(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107058101 B
(45)授权公告日 2021.06.01

(21)申请号 201710109954.X
(22)申请日 2012.10.17
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107058101 A
(43)申请公布日 2017.08.18
(30)优先权数据
61/548,013 2011.10.17 US
61/684,301 2012.08.17 US
(62)分案原申请数据
201280060689.6 2012.10.17
(73)专利权人 麻省理工学院
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 A·沙瑞 A·亚当姆 R·兰格 K·F·延森
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌
(51)Int.Cl.
C12M 3/02(2006.01)
C12M 3/00(2006.01)
C12M 1/42(2006.01)
C12M 1/00(2006.01)
C12N 15/87(2006.01)
(56)对比文件
US 2009280518 A1,2009.11.12
US 2007243523 A1,2007.10.18
US 2011030808 A1,2011.02.10
US 2009280518 A1,2009.11.12
审查员 纪圆圆

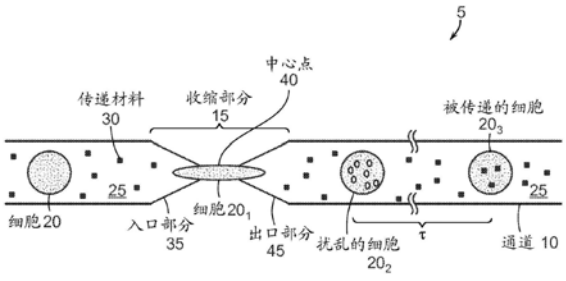
权利要求书3页 说明书39页 附图43页

(54)发明名称

细胞内传递

(57)摘要

能够在细胞膜中造成扰动的微流体系统，该系统包括定义腔室的微流体通道，该通道被设置使得悬浮在缓冲液中的细胞可从其中穿过，其中，所述微流体通道包括一种使细胞变形的收缩部分，其中，该收缩部分的直径为细胞直径的函数。



CN 107058101 B

1.一种将化合物或者组合物递送至细胞中的方法,所述方法包括:

在悬浮溶液中提供一种细胞;

使溶液通过一种微流体通道,所述微流体通道包括使细胞变形的收缩部分;

使细胞通过收缩部分从而对细胞施加变形力,造成足够大的细胞扰动,允许有效载荷通过;和

细胞通过收缩部分后,在包含有效载荷的溶液中使细胞培养一段预定的时间;

其中所述有效载荷包含以下的一种或更多种:多肽、多核苷酸、可检测标记物或纳米颗粒。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述收缩部分的直径是从其中通过的细胞直径的20-99%。

3.根据权利要求2所述的方法,其中,所述收缩部分的直径是从其中通过的细胞直径的60%。

4.根据权利要求1所述的方法,其中,所述通道的横切面选自如下所组成的组中:圆形、椭圆形、狭长的细缝、方形、六角形和三角形。

5.根据权利要求1所述的方法,其中,使溶液通过的步骤包括使溶液通过收缩部分的入口部分、中心点和出口部分。

6.根据权利要求5所述的方法,其中,进一步包括通过调整入口部分的收缩角度减少微流体通道的堵塞。

7.根据权利要求5所述的方法,其中,进一步包括通过调整入口部分的收缩角度改善传递和细胞存活率。

8.根据权利要求5所述的方法 ,进一步包括将入口部分的收缩部分角度调整为90度。

9.根据权利要求1所述的方法,其中,使溶液通过的步骤包括使溶液通过一系列经串联或者并联排列的微流体通道。

10.根据权利要求1所述的方法,其中,培养包括培养细胞0.0001秒到20分钟。

11.根据权利要求1所述的方法,其中,使细胞通过收缩部分包括使悬浮在缓冲液中的液体流导入所述收缩部分,所述收缩部分的直径比从其中穿过的细胞的直径要大,从而使细胞被液体流预压缩。

12.根据权利要求1所述的方法,其中,所述变形力是剪切力和压缩力中的一种。

13.一种将化合物传递入细胞的方法,所述方法包括:

将细胞悬浮在溶液中,

使溶液通过一种微流体通道,所述微流体通道包括使细胞变形的收缩部分;

收缩部分的尺寸是细胞直径的函数;

使细胞通过收缩部分从而对细胞施加变形力,造成细胞扰动;和

细胞通过收缩部分后,在包含有效载荷的溶液中使细胞培养一段被预设的时间,其中,所述细胞扰动足够大从而使有效载荷通过;

其中所述有效载荷包含以下的一种或更多种:多肽、多核苷酸、可检测标记物或纳米颗粒。

14.根据权利要求13所述的方法,其中,所述收缩部分的直径是从其中通过的细胞直径的20-99%。

15.根据权利要求14所述的方法，其中，所述收缩部分的直径是从其中通过的细胞直径的60%。

16.根据权利要求13所述的方法，其中，所述通道的横切面选自如下所组成的组中：圆形、椭圆形、狭长的细缝、方形、六角形和三角形。

17.根据权利要求13所述的方法，其中，使溶液通过的步骤包括使溶液通过收缩部分的入口部分、中心点和出口部分。

18.根据权利要求17所述的方法，进一步包括通过调整入口部分的收缩角度减少微流体通道的堵塞。

19.根据权利要求17所述的方法，其中，进一步包括通过调整入口部分的收缩角度改善传递和细胞存活率。

20.根据权利要求17所述的方法，进一步包括将入口部分的收缩部分角度调整为90度。

21.根据权利要求13所述的方法 ，其中，使溶液通过的步骤包括使溶液通过一系列经串联或者并联排列的微流体通道。

22.根据权利要求13所述的方法，其中，培养包括培养细胞0.0001秒到20分钟。

23.根据权利要求13所述的方法，其中，所述培养包括培养细胞超过0.0001秒。

24.根据权利要求13所述的方法，其中，所述变形力是剪切力和压缩力中的一种。

25.一种将化合物传递入细胞的方法，所述方法包括：

在溶液中提供一种细胞；

使用微流体收缩部分使细胞变形从而在细胞膜上产生扰动；并且

细胞变形后，在含有有效载荷的溶液中培养细胞；

其中所述有效载荷包含以下的一种或更多种：多肽、多核苷酸、可检测标记物或纳米颗粒。

26.根据权利要求25所述的方法，其中，使细胞变形包括使细胞变形1微秒到1毫秒。

27.根据权利要求25所述的方法，其中，所述培养进行0.0001秒到20分钟。

28.一种将化合物传递入细胞的方法，所述方法包括：

提供细胞和有效载荷的悬浮物到溶液中，从而产生一种悬浮液；

使悬浮液通过具有收缩部分的微流体通道，所述收缩部分的尺寸为使细胞发生突然和短时间的变形以使得有效载荷通过细胞膜；并在突然和短时间变形后将细胞在悬浮液中培养预定的时间；

其中所述有效载荷包含以下的一种或更多种：多肽、多核苷酸、可检测标记物或纳米颗粒。

29.根据权利要求28所述的方法，其中，使悬浮液通过微流体通道包括：使悬浮液通过微流体通道中的收缩部分；并且收缩部分的尺寸是细胞直径的函数。

30.根据权利要求28所述的方法，其中，所述收缩部分的尺寸是细胞直径的函数包括设计收缩部分的尺寸使收缩部分的直径是细胞直径的20-99%。

31.根据权利要求28所述的方法，其中，使悬浮液通过微流体通道包括：使细胞变形1微秒到1毫秒。

32.根据权利要求1-31中任意一项所述的方法，其中，所述方法用于将抗原或者RNA传递到初级免疫细胞中。

33.根据权利要求1-31中任意一项所述的方法，其中，所述方法用于将量子点和碳纳米管中的至少一个传递到靶细胞中对靶细胞成像。

34.一种用于将有效载荷传递到靶细胞中的方法，该方法包括：

在包括使细胞变形的收缩部分的微流体通道中通过使靶细胞通过所述收缩部分使靶细胞变形从而在靶细胞的细胞膜上产生一个或者一个以上短时间的小孔，所述一个或者一个以上短时间的孔足够大使有效载荷通过，并且

在含有有效载荷的溶液中将细胞培养一段被预设的时间；其中，所述变形被机械力或者剪切力诱导。

35.一种用于将有效载荷传递到多个靶细胞中的方法，该方法包括：

提供多个靶细胞到悬浮液中；

使包括多个靶细胞的溶液通过多个微流体通道，每个通道包括至少一个使细胞变形的收缩部分，从而诱导每个靶细胞变形，从而产生足够大的扰动允许有效载荷通过；以及

在细胞通过通道后，使所述多个靶细胞在溶液中培养一段预定时间。

36.根据权利要求1-31和34-35中任意一项所述的方法，其中：

(a)所述方法用于将DNA、RNA、siRNA或蛋白质传递到初级成纤维细胞和干细胞中进行细胞重新编码；或者

(b)所述有效载荷包含多肽，其中所述多肽为以下的一种或更多种：抗原、转录因子或抗体；或者

(c)所述有效载荷包含多核苷酸，其中所述多核苷酸包含以下的一种或更多种：DNA、cDNA、RNA、mRNA或siRNA；或者

(d)所述有效载荷包含可检测标记物，其中所述可检测标记物包含以下的一种或更多种：荧光分子、放射性核素、量子点、金纳米颗粒或磁珠；或者

(e)所述有效载荷包含抗原，其中所述抗原是癌症抗原；或者

(f)所述有效载荷包含转录因子，其中所述转录因子是重新编码因子；或者

(g)所述有效载荷包含DNA，其中所述DNA在包括1kb、2kb、5kb或更多的核酸聚合物的质粒或构建物中；或者

(h)所述有效载荷包含多核苷酸，其中所述多核苷酸是编码融合蛋白的重组核苷酸；或者

(i)所述细胞是初级细胞、干细胞和/或免疫细胞；或者

(j)所述细胞是初级细胞，其中所述初级细胞是初级成纤维细胞；或者

(k)所述细胞是干细胞，其中所述干细胞是胚胎干细胞或诱导的多能干细胞(iPSC)；或者

(l)所述细胞是免疫细胞，其中所述免疫细胞是B细胞、T细胞、树突状细胞、单核细胞或巨噬细胞。

细胞内传递

[0001] 本申请是2012年10月17日递交的申请号为201280060689.6,发明名称为“细胞内传递”的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2011年10月17日递交的美国临时申请第61/548,013号的优先权和2012年8月17日递交的美国临时申请第61/684,301号的优先权,其每一篇的内容通过引证在此并入本文。

[0004] 联邦赞助研究声明

[0005] 根据美国国立卫生研究院授权的Grant 5 RC1 EB011187-02,本发明至少部分的被政府支持。政府享有本发明的特定权利。

背景技术

[0006] 许多制药公司主要致力于研发小分子药物。

[0007] 之所以被称为小分子药物是由于这些药物相对小的分子尺寸,这使其能够在体内自由扩散达到其靶点。这些分子还可以滑过其他作为极大阻碍的不可渗透的细胞膜。然而新一代的基于蛋白、DNA或者RNA的治疗剂不能容易的穿过细胞膜,因此需要进行细胞修饰来加速传递。

[0008] 已经建立起来的方法使用化学或者电脉冲破坏细胞膜并将材料传递进入细胞质。合适的细胞内是研究、发开和实施下一代治疗剂中至关重要的步骤。

[0009] 现有的方法常常难以开发并很难对其特定的应用产生高度专一性。因此,现有技术无法合适的解决许多临床上重要的细胞型(例如干细胞和免疫细胞)所具有的问题。因此,对更稳定并更精确地技术存在需要,以期解决现代生物/医学研究的需要。

发明内容

[0010] 本发明基于一种出乎意料的发现,即,受控制的损伤,例如,使细胞经历收缩、快速拉伸、快速压缩、或者高剪切速率的脉冲,会导致细胞将分子从周围的培养基中吸收入细胞质。因此,本发明的特征在于一种含载体的微流体平台,用于直接将材料传递到真核细胞细胞质,所述材料例如化合物或者组合物。该装置可有效作为一种灵活的并且广泛应用的实验室工具,用于将理想的分子传递靶细胞。使用这里所描述的方法将分子传递入细胞是成比例的,例如,与细胞通过收缩和/或压力的速度呈线性比例的或者单调比例的。例如,在几秒内将50微升的细胞悬浮液通过该装置。通量范围在1个细胞/每秒每通道(或更少)至超过1000个细胞/每秒每通道之间。尽管细胞速度可以高达10m/s(或更高),但一般通过收缩的细胞速度包括10mm/秒到500mm/秒。其他的通道可以平行放置从而增加系统的总通量。

[0011] 分子的吸收是基于扩散的,而不是基于胞吞作用,即,通过本装置的途径之后,有效载荷(被传递到细胞中的化合物)存在于细胞质中而不在于核内质中。在细胞被处理之后,只有很少的或者没有所述有效载荷存在于核内质中。例如,大分子比小分子吸收的慢。受控制的细胞拉伸和细胞在收缩过程中的运动速度导致靶分子优先传递,同时保持细胞的

存活能力和完整性。在处理之后，细胞存活率在70-100％，例如，通常在处理之后存活率为90％。与此相比，之前的只使用高剪切速率传递几秒钟或者几毫秒的方法会使细胞在处理之后具有很差的存活能力。与之前的技术相比，本发明的方法当细胞经历收缩时，使细胞在非常短的时间内(大约100微秒)经受范围在100-1000帕的剪切脉冲。但是本发明的技术与之前的技术是完全不同的。在本发明的技术中，优选细胞在经历收缩时发生完整的机械变形，与现有技术相比，这可以强化不同的剪切力。在优选的实施方案中，细胞不经历电流。在另一个实施方案中，使用结合的方式处理，例如，使用这里描述的装置实现机械变形，并在之后或者之前进行电穿孔(一种渗透转染，其中使用电流在细胞膜上产生临时的孔，从而允许核酸或者大分子进入)。

[0012] 有效载荷是需要传递入细胞中的化合物或者组合物。例如，有效载荷可以包括蛋白质、荧光染料、量子点、碳纳米管、RNA分子、DNA分子、抗原或者其他大分子，纳米颗粒和物质的组合物。

[0013] 分子向细胞的传递受到装置收缩幅度、收缩部分长度、进入区域的地理结构和装置通道宽度的影响。优选的，导管收缩部分的宽度是直径不超过4微米，导管收缩部分的长度优选在40-50微米。收缩部分的长度通常不会超过90微米。收缩部分的直径与被处理的细胞类型有关。如下所述，该直径小于细胞直径(例如，是细胞直径的20-99％)。许多细胞直径在5-15微米之间，例如，树突细胞直径是7-8微米。例如，当处理单个细胞时，收缩部分的直径是4.5、5、5.5、6或者6.5微米。在其他实施例中，处理人类卵子的收缩部分尺寸/直径在6.2微米和8.4微米范围内，虽然也可以使用更大或者更小的收缩部分(人类卵细胞的直径大约是12微米)。在另一个实施例中，使用直径在12微米到17微米之间的收缩部分处理胚胎(例如，2-3个细胞的簇)。

[0014] 所述装置和方法能够有效的用于疫苗研发和使用专门的抗原呈递细胞(例如树突状细胞)生产。例如，通过以下来进行刺激抗原呈递的方法：将树突状细胞经历受控制的损伤，例如短时间的收缩或者高剪切力的脉冲，并且将树突状细胞与包括靶向抗原的溶液相接触。这种方法与之前的刺激方法相比能够产生高度活化的抗原呈递细胞。将树突状细胞或者其他抗原呈递细胞驱动穿过包含收缩部分的装置(因此细胞经受快速拉伸)，然后在含有有效载荷(例如，抗原)的溶液中培养细胞进行疫苗生产。在细胞快速变形之后，将细胞浸入含有一种或者更多种抗原的细胞培养基中，但是细胞在快速变形事件/过程之前、之中，和/或之后也可以与抗原相接触。

[0015] 选择性的，可在流动的缓冲液中使用表面活性剂(例如，0.1-10％重量/重量，例如，泊洛沙姆、来自动物的血清、白蛋白)。分子向细胞中的传递不受表面活性剂是否存在的影响，然而，选择性的，表面活性剂选择性的减少装置在操作期间的堵塞。

[0016] 所述装置由硅、金属(例如，不锈钢)、塑料(例如，聚苯乙烯)、陶瓷或者任何其他适合蚀刻微米级结构特征的材料组成，并且包括一个或者更多个供细胞流通的通道或者导管。硅尤其合适，这是由于使用这种材料很好的建立了微光栅方法，因此，它比较容易制备新的装置、改变的设计等等。另外，与其他柔软的底物(比如，聚二甲基硅氧烷(PDMS))相比，硅的硬度更具有优势，例如，更高的传递速率。例如，所述装置包括2个、10个、20个、25个、45个、50个、75个、100个或者更多的通道。通过蚀刻硅微制备该装置。使用压力移动，例如，推动细胞穿过通到或者导管。细胞驱动器可以提供这种压力。细胞驱动器包括，例如，压力泵、

气瓶、压缩机、真空泵、注射器、注射泵、蠕动泵、手动注射器、移液管、活塞、毛细管驱动和重力。作为通道的替代，细胞可以以网或者紧密放置的盘子的方式穿过收缩部分。在任意情况下，细胞穿过的收缩部分的宽度是被处理细胞在其自然无压力状态下宽度或者直径的20-99％。温度会影响组合物的吸收并影响生存能力。所述方法在室温下(例如，20℃)、生理温度(例如，39℃)下，比生理温度更高的温度或者更低的温度(例如，4℃)下，或者在这些示例性的温度之间的范围内进行。

[0017] 通过收缩、拉伸、和/或高剪切率脉冲对细胞进行受控制的伤害，随后在传递溶液中培养细胞，所述传递溶液包括希望引入细胞中的化合物或者分子。受控制的伤害特点是在细胞膜上的小损伤，例如，直径为200纳米。在通过收缩部分造成的损伤结束后几分钟是细胞的恢复时间。传递时间是1-10分钟或者更久，例如，15分钟、20分钟、30分钟、60分钟或更久，在室温下操作时，2-5分钟是最佳时间。在传递溶液中培养的时间越长不一定会增加吸收。例如，数据显示，五分钟后，几乎没有材料被细胞吸收。

[0018] 因此，本发明为向细胞传递药物领域长时间存在的问题提供了一种解决办法，并且为之前的方法中存在的缺陷提供了解决方法。

[0019] 关于向真核细胞传递的材料，细胞可以被分为两种主要类型：

[0020] 1)易于传递(ETD)的细胞：绝大多数的化学品和病毒方法属于此类。易于传递的细胞通常没有直接的临床关联性。

[0021] 2)难于传递(DTD)的细胞：高度临床相关性。传递技术的进步能够极大的促进新型治疗剂的发展。这类细胞包括干细胞、初级细胞和免疫细胞。由于在未来几年新型的RNA、干细胞和蛋白基治疗剂得到了极大的动力，可以预计DTD传递市场会快速发展。

[0022] 虽然也可以对易于传递的细胞使用相同的技术，但这里描述的技术被证实对DTD研究领域尤其有效。此外，此方法还促进了不能用其他方法传递入易于传递的细胞或者难于传递的细胞中的材料(例如，量子点、碳纳米管和抗体)的传递。

[0023] 总之，在一个方面，本发明的实施方式能够提供一种可以造成细胞膜扰动的微流体系统，该系统包括定义腔室的微流体通道，该通道被设置使得悬浮在缓冲液中的细胞可从其中穿过，其中，所述微流体通道包括一种收缩部分，其中，该收缩部分的直径是细胞直径的函数

[0024] 本发明的实施方式还可以提供一种或者一种以上的如下特征。所述收缩部分的直径是从其中通过的细胞直径的20-99％。所述通道的横切面选自如下所组成的组中：圆形、椭圆形、狭长的细缝、方形、六角形和三角形。所述收缩部分包括入口部分、中心点和出口部分。所述入口部分定义了收缩角度，其中所述收缩角度最好能减少通道堵塞。所述微流体系统进一步包括一系列平行安置的微流体通道，例如，2个、5个、10个、20个、40个、45个、50个、75个、100个、500个、1000个或者更多的通道

[0025] 总之，在另一个方面，本发明的实施方式还可以提供一种将化合物传递入细胞的方法，该方法包括，提供处于悬浮液中的细胞或者将细胞或者有效载荷悬浮在溶液中，将溶液穿过包括收缩部分的微流体通道，所述收缩部分的尺寸是细胞直径的函数，将细胞通过所述收缩部分从而对细胞实施压力，造成细胞足够的扰动，从而使有效载荷通过，并且在通过收缩部分后，在溶液中培养细胞一段被预设的时间。

[0026] 本发明的实施方式还可以提供一种或者一种以上如下特征。所述收缩部分的直径

是从其中通过的细胞直径的20-99％。所述通道的横切面选自如下所组成的组中：圆形、椭圆形、狭长的细缝、方形、六角形和三角形。通过溶液包括从收缩部分的入口部分、中心点和出口部分通过所述溶液。该方法进一步包括通过调整入口部分的收缩角度减少微流体通道的堵塞。该方法包括从平行安置微流体通道中通过所述溶液。

[0027] 总之，在依旧另一个方面，本发明的实施方式还可以提供一种将化合物传递入细胞的方法，所述方法包括，提供处于溶液中的细胞或者将细胞悬浮在溶液中，将溶液穿过包括收缩部分的微流体通道，所述收缩部分的尺寸是细胞直径的函数，将细胞通过所述收缩部分从而对细胞实施压力，造成细胞扰动，并且在通过收缩部分后，在含有有效载荷的溶液中培养细胞一段被预设的时间，其中，所述扰动应足够大从而使有效载荷穿过。

[0028] 本发明的实施方式还可以提供一种或者一种以上如下特征。所述收缩部分的直径是从其中通过的细胞直径的20-99％。所述通道的横切面选自如下所组成的组中：圆形、椭圆形、狭长的细缝、方形、六角形和三角形。“通过溶液”包括从收缩部分的入口部分、中心点和出口部分通过所述溶液。该方法进一步包括通过调整入口部分的收缩角度减少微流体通道的堵塞。“通过溶液”包括从一系列串联或并联排列的微流体通道中通过溶液。“培养”包括培养细胞0.0001秒到20分钟(或者更长时间)。压力是剪切力和压缩力中的一种。

[0029] 总之，在依旧另一个方面，本发明的实施方式还可以提供一种将化合物传递入细胞的方法，所述方法包括，提供处于溶液中的细胞或者将细胞悬浮在溶液中，使细胞变性从而在细胞膜上造成扰动，并在细胞变形后在含有有效载荷的溶液中培养所述细胞。

[0030] 本发明的实施方式还可以提供一种或者一种以上如下特征。“使细胞变形”包括使细胞变形1μs到10ms，例如，10μs、50μs、100μs、500μs和750μs。培养0.0001秒到20分钟，例如，培养1秒、30秒、90秒、270秒和900秒。

[0031] 本发明不同的实施方式可以提供一种或者一种以上的如下性能。与现有技术相比，能够实现更准确和成规模化的传递。材料可以自动被传递入细胞中。可以将材料(例如蛋白质、RNA、siRNA、肽、DNA和渗透性染料)植入细胞(例如胚胎干细胞)或者诱导多能干细胞(iPSCs)、初级细胞或者永生细胞系。可以根据不同的细胞类型修改这里所述的装置和方法，还可以根据被处理的细胞制定收缩部分的尺寸。这里的方法和装置可以提供明显的优势。例如，与现有技术相比，本发明技术可以降低现有系统中的实验噪音。材料通过一种细胞群落的传递量是持续的。细胞可以被单独处理而不必成批处理。本发明还介绍了一种相当独特的机会来将各种各样的纳米颗粒和蛋白质传递进入细胞质。而现有的方法在进行此功能时是非常不可靠或者是无效的。

[0032] 关于传递敏感型有效载荷，例如，蛋白质(尤其是大蛋白质，例如，大于30kDa、50kDa、100kDa、150kDa、200kDa、300kDa、400kDa、500kDa或更大)、量子点、或其他对电敏感或者容易被电破坏的有效载荷可以被可靠地传递如细胞并且保持所述敏感型有效载荷的完整性和活性。因此，本发明的装置和方法与现存技术(例如电穿孔)相比具有明显的优势，电穿孔使有效载荷组合物受电击(因此破坏有效载荷)并导致降低的细胞存活率(例如，在电穿孔后通常有505或者更多的细胞死亡)。快速拉伸/变形方法的另一个优势在于干细胞或者前体细胞被随机选择吸收有效载荷，并不改变被处理细胞的分化状态或者活性。除了向细胞的细胞质中传递组合物用于治疗(例如，疫苗生产)之外，该方法还可以用于引入分子，例如，向被标记的胞内结构(例如细胞器)中引入包括可检测标记物的大分子，或者向被

标记的胞内成分中引入包括可检测标记物的大分子用于诊断或者成像。

[0033] 本发明不同的实施方式可以提供一种或者一种以上的如下性能。可以将DNA递送至用于递送剂量的细胞中，例如，干细胞，初级细胞、免疫细胞等等。也可以实现非常大的质粒(甚至整个染色体)的传递。本发明还可以很容易的实现向细胞定量传递已知量的基因构建物，从而研究所关心基因的表达水平及其对浓度的敏感性。已知量的DNA序列与已知量的能提高DNA重组的酶一起传递，从而实现更简单/更有效的稳定传递，实现同源重组、点特异性突变。这里所描述的方法和装置还可以有效用于定量传递RNA进行更有效的/结论性研究。将小干扰性RNA传递进入细胞的细胞质中也可以很容易的实现。

[0034] 本发明不同的实施方式可以提供一种或者一种以上的如下性能。可以将RNA传递入细胞中，从而使RNA在不需要脂质体的情况下静止。已知量的RNA分子和已知量的Dicer分子一起传递，从而使RNA能够标准地、有效地在不同的情况下通过多重细胞系。可以将mRNA引入细胞来研究转录后水平上的基因表达规则。已知量的RNA标记物可用于研究RNA和细胞的半衰期。还可以实现通用的蛋白传递。已知量的标记蛋白质可以被传递从而研究其在细胞中的半衰期。还可以完成标记蛋白质向研究的蛋白位点的传递。已知量的标记蛋白可以被传递从而研究胞内环境下蛋白质-蛋白质之间的相互作用。还可以实现标记的抗体向活细胞中的传递进行免疫染色和荧光基的蛋白质印迹。

[0035] 本发明不同的实施方式还可以提供一种或者一种以上的如下临床和研究性能。可以实现将药物定量传递入细胞模型中进行改善的筛选的剂量研究。本发明还可以发展成一种高通量筛选细胞质中蛋白活性从而帮助识别蛋白治疗剂或者了解疾病发病机理的方法。由于现有的蛋白传递方法没有效果，已经严重限制了这些应用。本发明的装置和技术可以有效将药物在细胞内传递到特定的循环血液细胞(例如，淋巴细胞)亚组，糖向细胞中的高通量传递可以改善细胞的低温储藏，尤其是卵母细胞的低温储藏，可以通过引入蛋白质、mRNA、DNA和/或生长因子来改善靶细胞分化作用，基因或者蛋白材料的传递可以引起细胞的再进化，从而产生iPS细胞，将DNA和/或重组酶传递到胚胎干细胞中可以改善转基因干细胞系，将DNA和/或重组酶传递到受精卵中可以发展成转基因器官、DC细胞活化、诱导的多能干细胞产生和干细胞分化，还可以实现纳米颗粒传递以进行诊断和/或机理研究，以及还可以实现引入量子点。还可以使用这里介绍的装置和方法修饰在整形手术中使用的皮肤细胞。

[0036] 使用传递抗原和/或免疫刺激分子的方法刺激抗原呈递作用会产生抗原呈递细胞，例如，树突状细胞，同时与常用的刺激方法相比，上述方法能够改善活性水平，因此导致增加的T细胞和B细胞介导的针对靶抗原的免疫作用水平。因此，这种方法可以被用作活化免疫系统响应癌症或者感染的方法。

[0037] 为了实现筛选、成像和诊断目的，在标记细胞的方法中使用本发明的装置。通过使细胞经历受控制的损伤或者将细胞与包括可检测的标记物的溶液相接触来进行标记细胞的方法，其中，所述损伤包括短时间收缩或者高剪切率的脉冲。所述可检测的标记物包括荧光分子、放射性核素、量子点、金纳米颗粒或者磁珠。

[0038] 在本发明之前，对干细胞进行处理以引入外源组合物是非常困难的。这里描述的装置和方法，例如，使干细胞或者前体细胞(例如，诱导的多能干细胞(iPSCs))通过收缩的通道，不会诱导分化，但是会可靠地诱导组合物被吸收到细胞中。例如，分化因子被诱导进

入这些细胞中。在引入的因子被吸收之后，所述细胞按照引入的因子控制的分化途径进行分化，将所述因子引入所述细胞时所使用的方法不会造成任何困难。

[0039] 除了单个细胞之外，非常大的细胞，例如卵细胞(直径大约为200微米)、细胞簇，例如包括2-3个细胞的胚胎也可以被处理来吸收目标组合物。调整孔径尺寸从而使收缩部分宽度正好小于簇的尺寸。例如，通道的宽度是细胞簇宽度的20-99％。

[0040] 分离/纯化细胞或者细胞簇，或者富集需要的细胞类型。在本发明方法中使用的树突状细胞或者其他细胞(例如免疫细胞，比方说巨噬细胞、B细胞、T细胞或者干细胞，比如胚胎干细胞或者iPS)被纯化或者富集。例如，通过再起细胞表面标记物上表达或者其他可识别的特征分离或者富集细胞。通过其表达β-整合素、CD11c或其他可识别的细胞表面标记物的方法来识别并分离树突状细胞。关于这些细胞，术语“分离的”是指细胞基本上不含有其他细胞类型或者其天然存在的细胞材料。

[0041] 例如，当某一特定组织或者表型的细胞样品占整个细胞群落的60％时，该细胞样品室“基本上纯”的。优选的，所述比例是细胞群落的至少75％、更优选是至少90％，最优选是至少99％或者100％。通过合适的标准方法测定细胞纯度，例如，通过荧光激活的细胞分类法(FACS)。

[0042] 有效载荷组合物，例如多核苷酸、多肽或者其他试剂是纯化的和/或分离的。具体的，如这里所使用的，当使用重组技术生产、使用化学前体或其他化学品化学合成时，“分离的”或者“纯化的”核酸分子、多核苷酸、或者蛋白质是基本上不含有其他细胞材料或者培养基的。纯化的化合物的重量占所关心的化合物总重量的至少60％(干重)，优选的，所述比例是占所关心的化合物重量的至少75％、更优选的是至少90％，并且最优选的是至少99％。例如，纯化的化合物占所关心化合物总重量的至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、98％、99％或者100％(重量/重量)。通过合适的标准方法测量纯度，例如，通过柱状色谱法、薄层色谱法、或者高效液相色谱法(HPLC)分析。纯化的或者分离的多核苷酸(核糖核酸(RNA)或者脱氧核糖核酸(DNA))不含有其天然存在状态侧链上的基因或者序列。分离的或者纯化的核酸分子的实施例包括：(a)一种DNA，这种DNA的一部分是天然存在的基因DNA分子，但是在其侧链上不含有天然存在的器官基因组分子两端的侧链核酸序列；(b)整合入质粒的核酸或者整合入原核或者真核细胞基因组DNA的核酸，所得的分子与所有天然存在的载体或者基因组DNA完全不同；(c)单独的分子，例如cDNA，基因组片段、聚合酶链式反应(PCR)所得的片段、或者限制性片段；和(d)重组核苷序列，作为杂合基因(即，编码融合蛋白的基因)的一部分。本发明分离的核酸分子进一步包括合成的分子以及任何具有改变的化学结构和/或具有修饰的骨架结构的核酸。

[0043] 悬浮溶液是任意生理缓冲液或者溶液，或者细胞-相容性缓冲液或者溶液。例如，悬浮溶液是细胞培养基或者磷酸盐缓冲盐水。有效载荷是相同的或者不同的悬浮溶液，可以包括需要传递到细胞内部的组合物。

[0044] 该装置的优点包括不需要对理想的有效载荷进行修饰并且不需要将有效载荷暴露于电磁场或者其他形式的外力中。关于电穿孔，这种方法会损伤蛋白质并不能有效传递。这里描述的方法不存在这个重要问题；本发明的方法尤其适合于传递敏感的有效载荷，例如，蛋白质，尤其是大蛋白质(例如，40kDa-70kDa，或者分子量达到120、130、150、200KDa以上)，大的核酸构建物(例如质粒及其他构建物，包括1kb、2kb、5kb或更多的核酸聚合物，甚

至整个染色体)6、大化合物,以及量子点(例如,直径在12纳米)或其他已知对电敏感并在与电接触时容易受到损伤的材料。例如,当与电场接触时,纳米颗粒上的表面配体或者量子点会被损伤或者被充电,从而导致颗粒聚集,限制/消除其功能。受控制的损伤方法的另一个优点在于将细胞与传递组合物接触一定的时间。尤其对于蛋白质来讲,由于蛋白质对蛋白酶、温度和电敏感,与之前的方法相比,本方法在处理后将细胞与有效载荷溶液相接触相对短的时间。所述装置的微流体性能还需要更小的工作体积从而保存宝贵的原材料和/或细胞。该装置还可以与现有的传递方法,例如电穿孔结合使用,或者与脂质体结合使用,与各个方法单独使用相比,这种结合会产生显著提高的传递效果。

[0045] 被传递的有效载荷的功能活性与流体剪切力成反比,也就是说,对细胞膜实施的物理压力(例如拉伸细胞膜)能够比剪切更好的调节有效载荷的吸收。传统的纳米颗粒传递方法会使更多的材料进入细胞的胞内环境;然而与这里所描述的方法相比,传统方法会降低被传递的材料的活性,这是由于传统方法会使被传递的材料在核内体中产生多价螯合作用。这里描述的方法产生直接向细胞质传递的化合物/组合物,从而较少量的有效载荷被传递入细胞,但由于他们容易接近其他细胞质组分,被传递的分子保持了更大量的功能活性。例如,之前用于传递纳米颗粒的方法会传递2-10被的材料进入细胞,但是,由于被传递的材料在核内体中发生多价螯合作用,被传递的细胞只有很少的功能活性或者没有功能活性。通过避免内涵体,本发明的装置和方法能够克服现有细胞内传递方法所存在的问题。

[0046] 其他优势和特征包括处理的时间规格和细胞速度比之前的方法要快很多。此外,其他方法不象这里所述的方法一样挤压细胞,例如,收缩部分的尺寸(直径)由细胞的尺寸(直径)决定(是细胞直径的%)。这种快速、有力但是半抽打式、挤压或者形变会导致细胞更好的吸收“直接至细胞液”的有效载荷。细胞突然发生形变,也就是说,形变基本上在1微秒到1毫秒之间发生。通常,细胞过度形变产生的外力会致死细胞,而同时,如果外力不足,不会产生细胞扰动。因此,本发明的主题内容提供了一种方法和系统,所述方法和系统能够产生足够的外力诱导短时间扰动,但不会产生造成永久扰动的外力也不会致死细胞。

[0047] 上面所述的任意方法都可以在试管中、体外或者或体内进行。对于体内应用,所述装置可以被植入血管腔,例如,在内嵌的血管支架中。在阅读了随后的附图、详细说明和权利要求之后,会更容易理解本发明的这些性能以及其他性能,以及本发明本身。

附图说明

[0048] 图1a是微流体系统的示意图。在经过收缩部分后将细胞暴露于传递材料(有效载荷)。

[0049] 图1b是微流体系统的示意图。在整个过程中,通过将细胞悬浮在包括传递材料(有效载荷)的溶液中将细胞与传递材料(有效载荷)相接触(例如,在穿过所述收缩部分之前或者之后将所述细胞与传递材料相接触)。

[0050] 图2A是微流体系统的一个实施方案的示意图。

[0051] 图2B是微流体系统的示意图,描述了深度、宽度和长度。

[0052] 图3是微流体系统的示意图。

[0053] 图4是一种示意图,显示细胞壁上的扰动。

[0054] 图5是微流体系统的照片。

[0055] 图6是微流体系统的照片。

[0056] 图7是微流体系统的照片。

[0057] 图8a-8b是图，显示了微流体系统所获得的示例性结果。

[0058] 图9是图，显示了使用微流体系统处理过的细胞所获得的示例性结果。

[0059] 图10是图，显示了使用微流体系统处理过的细胞所获得的示例性结果。

[0060] 图11是图，显示了使用微流体系统处理过的细胞所获得的示例性结果。

[0061] 图12是微流体系统的示意图。

[0062] 图13是图，显示了使用微流体系统处理过的细胞所获得的示例性结果。

[0063] 图14是图，显示了使用微流体系统处理过的细胞所获得的示例性结果。

[0064] 图15是图，显示了使用微流体系统处理过的细胞所获得的示例性结果。

[0065] 图16a-16f是微流体系统的示例性示意图。

[0066] 图17是使用微流体系统的方法的流程图。

[0067] 图18a-18b是图，显示了使用微流体系统处理过的细胞所获得的示例性结果。

[0068] 图19是覆盖传输和共聚荧光图，显示了使用本发明的主题内容与量子点(QDs)一起处理的细胞的z切面共聚荧光图

[0069] 图20A显示了使用本发明的主题内容方法将聚咪唑基配体(PIL)涂布的量子点传递进入HeLa细胞细胞质的传递效率。通过流式细胞仪测定细胞存活率>80％。

[0070] 图20B显示了使用本发明的主题内容传递平QD535后HeLa细胞的存货率，所述存活率是碘化丙啶染色之后使用流式细胞仪测定的。

[0071] 图21显示了构建物设计，吸收和在各种介质中的稳定性。

[0072] 图22A显示了被处理的细胞和参照细胞的活细胞共焦显微镜照片。

[0073] 图22B显示了在绿和红通道中，被处理的细胞强度随时间的变化。

[0074] 图23显示了流式细胞仪测定的平均细胞荧光度和存活率。

[0075] 图24显示了在使用本发明装置处理10nM量子点溶液之后，细胞的细胞质中未聚集的单个量子点的落射荧光图，以及自体荧光性的三个量子点的闪烁轨迹。

[0076] 图25显示了一种实验结果，证明传递行为取决于细胞速度和收缩部分设计。

[0077] 图26显示了当传递太平洋蓝共轭的3kDa右旋糖苷之后，使用共焦显微镜测量的不同水平线的HeLa细胞的扫描图。

[0078] 图27显示了简化的2D扩散模型，该模型刺激材料被动扩散通过被打孔的细胞膜。

[0079] 图28显示了材料的双重传递结果。

[0080] 图29显示了与siRNA、蛋白质和纳米颗粒传递有关的数据。

[0081] 图30显示了本发明主题内容穿过细胞性的能力。

[0082] 图31显示了纳米材料和抗体传递的数据。

[0083] 图32显示了蛋白质传递应用。

[0084] 图33是示例性细胞类型的表，其中，有效载荷被成功传递。

[0085] 图34的图描述了一种系统，在此系统中，使用微流体装置处理父母血液，从而传递例如大分子的有效载荷。

[0086] 图35显示了使用10μιη-6μιη装置传递传递有效载荷的人胚胎干细胞的传递效率和存活率。

[0087] 图36显示了使用本发明主题内容直接传递融合再编码蛋白质之后鼠和人iPSC细胞系的产生和定性

[0088] 图37描述了初级蛋白再编码结果，并描述了iPSC克隆株中人胚胎干细胞标记物Oct4、SSEA-4、Tra-60、Tra-80、碱性磷酸酶(AP)的表达。

[0089] 图38描述了一种装置，通过光刻印刷技术在此装置的收缩部分两端整合入电极进行修饰，并且通过Au沉积向通道内引入局部电场，从而将细胞变形与电穿孔相结合。

[0090] 图39描述了微流体系统其他的实施方案，其中进入部分的收缩角度为90度。

[0091] 图40A和40B显示了图2A所描述的示例性实施方案中的装置和图39中所描述的示例性实施方案中的装置的存活率和传递功效的比较。

[0092] 图41显示了通过CD45的Alexa 488抗体测量的活化的T细胞的CD45表达。在CD45静止RNA存在的情况下使用装置处理细胞，会显示较低的荧光强度峰值，因此显示极低的CD45基因表达。

[0093] 图42显示了一些示例性的应用领域，例如再生性药物、免疫；成像和传感；和癌症疫苗和癌症研究。

[0094] 图43A和图43B是一种参照群落和一种细胞群落的流式细胞仪的强度直方图，所述参照群落接触与级联蓝共轭的3kDa的右旋糖苷，所述细胞群落受到30μιη-6μιη装置的处理然后与3kDa的右旋糖苷接触。

[0095] 图44是棒状图显示了在使用微流体系统和相关方法处理之后，人胚胎干细胞中GFP的降低。

具体实施方式

[0096] 本发明的实施方案提供了对细胞实施预先确定时间的受控制的变形，在细胞膜上造成扰动，从而将材料传递到细胞中的技术。所述变形可以通过如下方式产生，例如，机械压力或者剪切力造成的压力。在一个实施例中，微流体系统包括一种结构，这种结构能够通过小规模(例如，体积在毫升以下，例如微升、纳升或者皮升)的几何限制流体来控制和/或操作流体。所述微流体系统能够将任意有效载荷传递入细胞中。该系统由一个或者更多个供细胞通过的微流体通道组成，所述通道包括一种收缩部分。优选的，所述细胞通过悬浮在液态介质中的微流体通道，被压力驱使穿过系统。当细胞通过收缩部分时，细胞膜被扰动，造成细胞膜短时间的破坏并使周围介质中所含有的有效载荷被吸收。收缩部分是靶细胞尺寸的函数，但是优选的与细胞直径相同或者比细胞直径小。可以平行放置和/或串联放置多个收缩部分。扰动细胞指的是细胞的破坏，这种破坏允许细胞外的材料进入细胞(例如，洞、撕裂、空腔、细缝、孔、破裂、缝隙、穿孔)。通过这里所描述的方法产生的扰动(例如孔或者洞)不是由蛋白亚基组装形成多聚体孔结构(例如由补体或者细菌溶血素)而产生的。其他的实施方案也在本发明所描述的主题内容范围内。

[0097] 关于图1-3，微流体系统5包括定义了管状腔体的通道10。所述微流体管道10包括收缩部分15，该收缩部分被设置成每次只有单个靶细胞20可以通过。优选的，细胞20悬浮在溶液缓冲液25中通过通道10，所述缓冲液25中还含有传递材料30，但是传递材料也可以在细胞20通过收缩部分15之后被加入到溶液缓冲液25中。当细胞20达到并通过收缩部分15时，收缩部分15对细胞20施加压力(例如，机械压力)，压缩细胞20(例如，示作细胞20_1)。收

缩部分15向细胞施加的压力造成细胞膜(即,细胞20_2)扰动(例如,图4显示的洞)。一旦细胞通过收缩部分15,细胞20开始通过孔吸收溶液缓冲液25种的材料,包括传递材料30(即,细胞20_3)。细胞膜经过一段时间后恢复,优选的,至少一部分传递材料30被捕获在细胞内部。

[0098] 收缩部分15的构造可以定制从而控制细胞20的收缩,因此,控制向细胞20施加的力。

[0099] 优选的,收缩部分15包括入口部分35、中心点40和出口部分45。例如,收缩部分15的直径可以是变化的,从而调节对细胞施加的力(和所述力被施加/释放的速度),并且,收缩部分15的长度也是变化的从而调节对细胞施加力的时间。在某些结构中,不需要细胞的物理收缩,只是简单的将细胞与非常高的剪切速率和/或压缩速率相接触,就可以产生理想的扰动。通常这与微流体系统的外部直径无关,并且内直径和外直径的比率可以是变化的(例如,大于5)。

[0100] 中心点40的直径可以是细胞20直径的函数。优选的,中心点40与细胞20直径相同或者小于细胞20直径(例如,是细胞直径的20-99%)。优选的,中心点40的直径是细胞直径的60%-70%,但是,最佳的中心点直径可以根据应用和/或细胞类型变化。在之前的实验中,中心点40示例性的直径是5-6微米和7-8微米。中心点40的直径可以大于细胞20的直径,但是被设置成能够对细胞20产生压力脉冲(例如,剪切力).这种压力可以对细胞20实施并不使其接触通道10的壁。可以使用已知的方法测量剪切力(例如,Journal of Applied Physics 27,1097(1956);Murphey et al.)。

[0101] 入口部分35的收缩角度(例如,图2A所示)可以是变化的(例如,直径减少的速度)。优选的,所述收缩角度能够最小化细胞通过时系统5的阻塞。出口部分45的角度也可以是变化的。例如,出口部分45的角度被设计以减少非层流的湍流/涡流的可能性(例如,角度为1-80度)。入口部分35的壁和/或出口部分45的壁优选是直的,但是也可以是其他形状(例如所述墙壁是曲面的)。

[0102] 通道10、入口部分35、中心点40和出口部分45的横截面是可以变化的。例如,各种横截面可以是圆形的、椭圆形的、狭长的裂缝、正方形、六角形、三角形等等。中心点40的长度也可以变化,并可以调节来改变当细胞20通过收缩部分15时所受到的压力。在给定的流速下,较长的收缩部分15(例如,更长的中心点40)会对细胞20施加更长时间的压力。通道10、入口部分35、中心点40和出口部分45的宽度是可以变化的。例如,可以调节宽度来提供更紧的收缩并因此以与收缩宽度方面的变化相同的方式提高传递。装置设计时改变宽度和长度,并可以在制备装置时决定设备的宽度和长度,例如,通过光刻法中使用的铬掩模。在整个通道内宽度可以是均匀的,并且可以在制备时通过深反应性离子蚀刻步骤确定通道的宽度。所述宽度可以是,例如,15微米-20微米。如这里所使用的,装置尺寸由一系列表示长度、宽度的数字和收缩的数字(例如,30μm-60μm5表示装置的长度为30微米,宽度为5微米和5个收缩部分)组成。

[0103] 细胞20穿过通道10的速率也是可以变化的,从而控制传递材料30向细胞20的传递。例如,调节细胞20穿过通道10的速度可以改变对细胞施加压力的时间,并且可以改变对细胞施加压力的速度(例如,缓慢施加或者快速施加)。细胞20以至少0.1mm/s的速度穿过系统5,例如,以0.1mm/s-5m/s,优选以10mm/s到500mm/s的速度通过系统,当然,也可以其他速度通过。在一些实施方案中,细胞20以大于5m/s的速度通过。

[0104] 可以用不同的材料制备通道10，例如，硅、玻璃、陶瓷、晶体物质、非晶体物质和聚合物(例如，聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、PDMS、环烯烃共聚物(COC)等等)。优选的，制备过程是以干净的空间为基础的，并且可以使用，例如，干蚀刻、湿蚀刻、光刻印刷术、注塑成型、激光烧蚀、SU-8掩膜等等方法。一个示例性的通道10的长度大约是40-50微米，没有收缩的部分直径大约为50微米，收缩部分直径大约为4-8微米。优选的，通道10的长度足够短以避免堵塞。也可以使用其他尺寸。

[0105] 图39描述了本发明微流体的另一种实施方式。在次实施方案中，通道10包括预备入口部分50，该部分不收缩细胞20。延长的通道部分55为入口部分55提供了90度的收缩角度(即图2A中的α)。

[0106] 图40A和40B是两张图，显示了两种示例性实施方案存活率和传递效率方面的比较。标记4000指的是使用图2A所示的实施方案时的测量值，而4010指的是当使用图39所示的实施方案时的测量值。在相同的速度和操作压力下，图39所示的实施方案已经显示具有较高的传递效率和存活率。尽管具有与图2A条件相似的剪切速率、细胞速度和处于压力下的时间。

[0107] 一些参数会影响传递材料30传递到细胞20。例如，收缩部分15的尺寸、操作的流体速度(例如细胞通过收缩部分15的时间)、传递材料30在溶液缓冲液25中的浓度、和细胞20在收缩后进入溶液缓冲液25中恢复/培养的时间长度会影响传递材料30向细胞20中的传递。其他能够影响传递材料30向细胞20中的传递的参数包括细胞20在收缩部分15中的速度、收缩部分20的剪切率、垂直于流体速度的速度分量、细胞压缩速率和收缩时间。这些参数可以被设计从而控制传递材料30的传递。溶液缓冲液25的组合物(例如，盐浓度、血清浓度等等)也可以影响传递材料30的传递。当细胞20穿过收缩部分15时，由收缩部分15产生的变形/压力使细胞短时间内损伤造成材料穿过所述扰动部分形成被动扩撒。在一些实施方案中，细胞20只在很小的一段时间内发生形变，在100微秒级别，从而最小化激发细胞信号传导机制细胞凋亡途径的机会，当然其他时间也是可以的(例如，范围在纳秒至几小时)。最初的观察说明在细胞20通过收缩部分15之后几分钟的时间内传递材料30被细胞20所吸收。

[0108] 通过多种方法可以驱动细胞20穿过通道10。例如，在入口侧用泵施压(气体钢瓶或者压缩器)、在出口部分用真空泵抽真空、通过小管的毛细作用、和/或者系统5可以通过重力。还可以使用基于流体系统的位移(例如，注射泵、蠕动泵、手动移液器或者移液管、活塞等等)。通过单一通道10的示例性流体速率在1微升每秒的级别。另外，溶液缓冲液25可以包括一个或者一个以上的润滑剂(水或者其他表面活性剂)，从而减少或者消除通道10的堵塞并改善存活率。

[0109] 对系统5进行控制以保证传递材料30传递进入细胞群落的传递量是持续的。例如，系统5可以使用收缩后的对流传递机制，该机制能够使传递材料30撞击细胞20的渗透性细胞膜。通过控制二级流的流动速率，可以优选的控制向细胞中传递的传递材料30的量。另外，在细胞膜恢复期间控制传递材料30在溶液缓冲液25中的浓度也可以改善传递材料30向细胞群落中的传递。优选的，系统5完全在机械系统中操作，不使用电场和/或化学试剂，当然，也可是使用其他结构(例如，电传感器和/或光学传感器被用于测量细胞性质，例如，荧光性)。

[0110] 另外，优选的，系统5的传递不依赖于被传递的材料类型。例如，使用相同的系统可

以传递蛋白质、RNA和DNA而不需要进行任何修饰。

[0111] 在具有某些细胞20的结构中，细胞20在一种或者一种以上溶液中培养，目的是使传递材料被细胞所吸收。例如，在传递之前，细胞20可以在去聚合作用的溶液(例如，Lantrunculin A 0.1微克/毫升)中被培养1小时从而使肌动蛋白细胞骨架去聚合。作为一种额外的实施例，在传递前，细胞可以在10微摩的秋水仙碱(Sigma公司)中培养2小时，从而使微管网络结构去聚合化。传递DNA时，这种方法会帮助获得基因表达。

[0112] 关于图5，显示了系统5的平行结构的照片。系统5可以包括任意数量的平行通道。优选的，由于在系统5中加入了其他的平行通道，系统5的整体产量增加。图6显示了系统5的平行结构的照片，该系统在每个通道10的入口处包括过滤器。另外，图6还显示了收缩部分15的结构，所述收缩部分15包括具有多个台阶的入口部分35。关于图7，图7显示了另一种系统5的原型照片。如图7的显示，包括培养孔的原型尺寸大约为1英寸x1/4英寸x1/4英寸。系统5其他的结构还可以包括分选器、预处理/后处理模块，和/或传感器模块(例如，光学传感器、电学传感器和磁传感器)。

[0113] 如下面根据实施例中所更为详细的介绍，微流体系统和相关的方法具有广泛的应用。图42是一种示意图，描述了一些应用领域的实施例。例如，本发明的主题内容可以用于再生医学，从而使细胞能够重组和干细胞分化。本发明的主题内容可以用于免疫领域，例如通过向树突状细胞、单核细胞、T细胞、B细胞和其他淋巴细胞传递来实现抗原呈递和免疫活性的强化/抑制。进一步的，改善量子点、碳纳米管和抗体向靶细胞中的传递对成像和传感是有益的。另外，本发明的主题内容可以在癌症疫苗和研究中应用，例如，用于循环肿瘤细胞(CTC)Fenix和淋巴治疗。本方法还提供了一种鲁棒的平台，用于筛选能够治疗疾病或者控制细胞行为的活性siRNA和小分子化合物。

[0114] 这一概念已经被其原型成功的解释了，在其原型中，引入细胞20来吸收溶液缓冲液25中存在的细胞膜可渗透性染料(例如，分子量在3kDa到2MDa之间的荧光染料)、DNA、蛋白质、RNA、纳米管或者纳米颗粒。在处理后，细胞20能够恢复并增值，同时保留被传递的材料72小时。在此系统中试验了11种不同的细胞类型，包括图33中所列出的，因此说明了本系统对于不同的细胞型都可以表现出强有力的效果。图33是一种表，包括了本发明主题内容可以成功应用的细胞类型。使用单通道10测量的平均细胞通量大约为5000-20000细胞/秒，测量的平均传递效率为96％，并且测量的细胞存活率为95％。所有的实验都在室温条件下进行。但是，在某些技术中，温度可以是变化的。例如，所述方法可以在室温条件下(例如，20℃)进行，生理条件下(例如，39℃)进行，高于生理温度、或者降低的温度下(例如，4℃)进行，或者在这些例举的温度之间进行。在降低的温度下(即通过冷冻、冰浴或者其他已知的技术是温度基本上接近4℃)进行本发明的方法能够出乎意料的改善传递效率和细胞存活率。因此，可以调节温度来影响组合物的传递和细胞存活率。

[0115] 如图8a-b所示，提高细胞穿过收缩部分15的速度能够增加传递材料30的传递百分比和传递效率。据发现，传递效率随着细胞速度线性变化，并且存在一种依赖于剂量的反应。

[0116] 在图9中，在通过收缩部分15之后将细胞置于溶液缓冲液25中培养，培养时间会全面影响传递材料30向细胞20中传递的百分比。但是，据显示在培养一段时间之后(大约2-3分钟)，传递百分比基本上不再改变。根据这个数据可以相信细胞20通过收缩部分15之后造

成的细胞20上的扰动在细胞20通过收缩部分15之后大约5分钟的时间内被修正。另外，作为参考，对照组的相应时间是1分钟。

[0117] 如图10所示，据观察，细胞20多次通过收缩部分15会影响整体传递百分比，但是会对细胞20的整体存活率产生负影响。为了产生这个数据，使细胞通过收缩部分15、收集、然后在大约1分钟内再次通过装置一次。

[0118] 据观察，在细胞20被扰动的时间里(例如，在通过收缩部分15之后)，通过扰动可以提取细胞内的材料。因此，已经发现，当细胞20被扰动时，材料可以进出细胞20，。这个性质证明系统5可以被用作对细胞内材料取样的方法同时不会使细胞裂解。优选的，细胞膜的扰动会使大分子从细胞质中流出，因此可以用作细胞质组合物的探针。

[0119] 如图11所示，在绿色荧光蛋白质(GFP)静止siRNA(Ambion公司，美国)存在的情况下处理稳定表达绿色荧光蛋白质(GFP)的HeLa细胞，然后使用FACS(FACS Canto II，BD生物技术公司，美国)在48小时进行荧光分析.图11的结果显示与市售试剂(例如Lipofectamine 2000(Invitrogen公司，美国))的结果相比，基因表达降低了40％以上。图11还显示了阴性siRNA(Scrambled siRNA)参照物，如图所示，这个降低并不是由变形过程本身产生的。

[0120] 如图13-14所示，挤压尺寸会影响传递材料30的整体传递效率。例如，图13-14显示了当操作压力变化时(例如，通过改变收缩部分15的长度和/或宽度)，整体传递效率在某些程度上也发生改变(图14显示了不同条件下量子点(纳米颗粒)的传递)。而且，如图18a-18b所示，估计的细胞速度会影响传递材料30的整体存活率和整体传递效率。例如，图18a显示了随着操作速度的变化，整体传递速率在某些程度上发生变化。另外，图18b显示了随着操作速度的变化，细胞的存活率在某些程度上也发生变化。这些图显示收缩部分长度的变化会提高传递并最小程度的影响存活率。另外，与小分子相比，大分子在收缩之后以较低的速度进行细胞。这里所描述的细胞内传递方法是“通用的”，适用于多种不同类型的材料和细胞。进一步的，该装置产生的细胞膜破坏的一般尺寸至少为-100纳米，但是，其他尺寸的破坏也是可能的。

[0121] 如图12所示，在一个实施方案中，可以通过控制溶液缓冲液25和细胞质的浓度梯度来预计性的控制传递材料的量。可以使用局部传递方法，在局部传递方法中，在细胞20通过收缩制孔之后，将细胞20暴露于浓缩的大分子云。但是，这些局部传递方法应该考虑估计的扰动回复时间，从而确保适当的功能。在实施过程中可以向将高浓度有效载荷传递到细胞膜附近的通道里垂直加入“微管”(如图6A所示)。优选的，所述微管可以位于收缩部分15中和/或位于收缩部分15附近。这种方法通过对流提供扩散性的传递机制，因此能够获得更准确的细胞装载和更高的浓度。优选的，当细胞20处于收缩部分15的高浓度区域时发生所述注射。由于不需要在缓冲液中维持高浓度，这种局部化的技术能够更为有效的保存传递材料的有效性。

[0122] 关于图16a，可以使用一系列微型圆柱100对细胞20施加压力造成扰动。在此实施过程中，细胞20被迫使通过收缩的管阵列从而将压力实施到细胞20上。

[0123] 关于图16b，使用压缩板105对细胞20施加压力从而造成扰动。在此实施过程中，控制压缩板105以向细胞20施加预先确定时间的压力。设置压缩板105从而使一个或者两个板能够运动，对细胞20施加压力。还可以提供额外组的压缩板105以基本上包围细胞20.

[0124] 关于图16c，缓冲添加剂115(或者与细胞表面相连的大块材料)可以被用于刺激挤

压细胞20穿过收缩部分15，收缩部分15的直径大于细胞20的直径。例如，可以通过缓冲添加剂的干扰作用刺激收缩。缓冲添加剂115的实施例包括微米颗粒或者纳米颗粒(例如，聚合物基的、脂质基的、陶瓷基的、金属基的)。用细胞结合配位体(例如抗体、DNA序列、肽、或者小分子)标记这些颗粒，当然，这并不是必须的。

[0125] 关于图16d，使用磁珠120来压缩细胞20。例如，可以使用磁力和/或静电力向细胞20施加力，或者在图16e的情况下，来推动细胞20。优选的，对细胞20施加的力足够造成扰动。

[0126] 关于图16f，以能够对细胞20造成压力(或者快速短时间剪切力)的方式控制多个液体流125。例如，射出多个液体流从而使其相互接近或者相互撞击。由于细胞20穿过多个液体流125，可以对细胞施加力从而造成细胞20的细胞膜上的扰动。作为选择，细胞可以从狭窄的裂缝状的管中射出来加速传递。

[0127] 系统5可以是一种独立的系统，例如图7的显示，当然，也可以是其他结构。例如，系统5可以被植入病人体内进行局部细胞内传递，和/或在一种机器中被体外整合，用于在将细胞放回病人体内之前对细胞进行处理。

[0128] 为了实现这里描述的传递优势，所述系统的微流体性质使本领域技术人员能够通过练习精确控制不同的传递条件、预处理过程和随后的细胞定性。例如，所述系统可以被荧光活化的细胞分选器(FACS)串联应用。这可以实现在一个相同的系统中对细胞进行实时传递和分选。还可以使用多种预处理和分选后试验技术，从而开发持续的、高通量试验用于药物筛选和诊断。

[0129] 通过将靶细胞参照群落与有效载荷以及被微流体系统处理的群落相接触，从而确定有效载荷向靶细胞的传递效率。在相同的传递溶液中，在相同的浓度下处理参照样品以及被装置处理的细胞，并使其维持至少相同的时间。为了补偿表面结合、内吞作用以及其他作用例如自体荧光性，定义传递区域从而最多1-5％的活参照细胞落入此区域。因此，样品的传递效率对应于位于此传递区域内活细胞的百分比。例如，图43A是一种参照群落的流式细胞仪的强度直方图，所述参照群落接触与级联蓝共轭的3kDa的右旋糖苷，图43B是细胞群落的流式细胞仪的强度直方图，所述细胞群落受到30μιη-6μιη装置的处理然后与3kDa的右旋糖苷接触。图43A和43B中未涂阴影的区域是上述定义的传递区域。

[0130] 在操作中，关于图17，进一步的参考图1-3，用于实施细胞内传递系统5的工艺过程1000包括如图所示的各个步骤。但是，工艺过程1000只是示例性的，不是限制性的。可以通过例如添加、删除、改变或者重排各个步骤的方法改变工艺过程1000。

[0131] 在步骤1005，将细胞20单独与传递材料悬浮在溶液缓冲液25中。通常，细胞浓度在10^4到10^9细胞/毫升的范围内。传递材料的浓度在10毫克/毫升至0.1微克/毫升的范围内。

[0132] 在使用理想的设置进行传递之前或者传递完成后马上将传递材料加入细胞缓冲液中，所述理想的设置使损伤/孔在1-5分钟内保持开放。溶液缓冲液由许多盐类、糖类、生长因子、动物衍生物或者其他适合细胞增殖、维持细胞健康或者诱导细胞信号传导途径的成分所组成。其他的材料也可以加入溶液缓冲液25中。例如，可以向溶液缓冲液25中加入表面活性剂(即，共聚物)和/或大块材料。

[0133] 在步骤1010，包括细胞20和传递材料30的溶液缓冲液25通过系统5的通道10。所述溶液缓冲液25通过重力作用穿过通道10，或者可以被其他方法所辅助。例如，可以再通道10

的入口侧对溶液缓冲液25施加压力(例如,使用气瓶和/或压缩器),和/或在通道10的出口侧使用真空泵施加真空。另外,还可以使用基于位移的流体系统。

[0134] 随着单个细胞通过收缩部分15,收缩部分15的固体结构暂时性的对细胞20施加力,造成细胞20细胞膜的扰动,例如产生孔,从而将传递材料30传递到细胞20的内部。可以通过调节收缩部分15的尺寸、细胞20穿过收缩部分15的速度、和/对通过调整收缩部分15的形状来改变对细胞20实施压力的量和时间。在一个结构中,大约5,000-20,000个细胞/秒穿过收缩部分15,并且每个细胞被收缩大约100微秒。

[0135] 系统5可以包括一个或者更多个通道10。例如,系统5包括50-100个通道10,这些通道10平行排列。使用平行排列的结构可以减少一个或者更多个通道10中发生堵塞的情况,并且增加系统5的总通量。另外,系统5还包括一种或者一种以上的相互串联的通道。

[0136] 在步骤1015,当细胞20通过收缩部分15之后,通过将细胞静置在溶液缓冲液25中培养/恢复细胞。在此过程中,细胞20会通过细胞膜上出现的扰动来吸收一些溶液缓冲液25中存在的传递材料30。这种吸收的一个机理是基于扩散的,由于大分子的吸收速率比小分子的吸收速率要慢。优选的,细胞20在溶液缓冲液25中培养/恢复大约2-5分钟,当然,也可以是其他时间。在此时间内,细胞20在溶液缓冲液25中培养/恢复,细胞20内的材料也可能从细胞内释放到溶液缓冲液25中。在培养/恢复期间,可以控制某些条件以确保传递材料30的传递量持续穿过细胞群落。例如,收缩后可以使用对流传递机制将传递材料撞击进入正在培养中/恢复中的细胞。

[0137] 选择性的,在步骤1020中,细胞经过培养/恢复之后,洗涤细胞从而除去溶液缓冲液。优选的,在经过一段时间使之前发生的扰乱恢复之后进行洗涤,当然,洗涤液可以在其他时间进行从而控制被细胞吸收的传递材料30的量。

[0138] 实施例1-功能性工程纳米颗粒的传递

[0139] 工程纳米颗粒具有很大的潜力能够作为活细胞成像工具、治疗剂分子传递试剂或者甚至作为通过使用外部手段(例如光场或者磁场)操控活细胞的方法(Howarth,M.,et al.Monovalent,reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells(用作活细胞成像受体的单价小尺寸量子点).Nature Methods 5,397-399(2008))。但是,许多这些潜在应用需要将纳米材料传递到细胞的细胞质中。大多数纳米颗粒,例如QDs,需要被聚合物钝化使纳米颗粒能够溶解在水性媒介物中,这常常会妨碍纳米颗粒被动扩散穿过细胞膜。

[0140] 由于缺少专业仪器以及低通量,同时电穿孔使QD在细胞内沉积,所以纳米颗粒的微注射被认为是不可实现的。因此,目前大多数尝试将量子点传递入细胞质的方法都依赖于细胞对量子点的内吞作用并且不被内含体吞噬。在本发明主题之前,不可能以满意的方式、成规模的方式将量子点传递到细胞质中。本发明的系统为之前方法所存在的传递问题提供了解决方案。

[0141] 所述微流体系统可以与新近报道的新一代生物相容性QDs相结合((Liu,W.,et al.Compact biocompatible quantum dots via RAFT-mediated synthesis of imidazole-based random copolymer ligand(通过RAFT-介导的咪唑基随机共聚物配体压缩生物相容性量子点).JACS 132,472-483(2010))。在实施例1中使用的量子点涂布有聚咪唑配位体,该配位体由多重金属螯合的咪唑基团和多重水溶解性钝化的聚(乙烯基)乙二醇

(PEG)组成。

[0142] 为了向细胞质传递量子点,将细胞分装在含有量子点的PBS缓冲液中。用移液管将细胞-量子点溶液移入微流体装置,然后在持续的压力下使溶液穿过通道,随后进行5分钟的培养时间。在培养时间结束后,离心分离过量的量子点。对于参照群落,将细胞-量子点溶液防止在微流体系统中,然后使细胞暴露于量子点溶液足够长的时间从而允许细胞质内传递方法实施。

[0143] 图19是传输和共聚荧光图像的叠加,随后是使用本发明主题内容完成的经过传递量子点处理的细胞的z切面共聚荧光图像。图19显示(上图)刚刚处理(即,传递)完成之后和(下图)在37℃和5%的二氧化碳中培养48小时后。扩散染色方式被限制在细胞质中,并且纳米颗粒显示不会进入细胞核(细胞内黑色区域)。标尺是10微米。图19显示了用量子点涂布的、特定的不含有聚咪唑基的配位体的照片,这种配位体除去通过聚乙二醇基团提供生物相容性之外没有其他功能。共聚荧光照片显示了在流过微流体装置被分离的圆形HeLa细胞在细胞不同的z切面具有扩散性的细胞质QD染色(图19,上图)。在37℃和5%的二氧化碳中培养细胞并吸附48小时之后所述扩散性染色依然存在(图19,下图)。在48小时,扩散性量子点荧光变暗淡,可能是由于细胞分解(图19)。量子点(水力直径-13纳米)以-10,000细胞/秒的通量被传递到-40%活细胞群中。图20A显示了使用本发明主题内容将涂布有PIL的量子点传递到HeLa细胞的细胞质中的传递效率。通过流式细胞剂测定的细胞存活率大于80%。图20B显示了使用本发明主题名称将平QD535传递到HeLa细胞后的存活率,这是使用碘化丙啶染色并使用流式细胞仪测定的。使用流式细胞仪、对共聚图片的扩散染色测定被处理的细胞的存活率,细胞吸附的能力与量子点向活细胞的细胞质中的传递相一致。

[0144] 为了确定这些荧光确实是由被传递到细胞质中的量子点产生的而不是由被内含体捕获的量子点产生的,将纳米颗粒设计为其发射曲线随着其与细胞质的还原环境之间的相互作用而变化。细胞质中还原电势为-260到-220mV,并且最初是通过维持三肽谷胱甘肽的高浓度(5-10mM)来产生的。

[0145] 因此,通过测定QD-染料构建物的荧光强度来确定被传递的纳米颗粒的位置和化学可进入性,其中,当与细胞质环境相接触时,所述构建物的发射曲线发生变化。QD-染料被构建,从而包含发绿光的QD(透射率=541纳米),该QD作为能量供体提供碳氧-X-若丹明(Rox)染色(透射率=610纳米),通过还原性二硫键共轭。

[0146] 图21显示了在不同介质中构建物的设计、吸光度和稳定性。2100是与染料共轭前和涂布QD前PIL的示意图(左图),以及所得的量子点-二硫键-碳氧-X-若丹明(Rox)构建物的示意图(右图)(图片没有成比例显示)。2110是量子点-二硫键-碳氧-X-若丹明(Rox)构建物的吸收光谱。在实验过程中,488纳米和405纳米下的激发会产生独有的光吸收。2120是在37℃下和5%的二氧化碳条件下全培养基中QD向碳氧-X-若丹明(Rox)传递的构建物荧光能量的稳定性,说明在胞外环境下二硫键没有裂解。图2130显示了细胞内还原性谷胱甘肽造成的二硫键裂解,如QD荧光性的恢复所示。2140显示了通过使用非硫醇基还原性三(2-羧乙基)膦处理后产生的量子点荧光性的恢复,进一步证实了二硫键的裂解。

[0147] 整合入PIL的硫醇基与硫醇化的碳氧-X-若丹明(Rox)形成二硫键。当平均每量子点有13个碳氧-X-若丹明(Rox)时,纯化的构建物的吸光广谱具有量子点和碳氧-X-若丹明(Rox)(2120)的吸光特征,有效的退火QD荧光性(2130)。在细胞质中,该构建物可以作为一

种特定还原环境不可逆的传感器。当在488纳米(显微镜)或者405纳米(流式细胞计)下用激光选择性的刺激量子点同时维持二硫键的完整,所述构建物经历荧光性共振能量传递(FRET),从而碳氧-X-若丹明(Rox)发射红色光。在溶液实验中,细胞还原性谷胱甘肽裂解二硫键,释放碳氧-X-若丹明(Rox)染料并且恢复量子点的荧光性(2140)。非硫醇基还原性三(2-羧乙基)膦还可以恢复量子点的荧光性,这说明碳氧-X-若丹明(Rox)从量子点表面的释放不是由谷胱甘肽产生的PIL位移造成的。由于PIL上长聚乙二醇产生的空间位阻,一些二硫键被阻碍,并且由于染料和量子点表面之间会产生非常少量的非特异性相互作用,因此碳氧-X-若丹明(Rox)荧光性可能不会完全消失。

[0148] 通过流式细胞计和共焦显微镜测定的构建物荧光曲线的变化证实量子点-二硫化物-碳氧-X-若丹明(Rox)构建物传递到细胞质中。当暴露于还原性细胞质环境中时,二硫键的裂解破坏量子点向染料的荧光性共振能量传递(FRET)过程。因此,随着独有的量子点激发,量子点通道的荧光性随着时间增加而碳氧-X-若丹明(Rox)通道的荧光性随着时间减少。在含有高浓度的量子点-二硫化物-碳氧-X-若丹明(Rox)的溶液中用微流体装置处理活HeLa细胞,培养5分钟,然后在加入细胞培养基(即被处理的细胞)之前洗涤除去过量的量子点。不用微流体装置处理参照细胞,而是与量子点-二硫化物-碳氧-X-若丹明(Rox)一起培养参照细胞5分钟,然后在加入细胞培养基之前进行洗涤。使用共焦显微镜和流式细胞计观察被处理的细胞和参照细胞的碳氧-X-若丹明(Rox)和量子点通道荧光性。

[0149] 图22A和图22B显示了活细胞共焦显微照片和显示细胞质染色的荧光强度分析和量子点表面的化学可进入性。图22A显示了被处理的细胞(上图)和参照细胞(下图)的图像。只有被处理的细胞显示出扩散性绿荧光表象。标尺为10微米。图22b显示了绿通道和红通道中强度作为时间函数的变化。由于在每个时间点n<20,通过校准0小时时间点来纠正总平均荧光性的波动。

[0150] 在共焦显微镜下,扩散的荧光性穿过被处理细胞的细胞质从强烈的红色转变为强烈的绿色(如图22A所示)。参照细胞图像显示细胞膜外有一些非特异性结合,如环装荧光所示,并且绿色通道的信号没有增加。该作用与细胞质二硫键可预期的降解相一致,所述降解会减少荧光性共振能量传递(FRET)作用。在图22B中,所述线状图显示了,在被传递的荧光物质中,通过校准总荧光性修正细胞与细胞之间的差异后,被处理的细胞和参照细胞和自体荧光性细胞的每个细胞中平均量子点和碳氧-X-若丹明(Rox)通道强度。对于被处理的细胞,图像显示了培养2-4小时内的图像,其中量子点的荧光性上升超过碳氧-X-若丹明(Rox)的荧光性。有趣的是,9小时后被处理的细胞碳氧-X-若丹明(Rox)信号稳定维持于自体荧光水平之上。这与溶液实验结果相一致,其中,一些荧光性共振能量传递(FRET)在减少后残留。所观察到的对比着色和量子点信号的增加以及碳氧-X-若丹明(Rox)信号的减少有力的证实了细胞质传递和随后的二硫键裂解。通过对碳氧-X-若丹明(Rox)进行荧光性共振能量传递(FRET)淬火参照细胞中的量子点荧光性,其表象无法与自身荧光相区分。在较早的时间点所述参照细胞显示一些碳氧-X-若丹明(Rox)荧光性超过其自身荧光性,然后稳定的下降。这回在量子点-S-S-碳氧-X-若丹明(Rox)和细胞表面产生非特异性的相互作用,随后将所述构建物再溶解于所述培养基中。

[0151] 图23显示了流式细胞仪测定的平均细胞荧光强度和存活率。2300是每个细胞的QD平均荧光强度(左图)和碳氧-X-若丹明(Rox)的平均荧光强度(右图),说明只有在被处理的

细胞中QD荧光强度增加。在24小时时间点，被处理细胞核参照细胞的碳氧-X-若丹明(Rox)荧光强度处于自体荧光水平。2310是一种直方图，在QD通道(左图)和碳氧-X-若丹明(Rox)通道(右图)显示了被处理的细胞和参照细胞在选定的时间点荧光强度的分布。据估计，细胞群的至少35％发生量子点传递。灰色区域用于指导眼睛在荧光强度直方图峰上运动。2320显示了使用碘化丙啶测量的参照细胞和被处理细胞的存活率。

[0152] 如图23所示的流式细胞仪测定方法证实量子点-二硫化物-碳氧-X-若丹明(Rox)构建物可以与细胞质环境发生相互作用。记录所有活细胞的流式细胞仪测量结果，包括被传递的细胞(-35％的被处理细胞群)和未被传递的细胞。2100显示了被处理细胞和参照细胞的平均荧光强度。最开始，被处理细胞的QD荧光性上升，在大约9小时时出现峰值，然后逐步下降，这与参照细胞的QD荧光相反，参照细胞的QD荧光维持在自体荧光水平。这与被处理的细胞内部QD和染料之间二硫键桥联的细胞质内还原相一致，随后通过细胞分裂稀释荧光构建物。被处理细胞和参照细胞的碳氧-X-若丹明(Rox)荧光强度刚开始比较高，然后在最初的2小时内开始下降。这种下降造成颗粒(该颗粒在培养过程中结合在细胞表面)再溶解于培养基中。由于被处理的细胞群中也存在未传递细胞，因此被处理细胞群的平均碳氧-X-若丹明(Rox)荧光强度与参照细胞群的荧光强度相似。在被处理的细胞群中存在的被传递细胞和未被传递的细胞可以被2310中显示的量子点和碳氧-X-若丹明(Rox)强度的直方图区分。随着时间的增加，被处理细胞的荧光直方图变成双峰，但是参照细胞的直方图还是单峰。被处理细胞群亚组的QD荧光强度随着时间上升，这进一步说明被处理和被传递的细胞中FRET过程的破坏。由于结合细胞膜构建物被重新溶解在培养基中，碳氧-X-若丹明(Rox)荧光全面下降，但是被处理细胞群亚组还维持碳氧-X-若丹明(Rox)荧光性。这与共聚显微照片中观察到的QD-S-S-Rox键的不完全还原相一致。在所有时间点，使用碘化丙啶染色进行测定，被处理的细胞群的存活率在参照细胞存活率的10％之间(2130)。相对于参照组，细胞存活率>90％，这与作为替换的方法，例如电穿孔和基于聚合物的方法相比更受欢迎，作为替换的方法在处理后的存活率低至40-60％。

[0153] 图24显示了在使用本发明装置处理10nM量子点溶液之后，细胞的细胞质中未聚集的单个量子点的落射荧光图(上图)，以及自体荧光性的三个量子点(被标记为2400、2410和2420)的闪烁轨迹。由于长时间的采集(500ms)，QD闪烁轨迹是非二元的。标尺为10微米。

[0154] 量子点传递平台通过传递未聚集的量子点-二硫化物-碳氧-X-若丹明(Rox)构建物实现单个细胞成像，所观察到的发射间歇性与单个量子点一致。在此实验中，量子点-二硫化物-碳氧-X-若丹明(Rox)构建物被传递到细胞质中，随后进行10小时的培养并在落射荧光显微镜中成像。10小时的培养时间确保来自细胞质内部的量子点的荧光通过二硫键的还原被恢复；落射荧光显微镜用于确保足够的光子被收集。当细胞在低量子点浓度下(图24)被这里所描述的主题内容处理时可以观察到一些闪烁的量子点。2400、2410和2420显示了闪烁量子点在细胞质中的强度轨迹，由于长时间的采集(500ms)，量子点闪烁轨迹是非二元的。在采集时间内(大约1分钟)，转化细胞的运动微乎其微。这些数据说明使用本发明主题内容将量子点作为荧光标记传递后可以观察到细胞质内的单个细胞的情况。

[0155] 实施例1显示了使用本发明主题内容的实施方案将纳米颗粒传递到细胞质中。通过观察量子点-二硫化物-碳氧-X-若丹明(Rox)被细胞内还原剂裂解，显示纳米颗粒表面与细胞质成分相互作用。

[0156] 本发明主题内容的实施方案确保量子点高通量传递到细胞质中同时不产生细胞穿透或者内体逃逸的配位体，并维持细胞存活率和量子点完整性。传递效率为35％，这一效率可以进一步通过增加微流体收缩部分的数量、改变收缩部分尺寸、或者增加处理循环数而增加。与大多数现有的细胞穿透肽或者正电荷辅助传递方法不同，本发明主题内容不需要将细胞内传递处理方法和细胞质蛋白靶向处理方法相结合对相同的纳米颗粒实施。

[0157] 通过分配前述需要，可以实现交叉反应性关系的缓解、结合方案不平等的反应效率和共轭化学计量学。因此，量子点构建物的设计具有重要的灵活性，为细胞内蛋白标记和跟踪铺平道路。该方法可以有效用于传递许多复杂设计的荧光纳米材料，所述荧光纳米材料通过已被证实的蛋白质靶向方案(例如，但是不局限于链霉亲和素-生物素、卤代标记-氯代烷和分选酶标记)靶向细胞内蛋白质和细胞器。

[0158] 在实施例1中，所有化学品都来自于Sigma Aldrich公司并且除非另有说明，已收到时的形式被使用。在干燥的氮气条件下，在氧水平少于0.2ppm时用Omni-Lab VAC手套箱处理空气敏感材料。所有的溶剂都是光谱性的或者是试剂。使用手持紫外线灯和KMn04在TCL中成像含有芳香族环的化合物。使用茚三酮染色在TCL中成像含有氨基的化合物。在Teledyne Isco Combi Flash Companion进行快速柱状色谱。从ATCC购买HeLa细胞，然后除非另有明确说明，从Mediatech购买所有细胞培养基材料。

[0159] 在实施例1中，^{1}H NMR谱图被记录在Bruker DRX 401 NMR谱仪上。在Bruker Daltonics APEXIV 4.7 FT-ICR-MS上进行MS-ESI。使用HP 8453二极管阵列分光光度计记录紫外-可见光吸收光谱。使用BioTek Synergy 4微板阅读器记录光致发光光谱和吸收光谱。使用Agilent1100系列HPLC/GPC系统在DMF溶液中确定聚合物分子量，使用三个串联的PL胶柱(103、104、105A)和窄聚乙烯标准品。在Varian ProStar Prep HPLC系统中纯化染料衍生物。用GE Healthcare公司的装载有SephadexTM G-25M的PD-10柱纯化修饰的聚合物。离心纯化配位体交换的量子点然后用Millipore Amicon Ultra 30K切断离心过滤膜透析，然后在装配有自组装Superdex200 10/100玻璃柱的AKTAprime Plus色谱系统(Amersham Biosciences公司)上进行GFC。在LSR Fortessa(BD Biosciences公司)上进行流式细胞仪测定。

[0160] 在实施例1中，CdSe核具有478纳米的第一吸收峰，使用之前报道的方法(1)合成这种CdSe核。总的来说，将0.4微摩(54.1毫克)的CdO、0.8毫摩(0.2232克)TDPA、9.6毫摩(3,72)TOPO放置在25毫升圆底烧瓶中。在160℃下对溶液脱气1小时，然后在氩气下加热到300℃直到CdO溶解，并且形成干净的均相溶液。随后，在160℃下将上述溶液放置到真空中，除去演化产生的水。在氩气条件下将溶液重新加热到360℃然后快速加入TOP-Se溶液(在1.5毫升的TOP中含有1.5毫升的1.5M TOP-Se)直到产生第一吸收峰为478纳米的CdSe核。

[0161] 通过之前报道的方法(2)的修饰方法将CdS壳沉积在CdSe核上。通过反复用丙酮从己烷中沉淀来分离核，然后在油胺(3毫升)和十八碳烯(6毫升)混合物溶剂中升温至180℃。然后以4毫升/小时的速度持续的引入Cd和S前体溶液。Cd前体由在十八碳烯(1.5毫升)和TOP(3毫升)的溶剂混合物中0.33毫摩油酸Cd和0.66毫摩油胺组成。S前体由在6毫升TOP中的0.3毫摩尔的六甲基二矽硫醚[(TMS)2S]组成。总共加入3个单层，每个Cd和S产生一种量子点，所述量子点在541纳米有发射，并且当在辛烷中稀释的时候量子点产量为60％。使用文献(3)中记载的CdSe核的消光系数计算CdSe(CdS)的消光系数并假定在涂布步骤有95％

的CdSe核被保留。

[0162] 在实施例1中，使用光刻印刷术和深度反应性离子蚀刻技术制备硅芯片。清洁(用H_2O_2和H_2SO_4)所得蚀刻的硅晶片除去残渣，氧化产生玻璃表面并在切成单独包装的装置之前结合高硼硅晶片。然后在使用前分别检查每个装置的缺陷。

[0163] 实施例2-大分子的传递

[0164] 大分子的细胞内传递是治疗应用和研究应用的关键步骤。纳米颗粒调节的DNA和RNA传递可以有效用于例如基因治疗，而蛋白传递可用于在临床和实验室中影响细胞功能。其他材料，例如小分子、量子点或者金纳米颗粒可以被传递到细胞液中，其用途可包括癌症治疗、细胞内标记和单细胞追踪。

[0165] 为了说明该技术的多功能性，模型右旋糖酐分子被传递到一些细胞型中：DC2.4树突状细胞，新生人包皮成纤维细胞(NuFF)和小鼠胚胎干细胞(mESC)，获得的传递效率分别高达55％、65％和30％。最初的实现还显示在初级淋巴细胞、巨噬细胞和来自小鼠的树突状细胞中实现了成功的传递。此外，本技术不会产生过度的细胞毒性或者也不会诱导干细胞分化作用。的确，甚至在最高的实验速度下所有的细胞型具有超过60％的存活率。对于上述细胞型应预先设计最优装置和操作条件。

[0166] 图25显示了实验结果，证实传递情况取决于细胞速度和收缩部分涉及。收缩部分尺寸由数字表示(例如，10微米-6微米*5)，其中第一个数字表示收缩部分长度，第二个数字表示收缩部分宽度，第三个数字(如果存在的话)表示每个通路中串联的收缩部分数目。在2500显示了传递效率，在2510显示了处理后18小时的细胞存活率(使用流式细胞仪测定)，该存活率被表示为细胞速度(40微米-6微米(o)、20微米-6微米(□)和10微米-6微米(Δ)装置设计)的函数。在用30微米-6微米装置中，初始人成纤维细胞(□)、DC2.4树突状细胞(o)和小鼠胚胎干细胞(mESC)(Δ)的2520传递效率和2530细胞存活率(通过流式细胞仪测定)被证明是速度的函数。在传递后18小时分析人成纤维细胞和树突状细胞。在传递完成后1小时分析小鼠胚胎干细胞(mESC)。所有的数据点进行三次，误差线代表两个标准偏差。

[0167] 图26显示了在共焦显微镜下测定的，在传递由太平洋蓝共轭的3kDa右旋糖酐之后，HeLas细胞不同水平面的扫描2600。扫描从上向下进行，然后从左到右进行，其中，左上方ζ＝6.98微米，右下方的ζ＝-6.7微米。标尺为6微米。在2610显示了10微米-6微米(□)、20微米-6微米(o)、30微米-6微米(Δ)和40微米-6微米(0)装置的活细胞传递效率。时间轴表示从在于目标传递溶液相接触之前，开始对细胞进行处理时经过的时间。所有的结果都是在处理后18小时通过流式细胞仪来测定的。在2620，使用未处理的细胞相对于参照细胞的自体荧光性校准被传递的细胞群体的平均强度。在连续的处理循环中，向细胞中传递荧光素共轭的70kDa右旋糖酐(水平线)和太平洋蓝共轭3kDa右旋糖酐(对角线)(循环1和循环3)并从细胞中除去(循环2)。参照表示只与传递溶液相接触但是没有被本装置处理的细胞。所有的数据点进行三次，误差线代表两个标准偏差。

[0168] 之前描述的基于纳米颗粒和细胞穿透肽(CPP)的传递技术揭示了细胞内途径，所显示的证据排除了内吞作用对本发明主题内容传递机制的影响。在2600，图26显示了使用太平洋蓝共轭的3KDa右旋糖苷处理的细胞的共聚显微照片，其扩散性的细胞质染色与内吞作用方法所预计的点状特点相反。另外，当传递实验在4℃下进行时，该温度会使内吞作用最小化，而对于所实验的两个有效载荷(3KDa和70KDa的右旋糖苷)来讲，传递效率受温度影

响很小。这些数据显示，内吞作用不可能对本系统的传递承担责任。

[0169] 确定传递动力学随时间变化的特征。在不存在传递材料的情况下使用本发明主题内容传递材料，随后在处理后预定的时间间隔将细胞暴露于太平洋蓝标记的3KDa右旋糖苷中。在此方法中，由于细胞通过收缩部分造成其细胞膜的破坏，但是在我们将其暴露于被标记的右旋糖苷之前，没有发生可检测到的传递。因此，在每个时间点的传递效率会影响处理后细胞维持多孔性时间长度的百分比。本发明捕获孔形成/关闭动力学。所述结果显示，无论装置是如何设计的，几乎90％的传递发生在处理后第1分钟(2610)。所观察到的时间尺度证实孔形成假设，随着对细胞膜作用的修复，动力学报道了在造成损伤后大约30秒发生细胞膜修复。相反，内吞作用推荐的时间尺度，例如纳米颗粒和CPP介导的传递机制大约是以小时为单位的。

[0170] 由于材料通过细胞膜上孔的传递时扩散性的，在整个孔存在的时间内，材料可以被传递进入细胞或者传递出来。

[0171] 另一方面，内吞作用或者收缩机制必须是单向的，即，仅促使材料被传递进入细胞中。为了说明材料向细胞膜中的双向传递，进行包括3个传递循环的实验。在第一个循环中，在3kDa右旋糖酐和70kDa右旋糖苷存在的情况下处理细胞，在右旋糖苷溶液中培养5分钟，然后用磷酸缓冲液洗涤2次。留下三分之一的样品，随后待用。在第二循环中，用装置再次处理留下的洗涤细胞，但是这次不含有任何传递材料，并继续培养5分钟。将该样品的一半留出待用。在第三循环中，用装置处理第二循环留出的细胞，处理条件与第一循环的处理条件相同(即，在右旋糖苷存在的情况下)，培养5分钟然后用磷酸缓冲液洗涤2次。在试验完成后，用流式细胞仪对细胞进行18小时的分析。校准的荧光强度的变化说明右旋糖酐在第一循环网状扩散入细胞，在第二循环从细胞中出来，在第三循环中再次进入细胞(2620)。这些结果与扩散传递机制相一致。

[0172] 图27显示了一种简单的，2D扩散模型，该模型是COMSOL Multiphysics软件包开发的，显示了材料通过被动扩散进入成孔的细胞膜中。COMSOL Multiphysics是COMSOL公司开发的一种有限元分析求解器和仿真软件/FEA软件包，适用于多种物理和设计应用，尤其是耦合现象或者多物理场。在2700，材料的传递/损失被表示为细胞膜扩散性的函数。当成孔时，所感兴趣的材料处于缓冲液中(□)或者处于细胞中(o)时，模拟结果说明材料向细胞中的传递/损失百分比是细胞膜扩散性的函数。在2710代表了模拟系统的图像和当材料从缓冲液传递到细胞中去时，通过细胞膜的浓度梯度图像

[0173] 利用颗粒扩散进入细胞质和从细胞质中出来的文学价值，图26的实验数据/结果定性地再现作为物质传递唯一方式的扩散作用。而且，通过将实验数据与此模型相拟合，该技术将缓冲液中10-40％的传递材料传递到细胞质中。通过比较，用于传递蛋白质的CPP方法据估计只能向细胞中传递0.1％的缓冲液材料。

[0174] 颗粒尺寸(或者流体力学半径)影响其扩散性及其进入细胞膜上具有特定孔径的孔的能力。因此，这一参数会影响孔形成/扩散机制中的传递效率。在一系列实验中，实验有效载荷是3kDa、10kDa、70kDa、500kDa和2MDa的右旋糖苷与荧光素或者太平洋蓝共轭，传递这些有效载荷，另外，据估计其分子量为3.1MDa的荧光素标记的质粒也被传递。根据其分子量相似性选择模型分子作为所关心的传递材料。例如，3kDa-10kDa的右旋糖苷与一些短肽或者siRNA具有相似的尺寸，而70kDa-2MDa范围内的模拟大多数蛋白质和一些小纳米颗粒

的尺寸。

[0175] 图28显示了材料双重传递的结果。在2800显示了，对于使用太平洋蓝共轭的3KDa右旋糖苷(□)处理的、使用荧光素共轭的70kDa右旋糖苷(o)处理的和2MDa右旋糖苷处理的HeLa细胞来讲，活细胞传递效率是速度的函数。使用10微米-6微米×5芯片来进行本实验。所有的数据点进行三次，误差线代表两个标准偏差。2810和2820显示了未处理的(红色)、以700mm/s的速度处理的(绿色)和以500mm/s的速度处理的(橙色)以及以300mm/s的速度处理的(亮蓝色)、或者仅仅暴露于传递材料(参照，深蓝色)的HeLa细胞的流式细胞仪数据重叠的直方图。所述传递材料由太平洋蓝共轭的3KDa右旋糖苷(2810)和荧光素共轭的70KDa右旋糖苷(2820)组成。

[0176] 实验显示，大于70kDa的分子与30kDa右旋糖苷具有具有不同的传递曲线(2800)。所述装置产生双向传递，其中10微米-6微米×5的装置在500mm/s下运行，例如，能够确保90％的活细胞收到3kDa的分子，而大约50％的细胞收到大于70kDa和2MDa的分子。

[0177] 对应这些流式细胞仪数据的直方图显示3kDa的右旋糖苷传递产生2个不同的峰(2810)。在第一亚群中，通过相对于参照物(对于参照物，考虑0mm/s数据点时之前描述的内吞作用和表面结合性)产生的峰位移造成平均荧光强度增加2-6倍，显示出细胞温和的传递水平。在第二群众，与参照相比，细胞的平均荧光强度增加20-100倍，显示了增加的传递水平。该作用显示后一亚群比前一亚群的成孔情况更严重，因此能够使材料的流通增加大约10倍。事实上，由300mm/s、500mm/s和700mm/s的曲线所示，通过增加操作速率增加处理的严重性，貌似能够增加具有提高的传递能力的细胞百分比。对于较大的70kDa的右旋糖苷分子可以观察到相似的特点(2820)。但是由于较低的颗粒扩散性和可能的尺寸排除作用会降低整体传递量，这一作用不是那么明显。与3kDa情况所观察到的2-6倍增加相比，温和传递的细胞群(第一峰)的平均荧光强度只增加1.5-2倍。这一作用应被认为是2800传递数据中的差异，这是由于在大分子情况下，根据这里的传递定义，温和传递细胞群难以与参照群相区别。因此，对于较大的分子，例如70kDa和2MDa右旋糖苷，技术人员主要测定第二个传递明显被提高的细胞群。

[0178] 为了确定被快速机械变形作用传递到细胞质中的材料是有活性的并且在细胞的细胞质中具有生物可利用性，进行了一系列实验向能够表达去稳定性的GFP中传递待检测的有效载荷GFP静止siRNA(Ambion，美国)。在处理后18小时观察到剂量依赖型和序列特异性GFP抑制(高达80％)。作为细胞速度和装置设计的反应，基因抑制与右旋糖苷传递实验相一致，因此较高的速度和多个收缩部分设计会产生更大的基因抑制。在这些实验中，使用Lipofectamine 2000作为阳性参照。在进行这些实验之前，未对装置设计和操作参数进行siRNA传递最优化。

[0179] 图29显示了siRNA、蛋白质和纳米颗粒传递的数据。在2900中，在5微摩的传递浓度下用10微米-6微米×5芯片传递抗-eGFP siRNA之后18小时，在表达趋稳定的GFP的HeLa细胞中，基因抑制被解释为装置类型和细胞速度的函数。使用Lipofectamine2000作为阳性参照。在2910中，显示了荧光素标记的70kDa右旋糖苷和太平洋蓝标记的3kDa右旋糖苷进行快速机械变形传递和电穿孔传递的传递效率。在传递溶液中每种右旋糖苷类型的浓度是0.1毫克/毫升。在2920中，使用30微米-6微米装置，荧光素标记的胎牛血清白蛋白(o)的传递效率、太平洋蓝共轭的3kDa右旋糖苷传递效率(□)和细胞存活率(Δ)被显示为速度的函数。

在2930中显示了HeLa细胞的荧光显微图，所述HeLa细胞中传递了含有Alexa Fluor 488标记物的微管蛋白抗体。比例尺为5微米。2940和2950显示了被10微米-6微米×5装置处理并静止1小时后细胞中金纳米颗粒(一些由箭头表示)的投射电子显微镜(TEM)照片。比例尺为500纳米。所有的数据点进行三次，误差线代表两个标准偏差。

[0180] 在进一步的实施例中，为之前挑战的应用开发细胞质传递潜在方法，例如，蛋白传递和纳米颗粒传递。为了比较本发明主题内容与商业上可购得的方法的表现，使用3kDa和70kDa的右旋糖酐作为蛋白质模型，使用本发明主题内容和Neon电穿孔系统(Invitrogen)将这些模型传递到人类成纤维细胞中。结果显示，快速机械变形为这些大分子提供7倍增加的或者更多的传递效率(2910)。为了使这些方法适用于蛋白传递，使用通道直径为30微米-6微米的装置向HeLa细胞传递荧光素标记的胎牛血清白蛋白(BSA)，传递效率高达44％而且活性超过90％(2920)。在使用30微米-6微米的装置处理之后，以0.25毫克/毫升的抗体浓度将Alexa Fluor 488标记的微管蛋白抗体(Bio Legend公司)传递到HeLa细胞中(2930)。扩散染色显示材料没有被包裹在内含体中，因此适用于在细胞质中对细胞结构进行活细胞抗体染色。使用该技术还成功传递了载脂蛋白E。

[0181] 为了传递纳米颗粒，变形后静置1小时的细胞的TEM图像(2940和2950)显示了涂布有PEG1000的15纳米的金纳米颗粒的传递。金纳米颗粒基本上没有凝集并且没有被内含体可视的捕获。在这些图像中可以观察到一些细胞质造成的传递缺陷。已经证实能够实现高通量传递，量子点向细胞的细胞质中无细胞毒性的传递是之前的技术中无法实现的目标。在这些实验中，具有Rox染色的量子点结合其表面并通过快速机械变形传递，在一定时间内进行观察。数据产生最小的传递效果估计为35％，并且经证实，传递的量子点位于细胞质中并且对于细胞内环境是化学可接近的。

[0182] 当细胞通过微流体系统时，快速使细胞机械变形形成暂时孔。据显示，扩散细胞质染色(图26的2600)数据、siRNA功能性数据(图29的2900)和材料通过成孔细胞膜的双向运动数据(图26的2620)支持该机制。确定许多参数，例如收缩尺寸、串联的收缩部分数目和影响传递效果及存活率的细胞速度(图25)。因此，这些参数可以用于针对不同的应用，根据细胞类型和传递材料的尺寸优化装置设计。

[0183] 在实施例2中，这些技术基于微流体系统，所述微流体系统可以被整合入一种大的综合系统中，这种综合系统由多个传递之前的预处理步骤和处理后的分析或者分类步骤组成。在平均通过速率为10,000细胞/秒时，所述传递装置可以，例如，沿着流式细胞仪放置，从而对细胞进行分类或者在传递后立即进行其他分析。

[0184] 与之前存在的方法相比，这里描述的装置、系统和方法提供了很多潜在的优点。与电穿孔方法和微注射方法相似，本发明是一种基于成孔的方法，因此不依赖于外来的材料、不依赖于有效载荷的化学改变或者细胞内途径。然而，与电穿孔相反，本发明不需要依赖于电场，电场在蛋白质传递方面的作用非常有限并会损失一些有效载荷或者产生细胞毒性。事实上，目前的结果显示在绝大多数应用中具有相对高的存活率，并且敏感的有效载荷，例如量子点，未受损伤。本发明的主题内容在许多领域提供了非常重要的优势，例如，在标记和追踪细胞内材料时，被电穿孔作用损伤的量子点是一个重要问题，并且如果使用化学品的话，传递方法将被限制在有效的表面化学范围内。

[0185] 实施例2还显示了本发明的装置能向细胞质中传递蛋白质。数据和模型估计表明

与之前的方法(例如使用细胞穿透肽或者电穿孔方法)相比,本发明的主题内容可以向每个细胞中多传递10-100倍的材料。这种改善的传递率能提供一种更好的方法用于基于蛋白质的细胞重排,例如,在所述细胞重排中,转录因子向细胞液中的传递是研发可靠的iPSC生产方法主要障碍。通过传递各种关心的蛋白质/肽,技术人员还可以使用本发明主题内容研究疾病机制。事实上,本发明主题内容可以被用于高通量筛选肽文库,这是由于,与大多数CPP或者基于纳米颗粒的技术所不同,本发明主题内容对蛋白质结构和化学不敏感,不依赖胞吞作用途径,并且不影响蛋白质功能。

[0186] 由于本发明主题内容具有传递初级细胞的能力,因此通过快速机械变形完成的细胞质传递可以用作一种活体外治疗机制。在本方法中,在病人体外使用本发明装置处理来自病人血液或者其他组织的靶细胞,然后再重新放置于人体内。此方法具有增加的蛋白质或者纳米颗粒治疗剂传递效率并且比现有的技术更安全,这是由于,本发明不需要潜在的毒性载体粒子并且能够减缓任何与网状内皮组织清除率和去靶点传递有关的副作用。

[0187] 在实施例2中,使用光刻印刷法和深活性离子蚀刻技术在微组装设备中制备基于硅的装置。在此过程中,用六甲基二硅氮烷(HMDS)处理厚度为450微米的6″硅片,以3000rpm的速度旋转涂敷光致抗蚀剂(OCG934,FujiFilm公司)60秒,通过铬掩模暴露于紫外灯(EV1-EVG)中,并具有收缩部分管道设计,并在AZ405(AZ电子材料)溶液中延长100秒。在90℃下烘焙20分钟,使用深活性离子蚀刻(SPTS技术公司)蚀刻晶片到预定的深度(例如,在本实施例中,15微米)。在完成蚀刻过程之后,使用Piranha方法(过氧化氢和硫酸)除去残余的光致抗蚀剂。为了蚀刻进入孔(即,入口和出口),用不同的掩膜在晶片对边(即,不包括蚀刻通道的一边)重复进行上述过程,所述掩膜上包括进入孔图案和较厚的光致抗蚀剂AZ9260(AZ电子材料公司)。

[0188] 使用含氧血浆和RCA净化作用除去任何残留的杂质。在晶片与Pyrex晶片亚电化学键合之前使用湿氧化作为产生100-200纳米二氧化硅,然后切成单独的装置。在使用前分别检查每个装置的缺陷。

[0189] 在进行实验之前,将装置固定在支持物上,该支持物含有入口存储器和出口的存储器(Firstcut公司设计生产)。使用丁-腈橡胶-O-环(McMaster-Carr公司)将这些存储器与装置相连,提供合适的密封。使用特氟隆槽将进口存储器与压力调节系统相连,从而提供必需的驱动力,推动材料通过装置。实施例2可以调节压力使之高达70psi。

[0190] 在含有10%胎儿牛血清(FBS)(亚特兰大生物科学公司)和1%青霉素链霉素(Mediatech公司)的高葡萄糖Dubelco修饰的基础培养基(DMEM,Mediatech公司)中培养实施例2中包括HeLa(ATCC)、表达绿色荧光蛋白质(GFP)的HeLa、和DC2.4(ATCC)细胞的细胞培养物。在含有15%FBS的高葡萄糖DMEM中培养初级人成纤维细胞(NuFF)(Globalstem公司)。在培养器中,37℃下、5%的二氧化碳中保存细胞。当使用的时候,用0.05%胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(Mediatech公司)处理粘附细胞5-10分钟,使粘附细胞悬浮。

[0191] 在由85%敲除的DMEM、15%胎牛血清、1mM的谷氨酰胺、0.1mM的β巯基乙醇和1%非必需氨基酸代替的1000单位/毫升白血病抑制因子(LIF)(Millipore公司,美国)组成的培养基中,小鼠胚胎干细胞(mESC)在小鼠胚胎成纤维细胞(Chemicon)上生长。使用0.25%的胰蛋白酶/乙二胺四乙酸使细胞每2-3天传代一次。当用装置进行处理时,小鼠胚胎干细胞(mESC)能够重新形成菌落并在处理2周之后仍然维持正常的形态。

[0192] 为了进行实施例2中的实验，首先要将细胞悬浮在理想的传递缓冲液(生长培养基、磷酸质缓冲盐水(PBS)中，或者补充有3％FBS和1％F-68普卢兰尼克(Sigma公司)的PBS中，然后与所需传递材料相混合，放入装置入口存储器中。该存储器与压缩空气管道相连，压缩空气管道被一种调节器控制并且使用选择的压力(0-70psi)驱使流体通过装置。然后从出口存储器收集被处理的细胞。处理后在进行下一步处理之前，在室温下、传递缓冲液中培养细胞5-20分钟确保孔闭合。

[0193] 在实施例2中，在比较不同大小的右旋糖苷传递效果的实验或者比较蛋白质与右旋糖苷传递效果的实验中，可以将所关心的分子共同传递，即，使用相同的实验、使用相同的细胞群体，在相同的装置上传递，根据其荧光标记相区分。所有的数据点进行三次，误差线代表两个标准偏差。

[0194] 为了传递荧光标记的右旋糖苷分子(Invitrogen公司)或者载脂蛋白E(Invitrogen公司)，按照上面的描述进行实施例2的实验，从而传递缓冲液中分别包括0.1-0.3毫克/毫升的右旋糖苷或者1毫克/毫升的载脂蛋白E。

[0195] 为了传递荧光素共轭的BSA(Invitrogen公司)，首先将细胞在含有5毫克/毫升未标记的BSA(Sigma公司)的培养基中在37℃下培养2小时，然后用实施例2的装置处理，其中所使用的传递缓冲液包括1毫克/毫升的荧光素共轭的BSA。所述预培养步骤用于最小化荧光标记的BSA和细胞表面的非特异性结合。

[0196] 测定实施例2中的绿色荧光蛋白质(GFP)抑制，测量结果为相对于未处理参照物，细胞群落平均荧光强度减少的百分比。通过将1微克siRNA与1微升Lipofectamine 2000试剂在100微升的磷酸缓冲液中结合，制备Lipofectamine 2000+siRNA粒子。在室温下培养20分钟后，向每个试验孔中加入20微升的混合物，所述试验孔中包括20000个细胞和100微升的培养基。在分析之前，与所述颗粒一起培养细胞18小时。

[0197] 在实施例2中，通过将硫醇末端，1000分子量的聚乙二醇(PEG)共轭到纳米颗粒表面制备金颗粒，然后通过离心作用(10,000rcf进行30分钟)洗涤4此去掉过度的PEG，将所得材料悬浮在磷酸缓冲液中，最后浓度为100纳摩。为了反映GNP向HeLa细胞中的传递，将细胞悬浮在含有3％FBS、1％F-68普卢兰尼克和47nM GNP的磷酸缓冲液中；用10微米-6微米x5的装置处理并固定在含有2.5％(重量/体积)戊二醛、3％(重量/体积)多聚甲醛、和5.0％(重量/体积)蔗糖的二甲次肿酸钠缓冲液(pH7.4).在固定一整夜之后，将细胞再次固定在包括1％(重量/体积)Os04的巴比妥-醋酸缓冲液中1小时。然后用含有0.5％醋酸双氧铀的巴比妥-醋酸缓冲液(pH6.0)对全体细胞染色整夜，脱水并嵌入Spurr树脂中。使用钻石刀在Reichert Ultracut E(Leica)上切成厚度为70纳米厚的薄片。用EM410电子显微镜(Phillips)检查薄片。

[0198] 在实施例2中，在Neon电穿孔系统(Invitrogen公司)中，使用荧光素标记的70kDa右旋糖苷和太平洋蓝标记的3kDa右旋糖苷转染新生人成纤维细胞(NuFF)。按照使用说明，随后洗涤细胞然后将其悬浮在适当的缓冲液中。使用10微升tip处理细胞，浓度为10细胞/毫升，右旋糖苷浓度为0.1毫克/毫升。使用如下三个状态：1)一个20毫秒的1700V的脉冲；2)三个10毫秒的1600V的脉冲；3)两个20毫秒的1400V的脉冲。使用说明书推荐状态1和状态3作为eGFP质粒转染人成纤维细胞的最优条件，传递效率分别为84％和82％。

[0199] 在实施例2的共焦图像中，在800转每分的条件下离心样品4分钟然后在成像前使

用磷酸缓冲液洗涤2-3次。在装备有CI共焦附加单位和60倍水浸没透镜的Nikon TE2000-U倒置显微镜中获取活细胞的共焦图像。使用405纳米的激光激发荧光样品然后用标准DAPI过滤器(尼康)检测。

[0200] 在实施例2的荧光显微术中,在800转每分的条件下离心样品4分钟然后在成像前使用磷酸缓冲液洗涤2-3次。用装备有Neofluar透镜(Zeiss)的Axiovert 200(Zeiss)倒置显微镜成像。通过X-cite 120Q汞灯(Lumen Dynamics公司)激发荧光。所述显微镜装备有Hamamatsu C4742-95照相机(Hamamatsu公司)并用ImageJ(NIH)分析图像。

[0201] 在实施例2的流式细胞仪中,在传递试验后,为了分析细胞,使用磷酸缓冲液洗涤细胞2-3次(在96孔板中,每孔>100微升)。然后重新悬浮在含有3%FBS、1%F-68普卢兰尼克和10微克/毫升碘化丙啶的磷酸缓冲液(Sigma公司)中。在装配有高通量取样机器人的LSR Fortessa(BD生物科学公司)或者FACSCanto(BD生物科学公司)上分析细胞。用405纳米和488纳米激光激发所需的荧光团。使用695纳米长的通道并分别使用530/30和450/50过滤器检测碘化丙啶(活/死染色)、荧光素和太平洋蓝染色信号。使用FACS Diva(BD生物科学公司)和FlowJo(FlowJo)软件分析数据。

[0202] 实施例3-干细胞和免疫细胞

[0203] 蛋白质、纳米颗粒、siRNA、DNA和碳纳米管被成功的传递到11种不同的细胞类型,包括胚胎干细胞和免疫细胞。实际上,本发明的装置和方法能够将结构多样性材料及其可用性传递到难以转染的初级细胞中,这表明本发明的方法在研究和临床上有广泛的应用。

[0204] 在实施例3中,每个装置由45个相同的平行排列的微流体通道组成,该通道包括一个或者一个以上收缩部分,蚀刻在硅芯片上并用硼硅酸玻璃层密封。每个收缩部分的宽度和长度(下面会进行更详细的描述)分别在4-8微米和10-40微米。实施例3的装置通常以20,000个细胞/秒的通过速率操作,每个装置能产生将近一百万个被处理的细胞,然后由于堵塞,所述装置发生故障。选择平行通道的设计来增加处理量,同时确保对细胞进行均匀的处理,这是由于一个通道的堵塞或者缺陷不会影响相邻通道的流动速度(所述装置可以在恒定的压力下操作)。在使用前,可以首先将该装置连接到钢接触面,所述钢接触面与硅装置的进口和出口存储器相连接。然后将细胞和需要传递的材料的混合物放入进口存储器并在进口处。然后用压力调节器调节进口存储器的压力并驱使细胞通过所述装置。然后从出口存储器收集被处理的细胞。

[0205] 已经识别出能够影响传递效率的参数(参见,例如上述实施例2),这些参数包括细胞速度、收缩部分尺寸和收缩部分数目(从而改变细胞所受到的剪切力和压缩率)。例如,具有膜不可渗透性太平洋蓝标记的3kDa的右旋糖苷分子向活HeLa细胞的传递效率随着穿过不同收缩部分设计的细胞速度单调增加(例如,图25的2500)。收缩部分尺寸还影响传递;在所有操作速度下,将收缩部分长度从20微米增加到40微米几乎使传递效率增加两倍(例如,图25的2500),并且对存活率由最小的影响(例如,图25的2510)。减少收缩部分宽度会获得类似的作用。增加串联的收缩部分数目也可以增加传递效率,因此,在所有的细胞速度下,串联有5个10微米长度收缩部分的装置的工作性能比只有单个10微米、20微米或者40微米长度设计的装置的工作性能要好(例如,图25的2500和2510).在这些数据中,0mm/s数据点相当于参照情况,因此细胞与其他样品经历相同的处理但是不通过装置,因此反应了胞吞作用或者表面结合效应。

[0206] 为了研究本发明技术的多用性，评价本发明技术向一些细胞型传递模型右旋糖苷分子的能力，所述细胞型传统上是难以转染的，尤其是免疫细胞和干细胞。由于荧光标记的70kDa和3kDa右旋糖苷分别与许多蛋白质和siRNA分子具有相似的尺寸，便于用流式细胞仪检验并且由于他们是带负电的，可以最小化表面结合效应，因此，在这些实验中使用荧光标记的70kda和3kDa右旋糖苷。

[0207] 图30显示了在不同的细胞型中使用本发明的主题内容。3000显示了传递效率，以及用30微米-6微米装置向新生人成纤维细胞(NuFF)传递3kDa和70kDa右旋糖苷后新生人成纤维细胞(NuFF)的存活率。3010显示了用10微米-4微米装置处理脾中分离的鼠树突状细胞，向其中传递3kDa和70kDa的右旋糖苷。3020显示了鼠胚胎干细胞的传递效率和存活率，所述细胞被10微米-6微米装置处理从而传递3kDa和70kDa的右旋糖苷。3030显示了3kDa右旋糖苷向B细胞(CD19+)、T细胞(TCR-B+)和巨噬细胞(CDl 1b)中的传递效率，3040显示了70kDa右旋糖苷向B细胞(CD19+)、T细胞(TCR-B+)和巨噬细胞(CDl 1b)中的传递效率，所述细胞通过离心作用从全小鼠血液中分离，并被30微米-5微米和30微米-5微米x5装置以1000mm/s的速率处理。分别用太平洋蓝和荧光素分离3kDa和70kDa的右旋糖苷。所有的数据点进行三次，误差线代表两个标准偏差。

[0208] 使用各种装置设计将右旋糖苷传递到新生人包皮成纤维细胞(NuFF)(3000)、初级鼠树突状细胞(3010)和胚胎干细胞(3020)中。这些实验最小程度的损伤细胞存活率(<25％)(3000、3010和3020)并且，鼠胚胎干细胞的结果表明该方法不会诱导分化作用。在进一步的研究中，通过离心作用从血液中分离白血球(血块黄层)并用本发明装置处理。通过抗体染色区分B细胞、T细胞和巨噬细胞，结果显示3kDa和70kDa右旋糖苷都被成功的传递了(3030和3040)。

[0209] 为了显示本发明主题内容在解决目前传递方法存在的挑战的能力，在可能的应用上进行一系列实验，所述应用包括细胞再生和碳微管基传感。除了使用下面描述的特殊材料之外，本发明主题内容显示能够成功传递许多被实验的有效载荷，例如，载脂蛋白E、牛血清白蛋白和绿色荧光蛋白质(GFP)-质粒。

[0210] 图31显示了纳米颗粒和抗体传递数据。3100显示了使用10微米-6微米x5装置传递太平洋蓝标记的3kDa右旋糖苷和Cy5标记的包覆DNA的碳纳米管的传递效率和细胞存活率。3110显示了用拉曼散射覆盖的亮场细胞图像，在G带(红色)中，显示了碳纳米管向被处理的细胞中的传递(左侧)和胞吞作用(右侧)。刻度尺为2微米。3120显示了在传递了太平洋蓝标记的3kDa右旋糖苷(中间组)和Alexa Fluor 488标记的抗微观蛋白抗体(右组)18小时之后，HeLa细胞的荧光显微照片。刻度尺为3微米。3130显示了用10微米-6微米x5装置，以500mm/s的速率处理传递Alexa Fluor 488标记的抗微管蛋白抗体后，HeLa细胞的传递效率和存活率。将不同抗体浓度下的传递效率和100微克/毫升胞吞作用和未处理细胞相比较。

[0211] 通过流式细胞仪(3100)和拉曼光谱测定法(3110)证实碳纳米管(DNA低聚核苷酸包覆)被成功传递了。还可以使用本技术传递微管蛋白抗体(3120和3130)，产生细胞的扩散分布，这与细胞质传递相一致。上述材料使用目前方法难以传递到细胞的细胞质中，并且每个材料通常要求一种专门的修饰来促进传递。在实施例3中，使用相同的条件设置，在10微米-6微米x5的装置中将所有四种材料传递到HeLa细胞中。

[0212] 蛋白质向初级细胞中的有效传递能够用于一些治疗应用。细胞再编码问题是之前

CPP-基蛋白质传递方法所无法解决的。图32显示了蛋白质传递应用。在3200显示了使用细胞渗透性肽与10微米-6微米装置将c-Myc,Klf-4,Oct-4和Sox-2传递到新生人包皮成纤维细胞(NuFF)的蛋白质印记。

[0213] 四个蛋白质的每个都具有9个精氨酸(9R)基团,从而促进吸收。裂解柱对应细胞蛋白质的内含物,将内含物洗涤并裂解,同时,soup柱对应介质环境中的蛋白质。3210显示了使用10微米-4微米装置向脾分离的树突状细胞传递太平洋蓝标记的3KDa右旋糖苷和Alexa Fluor488标记的卵清蛋白的传递效率和存活率。所有的数据点进行三次,误差线代表两个标准偏差。

[0214] 检测向人成纤维细胞中传递四种示例性转录因子(Oct4、Sox2、c-Myc和Klf-4)的能力并将此能力与CPP方法的能力相比较(3200)。结果显示,除了不依赖于胞吞作用(胞吞作用会使大多数材料被内含体捕获)之外,由快速机械变形产生的传递对4种蛋白都产生明显更高的传递效率。这一结果与前述此景作用相一致,结果显示,与CPP相关的蛋白传递相比,本发明主题内容的传递效果好10-100倍。

[0215] 树突状细胞(DC)的抗原呈递是可以显示本发明主题内容优势的另一个领域。研究员已经开发了用于在树突状细胞MHC类I受体上表达抗原的方法,从而引入潜在的细胞毒性T细胞反应。本发明的主题内容具有直接的临床应用,例如,依靠抗原蛋白质的细胞质传递制备癌症疫苗,这是由于MHC类I呈递在细胞质蛋白中几乎是不存在的。通过加速材料向细胞质中的直接传递,本发明主题内容可以用作一种平台,产生对某一抗原的体内细胞毒性T细胞反应。为了说明这一能力,Alexa488标记的卵清蛋白作为模型抗原蛋白质被成功传递到来自于脾的鼠树突状细胞中(3210)。尽管在该细胞型中有较高的胞吞作用,但是与胞吞作用参照(0mm/s)相比,该装置显著的增加了传递效率。而且,根据细胞传递机制将传递材料传递到细胞质中,该特点对于抗原传递尤其重要,这是由于细胞质压力对于呈递MHC类I抗原是至关重要的。

[0216] 实施例3的系统是一种可以实施的研究工具,该工具能够传递碳纳米管、金纳米颗粒和抗原(图31)-三种难以使用现有技术传递的材料。本发明主题内容通过促进活细胞结构/蛋白质的抗体和量子点染色,以及使碳纳米管作为细胞质分子探针或者化学传感器,显著地扩大了探针进入细胞内方法的能力。作为一种鲁棒的蛋白质传递方法,本发明的方法可以用作肽/蛋白质文库的高通量筛选,这是由于,与大多数CPP或者纳米颗粒基技术不同,本发明对蛋白质结构和化学不敏感,不依赖与胞吞途径,不影响蛋白质的功能性。

[0217] 另外,本发明主题内容可以有效用于治疗(图32)。例如,从血液或其他组织中分离病人的靶细胞,用本发明装置处理传递理想的治疗剂,然后重新引入人体。这种方法利用治疗剂大分子增加的传递效率,并且由于不需要使用细胞毒性载体颗粒并且消除了潜在的与网状内皮组织清除和脱靶点有关的副作用,本发明主题内容比现有的技术更加安全。

[0218] 实施例4-个性化的癌症疫苗

[0219] 目前大分子细胞内传递的挑战在于不能更好的理解疾病机理和实施新型治疗方式。尽管近期在传递技术上已经取得一些进展,但是对病人衍生的细胞处理还是存在挑战,并且目前的方法通常依赖于有毒的电场或者外源物质。本发明的微流体平台和有关的系统和方法依赖于细胞的机械变形来加速传递。这种受控制的物理方法为之前描述的挑战领域提供答案,例如蛋白质基细胞再编码和量子点传递。

[0220] 影响细胞行为的最有效和最直接的方法是向细胞的细胞质中传递活性试剂。因此，大分子的细胞内传递在研究和发展中发挥着至关重要的作用，可以在从药物传递到生物化学过程治疗应用研究的范围内使用。但是现有的方法具有局限性。他们通常在病人衍生(初级)细胞中具有较低的效率，依靠有毒的电场或者外源材料，并且不适用于传递结构多样性材料，例如蛋白质。

[0221] 鲁棒的传递平台能够解决这些问题，并能够在生物研究中带来显著地进步，可用作新一代治疗剂(例如个性化癌症疫苗)的基础。例如，向免疫细胞中有效传递蛋白质的方法可用作癌症疫苗平台。

[0222] 如上所述，这里描述的微流体装置、相关的系统和方法能够通过快速使细胞通过收缩部分发生变形来加速材料向细胞内的传递。所述变形过程造成细胞膜的短时间破坏，因此使材料从周围缓冲液中被动扩散到细胞质中。由于不需要现有技术方法所依赖的外源材料和电场，本发明方法提供了一种更简单的鲁棒的方法传递，产生更少的毒性。因此，该方法能够用作一种广泛的平台进行大分子的细胞内传递，并在许多研究和临床应用(例如，癌症疫苗)中带来优势。

[0223] 图34是一种系统示意图，在此系统中，使用微流体装置处理病人血液进行大分子传递。本发明主题内容的一个实施方案包括一种系统，其中从病人血液中分离的树突状细胞(DC)被该装置处理，体外活化这些树突状细胞抵抗特定的癌症抗原并随后，重新引入病人血液流中。例如，被传递的抗原是一种常见的表达抗原，已知与某一特定的基本有关或者与活组织检查发现的病人独有的疾病有关。通过将癌症抗原直接传递到树突状细胞的细胞质中，本领域普通技术人员可以开发一种MHC-I类抗原呈递途径并向病人体内引入有力的细胞毒性T淋巴细胞反应。然后找出被活化的T细胞并破坏所有表达目标抗原的癌症细胞。该平台可以灵活使用已有的、疾病特异性抗原或者直接从病人肿瘤中衍生出的抗原，这种灵活性使其能够治疗对其他治疗剂有抵抗力的病人。事实上，这种方法提供了一种个性化的靶向疾病的反应并具有最小的副作用。这种实施方案可以在典型的医院实验室中由训练有素的技师进行(治疗前<1小时)。由于其较小的尺寸和相应的简单性，还可以使用病人操纵的治疗系统。

[0224] 已经在鼠模型中显示了癌症疫苗方法。这种系统被用于成功将卵清蛋白(模型蛋白)传递到鼠树突状细胞中并进行处理，并且被MHC类I受体上增加的抗原呈递、SIINFEKL肽所证实。这些被治疗的树突状细胞促进体外增殖性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应。将处理后的树突状细胞重新引入动物体内产生体内CTL反应。该装置可有效向来自人类血液的树突状细胞中传递抗原。

[0225] 这些数据显示，所述装置能够向敏感的初级细胞(包括树突状细胞)中传递材料，而不引起过多的细胞死亡。因此细胞破坏不是一个重要的问题。通过增加被处理的细胞数目，增加被传递的抗原数量he多样性，和/或共传递活化因子(例如脂质聚糖)可以改善免疫反应。在使用本发明装置处理的细胞中没有观察到细胞毒性或者只观察到很少的细胞毒性，因此本发明不只可行还能够有效用于治疗人类和动物应用。

[0226] 实施例5-血液癌症治疗

[0227] 如实施例4所述，细胞的快速机械变形能够提高一种鲁棒的向树突状细胞(DC)传递抗原的方法，并且因此可以作为细胞治疗平台。本系统基于一种发现，即细胞的快速机械

形变会产生短时间的细胞膜小孔，使周围培养基中的材料扩散性的传递到细胞中。与之前描述过的现有治疗所不同，本发明方法不依赖于常规融合蛋白质、抗原交叉呈递、病毒载体、纳米颗粒或者胞吞作用；因此本发明能够很大的改变体内效率同时减少治疗剂消耗。这种基本上不同的方法的灵活性和简单性为树突状细胞的活化提供了宽阔的平台，所述树突状细胞的活化能诱导CD8对多种癌症抗原发生反应。该系统可以靶向血液癌症、例如B细胞淋巴瘤，这对免疫治疗更加温和，而且本系统还能够靶向一些其他的癌症类型(例如黑素瘤、胰腺癌，等等)并提供一种重要的、个性化的新方法与这些疾病作斗争。

[0228] 由于抗癌细胞治疗法能够活化病人的免疫系统并产生针对该疾病更为长久的抗原特异性CD8T-细胞反应，因此是一种有吸引力的选择。相对于化学疗法和辐射治疗来讲这些治疗，例如最近获准的用于治疗前列腺癌的Provenge，具有最小的副作用。但是，通过将抗原传递到细胞质，发展细胞治疗法的一个最大的障碍已经实现合适的抗原呈递作用。

[0229] 传统上，CD8效应子反应活化作用与CD4反应的区别在于通过外源蛋白进入抗原递呈细胞(例如树突状细胞)的位置不同。细胞质中发现的蛋白质诱导CD 8反应而胞吞作用捕获的细胞外蛋白质诱导CD4反应。由于抗原呈递细胞的交叉呈递机制是难以捉摸的，本领域技术人员必须研发一种可靠的方法将所需抗原直接传递到细胞质中从而利用有效的细胞毒素效应因子CD8反应促进治疗。向树突状细胞的细胞质中传递的鲁棒、有效的方法可以被用作一种平台，诱导对各种癌症类型的免疫反应。

[0230] 图8A和图11显示了在HeLa细胞上的实验，这些实验显示了细胞快速的机械变形会在细胞膜上产生短时间损伤/小孔，这能使周围缓冲液中的材料被动扩散到细胞的细胞质中。这些之前未报到过的现象产生的细胞在处理后是存活的并且可以正常增殖。实现表明与较小的分子相比，较大的分子显示较低的传递速率，因此显示了扩散机制。使用共焦显微镜测定，成功的siRNA传递和扩散细胞质染色还表明被传递的材料处于细胞质中，并处于一种活性/可接近态。传统上，传递抗原的方法通常在细胞系中可以实施但是不能被翻译为初级免疫细胞。然而这里描述的传递方法不依赖于胞吞作用途径或者细胞对外源材料的反应(在不同的细胞型中有很大的差异)，而主要依赖于膜的双层性质。因此，由于其简单性和新型途径，本发明的技术能够更为平和的用于向各个细胞系和初级免疫细胞中传递，并且主要改善抗原呈递作用。

[0231] 根据卵清蛋白传递，通过抗体染色分析抗原的MHC I类呈递和树突状细胞成熟。从OT-1和OT-II TCR转基因小鼠中收获的T细胞还可以用于测定响应于卵清蛋白和/或SIINFEKL抗原装载的CD8和CD4增殖作用。与只使用胞吞作用产生的树突状细胞注入相比，可以对系统进行优化从而增加CD8的增殖作用。

[0232] 用MACS CDl lc+分离器(miltenyi Biotec，德国)纯化来自B6小鼠脾的初级鼠树突状细胞。一种装置包括6微米通道宽度的收缩部分，该装置能够用于使13umHeLa细胞的细胞膜成孔。由于这些树突状细胞的尺寸较小，还可以利用通道宽度为3-5微米的微组装和测试装置。对现有的光刻印刷法和深活性离子蚀刻技术进行修饰使其能够有效的生产这些装置。可以使用荧光标记的右旋糖苷分子作为模型分子，通过FACS评价传递效率。随后，使用卵清蛋白传递细胞并用蛋白质印迹实验证实蛋白质被触及细胞吸收。

[0233] 使用CD80和CD86抗体染色检验树突状细胞成熟过程显示本发明快速变形方法诱导细胞成熟。如果认为需要在传递后诱导树突状细胞成熟过程，可考虑利用细胞外TLR激动

剂，例如脂多糖(LPS)。可以将卵清蛋白传递给树突状细胞，然后用MHC-T SIINFEKL抗体定量抗原呈递。另外，根据TCR特异性肽的传递评价抗原呈递效率，显示系统传递/呈递蛋白质或肽的能力。随后，分别从TCR转基因OT-I和OT-II小鼠中收获CD8和CD4T细胞，用CFSE染色并且与卵清蛋白处理的树突状细胞共培养5天。两个子集的T细胞增殖都可以被FACS调节。对装置设计进行优化从而与传统的体外方法(例如胞吞作用)相比产生增加的功能性CD8细胞群体水平。

[0234] 癌症细胞治疗剂的一个目标是实现多方面诱导抗原特异性CD8反应的能力，迄今为止，由于现有传递方法在呈递抗原方面的低效性或者传递方法灵活性不足，所述癌症细胞治疗剂被证明是难捉摸的。现有方法存在很多缺点，包括这些方法依赖于有损伤的电场、利用外源材料、蛋白序列修饰和/或胞吞作用途径来促进抗原传递。然而本发明的主题内容提供了一种基本上不同的途径进行细胞质传递，细胞质传递不需要受到上述任意一个问题。此外，由于成孔-扩散机理的性质，本发明的方法可以广泛的用于多种抗原类型并且因此可以解决很多目标癌症。甚至可以使用相同的基质引入其他的信号分子，从而改善树突状细胞成熟/活化过程，产生更为有效的T细胞反应。这种广泛应用的平台是多用的，并且在作为癌症疫苗的调查中，比任何现有的抗原传递/呈递机制更为鲁棒。

[0235] 实施例5影响广泛。考虑到癌症在全国范围内引起的巨大社会重担(据估计，2011年美国有570,000死亡)；癌症可能折磨很大比例的人群。被折磨的人群受益于新型细胞治疗剂的发展，新型细胞治疗剂能够开发病人免疫系统的效力使之与疾病作斗争。本发明主题内容是一种更为有效的、个性化的治疗平台，可以治疗多种癌症类型，例如，血液癌症，比方说，白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤以及骨髓及外骨髓增殖的赘生物和脊髓发育不良综合症。举例来说，由于他们能够通过血液循环，本方法尤其适用于治疗转移性癌症。例如，可以通过消化肿瘤活组织切片检查样品、将溶解产物传递到病人的树突状细胞中，然后在将此树突状细胞引入人体来治疗具有未知抗原决定簇的癌症。这可以活化宿主体内针对多种癌症抗原的T细胞从而实现有效的多靶点治疗。这些个性化的方面对患有罕见形式的癌症的人具有尤其重要的意义，由于曝光在恶劣的环境中，现有的治疗方法难以治疗这些人。通过对个体疾病定制治疗方法，本发明方法可以提供及时地、有效的照顾，即使在最具侵略性的病例中，例如多重耐药性癌症病例。这种基于免疫的治疗还可以非常有效的预防转移(癌症转移造成90％的癌症相关死亡)，这是由于CD8T细胞可以容易的固定并且毁坏转移性细胞，而本发明治疗方法提供的免疫记忆可以用于预防未来的复发。另外，作为一种研究工具，本发明的方法开启了抗原过程过程前所未有的机械研究，能够更好的理解抗原交叉呈递的过程并因此改善现有/作为替换的免疫活化方法的效率。

[0236] 实施例6-细胞再编码

[0237] 干细胞在目前的再生医学研究中起到至关重要的作用，尤其在快速发展的组织工程设计领域。iPSCs具有自更新能力、可以分化成任意细胞类型并且具有自体同源性(病人特异性)，因此是更为感兴趣的细胞。iPSCs有机会从多功能源中产生多系谱祖细胞，这可以结合成清晰但是相互作用的组织代谢区。此外，这些细胞最终会使人类胚胎干细胞(hESCs)在临床应用中不在被需要，从而避免了许多困扰这些细胞类型的道德和伦理上的争论。而且，病人衍生的iPSC不会产生hESC衍生的免疫排异问题或者最小化hESC衍生的免疫排异问题。因此，目前的研究主要集中在设计有效的、无病毒的、产生大量iPSCs的方法。

[0238] 最初，根据4种转录因子Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4的逆病毒过表达，通过再编码成年鼠和人成纤维细胞(HFs)到一种可塑性状态产生iPSCs。这种iPSC不仅在整体基因表达、DNA甲基化和组蛋白修饰方面与ES细胞非常一致，而且还能够分化成所有三个胚层。虽然iPSC技术在生物医学研究和细胞基治疗中具有巨大的潜力，但为了实现其全部能力必须克服一些主要障碍。例如，大多数iPSC细胞系来自于各种体细胞，通过逆病毒或者慢病毒引入编码再编码因子的基因，病毒载体集合产生成倍的染色体分离，这些中的任意一个都会产生遗传性功能障碍和/或肿瘤。另外，再编码的转基因(尤其是c-Myc和Klf4)与肿瘤发生密切相关，提高了其残基表达和/或复活作用产生肿瘤的可能性。因此，最近许多实验室开发了不同的基因组非整合方法，例如腺病毒、附着体载体、mRNAs和微RNA。值得注意地是，已经显示通过直接将与细胞穿透肽(CPP)融合的四种再编码因子(Oct 3/4、Sox2、c-Myc和Klf4)直接传递产生iPSC。虽然已经报道了通过传递大肠杆菌表达的四种CPP融合因子可以产生鼠iPSC，但是据显示，使用哺乳动物细胞表达的四种CPP融合因子可以产生人iPSC。然而，这些研究显示蛋白质基再编码的再编码效率是非常低的(<0.01％)。由于蛋白质基的再编码不包括任何类型的遗传物质(DNA或者RNA)和载体媒介物(病毒或者质粒)，蛋白质的直接传递提供了一个最安全的再编码过程。已经显示，蛋白质基人iPSCs能够有效的产生功能性多巴胺神经元，并且不会产生与病毒基因组集合有关的异常性质。使用本发明的传递平台技术，本发明主题内容可以改善蛋白质基再编码的效率，因此在很大程度上打开了产生临床上可使用的iPS细胞的可能性。

[0239] 而且，本方法能够通过阻止控制mRNA、质粒和病毒重新编码中的翻译和/或转录的随机过程更精确的控制细胞功能。因此，与其他作为替换的方法相比，直接蛋白质传递具有两个基本优点，能够去除诱变性插入的风险，并能够更准确的控制高敏感度的再编码过程。这里描述的传递技术显示了其以高效率向HF和干细胞传递蛋白质的能力。进行实验比较本发明技术与现有的细胞穿透肽方法的传递能力，实验结果显示使用本发明方法的传递能力显著增加(根据模拟结果，传递能力可能增加100倍以上)。而且，其物理成孔机制不再需要进行化学修饰或者利用外源化合物，进行化学修饰或者利用外源化合物是其他作为替换的蛋白质传递方法所需要的。由于本方法对于被传递的材料是不可知论的，小分子、siRNA及其他因子还可以在重新编码期间共同传递。因此，本系统提供了一种独特的工具，通过直接蛋白质传递来诱导细胞重新编码。这种简单的作用机制(即，通过小孔扩散)还能使本领域技术人员可以较高准确度预计并控制传递量，从而促进最优化研究，改善对重新编码动力学的理解，并因此极大的提高效率。最后，本领域技术人员可以将这种微流体技术用作医疗器械来产生iPSC，用于临床组织设计和细胞治疗应用。而且，该系统的应用不限于蛋白质传递。

[0240] 这些技术可以被包括在一种通用的传递方法中，用于将大范围的大分子(DNA、RNA、蛋白质、糖和肽)传递到几乎所有细胞类型中。这能够适用于所有现有技术使用的应用中。现有的脂质体、纳米颗粒和电穿孔-基方法，例如，通常不能转染某些初级细胞(例如，免疫细胞或者干细胞)并且不能有效的传递蛋白质和纳米颗粒(例如量子点)。本发明的新方法还可以传递肽，用于治疗剂筛选和疾病机理应用，而目前的方法通常需要化学修饰或者密封。本领域技术人员还可以使用本发明的方法进行纳米颗粒-基的传感应用，从而传递修饰的量子点进行细胞器标记和机理性疾病研究。

[0241] 细胞内传递是许多生物研究应用的基础，包括基因表达原理研究、疾病机制研究，以及在本应用中解决的，iPSC的产生。已经建立的传递方法，例如脂质体、聚合纳米颗粒和电穿孔方法常常涉及外源化合物用作传递工具(或者，对于电穿孔的情况来说是电场)，并且是材料和/或细胞特异性的。例如，lipofectamine(Invitrogen)可以传递DNA和RNA分子(到细胞系子集或者初级细胞)，但是不能形成合适的复合物传递蛋白质或者其他大分子。另一方面，虽然电穿孔能够靶向一系列细胞类型，但是由于电穿孔的高电场会破坏细胞，因此在蛋白质传递上的成就非常有限。例如，这使电穿孔非常不适合于iPSC产生过程中要求的多次转染。膜穿透肽是另一个主要针对蛋白质的传递技术。然而这些基于肽的方法对肽的功能具有不可预知的作用，并且在内涵体中经历重要的蛋白质降解作用。因此，本发明主题内容描述了一种通用的方法，该方法能够传递大范围的大分子(DNA、RNA、蛋白质、肽、小分子)，并造成最小的细胞死亡，能够史无前例的在一个技术平台上控制细胞功能，从而研究疾病机理，识别大分子治疗剂候选物、指导干细胞的分化作用或者重新编码，并且使用报道细胞系发展诊断技术。

[0242] 这里描述的微流体装置可以作为一种广泛应用的传递平台。作为一种微流体装置，本发明的装置能够精确的控制单个细胞水平的处理条件。既能够进行单细胞水平的控制也能够进行大规模处理量，这种特有的结合使本发明的装置相对于现有传递方法处于一种独有的位置。迄今为止，数据显示本发明系统能够向超过11种不同的细胞型中传递材料，包括癌细胞系、胚胎干细胞、初级成纤维细胞和初级淋巴细胞。其机械成孔机制还能够传递预先激发的材料，例如碳纳米管和量子点。

[0243] 之前的工作使用重组蛋白质产生iPSC，并显示具有极低的效率(<0.01％)因此不适用于广泛的临床应用。然而这里提到的装置、系统和方法显示他们能够直接传递蛋白质进入细胞质，并且具有较高的效率和最小的细胞死亡，因此通过更有效的传递提供了强制机会使重新编码效率实质上提高。本领域技术人员可以通过直接确定有效蛋白的数量来准确的控制细胞内动力学。另一方面，其他的重新编码方法(例如，病毒、质粒和mRNA表达)根据随机效应确定蛋白有效性水平并因此不适于动力学研究。现有重新编码方法的低效率表明这些过程对随机变化具有较高的灵敏度并且只有很小范围的转录因子表达水平进行重新编码。通过直接将蛋白质传递到细胞质中，本领域技术人员可以准确的控制蛋白质的有效性并因此更均匀的使用重新编码所需的具体条件。一旦识别并优化了这些条件，这些条件可以对每个经历处理的细胞精确复制并因此显著地改善重新编码效率。

[0244] 该技术能够改善多种细胞内传递应用。另外，本技术完全使用机械作用的性质因此消除了使用化学试剂或者电场所产生的潜在的复杂因素。数据没有显示处理后细胞行为发生任何实质上的变化。因此，本系统是一种鲁棒的、高通量、高效率、通用的细胞内传递机制，并可以特定的用于重新编码。

[0245] 证据表明，细胞通过收缩部分时发生的快速变形能够诱导细胞膜上短时间内产生小孔，允许大分子从周围缓冲液中扩散进入细胞液。本技术已经在11中不同的细胞类型中使用过，包括癌细胞系、初级成纤维细胞、初级淋巴细胞和胚胎干细胞(不产生分化作用)。一个原型能够处理大约20,000细胞/秒并且可以处理一定范围的细胞浓度(10^4-10^8个细胞/毫升)。通过改善实验方案和芯片设计可以极大的缓解堵塞问题，因此每个装置在堵塞之前能够处理大约1百万个细胞，并可以被清洁循环使用。另外，多通道设计提供了显著的重复

性因此一个通道的堵塞不会影响其他通道的性能。压力驱动流动(在控制的恒压下)并且通道的平行设计确保无论芯片中被堵塞的通路的百分比是多少,每个通道都具有均匀的流动曲线。

[0246] 所述装置已经显示了一种能力,能够将右旋糖苷分子传递到人成纤维细胞和胚胎干细胞中。图35显示了细胞重新编码的潜在优势。在3500中显示了被10微米-6微米装置处理并传递3kDa右旋糖苷后的人胚胎干细胞的传递效率和存活率。在3510,对使用细胞穿透肽向新生人成纤维细胞(NuFF)中传递的c-Myc,Klf-4,Oct-4和Sox-2和使用10微米-6微米装置向新生人成纤维细胞(NuFF)中传递的c-Myc,Klf-4,Oct-4和Sox-2进行蛋白质印迹实验。溶解产物(Ly)柱对应于细胞的蛋白质含量,所述细胞被洗涤并裂解,而显影剂柱对应于培养基环境中的蛋白质含量。在3520中显示了在传递了重新编码因子后固定的新生人成纤维细胞(NuFF)的共焦显微镜图像。使用Alexa 488共轭的抗FLAG抗体标记所述蛋白质并用DAPI进行核染色。

[0247] 而且,将本发明装置的传递效率与目前用来进行蛋白质-基重新编码的9个精氨酸(CPP)方法相比较。蛋白质印迹实验结果(3510)显示被传递的c-Myc,Klf4,Oct4和Sox2数量显著增加。然后共焦显微镜检查法证实这些转录因子被成功的固定在细胞核(3520)中。在COMSOL中开发一种简单的2-D扩散模型,根据离子从细胞质内外扩散的记载值来模拟传递机制。将此模型与实验数据相拟合,据估计该技术能够将缓冲液中存在的10-40%的传递材料传递到细胞质中。相比较而言,用于传递蛋白质的CPP方法只能将0.1%的缓冲液材料传递到细胞质中,因此,本方法有效的增加的被传递的重新编码材料的量(10-100倍)。而且,确保被传递的转录因子具有更大的生物利用率。

[0248] 图36通过直接传递融合的重新编码蛋白质显示了小鼠和人iPSC细胞系的产生的定性。在3600,开始小鼠干细胞培养(第一图像);在进行6个蛋白质治疗处理之后的形态(第二图像);建立的iPS菌落(第三图像)和对建立的iPS菌落进行AP染色(第四图像)。3610显示了p-miPSC的ESC标记物免疫染色。用DAPI(蓝色)对核染色。在3620中,对Oct4启动子进行重亚硫酸盐序列分析显示p-miPSC-1和p-miPSC-2系中几乎完成了所有次生的重新编码。开环和闭环分别表示未甲醇化的和甲醇化的CpG。在3630,通过对免疫缺陷型小鼠注射p-miPSCs并对畸胎瘤进行H&E染色分析体内分化能力。所得的包括畸胎瘤的组织显示所有三个胚层;外胚层(神经管或者表皮)、中胚层(软骨或者肌肉)和内胚层(呼吸上皮或者肠状上皮)系谱细胞。在3640,p-miPSC-1(左图)衍生的嵌合体以及E13.5胎儿的p-miPSC-2(右图)显示注射的p-miPSCs中具有高水平的绿色荧光蛋白质(GFP)。在3650到3670,通过直接将CPP融合的四种重新编码因子从人活组织切片成人的成纤维细胞(3650)中直接传递来产生人iPSC细胞系、p-hiPSC-01(3660)和p-hiPSC-02(3670)。

[0249] 图37描述了初级蛋白质重新编码结果。在3700中显示了成纤维细胞向菌落的形态变化进展。白色箭头表明潜在的重新编程细胞。红色箭头指向联合iPSCs形成菌落。在3710到3760显示了在iPSC菌落中表达人胚胎干细胞标记物Oct4、SSEA-4、Tra-60、Tra-80、碱性磷酸酶(AP)。在适当的时候,小方块表示DAPI复染。标尺为100微米。

[0250] 由于产生了蛋白质-基人iPSC并对其进行了定性,使用之前的CPP-融合的重新编码因子生产进一步完全重新编码的小鼠和人iPSC,然后用所有标准方法进行检验,包括次生分析、体内多能性和嵌合体形成(图36)。然而,就算是使用部分纯化的蛋白质,这种重新

编码的效率还是很低的(<0.1%)并且比病毒重新编码方法花费的时间更长。因此,尝试使用本发明装置向人成纤维细胞中传递4种重新编码蛋白质Oct4、Sox2、Klf4、和c-Myc,缓冲液浓度为80微克/毫升。将细胞处理4次,每次传递之间间隔48小时。在培养基中培养14-20小时之后,出现第一个重新编码的hiPSC-样菌落。在这段时间内,由于形成了iPSC菌落并表达了一些hESC标记物,因此可以观察到成纤维细胞形态上的变化。

[0251] 内涵蛋白、细胞膜穴样内陷和巨胞饮是三种最常见的胞吞内化作用机制。为了检验在快速细胞变形之后进行的大分子传递中是否涉及胞吞作用,可以使用已知的化学品阻挡这种机制。具体地说,可以使用氯丙嗪抑制内涵蛋白介导的胞吞作用;使用金雀异黄素(genisten)抑制细胞膜穴样内陷介导的胞吞作用;以及使用5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利(amirolide)(EIPA)抑制巨胞饮(所有都购自Sigma Aldrich公司)。在处理前,将HeLa细胞与氯丙嗪(10微克/毫升)、金雀异黄素(genisten)(200微摩)和EIPA(25微摩)一起培养2小时。然后对细胞进行快速变形处理,传递右旋糖苷、dsRED和dsRED-9R蛋白质。使用荧光激活细胞分类术测定各自的传递效率,这些传递效率解释了胞吞抑制作用对CPP和基于装置的传递机制的影响。用共焦显微镜检查法,使用内含体标记物(Invitrogen)进行共定位实验,还可以帮助确定螯合进入内涵体中的材料百分比。

[0252] 也可以将快速细胞变形系统与其他已经确定的传递方法(例如电穿孔)耦合,从而缓和胞吞作用机制。

[0253] 收缩部分附近的结合电极可以与变形和电穿孔相耦合,使传递作用效率足够产生与各个方法单独使用时相比更高的系统性能。另外,可以与一些化学试剂(例如氯化喹啉(Sigma公司))、各种聚合物或者内涵体逃逸肽共传递,这种共传递可以用于帮助被传递的材料在快速细胞变形系统中进行内涵体逃逸。

[0254] 随着细胞穿过收缩部分,细胞经历短暂的(大约10-100微秒)但是快速的剪切作用和压缩作用。之前显示弦向剪切力能够诱导小孔形成。然而,该系统还诱导机械压缩。为了评价这些参数,传递前,在0.1微克/毫升Lantrunculin A(Invitrogen公司)中培养HeLa细胞和HF细胞1小时使肌动蛋白细胞骨架解聚。

[0255] 使用本发明快速变形装置可以向被处理的细胞群中传递荧光标记的右旋糖苷(Invitrogen公司)。在处理前,在10微摩秋水仙碱(Sigma)中培养细胞2小时解聚微管网络,在此细胞中重复这些实验。用荧光激活细胞分类术测定毒素处理的细胞相对于未处理的参照的传递效率。小孔形成被认为与细胞相应于给定的几何形态的变形速率有关。预先用一种装置研究细胞骨架在抵抗变形中的作用,所述装置探试细胞变形性从而提供变形率的定量测量值。在此方法中,将电极放置在收缩部分的两端,随着细胞通过测定两个电极之间的电容变化。然后该收缩部分之间的电容变化与细胞转播时间(即,其形变形率)有关。在上述实验中,这种装置的传递情况与这些之前的变形研究有关,从而在变形率和成孔效率之间产生一种定量关系。

[0256] 与已经公开的定性声孔作用的研究类似,在处理后,在确定的时间间隔取样,对固定的样品进行扫描电子显微镜法(SEM)和透射电子显微法(TEM)直接测量此时间内预计的小孔尺寸和分布。可以在室温条件下,使用25%的戊二醛溶液(Sigma公司)固定细胞。然后在成像前对细胞样品进行连续的乙醇洗涤使其脱水。使用环境SEM(ESEM)技术对固定的样品直接成像。然而,由于这种技术的分辨率相对较低(大约200纳米),因此适合于检测1-0.5

微米规格的形态变化或者损伤。如果ESEM不能检测出任何形态变化，可以用真空蒸发器将该细胞涂布一层1-10纳米后的金，从而将分辨度提高到纳米规格，这是使用SEM直接观察更精细的孔结构所需要的。如果SEM不能产生理想结果的话，还可以使用TEM作为替换性的成像技术。这些技术可以使本领域技术人员将局部损伤与传递的均匀成孔机制相区别，并测定平均孔径和分布。将经历快速细胞变形的细胞中的孔径和分布与未被处理的细胞的相比较。细胞膜表面上局部的孔分布显示了损伤模型，而更均匀的分布证实均匀的成孔模型。

[0257] 使用COMSOL multiphysics软件构造成孔细胞的三维模型。使用细胞质和缓冲液扩散率已经发表的数据，结合理论研究中得到的合适的孔径模型，可以产生预计性的传递模型。该模型模拟多孔膜，将低扩散率细胞质与高扩散率缓冲区域分离开。在此模型的假设下，在再次密封之前，这些小孔在固定的时间内具有固定的尺寸。通过与MatLab或者其他软件结合使用可以将动态小孔行为，例如形状和直径方面的变化，整合入复杂模型。使用荧光激活细胞分类术和凝胶电泳(例如蛋白质印迹实验)获得的实验数据确定传递量的模拟预测。可以使用这些比较调整模型从而使其能够预计被传递的材料的量。这种模型的预计能力可以模拟改变孔径的作用、孔径开启时间的作用和缓冲浓度的作用，因此可以被用作未来科学的指导。

[0258] 多物理场模拟(例如，COMSOL或者CFD-ACE)还可以被用于模拟液体通过该装置的流动。可以使用这些模型更精确的预计流动速度和进口部分、出口部分以及收缩部分的剪切力。这些数据可以用于解释剪切力和流动速度之间的联系，从而更有效的通过收缩部分传递。而且，通过构建该装置更多的模型，可以研究不同通道之间的压力分布并调整入口部分和出口部分的涉及，从而确保所有的通道在几乎相同的条件下操作，以改善细胞群体受到的处理的均匀性。

[0259] 首先，优化传递现象从而增加传递效率和细胞存活率。群体均匀性(即向每个细胞传递类似量的材料)可以被用作次级优化参数。最初的结果识别出细胞速度、收缩部分长度、收缩部分宽度以及入口部分形状是敏感的参数。另一方面，培养基组成仿佛不是一个主要因素。可以构建一系列装置从而系统性改变收缩部分长度和宽度分别至5-50微米和4-8微米。可以使用不同的斜角形成狭窄的收缩部分。荧光激活细胞分类术测定的这些装置的实验效率和存活率与上述模型数据有关，从而更好的理解剪切力和收缩部分尺寸的作用。对不同的细胞系重复此过程，不同的细胞系可能对处理的反应不同。该数据可被用于研发具有最有几何结构和操作参数的装置，进行特定的细胞(或者特定的细胞子集)传递。

[0260] 图38的显微照片说明了作为选择的装置结构。明场显微照片显示了将收缩部分和电极结合的准备工作(刻度尺是30微米)。如图38所述，通过将快速变形现象与电穿孔相耦合来修饰装置。通过光刻法印刷法和金沉淀法将金电极整合在收缩部分的两边，从而向通路中引入局部电场。后续实验可以确定操作参数值(电场强度、频率和操作速度)，从而使本发明方法具有改善的性能。本领域技术人员将两个独立的成孔机制耦合可以更精确的控制系统并变换多个参数对每种细胞类型都实现最佳的系统性能。

[0261] 另外，电场可以被用作驱动力来传递较大的带电分子(例如DNA)，所述较大的带电分子具有较低的扩散速率。可以为潜在的合作者提供适于使用的可流水线生产的并易于处理的系统版本。使用聚甲基丙烯酸甲酯和聚碳酸酯的注入制模或者热压印法提供基于聚合物的装置。随后，降低的成本能够使这些装置用作可随意处置的工具，从而改善无菌效果并

易于使用。另外，通过简化管道连接、系统安装和设置压力调节器可以提供易于使用的系统。

[0262] 将成纤维细胞基于蛋白质的重新编码入iPS细胞中，并研究重新编码的参数空间的最佳值。上述研究表示通过将CPP融合的重新编码因子从人和小鼠组织(图36)中直接传递，可以产生iPSC，并且表明这些蛋白质-iPSC可以分化成功能性细胞(例如，多巴胺神经元)，并且不会产生与病毒iPSC有关的异常表型。然而，由于培养基中许多因子(包括蛋白质)会发生降解作用，不能传递，并且由于细胞内含体中的降解，直接蛋白质传递的重新编码效率也非常低(<0.01％)不适于任何实际应用。通过有效的直接将蛋白质传递到细胞质中，这里描述的微流体装置可以显著的增加基于蛋白质的重新编码效率，从而避免游离蛋白质或者装入胶囊中的蛋白质传递方法常常会遇到的恶劣的体内环境和繁重的内逃逸过程。

[0263] 使用微流体基传递方法可以加速人iPSC的产生。所述装置可用于向胚胎人成纤维细胞(HF)中传递4个重新编码蛋白质中的一种或者一种以上(c-Myc(蛋白质，Genbank登记号:NP_002458.2;DNA,Genbank登记号:NM_002467.4)、Klf4(蛋白质，Genbank登记号:AAH30811.1;DNA,Genbank登记号:NM_004235.4)，Oct4(蛋白质，Genbank登记号:ADW77326.1;DNA,Genbank登记号:HQ122675.1)，和Sox2(蛋白质，Genbank登记号:NP_003097.1;DNA,Genbank登记号:NM_003106.3)。除了Yamanaka四种因子之外(MKOS是c-Myc-Klf4-Oct4-Sox2)，一些其他的因子(例如，Lin28(蛋白质，Genbank登记号:AAH28566.1;DNA,Genbank登记号:NM_024674.4)和Nanog(蛋白质，Genbank登记号:AAP49529.1;DNA,Genbank登记号:NM_024865.2)，Esrrb(蛋白质，Genbank登记号:AAI31518.1;DNA,Genbank登记号:NM_004452.3)，Glisl(蛋白质，Genbank登记号:NP_671726.2;DNA,Genbank登记号:NM_147193.2)，和PRDM14(蛋白质，Genbank登记号:NP_078780.1;DNA,Genbank登记号:NM_024504.3)以及被识别出能够提高重新编码效率。已经充分证明6种因子(MKOS+Lin28和Nanog;MKOSLN)的哺乳动物表达和提纯，并使用报道实验证实各个因子的生物活性。这些因子可以在大肠杆菌或者哺乳动物细胞中表达。由于大肠杆菌表达的蛋白质缺少后翻译修饰(例如，磷酸化作用、乙酰化作用和泛素化(ubiquitination))，在哺乳动物细胞(HEK293和CHO)中表达后，可以使用纯化的蛋白质。大肠杆菌表达的蛋白质(可以从Stemgent(剑桥，麻省)公司商业上购得)可以用作对比。首先，通过转染在HEK293细胞中表达的FLAG标记的重新编码因子可以被重新悬浮在NP40细胞溶解缓冲液中，所述缓冲液包括50mM Tris-HCl，pH值为7.4，250mM NaCl，5mM乙二胺四乙酸，1％NP-40和蛋白酶抑制剂。离心之后，用平衡的抗FLAG M2琼脂糖亲合凝胶加入收集的可溶部分。用磷酸缓冲液洗涤两次，加入0.1毫克/毫升FLAG肽(Sigma)洗提所得的FLAG标记蛋白质。

[0264] 人成纤维细胞和4或者6个纯化的蛋白质的悬浮溶液可以被用于该装置，并且将被处理的细胞放置于涂布0.1％明胶并含有调节的hESC培养基的平皿中，培养1、2或3天，随后进行下一次传递循环。在使用本发明微流体装置重复进行蛋白质传递循环(6-16次)后，将被处理的细胞放置在使用丝裂霉素C处理的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)中，并在常规hESC培养基中生长3-4周。在MEF上接种3周后可以观察到IPSC菌落。产生iPSC的效率可以与使用最初的CPP-融合重组蛋白质进行蛋白质传递的效率相比较。如之前所述，按照所有可靠iPSC标准彻底检查这些iPSC候选物，所述标准包括分子和细胞性质，以及体外和体内多能性。使

用4或6种因子会产生具有改善效率的iPSC系。还可以进一步的表达其他因子，例如Esrrb、Glisl和PRDM14，并且在重新编码实验中使用这些因子。

[0265] 重新编码的蛋白质和mRNA和/或微RNA可以结合传递。所述微流体装置不仅可以被用于传递蛋白质，还可以用于传递其他大分子。为了利用这种独特的性质进行最优的非基因组统一重新编码，可以结合使用重新编码因子和信使RNA和/或微RNA。尤其是，只使用微RNA就可以成功的产生iPSC系，这一点非常有意义。实际上，基于lipofectamine的微RNA转染可以产生iPSC-样菌落。由于与重新编码因子相比，微RNA可能在不同的机制中诱导重新编码，因此通过本发明微流体装置将重新编码蛋白质和微RNA适当的结合在一起，可以进一步提高重新编码效率。蛋白质和mRNA的结合传递能够显著的促进重新编码效率。因此，使用本发明的微流体装置能够传递最佳结合的蛋白质、mRNA、和/或微RNA。虽然微RNA/mRNA不能提供与蛋白质相等水平的参照，但是本发明装置的高通量最优化研究能力相对于之前的方法效率具有显著的增加。

[0266] 本发明微流体装置的独特性质能够传递各种量的因子，以一种受控制的并可重复的方式。本发明主题内容的优化可以促进一种可靠的、高效的工具的发展，用于将蛋白质传递入HF。这可以解释每种重新编码因子的最佳传递量和频率。与mRNA、质粒或者病毒方法所不同，本发明系统不依赖于基因表达和/或翻译的随机性质来确定转录因子的有效细胞内浓度。因此，该装置能直接将蛋白质传递到细胞质中，并将其放置在独特的位置来精确控制细胞内环境。可以进行一系列传递计划来改变处理频率(每天一次、每两天1次或者每3天一次)以及分别改变四个因子每个的蛋白质浓度。尤其是，一些报告显示高水平的Oct4对于有效的重新编码非常重要，可以使用不同浓度的Oct4检测该作用同时保持其他因子的浓度相同。对给定的细胞型评价不同浓度的c-Myc，这是因为在某些情况下已经发现高浓度的c-Myc会产生大多数转化菌落而不是iPSC。而且，可以检测更频繁的处理c-Myc的作用，这是由于在适当的浓度下c-Myc具有非常短的半衰期(大约30分)。

[0267] 使用这里描述的方法促进重新编码因子短暂处理的优化。每个因子都具有功能作用并且参与重新编码过程。在至少一个和有些情况下，需要结合这些因子实现理想的重新编码结果。例如，c-Myc已知能够抑制分化基因的表达。另外，Klf4已知抑制微RNA let-7，微RNA let-7与分化作用途径和多能性抑制作用有关。因此，在初始时，根据次最佳条件处理c-Myc和/或Klf4可以暂时调节重新编码作用。另外，虽然iPSC的产生不需要Nanog，但是本领域已知Nanog对于多能性的最终确定和保持是十分重要的。因此，可以检测在重新编码过程末期增加Nanog的作用。而且，检测连续处理的微RNA和蛋白质并比较各个处理方法之间和同时使用这些处理方法之后的重新编码效率。由于本发明微流体装置独特的性质，所述暂时调节的重新编码作用是可以实现的，并且对于进一步优化蛋白质的重新编码是十分重要的。通过将第28天的菌落数除以被处理的HF细胞数来计算重新编码效率。一旦完成，使用回归分析推导每个重新编码因子、其最佳浓度、最佳传递频率/时间的相对重要性，和因此而得到的产生iPSC的最佳方案。每个因子控制传递到每个细胞中的蛋白质数量和时间的能力阐明了每个因子在重新编码过程中的功能显著性，因此进一步提高了对细胞重新编码过程和多能性建立的了解。另外，该工作的结果可用于进一步改善装置设计从而满足重新编码的具体需要并最终发展成临床使用的版本。

[0268] 如上所述，使用优化的蛋白质重新编码方法，本发明方案通常可以被用于病人特

异性成人成纤维细胞。由于ESC和iPSC可以有效分化成功能性多巴胺神经元并且以及研究了其移植作用，因此可以从来源于帕金森病人的人成纤维细胞中产生iPSC或iPSC细胞系。一旦产生了IPSC细胞系并对其定性，这种细胞可以被诱导分化成多巴胺神经元并表征其细胞、分子、生理学和电生理学性质。在移植入帕金森氏病动物模型(例如遗传性PD模型或者aphakia小鼠)之后，在体内检测多巴胺神经元的功能性。

[0269] 基于微流体的蛋白质传递可以被用于直接细胞转化，例如，直接将成纤维细胞转化成其他细胞类型，例如功能性神经元、肝细胞和血细胞。过去，使用关键转录因子的病毒表达的操作方法造成重要的染色体分裂和基因突变，从而使开发非病毒、基因组非整合转化方法的需要更加显著，例如在这里描述的直接蛋白质传递方法。因此，该装置可以用基于微流体系统的蛋白质传递进行直接细胞转化。由于有时，某些转录因子的哺乳动物表达被激发，使之更易于使用一个或两个蛋白质因子进行检验。然后，有可能使用单个因子(例如，Oct4或者Sox2)将成纤维细胞转化为另一个细胞历程，从而分别产生血液或者神经前体。这些蛋白质在纯化的形式更易于应用，用于通过基于微流体的蛋白质传递进行细胞转化。

[0270] 图44是条形图，使用本发明微流体装置和相关方法对活性siRNA序列和被搅乱的参照进行处理48小时之后，测定绿色荧光蛋白质(GFP)强度，显示了HESC中的绿色荧光蛋白质(GFP)抑制作用。图45A和图45B显示了在传递了3kDa蓝染料之后的染料强度和人胚胎干细胞的存活率。

[0271] 其他的实施方案也包括在本发明的范围和精神内。例如，由于软件的性质，上述功能可以使用软件、硬件、操作系统、有线通信系统或者任何这些的结合来实施。特征实施功能也可以物理上位于各个位置，包括被分配的位置，因此所述功能可以在不同的物理地点实施。

[0272] 请注意一个或者一个以上的参考文献通过引证在此并入本文。如果任何被并入本文的材料与本发明的公开不一致，则以本发明的公开为准。而且，在需要的情况下，被并入本文的材料应该被忽视从而保证本发明权利要求的准确性。

[0273] 而且，尽管上面对本发明进行了描述，所述描述可以包括不止一个发明。

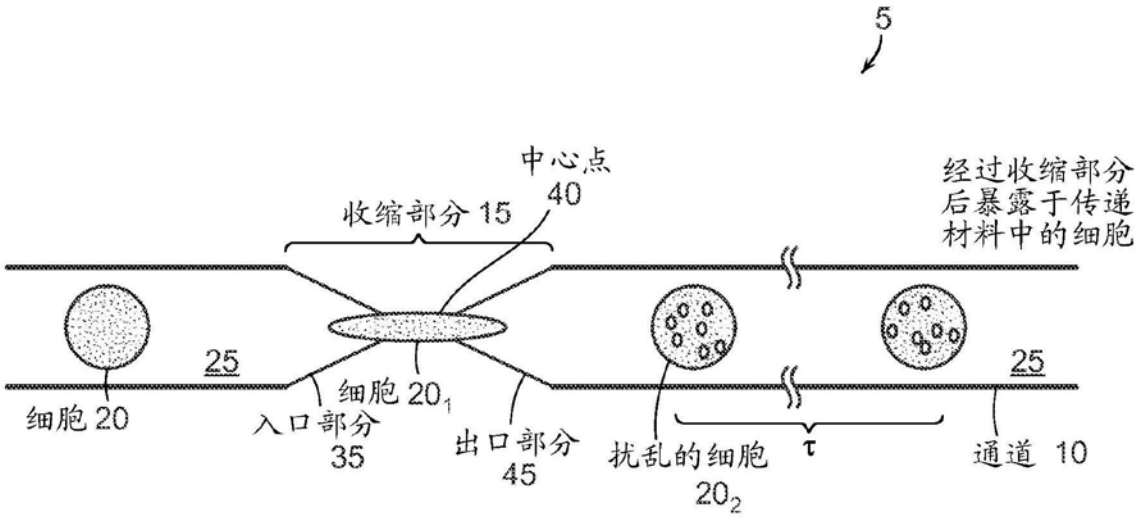

5
中心点
40
收缩部分 15
经过收缩部分
后暴露于传递
材料中的细胞
25
细胞 20
细胞 20_1
入口部分
35
出口部分
45
扰乱的细胞
20_2
τ
25
通道 10

图1A

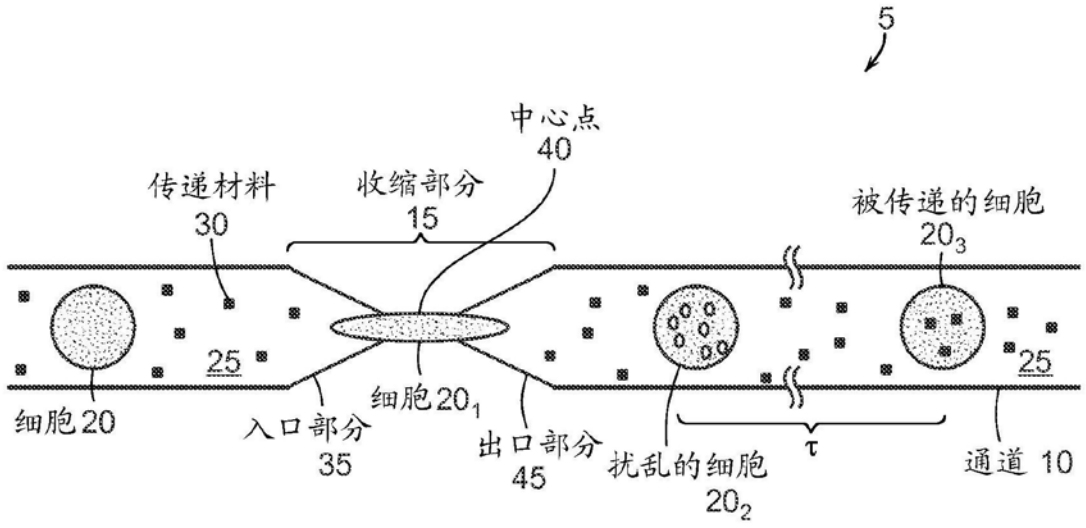

5
中心点
40
传递材料
30
收缩部分
15
被传递的细胞
20_3
25
细胞 20
细胞 20_1
入口部分
35
出口部分
45
扰乱的细胞
20_2
τ
25
通道 10

图1B

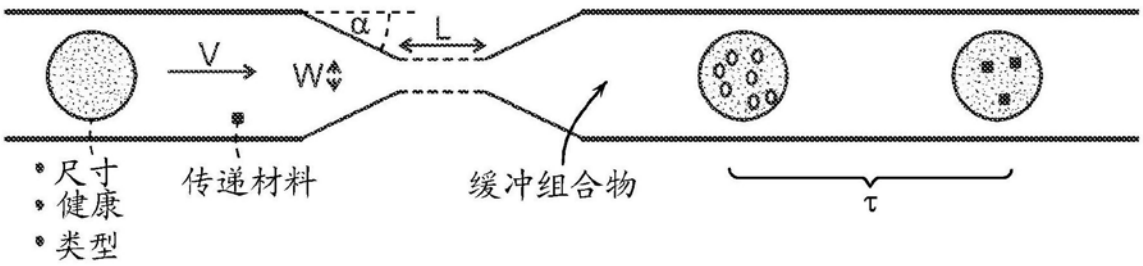

α
L
V
W
• 尺寸
• 健康
• 类型
传递材料
缓冲组合物
τ

图2A

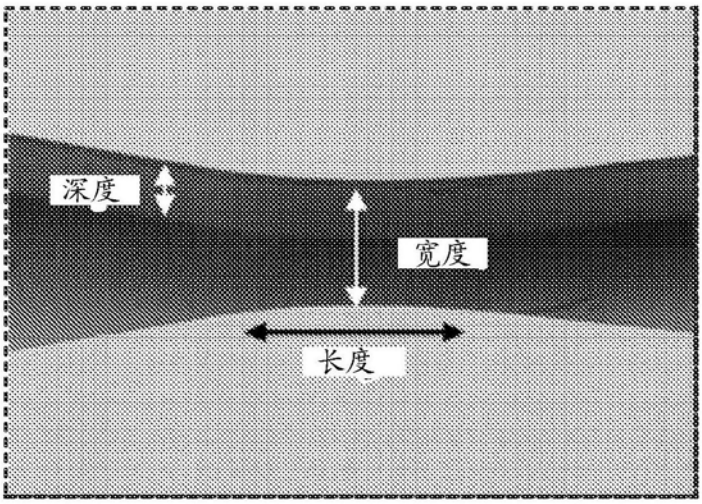


图2B

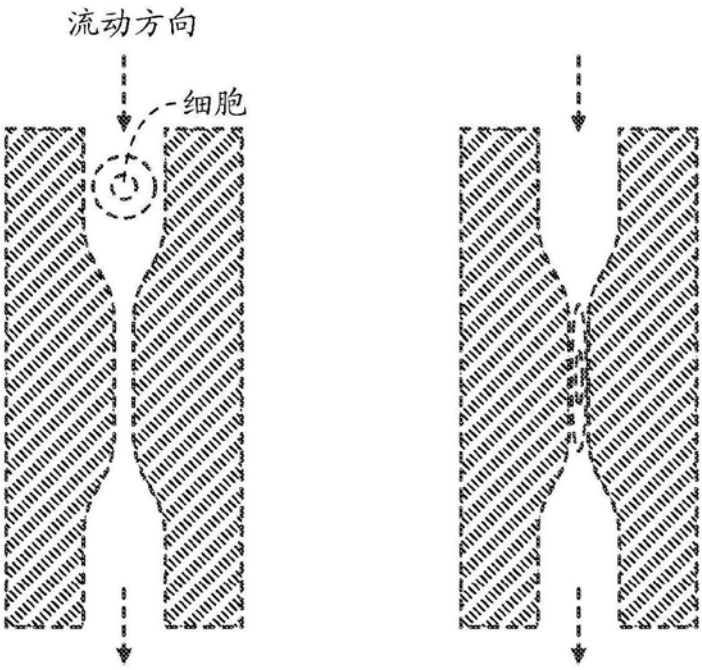


图3

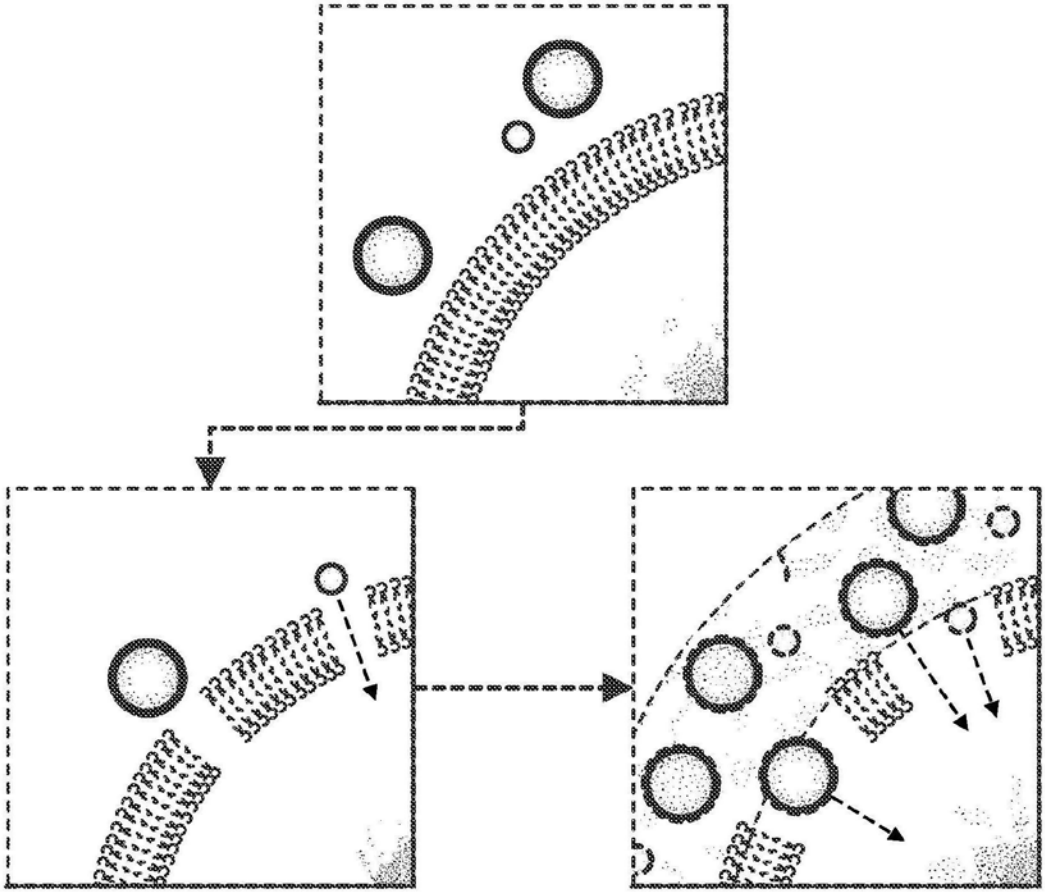


图4

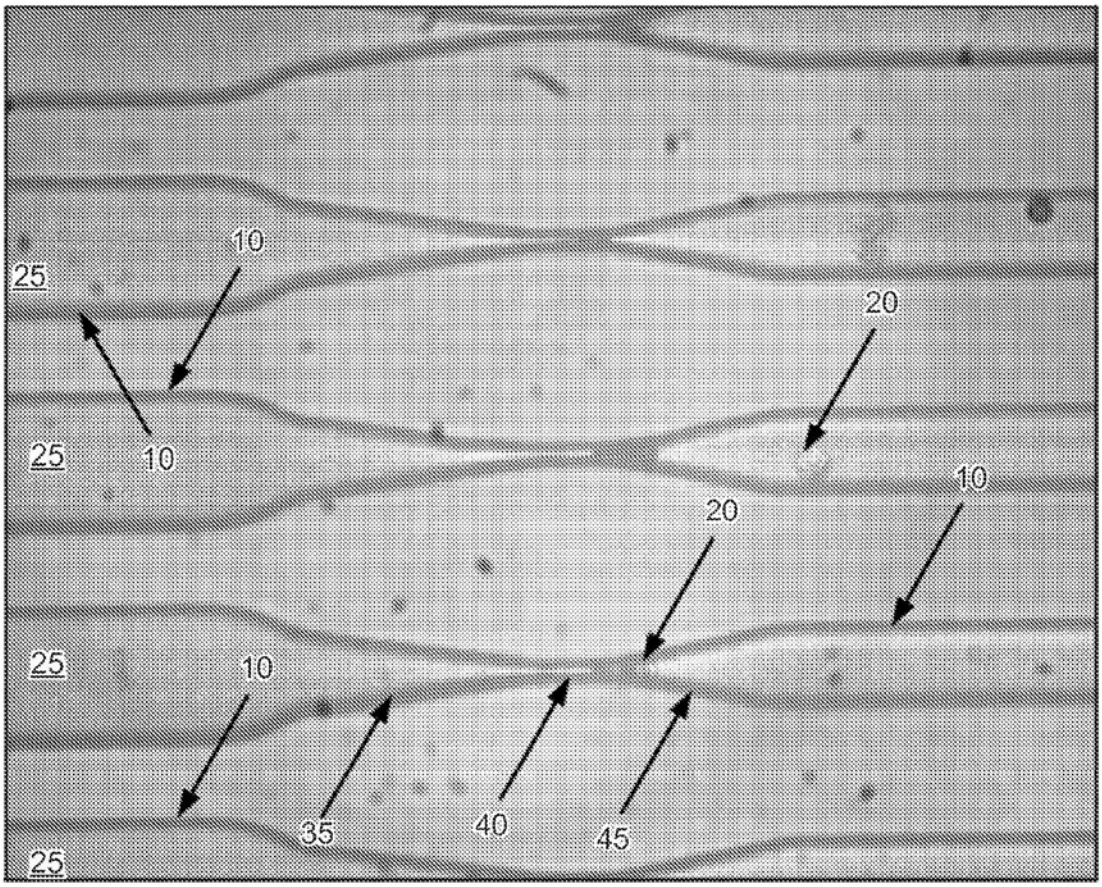

10
25
20
25
10
10
20
25
10
35
40
45
25

图5

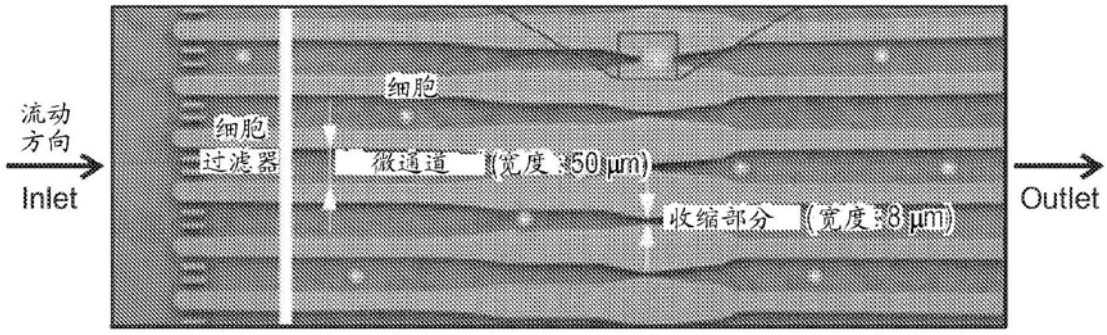

流动
方向
Inlet
细胞
细胞
过滤器
微通道
(宽度:50μm)
收缩部分
(宽度:8μm)
Outlet

图6

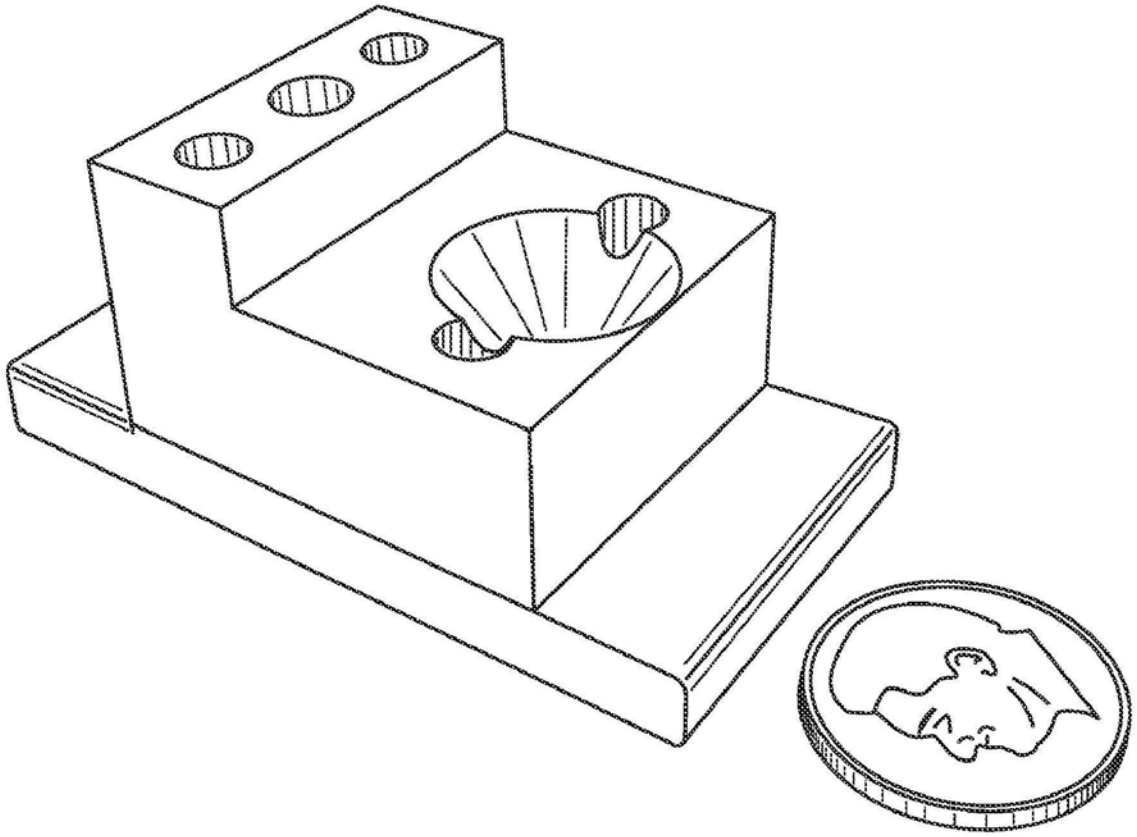


图7

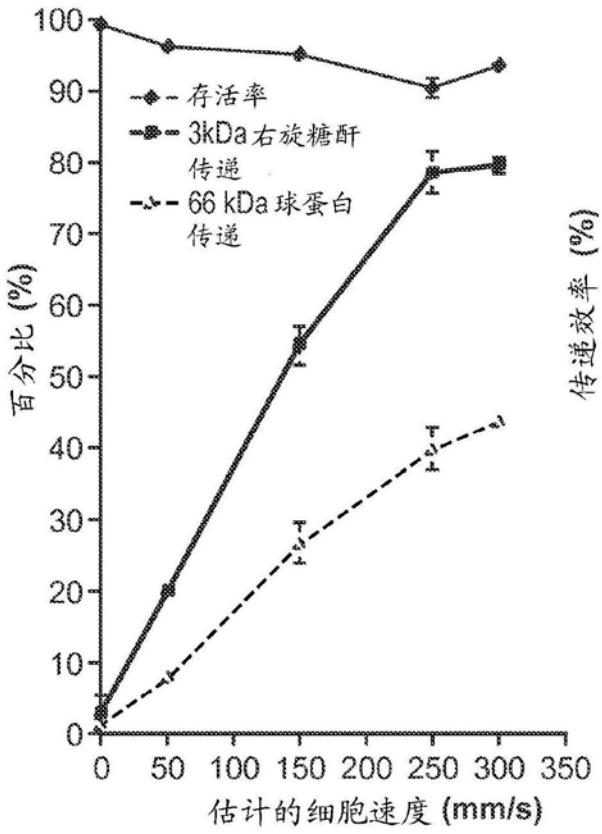

存活率
3kDa右旋糖酐传递
66 kDa球蛋白传递
百分比 (%)
估计的细胞速度 (mm/s)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0 50 100 150 200 250 300 350

图 8A

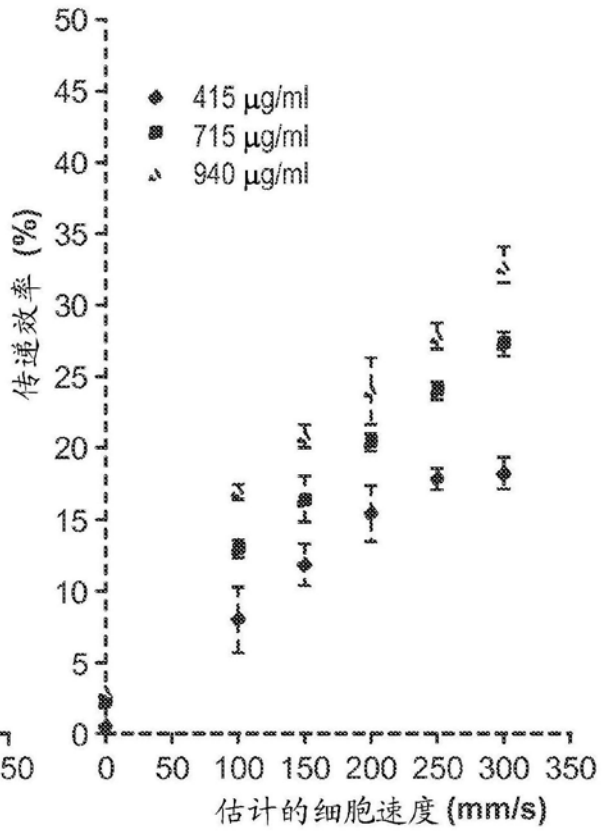

415 µg/ml
715 µg/ml
940 µg/ml
传递效率 (%)
估计的细胞速度 (mm/s)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
0 50 100 150 200 250 300 350

图 8B

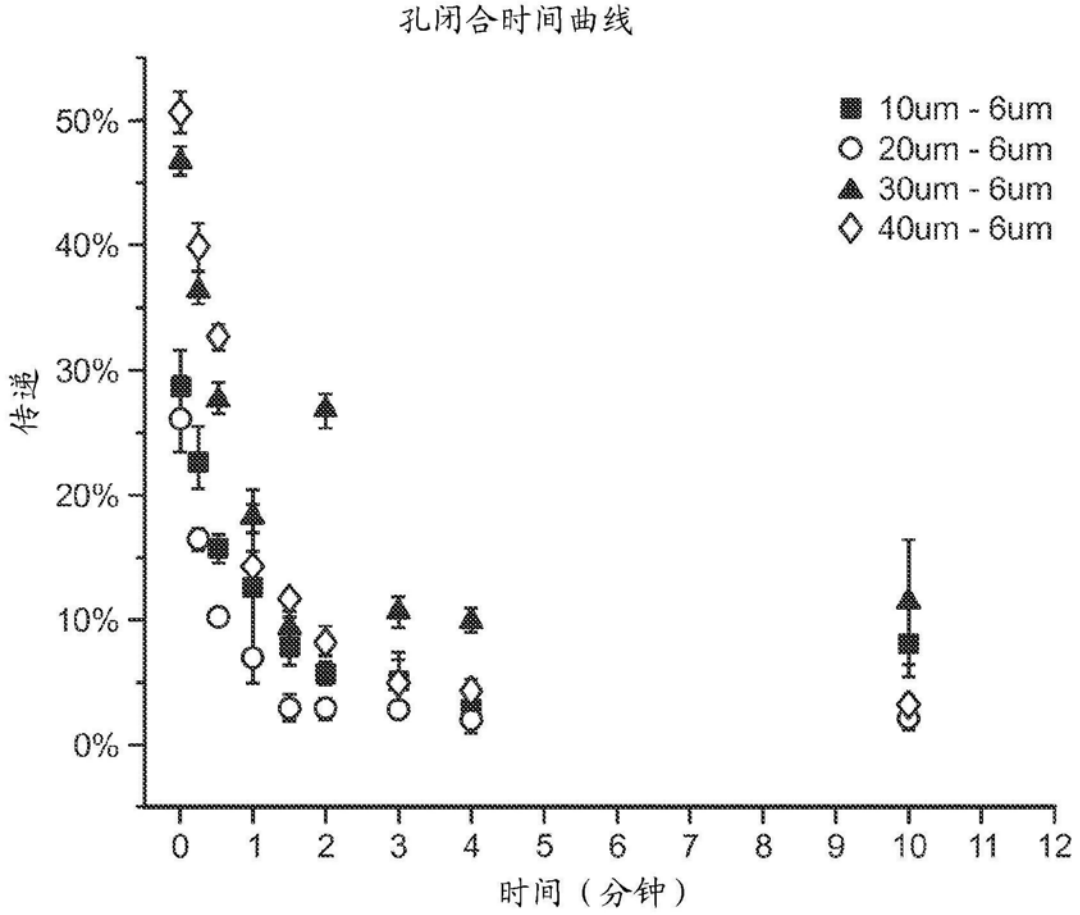

孔闭合时间曲线
10um - 6um
20um - 6um
30um - 6um
40um - 6um
传递
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
时间（分钟）

图9

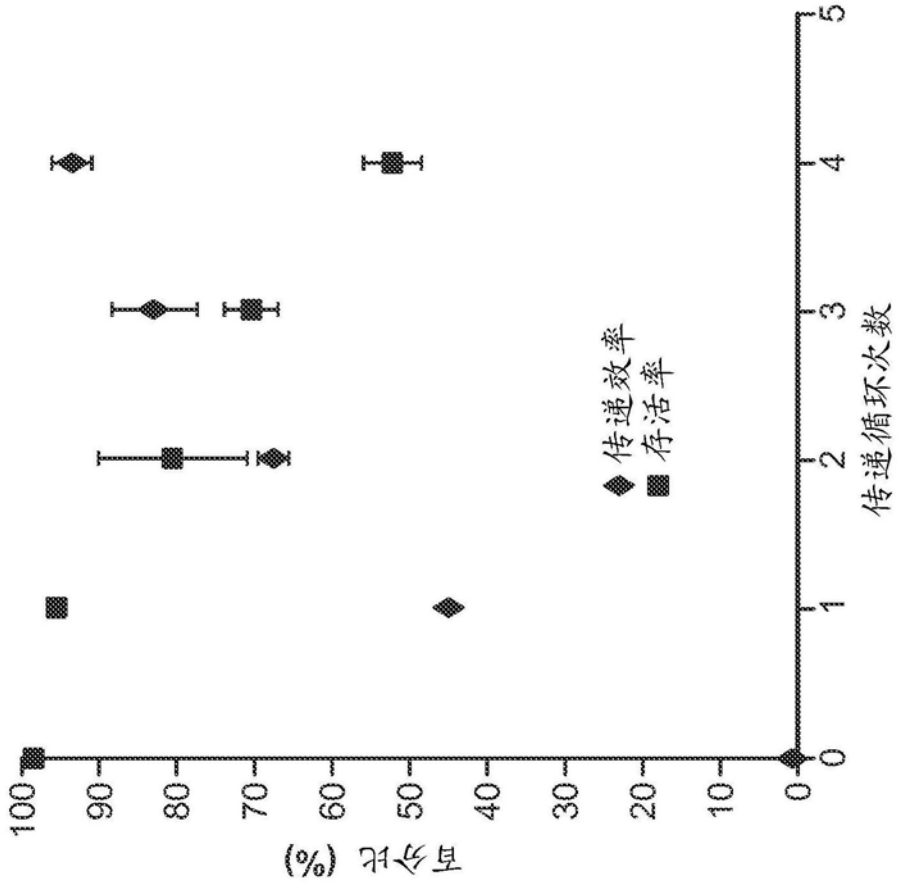


图10

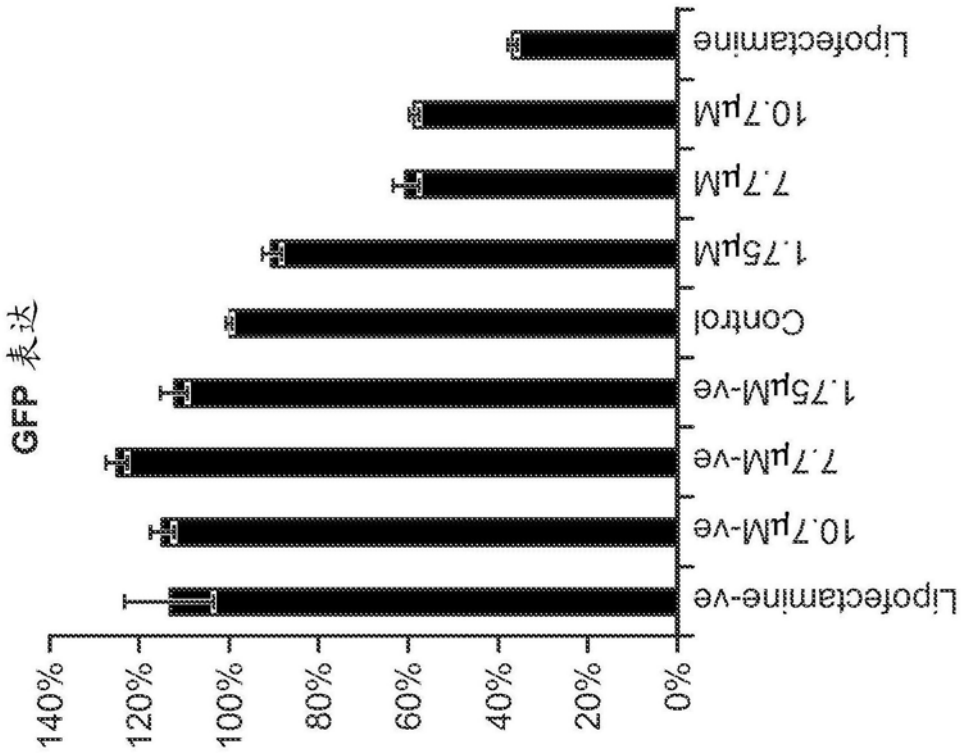

GFP 表达
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Lipofectamine-ve
10.7μM-ve
7.7μM-ve
1.75μM-ve
Control
1.75μM
7.7μM
10.7μM
Lipofectamine

图11

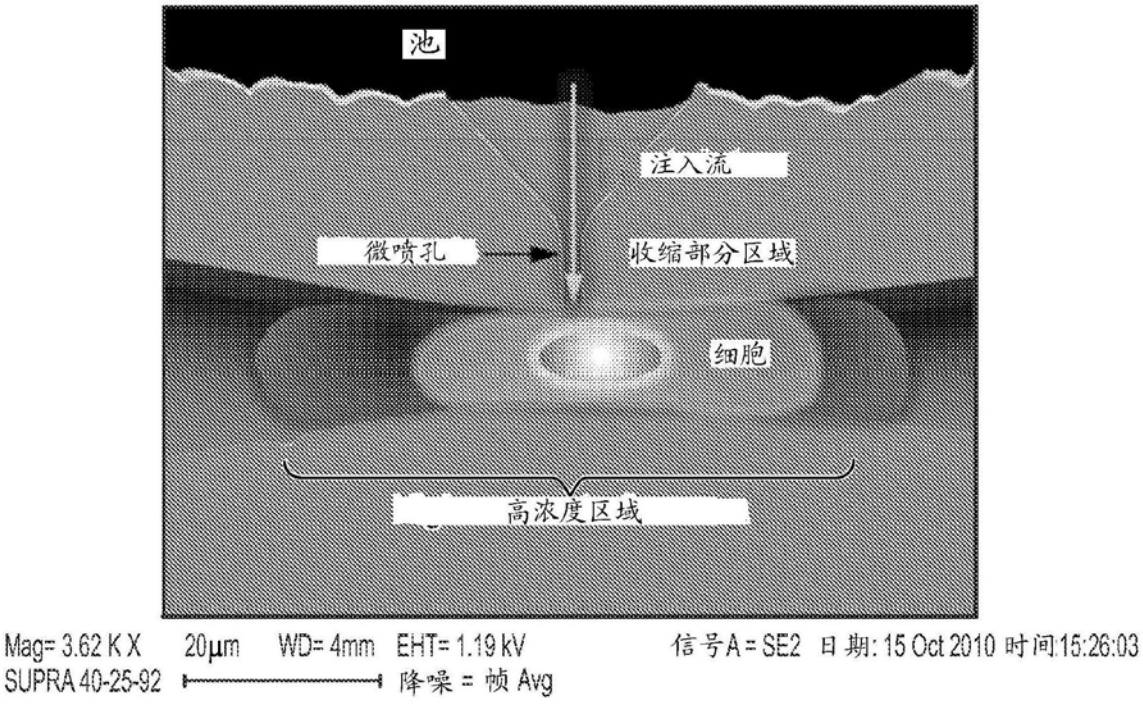
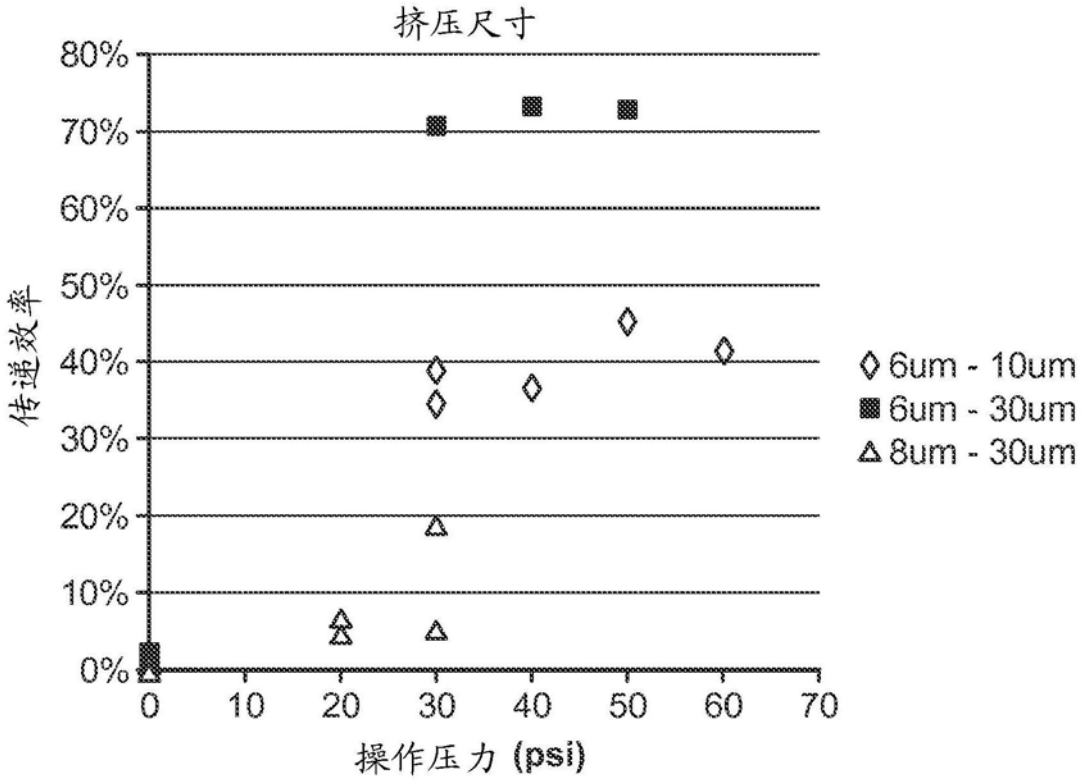

池
注入流
微喷孔
收缩部分区域
细胞
高浓度区域
Mag= 3.62 K X 20μm WD= 4mm EHT= 1.19 kV
信号A = SE2 日期: 15 Oct 2010 时间:15:26:03
SUPRA 40-25-92
降噪 = 帧 Avg

图12


挤压尺寸
传递效率
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0
10
20
30
40
50
60
70
操作压力 (psi)
6um - 10um
6um - 30um
8um - 30um

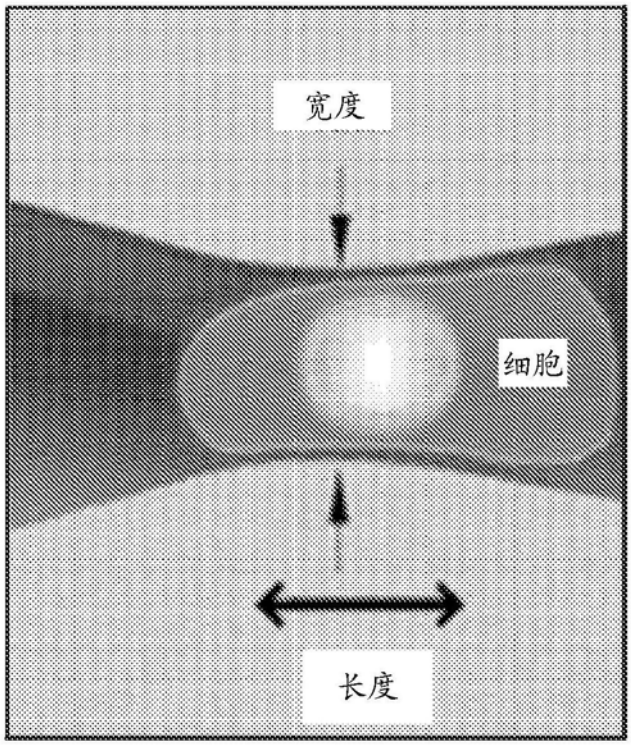

宽度
细胞
长度

图13

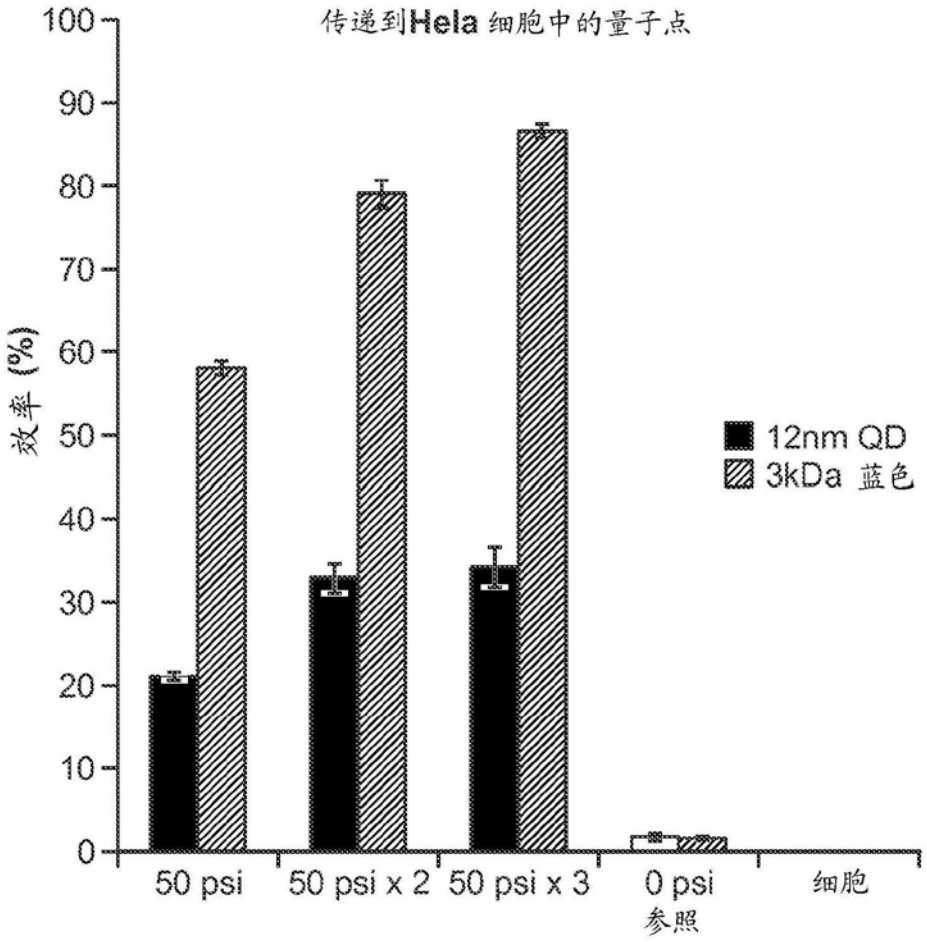

传递到Hela细胞中的量子点
效率 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
12nm QD
3kDa 蓝色
50 psi
50 psi x 2
50 psi x 3
0 psi
参照
细胞

图14

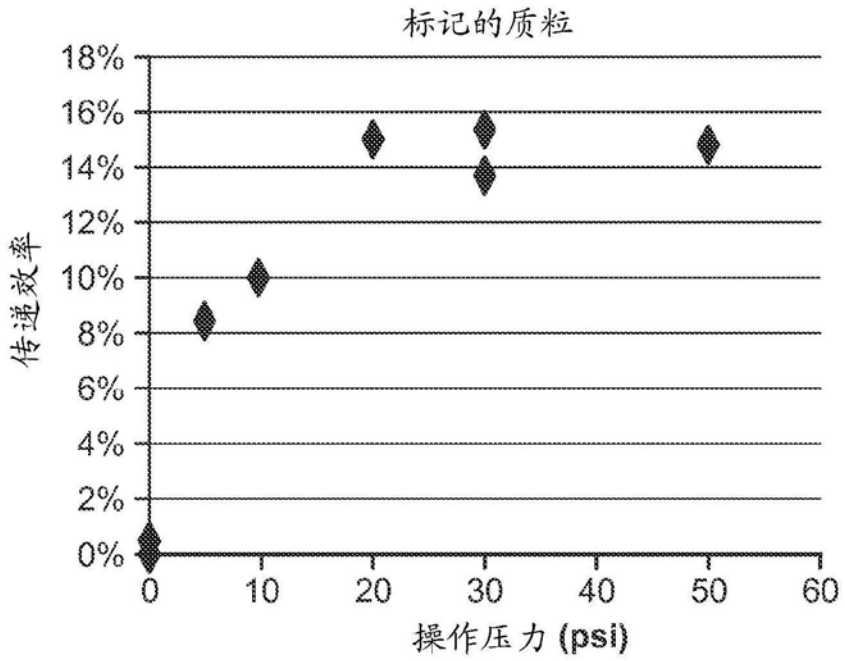


图15

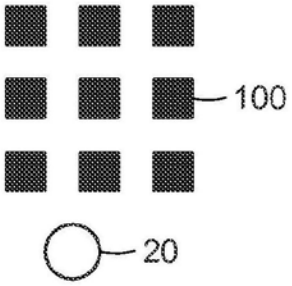


图16A

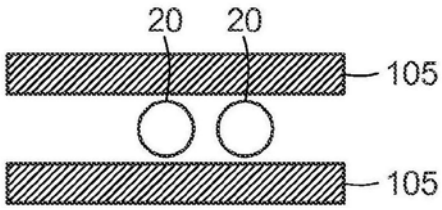


图16B

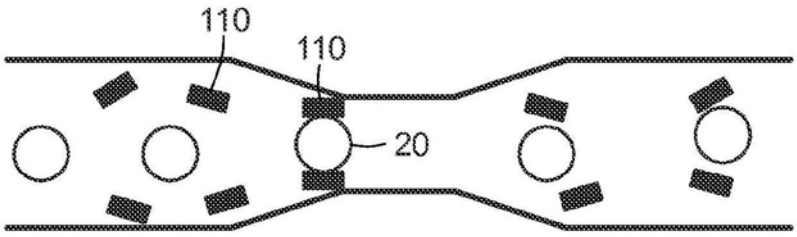


图16C

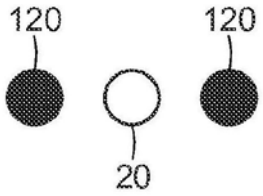


图16D

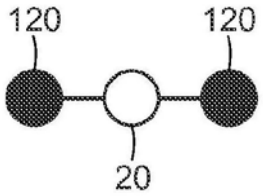


图16E

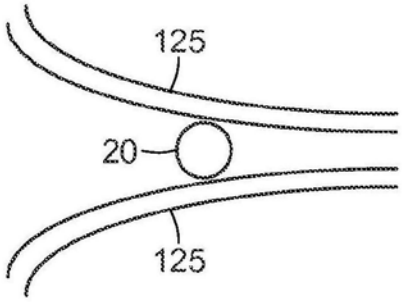


图16F

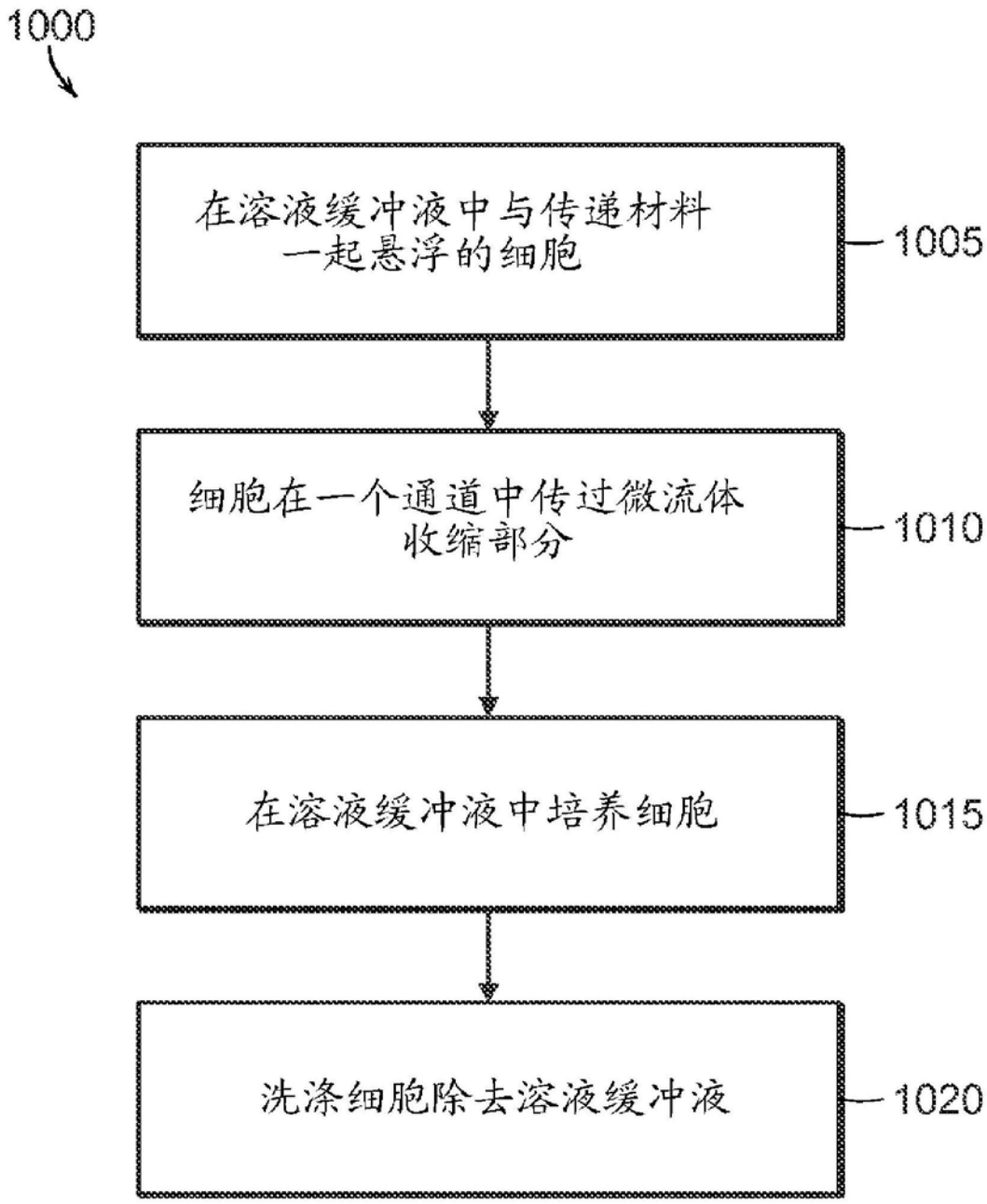

1000
在溶液缓冲液中与传递材料一起悬浮的细胞
1005
细胞在一个通道中传过微流体收缩部分
1010
在溶液缓冲液中培养细胞
1015
洗涤细胞除去溶液缓冲液
1020

图17

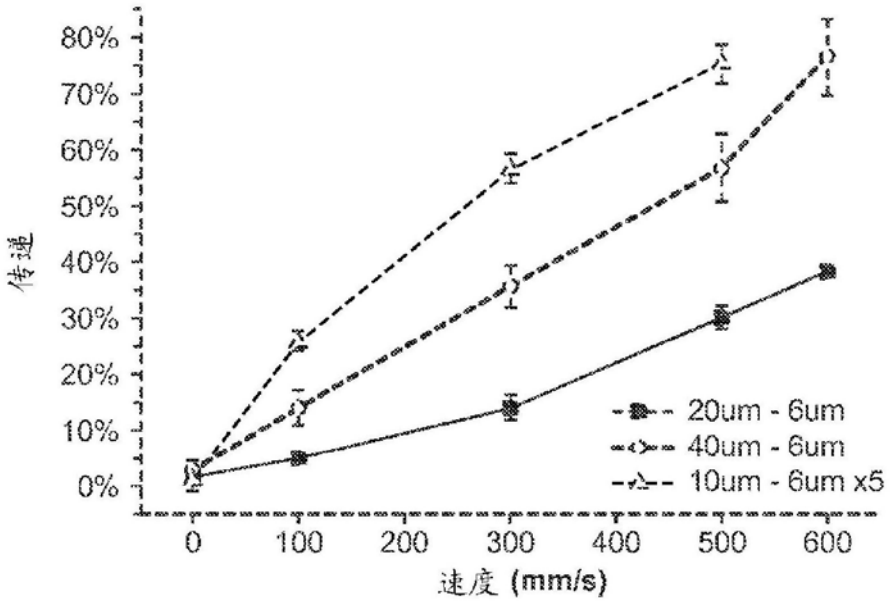

80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
传递
0
100
200
300
400
500
600
速度 (mm/s)
20um - 6um
40um - 6um
10um - 6um x5

图18A

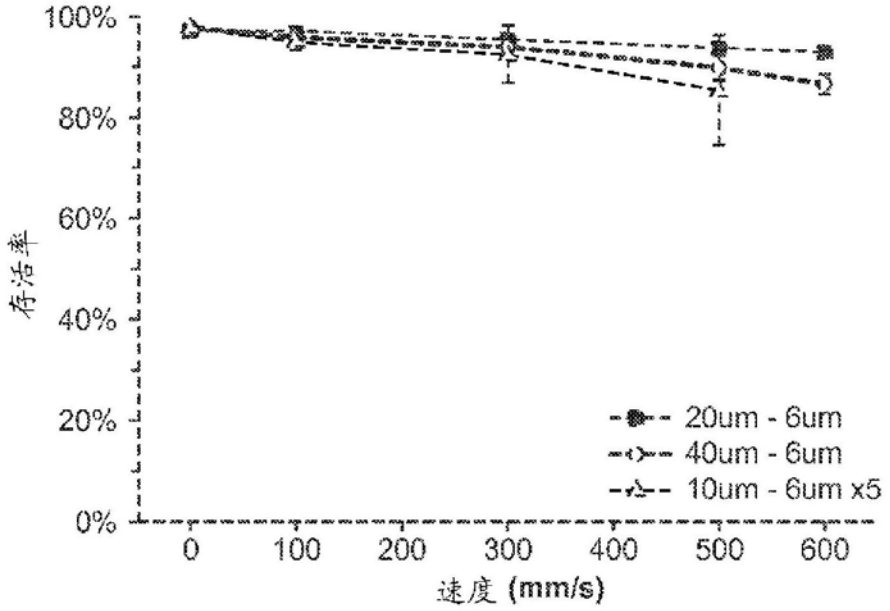

100%
80%
60%
40%
20%
0%
存活率
0
100
200
300
400
500
600
速度 (mm/s)
20um - 6um
40um - 6um
10um - 6um x5

图18B

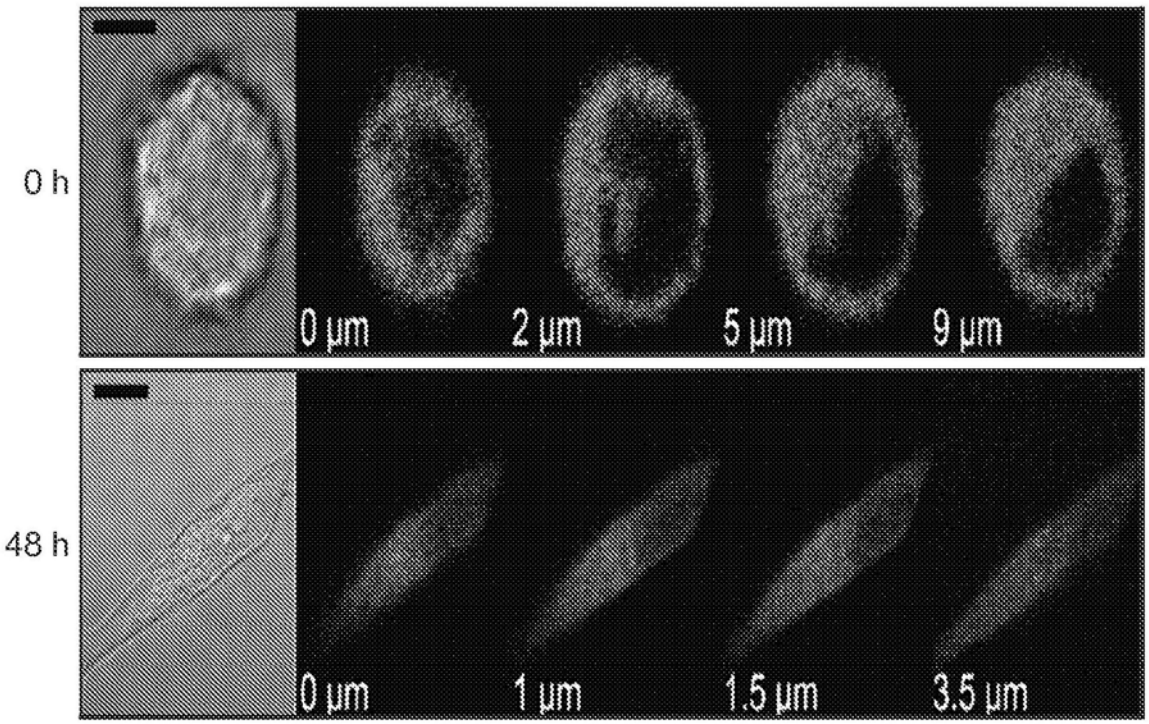

0 h
0 μm
2 μm
5 μm
9 μm
48 h
0 μm
1 μm
1.5 μm
3.5 μm

图19

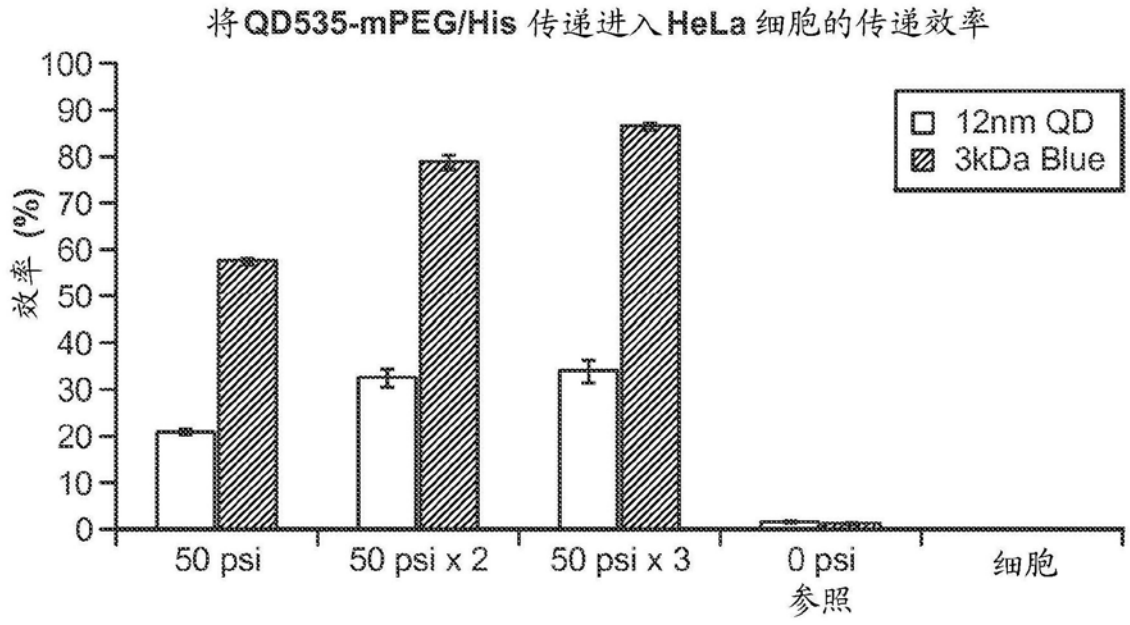

将QD535-mPEG/His 传递进入HeLa 细胞的传递效率
效率 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
12nm QD
3kDa Blue
50 psi
50 psi x 2
50 psi x 3
0 psi
参照
细胞

图20A

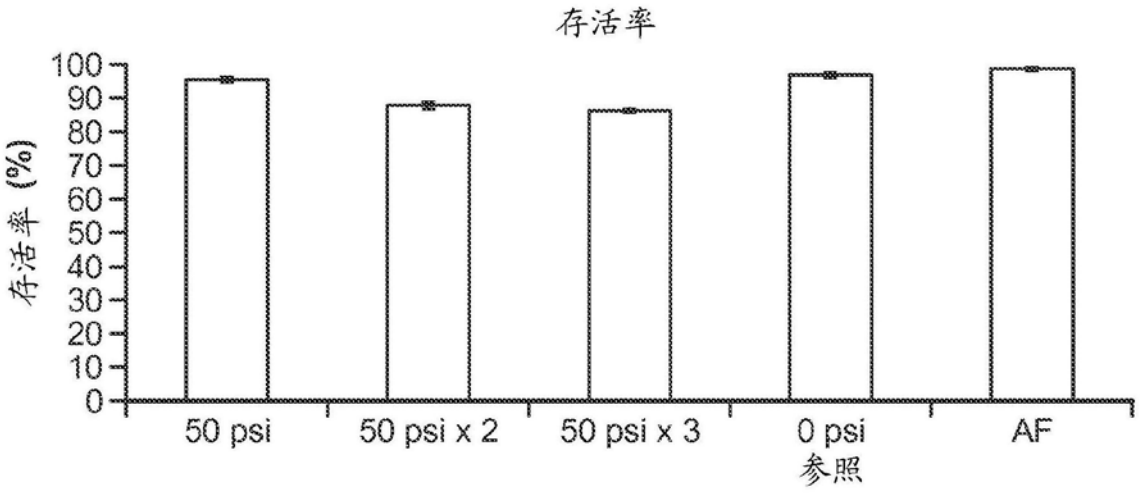

存活率
存活率 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
50 psi
50 psi x 2
50 psi x 3
0 psi
参照
AF

图20B

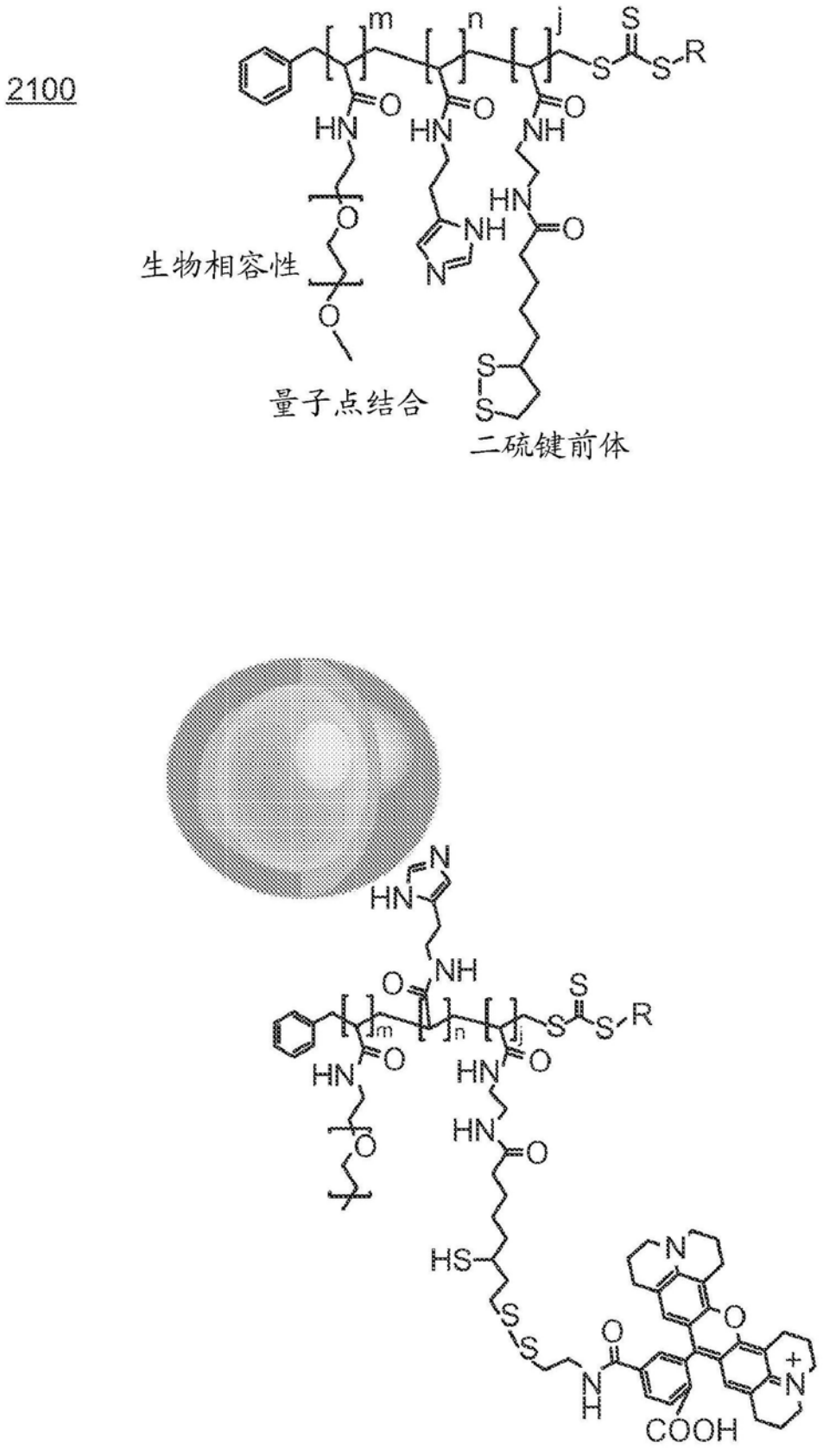


图21A

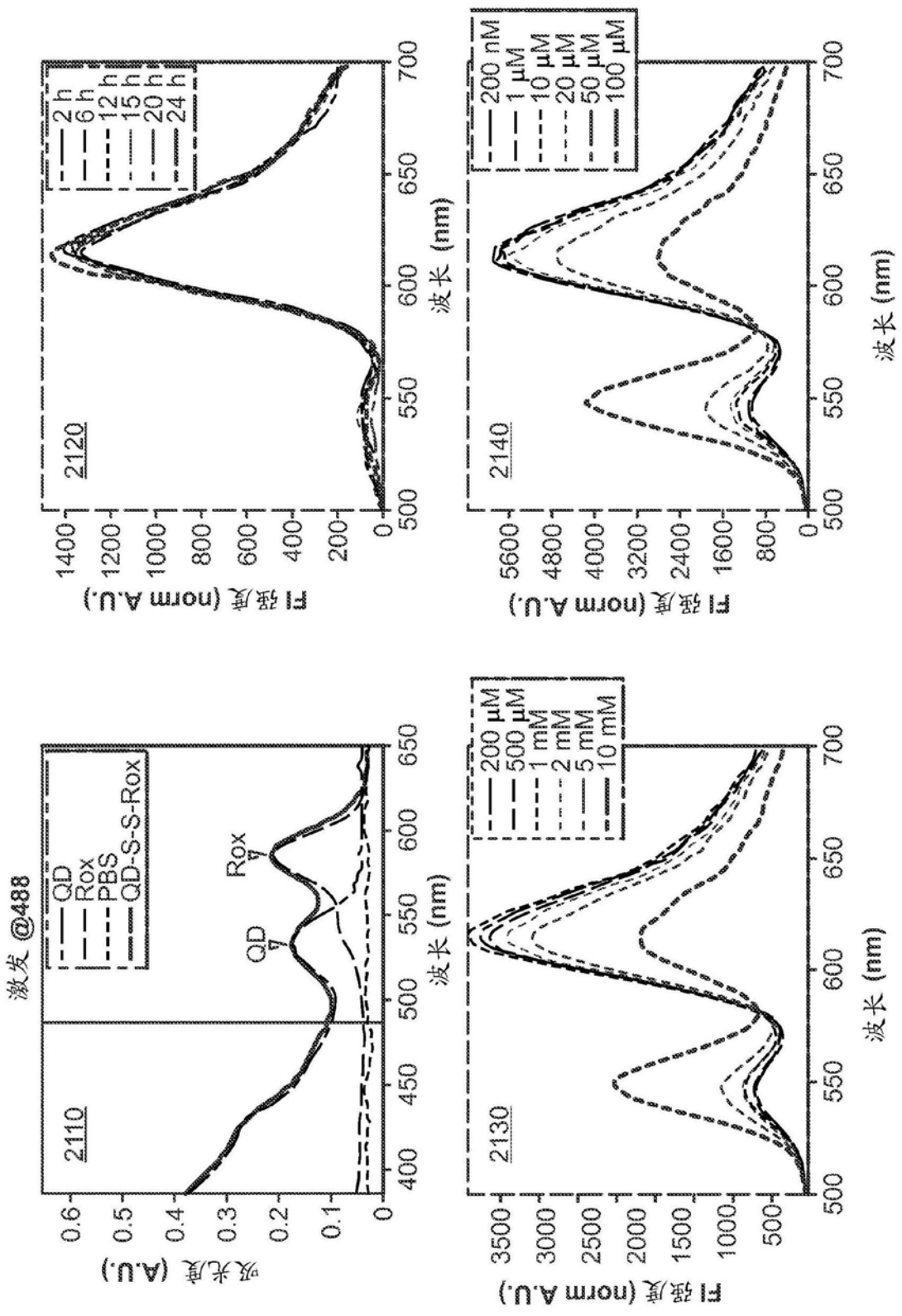

激发 @488
2110
QD
Rox
PBS
QD-S-S-Rox
Rox
QD
吸光度 (A.U.)
波长 (nm)
2120
2 h
6 h
12 h
15 h
20 h
24 h
FI 强度 (norm A.U.)
波长 (nm)
2130
200 μM
500 μM
1 mM
2 mM
5 mM
10 mM
FI 强度 (norm A.U.)
波长 (nm)
2140
200 nM
1 μM
10 μM
20 μM
50 μM
100 μM
FI 强度 (norm A.U.)
波长 (nm)

图21B

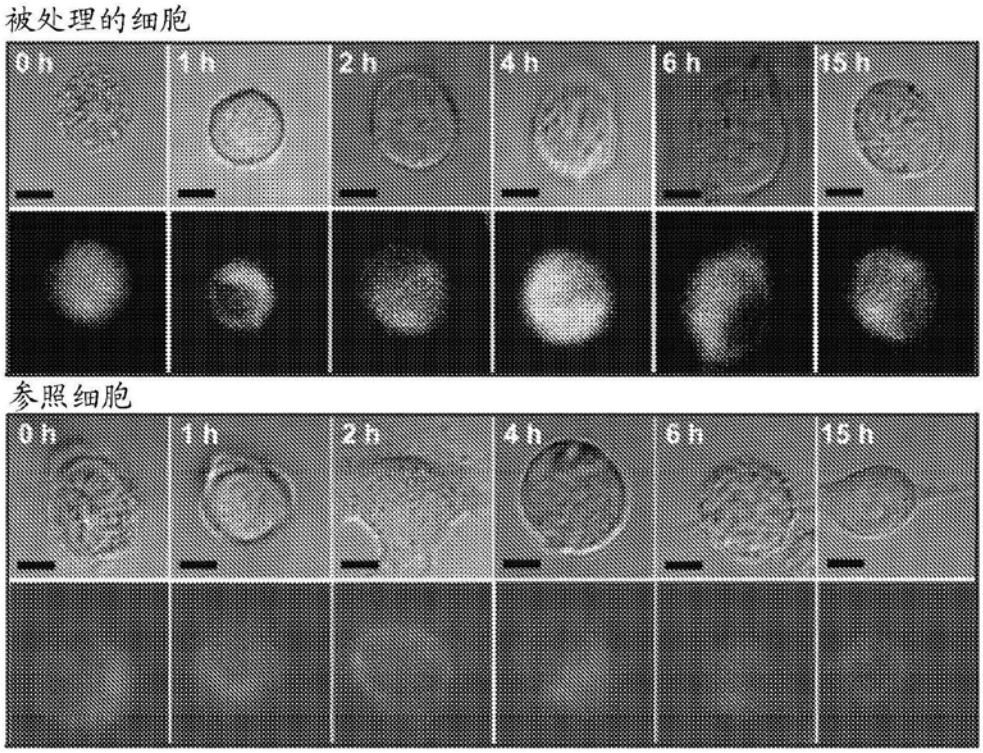

被处理的细胞
0 h
1 h
2 h
4 h
6 h
15 h
参照细胞
0 h
1 h
2 h
4 h
6 h
15 h

图22A

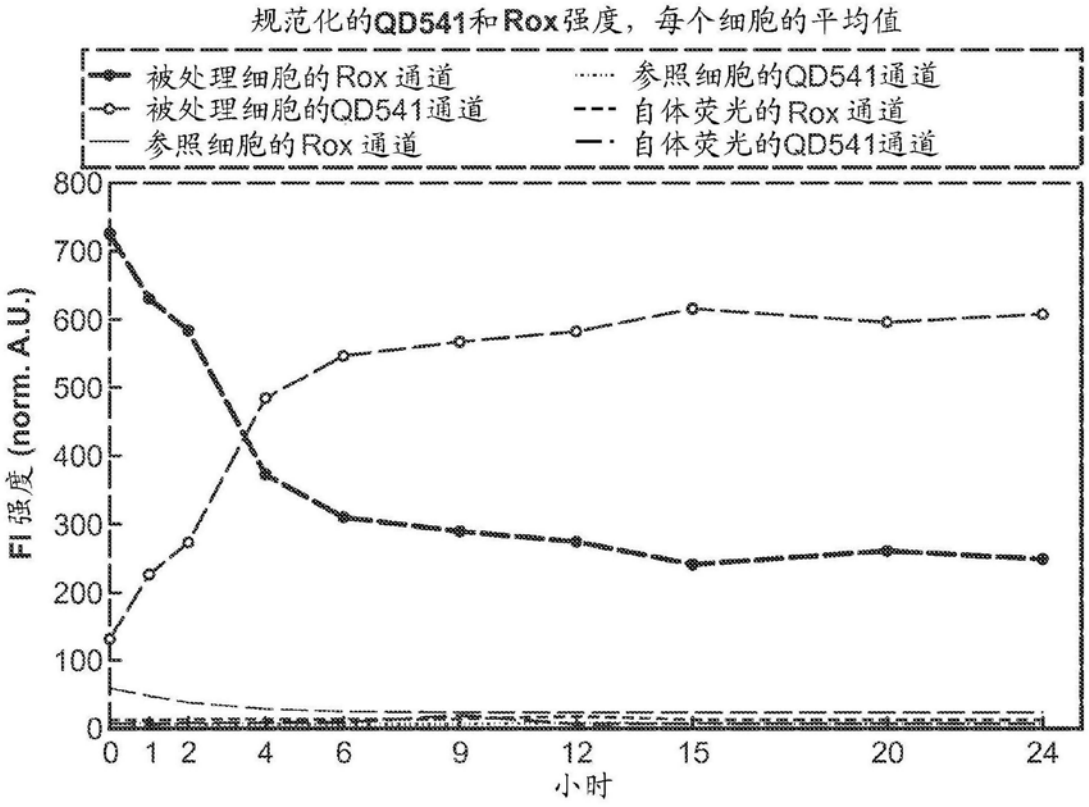

规范化的QD541和Rox强度，每个细胞的平均值
被处理细胞的Rox通道
被处理细胞的QD541通道
参照细胞的Rox通道
参照细胞的QD541通道
自体荧光的Rox通道
自体荧光的QD541通道
FI强度 (norm. A.U.)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 1 2 4 6 9 12 15 20 24
小时

图22B

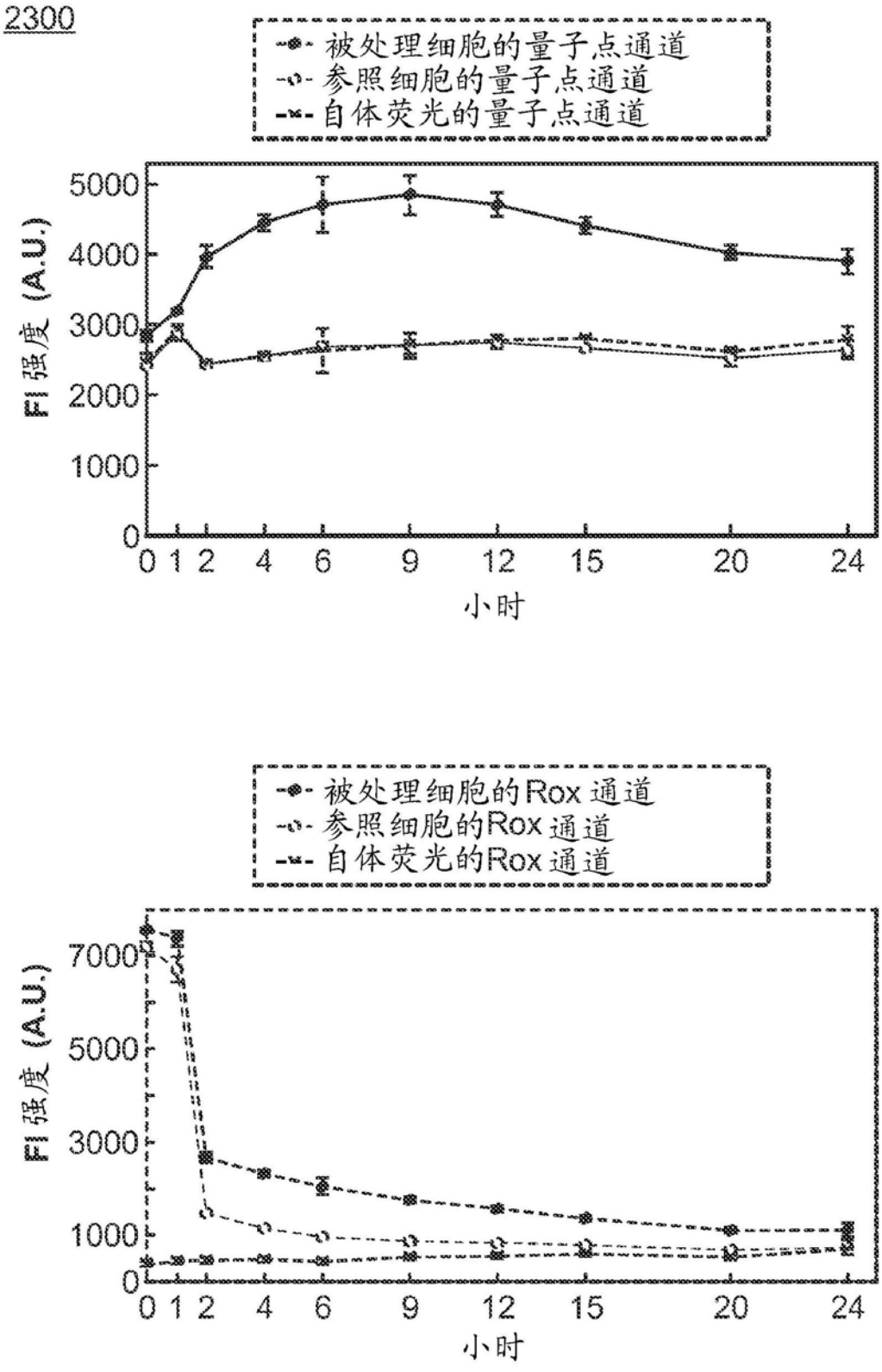
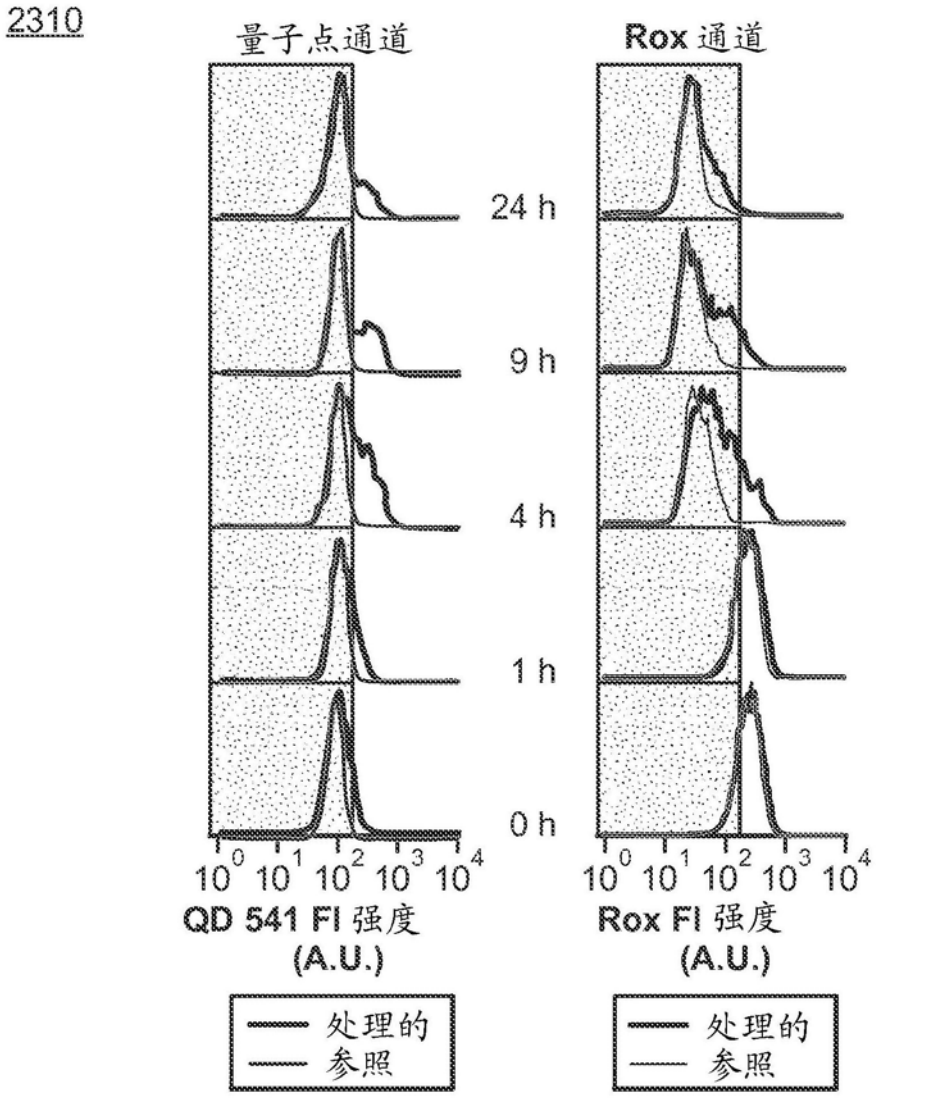

2300
被处理细胞的量子点通道
参照细胞的量子点通道
自体荧光的量子点通道
FI 强度 (A.U.)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0 1 2 4 6 9 12 15 20 24
小时
被处理细胞的Rox 通道
参照细胞的Rox 通道
自体荧光的Rox 通道
FI 强度 (A.U.)
7000
5000
3000
1000
0
0 1 2 4 6 9 12 15 20 24
小时

图23A


2310
量子点通道
Rox 通道
24 h
9 h
4 h
1 h
0 h
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
QD 541 FI 强度
(A.U.)
Rox FI 强度
(A.U.)
处理的
参照
处理的
参照

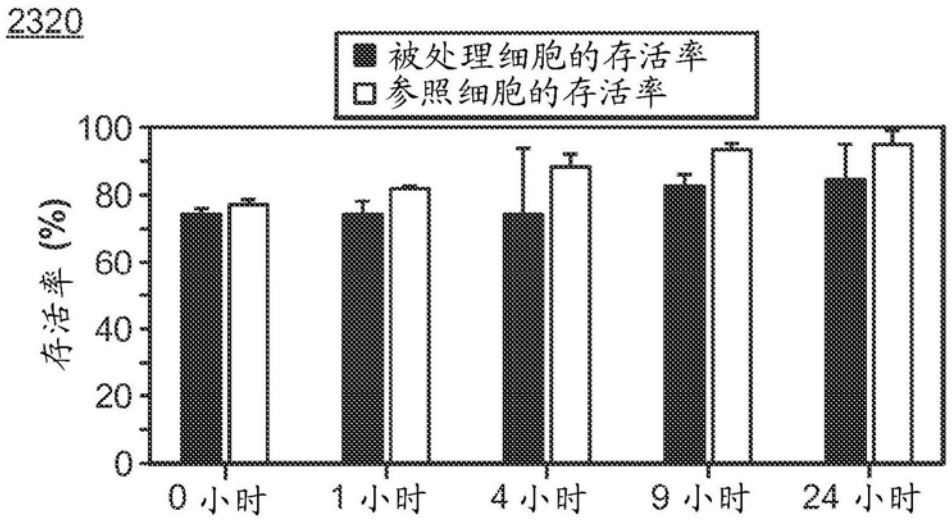

2320
被处理细胞的存活率
参照细胞的存活率
存活率 (%)
100
80
60
40
20
0
0 小时
1 小时
4 小时
9 小时
24 小时

图23B

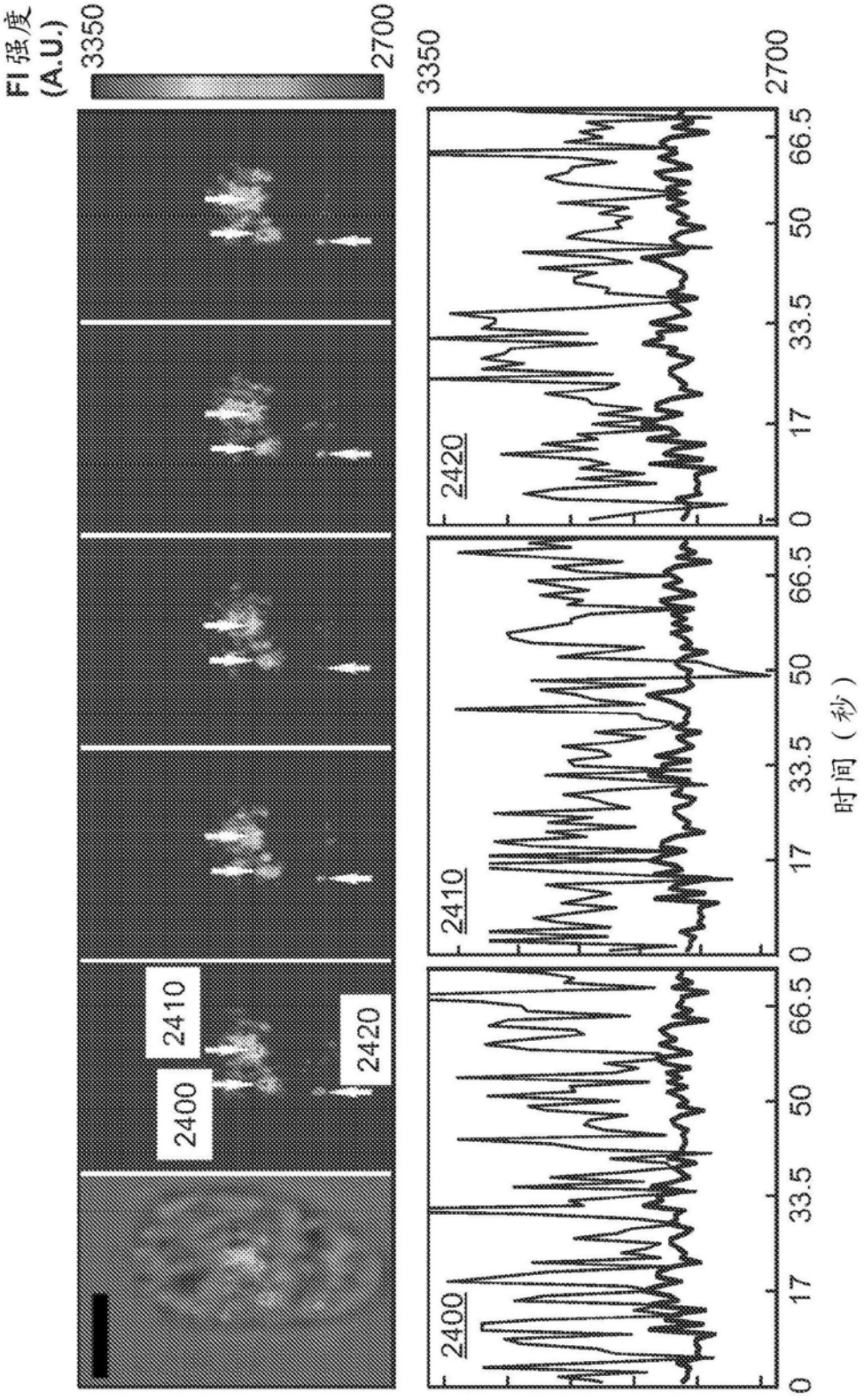


图24

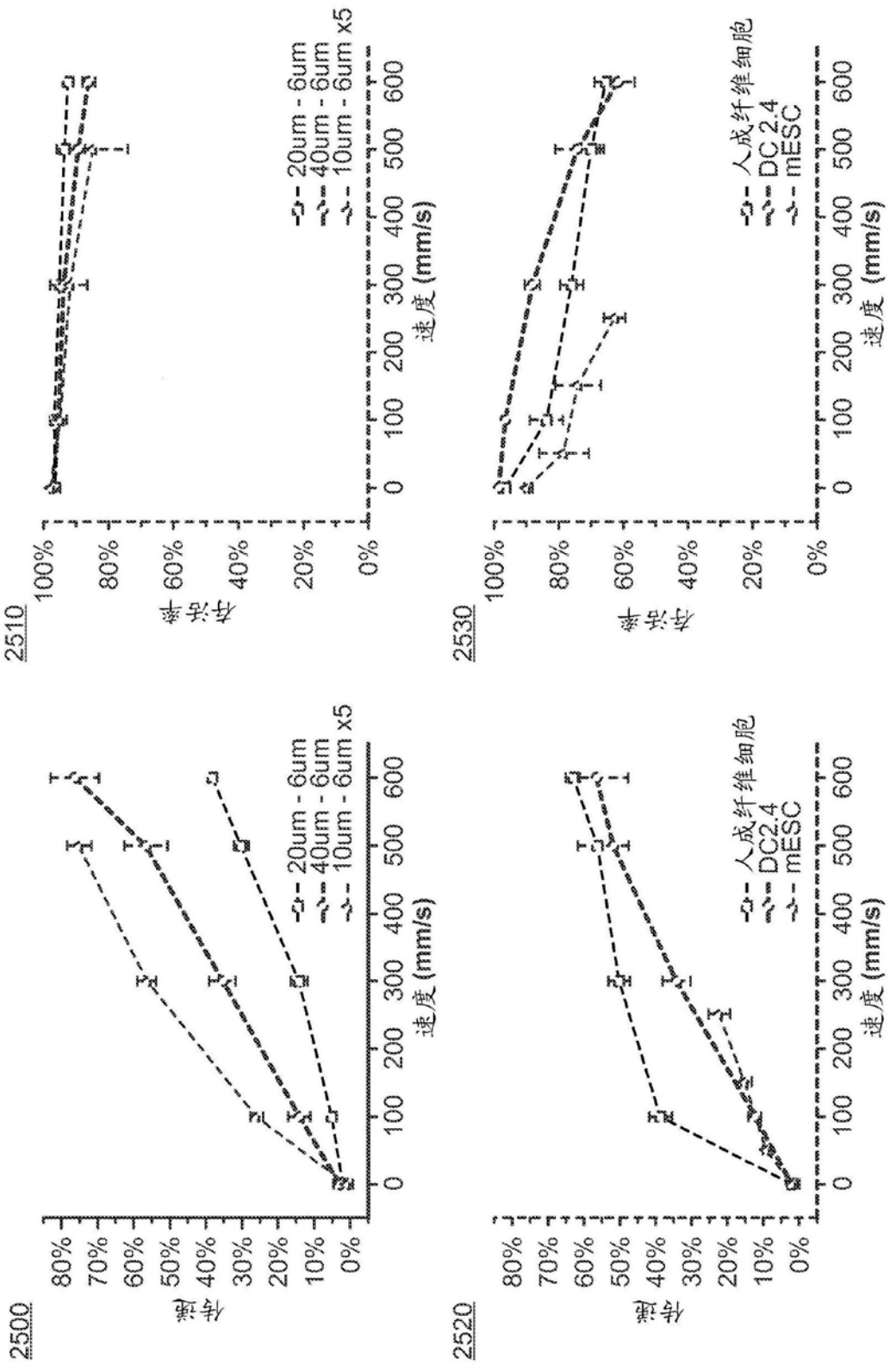

2500
传递
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0
100
200
300
400
500
600
速度 (mm/s)
20um - 6um
40um - 6um
10um - 6um x5
2510
存活率
100%
80%
60%
40%
20%
0%
20um - 6um
40um - 6um
10um - 6um x5
速度 (mm/s)
2520
传递
人成纤维细胞
DC2.4
mESC
速度 (mm/s)
2530
存活率
人成纤维细胞
DC 2.4
mESC
速度 (mm/s)

图25

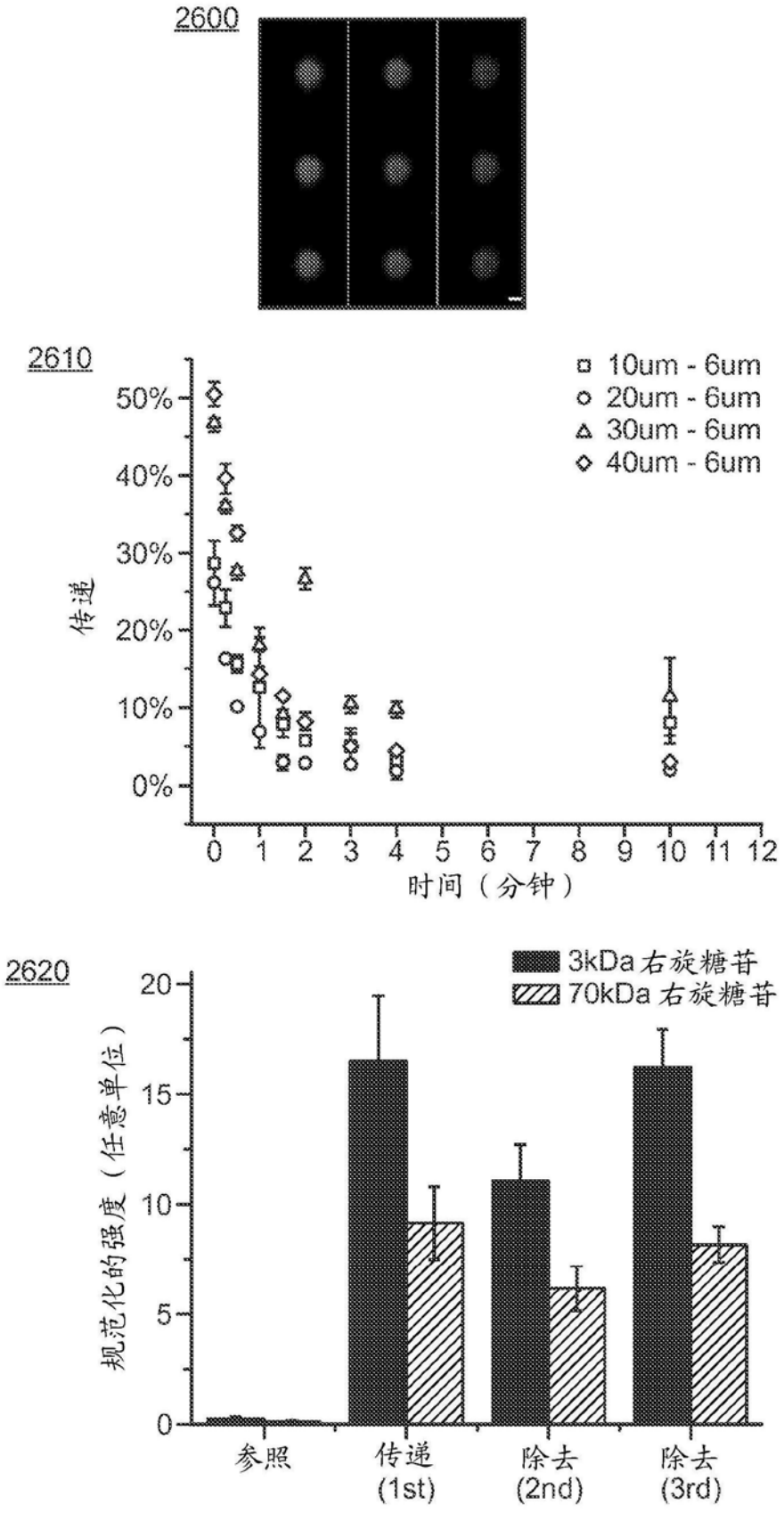
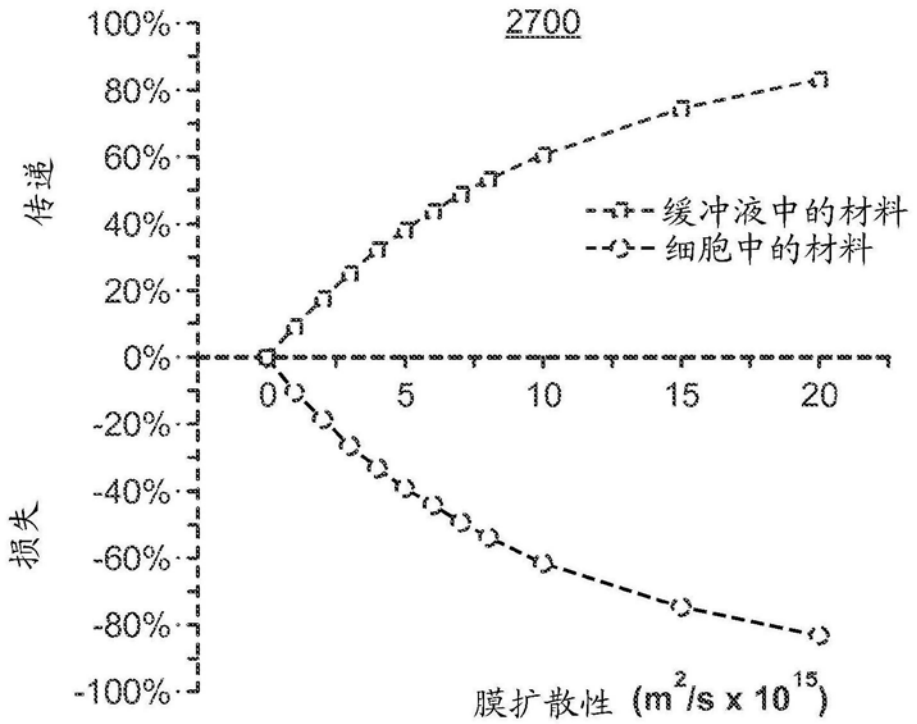

2600
2610
10um - 6um
20um - 6um
30um - 6um
40um - 6um
传递
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
时间（分钟）
2620
3kDa 右旋糖苷
70kDa 右旋糖苷
规范化的强度（任意单位）
20
15
10
5
0
参照
传递 (1st)
除去 (2nd)
除去 (3rd)

图26


2700
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
-40%
-60%
-80%
-100%
传递
损失
0
5
10
15
20
缓冲液中的材料
细胞中的材料
膜扩散性 (m²/s x 10¹⁵)

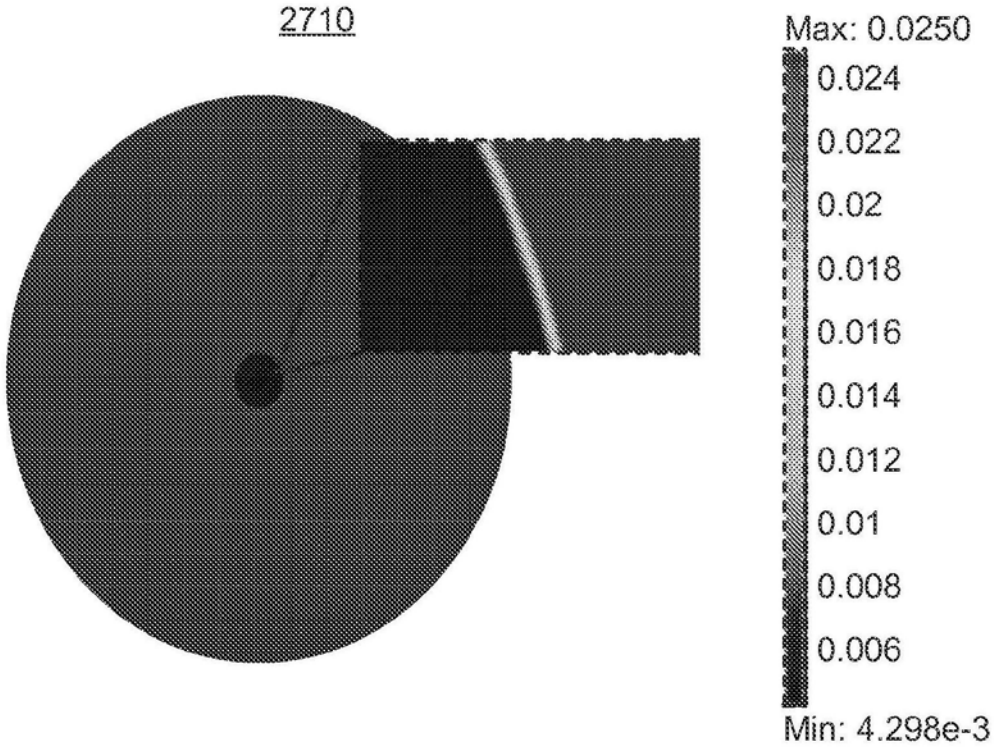

2710
Max: 0.0250
0.024
0.022
0.02
0.018
0.016
0.014
0.012
0.01
0.008
0.006
Min: 4.298e-3

图27

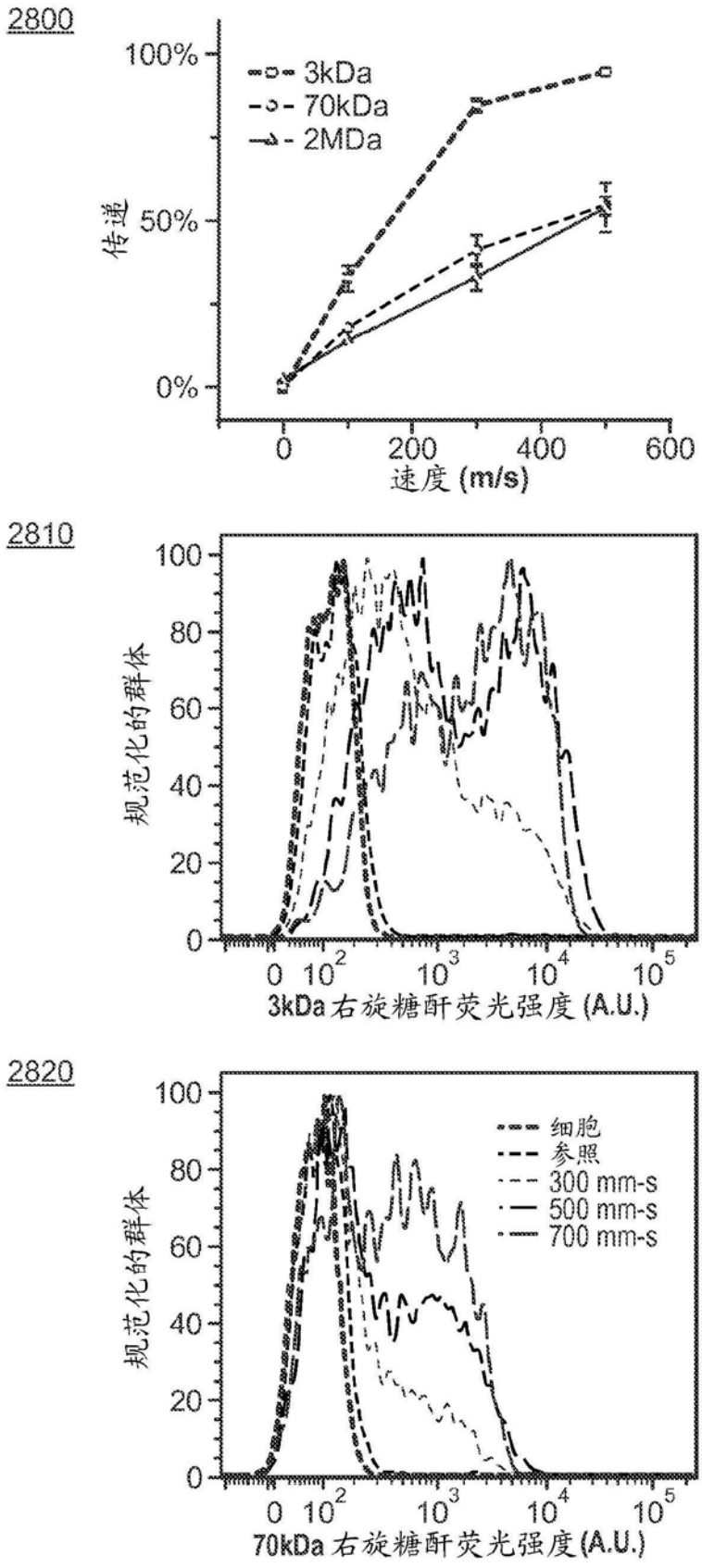

2800
100%
50%
0%
传递
3kDa
70kDa
2MDa
0
200
400
600
速度 (m/s)
2810
规范化的群体
100
80
60
40
20
0
0 10^2 10^3 10^4 10^5
3kDa右旋糖酐荧光强度 (A.U.)
2820
规范化的群体
细胞
参照
300 mm-s
500 mm-s
700 mm-s
70kDa右旋糖酐荧光强度(A.U.)

图28

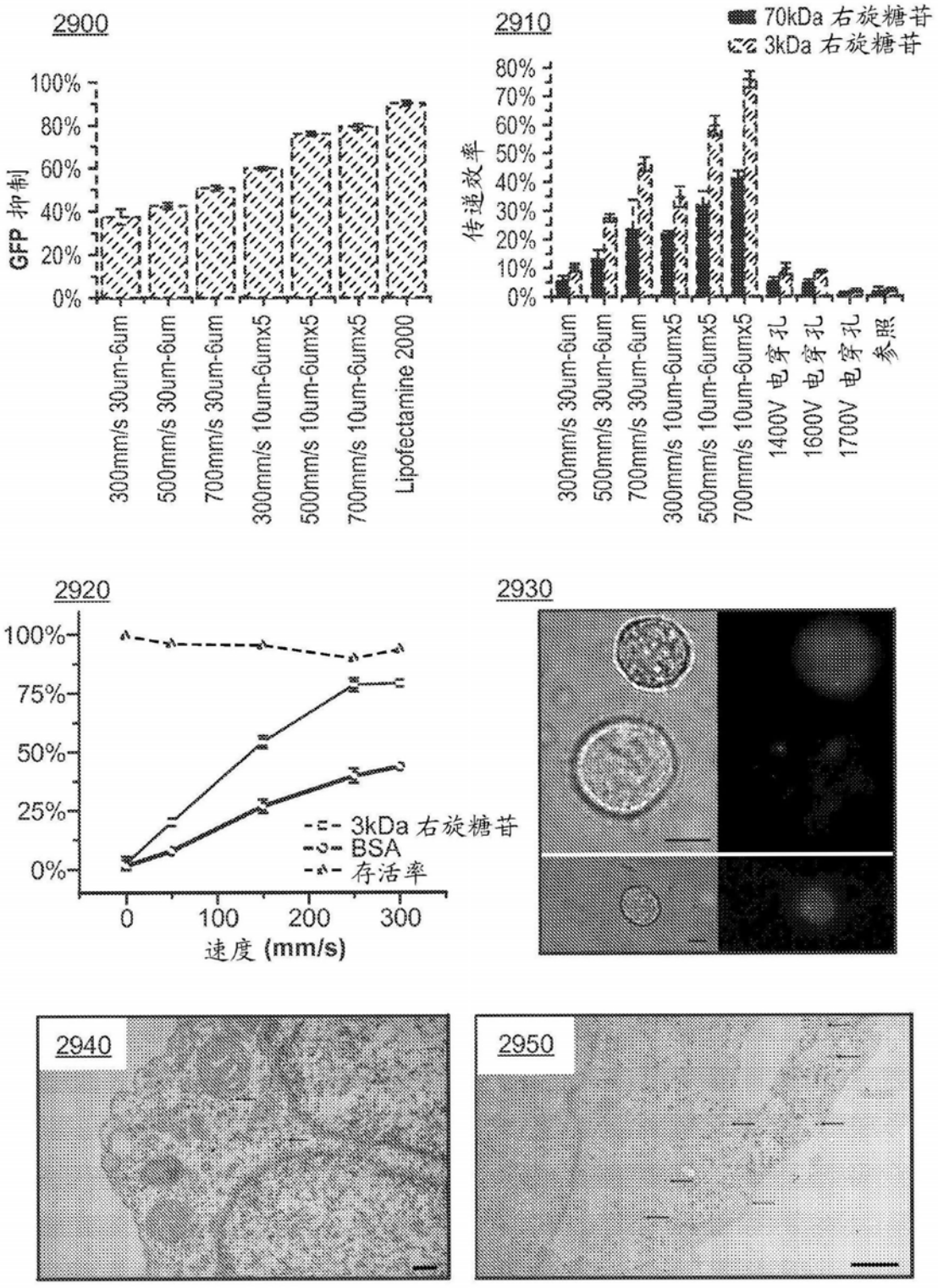

2900
GFP 抑制
100%
80%
60%
40%
20%
0%
300mm/s 30um-6um
500mm/s 30um-6um
700mm/s 30um-6um
300mm/s 10um-6umx5
500mm/s 10um-6umx5
700mm/s 10um-6umx5
Lipofectamine 2000
2910
70kDa 右旋糖苷
3kDa 右旋糖苷
传递效率
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
300mm/s 30um-6um
500mm/s 30um-6um
700mm/s 30um-6um
300mm/s 10um-6umx5
500mm/s 10um-6umx5
700mm/s 10um-6umx5
1400V 电穿孔
1600V 电穿孔
1700V 电穿孔
参照
2920
100%
75%
50%
25%
0%
3kDa 右旋糖苷
BSA
存活率
0
100
200
300
速度 (mm/s)
2930
2940
2950

图29

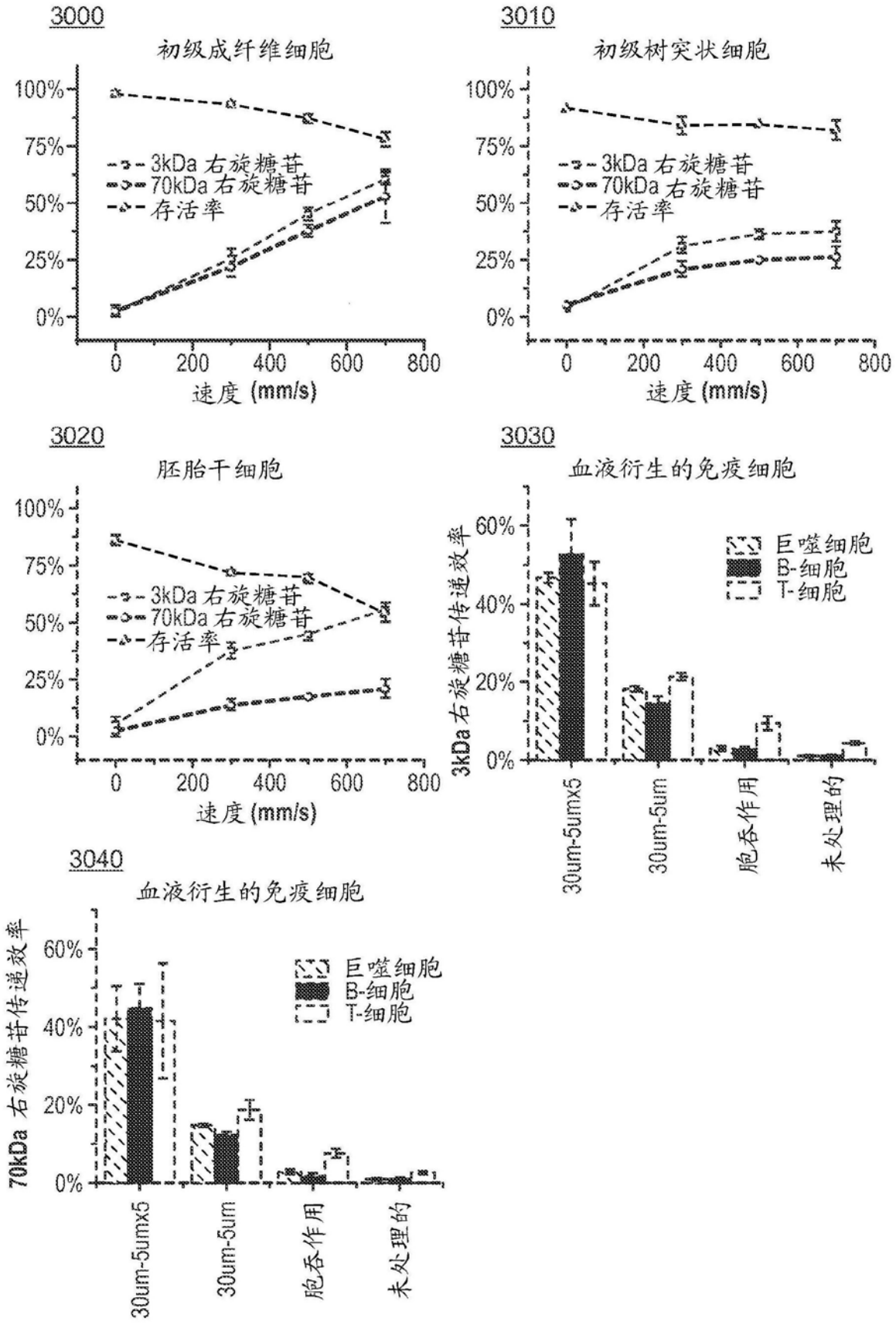

3000
初级成纤维细胞
100%
75%
50%
25%
0%
3kDa 右旋糖苷
70kDa 右旋糖苷
存活率
0
200
400
600
800
速度 (mm/s)
3010
初级树突状细胞
100%
75%
50%
25%
0%
3kDa 右旋糖苷
70kDa 右旋糖苷
存活率
0
200
400
600
800
速度 (mm/s)
3020
胚胎干细胞
100%
75%
50%
25%
0%
3kDa 右旋糖苷
70kDa 右旋糖苷
存活率
0
200
400
600
800
速度 (mm/s)
3030
血液衍生的免疫细胞
3kDa 右旋糖苷传递效率
60%
40%
20%
0%
巨噬细胞
-细胞
-细胞
30um-5umx5
30um-5um
胞吞作用
未处理的
3040
血液衍生的免疫细胞
70kDa 右旋糖苷传递效率
60%
40%
20%
0%
巨噬细胞
-细胞
-细胞
30um-5umx5
30um-5um
胞吞作用
未处理的

图30

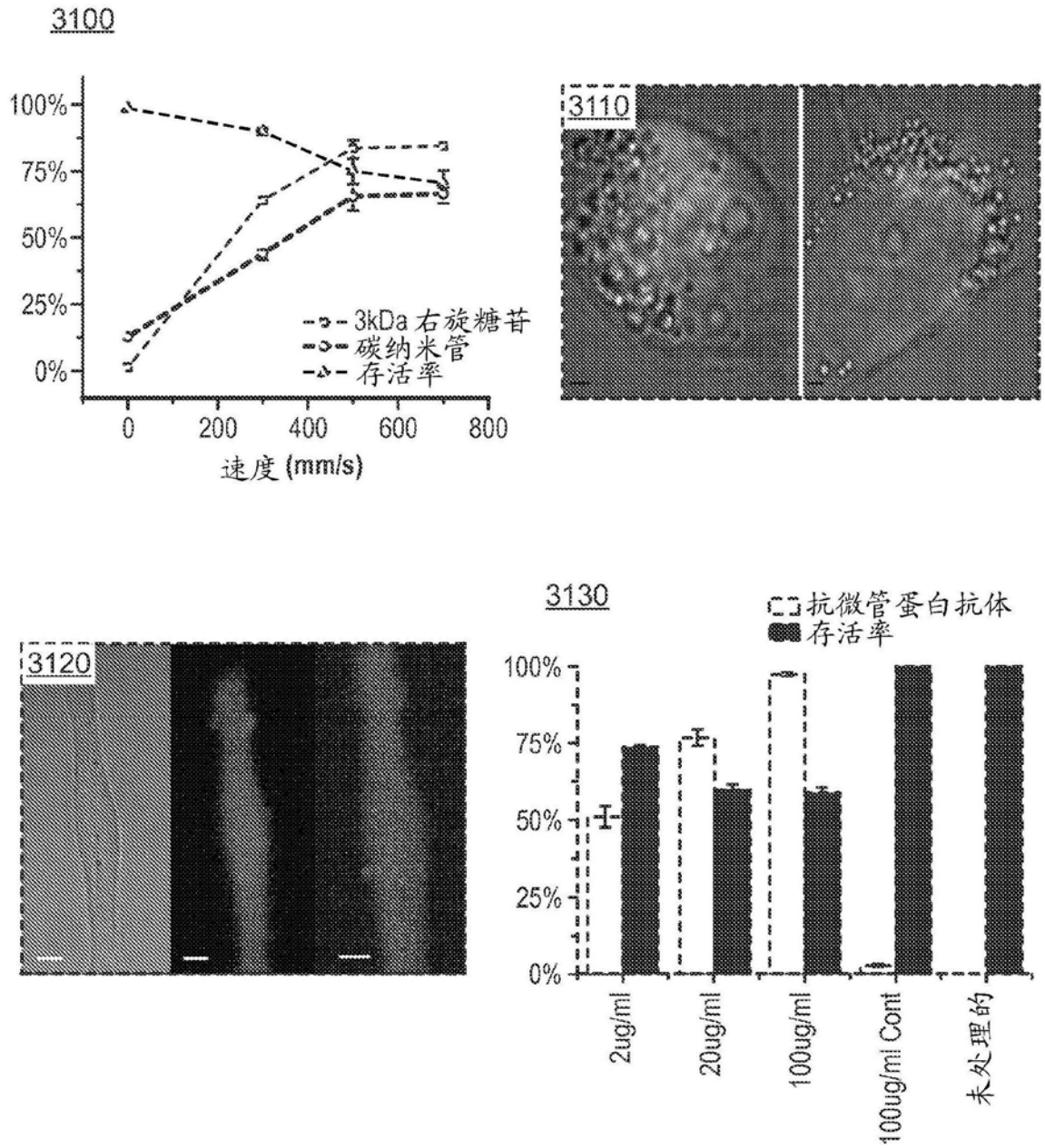
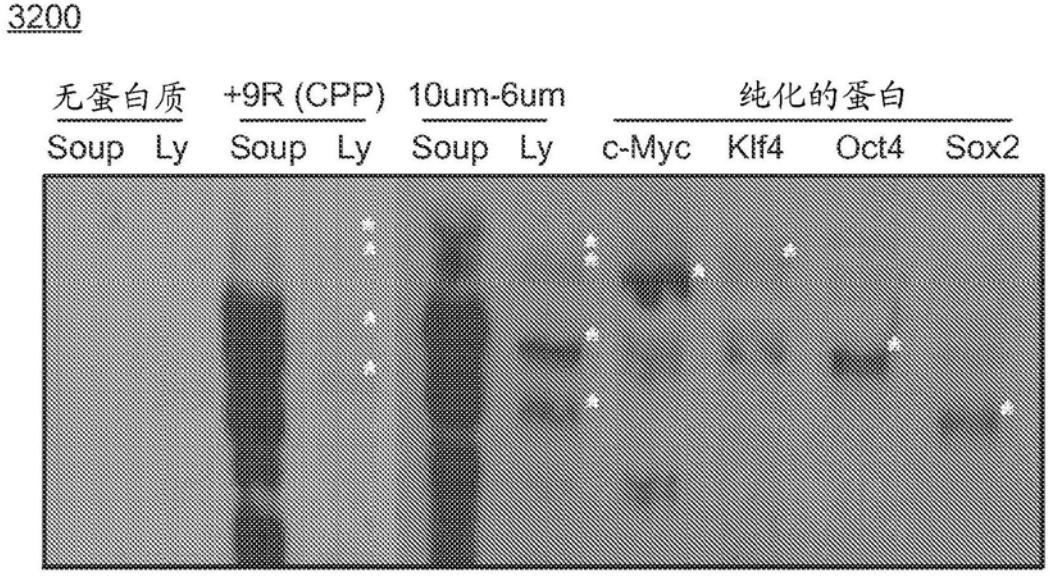

3100
100%
75%
50%
25%
0%
0
200
400
600
800
速度 (mm/s)
3kDa 右旋糖苷
碳纳米管
存活率
3110
3120
3130
抗微管蛋白抗体
存活率
100%
75%
50%
25%
0%
2ug/ml
20ug/ml
100ug/ml
100ug/ml Cont
未处理的

图31


3200
无蛋白质
+9R (CPP)
10um-6um
纯化的蛋白
Soup
Ly
Soup
Ly
Soup
Ly
c-Myc
Klf4
Oct4
Sox2

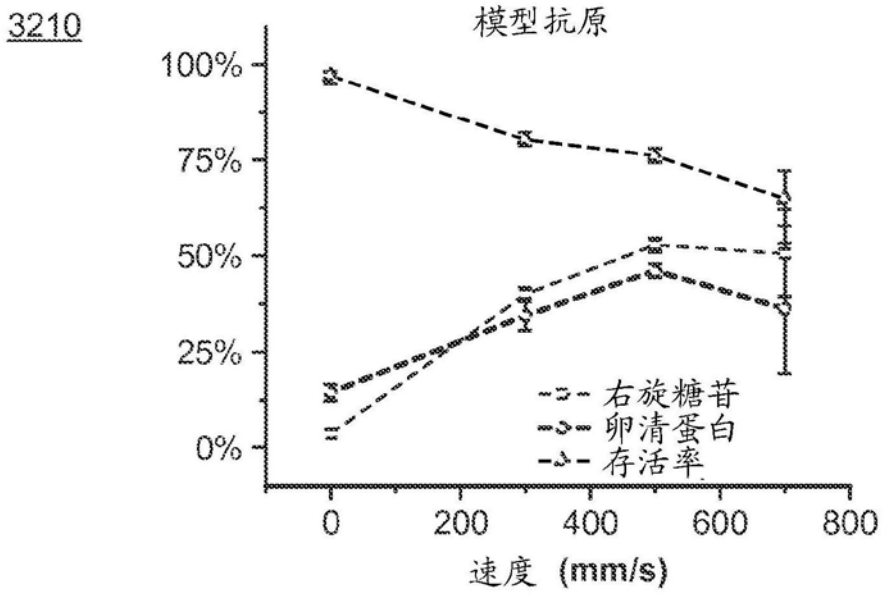

3210
模型抗原
100%
75%
50%
25%
0%
右旋糖苷
卵清蛋白
存活率
0
200
400
600
800
速度 (mm/s)

图32

细胞类型	初级/固定的	通过快速机械变形传递
B淋巴细胞（鼠）	初级	右旋糖苷
DC 2.4（鼠）	固定的	右旋糖苷
树突状细胞(鼠,脾)	初级	右旋糖苷,蛋白质
树突状细胞(鼠,骨髓)	初级	右旋糖苷,蛋白质
胚胎干细胞（鼠）	初级	右旋糖苷
胚胎干细胞(人)	初级	右旋糖苷，siRNA
成纤维细胞(人，多来源)	初级	右旋糖苷,蛋白质
HeLa (人)	固定的	右旋糖苷,siRNA,蛋白质,DNA,纳米颗粒,量子点碳纳米管
HT-29 (人)	固定的	右旋糖苷
巨噬细胞（鼠）	初级	右旋糖苷
T淋巴细胞（鼠）	初级	右旋糖苷

图33

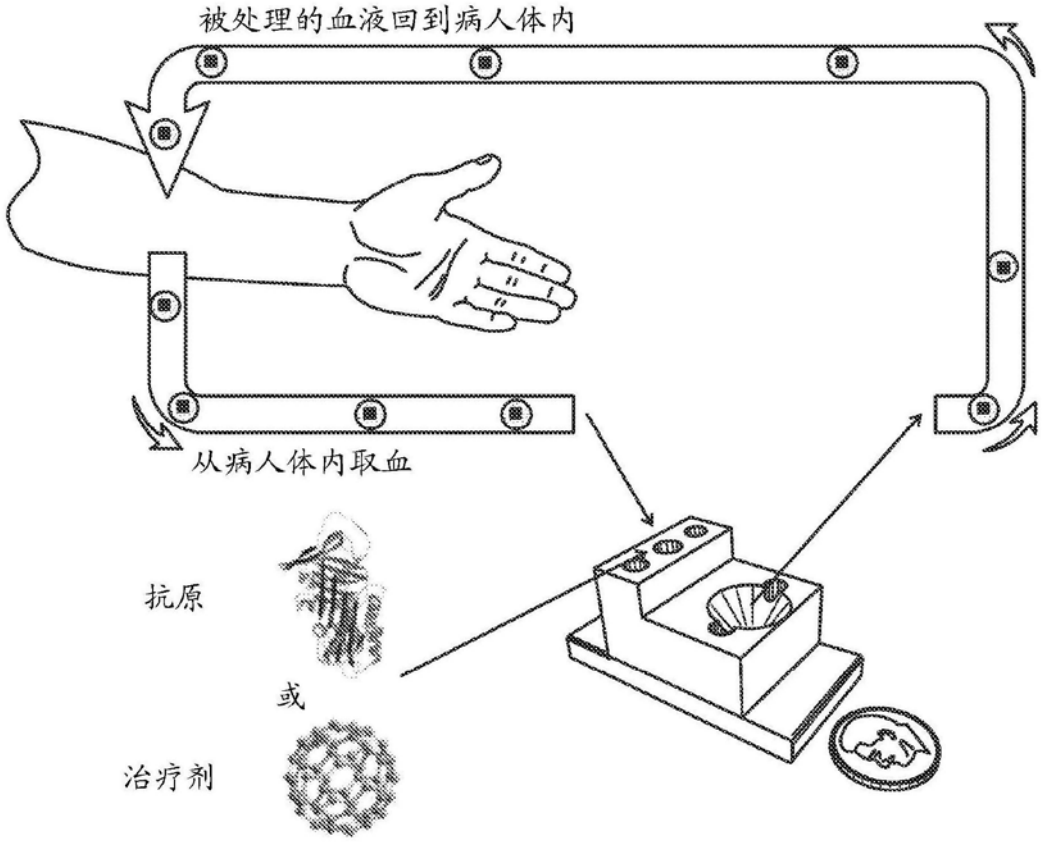


图34

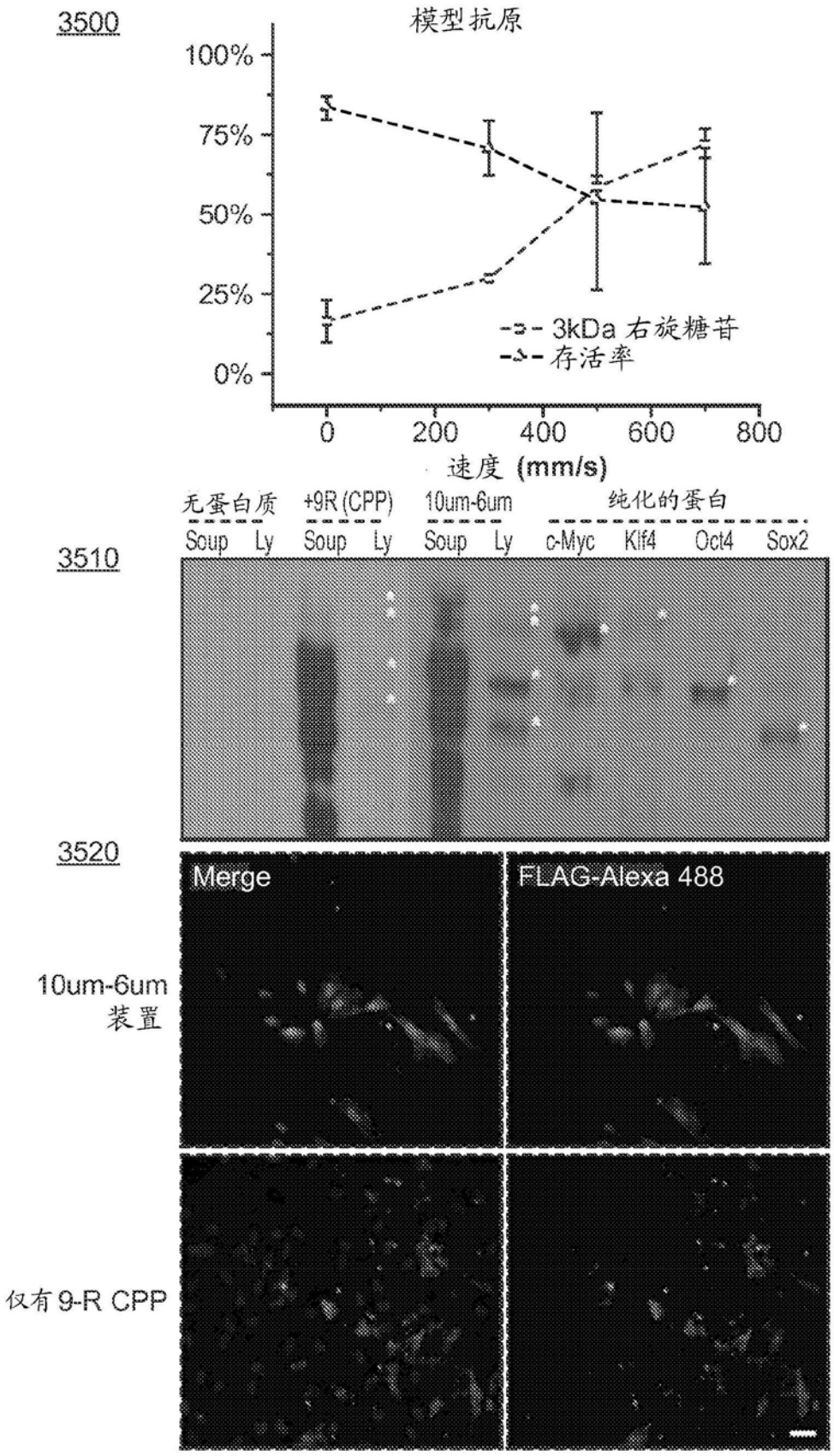

3500
模型抗原
100%
75%
50%
25%
0%
0
200
400
600
800
速度 (mm/s)
3kDa 右旋糖苷
存活率
无蛋白质
+9R (CPP)
10um-6um
纯化的蛋白
Soup
Ly
Soup
Ly
Soup
Ly
c-Myc
Klf4
Oct4
Sox2
3510
3520
Merge
FLAG-Alexa 488
10um-6um
装置
仅有 9-R CPP

图35

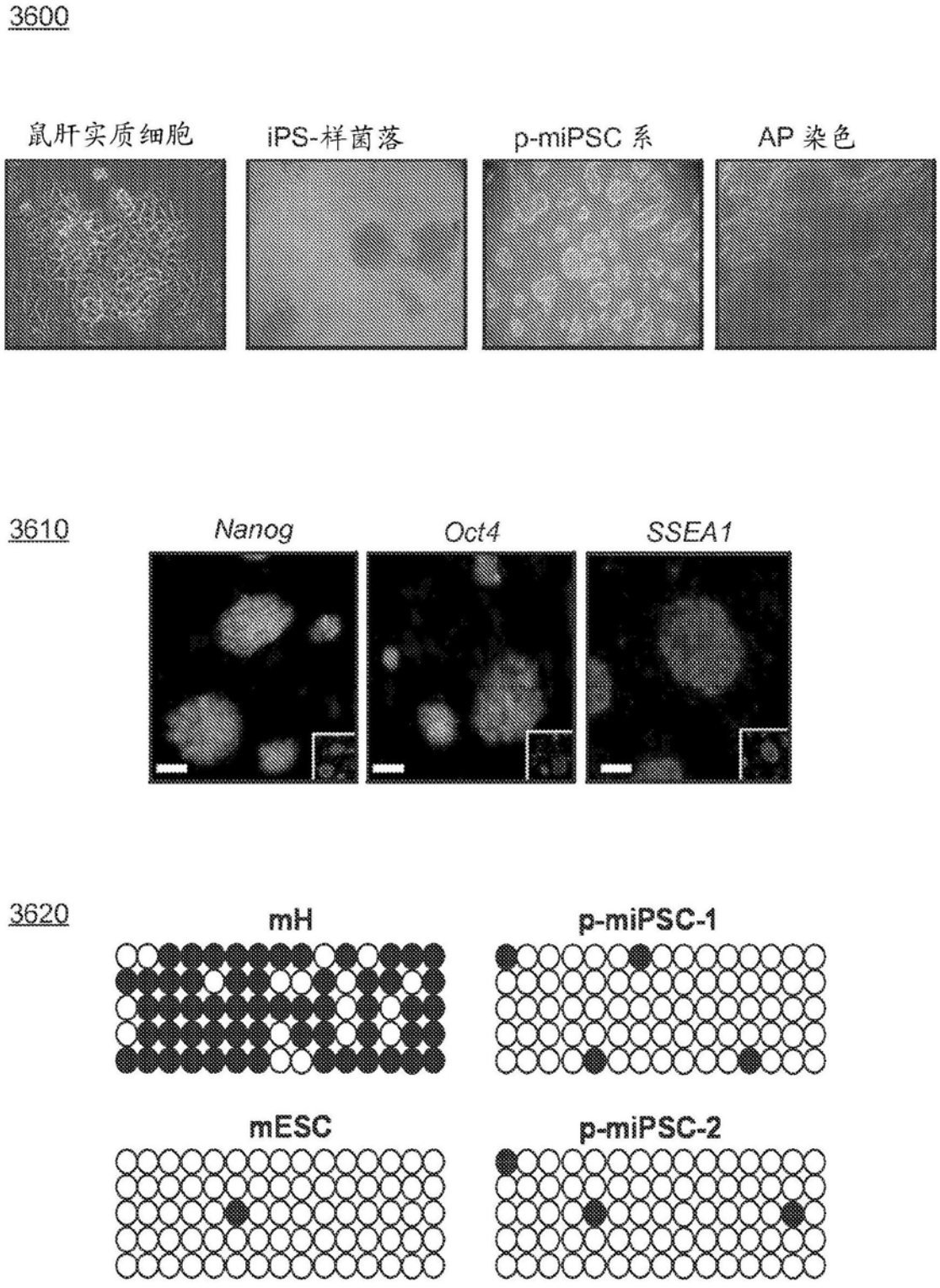
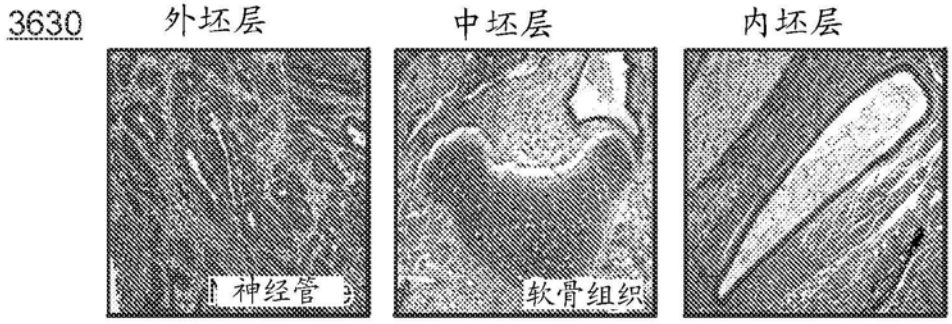
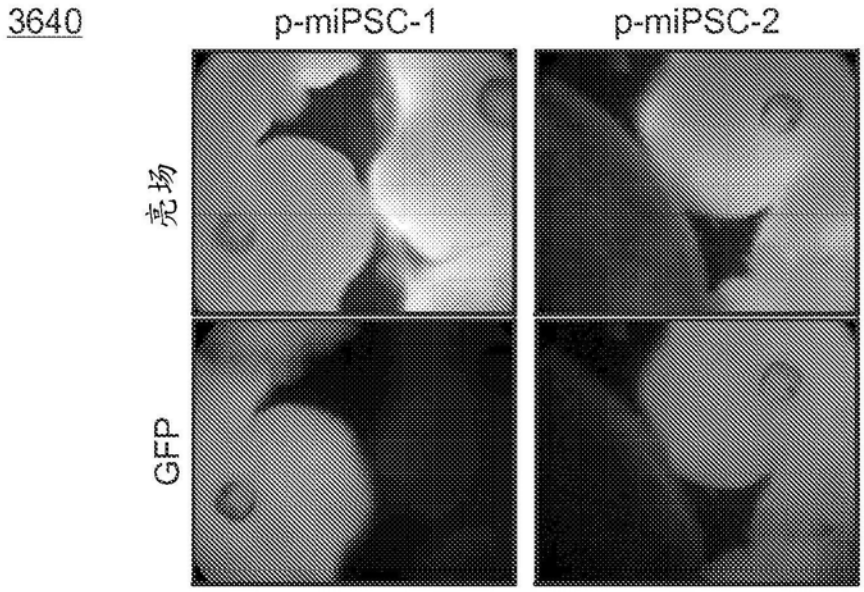

3600
鼠肝实质细胞
iPS-样菌落
p-miPSC 系
AP 染色
3610
Nanog
Oct4
SSEA1
3620
mH
p-miPSC-1
mESC
p-miPSC-2

图36A


3630
外坯层
中坯层
内坯层
神经管
软骨组织


3640
p-miPSC-1
p-miPSC-2
亮场
GFP

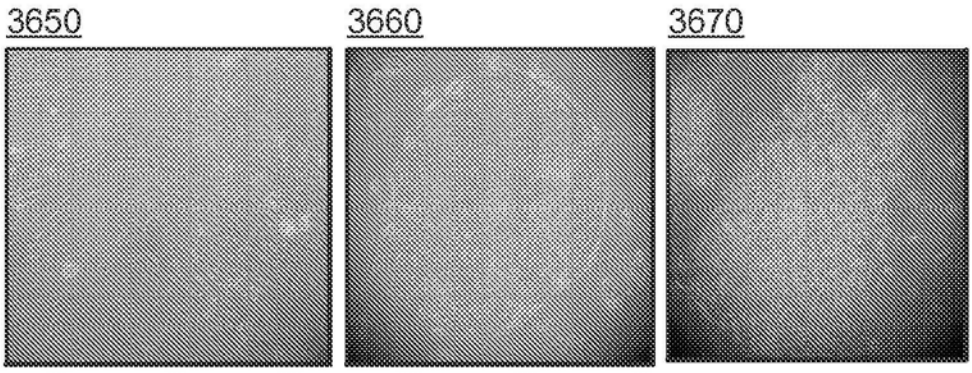

3650
3660
3670

图36B

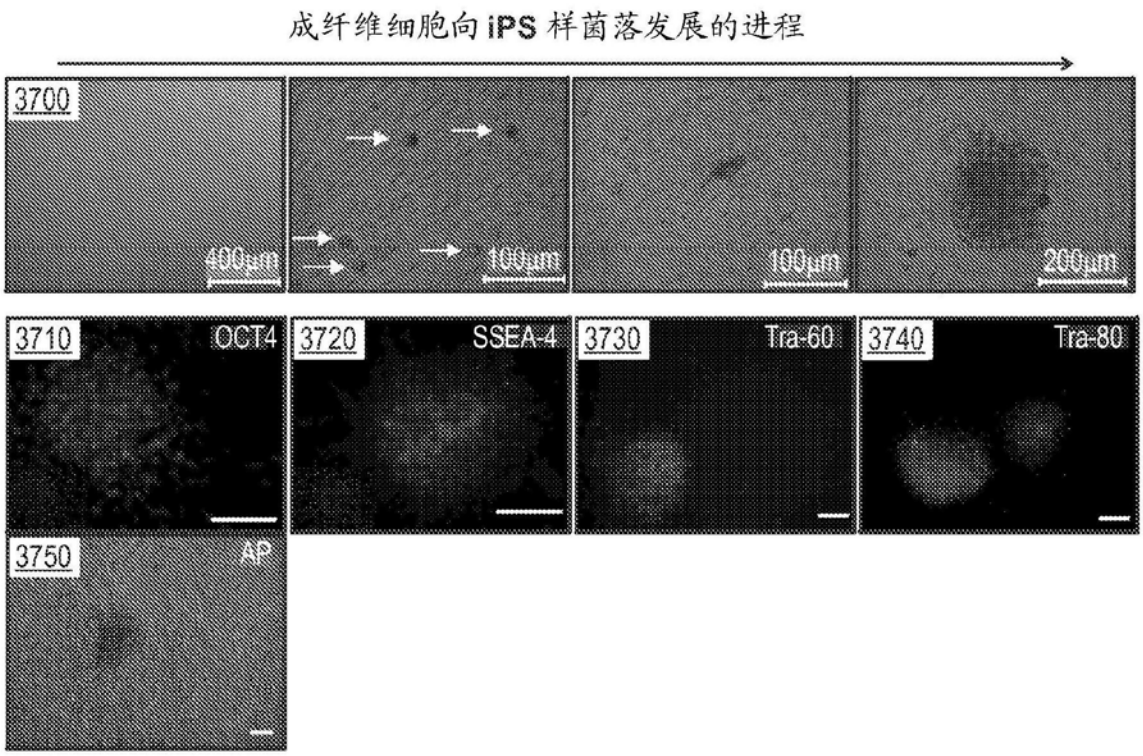

成纤维细胞向iPS样菌落发展的进程
3700
400μm
100μm
100μm
200μm
3710
OCT4
3720
SSEA-4
3730
Tra-60
3740
Tra-80
3750
AP

图37

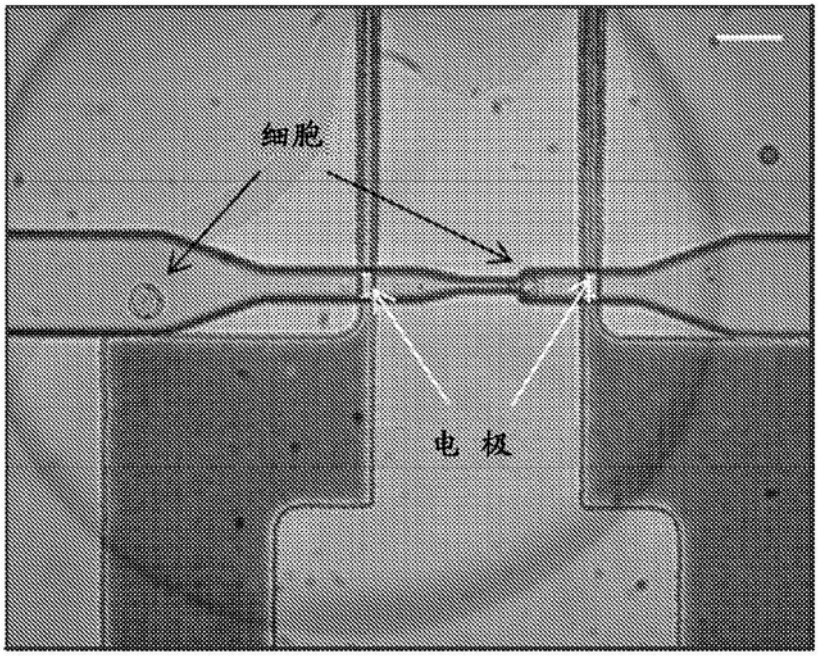

细胞
电 极

图38

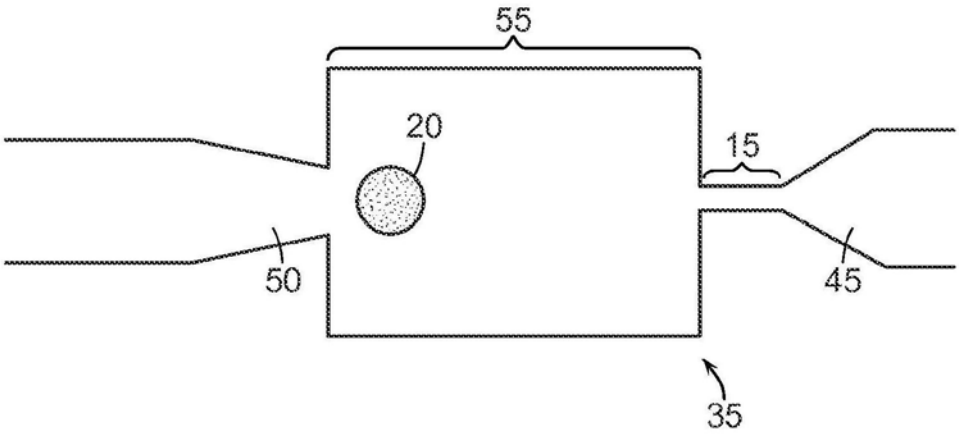


图39

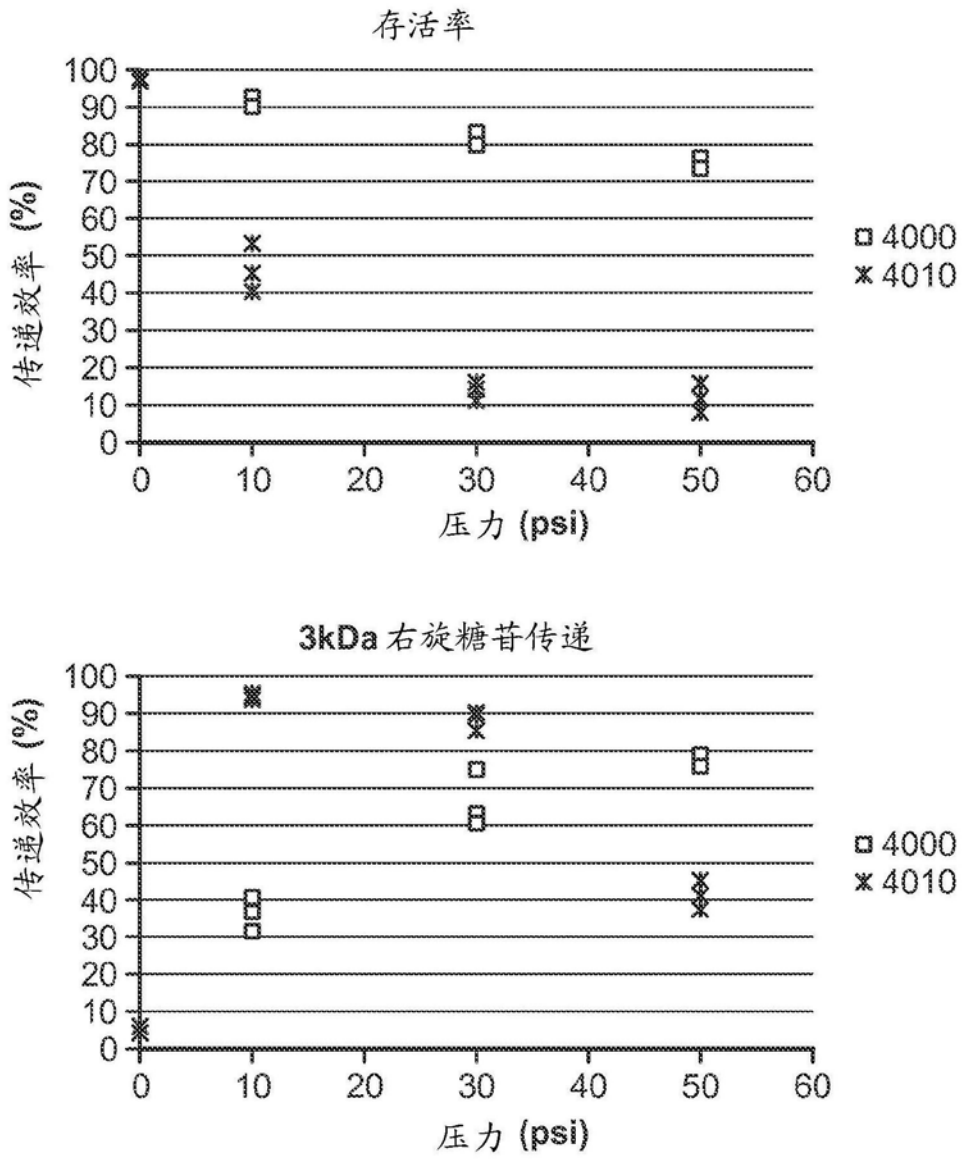

存活率
传递效率 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
压力 (psi)
4000
4010
3kDa 右旋糖苷传递
传递效率 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
压力 (psi)
4000
4010

图40

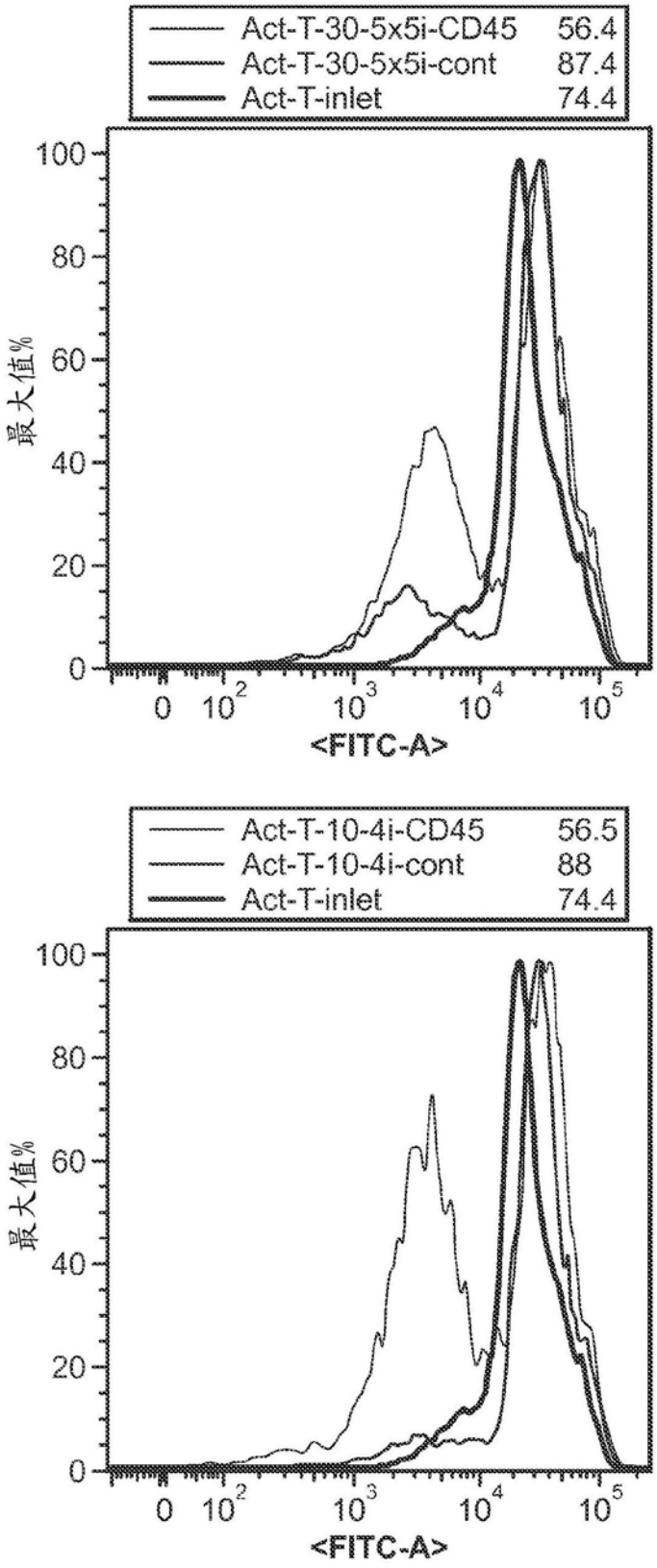

Act-T-30-5x5i-CD45 56.4
Act-T-30-5x5i-cont 87.4
Act-T-inlet 74.4
最大值%
<FITC-A>
Act-T-10-4i-CD45 56.5
Act-T-10-4i-cont 88
Act-T-inlet 74.4
最大值%
<FITC-A>

图41

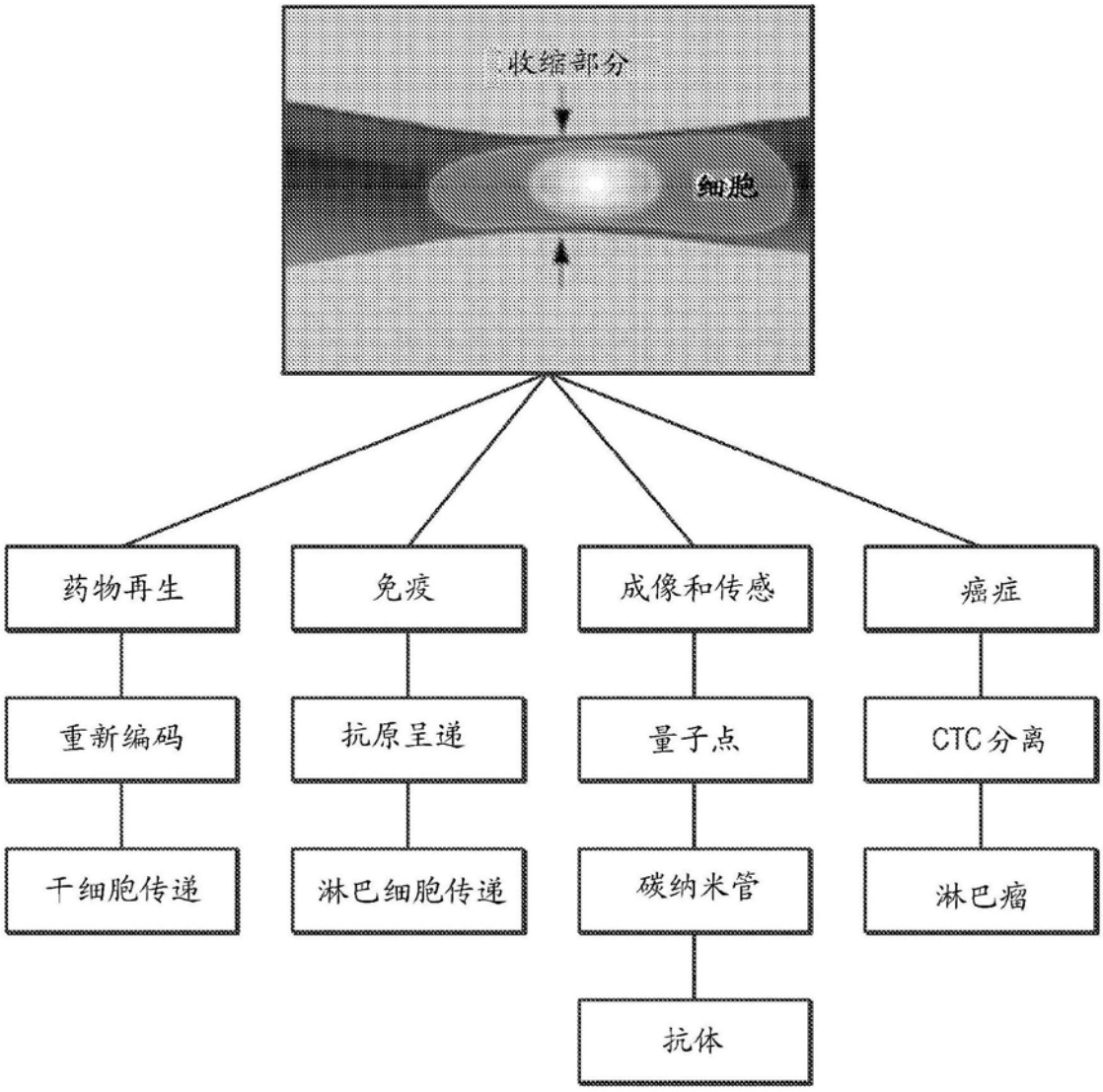

收缩部分
细胞
药物再生
免疫
成像和传感
癌症
重新编码
抗原呈递
量子点
CTC分离
干细胞传递
淋巴细胞传递
碳纳米管
淋巴瘤
抗体

图42

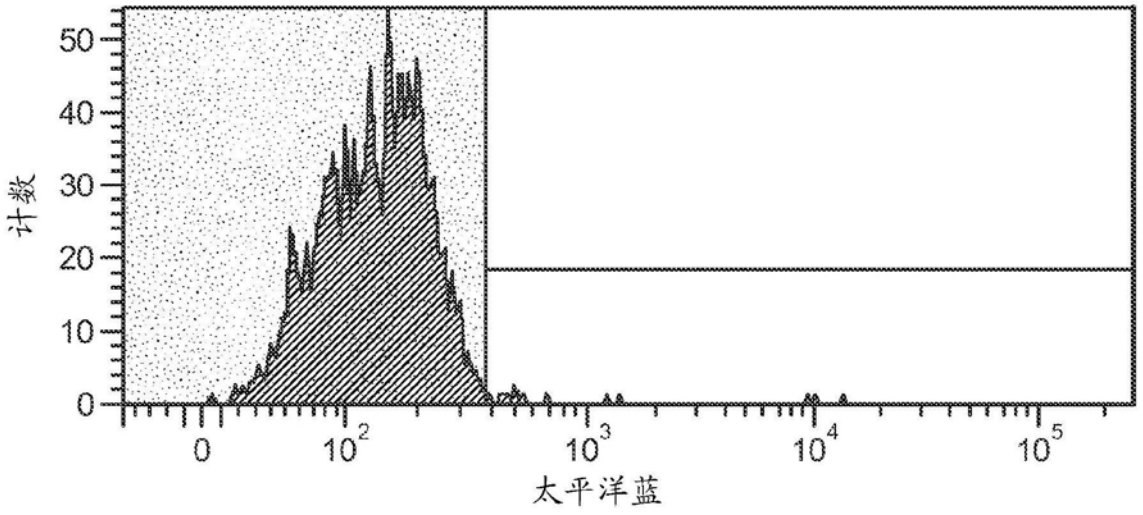

50
40
30
20
10
0
计数
0
10^2
10^3
10^4
10^5
太平洋蓝

图43A

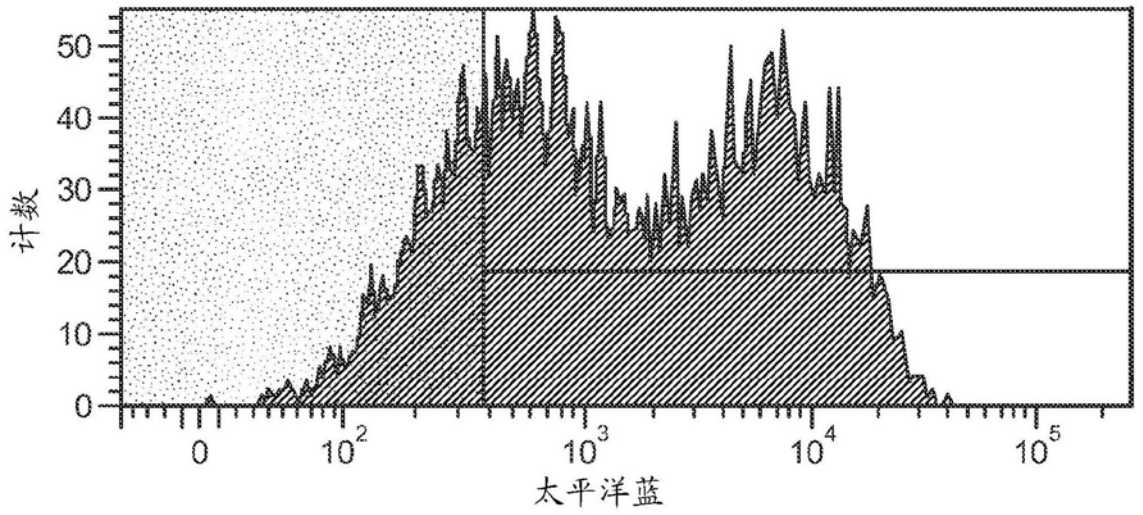

50
40
30
20
10
0
计数
0
10^2
10^3
10^4
10^5
太平洋蓝

图43B

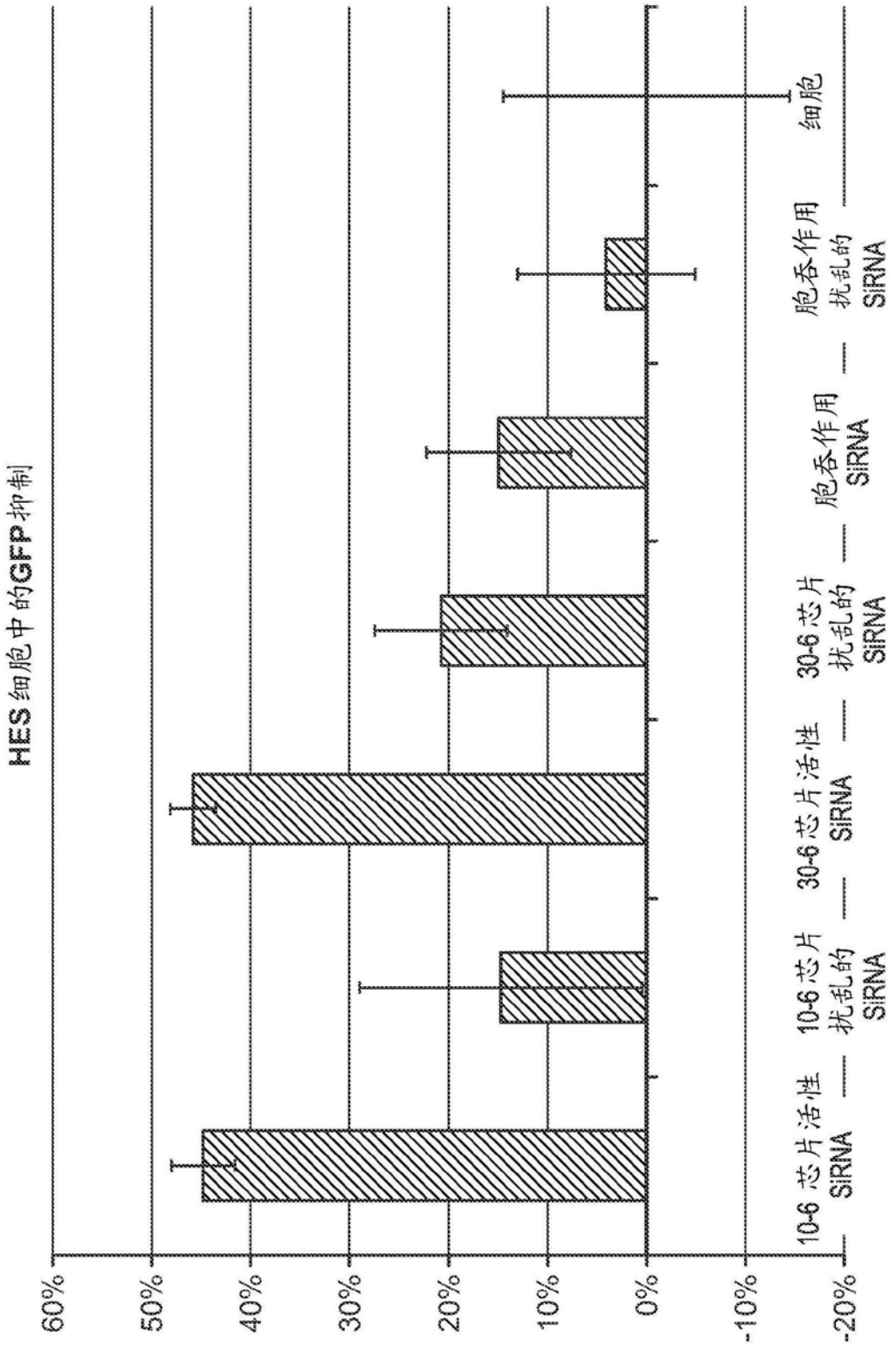

HES细胞中的GFP抑制
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
-10%
-20%
10-6芯片活性SiRNA
10-6芯片扰乱的SiRNA
30-6芯片活性SiRNA
30-6芯片扰乱的SiRNA
胞吞作用SiRNA
胞吞作用扰乱的SiRNA
细胞

图44

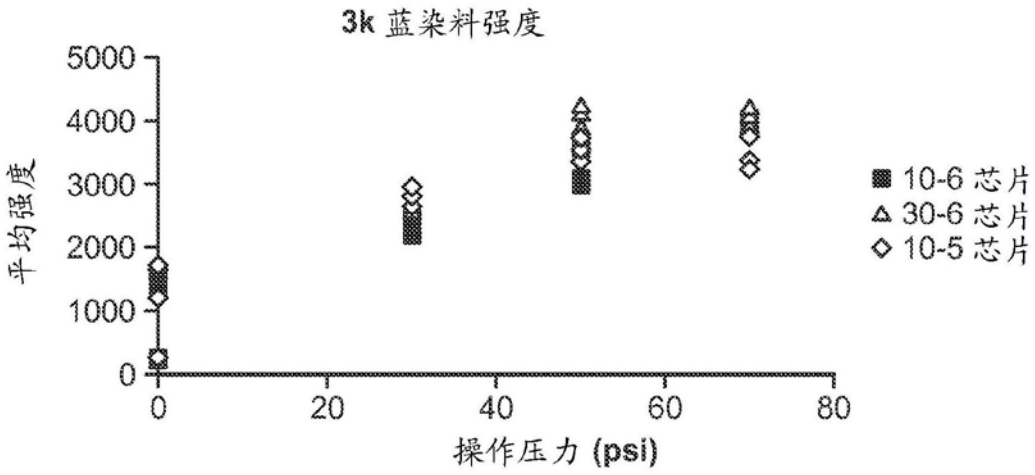

3k 蓝染料强度
平均强度
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
操作压力 (psi)
10-6 芯片
30-6 芯片
10-5 芯片

图45A

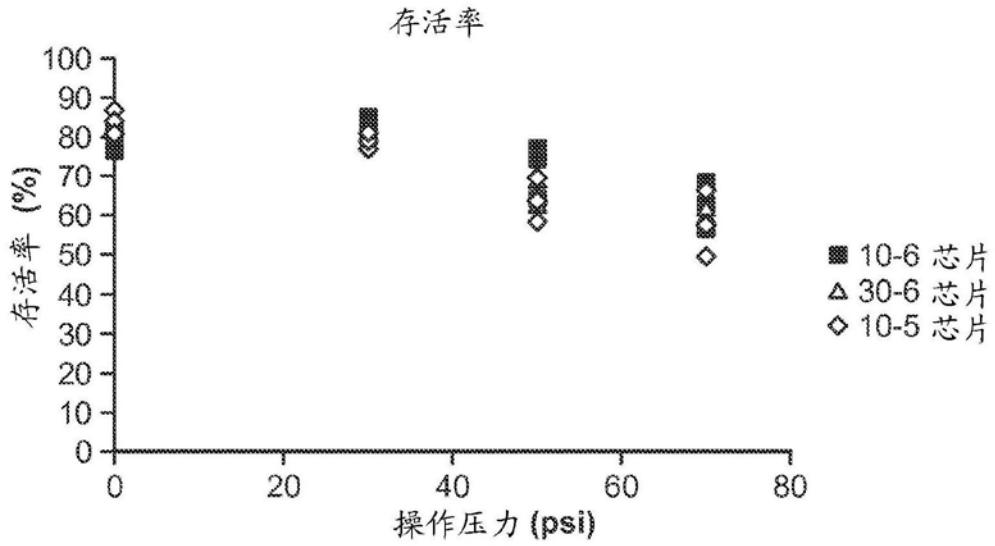

存活率
存活率 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
操作压力 (psi)
10-6 芯片
30-6 芯片
10-5 芯片

图45B