

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4217618号  
(P4217618)

(45) 発行日 平成21年2月4日(2009.2.4)

(24) 登録日 平成20年11月14日(2008.11.14)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/02 (2006.01)  
C 12 N 5/10 (2006.01)C 12 N 15/00  
C 12 N 5/00B  
B

請求項の数 10 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2003-525619 (P2003-525619)  
 (86) (22) 出願日 平成14年4月5日 (2002.4.5)  
 (65) 公表番号 特表2005-506837 (P2005-506837A)  
 (43) 公表日 平成17年3月10日 (2005.3.10)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2002/008239  
 (87) 國際公開番号 WO2003/020915  
 (87) 國際公開日 平成15年3月13日 (2003.3.13)  
 審査請求日 平成17年3月14日 (2005.3.14)  
 (31) 優先権主張番号 60/315,936  
 (32) 優先日 平成13年8月31日 (2001.8.31)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 501300975  
 サイト パルス サイエンシズ、インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国、メリーランド、コロンビア、ピー. オー. ボックス 609  
 (74) 代理人 100066692  
 弁理士 浅村 畏  
 (74) 代理人 100072040  
 弁理士 浅村 肇  
 (74) 代理人 100088926  
 弁理士 長沼 嶰夫  
 (74) 代理人 100102897  
 弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞融合のためのノンリニアな振幅の誘電泳動用波形

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞を一又は複数の細胞融合 / 電気穿孔パルスに供する前に該細胞をインピトロで処理する方法であつて、

時間に対して非直線的な形式で振幅を変化させた融合前電場波形 (a pre-fusion electric field waveform) によって、該細胞を処理するステップを含み、

該融合前電場波形が、時間に対して非直線的な形式で振幅が変化するAC電場波形を含む、方法。

## 【請求項 2】

前記処理によって、前記細胞を並べ、圧縮して、細胞融合に供される前に細胞膜接触を密にする、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記融合前電場波形が、振幅と持続時間の異なる電場波形を含み、相対的に振幅が小さく長時間の電場波形に続いて相対的に振幅が大きく短時間の電場波形を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記融合前電場波形の振幅が、時間に対して段階的に非直線的な形式で変化する、請求項 1 から 3 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

10

20

前記融合前電場波形の振幅が、時間に対して連続的に非直線的な形式で変化する、請求項1から3の何れか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記A C電場波形の振幅が、ノンリニアアルゴリズムに従って、時間に対して非直線的な形式で変化する、請求項1から5の何れか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記A C電場波形のA C波形電場強度が、10ボルト/cm～1,000ボルト/cmである、請求項1から6の何れか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記融合前電場波形が、融合前電場波形として適用される、非直線的に段階的に増大する波形を含み、該波形が、断続的又は継続的に与えられる、請求項1に記載の方法。 10

【請求項9】

請求項1から8の何れか1項に記載する方法により処理された前記細胞を、細胞融合パルスに供するステップと、

前記細胞融合パルスの後に、A C電場波形によって前記細胞を処理するステップとを含む、細胞融合方法。

【請求項10】

細胞を細胞融合に供する前に該細胞をインビトロで処理する方法であって、

前記細胞が一列に並び、細胞膜接触が密になり、細胞融合に供される前に互いに圧縮されるように、時間に対して非直線的な形式で変化する電場振幅によって前記細胞を処理するステップを含み。 20

該融合前電場波形が、時間に対して非直線的な形式で振幅が変化するA C電場波形を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2001年8月31日に出願された同時係属中の米国仮出願第60/315,936号に基づく優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、一般的には、生物工学において細胞を互いに融合させる方法及び装置に関する。より詳細には、本発明は、細胞を電場で処理して、細胞を並べ、細胞膜の接触を密とした後、当該細胞を細胞融合に供する方法及び装置を提供するものである。 30

【背景技術】

【0003】

中性電荷の細胞が、両方とも平面の1対の電極によって与えられるような均一な電場に置かれた場合、細胞は、両方の電極からの引力が同じなので、どちらの電極方向にも動くことはない。

【0004】

一方、中性電荷の細胞は、両方が平面ではない2つの電極によって与えられるような不均一な電場に置かれると、図1(従来技術を示す)に示すように、細胞は双極子を形成し、より大きな引力を有する電極に引き付けられてその大きな引力を有する電極の方向に移動する。 40

【0005】

このような不均一電場の利用は、誘電泳動において行なわれてあり、誘電泳動を用いて生細胞を並べ、その後融合／電気穿孔パルスによって細胞を融合させるという考え方とは、1970年代初期に文献に記載されている。この方法は、治療目的のため、モノクローナル抗体産生用のハイブリドーマを产生するため、核融合のため、或いは他のハイブリッド細胞を产生するために、2つの異なる細胞のハイブリッドを产生するのに用いられている。誘電泳動は、生細胞などの中性電荷の粒子に電気力を付与するプロセスである。誘電泳動による電気力は、不均一な電場をかけることによって生じ、細胞内の電荷を分離させて 50

双極子を形成させる。双極子が形成された後、細胞は、不均一な電場によって、より高い又はより低い電場強度の方向へ移動する。この移動は、培地と細胞若しくは生物学的粒子との相対的な導電率及び誘電率に依存する。誘電泳動力は、電場の2乗の関数であるので、電場極性は重要ではない。この力は、培地と粒子若しくは細胞との相対的な導電率及び誘電率の関数である。また、導電率及び誘電率は、適用した電場の周波数の関数もある。一般に、正弦波などのAC電圧波は、この交流の電場を生じさせるために電極間にかけられる。正弦波電圧、周波数及び持続時間は、個々の細胞タイプに応じて最適化される。AC波をかけて細胞を並べた後、一又は複数の融合／電気穿孔パルスをかけて、両細胞の膜が混じり合う細胞膜の通路を形成する。このような通路によって細胞の内容物を混合することを可能とし、ハイブリッド細胞が形成される。融合パルスを実施した後、さらにAC電場をかけて、融合細胞が安定している間にその細胞同士と一緒に保持することができる。いくつかの例で、突発的な電場による細胞の損傷を防止するために、AC電圧を直線的に増減するものがあった。

## 【0006】

細胞融合の適用例は、ハイブリドーマ産生及び核移植である。電気融合の最近の用途は、癌免疫療法のための治療用ハイブリッドを産生することである。これらのハイブリッドは、癌腫瘍細胞と免疫系樹状細胞とから、生体外プロセスによって産生される。其々の治療に多数の生存能のあるハイブリッドが必要なため、ハイブリッド産生プロセスにおいて高効率化に対する新しい要求が生じている。

## 【0007】

細胞融合を実施するために利用可能な（電気的、機械的、化学的）技術がいくつもあるが、本発明は、電気的手段に関する。現在の電気技術では、電極装置に接続された電圧波形発生装置が使用されている。関連する既知の電気的、機械的及び化学的な技術に関し、以下の米国特許及び国際公開が特に関係しており、これらを参照により本明細書に援用する。

第4,326,934号 1982年4月27日、Pohl

第4,441,972号 1982年4月10日、Pohl

第4,764,473号 1988年8月16日、Matschke他

第4,784,954号 1988年11月15日、Zimmermann

第5,304,486号 1994年4月19日、Chang

第6,010,613号 2000年1月4日、Walters他

国際公開公報第00/60065号 2000年10月12日、Walters他

## 【0008】

これらの文献によれば、一定振幅（従来技術図3参照）又は直線的に増加する振幅（従来技術図4参照）のどちらかを有する融合前電場波形（pre-fusion electric field waveforms）を使用することが知られている。図5は、電場波形を用いて細胞融合を実施する従来技術の一般的な手順の全般を示すものである。この手順においては、融合前電場波形の実施後、融合／電気穿孔パルスが実施され、さらにその後、融合後電場波形が実施される。

## 【0009】

それにもかかわらず、融合前電場波形の一定の振幅又は直線的に増加する振幅による細胞融合では、細胞融合の効率が、癌免疫療法で用いられる治療用ハイブリッドの産生といった用途において要求される高い効率には達することができない。この点で、一定の振幅又は直線的に増加する振幅の融合前電場波形を用いて処理された細胞よりも細胞融合効率の高い融合前電場波形を細胞に付与することが望まれる。

## 【0010】

より具体的には、Changの米国特許第5,304,486号において、Changの図2Eに、リニア低電圧ブリサイン（presine）AC波形、リニア高電圧電気穿孔用AC波形及びリニア低電圧ポストポレーション（post-poration）AC波形が開示されていることが注目される。Changの発明は、唯一、融合／電気

10

20

30

40

50

穿孔パルスに限定されている。Changは、リニア低電圧プレサインAC波形のみ開示し、ノンリニア低電圧プレサインAC波形を開示していない。Changは、プレサインAC波形という言葉を記載する以外、プレサインAC波形には注意を向けていない。

#### 【0011】

どんな細胞融合システムにおいても第1のプロセスは、細胞を接触させることである。いずれの場合でも、負の表面電荷に打ち勝つのに十分な力を各細胞に加えなければならぬ。均一な電場を単にかけるだけでは、細胞の実効電荷はゼロなので、細胞は動かない。即ち、下記の電場の定義から、力がかからない。

$$\text{力} = (\text{電場}) \times (\text{電荷})$$

#### 【0012】

10

しかし、図1(従来技術を示す)に示すように、不均一な電場は、各細胞内部の正イオンを一方の側に、負イオンを反対側に移動させ、双極子を生成させる。一旦、双極子が誘発されると、電場の強度が一方の側よりももう一方の側で大きくなるので、これらの究極的な力が細胞に作用する。一方向への細胞の移動によって、細胞はある区域に集中する。細胞はこの時双極子であるので、図2(従来技術を示す)に示すように、1の細胞の負の側が別の細胞の正の側を引き付け、負の表面電荷に打ち勝つ。不均一な電場は電極装置によって作られる。図1及び2(従来技術を示す)に示すように、不均一性は電極構成の関数である。

#### 【0013】

20

一般的に、融合させる細胞は、細胞を損傷したり、乱れを生じることにより融合ハイブリッドの数を減少させることがある、抵抗熱を最小限に抑えるため、低導電率培地(0.01S/m未満)に置かれる。この点で、細胞の整列及び細胞膜の接触中における加熱を低減するように、細胞融合に供する細胞を処理することが望まれる。

#### 【0014】

波形発生装置は2つの機能を有する。第1の機能は、AC電圧波形を生成することであり、このAC電圧波形は、電極装置によってAC電場に変換される。次いで、このAC電場によって、細胞が整列/接触する。第2の機能は、細胞膜を電気穿孔し、細胞を融合させるパルス電圧を発することである。いくつかの事例では、融合産物が生存可能又は安定になるまで細胞を整列させておくために、融合パルスの後にさらにAC電圧をかける。

#### 【0015】

30

融合が成功する要因の1つは、隣接細胞間の膜接触である。融合パルスをかける前に、この接触が密なほど、融合効率は高くなる。U.Zimmermann他、「電場誘導細胞-細胞融合(Electric Field-Induced Cell to Cell Fusion)」、J.Membrane Biol. 67, 165~182(1982)において、Zimmermannは、融合パルスの直前にAC波電場強度を増加させることが最適の手法と思われることを指摘している。乱れ又は加熱なしで細胞膜接触を密にする融合前電場波形によって前処理することが、細胞融合を行う細胞にとって望ましいことは明らかである。

#### 【0016】

40

また、いくつかの理由から、細胞融合に付する細胞に振幅の大きな整列波形(alignment waveform)を即時に与えることは望ましくない。その第1の理由は、機械的な理由である。すなわち、振幅の大きな整列波形を即時にかけると、細胞に極大な力が作用し、細胞が電極に向かって急速に移動する。この急速な細胞移動は、細胞を取り巻く培地に乱れの力(turbulence forces)を生じさせ、この乱れの力は、細胞の完全なパールチェーンの形成を妨げ、すでに形成されている細胞のパールチェーンを破壊する。

#### 【0017】

細胞融合に付する細胞に振幅の大きな整列波形を即時に与えることが望ましくない第2の理由は、このような振幅の大きな整列波形によって、細胞が懸濁している培地中で熱が発生することである。加熱にあっても、整列した細胞の完全なパールチェーンの形成が妨

50

げられ、すでに形成されているパールチェーンの破壊をもたらす乱れを生じる。加熱された培地中の熱によって、細胞の生存度も低下する。

#### 【0018】

上記のことを考慮すると、細胞融合を行う細胞に振幅の大きい整列波形を即時にかけることによって生じる機械的な力、乱れ及び加熱を回避することが望まれる。

#### 【0019】

以上、上述の従来技術の本文で、電気穿孔パルスを用いて細胞融合を実施する前に融合前電場波形を使用することが周知であることを示したが、上述の従来技術は、以下の望ましい特徴が組み合わされた細胞融合用誘電泳動波形を教示又は示唆していない。

(1) 一定の振幅又は直線的に増加する振幅の融合前電場波形を用いて処理された細胞よりも細胞融合効率が高い融合前電場波形を細胞に与える。 10

(2) 細胞融合を行う細胞に振幅の大きい整列波形を即時にかけることによって生じる機械的な力、乱れ及び加熱を回避する。

(3) 細胞融合に供する前に、細胞配列を整え、細胞膜接触を密にするために、融合前電場波形によって処理される細胞の加熱を低減する。

(4) 細胞融合を行う前に、融合前電場波形によって処理された細胞間の細胞膜接触を密にする。

以上の所望の諸特性は、本発明における細胞融合用の独自のノンリニア誘電泳動波形によって提供されるものであり、それらは以下の記述によって明らかになるであろう。従来技術に優る本発明の他の利点も、明確になるであろう。 20

#### 【0020】

その他の重要な米国特許としては以下のものが挙げられる。

第4,561,961号 1985年12月31日、Hofmann

第5,001,056号 1991年3月19日、Snyder他

第5,589,047号 1996年12月31日、Coster他

第5,650,305号 1997年7月22日、Hui他

#### 【0021】

その他の参考文献としては以下のものが挙げられる。

1. R. Bischoff他、「電気融合によって產生されるヒトハイブリドーマ細胞(Human Hybridoma Cells Produced by Electro-Fusion)」、Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 147, 64~68(1982). 30

2. L. Chang ben他、「細胞融合による動物細胞への125.su b. I-BSA及び125.su b. I-DNAの導入のためのヒト赤血球ゴーストの使用(Use of Human Erythrocyte Ghosts for Transfer of 125.su b. I-BSA and 125.su b. I-DNA into Animal cells from cell Fusion)」、Scientia Sinica(Series B) 25, 680~865(1982).

3. C. S. Chen他、「生物学的誘電泳動:不均一電場における孤立細胞の挙動(Biological Dielectrophoresis: The Behavior of Lone Cells in a Non-uniform Electric Field)」、Ann. N. Y. Acad. Sci. 238, 176~185(1974). 40

4. Coster, H. G. L. 及び Zimmermann, U. 「Valonia utricularisの膜における絶縁破壊の直接的証明(Direct Demonstration of Dielectric Breakdown in the Membranes of Valonia utricularis)」Zeitschrift fur Naturforschung. 30c, 77~79, 1975.

5. Coster, H. G. L. 及び Zimmermann, U. 「Valonia 50

*utricularis* の膜における絶縁破壊：エネルギー散逸の役割 (Dielectric Breakdown in the Membranes of *Valoniam utricularis*: the role of energy dissipation)、*Biochimica et Biophysica Acta.* 382、410~418、1975.

6. Coster, H. G. L. 及び Zimmermann, U. 「*Valoniam utricularis* の膜における電気的破壊の機構 (The mechanism of Electrical Breakdown in the Membranes of *Valoniam utricularis*)」*Journal of Membrane Biology.* 22、73~90、1975. 10

7. K. Kaler 他、「個体生細胞の動的誘電泳動レビューション (Dynamic Dielectrophoretic Levitation of Living Individual Cells)」、*J. Biol. Phys.* 8、18~31 (1980).

8. A. R. Murch 他、「炎症性多核巨細胞が融合によって生成される直接証拠 (Direct Evidence that Inflammatory Multi-Nucleate Giant Cells Form by Fusion)」、*Pathol. Soc. Gr. Brit. Ire.* 137、177~180 (1982).

9. Neumann, B 他、「*Dictyostelium*にかけられた高い電気インパルスによって誘導される細胞融合 (Cell Fusion Induced by High Electrical Impulses Applied to *Dictyostelium*)」、*Naturwissenschaften* 67、414、1980. 20

10. Petrucci、一般化学：原理及び最近の応用例 (General Chemistry: Principles and Modern Applications)、4th ed.、p. 621、1985 (月なし).

11. Zimmermann 他、「電場によって誘導される細胞 - 細胞融合 (Electric Field-Induced Cell-to-Cell Fusion)」、*The Journal of Membrane Biology.* vol. 67、p. 165~182 (1982) (月なし). 30

12. Pohl, H. 「誘電泳動 (Dielectrophoresis)」、Cambridge University Press、1978.

13. H. A. Pohl、「誘電泳動の生物物理学的側面 (Biophysical Aspects of Dielectrophoresis)」、*J. Biol. Phys.* 1、1~16 (1973).

14. H. A. Pohl 他、「細胞混合物の連続誘電泳動分離 (Continuous Dielectrophoretic Separation of Cell Mixtures)」、*Cell Biophys.* 1、15~28 (1979).

15. H. A. Pohl 他、「誘電泳動力 (Dielectrophoretic Force)」、*J. Biol. Phys.* 6、133 (1978). 40

16. H. A. Pohl 他、「微生物の正及び負の連続誘電泳動 (The Continuous Positive and Negative Dielectrophoresis of Microorganisms)」、*J. Bio. Phys.* 9、67~86 (1981).

17. Sale, J. H. 及び Hamilton, W. A. 「微生物に対する高い電場の効果 (Effects of High Electric Fields on Micro-Organisms)」、*Biochimica et Biophysica Acta.* 163、37~43、1968.

18. Sepersu, E. H. 、Kinoshita, K. 及び Tsong, T. Y. 「電場による赤血球膜透過性の可逆的及び不可逆的改変 (Reversible an 50

d Irreversible Modification of Erythrocyte Membrane Permeability by Electric Fields)」*Biochimica et Biophysica Acta.* 812, 779~785, 1985.

19. J. Vienken他、「電場によって誘導される融合：ヘテロカリオン細胞の高収率産生のための電気水力学的操作 (Electric Field-Induced Fusion: Electro-Hydraulic Procedure for Production of Heterokaryon Cells in High Yield)」、*Fed. Eur. Biomed. Soc. Lett.* 137, 11~13 (1982). 10

20. H. Weber他、「電場効果による酵母プロトプラスト融合の促進 (Enhancement of Yeast Protoplast Fusion by Electric Field Effects)」、*A Preprint for Proceedings of the Fifth International Symposium on Yeasts*, London, Ontario, Canada, Jul. 80.

21. Zimmermann, U. 「電場によって媒介される融合及び関連する電気的現象 (Electrical Field Mediated Fusion and Related Electrical Phenomena)」、*Biochimica et Biophysica Acta.* 694, 227~277, 1982. 20

22. Zimmermann, U. 他「電気的破壊によるカラスムギ葉肉プロトプラストの融合 (Fusion of Avena Sativa Mesophyll Protoplasts by Electrical Breakdown)」、*Biochimica et Biophysica Acta.* 641, 160~165, 1981. 1982.

23. U. Zimmermann他、「植物プロトプラストからの葉緑体の電場誘導放出 (Electric Field-Induced Release of Chloroplasts from Plant Protoplasts)」、*Naturwissen* 69, 451 (1982).

24. U. Zimmermann他、「電場によって媒介される細胞融合 (Electric Field-Mediated Cell Fusion)」、*J. Biol. Phys.* 10, 43~50 (1982). 30

25. U. Zimmermann、「機能が操作された細胞：細胞生物学、医薬品及び技術の新しい展望 (Cells with Manipulated Functions: New Perspectives for Cell Biology, Medicine, and Technology)」、*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20, 325~344 (1981).

### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0022】

本発明は、現行技術を改良したものである。本発明によれば、一又は複数の細胞融合 / 電気穿孔パルスをかける前に、細胞に、振幅が非直線的に変化するノンリニア電圧波形をかける。本発明では、最初に、ノンリニア電圧波をかけることによって、隣接細胞間の接線膜接触及び整列を生じさせ若しくは強制する。本発明では、次に、ノンリニア電圧波形をさらにかけることによって、隣接細胞間の密な膜接触を生じさせ若しくは強制する。この点に関し、細胞 10 は、振幅が非直線的に変化する波形の影響下で互いに圧縮される。細胞は、同様の真核細胞でもよく、異なる真核細胞でもよい。

#### 【0023】

振幅が非直線的に変化する融合前ノンリニア電圧波形は、ノンリニア A C 電圧波形とすることができます。A C 電場波形には正弦波が含まれる。融合プロセスが細胞タイプに 50

応じて最適化されるように、波形の振幅を変化させるノンリニアなパラメータを設定することができる。A C 波形の振幅が経時的に非直線的に変わることによって、細胞は一列に並び、より低いエネルギー（より少ない加熱）かつより高い融合効率で融合される。

#### 【0024】

融合前電場波形は、振幅の比較的小さい長時間の電場波形と、それに続く比較的短時間の振幅の大きい電場波形を含むことが好ましい。より具体的には、振幅の比較的小さい長時間の電場波形によって、乱れ又は細胞死を生じることなく、細胞のパールチェーンの形成及び整列が徐々に促進される。細胞が一列に並び、パールチェーンの状態になった後、振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形が細胞にかけられる。細胞はすでに整列しており、短時間で、加熱が生じる前に、乱れを生じることなく細胞圧縮が起こる。

10

#### 【0025】

融合前電場波形振幅は、時間に対して段階的に非直線的な形式で変化させることができる。融合前電場波形は、時間に対して連続的に非直線的な形式で振幅を変化させることができる。

#### 【0026】

融合前電場波形としては、時間に対して非直線的な形式で振幅が変化する A C 電場波形などがある。A C 電場波形の振幅は、ノンリニアなアルゴリズムに従って時間に対して非直線的な形式で変えることができる。

#### 【0027】

A C 電場波形は、10 ボルト / cm から 1,000 ボルト / cm の A C 波形電場強度を有することが好ましい。

20

#### 【0028】

振幅が非直線的に段階的に増大する波形を、隣り合うステップ又は隣り合うステップを有しないステップの何れにおいても融合前電場波形としてかけることができる。

#### 【0029】

細胞に、振幅が非直線的な形式で変化する融合前電場波形をかけた後、細胞融合パルスをかける。また、細胞融合パルスをかけた後に、細胞を、ノンリニア A C 電場波形で処理することができる。

#### 【0030】

融合前タイプで A C 振幅が時間とともに変化するなど、時間に対して非直線的な形式で振幅が変化するノンリニア波形のいくつかの実施形態を挙げることができる。振幅の経時的な非直線的变化に使用できるアルゴリズムの例としては、指数 (exponential)、対数 (logarithmic)、多項 (polynomial)、べき関数 (power function)、階段関数 (step function)、シグモイド関数 (sigmoid function)、及び一般的なノンリニアアルゴリズムなどがある。

30

#### 【0031】

以上の点から分かるように、本発明の一の目的は、細胞融合前の誘電泳動波形として、振幅が時間に対して非直線的な形式で変化する新しい改良されたノンリニア融合前電場波形を提供することである。

40

#### 【0032】

本発明の他の目的は、一定の振幅又は直線的に増加する振幅の融合前電場波形で処理された細胞よりも、細胞にかける A C 電場波形による細胞融合効率を高くする細胞融合用のノンリニア誘電泳動波形を提供することである。

#### 【0033】

本発明のさらに他の目的は、細胞融合に供する前に細胞配列を整え、細胞膜接触を密にするための、融合前電場波形によって処理される細胞の加熱が抑えられている新規な改良された細胞融合用ノンリニア誘電泳動波形を提供することである。

#### 【0034】

本発明のさらに他の目的は、細胞を細胞融合に供したときに、細胞融合を行う細胞に振

50

幅の大きい整列波形を即時にかけることによって生じる機械的な力、乱れ及び加熱を回避する、新規な改良された細胞融合用ノンリニア誘電泳動波形を提供することである。

#### 【 0 0 3 5 】

本発明のさらに他の目的は、細胞融合を行う前に融合前電場波形で処理した細胞間の細胞膜接触を密にする、新規な改良された細胞融合用ノンリニア誘電泳動波形を提供することである。

#### 【 0 0 3 6 】

本発明のこれら及びさらに他の目的は、本発明を特徴付ける新規な様々な特性に従って、特に、本開示に添付されその一部を成す特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明、その操作の利点、及びその使用によって達成される具体的目的をより良く理解するためにには、添付した図面及び本発明の好ましい実施形態を示す記述が参照されるべきである。  
10

#### 【 0 0 3 7 】

以下の本発明の詳細な記述を検討することによって、本発明がより良く理解され、上記目的及び上記以外の目的がより明瞭になるであろう。この記述では、添付の図面を参照している。

#### 【 発明を実施するための最良の形態 】

#### 【 0 0 3 8 】

本発明は、細胞融合用ノンリニア誘電泳動波形のための方法及び装置を提供するものである。以下で、本発明の方法及び装置を、図面を参照して説明する。  
20

#### 【 0 0 3 9 】

本発明は、現行技術を改良したものである。本発明によれば、一又は複数の細胞融合パルスを適用する前に、振幅が非直線的に変化するノンリニア電圧波形が細胞にかけられる。図6に散在する細胞10を示す。本発明は、最初に、ノンリニア電圧波形をかけることによって、図7に示すように、隣接細胞間の接線膜接触を生じさせ又は強制する。次いで、本発明は、ノンリニア電圧波形をかけることによって、図8に示すように、隣接細胞間の密な膜接触を生じさせ又は強制する。図8に示すように、細胞10は、ノンリニア電圧波形の影響で互いに圧縮される。

#### 【 0 0 4 0 】

振幅が非直線的な形式で変化するノンリニア電圧波形は、ノンリニアAC電圧波形とすることができます。融合プロセスが細胞タイプに応じて最適化されるように、波形の非線形性パラメータを設定することができる。AC波形の振幅が経時的に非直線的に変化することによって、細胞は一列に並び、より低いエネルギー（より少ない加熱）かつより高い融合効率で融合する。  
30

#### 【 0 0 4 1 】

より具体的には、図10のノンリニアAC電圧波形を参照すると、ノンリニアAC電圧波形は、細胞を密に近接させて整列状態にする第1の波形の部分では、比較的小さなAC電圧振幅を有することが好ましい。次いで、波形の第2の部分では、融合パルスがかけられる直前まで振幅が増大される。この振幅増大によって短時間で強く不均一な電場が形成され、それによって細胞がさらに密に接触するようになる。整列のために使用される電圧が低く、高いAC電圧部分が短時間であるため加熱は低減される。  
40

#### 【 0 0 4 2 】

このタイプの経時的AC振幅変化の実施形態はいくつもあり、例えば、指數、対数、多項、べき関数、階段関数、シグモイド関数、及び一般的なノンリニアアルゴリズムなどである。

#### 【 0 0 4 3 】

このノンリニアな波形の一の実施形態は、以下の数式又はアルゴリズムによって表すことができるべき関数である。

#### 【 0 0 4 4 】

時間の関数としてのAC波形の振幅 =

[ ( 時間 / 全 A C 時間 )<sup>k</sup> × ( 終了振幅 - 開始振幅 ) ] - 開始振幅

**【 0 0 4 5 】**

全 A C 波形時間、 A C 開始振幅、 A C 終了振幅及びべき指数「 k 」はすべて、使用する細胞タイプに対して最適化される。

**【 0 0 4 6 】**

べき指数「 k 」を変える効果を、図 9 のグラフに示す。「 k 」が 2 の場合の特定のべき関数グラフを図 10 に示す。かくして、本発明では、細胞を一列に並べるため、弱い電場を形成する振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形を与え、次いで、 A C 波の終了直前かつ細胞融合 / 電気穿孔パルスの開始直前に、強い電場の振幅を形成する比較的大きい短時間の融合前電場波形を与えて、細胞を強制的に密に接触させる。この本発明による振幅の非直線的な変化手法は、加熱及び乱れも少なく、それによってさらに細胞ハイブリッドの產生及び產生効率も増大する。10

**【 0 0 4 7 】**

上述したように、選択したべき関数定数「 k 」が 2 であるべき関数の、融合前電場波形としてかけられる振幅が非直線的に増大する連続波形を図 10 に示す。

**【 0 0 4 8 】**

図 11 は、融合前電場波形としてかけられ、振幅が非直線的な形式で変化する S 字型のノンリニアーワー波形を示し、この波形においては、比較的小さい長時間の融合前電場波形から、振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形へ、比較的ゆっくり移行している。20

**【 0 0 4 9 】**

図 12 は、融合前電場波形としてかけられ、振幅が非直線的な形式で変化する S 字型のノンリニアーワー波形を示し、この波形においては、振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形から、振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形へ、比較的素早く移行している。20

**【 0 0 5 0 】**

図 13 は、融合前電場波形としてかけられ、その振幅が非直線的な形式で変化し段階的に増大するノンリニアーワー波形を示す。この波形においては、融合前電場波形が、隣接するステップがないステップとして与えられている。第 1 の融合前電場波形は振幅が比較的小さく長時間の融合前電場波形であり、オフタイムが設けられ、第 2 の融合前電場波形は振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形である。30

**【 0 0 5 1 】**

図 14 は、融合前電場波形としてかけられ、その振幅が非直線的な形式で変化し段階的に増大するノンリニアーワー波形を示す。この波形においては、融合前電場波形は隣接するステップを有するステップとして与えられている。第 1 の融合前電場波形は振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形であり、第 2 の融合前電場波形は振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形であって、第 1 の融合前電場波形の直後にかけられる。30

**【 0 0 5 2 】**

本発明は、上述したような融合前電場波形を生じる装置によって実施することができる。この点に関しては、 P A - 1 0 1 A C 波形発生装置を備えた C y t o P u l s e P A - 4 0 0 0 システムにソフトウェア変更が成された。この C y t o P u l s e S c i e n c e s , I n c . P u l s e A g i l e ( 米国特許商標庁登録商標 ) システムソフトウェアは、現在、この波形を発生する ( 参照により本明細書に援用する米国特許第 6,010,613 号を参照されたい ) 。ノンリニアーワー A C 波形パラメータをユーザーが入力すると、コンピュータは A C 波形 ( 融合前電場波形 ) 及び融合パルス波形 ( 電気穿孔波形 ) を発生する。40

**【 実施例 】**

**【 0 0 5 3 】**

実験を実施して、振幅が非直線的な形式で変化する段階的融合前電場波形によって細胞融合が改善されることが示された。

**【 0 0 5 4 】**

A 5 4 9 細胞を A T C C から購入した。この細胞を解凍し、 A T C C の推奨する培地を50

有する組織培養フラスコに入れた。サイトカインの混合物中で末梢血単核球を7日間培養して調製された樹状細胞を融合パートナーとして用いた。

#### 【0055】

800万細胞/ミリリットルの各細胞タイプを均等に混合して、混合物中400万細胞/ミリリットルの最終濃度の各細胞タイプを得た。細胞懸濁液体積3ミリリットルを各融合に使用した。

#### 【0056】

手順は以下のステップからなった。

細胞を遠心分離して、Cyto Pulse市販Cytofusion培地(フォーミュラC)10ミリリットルに再懸濁した。細胞を同じ培地で2回洗浄し、洗浄後Cyto fusion培地に再懸濁した。細胞をカウントし、細胞濃度を800万細胞/ミリリットルに調節した。等体積のA549細胞と樹状細胞を混合した。細胞懸濁液3ミリリットルを、陰極から4mmの間隔を置いた直径3.9cmの内部円柱状陽極を有する容量6ミリリットルの同軸細胞融合電極中に入れた。

以下の細胞融合プロトコールを用いた。

#### 【0057】

2つの実験グループ及び1つの対照グループに対するパラメータは以下のとおりである。

##### グループA：(本発明)

第1の融合前電場波形：45V～45V、20秒、0.8MHz

第2の融合前電場波形：75V～75V、10秒、0.8MHz

融合/電気穿孔パルス 1X800V、40マイクロ秒

融合後/電気穿孔パルス 45V～45V、50秒、0.8MHz

#### 【0058】

##### グループB：(従来技術)

第1の融合前電場波形：75V～75V、10秒、0.8MHz

融合/電気穿孔パルス 1X800V、40マイクロ秒

融合後/電気穿孔パルス 45V～45V、50秒、0.8MHz

#### 【0059】

##### グループC：(対照-電気なし)

融合後、細胞を30分間静置して、融合を成熟させた。10%ウシ胎児血清を含む組織培養培地3ミリリットルを、細胞融合電極中で細胞懸濁液に添加した。15分後、細胞を分析するため回収した。

#### 【0060】

市販のCytopsin(Shandon)遠心分離機を用いて、シラン処理した(silinized)顕微鏡用のスライド上に一定分量の細胞を置いた。免疫組織化学によって細胞を同定した。抗ケラチンモノクローナル抗体を用いてA549細胞を同定し、抗ヒトHLA-DRモノクローナル抗体を用いて樹状細胞を同定した。マイヤーヘマトキシレン(hematoxylin)を用いて核を対比染色した。褐色ケラチン染色又は赤色HLA-DR染色のどちらか又は両方の細胞を手動でカウントした。

#### 【0061】

(細胞融合前に本発明の融合前電場波形によって処理した)グループAのA549と樹状細胞の混合物、(細胞融合前に従来技術の融合前電場波形によって処理した)グループBのA549と樹状細胞の混合物、及び(細胞融合前に融合前電場波形による処理をまったく受けていない)グループCのA549と樹状細胞の混合物に対する融合細胞パーセントを示した結果を下表に示す。

## 【表1】

表

グループ	融合された A549/A549	融合された den./den.	融合された den./A549
A (本発明)	7.2%	5.4%	22.7%
B (従来技術)	6.8%	4.0%	18.1%
C (対照)	2.2%	2.2%	10.8%

## 【0062】

表について説明すると、第1列には、融合処理にかけたA549細胞及び樹状細胞(den.)のそれぞれのグループを示した。第2列には、A549細胞と別のA549細胞との融合によって形成された融合細胞の百分率を示した。第3列には、樹状細胞と別の樹状細胞との融合によって形成された融合細胞の百分率を示した。第4列には、樹状細胞とA549細胞との融合によって形成された融合細胞の百分率を示した。

## 【0063】

各タイプの細胞融合(A549/A549、den./den.及びden./A549)では、融合細胞の百分率は、(本発明の融合前電場波形を使用する)グループAが、(従来技術の融合前電場波形を使用する)グループB又は(融合前電場波形を全く使用しない)グループCのどちらよりも大きいことが注目される。より具体的には、7.2%は6.8%よりも大きく、2.2%よりも大きい。また、5.4%は4.0%よりも大きく、2.2%よりも大きい。また、22.7%は18.1%よりも大きく、10.8%よりも大きい。要約すると、本発明の融合前電場波形を使用することによって、従来技術の融合前電場波形を使用するよりも、又は融合前電場波形をまったく使用しないよりも、融合効率が高くなる。

## 【0064】

本発明の使用方法及び操作に関しては、以上の開示から同様であることが明らかであり、したがって、使用方法及び操作に関連するこれ以上の考察は不要である。

## 【0065】

一定の振幅又は直線的に増加する振幅の融合前電場波形によって処理された細胞よりも細胞融合効率を高める融合前電場波形を細胞に与えるために有利に使用することができる、新規な改良された細胞融合用ノンリニア誘電泳動波形を提供することによって、記載した目的のすべてを本発明が達成できることは上記より明らかである。本発明では、ノンリニア誘電泳動波形によって、細胞融合を行う細胞に振幅の大きい整列波形を即時にかけることから生じる機械的力、乱れ及び加熱が回避される。本発明では、ノンリニア誘電泳動波形によって、融合前電場波形によって処理される細胞の加熱が減少し、細胞融合に供する前に、細胞配列が整い細胞膜接触が密になる。本発明によれば、ノンリニア誘電泳動波形によって、細胞融合を行う前に融合前電場波形によって処理された細胞間の細胞膜接触が密になる。

## 【0066】

かくして、本発明を、現時点で本発明の最も実際的で好ましい思われる実施形態との関連において、具体的かつ詳細に図面に示し十分に説明したが、本明細書に記載する原理及び概念から逸脱することなくななる、サイズ、材料、形状、形式、機能、並びに操作、アセンブリ及び使用の方法の変更を含めて(ただしこれらだけに限定されない)、本発明の多数の変更形態が当業者には明らかなはずである。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0067】

【図1】図1は、非対称電極によって形成される不均一電場の影響下にある細胞における、従来技術による双極子の形成を示す。

【図2】図2は、非対称電極によって形成される不均一電場における、従来技術による細

10

20

30

40

50

胞移動経路、並びに細胞のパールチェーン配列及び形成を示す。

【図3】図3は、従来技術による、一定振幅の融合前電場波形を示す。

【図4】図4は、従来技術による、振幅が直線的に増加する融合前電場波形を示す。

【図5】図5は、融合前電場波形の後に融合／電気穿孔パルスが続き、さらに融合後電場波形が続く電場波形を用いて細胞融合を実施するための一般的な従来技術の手順全般を示す。

【図6】図6は、本発明のノンリニア誘電泳動波形をかける前の独立した細胞を示す。

【図7】図7は、本発明の振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形を適用している際の、パールチェーン配列状態で接線接触している細胞を示す図である。

【図8】図8は、図7においてかけられた振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形を適用した後、本発明の振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形をかけた際の、密に接觸し圧縮された細胞を示す。 10

【図9】図9は、定数「 $k$ 」が変動するべき関数を用いて細胞にかけられる融合前電場波形の変化を示すグラフである。定数「 $k$ 」に各々の選択において、振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形部分の後に振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形部分があることに留意されたい。

【図10】図10は、図9の選択されたべき関数定数「 $k$ 」を有するべき関数と同様の融合前電場AC波形をかけた、選択された「 $k$ 」で変調された非直線的に増大する連続AC波形を示すグラフである。振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形部分の後に、振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形部分が続いていることが示されている。 20

【図11】振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形から振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形への移行が比較的遅い、融合前電場波形としてかけられたS字状ノンリニア波形を示す。

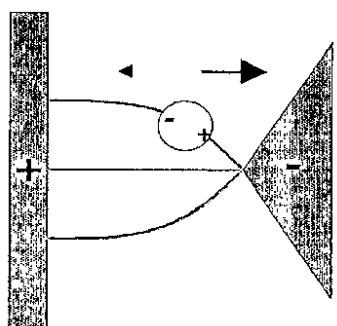
【図12】振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形から振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形への移行が比較的速い、融合前電場波形としてかけられたS字状ノンリニア波形を示す。

【図13】融合前電場波形が隣接するステップのないステップとして与えられ、第1の融合前電場波形が振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形であり、オフタイムが設けられ、第2の融合前電場波形が振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形である、融合前電場波形としてかけられた、段階的に増大するノンリニア波形を示す。 30

【図14】融合前電場波形が隣接するステップを有するステップとして与えられ、第1の融合前電場波形が振幅の比較的小さい長時間の融合前電場波形であり、第2の融合前電場波形が振幅の比較的大きい短時間の融合前電場波形であって第1の融合前電場波形の直後にかけられる、融合前電場波形としてかけられた、段階的に増大するノンリニア波形を示す。

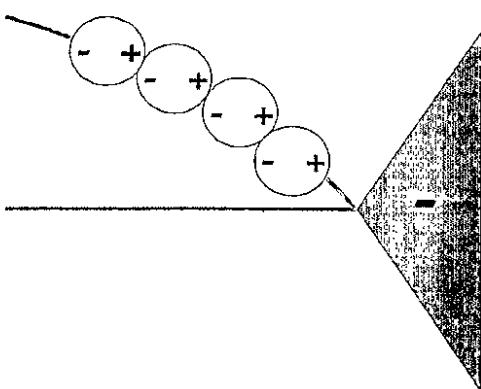
【図1】

## 不均一場移動



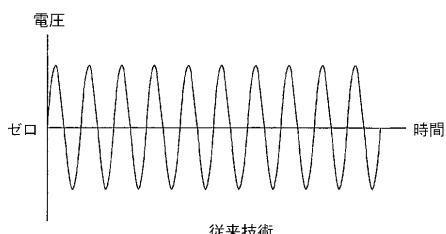
従来技術

【図2】

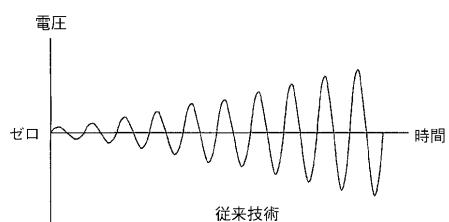


従来技術

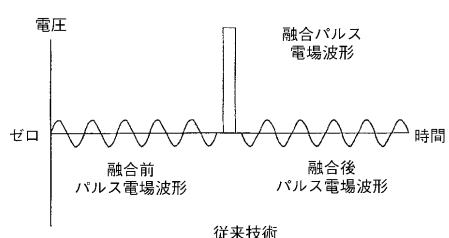
【図3】



【図4】



【図5】



【図7】

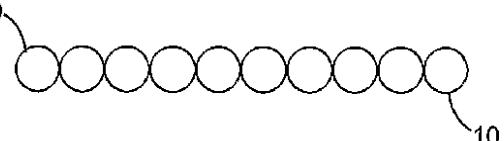


FIG. 7

【図8】

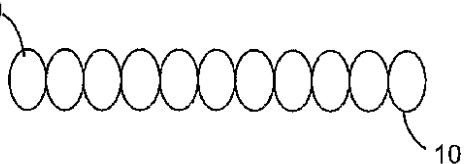


FIG. 8

【図6】

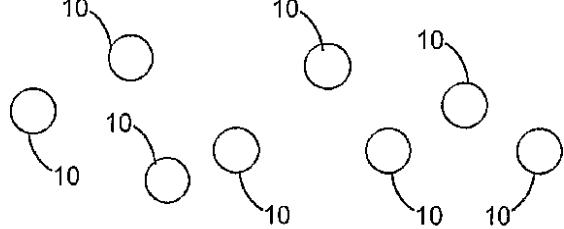
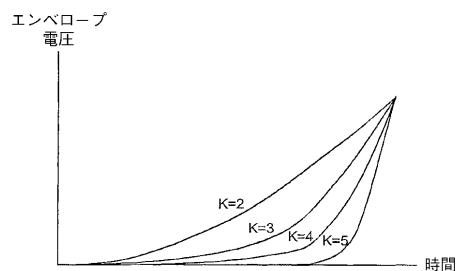
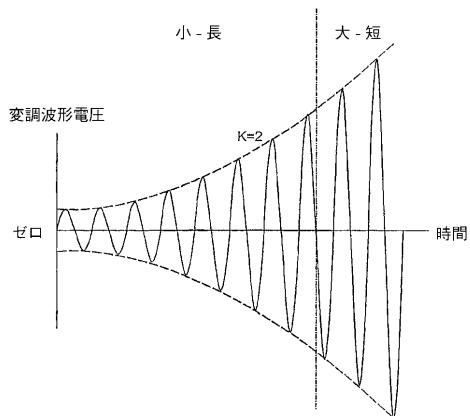


FIG. 6

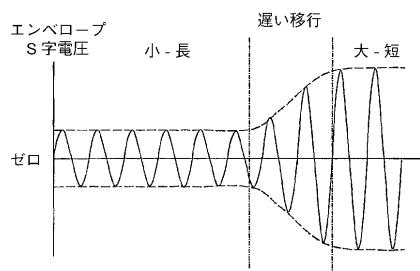
【図 9】



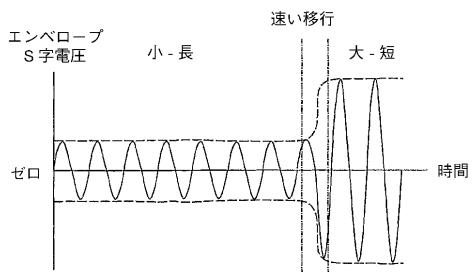
【図 10】



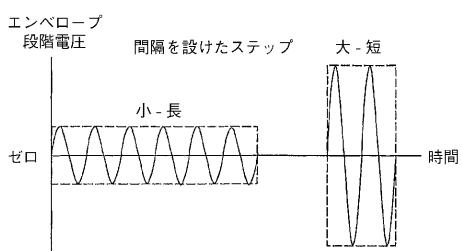
【図 11】



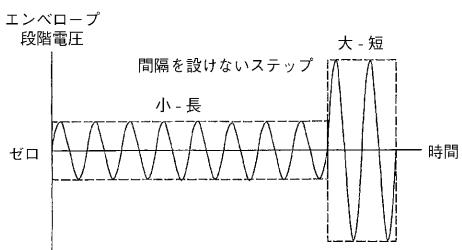
【図 12】



【図 13】



【図 14】



---

フロントページの続き

(72)発明者 ウォルターズ、リチャード、イー。

アメリカ合衆国、メリーランド、コロンビア、 ワイルド スワン ウェイ 6248

(72)発明者 ウォルターズ、デリン、シー。

アメリカ合衆国、テキサス、オースチン、 メドウファイヤー ドライブ 11931

(72)発明者 キング、アラン、ディ。

アメリカ合衆国、メリーランド、タコマ パーク、 リンカーン アベニュー 405

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 J.Membrane Biol.,1982,Vol.67,p.165-182

Biochimica et Biophysica Acta,1989,Vol.980,p.1-8

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 1/00-7/08、15/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)