

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6219832号
(P6219832)

(45) 発行日 平成29年10月25日(2017.10.25)

(24) 登録日 平成29年10月6日(2017.10.6)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00	1 0 1
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G
請求項の数 31 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-537184 (P2014-537184)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月17日(2012.10.17)
 (65) 公表番号 特表2014-533936 (P2014-533936A)
 (43) 公表日 平成26年12月18日(2014.12.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/060646
 (87) 国際公開番号 W02013/059343
 (87) 国際公開日 平成25年4月25日(2013.4.25)
 審査請求日 平成27年10月2日(2015.10.2)
 (31) 優先権主張番号 61/548,013
 (32) 優先日 平成23年10月17日(2011.10.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/684,301
 (32) 優先日 平成24年8月17日(2012.8.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 596060697
 マサチューセッツ インスティテュート
 オブ テクノロジー
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
 39ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア
 ヴェニュー・77
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞内送達

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ペイロードを細胞内に送達するための方法であって、
 懸濁溶液中に細胞を供給する段階；
 該溶液を、細胞変形用の狭窄を含むマイクロ流体チャンネルに通ず段階であって、該狭窄の直径が該細胞の直径より小さく、かつ、該細胞が該狭窄を通る時に、変形力が該細胞に印加され、ここで、該変形力が、ペイロードが通るのに十分な大きさの細胞膜の擾乱を誘導する、段階；および
 該細胞が狭窄を通った後に、該細胞を、ペイロード含有溶液中で所定の時間にわたってインキュベートする段階
 を含む、方法。

【請求項2】

前記懸濁溶液が、前記狭窄を通る前、間、および/または後に、細胞およびペイロードを含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記懸濁溶液が、前記狭窄を通る前に、細胞およびペイロードを含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記懸濁溶液が、前記狭窄を通った後に、細胞およびペイロードを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

狭窄の直径が、前記細胞の直径の20～99%である、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

狭窄の直径が、前記細胞の直径の20%～60%未満である、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

マイクロ流体チャンネルの断面が、円形、楕円形、細長いスリット、四角形、六角形および三角形からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

溶液を細胞変形用の狭窄に通す段階が、該溶液を狭窄の入口部分、中心点および出口部分に通すことを含み、ここで、該入口部分が狭窄角度を規定する、請求項1記載の方法。

10

【請求項 9】

入口部分の狭窄角度を調整することによってマイクロ流体チャンネルの目詰まりを減らすかもしくは送達および細胞生存度を向上させる段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

前記狭窄角度が90度である、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

溶液を通す段階が、該溶液を、直列および/または並列で並べられた複数のマイクロ流体チャンネルに通すことを含み、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

インキュベートする段階が、0.0001秒間よりも長く、ペイロード含有溶液中で細胞をインキュベートすることを含み、請求項1記載の方法。

20

【請求項 13】

インキュベートする段階が、0.0001秒間～60分間、ペイロード含有溶液中で細胞をインキュベートすることを含み、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

前記変形力が、圧縮、または圧縮および剪断を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

ペイロードを細胞内に送達するための方法であって、
懸濁溶液中に細胞を供給する段階；

30

該溶液を、細胞変形用の狭窄に通す段階であって、該細胞が該狭窄を通る時に変形力が該細胞に印加されるように該狭窄の直径が該細胞の直径より小さく、それにより、該細胞の膜にペイロードが通るのに十分な大きさの擾乱が引き起こされるように該細胞を変形させる、段階；および

該細胞が変形された後に、該細胞を該溶液中でペイロードとともにインキュベートする段階を含む、方法。

【請求項 16】

前記懸濁溶液が、前記狭窄を通る前、間、および/または後に、細胞およびペイロードを含む、請求項15記載の方法。

40

【請求項 17】

前記懸濁溶液が、前記狭窄を通る前に、細胞およびペイロードを含む、請求項15記載の方法。

【請求項 18】

前記懸濁溶液が、前記狭窄を通った後に、細胞およびペイロードを含む、請求項15記載の方法。

【請求項 19】

狭窄の直径が、前記細胞の直径の20～99%である、請求項15記載の方法。

【請求項 20】

狭窄の直径が、前記細胞の直径の20%～60%未満である、請求項19記載の方法。

50

【請求項 2 1】

前記変形力が、圧縮、または圧縮および剪断を含む、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 2】

インキュベートする段階が、0.0001秒間よりも長く行われる、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 3】

インキュベートする段階が、0.0001秒間～60分間、行われる、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

細胞を変形させる段階が、該細胞を1 μ s～1msにわたって変形させることを含む、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 5】

溶液を通す段階が、該溶液を、直列および/または並列で並べられた複数の狭窄に通すことを含む、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 6】

ペイロードを細胞内に送達するための方法であって、
細胞およびペイロードを含む懸濁液を供給する段階；
該懸濁液を、細胞変形用の狭窄に通す段階であって、該狭窄の直径が該細胞の直径より小さく、かつ、該細胞を急激かつ一時的に変形させるように構成される、段階；ならびに
該細胞を、急激および一時的な変形の後に、該懸濁液中で所定の時間にわたってインキュベートする段階
を含む、方法。

【請求項 2 7】

前記狭窄がマイクロ流体チャンネルである、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 8】

前記直径が、前記細胞の直径の20～99%である、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 9】

前記直径が、前記細胞の直径の20%～60%未満である、請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 0】

懸濁液を、狭窄を通して流す段階が、細胞を1 μ s～1msにわたって変形させる、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 3 1】

(i) 細胞リプログラミングのために、DNA、RNA、siRNAもしくはタンパク質を初代線維芽細胞および幹細胞に；
(ii) 抗原もしくはRNAを初代免疫細胞に；
(iii) 標的細胞の画像化を助けるために量子ドットおよびカーボンナノチューブのうちの少なくとも1つを該標的細胞に；または、
(iv) 薬物を、腫瘍細胞である標的細胞に
送達するために用いられる、請求項 1～3 0 のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2011年10月17日に提出された米国仮出願第61/548,013号、および2012年8月17日に提出された米国仮出願第61/684,301号に対する優先権を主張し、それぞれの内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0 0 0 2】

連邦政府による資金援助を受けた研究としての申告

本発明は、少なくとも一部には、米国国立衛生研究所(National Institute of Health)によって授与された助成金5 RC1 EB011187-02号の下で、政府の支援を受けてなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0003】

背景

多くの製薬企業は、小分子薬の開発に大きく重点を置いている。これらの薬物がそう呼ばれるのはこれらが比較的小さなサイズであるためであり、このことによりこれらは全身に自由に拡散してそれらの標的に到達することができる。これらの分子はまた、さもなくば不透過性である細胞膜を、ほとんど妨害されずに通り抜けることもできる。しかし、タンパク質、DNAまたはRNAをベースとする次世代の治療薬(therapies)は、細胞膜を容易には通り抜けることができず、それ故に、送達を促進するために細胞改変を必要とする。確立された方法では、化学物質または電気パルスを用いて膜を破り(breach)、材料を細胞質中に送達させる。適正な細胞内送達は、次世代の治療薬の研究、開発および実現において肝要な段階である。

10

【0004】

既存の方法は往々にして開発が困難であり、それらの個々の用途に対して特異的である。さらに、幹細胞および免疫細胞といった臨床的に重要な多くの細胞型は、既存の方法によっては適正に対処されない。このため、今日の生物学的/医学的研究の需要に応えることのできる、より強固かつ精度の高い手法に対する需要が存在する。

【発明の概要】

【0005】

概要

本発明は、制御された傷害、例えば、細胞を狭窄、急速な伸展、急速な圧縮、または高剪断速度のパルスに供することにより、周囲の細胞媒質から細胞の細胞質中への分子の取込みが導かれるという驚くべき発見に基づく。したがって、本発明は、真核細胞に対する、材料、例えば化合物または組成物の、サイトゾルへの細胞内直接送達のための、ベクターを用いない(vector-free)マイクロ流体プラットフォームを特徴とする。本デバイスは、所望の分子を標的細胞内に送達するための、多目的で、かつ適用範囲の広い研究用ツールとして有用である。本明細書に記載の方法を用いた細胞内への分子の送達は、狭窄および/または圧力による細胞速度に、例えば直線的または単調的に、比例する。例えば、50 μ lの細胞懸濁液はデバイスを数秒で通過する。スルーputは、1チャンネル当たり細胞1個/秒(またはさらにはそれ未満)から、1チャンネル当たり細胞1,000個超/秒までの範囲にわたる。狭窄を通じた典型的な細胞速度には10mm/秒~500mm/秒が含まれるが、細胞速度が最大で10m/秒である(またはさらにはそれよりも高い)ことも可能である。システムの総スルーputを高めるために、追加的なチャンネルを並列して配置することもできる。

20

30

【0006】

分子の取り込みは、エンドサイトーシスではなく拡散に基づき、すなわち、ペイロード(細胞に送達しようとする化合物)は、デバイスの通過後に、エンドソーム内ではなく細胞質中に存在する。細胞処理後にエンドソーム内に認められるペイロードはほとんどまたは全くない。例えば、大分子は、より小さな分子よりも緩徐に取り込まれる。狭窄を通じた細胞伸展および細胞移動速度の制御により、細胞の生存度および完全性を保ちながら、標的分子のより優れた送達が導かれる。処理後に細胞生存度は70~100%であり、例えば、典型的な生存度は処理後に90%である。これに比して、高剪断速度のみを数秒または数ミリ秒用いる以前の送達方法では、処理後に得られる細胞の生存度が低いことが示されている。従来手法とは対照的に、本発明の方法では、細胞が狭窄を通る際に、細胞を、極めて短時間(およそ100ミリ秒)、100~1000Paの範囲にわたる剪断パルスに供する。しかし、本手法は、以前の手法とは根本的に異なる。本手法では、細胞が狭窄を通る際に好ましくは細胞の全体的な機械的変形が起こり、これにより、従来手法とは異なる剪断力を印加することができる。好ましい態様において、細胞を電流に供することはない。他の態様においては、併用処理が用いられ、例えば、本明細書に記載のデバイスを用いる機械的変形の後に、またはその前に、エレクトロポレーション(電流を用いて細胞膜に一時的な穴を生じさせて、核酸または高分子の移入を可能にする、浸透圧トランスフェクションの

40

50

一種)を行う。

【0007】

ペイロードとは、細胞内に送達しようとする化合物または組成物のことである。例えば、ペイロードには、タンパク質、蛍光性色素、量子ドット、カーボンナノチューブ、RNA分子、DNA分子、抗原および他の高分子、ナノ粒子、ならびに組成物質が含まれる。

【0008】

デバイスの狭窄の幅、狭窄部分の長さ、入口領域の幾何形状およびデバイスのチャンネルの深さは、細胞内への分子の送達に影響を及ぼす。好ましくは、導管の狭窄部分の幅は直径4 μm 以上であり、導管の狭窄部分の長さは、好ましくは40~50 μm である。狭窄部分の長さは一般に、90 μm を上回らない。狭窄部分の直径は、処理しようとする細胞の種類と関連している。以下に述べるように、直径は細胞の直径未満である(例えば、細胞の直径の20~99%)。多くの細胞は直径5~15 μm であり、例えば、樹状細胞は直径7~8 μm である。例えば、単一細胞の処理の場合、狭窄部分の直径は4.5、5、5.5、6または6.5 μm である。もう1つの例では、ヒト卵の処理の場合の狭窄部分のサイズ/直径は6.2 μm ~8.4 μm であるものの、より大きいか、またはより小さい狭窄も可能である(ヒト卵子の直径はおよそ12 μm である)。さらにもう1つの例では、胚(例えば、細胞2~3個の塊)は、12 μm ~17 μm の狭窄直径を用いて処理される。

【0009】

本デバイスおよび方法は、特化した抗原提示細胞、例えば樹状細胞などを用いるワクチンの開発および生産に有用である。例えば、抗原提示を刺激する方法は、樹状細胞を、ごく短時間(transitory)の狭窄または高剪断力のパルスといった制御された傷害に供し、該樹状細胞を標的抗原を含む溶液と接触させることによって、実施される。本方法は、以前の刺激方法と比較して、高度に活性化された抗原提示細胞を生じさせる。ワクチン生産は、樹状細胞または他の抗原提示細胞を進ませて狭窄を含むデバイスに通し(それにより、細胞を急速な伸展イベントに供する)、続いて細胞をペイロード、例えば抗原を含む溶液中でインキュベートすることによって、実施される。細胞の急速な変形後に、細胞を1つまたは複数の抗原を含む細胞培養基中に浸すが、細胞を急速な変形イベント/プロセスの前、最中、および/または後に抗原と接触させてもよい。

【0010】

界面活性剤(例えば、0.1~10% w/w)が、任意で、流動緩衝液中に用いられる(例えば、ポロキサマー、動物由来血清、アルブミンタンパク質)。細胞内への分子の送達は、界面活性剤の存在によっては影響されない;しかし、界面活性剤は任意で、動作中のデバイスの目詰まりを減らすために用いられる。

【0011】

デバイスは、シリコン、金属(例えば、ステンレス鋼)、プラスチック(例えば、ポリスチレン)、セラミックス、または、ミクロン規模の特徴物(feature)をエッチングするのに適した他の任意の材料でできており、細胞が通る1つまたは複数のチャンネルまたは導管を含む。シリコンが特に好適であるが、これはこの材料についてはマイクロパターン化法が十分に確立されており、それ故に、新たなデバイスを加工すること、デザインを変更することなどがより容易であるためである。さらに、シリコンの剛性は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)のようなより柔軟な基質を上回る利点、例えば、より高い送達率をもたらす。例えば、デバイスは、2、10、20、25、45、50、75、100本またはそれ以上のチャンネルを含む。デバイスは、シリコンをエッチングすることによって微細加工されている。圧力を印加することによって細胞をチャンネルまたは導管内で移動させる、例えば推進させる。細胞駆動装置(cell driver)により圧力を印加することができる。細胞駆動装置には、例えば、圧力ポンプ、ガスポンプ、圧縮機、真空ポンプ、シリンジ、シリンジポンプ、蠕動ポンプ、手動シリンジ、ピペット、ピストン、毛管作用物(capillary actor)および重力が含まれる。チャンネルの代わりとして、細胞を、網または密に配置されたプレートの形態の狭窄に通してもよい。いずれのケースでも、細胞が通り抜ける狭窄の幅は、天然状態、すなわちストレスのない状態の、処理される細胞の幅または直径

10

20

30

40

50

の20~99%である。温度は組成物の取り込みに影響を及ぼす可能性があり、生存度に影響を及ぼす。本方法は、室温（例えば、20）、生理的温度（例えば、39）、生理的温度よりも高い温度もしくは低い温度（例えば、4）、またはこれらの例示的な温度間の温度で実施される。

【0012】

狭窄、伸展、および/または高剪断速度のパルスによる、細胞に対する制御された傷害の後に、該細胞内に導入することが望まれる化合物または分子を含む送達用溶液中で、該細胞をインキュベートする。制御された傷害は、細胞膜における、小さな、例えば直径200nmの欠損として特徴づけることができる。細胞の回復期間は、狭窄を通ることによって引き起こされた傷害が閉じるまで数分のオーダーである。送達期間には1~10分またはそれ以上、例えば、15、20、30、60分またはそれ以上が含まれ、室温で動作させる時には2~5分が最適である。送達用溶液中でのインキュベーション期間が長いほど、取り込みの増加が得られるわけでは必ずしもない。例えば、データからは、5分後に、細胞によって追加的に取り込まれた材料はほとんどまたは全くなかったことが指し示された。

10

【0013】

したがって、本発明は、細胞への薬物送達の分野における長年の問題に対して、かつ以前の方法に付随する短所に対して、解決策を与えるものである。

【0014】

真核細胞への材料の送達に関しては、細胞を2つの主要なカテゴリーに分類することができる：

20

【0015】

1) 送達が容易な(ETD)細胞：利用しうる化学的方法およびウイルス的方法のほとんどは、このカテゴリーに該当する。送達が容易な細胞は、往々にして、直接的な臨床的意義はない。

【0016】

2) 送達が困難な(DTD)細胞：臨床的意義が大きい。送達技術の進歩は、新規治療法の開発を大きく可能にする/加速することができる。このカテゴリーには、幹細胞、初代細胞および免疫細胞が含まれる。新規RNA、幹細胞およびタンパク質ベースの治療薬が今後数年のうちに活発化するにつれて、DTD送達の市場は劇的に拡大すると予想されている。

【0017】

本明細書に記載の手法は、DTD研究領域にとって特に有用であることが立証されているものの、同じ手法をETD細胞とともに用いることもできる。加えて、それは、他のあらゆる方法によってもETD細胞またはDTD細胞のいずれにも有効に送達することができない材料(量子ドット、カーボンナノチューブおよび抗体など)の送達も促進した。

30

【0018】

一般に、1つの局面において、本発明の実施により、細胞膜における擾乱を引き起こすためのマイクロ流体システムが提供され得、該マイクロ流体システムは、内腔を画定し、かつ緩衝液中に懸濁された細胞がそこを通り得るように構成された、マイクロ流体チャンネルを含み、該マイクロ流体チャンネルは、狭窄を含み、該狭窄の直径は該細胞の直径の関数である。

40

【0019】

また、本発明の実施により、以下の特徴物のうちの1つまたは複数も提供されうる。狭窄の直径は、そこを通る細胞の直径の実質的に20~99%である。チャンネルの断面は、円形、楕円形、細長いスリット、四角形、六角形および三角形からなる群より選択される。狭窄は、入口部分、中心点および出口部分を含む。入口部分は狭窄角度を定め、該狭窄角度はチャンネルの目詰まりを減らすように最適化されている。マイクロ流体システムは、並列して配列された複数の、例えば、2、5、10、20、40、45、50、75、100、500、1,000本またはそれ以上のマイクロ流体チャンネルをさらに含む。

【0020】

一般に、もう1つの局面において、本発明の実施により、化合物を細胞内に送達するた

50

めの方法も提供され得、該方法は、懸濁液中に細胞を供給する段階、または細胞およびペイロードを溶液中に懸濁させる段階、該溶液を、狭窄を含むマイクロ流体チャンネルに通す段階、該狭窄を該細胞の直径の関数としてサイズ変更する段階、圧力が該細胞に印加されるように該細胞を該狭窄に通す段階であって、それにより、ペイロードが通るのに十分な大きさの、該細胞の擾乱が引き起こされる、段階、および、該細胞を、それが狭窄を通った後に溶液中で所定の時間にわたってインキュベートする段階を含む。

【0021】

また、本発明の実施により、以下の特徴物のうちの1つまたは複数も提供されうる。狭窄の直径は、細胞の直径の実質的に20~99%である。マイクロ流体チャンネルの断面は、円形、楕円形、細長いスリット、四角形、六角形および三角形からなる群より選択される。溶液を通す段階は、溶液を、狭窄の入口部分、中心点および出口部分に通すことを含む。本方法は、入口部分の狭窄角度を調整することによって、マイクロ流体チャンネルの目詰まりを減らす段階をさらに含む。溶液は、溶液を、並列して配列された複数のマイクロ流体チャンネルに通すことを含む。

10

【0022】

一般に、さらにもう1つの局面において、本発明の実施により、化合物を細胞内に送達するための方法も提供され得、該方法は、溶液中に細胞を供給する段階または細胞を溶液中に懸濁させる段階、該溶液を、狭窄を含むマイクロ流体チャンネルに通す段階、該狭窄を該細胞の直径の関数としてサイズ変更する段階、圧力が該細胞に印加されるように該細胞を該狭窄に通す段階であって、それにより、該細胞の擾乱が引き起こされる、段階、および該細胞が狭窄を通った後に、該細胞を、ペイロードを含む該溶液中で所定の時間にわたってインキュベートする段階を含み、擾乱は、該ペイロードを通すのに十分な大きさである。

20

【0023】

また、本発明の実施により、以下の特徴物のうちの1つまたは複数も提供されうる。狭窄の直径は、細胞の直径の実質的に20~99%である。マイクロ流体チャンネルの断面は、円形、楕円形、細長いスリット、四角形、六角形および三角形からなる群より選択される。溶液を通す段階は、溶液を狭窄の入口部分、中心点および出口部分に通すことを含む。本方法は、入口部分の狭窄角度を調整することによって、マイクロ流体チャンネルの目詰まりを減らす段階をさらに含む。溶液を通す段階は、溶液を、直列および並列のうちの一方で配列された複数のマイクロ流体チャンネルに通すことを含む。インキュベートする段階は、細胞を0.0001秒間~20分間(またはさらにはより長く)インキュベートすることを含む。圧力は剪断性および圧縮性のいずれかである。

30

【0024】

一般に、さらにもう1つの態様において、本発明の実施により、化合物を細胞内に送達するための方法も提供され得、該方法は、溶液中に細胞を供給する段階または細胞を溶液中に懸濁させる段階、該細胞の膜に擾乱が引き起こされるように該細胞を変形させる段階、および、該細胞が変形された後に、該細胞を該溶液中でペイロードとともにインキュベートする段階を含む。

【0025】

また、本発明の実施により、以下の特徴物のうちの1つまたは複数も提供されうる。細胞を変形させる段階は、該細胞を1 μ s~10ms、例えば、10 μ s、50 μ s、100 μ s、500 μ sおよび750 μ sにわたって変形させることを含む。インキュベートする段階は、0.0001秒間~20分間、例えば、1秒間、30秒間、90秒間、270秒間および900秒間にわたって行う。

40

【0026】

本発明のさまざまな実施により、以下の能力のうちの1つまたは複数が提供されうる。従来の手法と比較して、送達の高い精度およびスケラビリティを達成することができる。細胞への材料の送達は自動化することができる。タンパク質、RNA、siRNA、ペプチド、DNAおよび不透過性色素などの材料を、胚性幹細胞または誘導多能性幹細胞(iPSC)、初代細胞または不死化細胞株などの細胞内に移植することができる。本デバイスおよ

50

び方法は任意の細胞型に適用可能であり、狭窄部分のサイズは、処理しようとする細胞に合わせて調整される。本デバイスおよび方法は、大きな利点をもたらす。例えば、現行のシステムにおける実験的ノイズを、従来の手法と比較して減少させることができる。材料の送達数量は、細胞集団の全体を通じて不変でありうる。細胞をバッチとして取り扱うのではなく、個別に取り扱うことができる。また、本発明により、種々のナノ粒子およびタンパク質をサイトゾルに送達するというかなり比類のない可能性も実証された。既存の方法は、そのような機能を遂行するにはかなり信頼性が低いか、または非効率的である。

【0027】

繊細な (sensitive) ペイロードの送達に関しては、例えば、タンパク質 (特に大型のタンパク質、例えば、30、50、100、150、200、300、400、500kDaを上回るか、またはそれ以上のもの)、量子ドット、または電気に対して繊細なもしくは電気への曝露によって損傷される他のペイロードが、繊細なペイロードの完全性および活性を保ちながら、細胞内に確実に送達される。したがって、本デバイスおよび方法は、ペイロード組成物を電気に供して (それによってペイロードを損傷させる) 低い細胞生存度をもたらす (例えば、細胞の505またはそれ以上が、典型的には、エレクトロポレーション後に死滅する) エレクトロポレーションなどの既存の手法を上回る、大きな利点を有する。急速な伸展/変形法のもう1つの利点は、幹細胞または前駆細胞が、処理された細胞の分化または活性の状態を変化させることなくペイロードの取り込みを受け入れるようになることである。例えばワクチン生産といった治療目的での、細胞の細胞質中への組成物の送達に加えて、本方法は、診断または画像化の目的で、オルガネラなどの細胞内構造を標識するためまたは細胞内構成要素を標識するために、分子、例えば検出可能マーカを含む大分子を導入するのにも用いられる。

【0028】

また、本発明のさまざまな実施により、以下の能力の1つまたは複数も提供されうる。DNAを、送達のために投与する (dose-to-deliver) 細胞、例えば幹細胞、初代細胞、免疫細胞の中に送達することができる。非常に大きなプラスミド (染色体全体でさえ) の送達を実現することができる。また、関心対象の遺伝子の発現レベル、および濃度に対するその感受性を試験するために、細胞内への既知の量の遺伝子構築物の定量的送達も容易に実現することができる。より容易な/より効率的な安定的な送達、相同組換えおよび部位特異的突然変異誘発を達成する目的で、既知の量のDNA配列の、DNA組換えを強化する既知の量の酵素を伴った送達も実現することができる。本明細書に記載の方法およびデバイスはまた、より効率的/確証的なRNA試験のための、RNAの定量的送達のためにも有用な可能性がある。細胞の細胞質中への低分子干渉RNA (siRNA) の送達も容易に実現される。

【0029】

本発明のさまざまな実施により、以下の能力の1つまたは複数も提供されうる。リボソームを必要とすることなしに、RNAサイレンシングのためにRNAを細胞内に送達することができる。既知の量のRNA分子を既知の量のダイサー分子とともに送達して、さまざまな条件における複数の細胞株間の、標準化された効率的なRNAを達成することができる。転写後レベルでの遺伝子発現調節の諸局面を調査するために、mRNAを細胞内に送達することができる。RNAおよび細胞の半減期を検討するための、RNAの既知の量の標識も可能と考えられる。汎用的なタンパク質送達を達成することができる。既知の量の標識タンパク質を、細胞におけるそれらの半減期を検討するために送達することができる。タンパク質局在を検討するための標識タンパク質の送達を実現することができる。細胞環境におけるタンパク質-タンパク質相互作用を検討するために、既知の量のタグ標識タンパク質を送達することができる。免疫染色および蛍光ベースのウエスタンブロット法のために、生きた細胞内への標識抗体の送達を達成することができる。

【0030】

また、本発明のさまざまな実施により、以下の臨床的能力および研究能力のうちの1つまたは複数も提供されうる。改良されたスクリーニングおよび投薬試験のための、細胞モ

10

20

30

40

50

デルへの薬物の定量的送達を達成することができる。本方法は、タンパク質治療薬を同定するため、または疾患の機序を解明するための一助として、サイトゾル中のタンパク質活性をスクリーニングするハイスループット方法として採用されうると考えられる。そのような用途は現在、それらが非効率的であるという理由から、現行のタンパク質送達方法によっては大きく制約されている。本デバイスおよび手法は、流血中血液細胞の特定サブセット（例えば、リンパ球）への薬物の細胞内送達、細胞、特に卵母細胞の凍結保存を改良するための細胞内への糖のハイスループット送達、タンパク質、mRNA、DNAおよび/または増殖因子を導入することによる標的化された細胞分化、iPS細胞を作製するために細胞リプログラミングを誘導するための遺伝子材料またはタンパク質材料の送達、トランスジェニック幹細胞株の開発のための胚性幹細胞内へのDNAおよび/または組換え酵素の送達、トランスジェニック生物の開発、DC細胞活性化、iPSC作製および幹細胞分化のための接合子内へのDNAおよび/または組換え酵素の送達、診断および/または機序研究のためのナノ粒子送達、ならびに量子ドットの導入のために有用である。形成外科手術に関連して用いられる皮膚細胞も、本明細書に記載のデバイスおよび方法を用いて改変される。

10

【0031】

抗原および/または免疫刺激分子を送達する方法を用いて抗原提示を刺激する方法により、従来の刺激方法と比較して活性レベルが向上した抗原提示細胞、例えば樹状細胞が得られ、それにより、標的抗原に対する増大したレベルでのT細胞およびB細胞媒介性免疫が導かれる。このため、そのような方法は、癌または感染に対する応答として免疫系を活性化させる手段として使用しうると考えられる。

20

【0032】

スクリーニング、画像化または診断の目的で、本デバイスは細胞を標識する方法に用いられる。細胞を標識する方法は、制御された傷害に細胞を供した上で、細胞を検出可能マーカを含む溶液に接触させることによって実施され、ここで前記傷害は、ごく短時間の狭窄または高剪断力のパルスを含む。検出可能なマーカには、蛍光性分子、放射性核種、量子ドット、金ナノ粒子または磁性ビーズが含まれる。

【0033】

本発明の前には、外因性組成物を導入することを目的とする幹細胞の操作は困難であった。本明細書に記載のデバイスおよび方法、例えば、誘導多能性幹細胞（iPSC）などの幹細胞または始原細胞を狭窄チャンネルに通すことは、分化を誘導しないが、細胞内への組成物の取り込みを確実に誘導する。例えば、分化因子がそのような細胞に導入される。導入された因子の取り込みの後に細胞は該導入された因子によって指令される分化経路を進み、該因子が細胞内に導入された方法に付随する問題を伴うことはない。

30

【0034】

単一細胞のほかに、非常に大きな細胞、例えば、卵；直径およそ200 μm、細胞の塊、例えば細胞2~5個の塊、例えば2~3個の細胞を含む胚なども、標的組成物を取り込むように処理される。開口部のサイズはそれに応じて調整され、すなわち、狭窄の幅は塊のサイズよりも少しだけ小さい。例えば、チャンネルの幅は細胞塊の幅の20~99%である。

【0035】

細胞または細胞塊は、所望の細胞型に関して精製/単離されるか、または濃縮される。本方法に用いられる樹状細胞または他の細胞、例えば、マクロファージ、B細胞、T細胞などの免疫細胞、または胚性幹細胞もしくはiPSなどの幹細胞は、精製または濃縮される。例えば、細胞は、その細胞表面マーカ-の発現または他の識別的特徴に基づいて単離されるか、または濃縮される。樹状細胞はそれらの -インテグリン、CD11cまたは他の識別の細胞表面マーカ-の発現に基づいて同定され、単離される。細胞に関して、「単離された」という用語は、その細胞が、それが天然に存在する場合に伴う他の細胞型も細胞材料も実質的に含まないことを意味する。例えば、特定の組織型または表現型の細胞の試料は、それが細胞集団の少なくとも60%を占める場合には「実質的に純粋」である。好ましくは、調製物は、細胞集団の少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも99%または100%を占める。純度は、任意の適切な標準的な方法によって、

40

50

例えば、蛍光活性化細胞分取法（FACS）によって測定される。

【0036】

ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは他の作用物質などのペイロード組成物は、精製および/または単離される。具体的には、本明細書で用いる場合、「単離された」または「精製された」核酸分子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、組換え手法によって産生される場合には他の細胞材料もしくは培養基を、または化学合成される場合には前駆的の化学物質もしくは他の化学物質を、実質的に含まない。精製された化合物は、関心対象の化合物が重量比で少なくとも60%を占める（乾燥重量）。好ましくは、調製物は、関心対象の化合物が重量比で少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも99%を占める。例えば、精製された化合物は、所望の化合物が重量比で少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、98%、99%または100%（w/w）を占めるものである。純度は、任意の適切な標準的な方法、例えば、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーまたは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析によって測定される。精製または単離されたポリヌクレオチド（リボ核酸（RNA）またはデオキシリボ核酸（DNA））は、その天然の状態ですべてに隣接する遺伝子も配列も含まない。単離または精製された核酸分子の例には、以下のものが含まれる：（a）天然のゲノムDNA分子の一部であるが、それが天然に存在する生物のゲノム中で分子の一部に隣接する核酸配列のいずれとも隣接していないDNA；（b）結果的に生じる分子がいかなる天然のベクターともゲノムDNAとも同一でない様式で、ベクター中、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA中に組み入れられた核酸；（c）分離した分子、例えばcDNA、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって生成された断片、または制限断片など；および（d）ハイブリッド遺伝子、すなわち融合タンパク質をコードする遺伝子の一部である組換えヌクレオチド配列。本発明による単離された核酸分子は、合成的に生成された分子、ならびに化学的に改変された、および/または修飾された骨格を有する任意の核酸をさらに含む。

【0037】

懸濁溶液とは、任意の生理的な、または細胞適合性のある緩衝液または溶液のことである。例えば、懸濁溶液は細胞培地またはリン酸緩衝食塩水である。ペイロードは同じまたは異なる懸濁溶液であり、それはまた、細胞内に送達しようとする組成物も含む。

【0038】

本デバイスの利点には、所望のペイロードの改変を回避すること、および、ペイロードを必ずしも電磁場や他の形態のストレスに曝露するわけではないことが含まれる。エレクトロポレーションに関して、係る方法はタンパク質を損傷させ、送達に関して効果的でないことが示されている。この重大な欠点は、本明細書に記載の方法では問題とならない；本方法は、繊細なペイロード、例えばタンパク質、特に大型のタンパク質（例えば、40kDa~70kDa、および最大で120、130、150、200kDaまたはそれ以上）、大型の核酸構築物（例えば、1kb、2kb、5kbまたはそれ以上の核酸重合体および最大で染色体全体までを含むプラスミドおよび他の構築物）、大型の化合物、ならびに量子ドット（例えば、直径12nm）、ならびに繊細であって電気への曝露によって容易に損傷されることが判明している他の材料などの送達に特に適している。例えば、ナノ粒子または量子ドット上の表面リガンドは、電場に応答して損傷されるかまたは荷電して、それ故に粒子の凝集をもたらし、それにより、それらの機能性を限定/消失させる恐れがある。制御された傷害方法のさらにもう1つの利点は、細胞を送達用組成物と接触させるタイミングのことである。プロテアーゼ、温度、ならびに電気に対して繊細なタンパク質に特に該当することであるが、より以前の方法と比較すると、細胞は処理後に比較的短期間にわたってペイロード溶液と接触される。また、デバイスはマイクロ流体の性質であるため、はるかにより小さい作動容積しか必要とせず、それにより、貴重な生の材料および/または細胞が保存される。また、本デバイスを、エレクトロポレーションまたはリポソームといった既存の送達方法と併用して、各方法の個別の場合に比して大きく強化された送達を生じさせることもできる。

【0039】

送達されるペイロードの機能的活性は流体剪断ストレスと逆相関し、すなわち、細胞膜に加わる物理的歪み、例えば細胞膜の伸展は、剪断ではなく、ペイロードの取り込みを媒介する。従来のナノ粒子送達法は、より多量の材料が細胞の細胞内環境に到達することをもたらす；しかし以前の方法は、送達された材料のエンドソーム内への隔離をもたらすという事実のために、それらの方法は、本明細書に記載の方法と比較して、送達された材料の活性がより低くなる。本明細書に記載の方法は、細胞内に送達されたより少量のペイロードによりそれらの他のサイトゾル構成要素へ到達可能であるために、送達された分子の機能的活性がずっと多くなるような、化合物/組成物のサイトゾルへの直接送達を招く。例えば、ナノ粒子を送達するための以前の方法は、細胞内に送達される材料の量を2~10倍にしたが、エンドソーム内への隔離のために、送達された材料は機能的活性をほと

10

【0040】

さらなる利点および特徴として、以前のアプローチよりもはるかに速い、処理の時間尺度および細胞速度が挙げられる。さらに、例えば、(細胞の直径に対する%としての)狭窄のサイズ(直径)に対する細胞のサイズ(直径)による判断では、他の方法は本方法ほど激しく細胞を押しつぶすことはない。この急速で、力強く、しかし致死的には至らない(sub-lethal)押しつぶすまたは変形は、細胞による、より優れた、ペイロードのサイトゾルへの直接取り込みを導く。細胞の変形は急激であり、すなわち、実質的に $1\mu\text{s} \sim 1\text{ms}$ で起こる。一般に、あまりにも大きい変形によって誘導される細胞ストレスは細胞に致死

20

【0041】

[本発明1001]

細胞膜における擾乱を引き起こすためのマイクロ流体システムであって、内腔を画定し、かつ緩衝液中に懸濁された細胞がそこを通り得るように構成された、マイクロ流体チャンネルであって、細胞変形用の狭窄を含み、該狭窄の直径が該細胞の直径の関数である、マイクロ流体チャンネルを含む、マイクロ流体システム。

30

[本発明1002]

狭窄の直径が、そこを通る細胞の直径の実質的に20~99%である、本発明1001のマイクロ流体システム。

[本発明1003]

狭窄の直径が細胞の直径の実質的に60%である、本発明1002のマイクロ流体システム。

[本発明1004]

狭窄の直径が、ペイロードが通るのに十分な大きさの、細胞壁の一時的擾乱を誘導するように選択される、本発明1001のマイクロ流体システム。

[本発明1005]

狭窄の直径がまた、細胞が変形の結果として死滅する可能性を低下させるようにも選択される、本発明1004のマイクロ流体システム。

40

[本発明1006]

チャンネルの断面が、円形、楕円形、細長いスリット、四角形、六角形および三角形からなる群より選択される、本発明1001のマイクロ流体システム。

[本発明1007]

狭窄が入口部分、中心点および出口部分を含む、本発明1001のマイクロ流体システム。

[本発明1008]

入口部分が狭窄角度を定め、該狭窄角度が、チャンネルの目詰まりを減らすように最適化されている、本発明1007のマイクロ流体システム。

50

[本発明1009]

入口部分が狭窄角度を定め、該狭窄角度が、送達および細胞生存度を向上させるように最適化されている、本発明1007のマイクロ流体システム。

[本発明1010]

入口部分が90度の狭窄角度を定めている、本発明1007のマイクロ流体システム。

[本発明1011]

直列および並列のうち的一方で並べられた複数のマイクロ流体チャンネルをさらに含む、本発明1001のマイクロ流体システム。

[本発明1012]

細胞駆動装置 (cell driver) をさらに含む、本発明1001のマイクロ流体システム。

10

[本発明1013]

細胞駆動装置が以下からなる群より選択される、本発明1012のマイクロ流体システム：圧力ポンプ、ガスポンプ、圧縮機、真空ポンプ、シリンジ、シリンジポンプ、蠕動ポンプ、手動シリンジ、ピペット、ピストン、毛管作用物 (capillary actor)、ヒト心臓、ヒト筋肉、および重力。

[本発明1014]

緩衝液中に懸濁された細胞の流体流がチャンネルにより狭窄内に運ばれ、該細胞が該流体流によって主として圧縮されるように該狭窄の直径がそこを通る該細胞の直径よりも大きい、本発明1001のマイクロ流体システム。

[本発明1015]

化合物または組成物を細胞内に送達するための方法であって、懸濁溶液中に細胞を供給する段階；該溶液を、細胞変形用の狭窄を含むマイクロ流体チャンネルに通す段階；圧力が該細胞に印加されるように該細胞を該狭窄に通す段階であって、それにより、ペイロードが通るのに十分な大きさの、該細胞の擾乱が引き起こされる、段階；および該細胞が狭窄を通った後に、該細胞を、ペイロード含有溶液中で所定の時間にわたってインキュベートする段階を含む、方法。

20

[本発明1016]

狭窄の直径が細胞の直径の実質的に20～99%である、本発明1015の方法。

30

[本発明1017]

狭窄の直径が細胞の直径の実質的に60%である、本発明1016の方法。

[本発明1018]

マイクロ流体チャンネルの断面が、円形、楕円形、細長いスリット、四角形、六角形および三角形からなる群より選択される、本発明1015の方法。

[本発明1019]

溶液を通す段階が、該溶液を狭窄の入口部分、中心点および出口部分に通すことを含む、本発明1015の方法。

[本発明1020]

入口部分の狭窄角度を調整することによってマイクロ流体チャンネルの目詰まりを減らす段階をさらに含む、本発明1019の方法。

40

[本発明1021]

入口部分の狭窄角度を調整することによって送達および細胞生存度をさらに向上させる段階をさらに含む、本発明1019の方法。

[本発明1022]

入口部分の狭窄角度を90度に調整する段階をさらに含む、本発明1019の方法。

[本発明1023]

溶液を通す段階が、該溶液を、直列および並列のうち的一方で並べられた複数のマイクロ流体チャンネルに通すことを含む、本発明1015の方法。

[本発明1024]

50

インキュベートする段階が、細胞を0.0001秒間～20分間インキュベートすることを含む、本発明1015の方法。

[本発明1025]

細胞を狭窄に通す段階が、緩衝液中に懸濁された該細胞の流体流がチャンネルにより狭窄内に運ばれることを含み、該細胞が該流体流によって主として圧縮されるように該狭窄の直径がそこを通る該細胞の直径よりも大きい、本発明1015の方法。

[本発明1026]

圧力が剪断および圧縮のうちの1つである、本発明1015の方法。

[本発明1027]

化合物を細胞内に送達するための方法であって、

細胞を溶液中に懸濁させる段階；

該溶液を、細胞変形用の狭窄を含むマイクロ流体チャンネルに通す段階；

該狭窄を該細胞の直径の関数としてサイズ変更する段階；

圧力が該細胞に印加されるように該細胞を該狭窄に通す段階であって、それにより、該細胞の擾乱が引き起こされる、段階；および

該細胞が狭窄を通った後に、該細胞を、ペイロードを含む該溶液中で所定の時間にわたってインキュベートする段階であって、該擾乱が、該ペイロードを通すのに十分な大きさである、段階

を含む、方法。

[本発明1028]

狭窄の直径が細胞の直径の実質的に20～99%である、本発明1027の方法。

[本発明1029]

狭窄の直径が細胞の直径の実質的に60%である、本発明1028の方法。

[本発明1030]

マイクロ流体チャンネルの断面が、円形、楕円形、細長いスリット、四角形、六角形および三角形からなる群より選択される、本発明1027の方法。

[本発明1031]

溶液を通す段階が、該溶液を狭窄の入口部分、中心点および出口部分に通すことを含む、本発明1027の方法。

[本発明1032]

入口部分の狭窄角度を調整することによってマイクロ流体チャンネルの目詰まりを減らす段階をさらに含む、本発明1031の方法。

[本発明1033]

入口部分の狭窄角度を調整することによって送達および細胞生存度をさらに向上させる段階をさらに含む、本発明1031の方法。

[本発明1034]

入口部分の狭窄角度を90度に調整する段階をさらに含む、本発明1031の方法。

[本発明1035]

溶液を通す段階が、該溶液を、直列および並列のうちの一方で並べられた複数のマイクロ流体チャンネルに通すことを含む、本発明1027の方法。

[本発明1036]

インキュベートする段階が、細胞を0.0001秒間～20分間インキュベートすることを含む、本発明1027の方法。

[本発明1037]

インキュベートする段階が、細胞を0.0001秒間よりも長くインキュベートすることを含む、本発明1027の方法。

[本発明1038]

圧力が剪断および圧縮のうちの1つである、本発明1027の方法。

[本発明1039]

化合物を細胞内に送達するための方法であって、

10

20

30

40

50

溶液中に細胞を供給する段階；
該細胞の膜に擾乱が引き起こされるように該細胞を変形させる段階；および
該細胞が変形された後に、該細胞を該溶液中でペイロードとともにインキュベートする
段階
を含む、方法。

[本発明1040]

細胞を変形させる段階が、該細胞を1 μ s~1msにわたって変形させることを含む、本発
明1039の方法。

[本発明1041]

インキュベートする段階が、0.0001秒間~20分間にわたって行われる、本発明1039の方
法。

10

[本発明1042]

化合物を細胞内に送達するための方法であって、
溶液中に細胞の懸濁液およびペイロードを供給して、懸濁液を作製する段階；
該懸濁液を、該細胞を急激かつ一時的に変形させるように構成されたマイクロ流体チャ
ンネルを通じて流す段階；ならびに
該細胞を、急激および一時的な変形の後に、該懸濁液中で所定の時間にわたってインキ
ュベートする段階
を含む、方法。

[本発明1043]

懸濁液を、マイクロ流体チャンネルを通じて流す段階が、
該懸濁液を、該マイクロ流体チャンネル内の狭窄を通じて流すこと；および
該狭窄を該細胞の直径の関数としてサイズ変更すること
を含む、本発明1042の方法。

20

[本発明1044]

狭窄を細胞の直径の関数としてサイズ変更することが、該狭窄の直径が該細胞の直径の
20~99%となるように該狭窄をサイズ変更することを含む、本発明1042の方法。

[本発明1045]

懸濁液を、マイクロ流体チャンネルを通じて流す段階が、細胞を実質的に1 μ s~1msに
わたって変形させることを含む、本発明1042の方法。

30

[本発明1046]

溶液中に懸濁された細胞とともに用いるため、および細胞の膜に擾乱を引き起こすため
のマイクロ流体システムであって、
細胞の膜に擾乱を引き起こすように構成されたシステムであって、該細胞に圧力を印加
することによって該細胞を急激かつ一時的に変形させるように構成され、該擾乱が、ペイ
ロードを通すのに十分な大きさである、システム
を含む、マイクロ流体システム。

[本発明1047]

流れを合流させることによる流体剪断流を用いて細胞に対する急激および一時的な変形
を引き起こすように構成されている、本発明1046のマイクロ流体システム。

40

[本発明1048]

複数のマイクロピラーを用いて細胞に対する急激および一時的な変形を引き起こすよう
に構成されている、本発明1046のマイクロ流体システム。

[本発明1049]

マイクロピラーが1つのアレイとして構成されている、本発明1048のマイクロ流体シス
テム。

[本発明1050]

1つまたは複数の可動プレートを用いて細胞に対する急激および一時的な変形を引き起
こすように構成されている、本発明1046のマイクロ流体システム。

[本発明1051]

50

増量 (bulking) 材料を用いて細胞に対する急激および一時的な変形を引き起こすように構成されている、本発明1046のマイクロ流体システム。

[本発明1052]

細胞を、該細胞の変形されていない直径の20~99%である直径まで変形させるように構成されている、本発明1046のマイクロ流体システム。

[本発明1053]

細胞を1 μ s~1msにわたって変形させるように構成されている、本発明1046のマイクロ流体システム。

[本発明1054]

細胞リプログラミングのために、DNA、RNA、siRNAまたはタンパク質を初代線維芽細胞および幹細胞に送達するために用いられる、本発明1015~1045のいずれかの方法。

10

[本発明1055]

抗原またはRNAを初代免疫細胞に送達するために用いられる、本発明1015~1045のいずれかの方法。

[本発明1056]

量子ドットおよびカーボンナノチューブのうちの少なくとも1つを標的細胞に送達して該標的細胞の画像化を助けるために用いられる、本発明1015~1045のいずれかの方法。

[本発明1057]

薬物を標的細胞に送達するために用いられ、該標的細胞が腫瘍細胞である、本発明1015~1045のいずれかの方法。

20

[本発明1058]

ペイロードを標的細胞内に送達するための方法であって、
1つまたは複数の一時的な孔が標的細胞膜内に誘導されるように標的細胞を変形させる段階であって、該1つまたは複数の孔が、該ペイロードが通るのに十分な大きさである、段階；および

該細胞をペイロード含有溶液中で所定の時間にわたってインキュベートする段階を含み、変形が、機械的ストレスまたは剪断ストレスによって誘導される方法。

[本発明1059]

ペイロードを複数の標的細胞内に送達するための方法であって、

懸濁溶液中に複数の標的細胞を供給する段階；

30

複数の標的細胞を含む該溶液を複数のマイクロ流体チャンネルに通ず段階であって、各チャンネルが、複数の標的細胞それぞれの変形が誘導されるような少なくとも1つの細胞変形用の狭窄を含み、それにより、ペイロードが通るのに十分な大きさの、細胞の擾乱が引き起こされる、段階；および

複数の標的細胞がチャンネルを通った後に、該複数の標的細胞を該溶液中で所定の時間にわたってインキュベートする段階を含む、方法。

上記の方法の任意のものが、インピトロ、エクスピボまたはインピボで実行される。インピボ用途の場合には、例えば、インライン (in-line) ステントのように、デバイスを血管内腔に植え込むこともできる。本発明のこれらの能力および他の能力は、本発明それ自体とともに、添付の図面、以下の詳細な説明および添付の特許請求の範囲を綿密に読むことにより、より十分に理解されるであろう。

40

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】図1aは、マイクロ流体システムの概略図である。細胞は、狭窄を通った後に送達用材料 (ペイロード) に曝露される。図1bは、マイクロ流体システムの概略図である。細胞は、送達用材料 (ペイロード) を含む溶液中に細胞を懸濁させることによって、プロセスの全体を通じて送達用材料 (ペイロード) に曝露される (例えば、細胞は狭窄を通る前および後に送達用材料に曝露される)。

【図2】図2Aは、マイクロ流体システムの1つの態様の概略図である。図2Bは、深さ、幅

50

および長さを描写している、マイクロ流体システムの説明図である。

【図3】マイクロ流体システムの概略図である。

【図4】細胞壁における擾乱を示している概略図である。

【図5】マイクロ流体システムの写真である。

【図6】マイクロ流体システムの写真である。

【図7】マイクロ流体システムの写真である。

【図8】図8a～8bは、マイクロ流体システムから得られた例示的な結果を示しているグラフである。

【図9】マイクロ流体システムを用いて処理された細胞から得られた例示的な結果を示しているグラフである。

10

【図10】マイクロ流体システムを用いて処理された細胞から得られた例示的な結果を示しているグラフである。

【図11】マイクロ流体システムを用いて処理された細胞から得られた例示的な結果を示しているグラフである。

【図12】マイクロ流体システムの概略図である。

【図13】マイクロ流体システムを用いて処理された細胞から得られた例示的な結果を示しているグラフである。

【図14】マイクロ流体システムを用いて処理された細胞から得られた例示的な結果を示しているグラフである。

【図15】マイクロ流体システムを用いて処理された細胞から得られた例示的な結果を示しているグラフである。

20

【図16】図16a～16fは、例示的なマイクロ流体システムの概略図である。

【図17】マイクロ流体システムを用いる方法に関する流れ図である。

【図18】図18a～18bは、マイクロ流体システムを用いて処理された細胞から得られた例示的な結果を示しているグラフである。

【図19】本主題を用いて量子ドット(QD)が送達された処理細胞の透過および共焦点蛍光画像の重ね合わせ図と、それに続いて、z断面(z-section)共焦点蛍光画像を示したものである。

【図20】図20Aは、ポリ-イミダゾールリガンド(PIL)をコーティングしたQDによる本主題の処理時のHeLa細胞サイトゾル中への送達効率を図示している。フローサイトメトリーによる測定で、細胞生存度は80%を上回った。図20Bは、ヨウ化プロピジウム染色およびフローサイトメトリー測定によって測定した、本主題によるプレーン(plain)QD535の送達時のHeLa細胞の生存度を図示している。

30

【図21A】構築物のデザインを図示している。

【図21B】構築物の吸光度およびさまざまな媒質中での安定性を図示している。

【図22】図22Aは、処理細胞および対照細胞の生細胞共焦点顕微鏡画像を図示している。図22Bは、緑および赤のチャンネルにおける、時間の関数としての処理細胞の強度の変化を図示している。

【図23A】平均細胞蛍光のフローサイトメトリー測定を図示している。

【図23B】平均細胞蛍光および生存度のフローサイトメトリー測定を図示している。

40

【図24】10nM量子ドット溶液によるデバイス処理後の細胞サイトゾル内での非凝集性の単一の量子ドットの落射蛍光画像化、および自己蛍光を伴う3種の量子ドットの点滅軌跡を図示している。

【図25】送達成績が細胞速度および狭窄デザインに依存することを示す実験結果を図示している。

【図26】共焦点顕微鏡検査によって測定した、パシフィックブルー結合3kDaデキストランの送達後のHeLa細胞の種々の水平面のスキャンを図示している。

【図27】孔の開いた(porated)膜を交差しての細胞内への材料の受動拡散をシミュレートしている単純化2D拡散モデルを図示している。

【図28】材料の二段重ね式送達の結果を図示している。

50

【図29】SiRNA、タンパク質およびナノ粒子の送達に関するデータを図示している。

【図30】細胞型間での本主題の適用可能性を図示している。

【図31】ナノ材料および抗体送達によるデータを図示している。

【図32】タンパク質送達の用途を図示している。

【図33】ペイロードの送達が成功した例示的な細胞型の表である。

【図34】患者の血液を高分子などのペイロードの送達のためにマイクロ流体デバイスによって処理するシステムの説明図である。

【図35】ペイロードを送達するために10 μ m-6 μ mデバイスで処理したヒト胚性幹細胞の送達効率および生存率を図示している。

【図36A】本主題を用いた融合リプログラミングタンパク質の直接送達によるマウスおよびヒトiPSC株の作製および特性決定を描写している。

【図36B】本主題を用いた融合リプログラミングタンパク質の直接送達によるマウスおよびヒトiPSC株の作製および特性決定を描写している。

【図37】予備的タンパク質リプログラミングの結果を描写するとともに、iPSCコロニーにおけるヒト胚性幹細胞マーカーOct4、SSEA-4、Tra-60、Tra-80、アルカリホスファターゼ(AP)の発現を描写している。

【図38】局所的な電場をチャンネル内に導入することによって細胞変形をエレクトロポレーションと組み合わせるために、フォトリソグラフィ・パターンニングおよびAu沈着によって狭窄の両側に電極を組み込むことにより改変されたデバイスを図示している顕微鏡写真を描写している。

【図39】入口部分が90度の狭窄角度を有する、マイクロ流体システムのもう1つの態様を描写している。

【図40】図40Aおよび40Bは、図2Aに描写された例示的な態様によるデバイスと、図39に描写された例示的な態様によるデバイスとの間での生存率および送達効率の比較を示しているプロットである。

【図41】CD45に対するAlexa 488抗体によって測定した、活性化T細胞のCD45発現のヒストグラムである。CD45サイレンシングRNAの存在下でデバイスによって処理した細胞はより低い蛍光強度ピークを呈し、これにより、CD45遺伝子発現のノックダウンが指し示される。

【図42】再生医学；免疫学；画像化およびセンシング；ならびに癌ワクチンおよび癌研究といった、いくつかの例示的な適用分野を描写している説明図である。

【図43】図43Aおよび43Bは、カスケードブルー結合3kDaデキストランに曝露した対照集団、および30 μ m-6 μ mデバイスに供した上で3kDaデキストランに曝露した細胞の集団のフローサイトメトリーの強度ヒストグラムである。

【図44】マイクロ流体デバイスおよび関連した方法を用いる処理後のヒト胚性幹細胞におけるGFPノックダウンを図示している棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0043】

詳細な説明

本発明の諸態様は、細胞膜における擾乱を引き起こす目的で、細胞に所定の時間にわたって制御された変形を加え、その結果、材料を細胞の内部に送達しうるようにするための手法を提供する。変形は、例えば、機械的歪みまたは剪断力によって誘導される圧力によって引き起こすことができる。1つの例では、マイクロ流体システムは、流体を幾何形状的に小規模（例えば、1ミリリットル未満の容積、例えばマイクロリットル、ナノリットルまたはピコリットルなど）に制限することによって流体を制御および/または操作する構造を含む。マイクロ流体システムは、事実上あらゆるペイロードを細胞へと細胞内送達することが可能である。本システムは、細胞が通る狭窄を備えた、1つまたは複数のマイクロ流体チャンネルからなる。好ましくは、細胞は、システムを通るように圧力駆動される液体媒質中に懸濁されて、マイクロ流体チャンネルを通じて流れる。細胞が狭窄を通ると、その膜が擾乱されて膜における一時的破損を引き起こし、周囲の媒質中に存在するべ

10

20

30

40

50

イロードの取り込みをもたらす。狭窄は標的細胞のサイズの関数であるが、好ましくは、細胞直径と同程度であるか、またはそれよりも小さい。複数の狭窄を並列および/または直列に配置することができる。細胞における擾乱とは、材料が細胞外から細胞内に移動することを可能にする、細胞における割れ目（例えば、穴、裂け目、空隙、開口部、孔、断裂（break）、ギャップ、穿孔）のことである。本明細書に記載の方法によって作り出される擾乱（例えば、孔または穴）は、補体または細菌溶血素によって作り出されるもののような、タンパク質サブユニットの集合による多量体性孔構造の形成の結果として形成されるのではない。他の態様も、記載される主題の範囲内にある。

【0044】

図1~3を参照すると、マイクロ流体システム5は、管状内腔を定めるチャンネル10を含む。マイクロ流体チャンネル10は、好ましくは一度に単一の標的細胞20のみが狭窄15を通り得るように構成された狭窄15を含む。好ましくは、細胞20は、送達用材料30をも含む緩衝溶液25中に懸濁されてチャンネル10を通り得るが、送達用材料を、細胞20が狭窄15を通った後に溶液緩衝液25に添加することもできる。細胞20が狭窄15に接近して通る際に、狭窄15は細胞20に圧力（例えば、機械的圧縮）を印加して、細胞20を圧搾する（例えば、細胞20₁として示されているように）。狭窄15によって細胞に印加される圧力は細胞膜における擾乱（例えば、図4に示された穴）を引き起こす（例えば、細胞20₂）。ひとたび細胞が狭窄15を通ると、細胞20は、送達用材料30を含む、緩衝溶液25中の材料を穴を通して取り込み始める（例えば、細胞20₃）。細胞膜は時が経つにつれて元に戻り、送達用材料30の少なくとも一部分は、好ましくは細胞の中に捕捉されたままで保たれる。

【0045】

狭窄15の形状構成（configuration）をカスタマイズして、細胞20の狭窄を制御し、それによって細胞20に印加される圧力を制御することができる。好ましくは、狭窄15は入口部分35、中心点40および出口部分45を含む。例えば、狭窄15の直径を、細胞に印加される圧力（およびどの程度迅速に圧力が印加される/解除されるか）を調整するために変更することができる。かつ、狭窄15の長さを、圧力が細胞に印加される時間を調整するために変更することができる。ある形状構成においては、細胞の物理的狭窄は必要でなく、むしろ細胞を非常に高い剪断速度（shear rate）および/または圧縮速度にごく短時間供することにより、所望の擾乱が引き起こされ得る。一般に、マイクロ流体システムの外径に関する必要条件はなく、内径と外径との比はさまざまであってよい（例えば、5を上回る）。

【0046】

中心点40の直径は、細胞20の直径の関数でありうる。好ましくは、中心点40は、細胞20の直径と同程度であるか、またはそれよりも小さい（例えば、細胞の直径の20~99%）。好ましくは、中心点40の直径は細胞の直径の60%~70%であるが、最適な中心点直径は用途および/または細胞型によって異なりうる。従来の実験で用いられてきた中心点40の例示的な直径は、5~6 μm 、および7~8 μm である。また、中心点40は細胞20の直径より大きくてもよいが、細胞20に印加される圧力（例えば、剪断）のパルスを引き起こすように構成される。そのような圧力は、細胞20に対して、それがチャンネル10の壁に触れなくても印加することができる。剪断作用は、公知の手法によって測定することができる（例えば、Journal of Applied Physics 27, 1097 (1956); Murphey et al.）。

【0047】

入口部分35の狭窄角度（例えば、図2Aにおける θ ）は、さまざまでありうる（例えば、直径がどの程度急に減じるか）。狭窄角度は、好ましくは、細胞がそこを通る時に、システム5の目詰まりを最小限に抑える角度である。出口部分45の角度もさまざまでありうる。例えば、出口部分45の角度は、非層流をもたらさうる乱流/渦の可能性を低下させるように構成される（例えば、1~80度の範囲）。入口部分35および/または出口部分45の壁は好ましくは直線的であるが、他の形状構成も可能である（例えば、壁が湾曲していてもよい）。

【0048】

チャンネル10、入口部分35、中心点40および出口部分45の断面はさまざまでありうる。

例えば、さまざまな断面とは、円形、楕円形、細長いスリット、四角形、六角形、三角形などであってもよい。中心点40の長さもさまざまであってもよく、細胞20が狭窄15を通る際にそれに対して圧力が印加される時間を変更するように、調整することができる。ある所与の流速では、狭窄15が長いほど（例えば、中心点40が長いほど）、細胞20に対してより長い期間にわたって圧力を印加することができる。チャンネル10、入口部分35、中心点40および出口部分45の深さはさまざまでありうる。例えば、深さは、より狭い狭窄をもたらし、それによって狭窄幅の変化に類似した様式で送達を強化するように調整することができる。幅および長さ（*length*）はデバイスデザイン毎にさまざまであってもよく、リソグラフィ段階に用いられるクロムマスクなどによって、デバイスの製造時に決定することができる（デバイスがシリコンベースの場合）。深さはチャンネルの全体を通じて均一であってよく、ディープ反応性イオンエッチング段階などによって、デバイスの製造時に決定することができる。深さは、例えば15 μm ~ 20 μm でありうる。本明細書で用いる場合、デバイス寸法は、長さ、幅および狭窄の数を指し示す一連の数字によって表される（例えば、30 μm -6m \times 5は、長さ30 μm 、幅6 μm および狭窄5つのデバイスを表す）。

【0049】

細胞20への送達用材料30の送達を制御するために、細胞20がチャンネル10を通る速度も変更することができる。例えば、チャンネル10を通る細胞20の速度の調整により、細胞に圧力が印加される時間を変更すること、および細胞に圧力がどの程度急速に印加されるか（例えば、緩徐的または衝撃的に）を変更することができる。細胞20はシステム5を少なくとも0.1mm / 秒の速度で、例えば0.1mm / 秒間 ~ 5m / 秒、好ましくは10mm / 秒間 ~ 500mm / 秒の速度で通るが、他の速度も可能である。いくつかの態様において、細胞20はシステム5を、5m / 秒を上回る速度で通り得る。

【0050】

チャンネル10は、シリコン、ガラス、セラミック、結晶基板、非晶質基板およびポリマー（例えば、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、PDMS、環状オレフィンコポリマー（COC）など）といったさまざまな材料で製作することができる。製作は好ましくはクリーンルームを利用したものであり、例えば、ドライエッチング、ウェットエッチング、フォトリソグラフィ、射出成形、レーザー焼灼、SU-8マスクなどを用いることができる。1つの例示的なチャンネル10は長さがおよそ40 ~ 50 μm であり、およそ50 μm の非狭窄部直径を有し、かつ、およそ4 ~ 8 μm の狭窄部直径を有する。好ましくは、チャンネル10の長さは目詰まりを避けるように短く保たれる。他の寸法も可能である。

【0051】

図39は、マイクロ流体システムのもう1つの態様を描写している。この態様において、チャンネル10は、細胞20を締めつけない（constrict）予備的入口部分50を含む。拡張されたチャンネル部分55は、90度の狭窄角度（例えば、図2Aにおける ）を有するような入口部分35をもたらす。

【0052】

図40Aおよび40Bは、2つの例示的な態様間での生存度および送達効率の比較を示している2つのプロットである。ラベル4000は、図2Aによる態様を用いた場合に得られた測定値を指示しており、一方、4010は図39による態様を用いた場合に得られた測定値を指示している。同じ細胞速度および動作圧力の場合、図39の態様が高い送達効率および生存度を有することが示された。これは、図2Aの態様と同程度の剪断速度、細胞速度および圧縮下に置かれた時間にもかかわらず、そうである。

【0053】

いくつかのパラメーターが、細胞20内への送達用材料30の送達に影響を及ぼしうる。例えば、狭窄15の寸法、動作流速（例えば、狭窄15への細胞移動時間）、緩衝溶液25中の送達用材料30の濃度、および狭窄の後に緩衝溶液25中で細胞20を回復させる / インキュベートする時間は、細胞20内への送達用材料30の吸収に影響を及ぼしうる。細胞20内への材料30の送達に影響を及ぼしうるそのほかのパラメーターには、狭窄15における細胞20の速度、狭窄20における剪断速度、流速に対して垂直である速度成分、細胞圧縮速度、および狭

10

20

30

40

50

窄内にある時間が含まれる。そのようなパラメーターを、送達用材料30の送達を制御するために設計することができる。緩衝溶液25の組成（例えば、塩濃度、血清含有量など）も、送達用材料30の送達に影響しうる。細胞20が狭窄15を通る際に、狭窄15によって誘導される変形/ストレスが、細胞への傷害を一時的に引き起こし、これが擾乱を通じての材料の受動拡散を引き起こす。いくつかの態様において、細胞20は、細胞シグナル伝達機構を通じてアポトーシス経路が活性化される見込みを最小限に抑えるために100 μ s程度のごく短期間しか変形されないが、他の持続時間も可能である（例えば、ナノ秒から数時間の範囲）。初期の観察所見により、細胞20による送達用材料30の吸収は、細胞20が狭窄15を通った後、数分程度で起こることが指し示されている。

【0054】

細胞20は、さまざまな方法によって、チャンネル10を通り抜けるように駆動させることができる。例えば、圧力を入口側にあるポンプ（例えば、高圧ガス容器または圧縮機）によって印加してもよく、出口側にある真空ポンプによって陰圧を印加してもよく、チューブを通じての毛管作用でもよく、および/またはシステム5が重力送り式であってもよい。押し退け（displacement）に基づく流動システムを用いることもできる（例えば、シリンジポンプ、ペリスタポンプ、手動シリンジまたはピペット、ピストンなど）。単一のチャンネル10を通る例示的な流速は、数秒間に1 μ l程度である。さらに、緩衝溶液25は、チャンネル10の目詰まりを減少させるかまたは消失させかつ生存度を向上させるように設計しうる、1つまたは複数の潤滑剤（ブルロニックまたは他の界面活性剤）も含みうる。

【0055】

システム5は、送達用材料30の送達数量が細胞集団全体を通じて確実に一定であるように制御することができる。例えば、システム5は、送達用材料30を細胞20の透過化細胞膜に対して衝突させる狭窄後対流送達機構の使用を含みうる。二次流の流速を制御することにより、細胞にもたらされる送達用材料30の数量を、好ましくは制御することができる。さらに、膜回復時の緩衝溶液25中の送達用材料30の濃度を制御することにより、細胞の集団への送達用材料30の送達の均一性を向上させることもできる。好ましくは、システム5は、いかなる電場および/または化学物質も適用されない純粋に機械的なシステムとして動作するが、他の形状構成も可能である（例えば、蛍光などの細胞特性を測定するために電気的および/または光学的センサーを用いることができる）。さらに、システム5は好ましくは、送達される材料の種類とは無関係に動作する。例えば、タンパク質、RNAおよびDNAを、いかなるさらなる改変も伴わずに同じシステムを通じて送達することができる。

【0056】

ある種の細胞20を用いるいくつかの形状構成においては、細胞20を、細胞の内部への送達用材料の吸収を助ける1つまたは複数の溶液中でインキュベートすることができる。例えば、アクチン細胞骨格を脱分極させるために、送達の前に1時間、ラトランクリンA（Lantrunculin A）（0.1 μ g/ml）などの脱重合溶液中で細胞20をインキュベートすることができる。さらなる一例として、微小管網を脱分極させるために、送達の前に2時間、10 μ M コルヒチン（Sigma）中で細胞をインキュベートすることもできる。これらの方法は、DNAを送達する場合に遺伝子発現を得る上での一助となりうる。

【0057】

同じく図5も参照すると、システム5の並列の形状構成の写真が示されている。システム5は、任意の数の並列チャンネルを含みうる。好ましくは、追加的な並列チャンネルをシステム5に加えると、システム5の総スルーputを高めることができる。図6は、チャンネル10のそれぞれの注入口にフィルターを含むシステム5の並列の形状構成の写真を示している。さらに、図6はまた、複数の段を含む入口部分35を含む狭窄15の形状構成も示している。同じく図7も参照すると、システム5のプロトタイプの写真が示されている。図7で明らかなように、インキュベーション用ウェルを含むプロトタイプは、およそ1インチ×1/4インチ×1/4インチの寸法を有する。システム5の他の形状構成はまた、ソーター、処理前/処理後モジュール、および/またはセンサーモジュール（例えば、光学的

10

20

30

40

50

、電気的および磁氣的)も含みうる。

【0058】

これらの実施例に関して以下により詳細に説明するように、マイクロ流体システムおよび関連した方法は広範囲にわたる用途を有する。図42は、いくつかの例示的な適用分野を描写している説明図である。例えば、本主題を、細胞リプログラミングおよび幹細胞分化を可能にするといった目的で再生医学に適用することができる。本主題を、樹状細胞、単球、T細胞、B細胞および他のリンパ球への送達を通じての免疫活性の抗原提示および強化/抑制といった目的で免疫学に適用することができる。さらに、画像化およびセンシングも、標的細胞への量子ドット、カーボンナノチューブおよび抗体の送達の向上によって恩恵を受けることができる。さらに、本主題は、流血中腫瘍細胞(CTC)の単離およびリンパ腫治療といった目的で癌ワクチンおよび研究における用途も有する。本方法はまた、疾患を治療すること、または細胞挙動を操作することが可能な活性siRNAおよび小分子化合物をスクリーニングするための強固なプラットフォームも提供する。

10

【0059】

この概念は、緩衝溶液25中に存在する、通常であれば膜不透過性の色素(例えば、分子量3kDA~2MDAの蛍光性色素)、DNA、タンパク質、RNA、ナノチューブまたはナノ粒子を取り込むように細胞20を誘導したプロトタイプにおいて、実証が成功した。細胞20は、この過程の後に回復および増殖すると同時に、送達された材料を72時間を超えて保持することが示された。図33に列記されたものを含め、11種の異なる細胞型をこのシステムで試験したところ、本システムが種々の細胞型において強固な成績をもたらすことが実証されている。図33は、本主題の適用が成功した細胞型を含む表である。単一のチャンネル10を用いて、平均細胞スループットは細胞5,000~20,000個/秒のオーダーで測定され、平均送達効率は96%と測定され、細胞生存度は95%と測定された。試験はすべて室温で行った。しかし、ある種の手法では、温度を変更してもよい。例えば、本方法は、室温(例えば、20)、生理的温度(例えば、39)、生理的なよりも高い温度もしくは低い温度(例えば、4)、またはこれらの例示的な温度間の温度で実施することができる。本方法を低温(すなわち、例えば、冷却、氷浴または他の公知の手法によって達成しうる実質的に4付近)で行うことにより、送達効率および細胞生存度の驚くべき向上が生じた。このように、温度を調整することにより、組成物送達および細胞生存度に影響を及ぼすことができる。

20

30

【0060】

図8a~bに示されているように、狭窄15を通る細胞速度を高めることにより、送達用材料30の送達率および送達効率を高めうることが見いだされた。送達率は細胞速度とともに直線的に変化すること、および用量依存的反応がみられることが見いだされた。

【0061】

図9に示されているように、細胞が狭窄15を通った後の緩衝溶液25中での細胞のインキュベーション時間は、細胞20への送達用材料30の総送達率に影響を及ぼしうる。しかし、ある一定のインキュベーション時間(およそ2~3分)後には、送達率は実質的に不変となることが認められた。このデータによれば、細胞20が狭窄15を通った後にそれに生じる擾乱は、細胞20が狭窄15を通った後約5分以内のオーダーで是正されると考えられる。さらに、参考までに、-1分が対照群に対応する。

40

【0062】

図10に示されているように、細胞20を狭窄15に複数回通すことは総送達率に影響を及ぼしうるが、それは細胞20の総生存度には負の影響を及ぼすことが観察された。このデータを生成するため、細胞を狭窄15に通し、収集した上で、およそ1分以内に再びデバイスに通した。

【0063】

細胞20が擾乱されている期間中(例えば、狭窄15を通した後)には、細胞内からの材料を該擾乱を通じて抽出されることが観察された。したがって、細胞20が擾乱されると、材料が細胞20に流入することもそこから流出することも可能であることが見いだされた。

50

この特性は、システム5が、細胞を溶解させずに細胞内材料の試料採取を行う方法として使用可能であることを意味する。細胞膜における擾乱は、好ましくは、細胞質からの高分子の流出をもたらすと考えられ、それ故に細胞質の組成を探索するために用いられる。

【0064】

図11に示されているように、安定して緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するHeLa細胞を、GFPサイレンシングsiRNA(Ambion, U.S.A)の存在下で処理し、48時間の時点でFACS(FACS Cantoll, BD Biosciences, U.S.A.)によって蛍光ノックダウンに関して分析した。図11における結果は、40%を上回る遺伝子発現のノックダウンを指し示している。これはリポフェクタミン2000(Lipofectamine 2000)(Invitrogen, U.S.A)などの市販の試薬のそれと同等な結果である。同じく図11では、スクランブルsiRNA対照により、このノックダウンが変形過程それ自体によっては引き起こされないことが指し示されている。

10

【0065】

図13~14に示されているように、圧搾寸法は、送達用材料30の総送達効率に影響を及ぼしうる。例えば、図13~14は、動作圧力を変更すると(例えば、狭窄15の長さおよび/または幅を変更することによって)、総送達効率が幾分変化することを示している(図14は、種々の条件下での量子ドット(ナノ粒子)の送達に関する)。その上、図18a~18bに示されているように、推定細胞速度も送達用材料30の総生存度および送達効率に影響を及ぼしうる。例えば、図18aは、動作速度が変化すると、総送達効率が幾分変化することを示している。さらに、図18bは、動作速度が変化すると、細胞の生存度が幾分変化しうることを示している。これらの図は、狭窄の長さの変化が、送達を促進する一方で生存度には最小限にしか影響しないことを示している。さらに、大きな分子は狭窄の後、より小型の分子よりも低い速度で細胞に入る。本明細書に記載のこの細胞内送達方法は、それが非常にさまざまな種類の材料および細胞に対して奏功するという点で「汎用的(universal)」である。さらに、このデバイスによって誘導される膜破損は典型的には少なくともほぼ100nmのサイズでありうるが、他のサイズの破損も可能である。

20

【0066】

図12を参照すると、1つの実施においては、緩衝溶液25とサイトゾルとの間の濃度勾配を制御することで、送達される材料の量を予想通りに制御することができる。細胞20が狭窄によって穿孔を受けた後に、細胞20を濃縮された一群の高分子に曝露する局部的送達法を用いることができる。しかし、そのような局部的送達法は、適正な機能が確実に得られるように、推定される擾乱再封鎖時間を考慮に入れるべきである。これは、細胞膜の近傍に高濃度のペイロードを送達する、チャンネルに対して垂直な「マイクロノズル」を組み入れることによって実現することができる(図6Aに図示されている)。好ましくは、マイクロノズルは、狭窄15の箇所および/またはその付近に配置しうる。そのようなアプローチは、拡散性送達機構に対流成分を補い、それ故により高濃度でのより正確な細胞ローディングを可能にしうると思われる。好ましくは、注入は、細胞20が狭窄15の高濃度領域にある時に起こる。局部的手法には、緩衝液全体を高濃度に維持する必要がなくなることから、貴重な送達用材料が節約されるというさらなる利点がある。

30

【0067】

図16aを参照すると、一連のマイクロピラー100を用いて、擾乱が引き起こされるように細胞20に圧力を印加することができる。この実施において、細胞20は、圧力が細胞20に印加される様式で狭窄性ピラーアレイに強制的に通される。

40

【0068】

図16bを参照すると、圧縮プレート105を用いて、擾乱が引き起こされるように細胞20に圧力を印加することができる。この実施において、圧縮プレート105は、圧力が所定の時間にわたって細胞20に印加されるように制御することができる。圧縮プレート105は、細胞20に圧力を印加するように一方または両方のプレートが動くように構成することができる。細胞20が実質的に取り囲まれるように、圧縮プレート105のもう1つのセットを供給することもできる。

【0069】

50

図16cを参照すると、細胞20が細胞20の直径よりも大きい狭窄15を通る際に圧搾をシミュレートするために、緩衝液添加剤115（または細胞表面に結合した増量（bulking）材料）を用いることができる。例えば、緩衝液添加剤115による干渉に起因する狭窄のシミュレートが可能である。緩衝液添加剤115の例には、微粒子またはナノ粒子（例えば、ポリマーベースの、脂質ベースの、セラミックベースの、金属製のものなど）が含まれる。これらの粒子は、抗体、DNA配列、ペプチドまたは小分子などの細胞結合性リガンドによって標識されるが、これが不可欠なわけではない。

【0070】

図16dを参照すると、ビーズ120を用いて細胞20を圧縮することができる。例えば、磁力および/もしくは静電力を用いて細胞20に圧力を印加することができ、または図16eのケースでは、細胞20を引っ張ることができる。好ましくは、細胞20に印加される力は擾乱を引き起こすのに十分である。

【0071】

図16fを参照すると、複数の流体流125を、細胞20の圧縮（または急速なごく短時間の剪断）が引き起こされるような様式で向かわせることができる。例えば、複数の流体流125を、それらが互いに接近するかまたは衝突するような様式で作動させることができる。細胞20が複数の流体流125を通る際に、細胞20の膜における擾乱が引き起こされるように細胞20に力を印加することができる。または、送達を促進するために狭いスリット様ノズルを通して細胞を作動させることもできる。

【0072】

システム5は図7に示されているもののような独立型システムであってもよいが、他の形状構成も可能である。例えば、システム5を、局所的細胞内送達のためにインビボで患者に移植してもよく、または細胞を患者に戻す前に細胞を処理するためにエクスピボで機械に組み入れてもよい。

【0073】

本明細書に記載したその送達上の利点に加えて、本システムのマイクロ流体的な性質により、送達条件全体での正確な制御、前処理、およびその後の細胞の特性決定も行うことが可能である。例えば、本システムに、蛍光活性化細胞分取法（FACS）モジュールを直列に実装することができる。これにより、所望の細胞の送達および分取を、同一のシステム上でリアルタイムで行うことが可能である。さまざまな前処理および分取後アッセイ手法を採用することもでき、それにより、薬物スクリーニングおよび診断のための連続的なハイスループットアッセイの開発が可能になる。

【0074】

標的細胞に送達されるペイロードの送達効率は、標的細胞の対照集団、ならびにマイクロ流体デバイスによる処理を受けた集団をペイロードに供することによって決定される。対照試料を、同一の送達用溶液に、同じ濃度で、デバイスによって処理される細胞と少なくとも同じ時間にわたって曝露する。表面結合、エンドサイトーシス、および自己蛍光などの他の影響を補償するために、送達領域は、生きた対照細胞の上位1~5%のみがこの領域に入るように定められる。試料の送達効率はそれ故、送達領域にある生細胞のパーセンテージに対応する。例えば、図43Aは、カスケードブルー結合3kDaデキストランに曝露した対照集団のフローサイトメトリーによる強度ヒストグラムである。図43Bは、30 μ m-6 μ mデバイスに供した細胞のフローサイトメトリーによる強度ヒストグラムである。定められた送達領域は、43Aおよび43Bのいずれにおいても、陰影のない領域である。

【0075】

動作においては、図1~3をさらに参照しながら図17を参照すると、複数の段階を含む、システム5の細胞内送達を行うための過程1000が示されている。しかし、過程1000は例示に過ぎず、限定ではない。過程1000は、段階を追加すること、除去すること、改変すること、または並べ替えることによって改変することができる。

【0076】

段階1005では、細胞20を、送達用材料30とともに緩衝溶液25に懸濁させる。典型的な細

10

20

30

40

50

胞濃度は $10^4 \sim 10^9$ 個/mlの範囲でありうる。送達用材料の濃度は、 $10\text{mg/ml} \sim 0.1\mu\text{g/ml}$ の範囲でありうる。損傷/孔が1~5分間開いたままであることを考えれば、送達用材料は、所望の機構に応じて送達の前または直後に細胞緩衝液に添加することができる。緩衝溶液は、いくつかの塩、糖、増殖因子、動物由来産物、または適正な細胞増殖、細胞の健康状態の維持、もしくは細胞シグナル伝達経路の誘導のために必要な任意の他の成分で構成されてよい。そのほかの材料を緩衝溶液25に添加してもよい。例えば、界面活性剤（例えば、プルロニック）および/または増量材料を緩衝溶液25に添加することができる。

【0077】

段階1010では、細胞20および送達用材料30を含む緩衝溶液25を、システム5のチャンネル10に通す。緩衝溶液25は、重力を用いてチャンネル10を通すこともでき、他の方法によって補助することもできる。例えば、チャンネル10の入口側で緩衝溶液25に圧力を印加すること（例えば、高圧ガス容器および/または圧縮機を用いて）、および/または出口側上の真空ポンプによって陰圧を印加することができる。さらに、押し退けに基づく流動システムを用いることもできる。

10

【0078】

個々の細胞20が狭窄15を通る際に、狭窄15の固い構造（solid construction）によって圧力が瞬間的に細胞20に印加されて、これにより、送達用材料30が細胞20の内側に送達されうるように、穴などの擾乱が細胞膜に生じる。圧力が細胞20に印加される量および/または持続時間は、狭窄15の寸法、細胞20が狭窄15を通る速度を調整することによって、および/または狭窄15の形状を調整することによって変更することができる。1つの形状構成では、狭窄15をおよそ $5,000 \sim 20,000$ 個/秒の細胞が通り、各細胞はおよそ $100\mu\text{s}$ にわたって締めつけられる。

20

【0079】

システム5は、1つまたは複数のチャンネル10を含みうる。例えば、システム5は、並列の形状構成に並べられた $50 \sim 100$ 本のチャンネル10を含みうる。並列の形状構成を用いることにより、チャンネル10の1つまたは複数で目詰まりが起こることの重要性を低下させることができ、システム5の総スルーputを高めることができる。さらに、システム5は、互いに直列になった1つまたは複数のチャンネルも含みうる。

【0080】

段階1015では、細胞20が狭窄15を通った後に、細胞を緩衝溶液25中に置くことによってインキュベート/回復させる。この時間中に、細胞20は、細胞膜における擾乱を通じて、緩衝溶液25中に存在する送達用材料30のいくつかを取り込むと考えられる。より大型の分子がより小型の分子よりも遅い速度で吸収されるようであるため、取り込みの1つの機序は、拡散に基づくものである。好ましくは、細胞20を2~5分間のオーダーで緩衝溶液25中でインキュベート/回復させるが、他の持続時間も可能である。細胞20を緩衝溶液25中でインキュベート/回復させている時間中に、細胞20内部の材料も細胞から緩衝溶液25中に放出されうる。インキュベーション/回復期間の間、送達用材料30の送達数量が細胞集団全体で一定であることを確実にするために、ある特定の条件を制御することができる。例えば、狭窄後に、送達用材料をインキュベート/回復中の細胞に衝突させる対流送達機構を用いることができる。

30

40

【0081】

任意で、段階1020において、細胞をインキュベート/回復させた後に、緩衝溶液を除去するために細胞を洗浄してもよい。好ましくは、洗浄は、擾乱を修復させるために必要な期間の後に行われるが、細胞によって吸収される送達用材料30の量を制御する目的で、洗浄を他の時点で行うこともできる。

【実施例】

【0082】

実施例1 機能的に操作されたナノ粒子の送達

操作されたナノ材料は、生細胞画像化ツール、治療用分子送達物質として、またはさらには、光照射野もしくは磁場といった外的操作手段（external handle）によって生細胞

50

を操作するための手法としても、計り知れない潜在能力を有する (Howarth, M., et al. Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells. *Nature Methods* 5, 397-399 (2008))。しかし、これらの潜在的な用途の大半は、ナノ材料が細胞内のサイトゾルに送達されることを必要とする。QDなどのほとんどのナノ粒子は、水性媒質中での可溶性を付与するポリマーによってナノ粒子を被膜保護することを必要とし、これは一般に、それらが細胞膜を交差して受動拡散することを防ぐ。ナノ粒子のマイクロインジェクションは、特殊な装置の必要性およびスループットの低さに加えて、エレクトロポレーションが細胞の内側でQD凝集を引き起こすという理由から、非現実的とみなされている。このため、QDを細胞質中に送達するための試みのほとんどは、細胞によるエンドサイトーシスを受けて、エンドソームからは回避するQDに依拠してきた。本主題よりも前には、満足の行く規模変更可能な様式で、QDを細胞質中に送達することは不可能であった。それらのシステム (they system) は、より以前のアプローチのこの送達問題に対する解決策を提供する。

10

【 0 0 8 3 】

マイクロ流体デバイスを、最近記載された新世代の生体適合性QDと組み合わせる (Liu, W., et al. Compact biocompatible quantum dots via RAFT-mediated synthesis of imidazole-based random copolymer ligand. *JACS* 132, 472-483 (2010))。実施例1の全体を通じて用いられるQDは、複数の金属キレート性イミダゾール基および複数の水溶性を付与する被膜保護性ポリ(エチレン)グリコール (PEG) で構成されるポリ-イミダゾールリガンドでコーティングした。

20

【 0 0 8 4 】

QDのサイトゾル送達のために、QDを含有するPBS溶液中に細胞を分注した。この細胞-QD溶液をピペットでマイクロ流体デバイスに注ぎ、溶液を一定圧力でチャンネルを通り抜けさせた後に、5分間のインキュベーション期間をおいた。このインキュベーション期間の後に、余分なQDを遠心分離によって分離した。対照集団については、細胞-QD溶液をマイクロ流体デバイスに入れて、細胞をサイトゾル送達プロトコールと等しい時間にわたってQD溶液に曝露した。

【 0 0 8 5 】

図19は、本主題を用いてQDが送達された処理細胞の透過および共焦点蛍光画像の重ね合わせ図と、それに続いて、z断面 (z-section) 共焦点蛍光画像を示したものである。図19は、(上) 処理 (すなわち、送達) の直後、ならびに (下) 37 °C および5% CO₂ 下での48時間のインキュベーション後を図示している。びまん性染色パターンは細胞質に局限されており、ナノ粒子は核 (細胞内の暗い領域) には入っていないように思われる。スケールバーは10 μmである。図19において撮像されたQDをコーティングした特定の遊離性ポリ-イミダゾールリガンドは、PEG基を介して生体適合性をもたらすこと以外には機能を有しなかった。これらの共焦点顕微鏡画像は、マイクロ流体デバイスを通った後の、剥離された丸いHeLa細胞が、細胞の種々のz断面の全体を通じて、びまん性の細胞質QD染色を有したことを示している (図19、上)。このびまん性染色は、5% CO₂、37 °C での細胞のインキュベーションおよび付着後の、48時間後にも存続していた (図19、下)。びまん性QD蛍光は48時間後の時点では不明瞭であるが、これは細胞分裂に起因する可能性が高い (図19)。

本デバイスは、QD (流体力学直径はほぼ13nm) を、生細胞集団のほぼ40%に、ほぼ10,000個/秒というスループット速度で送達した。図20Aは、PILでコーティングしたQDによる本主題の処理時のHeLa細胞サイトゾルへの送達効率を図示している。フローサイトメトリーによる測定で、細胞生存度は80%を上回った。図20Bは、ヨウ化プロピジウム染色およびフローサイトメトリー測定によって測定した、本主題によるプレーン (plain) QD535の送達時のHeLa細胞の生存度を図示している。フローサイトメトリー、共焦点画像でのびまん性染色、および細胞の付着能力によって測定される処理細胞の生存度は、生細胞の細胞質中へのQDの送達と一致している。

30

40

【 0 0 8 6 】

蛍光が、エンドソーム内に隔離されたQDではなく、サイトゾル中に送達されたQDから実

50

際に生じていることを確かめるために、サイトゾルの還元性環境との相互作用によってその発光プロフィールが変化するナノ粒子を設計した。細胞質内部の還元電位は-260~-220 mVであり、これは主として、トリペプチドであるグルタチオンが高濃度(5~10mM)に維持されることによって定められる。このため、サイトゾル環境に曝露された場合に発光が変化するQD-色素構築物の蛍光を測定することにより、送達されたナノ粒子の局在および化学的到達性を判定することができる。還元しうるジスルフィド結合を介してコンジュゲートされた、カルボキシ-X-ローダミン(Rox)色素(emission=610nm)に対するエネルギー供与体として作用する緑色発光性QD(emission=541nm)を含むQD-色素を構築した。

【0087】

図21は、構築物のデザイン、吸光度およびさまざまな媒質中での安定性を図示している。2100にあるのは、色素とのコンジュゲーションおよびQDのコーティングの前のPIL(左)、ならびに結果的に生じるQD-ジスルフィド-Rox構築物(右)の概略である(画像は縮尺通りではない)。2110にあるのは、QD-ジスルフィド-色素構築物の吸光度スペクトルである。実験全体を通じて、488nmおよび405nmでの励起により、QDによる排他的吸収が得られた。2120にあるのは、37%および5% CO₂下での完全培地中での構築物に関するQDからRoxへの蛍光エネルギー転移の安定性であり、これはジスルフィド結合が細胞外環境で切断されないことを実証している。プロット2130は、QD蛍光の回復によって示される、サイトゾル性還元物質グルタチオンによるジスルフィド結合の切断を図示している。2140では、非チオール性還元物質であるトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンによる処理時のQD蛍光の回復が示されており、これはジスルフィド結合の切断のさらなる裏づけとなる。

【0088】

PILに組み入れられたチオール基は、チオール化されたRox色素とジスルフィド結合を形成した。精製された構築物の吸光度スペクトルは、QDおよびRoxの両方の吸光度の特徴を有し(2120)、QD 1個当たりRox色素が平均13個であり、QD蛍光を事実上消光させる(2130)。この構築物は、サイトゾル中の特異的還元環境の非可逆的センサーとして役立つ。ジスルフィド架橋が無傷のまま、488nm(顕微鏡検査)または405nm(フローサイトメトリー)のレーザーによってQDが選択的に励起されると、この構築物は蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を起こし、その結果、赤色域にあるRox発光が優勢となる。溶液アッセイでは、細胞性還元物質グルタチオンがジスルフィド架橋を切断して、Rox色素を放出させ、QD蛍光を回復させる(2140)。非チオールベースの還元物質であるトリス-(2カルボキシエチル)ホスフィンもQD蛍光の回復が可能であり、このことはQD表面からのRoxの放出がグルタチオンによるPILの押し退けを介するのではないことを指し示している(2140)。Rox蛍光は、PIL上のジスルフィド架橋の一部が長いPEG基によって立体的に妨害されること、および色素とQD表面との間にある程度少量の非特異的相互作用が理由となって、完全には消失しない可能性がある。

【0089】

フローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡検査によって測定した、構築物の蛍光プロフィールの変化により、QD-ジスルフィド-Rox構築物の細胞質への送達が確かめられる。還元性サイトゾル環境に曝露されると、ジスルフィド結合の切断により、QDから色素へのFRET過程が途絶する。このため、QDの排他的励起に際して、QDチャンネル蛍光は経時的に増加するが、一方、Roxチャンネル蛍光は減少する。生きたHeLa細胞を、高濃度のQD-ジスルフィド-Roxを伴う溶液中でマイクロ流体デバイスで処理し、5分間インキュベートした上で、余分なQDを除去するために洗浄し、その後に細胞培地に添加した(すなわち、処理細胞)。対照細胞は、マイクロ流体デバイスによって処理する代わりにQD-ジスルフィド-Roxとともに5分間インキュベートし、洗浄した後に、細胞培地の中に入れた。これらの処理細胞および対照細胞のRoxおよびQDチャンネルの蛍光を、共焦点顕微鏡検査およびフローサイトメトリーの両方によって観察した。

【0090】

図22Aおよび22Bは、QD表面の細胞質染色および化学的到達性を実証している、生細胞共

10

20

30

40

50

焦点顕微鏡画像および蛍光強度分析を図示している。図22Aは、処理細胞（上）および対照細胞（下）の画像を図示している。びまん性緑色蛍光の出現は、処理細胞のみに存在する。スケールバーは10 μm である。図22Bは、緑色チャンネルおよび赤色チャンネルにおける時間の関数としての強度の変化を図示している。各時点でnが20未満であったため、総平均蛍光の変動を、0時間の時点に対して標準化することによって補正した。

【0091】

共焦点顕微鏡下で、処理細胞の細胞質を通じて現れるびまん性蛍光は、強い赤色から強い緑色に進展した（図22Aに示されるように）。対照細胞画像は、輪状の蛍光によって実証されるように、外膜上でのある程度の非特異的な結合を示しており、緑色チャンネルシグナルの増加はみられない。これらの影響は、FRET効果を減少させる、サイトゾル性ジスルフィド結合の予想された切断に一致する。図22Bにおいて、線グラフは、送達された蛍光性材料の細胞間差異を、処理細胞および対照細胞に関する総蛍光、ならびに自己蛍光に関して標準化することによって補正した後の、細胞1個当たりのQDおよびRoxチャンネルの平均強度をプロットしている。処理細胞について、このグラフは、QD蛍光が増加してRox蛍光を上回る、インキュベーション2~4時間での交差を示している。興味深いことに、処理細胞のRoxシグナルは、9時間後に自己蛍光レベルを上回るところで安定化することが示されている。このことは、還元後にある程度のFRETが残存していた、溶液アッセイによる結果と一致している。観察されたびまん性染色、ならびにQDシグナルの増加およびRoxシグナルの減少は、サイトゾル送達およびその後のジスルフィド結合切断を強く裏づけている。RoxへのFRETによって消光される、対照細胞におけるQD蛍光は、自己蛍光と識別不能であるように思われる。対照細胞は、初期の時点では自己蛍光を上回るある程度のRox蛍光を呈するが、その後は絶えず減少する。このことは、QD-S-S-Roxと細胞の表面との非特異的相互作用、およびそれに続く構築物の媒質中への再溶媒和（re-solvation）に起因すると考えることができる。

【0092】

図23は、平均細胞蛍光および生存度のフローサイトメトリー測定を図示している。2300にあるのは、細胞1個当たりのQD（左）およびRox（右）の平均蛍光であり、処理細胞のみにおけるQD蛍光の増加を示している。Rox蛍光は処理細胞および対照細胞の両方において、24時間の時点までに自己蛍光レベルとなる。2310にあるのは、QDチャンネル（左）およびRoxチャンネル（右）における、処理細胞および対照細胞における選択した時点での蛍光強度の分布のヒストグラムである。QD送達は、細胞集団の少なくとも35%で起こったと推定される。グレイの領域は、蛍光強度ヒストグラムのピークの動きを目で追う際の目安とすることを意図している。2320では、ヨウ化プロピジウムによって測定した、対照細胞および処理細胞の生存度が図示されている。

【0093】

図23に図示されたフローサイトメトリー測定により、QD-ジスルフィド-Rox構築物がサイトゾル環境と相互作用しうることが確かめられている。フローサイトメトリー測定を、送達された細胞（処理細胞集団のほぼ35%）および非送達細胞の両方を範囲に含めて、すべての生細胞で記録した。2100では、処理集団および対照集団の細胞1個当たりの平均蛍光が図示されている。処理細胞では平均QD蛍光が最初に増大し、ほぼ9時間でピークに達して、その後は徐々に低下するが、これは自己蛍光レベルと同等なままに保たれる対照細胞集団のQD蛍光とは対照的である。このことは、処理細胞の内部でQDと色素との間のジスルフィド架橋のサイトゾル性還元が起こり、続いて細胞分裂による蛍光構築物の希釈が起こることと一致している。Rox蛍光は処理細胞および対照細胞のいずれについても高値で始まり、最初の2時間以内に急低下する。この急低下は、インキュベーション中の、細胞表面に結合した分子の媒質中への再溶媒和に起因すると考えられる。処理細胞集団における平均Rox蛍光は対照細胞と同程度であるように思われるが、これは処理集団内に非送達細胞が存在することに起因する。処理集団内における送達細胞および非送達細胞の両方の存在は、2310に示されたQD強度およびRox強度のヒストグラムで識別することができる。時間の経過に伴って、蛍光ヒストグラムは処理細胞については二峰性となるが、対照細胞

10

20

30

40

50

については単峰性のままである。QD蛍光は処理細胞集団のあるサブセットでは時間とともに増大するが(2100)、このことは処理されて送達された細胞のサイトゾル中でのFRET過程の途絶をさらに裏づけるものである。Rox蛍光は、膜に結合した構築物が媒質中に再溶解和されるとともに全体的に減少するが、処理細胞集団のあるサブセットはRox蛍光を保ち続ける。このことは、共焦点顕微鏡検査において観察されたQD-S-S-Rox結合の不完全な還元と一致する。ヨウ化プロピジウム染色によって測定した、処理細胞集団の生存度は、すべての時点で対照集団の10%以内である(2130)。対照群に比して90%を上回る細胞生存度は、処理後の生存度が40~60%という低さであるエレクトロポレーションおよびポリマーベースの方法といった代替的な方法よりも勝る。

【0094】

図24は、10nM QD溶液によるデバイス処理後の細胞サイトゾル内での非凝集性の単一の量子ドットの落射蛍光画像化(上)、ならびに自己蛍光を伴う3種のQD標識2400、2410および2420の点滅軌跡を図示している。QD点滅軌跡は、二値(bin)取得時間が長いこと(500ms)により、非二値性(non-binary)であるように思われる。スケールバーは10 μ mである。

【0095】

このQD送達プラットフォームにより、観察された発光間欠性が単一のQDと一致することから、非凝集QD-ジスルフィド-Rox構築物を送達することによる単分子画像化も可能となった。この実験については、QD-ジスルフィド-Rox構築物をサイトゾル中に送達し、その後10時間のインキュベーションを行って、落射蛍光顕微鏡での画像化を行った。10時間のインキュベーションにより、サイトゾル内部からのQD蛍光をジスルフィド結合還元を介して確実に回収された；落射蛍光顕微鏡検査を用いたのは、十分な光子を確実に収集するためである。細胞を本主題によって低QD濃度で処理したところ、いくつかの点滅性QDが観察された(図24)。2400、2410および2420に示されたサイトゾル中での点滅性QDの強度軌跡は、二値(bin)取得時間が長いこと(500ms)により、非二値性(non-binary)であるように思われる。並進性細胞移動は、この取得時間枠(ほぼ1分間)の間にはごくわずかであると考えられた。これらのデータは、本主題を用いて蛍光性標識としてQDを送達することによって、細胞サイトゾル内での単分子イベントを観察しうることを実証している。

【0096】

実施例1は、本主題の態様による細胞サイトゾル中へのナノ粒子送達を実証している。サイトゾル性還元物質によるQD-ジスルフィド-Roxの切断を観察することにより、ナノ粒子表面がサイトゾル成分と相互作用することが示された。本主題の諸態様は、いかなる細胞浸透性またはエンドソーム回避性リガンドも用いずに細胞質中へのQDのハイスルーブットでの送達を可能にし、同時に細胞生存度およびQD完全性も保たれる。35%という送達効率は、マイクロ流体狭窄の数を増やすこと、狭窄寸法を変更すること、または処理サイクルの数を増やすことによってさらに高めうる可能性がある。現行の細胞浸透性ペプチドまたは正電荷により補助される送達法の大部分とは異なり、本主題は、同一のナノ粒子上での細胞内送達ハンドルとサイトゾル性タンパク質標的指向性ハンドルとの二重コンジュゲーションを必要としない。前者の必要性をなしで済ませられることにより、交差反応性、コンジュゲーション戦略の反応効率の不均等性、およびコンジュゲーションの化学量論性に関する懸念の軽減を達成することができる。このことにより、QD構築物デザインに関して大きな柔軟性が獲得され、細胞内タンパク質の標識および追跡のための道が開かれる。本方法は、ストレプトアビジン-ビオチン、HaloTag-クロロアルカン、およびソルターゼタグ標識などの、ただしこれらには限定されない、立証されたタンパク質ターゲティング戦略を通じて細胞内タンパク質およびオルガネラを標的とする、複雑なデザインを有する多くの蛍光性ナノ材料の送達のために有用である。

【0097】

実施例1において、化学物質はすべてSigma Aldrichから入手し、別に指示する場合を除き、受け取ったままで用いた。空気感受性材料は、酸素レベルが0.2ppm未満の乾燥窒素雰囲気中にあるOmni-Lab VACグローブボックス内で取り扱った。溶媒はすべてSpectroscopi

10

20

30

40

50

cまたは試薬とした。芳香環を保有する化合物は、手持ち式UVランプおよびKMnO₄を用いてTLC上で可視化した。アミンを保有する化合物は、ニンヒドリン染料を用いてTLC上で可視化した。フラッシュカラムクロマトグラフィーは、Teledyne Isco Combi Flash Companion上で行った。HeLa細胞はATCCから購入し、細胞媒質材料はすべて、別に指示する場合を除き、Mediatechから購入した。

【0098】

実施例1において、¹H NMRスペクトルはBruker DRX 401 NMR Spectrometerで記録した。MS-ESIはBruker Daltonics APEXIV 4.7 FT-ICR-MS機器にて行った。UV-Vis吸光度スペクトルは、HP 8453ダイオードアレイ分光光度計を用いて得た。光ルミネセンスおよび吸光度スペクトルは、BioTek Synergy 4 Microplate Readerを用いて記録した。ポリマーの分子量は、DMF溶液中で、3種のPLgelカラム(103、104、105)を直列につないだAgilent 1100 series HPLC/GPCシステムにて、狭小なポリスチレン標準物質との対比により求めた。色素誘導体はVarian ProStar Prep HPLCシステムを用いて精製した。改変ポリマーは、Sephadex(商標) G-25Mを充填したGE HealthcareのPD-10カラムを用いて精製した。リガンドを交換したQDは、Millipore Amicon Ultra 30Kカットオフ遠心濾過器による遠心透析によって、および自己充填によるSuperdex 200 10/100ガラスカラムを備え付けたAKTA prime Plusクロマトグラフィーシステム(Amersham Biosciences)によるGFCによって精製した。フローサイトメトリー測定は、LSR Fortessa(BD Biosciences)にて行った。

【0099】

実施例1においては、以前に報告された方法(1)を用いて、478nmに第1の吸収ピークを有するCdSeコアを合成した。要約すると、0.4mmol(54.1mg)のCdO、0.8mmol(0.2232g)のTDPA、9.6mmol(3.72g)のTOPOを25mL丸底フラスコに入れた。溶液を160℃で1時間かけて脱気し、CdOが溶解して透明な均質溶液が形成されるまでアルゴン中で300℃に加熱した。この後に、発生した水を除去するために溶液を160℃の真空下に置いた。溶液をアルゴン中で360℃に再び加熱し、TOP-Se溶液(1.5mLのTOP中に1.5mLの1.5M TOP-Seを加えたもの)を急速に添加して、478nmに第1の吸収特徴を有するCdSeコアを得た。

【0100】

以前に報告された手順(2)の変法により、CdSシェルをCdSeコア上に沈着させた。アセトンによるヘキサンの反復沈殿によって単離されたコアを、オレイルアミン(3mL)とオクタデセン(6mL)の溶媒混合物中で180℃にした。続いて、Cd前駆体およびS前駆体の溶液を4mL/時の速度で連続的に投入した。Cd前駆体は、オクタデセン(1.5mL)とTOP(3mL)との溶媒混合物中にある0.33mmolオレイン酸Cdおよび0.66mmolオレイルアミンからなった。S前駆体は、6mL TOP中にある0.3mmolヘキサメチルジシラチアン[(TMS)₂S]からなった。CdおよびSのそれぞれを合計3つの単層ずつ添加することにより、オクタン中に希釈した場合に541nmで発光し、量子収率が60%であるQDが生成された。CdSe(CdS)の消衰係数は、文献(3)によるCdSeコアの消衰係数から、オーバーコーティング段階の際にCdSeコアの95%が保たれると仮定した上で算出した。

【0101】

実施例1において、シリコンチップは、フォトリソグラフィーおよびディープ反応性イオンエッチング手法を用いて製作した。その結果得られたエッチングされたシリコンウエーハを、残屑を除去するために洗浄し(H₂O₂およびH₂SO₄により)、酸化させてガラス表面を生じさせた上で、Pyrexウエーハに結合させ、その後切り分けて個別にパッケージ化されたデバイスとした。続いて、各デバイスを使用前に不具合に関して個別に点検した。

【0102】

実施例2 高分子の送達

高分子の細胞内送達は、治療および研究の用途において決定的な段階である。例えば、DNAおよびRNAのナノ粒子媒介性送達は遺伝子治療のために有用であり、一方、タンパク質送達は臨床および研究室の両方の状況において細胞機能に影響を及ぼすために用いられている。小分子、量子ドットまたは金ナノ粒子などの他の材料は、癌治療から細胞内標識お

10

20

30

40

50

よび単分子追跡までの範囲にわたる目的でサイトゾルに送達される。

【0103】

本手法の多目的性を実証するために、モデルとなるデキストラン分子をいくつかの細胞型に送達した：DC2.4樹状細胞、ヒト新生児包皮線維芽細胞（NuFF）およびマウス胚性幹細胞（mESC）で、それぞれ最大で55%、65%および30%の送達効率が達成された。初期実験により、マウスに由来する初代リンパ球、マクロファージおよび樹状細胞の送達の成功も示された。さらに、本手法は過度の細胞傷害性を引き起こすことも、幹細胞分化を誘導することもなかった。実際に、すべての細胞型で、試験した最も高い速度でも生存度が60%を上回った。デバイスのデザインおよび動作条件は、前述の細胞型のいずれに対しても事前に最適化しなかった。

10

【0104】

図25は、送達成績が細胞速度および狭窄デザインに依存することを示す実験結果を図示している。狭窄寸法は、第1の数字が狭窄の長さ、第2のものが狭窄幅、および第3のもの（あれば）がチャンネル1本当たりの直列になった狭窄の数に対応するように、数字によって表される（例えば、 $10\mu\text{m}-6\mu\text{m}\times 5$ ）。2500では送達効率が示されており、2510では、 $40\mu\text{m}-6\mu\text{m}$ （ ）、 $20\mu\text{m}-6\mu\text{m}$ （ ）および $10\mu\text{m}-6\mu\text{m}\times 5$ （ ）のデバイスデザインについて、処理18時間後の細胞生存度（フローサイトメトリーにより測定）が細胞速度の関数として示されている。2520では送達効率が、2530では細胞生存度（フローサイトメトリーにより測定）が、 $30\mu\text{m}-6\mu\text{m}$ デバイスによって処理した初代ヒト線維芽細胞（ ）、DC2.4樹状細胞（ ）およびマウス胚性幹細胞（mESC）（ ）における、速度の関数として示されている。ヒト線維芽細胞および樹状細胞は送達18時間後に分析した。MESCは送達1時間後に分析した。データポイントはすべて3回ずつの試験によるものであり、エラーバーは2つの標準偏差を表している。

20

【0105】

図26は、共焦点顕微鏡検査によって測定した、パシフィックブルー結合3kDaデキストランの送達後のHeLa細胞の種々の水平面のスキャン2600を図示している。スキャンは上から下に読み取って、続いて左から右に読み取ったが、ここで左最上部は $z = 6.98\mu\text{m}$ であり、右最下部 $z = -6.7\mu\text{m}$ である。スケールバーは $6\mu\text{m}$ を表している。2610では、 $10\mu\text{m}-6\mu\text{m}$ （ ）、 $20\mu\text{m}-6\mu\text{m}$ （ ）、 $30\mu\text{m}-6\mu\text{m}$ （ ）および $40\mu\text{m}-6\mu\text{m}$ （ ）デバイスの生細胞送達効率が示されている。時間軸は、細胞を標的送達用溶液に曝露する前の、細胞の初期処理から経過した時間を指し示している。結果はすべて、処理18時間後にフローサイトメトリーによって測定した。2620にあるのは、自己蛍光に関する対照とするための非処理細胞によって標準化した、送達された細胞集団の平均強度である。連続した処理サイクルにおいて、フルオレセイン結合70kDaデキストラン（横線）およびパシフィックブルー結合3kDaデキストラン（対角線）を細胞に送達し（サイクル1および3）、細胞から除去した（サイクル2）。対照は送達用溶液のみに曝露し、デバイスによる処理を行わなかった細胞を表している。データポイントはすべて3回ずつの試験によるものであり、エラーバーは2つの標準偏差を表している。

30

【0106】

以前のナノ粒子および細胞浸透性ペプチド（CPP）に基づく送達手法ではエンドサイトーシス経路を利用していることから、本主題の送達機構におけるエンドサイトーシスの影響の可能性を否定するための証拠を提示する。図26は、2600で、エンドサイトーシス法で予想されるであろう点状特性とは異なり、パシフィックブルー結合3kDaデキストランで処理された細胞がびまん性サイトゾル染色を明らかに示している共焦点顕微鏡検査を図示している。さらに、エンドサイトーシスが最小限となる4 で送達実験を実施すると、3kDaおよび70kDaデキストランといういずれの被験ペイロード材料についても、送達効率は温度によってわずかにしか影響されない。このデータは、エンドサイトーシスがこのシステムにおける送達の原因である可能性は低いことを指し示している。

40

【0107】

経時的な送達動態の特性決定を行った。細胞を送達用材料の非存在下で本主題によって

50

処理し、その後処理後の定められた時間間隔でパシフィックブルー標識3kDaデキストランに曝露した。このアプローチでは、細胞が狭窄を通る際にそれらの膜が攪乱される；しかし、それらを標識デキストランに曝露するまで、測定可能な送達は起こらなかった。したがって、各時点での送達効率は、処理後にその時間にわたって多孔性に保たれる細胞の割合を反映すると考えられる。この方法により、孔形成/閉鎖の動態が捉えられる。これらの結果は、デバイスのデザインに関係なく、送達のほぼ90%が処理後の最初の1分間に起こることを指し示している(2610)。観察されたこの時間スケールは、膜修復動態に関する以前の諸研究で膜封孔が傷害が誘導されてから約30秒後に起こることが報告されているように、孔形成仮説を裏づけるものである。対照的に、ナノ粒子およびCPP媒介性送達機構といったエンドサイトーシス法に関して推奨される時間スケールは時間のオーダーである。

10

【0108】

膜孔を通しての材料の送達は拡散性であるため、材料は孔の寿命の全体を通じて細胞の中および外へと交換可能であると考えられる。一方、エンドサイトーシスまたは対流による機序は、一方向性でなければならず、すなわち、細胞内への材料の輸送を促進するのみでなければならない。細胞膜を交差する材料の双方向性輸送を実証するために、3つの送達サイクルからなる実験を実施した。第1のサイクルでは、細胞を3kDaおよび70kDaデキストランの存在下で処理し、デキストラン溶液中で5分間インキュベートした上で、PBSにより2回洗浄した。試料の3分の1を残し、追跡調査のためにプレーティングした。第2のサイクルでは、洗浄した残りの細胞をデバイスによって再び、ただし送達用材料の非存在下で処理して、さらに5分間インキュベートした。この試料の半分を追跡調査のためにプレーティングした。第3のサイクルでは、第2のサイクルからの残りの細胞を、第1のサイクルと同じ条件下(すなわち、デキストランの存在下)でデバイスに通し、5分間インキュベートした上で、PBS中で2回洗浄した。細胞を、実験から18時間後にフローサイトメトリーによって分析した。標準化された蛍光強度の変化により、第1のサイクルでは細胞内に、第2のサイクルでは細胞外への、さらに第3のサイクルでは再び細胞内への、デキストランの正味の拡散があることが実証されている(2620)。このように、これらの結果は、拡散性送達機構と一致する。

20

【0109】

図27は、孔の開いた(porated)膜を交差しての細胞内への材料の受動拡散をシミュレートしている、COMSOL Multiphysicsとして知られるソフトウェアパッケージにおいて開発された、単純化された2D拡散モデルを図示している。COMSOL Multiphysicsは、さまざまな物理学および工学的用途、特に結合現象またはマルチフィジックス(multiphysics)のためにCOMSOLによって開発された、有限要素解析法、ソルバー(solver)およびシミュレーション用のソフトウェア/FEAソフトウェアパッケージである。2700にあるのは、材料の送達/損失が膜拡散率の関数として示されている。関心対象の材料が穿孔時に緩衝液中()または細胞内()にある場合の膜拡散率の関数として、細胞に送達された/細胞から損失した材料のパーセンテージを指し示しているシミュレーション結果である。2710にあるのは、材料が緩衝液から細胞に送達された場合に膜の両端間に形成される、シミュレートされたシステムおよび濃度勾配のグラフ表示である。

30

40

【0110】

細胞質の内側および外側での粒子拡散率に関する文献値を用い、拡散を物質移動の唯一の様式として用いて、図26の実験結果を質的に再現させた。さらに、実験データをこのモデルに適合させることにより、この手法は緩衝液中の送達用材料の10~40%を細胞サイトゾル中に送達した。これに比して、タンパク質送達のためのCPP法は、緩衝液材料の0.1%しかサイトゾルに送達しないと推定される。

【0111】

粒子のサイズ(または流体力学的半径)は、その拡散率およびそれが特定のサイズの膜孔に入る能力に影響を及ぼす。このため、このパラメーターは、孔形成/拡散の機序での送達効率に影響を及ぼす。一連の実験において、フルオレセインまたはパシフィックブルー

50

ーにコンジュゲートさせた3kDa、10kDa、70kDa、500kDaおよび2MDaデキストランの被験ペイロードを送達させた。3.1MDaと推定されるフルオレセイン標識プラスミドも送達させた。これらのモデル分子は、分子量の点でのそれらの関心対象の送達用材料との類似性に基づいて選択した。例えば、3kDa~10kDaデキストランはある種の短いペプチドまたはsiRNAと同程度のサイズであり、一方、70kDa~2MDaの範囲はほとんどのタンパク質およびある種の小型ナノ粒子のサイズを模している。

【0112】

図28は、材料の二段重ね式送達の結果を図示している。2800では、パシフィックブルー結合3kDa()、フルオレセイン結合70kDa()および2MDa()デキストランで処理したHeLa細胞について、速度の関数としての生細胞送達効率が示されている。この実験は10 μ m-6 μ m \times 5チップを用いて実施した。データポイントはすべて3回ずつの試験によるものであり、エラーバーは2つの標準偏差を表している。2810および2820は、非処理(赤色)、700mm/秒で処理(緑色)、500mm/秒で処理(オレンジ色)、300mm/秒で処理(淡青色)するか、または送達用材料のみに曝露した(対照、濃青色)HeLa細胞に関して、フローサイトメトリーデータのヒストグラム重ね合わせ図を図示している。送達用材料は、パシフィックブルー結合3kDaデキストラン(2810)およびフルオレセイン結合70kDaデキストラン(2820)からなった。

【0113】

これらの実験により、70kDaよりも大きい分子は、3kDaデキストランに比して異なる送達プロフィールを有することが示された(2800)。本デバイスにより、10 μ m-6 μ m \times 5デバイスを500mm/秒で動作させた場合には二段重ね式送達が生じ、例えば、生細胞の90%超が3kDa分子を受け入れることができ、一方、より大きな70kDaおよび2MDa分子を受け入れたのは約50%である。

【0114】

これらのフローサイトメトリーデータに対応するヒストグラムは、3kDaデキストラン送達によって2つの明確に異なるピークが生じることを指し示している(2810)。第1の部分集団において、対照に比してのピークシフトによって観察されるように(対照は、0mm/秒データポイントに関して以前に記載したようなエンドサイトーシスおよび表面結合に相当する)、細胞は軽度の送達レベルを呈し、平均蛍光強度は2~6倍に増加する。第2の集団において、細胞は、対照に比して平均蛍光強度の20~100倍の増加に対応する強化された送達レベルを呈する。この効果は、細胞の后者の部分集団が前者よりも過酷に孔の開いた状態にあり、材料の流入がほぼ10倍に増加することが可能になったことを指し示すと考えられる。実際に、300mm/秒、500mm/秒および700mm/秒の曲線によって図示されているように、動作速度を高めることによって処理の過酷さを高めることにより、送達が強化された細胞の割合が高くなるように思われる。より大きな70kDaデキストラン分子の送達についても、類似の特徴が観察される(2820)。しかし、粒子拡散率がより小さく、サイズ排除効果の可能性のあることから送達される総数量が減少するために、その効果は相対的に顕著ではない。軽度送達集団(第1のピーク)は、3kDaのケースでは2~6倍が観察されたのに比較して、平均蛍光強度の1.5~2倍の増加を示すのみである。この効果は、より大型の分子のケースでは、送達の本定義に基づいて軽度送達集団を対照と識別することが困難となりうるという、2800における送達データの不一致の説明になりうると思われる。その結果として、70kDaおよび2MDaデキストランといったより大型の分子については、第2の強化された送達集団を主として測定する。

【0115】

急速な機械的変形によって送達される材料が細胞サイトゾル中で活性があり、生物学的に利用可能であることを立証するために、不安定化されたGFPを発現するHeLa細胞に、被験ペイロードGFPサイレンシングsiRNA(Ambion, USA)を送達する、一連の実験を実施した。処理18時間後に、用量依存性かつ配列特異的なGFPノックダウン(最大で80%)が観察された。細胞速度およびデバイスデザインに対する遺伝子ノックダウン反応はデキストラン送達実験と一致し、速度が高く、複数の狭窄を有するデザインであるほど、より高度

10

20

30

40

50

の遺伝子ノックダウンが生じた。リポフェクタミン2000を、これらの実験における陽性対照として用いた。これらの実験を行う前に、デバイスデザインおよび動作パラメーターをsiRNA送達に関して最適化することはしなかった。

【0116】

図29は、SiRNA、タンパク質およびナノ粒子送達に関するデータを図示している。2900では、10 μ m-6 μ m \times 5チップを送達濃度5 μ Mで用いた抗eGFP siRNAの送達から18時間後の不安定化されたGFPを発現するHeLa細胞における、デバイスの種類および細胞速度としての遺伝子ノックダウンが図示されている。リポフェクタミン2000を陽性対照として用いた。2910では、急速な機械的変形およびエレクトロポレーションによるフルオレセイン標識70kDaデキストランおよびパシフィックブルー標識3kDaデキストランの送達効率が示されている。各デキストラン種類は、送達用溶液中の濃度0.1mg/mlとした。2920では、30 μ m-6 μ mデバイスを用いて、速度の関数として、フルオレセイン標識ウシ血清アルブミン()送達効率、パシフィックブルー結合3kDaデキストラン()送達効率および細胞生存度()が示されている。2930では、Alexa Fluor 488タグを有するチューブリンに対する抗体の送達直後のHeLa細胞の蛍光顕微鏡写真が示されている。スケールバーは5 μ m。2940および2950では、10 μ m-6 μ m \times 5デバイスによる処理後にほぼ1秒間固定した細胞における、金ナノ粒子(いくつかを矢印によって指し示している)のトンネル電子顕微鏡検査(TEM)画像が示されている。スケールバーは500nm。データポイントはすべて3回ずつの試験によるものであり、エラーバーは2つの標準偏差を表している。

【0117】

さらなる実験において、サイトゾル送達能力を、タンパク質およびナノ粒子の送達といった、これまで困難であった用途に対して調べた。本主題の成績を商業化された方法と比較するために、本主題およびNeonエレクトロポレーションシステム(Invitrogen)を用いて、ヒト線維芽細胞に対して、3kDaおよび70kDaデキストランをタンパク質モデルとして送達した。その結果、急速な機械的変形により、そのような高分子についての送達効率の7倍またはそれ以上の増加がもたらされることが指し示されている(2910)。本方法をタンパク質送達へと置き換えるために、30 μ m-6 μ mチャンネル直径デバイスを、フルオレセイン標識ウシ血清アルブミン(BSA)のHeLa細胞への送達に用いたところ、効率は最大で4%であり、一方、生存度は90%以上に維持された(2920)。また、チューブリンに対するAlexa Fluor 488標識抗体(Bio Legend)も、0.25mg/mlの抗体濃度を用いて、30 μ m-6 μ mデバイスによる処理後にHeLa細胞に送達させた(2930)。びまん性染色により、材料がエンドソーム内に捕捉されておらず、それ故にサイトゾル中の細胞構造の生細胞抗体染色のために適することが指し示されている。アポリタンパク質Eも、この手法を用いた送達に成功した。

【0118】

ナノ粒子の送達に関しては、変形後にほぼ1秒間固定した細胞のTEM画像(2940および2950)により、PEG 1000でコーティングした15nm金ナノ粒子の送達の実証されている。金ナノ粒子はほとんど非凝集性であるように思われ、視認しうる程度ではエンドソーム内に隔離されなかった。これらの画像において、送達の原因となる細胞質中のさまざまな瑕疵が観察された。ハイスループットでの、量子ドットの細胞サイトゾルへの直接的な非細胞傷害性送達の実証された。これは以前の手法が達成しようと努めてきた目標である。これらの実験においては、Rox色素をその表面に結合させた量子ドットを急速な機械的変形によって送達し、経時的に観察した。これらのデータにより、35%という最小推定送達効率を得られ、送達された量子ドットがサイトゾル中にあり、細胞内環境に化学的に到達可能であることが確かめられた。

【0119】

細胞がマイクロ流体狭窄を通る際に、細胞の急速な機械的変形によって一過性の孔が形成される。データからは、びまん性サイトゾル染色(図26の2600)、siRNA機能性(図29の2900)および孔の開いた膜を交差する材料の双方向性移動(図26の2920)を実証することによって、この機序が裏づけられている。送達効率および生存度に影響を及ぼす、狭窄

寸法、直列になった狭窄の数および細胞速度といったいくつかのパラメーターが同定されている(図25)。したがって、これらのパラメーターを用いて、個々の用途に対して、細胞型および送達用材料のサイズに基づいてデバイスデザインを最適化しうると考えられる。

【0120】

実施例2において、この手法は、送達前の複数の前処理段階および処理後の分析または分取段階からなるより大型の集積システムに組み込むことのできるマイクロ流体システムに基づく。例えば、送達直後に細胞を分取するため、または他の分析作業を行うために、10,000個/秒という平均スループット速度で、本送達デバイスを、フローサイトメトリー機器に直列させて配置することができる。

10

【0121】

本明細書に記載のデバイス、システムおよび方法には、既存の方法を上回る潜在的な利点がある。エレクトロポレーションおよびマイクロインジェクションと同様に、これは穿孔に基づく機序であり、それ故に、外因性材料、ペイロードの化学的修飾、またはエンドサイトーシス経路のいずれにも依拠しない。しかし、エレクトロポレーションとは対照的に、これは、タンパク質送達における成果が限定的であり、ある種のペイロードを損傷させるか、または細胞傷害作用を引き起こす恐れのある電場には依拠しない。実際に、本結果からは、ほとんどの用途において比較的高い生存度が実証されており、量子ドットなどの繊細なペイロードは損傷を受けていないように思われる。本主題はこのため、エレクトロポレーションに起因する量子ドットの損傷が問題となる恐れがあり、化学的送達法の使用によって利用可能な表面化学の範囲が制約される恐れのある、サイトゾル材料の標識および追跡といった分野において大きな利点を有する。

20

【0122】

また、実施例2により、タンパク質を細胞サイトゾルに送達する本デバイスの能力も実証された。データおよびモデル化の推定値により、本主題が、細胞浸透性ペプチドまたはエレクトロポレーションの使用といった従来手法に比して、細胞1個当たり10~100倍の多さの材料を送達しうると考えられることが指し示されている。送達率のこの向上は、例えば、細胞サイトゾルへの転写因子の送達が信頼性の高いiPSC作製法を開発する上での重大な障害になっている、タンパク質に基づく細胞リプログラミングに用いるための強力な方法をもたらす。また、関心対象のさまざまなタンパク質/ペプチドを送達することによって疾患機序を研究するために、本主題を用いることもできる。実際に、本主題は、ペプチドライブラリーのハイスループットスクリーニングのために用いることができるが、これは、CPPまたはナノ粒子に基づくほとんどの手法とは異なり、本主題がタンパク質の構造および化学に対して繊細でなく、エンドサイトーシス経路に依拠せず、かつタンパク質の機能性に影響を及ぼさないためである。

30

【0123】

本主題が初代細胞への送達に関する能力を実証したことから、急速な機械的変形によるサイトゾル送達をエクスピボ治療の機序として具体化することができる。このアプローチでは、血液または他の組織から単離された患者の標的細胞を、患者の体外でデバイスによって処理し、続いて体内に再び導入する。そのようなアプローチは、タンパク質またはナノ粒子治療薬の送達効率の増加をうまく利用しており、既存の手法よりも安全であるが、これは毒性のある可能性があるベクター粒子の必要性をなくすとともに、網内系クリアランスおよびオフターゲット送達に伴う副作用の可能性も減じるためである。

40

【0124】

実施例2においては、シリコンベースのデバイスを、微細加工施設にてフォトリソグラフィおよびディープ反応性イオンエッチング手法を用いて製作した。この過程では、厚さの450 μ mの6インチのシリコンウエーハを、ヘキサメチルジシラザン(HMDS)で処理し、フォトレジスト(OCG934, FujiFilm)により3000rpmで60秒間のスピンコーティングを行い、狭窄チャンネルデザインを備えたクロムマスクを通してUV光(EV1-EVG)を照射し、AZ405(AZ Electronic Materials)溶液中で100秒間にわたり現像させた。90 で20分

50

間の焼き付けを行った後に、ウエーハを、ディープ反応性イオンエッチング (SPTS Technologies) によって、所望の深さ (典型的には、この実施例では15 μm) にエッチングした。エッチング過程が完了した後に、ピラニア処理 (H₂O₂およびH₂SO₄) を用いて、残ったフォトレジストを除去した。アクセス用の穴 (すなわち、注入口および流出口) をエッチングするには、この過程をウエーハの反対側 (すなわち、エッチングされたチャンネルを含まないもの) に対して、アクセス用の穴のパターンおよびより厚いフォトレジストAZ9260 (AZ Electronic Materials) を含む異なるマスクを用いて繰り返した。

【 0 1 2 5 】

酸素プラズマおよびRCA洗浄を用いて、残留性不純物を除去した。湿式酸化を用いて100 ~ 200nmの酸化ケイ素を成長させ、その後にウエーハをPyrexウエーハに陽極接合させた上で、個々のデバイスへと切り分けた。各デバイスを、使用前に不具合に関して個別に点検した。

10

【 0 1 2 6 】

各実験の前に、注入口リザーバーおよび流出口リザーバーを有するホルダーにデバイスをマウントした (いずれも受注設計であり、Firstcutによって製造された)。これらのリザーバーは、適正な密封が得られるように、Buna-N Oリング (McMaster-Carr) を用いてデバイスと接合されている。注入口リザーバーは、材料を押し込んでデバイスに通すために必要な駆動力を得るために、テフロンチューブを用いて圧力調節システムに接続されている。実施例2は、最大で70psiの圧力に対応しうる。

【 0 1 2 7 】

20

実施例2の細胞培養物には、10%ウシ胎仔血清 (FBS) (Atlanta Biologics) および1%ペニシリン・ストレプトマイシン (Mediatech) を加えた高グルコースダルベッコ変法必須培地 (DMEM, Mediatech) 中で培養した、HeLa細胞 (ATCC)、GFPを発現するHeLa細胞、およびDC2.4 (ATCC) 細胞が含まれる。初代ヒト線維芽細胞 (NuFF) (GlobalStem) は、15% FBSを加えた高グルコースDMEM中で培養した。細胞は、37 °Cおよび5% CO₂のインキュベーター内に保った。適用可能な場合には、付着細胞を0.05%トリプシン / EDTA (Mediatech) による5 ~ 10分間の処理によって懸濁させた。

【 0 1 2 8 】

マウス胚性幹細胞 (mESC) は、85%ノックアウトDMEM、15%ウシ胎仔血清、1mMグルタミン、0.1mMメルカプトエタノールおよび1%非必須アミノ酸からなり、1000単位/mLのLIF (Millipore, USA) を加えた培地中で、マウス胚性線維芽細胞 (Chemicon) 上にて増殖させた。細胞を2 ~ 3日毎に0.25%トリプシン / EDTAを用いて継代した。デバイスによって処理したところ、mESCは、処理から2週であってもコロニーを再形成することができ、正常な形態を保った。

30

【 0 1 2 9 】

実施例2に関する実験を行うためには、細胞をまず所望の送達緩衝液 (増殖培地、リン酸緩衝食塩水 (PBS)、または3% FBSおよび1% F-68プルロニック (Sigma) を加えたPBS) 中に懸濁させて、所望の送達用材料と混合した上で、デバイスの注入口リザーバー内に入れた。このリザーバーは調節器によって制御される圧縮空気路と接続されており、流体をデバイスに通して推進させるために、選択した圧力 (0 ~ 70psi) が用いられる。続いて、処理した細胞を流出口リザーバーから収集する。孔閉鎖が確実に得られるように、細胞を処理後に送達用溶液中で室温にて5 ~ 20分間インキュベートし、その後にさらなる処理に供した。

40

【 0 1 3 0 】

異なるサイズのデキストランまたはタンパク質の送達をデキストランと比較する実施例2の実験においては、関心対象の分子を同時送達させ、すなわち、それらを同一のデバイス上で同一の細胞集団を用いる同一の実験に用いた上で、それらの蛍光性標識に基づいて識別した。実験条件のすべてを3回ずつ実施しており、エラーバーは2つの標準偏差を表している。

【 0 1 3 1 】

50

蛍光標識デキストラン分子 (Invitrogen) またはアポリポタンパク質E (Apolipoprotein E) (Invitrogen) を送達するためには、実施例2の実験を、送達緩衝液が0.1~0.3mg/mlのデキストランまたは1mg/mlのアポリポタンパク質Eのそれぞれを含むようにして、上記の通りに実施した。

【0132】

フルオレセイン結合BSA (Invitrogen) を送達するためには、細胞をまず、5mg/mlの非標識BSA (Sigma) を含む培地中で37℃にて2時間インキュベートし、続いて、1mg/mlのフルオレセイン結合BSAを含む送達緩衝液を用いて、実施例2のデバイスによって処理した。プレインキュベーション段階は、蛍光標識BSAの細胞表面への非特異的結合を最小限に抑えることを狙いとした。

10

【0133】

実施例2に関するGFPノックダウンは、非処理対照に比しての細胞集団の平均蛍光強度の低下率として測定した。リポフェクタミン2000 + siRNA粒子は、100 µlのPBS中で1 µgのsiRNAと1 µlのリポフェクタミン2000試薬を合わせることによって調製した。室温での20分間のインキュベーション後に、この混合物の20 µlを、ほぼ20,000個の細胞および100 µlの培地を含む各実験ウェルに添加した。細胞を粒子とともに18時間インキュベートし、その後分析を行った。

【0134】

実施例2において、金ナノ粒子は、チオール終端化した1000MWのポリエチレングリコール (PEG) をナノ粒子表面とコンジュゲートさせ、続いて余分なPEGを遠心分離 (10,000rcfで30分間) によって4回洗浄し、その結果得られた材料をPBS中に再懸濁させて最終濃度を100nMにすることによって調製した。HeLa細胞へのGNP送達を画像化するためには、3% FBS、1% F-68プルロニックおよび47nMのGNPを加えたPBS中に細胞を懸濁させ; 10 µm-6 µm x 5デバイスによって処理し、2.5% (w/v) グルタルアルデヒド、3% (w/v) パラホルムアルデヒドおよび5.0% (w/v) スクロースを含む0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中で固定した。一晩の固定の後に、1% (w/v) OsO₄を含むペロナル-酢酸緩衝液中で1時間かけて細胞を後固定した。続いてそれらを、0.5% 酢酸ウラニルを含むペロナル-酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中で一括して一晩染色し、脱水した上で、Spurr樹脂中に包埋した。Reichert Ultracut E (Leica) にてダイヤモンドナイフを用いて、厚さ70nmの切片を切り出した。切片をEM410電子顕微鏡 (Phillips) を用いて検査した。

20

30

【0135】

実施例2においては、Neonエレクトロポレーションシステム (Invitrogen) を用いて、N₂uFF細胞にフルオレセイン標識70kDaデキストランおよびパシフィックブルー標識3kDaデキストランをトランスフェクトした。細胞の洗浄は製造元の手順に従って行い、それらを適切な緩衝液中に懸濁させた。細胞を、デキストラン濃度0.1mg/mlを用い、10⁷個/mlの密度で、10 µlチップを用いて処理した。用いた3つの条件は以下の通りであった: 1) 1700Vの20msパルスを1回、2) 1600Vの10msパルス3回、3) 1400Vの20msパルス2回。条件1および3はいずれも、ヒト線維芽細胞のトランスフェクションのための最適な条件として製造元によって推奨されており、eGFPプラスミド送達効率はそれぞれ84%および82%である。

40

【0136】

実施例2の共焦点画像では、試料を800rcfで4分間、遠心分離して、PBSで2~3回洗浄した後に画像化を行った。60倍水浸レンズを装着したNikon TE2000-U倒立顕微鏡のC1共焦点増設ユニットを用いて、生細胞での共焦点画像を取得した。蛍光試料は405nmレーザーによって励起させ、標準的なDAPIフィルター (Nikon) を用いて検出した。

【0137】

実施例2の蛍光顕微鏡検査では、試料を800rcfで4分間、遠心分離し、PBSで2~3回洗浄した後に画像化を行った。画像は、Neofluarレンズ (Zeiss) を装着したAxiovert 200 (Zeiss) 倒立顕微鏡を用いて得た。蛍光励起は、X-cite 120Q水銀ランプ (Lumen Dynamics) によって行った。顕微鏡にHamamatsu C4742-95カメラ (Hamamatsu) を取り付け、画

50

像をImageJ (NIH) によって分析した。

【 0 1 3 8 】

実施例2のフローサイトメトリーにおいては、送達実験後の細胞の分析のために、細胞をPBSで2~3回洗浄した(96ウェルプレート中の1ウェル当たり100 μ l超)。続いてこれらを、3% FBS、1% F-68プルロニックおよび10 μ g/mlのヨウ化プロピジウム(Sigma)を加えたPBS中に再懸濁させた。細胞は、ハイスループットの試料自動採取装置(sampling robot)を装着したLSR Fortessa (BD Biosciences)またはFACSCanto (BD Biosciences)にて分析した。405nmおよび488nmレーザーを、所望のフルオロフォアの励起のために用いた。ヨウ化プロピジウム(生/死滅に対する染色)、フルオレセインおよびパシフィックブルーのシグナルを、695nmロングパスフィルター、530/30フィルターおよび450/50フィルターをそれぞれ用いて検出した。データ解析は、FACS Diva (BD Biosciences)およびFlowJo (FlowJo) ソフトウェアを用いて実施した。

10

【 0 1 3 9 】

実施例3 幹細胞および免疫細胞

タンパク質、ナノ粒子、siRNA、DNAおよびカーボンナノチューブが、胚性幹細胞および免疫細胞を含む11種の異なる細胞型に対する送達に成功した。実際に、構造的に多様な材料を送達する能力、およびトランスフェクトするのが困難な初代細胞に対するその適用可能性により、本デバイスおよび方法が研究用途および臨床の用途における幅広い適用可能性を有することが指し示されている。

【 0 1 4 0 】

実施例3において、各デバイスは、シリコンチップ上にエッチングされ、Pyrex層によって密封された1つまたは複数の狭窄を含む、45本の並列した同一のマイクロ流体チャンネルからなる。各狭窄の幅および長さ(以下により詳細に記載されている)は、それぞれ4~8 μ mおよび10~40 μ mの範囲にわたる。実施例3のデバイスは、典型的にはスループット速度20,000個/秒で動作させ、目詰まりに起因する故障が起こるまでに、デバイス1個当たり100万個に近い処理細胞が得られた。細胞の均一な処理を確保しながらスループットを高めるために、並列したチャンネルデザインを選択したが、これは、1つのチャンネルにおける目詰まりまたは不具合が近傍チャンネルにおける流速に影響を及ぼしえないことが理由である(デバイスは一定圧力で動作させることができる)。使用の前に、デバイスをまず、注入口リザーバーおよび流出口リザーバーをシリコンデバイスと接続させる鋼鉄製インターフェースと接続する。続いて、細胞と所望の送達用材料との混合物を注入口リザーバーの中に入れて、テフロンチューブを注入口に結びつける。続いて、圧力調節器を用いて注入口リザーバーでの圧力を調整し、細胞をデバイスに通して推進させる。処理された細胞を流出口リザーバーから収集する。

20

30

【 0 1 4 1 】

送達効率に影響を及ぼす、同定されているパラメーター(例えば、上記の実施例2参照)には、細胞速度、狭窄寸法および狭窄の数が含まれる(それにより、細胞が受ける剪断速度および圧縮速度が変化する)。例えば、膜不透過性のパシフィックブルー標識3kDaデキストラン分子の、生きたHeLa細胞への送達効率は、種々の狭窄デザインを通じて、細胞速度とともに単調に高くなる(例えば、図25の2500)。狭窄寸法もまた、送達に影響する;狭窄の長さを20 μ mから40 μ mに伸ばすことにより、すべての動作速度で送達効率がほぼ2倍になり(例えば、図25の2500)、生存度に対する影響はわずかであった(例えば、図25の2510)。狭窄の幅を縮小することにも同様の効果があった。直列になった狭窄の数もまた、送達効率を高め、直列になった5つの長さ10 μ mの狭窄を有するデバイスは、すべての細胞速度を通じて、単一の長さ10 μ m、20 μ mまたは40 μ mのデザインよりも成績が優れていた(例えば、図25の2500および2510)。これらのデータにおいて、0mm/sデータポイントは、細胞が他の試料と同じ処理を受けたがデバイスは通っていない対照例に相当し、それ故に、エンドサイトーシスまたは表面結合の影響を反映する、。

40

【 0 1 4 2 】

本手法の多目的性を調べるために、それがモデルとなるデキストラン分子を、従来はト

50

ランスフェクトするのが困難であったいくつかの細胞型、特に免疫細胞および幹細胞に送達する能力を評価した。蛍光標識した70kDaおよび3kDaデキストランをこれらの実験のために用いたが、これはそれらがそれぞれ多くのタンパク質およびsiRNA分子とサイズの点で類似しており、フローサイトメトリーによる検出が容易であり、かつ、それらが負に荷電しているために表面結合の影響が最小限であることが理由である。

【0143】

図30は、細胞型の間にもわたる、本主題の適用可能性を図示している。3000では、3kDaおよび70kDaデキストランを送達するために30 μm -6 μm デバイスによって処理したNuFF細胞の送達効率および生存度が示されている。3010では、脾臓から単離して、3kDaおよび70kDaデキストランを送達するために10 μm -4 μm デバイスによって処理したマウス樹状細胞の送達効率および生存度が示されている。3020では、3kDaおよび70kDaデキストランを送達するために10 μm -6 μm デバイスによって処理したマウス胚性幹細胞の送達効率および生存度が示されている。3030では、マウス全血から遠心分離によって単離して、30 μm -5 μm および30 μm -5 μm x 5デバイスにより1000mm / 秒で処理したB細胞 (CD19⁺)、T細胞 (TCR⁺) およびマクロファージ (CD11b) への3kDaデキストランの送達効率が示されており、3040では70kDaデキストランの送達を示されている。3kDaおよび70kDaデキストランはそれぞれ、パシフィックブルーおよびフルオレセインによって標識した。データポイントはすべて3回ずつの試験によるものであり、エラーバーは2つの標準偏差を表している。

【0144】

さまざまなデバイスデザインを用いて、デキストラン分子をヒト新生児包皮線維芽細胞 (NuFF) (3000)、初代マウス樹状細胞 (3010) および胚性幹細胞 (3020) に送達させた。これらの実験によって生じた細胞生存度の損失はわずか (25%未満) であり (3000、3010および3020)、マウス胚性幹細胞における結果からは本方法が分化を誘導しないことが指し示されている。さらなる試験においては、白血球 (バフィーコート層) をマウス血液から遠心分離によって単離し、それらを本デバイスによって処理した。抗体染色によって識別したB細胞、T細胞およびマクロファージから、3kDaおよび70kDaデキストランの両方の送達の成功が指し示された (3030および3040)。

【0145】

現在の送達上の課題に対処する本主題の能力を例示するために、細胞リプログラミングからカーボンナノチューブに基づくセンシングまでの範囲にもわたる考えられる用途についてのいくつかの実験を実施した。以下に詳述する用途特異的な材料に加えて、本主題により、アポリタンパク質E、ウシ血清アルブミンおよびGFP-プラスミドといった種々の被験ペイロードの送達の成功が実証された。

【0146】

図31は、ナノ材料および抗体送達によるデータを図示している。3100では、10 μm -6 μm x 5デバイスによって処理したHeLa細胞の、パシフィックブルー標識3kDaデキストラン、およびCy5で標識してDNAを巻き付けたカーボンナノチューブを送達する送達効率および生存度が示されている。3110では、処理細胞におけるカーボンナノチューブの送達 (左) をエンドサイトーシス (右) と対比して指し示しているGバンド (赤色) でのラマン散乱を重ね合わせた、明視野細胞画像が示されている。スケールバーは2 μm 。3120では、パシフィックブルー標識3kDaデキストラン (中央パネル) およびAlexa Fluor 488タグを有するチューブリンに対する抗体 (右のパネル) の送達から18時間後のHeLa細胞の蛍光顕微鏡写真が示されている。スケールバーは3 μm 。3130では、Alexa Fluor 488標識抗チューブリン抗体を送達するために10 μm -6 μm x 5デバイスによって500mm / 秒で処理したHeLa細胞の送達効率および生存度が示されている。種々の抗体濃度での送達効率を、100 μg / mlでのエンドサイトーシス対照および非処理細胞と比較している。

【0147】

フローサイトメトリー (3100) およびラマン分光法 (3110) による、カーボンナノチューブ (DNAオリゴヌクレオチドにより封入) の送達成功の立証。チューブリンに対する抗体もこの手法を用いて送達され (3120および3130)、細胞全体を通じて、サイトゾル送達

と一致すると考えられるびまん性分布が生じた。前述の材料は現在のところ、細胞サイトゾルに送達することが困難であり、各材料は往々にして、送達を促進するための特殊な改変を必要とする。実施例3において、4種の材料はすべて、10 μ m-6 μ m \times 5 μ mデバイスで同じ条件セットを用いて、HeLa細胞に送達させた。

【0148】

初代細胞へのタンパク質の効率的な送達により、いくつかの治療用途を可能にすることができる。例えば、細胞リプログラミングにおける課題は、従来のCPPに基づくタンパク質送達法の非効率性である。図32は、タンパク質送達の用途を図示している。3200では、NuFF細胞への細胞浸透性ペプチドによるc-Myc、Klf-4、Oct-4およびSox-2の送達のウエスタンブロット分析が、10 μ m-6 μ mデバイスと比較して示されている。4種のタンパク質はそれぞれ、取り込みを促進するための追加的な9個のアルギニン(9R)基を有する。溶解物(Ly)カラムは洗浄して可溶化させた細胞のタンパク質内容物に対応し、一方、スープ(soup)カラムは培地環境のタンパク質内容物に対応する。3210では、脾臓から単離して、パシフィックブルー標識3kDaデキストランおよびAlexa Fluor 488標識オボアルブミンを送達するために10 μ m-4 μ mデバイスによって処理した樹状細胞の送達効率および生存率が示されている。データポイントはすべて3回ずつの試験によるものであり、エラーバーは2つの標準偏差を表している。

【0149】

4種の例示的な転写因子(Oct4、Sox2、c-MycおよびKlf-4)をヒト線維芽細胞に送達する能力を検討して、CPP法と比較した(3200)。この結果は、多くの材料がエンドソーム内に捕捉されたままとなる恐れのあるエンドサイトーシスに依拠しないことに加えて、4種のタンパク質すべてについて、急速な機械的変形による送達で有意に高い送達効率を得られることを示している。この結果は、本主題がCPPと比較してタンパク質送達の10~100倍の向上をもたらしうることを指し示した前述のシミュレーション作業と整合性がある。

【0150】

樹状細胞(DC)における抗原提示は、本主題に利点があるもう1つの分野である。研究者らは、強力な細胞傷害性T細胞応答を誘導する目的で、DCのMHCクラスI受容体上に抗原を発現させる方法を探究してきた。癌ワクチンの調製において直接的な臨床的意義を有する本主題は、例えば、抗原タンパク質のサイトゾル送達に依拠しているが、これは、MHCクラスI提示がサイトゾル性タンパク質にほぼ独占されているためである。材料のサイトゾルへの直接送達を促進することにより、本主題は、特定の抗原に対するインビボ細胞傷害性T細胞応答を生じさせるためのプラットフォームとして役立つ。この可能性を例示するために、モデル抗原タンパク質であるAlexa 488標識オボアルブミンの、脾臓に由来するマウス樹状細胞に対する送達に成功した(3210)。この細胞型におけるエンドサイトーシスの速度は比較的高いにもかかわらず、本デバイスは、エンドサイトーシス対照に比して(0mm/秒)、送達率の有意な増加を生じさせた。さらに、細胞変形機序のおかげで、送達された材料は細胞質中に存在する。この特徴は抗原送達のために特に重要であるが、これは細胞質圧力がMHCクラスI抗原提示のための決定的な必要条件であるためである。

【0151】

実施例3のシステムは、カーボンナノチューブ、金ナノ粒子および抗体 現行の手法では送達するのが困難な3種の材料 を送達する能力を有する、機能付与性の研究ツールである(図31)。本主題は、生細胞の構造/タンパク質の抗体および量子ドットによる染色を促進すること、ならびにカーボンナノチューブをサイトゾル分子プローブまたは化学センサーとして用いるのを可能にすることによって、細胞内プロセスをプローブ検索する能力を大きく広げる。タンパク質送達の強固な方法として、それをペプチド/タンパク質ライブラリーのハイスループットスクリーニングのために用いることができるが、これは、ほとんどのCPPまたはナノ粒子に基づく手法とは異なり、本方法がタンパク質の構造および化学に対して繊細でなく、エンドサイトーシス経路に依拠せず、かつタンパク質の機能性に影響を及ぼさないためである。

【0152】

さらに、本主題は治療法のためにも有用である（図32）。例えば、患者の標的細胞を血液または他の組織から単離して、所望の治療薬を送達するためにデバイスによって処理した上で、体内に再び導入する。そのようなアプローチは、治療用高分子の送達効率の増加を利用しており、既存の手法よりも安全であるが、これは毒性のある可能性があるベクター粒子の必要性をなくすとともに、網内系クリアランスおよびオフターゲット送達に伴う副作用の可能性も減じるためである。

【0153】

実施例4 個別化された癌ワクチンの接種

高分子の細胞内送達における現在の課題は、疾患機序をより良く解明する上での大きな障害、および新規な治療アプローチの実現である。送達技術の最近の進展にもかかわらず、患者由来細胞の処理は依然として課題であり、現在の方法は往々にして毒性のある電場または外因性材料に依拠している。マイクロ流体プラットフォームならびに関連したシステムおよび方法は、送達を促進するために細胞の機械的変形に依拠している。この制御された物理的アプローチにより、タンパク質に基づく細胞リプログラミングおよび量子ドット送達といった、従来から課題となっている分野における結果が得られている。

【0154】

細胞の挙動に影響を及ぼすのに最も効率的かつ直接的なやり方は、活性物質を細胞質に送達することによる。このため、高分子の細胞内送達は研究および開発（R&D）において決定的な役割を果たし、薬物探索から生化学的プロセスの研究、さらに治療用途までの範囲にわたる用途を有する。しかし、現行の方法には限界がある。それらは往々にして患者由来（初代）細胞における有効性が低く、毒性のある電場または外因性材料に依拠しており、タンパク質などのように構造的に多様な材料の送達には不向きである。

【0155】

これらの問題に対処しうる強固な送達プラットフォームは、生物学研究における大きな進展を可能にし、個別化癌ワクチン接種などの新世代治療薬の基盤としても役立つ。免疫細胞に対するタンパク質送達法は、例えば、癌ワクチン接種プラットフォームとして役立つ。

【0156】

上記のように、本明細書に記載のマイクロ流体デバイス、関連したシステムおよび方法は、細胞が狭窄を通る際に細胞を急速に変形させることによって、材料の細胞内送達を促進する。この変形過程は細胞膜の一過性攪乱を引き起こし、それによって、周囲の緩衝液から細胞サイトゾル中への材料の受動拡散を可能にする。現在の方法が依拠している外因性材料および電場の必要性をなくすことにより、このアプローチは、毒性の低下した、送達のための単純化された強固なアプローチをもたらす。それ故に、この方法は、癌ワクチン接種といったある種の研究用途および臨床的用途における利点を備えた、高分子の細胞内送達のための幅広いプラットフォームとして役立つ。

【0157】

図34は、患者の血液を、高分子の送達のためにマイクロ流体デバイスによって処理するシステムを描写している説明図である。本主題の1つの態様は、患者の血液から単離した樹状細胞（DC）をエクスピボで本デバイスによって処理し、それらを特定の癌抗原に対して活性化した上で、続いて患者の血流に再び導入するシステムを含む。例えば、送達される抗原は、特定の疾患に伴うことが知られた一般的に発現されるタンパク質、または生検によって得られた患者特異的なものである。癌抗原をDC細胞質に直接的に送達することによって、MHC-I抗原提示経路を利用して、患者における強力な細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答を誘導することができる。続いて、これらの活性化T細胞は、標的抗原を発現する癌性細胞を見つけて破壊する。確立された疾患特異的抗原、または患者の腫瘍に直接由来するものを用いる上での本プラットフォームの柔軟性により、それが他の治療法に対して抵抗性である患者を治療することが可能になる。実際に、これは個別化され標的化された疾患反応をもたらす、副作用はわずかである。この態様は、熟練した技師により、典型的な病院検査室において履行されうる（1回の処理当たり1時間未満）。それが小型で比較的

10

20

30

40

50

簡単であることから、患者が動作させる治療システムも用いる。

【0158】

癌ワクチン法はマウスモデルにおいて実証されている。本システムは、MHCクラスI受容体上の抗原、SIINFEKLペプチドの提示増大によって指し示されるように、マウス樹状細胞へのモデル抗原、オボアルブミンの送達および処理の成功のために用いられる。これらの処理された樹状細胞は、インビボで増殖性細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答を促進する。処理されたDCを動物に再び導入して、インビボCTL応答を生じさせる。本デバイスは、ヒト血液から単離したDCに抗原を送達するために有用である。

【0159】

本データは、本デバイスが、過度の細胞死を引き起こすことなしに、繊細な初代細胞（DCを含む）に材料を送達しうることを指し示している。このため、細胞損傷は重大な問題ではない。免疫応答は、処理細胞の数を増やすこと、送達される抗原の数量および多様性を増大させること、および/またはリポ多糖などの活性化因子を同時送達することによって向上させることができる。本デバイスによって処理された細胞では毒性がほとんどまたは全く観察されておらず、このため、本方法は実行可能であるだけでなく、ヒトでの用途および獣医学的用途のための治療薬にとっても有利である。

【0160】

実施例5 血液悪性腫瘍の治療

実施例4で記載したように、細胞の急速な機械的変形は、抗原を樹状細胞（DC）に送達する強固な手段をもたらし、それ故に細胞治療のためのプラットフォームとなりうる。このシステムは、細胞の急速な機械的変形が、周囲の媒質からの材料の拡散性送達を可能にする一過性膜孔の形成を引き起こしうるという発見に基づく。以前に考察された既存の治療法とは異なり、この方法は、特別仕様の融合タンパク質、抗原交差提示、ウイルスベクター、ナノ粒子またはエンドサイトーシス機構に依拠しない；このため、これはインビボでの有効性の大きな向上をもたすとともに治療コストも軽減する。この根本的に異なるアプローチの柔軟性および簡単さにより、種々の癌抗原に対するCD8応答を誘導しうる、樹状細胞活性化のための幅広いプラットフォームが可能になる。本システムは、免疫療法との親和性がより高いB細胞リンパ腫などの血液悪性腫瘍、ならびにいくつかの別の種類の癌（例えば、黒色腫、膵癌など）を標的とすることができ、疾患に立ち向かうための、極めて重要な、個別化された新規アプローチを提供する。

【0161】

癌に対する細胞療法は、それが患者の免疫系を活性化して、疾患に対する持続性の抗原特異的CD8 T細胞応答を推進させることから、興味をそそる選択肢である。前立腺癌に対して最近認可されたプロベンジ（Provenge）（登録商標）などのこれらの治療法は、化学療法および放射線治療に比して副作用がわずかである。しかし、細胞療法を開発する上での最大の障害の1つは、抗原を細胞質中に送達することによって適正な抗原提示を達成することである。従来より、CD8エフェクター応答の活性化は、外来性タンパク質が抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）内に入る場所によって、CD4応答とは区別される。細胞質中に認められるタンパク質はCD8応答を誘導し、一方、エンドサイトーシスによって捕捉された細胞外タンパク質はCD4応答を誘導する。抗原提示細胞内での交差提示の機序は依然として明確になっていないことから、強力な細胞傷害性エフェクターCD8応答を利用する治療法を進展させるために、所望の抗原を細胞質に直接的に送達する信頼性の高い方法を開発しなければならない。樹状細胞への細胞質送達の強固かつ有効な方法の1つは、さまざまな種類の癌に対する免疫応答を誘導するためのプラットフォームとして用いられる。

【0162】

図8Aおよび図11に図示されたHeLa細胞に対する実験により、細胞の急速な機械的変形が細胞膜における一過性損傷/孔の形成をもたらし、そのことが周囲の緩衝液からの材料の細胞質中への受動拡散を可能にすることが指し示された。これまで報告されていなかったこの現象は、処理後に生存性がある正常に増殖する細胞を生じさせる。実験により、より大型の分子はより小型のものよりも低い送達率を示すことが指し示されており、このこ

10

20

30

40

50

とは拡散性機序を指し示している。共焦点顕微鏡検査によって測定されたsiRNA送達およびびまん性サイトゾル染色の成功も、送達された材料がサイトゾル中にあり、活性/到達可能な状態にあることを指し示している。従来より、抗原送達の方法は往々にして、細胞株では有望と思われたものの、初代免疫細胞への置き換えは成功していない。しかし、本明細書に記載の送達方法は、細胞型を通じて大きく異なる恐れのあるエンドサイトーシス経路にも外因性材料に対する細胞応答にも依存しておらず、主として膜二重層特性に依拠している。したがって、その簡単さおよび新規経路を理由として、この技術は細胞株から初代免疫細胞での送達に移行させうる親和性がより高く、それ故に抗原提示の大きな向上をもたらす。

【0163】

抗原のMHCクラスI提示および樹状細胞成熟は、オボアルブミンタンパク質の送達に応答した抗体染色によって分析することができる。また、OT-IおよびOT-II TCRトランスジェニックマウスから採取したT細胞を用いて、オボアルブミンおよび/またはSIINFEKL抗原ローディングに反応したCD8およびCD4増殖を測定することもできる。本システムは、エンドサイトーシスのみによって刺激された樹状細胞と比較してCD8増殖が増加するように最適化することができる。

【0164】

初代マウス樹状細胞を、B6マウスの脾臓からMACS CD11c+分離 (Miltenyi Biotec, Germany) によって精製する。13umのHeLa細胞の膜に穿孔させることができる6μmチャンネル幅の狭窄を有するデバイスを用いる。これらの樹状細胞のサイズはより小型であるため、チャンネル幅3~5μmのデバイスの微細加工および検査を利用しうる。フォトリソグラフィおよびディープ反応性イオンエッチングのための既存のプロトコールを、これらのデバイスの効率的製造が可能になるように改変することができる。蛍光標識デキストラン分子を、FACSによって送達効率を評価するためのモデル分子として用いることができる。その後、オボアルブミンタンパク質を細胞に送達させて、初代細胞におけるタンパク質取り込みを確かめるためにウエスタンブロットによってアッセイすることができる。

【0165】

樹状細胞成熟は、急速変形法が細胞成熟を誘導することを示すためのCD80およびCD86抗体染色によって検査しうる。送達後のDC成熟を手作業で誘導することが必要と考えられる場合には、リポ多糖 (LPS) などの細胞外TLRアゴニストの使用を考慮しうる。オボアルブミンタンパク質を樹状細胞に送達させて、抗原提示をMHC-I SIINFEKL抗体によって定量することができる。さらに、本システムが抗原タンパク質を送達/提示させる能力をペプチドとの比較で示すために、TCR特異的ペプチドの送達に反応した抗原提示の効率を評価することもできる。その後、CD8およびCD4 T細胞をそれぞれTCRトランスジェニックOT-IおよびOT-IIマウスから採取し、CFSEによって染色した上で、オボアルブミンで処理した樹状細胞とともに5日間共培養する。両方のサブセットのT細胞増殖をFACSによって測定しうる。デバイスデザインは、従来のインピトロ方法 (例えば、エンドサイトーシス) と比較して、機能的CD8 T細胞集団が増大したレベルで生じるように最適化することができる。

【0166】

抗原特異的CD8応答を誘導する多目的能力は癌細胞治療の目標となっているが、これまでのところは送達法による抗原提示の非効率性または柔軟性の不十分さが理由で達成困難であることが判明している。既存の方法には、抗原送達を促進するための、損傷を与える電場へのそれらの依拠、外因性材料の使用、タンパク質配列の改変および/またはエンドサイトーシス経路を含む、いくつかの短所がある。しかし、本主題は、前述の問題のいずれをも被らない、サイトゾル送達のための根本的に異なるアプローチを提供する。さらに、その穿孔-拡散機序の性質により、この方法は抗原の種類を通じて幅広く適用可能であり、それ故にさまざまな範囲の標的癌に対して対処しうると考えられる。同じ機序を、より強力なT細胞応答を生じさせる目的でDC成熟/活性化を向上させるために、さらなるシグナル伝達分子を導入するために用いることさえも可能である。そのような広域的なプラ

10

20

30

40

50

ットフォームは、癌ワクチンに関して開発中の既存のいかなる抗原送達 / 提示機序よりも多目的であり、かつ強固である。

【 0 1 6 7 】

実施例5には、広範囲にわたる影響力がある。この国全体での癌による莫大な社会的負担を考慮すれば（2011年の米国での死亡は推定570,000件）；癌には人口のかなりの割合が罹患している可能性が高い。罹患集団は、疾患に立ち向かう患者の免疫系の力を利用する新規細胞治療の開発による恩恵を受ける。本主題は、例えば、白血病、リンパ腫および多発性骨髄腫、ならびに骨髄増殖性新生物および骨髄異形成症候群といった血液悪性腫瘍などのさまざまな種類の癌に対する、より効率的で個別化された治療プラットフォームを提供する。本方法はまた、転移性癌の治療のためにも特に有用であり、これは例えば、それらに血液循環を介して播種する性向があることが理由である。例えば、抗原エピトープが未知である癌を、腫瘍生検試料を消化し、溶解物を患者のDCに送達させた上で、DCを体内に再び導入することによって治療しうると考えられる。これにより、広範囲にわたる癌抗原に対して宿主のT細胞を活性化させ、それにより、有効な多標的治療を実現することが可能になると考えられる。この個別化された局面は、不利な環境に供されるために現行の治療が往々にして役に立たない、稀な型の癌を発症する可能性のある人々に対しては、特に関心対象になると考えられる。その個体の疾患に対する治療を個別に調整することにより、この方法は、多剤耐性癌といった最も悪性度の高い症例においてさえも、時宜を得た有効な医療を提供することができる。CD8 T細胞は転移性細胞の位置を容易に特定してそれを破壊することができ、同時にこれらの治療を通じてもたらされる免疫記憶は将来の再発を防止しうると考えられるため、この免疫ベースの治療法はまた、転移（癌関連死のほぼ90%の原因である）の予防にも特に有効である。加えて、この方法は、研究ツールとしても、抗原交差提示の過程をより解明するための抗原処理に関する前例のない機序研究を可能にし、それにより、既存の / 代替的な免疫活性化方法の有効性を向上させることができる。

【 0 1 6 8 】

実施例6 細胞リプログラミング

幹細胞は、再生医学に関する現在の研究において決定的な役割を果たしており、急速に発展している組織工学の分野では特にそうである。iPSCは、それらに自己再生の能力があり、任意の細胞型に分化しうることが実証されており、かつ自己性（患者特異的）特性を有することから、特に関心の的となっている。このため、iPSCは、特異ではあるもののまだ相互作用性はある組織区画に組み入れることのできる多系列始原細胞を、共通の多能性供給源から導き出す機会をもたらす。さらに、これらの細胞は、最終的には臨床的用途におけるヒト胚性幹細胞（hESC）の必要性をなくすことができ、それにより、これらの細胞型で問題になっている人道的および倫理的な論争の多くを回避することができる。その上、患者由来iPSCは、hESC由来細胞の免疫拒絶の問題を回避するか、または最小限に抑えることができる。このため、現在の研究は主として、多数のiPSCを生じさせるための、効率的でウイルスを用いないプロトコルを考案することに重点が置かれている。

【 0 1 6 9 】

iPSCは当初、4つの転写因子、Oct 3 / 4、Sox2、c-MycおよびKlf4のレトロウイルス性過剰発現に基づき、成体マウスおよびヒトの線維芽細胞（HF）を多能性状態にリプログラミングすることによって作製された。これらのiPSCは、全体的な遺伝子発現、DNAメチル化およびヒストン修飾の点でES細胞とほとんど同一であるのみならず、3種の胚葉のすべてに相当する細胞型に分化することができる。iPSC技術には、生物医学研究および細胞ベースの治療法にとって極めて大きな可能性があるものの、その十分な能力を実現するためには大きな障害を克服しなければならない。例えば、ほとんどのiPSC株は、リプログラミング因子をコードする遺伝子のレトロウイルス性またはレンチウイルス性導入を行って、ウイルスベクター組み込みによる複数の染色体破損を起こさせることによって、さまざまな体細胞から導き出されているが、これらはいずれも遺伝子機能不全および / または腫瘍を

引き起こす恐れがある。加えて、リプログラミング導入遺伝子（特に、c-MycおよびKlf4）は発癌と密接な関係があり、このため、その残留発現および/または再活性化によって腫瘍形成が引き起こされる可能性もある。このため、多くの研究所では最近、アデノウイルス、エピソードベクター、mRNAおよびマイクロRNAといった異なるゲノム非組み込みアプローチを探究している。注目されることとして、細胞浸透性ペプチド（CPP）と融合させた4種のリプログラミング因子（Oct 3/4、Sox2、c-MycおよびKlf4）の直接送達によってiPSCを作製しうることが示されている。マウスiPSCの作製が、大腸菌（E. coli）で発現させた4種のCPP融合因子の送達によって起こりうることが報告されていることから、哺乳動物細胞で発現させた4種のCPP融合因子によってヒトiPSCを作製しうること示される可能性がある。しかし、どちらの研究も、タンパク質に基づくリプログラミングによるリプログラミング効率が極めて低い（0.01%未満）ことを報告している。タンパク質に基づくリプログラミングは、いかなる種類の遺伝物質（DNAまたはRNA）もベクター媒体（ウイルスまたはプラスミド）も伴わないため、タンパク質の直接的な送達により、最も安全なリプログラミング手順の1つがもたらされる。タンパク質に基づくヒトiPSCは、ウイルスゲノム組み込みに伴う異常特性を伴うことなく、機能的ドーパミンニューロンを効率的に生じたことが示されている。タンパク質に基づくリプログラミングの効率は、送達プラットフォーム技術を用いて本主題によって向上させうるため、これは、臨床的に生存可能なiPS細胞を作製する可能性を広く切り開くものである。さらに、このアプローチは、mRNA性、プラスミド性およびウイルス性リプログラミングにおける翻訳および/または転写を司る確率過程を回避することにより、より微細なレベルでの細胞機能の制御も可能にする。このように、直接的なタンパク質送達は、突然変異挿入のリスクを未然に防ぎ、非常に繊細なリプログラミング過程のより正確な制御を可能にすることによって、代替的な方法を上回る2つの根本的な利点をもたらす。本明細書に記載の送達技術は、HFおよび幹細胞に対して高い効率でタンパク質を送達しうることが実証されている。この手法の送達能力を既存の細胞浸透性ペプチド方法と比較する実験により、このアプローチを用いた場合の送達の有意な増加（シミュレーションによれば可能性としては100倍）が示されている。さらに、その物理的穿孔機序により、代替的なタンパク質送達法に伴う化学的修飾または外因性化合物の使用の必要性もない。また、本方法は送達される材料の種類に対して寛容であるため、リプログラミングの際に小分子、siRNAおよび他の因子を同時送達することもできる。このシステムはこのため、直接的なタンパク質送達を通じて細胞リプログラミングを誘導するための比類のないツールとなる。また、この単純な作用機序（すなわち、孔を通しての拡散）は、送達数量を正確に予測して、高精度に制御することも可能にし、これにより、リプログラミング動態の理解を向上させるための最適化試験が容易になり、それによって効率を大きく高めることができる。さらに、このマイクロ流体手法を、臨床組織工学および細胞治療の用途に向けてiPSCを作製するための医用デバイスとして採用することもできる。

【0170】

さらに、このシステムの用途はタンパク質送達には限定されない。この手法は、さまざまな範囲にわたる高分子（DNA、RNA、タンパク質、糖およびペプチド）をほぼ任意の細胞型へと送達しうる汎用的送達法に含めることができる。これにより、現行の技術によっては十分な恩恵が得られない多数の用途が可能になる。例えば、リポソーム、ナノ粒子およびエレクトロポレーションに基づく現在の方法は、多くの場合、ある種の初代細胞（免疫細胞または幹細胞など）をトランスフェクトすることに苦労しており、タンパク質およびナノ粒子（量子ドットなど）の送達には無効なことがある。治療薬スクリーニングおよび疾患機序の用途に向けたペプチド送達もこの新規方法によって対処しうるが、一方、現行の手法は多くの場合、化学的修飾またはカプセル封入を必要とする。また、この方法を、オルガネラ標識および疾患機序研究の目的で修飾された量子ドットを送達するための、ナノ粒子に基づくセンシング用途に向けて用いることもできる。

【0171】

細胞内送達は、遺伝子発現の基礎的研究から、疾患機序、さらには本出願で扱っている

10

20

30

40

50

ようなiPSCの作製までの範囲にわたる多くの生物学的研究用途の基礎となるものである。例えばリポソーム、ポリマー性ナノ粒子およびエレクトロポレーションといった確立された送達法は、多くの場合、送達媒体としての外因性化合物（またはエレクトロポレーションの場合には電場）の使用を伴い、材料および/または細胞に特異的である。例えば、リポフェクタミン（Invitrogen）は、DNA分子およびRNA分子を（細胞株または初代細胞のサブセット）に送達することはできるが、タンパク質または他の高分子を送達するための適正な複合体を形成することはできない。一方、エレクトロポレーションは、種々の細胞型を標的とする能力の点では有望であるものの、高電場が原因で細胞に障害を引き起こし、タンパク質送達における成果は限定的である。このことから、例えば、iPSC作製に必要とされる複数のトランスフェクションには特に不適である。膜浸透性ペプチドは、主として

10

タンパク質に特異的な、もう1つの送達手法である。しかし、これらのペプチドに基づく方法は、タンパク質機能に予測できない影響を及ぼす上、エンドソーム内での高度のタンパク質分解にも供される。このため、さまざまな範囲にわたる高分子（DNA、RNA、タンパク質、ペプチド、小分子）を送達することができ、細胞死もわずかである汎用的方法を記載している本主題は、単一の技術プラットフォームで細胞機能に対する前例のない制御を可能にし、それにより、疾患機序の研究、高分子治療薬候補の同定、幹細胞の誘導分化またはリプログラミング、およびレポーター細胞株を用いる診断手法の開発を可能にする。

【0172】

本明細書に記載のマイクロ流体デバイスは、広域的な汎用的送達プラットフォームとして役立てることができる。マイクロ流体デバイスとしては、それは処理条件の単一細胞レベルでの正確な制御という恩恵を享受している。単一細胞レベルでの制御と大規模スループットとの比類のない組み合わせからみて、このデバイスは、既存の送達法に比して比類のない位置にある。これまでのデータから、本システムが、癌細胞株、胚性幹細胞、初代線維芽細胞および初代リンパ球を含む、11種を上回る細胞型に材料を送達しうることが実証されている。その機械的穿孔機序により、カーボンナノチューブおよび量子ドットといった、これまでは困難であった材料の送達も可能になった。

20

【0173】

iPSCを作製するために組換えタンパク質を用いた以前の研究では、極端に低い効率（0.01%未満）が実証されており、そのため、広範にわたる臨床的用途には不適である。しかし、本明細書で言及したデバイス、システムおよび方法からは、それらがタンパク質を細胞質中に高い効率で直接的に送達することができ、細胞死もわずかであることが実証されており、このため、より有効な送達を通じてリプログラミング効率の大幅な利得を得るといふ説得力のある機会をもたらす。利用可能なタンパク質の数量を直接的に決定することにより、細胞内動態の正確な制御を遂行することができる。一方、他のリプログラミング方法（例えば、ウイルス、プラスミドおよびmRNA発現）は、タンパク質の利用能を決定するのに確率作用に依拠しており、このため、動態試験には不適である。現在のリプログラミング方法の低い効率は、この過程が確率的変動に対して非常に敏感であって、狭い範囲の転写因子発現レベルでのみリプログラミングが起こることを指し示している。タンパク質を細胞質に直接的に送達することにより、タンパク質の利用能に対して前例のない制御を遂行することが可能になり、それにより、リプログラミングのために必要な厳密な条件をより堅実に課すことができる。これらの条件は、ひとたび同定されて最適化されれば、処理を受けるあらゆる細胞に対して正確に再現することができ、それにより、リプログラミング効率を劇的に向上させることができる。

30

40

【0174】

この手法は、種々の細胞内送達の用途を可能にする/向上させる。加えて、本手法の厳密に機械的な性質により、化学物質または電場の使用に起因する複雑な問題の可能性もなくなる。データでは、処理の結果としての細胞挙動のいかなる実質的な変化も認められていない。したがって、このシステムは、リプログラミング用途に特に有用性のある、強固で、ハイスループットで、高効率で、汎用的な細胞内送達機構である。

【0175】

細胞が狭窄を通る際に起こる急速な変形が細胞膜における一過性孔の形成を誘導して、周囲の緩衝液からサイトゾル中への高分子の拡散が可能になることが、証拠によって指し示されている。この手法は、癌細胞株、初代線維芽細胞、初代リンパ球および胚性幹細胞を含む11種の異なる細胞型において実証された（分化を引き起こすことなしに）。1つのプロトタイプは、細胞ほぼ20,000個/秒を処理することができ、さまざまな範囲にわたる細胞濃度（104~108個/ml）で動作しうる。目詰まりに関する問題も、各デバイスが、洗浄および再利用という選択肢を加えて、目詰まりを起こすまでにほぼ100万個の細胞を処理しうるように実験プロトコールおよびチップデザインを改良することによって、大きく軽減された。加えて、多チャンネルデザインにより、1本のチャンネルの目詰まりが他のものの成績に影響しないような高度の冗長性がもたらされる。圧力駆動による流れ（制御された一定圧力で）およびチャンネルの並列のデザインにより、チップ内の目詰まりしたチャンネルのパーセンテージにかかわらず、チャンネル1本当たりで一定した流動プロフィールが確実に得られる。

【0176】

本デバイスが、デキストラン分子をヒト線維芽細胞および胚性幹細胞に送達しうることが実証された。図35は、細胞リプログラミングの潜在的な利点を図示している。3500では、3kDaデキストランを送達するために10 μ m-6 μ mデバイスによって処理したヒト胚性幹細胞の送達効率および生存度が示されている。3510では、NuFF細胞への細胞浸透性ペプチドによるc-Myc、Klf-4、Oct-4およびSox-2の送達のウエスタンブロット分析が、10 μ m-6 μ mデバイスと比較して示されている。溶解物（Ly）カラムは洗浄して可溶化させた細胞のタンパク質内容物に対応し、一方、スープ（soup）カラムは培地環境のタンパク質内容物に対応する。3520では、リプログラミング因子の送達後に固定したNuFF細胞の共焦点顕微鏡画像がある。タンパク質はAlexa 488結合抗FLAG抗体を用いてタグ標識されており、核はDAPIによって染色されている。

【0177】

さらに、デバイスの送達効率を、タンパク質に基づくリプログラミングのために現在用いられている9アルギニン（CPP）法のものと比較した。その結果（3510）、ウエスタンブロットによる測定で、送達されたc-Myc、Klf4、Oct4およびSox2の数量の有意な増加が実証された。続いて、共焦点顕微鏡検査により、これらの転写因子の細胞核への局在化成功が確認された（3520）。細胞質の内側および外側での粒子拡散率に関する文献値に基づき、拡散性機序をシミュレートするための単純な2-D拡散モデルをCOMSOLにおいて開発した。このモデルを実験データに適合させることにより、この手法は緩衝液中に存在する送達用材料の10~40%を細胞サイトゾル中に送達したことが推定できた。これに比して、タンパク質送達のためのCPP法は、緩衝液材料の0.1%しかサイトゾルに送達しないと推定される。このように、このアプローチは、送達されるリプログラミング材料の数量の強固な増加をもたらす（10~100倍）。さらに、これにより、送達された転写因子の、より高い生物学的利用能が確実に得られる。

【0178】

図36は、融合リプログラミングタンパク質の直接送達によるマウスおよびヒトiPSC株の作製および特性決定を描写している。3600では、出発時のマウス肝細胞培養物（第1の画像）；6サイクルのタンパク質処理後の形態（第2の画像）；樹立されたiPSコロニー（第3の画像）；および樹立されたiPSコロニーのAP染色（第4の画像）がある。3610では、p-miPSCにおけるESCマーカー（Nanog、Oct4およびSSEA1）の免疫染色がある。核はDAPIで染色した（青色）。3620では、Oct4プロモーターの亜硫酸水素による配列解析により、p-miPSC-1株およびp-miPSC-2株におけるほぼ完全なエピジェネティック性リプログラミングが明らかになっている。白抜き円印および黒塗り円印はそれぞれ、非メチル化CpGおよびメチル化CpGを指し示している。3630では、p-miPSCを免疫不全マウスに注入することにより、および奇形腫のH&E染色により、インビボ分化能力を分析した。その結果得られた奇形腫は、3つの胚葉のすべてに相当する組織を含んでいた；外胚葉（神経管または表皮）、中胚葉（軟骨または筋肉）および内胚葉（呼吸上皮または腸管様上皮）系列細胞。3640では

、E13.5胎仔のp-miPSC-1（左のパネル）およびp-miPSC-2（右のパネル）に由来するキメラが、注入されたp-miPSC由来の高レベルのGFPを示している。3650～3670では、ヒトiPSC株、p-hiPSC-01（3660）およびp-hiPSC-02（3670）を、生検採取したヒト成人線維芽細胞由来の4種のCPP融合リプログラミング因子の直接送達によって作製している（3650）。

【0179】

図37は、予備的タンパク質リプログラミングの結果を描写している。3700では、線維芽細胞からコロニーへの形態的变化の進行である。白い矢印は、リプログラミングされたと考えられる細胞を指し示している。赤い矢印は、コロニーを形成しつつある癒合性iPSCを指している。3710～3760にあるのは、iPSCコロニーにおけるヒト胚性幹細胞マーカー-Oct4、SSEA-4、Tra-60、Tra-80、アルカリホスファターゼ（AP）の発現である。該当する場合、小さなボックスはDAPI対比染色を表している。スケールバーは100 μm。

10

【0180】

タンパク質に基づくヒトiPSCを作製して特性決定を行ったことを受けて、CPP融合リプログラミング因子の以前の送達法により、エピジェネティック分析、インビボ多能性およびキメラ形成を含むすべての基準による検討の上で、さらに完全にリプログラミングされたマウスおよびヒトiPSCを作製した（図36）。しかし、部分精製タンパク質を用いたにもかかわらず、リプログラミング効率は依然として低く（0.1%未満）、ウイルスリプログラミング法よりも長い時間がかかった。このため、本デバイスを用いて、4種のリプログラミングタンパク質、Oct4、Sox2、Klf4およびc-Mycを、緩衝液濃度80 μg/mlでヒト線維芽細胞に送達することを試みた。各送達の間48時間の間隔をおいて細胞を4回処理した。培養下で14～20日後に、リプログラミングされた最初のhiPSC様コロニーが出現した。この時間中に、それらがiPSCコロニーを形成するのに伴って線維芽細胞形態への移行が観察され、それらはいくつかのhESCマーカーを発現した（図37）。

20

【0181】

クラスリン、カベオラおよびマクロピノサイトーシスは、エンドサイトーシス性内部移行に関して最も一般的に提唱されている3つの機序である。急速な細胞変形後の高分子送達にエンドサイトーシスが関与しているか否かを検討するために、これらの機序を阻止する公知の化学物質を用いることが可能である。具体的には、クロルプロマジンを用いて、クラスリン媒介性エンドサイトーシスを阻害することができる；ゲニステン（genisten）を用いて、カベオラ媒介性エンドサイトーシスを阻害することができる；および、5-(N-エチル-N-イソプロピル)アミロライド（EIPA）を用いてマクロピノサイトーシスを阻害することができる（いずれもSigma Aldrichから購入しうる）。HeLa細胞を、処理の前に、クロルプロマジン（10 μg/ml）、ゲニステン（200 μM）およびEIPA（25 μM）とともに2時間インキュベートする。続いて、デキストラン、dsREDおよびdsRED-9Rタンパク質を、処理細胞の急速な変形によって送達させる。FACSによって測定した各々の送達効率により、CPPおよびデバイスに基づく送達機構の両方に対するエンドサイトーシス阻害の影響を例示することができる。また、共焦点顕微鏡検査を用いたエンドソームマーカー（Invitrogen）との共存実験も、エンドソーム内に隔離される材料のパーセンテージを決定する一助となりうる。

30

【0182】

エンドサイトーシス機序を緩和するために、急速細胞変形システムを、エレクトロポレーションといった他の確立された送達方法と連結させることが可能である。狭窄の付近に電極を組み入れることにより、いずれかの個別の方法に比して強化されたシステム成績が得られる送達効果が可能となるように、変形とエレクトロポレーションを連結させることができる。加えて、クロロキン（Sigma）、さまざまなポリマーまたはエンドソーム回避ペプチドといった化学物質との同時送達を用いることで、急速細胞変形システムにおいて送達された材料のエンドソーム回避を補助することができる。

40

【0183】

細胞が狭窄を通る際に、それは短時間（ほぼ10～100us）であるが急速な剪断および圧縮を受ける。接線剪断は孔形成を誘導することが以前に示されている。しかし、本システ

50

ムは機械的圧縮も誘導する。これらのパラメーターを評価するために、アクチン細胞骨格を脱分極させる目的で、送達の前に、HeLa細胞およびHF細胞を0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のラトランクリンA (Lantrunculin A) (Invitrogen) とともに1時間インキュベートすることができる。続いて、急速変形デバイスを用いて、蛍光標識デキストラン (Invitrogen) を、処理した細胞集団に送達させる。これらの実験を、微小管ネットワークを脱分極させる目的で、送達の前に、10 μM コルヒチン (Sigma) とともに2時間インキュベートした細胞で繰り返すこともできる。FACS分析を用いて、毒素処理細胞の送達効率を非処理対照と対比して測定することができる。孔形成は、所与の幾何形状に応じた細胞の変形速度と相関すると考えられている。変形に抗する細胞骨格の役割は、変形速度の定量的測定値を得るために細胞変形能を探索するデバイスを用いて以前に調べられている。この方法では、狭窄の両側に電極を配置して、細胞が通る際の2つの電極間のキャパシタンスの変化を測定する。続いて、狭窄の両端間のキャパシタンスの変化を、細胞移動時間、すなわちその変形速度と相関づける。上述した実験における本デバイスの送達成績をこれらの事前の変形試験と相関づけて、変形速度と穿孔効率との定量的関係を得ることができる。

【0184】

ソノレーションの特性決定を行った発表済みの諸研究と同様に、処理後の所定の時間間隔の時点で固定した試料に対して、走査型電子顕微鏡検査 (SEM) および透過型電子顕微鏡検査 (TEM) の手法を用いて、企図した孔のサイズおよび分布を経時的に直接測定することができる。細胞固定は、25%グルタルアルデヒド溶液 (Sigma) を用いて室温で行うことができる。続いて、細胞試料を連続的なエタノール洗浄によって脱水させて、その後画像化を行う。環境SEM (ESEM) 手法を用いて、固定した試料を直接的に画像化することができる。しかし、その分解能が比較的低いため (ほぼ200nm)、この手法が適するのは1~0.5 μm の規模の形態的变化または損傷の検出用である。ESEMで形態的变化を検出できない場合には、SEMを用いてより微細な孔構造を直接観察するために必要なナノメートルの規模まで分解能を高めるために、真空蒸発器を用いて細胞を1~10nmの金属でコーティングしてもよい。SEMで所望の結果が得られない場合には、TEMを代替的な画像化手法として用いることもできる。これらの手法により、局所的傷害と均一な穿孔による送達機序とを識別すること、ならびに平均孔径および分布を測定することができる。急速な細胞変形を受けた細胞における孔径および分布を、非処理細胞と比較することができる。膜表面上の局所的な孔分布によって傷害モデルが指し示され、一方、より均一な分布によって均一穿孔モデルが裏づけられる。

【0185】

COMSOLマルチフィジックスソフトウェアを用いて、孔の開いた細胞の3Dモデルを構築することができる。細胞質および緩衝液での拡散率に関する発表済みのデータを用い、機序研究による適切な孔モデルと組み合わせることで、送達の予測モデルを作成することが可能である。このモデルは、低拡散率の細胞質を高拡散率の緩衝液領域と隔てる多孔性膜をエミュレートする。モデルの仮定を用いると、孔は一定サイズを一定時間にわたって有し、その後は瞬時に再封鎖する。MatLabまたは他のソフトウェアとの連動により、複雑なモデルに形状および直径の変化といった孔の動的挙動を組み入れることができる。シミュレートされた送達数量の予測値を、FACSおよびゲル電気泳動 (例えば、ウエスタンブロット) に基づく実験データを用いて検証する。これらの比較を用いてモデルを微調整することができ、それにより、送達された材料の数量を予測することができる。このモデルの予測能力は、孔径、開孔時間および緩衝液濃度を変化させることによる影響をシミュレートすることができる、それ故に今後の研究の手引きとして用いることができる。

【0186】

また、マルチフィジックスシミュレーション (例えば、COMSOLまたはCFD-ACE) を用いて、デバイス全体を通じた流体流をモデル化することもできる。これらのモデルを用いて、注入口、流出口および狭窄領域における流速および剪断ストレスをより正確に予測することができる。このデータは、剪断ストレスおよび流速と送達効率との結びつきを、狭窄デザインを通じて解明するために用いることができる。さらに、デバイスの広範なモデル

10

20

30

40

50

を構築することにより、異なるチャンネル間の圧力低下の均一性を検討して、細胞集団全体での処理の均一性を向上させる目的ですべてのチャンネルが確実にほぼ同一な条件下で動作するように注入口および流出口のデザインを調整することができる。

【0187】

送達現象は、主として送達効率および細胞生存度が高まるように最適化することができる。集団均一性（すなわち、各ウェルに同程度の量の材料が送達されること）を、二次的な最適化パラメーターとして用いることができる。初期結果により、細胞速度、狭窄の長さ、狭窄の幅および入口領域の形状が、敏感なパラメーターとして同定された。一方、培地組成は重要な因子ではないように思われる。狭窄の長さおよび幅をそれぞれ5~50 μmおよび4~8 μmの範囲で系統的に変化させた、一連のデバイスを構築することが可能である。主チャンネルが狭小化して狭窄を形成する際のテーパ角を異ならせることも可能である。FACSによって測定した、これらのデバイスによる実験的な効率および生存度データを、前述のモデル化データと関連づけて、剪断ストレスおよび狭窄寸法の影響をさらに十分に解明することができる。この過程を、処理に対して異なるように反応する可能性のある種々の細胞株に対して繰り返す。このデータを用いて、特定の（または特定サブセットの）細胞型に対して最適化された幾何形状および動作パラメーターを有するデバイスを開発することができる。

【0188】

図38は、代替的なデバイス構造を図示している顕微鏡写真を描写している。狭窄と電極とを組み合わせた予備的検討の明視野顕微鏡写真（スケールバー30 μm）。図38に図示されているように、急速変形現象とエレクトロポレーションを連結させることによってデバイスを改変することができる。チャンネル内に局所的な電場を導入するために、フォトリソグラフィ・パターニングおよびAu沈着によって狭窄の両側に金電極を組み込むことができる。その後の実験により、現在の方法よりも向上した成績を示す動作パラメーター値（電場強度、周波数および動作速度）を同定することができる。2つの独立した穿孔機序を連結させることにより、システムに対するより微細な制御を遂行することができ、各細胞型に対するシステム成績を最適化するために複数のパラメーターを操作することができる。さらに、電場を、拡散率の低さが問題となる、DNAなどの比較的大きな荷電分子を送達するための駆動力として用いることができる。

【0189】

協力者となる可能性のある者による使用に適した、簡潔化された使い捨て型のシステムも可能である。PMMAおよびポリカーボネート射出成形または熱エンボス加工を用いて、ポリマーに基づく型のデバイスを実現することができる。その結果得られるコストの低下により、これらのデバイスを使い捨てツールとして使い、それによって無菌性および使いやすさを向上させることが可能と考えられる。加えて、チューブ接続、マウント用システムおよび圧力調節機構を単純化することにより、使い勝手の良いシステムを供給することが可能である。

【0190】

線維芽細胞のiPS細胞へのタンパク質に基づくリプログラミング、およびリプログラミング用パラメーター空間の最適化試験が可能である。以前の諸研究により、ヒト組織およびマウス組織の両方から、CPP融合リプログラミング因子の直接送達によってiPSCを作製しうること（図36）、ならびにこれらのタンパク質-iPSCが、ウイルス性iPSCに伴う異常表現型を伴わずに機能的細胞（例えば、ドーパミンニューロン）へと分化しうることは示されている。しかし、培養下でのタンパク質分解、送達の非効率性、および細胞のエンドソーム内での分解を含む多くの因子が原因で、直接的なタンパク質送達によるリプログラミング効率は、いかなる実用にとっても非常に低い（0.01%未満）。本明細書に記載のマイクロ流体デバイスは、細胞質へのタンパク質の効率的な直接送達を可能にし、それにより、遊離状態またはカプセル封入されたタンパク質の送達法において通常遭遇する過酷なエンドソーム環境および手間のかかるエンドソーム回避過程を避けることによって、タンパク質に基づくリプログラミングの効率を有意に高めることができる。

【 0 1 9 1 】

ヒト iPSC の作製は、マイクロ流体に基づく送達によって容易になる。本デバイスを、1 つまたは複数の、例えば4種のリプログラミングタンパク質 (c-Myc (タンパク質、Genbank アクセション NP_002458.2 ; DNA、Genbank アクセション NM_002467.4)、Klf4 (タンパク質、Genbank アクセション AAH30811.1 ; DNA、Genbank アクセション NM_004235.4)、Oct4 (タンパク質、Genbank アクセション ADW77326.1 ; DNA、Genbank アクセション HQ122675.1) および Sox2 (タンパク質、Genbank アクセション NP_003097.1 ; DNA、Genbank アクセション NM_003106.3) ;) の、ヒト胚性線維芽細胞 (HF) への送達のために用いる。山中四因子 (MKOSはc-Myc-Klf4-Oct4-Sox2である) のほかに、いくつかのさらなる因子 (例えば、Lin28 (タンパク質、Genbank アクセション AAH28566.1 ; DNA、Genbank アクセション NM_024674.4) および Nanog (タンパク質、Genbank アクセション AAP49529.1 ; DNA、Genbank アクセション NM_024865.2)、Esrrb (タンパク質、Genbank アクセション AA131518.1 ; DNA、Genbank アクセション NM_004452.3)、Glis1 (タンパク質、Genbank アクセション NP_671726.2 ; DNA、Genbank アクセション NM_147193.2) および PRDM14 (タンパク質、Genbank アクセション NP_078780.1 ; DNA、Genbank アクセション NM_024504.3)) が、リプログラミング効率を高めることが同定されている。6種の因子 (MKOS + Lin28 および Nanog ; MKOSLN) の哺乳動物での発現および精製は十分に確立されており、各因子の生体活性もレポーターアッセイを用いて確認されている。これらの因子は、大腸菌細胞または哺乳動物細胞のいずれにおいても発現させることができる。大腸菌により発現されたタンパク質は、リン酸化、アセチル化およびユビキチン化などの翻訳後修飾を欠いているため、哺乳動物細胞 (HEK293 および CHO) における発現後に精製タンパク質を用いることができる。大腸菌により発現されたタンパク質 (Stemgent, Cambridge, MA により販売) を、比較のために用いることができる。第1に、トランスフェクションによって HEK293細胞で発現させた FLAG-タグ標識リプログラミング因子を、50mM Tris-HCl、pH 7.4、250mM NaCl、5mM EDTA、1% NP-40 および プロテアーゼインヒビターを含む NP40細胞可溶性緩衝液中に再懸濁させる。遠心分離後に、収集した可溶性画分を、平衡化した抗FLAG M2アガロースアフィニティーゲルに添加する。PBSで2回洗浄した後に、0.1mg/mlのFLAGペプチド (Sigma) を添加することにより、保持されたFLAG-タグ標識タンパク質を溶出させることができる。ヒト線維芽細胞および4種または6種の精製タンパク質の懸濁溶液をデバイスに適用し、処理した細胞を、0.1%ゼラチンでコーティングして馴化hESC培地を入れたプレートにプレーティングし、1日、2日または3日置いた後に次の送達サイクルを行う。マイクロ流体デバイスによるタンパク質送達サイクル (6~16回) を繰り返した後に、処理した細胞を、マイトマイシンCで処理したマウス胚性線維芽細胞 (MEF) 上にプレーティングして、通常のhESC培地を用いて3~4週間増殖させる。iPSCコロニーは、MEF上への播種から3週間後以内に視認しうるようになる。iPSC作製の効率を、本発明者らの当初のCOP融合組換えタンパク質を用いたタンパク質送達によるものと比較することができる。これらのiPSC候補を、以前に記載されたような分子特定および細胞特性ならびにインビトロおよびインビボでの多能性を含む、真性iPSCのすべての基準に関して十分に検討する。4種または6種の因子を用いることにより、iPSC株がはるかに向上した効率で作製されると考えられる。また、Esrrb、Glis1およびPRDM14などのさらなる因子をさらに発現させて、これらの因子をリプログラミング実験に用いることも可能である。

【 0 1 9 2 】

リプログラミングタンパク質ならびにmRNAおよび/またはマイクロRNAを、組み合わせで送達することができる。マイクロ流体デバイスは、タンパク質だけでなく、任意の他の高分子をも送達するために用いることができる。最適な非ゲノム組み込み性リプログラミングのためのこの比類のない特性を利用するために、リプログラミング因子ならびにmRNAおよび/またはマイクロRNAの使用を組み合わせることが可能である。特に、マイクロRNAのみを用いることによってiPSC株の作製に成功したことは大きな関心の的である。実際に、マイクロRNAのリポフェクタミンに基づくトランスフェクションにより、iPSC様コロニーを作製することができる。マイクロRNAはリプログラミング因子とは異なる機序でリブ

10

20

30

40

50

リプログラミングを誘導する可能性が高いことから、マイクロ流体デバイスを介したリプログラミングタンパク質およびマイクロRNAの両方の適切な組み合わせにより、リプログラミング効率をさらに高めることができる。タンパク質およびmRNAの組み合わせ送達により、リプログラミング効率が大きく促進されうる。このため、タンパク質、mRNAおよび/またはマイクロRNAの最適な組み合わせ処理を、マイクロ流体デバイスを用いて送達することができる。マイクロRNA/mRNAについてはタンパク質と同等なレベルでの制御は得られないと考えられるものの、ハイスループット最適化試験に対するデバイス能力により、以前のアプローチに比して効率の点で大きな利得がやはり得られる。

【0193】

本マイクロ流体デバイスの比類のない特徴により、さまざまな定量化された量の各因子の、制御された反復可能な様式での送達が可能になる。本主題の最適化により、HFへのタンパク質送達のための、信頼性が高く、効率の高いツールの開発が促進される。各リプログラミング因子の最適な送達数量および頻度を明らかにすることが可能である。mRNA性、プラスミド性またはウイルス性の方法とは異なり、本システムは、転写因子の有効な細胞内濃度を決定する上で、遺伝子発現および/または翻訳の確率的性質には依拠しない。このため、タンパク質をサイトゾルに直接的に送達しうる本デバイスの能力は、それを細胞内環境に対して正確な制御を遂行しうるという比類のない位置に置くものである。4種の因子のそれぞれの処理頻度（1日、2日または3日毎に1回）およびタンパク質濃度を独立に変化させる、一連の送達スケジュールが可能である。特に、比較的高いレベルのOct4が効率的なリプログラミングのために重要であることを指し示しているいくつかの報告に基づけば、他の因子の濃度を同一に保ちながら、Oct4を異なる濃度で用いることの影響を試験することが可能である。c-Mycの種々の濃度を所与の細胞型に対して評価してもよいが、これはそのレベルが高いと、状況によってはiPSCの代わりに、ほとんど形質転換したコロニーが作製させることが見いだされているためである。その上、c-Mycの半減期が極めて短い（ほぼ30分間）ことから、c-Mycによるより高頻度での処理の影響を、適切な濃度で試験することも可能である。

【0194】

リプログラミング因子の一時的治療の最適化は、記載された方法を用いることで容易になる。各因子は機能的役割を有し、リプログラミング過程にかかわっている。少なくとも1つの場合およびいくつかの場合には、所望のリプログラミング結果を達成するために、これらの因子の組み合わせが必要である。例えば、c-Mycは分化遺伝子の発現を抑制することが知られている。加えて、Klf4は、分化経路および多能性の阻害に関係するマイクロRNA let-7を抑制することが知られている。したがって、準最適条件に基づいて、初期にc-Mycおよび/またはKlf4で処理することによって、時間的に調節されたリプログラミングが可能である。加えて、NanogはiPSC作製のために必要ではないものの、最終樹立および多能性の維持のためには極めて重要であることが知られている。このため、リプログラミング過程の後期段階でNanogを添加する影響を試験することもできる。その上、マイクロRNAおよびタンパク質の逐次的処理について試験して、リプログラミング効率を、各処理または同時処理によるものと比較することもできる。この時間的に調節されたリプログラミングは、本マイクロ流体デバイスの比類のない特徴のおかげで可能であり、タンパク質リプログラミングをさらに最適化することは重要な可能性がある。リプログラミング効率は、第28日のコロニー数を、処理したHF細胞の数によって除算することによって算出することができる。完了したところで、回帰分析を用いて、各リプログラミング因子の相対的重要性、その最適濃度、最適な送達頻度/タイミングを推定することができ、その結果として、iPSCを作製するための最適なプロトコルを推定することができる。各細胞に送達されるタンパク質の量およびタイミングを制御しうることにより、リプログラミング過程における各因子の機能的意義を解明し、それにより、細胞リプログラミング過程および多能性樹立の理解をさらに高めることができる。加えて、この検討の結果を用いて、リプログラミングの具体的な需要に合致するようにデバイスデザインをさらに改良して、最終的には臨床的に適用な型の開発を実現することもできる。

10

20

30

40

50

【0195】

上記のような最適化されたタンパク質リプログラミング手順を用いることで、本プロトコールは一般に、患者特異的なヒト成人線維芽細胞に適用することができる。ESCおよびiPSCの機能的ドーパミンニューロンへの効率的分化、ならびに移植の効果については研究がなされていることから、パーキンソン病患者に由来するヒト線維芽細胞からiPSC株またはiPSC株を作製することが可能である。iPSC株を作製して特性決定を行った上で、ドーパミンニューロンに分化するようにそれらを誘導して、それらの細胞特性、分子特性、生理学的特性および電気生理学的特性に関して特性決定を行う。これらのドーパミンニューロンを、遺伝的PDモデル、無水晶体マウスといったパーキンソン病の動物モデルへの移植後にインビボ機能性に関して試験する。

10

【0196】

マイクロ流体に基づくタンパク質送達を、直接的な細胞変換、例えば、線維芽細胞の、機能的ニューロン、肝細胞および血液細胞といった他の細胞型への直接的な変換のために用いることができる。従来は、これらの操作には重要な転写因子のウイルス性発現が用いられたが、これは重大な染色体破損および遺伝子突然変異を引き起こすことから、本明細書に記載した方法を用いる直接的なタンパク質送達のような非ウイルス性でゲノム非組み込み性の変換方法を開発する必要性が強く示されている。このため、本デバイスを、直接的な細胞変換のためのマイクロ流体に基づくタンパク質送達のために用いることができる。ある種の転写因子の哺乳動物での発現は幾分困難であるため、1つまたは2つのタンパク質因子による変換について試験することに、より高度の実行可能性があることも考えられる。しかし、単一の因子、例えばOct4またはSox2を、それぞれ血液前駆体または神経前駆体を作製するために用いて、線維芽細胞を別の細胞運命に変換させることも可能である。これらのタンパク質は、マイクロ流体に基づくタンパク質送達を用いる細胞変換のために、精製形態で容易に入手可能である。

20

図44は、マイクロ流体デバイスおよび関連した方法を用いた活性siRNA配列およびスクランブル対照による処理から48時間後のGFP強度によって測定した、HESCにおけるGFPノックダウンを図示している棒グラフである。図45Aおよび45Bは、3kDa blue色素の送達後のヒト胚性幹細胞の色素強度および生存度を図示している2つのプロットである。

【0197】

その他の態様が、本発明の範囲および趣旨に含まれる。例えば、ソフトウェアの性質を理由として、上記の機能を、ソフトウェア、ハードウェア、ファームウェア、ハードワイヤリング、またはこれらの任意の組み合わせを用いて実現することができる。また、機能を実現する特徴物を、機能の部分が複数の異なる物理的位置で実現されるように分布させることを含め、さまざまな位置に物理的に配置することもできる。

30

【0198】

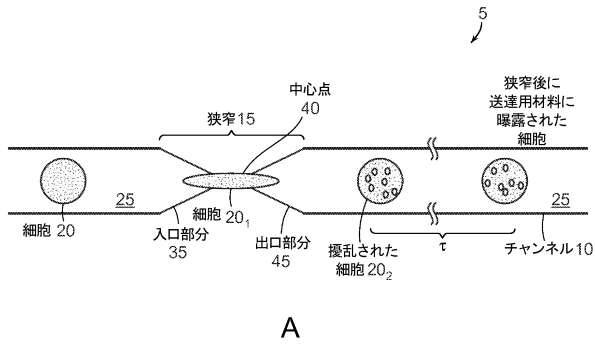
1つまたは複数の参考文献が本明細書に組み入れられることに留意されたい。組み入れられた材料のいずれかが本開示と相反する場合には、本開示が優先するものとする。さらに、必要な場合には、添付の特許請求の範囲の有効性を保全することが必要であるならば、本明細書中の参考文献によって組み入れられた材料を無視すべきである。

【0199】

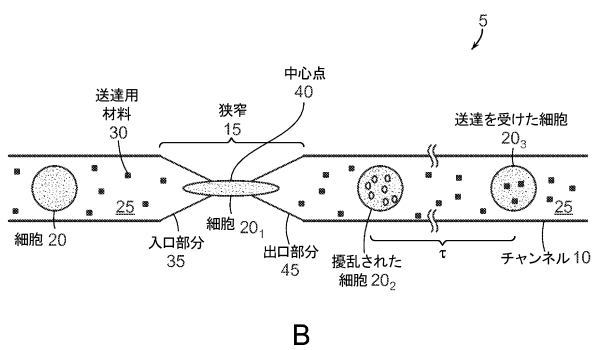
さらに、上記の説明は本発明を指しているものの、説明が複数の発明を含んでもよい。

40

【図1】

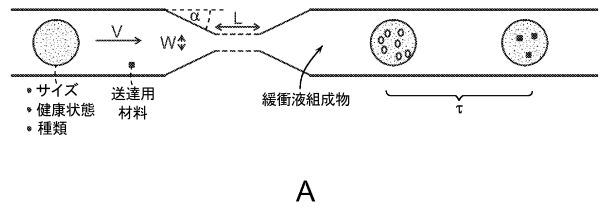


A

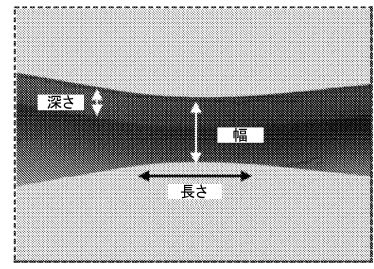


B

【図2】

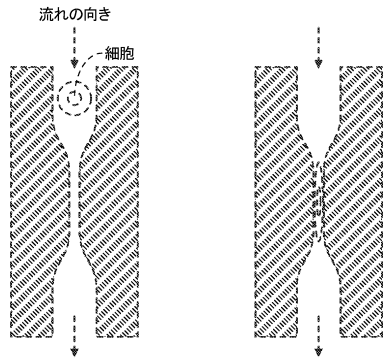


A

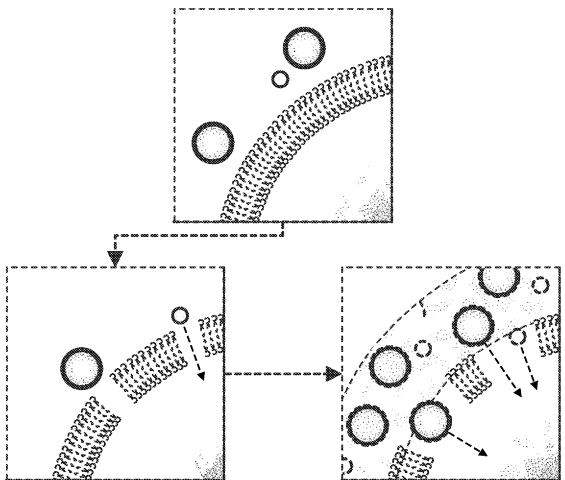


B

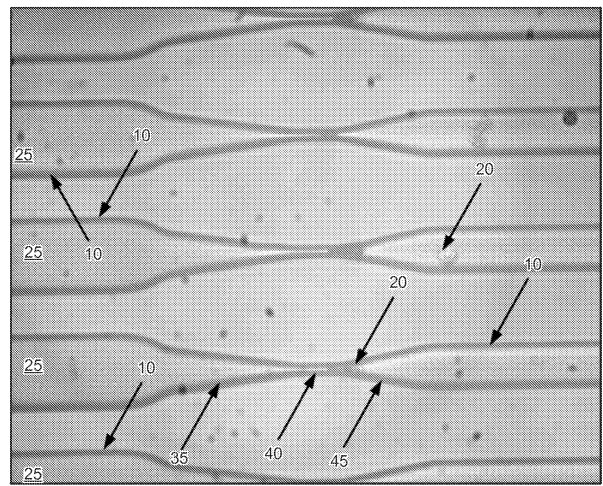
【図3】



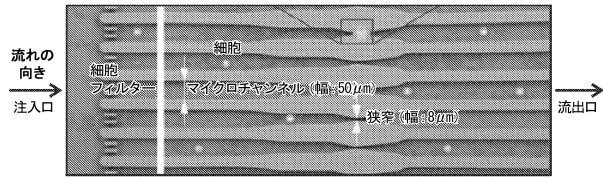
【図4】



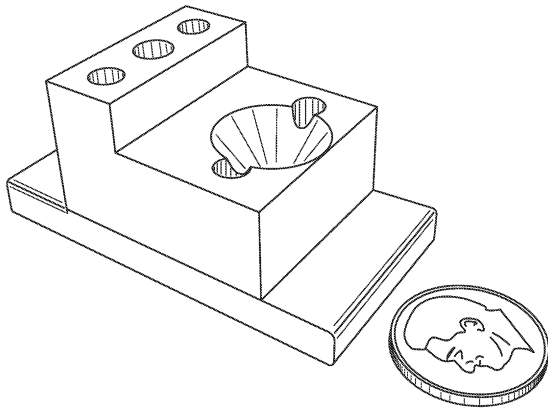
【図5】



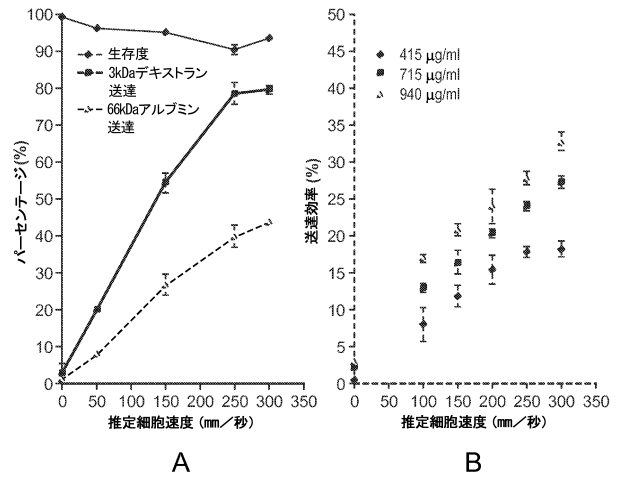
【図6】



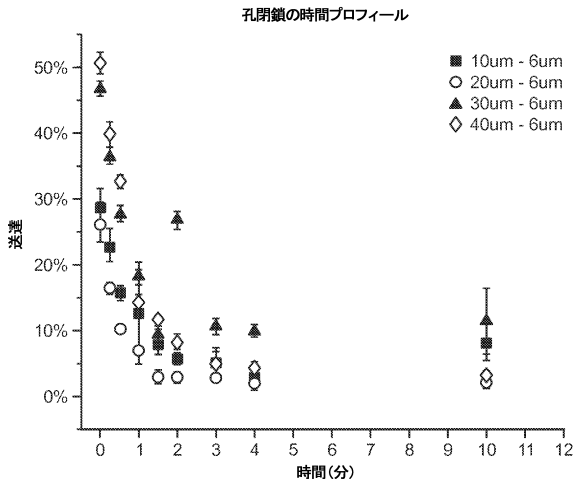
【図7】



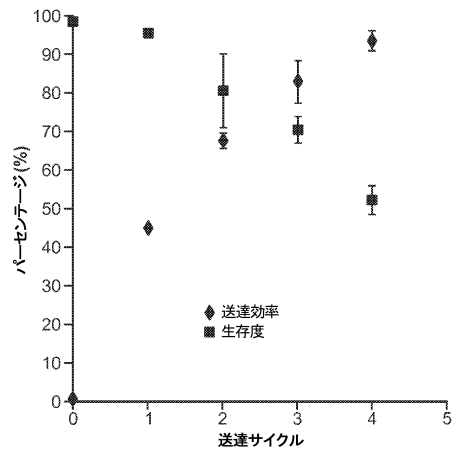
【図8】



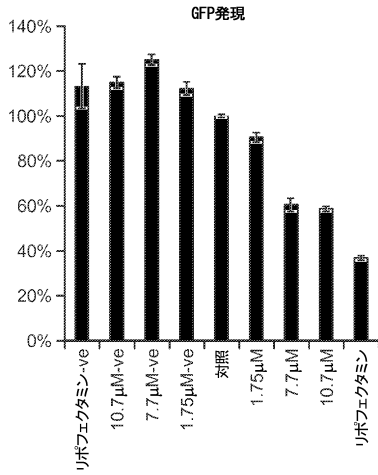
【図9】



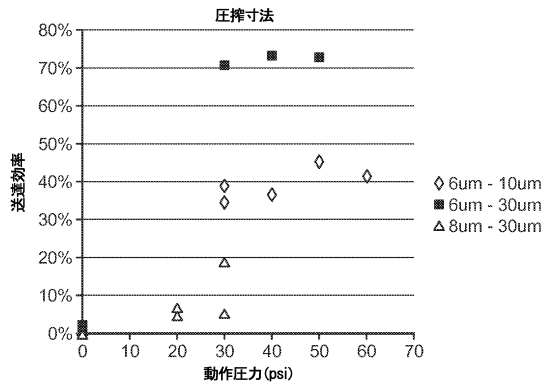
【図10】



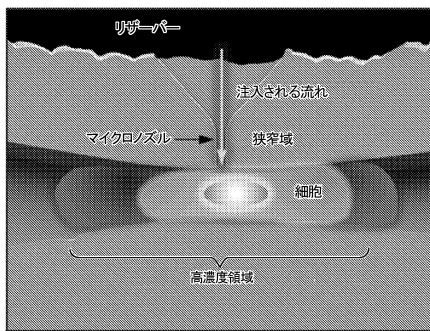
【図 1 1】



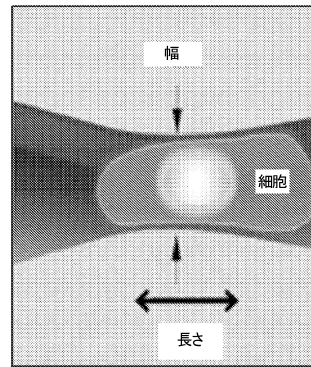
【図 1 3】



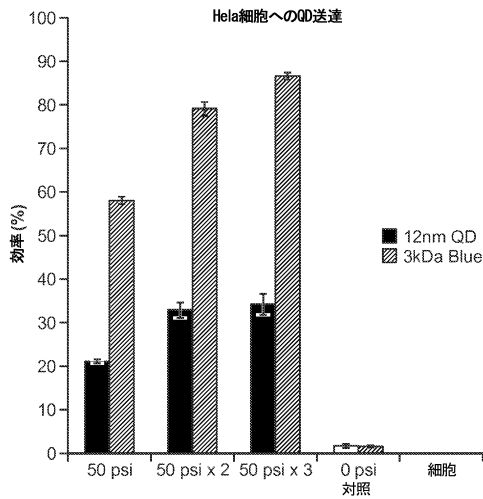
【図 1 2】



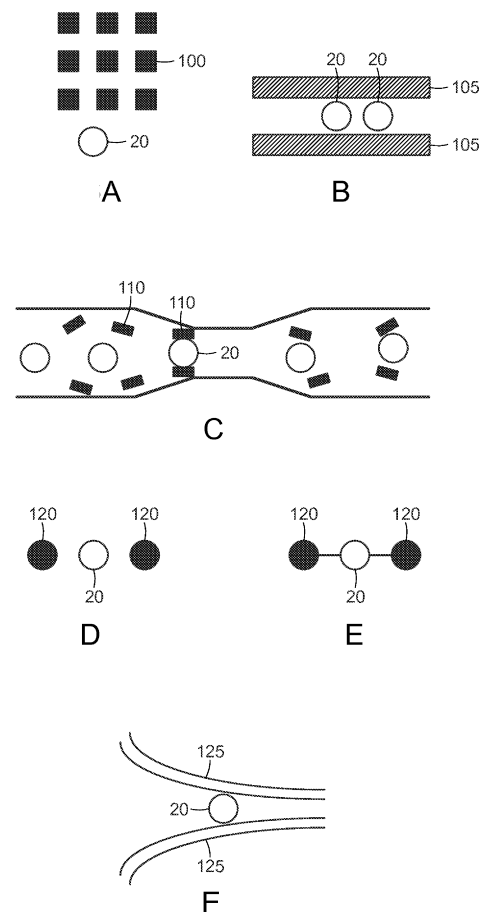
Mag= 3.62 K X 20μm WD= 4mm EHT= 1.19 kV Signal A = SE2 Date: 15 Oct 2010 Time: 15:26:03
SUPRA 40-25-02 Noise Reduction=Frame Avg



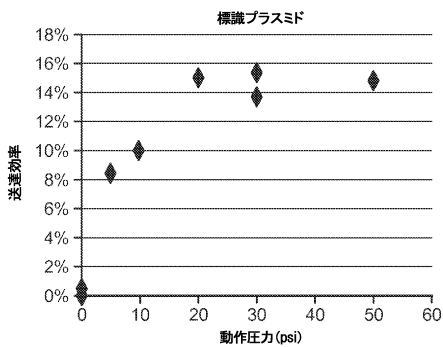
【図 1 4】



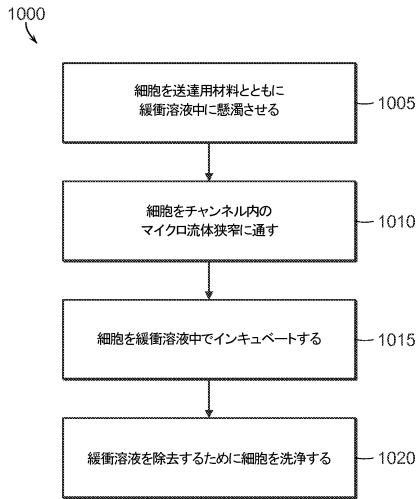
【図 1 6】



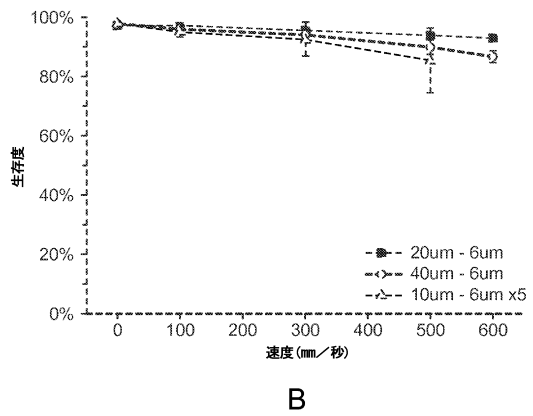
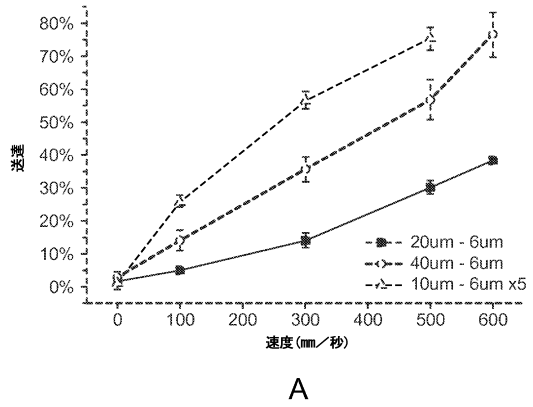
【図 1 5】



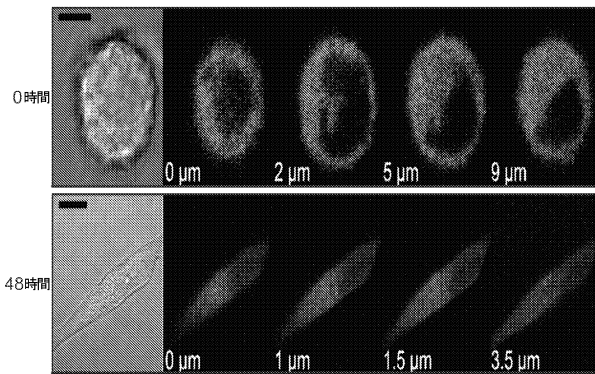
【図17】



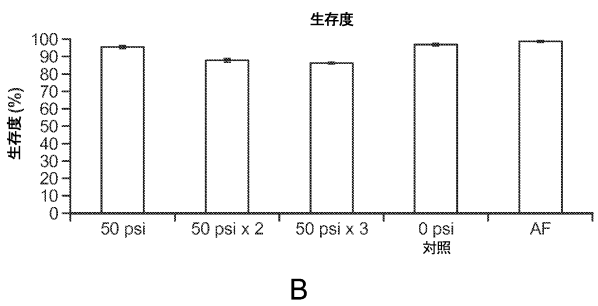
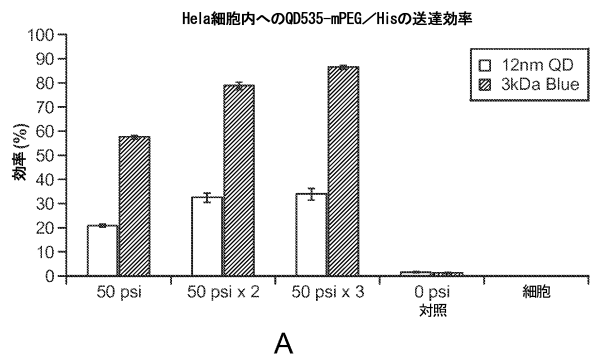
【図18】



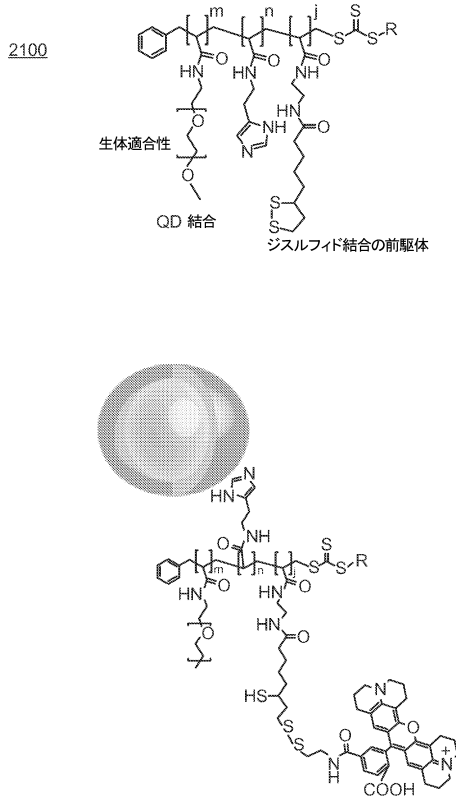
【図19】



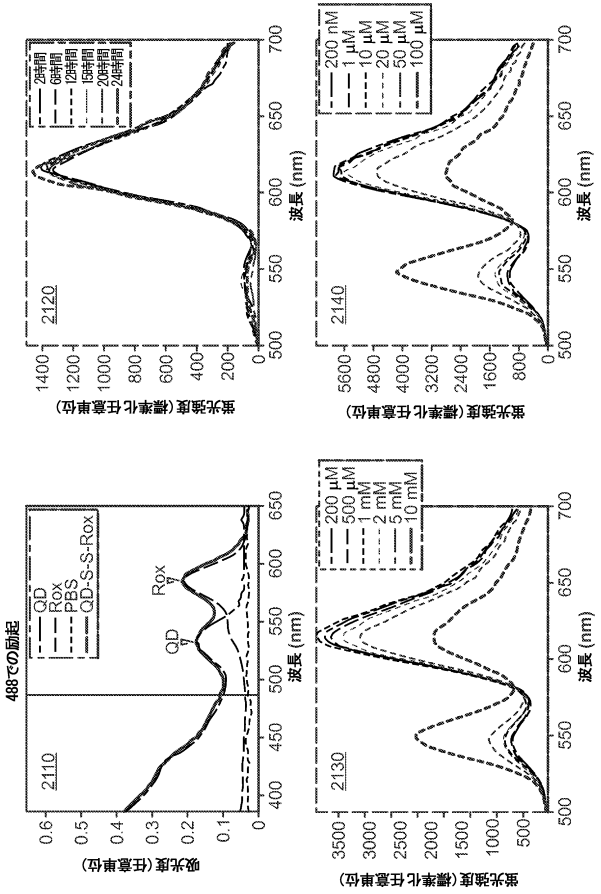
【図20】



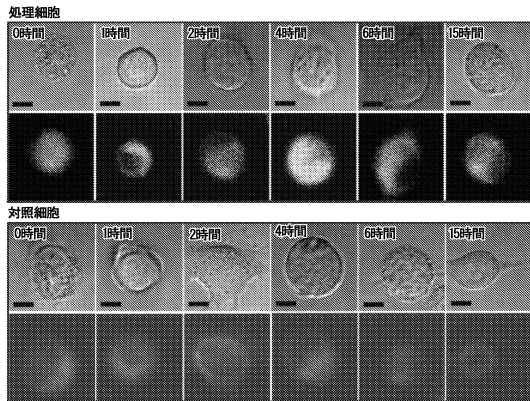
【図 2 1 A】



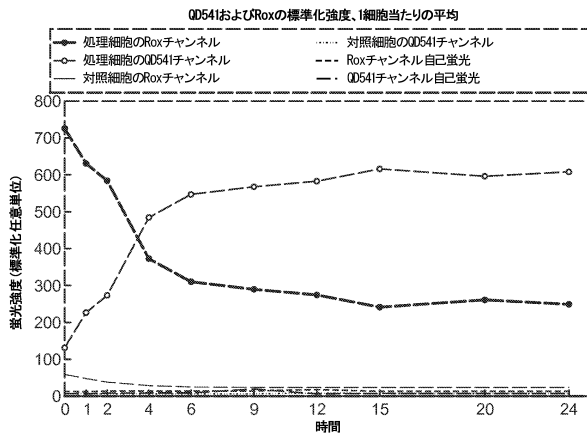
【図 2 1 B】



【図 2 2】

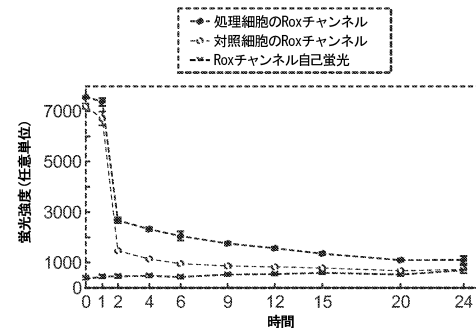
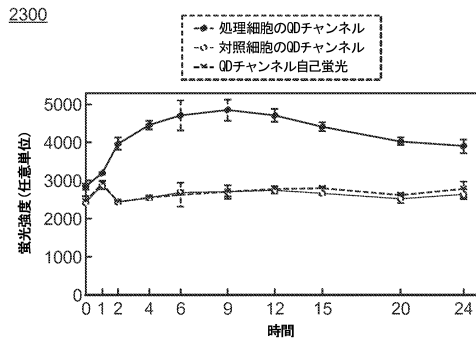


A



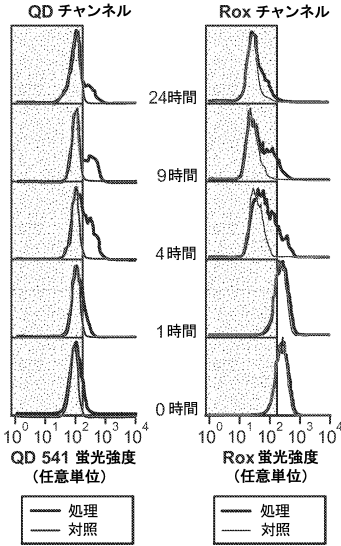
B

【図 2 3 A】

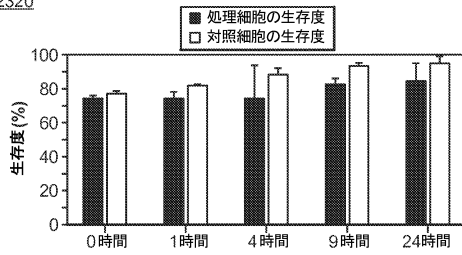


【図 2 3 B】

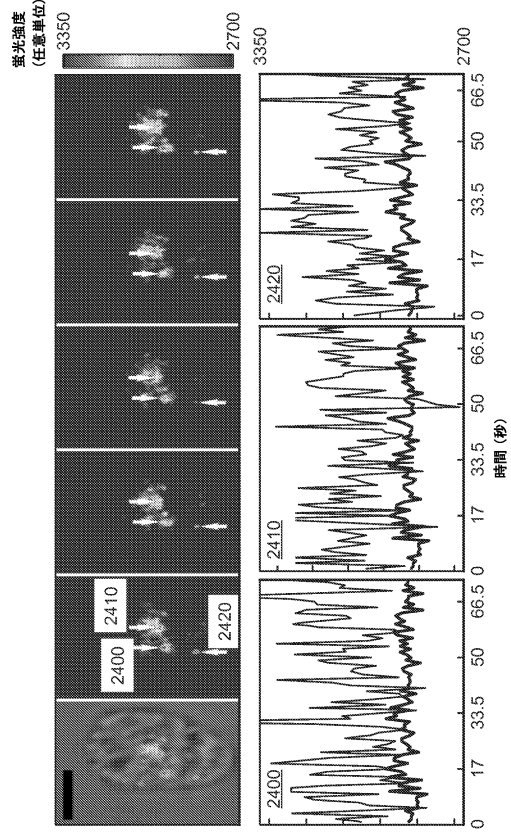
2310



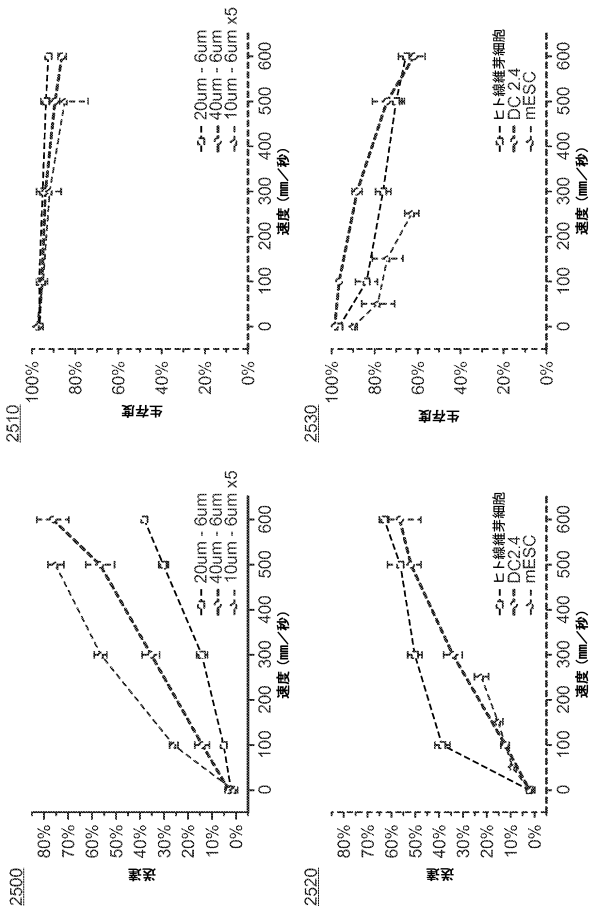
2320



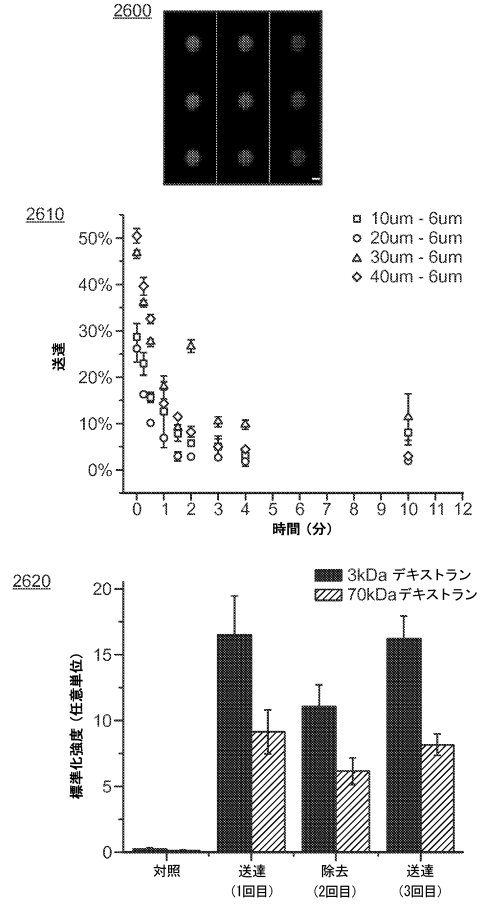
【図 2 4】



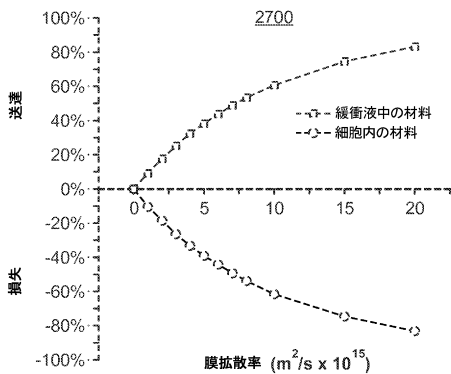
【図 2 5】



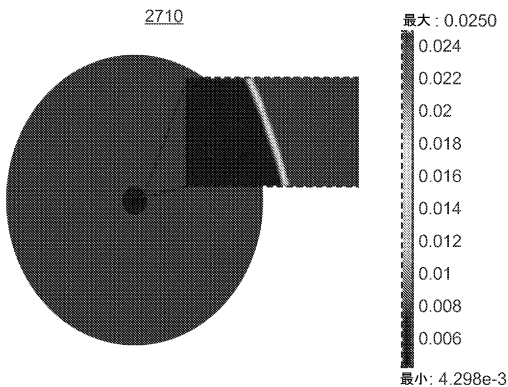
【図 2 6】



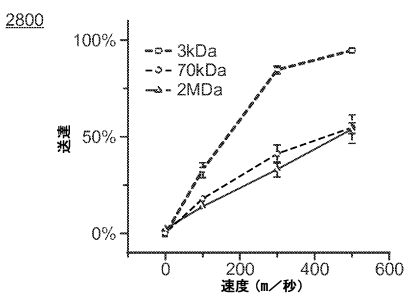
【図 27】



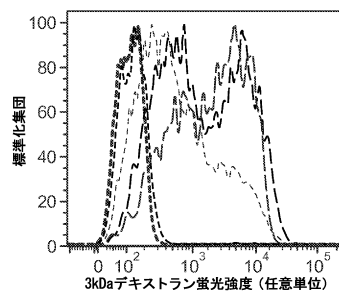
2710



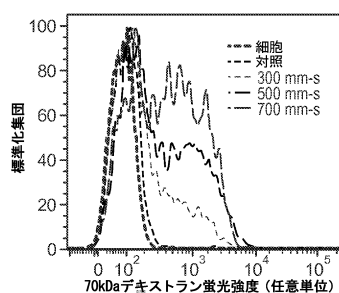
【図 28】



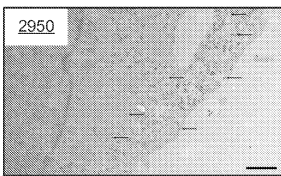
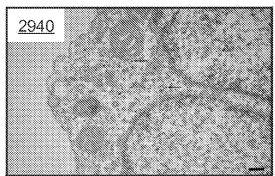
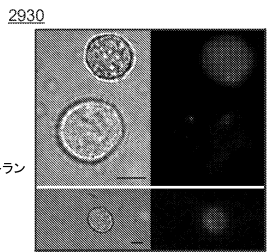
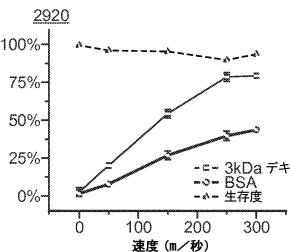
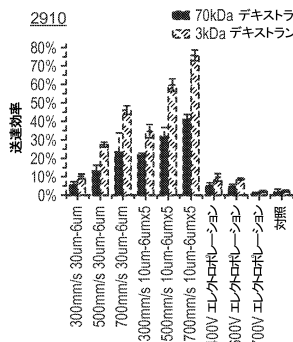
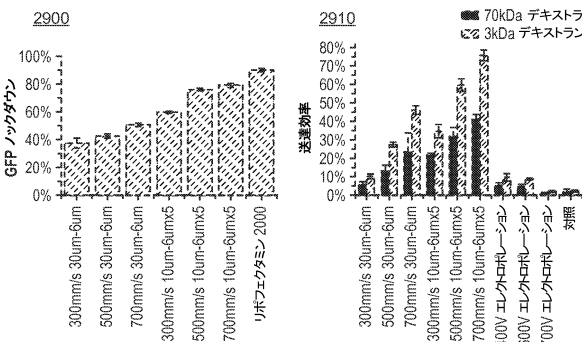
2810



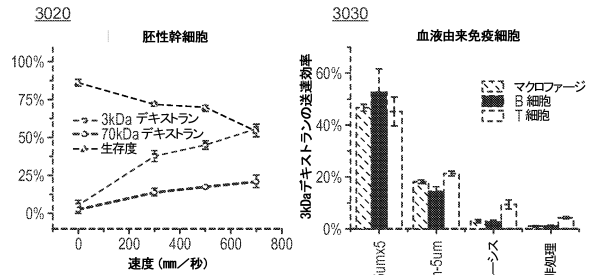
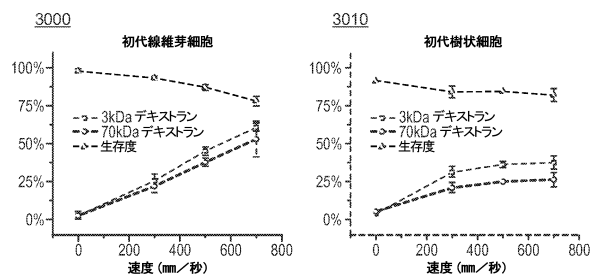
2820



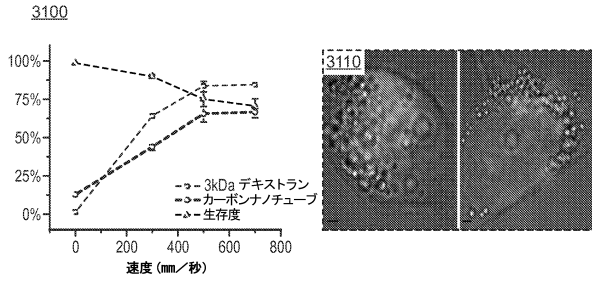
【図 29】



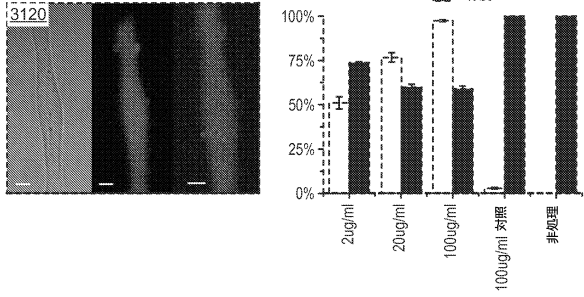
【図 30】



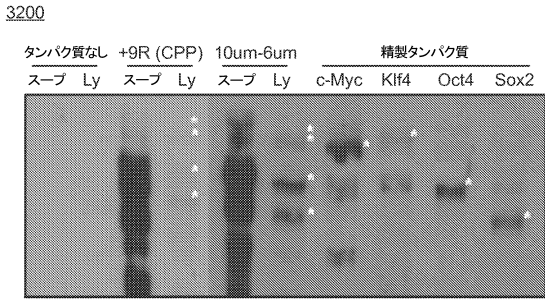
【図 3 1】



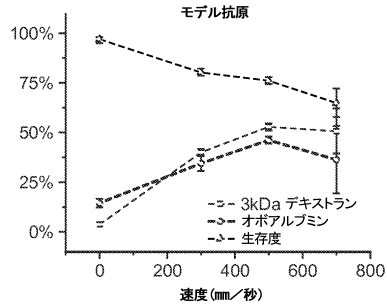
3120



【図 3 2】



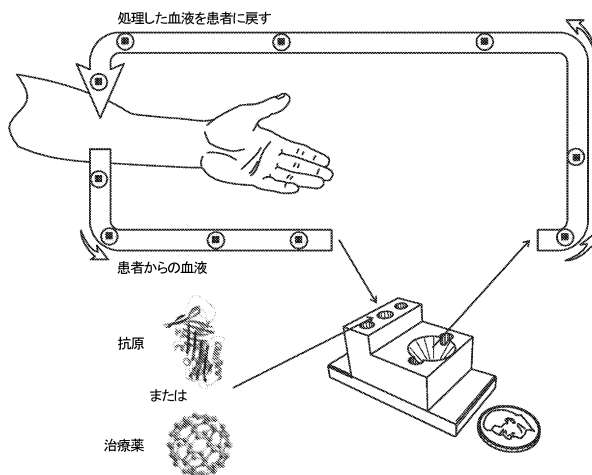
3210



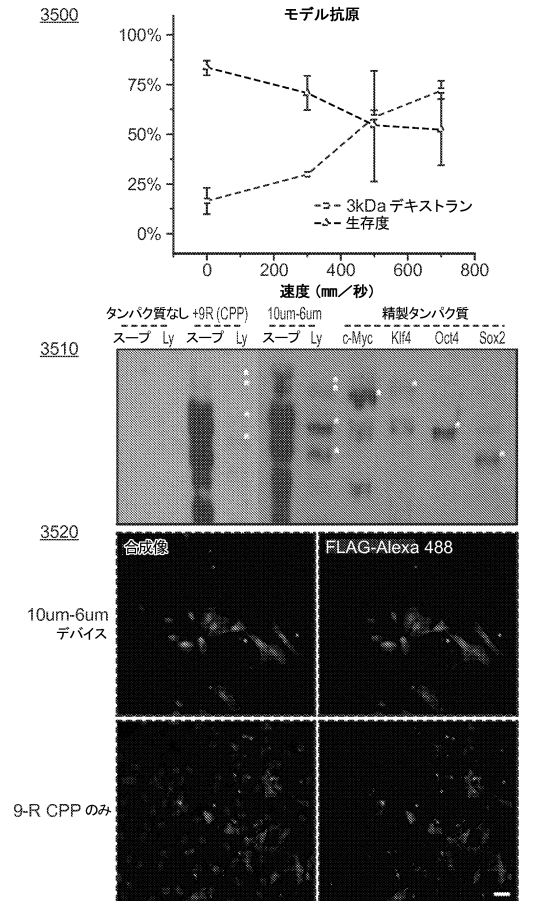
【図 3 3】

細胞型	初代/ 不死化	急速な機械的変形による 送達
Bリンバ球 (マウス)	初代	デキストラン
DC 2.4 (マウス)	不死化	デキストラン、タンパク質
樹状細胞 (マウス、脾臓)	初代	デキストラン、タンパク質
樹状細胞 (マウス、骨髄)	初代	デキストラン、タンパク質
胚性幹細胞 (マウス)	初代	デキストラン
胚性幹細胞 (ヒト)	初代	デキストラン、siRNA
線維芽細胞 (ヒト、複数の供給源)	初代	デキストラン、タンパク質
HeLa (ヒト)	不死化	デキストラン、siRNA、タンパク質、DNA、ナノ粒子、量子ドット、カーボンナノチューブ
HT-29 (ヒト)	不死化	デキストラン
マクロファージ (マウス)	初代	デキストラン
Tリンバ球 (マウス)	初代	デキストラン

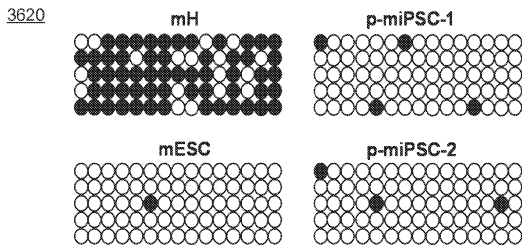
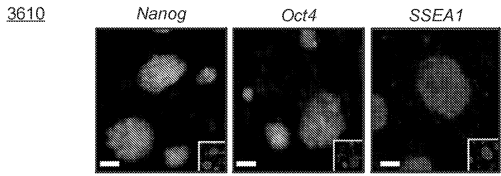
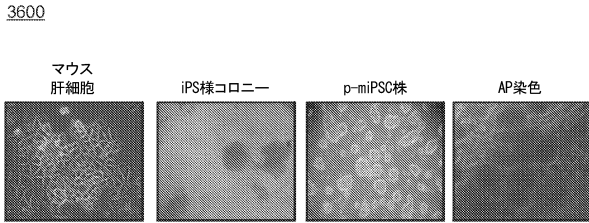
【図 3 4】



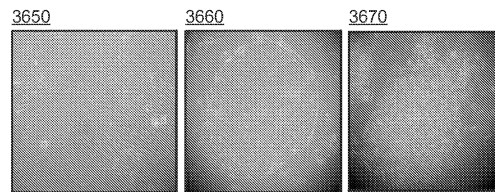
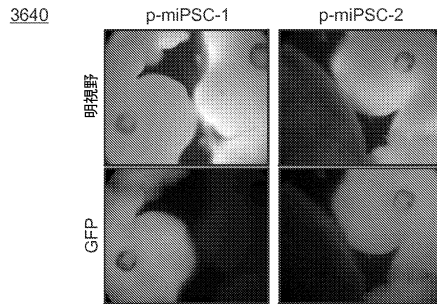
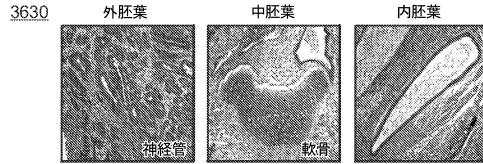
【図 3 5】



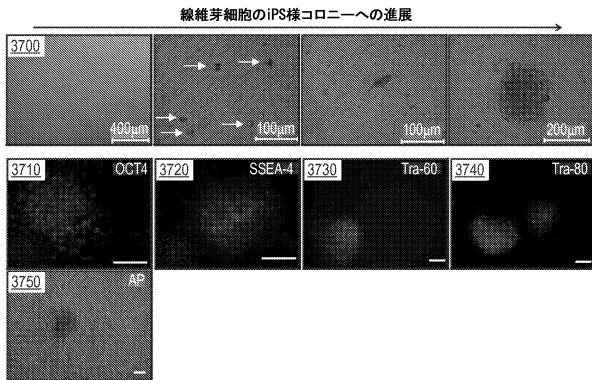
【図36A】



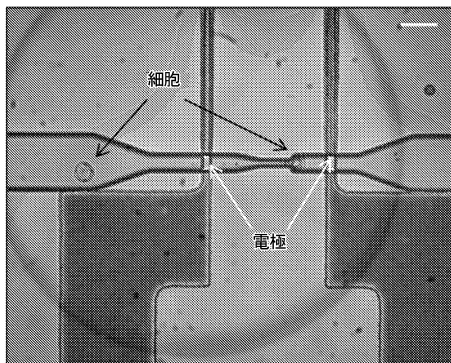
【図36B】



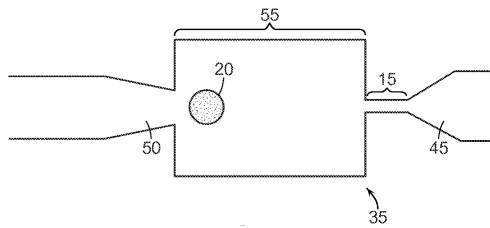
【図37】



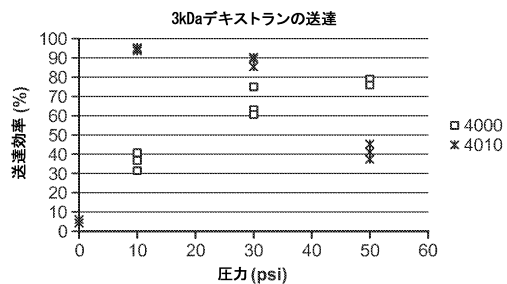
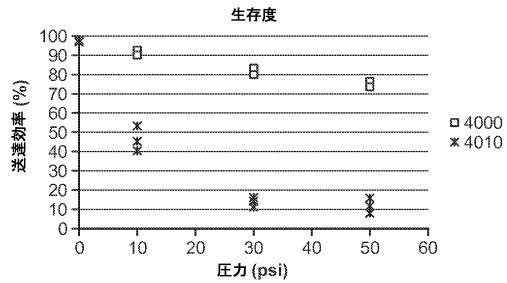
【図38】



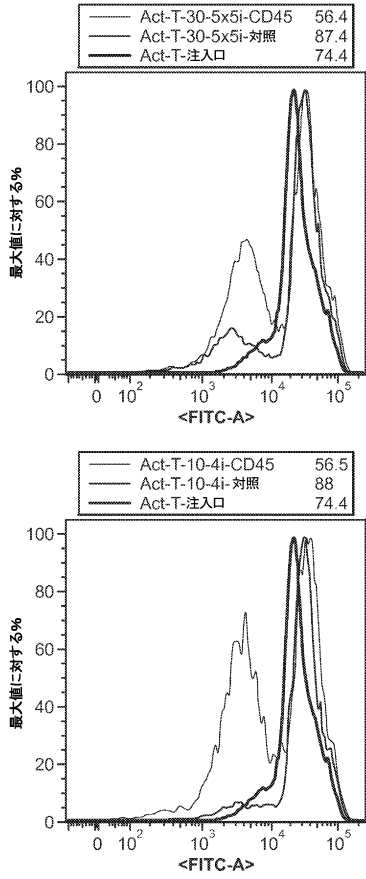
【図39】



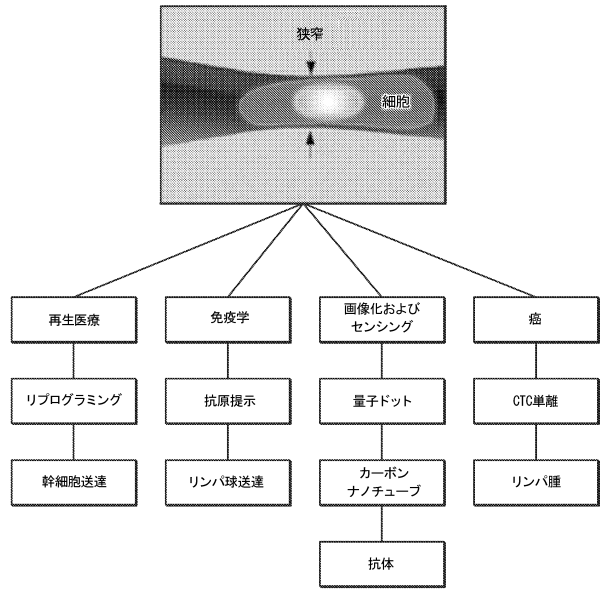
【図40】



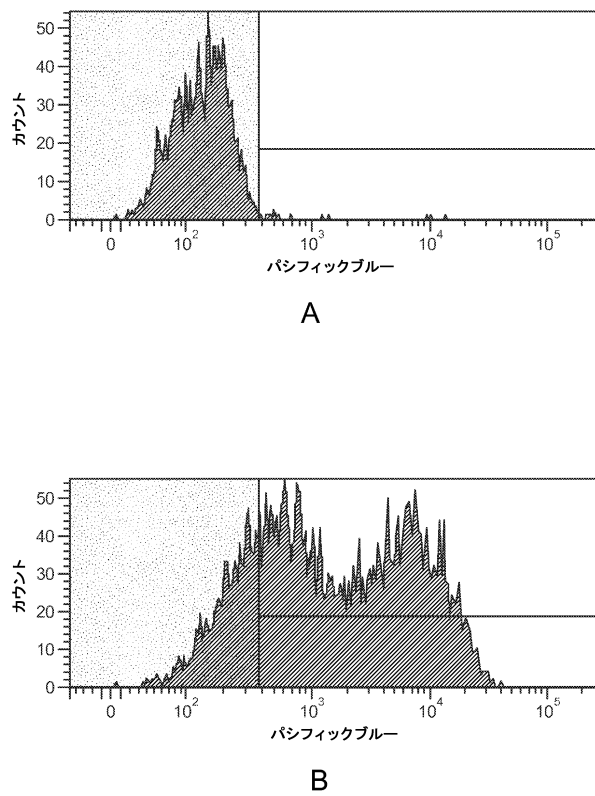
【 図 4 1 】



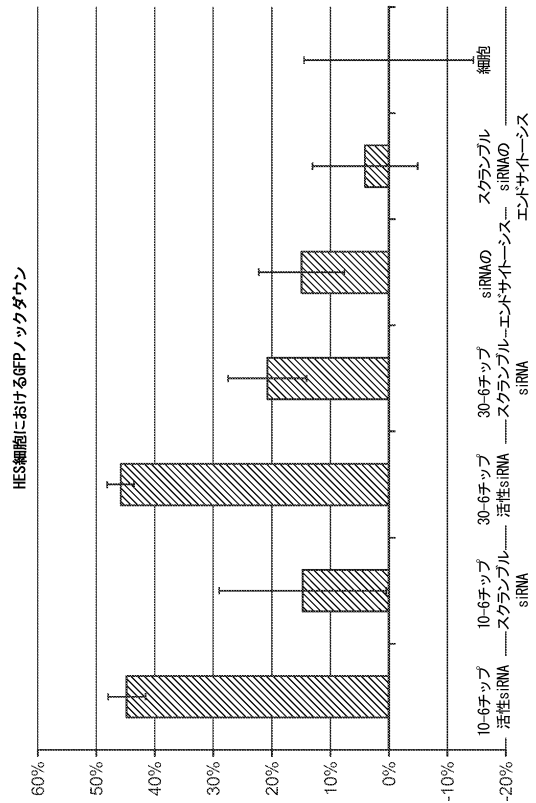
【 図 4 2 】



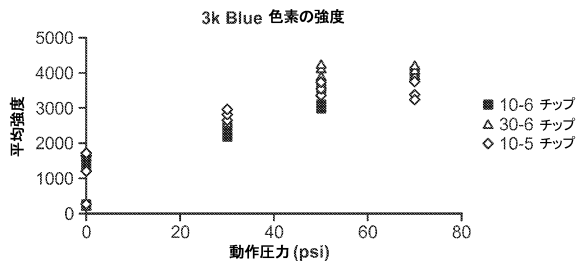
【 図 4 3 】



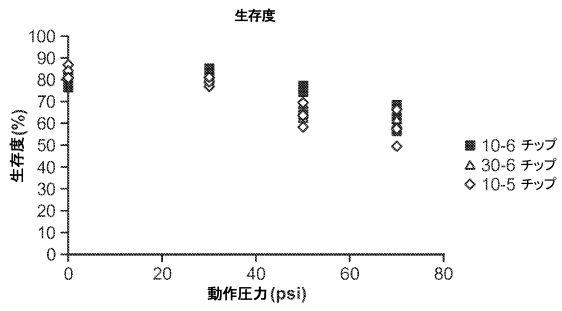
【 図 4 4 】



【 図 4 5 】



A



B

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

- (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 シャレイ アーモン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンラファエル マルガリータ ドライブ 6
- (72)発明者 アダモ アンドリア
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ゴードン プレイス 4
- (72)発明者 ランガー ロバート
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン モントベール ストリート 98
- (72)発明者 イェンセン クラヴス エフ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン アウトルック ドライブ 103

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0280518(US, A1)
 Biotechnol. Bioeng., (2008), 99, [4], p.846-854

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)