



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101370553 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 10

(21) 申请号 200780002313. 9

(22) 申请日 2007. 02. 09

(30) 优先权数据

60/772, 255 2006. 02. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 07. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/003615 2007. 02. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02007/095140 EN 2007. 08. 23

(73) 专利权人 基因特伦尼克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 鲁内·谢肯 雅各布·马蒂森

托伦·伊丽莎白·谢尔勒

乔治·麦克休

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 章社杲 李丙林

(51) Int. Cl.

A61N 1/32(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5702359 A, 1997. 12. 30, 说明书摘要, 说明书第 2 栏第 30 行—第 6 栏第 21 行, 图 1—6C、9A—9D.

US 2002/0198512 A1, 2002. 12. 26, 说明书 [0009]—[0015], [0041], 图 8—13.

CN 1312731 A, 2001. 09. 12, 全文.

审查员 李佳

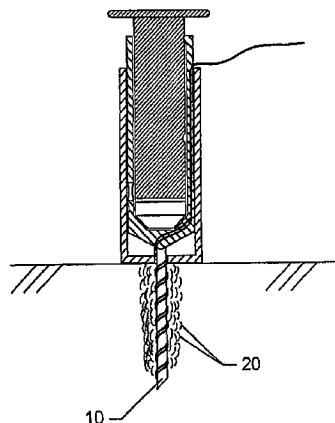
权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 19 页

(54) 发明名称

用于单针体内电穿孔的装置和方法

(57) 摘要

本发明描述了用于将分子给予体内组织以用于各种医学应用的装置和方法, 该装置包括单皮下注射针和至少两个隔开的细长电极, 其提供了这样的能力, 当该针被插入组织 (如皮肤或肌肉) 中时, 用非均匀电场脉冲化组织, 该电场足以造成位于沿着或接近在该针插入所述组织中后由该针形成的轨道的细胞的可逆穿孔。



1. 一种用于体内组织电穿孔的装置,用于将治疗性物质递送到所述组织的细胞中,包括:

a. 至少一个能够穿透所述组织的单个电穿孔针,所述针包括:

适于将包括治疗性物质的流体递送至所述组织的细长中空轴,所述轴具有从针的一端延伸到针的另一端的针的尖端的长度,以及

沿着所述轴的外部表面暴露的至少两个电极,所述电极适于递送通常为圆柱形的电场,所述暴露选自间隔开并彼此电绝缘并且彼此平行设置并平行于所述轴的长度的电极,或沿着所述轴的长度呈螺旋状并相互平行的电极;以及

b. 能够将所述电极中的每一个连接至电能源的电线导管;

其中当所述轴被插入所述组织中并且所述电极被所述电能源激发时,所述电极能够在围绕所述轴的处理区中产生电场,所述电场足以造成所述处理区中的细胞变得可逆地穿孔,以便允许所述细胞摄取所述治疗性物质。

2. 根据权利要求1所述的装置,进一步包括与所述中空轴流体连通的可膨胀或可回缩的容器。

3. 根据权利要求2所述的装置,其中,所述容器包括注射器。

4. 根据权利要求3所述的装置,其中,所述容器具有选自由0.0至0.5ml、0.0至1ml、0.0至3ml、以及0.0至5ml组成的组的可变体积的容量。

5. 根据权利要求1所述的装置,其中,所述电能源是电穿孔脉冲发生器。

6. 根据权利要求5所述的装置,其中,所述电穿孔脉冲发生器能够产生电脉冲,其中平均电压在1至200V的范围内。

7. 根据权利要求5所述的装置,其中,所述电穿孔脉冲发生器能够产生具有1mA至400mA电流的电脉冲。

8. 根据权利要求7所述的装置,其中,所述电流在选自由在10到40mA、25到100mA、50到150mA、125到200mA、175到250mA、225到300mA、250到300mA、以及300到400mA之间组成的组的范围内。

9. 根据权利要求5所述的装置,其中,所述电穿孔脉冲发生器能够产生具有选自由1至10000Hz组成的组的频率的电脉冲。

10. 根据权利要求6所述的装置,其中,所述电穿孔脉冲发生器能够产生具有选自由0.1 μ s至1000ms组成的组的持续时间的电脉冲。

11. 根据权利要求1所述的装置,其中,所述中空轴是皮下注射针,尺寸为选自由20规格、21规格、22规格、23规格、24规格、25规格、26规格、27规格、28规格以及29规格组成的组的注射针的规格。

12. 根据权利要求1所述的装置,其中,所述中空轴与每个电极电绝缘。

13. 根据权利要求1所述的装置,其中,所述组织包括选自由皮肤、皮下组织、皮内组织、骨骼肌、横纹肌、平滑肌、心脏、乳腺、肺、胰、肝、脾以及粘膜组成的组的任何组织类型或器官。

14. 根据权利要求1所述的装置,其中,所述电极沿所述轴的相对侧设置。

15. 根据权利要求1所述的装置,其中,每个电极具有基本上等于所述轴的长度的长度。

16. 根据权利要求1所述的装置,其中,所述电极在所述轴的整个长度上延伸。

用于单针体内电穿孔的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体内细胞的电穿孔,尤其是患者组织的细胞。更具体地,本发明涉及用于将分子递送到位于细长 (elongate) 单针电极的预定插入轨道位置处、附近和 / 或邻近的细胞的新型装置和方法。还更具体地,本发明涉及物质沿着针轨道 (needle track) 并在针轨道的附近被电穿孔递送入细胞内,该针轨道通过电极从组织的表面插入并进入组织中达 3mm 至 3cm 的深度,所述组织可以包括任何组织,包括但不限于皮肤、横纹肌和平滑肌、粘膜、以及器官。

背景技术

[0002] 下面的描述包括可能对理解本发明有用的信息。当并不是承认:任何这样的信息是现有技术,或者与在此要求的本发明相关,或者明确或暗示地引用的任何公开出版物是现有技术。

[0003] 电穿孔已经被用于利用各种多电极设计(如两个或多个电极的阵列,其通常被设计为用于插入所述组织的针电极)将分子递送至表面下组织。通常,这样的阵列限定位于该阵列的针电极之间的处理区 (treatment zone)。这样的处理区因此包括组织的三维体积,其中处理区中的细胞暴露于电场,该电场的强度足以造成位于三维体积内或附近的那些细胞的细胞膜的暂时或可逆穿孔,或者甚至有时不可逆的穿孔。

[0004] 用于组织内电穿孔细胞的目前的实践包括利用有效的(显著的)电压以便给予穿过三维处理区的相对均匀的电场。“相对均匀的”是指与足以引起穿孔的电脉冲的应用一致的电力线贯穿三维处理区体积被相当均匀穿过细胞被给予。最终,大量与大注射体积和高电场结合的电极针对于确保注射药与经历电场的组织体积之间的足够的重叠是必需的,因为通常,被递送至组织的注射推注团 (bolus) 从注射位置迅速扩散。高电场和大电极阵列的应用具有许多缺点。例如,许多针和高电场(电压)的应用造成更多的疼痛,同时高注射量使得剂量难以控制,因为它造成药物的浪费(大多数药物不进入细胞,因为它将在处理区的外部)。并且,这样的多针装置的应用是笨重的,并且是用于从患者的立场的理解的原因。

[0005] 除了具有多针的装置的侵入性以外,典型的电穿孔技术,如上所述,导致处理区内细胞的电穿孔中的可变性。这是电穿孔的医疗用途的缺点,因为注射的推注团的处理分子在周围组织中的分散导致对于这样的处理分子的量失去控制,所述这样的处理分子最终通过电穿孔事件被转染入处理区内的细胞中。因此,在电穿孔领域中存在对装置和方法的需要,以缩窄或精制对于进入患者的组织内特异和清晰的递送位置(递送部位)中的处理分子的“剂量”的控制。同样地,在该领域也存在对于这样的方法和装置的需要,该方法和装置可以伴随较少侵入性的电穿孔,并且给予较小的来自电场脉冲的疼痛,该电场脉冲是在将治疗性物质递送到包括皮肤、肌肉、粘膜和器官的各种组织中采用的。

发明内容

[0006] 在第一具体实施方式中,本发明提供了原位电穿孔细胞,尤其是位于皮下、皮内、皮肤下、和 / 或肌肉内 (尤其是骨骼肌、横纹肌和平滑肌,如心、肌肉) 的细胞。在相关的具体实施方式中,本发明提供了邻近和 / 或相邻于由单个细长针电极插入组织形成的轨道的细胞的电穿孔。例如,利用本发明的装置变得电穿孔的细胞是那些位于距离针轨道 0.0 到 5mm 之间的任何地方的半径内的细胞,以便包括基本上圆柱形的处理区,该处理区由单针电极给予组织内的电场的新型设计和脉冲给予。

[0007] 在第二具体实施方式中,本发明提供了任何数量的结构性布置 (structural arrangement), 提供了位置与单细长电惰性轴相关的至少两个相对电极导线 (即,至少一个阳极和至少一个阴极), 其轴本身可以包括电极和电惰性材料,如医学上可接受的塑料或聚碳酸酯,填充电极之间的空间 0.05mm 至 1.5mm 之间,或者可以仅包括细长相对隔开 (space) 的电极。在任一具体实施方式中,穿过组织的单针电极或包含轴的电极的电极具有 0.05mm 到 1.5mm 之间的间隔尺寸。在相关的具体实施方式中,电极本身可以具有沿着细长轴任何地方从整个针长度到仅仅针的部分 (如邻近轴穿透尖端) 暴露的长度。此外,电极可以具有 0.005 到 0.80mm 之间的截面尺寸。在又一结构性布置的具体实施方式中,单针电极可以包括皮下注射针,该皮下注射针包括至少两个沿着皮下注射针外部的长度的至少一部分隔开的细长电极。例如,皮下注射针可以包括至少两个沿着针的长度的一部分延伸的电极 (即,阳极和阴极)。(参见图 1A) 在工作具体实施方式中,每个电极连接至用于在相对极 (异性极) (即,一个电极为阳极电极,而另一电极为阴极电极) 之间产生电场的电能源。在另外的实施例中,多个电极可以形成在皮下注射针的外部上,如图 3 所披露的包括多个直和平行的电极,或者如图 2 和 4 所示的包括多个螺旋环绕注射针的电极。在又一具体实施方式中,单针电极可以利用任何数量的熟知方法来制造,所述方法包括蚀刻和分层 (layering) 每个微电-机械系统 (MEMS) 技术。在这样的制造方法中,显微机械加工工艺被用于添加或去掉对于电脉冲和电路的正确退火、绝缘和传导重要的物质的层。图 13A、B、C、D 以及 E 是具体实施方式的照片,其中电极被蚀刻到递送针轴上。具体地,金电极分层已被涂覆到惰性物质 (聚对二甲苯) 的层上,其本身已经在皮下注射针轴上被分层。用于制造细长电极的另外的方法包括挤出技术,其中电极导线形成入和 / 或沿着具有绝缘性质的电惰性成分的轴,如塑料、聚酯衍生物、或聚氯乙烯 (PVC)、或绝缘碳纤维。如图 14A 和 B 所示,细长中空针可以用电极成分挤出,如,例如,沿着中空轴的相对侧或以螺旋形式的线,如图 14B 所示。此外,针轴还可以包括没有暴露的电极的部分。例如,针轴的一端连接至形成用于连接至流体源的连接器的集线器 (中心,轮轴, hub), 如,例如注射器。在轴的这样的部分附近或沿着轴的这样的部分的绝缘可以提供患者的可察觉的电刺激感觉的减少。在关于本文描述的任何这样的电极构造的又一具体实施方式中,每个电极可单独地激发,以便电极的任何组合可以成对 (即,阴极和阳极) 一起同时激发或以任何给定顺序激发,并且进一步利用任何类型的脉冲,包括而但不限于单极、双极、指数式衰减、或前者的任何的脉冲串 (脉冲群) 组合。

[0008] 在第三具体实施方式中,本发明提供了相对低电压和 / 或低电流的应用,其又不仅提供了用于造成处理区内细胞的可逆穿孔的足够电能,而且允许在电脉冲应用到周围组织期间由受治疗者经历低痛苦水平,所述应用利用通常在 1 到 100V 之间、典型地在 2 到 50V 之间、更优选地在 3 到 25V 之间的额定电场强度。在相关方面,本发明的装置和方法采用的

电流通常使用在 1 ~ 400mA 之间,典型地在 5 ~ 200mA 之间,并且更优选地在 20 ~ 100mA 之间。在相关的具体实施方式中,所选的安培数取决于电极的总表面积。例如,取决于每个电极的总电极表面积,该装置可以采用 10 至 40、或 25 至 100、或 50 至 150、或 125 至 200、或 175 至 250、或 225 至 300、或 250 至 300 或 300 至 400mA 之间的范围。表面积越小,为获得原位组织中的电穿孔电场必须的安培数越低。脉冲可以应用 1 至 1000 毫秒。

[0009] 在另一具体实施方式中,本发明提供了以各种浓度(如,例如,在 0.05 μ g ~ 3 mg/ml 之间)并优选以低推注体积(如,例如,通常 1 μ l 至 1ml)递送处理分子。在相关的具体实施方式中,利用包括与单针电极轴相关的递送管的结构性的具体实施方式,处理分子的体积在注射入组织后(如受控注射,其中在针的插入期间递送注射液(injectate))立即令人吃惊地在注射针轨道附近保持在基本水平(substantial level)。处理分子被预期包括治疗性药物,如小分子、有机化合物、以及蛋白质、和编码多肽的核酸,所述多肽具有生物活性或者一旦这样的多肽在电穿孔的细胞中表达将导致宿主中的免疫反应。曾经在细胞中表达的多肽可以有效用于与细胞代谢机器(cellular metabolic machinery)和免疫系统通路相互作用。

[0010] 在又一具体实施方式中,用于脉冲组织的电能提供了独特的电场,其不同于用于类似组织电穿孔的先前应用(施加)的场。具体地,现有技术电场故意地和固有地给予在电穿孔领域被认为是“均匀的”电场,意味着所施加的电能是足够强度的以给予额定场强和穿过处理区的相对均匀的电压降,其通过相互离开给定的距离而广泛分开电极并将靶处理区最佳地放置在所述间隔的电极之间的中心来形成。这样的电极阵列设计在组织中脉冲化时,倾向于电穿孔主要在通常在电力线附近的由电极分界的区域内的细胞,并且到达仅在相邻并围绕三维处理区定位的较小程度的细胞区。

[0011] 相反,本发明利用包括通常为圆柱形或柱形“非均匀”场的电场,该“非均匀”场形成约针轴的长度,从而形成细胞的处理区,所述细胞位于足够接近中心放置的电极的区域内,遭受电极的邻近位置的外部的强度足以穿孔所述细胞的电穿孔场。这样的处理区完全在中心针和电极的外部并且围绕所述中心针和电极,而非均匀场相对于从电极/针向外的距离耗散(消散,dissipate)。通常,认为随着从单针电极的距离增加,电能中的耗散(消散)平行于在其它物理现象中存在的消散,其中能量,这里能量足以可逆地穿孔细胞,以指数比率耗散。然而,这样的耗散速率,如果可应用,并不会负面地影响本发明装置的功能或者将物质递送到限定区域中的细胞的期望结果。因此,由于造成细胞穿孔所需的电能随着从电场源的距离而耗散,对电穿孔敏感的针轨道周围的区域固有地局限于与针轨道的长度相关的中心核并且侧向地限于给定的半径,因此通常依赖于给予电极的脉冲能形成可变半径的圆柱形处理区。在又一相关的具体实施方式中,用于脉冲的能量越多,破坏直接与电极接触的细胞的潜能越大。本发明的方法的又一意图是将造成这样的损害的能力用于进一步刺激免疫系统的目的。因此,可以使用处理方案(治疗方案,treatment regimen),其有意地给予较大而不是较小的能量,以便提供用于处理部位周围免疫反应活性的刺激。

[0012] 在另一具体实施方式中,该装置可以用于递送药物、具有生物活性的天然多肽、以及编码这样的多肽的基因,其可以在处理区内的细胞中原位表达,用于治疗病症或者用于调节宿主中的免疫反应和/或用于治疗多种疾病,包括但不限于由致病生物和病毒造成的疾病和癌症。

[0013] 通过下面的附图、详细说明、以及所附权利要求,本发明的其它特征和优点将变得显而易见。

附图说明

[0014] 图 1A 是示出了具有整合(集成)在其中的细长电极的皮下注射针的示图。该针的特征在于用于分配来自穿过其中的腔的液体制剂的端口和用于连接至运载(携带)液体的容器的端口。

[0015] 图 2 示出了本发明装置的可替换具体实施方式,其中阳极和阴极电极相互平行通过围绕针的螺旋中形成的平面。

[0016] 图 3A 是另一可替换的具体实施方式,其中递送针包括多个沿着递送针的长度直接和平行延伸的阳极和阴极电极。也如示出的,该图包括用于将电极连接至电能源的连接器的实施例。图 3B 示出了沿线 A-A 的本发明电极的一个实施例的横截面图。如所示的,在一种构造中,电极可以通过多种制造工艺领域中的技术人员已知的多种技术在递送管和腔的外截面上被分层。在该图中示出了具有由绝缘材料 55 包绕的腔 54 的内针 53,其上电极被分层。

[0017] 图 4 是一种具体实施方式的另一实施例,包括盘旋(螺旋)环绕递送针的电极。如此盘旋的电极可以包括多个阳极和阴极对,但是通常包括一对或两对电极,每对包括阳极和阴极。

[0018] 图 5A-C 示出了本发明的一个具体实施方式,其中,本发明的电极被示出,包括另外的具体实施方式,其包括容器(通常为注射器样式的容器),以及在针被插入患者组织中时能够缩回的尖罩(sharp cover)。该图还示出了其他特征,其可以被体现在本发明的装置内,如弹性膜(resilient membrane)(其可以如被针刺穿以填充容器)和机构(用于允许尖罩和注射器柱塞被适当地保持在延伸或缩回的位置)。此外,可缩回的尖罩还作为针导向装置并且可以安装有挡块以用作深度导向装置。虽然未示出,但单针电极可以被安装到注射器并附着于自动针递送/同时流体递送电穿孔装置,如在美国专利申请 10/612,304 和 PCT/GB2003/002887 中所示出的。在这样的具体实施方式中,该装置将仅具有一个针和一个注射器。

[0019] 图 6 示出了使用中的本发明的装置的图,其中在电极/递送针被插入组织的插入期间或插入后,流体物质被给予,电极被激发以便从针轨道向外给予电场并进入组织中。电场从插入针的部位向外耗散入组织中。

[0020] 图 7 示出了假设组织的顶视图以及本发明装置将在围绕针轨道的组织内产生的并具有侧面尺寸(a)和(b)的典型电场的图。

[0021] 图 8A-C 是示出了具有通常相对均匀的电力线的现有技术阵列和阵列针之间相应的电场的图,与本发明的相反,其中非均匀电力线和各自的电场围绕该阵列并且从其迅速消散。例如,图 8A 示出了线性阵列中的三个相对电极,其中电极之间的力线相对均匀。在图 8B 和 C 中示出了环形阵列,其中处理区在电极的中心并且在相对均匀的力线和各自的电场之下(在相对对内独立地脉冲化,图 8B,或者在不同方向上相对电极的成对脉冲化,图 8C)。

[0022] 图 9A-D 示出了本发明装置的另一具体实施方式,其包括引导装置,用于放置(保持,rest)以锐角穿透要处理的组织的针和容器,用在包括将处理物质递送到组织表面附近

的方法中。该角通常从由组织表面的总区域形成的平面在 3 到 25 度之间。

[0023] 图 10 示出了包括在递送针的尖端附近暴露的电极的递送针的局部视图。图 10A 示出了支撑直线电极的针,而图 10B 示出了支撑螺旋电极的针。示出的用于阳性和阴性阴极的每个的导线在针的内部延伸。此外,该图试图表示细长针的上部可以包括围绕电极导线和 / 或涂覆上针轴的绝缘(绝缘体,insulation)。

[0024] 图 11A 和 B 示出了组织中电穿孔的结果,其中主要在针轨道附近的细胞已经被穿孔影响。在图 11A 中示出了组织的相邻薄片的系列照片,而图 11B 示出了直接沿针轨道的中心薄片的特写图。

[0025] 图 12 示出了利用根据本发明的电穿孔装置单注射入兔高肌肉(high muscle)包含编码荧光标记蛋白(fluorescent marker protein, GFP)的表达载体的核酸的结果。

[0026] 图 13A、B、C、D 和 E 示出了原型皮下注射针的放大照片,其中金细长电极利用 MEMS 技术被蚀刻到标准注射针上,即将材料显微成层、以及蚀刻和重新成层到基础注射针轴上,使得每个电极包括 1/4 的针轴圆周。图 13A 示出了针的一个视图,示出了沿针长度延伸的一个长电极。在图 13B 中,从允许两个金电极的终端部分可视化的角度示出了详细图。图 13C 是示出了蚀刻到针轴上的电极的终端部分的细节的另一透视图。图 13D 和 E 示出了另一具体实施方式,其中 MEMS 制造的电极是针轴的 1/16 圆周。

[0027] 图 14A、B 和 C 是示出了单针设计的另外的具体实施方式的图,其中该轴包括惰性材料,如,例如,塑料,挤压为构建成挤压的皮下注射轴(皮下注射器轴, hypodermic shaft)的电极导线。图 14A 示出了平行于针轴延伸的直电极。图 14B 示出了轴周围螺旋状的电极。图 14C 描绘了示出一个具体实施方式的图 14A 的横截面 AA-AA,其中轴的电极可以连接至定位在针集线器(针中心, needlehub)的电极导线。

[0028] 图 15 是示出了兔抗人 IgG 抗体的水平的图,该抗体在利用单针发明(■)电穿孔脉冲与没有电穿孔(▲)后产生。

[0029] 图 16 是示出了兔抗 SEAP 抗体的水平的图,该抗体在利用单针发明(■)电穿孔脉冲与没有电穿孔(▲)后产生。

[0030] 图 17A 和 B 是示出了在注射编码 GFP 的质粒 DNA 随后没有电穿孔后绿色荧光蛋白(GFP)的结果的照片。与自然光和荧光结合,图 17A 示出了在注射 / 针轨道位置附近的组织的相邻薄片。该照片示出在没有电穿孔的情况下没有表达。

[0031] 图 18A 和 B 是分别示出了自然光和绿色荧光的组合或仅荧光的照片,其中注射编码 GFP 的质粒 DNA 后利用包括 23 规格针和具有针轴周长的 1/16 宽度的阳极和阴极电极进行电穿孔。在该实验中,电极以 50mA 的恒定电流被脉冲化。

[0032] 图 19A 和 B 是示出了自然光和绿色荧光的组合或仅荧光的照片,其中注射编码 GFP 的质粒 DNA 后利用包括 23 规格针和具有针轴周长的 1/16 宽度的阳极和阴极电极进行电穿孔。在该实验中,电极以 100mA 的恒定电流被脉冲化。

[0033] 图 20A 和 B 是示出了自然光和绿色荧光的组合或仅荧光的照片,其中注射编码 GFP 的质粒 DNA 后利用包括 23 规格针和具有针轴周长的 1/4 宽度的阳极和阴极电极进行电穿孔。在该实验中,电极以 50mA 的恒定电流被脉冲化。

[0034] 图 21A 和 B 是示出了自然光和绿色荧光的组合或仅荧光的照片,其中注射编码 GFP 的质粒 DNA 后利用包括 23 规格针和具有针轴周长的 1/4 宽度的阳极和阴极电极进行电穿

孔。在该实验中,电极以 100mA 的恒定电流被脉冲化。

[0035] 图 22A 和 B 是示出了自然光和绿色荧光的组合或仅荧光的照片,其中注射编码 GFP 的质粒 DNA 后利用包括 23 规格针和具有针轴周长的 1/4 宽度的阳极和阴极电极进行电穿孔。在该实验中,电极以 150mA 的恒定电流被脉冲化。

[0036] 图 23A 和 B 是分别示出了自然光和绿色荧光的组合或仅荧光的照片,其中注射编码 GFP 的质粒 DNA 后利用包括 1mm 间隔没有流体递送实施方式的电极的单针电极进行电穿孔。在该实验中,电极以 75mA 的恒定电流被脉冲化。

[0037] 图 24A 和 B 是分别示出了自然光和绿色荧光的组合或仅荧光的照片,其中注射编码 GFP 的质粒 DNA 后利用包括 1mm 间隔没有流体递送实施方式的电极的单针电极进行电穿孔。在该实验中,电极以 150mA 的恒定电流被脉冲化。

[0038] 图 25A 和 B 是分别示出了自然光和绿色荧光的组合或仅荧光的照片,其中注射编码 GFP 的质粒 DNA 后利用包括 1mm 间隔没有流体递送实施方式的电极的单针电极进行电穿孔。在该实验中,电极以 250mA 的恒定电流被脉冲化。

具体实施方式

[0039] 在第一具体实施方式中,本发明包括体内用于组织的电穿孔的装置,该装置包括由能够原位插入生物组织或器官和通过其递送流体介质的材料制成的中空轴(即,递送针轴),所述轴进一步包括在所述轴的外部表面上至少部分暴露的至少两个电极,其中所述电极相互间隔并且沿着所述针轴彼此平行设置。用于电极的具体实施方式可以采用多种电极结构设计。例如,阳极和阴极电极可以与递送针结合设置,其相互平行延伸并且到递送针的长度,如图 1 和 3 中所披露的,或者其相互平行但是绕着针轴呈螺旋状,如图 2 和 4 中所示出的。本发明的装置还包括将所述电极的每一个连接至电能源的电线导管,其中所述电极在所述针被插入患者组织中时能够单独地被激发(增能, energize),产生到达围绕所述针的处理区中的细胞的电场,该电场足以引起沿着由所述针插入所述组织形成的轨道和轨道附近的细胞变得可逆地穿孔,以便允许处理分子进入所述细胞。

[0040] 这样的包含流体递送针的电极的制造可以通过许多熟知的方法进行,所述方法包括显微机械加工,如通常理解的 MEMs 技术。例如,可以用电惰性材料涂敷标准皮下注射针(其可以为任何规格,如 20 规格、21 规格、22 规格、23 规格、24 规格、25 规格、26 规格、27 规格、28 规格以及 29 规格),随后沉积电传导材料(导电材料),如金,随后又在针的表面上沿理想的方向蚀刻去除传导材料。具体地说,通常该过程包括在准备惰性物质(如,具有均匀地附着于表面的性能的聚合物,如聚对二甲苯)的沉积中清洁皮下注射针轴。在剥离金属轴后,例如通过真空沉积,将聚对二甲苯沉积到针上。这又利用激光被图案化以沉积电极可导电材料,如金,随后又选择性去除金以在针轴上形成预定图案的电极。在本发明中, MEMs 技术的应用提供了操纵三维针和在小型规模(小型尺寸)上涂覆和蚀刻的能力。制造单针电极的能力通过图 13A 至 E 的照片证明。也可以通过挤出技术进行制造。如图 14A-C 示出的,在这方面,电极 202 和 203(图 14A) 被挤出为线性形式的具有电惰性物质(如聚乙烯基氯等)的细金属丝。针尖 204 可以被机械加工或切割成穿透性尖端(尖锐性尖端),并且在另一端适配于集线器(中心, hub) 200,集线器 200 包括电极导线 201a 和 201b 和用于连接至流体介质源的配件(附件, fitting) 205。图 14B 示出了包括具有螺旋状电极的挤出针和

电极导线 210 和 211 的结构具体实施方式的实例。

[0041] 在第二具体实施方式中,本发明包括用于将分子递送到体内细胞的方法,包括:提供到达包含所述细胞的患者组织的注射针,该注射针进一步包括至少两个沿着针轴定位的细长电极(即,阴极和阳极)和至少一个包含所述分子的容器,其中所述容器和分子与穿过所述针轴的腔流体连通;将分子注射入所述组织;以及用电能激发电极,以提供电脉冲,该电脉冲足以造成注射部位和针轨道附近的细胞变得可逆地穿孔,从而电穿孔所述细胞用于它们摄取所述分子。

[0042] 在第三具体实施方式中,该装置提供了用于在狭窄地限定的位置中的细胞,尤其是沿着由注射针形成的轨道或轨道附近的细胞的电穿孔。通常,被认为在处理部位内的细胞是那些位于针轨道周围约 5mm、更典型地约 3mm、甚至更特别地约 2mm、并且最特别地约 1mm 的半径内的细胞。在相关的具体实施方式中,足以用于电穿孔所述处理部位内的细胞的电场的产生是这样的场,其从中心注射针向外变弱,使得处理部位由延伸到组织内超出距离电极一定距离的脉冲能量的失能(inability)限定。

[0043] 在另一相关的具体实施方式中,本发明要求单独的细长探针(其包括注射针和电极)的新型应用,用于进行组织内高度定位的成组细胞的原位电穿孔。

[0044] 在另一具体实施方式中,本发明的装置可以与多种电脉冲条件中的任何一个使用。例如,电极可以负荷有恒定电流的至少一个脉冲,该恒定电流在 1-400mA 之间,通常在 5-200mA 之间,并且更优选在 20 到 100mA 之间的范围内。在另一实施例中,电极可以负荷有 1 至 100 伏特的范围内的电压脉冲。此外,电脉冲可以为单极或双极脉冲,其中所述脉冲可以为单、双或多脉冲序列,具有各种特性,如成组(规定, set)电压降、可变成形脉冲串、或采用恒定电流的脉冲。

[0045] 在其他具体实施方式中,提供了一种装置和方法,用于将本领域技术人员熟知的药物、蛋白、核酸(包括 DNA 和 RNA)、及其合成变异(合成修饰, synthetic modification)递送或转染入患者组织,尤其是位于哺乳动物身体的皮下、皮内、及皮肤下空间以及骨骼肌和横纹肌隔室中的细胞,以及包括心、肺、胰、脾、肝的器官,以及消化道的器官。一旦转染了所选择的材料,细胞将被药物、或蛋白或核酸的活性直接影响。在核酸被转染时,通常这样的核酸被用于编码的蛋白,从而其可以在处理部位的细胞中表达。此外,所述物质可以包括细胞因子、趋化因子、及免疫相关生物活性分子,该生物活性分子包括这样的活性分子,如选自自由 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、LIF、LT、TGF- β 、IFN、TNF- α 、BCGF、CD2、或 ICAM 组成的组的免疫调节分子。

[0046] 在另一具体实施方式中,待递送至细胞的材料可以以液体形式并以 0.01ml 至 1ml 之间的量(体积)进行递送。在一个具体实施方式中,编码多肽的核酸可以被溶解在 0.9% 的氯化钠(NaCl)中。然而,精确的溶剂对于本发明并不是关键的。例如,本领域熟知,如蔗糖的其它溶剂能够提高核酸在骨骼肌中的摄取。在相关的具体实施方式中,待递送的量可以相对于针的长度(由于针轴的长度将决定通过其要被转运的物质的量)和形成的针轨道进行调整,以便在它通过针被表达并进入针轨道和周围组织后确定对于要填充的所述物质可以获得的空间的量。例如,2mm 长的针可以用于将物质递送至皮层组织并提供 0.01ml 到 0.05ml 范围内的量的注射,而 5mm 长的针可以用于递送 0.1ml 到 0.15ml 范围内的量,并且 1.5 到 2cm 长的针可以用于递送 0.3ml 到 0.5ml 范围内的量。

[0047] 其他物质也可以因为各种有益原因而与感兴趣的分子共转染。例如,分子 P199(lee, et al. PNAS. , 4524-8, 10, 89(1992)), 其已知用于密封电穿孔化的(电渗透化的, electropermeabilized)膜, 可以通过提高转染的肌纤维的存活率(生存率)来有益地影响转染效率。

[0048] 参照图 6, 携带皮下注射针的电极被插入患者组织中到达期望的穿透深度。附着的注射器的柱塞被活化以注射包含所选的用于注射的材料的液体的量, 并且电极其后立即、或可选地与材料的注射同时, 被电能的至少一个脉冲激发, 足以造成处理区中的至少一些细胞变得可逆地穿孔。虽然注射器的柱塞通常利用活动装置(animate means)活化, 如利用手, 但是注射器也可以固定到支持装置, 如图 9 中披露的, 或者甚至自动剂量装置, 如在于 2003 年 7 月 3 日提交的美国专利申请 10/612, 304 中披露的装置, 将其全部内容结合于此作为参考。

[0049] 在其他具体实施方式中, 本发明可以应用于从身体组织表面的各种深度处的细胞的电穿孔。例如, 除了位于肌肉组织隔室内的细胞的电穿孔(其中物质的递送由材料以从组织表面约 90 度的方向注射入组织而开始)以外, 在一个具体实施方式中, 本发明的装置可以被用于电穿孔皮下、皮内、或皮肤的皮肤下空间的细胞。它还可以用于使物质电穿孔进入淋巴结、或其它器官中的组织层, 如心脏和血管组织。至于电穿孔在这些局部的任何一个中的细胞, 用于电穿孔这样的组织层中的细胞的装置的使用可以包括具有足以穿透组织层的外部(即, 皮肤、皮下等)的长度的短针的使用, 用于以与组织表面成约 90 度的角进行注射和电穿孔, 或者其中递送针较长, 如在 3 到 4cm 之间, 单针的插入可以利用如图 9A 中所示的支持装置以与表面组织成锐角来进行。这将允许期望的层内组织的较大部分的电穿孔。此外, 插入的锐角可以从组织表面在 3 至 25 度角之间。这样的组织表面可以描述为通常形成平面区(flat surfacezone), 该平面区形成包围用于插入单针/电极的位置(部位)的平面。如图 9A 至 D 所示的, 注射器可以连接至附着装置(附加装置, attachment means), 其被设计为在平面引导盘(guide tray)100 上以固定角度支持注射器, 其中放置的针以固定距离 X 放入组织中, 其由基于针插入组织中的预定的期望深度来确定。使具有暴露的针的该引导盘与组织表面接触, 以便针以指定的锐角插入组织。在针被如此插入并且治疗性物质从注射器排除后, 电极被激发以引起注射的物质递送入皮下、皮内、或者皮肤下细胞。如上所述以斜角的该装置的应用还可以用于电穿孔器官组织的不同层。

[0050] 实施例

[0051] 下面给出的实施例示出了由本发明形成的各种具体实施方式。应当理解, 下面的实施例不是全面的或穷尽的可以根据本发明制备的许多类型的具体实施方式。

[0052] 实施例 1

[0053] 现在转向本发明的多个方面, 该装置可以包括分子递送容器 20 和电极针 10 部件, 如(图 5)中实施例所示出的。另外的具体实施方式包括尖罩(sharps cover)11、弹性膜 12(密封包括容器 20 的结构的部分, 用于填充容器(如通过注射器针的穿刺))、以及机构, 如凹坑(dimple)13 以及容器 20 外壳结构内的凹处(recess)14 和 14*, 用于将尖罩 11 保持在打开/缩回(图 5C)或封闭/覆盖(图 5A 和 B)的半固定位置。另外的具体实施方式包括机构, 用于将柱塞 9 保持在半固定的打开/缩回或封闭/排出位置, 如, 例如, 凹坑 15 以及凹处 16 和 16*。本领域技术人员应当清楚, 与用于提供尖罩 11 和柱塞 9 的半固定定位

的方法无关,这样的定位可以通过生命能(animate energy),如通过手的力、或者机械地,如通过电驱动致动器而容易地改变。尖罩 11 的远端可以包括可移动地附着于其上的无菌盖 60。电极针 10 可以进一步包括通过其在组织穿刺尖端 22 终止的腔,以及用于连接至容器 20 的孔 25(参见图 1)。注射针 10 可以为 18 到 29 标准皮下注射针规格尺寸之间的量规(gage)。在优选的具体实施方式中,递送针包括至少一对电极,如图 1 的电极 21a 和 21b。所述电极包括至少一个阳极和一个阴极电极,其与电极导线 24a 和 24b 电连通。依赖于选择用于任何特别的发明产品的设计,所述导线可以在导线末端(引线端子)23 终止(例如,参见图 3 和 4),或者通过任何具有来自电极的引线的其它装置连接到电能源,如脉冲发生器。针部件 10 可以进一步包括连接器 26(图 3 和 4)用于连接到皮下注射针容器,或者连接到注射器容器,注射器容器附有锁定机构,以可分离地将针部件 10 紧固到皮下注射器端口。

[0054] 在另一具体实施方式中,容器 20 可以用预定用于治疗特定疾病的物质制造。可替换地,该容器可以通过抽出柱塞 9 通过电极针 10 将这样的物质吸入容器来填充感兴趣的物质,或者优选地,该容器可以首先通过将柱塞缩回到打开位置来清除柱塞,随后通过将物质经由弹性密封 12 注入容器来将物质递送到容器,类似于通常在将来自无菌瓶的药物抽入注射器中并将它们引入到另一容器中进行的步骤。

[0055] 递送针 10 与其电极阵列(如电极 21a 和 b、31a 和 b、51a 和 b 及 52a 和 b、或 41 和 42、分别为图 1-4)可以被插入组织中,通常以与组织表面成约 90 度,或者可替换地相对于组织表面成锐角,并且物质注入针轨道和局部组织。电极可以利用脉冲发生器在所述物质注入后激发,或者可以与所述物质的注入同时激发。如图 6 所示,当被电脉冲激发时,电极维持电场 20 的产生,该电场 20 提供了足够的能量以造成所述区域内细胞的可逆穿孔。产生的电场是非均匀的,因为它随着与针轨道 80 的距离指数减小(图 7)。因此,足以提供这样的穿孔的电场,依赖于所采用的能量,具有对称的侧向尺寸(a)×(b)(如图 7 所示),形成电穿孔电场的固定直径(设定直径,set diameter),其相对于针轨道长度,形成限定的三维体积。通常,穿孔充分的电场具有来自电极针 10 的半径,其在 0 到 5mm 之间,通常在 0 到 4mm 之间,并且优选在 0 到 3mm 之间,以及最优选地在 0 到 2mm 之间。

[0056] 电穿孔领域的技术人员可以容易地理解,由本发明的单针电极产生的场,不同于现有的电穿孔装置,是非均匀电场,其中场强在针附近较大,随着从电极向外测量而减小。与本发明的电极布置相比,图 8 示出了现有的电极布置,其中采用穿过大体积的处理部位的均匀电场。本发明可测量地不同于表明需要利用“均匀”场的先前的概念。这里,本发明采用非均匀场,其提供了细胞的可逆穿孔,在递送针的位置(即,针轨道)附近达到更大的量。这又允许清楚的益处以确定接收已知剂量的治疗物质的那些细胞的精确位置。因此该发明通过它的具体实施方式提供了用于使电场“适合(fitting)”于注射位置以便将物质更均匀地分布至细胞并限制到局部组织区域,这与使用常规均匀电场和电极的外部阵列的电穿孔系统的可变分布相反。

[0057] 至于电极,通常,它们可以包括任何金属,但是优选并不给予毒性的金属,因为金属离子到达电穿孔组织的细胞。这样的材料包括金、钨、氮化钛、铂、铂铱、以及氧化铱。电极材料可以在递送管(即,注射针)上形成,使得在电极与递送管之间存在绝缘层,如图 3B 所示。可替换地,该针可以包括本身不传导(绝缘)的材料,消除使电极与注射管绝缘的特别需要。在这方面,该递送管可以由任何适合的用于原位插入组织的材料构成,该材料是不

传导的,包括,如陶瓷、或硬化的生物相容性塑料,包括聚乙烯基氯(聚氯乙烯)等。

[0058] 在另一具体实施方式中,递送针/电极部件可以被设计成使得电极 90 或 101(图 10) 被暴露用于仅针的尖端附近的电穿孔,如图 9A、以及 10A 和 B 中所示出的。所述电极的未暴露的部分 91 和 102 可以被绝缘并且沿着递送针外部或内部延伸到针。具体地,当期望在特定组织放置限定的处理量(由电极阵列给予组织的电穿孔电场的尺寸限定)时,希望避免其他组织的电穿孔,电极,如图 10 中所披露的,可以用于例如,电穿孔深肌组织并且避开靠近组织表面的其他组织,如脂肪细胞层,或者可替换地,电穿孔表面附近的组织,如,例如,皮肤下组织,如图 9A 所示。这样的具体实施方式提供了对于处理量的设置和大小的另外的控制。

[0059] 实施例 II

[0060] 在该实施例中,描述了通过可逆穿孔将分子递送到在沿着轨道和轨道附近定位的细胞的结果,该轨道通过将本发明的单皮下注射针电极插入组织中而形成。

[0061] 如图 11A 和 B 所示,用编码 β -半乳糖苷酶的 DNA 以包括 0.2ml 的推注量和 1mg/ml 的浓度对兔四头肌进行注射。利用 250mA 的 2 个脉冲脉冲化(pulsed)所述电极,持续时间为 20 毫秒。在电穿孔后, β -半乳糖苷酶基因在被电穿孔作用的细胞中表达。在电穿孔后第 4 天,处死兔子并且在通过单针/电极的插入上的位置,肌肉被制备为 3mm 厚的薄片。在化学固定后,肌肉薄片表达 β -半乳糖苷酶的细胞通过酶促反应被可视化。图 11A 中的箭头示出了递送管插入兔肌肉中的方向。如所示出的,染色主要沿着由所述针递送电极插入组织形成的轨道存在。

[0062] 实施例 III

[0063] 该实施例描述了采用根据本发明具体实施方式的电穿孔装置将编码绿色荧光蛋白(GFP)的 DNA 递送入兔四头肌的实验,结果在图 12 中示出。

[0064] 这里,多只新西兰白色雄性兔,每个重达 4-5kg(Perry Scientific, San Diego, California),其中每个被注射编码明亮 GFP(Cheng, et al. (1996), Nature biotechnology, vol. 14 :606-9) 的表达载体(gWizGFP, lot 12311, 购自 Aldevron, LLC, Fargo, ND;还参见 Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA),其表达在修饰的人类巨细胞病毒直接早期启动子/增强子的控制下。

[0065] 在注射前,每只兔子首先用乙酰丙嗪(1mg/kg)镇静,然后在胃长宁(0.01mg/kg)的存在下,通过肌肉注射氯胺酮(35mg/kg)和甲苯噻嗪(5mg/kg)的混合物麻醉,胃长宁被预先皮下给予以防止因为氯胺酮/甲苯噻嗪处理而造成的不均匀的心搏动。随后在要进行注射,即,进入四头肌的位置给兔子削毛。通过首先插入 18 规格的针,随后利用手术刀轻微扩大而在覆盖该肌肉的皮肤内刺孔。单针电穿孔装置(由 18 规格的针形成,该针具有两个彼此相对设置、到达针的外表面的平行电极(如图 1 所示))随后被缓慢插入肌肉组织,周期性地暂停以每隔几毫米将 DNA 注射到约 25mm 的最终插入深度。总共为 500 μ l 的包含 100 μ g gWizGFP 的含 DNA 溶液被注入每个注射位置。完成注射后不久,并且当针/电极装置仍插入到其最终插入深度时,电穿孔开始。具体地,利用 Elgen 1000(Inovio AS, Oslo, Norway) 电流-箱位脉冲将五个 250mA 脉冲(每个 20 毫秒(ms)的持续时间)以 10Hz 间隔(即,100ms)施加于电穿孔针装置。

[0066] 处理后四天,动物被仁慈地安乐死。覆盖其中载体被递送的腿部区域的皮肤被仔

细地去除,其后每个动物被置于 -20°C 约1小时。随后利用手术刀去除处理过的肌肉,然后置于 -20°C 另外的1到2小时。随后利用旋转切肉机将冷冻的肌肉组织切成约3mm厚的薄片。肌肉薄片被设置在塑料盘内并利用安装有UV光和GFP过滤器(filter)组合的Leica MZ 12解剖显微镜观察GFP表达。图12是通过该分析获得的结果的代表性照片,并且清楚地表明根据本发明的电穿孔装置可以用于成功地将试剂,如编码期望的蛋白(其随后以活性形式被表达)的表达载体,递送到细胞内。

[0067] 实施例 IV

[0068] 在该实施例中,对于其的数据在图15和16中示出,利用本发明的电极构造,编码SEAP(pSEAP#3348, Aldevron)和IgG(pLNOH2hg3#11765, Aldevron)的质粒被电穿孔入测试动物组织的细胞中(即,肌肉注射入动物的胫骨前肌中)并且检测表达以证明在兔肌肉中表达成功以及测量针对“弱(weak)”和“强”抗原(分别为SEAP和IgG)的免疫应答。在这些实验中,SEAP和IgG质粒以 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的最终浓度被给予。

[0069] 利用的动物为新西兰白色雄性兔,3.5到4.5kg。利用Elgen 1000(Inovio AS, Oslo, Norway Serial number 009)进行电穿孔,Elgen1000进一步包括电流-箱位脉冲发生器(原型)和单针原型,其中电极平行于注射轨道并且约在1mm间隔之间延伸。电极被脉冲化20毫秒脉冲长度,每个在150mA的5个脉冲,脉冲之间250毫秒间隔(即,约4Hz的频率)。电极延伸入组织约1.0cm的深度。

[0070] 所述实验中的每个包括两步递送过程,即,利用29规格胰岛素注射器注射质粒溶液($200\mu\text{l}$),其中在针的插入期间注射以在不同的深度分布DNA,随后去除注射器针并插入单针电极。

[0071] 如下面的表1所示,IgG和SEAP实验中的每个具有两组试验动物,即,一组动物接受电穿孔,而另一组不接受电穿孔(对照)。

[0072] 表 1

[0073] 组 #	电流	处理
[0074] 1	150-250mA	100 μl \times 2SEAP 1mg/ml, 100 μl \times 2 左侧胫骨 (tibialis), IgG 1mg/ml
[0075]		
[0076]	100 μl \times 2 右侧胫骨	
[0077] 2	没有 EP	100 μl \times 2SEAP 1mg/ml, 100 μl \times 2 左侧胫骨, IgG 1mg/ml
[0078]		
[0079]		100 μl \times 2 右侧胫骨

[0080] 在第0、14天和第21天采集样品。在第21天,通过皮下注射0.5ml hypnorm(Hypnorm 0.1ml/kg),随后在耳静脉静脉注射1ml/kg的10% Pentobarbital而终止兔子。

[0081] 从图15和16的结果可以清楚地看到,由单针递送引发的抗体效价(抗体滴度, antibody titer)的水平远远超过阴性对照。具体地,如所预料的,两个测试抗原(IgG和SEAP)相对于彼此引发效价,其中IgG是比SEAP更强的抗原(参见效价规模)。在电穿孔样品中两个抗原均引发抗体产生,并且在未穿孔的样品中实际上(virtually)没有抗体产生。

[0082] 实验 V

[0083] 在该实验中,利用各种脉冲能量和绿色荧光蛋白表达测试兔组织中原型 MEMs 制造的单针电极。如表 II 中所示出的,测试了三种不同的电极具体实施方式,(1) 单针电极,其中阳极和阴极电极被应用于 23 规格针,每个针 1/16 圆周,并通过 MEMs 技术应用于针的全长(图 13D-E),(2) 单针电极,其中电极为每个针轴的 1/4th 圆周(图 13A-C),以及(3) 单针布置,其中电极间隔 1mm,没有流体介质递送管。如表 II 中所示出的,进行了脉冲的各种组合。

[0084] 在该实验中用于每只动物的方案包括以所示浓度注射 GFP 质粒、利用单针电极的具体实施方式电穿孔组织、随后处死动物并通过将处理后的肌肉切成相邻薄片进行组织制备并观察荧光。通常,由于将组织切片以便平行于注射轨道回收薄片的困难,在图形照片中的 GFP 荧光通常以圆或椭圆示出。这些荧光图案证明,单针概念起作用并且在围绕针轨道和组织内的限定位置内提供了组织的电穿孔非常低的电压和相对电流。

[0085] 表 II

[0086]

电极设计	组织部位	恒定电流	电压 (平均 V)	脉冲的 数量	pGFP DNA 浓度/ 体积
电极 1/4 轴圆周	四头肌	0.0	0.0	0.0	0.2 mg/ml
电极 1/16 轴圆周	四头肌	50 mA	8	2	0.2 mg/ml
	四头肌	100 mA	18	2	0.2 mg/ml
电极 1/4 轴圆周	四头肌	50 mA	11	2	0.2 mg/ml
	四头肌	100 mA	15	2	0.2 mg/ml
	四头肌	150 mA	20	2	0.2 mg/ml
	四头肌	250 mA	33	2	0.2 mg/ml
电极 1 mm 间隔,没有流体递送具体实施方式	胫骨肌	75 mA	13	2	1.0 mg/ml
	胫骨肌	150 mA	18	2	1.0 mg/ml
	胫骨肌	250 mA	28	2	1.0 mg/ml
	四头肌	150-200	20	2	1.0 mg/ml
	四头肌	250-500	40	2	1.0 mg/ml
	四头肌	600-1000mA	50	2	1.0 mg/ml

[0087] 图 17A 和 B 分别示出了自然光和荧光,在注射编码 GFP 的质粒 DNA 后(没有穿孔) GFP 表达的照片。如所示出的,实际上没有绿色荧光蛋白表达。因此,很清楚没有电穿孔,就没有期望基因的足够摄取和表达。

[0088] 至于利用 1/16 宽度电极模式的原位电穿孔,表达电穿孔的 GFP 的能力在图 18A 和 B 以及 19A 和 B 中示出。图 18A 和 B 示出了在用 50mA 的恒定电流电穿孔后 GFP 表达结果,而图 19A 和 B 示出了在 100mA 下的电穿孔。

[0089] 对于利用 1/4 圆周单针电极的 GFP 表达,结果在图 20A 和 B、21A 和 B、以及 22A 和 B 中提供,其中分别利用 50、100 和 150mA 进行电穿孔。

[0090] 还利用其中单针电极不包括与电极相关的流体递送管的具体实施方式测试了 GFP 表达。如图 23A 和 B、24A 和 B、以及 25A 和 B 所示,本发明装置的具体实施方式在 75、150 和 250mA 的每个恒定电流下测试。这里, GFP 质粒的量是图 19-22 中所示实验的浓度的 5 倍。

因此,处理区更容易显示。

[0091] 根据本文披露的内容,可以进行和执行本文披露和要求的组合物和方法,而无需过度实验。虽然已根据优选的具体实施方式描述了本发明的组合物和方法,但对于本领域技术人员来说明显的是,可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下,对组合物和方法以及本文描述的方法的步骤或步骤顺序地进行改变。更具体地说,描述的具体实施方式在各个方面都仅是说明性的而不是限制性的。对本领域技术人员来说明显的是,所有类似置换和改进被视为在如由所附权利要求所限定的本发明的精神和范围内。

[0092] 说明书中提及的所有专利、专利申请、以及公开出版物表示本发明所属领域普通技术人员的水平。所有专利、专利申请、以及公开出版物,包括那些要求优先权或其它权益的,按照相同的程度以引用方式并入本文,好像每个单独的公开出版物被具体和单独地示出为以引用方式并入。

[0093] 可以在没有在本文具体披露的任何要素的缺乏下实施本文合适地示意性描述的本发明。因此,例如,在本文每个实例中,术语“包括”、“基本上由...组成”和“由...组成”中的任何一个可以用其它两个术语中的任何一个替换。已采用的术语和表达是用作描述的而不是限制的术语,因此使用这样的术语和表达并不意味着全部或部分地排除所示出和描述的特征的任何等效替换,而是应当明了,在本发明要求的范围内各种改进是可能的。因此,应当明了,虽然已通过优选的具体实施方式和可选特征具体地披露了本发明,但本领域技术人员可以利用本文披露的构思的改进和变化,并且这样的改进和变化被认为是在如由所附权利要求所限定的本发明的范围内。

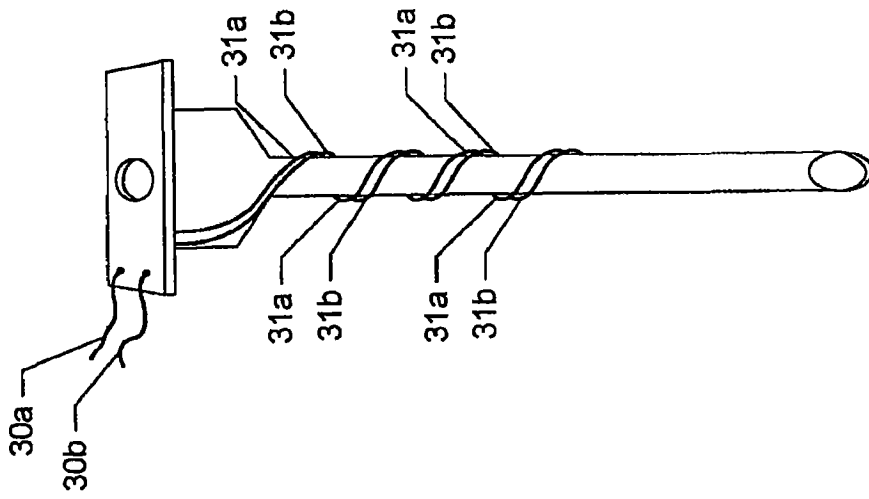


图 2

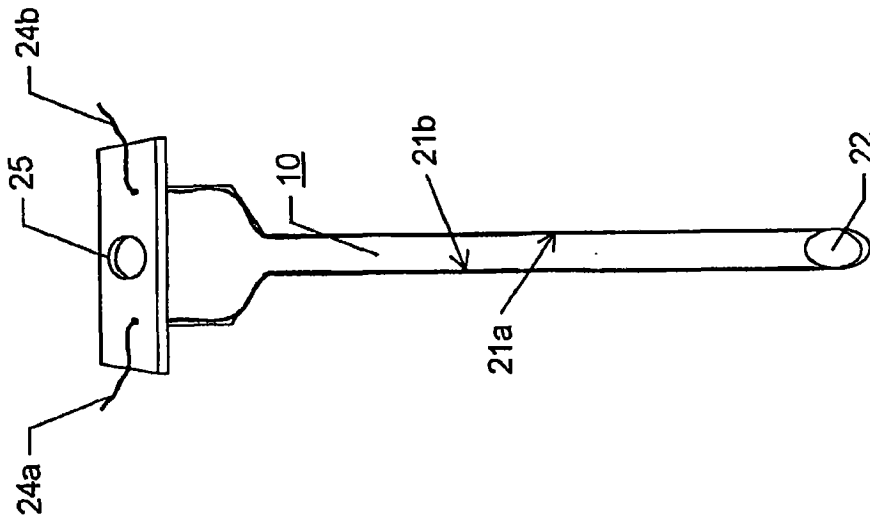


图 1

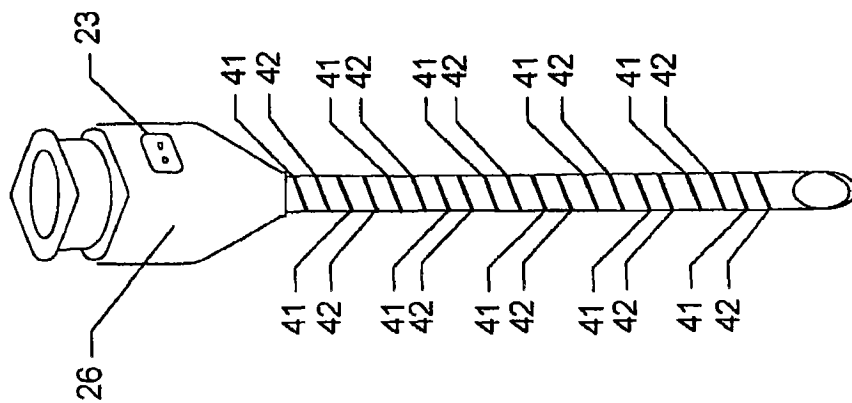


图 4

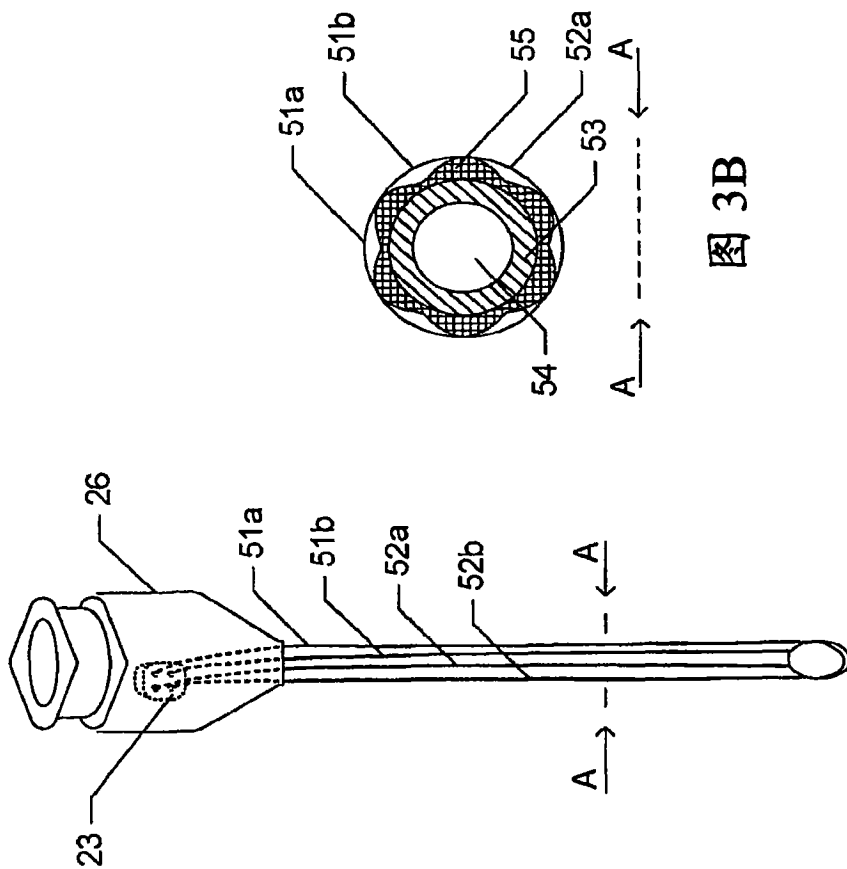


图 3B

图 3A

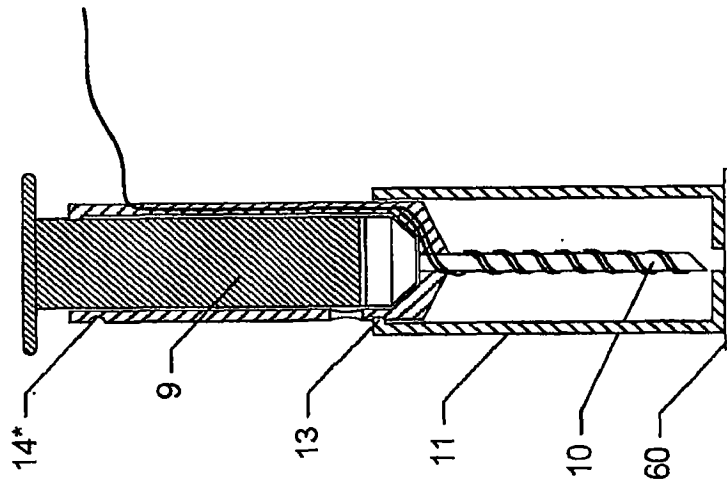


图 5A

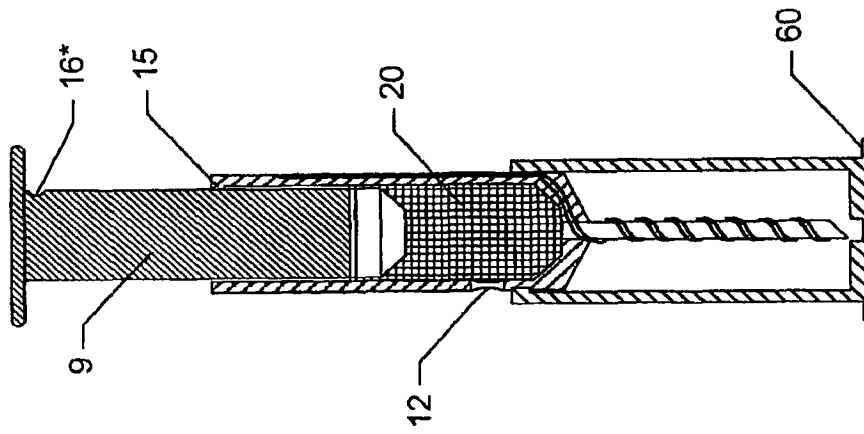


图 5B

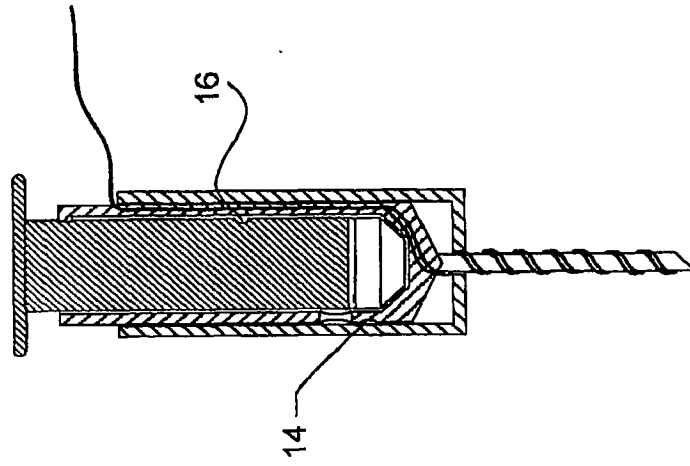


图 5C

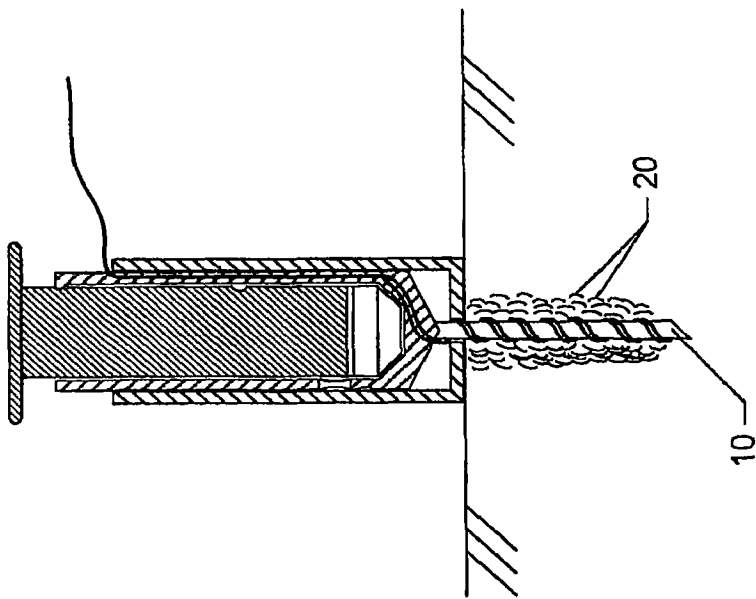


图6

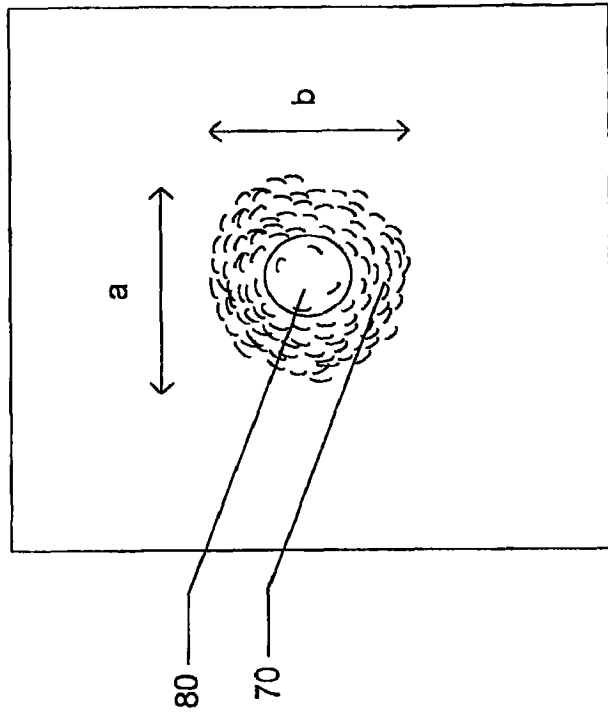


图7

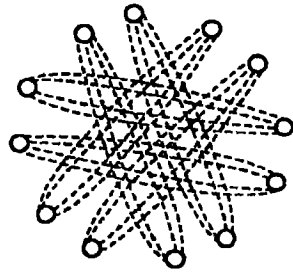


图 8C

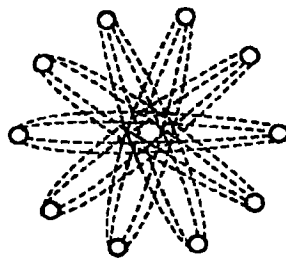


图 8B

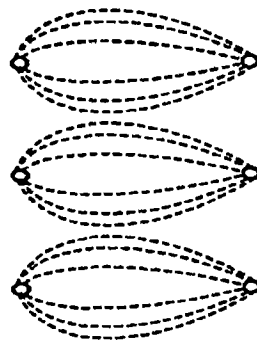
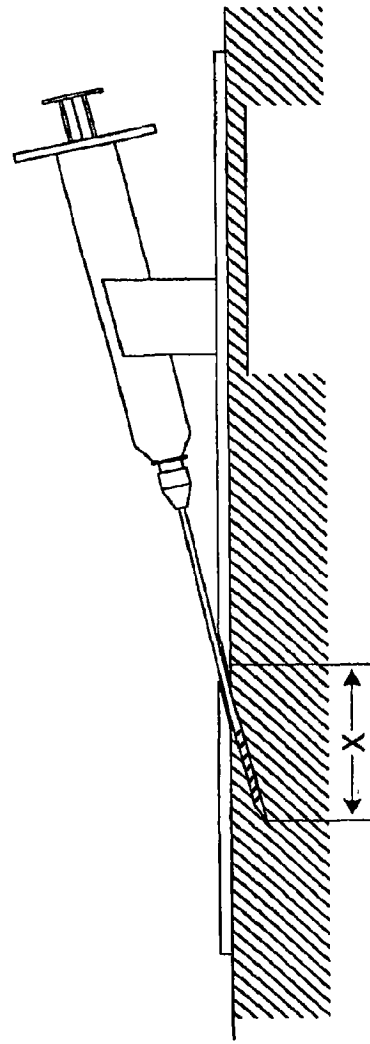
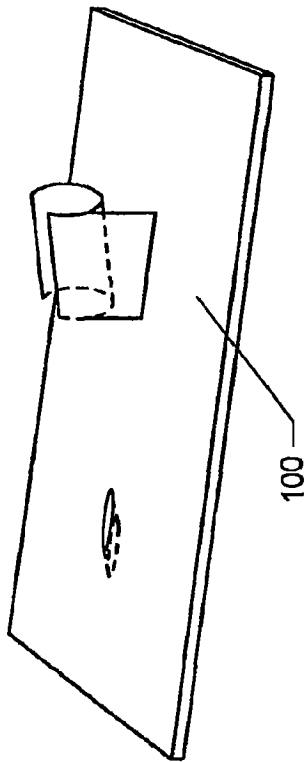
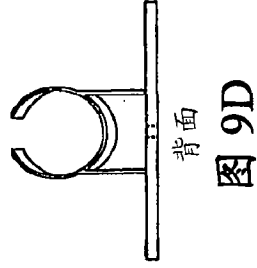
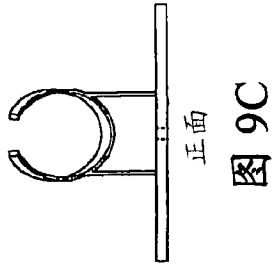


图 8A



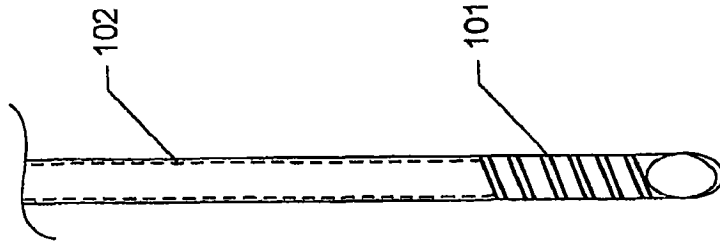


图 10B

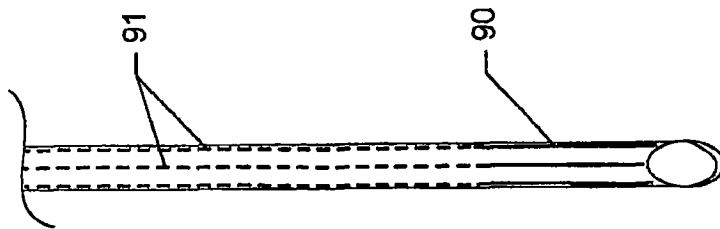


图 10A



图 11A



图 11B

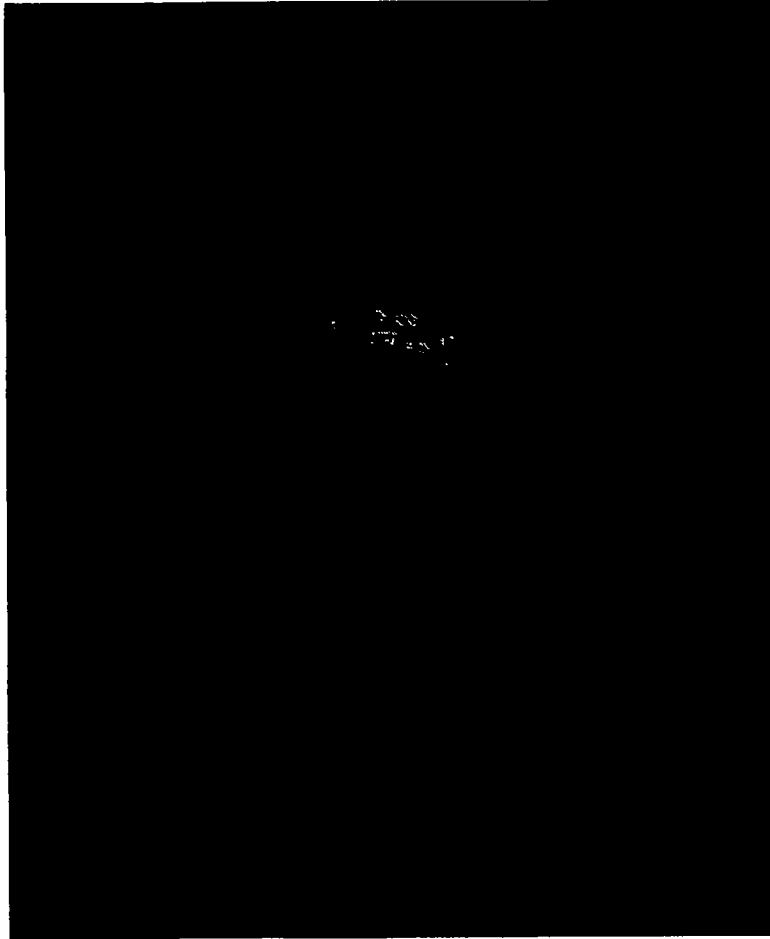


图 12



图 13A

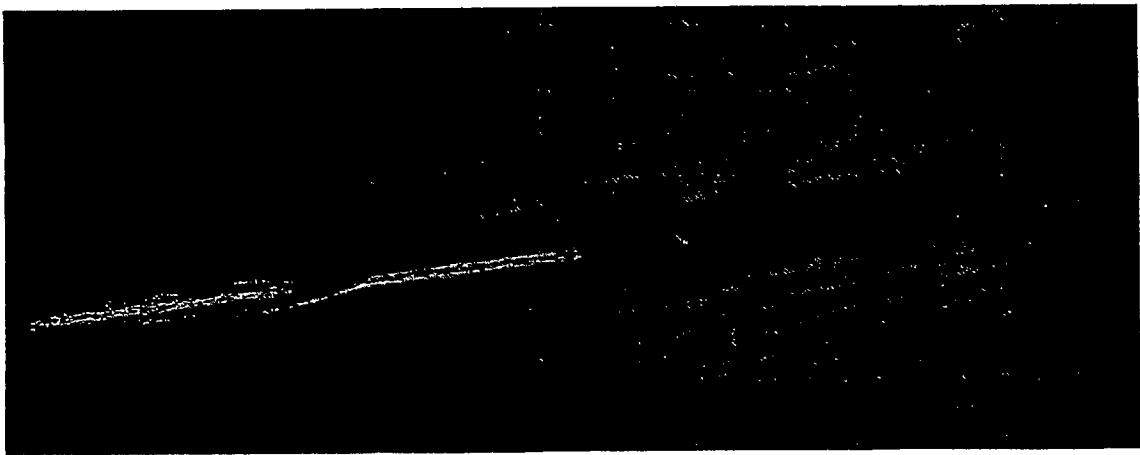


图 13B

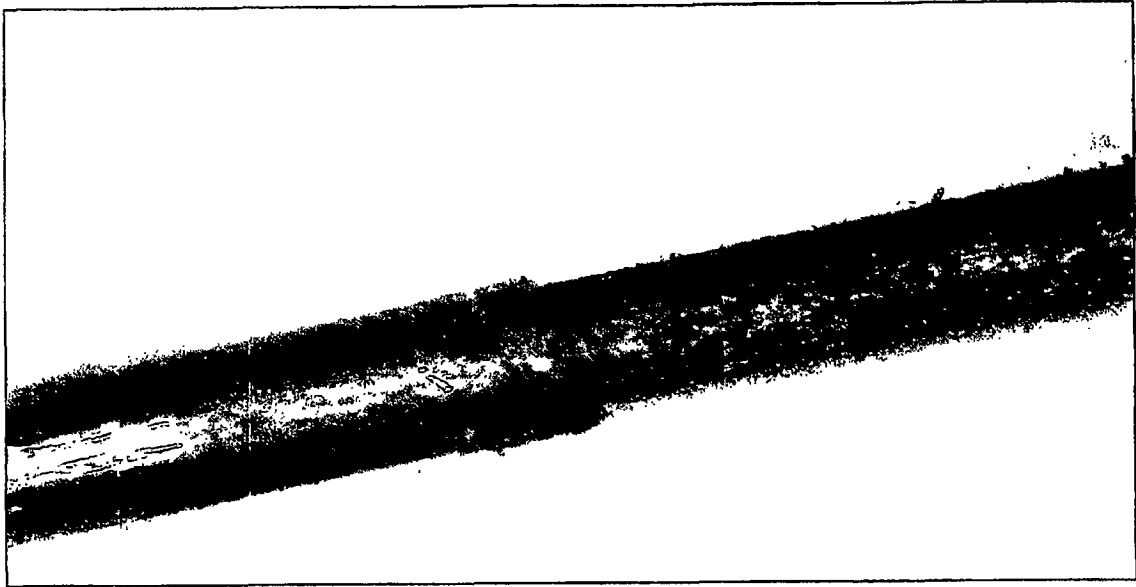


图 13C

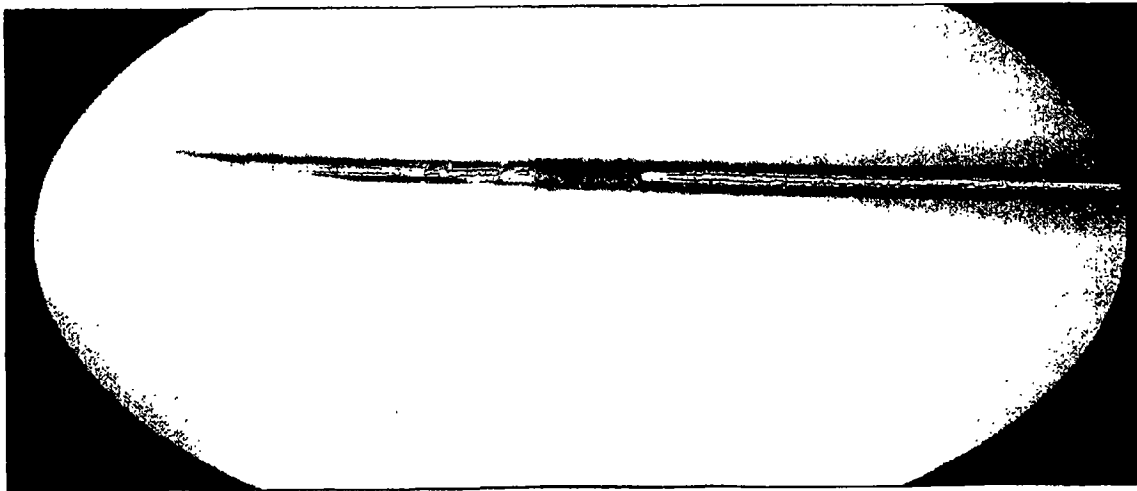


图 13D

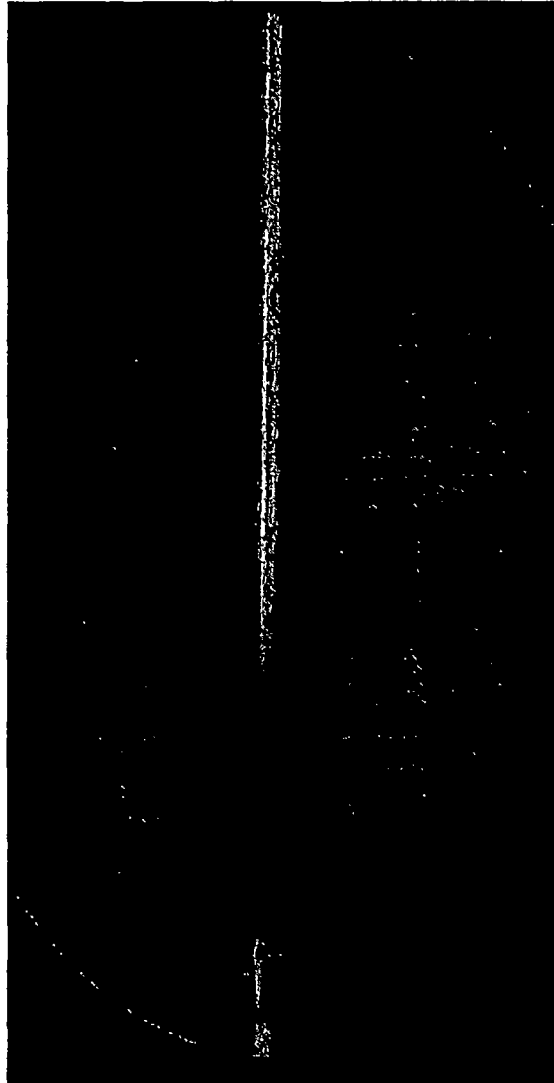


图 13E

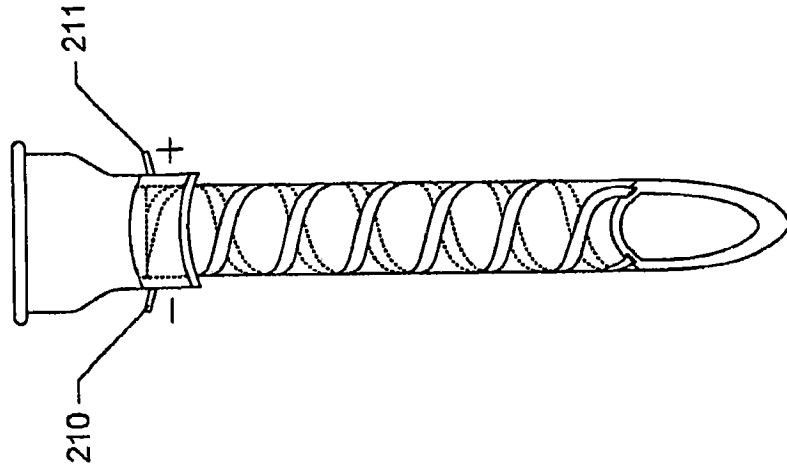


图 14B

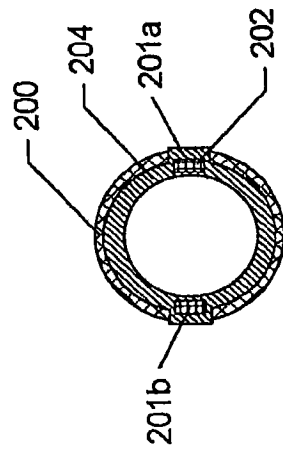


图 14C

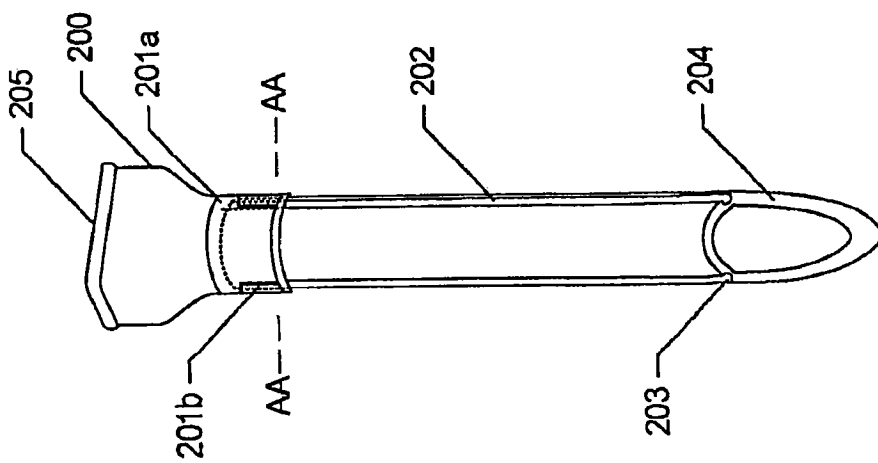


图 14A

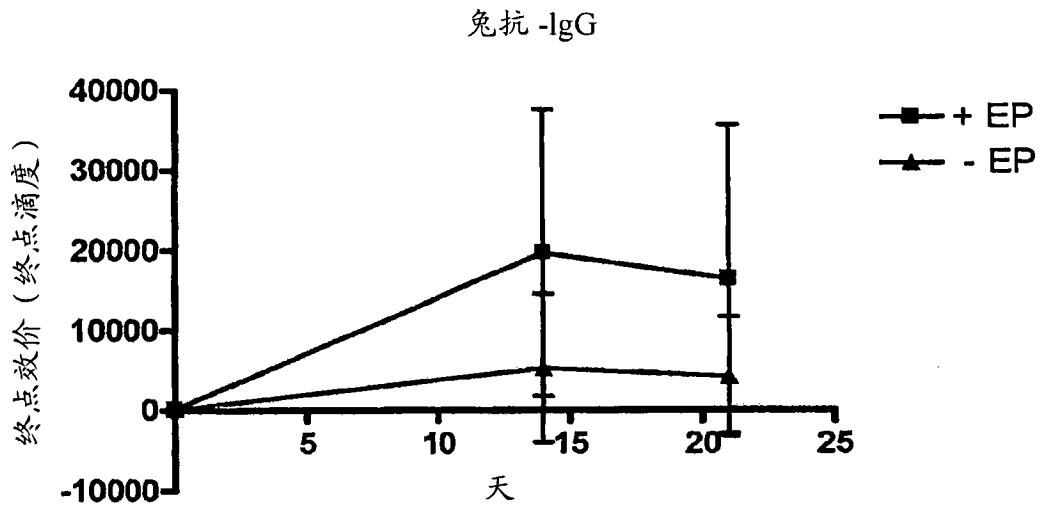


图 15

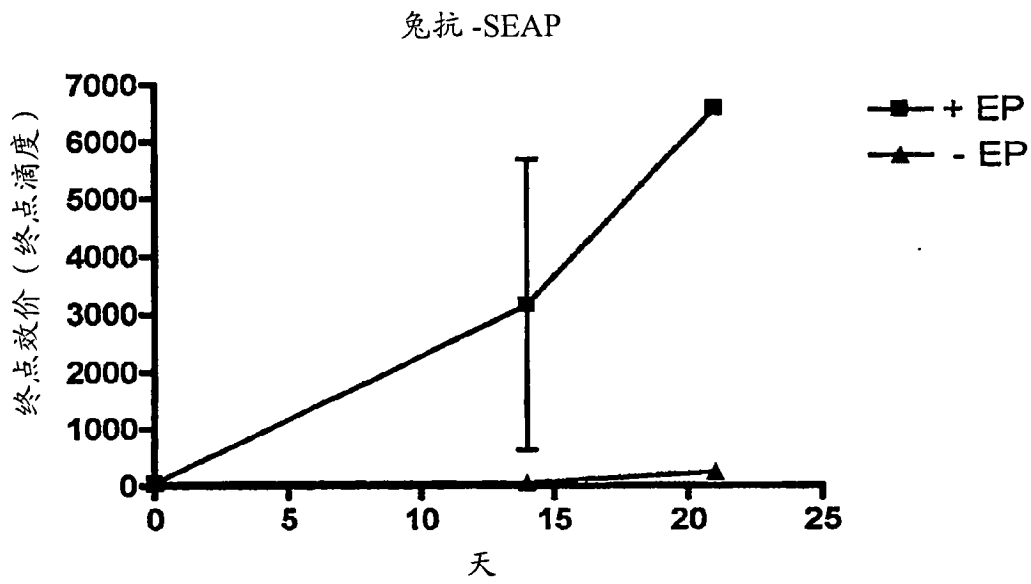


图 16



图 17B

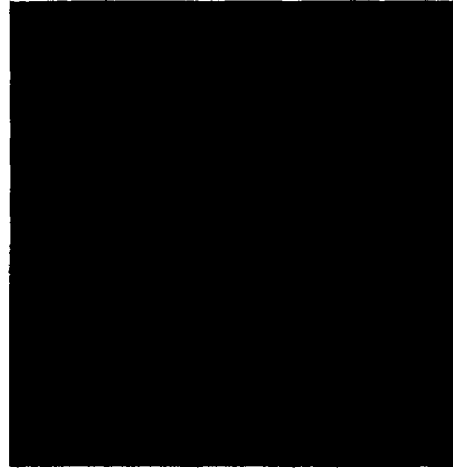


图 18B



图 17A



图 18A



图 19B



图 20B



图 19A



图 20A



图 21B

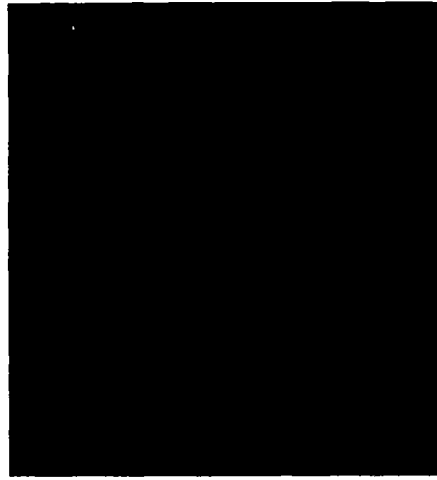


图 22B

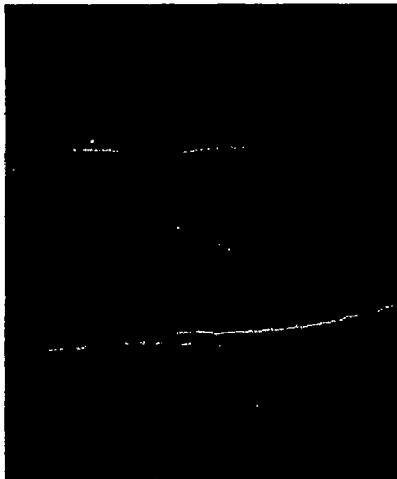


图 21A



图 22A



图 23B



图 24B



图 23A



图 24A

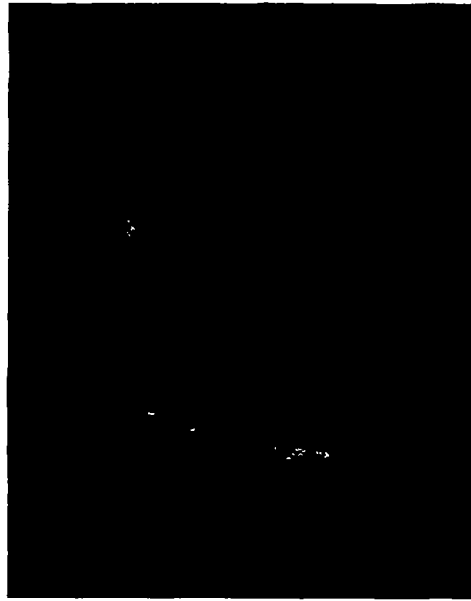


图 25B



图 25A