述至少一个针的插入停止,从而控制针插入所述实体组织的深度。

130. 如权利要求 129 所述的装置,其进一步包括至少一个弹簧,其中所述至少一个弹簧与所述至少一个可调节支腿和所述底部区块实质接触。

131. 一种将至少一种药剂递送至实体组织内的方法,其包括:

(a) 提供如权利要求 118 所述的装置;

(b) 使用所述装置将一个或多个针插入所述实体组织;和

(c) 使用所述装置将所述一种或多种药剂注入所述实体组织内并将所述一个或多个针从所述实体组织中退出。

132. 如权利要求 131 所述的方法,其进一步包括评价所述一种或多种药剂中的至少一种对所述实体组织的效果。

133. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述一个或多个针包含至少两个针。

134. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述一个或多个针包含至少五个针。

135. 如权利要求 131 所述的方法,其中所述一个或多个针包含至少十个针。

药物递送方法

交叉引用

本申请根据 35U. S. C. 第 119(e) 条要求于 2011 年 10 月 28 日提交的美国临时申请 61/553, 003 和于 2012 年 8 月 8 日提交的美国临时申请 61/680, 847 的优先权 ;这些申请的内容通过引用整体并入。

背景技术

[0001] 许多与癌症相关的治疗剂正处于临床前、I 期或 II 期临床试验阶段,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,大量候选药物在临床前试验中失败,据估计超过 90% 的癌症相关治疗剂在 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 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。

[0002] 此外,许多受试者甚至对已证明有效的标准药物没有反应。由于目前还不是很了解或不容易评价的原因,受试个体可能对标准药物治疗无反应。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治疗选择,以降低发生不必要的副作用的风险。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)。

[0003] 本发明满足了这些及类似的需求,并且提供了其它相关的益处。

发明内容

[0004] 一方面,本发明提供了一种将多种药剂递送至受试者的实体组织的方法,其包括

(a) 将多个微透析探针插入实体组织 ;和

(b) 通过所述多个微透析探针将所述多种药剂递送至所述实体组织。该方法可进一步包括评价所述多种药剂对该实体组织的至少一种效果。

[0005] 另一方面,本发明提供了一种将两种或更多种药剂递送至受试者的实体组织的方法,其包括 : (a) 向所述受试者全身施用所述两种或更多种药剂中的至少一种,和 (b) 用至少一个微透析探针或至少一个针将所述两种或更多种药剂中的至少一种递送至所述实体组织,其中 (a) 中施用的所述药剂不同于 (b) 中递送的所述药剂。在一些情况下,步骤 (a) 在步骤 (b) 之前进行。在其它一些情况下,步骤 (a) 在步骤 (b) 之后进行。该方法可进一步包括评价药剂对实体组织的至少一种效果。

[0006] 在一些实施方案中,在 (a) 或 (b) 中递送的药剂选自抗血管生成剂、激酶抑制剂、优先在癌细胞中表达的代谢途径靶标的抑制剂,或表观遗传修饰剂。在其它一些实施方案中,在 (a) 或 (b) 中递送的药剂包含小分子抗癌剂。在一些实施方案中,(a) 中递送的药剂包含抗体或抗体药物偶联物。在一些实施方案中,(b) 中递送的药剂包含小干扰 RNA、反义 RNA 或小分子抗癌剂。步骤 (b) 中递送的药剂中的至少一种可以不同浓度递送至实体组织的不同区域。或者,步骤 (b) 中递送的药剂中的至少一种可以多个剂量递送至实体组织的

相同区域。步骤 (a) 中施用的药剂和步骤 (b) 中递送的药剂可能对实体组织具有协同效应。该药剂可以低于治疗有效浓度的浓度存在。

[0007] 微透析探针可以具有不同形状。在一些实施方案中,所述多个微透析探针中的至少一个是 Y 型的。在进一步的实施方案中,所述多个微透析探针中的每一个是 Y 型的。在其它一些实施方案中,所述多个微透析探针中的至少一个是线形的。在进一步的实施方案中,所述多个微透析探针中的每一个是线形的。

[0008] 药剂可通过穿过微透析探针的扩散来递送。扩散可由浓度梯度(例如,从较高浓度至较低浓度)驱动。在一些实施方案中,扩散可由溶解度梯度(例如,从较低溶解度溶液至较高溶解度溶液或从较高溶解度溶液至较低溶解度溶液)驱动。或者,扩散可由主动转运驱动。在一些实施方案中,通过使药剂溶液流过微透析探针来递送药剂。流速可以是至少约 $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$ 。在一些实施方案中,流速为约 $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$ 至约 $10 \mu\text{l}/\text{min}$ 。在进一步的实施方案中,流速为约 $1 \mu\text{l}/\text{min}$ 至约 $2 \mu\text{l}/\text{min}$ 。在其它一些实施方案中,流速为约 0.5、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 或 $10.0 \mu\text{l}/\text{min}$ 。

[0009] 所述多种药剂可以连续的方式流过微透析探针。流动可用蠕动泵或注射泵进行。流动可跨越预定的时间段。预定的时间段可以是至少约 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、6 小时、12 小时、18 小时、24 小时、36 小时、48 小时、72 小时或 96 小时。预定的时间段可在约一小时至约一年的范围内。

[0010] 插入实体组织后,跨越实体组织的微透析探针的至少一部分可包含半透膜。在一些实施方案中,跨越实体组织的微透析探针的整个部分包含半透膜。

[0011] 微透析探针的插入可由阵列引导器引导。微透析探针的插入可由关节镜装置引导。微透析探针的插入可用针阵列装置进行。针阵列装置可包含至少两个、至少五个或至少十个针。所述针中的每一个可配置成接纳一个微透析探针。针阵列装置可进一步包含至少一个用于控制针插入的致动器。

[0012] 在一些实施方案中,插入至少三个、至少五个或至少十个微透析探针。每个微透析探针可含有不同的药剂。此外,至少两个微透析探针可含有相同或不同浓度的相同药剂。

[0013] 另一方面,本发明提供了一种将一种或多种药剂递送至实体组织的方法,其包括:(a) 将一个或多个针插入实体组织;和 (b) 通过从实体组织中退出一个或多个针,并且将一种或多种药剂注入实体组织,来将一种或多种药剂递送至实体组织。该方法可进一步包括评价一种或多种药剂对实体组织的效果的步骤。

[0014] 所述针可以是多孔针或端口(end port)针。在一些实施方案中,所述针是多孔针。在其它一些实施方案中,所述针是端口针。

[0015] 注射一种或多种药剂的速率可以是至少约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5、1.8、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、12.0、15.0、20.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。在一些实施方案中,注射一种或多种药剂的速率为约 $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$ 至约 $5.0 \mu\text{l}/\text{min}$ 。在其它一些实施方案中,注射一种或多种药剂的速率为约 0.1、0.5、1.0 或 $2.0 \mu\text{l}/\text{min}$ 。

[0016] 退出一个或多个针的速率可以是至少约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.8、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 或

15.0mm/min。在一些实施方案中,退出一个或多个针的速率为约 0.1mm/min 至约 5.0mm/min。在其它一些实施方案中,退出一个或多个针的速率为约 0.1、约 0.5、约 1.0 或约 2.0mm/min。

[0017] 针的插入和退出可由固定引导器或关节镜装置引导。固定引导器可包含立体定位装置。针的退出和药剂的注射可同时或相继进行。在一个示例性的实施方案中,针的退出和药剂的注射同时进行。

[0018] 插入可用针阵列装置进行。针阵列装置可包含至少两个、至少五个或至少十个针。针阵列装置可包含多个储器。在一些实施方案中,针阵列装置包含至少三个、至少五个或至少十个储器。所述储器中的每一个可与单独的针单独流体连通。所述储器中的每一个可含有与任何其它储器中的药剂不同的药剂。在一些情况下,所述储器中的至少两个含有不同浓度的相同药剂。针阵列可进一步包含致动器和 / 或控制器。控制器可与致动器可操作地连接或与致动器分离。控制器可控制将要递送至实体组织的药剂的剂量。

[0019] 关于任一上述方面,药剂或者 (i) 在实体组织外检测不到,或者 (ii) 若在实体组织外能检测到,则该药剂以低于最小剂量的量存在。或者,药剂以低于全身递送时在受试者中产生可检测效果所需的最小剂量的量引入。或者,药剂以治疗有效浓度存在于实体组织中。实体组织中的治疗有效浓度可通过口服施用药剂而达到。

[0020] 关于任一上述方面,微透析探针或针可沿轴插入。一旦插入,药剂可沿轴递送。该轴可以是实体组织内多个平行轴中的一个。在一些实施方案中,存在 3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、18 或甚至 20 个平行轴。

[0021] 关于任一上述方面,实体组织可包含肿瘤。该肿瘤可选自良性肿瘤和恶性肿瘤。该肿瘤可选自原发性肿瘤、侵袭性肿瘤和转移性肿瘤。该肿瘤可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。该肿瘤可包括选自腺瘤、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。此外,实体组织可选自脑、肝、肺、肾、前列腺、卵巢、脾、淋巴结、甲状腺、胰腺、心脏、骨骼肌、肠、喉、食管和胃。

[0022] 关于任一上述方面,评价可在体外或体内进行。在一些实施方案中,评价选自组织学切片;收集并分析至少一种肿瘤细胞死亡、细胞信号改变或增殖 / 有丝分裂改变的生物标志物;检测所述一种或多种药剂对所述实体组织的增殖梯度或多种微环境的效果;检测所述多种药剂中的每一种在实体组织的不同区域中的活性或毒性;检测不同浓度的一种药剂在实体组织中相邻位置上的活性或毒性;以及检测所述多种药剂中的至少两种在实体组织的相同区域中的活性或毒性。当在实体组织的相同区域中检测到所述多种药剂中的至少两种的活性或毒性时,来自不同药剂的活性或毒性可以是协同的或加成的。在其它一些实施方案中,评价包括对所述实体组织进行成像。成像可包括放射摄影成像、磁共振成像、正电子发射断层显像或生物光子成像。成像可在引入药剂之前、期间或之后进行。

[0023] 关于任一上述方面,所述多种药剂可包含选自蛋白质、肽、拟肽、抗体、小分子、编码小干扰 RNA 的多核苷酸、纳米颗粒、GCMS 标记分子、基因治疗剂、编码反义 RNA 的多核苷酸、荧光染料、阳性对照、阴性对照、小分子抗癌剂或编码核酶的多核苷酸的药剂。在一些实施方案中,所述多种药剂包含化疗剂。在进一步的实施方案中,化疗剂包含小分子药剂。在再进一步的实施方案中,小分子药剂的分子量小于 10^3 道尔顿。在其它一些实施方案中,所

述多种药剂包含抗癌剂。在一些情况下,两种或更多种药剂同时递送至所述实体组织内的相同区域。在一些情况下,两种或更多种药剂通过微透析探针相继递送至所述实体组织内的相同区域。

[0024] 关于任一上述方面,该方法可进一步包括对插入位点进行标记。在一些实施方案中,在递送药剂之后,用附接于探针的残余颜色标志物标记插入位点。在其它一些实施方案中,插入位点用至少一种位置标记物进行标记。在进一步的实施方案中,所述至少一种位置标记物包含染料。该染料可以是荧光染料。

[0025] 关于任一上述方面,药剂可以多个剂量递送至实体组织的相同区域。所述多个剂量中的任意两个可被选定的时间段分隔开。选定的时间段可以是至少约 10 分钟、20 分钟、30 分钟、40 分钟、60 分钟、80 分钟、90 分钟、120 分钟、6 小时、12 小时、24 小时、36 小时、48 小时、72 小时或 96 小时。选定的时间段可在约一小时至约三个月的范围内。

[0026] 关于任一上述方面,药剂可包含癌症治疗剂,并且评价可包括检测是否存在药物反应和 / 或至少一种生物标志物。药物反应或生物标志物的实例可包括但不限于细胞凋亡、下游蛋白质磷酸化、基因表达标志物、代谢标志物和其它 IHC 标志物。细胞凋亡可在离递送位点约 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 或约 5mm 以内的区域内检测到。细胞凋亡可在离递送位点约 0.001-0.1、0.1-0.5、0.5-1.0 或 1.0-5.0mm 的区域内可检测到。基于细胞凋亡选择药剂或取消对药剂的选择的阈值可取决于所用的癌症治疗剂和肿瘤的性质或大小。在一些实施方案中,如果与不含癌症治疗剂的对照相比,观察到少于约 1%、约 3%、约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 35%、约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95% 或约 100% 的细胞凋亡,则从进一步的评价中取消对该癌症治疗剂的选择。在其它一些实施方案中,如果与不含癌症治疗剂的对照相比,观察到多于约 1%、约 3%、约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 35%、约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95% 或约 100% 的细胞凋亡,则选择该癌症治疗剂进行进一步的评价。

[0027] 关于任一上述方面,受试者可以是动物或人。在评价药剂对实体组织的至少一种效果时,可基于该评价对药剂进行选择、取消选择或优先排序 (prioritized)。在一些实施方案中,基于该评价为临床试验选择药剂。在其它一些实施方案中,基于该评价从临床试验中取消对药剂的选择。受试者可以是多个受试者之一。在评价药剂对多个受试者的实体组织的至少一种效果时,可基于该评价对一些受试者进行选择、取消选择或优先排序。在一些实施方案中,基于该评价为药剂的临床试验选择一些受试者。在其它一些实施方案中,基于该评价从药剂的临床试验中取消对一些受试者的选择。所述效果的非限制性实例包括实体组织生理状态改变的存在或不存在和生物标志物的存在或不存在。

[0028] 另一方面,本发明提供了一种用于将多种药剂递送至受试者的实体组织的装置,其包含多个微透析探针。该装置可进一步包含以下的任一项:(1) 多个针,每个针配置成接纳所述多个微透析探针中的一个;(2) 至少一个控制器,其可操作地耦接至所述多个针;和(3) 引导装置,用于引导所述多个针插入所述实体组织。该装置可包含至少 3、4、5、6 或 10 个微透析探针或针。在一些实施方案中,控制器是计算机。该计算机可用于控制微透析探针的插入和药剂的注射。在一些进一步的实施方案中,该计算机是云计算系统的一部分。

[0029] 另一方面,本发明提供了一种装置,其包含具有第一多个孔的顶部区块,该孔的大小允许针穿过该顶部区块,以及具有第二多个孔的底部区块,该孔的大小允许针穿过该底部区块,其中顶部和底部区块处于基本平行的布置,并且其中第一和第二多个孔被定位为允许一个或多个针以基本垂直于两个区块平面的路径穿过顶部区块和底部区块中的孔。该装置可进一步包含至少一个可调节支腿,其中所述至少一个可调节支腿附接于底部区块上。支腿的数目可以是至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20 个或甚至更多。在一个示例性的实施方案中,有 4 个支腿。在一些实施方案中,支腿在垂直和水平方向是可调节的。底部区块和顶部区块可独立地是固定的或活动的。在一些情况下,该装置的底部区块是固定的,而顶部区块可相对于底部区块垂直移动。在一些进一步的实施方案中,顶部区块沿着附接于底部区块上的导杆移动。任何区块的移动可以受到控制。例如,系统可以附接于该装置上以控制顶部区块的垂直移动。

[0030] 在一些实施方案中,第一和第二多个孔以基本平行的行布置。该装置可进一步包含至少一个针。在一些实施方案中,控制附件附接于至少一个针上。该控制附件可使所述至少一个针的插入停止,从而控制针插入实体组织的深度。此外,该装置可进一步包含至少一个弹簧,其中所述至少一个弹簧与可调节支腿和底部区块实质性接触。

援引并入

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

附图说明

[0032] 图 1 是根据各实施方案用于向生物组织注射药剂的针阵列组装件的示意图。

[0033] 图 2 示出了体现本发明原理的示例性装置。

[0034] 图 3 示出了体现本发明原理的、采用弹簧进行肿瘤稳定化的平台的实例。

[0035] 图 4 示出了体现本发明原理的、具有控制附件的针的俯视图。

[0036] 图 5 示出了体现本发明原理的、具有用于控制顶部区块垂直移动的驱动机构的示例性装置。

[0037] 图 6 图示了说明本发明原理的肿瘤的一部分。

[0038] 图 7 示出了体现本发明原理的、采用微透析探针的线性阵列靶向能表达感兴趣的靶标 (c-Met) 的活 EBC-1 肿瘤上皮的实例。

[0039] 图 8 示出了体现本发明原理的、采用长微透析膜体内监测实体瘤内多个区域 / 微环境的示意性实例。

[0040] 图 9 示出了体现本发明原理的、采用微透析探针确定剂量的示意图。通过使药物的连续环路运行固定的时间,可以收集来自管道的总透析液,并用 HPLC、荧光度 / 吸光度等进行分析,以确定通过被动扩散递送的治疗剂的量。

[0041] 图 10 示出了体现本发明原理的、检测按特定顺序给予的抗癌药的功效的示意图。在第一剂量中,在接触抑制的低增殖区中细胞周期 / 信号传导得到激活。一段时间后并且从微透析管道中清除第一药物之后,施用能阻滞并杀死正在进行活跃分裂的细胞的第二药物。

[0042] 图 11 示出了体现本发明原理的、采用挤出 / 注射技术靶向实体瘤模型中增殖区和

其它区二者的示意图。

[0043] 图 12 示出了体现本发明原理的、使用微透析探针在肿瘤中递送的近红外 (NIR) 染料的荧光成像。A、B、C 和 D 表示不同的截面。

[0044] 图 13a 和 13b 示出了体现本发明原理的、通过微透析探针递送的药物诱发了空间受限的药物特异性肿瘤细胞死亡。

[0045] 图 14 示出了体现本发明原理的、两种注射方法在效率 (14a)、信号均一性 (14b) 和柱长度 (14c) 的结果。

[0046] 图 15 示出了体现本发明原理的、三种不同注射方法的每个切片中阳性区域的平均数。

[0047] 图 16 示出了三种不同注射方法的切片之内的平均方差。

[0048] 图 17 示出了体现本发明原理的、用简化的实验系统评价不同注射方法的结果。

[0049] 图 18 示出了体现本发明原理的、三种不同注射方法的荧光显微镜检查图像。

发明详述

总体概述

[0050] 包括癌症治疗剂在内的治疗剂的临床试验极其昂贵且耗时。因此,在该过程中尽早有效地筛选具有相对较大潜能的药剂是很重要的。经历这种筛选的药剂有时被称为候选药剂。一种筛选方法包括使肿瘤细胞在人工环境下在含有生长培养基的塑料细胞培养板上生长,然后将每种候选药剂置于各自的细胞培养板或皿中。随后对细胞培养物评价细胞生长的指标。看起来似乎阻碍了癌细胞生长和 / 或能与生物靶标结合的药剂可随后继续进行进一步的研究。

[0051] 然而,出于多种原因,此方法只低限度地有效。首先,细胞培养物对患者体内肿瘤生长的模拟较差。从这些研究中只能搜集到最一般的信息,因为试验条件根本不类似于癌症正常存活和生长的条件以及其被治疗性处理的条件。因此,像所述的那些筛选试验对这些是无效的。其次,为了实验室应用而对肿瘤进行永生化的过程可以改变肿瘤的反应特性。此过程包括将肿瘤基本上做成泥状,这彻底摧毁了任何结构差异,并且可能导致癌症对一些在体内对相同品系无效果的药剂敏感,从而导致假阳性,即使此类药剂对治疗患者的癌症可能是无用的。第三,相同的还原过程也可以产生假阴性,其中一些药剂可能在体外无法抑制细胞生长,但在体内对治疗同一种癌症是有效的。最后,甚至在药剂在治疗特定癌症类型、亚型、变体、品系等中的一般功效已得到证明的情况下,特定患者的癌症对该药剂完全没有反应也并不是罕见的。

[0052] 本发明人已经认识到,需要精确定位药剂和 / 或控制药剂在体内递送到实体组织中的量并且随后确定该药剂在实体组织中的位置。如果能够达到这样的精度,那么在研究和治疗中的显著益处就可以实现。例如,除了其它差异,许多肿瘤在本质上是异质的,具有休眠性内区和增殖性外区。靶向实体瘤的增殖区以评估靶向有丝分裂和有丝分裂检查点和 / 或在增殖区较为活跃的途径 (例如, C-Met 和 AKT) 的药物可能是重要的。因此,允许在整个实体瘤内评价治疗剂的方法可能是非常有价值的。

[0053] 本发明提供了用于将药剂递送至实体组织,特别是体内递送至实体瘤的方法和装置。通常,以提高的精确度、均一性和剂量控制将一种或多种药剂递送至实体组织。此后,药剂在实体组织内保持选定的一段时间。然后在体内或体外监测药剂对实体组织的效果。基

于观察到的效果,针对患者治疗的进一步研究或考虑选择各药剂或取消对各药剂的选择,针对该患者的实体组织已对候选药物进行了评价。

[0054] 药剂通常溶解在溶液中并递送至实体组织内的靶位点。递送的流体的体积可以是微乎其微的,远小于当全身递送时在受试者中产生可检测效果所需的最小剂量。然而取决于药剂,其效果可在紧接递送位点周围的非常小的区域内检测到。因此,可将候选的有效药剂(例如,原位)注入肿瘤,而没有损害受试者的危险。此外,显著数量的不同药剂可以同时递送至肿瘤内各自的递送轴。

[0055] 本文所述的程序可用来解决导致开发有效的癌症疗法的花费和延迟的若干问题和困难。例如,由于候选药剂是体内递送的,肿瘤不受另外的干扰,并且药物浓度可接近通过全身施用该药物所达到的水平,因此其对各药剂的反应将倾向于指示其在暴露于治疗有效量的该药剂时的反应。假阳性和假阴性的发生率显著降低。其次,由于相对大量的药剂可递送至肿瘤而对受试者无显著危险,因此在测试过程早期使用该程序筛选大量候选药剂是实用的,或许也能为其它研究排除那些表现出最差前景的药剂,标记出最有前景的药剂,或对候选物进行优先排序以用于进一步的研究。第三,还是因为大量药剂可递送至肿瘤,所以针对对特定药剂的响应可筛选出潜在的研究受试者,从而减少或排除了具有特异性响应的受试者的数目。第四,由于药剂被局部递送至实体组织,因此可以避免药剂的全身性暴露。

[0056] 因此,例如,某些实施方案涉及在低流速下以低剪切力直接将药物递送至实体组织,该剪切力能消除或减少对组织的机械化学损伤,而同时允许向限定的病灶位点的精确靶向治疗剂递送。在实体组织中比在全身递送该药剂时可达到显著更高的药剂浓度。换言之,达到期望的药理效果所需要的药剂的量将比全身递送该药剂的情况更低,并且在某种情况下低得多。在一些情况下,药剂在所述实体组织之外检测不到。在其它一些情况下,在实体组织之外(例如,在体循环中)检测到小于10%的药剂。在其它一些情况下,一旦递送,药剂在实体组织中以治疗有效浓度存在。实体组织中药剂的治疗有效浓度可以通过口服该药剂来实现。但是,全身性药剂暴露,往往是在高浓度下,是必需的。因此,本发明公开的实施方案克服了与施用过高全身浓度的药剂以在期望的实体组织中获得治疗有效浓度相关的问题(例如,毒性、有害副作用等)。

[0057] 一方面,本发明提供了用一个或多个微透析探针在实体组织中递送和评价一种或多种药剂的方法。插入的微透析探针的数目可以是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、20、25或30个。在一些情况下,同时插入至少其中一些微透析探针。在其它一些情况下,相继插入至少其中一些微透析探针。微透析探针可沿轴插入。该轴可以是多个平行轴中的一个。轴的数目可以是至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少12个或至少15个。轴的数目可以是约3、4、5、6、7、8、9、10、12或15个。插入之后,药剂可通过穿过微透析探针扩散来递送至实体组织。药剂可通过微透析探针的膜区域扩散,从而沿着实体组织中的递送轴将药剂递送至圆柱形区域。

[0058] 微透析探针中的每一个可含有不同于任何其它探针的药剂。或者,其中一些微透析探针可含有与至少另一个微透析探针相同的药剂。当两个或更多个微透析探针在灌注液中含有相同药剂时,不同探针中的药剂浓度可以相同或不同。

[0059] 药剂可以连续的方式递送至实体组织。在一些情况下,递送可持续约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、200、220、240、260、280、

300、320、340、360、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、2000、2200、24000、2600、2800、3000 分钟、3 天、4 天、5 天、6 天、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、2 个月、3 个月、4 个月、6 个月、8 个月、9 个月、1 年或 2 年。

[0060] 药剂可以多个剂量递送至实体组织。多个剂量中的至少两个可被预定的时间段分隔开。预定的时间段可以是约 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、2000、2200、24000、2600、2800、3000 分钟、3 天、4 天、5 天、6 天、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、2 个月、3 个月、4 个月、6 个月、8 个月、9 个月、1 年或 2 年。

[0061] 每个微透析探针中药剂的流速可被独立地控制。该流速可以独立地是至少 $0.001 \mu\text{l}/\text{min}$ 。在一些实施方案中,该流速独立地是在约 $0.001 \mu\text{l}/\text{min}$ 至约 $5 \mu\text{l}/\text{min}$ 的范围内。在一些实施方案中,该流速独立地是约 0.001、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9 或 $5.0 \mu\text{l}/\text{min}$ 。

[0062] 微透析探针可用针阵列装置插入。针阵列装置可含有多个针。在一些情况下,针阵列装置含有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 个或甚至更多个针。所述针的每一个可配置成接纳至少一个微透析探针。在一些情况下,每个针沿多个平行轴中的一个插入。插入微透析探针并将其放置在实体组织中,随后退出针,而将微透析探针留在实体组织中。

[0063] 该方法可进一步包括评价药剂对实体组织的效果的步骤。在一些情况下,此类评价包括检测每种药剂在实体组织的不同区域中的活性或毒性。在其它一些情况下,此类评价包括检测两种或更多种药剂在实体组织的相同区域中的活性或毒性。当将两种或更多种药剂递送至相同区域时,它们可以同时或相继递送。在其它一些情况下,此类评价包括检测不同浓度的相同药剂在实体组织的相邻区域中的活性或毒性。在进一步的实施方案中,此类评价包括检测三种或更多种药剂在实体组织的相同区域中的活性或毒性。

[0064] 另一方面,本发明提供了一种将两种或更多种药剂递送至受试者的实体组织的方法,其包括:(a) 向所述受试者全身施用所述两种或更多种药剂中的至少一种;和 (b) 用至少一个微透析探针或至少一个针将所述两种或更多种药剂中的至少一种递送至所述实体组织,其中 (a) 中施用的所述药剂不同于 (b) 中递送的所述药剂。在一些情况下,步骤 (a) 在步骤 (b) 之前进行。在其它一些情况下,步骤 (a) 在步骤 (b) 之后进行。该方法可进一步包括评价药剂对实体组织的效果的步骤。步骤 (a) 中的药剂可口服或通过注射施用。

[0065] 另一方面,本发明提供了一种将一种或多种药剂递送至实体组织的方法,其包括:(a) 将一个或多个针插入实体组织;和 (b) 通过将一个或多个针从实体组织中退出并将一种或多种药剂注入该实体组织,而将一种或多种药剂递送至该实体组织。该方法可进一步包括评价一种或多种药剂对实体组织的效果。

[0066] 一种或多种药剂的注射和一个或多个针的退出可相继或同时进行。在一些实施方案中,一种或多种药剂的注射和一个或多个针的退出同时进行。此外,由于药剂被递送至空

的空间,而不是强行穿过实体组织,因此药剂交叉污染的可能性大大减小。

[0067] 一种或多种药剂的注射速率和一个或多个针的退出速率可分开控制。注射速率可在 0.1–5.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的范围内。在一些实施方案中,注射速率为至少约 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 或约 5.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。在其它一些实施方案中,注射速率为约 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 0.91 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 1.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 2.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 3.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、约 4.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 或约 5.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。在其它一些实施方案中,注射速率在 0.1–1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、0.5–1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、1.0–2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、2.0–3.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、3.0–4.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 或 4.0–5.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的范围内。

[0068] 一个或多个针的退出速率可在 0.1–10mm/min 的范围内。在一些实施方案中,一个或多个针的退出速率为至少约 0.1mm/min、约 0.2mm/min、约 0.3mm/min、约 0.4mm/min、约 0.5mm/min、约 0.6mm/min、约 0.7mm/min、约 0.8mm/min、约 0.9mm/min、约 1.0mm/min、约 1.1mm/min、约 1.2mm/min、约 1.3mm/min、约 1.4mm/min、约 1.5mm/min、约 1.6mm/min、约 1.7mm/min、约 1.8mm/min、约 1.9mm/min、约 2.0mm/min、约 2.1mm/min、约 2.2mm/min、约 2.3mm/min、约 2.4mm/min、约 2.5mm/min、约 2.6mm/min、约 2.7mm/min、约 2.8mm/min、约 2.9mm/min、约 3.0mm/min、约 3.1mm/min、约 3.2mm/min、约 3.3mm/min、约 3.4mm/min、约 3.5mm/min、约 3.6mm/min、约 3.7mm/min、约 3.8mm/min、约 3.9mm/min、约 4.0mm/min、约 4.1mm/min、约 4.2mm/min、约 4.3mm/min、约 4.4mm/min、约 4.5mm/min、约 4.6mm/min、约 4.7mm/min、约 4.8mm/min、约 4.9mm/min、约 5.0mm/min、约 5.1mm/min、约 5.2mm/min、约 5.3mm/min、约 5.4mm/min、约 5.5mm/min、约 5.6mm/min、约 5.7mm/min、约 5.8mm/min、约 5.9mm/min、约 6.0mm/min、约 6.1mm/min、约 6.2mm/min、约 6.3mm/min、约 6.4mm/min、约 7.0mm/min、约 8.0mm/min、约 9.0mm/min 或 10.0mm/min。在其它一些实施方案中,一个或多个针的退出速率为约 0.1mm/min、约 0.2mm/min、约 0.3mm/min、约 0.4mm/min、约 0.5mm/min、约 0.6mm/min、约 0.7mm/min、约 0.8mm/min、约 0.9mm/min、约 1.0mm/min、约 1.1mm/min、约 1.2mm/min、约 1.3mm/min、约 1.4mm/min、约 1.5mm/min、约 1.6mm/min、约 1.7mm/min、

约 1.8mm/min、约 1.9mm/min、约 2.0mm/min、约 2.1mm/min、约 2.2mm/min、约 2.3mm/min、约 2.4mm/min、约 2.5mm/min、约 2.6mm/min、约 2.7mm/min、约 2.8mm/min、约 2.9mm/min、约 3.0mm/min、约 3.1mm/min、约 3.2mm/min、约 3.3mm/min、约 3.4mm/min、约 3.5mm/min、约 3.6mm/min、约 3.7mm/min、约 3.8mm/min、约 3.9mm/min、约 4.0mm/min、约 4.1mm/min、约 4.2mm/min、约 4.3mm/min、约 4.4mm/min、约 4.5mm/min、约 4.6mm/min、约 4.7mm/min、约 4.8mm/min、约 4.9mm/min、约 5.0mm/min、约 5.1mm/min、约 5.2mm/min、约 5.3mm/min、约 5.4mm/min、约 5.5mm/min、约 5.6mm/min、约 5.7mm/min、约 5.8mm/min、约 5.9mm/min、约 6.0mm/min、约 6.1mm/min、约 6.2mm/min、约 6.3mm/min、约 6.4mm/min、约 7.0mm/min、约 8.0mm/min、约 9.0mm/min 或 10.0mm/min。在其它一些实施方案中,一个或多个针的退出速率在 0.1-1.0mm/min、0.5-1.5mm/min、1.0-2.0mm/min、1.5-2.5mm/min、2.0-3.0mm/min、2.5-3.5mm/min、3.0-4.0mm/min、3.5-4.5mm/min 或 4.0-5.0mm/min 的范围内。

[0069] 另一方面,本发明提供了一种用于将多种药剂递送至受试者的实体组织的装置,其包含多个微透析探针。该装置可进一步包含以下的任一项:(1) 多个针,每个针配置成接纳所述多个微透析探针中的一个;(2) 至少一个控制器,其可操作地耦接至所述多个针;和(3) 引导装置,用于引导所述多个针插入所述实体组织。该装置可包含至少 3、4、5、6 或 10 个微透析探针或针。在一些实施方案中,控制器是计算机。该计算机可用于控制微透析探针的插入和药剂的注射。在一些进一步的实施方案中,该计算机是云计算系统的一部分。

[0070] 另一方面,本发明提供了一种用于控制针向实体组织内的插入和从实体组织中的退出的装置,其包括:(a) 定位机构;(b) 深度控制机构;和(c) 退针机构。

[0071] 在又一方面,提供了一种用于将至少一种药剂递送至实体组织的装置,其包含处于基本平行的布置的一个底部区块和一个顶部区块,其各自具有多个孔。底部和顶部区块中的多个孔可引导针的插入。在一些情况下,可控制孔的大小以允许特定尺寸的针通过。该装置可导致提高的针插入精度,以及对至少一种药剂向实体组织的递送的精巧控制。

[0072] 如本文使用的术语“协同活性或毒性”是指两种或更多种药剂的协调的活性或毒性,以致于其联合作用大于各药剂单独起作用的总和。协调的活性或毒性可比各药剂单独起作用的总和至少约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90% 或更多。

[0073] 如本文使用的术语“加成的活性或毒性”是指两种或更多种药剂的活性或毒性,以致于其联合作用约等于各药剂单独起作用的总和。

[0074] 如本文使用的术语“约”是指 $\pm 10\%$, 并且包括 $\pm 1\%$ 和 $\pm 0.1\%$ 。

[0075] 如本文使用的术语“治疗有效浓度”是指当在实体组织中观察到期望的药理效应时,药剂在实体组织中的浓度。例如,对于口服递送的抗癌药而言,药物需要经历吸收过程才能进入体循环。吸收后,药物随后进入实体组织或在其中积聚。当观察到期望的药理效应时,实体组织和体循环中的药物浓度可能是相同的或不同的。

[0076] 如本文使用的术语“预定的时间段”或“选定的时间段”是指在 1 分钟至 2 年的范围内的任意时间。在一些实施方案中,所述预定的时间段或选定的时间段为约 0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18、24、36、48、72、96、120、144、168 或 192 小时。在其它一些实施方案中,所述预定的时间段或选定的时间段在约 24-72 小时的范围内。

微透析探针

[0077] 本发明提供了通过使用一个或多个微透析探针向实体组织施用药剂的方法。在一些情况下,微透析探针具有入口管、出口管和膜区域。输入管中的溶液被称为“灌注液”,而输出管中的溶液被称为“透析液”。输入和输出管可由适合于微透析应用的材料制成。在一些实施方案中,该材料是熔融石英。在其它一些情况下,微透析探针具有输入管和膜区域,而无输出管。在这种设计中,药剂可被主动泵送穿过膜区域。

[0078] 本发明人认识到使用微透析探针作为递送工具的优势,其包括:(1) 微透析探针是封闭的系统,不依赖于液体体积的递送,因此能消除许多微流体工程障碍;(2) 探针周围的半透膜允许液体在注入实体组织中时沿着探针膜均匀地填充并分布;(3) 药剂的初始递送和生物分布高度受限,并且依赖于被动扩散力,而不是液体的沉积/递送;(4) 可通过控制灌注液的时间、流速和浓度来实现药剂的真正的“微给药”;(5) 可通过将探针留在实体组织中实现在一段延长的时间内多次给药或定时给药;(6) 可通过分析灌注液和透析液中药剂的量来精确确定递送的药剂的量;(7) 可定制探针/半透膜的长度,以靶向不同尺寸的肿瘤或肿瘤内不同长度的靶向区域;(8) 可设计线性微透析探针的阵列,以靶向实体瘤异种移植物中的增殖区,以及避免了中心区域坏死;(9) 使用线性探针阵列可以实现在多个区域(包括在实体瘤的整个维度)中更好的采样,以寻找功效差异;和(10) 在给药后不同时间点收集和分析透析液可允许开发和分析肿瘤细胞死亡、细胞信号改变或增殖/有丝分裂改变的标志物。此外,微透析探针可用于诱使接触抑制的细胞进入细胞周期,从而利用检查点抑制/DNA 损伤将其杀死,或者激活已在非增殖区中关闭的细胞信号途径。

[0079] 微透析探针可适合于容纳、施用、递送和转运内容物。内容物可以是包含含有一种或多种药剂的药物组合物的水溶液。单个微透析探针内的药剂可以是相同的或是不同类型药剂的混合物。在多个微透析探针内,各微透析探针可含有与另一个探针相同的药剂,或与另一个探针不同的药剂。在一些实施方案中,每个微透析探针含有的药剂与其它微透析探针中所含的药剂相比是独特的。

[0080] 微透析探针可具有不同的形状。在一些情况下,微透析探针具有“Y”型。在其它一些情况下,微透析探针具有线型。线型可允许微透析探针穿过肿瘤的不同部分。

[0081] 微透析探针的膜可以是半透性的。该膜可允许一些但不是所有溶质的转运。在一些实施方案中,该膜允许分子量小于1百万道尔顿的溶质的转运。在进一步的实施方案中,该膜允许分子量在5,000道尔顿至1百万道尔顿范围内的溶质的转运。在另一个进一步的实施方案中,该膜允许分子量小于1,000道尔顿的溶质的转运。

[0082] 物质或药剂从膜的一侧向另一侧的移动可由浓度梯度驱动。在一些情况下,物质或药剂从膜的一侧向另一侧的移动仅由浓度梯度驱动。物质或药剂可透过半透膜从较高浓度区域移动到较低浓度区域。在一些情况下,药剂从微透析探针扩散到实体组织内。在其它一些情况下,实体组织中的溶质扩散到微透析探针内。溶质可从透析液中收集和/或进行分析。或者,物质或药剂的移动可由主动转运物驱动,而与浓度梯度无关。例如,事实上,一些细胞使用主动转运物来积聚分子,诸如离子、葡萄糖和氨基酸。或者,物质或药剂的移动可由溶解度差异驱动。物质或药剂可在膜的一侧具有比在另一侧的溶解度更高的溶解度。在一些情况下,物质或药剂从较高浓度的一侧移动到较低浓度的一侧。在一些实施方案中,物质或药剂从较低浓度的一侧移动到较高浓度的一侧。在一些情况下,物质或药剂从膜的一侧向另一侧的移动由浓度梯度、主动转运和溶解度差异中的任一种的组合所驱动。

[0083] 膜可以是生物相容的。膜可以是基本上无生理活性的或不会引发生理学事件的。在一些实施方案中,膜可能不会导致炎症、免疫应答、感染或实体组织内任何其它类型的排斥。

[0084] 膜可以是柔性的。膜的柔性将允许膜部分插入实体组织内,而对组织的损伤最小。然而,膜可具有一定的强度,以在插入之前、过程中或之后保持其完整性。在一些实施方案中,膜兼具柔性和耐用性。

[0085] 膜材料可以是聚合的或共聚的。聚合或共聚材料可以是线性的或交联的。膜材料的非限制性实例包括 PE(聚乙烯)、凯夫拉(Kevlar)、铜纺、聚醚砜、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、多晶硅氧化物、醋酸纤维素和多环芳香族材料。

[0086] 膜材料可以是多孔的。在一些实施方案中,平均孔径小于约 1、5、10、20、30、40、50、100、200、500、1000、2000、5000 或 10000 纳米。在其它一些实施方案中,平均孔径大于约 1、5、10、20、30、40、50、100、200 或 500 纳米。在其它一些实施方案中,平均孔径在 1-10、1-40、1-100、1-200 或 1-500 纳米的范围内。在其它一些实施方案中,膜的所有孔都具有基本相似的孔径。

[0087] 孔径可控制扩散速率。可调节孔径以控制扩散速率。出于控制扩散速率的目的,可将膜制成具有选定的平均孔径。药剂的不同药物组合物可以不同的速率扩散通过膜,部分地通过药物组合物、药剂和膜材料的理化性质进行控制。在一些实施方案中,选定的孔径允许分子量小于 1 百万道尔顿的溶质的转运。在进一步的实施方案中,选定的孔径允许分子量在 5,000 道尔顿至 1 百万道尔顿范围内的溶质的转运。在另一个进一步的实施方案中,选定的孔径允许分子量小于 1,000 道尔顿的溶质的转运。此外,可以制备具有不同平均孔径的膜并通过实验进行测试,以找到能为特定药物组合物或药剂提供所期望的扩散率的孔径。

[0088] 药物组合物或药剂可通过使用泵如蠕动泵或注射泵来递送至微透析探针。使用泵可导致受控的递送。例如,药剂或药物组合物可通过微透析探针以连续的方式递送。或者,药剂或药物组合物可以若干个剂量递送。任意两个剂量之间的时间间隔是可以控制的。此外,可单独控制各个微透析探针的流速。流速可在约 0.1 至约 5 微升/分钟的范围。流速可为约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 或约 5 微升/分钟。

[0089] 微透析探针可直接或间接插入实体组织内。间接插入可包括以下步骤:(1) 将微透析探针插入针中;(2) 将针插入实体组织内;和(3) 将针从实体组织中退出,因此将微透析探针留在实体组织中。在一些情况下,多个微透析探针随着多个针沿多个轴插入实体组织而被插入实体组织中。多个针中的每一个容纳多个微透析探针中的一个。在一些实施方案中,多个轴是多个平行轴。在一些实施方案中,多个针是针阵列装置的一部分。针阵列装置可包含至少 2、5、10 个或甚至更多个针。

[0090] 此外,本发明提供了一种具有输入管而没有输出管的微透析探针。在一些实施方案中,探针的末端被半透膜包围。在此设计中,微透析探针可作为扩散器,在其中液体和小分子被主动泵送穿过半透膜。

[0091] 微透析探针的插入可受到引导。在一些实施方案中,微透析探针的插入由固定引

导器引导,从而将微透析探针的插入引导至实体组织的选定区域。在一些实施方案中,微透析探针的插入由关节镜装置引导。

[0092] 本发明还提供了一种监测实体组织内的药物代谢和响应的方法。例如,但不是限制性的,微透析探针可以是闭合环路的一部分。微透析探针的膜部分可跨越实体组织。通过使药剂溶液连续流过微透析探针一段选定的时间,可将药剂递送至实体组织。在另一段选定的时间过后,另一种溶液(例如,盐水)可流过微透析探针。例如,但不是限制性的,可在透析液中收集实体组织中的溶质并进行分析。溶质的非限制性实例包括生物标志物、递送至实体组织的药剂和递送至实体组织的药剂的代谢物。通过分析溶质的存在与否和/或浓度,可确定药剂对实体组织的功效。

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药剂的方法。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(包括扁桃腺)、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] 在一些实施方案中,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,该肿瘤包括选自腺瘤、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。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 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 (2008 *Pathobiology* 75:104); *Curr. Drug Discov. Technol.* 5:9) 和 Auman 等人 (2008 *Drug 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,在某些进一步的实施方案中,受试者是临床前模型或人类患者之一。

[0095] 某些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、长尾黑颚猴、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, Talmadge 等人, 2007 *Am. J. Pathol.* 170:793 ; Kerbel, 2003 *Canc. Biol. Therap.* 2(4Suppl1):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。

[0097] 本发明的方法适用于向多种动物组织施用药剂; 因此这些方法具有医学和兽医学用途。在一些实施方案中, 该动物组织是软组织。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。在一些实施方案中, 该动物是爬行动物、两栖动物、鸟类或哺乳动物。在一些实施方案中, 该动物是哺乳动物。在一些实施方案中, 该动物是小鼠。在一些实施方案中, 该动物是人。在一些实施方案中, 该动物是宠物、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, 靶组织不表现出疾病的特征, 但是可以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药剂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) 或生物样品中的状况、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的参数, 该生物样品允许检测来自受试者或生物来源的生物样品中改变的 (例如, 相对于适当的对照以统计学显著的方式可测量地改变的) 结构或功能。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。

[0099] 改变的生理状态可进一步指任何状况或功能, 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。

药剂

[0100] 在一些实施方案中，药剂包括选自以下的药剂：(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 和编码多核苷酸中的一种；(g) 反义 RNA 和编码多核苷酸中的一种；(h) 核酶和编码多核苷酸中的一种；(i) 可检测标记物；(j) 治疗性蛋白质、肽、多肽和拟肽中的一种；(k) 抗血管生成剂；(l) 表观遗传修饰剂；(m) 抗体-药物偶联物；(n) 激酶抑制剂；和 (o) 优先在癌细胞中表达的代谢途径靶标的抑制剂。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，该药剂选自 (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。抗血管生成剂的实例包括但不限于贝伐珠单抗和开发中的其它药剂。表观遗传修饰剂的实例包括但不限于阿扎胞苷和地西他滨以及开发中的其它药剂。小分子可以是具有明显细胞毒性的药剂。

[0101] 药剂可以溶解或悬浮在水溶液中作为可递送至靶组织的混合物或胶体。当用来指代通过微透析探针或针递送的药剂时，术语药剂在广义上解读为能够流经此类微透析探针或针的任何物质，包括液体、气体、胶体、悬浮的固体等。

[0102] 在一些实施方案中，该药剂是候选的肿瘤学药剂。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)）。治疗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。

[0103] 在筛选方法中使用以及在为了开发治疗剂而对其进行评定的方法中使用的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被称为“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。

[0104] 例如,受试化合物文库的多个成员可作为治疗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,这通过将每种治疗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。

[0105] 药剂进一步可以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、EP0774464、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。其它药剂可以是蛋白质(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, 1997 Elsevier, NY。

[0106] 在一些实施方案中,该药剂是小分子药剂。如本文所用的术语“小分子药剂”是指具有小于约 1000 道尔顿、小于约 800 道尔顿或小于约 500 道尔顿的分子量的药剂。在一些进一步的实施方案中,小分子药剂是抗癌剂。该抗癌剂可以是目前市场上的已批准的抗癌药、目前处于临床试验中的抗癌药、由于毒性或缺乏有效性而退出临床试验或市场的抗癌药或开发中的早期抗癌药。

[0107] 其它药剂可以是抗体,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、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)。

[0108] 用于治疗用途的药理学上可接受的载体是药理学领域所熟知的,并且在例如 Remington's 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。此外,可使用抗氧化剂和悬浮剂。“药理学上可接受的盐”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)相组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。

[0109] 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。

[0110] 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。将要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。一剂药剂包含全部或一部分治疗有效量的特定药剂,该药剂将以足以达到或维持期望的药剂浓度范围(例如,实体组织中紧邻递送微透析探针或针处的药剂的期望浓度范围)的某种方式在一段时间内施用,并且其中包含一个剂量的药剂的绝对量将根据药剂、受试者、实体组织和熟练从业者基于医学和药理学及相关领域的状况将会熟悉的其它标准而不同。在某些实施方案中,可施用药剂的至少两个剂量,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。

[0111] 本文使用的液体药物组合物,无论是溶液形式、悬浮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。

[0112] 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不同。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-lactide 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。

[0113] 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。

位置标记物

[0114] 某些实施方案考虑将多种药剂、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物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。

[0115] 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动物组织后对染料进行成像,以观察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,该染料是荧光染料。在一些实施方案中,该染料是放射性染料。

[0116] 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下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。位置标记物是已知的,作为非限制性实例,包括金属或塑料夹、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, 2007 *Canc. 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的信号。

[0117] 在一些实施方案中，微透析探针用作位置标记物。在将药剂递送至实体组织后，可沿着基本上垂直于微透析探针的插入轴的平行平面将实体组织切片。剩余的微透析探针可用作位置标记物。

[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气相色谱“签名”而被鉴别的方式添加到本文描述的装置的单个储器中，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。

[0119] 某些其它实施方案考虑使用有色的微透析探针或针作为位置标记物。例如，当微透析探针用于递送药剂时，可牵拉附接于探针上的有色蜡通过实体组织以标记注射区，用于接下来的组织学切片分析。

装置

[0120] 在一方面，本发明提供了一种用于将多种药剂递送至受试者的实体组织的装置，该装置包含多个微透析探针。该装置可进一步包含以下的任一项：(1) 多个针，每个针配置成接纳所述多个微透析探针中的一个；(2) 至少一个控制器，其可操作地耦接至所述多个针；和 (3) 引导装置，用于引导所述多个针插入所述实体组织。该装置可包含至少 3、4、5、6 或 10 个微透析探针或针。在一些实施方案中，控制器是计算机。该计算机可用于控制微透析探针的插入和药剂的注射。在一些进一步的实施方案中，该计算机是云计算系统的一部分。

[0121] 在另一方面，本发明提供了用针阵列装置递送一种或多种药剂的方法。在一些情况下，针阵列装置用于将多个微透析探针插入实体组织。在其它一些情况下，针阵列装置用于通过以下步骤递送多种药剂：(1) 将多个针插入实体组织；和 (2) 从实体组织中退出一个或多个针并将一种或多种药剂注入实体组织，从而将一种或多种药剂递送至实体组织。

[0122] 针阵列装置可包含多个针和多个储器。针阵列装置可包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、30 个或甚至更多个针。针阵列装置可包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、30 个或甚至更多个储器。在一些实施方案中，所述多个储器中的每一个与多个针中的单独一个单独流体连通。针阵列装置可进一步包含一个或多个驱动器。可驱动所述一个或多个驱动器以产生负压或正压。针阵列装置可进一步包含一个或多个控制器。该控制器可控制针插入的深度，并因此控制微透析探针插入的深度。Bahrami 等人的 W02009/023798 中描述了针阵列装置的一个实例，并通过引用整体并入本文。

[0123] 参见图 1，显示了针阵列组装件 100，其包括多个针 112、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就位,并且柱塞也可操作地耦接,以便固定就位并可同时致动。多个针 112 中的每一个与多个储器 114 中的单独一个流体连通,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 中的单独一个中。控制器 102 与多个柱塞 116 中的每一个的第二端可操作地耦接。该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。

[0124] 尽管最近关于利用针阵列装置注入药剂有所进展,但仍存在对降低潜在平台可变性的需求。平台可变性可导致错过注射、不等的药剂沉积、交叉污染或其组合。平台可变性的潜在来源可包括:(a) 肿瘤环境;(b) 注射系统;(c) 操作者技术。其中,注射系统和操作者技术的来源可以是可固定的和可控的。对这两方面的改善可导致用于递送药剂的改进的方法,例如,改善的精度和窄的生物分布。

[0125] 在一方面,本发明提供了一种用于控制针插入实体组织和从实体组织中退出的装置,该装置包含:(a) 定位机构;(b) 深度控制机构;和(c) 退针机构。

[0126] 定位机构是用于引导针插入的机构。针的插入可由孔来引导。孔可将针引导至插入位点。通过孔设置的物理边界可提高针插入的精度。在一些实施方案中,每个孔仅容纳一个针。

[0127] 深度控制机构是用于控制针插入深度的机构。深度控制机构可以是可调节的,以控制针插入的深度。在一些实施方案中,附件附接至针的一端。沿着针的附件的位置可以是可调节的。在与孔接触后,附件可停止针的进一步插入。

[0128] 退针机构可包含驱动机构。驱动机构可以是可控的。其可以某一可控速度移动。驱动机构可以可操作地连接至定位机构并控制针退出的速度。

[0129] 在另一方面,提供了一种用于将至少一种药剂递送至实体组织的装置,该装置包含处于基本平行的布置的一个底部区块和一个顶部区块,每一个具有多个孔。底部区块和顶部区块中的多个孔可引导针的插入。在一些情况下,可控制孔的大小以允许特定大小的针通过。该装置可导致提高的针插入精度,以及对至少一种药剂向实体组织的递送的精巧控制。

[0130] 本文所述的实例和装置是说明性的而并非限制本发明的范围。

[0131] 图 2 描绘了体现本发明原理的一种类型的装置。该装置组装件包含导杆 201、具有控制附件的针 202、顶部区块 203、底部区块 204、平台 206、支腿 205 和顶部区块和底部区块中的孔 207。顶部区块 203 和底部区块 204 处于基本平行的布置。顶部区块 203 和底部区块 204 可由多种材料构成,包括但不限于金属和塑料。它们可以是透明的,并且可以具有一定的厚度。每个区块可具有表示为 207 的多个孔。每个区块中的孔可具有多种布置。在特定的实施方案中,每个区块中的孔形成基本平行的行。可以控制孔的数目以允许插入特定数目的针。每个区块中孔的数目可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、8、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400 和 500 个。如果需要,孔的数目可以是 1000 个或者甚至 2000 个。

[0132] 本发明意在利用任何和所有标准大小的针均是有用的。可独立地控制孔 207 的大小以允许特定规格的针通过它们。通常,顶部区块和底部区块中的孔以针的插入轨迹基本上垂直于它们的平面的方式对齐。在一些情况下,限定插入轨迹的两个孔(一个在顶部区

块中,一个在底部区块中)大小相同。此外,区块中孔的大小可以是一致的或不同的。当孔的大小一致时,使用相同大小的针。当孔的大小不同时,使用不同大小的针。

[0133] 如图 2 中所示,导杆 201 用于引导顶部区块的移动。导杆的数目可以是 1-10 的任何数字(包括 1 和 10)。在图 2 中,两个导杆 201 永久性地附接至底部区块 204。导杆 201 控制顶部区块 203 的移动轨迹。在一些情况下,导杆 201 基本上垂直于底部区块 204 和/或顶部区块 203。在一些情况下,导杆基本上彼此平行。在一些情况下,顶部区块 203 相对于底部区块 204 垂直地往返移动。除了如图 2 所示的永久性附件选项之外,还可设想多种其它附接导杆的方式,并且完全落在本发明的范围内。例如,非限制性地,可经由夹子将导杆附接至底部区块上,该夹子永久性地附接至底部区块的一侧。在这种具体配置中,导杆 201 和顶部区块 203 在需要时可以很容易地从装置上拆卸下来。

[0134] 此外,在图 3 中显示了位于底部区块 204 下方的平台 206。平台 206 为固定的底部区块 204 提供支撑。该平台可具有多种形状和配置,只要其为底部区块提供支撑即可。平台的一个示例性实例在图 3 中示出。该平台由 4 个支腿 205 组成,每个附接至底部区块 204 的一侧。支腿 205 的另一端附接至支撑面 208。支腿可以是圆柱形的、矩形的或正方形的。支腿可以具有任何形状,只要它们为底部区块 204 提供支撑即可。在一个特定的实施方案中,支腿在垂直和水平方向上是可调节的。将实体组织或受试者放置在装置中后,可调节的平台允许在插入针和注射至少一种药剂期间大大改善组织和/或受试者的稳定化。尤其是,与未使用该装置的注射相比,这导致更高的插入精度、更窄的生物分布和更少的样品交叉污染。可改变支腿的数目。支腿的数目可以是 1-12 的任何数字(包括 1 和 12)。

[0135] 回到图 3,其显示了根据一个实施方案用于实现实体组织和/或受试者稳定化的一种配置。弹簧 301 与支腿 205 以及底部区块 204 的一侧实质性接触。如果适当地调节支腿,则在将实体组织或受试者放置在该装置中后,在针插入和药剂注射过程中,来自弹簧的张力可以牢固地固定实体组织和/或受试者。

[0136] 图 4 示出了具有控制附件 402 的针的俯视图。在该图中,控制附件 402 基本上是正方形的,并且附接在针的周围。当接触顶部区块 103 中的孔的上表面后,控制附件 102 使针的进一步插入停止。控制附件 102 附接至针的位置是控制插入深度的关键因素之一。因为控制附件的功能是使针的插入停止,所以控制附件可以具有任何大小、形状、附件配置和材料,只要其能够使针的进一步插入停止即可。

[0137] 图 5 显示了体现本发明原理的一种具体类型的装置。除了图 2 中列出的组件外,还示出了用于控制顶部区块 203 的垂直移动的驱动机构 501。驱动机构 501 可发挥两种功能:(1) 设置针插入之前顶部区块 203 的位置;(2) 利用控制附件将顶部区块 203 和针退出实体组织或受试者。可以控制退出的速率。

[0138] 根据一个实施方案,提供了一种操作本文所述的装置的方法。驱动机构 501 设置顶部区块 203 的位置。可考虑多种因素,例如,但不限于,针的长度、底部区块 204 的高度、实体组织的大小和预期插入的深度,用于确定顶部区块 203 的适当位置。顶部区块 203 与底部区块 204 之间的距离没有特别限制。该距离可以是 0,或至少 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、15 或 20mm。该距离可以小于 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、

1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、15 或 20mm。或者，该距离可以是约 0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、15 或 20mm。当两个区块之间的距离为零时，顶部区块位于底部区块上方。在设定顶部区块的位置之后，驱动机构 501 保持顶部区块固定不动。将实体组织或受试者放置在底部区块下方。在一个特定实施方案中，实体组织或受试者大体放置在由所有支腿设定的边界内。例如，实体组织或受试者的一侧抵靠支腿 205 和 / 或支撑底板 208 的底部放置。另一侧通过调节支腿 205 而抵靠底部区块 204 放置。实体组织或受试者的放置可在设定顶部区块 203 的适当位置之前或之后进行。调节平台 206 以提供实体组织或受试者的稳定化。针通过顶部区块 203 和底部区块 204 中的孔插入。针插入的路径由孔引导。在一些情况下，针是针阵列装置的一部分。

[0139] 本发明不限制针阵列的类型或形状，只要针阵列的形状与由顶部区块和底部区块限定的孔的配置相匹配即可。此外，本发明不限制将使用的针的类型，只要控制附件附接至针上即可。任何针可独立地选自 14、16、18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 号。该针可以是端口针或多孔针。在一些情况下，该针是端口针。在一些情况下，该针是多孔针。在一些情况下，该针是端口针和多孔针的混合。在一些情况下，所有针是 26 号。当使用针阵列装置时，针的一端附接至装置上。该装置及其用途已在 2010 年 12 月 30 日公布的 Bahrami 等人的美国专利申请 2010/0330589A1 和 2011 年 9 月 22 日公布的 Bahrami 等人的 2011/0230839A1 中描述。

[0140] 在针插入之后，顶部区块 203 以通过驱动机构 501 控制的选定速度从底部区块 204 抬起。同时，通常溶解的和 / 或与至少一种合适的溶剂混合的至少一种药剂通过针注入实体组织内各自的位置。可独立地控制抬起顶部区块 203 的速率和注射速率。各个速率的选择可能取决于多种因素，例如，但不限于，实体组织的类型、针的大小、溶剂的粘度和至少一种药剂的渗透性。在一些实施方案中，顶部区块的移动速率为至少 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10、11、12、13、14、15、18 或 20mm/min。在一些实施方案中，顶部区块的移动速率小于 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10、11、12、13、14、15、18 或 20mm/min。在一些实施方案中，顶部区块的移动速率为约 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、1.0、1.1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10、11、12、13、14、15、18 或 20mm/min。在一些情况下，注射至少一种药剂的速率为至少 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.0、1.1、1.2、1.3、1.5、1.8、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50 μ l/min 或甚至更大。在其它一些情况下，注射至少一种药剂的速率小于 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.0、1.1、1.2、1.3、1.5、1.8、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40 或 50 μ l/min。在其它一些情况下，注射至少一种药剂的速率为约 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、

0.8、0.85、0.9、0.95、1.0、1.1、1.2、1.3、1.5、1.8、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40 或 $50 \mu\text{l}/\text{min}$ 。

[0141] 根据多个实施方案,组织区域在被切下之前保留在原处一段时间。例如,认为递送后 48-72 小时对于肿瘤展现出可检测到的响应通常是足够的。在其它情况下,等待时间可以是数分钟、数小时、数天或数周。此外,可以使用已知方法对组织区域进行成像,以在插入针之前精确地定位组织的靶区域。可在将多种药剂递送至组织区域之前和之后反复地对该区域进行成像。重复次数可以是约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 次或甚至更多次。

[0142] 根据一些实施方案,随后将已向其中递送至少一种药剂的实体组织从受试者中切除并进行评价。例如,在靶组织是癌性肿瘤的情况下,注入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,并将这种方法与现有的离体或体外治疗评价方法区分开来。假设使用的针配置为用于在沿其长度的任意给定位置递送基本上等量的药剂,则由每个针递送的药剂沿着递送轴均匀地分布至周围组织,在药剂递送至实体组织的过程中各自的针定位在该递送轴上。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,这取决于诸如周围组织的密度、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其各自的递送轴共轴的、大致为柱形的区域。

方法

[0143] 通过使用本文所述的方法,其包括配置(例如通过以允许容易鉴定在组织位置从特定针释放的内容物在特定位置的效应(如果有的话)的方式将至少一个位置标记物放置在多个渗透探针或针的一个或多个已知位置),这些和相关的实施方案因此考虑同时递送和比较大量候选治疗剂的相对治疗效果和/或毒性的方法。这样的应用可用于药物筛选和药物发现,例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。其它类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和不期望的副作用,来有利地推进对受试者的治疗管理。

[0144] 在某些其它实施方案中,评价包括根据实体组织的不同切片的不同特征区别多种药剂中的至少一种对实体组织的不同切片的影响程度。在某些其它实施方案中,评价包括比较多种药剂中的至少第一种对实体组织的第一效应与多种药剂中的至少第二种对实体组织的第二效应。在某些其它实施方案中,评价包括,关于多种药剂中的至少一种,评价对实体组织区域的功效、活性和毒性中的至少一种。在某些其它实施方案中,该方法包括基于该评价取消对多种药剂中的至少一种的选择。在某些其它实施方案中,该方法包括基于所述评价选择至少一种药剂。在某些其它实施方案中,该方法包括基于该评价对多种药剂中的至少两种进行优先排序。在某些其它实施方案中,该方法包括将多种药剂分配至多个位置,每个位置沿着多个受试者中每个受试者内的实体组织区域中的多个平行轴的各一个。在某些进一步的实施方案中,该方法包括以下之一:(i) 基于该评价选择多种药剂中的至少一种,(ii) 基于该评价取消对多种药剂中的至少一种的选择,和 (iii) 基于该评价对多

种药剂中的至少两种进行优先排序。在某些其它实施方案中,该方法包括以下之一:(i) 基于该评价选择多个受试者中的至少一个,(ii) 基于该评价取消对多个受试者中的至少一个的选择,和(iii) 基于该评价对多个受试者中的至少两个进行优先排序。在某些其它实施方案中,该评价包括确定接近多个平行轴中的至少一个的实体组织的改变的生理状态水平。

[0145] 在某些实施方案中,提供了一种筛选受试者参与一种或多种药剂的临床试验的资格的方法,该方法包括(a) 通过将每种所述药剂沿着每个受试者中区域内的轴分布至多个位置而将一种或多种药剂引入一个或多个受试者体内的实体组织区域;(b) 从每个受试者中取出该实体组织区域;和(c) 对(b)中取出的每个区域评价每种药剂对沿着该区域中的轴线的各位置的效应,其中(i) 对于任何给定的一种或多种药剂,所述一种或多种药剂对来自受试者的实体组织区域的可检测效应的存在表明受试者有资格参与一种或多种药剂的临床试验,(ii) 对于任何给定的一种或多种药剂,所述一种或多种药剂对来自受试者的实体组织区域的可检测效应的缺乏表明受试者没有资格参与一种或多种药剂的临床试验,或(iii) (i) 和(ii) 两者。

[0146] 在某些实施方案中,提供了一种对候选药剂发展为治疗实体瘤的治疗剂进行评级的方法,该方法包括(a) 通过将每种所述候选药剂分配至沿每个受试者中的区域内的轴的多个位置而将一种或多种药剂引入患有已知肿瘤类型的肿瘤的每一个或多个受试者中已知肿瘤类型的实体瘤区域;(b) 从每个所述受试者中取出该实体瘤区域;和(c) 对(b)中取出的每个区域比较每种候选药剂对沿着该区域内的轴的各位置的影响,其中当引入肿瘤时产生较大有利影响的药剂得到发展为用于治疗实体瘤的治疗剂的更加有利的评级,而当引入肿瘤时产生较小有利影响的药剂得到发展为用于治疗实体瘤的治疗剂的较不有利的评级。

[0147] 本发明提供了对于受试者或受试者群体的分类和/或分层有用的组合物和方法,包括用于药物发现和药物基因组学。在这些以及相关的实施方案中,改变的生理状态的一种或多种指标与已向实体瘤中引入给定候选药剂的位置的关联可用于测量受试者对特定治疗性处理的响应性或特定治疗性处理的潜在有效性;相关实施方案考虑了这种用于“取消选择”在肿瘤中的引入位点未检测到生理状态改变的证据的候选药剂或将其从作为潜在疗法的选择中排除的方法。

[0148] 如本文所述,对生理状态改变的至少一个指示物的水平的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 III 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,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 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。

[0149] 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、无应答者或可能的应答者。

数据采集和分析

[0150] 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。

[0151] 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。

[0152] 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。

[0153] 本文所述的某些实施方案涉及向受试者的实体组织中引入药剂,和 / 或从受试者中切除所有或部分实体组织,和 / 或从可能在受试者中的实体组织获得一种或多种生物样品,和 / 或筛选一个或多个受试者的临床试验资格,和 / 或可能涉及受试者(包括受试者或生物来源)的任何数量的其它方法。

[0154] 受试者或生物来源可以是人或非人类动物、转基因的或克隆的或组织工程化(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。

[0155] 本文公开的一些实施方案涉及用于将流体相药剂选择性递送至实体组织的方法。如同上面所提到的,这种选择性递送消除了为了在期望的实体组织中获得治疗有效浓度而对治疗剂或候选药剂的过量全身浓度的需要,从而避免了对未累及组织的临床有害毒性,还避免了不期望的副作用。相关实施方案考虑到通过这种向实体组织的选择性递送来测试目前尚未批准的候选药剂。不希望被任何理论所束缚,根据这些实施方案,可通过体内施用,而后对切下的组织进行离体分析来评价候选药剂对实体组织(例如,实体瘤)的直接效应,而不威胁受试者的健康,因为直接施用至实体组织所用的剂量远低于以其它方法全身施用的最小剂量。(最小剂量是将在受试者体内产生期望的生理效应的药剂的最小量)。鉴于目前流体施用模式的小体积和低压力,以及实体组织完全或部分开放作为促进施用的流体保留的物理性质(也可通过现有方法确定,例如,通过成像和 / 或通过使用可检测的标记作为示踪物),根据本公开内容选择性施用至实体组织的药剂在实体组织外检测不到,或者如果在实体组织外可检测到,则该药剂以小于(以统计学显著的方式)最小剂量的量存在。

[0156] 这样的考虑因素适合于相关的实施方案,其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。

[0157] 在这样的实施方案中, 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细胞外基质中的滞留, 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效应的性质。

[0158] 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, 或基于从受试者中切除实体组织之前、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。

[0159] 预期任何类型的实体瘤均适合于使用本文所述的装置进行干预。在一些实施方案中, 该实体瘤可以是良性肿瘤或恶性肿瘤, 其可以进一步是原发性肿瘤、侵袭性肿瘤或转移性肿瘤。某些实施方案考虑到包含前列腺癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、肺癌细胞、脑癌细胞和卵巢癌细胞中的一种的实体瘤, 但是本发明并非意在如此受到限制, 可以使用其它实体瘤类型和癌细胞类型。例如, 该肿瘤可包括选自腺瘤、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等的癌。如在本文其它地方提到的, 已针对这些和其它癌症类型制定了本领域公认的临床诊断标准, 如美国国家癌症研究所(Bethesda, MD, USA)公布的或在 DeVita、Hellman 和 Rosenberg 的 Cancer: Principles and Practice of Oncology (2008, Lippincott, Williams 和 Wilkins, Philadelphia/Ovid, New York); Pizzo 和 Poplack, Principles and Practice of Pediatric Oncology (第四版, 2001, Lippincott, Williams 和 Wilkins, Philadelphia/Ovid, New York); 以及 Vogelstein 和 Kinzler, The Genetic Basis of Human Cancer (第二版, 2002年, McGraw Hill Professional, New York) 中所描述的那些标准。特定癌症的分型和表征的其它非限制性实例在例如 Ignatiadis 等人.(2008Pathobiol. 75:104); Kunz (2008Curr. Drug Discov. Technol. 5:9) 和 Auman 等人.(2008Drug Metab. Rev. 40:303) 中有所描述。

[0160] 根据某些本文涉及的实施方案,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许多生物学参数(如 Hanahan 和 Weinberg (2000Cell100:57) 以及其中引用的参考文献所综述的那些参数)中的任一个,来鉴定候选药剂的功效。癌细胞存在一些特征,这些特征可用于确定候选药剂对癌细胞所展现的一种或多种性状的效果,并且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。为了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分析,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 Sci111:3333)等等。

[0161] 在一些情况下,药剂的选择/取消选择基于细胞凋亡。基于细胞凋亡对药剂进行选择或取消选择的阈值可取决于所用的癌症治疗剂,和/或肿瘤的性质或大小。例如,可通过将含有药剂和对照(不含药剂的相同溶液对照)的流体溶液同时递送至实体组织的相邻位置来进行该实验。在选定的时间段后,比较药剂或对照对细胞凋亡的影响。在一些实施方案中,如果与不含癌症治疗剂的对照相比,观察到少于约1%、约3%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约100%的细胞凋亡,则从进一步的评价中取消对该癌症治疗剂的选择。在其它一些实施方案中,如果与不含癌症治疗剂的对照相比,观察到多于约1%、约3%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约100%的细胞凋亡,则选择该癌症治疗剂进行进一步的评价。

[0162] 本发明提供了评价抗癌或抗肿瘤剂对受试者的实体组织,尤其是对实体瘤的影响的方法。在一些实施方案中,该评价是基于对药剂对药剂递送位点的约15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2.5、2、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1或0.05mm内的区域的效应的分析。该效应可以是改变的生理状态、生物标志物或细胞凋亡的存在与否。基于该评价,可针对进一步的研究选择或取消选择该药剂和/或受试者。

[0163] 本发明还涉及将不同浓度的至少一种药剂分配至实体组织内的相邻位置的方法。在一些实施方案中,将一种药剂以2、3、4、5、6种或甚至更多种不同的浓度分配至实体组织内的相邻位置。在选定的时间段后,切除实体组织并对其评价。该选定的时间段可以是至少6、12、18、24、36、48、72、96小时或甚至更长。基于该评价,可以确定对实体组织具有

效应的药剂的最小浓度。例如,对于肿瘤,可通过将不同浓度的药剂注入肿瘤内来确定潜在抗肿瘤剂具有抗肿瘤效应的最小浓度。该信息可帮助医师为患者设计最优给药方案。

[0164] 图6显示了本发明的一个实施方案。肿瘤620的一部分已被沿着基本上与递送轴垂直的平面切成多个切片622。圆柱形递送区域624限定了各药剂的渗透区域,并且垂直于切片622的平面延伸。

[0165] 许多区域624对于使用者来说可能是不易检测的,所以通常在相距甚远的位置在药剂之中注射至少两种易于检测的位置标记物624a、624b。在一些情况下,可检测的位置标记物与至少一种另外的药剂共同注射。使用者然后可覆盖模板,在该模板上标记每个递送轴的位置,将模板的指示的标记位置与给定切片622的可检测位置标记物624a、624b对齐,从而定位其余的递送区域624。位置标记物624a、624b可以是可由使用者检测的任何组合物。在本文的其它地方对许多示例性位置标记物进行了详细描述。根据一个实施方案,选择位置标记物来抵抗向周围组织的渗透和扩散并保持集中于狭窄的柱中,例如在624a所示,以便在注射程序后的一段较长时间内为可检测的,并且为定位模板提供精确的指导。或者,位置标记物624a、624b可以是涂覆在针或微透析探针上的颜色染料。针或微透析探针的插入可导致实体组织在插入位点的染色。此外,至于微透析探针,可将有色串附接至微透析探针上。将药剂递送至实体组织后,牵拉微透析探针通过实体组织,从而导致注射位点被有色蜡串染色。

[0166] 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,而阳性对照可包含在其它递送轴单独递送的大多数或全部药剂的化合物。

[0167] 在对肿瘤620进行切片以后,如下文更详细描述,使用者对肿瘤620的多个切片622的递送区624进行选定的分析。本文公开的装置和方法的一个优点是,除了评价给定的药剂对肿瘤的功效以外,还可对药剂在各递送区域624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622a处的递送区域624c中的效果例如与其在切片622b和622c处的相同区域624c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624c和624d处递送相同的药剂,然后可比较指定切片622中的那些位置处的相对效果,从而提供水平方向上的差异。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。

[0168] 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624e和624f比其它递送区域隔得更近,从而导致各自的药剂在区域324ef中相互作用,在区域324ef中各自的递送区域重叠。

生物标志物

[0169] 本申请举例说明了一种通过测量细胞分泌的生物标志物来评价肿瘤细胞或致癌细胞的生理状态变化的方法。细胞可通过分泌可能是可溶性因子的生物标志物(包括自分泌、旁分泌或内分泌)而与生理信号通讯或响应于生理信号。肿瘤细胞或致癌细胞可在生理状态变化之前、过程中或之后分泌医学领域已知的多种生物标志物。该生物标志物可以是蛋白质、肽、氨基酸、RNA、DNA、核酸、蛋白聚糖、脂质、有机小分子、无机小分子或离子。在

一些实施方案中,可在基因表达的转录水平或在蛋白质水平上测量生物标志物。通过随时间推移测量和检测本文所述的生物标志物,并且将该测量与医学领域已知的生物标志物相关联,从而可以确定肿瘤细胞或致癌细胞的生理状态或生理状态的变化,如细胞死亡、细胞增殖、细胞信号传导过程或细胞响应。

[0170] 肿瘤细胞或致癌细胞的死亡可以经由细胞凋亡或坏死。细胞凋亡是程序性细胞死亡的过程,并且可以通过死亡受体介导的外源途径或线粒体引导的内源途径激活而激活。可在基因表达或蛋白质水平上测量的细胞凋亡的生物标志物的非限制性实例包括:激活的胱天蛋白酶家族,如胱天蛋白酶 2、3、7、8、9 和 10;肿瘤蛋白 53(p53)、磷酸-p53、p73、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1(p21-waf1) 和磷酸-H2AX/Ser139(pH2AX);B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2) 家族成员,如 Bcl-2、B 细胞淋巴瘤-超大型(Bcl-XL)、Bcl-xs、Bcl-W 和诱导的髓样白血病细胞分化蛋白(Mcl-1);促细胞凋亡蛋白家族,如 Bcl-2 相关的 X 蛋白(Bax) 和 Bcl-2 同源拮抗剂/杀伤剂(Bak);Bcl-2 同源(BH) 结构域家族,如 BH1、BH2、BH3、BH4、Bcl-2 相关死亡促进剂(Bad)、p53 细胞凋亡上调调节剂(PUMA)、NOXA、Bcl-2 修饰因子(Bmf)、Bcl-2 相互作用杀伤剂(Bik)、Bcl-2 相关卵巢杀伤剂(Bok)、Bcl-2 细胞死亡相互作用调节剂(Bim) 和 BH3 相互作用结构域死亡激动剂(Bid);细胞凋亡蛋白质的调节剂,如细胞凋亡蛋白酶激活因子 1(APAF-1)、细胞凋亡诱导因子(AIF)、细胞凋亡抑制剂(IAP) 如 cIAP1、cIAP2、Cp-IAP、Op-IAP、XIAP、NAIP、存活蛋白和胱天蛋白酶的第三线粒体衍生的激活剂(SMAC);用于测量 DNA 氧化损害程度的标志物,如 8-羟基-2-脱氧鸟苷和 3-硝基酪氨酸;与细胞凋亡相关的其它生物标志物,如细胞色素 c、N-羟基-L-精氨酸(NOHA)、14-3-3 蛋白质、肿瘤坏死因子(TNF) 相关细胞凋亡诱导配体(TRAIL)、活性氧(ROS)、外化磷脂酰丝氨酸、细胞角蛋白、聚(ADP-核糖)聚合酶、核小体 DNA、细胞凋亡抗原 1(Apo-1)、TNF 受体超家族成员 6(Fas)、Fas 配体(FasL)、Fas 相关死亡结构域蛋白(FADD)、磷酸化-FADD、谷胱甘肽-S-转移酶-同工酶 π (Gst- π)、 β -半乳糖苷酶、磷酸化视网膜母细胞瘤抑制蛋白等。

[0171] 坏死是细胞或组织的过早死亡,并且可由细胞或组织之外的因素导致。坏死可触发细胞的其它生理学事件如炎症反应。可在基因表达或蛋白质水平上测量的与肿瘤细胞或致癌细胞坏死相关的生物标志物的非限制性实例包括肿瘤坏死因子(TNF)、cachexin、恶液质素、淋巴毒素、亲环蛋白 A、白细胞介素-1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 和 17、 α 1-抗胰蛋白酶、肽素、髓过氧化物酶、FLICE 样抑制蛋白(FLIP)、转录的转导物或激活剂(STAT)、肿瘤坏死因子受体超家族成员 19(TROY)、环加氧酶(COX)-1、COX-2、细胞死亡因子、巨噬细胞炎性蛋白质、巨噬细胞活化因子、巨噬细胞迁移抑制因子、神经白介素、免疫抑制因子、转移因子、制癌蛋白、骨桥蛋白、I 型干扰素、干扰素 γ 、白细胞介素 1 受体拮抗蛋白、CD70、CD30、CD40、4-1BB 配体、外胚层发育异常蛋白、B 细胞活化因子、核因子 κ -B 配体的受体激活剂(RANKL)、淋巴毒素等。

[0172] 除了测量可能与细胞死亡相关的生物标志物之外,本发明进一步提供了一种测量可以在基因表达或蛋白质水平上进行测量以便与肿瘤细胞或致癌细胞的增殖/生长或有丝分裂活性相关联的生物标志物的方法。本文所述的生物标志物的非限制性实例包括 Akt 蛋白激酶 B、Wilms 瘤标志物、视网膜母细胞瘤(Rb)、Ki-67、增殖细胞核抗原(PCNA)、丝氨酸/苏氨酸激酶、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、神经营养蛋白、蛋白质 Mis18 β 、肌生成抑制蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶(Cdk)1、2、4 和 6,细胞周期蛋白依赖性激酶复合体

2(Cdc2p34)、细胞周期蛋白 D1、细胞周期蛋白 D2、细胞周期蛋白 D3、细胞周期蛋白 E、细胞周期蛋白 A、生长分化因子 1、2、3、5、6、9、10 和 15 等。

[0173] 细胞的生理状态可受到多种信号转导途径的严格调节。当细胞外信号分子或配体结合至细胞表面受体并进一步激活细胞表面受体时,发生信号转导,从而改变细胞内分子,产生响应。在一些优选的方面,与肿瘤细胞或致癌细胞的信号转导改变相关的生物标志物可在基因表达或蛋白质水平上进行测量。本文所述的生物标志物可参与信号转导途径,如生长因子、酶、信号传导因子、配体、在生物途径中产生的中间分子、激素、营养物、跨膜蛋白、细胞外基质蛋白、细胞内组分、蛋白质磷酸化的下游因子等。信号转导生物标志物的非限制性实例包括人表皮生长因子受体(HER)家族分子,如 HER1、3 和 4;磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号转导途径分子如 PI3K/AKT、微管相关蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节激酶(ERK)途径分子如 MAPK、促分裂原活化蛋白激酶(MEK)、Ras、原癌基因丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶(RAF)、ERK1 和 2;刺猬(hedgehog)途径蛋白如音猬因子、沙漠刺猬因子、印度刺猬因子、刺猬因子-相互作用蛋白、平滑蛋白(SMO)、Gli-1、Gli-2、Gli-3 和叉头框(forkhead box)0(FoxO)-1;Wnt 信号转导途径调节剂如 Wnt1、2、2B、3、3A、4、5A、5B、6、7A、7B、8A、8B、9A、9B、10A、10B、11、16、Wnt1 诱导型信号转导途径蛋白 1(Wisp-1)、Wisp-2 和 β -联蛋白;甲状旁腺激素相关蛋白如恶性疾病的高钙血激素、甲状旁腺激素如肿瘤因子;磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(SGK3)、真核翻译起始因子 4E-结合蛋白 1(4E-BP1)、胸苷(thymidine)激酶、生长激素、丙酮酸脱氢酶、硫辛酰胺激酶同工酶 1(PDK1)、柠檬酸盐、一氧化氮、P70S6 激酶、糖原合酶激酶 3(GSK-3)、含有 Src 同源 2 结构域(SHC)的转化蛋白 1、CD117、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)- α 、PDGFR- β 、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)、表皮生长因子受体(EGFR)、基质金属蛋白酶(MMP)-1、CD9、角蛋白 7、p27、parafibromin、BMI1 多梳环指癌基因(Bmi-1)、14-3-3 σ 、半胱氨酸蛋白酶抑制剂-SA、附睾分泌蛋白 E4、乳清酸性蛋白(WAP)四-二硫核结构域蛋白 2(WFDC2)、脂连蛋白、瘦蛋白、抵抗素、刺鼠信号蛋白、刺鼠相关蛋白、血管生成素、血管生成抑制蛋白、富含半胱氨酸的蛋白 61、肾母细胞瘤过度表达的蛋白、肽 PHI、肽 YY、胰岛素、葡萄糖、垂体激素、胎盘激素、松弛素、分泌素、尿皮素、尿紧张肽、血管活性肠肽、自分泌活动因子、 β -血小板球蛋白、白血病抑制因子、白细胞迁移抑制因子、淋巴毒素- α 、内皮素、enphrin、缓激肽、激肽原、速激肽、趋化因子如趋化因子 C、CC、CXC、CX3C 等。

[0174] 在某些方面,能够触发信号转导途径,转而改变细胞响应的生物标志物可以是生长因子。可在基因表达或蛋白质水平上测量以便将肿瘤细胞或致癌细胞与生理状态相关联的生长因子的非限制性实例包括红细胞生成素(EPO)、血管生成素(Ang)、干细胞因子(SCF)、血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、神经生长因子(NGF)、造血细胞生长因子、肝细胞生长因子、肝细胞瘤衍生的生长因子、迁移刺激因子、自分泌活动因子、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)、转化生长因子(TGF)、软骨生长因子(CGF)、角质形成细胞生长因子(KGF)、骨骼生长因子(SGF)、成骨细胞衍生的生长因子(BDGF)、cytoline 生长因子(CGF)、集落刺激因子(CSF)、整联蛋白调节因子(IMF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、钙调蛋白、骨形态形成蛋白(BMP)、组织抑制剂基质金属蛋白酶(TIMP)等。

[0175] 在某些实施方案中,生物标志物为免疫组织化学(IHC)标志物。可测量的 IHC 标

志物的非限制性实例包括造血标志物、乳腺标志物、癌或间皮标志物、结肠标志物、中枢神经系统标志物、传染病标志物、角蛋白或上皮标志物、肺标志物、黑素细胞标志物、神经内分泌标志物 / 其它激素、其它器官相关标志物、其它预后性标志物、前列腺标志物、基质标志物或肿瘤标志物。造血标志物包括但不限于：膜联蛋白 A1、BCL2 滤泡性淋巴瘤标志物、BCL6 滤泡中心 B 细胞标志物、CD10、CD20、CD23、CD79a、细胞周期蛋白 D1、毛细胞白血病标志物、多发性骨髓瘤致癌基因 1、PAX-g B 细胞转录因子、ZAP70、CD34、CD68、CD99、CD117、血型糖蛋白 -A、髓过氧化物酶、末端脱氧核苷酰转移酶、von willebrand 因子 VIII、间变性淋巴瘤激酶 -1、CD15、CD30、肌成束蛋白、CD45、CD138、 κ 免疫球蛋白轻链、 λ 免疫球蛋白轻链、浆细胞 p63、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD43、CD56、CD57 和粒酶 B。乳腺标志物包括但不限于：Akt 蛋白激酶、细胞角蛋白 5、p63、上皮抗原、组织蛋白酶 D、细胞角蛋白 8、高分子量 HMW 细胞角蛋白、细胞角蛋白 5/6、细胞角蛋白 7、细胞角蛋白 19、细胞角蛋白 20、E-钙黏蛋白、雌激素受体、HER2/neu、Ki67 细胞增殖标志物、p53 肿瘤抑制基因蛋白、孕酮受体和平滑肌肌动蛋白。癌或间皮标志物包括但不限于：BER-EP4 上皮抗原、钙网膜蛋白、ERA 上皮相关抗原、宫颈或妇科标志物、p16 肿瘤抑制基因蛋白、ProEx C 生物标志物、TAG72 和 wilms 瘤标志物。结肠标志物包括但不限于：表皮生长因子受体、CDX2、微卫星不稳定性标志物如 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 和 p53。CNS 标志物包括但不限于：人胶质原纤维酸性蛋白质和神经丝。传染病标志物包括但不限于：巨细胞病毒、单纯性疱疹病毒 I 型、II 型、pylori H 和水痘带状疱疹病毒。角蛋白和上皮组织标志物包括但不限于：细胞角蛋白 5/6、细胞角蛋白 7、细胞角蛋白 8/18、细胞角蛋白 19、细胞角蛋白 20、高分子量细胞角蛋白、平滑肌钙调结合蛋白、p63、胶原蛋白 9、平滑肌肌球蛋白、细胞角蛋白混合物和上皮膜抗原。肺标志物包括但不限于：34BE12、高分子量 HMW 细胞角蛋白、切除修复交叉补充多肽、突触囊泡蛋白和甲状腺转录因子 -1。黑素细胞标志物包括但不限于：HMB 黑素瘤相关标志物 45、黑素瘤混合物、黑素瘤相关标志物 1、s100 蛋白和酪氨酸酶。神经内分泌标志物和其它激素包括但不限于：雄激素受体、降钙素、嗜铬粒蛋白 A、G 细胞窦幽门粘膜、神经元特异性烯醇化酶、促生长素抑制素和突触囊泡蛋白。其它器官相关标志物包括但不限于：CEA 癌胚抗原、钙凝集素 -3、总囊肿疾病流体蛋白 15、肝细胞抗原、肾上腺皮质抑制素和肾细胞癌标志物。前列腺标志物包括但不限于：PIN2 混合物、PIN4 混合物、前列腺特异性抗原、前列腺酸性磷酸酶和 p504s 基因产物。基质标志物包括但不限于：CD31、平足蛋白、来源于 GIST1 的 DOG1、结蛋白丝蛋白、纤维组织细胞因子 XIIIa、8 型人疱疹病毒、肌肉特异性肌动蛋白、成肌蛋白肌肉标志物、心脏肌球蛋白和骨骼标志物、s100 蛋白、平滑肌肌动蛋白、平滑肌肌球蛋白和波形蛋白。肿瘤标志物包括但不限于：甲胎蛋白、Ca19-9CI、Ca-125 恶性上皮瘤标志物和存活蛋白。

[0176] 在一些实施方案中，可在基因表达或蛋白质水平上测量的生物标志物是代谢物或代谢生物标志物。代谢物或代谢生物标志物的非限制性实例包括：三磷酸腺苷 (ATP)、二磷酸腺苷 (ADP)、单磷酸腺苷 (AMP)、环磷酸腺苷 (cAMP)、鸟苷 -5' -三磷酸 (GTP)、鸟苷 -5' -二磷酸 (GDP)、鸟苷 -5' -单磷酸 (GMP)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP)、NADPH、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)、NADH、增殖细胞核抗原、葡萄糖、葡萄糖 -6-磷酸、果糖 -6-磷酸、果糖 1, 6-b 磷酸、核糖 -5-磷酸、赤藓糖 -4-磷酸、木酮糖 5-磷酸、甘油醛 -3-磷酸、景天庚酮糖 7-磷酸、3 核酮糖 -5-磷酸、1 核糖 -5-磷酸、磷酸烯醇丙酮酸、2-磷酸甘油酸酯、3-磷酸甘油酸酯、1, 3-磷酸甘油酸酯、二羟丙酮磷酸、苹果酸、草酰乙酸、酮戊二酸、乳酸、谷胺酰胺、丙

胺酸、谷氨酸、丙酮酸、脂肪酸、乙酰辅酶 A、柠檬酸、甘油、尿酸、胆固醇、类花生酸、糖脂、磷脂、鞘磷脂 (sphingolipids)、类固醇、三酰甘油、白蛋白、胰岛素、二醇类、Ros、NO、胆红素、磷酸肌酸、酮体、L- 鸟氨酸、精氨酸琥珀酸、延胡索酸、L- 精氨酸、尿素、氨甲酰磷酸、鸟氨酸、瓜氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、脯氨酸、硒代胱氨酸、丝氨酸、牛磺酸、酪氨酸、柠檬酸等。

[0177] 在一些实施方案中,生物标志物可以是离子。非限制性实例包括氢、钾、钠、钙、氯、镁、碳酸氢根、磷酸根、羟基、碘、铜、铁、锌、硫酸根等。

实施例

实施例 1

[0178] 图 7 示出了使用微透析探针线性阵列靶向表达感兴趣的靶标 (c-Met) 的活肿瘤上皮细胞的实例。可控制探针 / 膜的长度,从而允许将治疗剂主要递送至肿瘤的增殖区。该图像是来自 EBC-1 细胞系异种移植物的 H&E 染色的切片的图像。EBC-1 细胞为具有 c-Met 扩增的肺癌细胞系。这些异种移植体在裸鼠中迅速生长并发展为以白色显示的细胞结构和坏死的中心区域。为了评价意在靶向 c-met 的化合物的作用,有必要将化合物引导至接近肿瘤周围的活跃增殖区。该图表明了微透析探针如何通过肿瘤串联并且仅放置在肿瘤的周围区域,从而允许适当评价化合物仅对感兴趣的组织的活性而非对与化合物作用不相关的肿瘤区域的活性。

实施例 2

[0179] 图 8 示出了使用长的微透析膜对实体移植肿瘤中多个区域 / 微环境进行采样的实例。通过使用长的微透析膜,对实体瘤的完整尺寸和增殖梯度以及多个微环境进行给药。这代表比现有技术更全面的三维给药。在该图像中,外圈代表通常更加增生性的肿瘤区域,内圈代表通常较少活性和更紧密堆积的肿瘤中心。在此,该图示出了较长的微透析探针如何通过肿瘤的整个长度串联,从而允许将化合物递送至单一肿瘤的各个组织 / 区域中的每一个中,以评价在考虑到局部肿瘤环境中存在变化的情况下某种化合物或多种化合物的差异效应。

实施例 3

[0180] 图 9 示出了使用微透析探针进行剂量确定的示意图。通过运行药物的连续循环一段固定的时间,可收集来自管的总透析液并使用 HPLC、荧光 / 吸光度等进行分析,以确定通过被动扩散递送的治疗剂的量。在该图中,肿瘤由两个带阴影的圆圈 (一个在另一个内部) 表示。微透析探针显示为从肿瘤一侧延伸 (string) 至另一侧的圆柱体,管道闭合环路连接至微透析探针并穿过由底部的轮状物表示的蠕动泵。这种设置允许将已知浓度的化合物引入该封闭系统。在该系统中,可以将化合物被动地或主动地递送至肿瘤以及将来自肿瘤的信号分子收集至闭合的环路系统内。因此在给定的时间后,可收集闭合系统中的流体并对其进行分析,以通过确定起始浓度与终浓度的差异以及从肿瘤排入微透析探针的分子随时间的变化来确定递送至肿瘤的药物确切量。

实施例 4

[0181] 图 10 示出了利用微透析膜的多剂量给药系统的示意图。在这种情况下,探针靶向

于肿瘤的内部非增殖区。通过探针的第一剂量将会递送设计用于激活在这些先前阻止的细胞中的细胞循环的化合物。而后将在未来的某一时间递送不同化合物的第二剂量,以评价对已重新进入细胞周期的那些细胞的效应。该技术允许肿瘤内可在自然肿瘤进展过程中产生的新细胞状态的构建,并且随后评价化合物对那些新细胞状态的功效。实施例 5

[0182] 图 11 示出了使用挤出 / 注射技术靶向于实体瘤模型中的增殖区的示意图。在挤出注射过程中,固定引导器避免了肿瘤受到针的牵拉;药物放置的深度和长度通过插入和挤出 / 递送距离来表示。在该图中,彼此内部的阴影圆圈代表肿瘤。在此示出了由贯穿标示为“固定引导器”和“挤出阵列头部”的阴影框的垂直线所代表的针。这些针附接至“挤出阵列头部”,并在与针相同的方向上穿过“固定引导器”中的孔。这种设置允许平行放置多个针和多列药物以及将那些针精确地放置在肿瘤的多个区域内。针的放置通过附加的立体定位装置来完成,该装置附接至“挤出阵列头部”,该“挤出阵列头部”取决于期望将化合物放置在肿瘤中的位置可以以微米的增量升高 / 降低。针穿过的“固定引导器”确保针彼此处于相同的方向上以及当针通过其将移动时将肿瘤固定就位。

实施例 6

[0183] 图 12 示出了沿着肿瘤内的特定轴插入的微透析探针的实例。在实体瘤的外部标记进入点,并且在注射后 24hr 通过来自 Perkin Elmer 的 VivoTAG680-S 的 IVIS 谱对团块进行成像。

实施例 7

[0184] 图 13 示出了明显表现出触发的细胞响应的实体组织中药剂的放置。在递送轴周围存在均匀的生物标志物表达模式,表明药剂均匀分布至周围组织。没有观察到或观察到极少的由于插入导致的组织破坏的证据。膜通过插入和组织处理(包括切片切片)保持其完整性。实体瘤是人类淋巴瘤 Ramos 细胞系的小鼠异种移植植物。生物标志物是针对核染色的 DAPI 和针对响应于作为递送药剂的长春新碱的细胞死亡的裂解胱天蛋白酶 3 荧光团 555。

实施例 8

[0185] 图 14 示出了标准注射方法和体现本发明原理的示例性注射方法在功效(14a)、信号均匀性(14b)和柱长(14c)方面的结果的比较。本实施例中提及的“新”方法是体现本发明原理的示例性注射方法,包括从实体组织中退出针并将药剂用下文详细描述端口针同时注入组织中。本实施例中提及的“标准”方法包括将多孔针插入实体组织并注射如下文详细描述药剂。注射的药剂是来自 Perkin Elmer 的 VivoTAG680-S。检测方法经由来自 Perkin Elmer 的 IVIS 谱。被注射的组织是裸鼠中的 H2122 或 RH30 细胞系异种移植植物。

“标准”方法的实验细节

具有 5mm 长多孔区域的 26 号多孔针

流速为 0.70 μ L/min

针没有垂直缩回

5 微升注射体积

“新”方法的实验细节

来自 BD Biosciences 的 25 号端口针

流速为 0.70 μ L/min

针的退出速率为 1mm/min

5 微升注射体积

[0186] 图 14a 示出了注射方法的“功效”，其被定义为展示出从肿瘤的“顶部”或背侧和“底部”或腹侧一半的每个 2mm 薄片中的 4 个注射点中的每一个的肿瘤的数目。

[0187] 图 14b 示出了“瘤内信号均匀性”，其被定义为在相同的 2mm 肿瘤切片内的注射点之间和不同的 2mm 切片之间的信号强度有多么一致。实质上，其代表通过肿瘤的信号强度的范围，其中 100% 表示所有斑点都显示出相同的强度，而 0% 表示没有 2 个斑点具有相同的信号强度。使用 Living Image 软件 (Perkin Elmer) 进行测量。

[0188] 图 14c 示出了肿瘤内的荧光柱的垂直长度 (mm)，其被测量为在给定点显示出信号的肿瘤的第一切片与在相同点显示出信号的相同肿瘤的最后的切片之间的距离。

实施例 9

[0189] 图 15 示出了对于以下所列的每种方法，最多 4 个注射点之外的可见注射点的平均数目的比较。注射的药剂是来自 Perkin Elmer 的 VivoTag680S。检测方法是 Perkin Elmer 的 IVIS 谱。被注射的组织是裸鼠中的 H2122 或 RH30 细胞系异种移植植物。

[0190] 图 16 示出了对于以下所列的每种注射方法，肿瘤的不同切片中不同注射点之间的荧光信号强度的平均方差的比较。使用来自 Perkin Elmer 的 Living Image 软件测量信号强度。所分析的肿瘤切片与图 15 中相同。实验细节

方法 A：

来自 BD Biosciences 的 25 号端口针

注射速率为 0.70 μ L/min

针的退出速率为 1mm/min

方法 B：

具有 3mm 长的多孔区域的 26 号多孔针

注射速率为 0.70 μ L/min

针的退出速率为 1mm/min

5 微升注射体积

方法 C：

具有 5mm 长的多孔区域的 26 号多孔针

注射速率为 0.70 μ L/min

针没有垂直缩回

5 微升注射体积

实施例 10

实验细节

[0191] 图 17 示出了利用简化的实验系统评价不同注射方法的结果。

流体动力学模拟

[0192] 使用 Comsol 多重物理流体动力学软件进行模拟。对诸如流速、孔径、孔数、针长度、流体粘度等变量进行操作，以确定对针外流体沉积的影响。建模类似于以下文献中所示的建模：S. Mokhtari, V. Kudriavtsev, M. Danna, “Flow Uniformity and Pressure Variation in Multi-outlet Flow Distribution Pipes”, ASME Vol. PVP-355, /K. K. Panahi

编, *Advances in Analytical, Experimental and Computational Technologies in Fluids, Structures, Transients and Natural Hazards*, ASME Pressure Vessels and Piping Conference, 1997 年 7 月, pp. 113-122。

向凝胶平板内的注射的实时可视化

[0193] 实时进行注射, 并利用使用 Canon EF-S60mm 微距镜头的 Canon EOS Rebel T3i 进行可视化。注射的染料均属于现有食物染色标准。

FD&C 蓝 1 号, 亮蓝 FCF, EU#E133,

FD&C 绿 3 号, 固绿 FCF, EU#E143,

FD&C 红 3 号, 赤藓红, EU#E12, 7

用于注射的明胶通常被称作“弹道凝胶 (ballistics gel)”并设计用于模拟动物组织。

一般注射条件

[0194] 流速为 $0.70 \mu\text{L}/\text{min}$ - $250 \mu\text{L}/\text{min}$,

[0195] 退针速率为 $0.5\text{mm}/\text{min}$ - $1\text{mm}/20\text{sec}$, 并且针没有缩回

[0196] 注射体积为 3-5 微升,

[0197] 测试的针设计包括来自 BD Biosciences 的 25 号端口针、来自 BD Biosciences 的 23 号端口针、具有 5mm 多孔区域的 26 号多孔针、具有 3mm 多孔区域的 26 号多孔针。改变的 / 评价的其它因素为由阵列施加至凝胶上方的压力的量。重复注射, 每次至少 5 次, 并针对一致性和垂直柱向下的均匀流体分布以及对凝胶的物理破坏和从注射位点的溢流 / 泄漏进行目视评价。

利用来自 BD Biosciences 的 25 号端口针以 $0.70 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流体流速、 $1\text{mm}/\text{min}$ 的退针速率和 5 微升注射体积进行方法 1。利用具有 3mm 长的多孔区域的 26 号多孔针以 $0.70 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流体流速、 $1\text{mm}/\text{min}$ 的退针速率和 5 微升注射体积进行方法 2。利用具有 5mm 长的多孔区域的 26 号多孔针以 $0.70 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流体流速和 5 微升注射体积进行方法 3。图像为注射了 VivoTag680S (Perkin Elmer) 并使用 IVIS 谱 (Perkin Elmer) 可视化的裸鼠中 H2122 或 RH30 细胞系异种移植物的图像。

实施例 11

[0198] 图 18 示出了三种不同注射方法的荧光图像和亮视野图像。在裸鼠中的 H2122 或 RH30 细胞系异种移植物中进行注射。注射的药剂为 VivoTAG680-S (Perkin Elmer)。使用 IVIS 谱 (Perkin Elmer) 进行成像和信号检测。

[0199] 前两行是利用来自 BD Biosciences 的 25 号端口针以 $0.70 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流体流速、 $1\text{mm}/\text{min}$ 的退针速率和 5 微升注射体积进行的方法的图像。第三和第四行是利用具有 3mm 长的多孔区域的 26 号多孔针以 $0.70 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流体流速、 $1\text{mm}/\text{min}$ 的退针速率和 5 微升注射体积进行的方法的图像。第五和第六行是利用具有 5mm 长的多孔区域的 26 号多孔针以 $0.70 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流体流速和 5 微升注射体积在没有垂直针缩回的情况下进行的方法的图像。

[0200] 每行示出了来自使用上述给定方法注射的一个肿瘤连续 2mm 切片。从左至右, 切片从肿瘤的背侧 (即, 针首先刺穿的肿瘤表面) 开始移动至肿瘤的腹侧。

实施例 12

[0201] 一个或多个微透析探针的插入由针引导器引导。该针配置为用于接纳一个微透析

探针。根据探针设计（如上所述的线形或 Y 型）来选择针距。为了沿着期望的轴放置微透析探针，进行以下步骤：1) 将微透析探针插入针中，而没有加载针的针座（hub），所有的探针前端组件（线形探针中的出口管）都隐藏在针内部；2) 通过利用针的尖端穿透皮肤和组织而将导针插入实体瘤（对于一些生物体，可能需要将针皮下引导至肿瘤内，以使得没有入口管暴露。如果将线形探针放置在出口管进行灌注液收集，则针可安全通过实体瘤穿孔；或对于普通线形探针放置，针可产生通道，探针可通过该通道移动直至达到期望的放置）；3) 从实体组织中退出针，从而将微透析探针留在实体组织中（在线形探针放置的情况下，在针缩回期间将出口管固定就位，以使得可将探针保留就位；在针移除期间，入口管在末端探针（无出口管）上固定就位；针载片一直远离入口管）；4) 将一个或多个管适配器附接至探针的入口管上；5) 利用蠕动泵以如上所述的流速跨过半透膜进行主动泵送；6) 断开泵管并通过切断来调节入口和出口探针管的长度，以使其适合保留在生物体上；7) 对于额外的给药，可将管适配器重新附接于入口管并再次连接至泵。探针可保留在实体瘤中用于组织学处理或将其从肿瘤中拉出。

[0202] 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。在不偏离本发明的情况下，本领域技术人员现在将会想到众多更改、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。

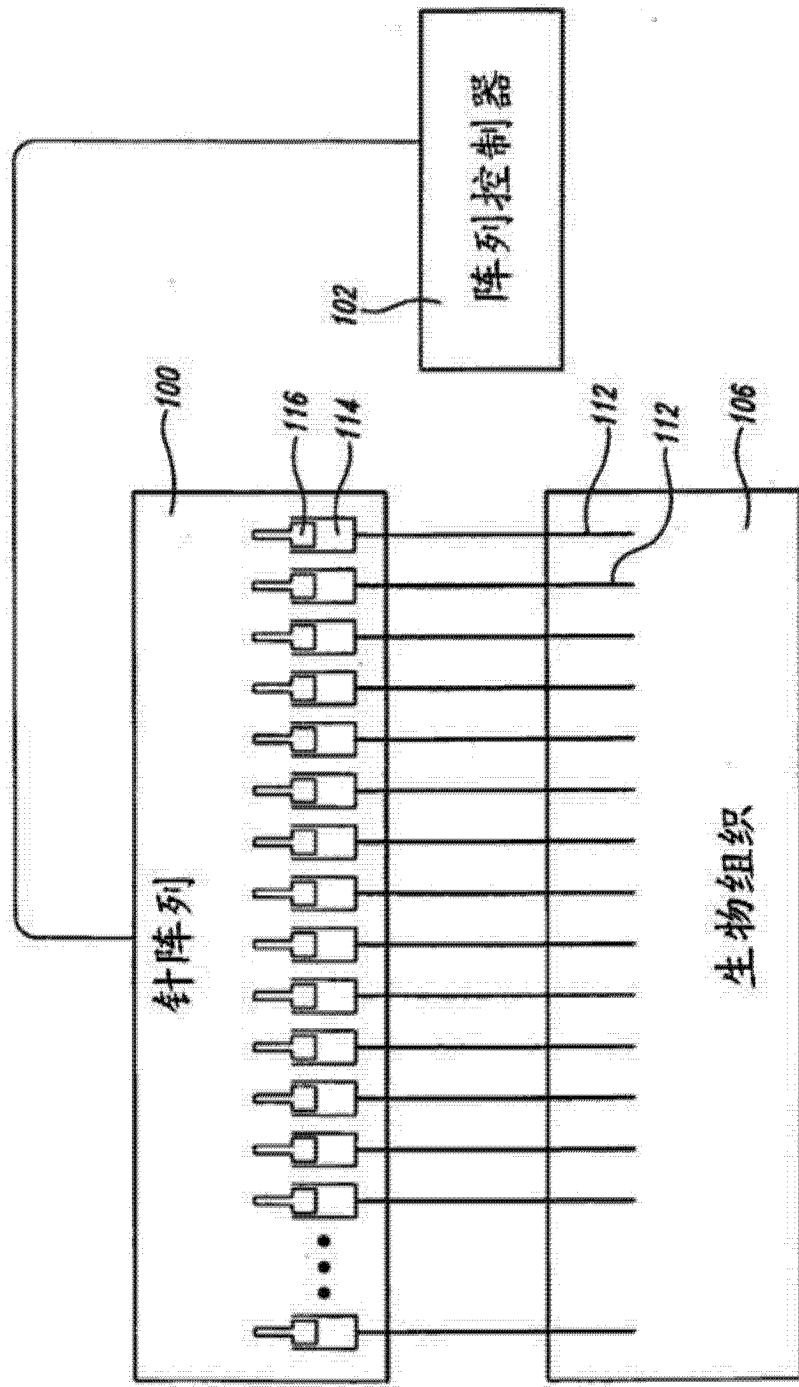


图 1

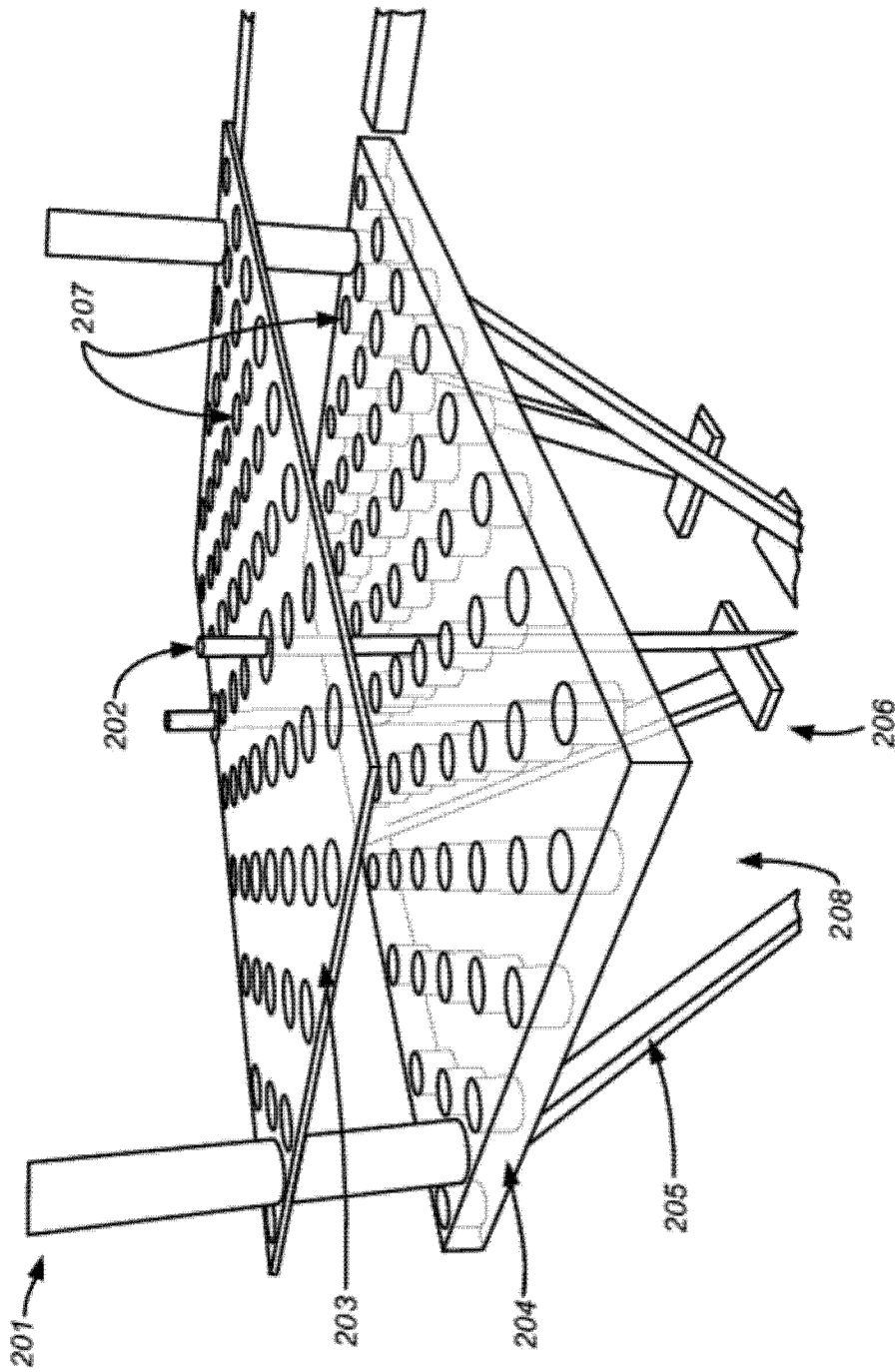


图 2

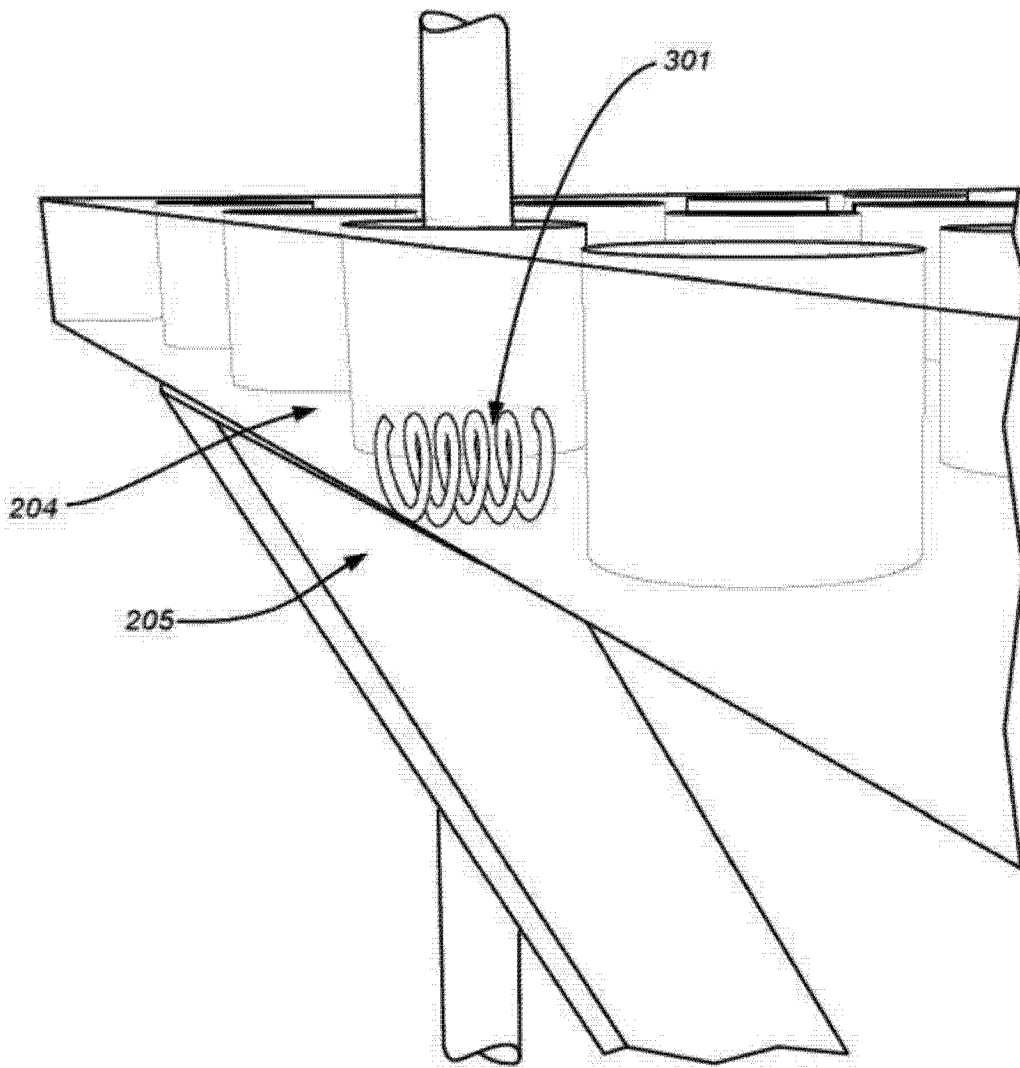


图 3

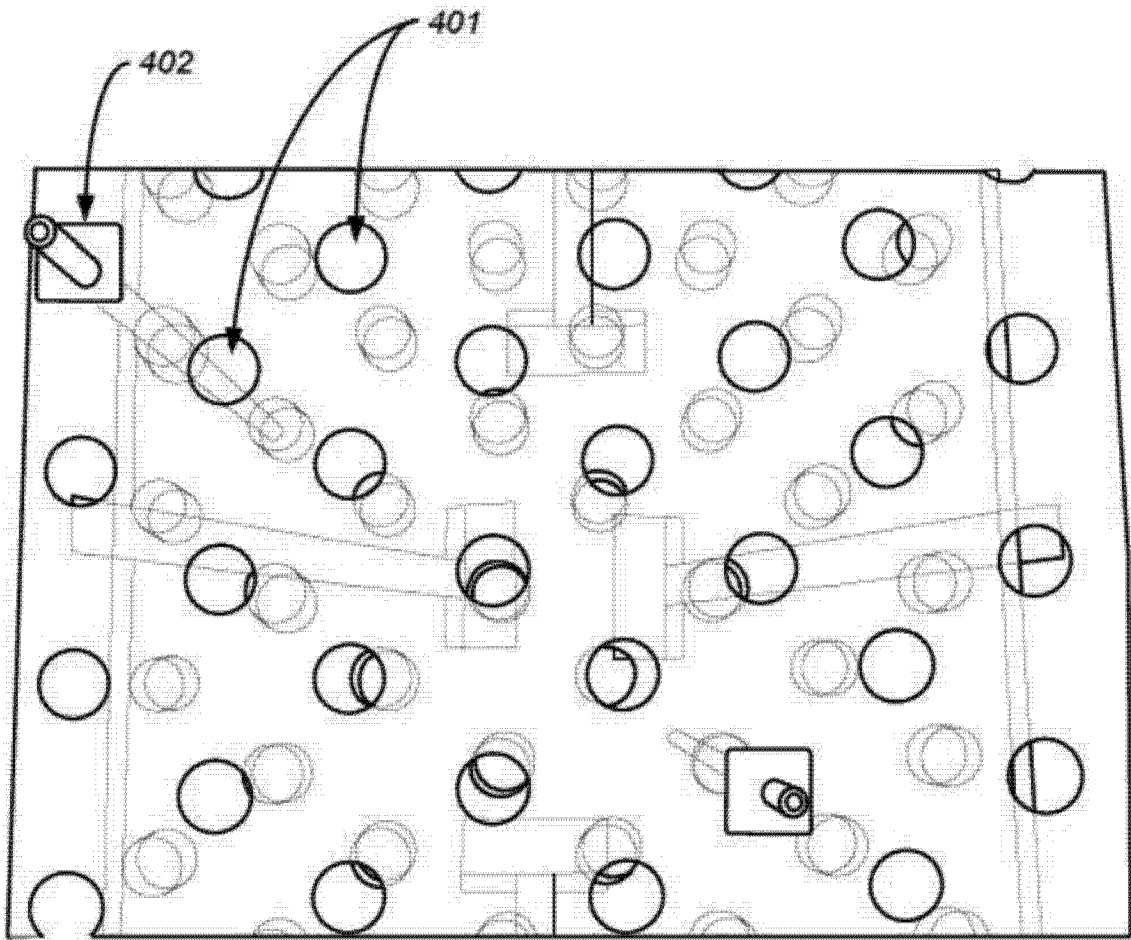


图 4

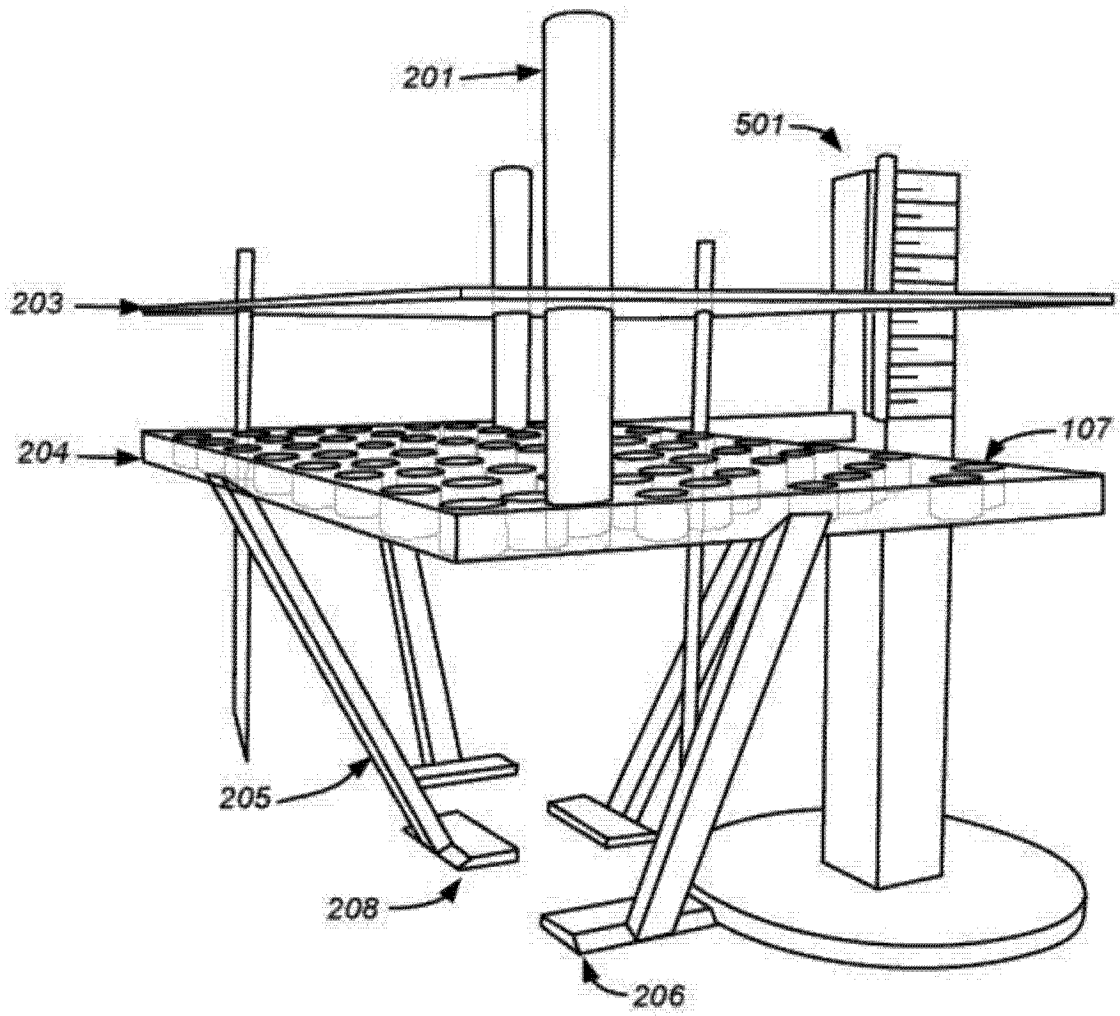


图 5

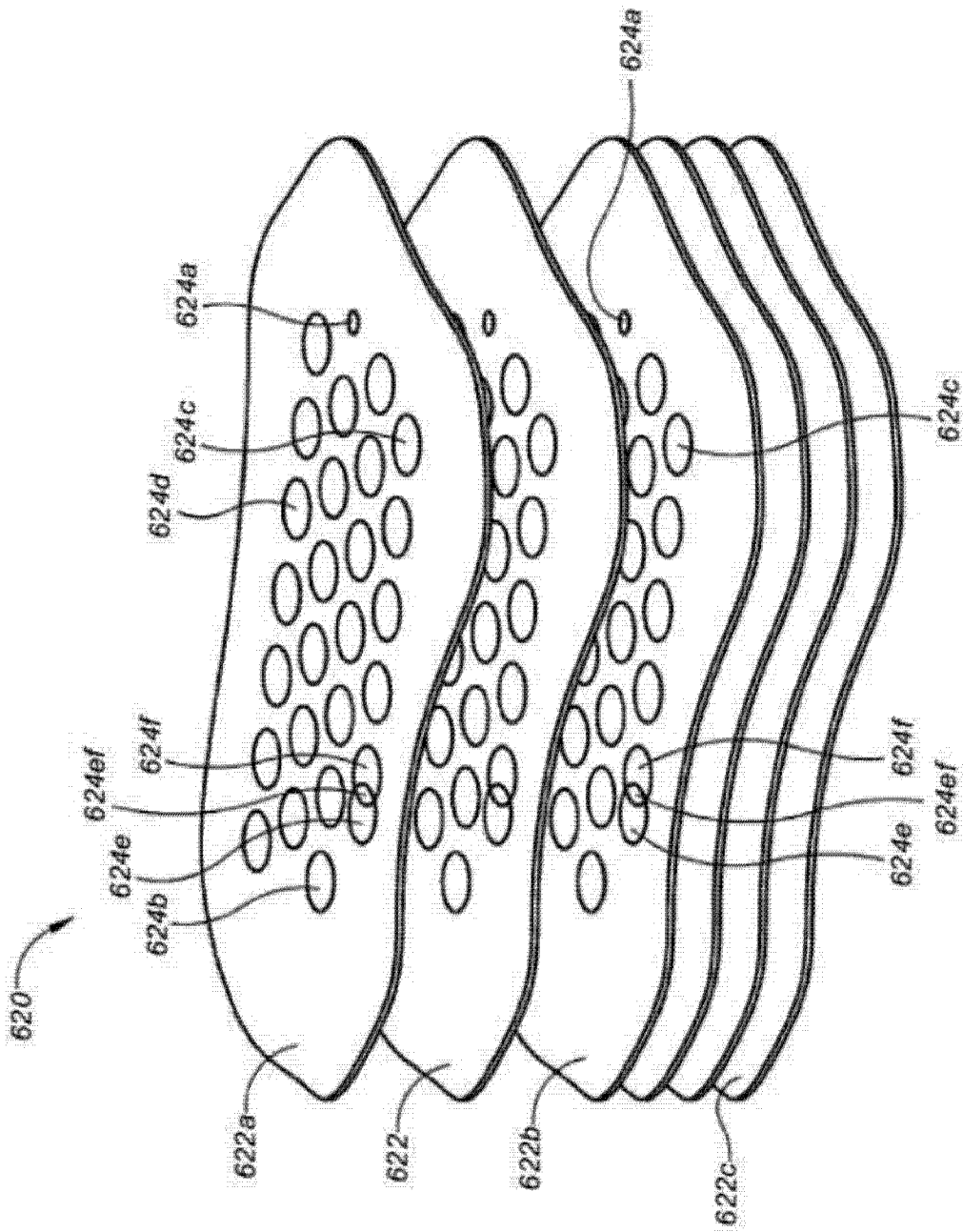


图 6

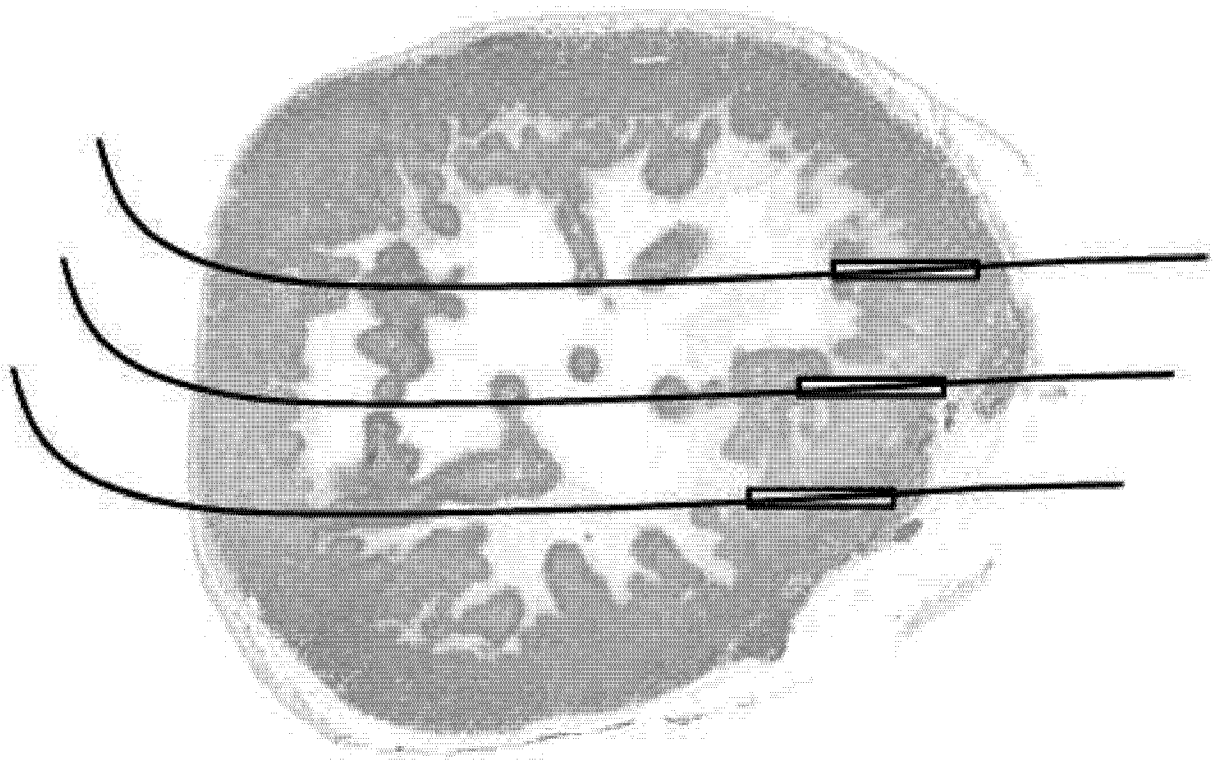


图 7

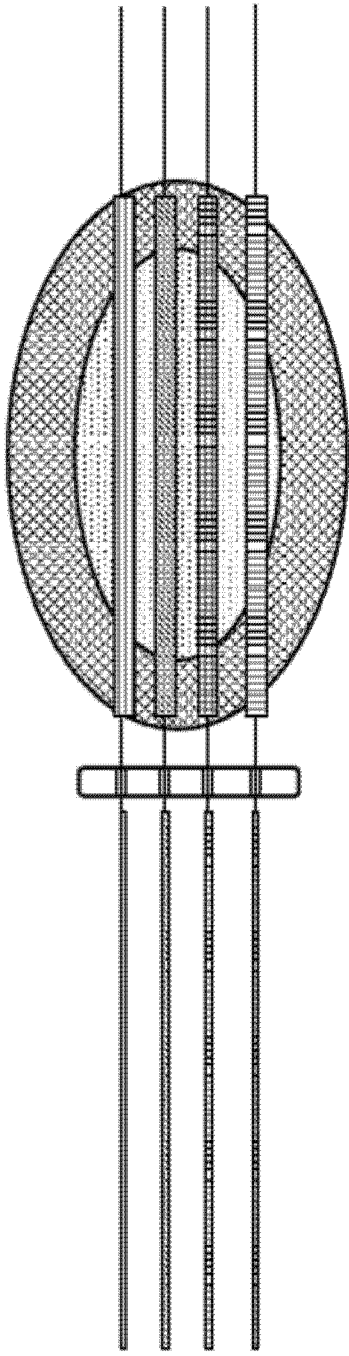


图 8

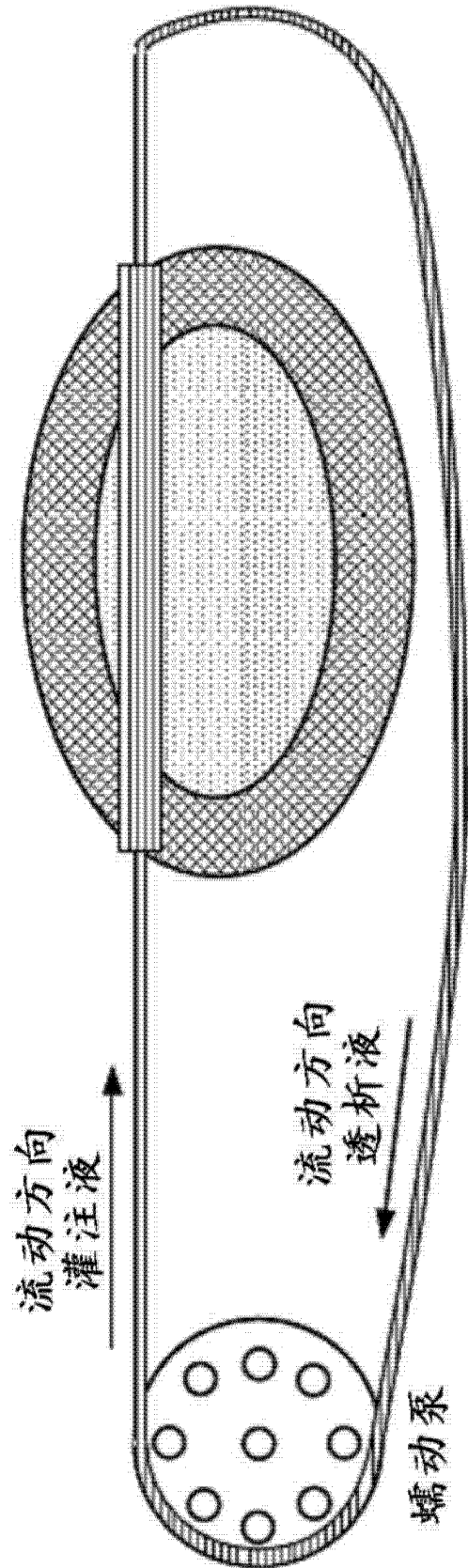


图 9

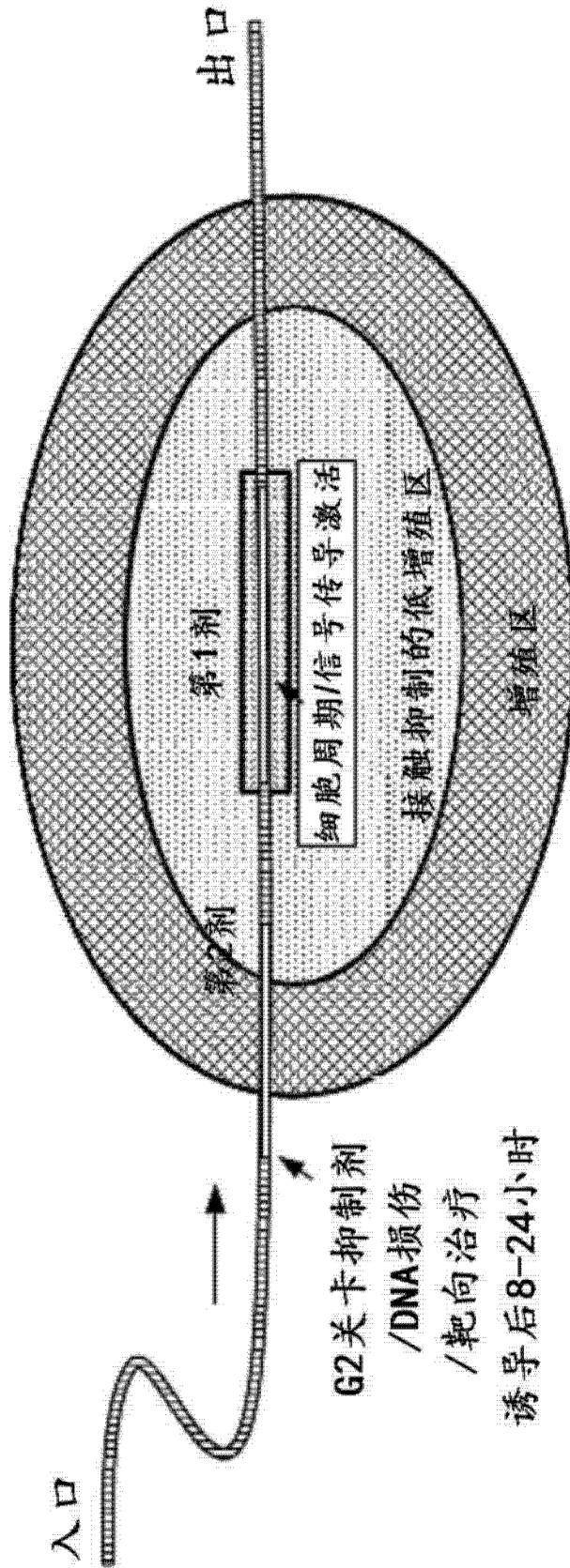


图 10

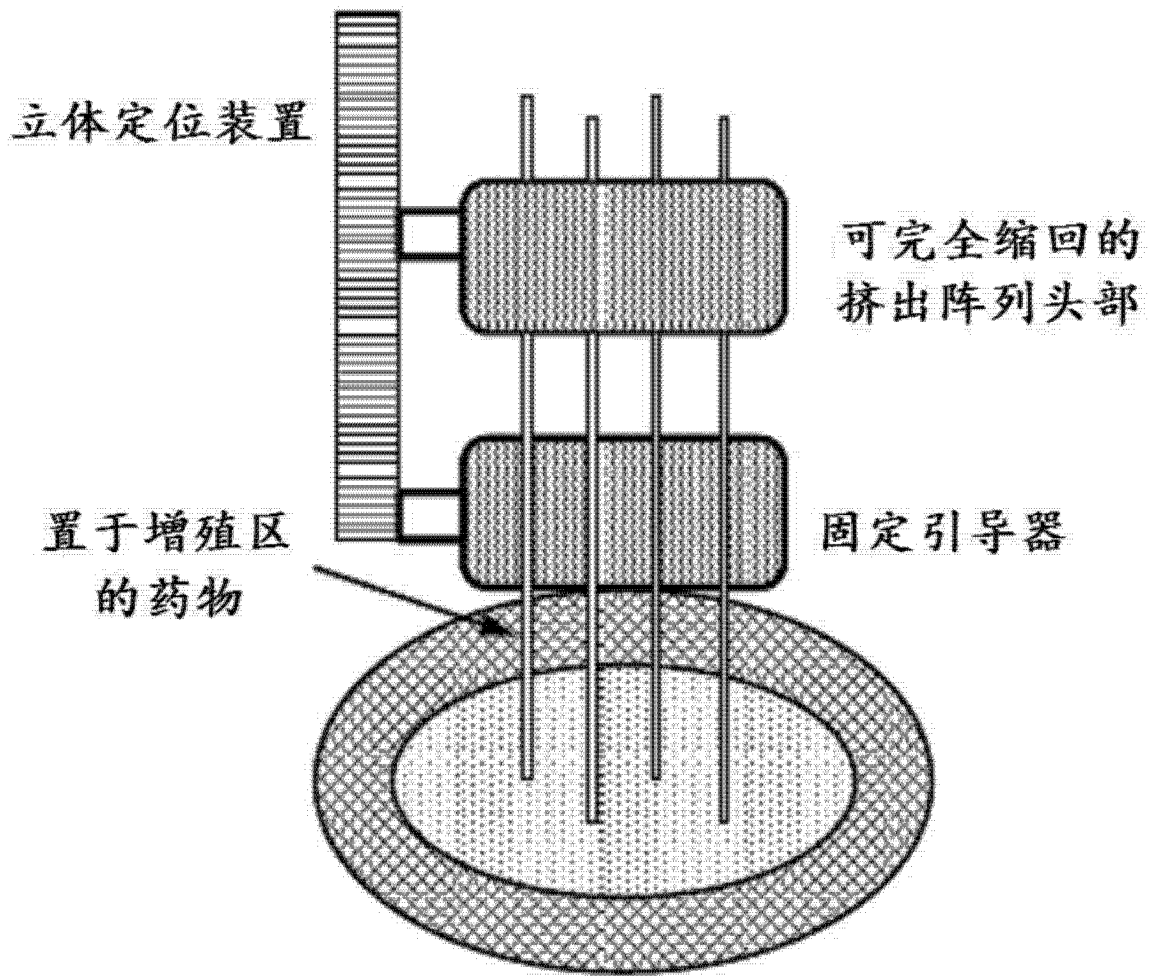


图 11

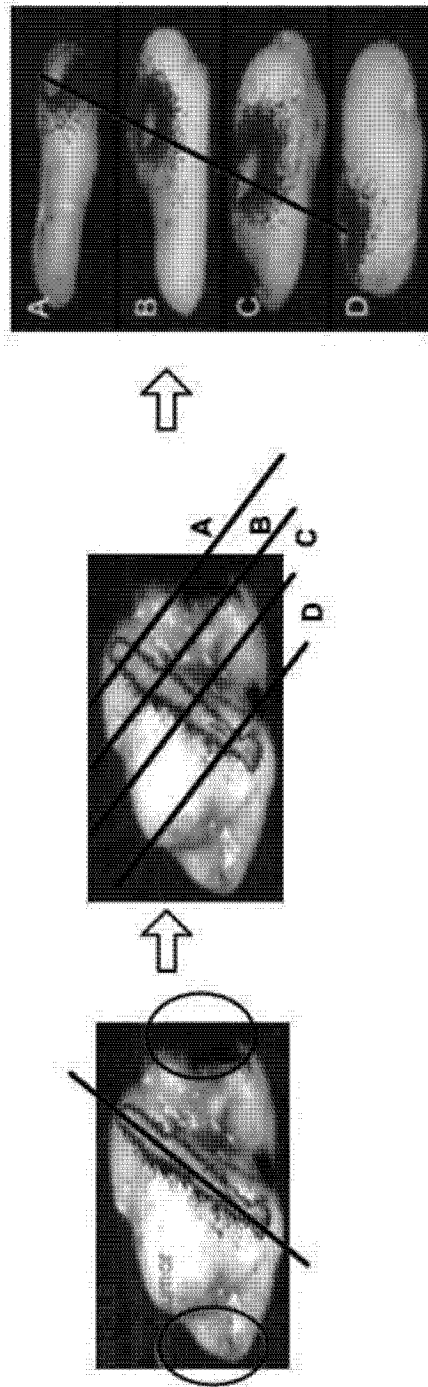


图 12

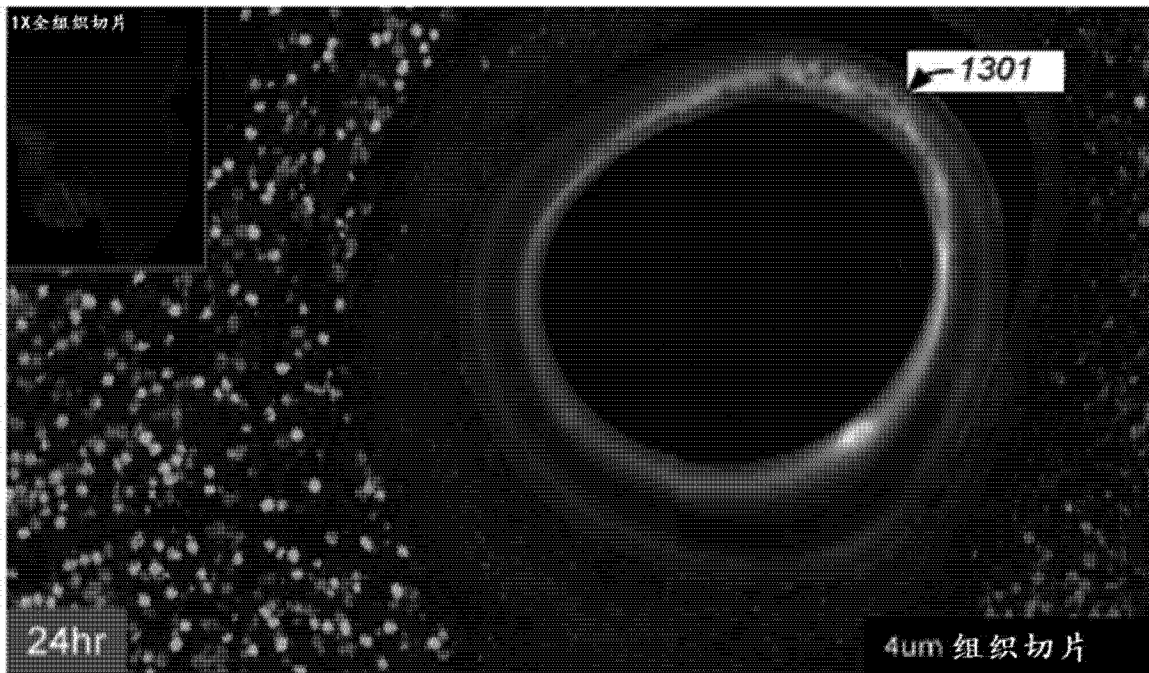
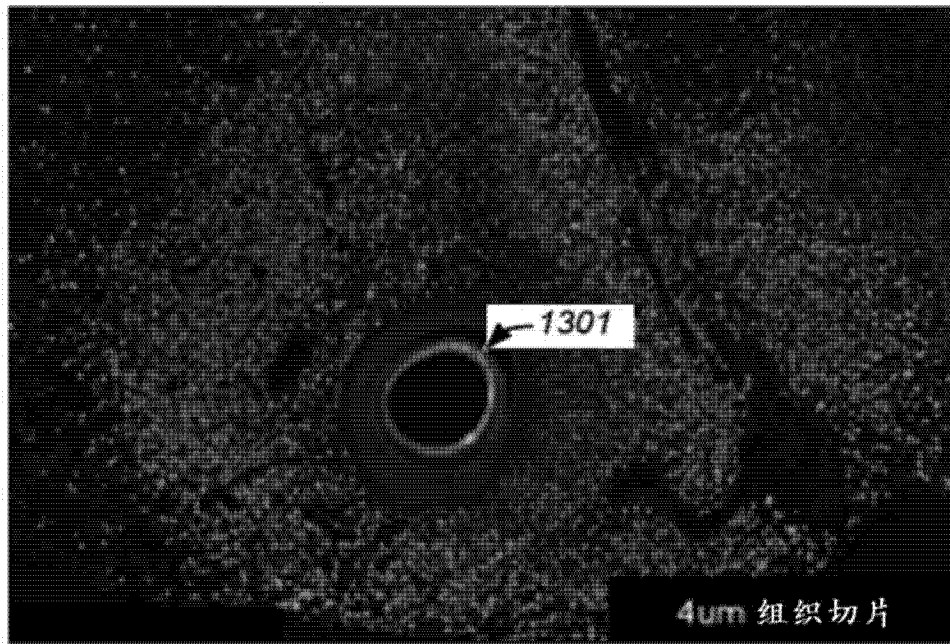


图 13

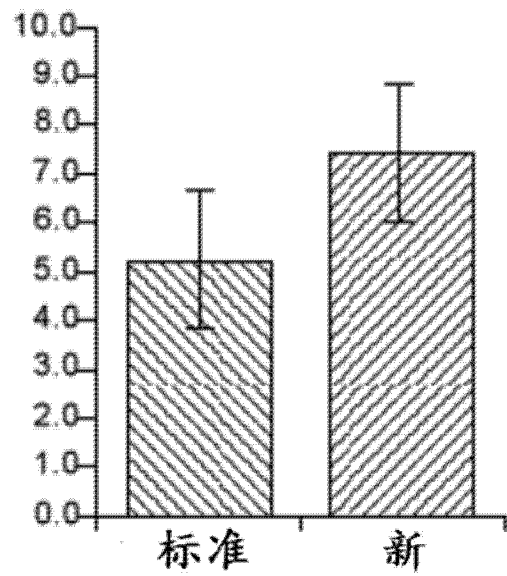
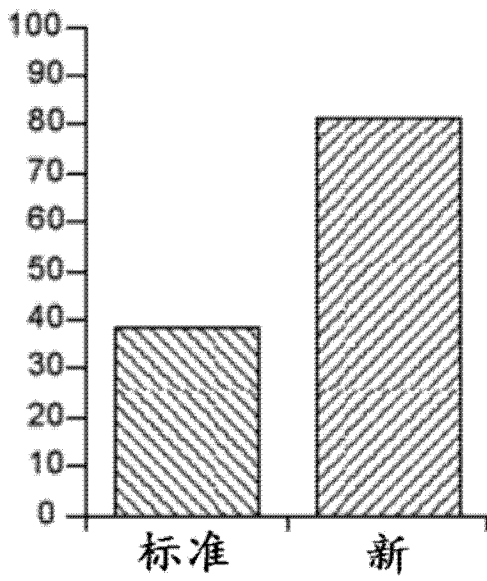
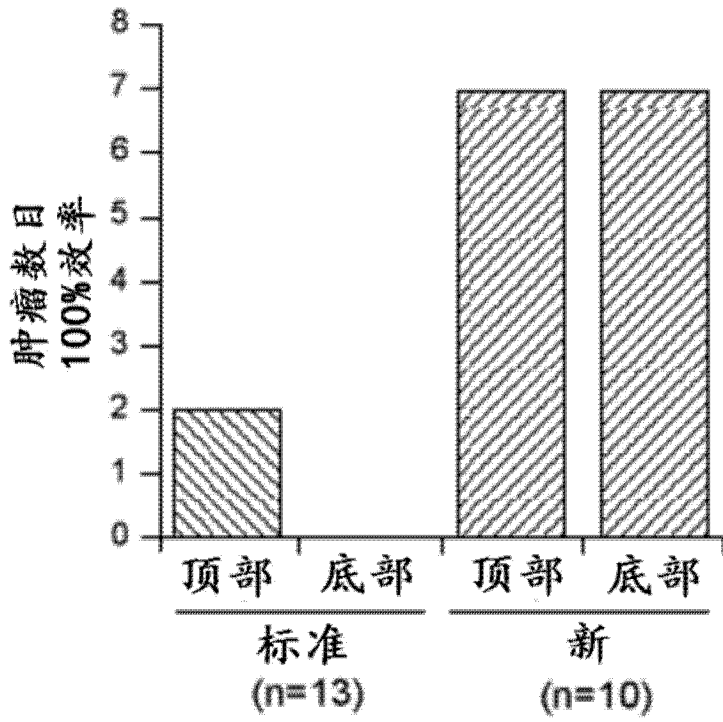


图 14

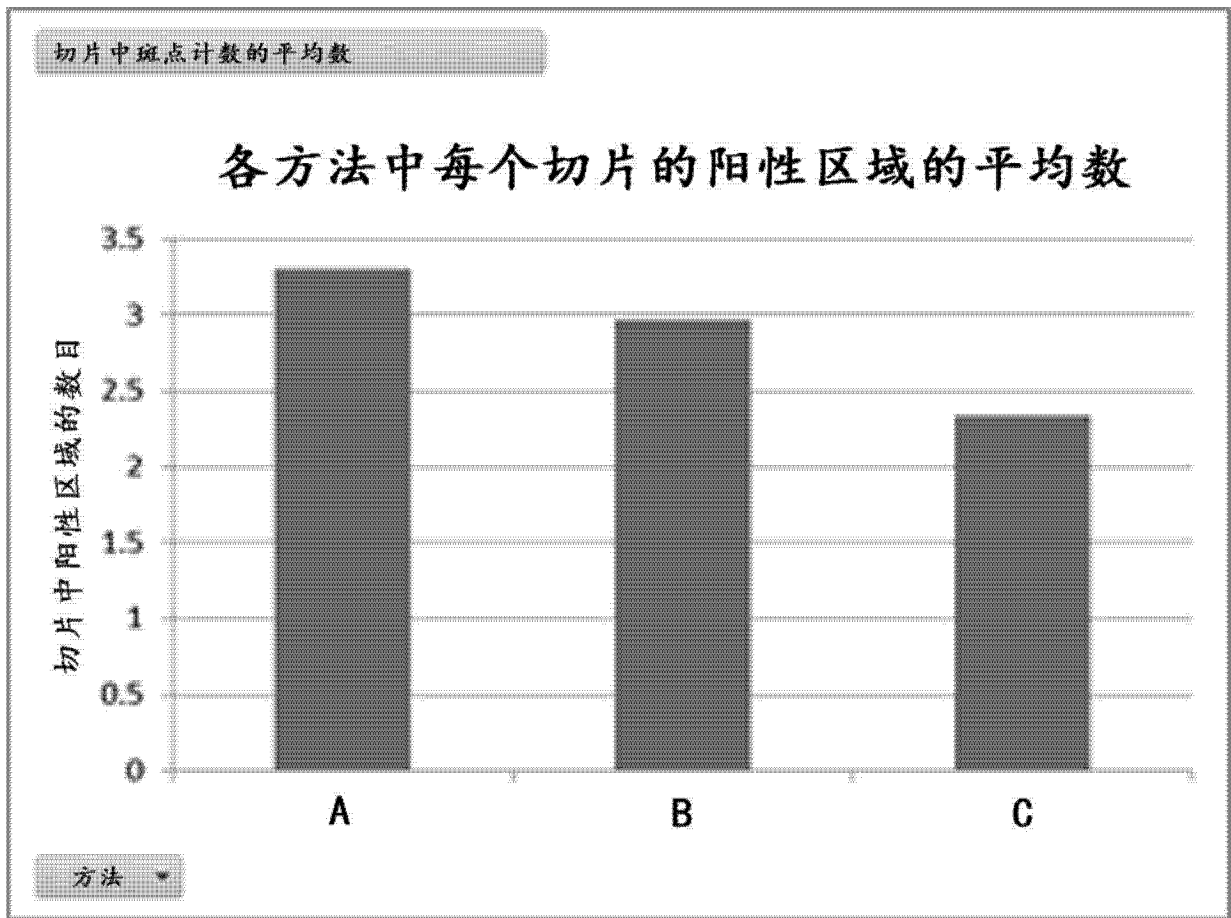


图 15

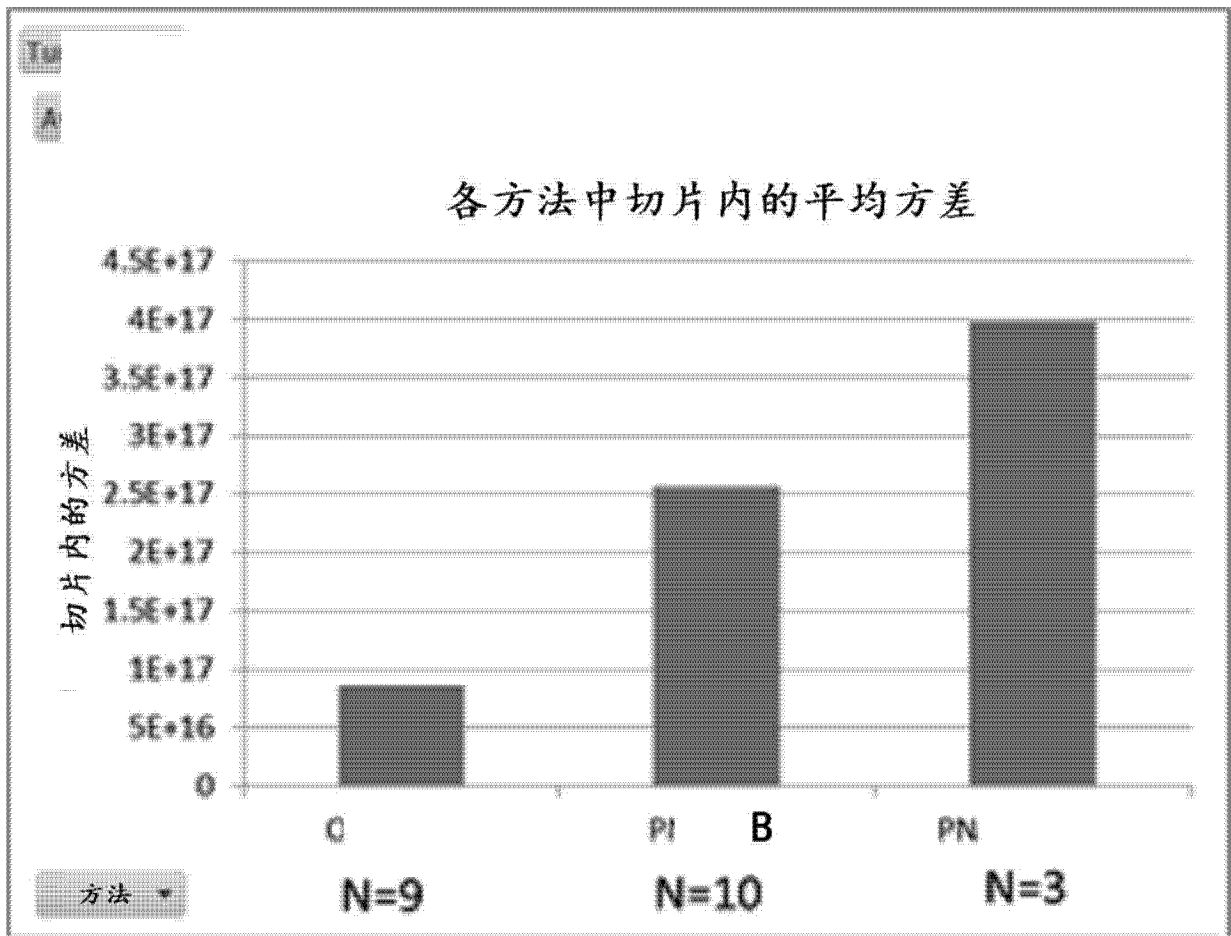


图 16

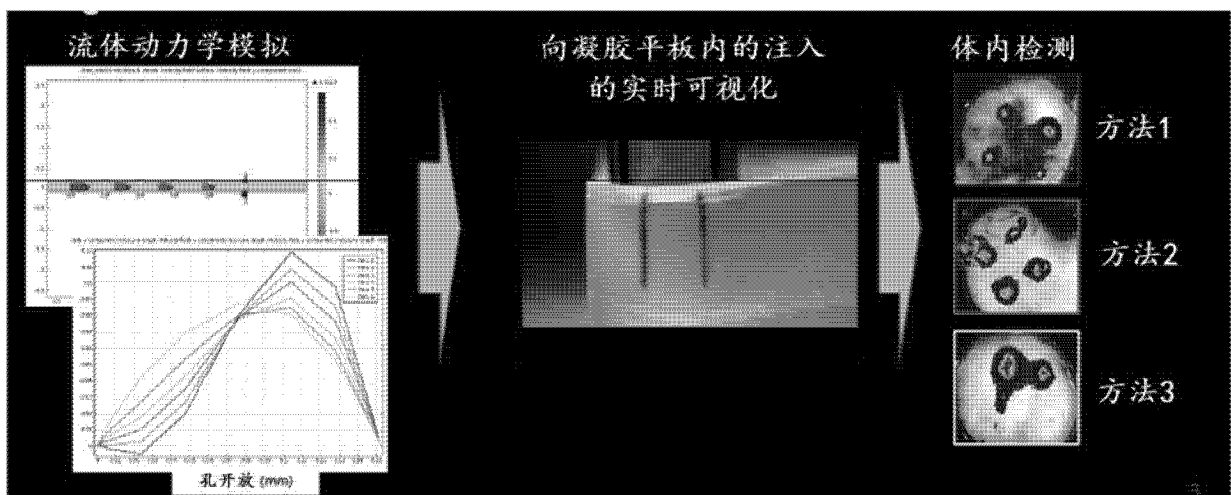


图 17

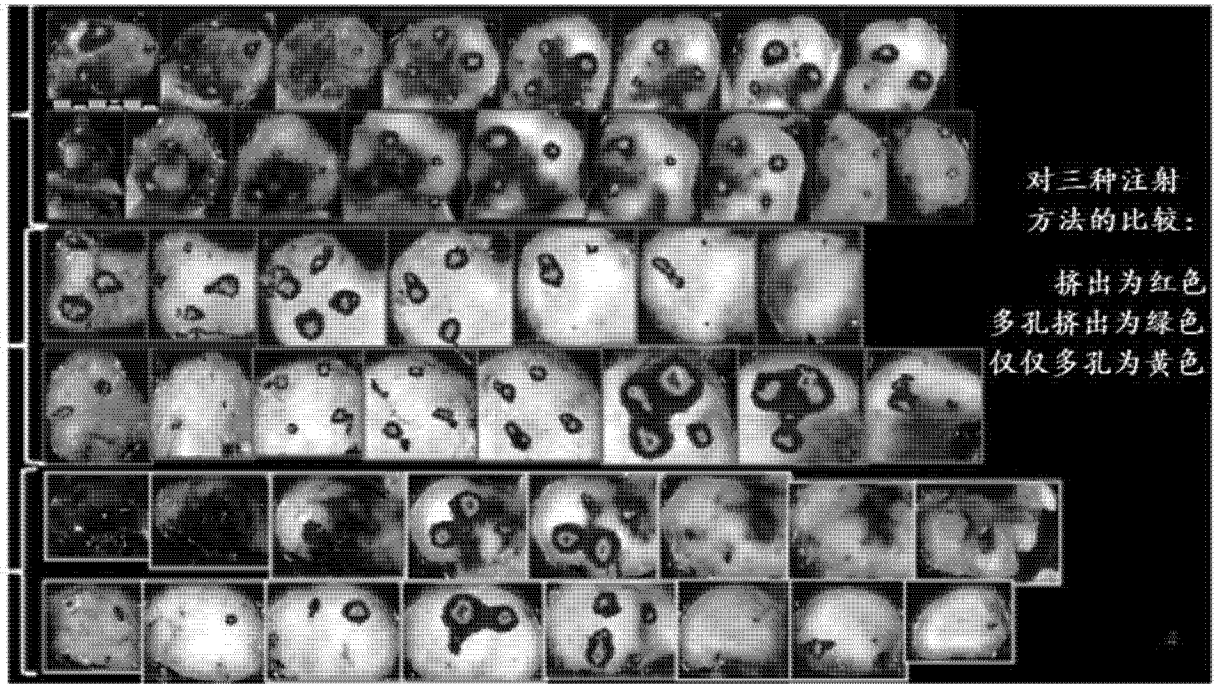


图 18