



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1826408 B

(45) 授权公告日 2011.01.26

(21) 申请号 200480012680.3

(22) 申请日 2004.03.15

(30) 优先权数据

60/454,360 2003.03.14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.11.10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/005237 2004.03.15

(87) PCT申请的公布数据

W02004/083379 EN 2004.09.30

(73) 专利权人 塞托·帕尔斯科技公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 理查德·E·沃尔特斯 阿兰·D·金

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张平元 赵仁临

(51) Int. Cl.

C12N 13/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5720921 A, 1998.02.24, 全文.

US 6010613 A, 全文.

US 4800163 A, 1989.01.24, 全文.

审查员 丁慧萍

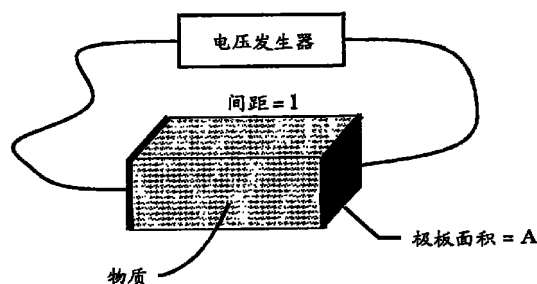
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 3 页

(54) 发明名称

大容量离体电穿孔法

(57) 摘要

本发明的目的在于提供一种用外原性物质处理泡囊以将外原性物质嵌入泡囊中的电穿孔法,该方法包括下列步骤:a) 将泡囊和外原性物质的悬浮液保留在包括电极的室中的处理容积内,其中该室具有由电极间距的平方(cm^2)除以室体积(cm^3)的商定义的几何因子(cm^{-1}),其中该几何因子小于或等于 0.1cm^{-1} ,其中所述泡囊和外原性物质的悬浮液处于介质中,该介质经调整以便其电导率为 $0.01 \sim 1.0$ 毫西门子,其中在处理过程该悬浮液封闭在室中,及b) 用一个或多个脉冲电场处理封闭在室中的悬浮液。利用该方法,所述悬浮液的处理容积是可以按比例变化的,而且泡囊在室中的处理时间基本上是相同的。



1. 一种用外原性物质处理泡囊以将该外原性物质嵌入泡囊中的方法,该方法包括下列步骤:

a) 将以悬浮液形式在介质中的泡囊和外原性物质保留在包括电极的室中的处理容积内,其中该室具有通过电极间距平方 (cm^2) 除以室体积 (cm^3) 而得到的商来定义的几何因子 (cm^{-1}),其中所述几何因子小于或者等于 $0.1 (\text{cm}^{-1})$,其中所述泡囊、外原性物质和介质的悬浮液经过调整,使在室中要处理的物质的电导率为 $0.001 \sim 100$ 毫西门子 /cm,其中在室中要处理的物质的总电阻大于 1 欧姆,其中所述悬浮液在处理过程被封闭在所述室中;及

b) 用一个或多个脉冲电场处理封闭在所述室中的悬浮液,

其中根据上述的 a) 和 b) 步骤,所述悬浮液的处理容积是可以按比例变化的,在室中泡囊的处理时间对于所有泡囊来说基本上相同。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中所述室为封闭室。

3. 根据权利要求 1 的方法,其中所述室具有至少 2 毫升的容量。

4. 根据权利要求 1 的方法,其中所述室及其内容物是无菌的。

5. 根据权利要求 1 的方法,其中所述室具有入口和出口,以使所述悬浮液进入和移出。

6. 根据权利要求 1 的方法,其中所述电极为平行板电极。

7. 根据权利要求 1 的方法,其中所述电场包含矩形电压脉冲波形,以在平行板电极之间产生大于 100 伏特 /cm 并小于 5000 伏特 /cm 的均匀脉冲电场,该电场在整个处理容积中基本上是均匀的。

8. 根据权利要求 1 的方法,其中所述脉冲电场从电脉冲指向所述外原性物质,该电脉冲为至少三个非正弦电脉冲的序列,其场强等于或大于 100V/cm ,其中所述至少三个非正弦电脉冲的序列具有下面特性中的一个、两个或三个:(1) 在所述至少三个电脉冲中,至少有两个具有彼此不同的脉冲振幅;(2) 在所述至少三个电脉冲中,至少有两个具有彼此不同的脉冲宽度;及(3) 在所述至少三个电脉冲中,第一组两个脉冲之间的时间间隔不同于第二组两个脉冲之间的时间间隔。

9. 根据权利要求 1 的方法,该方法连续批量地进行。

10. 根据权利要求 1 的方法,其中所述外原性物质为治疗性物质。

11. 根据权利要求 1 的方法,其中在利用外原性物质对泡囊处理中产生治疗性产物。

12. 根据权利要求 1 的方法,其中所述外原性物质为多核苷酸。

13. 根据权利要求 1 的方法,其中所述外原性物质为多肽。

14. 根据权利要求 1 的方法,其中所述外原性物质为蛋白质。

15. 根据权利要求 1 的方法,其中所述室具有室体积,所述悬浮液具有悬浮液体积,并且悬浮液体积大于室体积,而且其中

将初始部分的悬浮液体积移入室中,在室中保留和处理,并从室中移出;及

将另外部分的悬浮液体积移入室中,在室中保留和处理,及从室中移出。

16. 根据权利要求 1 的方法,其中将再更多部分的所述悬浮液体积顺序移入室中,在室中保留和处理,并从室中移出。

17. 根据权利要求 1 的方法,其中所述泡囊和外原性物质的悬浮液处于介质中,其经过调整,使得介质的电导率为 $0.01 \sim 1.0$ 毫西门子 /cm。

18. 一种电穿孔仪,包括:

室,其体积为至少 2 毫升;

在所述室内部包含的一对电穿孔电极;

电穿孔介质,该电穿孔介质以悬浮液形式携带泡囊,并包含在所述室内,位于电穿孔电极之间,其中在室中要处理物质的电导率为 0.001 ~ 100 毫西门子 /cm,和其中在室中要处理物质的总电阻大于 1 欧姆;

脉冲电压电源,其与所述电穿孔电极电连接;及

向电穿孔处理室中加入物质以在其中进行电穿孔处理的装置和从该室中移除处理过的物质的装置。

19. 根据权利要求 18 的电穿孔仪,其中所述室包含通风装置,以在将流体移入所述室中时排出空气。

20. 根据权利要求 18 的电穿孔仪,其中所述室包含室入口和室出口。

21. 根据权利要求 18 的电穿孔仪,还包括:

与所述室入口液接的第一储器,以在将电穿孔介质引入到所述室之前储存所述具有泡囊的电穿孔介质;

与所述室入口液接的第二储器,以储存室冲洗物质,用于从所述室中冲洗出处理过的具有泡囊的介质;及

与所述室出口液接的第三储器,以接收从所述室冲洗出来的处理过的具有泡囊的介质。

22. 根据权利要求 18 的电穿孔仪,其中所述介质具有 0.01-1.0 毫西门子 /cm 的电导率。

大容量离体电穿孔法

[0001] 相关专利申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 Walters 和 King 之共同待审的美国申请的优先权, 该申请的序列号为 60/454360, 申请日为 2003 年 3 月 14 日, 题为“大容量离体电穿孔法”。

技术领域

[0003] 总体上本发明涉及一种离体 (ex vivo) 电穿孔法, 更具体地, 本发明涉及一种特别适于临床和工业应用的电穿孔法。

背景技术

[0004] 多年以来, 在文献中已经论述了为了治疗目的, 利用离体或体外 (in vitro) 电穿孔法将大分子导入活细胞中。电穿孔的目的在于增强分子进出活细胞或非活体泡囊 (vesicle) 的移动。电穿孔的实际用途很多, 并且可以根据所导入物质的复杂性、导入场所和导入目的而变化。

[0005] 复杂性包括从难于进入细胞的小的药物分子到多核苷酸的复杂混合物。

[0006] 广义上讲, 导入场所分为体内 (in vivo) 导入和离体导入。体内部位的选择基于要处理的组织的位置和是否需要局部或全身处理。

[0007] 该方法可应用于临床和工业。在临床和工业应用中, 常常希望将大分子嵌入到许多细胞中并确保所有细胞均被同等地处理了。为此, 需要同时处理所有的细胞, 以保证所有细胞均经受相同的处理条件。

[0008] 导入的治疗用途很多。其一些实例包括基因置换疗法, 用于后天性疾病的治疗性遗传性药物, 多核苷酸疫苗, 免疫疗法, 增强的化学疗法及其它。工业和农业应用同样是多样的。工业应用的一些实例包括从发酵罐中产生的细胞中提取物质, 用于制备重组体蛋白的大规模转染, 工业用途的细胞改良, 液体或疫苗生产的杀菌。农业用途的一些实例包括牲畜 (包括有蹄类、鸟类和水生动物) 的疫苗和用于改善选定性状的基因改性。

[0009] 对于标准的体外电穿孔而言, 通常使用比色杯 (cuvette)。这些比色杯是由平行板电极构成的嵌入塑料中的且容量有限的腔室。用于这些比色杯的容积小于 1 毫升。有限的容积限制了处理细胞的总容量。

[0010] 常用的细胞密度为每毫升 100 万~1000 万个细胞。细胞一般放在具有高离子含量的生理介质如磷酸盐缓冲的盐水中, 其电导率为每立方厘米 0.017 西门子/cm (17000mS/cm)。

[0011] 在电穿孔中, 细胞密度是重要的参数。如果细胞不足够稠密, 那么就浪费了治疗性物质或其它物质。如果细胞太稠密, 则每个细胞附近的电场在方向或强度方面就不均匀。为了得到临床应用所需的一致性结果, 接近细胞的电场必须在方向和强度方面都是均匀的。根据 Fomekong 等人在“Passivelectrical properties of RBC suspensions: changes due to distribution of relaxation times in dependence on the cell volume fraction and medium conductivity”, in Bioelectrochemistry and Bioenergetics,

1998, Vol 47 :81-88) 中所述,细胞对于细胞悬浮液的电性质的影响,取决于细胞的红细胞压积 (packed cell volume)。对于小于 10% 的红细胞压积,细胞之间的距离快速增加,因此,在低于 10% 的红细胞压积下,电场中一个细胞对于另一个细胞的干扰作用快速下降。直径为 15 微米的典型细胞在约 6000 万个细胞 /ml 的密度下会具有 10% 的红细胞压积 (利用 0.000001767mm^3 / 细胞的平均细胞体积算得)。因而,应该使用 6000 万个细胞 /ml 以下的细胞密度,通常使用 3000 万个细胞 /ml 以下的细胞密度。

[0012]

表 1 电极室容积的毫升数

出来数	进入数	细胞密度	
100 万 /ml	100 万 /ml	2000 万 /ml	4000 万 /ml
10	20	1	0.5
100	200	20	5
1000	2000	100	50

[0013] 临床应用通常需要 1000 万~5 亿个其中已经适当地嵌入了大分子的细胞。如果处置需要 5 个剂量,且每个剂量(处置)需要 1000 万个细胞,那么必须准备至少 5000 万个治疗细胞。如果假定电穿孔法的效率为 50%,且细胞以 2000 万个细胞 /ml 的浓度接受处理,那么将需要 5ml 容量的电极 ($5000 \text{万} \times 2 / 2000 \text{万}$)。如果需要 1 亿个治疗细胞,则需要 10ml 容量的电极。

[0014] 要获得所需的容量,不能简单地增加电极的尺寸,因为由于电极电阻的降低,电极尺寸的增加导致电流强度成比例地增加。随着电极尺寸增加,只要所用介质的电导率保持恒定,电极电阻就降低。

[0015] 如果需要 1 亿个治疗细胞且输入细胞密度为每毫升 2000 万个细胞,那么就需要 20ml 电极。

[0016] 这种情况下,仅按比例将电极的尺寸增加到 20 毫升并不起作用。电极体积的增加,电极的电阻因介质的电导率而降低。介质在电极中的电阻计算如下:

[0017] 式 1:

[0018]

$$R = \frac{1}{\sigma} \frac{\text{间距}}{\text{面积}} (\text{欧姆})$$

[0019] 式中 σ 为电导率,单位为西门子 /cm,间距单位为 cm,极板面积单位为 cm^2 。另外:

[0020] 式 2:

[0021] 体积 = 间距 $\times$ 面积 (cm^3), 及

[0022] 式 3:

[0023]

$$R = \frac{1}{\sigma} \frac{\text{间距}^2}{\text{体积}} (\text{欧姆})$$

[0024] 在上面提及的式 1、2 和 3 出自 Electroporation and Electrofusion in Cell Biology, edited by Eberhard Neumann, Arthur Sowers, and Carol Jordan, Plenum Press, 1989。

[0025] 下面表 2 给出了在 4- 毫米间距和介质电导率为 0.017 西门子 /cm 的条件下,作为体积的函数的电极室电阻。

[0026]

表 2

电极体积 /ml	介质电阻 / 欧姆
0.5	19.2
1	9.6
5	1.92
10	0.96
50	0.19

[0027] 当电极室体积超过 1ml 时,离子溶液的电阻小得不切实际;由于破坏细胞的高脉冲电流,将会产生显著的溶液加热作用。

[0028] 为了解决该问题,已经开发出流动经过 (flow through) 技术。在该方法中,大体积的介质流过小的处理室,并将电压脉冲波形施加到室中的平行板电极上。该方法的问题在于:

[0029] 1. 不是所有细胞都暴露于强度和方向相同的电场。

[0030] 2. 不能保证要嵌入的物质的密度和细胞的密度均为恒定的。

[0031] 3. 仅可以施加均匀的脉冲电压。不能使用如 US 6010613 中所公开的可变矩形脉冲波形。

[0032] 在流动经过法中,没有保证所有的细胞均经受强度和方向相同的电场。在这方面,因为层流和湍流的性质,在流动经过法中不是所有的细胞都被处理相同的时间。最接近流经性导管壁的薄层比远离管壁的薄层移动得慢。流动经过法既可以用于电场强度超过 20000 伏特 /cm 的食品加工中,也可以用于为了治疗目的而将分子嵌入细胞中。

[0033] 在电穿孔领域存在大量的现有技术,而且这些大量现有技术的许多方面都是本发明特别感兴趣的。例如,本发明特别感兴趣的是电穿孔介质的公开,特别关注的是介质参数。在这方面,本文中的表 3 列出了很多与电穿孔介质参数如阳离子、阴离子、摩尔渗透压浓度和缓冲液有关的文献。

[0034]

表 3 下表总结了本领域的现状:

公布	电导率	阳离子		阴离子	摩尔渗透压浓度	缓冲液
	($\mu\text{S}/\text{cm}$)	高浓度	低浓度			
发明	低(50~150)	无	Ca, Mg	有机物	L-N	组氨酸
US 5124259	高	K	Ca, Mg	有机物	N	
US 6040184	非常低	无	无	无	L-N	无
US 6338965	非常低	无	无	无	L-N	无
US 6368784	高	K	Ca, Mg	Cl	N	Phos., HEPES
Djuzenova 1996	中等至高 (800~14000)	Na, K	Ca	Cl, 硫酸盐	N	磷酸盐 (Phos.)
Kinosita 1977	高	Na		Cl		Phos.
Dimitrov 1990	低至中等		Na	Phos., Cl		Phos.
Rols 1989	低和高	Na		Cl		Phos.
Pucilar 2001	低和高	Na, K(如果使用)	Mg	Cl, 硫酸盐	N	Phos

[0035] 关于表 3 的具体内容,US 5124259 描述了一种提供高转染效率的电穿孔介质。该介质含有钾离子 (35 ~ 105 毫克当量 / 升) 和有机阴离子且基本上不含氯离子。由于钾离子,该介质是高度导电的。没有讨论为了能够利用大电穿孔电极而利用低导电介质。

[0036] US 6040184 和 US 6338965 描述了一种基本上不含离子的电穿孔介质。通过利用糖和非无机离子,使该介质为非离子性。该专利描述了利用非离子性介质而在细菌中增加的转染效率。该专利没有提及为了提供若干电导率及因此提供若干电流以在电穿孔过程中保持电场,而加入少量有机离子。

[0037] US 6368784 描述了一种电穿孔缓冲液,其也是低温防护剂。该专利还描述了将该物质用于在转染之前冷冻细胞。所使用的介质具有高浓度的钾离子,其与细胞内的细胞质中相似并与在 US 5124259 中所述相似。该专利没有描述为了能够利用更大容量电极,而利用具有较低电导率的电穿孔介质。

[0038] 介质的电导率影响物质向细胞的移动。Djuezenova (Djuzenova 等人, *Biochimica et Biophysica Acta* V 1284, 1996, p143-152) 指出在低到 1mS/cm 的较低电导率介质中,小分子的吸收得到增加,1mS/cm 为研究中使用的最低电导率。其它研究者同意在电穿孔过程中较低的电导率增加细胞向小分子的参透性 (Kinosita, K, Tsong, TY, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977 V74 :1923-1927) (Kinosita, K, Tsong, TY *Nature*, 1977 V268 :438-440) (Dimitrov, DS, Sowers, AE, *Biochem. Biophys. Acta*. 1990, V 1022 :381-392)。

[0039] Kinosita 证实,利用给定的电场,具有高电导率的介质允许小离子 (钠和钾) 的渗漏,而具有较低电导率的介质允许较大分子 (蔗糖而不是蛋白质) 通过红血球膜。更具体地, Kinosita 等人公开了采用电穿孔步骤对人红血球的溶血作用。关于用于电穿孔的细胞,没有公开电极表面积。因此,细胞室体积很重要,并且是不能确定的。规定了宽范围的介质电导率。规定了宽范围的电极间距。然而,没有提供关于具体选择任一组介质电导率和电极间距的教导。

[0040] Dimitrov 指出,与具有低电导率的介质相比,具有中等电导率的介质中荧光染料从电穿孔的红血球中的泄露较少。利用测量小分子的渗透性的敏感性化验,一群人 (Pucihar G 等人的 *Bioelectrochemistry*, 2001, V 54 :107-115) 表明,在给定电场下降低电穿孔缓冲液的电导率没有导致渗透性变化,而导致活细胞增加。所利用的化验,即使用博来霉素的电穿孔,检测到小量小分子吸收,并且对于在给定细胞中的电穿孔量的变化不敏感。

[0041] 其他人发现了恰恰相反的作用,如在“Better permeability of cells to small molecules was seen during electroporation using media of higher conductivity” (Rols, MP, Tiessie, *Eur. J. Biochem* 1989 V 179 :109-115) 中所公开的。Rols 和 Tiessie 指出,在相等的场强和脉冲数下,在高钠介质中对于小分子锥虫蓝的渗透性较大。其他人 (vnd den Hoff, MJ, Christoffels, VM, Labruyere, WT, Moorman, AF, Lamers, WH, *Electrotransfection with “intracellular” buffer*, 1995, *Methods Mol. Biol.* V48 : 185-197) 利用高浓度的钾来模仿细胞内的离子含量,以努力保持细胞成活力。更近的研究 (Baron, S 等人, *J. Immunol. Meth.*, 2000 V242 :115-126) 利用商业上得到的具有高钾含量的介质 (VisSpan, Belzer UWcold-storage solution, DuPont Pharmaceuticals) 来增加电穿孔效力。在该研究中所传送的物质为大分子如蛋白质和 DNA。

[0042] 上述文献都没有讨论利用具有较低电导率的介质实现大分子到哺乳动物细胞中的移动。这些文献都没有讨论利用具有较低电导率的介质能够允许使用大容量的电极。

[0043] 介质的其它成分既有助于转染又有助于细胞成活力。所使用的一种成分为钾。与细胞内的量相等的生理学含量的钾往往增加在电穿孔的细胞中的成活力。van den Hoff(van den Hoff 等人的 Nucleic Acids Res., vol. 20, No. 11, 1992, p. 2902) 和其他人指出了这点。将钾加入到电穿孔介质中,增加了介质的电导率并使得介质更不适合用于更大的电极中。

[0044] 也报道了钙离子增加电穿孔后细胞的成活力。据报道,成活力增加的原因是在电穿孔后再密封过程中钙的贡献。由于钙引起的成活力增加被小分子吸收的降低稍微抵消,大概根据由于钙引起的孔隙闭合增加的相同机理。根据因为使用少量钙而增加的电导率,以低成本获得由于少量钙 (0. 1mM) 引起的成活力增加。因此,希望向电穿孔介质中加入钙。

[0045] 介质的摩尔渗透压浓度影响细胞的成活力和大分子移动经过细胞膜的效率。多数电穿孔是利用具有标准摩尔渗透压浓度的介质进行的。然而,利用低于摩尔渗透压浓度的(hypoosmolar) 介质可以增加 DNA 转染效率(van denHoff 等人的 Nucleic Acids Res., vol. 18, No. 21, 1990, p. 6464) (Golzio 等人的 Biophys. J., vol. 74, 1998, pp. 3015-3022)。可以利用非离子性化合物如糖、糖醇、其它无毒的有机化合物的氨基糖,来调节电穿孔介质中的摩尔渗透压浓度。这些物质没有增加电导率。可以利用无机阴离子与无机或有机阳离子精确控制电导率。希望利用非离子性有机物质来调节摩尔渗透压浓度,而不影响电导率。

[0046] 其它参考文献包括:Melkonyan 等人的“Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide(DMSO)”, Nucleic Acids Res., vol. 24, No. 21, 1996, pp. 4356-4357 和 Rols 等人的“Control by ATP and ADP of voltage-induced mammalian-cell-membrane permeabilization, gene transfer and resulting expression”, Eur. J. Biochem., vol. 254, 1998, pp. 382-388。

[0047] 关于在现有技术中公开的电穿孔法和仪器,在本文中的其它参数是很重要的。特别重要的是下列参数:容量,细胞处理的环境(静止或流动),所处理的物质,是否提供临床应用,及所使用的介质或缓冲液。表 4 列出了许多关于这些参数的 US 专利。

[0048]

表 4

专利	容量	静止或流动	处理的物质	临床应用	所使用的介质或缓冲液
US 4695472	大	流动	食物	N	食物
US 4695547	小	静止	细胞	N	任何
US 4838154	大	流动	食物	N	食物
US 4849089	小	静止	细胞	N	任何
US 4882281	小	静止	细胞	N	任何
US 5048404	大	流动	食物	N	食物
US 5098843	大	流动*	细胞	可能	非离子性
US 5128257	小	静止	粘附细胞	N	离子
US 5134070	小	静止	粘附细胞	N	离子
US 5137817	小**	静止	细胞	Y	任何
US 5173158	小	静止(过滤器上)	细胞	可能	任何
US 5186800	小	静止	细菌	N	低离子
US 5232856	小	静止	粘附细胞	N	任何
US 5235905	大	流动	食物	N	食物
US 5283194	小	静止	细胞	可能	任何
US 5545130	大	流动	血液	Y	离子

US 5676646	大	流动	血液	Y	离子
US 5720921	大	流动	血液	Y	离子
US 5776529	大	流动	食物	N	离子
US 5874268	小	静止	粘附细胞	N	任何
US 6001617	小	静止	粘附细胞	N	任何
US 6074605	大	流动	血液	Y	离子

[0049] 表 4 的注释：

[0050] * 电场总是存在，没有脉冲，有效脉冲宽度由流速确定；

[0051] ** 镀在表面上的电极

[0052] 更具体地，关于在表 2 中列举的专利，US 4695472 描述了利用大体积流经室 (flow through chamber) 由电穿孔法对食物进行处理。不能减小食物的电导率，具有大的有效容量，没有临床应用。

[0053] US 4695547 描述了用于在圆组织培养皿内电穿孔的圆电极。没有低传导性介质，没有大尺寸，没有临床应用。

[0054] US 4838154 描述了利用大体积流经室由电穿孔对食物进行处理。不能减小食物的电导率，具有大的有效容量，没有临床应用。

[0055] US 4849089 描述了用于利用全封闭室进行电穿孔的圆电极。没有低传导性介质，没有大尺寸，没有临床应用。

[0056] US 4882281 描述了用于在圆组织培养皿内进行电穿孔的圆电极。没有低传导性介质，没有大尺寸，没有临床应用。

[0057] US 5048404 描述了利用大体积流经室由电穿孔法对食物进行处理。不能减小食物的电导率，具有大的有效容量，没有临床应用。

[0058] US 5098843 描述了用于细胞转染的流经性电穿孔室。一直有脉冲并且有效脉冲宽度由在该室中的时间（流速）确定。描述了非离子性介质，但是没有描述大体积容量、可能的临床应用。

[0059] US 5128257 描述了用于转染作为粘附细胞生长的细胞的仪器。仪器由放置在单层细胞上的多个平行板组成。所描述的唯一缓冲液是 PBS（高度离子化的），由于单层细胞而难于具有大容量。没有描述临床应用。

[0060] US 5134070 描述了用于在传导性的光学透明表面上培养细胞的室。该室用于粘附细胞的电穿孔。在权利要求书中提到低 - 离子的介质，但是没有讨论具体式。因为粘附细胞，所以难于具有大容量，没有提及临床应用。

[0061] US 5137817 描述了多种电极。实施例利用了非离子性介质，然而它提到可以利用多种不同离子强度的介质。描述了体内和体外电极。体外电极是小容量的，因为它们具有在表面上电镀的电极（不容易按比例变化）。使用低离子介质，小容量，提及体内电极的临床应用。

[0062] US 5173158 提及陷入非传导性薄膜的孔隙中的细胞的电穿孔。可能利用低电压，因为所有电流都流过膜孔。没有提及电穿孔介质电导率或离子含量。没有提及临床应用。由于需要把细胞陷入孔隙中而具有小容量。

[0063] US 5186800 描述了原核生物（细菌）的转染。使用低离子介质。没有描述 将低离子介质用于哺乳动物的细胞。其中描述需要小容量。没有描述临床应用。

[0064] US 5232856 描述了电穿孔, 其中一个电极是部分传导性的。电极之一可以使用倾斜的电极, 以补偿利用一个部分传导性电极产生的不均匀电场。虽然在权利要求书中没有清楚地描述, 但是该部分传导性的电极是用于将细胞粘附到它的表面。没有提及介质的离子含量。粘附会限制尺寸。没有提及临床应用。

[0065] US 5235905 描述了电穿孔用于处理液体食物。描述了大容量流经性电极。食物的离子含量是不可调的。没有描述大静止容量。没有描述临床应用。

[0066] US 5283194 提及陷入非传导性薄膜的孔隙中的细胞的电穿孔。可能利用低电压, 因为所有电流都流经薄膜孔隙。没有提及电穿孔介质电导率或离子含量。没有提及临床应用。由于需要把细胞陷入孔隙中而具有小容量。

[0067] US 5514391 描述了电穿孔用于处理液体食物。描述了大容量流经性电极。食物的离子含量是不可调的。没有描述大静止容量。没有描述临床应用。

[0068] US 5545130 和 US 5676646 描述了流经性电穿孔仪。设计该仪器来处理全血。可以将不是离子性的物质加入到血液中, 但是血液是高度离子性的。由于流经性而具有大容量。没有提及低电导率增加容量。没有描述大静止容量。描述了临床应用。

[0069] US 5720921 描述了流经性电穿孔室。进行了改良, 增加柔韧性壁以缓冲压力变化。给出的主要实施例是, 通过把增加氧从细胞中的释放的物质引入到红血球中来处理它们。使用传导性的电穿孔介质。由于流经性而具有大容量。没有提及低电导率增加电容。没有描述大静止容量。描述了临床应用。

[0070] US 5776529 描述了电穿孔用于处理液体食物。描述了大容量流经性电极。食物的离子含量是不可调的。没有描述大静止容量。没有描述临床应用。

[0071] US 5874268 描述了设计来电穿孔粘附细胞的电穿孔室。本发明的目的在于降低所需的细胞数。没有提及大容量。没有提及具体的电穿孔缓冲液 (仅声明利用任何电穿孔缓冲液)。没有描述临床应用。

[0072] US 6001617 描述了用于处理粘附细胞的光学透明的电穿孔室。粘附细胞限制了尺寸。没有讨论低离子介质。没有讨论临床应用。

[0073] US 6074605 描述了流经性电穿孔室。所给出的主要实施例是, 通过将增加氧从细胞中的释放的物质引入红血球中来处理它们。使用了传导性的电穿孔介质。由于流经性而具有大容量。没有提及低电导率容量增加。没有描述大静止容量。描述了临床应用。

[0074] 现有技术的另一方面涉及下列参数: 结合电极尺寸 (高度、宽度和间距) 的电导率, 比色杯的存在或不存在, 体积, 及尺寸, 如表 5 所示。

[0075] 表 5

[0076] 1. 表 5

[0077] 2. 电极尺寸

[0078] 静止, 没有粘附细胞

公布	电导率 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	电极尺寸			比色杯	体积 ml	尺寸
		高度 mm	宽度 mm	间距 mm			
US 5124259	高(~10K)	2	87.5	4	N	0.7	0.23
US 6040184	非常低				Y		0.1~0.4
US 6338965	非常低				Y		0.1~0.4
US 6368784	高(~17K)				4		0.4
Djuzenova 1996	中等至高 (800~14000)			6	N	1.2	0.3
*Kinosita 1977	盐和蔗糖		5~100	2~10	N, 横截面 =50~200 mm^2		从公布中 不能确定
Reimann 1975	PBS	30	30	10			0.11
Dimitrov 1990	低至中等 (~100~10K)			2	N	.003	66
Pucilar 2001	0.0011~1.61 S/m			2		.05	0.8
Baron 2000	高(~17K)				4	.4	0.4
Schwister 1985	PBS	30	30	10	N	10	0.11
Mussauer 2001	1.5~3.5 mS/cm				2	.4	0.1
Mussauer 1999	1~8 mS/cm			6		1.1	0.33
Fomekong 1998	0.064~1.447 S/cm			5		.884	0.28
US 5128257	盐	10~20	50~80		0.5~1.5		
US 5186800	水				0.5~2.5	0.001~1	0.5~几百

[0079] 已经讨论了上面的现有技术,显然现有技术的上述内容没有教导或暗示具有下面所需特性的结合的电穿孔法和仪器:(1)可以用于临床和治疗目的,其中离体或体外的所有细胞都经受基本上相同的处理条件;(2)是可以按比例变化的,以便在相对短期的时间里可以处理基本上大容量的离体或体外细胞;(3)获得增加的细胞容量,而不增加电极的尺寸,电极尺寸的增加导致需要过大的电流强度;(4)将在处理细胞内的加热限制于低水平;(5)将基本上所有的离体或体外细胞暴露于相同的电场强度和方向;(6)使得所要嵌入到处理室中的物质的密度可以保持恒定;(7)允许可以采用如在US 6010613中所公开的可变的矩形脉冲波形;(8)避免在流经性处理细胞中由于层流和湍流条件引起的问题;(9)允许利用具有较低电导率的介质,以获得大分子向哺乳动物的细胞中的移动,及允许利用较大容量的电极;及(10)容易按比例变化到大容量,而不利用用于所要处理的细胞的流经性处理室。

[0080] 通过本发明独特的大容量离体电穿孔法,提供前述所需的特性,将从其下面的描述中使这些所需的特性显而易见。也将使本发明相对于现有技术的其它优点变得明显。

发明内容

[0081] 鉴于上述问题,本发明的一个目的在于提供一种大容量离体电穿孔法,该方法可以用于临床和治疗目的,其中所有离体或体外的细胞都经受基本相同的处理条件。

[0082] 本发明的另一个目的在于提供一种可以按比例变化的大容量离体电穿孔法,以便在较短的时限内能够处理很大容量的离体或体外细胞。

[0083] 本发明的再一个目的在于提供一种大容量离体电穿孔法,该方法在不增加导致过大电流强度需要的电极尺寸的情况下,可以实现增加的细胞容量。

[0084] 本发明的再一个目的在于提供一种大容量离体电穿孔法,该方法将细胞处理中的发热限制在低水平。

[0085] 本发明的再一个目的在于提供一种大容量离体电穿孔法,该方法基本上将所有离体或体外细胞暴露于强度和方向相同的电场。

[0086] 本发明的再一个目的在于提供一种大容量离体电穿孔法,该方法使得要嵌入到处理室中的物质的密度能够保持恒定。

[0087] 本发明的再一个目的在于提供一种大容量离体电穿孔法,该方法使得可以采用如 US 6010613 中所公开的可变矩形脉冲波形。

[0088] 本发明的再一个目的在于提供一种大容量离体电穿孔法,该方法避免流经性处理细胞中因层流和湍流条件而引起的问题。

[0089] 本发明的再一个目的在于提供一种大容量离体电穿孔法,该方法允许利用电导率较低的介质实现大分子到哺乳动物细胞中的移动,并允许使用容量较大的电极。

[0090] 本发明的再一个目的在于提供一种大容量离体电穿孔法,该方法容易按比例地变化到大容量,而不采用用于要处理的细胞的流经性处理室。

[0091] 在所附的并构成本公开一部分的权利要求书中,具体地给出了本发明的这些及其它目的,以及表征本发明的新的特征。为了更好地理解本发明、其操作优点以及具体的应用目的,可以参考附图及例举本发明优选实施方案的说明书部分。

[0092] 为了获得上述及其它优点,简要地说,本发明提供一种具有大容量的静态室,以保证所有的细胞经受相同的电场强度和方向,并保证细胞和物质的密度是均匀的。对于本发明,可以使用任何波形。本发明具有与平行板电极相连接的电压波形发生器,低电导率的介质,及 2000 万个细胞或更小的细胞密度。本发明使用电导率为 $50 \sim 500 \mu\text{S}/\text{cm}$ 的介质。本发明可以用于临床,并具有细胞和大分子嵌入其中和从中移除的密封无菌室。

[0093] 根据本发明的一个方面,提供一种用外原性物质 (exogenous material) 处理泡囊以将外原性物质嵌入泡囊中的方法,该方法包括下列步骤:

[0094] a) 将泡囊和外原性物质的悬浮液保留在包括电极的室中的处理容积内,其中该室具有通过电极间距平方 (cm^2) 除以室体积 (cm^3) 而得到的商来定义的几何因子 (cm^{-1}),其中所述几何因子小于或者等于 $0.1 (\text{cm}^{-1})$,其中所述泡囊和外原性物质的悬浮液处于介质中,该介质经过调整,使其电导率为 $0.01 \sim 1.0$ 毫西门子,其中所述悬浮液在处理过程被封闭在所述室中;及

[0095] b) 用一个或多个脉冲电场处理封闭在所述室中的悬浮液,

[0096] 其中根据上述的 a) 和 b) 步骤,所述悬浮液的处理容积是可以按比例变化的,而且其中所述泡囊在室中的处理时间基本上是相同的。

[0097] 优选该室为封闭室。优选该室具有至少 2 毫升容量。该室及其内容物可以是无菌的。优选该室包括用于悬浮液进入和移除的入口和出口。优选电极为平行板电极。

[0098] 在整个处理容积中,电场基本上是均匀的。电场可以包括矩形电压脉冲波形,以在平行板电极之间产生大于 100 伏特/cm 并小于 5000 伏特/cm 的均匀脉冲电场,其在整个处理容积中基本上是均匀的。

[0099] 泡囊可以是活细胞,介质可以是生理介质并具有 $50 \sim 500 \mu\text{S}/\text{cm}$ 的电导率。在该室中一次处理活细胞的数目可以超过 1000 万个。而且,在该室中一次处理活细胞的数目可以超过 2000 万个。

[0100] 泡囊可以是自体细胞,该自体细胞在用外原性物质处理之后将返回供体。泡囊可以是同基因细胞,该同基因细胞将被给予供体之外的接受者。泡囊可以是异基因细胞 (xenogeneic cell)。泡囊可以是人造脂质体。

[0101] 脉冲电场可以从电脉冲指向所述外原性物质,该电脉冲为至少三个非正弦电脉冲的序列,其场强等于或大于 $100\text{V}/\text{cm}$,其中所述至少三个非正弦电脉冲的序列具有下面特性中的一个、两个或三个:(1) 在所述至少三个电脉冲中,至少有两个具有彼此不同的脉冲振幅;(2) 在所述至少三个电脉冲中,至少有两个具有彼此不同的脉冲宽度;及(3) 在所述至少三个电脉冲中,第一组两个脉冲之间的时间间隔不同于第二组两个脉冲之间的时间间隔。

[0102] 利用本发明的方法,在泡囊处理过程中的温度升高很小。

[0103] 本发明的方法可以在 $2 \sim 10$ 毫升内按比例变化。本发明的方法可以连续地批量进行。

[0104] 外原性物质可以是治疗性物质。外原性物质可以是利用其处理泡囊时形成的治疗性产物。外原性物质可以选自多核苷酸, DNA, RNA, 多肽, 蛋白质, 及有机化合物。

[0105] 外原性物质可以包括众多的碱基对,例如至少 8 个碱基对。

[0106] 根据本发明,室具有室体积,悬浮液具有悬浮液体积,且悬浮液体积大于室体积。在这方面,将初始部分的悬浮液体积移入室中,在室中保留和处理,并从室中移出。然后,将另外部分的悬浮液体积移入室中,在室中保留和处理,并从室中移出。

[0107] 再将其它部分的悬浮液体积顺序移入室中,在室中保留和处理,并从室中移出。可以重复这些步骤,直到耗尽悬浮液的体积。

[0108] 根据本发明的另一个方面,提供一种电穿孔仪,该电穿孔仪包括室体积为至少 2 毫升的室。室内包括一对电穿孔电极。以悬浮液形式携带泡囊的电穿孔介质装在室中的电穿孔电极之间。介质的电导率为 $50 \sim 500 \mu\text{S}/\text{cm}$ 。脉冲电压电源与其中的电穿孔电极和用于将要进行电穿孔处理的物质加到室中的装置电连接。此外,还装有用于将处理过的物质从室中移出的装置。

[0109] 优选密封装置与室连接,以提供密封室。该密封装置可包括一些弹性体材料。

[0110] 优选室内部的密封室是无菌的。优选室包括通风装置,以在将流体移入室中时排出空气。通风装置可以包括位于室壁中的过滤部件。作为选择,通风装置可以包括与室液接的通风单元 (vent cell)。

[0111] 室包括室入口和室出口。可以提供与室入口液接的第一储器,以在电穿孔介质引入室中之前储存具有泡囊的电穿孔介质。可以提供与室入口液接的第二储器,以储存用于将处理过的具有泡囊的介质从室中冲洗出来的室冲洗物质。可以提供与室出口液接的第三

储器,以接收处理过的从室中冲洗出来的具有泡囊的介质。

[0112] 第一储器、第二储器和第三储器可以由柔性袋构成。入口阀可以连接在室入口与第一储器和第二储器之间,出口阀可以连接在室出口与第三储器之间。

附图说明

[0113] 在研究了其下面的详述之后,将更好地理解本发明,并且上述目的以及除了上述目的之外的其它目的将变得更加显而易见。该详述参照附图,在附图中:

[0114] 图 1 为用来实施本发明方法的仪器示意图。

[0115] 图 2 为本发明方法在三角形内的工作范围,及本发明的工作范围如何在由三角形外的小块表示的现有技术电穿孔法的工作范围外的示意图。

[0116] 图 3 为生物细胞的充电时间(单位为微秒)和具有三种不同直径,即 1 微米、10 微米和 100 微米的细胞的介质电导率(单位为微西门子/cm)之间关系图。

[0117] 图 4 为与本发明的方法相关的时间常数与电导率关系图。

具体实施方式

[0118] 如前所述,重要的问题是用于电穿孔的介质电导率。在该方法中使用低电导率介质,以保持介质的总电阻很小,并实际上消除发热(heating)。不是任何介质电导率都是可以使用的。随着介质离子含量的减小,可用于建立跨越细胞膜(cell member)的电荷(电压)的自由离子的数目降低。结果增加了使细胞膜带电所需要的时间。有关该方法的描述参见 Electroporation and Electroporation in Cell Biology, edited by Eberhard Neumann, Arthur Sowers, and Carol Jordan, Plenum Press, 1989, on page 71。假定典型细胞的直径为 10 微米,则在 $80 \mu\text{S/cm}$ 下的带电时间为 20 微秒。在 $80 \mu\text{S/cm}$ 以下,带电时间变得太长,并且停止在细胞膜中形成通道。下面的表 6 举例说明了介质的电阻作为电极室体积和电导率函数。

[0119] 表 6

电极体积/ml	介质电阻/欧姆		
	$17000 \mu\text{S/cm}$	$200 \mu\text{S/cm}$	$80 \mu\text{S/cm}$
0.5	19.2	1600	4000
1	9.6	800	2000
5	1.92	160	400
10	0.96	80	200
50	0.19	16	40

[0120] 离体电穿孔已经在许多出版的研究项目中得到证实。在这点上,商业应用,如为患者制备疫苗的临床转染,需要大电极或室,以一次处理数百万个细胞。在任何可利用的构造中,静态的平行板室提供最均匀的振幅和最均匀的电场方向。这种均匀性是保证均匀地处理目标细胞所必须的。另外,为了确保细胞周围的局部均匀性,不使用特别高密度的细胞浓度如 3000 万个细胞/ml 也是重要的。本发明适用于大于 1 毫升的室。

[0121] 当施加电压时,利用较大的室可以导致高电流。室电阻对细胞和介质混合物的电导率以及室尺寸的方程式如下:

[0122] 物质的体积 = $1 \times A$

[0123]

$$\text{物质的电阻} = \rho \frac{l}{A} = \frac{1}{\sigma} \frac{l}{A} = \frac{1}{\sigma} \frac{l^2}{v} = \frac{GF}{\sigma} \text{ 欧姆}$$

[0124] ρ = 电阻率, 单位为欧姆 $\cdot$ cm

[0125] σ = $1/\rho$, 单位为西门子 /cm

[0126] v = 要处理的物质的体积

[0127] 存在几何因子 (GF), 其对于任何室尺寸都是常数。随着室体积的变大, 室中的物质的电阻变小, 从而增大了电流。

[0128] 本发明采用具有大容量的电极, 结合具有规定低的电导率的电穿孔缓冲液。该方法将所有细胞暴露于相同的处理条件, 对所需的电流强度提供控制, 并且可以处理大量细胞。由于在施加脉冲电场时细胞悬浮液在室中保持静止, 所以可以利用复杂的波形。

[0129] 本发明的另一方面还通过交替地填充和排空电极之间的间隙来增加容量。因此, 满足了在具体处理过程中所需的全部性质, 并且在间歇性批量处理中电极可以再用于随后的处理。

[0130] 本发明规定了物质电导率的范围, 其可以作为室尺寸的函数来使用, 体积越大, 电导率越小。本发明规定了与大体积电极一起使用的工作区域。这如图 2 所示。现有技术已经公开的工作点也以正方形示于图 2 中。对于几何因子小于 0.1 的室, 存在两个相关的限制因素。第一限制因素是室电阻的绝对值。在本发明中, 室电阻为 1 欧姆或更大。在低于 1 欧姆的操作被视为不切实际。另一限制因素是室中的介质的电导率。随着电导率的减小, 细胞膜的充电时间增加, 因为细胞膜的外部存在较少的离子。

[0131] 跨膜电压 (TMV) 与电导率和细胞直径之间的关系如下, 引自 Neumann 等人的下述文献:

[0132] 跨膜电压 = TMV

[0133] $TMV = -1.5Er |\cos \delta| f(\lambda)$

[0134] 式中: E = 电场, 单位为伏特 /cm

[0135] r = 细胞半径, 单位为 cm

[0136] δ = 电力线的角度, 单位为度

[0137] $f(\lambda)$ = 复合电导率

$$[0138] \quad f(\lambda) = \frac{\lambda_o \lambda_i (2 \frac{d}{r})}{(2\lambda_o + \lambda_i) \lambda_m + (2 \frac{d}{r})(\lambda_o - \lambda_m)(\lambda_i - \lambda_m)}$$

[0139] 式中: λ_o = 细胞外的介质的电导率, 单位为毫西门子 /cm

[0140] λ_i = 细胞质的电导率

[0141] λ_m = 细胞膜的电导率

[0142] d = 细胞膜的厚度

[0143] 参考文献: Electroporation and Electrofusion in Cell Biology, Edited by Eberhard Neumann, Arthur Sowers, and Carol Jordan Plenum Press, 1989

[0144] 在 1 微西门子 /cm 以下, 存在的离子很少, 以至于改变细胞膜的时间不切实际地

大。因此,本发明的优选工作区域为:

[0145] 细胞直径 > 1 微米

[0146] 室体积 > 1 毫升

[0147] 要处理的物质的电导率 > 1 微西门子/cm

[0148] 室中要处理的物质的总电阻 > 1 欧姆

[0149] 室的几何因子 $< 0.1\text{cm}^{-1}$

[0150] 本发明利用具有大体积的静态的室,以保证所有细胞均经受相同的电场强度和方向,并且保证细胞和处理物质的密度是均匀的。本发明可以使用任何波形。本发明具有与平行板电极相连接的电压波形发生器,并且具有低电导率介质,且细胞密度为 2000 万个细胞或更小。

[0151] 本发明的组成部分是在规定范围内利用低电导率介质,以限制电流强度和热量,同时提供足够的离子以有效地使细胞电穿孔。常用的介质的电导率将为 $50 \sim 500 \mu\text{S/cm}$ 。

[0152] 本发明可应用于临床,并利用密闭的无菌室,将细胞和大分子的嵌入其中和从中移除。

[0153] 再一方面,本发明还通过交替地填充和排空电极来增加容量。按这种方式,满足了在具体处理过程中所需的全部性质,并且在间歇性批量处理中电极可以再用于随后的处理。

[0154] 用于电穿孔的介质的电导率是本发明的重要方面。在该方法中,使用低电导率介质以保持介质的总电阻小,并实际上排除加热。对于所使用的较低的电导率介质有限制。随着介质的离子含量减小,可用于在细胞膜两端构造电荷(电压)的自由离子数降低。结果增加了使薄膜充电所花费的时间。该方法由 Neumann, p71 中的方程式描述。假定一般细胞直径为 10 微米,在 $80 \mu\text{S/cm}$ 下的充电时间为 20 微秒。在 $80 \mu\text{S/cm}$ 以下,充电时间变得太长,并且在细胞膜中的通道停止形成。

[0155] 利用具有 4mm 间距的电极,表 6 说明了作为电极室体积和电导率的函数的介质的电阻。

[0156] 在本发明的一个方面,如图 1 所示,使用具有两个电极的室。可以使用的电极尺寸的实例为,间距为 0.4cm,电极高度为 2cm,电极长度为 10cm。可以利用商业电穿孔仪,如 Cyto Pulse Sciences, Inc. PA-4000 电穿孔仪,来使用室。

[0157] 可以用于该室的介质的实例为下面的介质:

[0158] 山梨糖醇, 280 毫摩尔

[0159] 乙酸钙, 0.1 毫摩尔

[0160] 乙酸镁, 0.5 毫摩尔

[0161] 图 3 为生物细胞的充电时间(单位为微秒)和具有三种不同直径,即 1 微米、10 微米和 100 微米的细胞的介质电导率(单位为微西门子/cm)之间关系图。从图 3 中可以发现,对于在 1 微西门子/cm 以下的介质电导率,充电时间会太长以致于电穿孔会不工作。

[0162] 关于本发明的使用 and 操作方法,其将从上面的公开中显而易见,因此,不需要提供关于使用和操作方法的进一步讨论。

[0163] 从上述公开中显而易见,本发明通过提供大容量离体电穿孔法,实现所列出的所有目的,该方法可以有利地用于临床和治疗目的,其中所有离体或体外的细胞都经受基本

相同的处理条件。利用本发明,提供一种大容量离体电穿孔法,该方法是可以按比例变化的,以致基本上可以在相对短的时间内处理大体积的离体或体外细胞。利用本发明,提供一种大容量离体电穿孔法,该方法获得增加的细胞容量,而不增加电极的尺寸,电极尺寸增加导致需要过大的电流强度。利用本发明,提供一种大容量离体电穿孔法,该方法将在处理细胞内的加热限制在低水平。利用本发明,提供一种大容量离体电穿孔法,该方法使基本上所有离体或体外细胞暴露于相同的电场强度和方向。利用本发明,大容量离体电穿孔法使得所要嵌入到处理室中的物质的密度可以保持恒定。利用本发明,提供一种大容量离体电穿孔法,该方法允许能够采用如在 US 6010613 中所公开的变化的矩形脉冲波形。利用本发明,提供一种大容量离体电穿孔法,该方法避免由于层流和湍流条件所引起的在流经性处理细胞中的问题。利用本发明,提供一种大容量离体电穿孔法,该方法允许利用具有较低电导率的介质,以获得大分子向哺乳动物的细胞中的移动,并允许利用较大容量的电极。利用本发明,提供一种大容量离体电穿孔法,该方法容易按比例变化到大容量,而不利用用于所处理细胞的流经性处理室。

[0164] 关于上述说明,应该了解,对于本领域的技术人员来说,本发明的零件的最佳尺寸关系,包括尺寸、形状函数和工作、组件和应用方法的变化,认为容易明显和显而易见,因此,等效于附图中所说明的和在说明书中所描述的那些关系的全部关系,意在仅由所附权利要求书的范围所涵盖。

[0165] 尽管已经在附图中图示,并结合本发明最实用和最优选实施方案在上面精确和详细地完全描述了本发明,但是对于本领域的普通技术人员来说将显而易见,其可以进行许多修改,而不脱离本文中阐述的原理和构思。因此,本发明的正确范围应该仅由所附的权利要求书的最宽的解释决定,以涵盖所有上述修改和等价物。

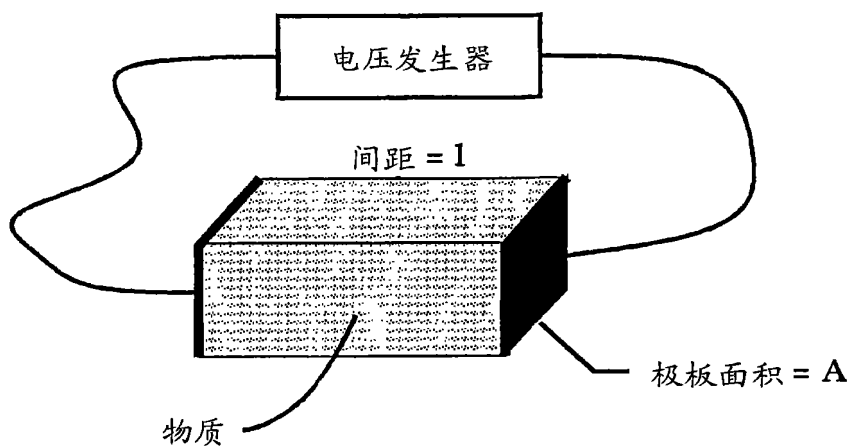


图 1

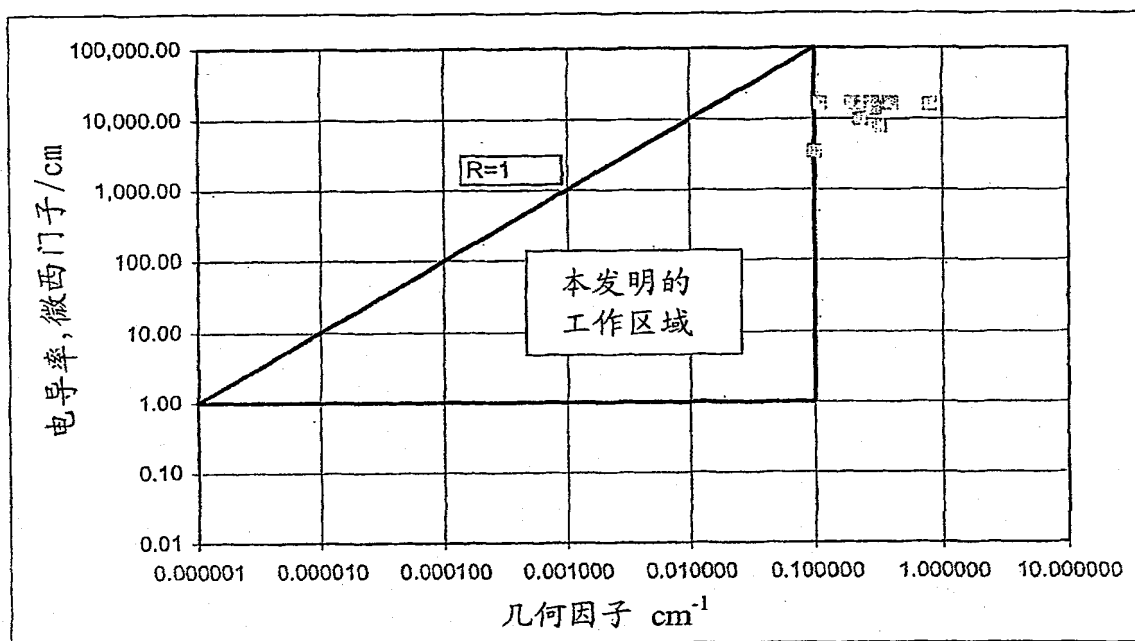


图 2

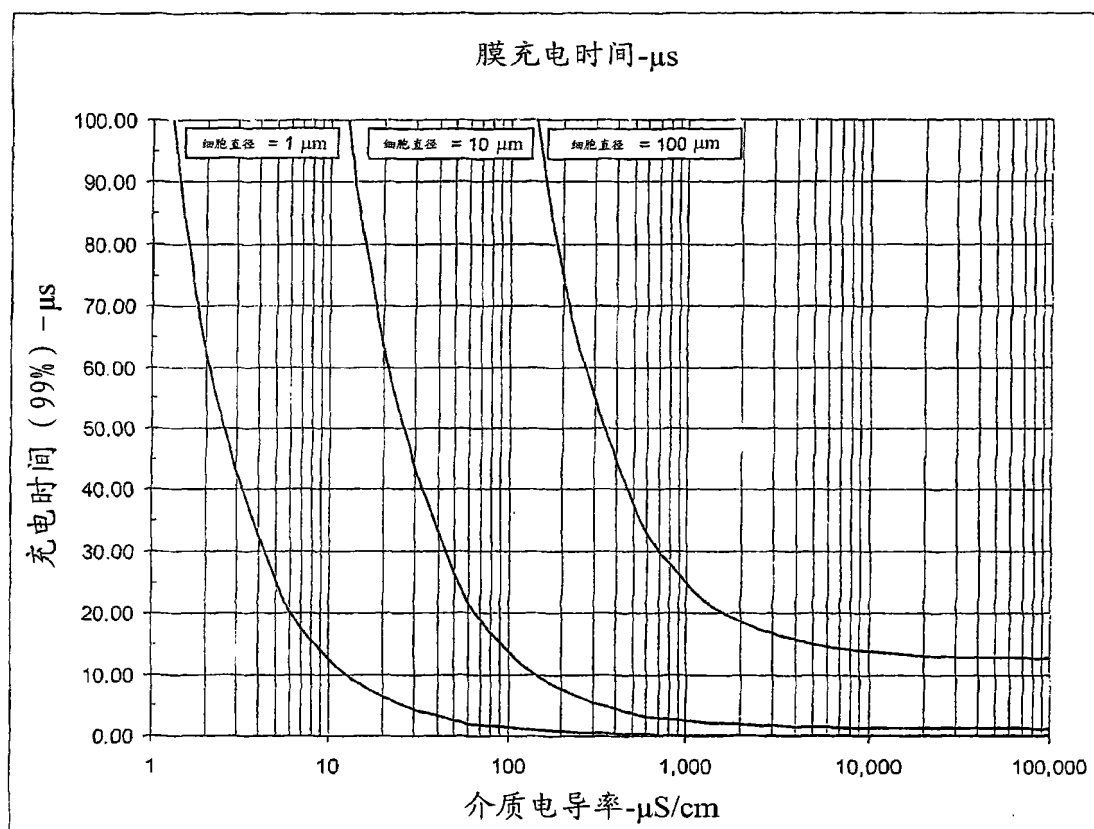


图 3

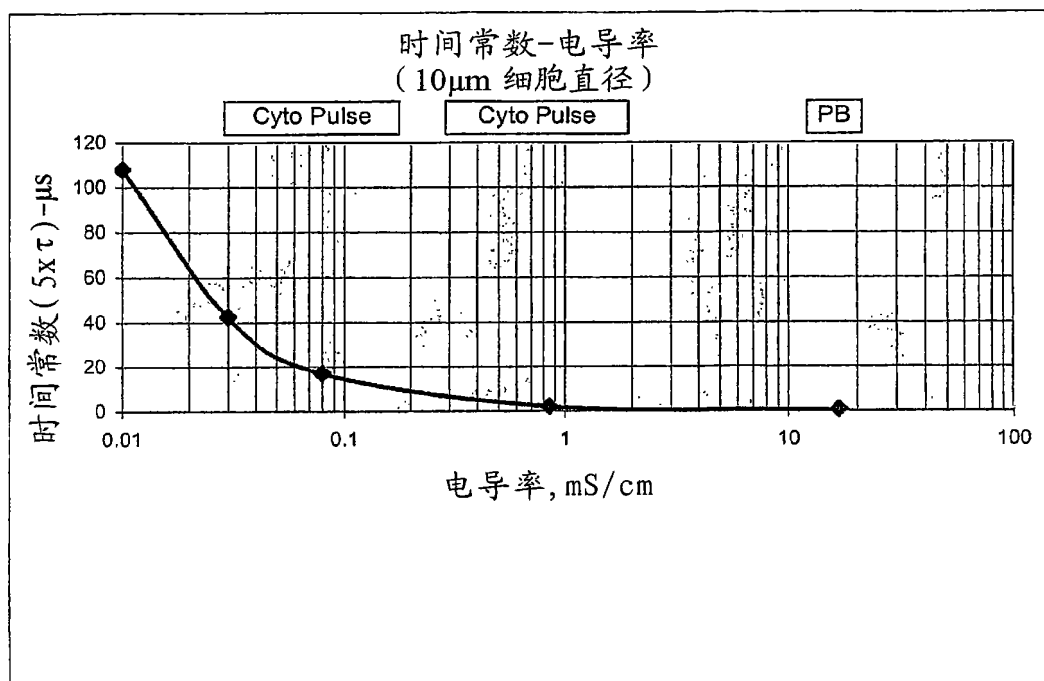


图 4