



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102014734 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 200980112079. 4

(22) 申请日 2009. 02. 24

(30) 优先权数据

08290179. 4 2008. 02. 26 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/001308 2009. 02. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02009/106295 FR 2009. 09. 03

(71) 申请人 博尔斯特姆斯有限公司

地址 爱尔兰都柏林

(72) 发明人 阿兰·蓬皮杜

阿尔贝-克洛德·贝纳姆欧

(74) 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理有限公司 11225

代理人 朱梅 徐琳

(51) Int. Cl.

A61B 5/00 (2006. 01)

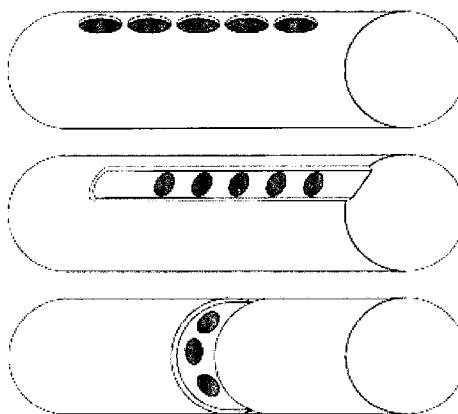
权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 7 页

### (54) 发明名称

包括金属导向装置的体内微创检查设备

### (57) 摘要

本发明涉及一种分析设备,其中,所述系统包括至少一个金属导向装置,其一端设有至少一组孔,该孔直接与对底物具有特异性的反应物结合,所述端为穿孔端,而其另一端用于控制所述导向装置,并且非必须地与抽吸系统相连。所述导向装置可以插入到与功能端齐平的可拆卸的保护系统中,一直到微量分析和/或微量取样位点,和/或所述导向装置可以插入至具有内部通路的医疗器械中,所述导向装置可以在其中滑动。本发明也涉及这种设备在制造一种用于诊断患者体内的癌症、炎症、感染、神经变性疾病或移植排斥的工具中的用途,优选通过经体壁的路径。本发明还涉及一种使用这种设备在体外分析底物的方法。



1. 一种分析设备，其特征在于，所述设备包括用于底物的微创和 / 或微量取样检查的系统，所述系统由至少一个金属导向装置构成，该装置包括：

Ea 端，其表面被构造成具有至少一组孔，该孔直接与至少一种对所述底物具有特异性的反应基团结合，所述 Ea 端用于穿孔，以及

另一 Em 端，其用于操纵所述金属导向装置。

2. 根据权利要求 1 所述的设备，其进一步包括与 Ea 端齐平的可拆卸的保护系统。

3. 根据权利要求 2 所述的设备，其中，所述可拆卸的保护系统为柔性导管。

4. 根据权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的设备，其进一步包括具有内部通路的医疗器械，所述至少一个金属导向装置能够在其中滑动。

5. 根据权利要求 4 所述的设备，其中，所述医疗器械选自包括经体壁的抽吸针和 / 或包括血管内导航系统在内的内窥镜的组中。

6. 根据权利要求 5 所述的设备，其中，所述经体壁的抽吸针为经皮的或经粘膜的抽吸针。

7. 根据权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的设备，其中，所述至少一个金属导向装置选自包括一个或多个实心柔性金属铰链和 / 或一个或多个中空的刚性金属铰链的组中，所述铰链的直径为  $0.3 \sim 3.5\text{mm}$ ，长度为  $5 \times 10^{-2} \sim 2\text{m}$ 。

8. 根据权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的设备，其中，所述至少一个金属导向装置与可视显示系统在其长度的至少一部分上相连。

9. 根据权利要求 8 所述的设备，其中，所述可视显示系统为光纤。

10. 根据权利要求 7 所述的设备，其中，所述至少一个实心柔性金属铰链为光纤，其 Ea 端与设有至少一组孔的金属环相连，该孔直接与对所述底物具有特异性的反应基团结合，所述 Ea 端用于穿孔。

11. 根据权利要求 1 ~ 10 中任一项所述的设备，其中，所述至少一个金属导向装置全部或部分由金属合金构成，该金属合金选自包括不锈钢、基于钛的合金、基于镍的合金、基于钴的合金或其混合物的组中。

12. 根据权利要求 11 所述的设备，其中，所述金属导向装置全部或部分由钛镍合金构成。

13. 根据权利要求 1 ~ 12 中任一项所述的设备，其中，除 Ea 端以外，所述至少一个金属导向装置由厚度为  $2 \times 10^{-3} \sim 1 \mu\text{m}$  的保护性聚合物层涂覆。

14. 根据权利要求 1 ~ 13 中任一项所述的设备，其中，所述至少一种反应基团对癌症、炎症、感染、移植排斥或神经变性疾病的特异性底物或抗原具有特异性。

15. 根据权利要求 1 ~ 14 中任一项所述的设备，其中，所述至少一种对底物具有特异性的反应基团为抗体或抗体片段，该抗体或抗体片段选自由片段 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv 组成的组中。

16. 根据权利要求 1 ~ 15 中任一项所述的设备在制造一种用于诊断癌症、炎症、感染、移植排斥或如阿尔茨海默病、帕金森病或肌萎缩侧索硬化症的神经变性疾病的工具中的用途。

17. 根据权利要求 16 所述的用途，其中，所述工具包括至少一个插入至柔性导管中的金属导向装置，所述导管插入至内窥镜中，并且所述工具用于诊断癌症、炎症、感染、

移植排斥或神经变性疾病。

18. 根据权利要求 16 所述的用途，其中，所述工具包括至少一个金属导向装置，所述金属导向装置由经体壁的抽吸针构成并且插入至柔性导管中，并且所述工具用于诊断癌症、炎症、感染、移植排斥或神经变性疾病。

19. 根据权利要求 18 所述的用途，其中，所述至少一个金属导向装置与柔性导管配合使用，以便于使功能 Ea 端接触微量分析和 / 或微量取样位点。

20. 根据权利要求 17 ~ 19 中任一项所述的用途，其中，经体壁的路径选自自由经皮的和经粘膜的路径组成的组中。

21. 根据权利要求 17 ~ 20 中任一项所述的用途，其中，所述至少一个金属导向装置与光纤在其长度的至少一部分上相连。

22. 一种用于体外检测存在于组织或器官中的底物方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：

a) 当根据权利要求 1 ~ 15 中任一项所述的设备的功能 Ea 端与所述待检查的组织或器官接触时，使用包含至少一种对所述底物具有特异性的检测剂的溶液孵育所述功能 Ea 端；

b) 检测所述底物。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中，所述步骤 a) 中的至少一种检测剂为对所述底物具有特异性的可能标记抗体。

24. 根据权利要求 22 或 23 所述的方法，其中，在步骤 a) 和 b) 之间进一步包括在溶液中孵育所述端的步骤 a' )，该溶液包含至少一种对步骤 a) 中的检测剂具有特异性的检测剂。

25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中，所述步骤 a' ) 中的至少一种检测剂为对步骤 a) 中的检测剂具有特异性的标记抗体。

26. 根据权利要求 22 或 23 所述的方法，其中，跟在步骤 a) 之后还有冲洗步骤。

27. 根据权利要求 24 或 25 所述的方法，其中，跟在步骤 a) 和 / 或步骤 a' ) 之后还有冲洗步骤。

## 包括金属导向装置的体内微创检查设备

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种经体壁的检查设备的功能，一种使用本发明的功能化设备在体外分析底物的方法，以及这种设备用于制造一种用于诊断病人体内癌症、感染、炎症、神经变性疾病或移植排斥的工具的用途。

### 背景技术

[0002] 检查或体内治疗设备为本领域技术所公知。这样的设备呈内窥镜类型的硬管形式或者由软管构成的导管形式，这样的导管，特别是通过天然路径或者血管，插入生物体内，并且使其到达器官或特定组织。这些设备可以专门地消除血凝块，或者当它们与光纤联合时，可以显现和体内控制一个系统（如消化管）或一个器官（如结肠）的状态。然后，使由于使用这些设备对患者造成的创伤降至最低，但仍有待改善。然而，用这些设备分析患者体内的器官或者组织不一定是可能的。这种不可能性可能是由于与血液循环或者天然路径相比，对所述组织或器官的可接进性降低，或者是由于没有对所述器官或组织的细胞进行细致地研究而很难做出可靠的诊断。这种情况下，现有技术中使用至今的，通常是对所述组织或器官的片段进行取样（活组织检查），从而体外控制这些组织或器官的形态，或者，特别是通过细针，更加细微地对其组成细胞之一进行取样（FNA 或《Fine Needle Aspiration》：Engelstein 等人，Br.J.Urol., 7：210-213, 1994；Rodrigues 等人，J.Am.Acad.Dermatol., 42：735-740, 2000；Ariga 等人，Am.J.Surg., 184：410-413, 2002；Pérez-Guillermo 等人，Diagn.Cytopathol., 32：315-320, 2005；Fernandez-Esparrach 等人，Arch.Bronconeomol., 43：219-224, 2007）。而且，也可以分析一定数量标记物的表达状况，该标记物的表达与特定的病理状态（特别是癌症、炎症、感染、神经变性疾病或者移植排斥）有关。

[0003] 然而，由于活组织检查的取样或者细胞的抽吸，这些不同的方法有时会对所述组织或器官并且最终对患者造成严重的创伤。由于连续取样的出血或者生成瘢痕，特别是对特定器官（脑、胰腺、肝脏或者肺脏），生物体后来可能会遭受痛苦的折磨。

[0004] 所以至今仍需要新的可以进行可靠准确诊断的检查方法，特别是与不同病理（如癌症、炎症、感染或者神经变性疾病）有关的特异性标记物的表达相比，同时限制对患者造成的创伤。

[0005] 专利 EP 1 358 481 描述了一种分析或者体内治疗的设备，其包括 (i) 不同于通过分析荧光信号的检查底物的微系统，(ii) 柔性铰链 (butt)，其一端固定于所述微系统，而另一端用来控制所述微系统，(iii) 医疗器械，其具有内部通路，在该内部通路中所述柔性铰链可以滑动，(iv) 保护微系统的滑动系统，其为可拆卸的并与底物位于同一水平上，以及 (v) 在所述微系统的水平上的组织或细胞的撕裂系统，其与选自通过感受器（触觉、视觉、理化或者数值信息 (numerized informatic)）远距离控制进行监测的设备中的一个或几个设备相连，来进行活组织检查、治疗、局部注射生物或化学制品。

[0006] 为了可以进入血管以及撕裂组织或细胞，所述微系统因此与另一个刚性更大的

系统相连，优选在末端位置相连，来确保这一功能。

[0007] 然而，在体内检查设备的情况中，检查设备时常通过使用血管内或腔内路径直达目标器官或者组织。微系统与撕裂系统的连接于是会使所述设备一端的直径以不可忽略的方式增大。后者随后会陷入太复杂的使用中，以至于不能在没有同时改变血液循环路径的情况下正确直达其目标位点。同时，关于使器官或组织穿孔所需的刚性的获得，连接多种元件会损害设备的总柔性并因此损害其正确导向。

## 发明内容

[0008] 在一些重要的研究之后，发明人现已设法开发出一种包括金属导向装置的设备，其穿孔一端直接与反应基团（特别是待测底物的特异性抗体或者抗体片段）结合，并且其另一端用于操纵所述导向装置从插入位点到所述底物的微量分析位点和 / 或微量取样位点。所述导向装置可以插入到可拆卸的保护系统（例如柔性导管）中，随后其可以保护所述导向装置的功能端到达由组织、器官或它们的细胞构成的待测底物的微量分析位点和 / 或微量取样位点。

[0009] 本发明构造了导向装置的表面从而使导向装置上具有一些斑点，例如孔（well），反应基团会在此沉积并在此会发生生物化学相互作用。所述“孔”可以采用不同的方法得到，如通过聚焦离子束的光刻（FIB 或见《Focused Ionbeam》：Xie 等人，Nuclear Instruments & Methods in Physics research SectionB-beam Interactions with Materials and Atoms, 211(3)：363-368, 2003)、激光光刻及其后的电化学攻击和激光。

[0010] 可选地，可以构造金属导向装置从而使所述导向装置上具有一些斑点，例如至少一个呈线形、圆形或带状形式的沟（furrow），在其中连带地连接至少一个小型生物芯片，反应基团会在此沉积并会发生生物化学反应。由导向装置的表面的结构形成的斑点（例如孔）不会在导向装置的表面形成浮凸，而是形成一些沟或者凹陷（hollow）。因此，由导向装置的表面的结构形成的斑点不会增大导向装置的直径。

[0011] 有利地，由导向装置的表面的结构形成的斑点位于导向装置的表面，这意味着这些斑点直接与液体、组织和细胞接触。

[0012] 而且，所述设备可以插入具有内部通路的医疗器械中，所述金属导向装置可以在其中滑动，且尤其是在经体壁的针穿刺中，特别是经皮的或经粘膜的，或者在内窥镜中，其包括血管内导航系统。

[0013] 而且，所述设备可以与光纤连接，或者所述设备的金属导向装置可以用光纤替换，其穿孔一端连接至其上直接结合了反应基团（尤其是待测底物的特异性抗体或者抗体片段）的金属环，以便于在考虑到诊断和最终预后评价所需的体内捕获的要素的情况下，进行细微的原位观测。使用光纤的目的是成像以及从原位观测的位置设置所述设备。

[0014] 根据本发明的设备，由于简化，在保持微创的同时，呈现出与现有技术的设备相比改进的柔性或弹性。于是，其可以更有效地用于通过腔内路径（尤其是血管内路径）或者通过经体壁的路径（尤其是经皮的或经粘膜的路径）检查。而且，根据本发明的设备，由于使用金属导向装置，其一端与特异性反应物结合，其功能端具有足够的刚性用以对组织或器官进行有效穿孔。最后，根据本发明的设备，其端部直径足够小用以在血

液循环或自然体腔中可以容易导航，并且特别是将对必须进行穿孔的组织或器官造成的创伤减至最低。

[0015] 更进一步地，在收回所述设备后，也能够运用标准方法进行体外鉴定，如免疫酶剂量或者免疫荧光，例如在固体载体上 [ELISA 技术，蛋白质芯片 (ESPINA 等人，J.Immunol.Methods, vol.290, p: 121-133, 2004)]，在根据本发明的设备的末端处并因此在此在微量分析和 / 或微量取样 (器官或组织) 位点水平处存在具有相对浓度的所述特定底物。

[0016] 最后，由于所述金属导向装置的特性，所述设备呈现的图像信号 (动脉造影、回波描记、扫描、MRI 等) 得到改善。在无线电导航对目标组织或器官产生干扰的时候，这一特性使其显著降低。同样，这一特性使得所述设备与用于成像的光纤连接时，可以进行细微的原位观测。

[0017] 因此，本发明的第一个目的是提供一种用于分析底物的设备，其特征在于，所述设备包括用于对所述底物进行检测和 / 或微量取样的微创系统，所述系统由至少一个金属导向装置构成，其 Ea 端 (extremity Ea) 设有至少一组孔并且该孔直接与所述底物的至少一个特异性反应基团结合，所述 Ea 功能端用于穿孔，而其另一 Em 端用于操纵所述金属导向装置并最终与抽吸系统相连。

[0018] 有利地，Ea 端的表面可以构造成具有至少一组孔，其与所述底物的至少一种特异性的反应基团直接结合，所述 Ea 端用于穿孔。

[0019] 由于根据本发明的设备对患者造成的创伤微小，因此可以对患者定期进行几次微量分析或者微量取样 (例如，对前列腺进行分步分析和 / 或取样)。除诊断外，所述分析和 / 或连续取样因此可以用于跟踪患者体内癌症、炎症、感染、神经变性疾病或者移植器官的良好保持的发展。

[0020] 有利地，Ea 功能端 (functionalized extremity Ea) 可以在约 0.5 ~ 2cm 的长度上呈现出至少一组 1 ~ 25 个孔，优选 2×25 个孔，所述孔的平均直径为约 30 ~ 80  $\mu\text{m}$ ，优选为约 40 ~ 60  $\mu\text{m}$ ，且更优选为约 50  $\mu\text{m}$ ，所述孔的深度为约 20 ~ 30  $\mu\text{m}$ ，优选为 25  $\mu\text{m}$ ，所述孔彼此相隔约 60 ~ 120  $\mu\text{m}$ 。优选地，所述孔具有光滑或粗糙的壁、卵圆形或圆形形状、以及平坦或凹面的底部。

[0021] 有利地，功能端可以设有许多尽可能隆起的孔。孔的数量可以为使金属导向装置具有足够的刚性以对组织或器官进行穿孔。在这一实施方式中，功能端的平均直径可以为约 0.3 ~ 3.5mm，优选为约 0.35mm。有利地，所述金属导向装置可以构造成 0.5 ~ 2cm 的长度，优选 1cm，以形成所述孔。有利地，孔的直径可以为约 30 ~ 80  $\mu\text{m}$ ，优选为约 30 ~ 60  $\mu\text{m}$ ，例如 35  $\mu\text{m}$ 。有利地，所述孔的深度可以为约 20 ~ 30  $\mu\text{m}$ ，优选为约 25  $\mu\text{m}$ 。所述孔之间的间隔可以为 20 ~ 120  $\mu\text{m}$ ，优选为 25  $\mu\text{m}$ 。

[0022] 有利地，所述 Ea 功能端可以是柱状、平面或者螺旋状形式，或者是改进的形状从而增加所述孔与液体、组织和细胞接触的表面。

[0023] 根据本发明的设备的一个特定的实施方式，所述设备在 Ea 功能端进一步包括可拆卸的保护系统。

[0024] 根据本发明的设备的一个特定的实施方式，所述设备进一步包括具有内部通路的医疗器械，所述的至少一个金属导向装置可以在其中滑动。

[0025] 例如, “金属导向装置”, 是指实心柔性金属铰链 (butt) 或者中空的刚性金属铰链, 其直径为  $0.2 \sim 3.5\text{mm}$ , 长度为  $5 \times 10^{-2} \sim 2\text{m}$ , 并且其可以插入血管、小腔中, 或者穿过器官或组织, 从而可以从插入位点直接到达原位微量分析和 / 或微取样位点。

[0026] 特别地, 实心柔性金属铰链可以由光纤构成, 其 Ea 端与设有至少一组孔的金属环相连。所述孔与所述底物的至少一种特异性的反应基团结合, 所述 Ea 功能端用于穿孔。

[0027] 有利地, 所述金属环的宽度为约  $0.5 \sim 2\text{cm}$ , 可以呈现出至少一组  $1 \sim 25$  个孔, 优选  $2 \times 25$  个孔, 所述孔的平均直径为约  $30 \sim 80 \mu\text{m}$ , 优选为约  $30 \mu\text{m}$  或  $40 \sim 60 \mu\text{m}$ , 且更优选为约  $50 \mu\text{m}$  或者  $35 \mu\text{m}$ , 所述孔的深度为约  $20 \sim 30 \mu\text{m}$ , 优选为  $25 \mu\text{m}$ , 所述孔彼此相隔约  $20 \sim 120 \mu\text{m}$ , 例如约  $60 \sim 120 \mu\text{m}$ 。优选地, 所述孔具有光滑或粗糙的壁、卵圆形或圆形形状、以及平坦或凹面的底部。

[0028] “金属导向装置”进一步指实心或者中空的、刚性或柔性的铰链, 其全部或部分由合金构成, 该合金的柔性、刚性、氧化性以及免疫原性的特性符合其在生物体中特别是在动物、更特别地是在人体中的使用。本领域技术人员通过其常识可以容易地确认这种生物相容性合金, 并且其主要包括不锈钢、基于钛的合金、镍、钴, 或者它们的混合物。

[0029] 发明人已设法证明了基于钛镍合金的导向装置 (镍钛记忆合金 (Nitinolalloy)) 在其末端处的总柔性和刚性方面呈现出一些特别有益的特性, 从而在血管内或腔内路径中能有效使用, 并且也能有效地对组织或器官穿孔, 同时将创伤 (对所述组织或器官的水平处的穿孔的尺寸为, 例如约  $0.05 \sim 0.5\text{mm}^2$ , 且优选约  $0.07\text{mm}^2$ ) 减至最低。

[0030] 有利地, 所述金属导向装置为基于钛镍合金的导向装置, 优选基于镍钛记忆合金 (金属导向装置由 Euroflex society 出售) 的导向装置。

[0031] 除在 Ea 功能端处, 所述金属导向装置可以被亲水性聚合物 (优选水凝胶) 或者被多孔保护性聚合物层覆盖, 厚度为约  $0.1 \sim 51 \mu\text{m}$ 。有利地, 保护性聚合物由聚对亚苯基二甲基、 $\text{TiO}_2$  或者 OptoDex® (Arrayon Biotechnology, Switzerland) 的膜构成, 并且更优选聚对亚苯基二甲基膜。

[0032] 其中插入有所述金属导向装置的可拆卸的保护系统可以采用多种形式, 主要采用本领域技术人员可以容易地进行测定的柔性导管的形式, 例如, 可用于血管内、腔内、经体壁的以及特别是经皮的路径的形式。

[0033] 所述可拆卸的保护系统可以通过血管内的路径插入, 特别是插入至心脏、大脑、肺、胰脏、肾脏以及肝脏的血管。

[0034] 所述可拆卸的保护系统可以通过腔内通道插入, 特别是通过内窥镜方式, 通过口腔、肛门、泌尿生殖以及呼吸路径, 或者 ENT 的经粘膜路径, 或者也可以通过对皮肤进行穿刺方式的经皮路径, 为了到达例如乳腺、特别是肾脏中, 某一关节、椎管中, 可以通过腰椎穿刺或者在肝脏、肺或者肾脏中经体壁的路径, 也可以通过经粘膜路径, 特别是用于消化道中。

[0035] 发明人证实了根据本发明的设备通过通常使用的血管内、腔内或经体壁的路径, 特别是经粘膜或经皮的路径, 到达通常难以到达的组织或器官。

[0036] 一般地说, 发明人证实了根据本发明的设备, 由于其末端处的总柔性和刚性的

具体特性，可以通过经体壁（经皮的、经粘膜的）、血管内或腔内路径到达并对一些器官和组织进行穿孔，这些组器官和组织为口咽到直肠的消化系统（包括肝脏和胰脏）、泌尿生殖系统（包括膀胱、肾脏、前列腺、睾丸、卵巢和乳腺）、气管与支气管系统（包括肺）、ENT 系统（包括耳和鼻咽）、骨关节系统（包括滑液腔）、内分泌系统、脑神经系统（neurocerebral system）或外被系统中的部分，然后经活组织检查后实现对病理的诊断，而不是经肝的活检时进行深度攻击性穿刺，包括用细针抽吸（也称为 FNA）的细胞取样。

[0037] 有利地，其中插入有金属导向装置的所述可拆卸保护系统采用适用于血管内或腔内传送的柔性导管形式。

[0038] 根据本发明的设备尤其适用于对如动脉和静脉、心血管、前列腺、乳腺、胰脏、肾脏、心肌、中枢神经系统以及其体腔或管道，大脑或者肝脏进行检查。

[0039] 根据本发明的设备的第一个特定实施方式，将所述其中插入有金属导向装置的可拆卸保护系统自身插入内窥镜中。根据本发明的设备便特别适用于腔内传送。

[0040] 根据本发明的设备便特别适用于对例如气管-支气管系统（包括肺脏）、从咽到直肠的消化系统（包括肝脏和胰脏）、泌尿生殖系统（包括膀胱、肾脏、前列腺、睾丸、卵巢和乳腺）、眼系统（泪管）、耳鼻喉系统（包括耳和鼻咽）、骨关节系统、或中枢神经系统进行检查，特别是通过经脊柱内（endo-spinal）传送，或者是通过乳管内传送进行乳腺的检查。

[0041] 根据本发明的设备的第二个特定实施方式，由经体壁的抽吸细针（且更特别的是经皮的或经粘膜的抽吸细针）组成的金属导向装置可以插入到可拆卸的保护系统（例如柔性导管）中。根据本发明的设备便特别的适用于特定的经皮的或经粘膜的传送。

[0042] 根据本发明的设备特别适用于对例如关于外被（皮肤、头皮等）、胸部、肾脏、肺、肝脏、肌肉、骨骼肌或骨关节系统、中枢或末梢神经系统或者内分泌腺（更优选甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、睾丸、乳腺或卵巢）进行检查。

[0043] 关于根据本发明设备的 Ea 功能端，其设有至少一组孔，该孔直接与待测底物的特异性反应基团结合。

[0044] “特异性反应基团”是指，例如，与待测核酸序列互补的核酸序列 [DNA（扩增产物、基因片段、EST、SNP）或者 NRA]，以及待测抗体的特异性抗原或者待测抗原的特异性抗体或者抗体片段，优选抗体或者抗体片段。

[0045] 有利地，依据增加或减少的范围，将所述特异性反应基团设置于根据本发明的设备的功能端的微孔（micro-well）中。本领域技术人员使用其常识和惯常经验可以容易地确定所述范围与反应基团对底物的亲和性的函数关系。例如，反应基团的范围约为  $50 \sim 500 \mu\text{g/ml}$ ，优选为  $10 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ ，对于反应物来说，更优选对其底物具有亲和性的抗体，更特别的是抗原的数量级为约  $10^{-9}$ 。

[0046] “抗体”优选地指活体生物、哺乳动物的免疫球蛋白，更优选人类的免疫球蛋白并且更优选 IgG。

[0047] “抗体片段”指能够与其抗原保持特异性固定的抗体片段。可以引用 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$  或 Fv 片段作为这种抗体片段的例子。

[0048] 结合反应物的方法，特别是将蛋白质一次性结合在金属载体上的方法是本领域技术人员所公知的。由于氨基酸的低化学反应性，这种方法通常需要通过氧化作

用机制或者用至少一个连接分子（最常见的是聚合物（该聚合物通常例如为巯基、羧酸和 / 或胺类））层覆盖金属表面来活化金属表面。 这种方法的例子有，功能分子以自组装单层 (SAM) 的形式吸附于金属载体上，特别是硫醇 (alkanethiol)（参照 WITTSTOCK 和 SCHUHMANN, *Anal.Chem.*, vol.69, p: 5059-5066, 1997；以及国际申请 WO 03/006948）或者吡咯 (electrochemical polymerization of biotinylated pyrrole；DUPONT-FILLIARD 等., *Anal.Chim.Acta.*, vol.449, p: 45-50, 2001)。

[0049] 将抗体或者抗体片段结合至功能分子层上是指共价键（像硫醇中的游离巯基之间的二硫键）或者非共价键（像吡咯 / 生物素复合物的聚合物层的生物素与链酶抗生物素蛋白 / 抗体复合物或抗体 / 链酶抗生物素蛋白片段的链酶抗生物素蛋白之间的链酶抗生物素蛋白 - 生物素连接）。

[0050] 依据第一个优选实施方式，根据本发明的设备包括至少一个金属导向装置，其 Ea 端与至少一种反应基团结合，所述反应基团优选为对癌（更特别是乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、腹内肿瘤、肾癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、中枢或末梢神经系统或内分泌腺（更特别是甲状腺、睾丸或卵巢）肿瘤）标记物（抗原）具有特异性的抗体或者抗体片段。

[0051] 乳腺癌的标记物的例子有：标记 CA15-3 (Carcinoma-Associated Antigen15-3；Duffy M.J., Shering S., Sherry F., McDermott E., O' Higgins N., *Int.J.Biol.Markers*, 2000Oct.-Dec.；15(4)：330-3)、CA 27-29 (Carcinoma-AssociatedAntigen 27-29；Kaohsiung J., *J.Med.Sci.*, 1999Sept.；15(9)：520-8)、CEA (Carcinoembryonic antigen；Soletormos G., Nielsen D., Schioler V., MouridsenH., Dombernowsky P., *Eur.J.Cancer*, 2004Mar.；40(4)：481-6)、TPA (TissuePolypeptide Antigen)、TPS (Tissue Polypeptide Specific Antigen；Given M., ScottM., Mc Grath J.P., Given H.F., *Breast*, 2000Oct.；9(5)：277-80)、HER2 (Fehm T., Jager W., Kramer S., Sohn C., Solomayer E., Wallwiener D., Gebauer G., *Anticancer Research*, 2004May-Jun；24(3b)：1987-92)、ER (Estrogene Receptor；Platet N., Cathiard A.M., Gleizes M., Garcia M., *Crit.Rev.Oncol.Hematol.*, 2004Jul.；51(1)：55-67)、PR (Progesterone Receptor；Duffy M.J., *Clin.Chem.*, 2005Mar.；51(3)：494-503.Epub 2005Jan.6.)、Ki-67 (cell proliferation-associatedantigen of antibody Ki-67；Schlüter C., Duchrow M., Wohlenberg C., BeckerM.H., Key G., Flad H.D., Gerdes J., *J.Cell.Biol.*, 1993Nov.；123(3)：513-22) 和 UPA (Urokinase Plasmogen Activator；Duffy M.J., *Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.*, 2001Jun.；38(3)：225-62)。

[0052] 卵巢癌标记物的例子有：标记 CA125 (Carcinom Antigen125；Moss E.L., Hollingworth J., Reynolds T.M., *J.Clin.Pathol.*, 2005Mar.；58(3)：308-12)、CA15-3 和 CEA (Valenzuela P., Mateos S., Tello E., Lopez-Bueno M.J., Garrido N., Gaspar M.J., *Eur.J.Gyn.Oncol.*, 2003；24(1)：60-2)。

[0053] 前列腺癌标记物的例子有：标记 PSA (Prostate-Specific Antigen；GrayM.A., *Clin.Lab.*, 2005；51(3-4)：127-33)、PMSA (Prostate-Specific MembraneAntigen) 和 AR (Androgen Receptor；Birtle A.J., Freeman A., Masters J.R., PayneH.A., Harland S.J., *BJU Int.*, 2005Aug.；96(3)：303-7)。

[0054] 结肠癌标记物的例子有：标记 CEA (Duffy M.J., Clin.Chem., 2001Apr.; 47(4): 624-30)、CA 19-9 (Carcinom Antigen 19-9)、CA242 (Carcinom Antigen242)、CA 72-4 (Carcinom Antigen 72-4)、TPA、TPS (Duffy M.J., van Dalen A., Haglund C., Hansson L., Klapdor R., Lamerz R., Nilsson O., Sturgeon C., Topolcan O., Eur. J.Cancer, 2003Apr.; 39(6): 718-27)。

[0055] 腹内肿瘤标记物的例子有：标记 CEA 或 CA19-9 (Coban E., Samur M., Bozcuk H., Ozdogan M., Int.J.Biol.Markers, 2003Jul-Sep; 18(3): 177-81)。

[0056] 胰腺癌标记物的例子有：标记 TA90-IC (90kDa 的免疫原性肿瘤相关抗原)、CA-19-9 (Chung M.H., Gupta R.K., Bilchik AJ, Ye W, Yee R., Morton D.L., Curr. Surg., 2002March-April; 59(2): 194-198)、TPS、HCG  $\beta$  (hCG beta, Human Chorionic Gonadotropin beta)、CA 72-4、CEA、CA 19-9、CA 242 (Louhimo J., Alfthan H., Stenman U.H., Haglund C., Oncology, 2004; 66(2): 126-31)。

[0057] 肝癌标记物的例子有  $\alpha$ -胎蛋白标记。

[0058] 肺癌标记物的例子有：标记 Cyfra A41 (细胞角蛋白片段 41)、SCC (鳞状细胞癌抗原)、ACE (血管紧张素转换酶)、CA 19-9、CA 125、NSE (神经元特异性烯醇酶)、嗜铬粒蛋白 A、CYFRA 21-1 (细胞角蛋白片段 21-1)、CA 15-3。

[0059] 依据第二个优选实施方式，根据本发明的设备包括至少一个金属导向装置，其 Ea 端与至少一种反应物结合，优选与对炎症、更特别是类风湿性关节炎的特定标记物具有特异性的抗体或者抗体片段结合。

[0060] 类风湿性关节炎标记物的例子有：IL-1 $\beta$ 、IL-1R $\alpha$ 、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-5、IL-6、IL7、IL8、IL10、IL12p40P70、IL-13、IL-15、IL-17、le TNF $\alpha$ 、IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、le GM-CSF、le MIP-1、IP-10、MIG、Eotaxine、RANTES 和 MCP-1 (COCKRUM 等., Lab Automation, BTi, October 2005, p: 19-21)。

[0061] 依据第三个优选实施方式，根据本发明的设备包括至少一个金属导向装置，其 Ea 端结合至少一种反应物，该反应物优选为对感染 (更特别是病毒、细菌或寄生虫感染) 的特定标记物具有特异性的抗体或抗体片段。

[0062] 很多感染标记物是本领域技术人员公知的，并且本领域技术人员能够非常容易地识别特异性标记物或者与假定感染有关的标记物。

[0063] 依据第四个优选实施方式，根据本发明的设备包括至少一个金属导向装置，其 Ea 端结合至少一种反应物，优选对移植排斥的特定标记物具有特异性的抗体或者抗体片段。

[0064] 很多移植排斥的标记物是本领域技术人员公知的。例如，用于心脏移植的 MIP-1 $\beta$  和 VE-钙粘蛋白 (VE-cadherine) (ROUSSOULIÈRES 等., Circulation, vol.111(20), p: 2636-2644, 2005)。

[0065] 本领域技术人员可以运用其常识，经有限的实验即可容易地鉴别上述特异性标记物，所述抗体或者抗体的特异性片段可以用于本发明的设备。这种抗体的例子有在 TEBU 或 AXXORA 可得的抗体。本领域技术人员也可以运用已知的免疫法获取这样的抗体。

[0066] 同样地，本领域技术人员将能鉴定出能用于本发明设备的适合的特异性核酸。

[0067] 依据第五个优选实施方式, 根据本发明的设备包括至少一个金属导向装置, 其 Ea 端结合至少一种反应物, 优选抗体或者抗体片段, 所述抗体或者抗体片段对神经变性疾病的一种特定标记物或者一系列特定标记物具有特异性, 所述神经变性疾病例如为阿尔茨海默病 (MA)、帕金森综合症、肌萎缩性侧索硬化 (SLA), 该列表为非穷举的。

[0068] 有几种本领域技术人员已知并已用于研究这种病症的标记物。例如, 对于精神失常或有精神失常先兆状态, 总蛋白 Tau (MAPT- 微管相关蛋白 Tau)、淀粉状肽 ABETA1-42、高度磷酸化蛋白 Tau (p.Tau phosphorylated in 128), 由 Waldemar G. 等举例描述 [Waldemar G., Dubois B., Emre M. 等, Eur.J.Neurol., 2007, 14, pp 1-26; Dubois B., Feldmann H.H., Jacova C., Dekosky S.T. 等, LancetNeurol.2007, 6, pp 734-746; Krolak-Salmon P. 等. " Vers un diagnostiquebiologique de la maladie d' Alzheimer et des syndromes apparentés", La Revue demédecine interne(2008), doi: 10.1016/J.revmed.2008.01.029]。这些标记物可以由酶联免疫吸附的抗原-抗体技术进行鉴定 (ELISA.INNOTEST B-Amyloid type(1-42), INNOTEST hTAUAg, INNOTEST PHOSPHOTAU(181p); Innogenetics, Ghent, Belgium.)。

[0069] 其他标记物也能检测大脑的退化状态, 并且更特别的是视锥蛋白样蛋白 (VLP6 或 VILIP-1 或 VSNL), 如在文献 Lee J.M. 等人, Clin.Chem., 2008, 54, pp1617-1623 中所描述的。在实施本发明时可采用这些标记物。

[0070] 关于帕金森病和多系统 (共核蛋白病 synucleopathies) 萎缩的标记物可为  $\alpha$ -SYNUCLEINE (Mollenhauer B., Cullen V., Khan I., Experimental Neurology, 2008, 213, pp 315-325)。

[0071] 最后, 存在对中枢神经系统 (SNC) 疾病具有非特异性的标记物, 也可以将其在本发明范围内使用。这些标记物是源于 SNC (如 GFAP 蛋白、髓鞘、神经肽和神经递质) 的蛋白。更特别的是在加州圣地亚哥大学的文献 Medicine& health/diseases (2009 年 2 月) 中描述的 BDNF 蛋白 (脑源性神经营养因子), 也引起了特别的关注。而且, 在实施本发明时可以使用免疫应答蛋白 (例如 IgG、白蛋白、补体蛋白、反应蛋白 C) 以及炎性蛋白 (如转铁蛋白、结合珠蛋白 (haptoglobin)、铜蓝蛋白、溶菌酶、烯醇化酶)。

[0072] 本发明的任何实施方式中, 可以将几种不同的标记物 (即不同病理标记物) 放置在同一金属导向装置的孔中。即, 可以将标记物置于所述孔中以使不同的标记物不相互反应。

[0073] 有利地, 根据本发明的设备或至少是与待分析底物接触的功能末端部分呈约  $10^{-6}$  的无菌确保等级 (SAL 为无菌确保等级)。可以使用不同的可选的解决方案来达到这个无菌等级。存在一种可能性, 在没有待测底物的特异性反应基团存在的情况下, 对设备灭菌, 然后在无菌条件下加入该反应基团。存在另一种可能性, 在添加反应基团后再对设备灭菌, 这就需要使用不会显著降低所述反应基团的活性的灭菌技术 (例如使用环氧乙烷或辐射灭菌)。

[0074] 本发明的第二个目的是提供一种体外检测存在于组织或器官中的底物的方法, 其特征在于包括如下步骤:

[0075] a) 当根据本发明的设备的功能 Ea 端与所述待检查的组织或器官接触时, 使用包含至少一种对所述底物具有特异性的检测剂的溶液孵育所述功能 Ea 端。

[0076] b) 检测所述底物。

[0077] 孵育步骤需在充裕的时间内进行以便于溶液中的检测剂，特别是抗体，能特异地固定于所述底物（标记物、抗原、抗体等），特别是抗原上，并且非必须地存在于设备末端。本领域技术人员可以运用其常识和例行实验容易地确定该孵育时间与溶液中检测剂的亲和性的函数关系，特别是抗体对其底物的亲和性，更特别的是抗原。该孵育时间也取决于孵育期间的溶液温度。例如，在温度为 20℃～37℃之间，孵育时间约为 1 分钟至 2 小时，优选 5 分钟至 1 小时，并且特别优选 10～30 分钟。

[0078] 有利地，溶液中的检测剂不同于与根据本发明的设备的功能端结合的特异性反应物。

[0079] 优选地，所述检测剂为抗体。

[0080] 有利地，溶液中的抗体以及结合至根据本发明的设备的功能端的抗体各为多克隆抗体，优选所述抗体是相同的。

[0081] 有利地，溶液中的抗体以及结合至根据本发明的设备的功能端的抗体各为单克隆抗体，优选所述抗体是不同的。

[0082] 有利地，标记溶液中的抗体，并且更特别的是，将其与酶偶联，例如与过氧化物酶或者碱性磷酸酶偶联。

[0083] 根据本发明方法的第一个特定实施方式，所述方法在步骤 a) 和 b) 之间进一步包括在溶液中孵育所述端的步骤 a')，该溶液包含至少一种对步骤 a) 中的检测剂具有特异性的检测剂。

[0084] 本领域技术人员能运用其常识，容易地鉴定出适合根据本发明的方法的抗体。例如，如果在步骤 a) 中使用特异性针对待识别底物（标记物、抗原、抗体等）的小鼠免疫球蛋白，则可以在第二个步骤中使用特异性识别该小鼠免疫球蛋白的抗体。

[0085] 根据本发明方法的第二个特定实施方式，根据本发明的方法，在孵育步骤 a) 和可选步骤 a') 之后，包括冲洗步骤，冲洗步骤能消除没有特异性固定于标记物（抗原）上的抗体。

[0086] 这样的冲洗步骤的程序也属于常识，并能通过例行实验很容易地确定。例如，该步骤可以使用包括一定浓度的洗涤剂 (0.05～1%) (如 TRITON X100® 或 TWEEN 20®) 的溶液来进行，具有提高溶液中的抗体对其特异性抗原的亲和性的作用。

[0087] 检测步骤根据活性进行，更特别的是根据与步骤 a) 或可选步骤 a') 中所用的抗体结合的酶的活性而进行。

[0088] 该检测步骤所采用的程序取决于所使用的标记物，更特别的是所使用的酶，例如过氧化物酶和碱性磷酸酶，并且这也属于本领域技术人员的常识。

[0089] 该检测步骤能推导出固定于所述设备功能端的特异性底物（例如抗原）的量，并且最终推导出存在于器官或组织在进行微量分析和 / 或微量取样处水平上的特异性底物的量。

[0090] 最后，能用于实施根据本发明的方法的各种反应基团也是本领域技术人员周知的，并且更特别的是，这些反应基团包括用于免疫酶或免疫荧光剂量技术的反应物，例如在固体载体上 [ELISA 技术，蛋白质芯片 (ESPINA 等., 见上文, 2004)]。

[0091] 本发明的第三个目的是使用根据本发明的设备制造一种用于诊断患者体内癌

症、炎症、感染、移植排斥或神经变性疾病工具。

[0092] 根据本发明的一个特定实施方式，所述诊断工具可以包括至少一个插入柔性导管中的金属导向装置，所述柔性管插入于内窥镜中。

[0093] 根据本发明的另一个特定实施方式，所述诊断工具可以包括至少一个金属导向装置，所述金属导向装置由穿过体壁的（并且更特别的是经皮的或经粘膜的）抽吸细针组成，其可以插入可拆卸的保护系统（例如柔性导管中）中。此外，可拆卸的保护系统与金属导向装置配合使用以便于使所述导向装置的功能 Ea 端与微量分析和 / 或微取样位点接触。

[0094] 在这两个本发明的特定实施方式中，所述至少一个金属导向装置可以与用于可视鉴别和定位的光纤长度的至少一部分相连。

[0095] 有利地，所述诊断仪器通过腔内路径传送。

[0096] 因此，所述工具能够在从咽至直肠的消化系统（包括肝脏和胰脏）、泌尿 - 生殖系统（包括膀胱、尿道、肾脏、前列腺）、气管 - 支气管系统（包括肺）、ORL 系统（包括耳和鼻咽）以及骨关节系统（包括滑液腔）中进行微量分析和 / 或微量取样。

[0097] 优选地，所述诊断工具通过经体壁的路径传送，更特别的是通过经皮或经粘膜的路径传送。

[0098] 这种诊断工具也能够对通过常规使用的腔内或血管内路径很难到达的组织或器官进行分析。这种诊断工具也能通过经体壁的路径，在皮肤、睾丸、前列腺、卵巢、乳腺以及肾脏和肝脏水平，末梢神经系统和中枢神经系统（更特别的是通过脊柱内的路径）的水平上以及在内分泌系统（例如甲状腺）水平上，进行微量分析和 / 或微量取样。

[0099] 在下文中的实施例可以阐明本发明，该实施例作为非限定的实例给出。

## 附图说明

[0100] 图 1 示出了构造金属导向装置的各种可能性；

[0101] 图 2 示出了 FIB 制成的不同孔的扫描电子显微镜图片（能够观察到由于不均一蚀刻产生的重要的表面糙度）；

[0102] 图 3 示出了氟辅助铣削技术的遮蔽效应的图解和观测结果；

[0103] 图 4 示出了微观成型操作的进步；

[0104] 图 5 示出了 (a) 光学显微镜观察到的半球形孔，(b) 用扫描电子显微镜在使用镍钛记忆合金的导向装置上观察到的一组孔，(c) 腔的细节，(d) 腔内的表面糙度与导向装置的表面糙度的比较；

[0105] 图 6 示出了与图 5 中相同的半球形孔在电化学磨光处理后的扫描电子显微图片；

[0106] 图 7 示出了本发明的设备用第一个单克隆抗体 (AcM 1) 进行免疫捕获和用第二个单克隆抗体 (AcM 2) 使抗原 ACE 显露的图解；

[0107] 图 8 示出了用捕获抗体 5910 和用抗体 5909 显露的 ELISA 结果（使用抗原 ACE 阳性血清获得的吸光度）；

[0108] 图 9 示出了用捕获抗体 5910 和用抗体 5909 显露的 ELISA 结果（使用抗原 ACE 阴性血清获得的吸光度）；

[0109] 图 10 示出了用捕获抗体 5905 和用抗体 5909 显露的 ELISA 结果（使用抗原 ACE 阳性血清获得的吸光度）；

[0110] 图 11 示出了用捕获抗体 5905 和用抗体 5909 显露的 ELISA 结果（使用抗原 ACE 阴性血清获得的吸光度）；

[0111] 图 12 示出了用具有捕获抗体 5910 的刚性塑料铰链和用抗体 5909 显露的的 ELISA 结果（使用抗原 ACE 阳性血清获得的吸光度）；

[0112] 这些图片用于说明所用方法的敏感性和特异性。

## 具体实施方式

[0113] 实施例 1：基于镍钛记忆合金的金属导向装置的制造及其活化

[0114] 将基于镍钛记忆合金的金属导向装置 (Euroflex) 的表面进行构造使其具有特定部位，例如孔，反应基团会置于其中并会在此发生生物化学反应（图 1）；

[0115] 所述“孔”可以使用多种方法获得，例如聚焦离子束光刻 (FIB, Xie 等, Nuclear Instruments & Methods in Physics research Section B-beam Interactions with Materials and Atoms, 211(3) : 363-368, 2003)、通过激光光刻及随后的电化学蚀刻和激光烧蚀。

[0116] 使用 FIB 技术，机器产生聚焦到必须进行构造的表面上的离子束。在离子束的机械作用下，表面材料的原子自表面除去。在适合的时间用 FIB 技术可以通过束流为 20nA 的  $8 \mu\text{m}^3\text{s}^{-1}$  的蚀刻写入器 (etching reader) 形成直径为  $20 \mu\text{m}$  的孔。图 2 示出直径为 5、20 和  $40 \mu\text{m}$  且深为 10 和  $20 \mu\text{m}$  的孔。在蚀刻期间，由于粉末状材料的再沉积，所述孔的底部表面粗糙。在  $200\text{nm min}^{-1}$  在直径为  $40 \mu\text{m}$  且束流为 20nA 的圆形区域上测定了蚀刻率。该蚀刻速率的结果为  $0.2 \mu\text{m}^3\text{nC}^{-1}$  (约  $5 \mu\text{m}^3\text{s}^{-1}$ )，其相当于在 20 分钟的加工时间内制造出直径为  $20 \mu\text{m}$  且深  $20 \mu\text{m}$  的孔。为了改善表面糙度，可使用氟 ( $\text{XeF}_2$ ) 辅助的铣削技术；随后可以得到非常低的表面糙度，但是由于  $\text{XeF}_2$  并非精确地沿着蚀刻光束的轴，故产生了遮蔽效应（图 3）。

[0117] 激光光刻技术和电化学蚀刻存在于用聚合物层涂覆表面的第一步。第二步中，使用激光烧蚀对聚合物层进行机械加工。第三步中，用等向性电化学蚀刻穿过置于聚合物层中的开口，对表面进行蚀刻（图 4）。图 5 示出了在基于镍钛记忆合金的金属导向装置上的各种结构测试的结果。

[0118] 此外，用于体内的基于镍钛记忆合金的金属导向装置经常通过电化学抛光进行加工，这使得具有生物相容性的  $\text{TiO}_2$  层取代了本征 NiTi 氧化层。为了评价这种方法对孔结构的影响，机械加工的具有孔的导向装置须经历这种方法（图 6）。

[0119] 另一种在基于镍钛记忆合金的导向装置表面上制造洞的方法是使用激光烧蚀。在不会因热的生成而影响周围金属的条件下，使用短激光脉冲使金属局部蒸发。报道的最小尺寸约为  $20 \mu\text{m}$ 。

[0120] 如果上述的三种方法都能制造出孔，则电化学蚀刻方法的结果最佳。

[0121] 实施例 2：连续将金属导向装置体内插入至特定器官所引起的创伤

[0122] 这些实验中使用的是金属微型导向装置 (MTI 0.012" Silver speed)，并且将所述金属导向装置插入至微型导管中。

[0123] 在抽吸水平上将所述装置引入全麻状态下的猪体内，随后在股三角 (scarpa) 水

平通过血管内路径（通过股动脉）向上到达肾脏。该导向装置通过动脉造影由位于股动脉中的所述设备的追踪观察进行操纵。

[0124] 当所述设备处于肾脏入口时，其可以通过入侵动脉路径到达肾脏。这样穿刺进入组织几毫米深处，并且所述设备在那里停留约 10 分钟。

[0125] 最后，移除所述设备。

[0126] 在根据本发明的设备进行穿刺后，处死动物并将其肾脏作为样本来评价它们的状况。

[0127] 结果显示肾脏中没有与入侵相关的重大出血。观察到的最为严重的损伤是在入侵位点上  $3 \times 1\text{mm}$  大小的范围。

[0128] 根据本发明的设备因此能够到达器官并同时产生及其轻微地侵害。

[0129] 实施例 3：在肝脏中插入设备伴随的微创

[0130] 与实施例 1 不同，将所用的金属微型导向装置 (MTI 0,012" Silver speed) 设置在纤维镜中。

[0131] 在抽吸水平上将所述装置引入全麻状态的猪体内，随后在股三角水平上通过血管内路径（通过股动脉）向上到达肝脏。该导向装置由位于股动脉中的所述设备通过动脉造影进行操纵。

[0132] 当接近肝脏时，将设备引入至该器官。穿刺进入组织几毫米深处，并且所述设备再次在那里停留约 10 分钟。

[0133] 最后，移除所述设备。

[0134] 如前所述，该操作中的肝脏样本能用于评价该操作对这一器官的侵害程度。

[0135] 肝脏表面没有肉眼可见的损伤。当切割时，可以看到被膜下薄壁组织内有  $1.5 \times 0.4\text{cm}$  和  $1.8 \times 0.5\text{cm}$  尺寸的两个出血节点。在组织学结构上，肝组织的每一个方向上的窦状隙、肝门小静脉和中央小叶静脉有一点充血，但并没有任何异常。

[0136] 结论：

[0137] 结果显示出血性损伤很小：可以在显微镜下看到两个很小的伤口，但没有损坏薄壁组织细胞，并且毛细血管和中央小叶静脉有一些充血。

[0138] 因此，使用金属导向装置能产生很小的创伤，在任何情况下，这些创伤都远远小于活组织检查造成的创伤。

[0139] 实施例 4：构思和制造确保在固体载体上进行体外免疫捕获和检测抗原 ACE 的设备参数的研究

[0140] 所述设备使用 ELISA 技术的原理使抗原 ACE 显露。两个识别该抗原上的不同表位的单克隆抗体用于捕获 (AcM1) 和显露抗原 ACE (AcM2)。这些具有相同的同位素的单克隆抗体 (IgG1)，用单克隆抗体偶联至生物素和链酶抗生物素蛋白 - 过氧化物酶的复合物上从而使 ACE 抗原显露 (图 7)。

[0141] 使用两种类型的载体，用于 ELISA 的板或者刚性塑料。

[0142] 用于 ELISA 的板 (Greiger)

[0143] 将  $100\ \mu\text{l}$  的用碳酸盐 / 碳酸氢盐缓冲液稀释 ( $1/5000$  和  $1/128000$ ) 的针对 ACE 抗原的单克隆抗体 (克隆 5910 或克隆 5905，在小鼠中制备并由 MedixBiochemical 出售) 置于每一个孔中，然后将该板在  $37^\circ\text{C}$  下放置 1 小时。用碳酸盐 / 碳酸氢盐缓冲液代替所

述抗体作为阴性对照。

[0144] 用 250  $\mu$ l 的 PBS 将每一个孔冲洗三次后, 在 37  $^{\circ}$ C 下, 用 200ml 3 % 的 PBS-BSA (牛血清白蛋白) 饱和该板的自由位点 (free site) 两小时。

[0145] 然后用 250  $\mu$ l 0.5 % 的 PBS-吐温对每个孔冲洗三次, 之后在每个孔中加入用 PBS-吐温按 1/10、1/100、1/1,000 范围内稀释的 100  $\mu$ l 的抗原 ACE 阳性血清, 并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育该板 1 小时。

[0146] 然后用 250  $\mu$ l 的 PBS-吐温对每个孔冲洗三次, 随后再添加 100  $\mu$ l 的用 PBS-吐温按 1/500 范围内稀释的生物素化的针对 ACE 抗原的单克隆抗体 (小鼠中制备的克隆 5909 并且由 Medix Biochemical 出售, 由于恒定的亲和力和识别表位, 故不同于之前使用的捕获抗体), 并在 37 $^{\circ}$ C 下再次孵育该板 1 小时。

[0147] 用 PBS-吐温冲洗三次后, 在每个孔中加入 100  $\mu$ l 的按 1/2000 范围内稀释的偶联至过氧化物酶的链酶抗生物素蛋白复合物, 并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时。

[0148] 用 PBS-吐温冲洗三次后, 在每个孔中加入 200  $\mu$ l 底物 ( $H_2O_2$ ) 和色原 (OPD, Sigma) 的混合物, 该底物和色原于柠檬酸-磷酸盐对照溶液中 (pH 5)。

[0149] 平行地, 使用“正常”患者的血清作为抗原 (阴性对照, ACE 剂量 < 5UI/ml) 进行同样的操作。

[0150] 然后, 通过在每个孔中加入 50  $\mu$ l 1M 的硫酸终止反应。在 492nm 下用酶标仪 (参考: ELX.800UV) 测定吸光度。

[0151] 图 8 示出了对于抗原 ACE 阳性血清以及图 9 中示出了对于抗原 ACE 阴性血清, 用单克隆抗体 5910 (稀释范围在 1/500 内然后一半一半 (half by half) 稀释至 1/128000) 进行免疫捕获以及用生物素化的单克隆抗体 5909 显露的结果。

[0152] 图 10 示出了对于抗原 ACE 阳性血清以及图 11 示出了对于抗原 ACE 阴性血清, 用单克隆抗体 5905 (稀释范围在 1/100、1/200、1/500 内然后一半一半稀释至 1/32000) 进行免疫捕获以及用生物素化的单克隆抗体 5909 显露的结果。

[0153] 图 8 ~ 11 说明:

[0154] 纵坐标: 492nm 处的吸光度 (DO),

[0155] 横坐标: 捕获抗体 (5909 或 5905) 的稀释,

[0156] ◆ 1/10 范围内稀释的 ACE 阳性血清,

[0157] ■ 1/100 范围内稀释的 ACE 阳性血清,

[0158]  $\Delta$  1/1000 范围内稀释的 ACE 阳性血清,

[0159] x = 无血清。

[0160] 结果显示, 当所使用的捕获单克隆抗体在 1/500 的稀释范围内时, 1/10 稀释范围内的抗原 ACE 阳性血清的吸光度 (DO) 在 0.5 以上 (图 8)。在同样条件下, 抗原 ACE 阴性血清的 DO 低于 0.15 (图 9)。

[0161] 然而, 应当注意到, 用捕获单克隆抗体 5905 以及检测单克隆抗体 5909 的组合得到的结果 (图 10 和 11) 优于用捕获单克隆抗体 5910 以及检测单克隆抗体 5909 的组合得到的结果 (图 8 和 9)。事实上, 1/10 范围内稀释的抗原 ACE 阳性血清的吸光度为 1 时 (图 10), 而在同样条件下抗原 ACE 阴性血清的吸光度为 0.1 (图 11)。这些结果由使用不同稀释条件的捕获单克隆抗体 5910 证实 (数据未显示)。

[0162] 刚性标准载体

[0163] 在第一步中, 将以长为 2 ~ 3cm 且直径为 0.5 ~ 1mm 的铰链形式的刚性塑料载体活化。

[0164] 第二步中, 将由此活化的载体置于 1ml 溶血 (haemolyse) 的微型管 (Fisher) 中, 并在 37℃ 下用针对 ACE 抗原的单克隆抗体 (克隆 5910 在小鼠中制备并由 Medix Biochemical 出售) 使其功能化 1 小时, 所述抗体用碳酸盐 / 碳酸氢盐对照液 (250  $\mu$ l / 管) 在 1/50、1/100、1/250、1/500 范围内稀释。用碳酸盐 / 碳酸氢盐对照液代替单克隆抗体作为阴性对照。在固定和冲洗后, 使用 500  $\mu$ l 3% 的 PBS-BSA 在 +4℃ 下过夜使其饱和。

[0165] 然后, 将载体用 250  $\mu$ l 的经 PBS 在 1/10、1/100 范围内稀释的抗原 ACE 阳性血清或者使用同样稀释范围内的“健康”被试者的血清 (抗原 ACE 阴性对照) 在 37℃ 下孵育 1 小时。

[0166] 1mg/ml 范围内的针对 ACE 抗原的单克隆抗体 (克隆 5909 在小鼠中制备并由 Medix Biochemical 出售, 由于其固有亲和性和识别表位, 与纯化的克隆 5910 不同) 在 0.1M pH 8.8 的硼酸盐对照液中 4℃ 过夜透析。然后以 50  $\mu$ g/mg 抗体的量加入 10mg/ml 的 DMSO 生物素溶液。室温下孵育 4 小时后, 在搅拌条件下以 20  $\mu$ l/250  $\mu$ g 生物素的量加入 1M 的氯化铵, 并将所得溶液在室温下再次孵育 1 分钟。终止反应后, 有标记的抗体在 PBS 中 +4℃ 透析 24 小时, 然后将该标记抗体等分并在 -20℃ 下保存。

[0167] 用 PBS-吐温冲洗 3 次后, 将所述载体用 250  $\mu$ l 的经 PBS-吐温按 1/500 范围内稀释的生物素化的抗体 5909 在 37℃ 下孵育 1 小时。

[0168] 37℃ 下, 使用在 PBS 中按 1/2000 范围内稀释的链酶抗生物素蛋白 - 过氧化物复合物 (Amersham Biosciences) 1 小时证实了生物素 (6-生物素酰胺基己酰基酰胺基己酸 (6-biotinamidocaproylamido-caproic acid) 与 N-羟基琥珀酰亚胺的酯, Sigma) 的检测。

[0169] 通过在柠檬酸盐 - 磷酸盐对照液 (pH 5) 中每管加入 750  $\mu$ l 底物 ( $H_2O_2$ ) 和色原 (OPD, Sigma) 混合物, 来使酶活性显露。

[0170] 然后, 加入 1M 的硫酸终止反应。吸光度在 492nm 下读取。

[0171] 在塑料铰链上的 ELISA 结果如图 12 所示。

[0172] 图 12 说明:

[0173] 纵坐标: 492nm 处的吸光度 (DO),

[0174] 横坐标: 捕获抗体 5910 的稀释,

[0175] ◆ 1/10 范围内稀释的抗原 ACE,

[0176] ■ 1/100 范围内稀释的抗原 ACE,

[0177] Δ 1/10 范围内稀释的阴性对照,

[0178] x1/100 范围内稀释的阴性对照。

[0179] 总之, 结果显示使用抗原 ACE 阳性血清的 DO 值比使用抗原 ACE 阴性血清的 OD 值高 7 ~ 10 倍。

[0180] 使用刚性塑料载体所得的最佳结果是其上固定有按 1/50 或 1/100 范围内稀释的捕获单克隆抗体 5910。

[0181] 检测的最佳抗原 ACE 浓度相当于按 1/100 范围内稀释的患者的血清, 即 6UI/ml (与“正常”比例相近: < 5UI/ml), 以及相当于检测单克隆抗体 5909 按 1/500 范围

内稀释时。

[0182] 使用塑料载体能够证实在根据上述步骤的功能化金属铰链上的免疫捕获过程的特异性和敏感性。

[0183] 结论：

[0184] 通过体外免疫捕获和显露技术测定抗原 ACE 的结果较佳，其证实了“功能化铰链”设备可以在体内捕获抗原 ACE 以及随后离体显露的有效性。

[0185] 实施例 5：例如在成像技术以及更特别的放射线技术控制下，乳腺肿瘤标记 ACE 的表达鉴定

[0186] 根据 PCT 申请 WO 03/006948 描述的实验步骤，在第一步中，硫醇层被吸附在基于镍钛记忆合金的金属导向装置 (Euroflex) 的其中一端上。第二步中，该层中的游离巯基的作用是能与针对 ACE 抗原的单克隆抗体形成二硫键。

[0187] 将得到的金属导向装置随后引入适用于动物或人的活检穿刺针中。

[0188] 在从乳腺癌患者体内移除肿瘤（乳房肿瘤）后，使用该设备对所要操作的肿瘤进行临时的解剖－病理检查。依据一个可选的解决方案，在允许的医疗道德条件下，在局部或全身麻醉条件下，对乳腺癌患者的乳房上进行微切口。将其内插入有与针对 ACE 抗原的抗体结合的金属导向装置的细针，引入至肿瘤，或者在通过成像追踪其进展的同时，通过微切口然后引导到达肿瘤，更特别的是模仿书写。

[0189] 然后，所述微创导向系统可以去掉与针对 ACE 抗原的抗体结合的金属导向装置的末端。金属导向装置的末端随后被引入至肿瘤（通过穿孔）约几毫米深处。在约 10 分钟的短暂等待后，在这期间确保了肿瘤任选表达的抗原 ACE 的免疫捕获，移除设备。

[0190] 微量取样限于体内免疫捕获的分析物，并且也不要求任何活组织检查。

[0191] 最后，移除设备，然后用针对标记物 ACE 的单克隆抗体，在设备末端上进行标记物 ACE 的 ELISA 剂量，该单克隆抗体由于对抗原 ACE 的固有亲和性和识别表位而与捕获抗体不同，并且其与生物素结合。

[0192] 用链酶抗生物素蛋白－过氧化物酶复合物显露酶活性能够推导出肿瘤标记物 ACE 的表达，并由此调整对患者施用的最佳的治疗方案。

[0193] 实施例 6：皮肤癌

[0194] 根据 PCT 申请 WO 03/006948 描述的实验步骤，在第一步中，硫醇层被吸附在基于镍钛合金的金属导向装置 (Euroflex) 的末端上。第二步中，该层中的游离巯基的作用是可以与针对 FAP 标记物（成纤维细胞激活蛋白；RETTIG 等人，Proc.Natl.Acad.Sci. USA, vol.85, p: 3110, 1988）的单克隆抗体形成二硫键。

[0195] 在允许的医疗道德条件下，将得到的金属导向装置随后引入至动物或人的皮肤肿瘤水平，或者引入至皮肤癌患者切除后的皮肤肿瘤水平，来进行常规或临时的解剖－病理检查。

[0196] 微量取样限于体内免疫捕获，并且也不要求特定的活组织检查。

[0197] 最后，移除设备，然后用针对标记物 FAP 的单克隆抗体，在设备末端上进行标记物 FAP 的 ELISA 剂量，所述标记物 FAP 与过氧化物酶结合。

[0198] 过氧化物酶活性的显露，能够推导出肿瘤标记物 FAP 的表达，并由此调整对患者施用的最佳的治疗方案。

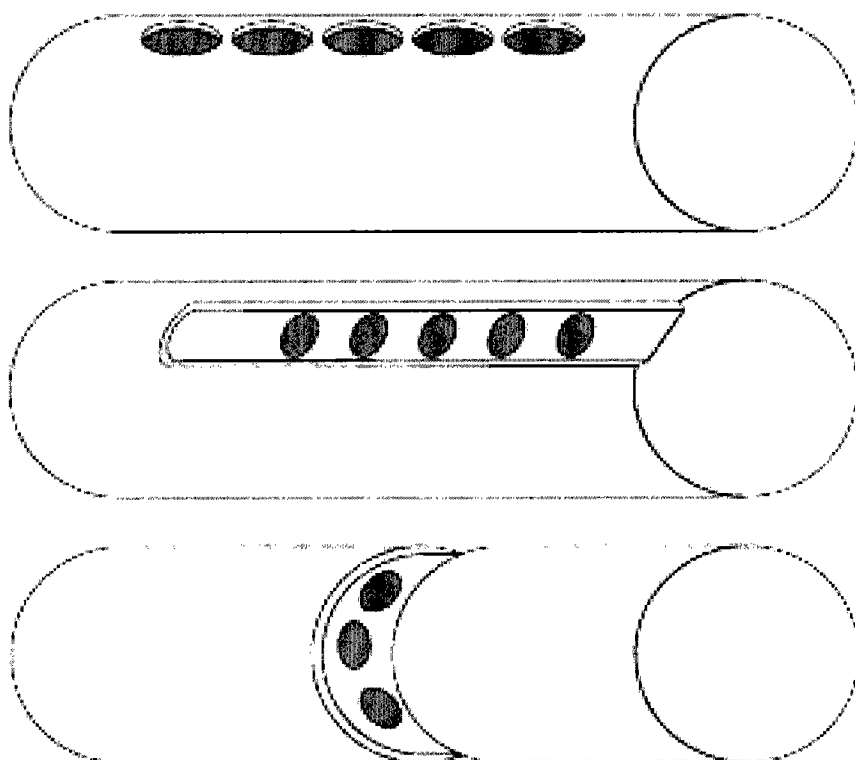


图 1

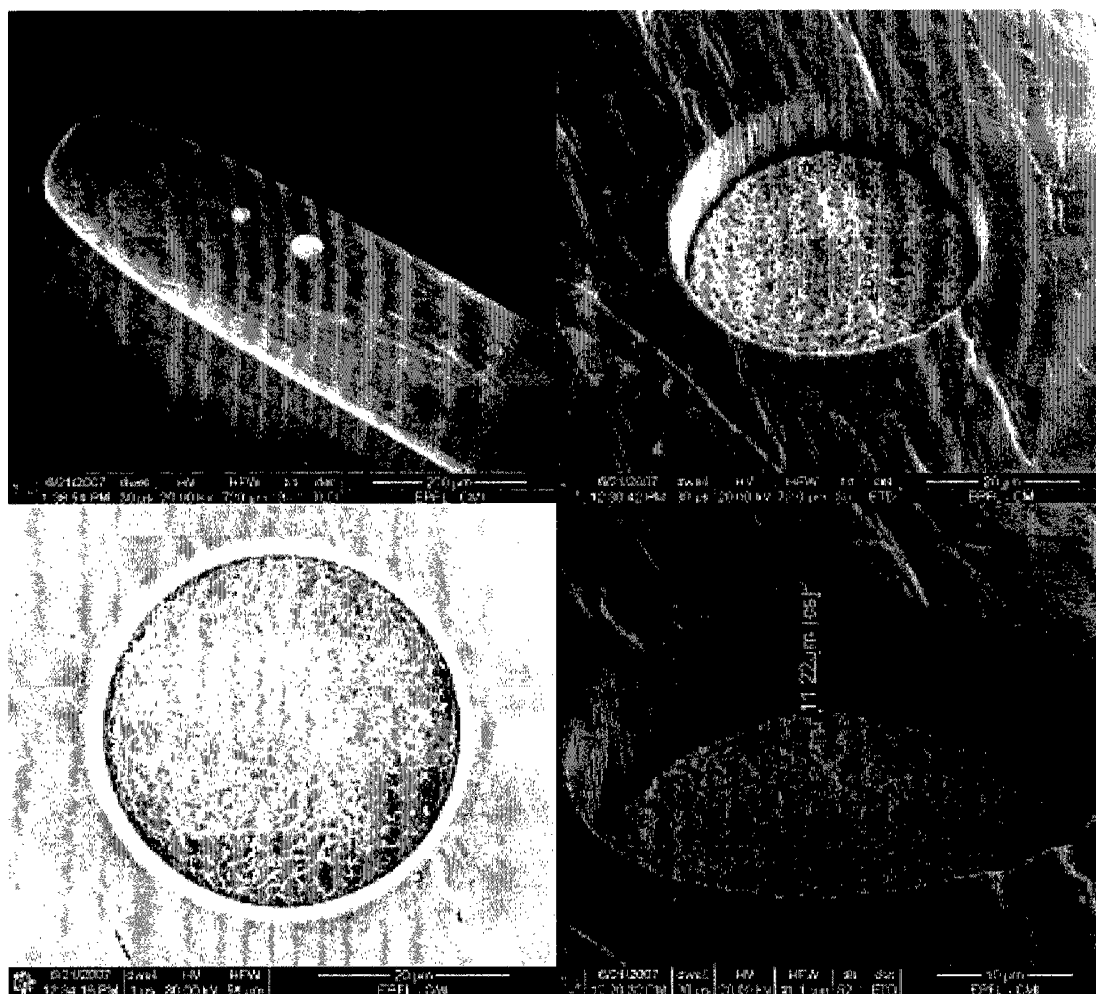


图 2

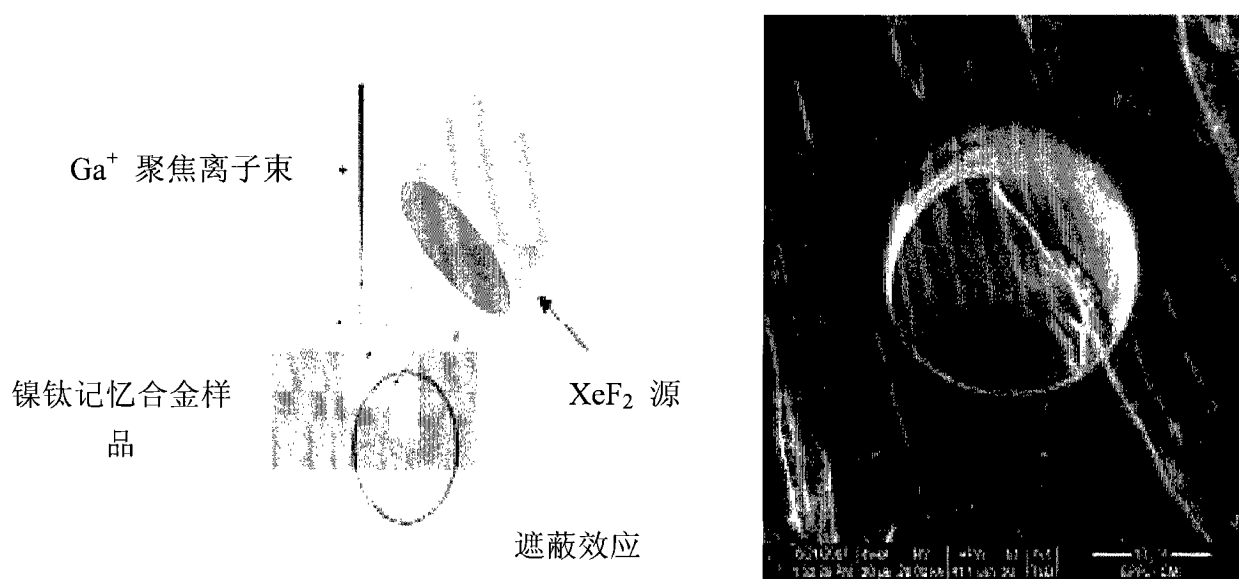


图 3

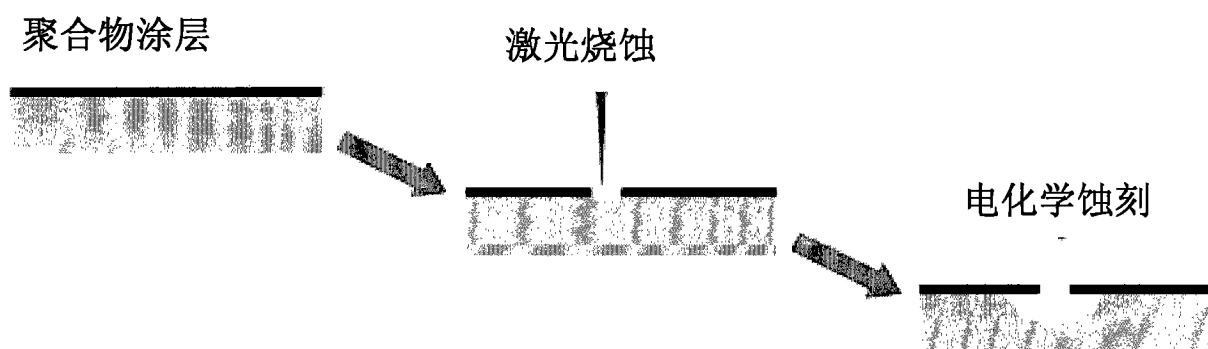


图 4

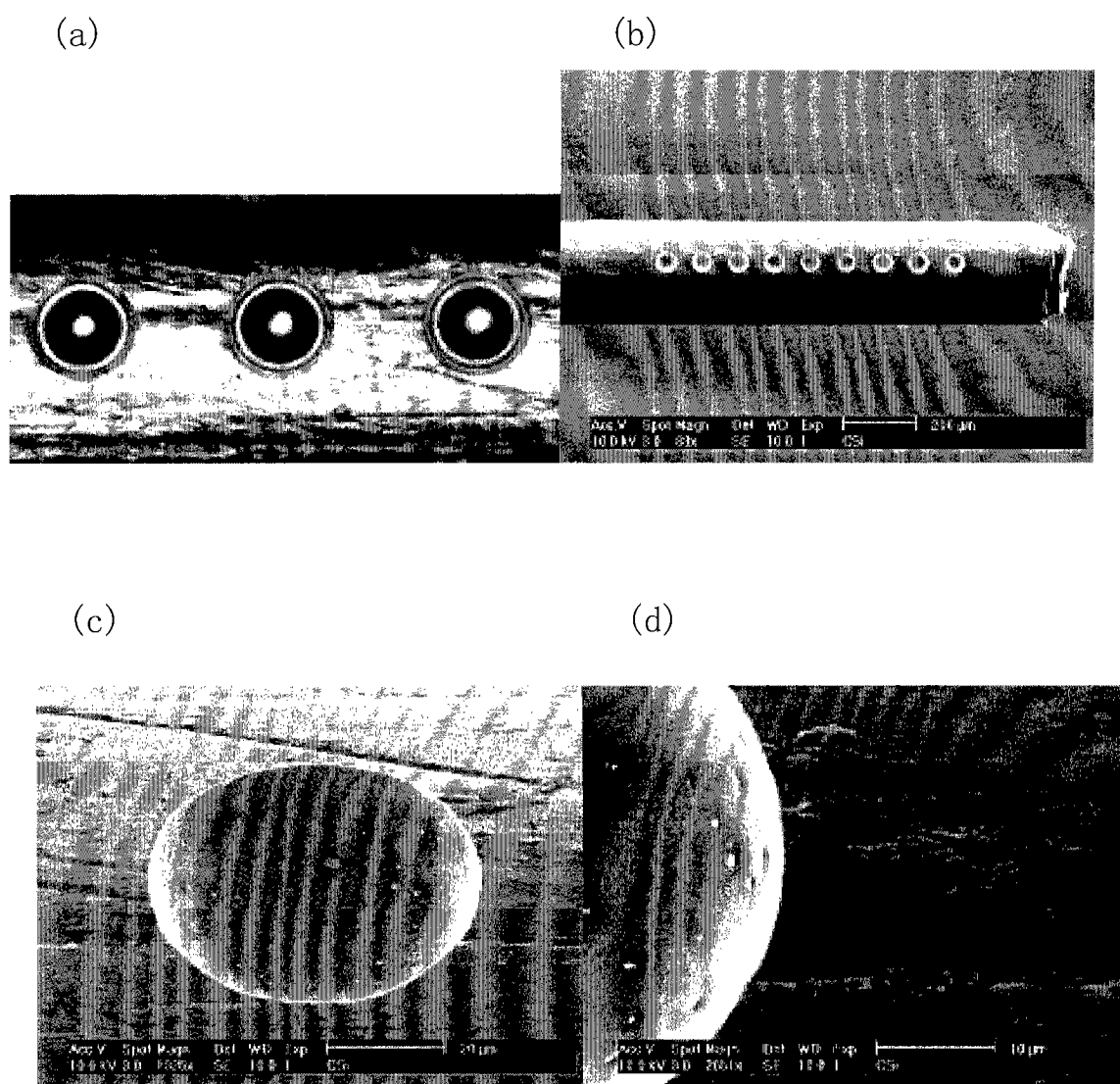


图 5

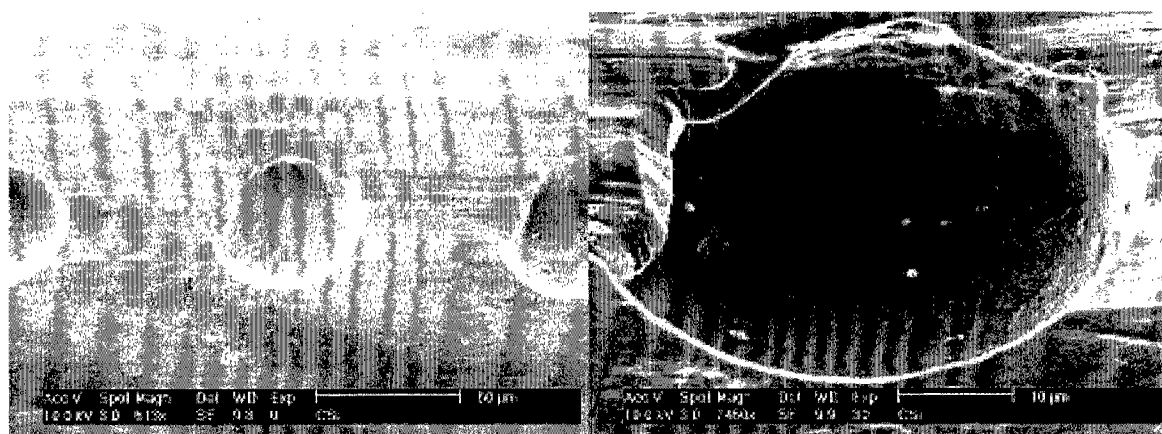


图 6

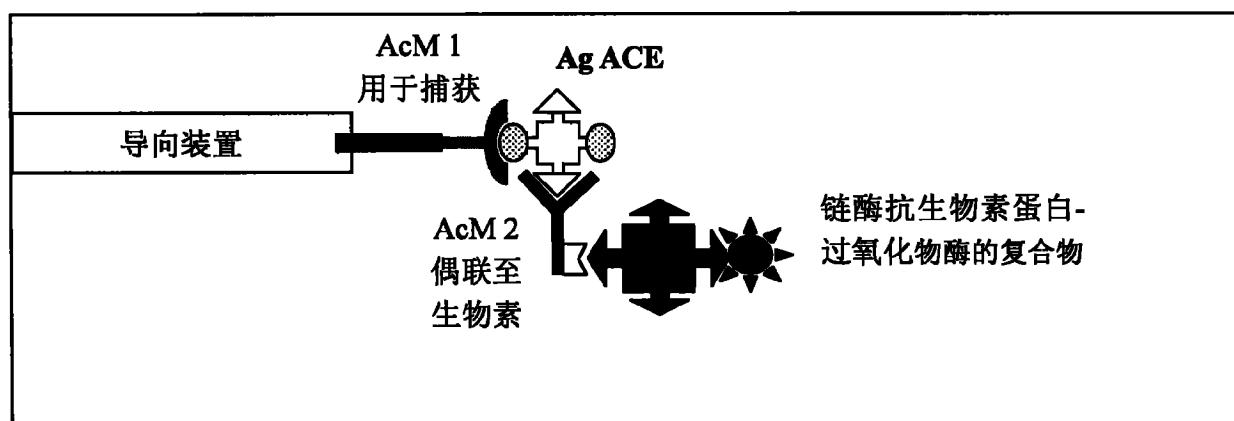


图 7

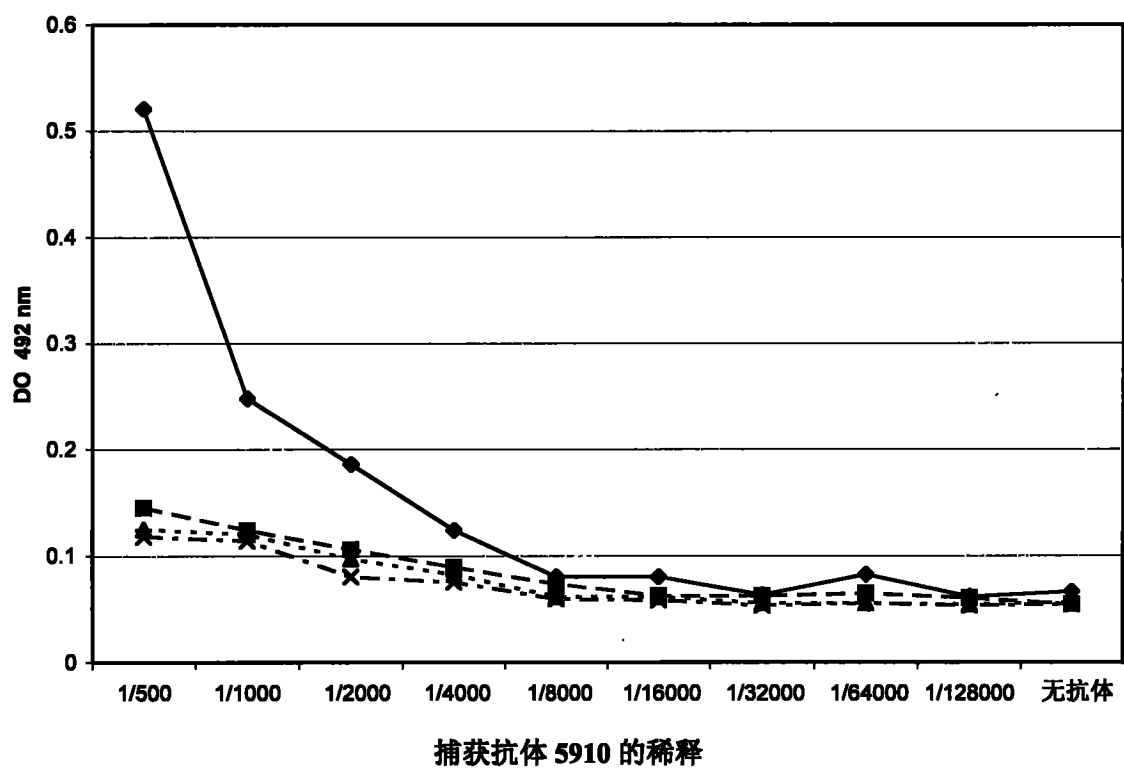


图 8

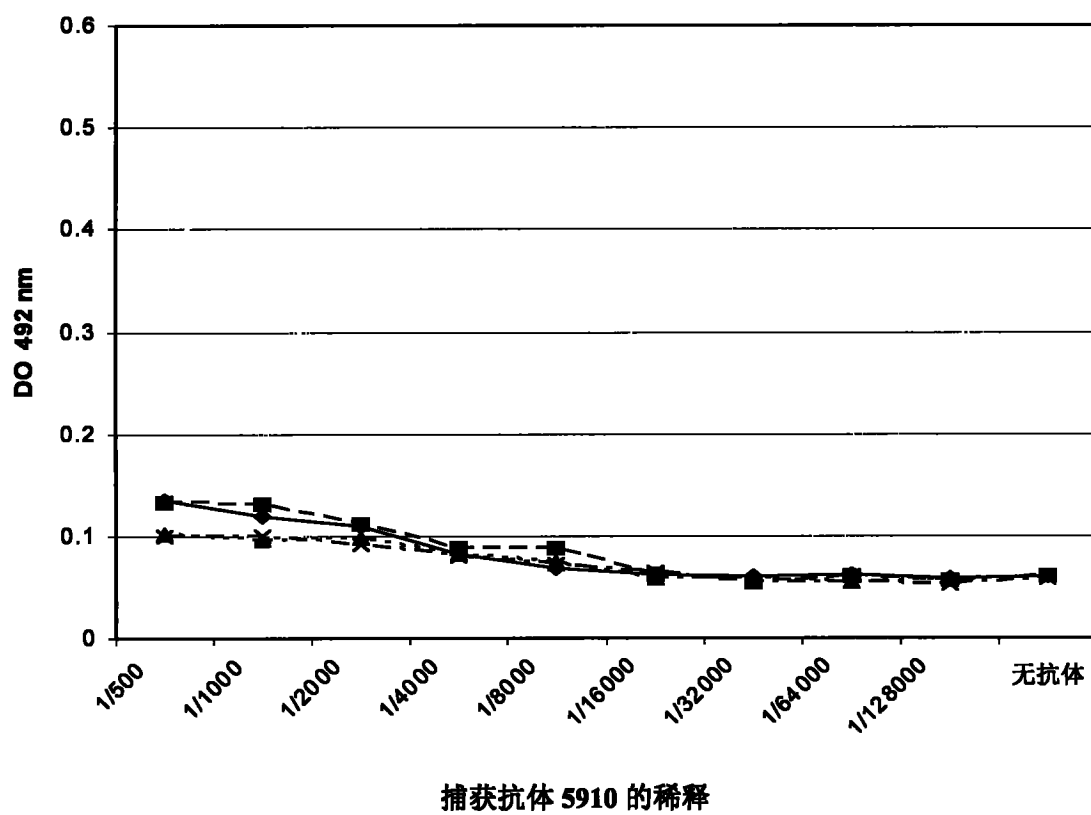


图 9

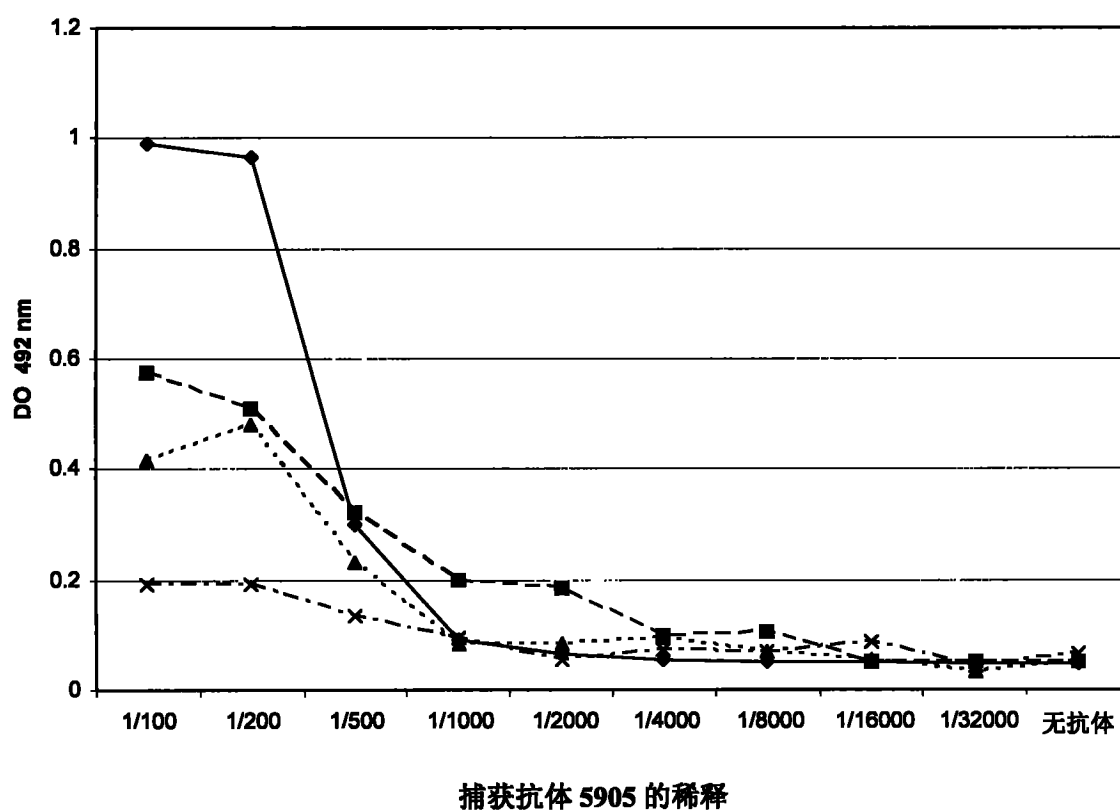


图 10

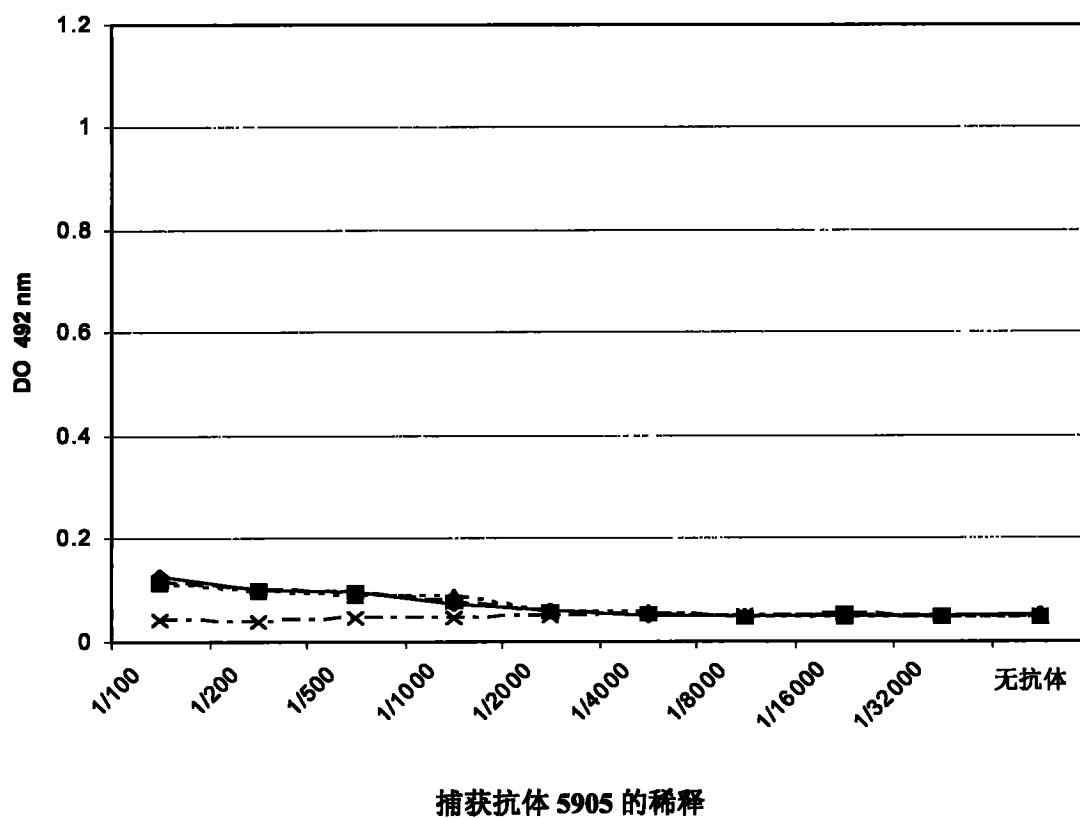


图 11

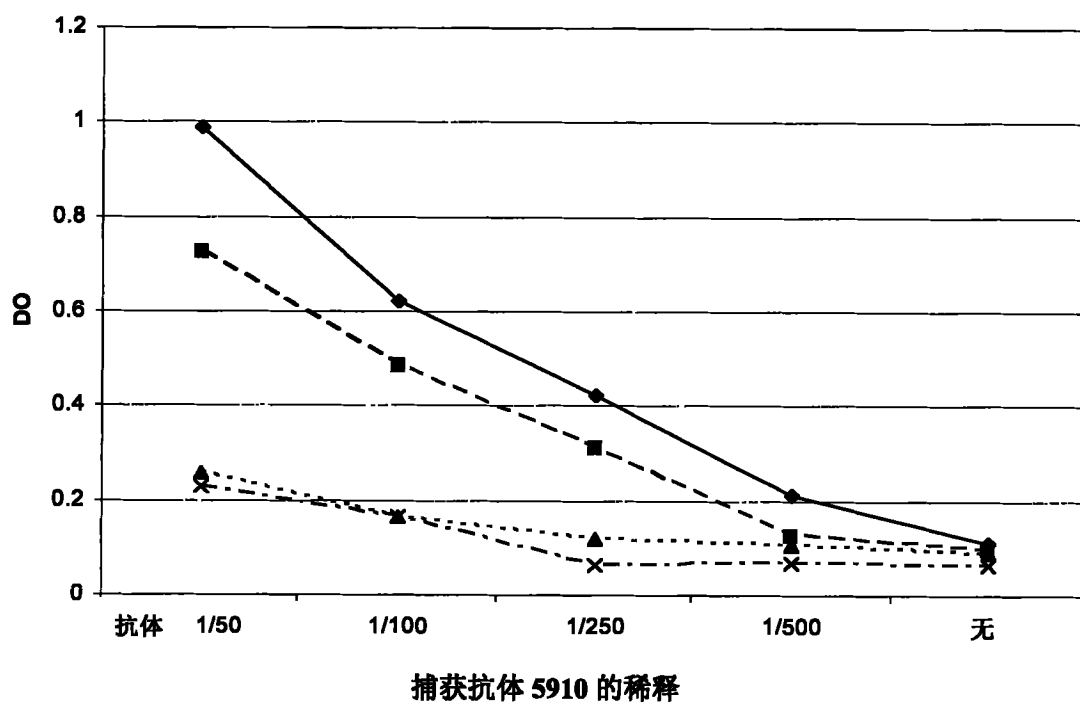


图 12

|         |                                                                                |         |            |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 包括金属导向装置的体内微创检查设备                                                              |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN102014734A</a>                                                   | 公开(公告)日 | 2011-04-13 |
| 申请号     | CN200980112079.4                                                               | 申请日     | 2009-02-24 |
| [标]发明人  | 阿兰·蓬皮杜<br>阿尔贝·克洛德·贝纳姆欧                                                         |         |            |
| 发明人     | 阿兰·蓬皮杜<br>阿尔贝·克洛德·贝纳姆欧                                                         |         |            |
| IPC分类号  | A61B5/00                                                                       |         |            |
| CPC分类号  | A61B5/1473 A61B5/14542 A61B5/00 A61B2562/02 A61B2562/043 A61B5/6851 A61B5/4076 |         |            |
| 代理人(译)  | 朱梅<br>徐琳                                                                       |         |            |
| 优先权     | 2008290179 2008-02-26 EP                                                       |         |            |
| 其他公开文献  | CN102014734B                                                                   |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                 |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种分析设备，其中，所述系统包括至少一个金属导向装置，其一端设有至少一组孔，该孔直接与对底物具有特异性的反应物结合，所述端为穿孔端，而其另一端用于控制所述导向装置，并且非必须地与抽吸系统相连。所述导向装置可以插入到与功能端齐平的可拆卸的保护系统中，一直到微量分析和/或微量取样位点，和/或所述导向装置可以插入至具有内部通路的医疗器械中，所述导向装置可以在其中滑动。本发明也涉及这种设备在制造一种用于诊断患者体内的癌症、炎症、感染、神经变性疾病或移植排斥的工具中的用途，优选通过经体壁的路径。本发明还涉及一种使用这种设备在体外分析底物的方法。

