

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6367493号
(P6367493)

(45) 発行日 平成30年8月1日 (2018.8.1)

(24) 登録日 平成30年7月13日 (2018.7.13)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/87 (2006.01)	C 1 2 N 15/87 Z
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A

請求項の数 15 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2017-536354 (P2017-536354)	(73) 特許権者	517235834
(86) (22) 出願日	平成27年11月26日 (2015.11.26)		インディー. インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2018-506965 (P2018-506965A)		アメリカ合衆国, デラウェア州 1 9 8 0
(43) 公表日	平成30年3月15日 (2018.3.15)		3, ニュー キャッスル カウンティ, ウ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2015/050748		イルミントン, コンコード パイク 1 5
(87) 国際公開番号	W02016/109864		2 1 ナンバー 3 0 3
(87) 国際公開日	平成28年7月14日 (2016.7.14)	(74) 代理人	100079108
審査請求日	平成29年10月27日 (2017.10.27)		弁理士 稲葉 良幸
(31) 優先権主張番号	2015900021	(74) 代理人	100109346
(32) 優先日	平成27年1月7日 (2015.1.7)		弁理士 大貫 敏史
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	100117189
早期審査対象出願			弁理士 江口 昭彦
		(74) 代理人	100134120
			弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 機械的及び流体力学的マイクロ流体形質移入の方法ならびにそのための装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内への外因性物質の導入方法であって、

マイクロ流体デバイスのフローチャネルに液体を導入することであって、前記チャネルが、一又は複数のフローダイバータを含み、それぞれのフローダイバータは、それぞれのフローダイバータの間に間隙を有し、前記それぞれのフローダイバータの間の間隙は幅を有し、前記間隙の幅は前記細胞の直径より大きいことと、

前記細胞が前記フローダイバータを通り過ぎて流れる際に、前記フローダイバータの下流で、前記細胞を圧力の一過的低下及び非定常流にさらし、これにより前記細胞内に前記外因性物質を導入することと、

を含む方法。

【請求項 2】

前記細胞が圧力の前記一過的低下及び非定常流にさらされた後で生存可能である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞が、細菌細胞、哺乳類細胞、酵母細胞、植物細胞及び昆虫細胞からなる群から選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記外因性物質が、有機低分子、核酸、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、多糖、量子ドット、カーボンナノチューブ、ナノ粒子、

金粒子、単糖、ビタミン及びステロイドからなる群から選択される、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞の細胞質中に前記外因性物質を導入する、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

圧力の前記一過的低下が少なくとも 10 kPa の低下である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも 10 ナノ秒間、前記外因性物質の存在下で前記細胞を圧力の前記一過的低下にさ
らす、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 8】

前記フローダイバータが柱である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記柱が円柱形である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記柱が、それぞれの柱の間の間隙よりも大きい直径を有する、請求項 8 に記載の方法
。 20

【請求項 11】

前記フローダイバータが 20 μ m の最大幅を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

液体中の細胞への外因性物質の導入するためのマイクロ流体デバイスであって、
前記細胞が直径を有し、
液体に懸濁させた前記細胞及び外因性物質が通って流れるように構成された寸法の少なく
とも部分的に密閉されたチャンネルと、
前記チャンネル内の 1 つ以上のフローダイバータと、
を備え、
それぞれのフローダイバータは、それぞれのフローダイバータの間に間隙を有し、前記
間隙は、前記細胞の直径よりも大きく設定された幅を有し、
前記フローダイバータが前記フローダイバータのすぐ下流に少なくとも 1 つの圧力が低
下した領域及び非定常流をもたらす、前記外因性物質が、圧力の低下に伴って、前記細胞
内に導入される、
デバイス。 30

【請求項 13】

前記フローダイバータが柱である、請求項 12 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 14】

前記柱が円柱形である、請求項 13 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 15】

前記柱が、それぞれの柱の間の間隙よりも大きい直径を有する、請求項 13 に記載のマ
イクロ流体デバイス。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、外因性物質の存在下で細胞を圧力の一過的低下にさ
らすことを含む細胞内への外因性物質の導入方法に関する。圧力の一過的低下は好ましくは、細胞及び外因性物質
が存在する液体の非定常流に関連する。特に、本発明は哺乳類細胞の形質移入に関する。

【0002】

関連出願

本出願は、2015 年 1 月 7 日に提出された「Continuous Deliver 50

y Technique」という名称の豪州仮出願第2015900021号に対する優先権を主張し、その主題全体を参照により本明細書に援用する。

【背景技術】

【0003】

本明細書全体にわたる先行技術のいかなる説明も、決してそのような先行技術が広く知られており、当該分野の共通一般知識の一部を形成するという自認とみなされるべきではない。

【0004】

インビトロ及びインビボでの細胞への外因性物質、例えば有機低分子、タンパク質及び核酸などの導入は、治療法及び治療薬送達戦略の研究開発の進展のために非常に重要である。

10

【0005】

例えば、細胞内への蛍光標識タンパク質の導入により、細胞全体にわたるタンパク質の交通のリアルタイム解析が可能となり、これはまた、疾患の臨床的に重要な段階中の、または特異的なトリガーへの反応におけるタンパク質相互作用の同定にも役立ち得る。薬剤開発中における自然には細胞膜を効果的に横断しない推定上の有機低分子薬の細胞内への導入によって、こうした薬剤のための送達媒体の開発に貴重な時間及び努力を向ける前に、当該薬剤の活性についての情報を得ることができる。

【0006】

細胞内への核酸の導入は細胞治療薬製造における不可欠なステップであり、治療薬として用いることのできる生細胞を効果的に改変するために、遺伝子をコードする発現ベクターが細胞膜を横断して細胞質中に送達される。例として、細胞療法は、個体自身の免疫系が癌細胞を攻撃するように、またはウイルス、例えばHIVなどを回避するように誘導するために用いられ得る。癌及びHIVは、2013年のHIV患者が推定35百万人、2012年の新たな癌症例が1400万件という人口におけるこれらの有病率を考慮した世界的な健康の観点から特に関連している。世界的な健康戦略としての細胞由来の遺伝子治療の利用には、毎年何千万人もの患者を治療する可能性を秘めた十分な量の製品を、適切な価格で、及び規制基準に従う現行の適正製造基準の下で再現可能に製造することのできる細胞治療薬製造方法が必要とされる。

20

【0007】

したがって、迅速かつ効率的に細胞内に外因性物質及び特に核酸を導入する能力は、有益な研究ツールであり、かつ治療戦略の有用な構成要素でもある。

30

【0008】

細胞内に作用物質を導入するためのいくつかの公知の方法が存在し、方法の選択は一般に、細胞の型、要求される効率のレベル、導入される分子のサイズ及び利用可能な細胞の数によって決定される。

【0009】

用語が同じ意味で用いられ得るが、真核細胞内への作用物質、例えば核酸などの導入は一般に「形質移入」と呼ばれ、一方で、原核細胞内への核酸の導入は一般に「形質転換」と呼ばれる。形質移入及び形質転換方法は、便宜上3つのカテゴリー、すなわち、化学的、物理的及びウイルスベースの方法に分けられ得る。

40

【0010】

形質移入の化学的方法は、細胞内への送達のために核酸を実質的にパッケージとするカチオン性脂質、リン酸カルシウム、カチオン性ポリマー及びデンドリマー分子などの試薬を用いる。しかし、これらの方法の多くはすべての細胞型に適用可能というわけではない。その上、それらは細胞培地中のpH変動または塩／リン酸塩によって損なわれ得る。これらの方法のいくつかにおける核酸のパッケージ化に対する要件のために、収容することのできる核酸分子のサイズは制限され得る。さらに、化学的形質移入方法は、高価な及び／または高濃度では細胞に有毒な試薬の使用を必要とし得る、及び／またはこの方法では低い／一貫性のない形質移入効率しか得られない場合がある。

50

【0011】

真核細胞を形質移入するために用いられる従来の物理的方法は、磁性ナノ粒子、エレクトロポレーション、バイオリスティック粒子送達及びマイクロインジェクションの使用を含む。しかし、これらの方法は細胞にとって極めて苛酷なものである傾向にあり、多くの場合、死亡率が高くなる。これらの方法には、固定化した細胞、高価な装置及び／または方法の実施者側のより高いレベルの技能も必要であり得る。例えば、いくつかのエレクトロポレーション法において、まず懸濁細胞を透過化し、その後、電界を印加して帯電した外因性物質の能動送達を助長する。したがって、これらの技術には、細胞膜の透過化及び電界の印加のための特殊な装置及び消耗品が必要となる。

【0012】

10

ウイルスベースの形質移入は、細胞内への核酸の送達のためにレンチウイルス、アデノウイルス及びレトロウイルスベクターをはじめとするウイルスベクターに依存し、核酸はウイルスプロモーターのおかげで高いレベルで発現され得る。これらのウイルスベースの方法は、リンパ系及び造血系の癌の効果的な治療に、ならびにHIV治療薬に有用であると判明していると思われる。しかし、形質移入効率が不定であるため、これらの種類の治療薬用のウイルスベクターを製造するコストは、患者1人当たり数千ドルのオーダーである。さらに、この方法は、プロセスが自動化されない場合、労働集約的であり、かつ製造上の問題が発生しやすいものとなる可能性がある。

【0013】

20

原核細胞内への外因性物質、及び特に核酸の導入も、治療薬開発時の生物学的製剤の製造、さらに言えば、研究全般における重要な態様である。有益な分子、例えば生物学的ベースの医薬品（いわゆるバイオ医薬品）などの組換え産生のための外因性核酸での細菌細胞株の形質転換は、化学的形質転換及びエレクトロポレーションを含めた様々な方法によって達成することができる。しかし、これらの方法は、形質転換前に細胞が（例えば、一連の遺伝子のスイッチをオンにする高細胞密度及び／または栄養制限を誘発することによって）「コンピテント」にされることを必要とする場合があり、すべての細胞型に適用可能でない場合があり、及び／または細胞死亡率が高レベルとなる場合がある。

【0014】

したがって、様々な細胞型に外因性物質を導入する迅速かつ効率的な方法で、公知の方法の難点を1つ以上克服するものが必要とされている。その方法では許容可能なレベルの細胞生存率が得られ、費用対効果が優れていることが好ましい。

30

【0015】

従来技術の欠点の少なくとも1つを克服もしくは改善する、または有用な代替物を提供することが本発明の目的である。

【0016】

本明細書において「好ましい」または「好ましくは」と言った場合、例示を意図するに過ぎないことが理解されるであろう。

【発明の概要】

【0017】

細胞内への外因性物質の導入に伴う制約は、多くの場合、物理的、ウイルス的及び化学的形質移入及び形質転換方法に用いられる試薬及びデバイスに関連する毒性及び／または費用に関係する。さらに、多くの形質移入方法は高スループット用途に適用できないが、その理由の1つには、低い形質移入効率及び／または細胞生存率を補償するために、プロセス全体を通してかなりのヒトによる介入及び大量の細胞を必要とするということがある。実際に、ヒトの介入は、技術者に大きく依存している方法の形質移入効率に関連する一貫性が得られない原因であることが多い。ヒトによってもたらされる不正確さが低レベルであっても、送達効率、細胞生存率及び／または再現性に著しい悪影響を及ぼす恐れがある。例えば、Mitsuyasu et al. (Mitsuyasu R. T., et al. (2009). Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous C

40

50

D34+ cells. Nature Medicine, 15(3):285-292)を参照すると、CD34+造血前駆細胞に形質移入するのにウイルスベクターを用いた結果、38人の患者(n=38)で $54 \pm 17\%$ (平均±標準偏差)の送達効率となった。

【0018】

驚くべきことに、本発明者によって、圧力の一過的低下にさらされた際に細胞は外因性物質を取込みやすいことが発見された。

【0019】

理論に縛られることを望むものではないが、圧力の一過的低下により、細胞が溶解することなく細胞膜が透過化されるのはほぼ間違いない。細胞膜を横断する比較的急で一時的な圧力低下は、それによって細胞内圧力が細胞外圧力よりも高くなり、膜中に一時的な孔の形成をもたらし、外因性物質の導入を可能とし得る。

10

【0020】

したがって、本発明の第1態様において、外因性物質の存在下で細胞を圧力の一過的低下にさらし、これにより細胞内に外因性物質を導入することを含む、細胞内への外因性物質の導入方法を提供する。圧力の一過的低下では細胞が溶解することにはならないが、ある実施形態においては生存不能となり得る。当業者であれば、本発明を細胞の集団に適用した場合、集団の細胞の中には溶解されるものもあり得ることを理解するであろう。

【0021】

細胞は圧力の一過的低下にさらされた後で生存可能であることが好ましい。

20

【0022】

細胞は、細菌細胞、哺乳類細胞、酵母細胞、植物細胞及び昆虫細胞からなる群から選択されることが好ましい。

【0023】

ある好ましい実施形態において、細胞は哺乳類細胞である。他の好ましい実施形態において、細胞は細菌細胞である。さらに他の好ましい実施形態において、細胞は酵母細胞である。さらに好ましい実施形態において、細胞は昆虫細胞である。またさらに好ましい実施形態において、細胞は植物細胞である。

【0024】

外因性物質は、有機低分子、核酸、ヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、多糖、ウイルス、量子ドット、カーボンナノチューブ、放射性核種、磁気ビーズ、ナノ粒子、金粒子、単糖、ビタミン及びステロイドからなる群から選択されることが好ましい。

30

【0025】

核酸は、PNA、DNA、RNA、mRNA、miRNA及びsiRNAからなる群から選択されることが好ましい。

【0026】

DNAはプラスミドであることが好ましい。

【0027】

プラスミドは発現ベクターであることが好ましい。

40

【0028】

発現ベクターは、PNA、DNA、RNA、miRNA、siRNAまたはタンパク質を発現することが好ましい。

【0029】

発現ベクターはウイルスベクターであることが好ましい。

【0030】

ウイルスベクターはレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターであることが好ましい。

【0031】

発現ベクターは細菌人工染色体(BAC)または酵母人工染色体(YAC)であること

50

が好ましい。

【0032】

外因性物質は細胞の細胞質中に導入されることが好ましい。

【0033】

外因性物質は細胞の核内に導入されることが好ましい。これらの好ましい実施形態において、細胞は哺乳類細胞、酵母細胞、配偶子（例えば精細胞もしくは卵細胞）または昆虫細胞である。細胞は哺乳類細胞であることがより好ましい。

【0034】

圧力の一過的低下は少なくとも10kPaの低下であることが好ましい。

【0035】

圧力の一過的低下は少なくとも100kPaの低下であることが好ましい。

【0036】

圧力の一過的低下は少なくとも500kPaの低下であることが好ましい。

【0037】

圧力の一過的低下は少なくとも1000kPaの低下であることが好ましい。

【0038】

少なくとも10ナノ秒間、外因性物質の存在下で細胞を圧力の一過的低下にさらすことが好ましい。

【0039】

少なくとも100ナノ秒間、外因性物質の存在下で細胞を圧力の一過的低下にさらすことが好ましい。

【0040】

少なくとも1マイクロ秒間、外因性物質の存在下で細胞を圧力の一過的低下にさらすことが好ましい。

【0041】

1ミリ秒以下の間、外因性物質の存在下で細胞を圧力の一過的低下にさらすことが好ましい。

【0042】

圧力の一過的低下にさらされている時に、外因性物質及び細胞は液体中にあることが好ましい。

【0043】

外因性物質及び細胞を含む液体を通して流れさせるように構成された寸法の密閉チャンネル内で、細胞を圧力の一過的低下にさらすことが好ましい。

【0044】

チャンネル内の液体の流れは変動速度を有することが好ましい。

【0045】

流れは少なくとも1m/sの最小ピーク速度を有することが好ましい。

【0046】

流れは少なくとも5m/sの最小ピーク速度を有することが好ましい。

【0047】

流れは50m/s以下の最大ピーク速度を有することが好ましい。

【0048】

流れは100m/s以下の最大ピーク速度を有することが好ましい。

【0049】

液体の流れに影響を与え、その結果、チャンネル内に液体の流れが層流である1つ以上の領域があるように、及び／またはチャンネル内に液体の流れがほふく流である1つ以上の領域があるように、及び／またはチャンネル内に液体の流れが非定常流である1つ以上の領域があるように、チャンネルが構成されていることが好ましい。

【0050】

チャンネル内の領域の少なくとも1つにおけるフローダイバータ周囲の液体の流れの物体

10

20

30

40

50

レイノルズ数 (Re_o) は、非定常流を引き起こすのに十分であることが好ましい。

【0051】

物体レイノルズ数 (Re_o) は少なくとも40であることが好ましい。

【0052】

物体レイノルズ数 (Re_o) は2000以下であることが好ましい。

【0053】

液体の流れはチャンネル内の1つ以上のフローダイバータに影響されることが好ましい。

【0054】

液体の流れが非定常流であるチャンネル内の1つ以上の領域はフローダイバータの下流にあることが好ましい。

10

【0055】

フローダイバータの下流で細胞を圧力の一過的低下にさらすことが好ましい。

【0056】

フローダイバータは密閉チャンネル内に配置された障害物であることが好ましい。

【0057】

障害物は柱であることが好ましい。柱は円柱形であることがより好ましい。

【0058】

チャンネルを通して流れる際に、細胞が少なくとも $1.01 \times$ 細胞の最小直径の幅及び高さ、または直径の間隙を通過しなければならないように、障害物がチャンネル内に位置することが好ましい。

20

【0059】

間隙は少なくとも $1.01 \times$ 細胞の最小直径の幅及び高さ、または直径を有することが好ましい。

【0060】

間隙は少なくとも $2 \times$ 細胞の最小直径の幅及び高さ、または直径を有することが好ましい。

【0061】

間隙は少なくとも $10 \times$ 細胞の最小直径の幅及び高さ、または直径を有することが好ましい。

【0062】

間隙は少なくとも $100 \times$ 細胞の最小直径の幅及び高さ、または直径を有することが好ましい。

30

【0063】

障害物は 10 nm の最大幅を有することが好ましい。

【0064】

障害物は $20\text{ }\mu\text{ m}$ の最大幅を有することが好ましい。

【0065】

障害物は $100\text{ }\mu\text{ m}$ の最大幅を有することが好ましい。

【0066】

障害物は 1 mm の最大幅を有することが好ましい。

40

【0067】

細胞内に外因性物質を導入する高スループット方法を、ラージスケール製造の要求を満足するように適応させるための多数の利点が存在する。例えば、マイクロ流体デバイスなどのデバイスは、外因性物質の存在下で細胞を1回以上の圧力の一過的低下にさらすように適切に設計及び操作することができる。有利には、非常に低コストで、場合によりデバイス当たりわずか数ドルの範囲で、簡素なプラスチックからデバイスが製造され得る。

【0068】

したがって、本発明の第2態様において、液体中の細胞への外因性物質の導入方法に用いるためのデバイスであって、

液体に懸濁させた細胞及び外因性物質が通って流れるように構成された寸法の少なくと

50

も部分的に密閉されたチャネル；ならびに

チャネル内の1つ以上のフローダイバータ；
を含み、フローダイバータがフローダイバータのすぐ下流に少なくとも1つの圧力が低下した領域をもたらすデバイスを提供する。

【0069】

圧力が低下した領域はフローダイバータのすぐ下流の少なくとも1つの非定常流の領域に生じることが好ましい。

【0070】

デバイスはマイクロ流体デバイスであることが好ましい。

【0071】

デバイスは図4に従って構成されていることが好ましい。

【0072】

デバイスは図5に従って構成されていることが好ましい。

【0073】

デバイスは図6に従って構成されていることが好ましい。

【0074】

デバイスは図7に従って構成されていることが好ましい。

【0075】

デバイスは図8に従って構成されていることが好ましい。

【0076】

デバイスは図9に従って構成されていることが好ましい。

【0077】

デバイスは図10に従って構成されていることが好ましい。

【0078】

デバイスは、前述の態様のいずれか1つに従って液体中の細胞に外因性物質を導入する方法に用いられることが好ましい。

【0079】

したがって、本発明の第3態様において、前述の態様のいずれか1つに従って作製された外因性物質を含む細胞を提供する。

【0080】

したがって、本発明の第4態様において、第4態様の細胞を含む細胞懸濁液を提供する。

【0081】

したがって、本発明の第5態様において、第3態様の細胞または第4態様の細胞懸濁液、及び医薬品として許容可能な希釈剤、凍結保存剤、担体または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【0082】

したがって、本発明の第6態様において、第2態様のデバイスを含むキットを提供する。

【0083】

本発明は、細胞内への外因性物質の導入に関する。本明細書で用いる場合、用語「外因性」は、細胞が外因性物質の存在下で圧力の一過的低下にさらされる前に細胞外に存在する任意の物質を意味する。用語「外因性」は、細胞外で開発、成長または発生した物質に関するとして理解されるであろう。外因性物質は自然発生してもよく、合成されてもよい。本出願の文脈において、用語「自然発生」は、物質に関する限り、天然に存在する任意の物質を意味し、生物活性物質を含み得る。自然発生物質は、天然においては自然発生しない、当該技術分野において公知の技術によって天然から適切に単離される形で改変され得る。本出願の文脈において、用語「合成」は自然発生ではなく、ヒトの技術的介入によって作製されることを意味する。合成タンパク質及び核酸との関連では、これは当該技術分野において公知の組換え、化学的合成またはコンビナトリアル技術によって生成された分子

10

20

30

40

50

を包含する。合成物質は自然発生物質の模倣物であってもよく、または天然に存在する物質と類似していなくてもよい。

【0084】

外因性物質は、物質が導入される細胞内で生物学的に活性であり得る。あるいは、外因性物質は導入された後で細胞に対して検出可能な影響を及ぼさない場合もある。

【0085】

細胞は、当該細胞が圧力の一過的低下にさらされた際に一時的に透過化され得る細胞膜または細胞壁を有する任意の細胞であり得る。細胞は、本発明の方法において圧力の一過的低下にさらされる前または後で、生存可能であってもなくてもよい。細胞は老化していてもよく、していなくてもよい。本発明の方法は、細胞内に外因性物質を導入する受動的10
方法であり得るので、生存可能及び／または活発に分裂している細胞で本発明の方法を実施することは必須ではないと理解されよう。例えば、細胞質における特定のオルガネラを同定するために外因性物質が細胞内に導入される場合、本発明の方法は死細胞（それ以上代謝することのできない細胞）で実施され得る。別の例では、細胞内に導入される外因性物質が細胞死の選択マーカーである場合、本発明の方法は生細胞及び死細胞の混合物で実施され得る。

【0086】

本発明の特定の実施形態において、細胞は細菌細胞、哺乳類細胞、酵母細胞、配偶子（例えば精細胞もしくは卵細胞）、植物細胞または昆虫細胞である。本発明は前駆細胞、特に幹細胞、より好ましくは造血幹細胞または間葉系幹細胞も企図すると理解されよう。細胞は培養されていてもよく、組織サンプルから抽出されてもよく、及び／または不死化されてもよい。植物細胞を企図する実施形態において、本発明の方法に従う処理の前に、細胞壁を完全にまたは部分的に除去してプロトプラストを形成することが理解されよう。細胞は初代培養由来であってもよく、連続（二次）培養由来であってもよい。細胞は任意の組織型に由来し得る。細胞は終末分化していてもよく、していなくてもよい。細胞は単離細胞であることが好適である。「単離」は、精製された、または合成的手段によって生成された場合に、天然の状態において通常付随するコンポーネント、または生成時に存在するコンポーネントをほとんどまたは実質的に含まない物質を意味する。したがって、用語「単離」は精製または合成物質もその範囲内に含む。20

【0087】

当業者であれば理解するであろうが、好ましい開始細胞密度は細胞型及び／または外因性物質に依存し得る。本発明の好ましい実施形態及び特に哺乳類細胞に関する好ましい実施形態において、開始細胞密度は約200万細胞／mL～約1000万細胞／mL、及び間のすべての整数である。30

【0088】

本明細書に記載の「細胞内への外因性物質の導入」の文脈において、用語「導入」は、外因性物質が少なくとも細胞の最も外側の隔膜、すなわち細胞壁または細胞膜内に送達される、移動するまたは転移することを意味する。外因性物質は細胞の最も外側の隔膜を越えて移動し、細胞壁または細胞膜を通過して細胞の細胞質領域に進入し得る。外因性物質は細胞内のオルガネラ中に移動し得る。具体的には、外因性物質は細胞の核内に移動し得る。40

【0089】

本発明の実施形態において、細胞内に導入される外因性物質は、有機低分子、核酸、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、多糖、量子ドット、ナノ粒子、単糖、金粒子、ビタミン及びステロイド、ならびにこれらの組合せからなる群から選択される。外因性物質は正味電荷を有する必要はない。

【0090】

核酸は、PNA、DNA、RNA、miRNA及びsiRNA、ならびにこれらの組合せからなる群から選択されることが好ましい。DNAはオリゴヌクレオチドまたはプラスミドであることが好ましい。50

【0091】

本発明の特定の実施形態において、プラスミドは発現ベクターである。発現ベクターは、自己複製性染色体外ベクター、例えばプラスミドなどまたは宿主ゲノム中に組み込まれるベクターのいずれかであり得る。本明細書で用いる場合、用語「ベクター」は、細胞における核酸の送達または発現を補助するための媒体として用いられる任意の分子のことをいう。ベクターは、DNA、RNA、miRNA、siRNAまたはタンパク質を発現することが好ましい。「ベクター」はポリヌクレオチド分子、好適には例えば、ポリヌクレオチドを挿入またはクローニングすることができるプラスミド、バクテリオファージ、ウイルス、酵母または植物、脊椎動物もしくは無脊椎動物をはじめとする高等真核生物に由来するDNA分子を意味する。ベクターは好ましくは1つ以上の固有の制限部位を含有し、標的細胞もしくは組織もしくは前駆細胞もしくはその組織をはじめとする所定の宿主細胞において自律複製可能、またはクローニングされた配列が複製可能なように所定の宿主のゲノムに組み込み可能であり得る。したがって、ベクターは自律複製ベクター、すなわち染色体外物として存在するベクターとすることができ、その複製は染色体複製とは独立しており、例えば直線状もしくは閉環状プラスミド、染色体外要素、微小染色体、または人工染色体がある。ベクターは自己複製を保証する任意の手段を含有することができる。あるいは、ベクターは、宿主細胞内に導入された場合に、ゲノム中に組み込まれ、組み込まれた染色体（複数可）とともに複製されるものとして行うことができる。ベクターシステムは単一のベクターまたはプラスミド、2種以上のベクターまたはプラスミドを含むことができ、これらはともに宿主細胞のゲノム中に導入しようとする全DNA、またはトランスポゾンを含む。ベクターの選択は一般に、ベクターを導入しようとする宿主細胞とのベクターの適合性に依存することになる。いくつかの実施形態において、ベクターはウイルスベクターまたはウイルス由来ベクターであり、脊椎動物または無脊椎動物及び好適には哺乳類細胞において作用可能に機能する。そのようなベクターはボックスウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスまたは酵母に由来し得る。ベクターは、選択マーカー、例えば好適な形質転換体の選択に用いることのできる抗生物質耐性遺伝子なども含むことができる。そのような耐性遺伝子の例は当業者には公知であり、抗生物質カナマイシン及びG418（Geneticin（登録商標））に対する耐性をもたらすnptII遺伝子、ならびに抗生物質ハイグロマイシンBに対する耐性をもたらすhph遺伝子が挙げられる。

10

20

30

【0092】

本発明の他の実施形態において、ベクターはウイルスベクター、好ましくはレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである。ベクターは細菌人工染色体または酵母人工染色体であってもよい。

【0093】

本発明との関係において、用語「溶解」は、細胞の細胞壁／細胞膜が十分に損なわれ、その結果、細胞の内容物の大部分がもはや細胞壁／細胞膜の内側に含まれておらず、そのため細胞が生存不能となることを意味する。しかし、たとえ細胞が溶解していなくても、本発明で有用であるためには必ずしも生存可能である必要はない。当業者であれば、細胞が溶解していないという条件で、得られる形質移入細胞が生存可能であることを必要とせず、外因性物質を細胞に形質移入することが望ましい状況があり得ると理解するであろう。例えば、外因性物質が細胞内の特定のタンパク質の位置または発現プロファイルに結合して示すように設計されたマーカーまたは抗体である場合、細胞の生存力はアッセイ結果の決定的要因にはなり得ない。さらなる例において、本発明の方法は、溶解してはいないが壊死しており、それでも対象とされるものである細胞をもたらし得る。

40

【0094】

本発明の特定の実施形態において、細胞は本発明の方法において圧力の一過的低下にさらされた後で生存可能である。「生存可能」な細胞は細胞代謝及び／または細胞分裂が可能なものであると理解されよう。細胞代謝が可能な細胞は、分子を分解してエネルギーを解放すること（一般に異化と呼ばれる）、分子（例えば多糖、脂質、核酸及びタンパク質

50

など)を生成し、及び／またはエネルギーを消費すること(一般に同化と呼ばれる)が可能なるものである。生存可能な細胞は、細胞代謝は可能であるが、恒久的に細胞周期のG₀期にあり、細胞分裂が不可能なものであり得る。

【0095】

本発明の方法は細胞の集団を形質移入するために用いられ得るが、この細胞の集団の中には、溶解した(ゆえに生存可能でない)細胞もあれば、溶解していないが生存可能でない細胞もあり、一方で生存可能なものもあり得る。

【0096】

本明細書で用いる場合、用語「圧力の低下」は、そのような低下への細胞の曝露に関する限り、その区域のすぐ周りの圧力よりも比較的低い圧力の区域に細胞がさらされることを意味する。この区域の圧力は一様であってもよく、または多様な圧力の局所的領域を有してもよいが、ただし、こうした局所的領域が依然としてその区域の周りの圧力と比較して低い圧力を有する場合に限る。この区域の周りの圧力は一様であってもよく、または多様な圧力の局所的領域を有してもよいが、ただし、こうした局所的領域がその区域と比較して高い圧力を有する場合に限る。

【0097】

「圧力」は、当該技術分野において公知のように、物質によってその周囲に及ぼされる単位面積当たりの力を意味する。圧力のSI単位はパスカル(Pa)である。他の一般に用いられる圧力の測定用の単位としては、キロパスカル(kPa)、重量ポンド／平方インチ(PSI)、水銀柱ミリメートル(mmHg)、ミリバール(mbar)、及び標準気圧(atm)が挙げられる。特に真空に関する圧力はトル(Torr)で測定され得る。本出願において、用語「kPa」を用いる場合、絶対圧ではなくゲージ圧を意味し、0 kPaのゲージ圧は101.325 kPaの絶対圧を意味する。

【0098】

圧力の一過的低下は、周囲の区域の圧力と比較して低い圧力の区域の間の圧力差との関連で定義され得る。圧力の一過的低下は、低い圧力の区域の最低圧力及び周囲の区域の最高圧力との関連で定義され得る。例えば、低い圧力の区域の最低圧力が-10 kPaであり、周囲の区域の最高圧力が100 kPaである場合、圧力差は110 kPaとなる。別の例では、低い圧力の区域の最低圧力が20 kPaであり、周囲の区域の最高圧力が500 kPaである場合、圧力差は480 kPaとなる。さらなる例において、低い圧力の区域と周囲の区域との圧力差が200 kPaの場合があるが、これは低い圧力の区域の最低圧力が-100 kPa~1000 kPaの範囲であり、周囲の区域の最高圧力が100 kPa~1200 kPaの範囲である結果であり得る。さらに別の例において、低い圧力の区域と周囲の区域との圧力差が50 kPaの場合があるが、これは低い圧力の区域の最低圧力が0 kPa~150 kPaの範囲であり、周囲の区域の最高圧力が50 kPa~200 kPaの範囲である結果であり得る。

【0099】

任意の1つの細胞型に印加することができる最高及び最低圧力は有能な当業者には明らかであろう。低すぎる圧力では、本方法の効率が損なわれる場合があり、高すぎる圧力では、細胞が破裂する場合がある。最適な圧力差は、本出願の例への参照によって及び定型的な実験を通して特定の細胞に対して特定され得る。

【0100】

外因性物質の存在下で細胞をさらす圧力の一過的低下は、少なくとも10 kPa、少なくとも100 kPa、少なくとも500 kPaまたは少なくとも1000 kPaの低下であることが好ましい。ある実施形態において、圧力の一過的低下は、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも350、少なくとも400、少なくとも450、少なくとも500、少なくとも550、少なくとも600、少なくとも650、少なくとも

700、少なくとも750、少なくとも800、少なくとも850、少なくとも900、少なくとも950または少なくとも1000の圧力（kPa）の低下である。

【0101】

圧力の低下との関連における用語「一過的」は、細胞が低下した圧力にさらされた後、細胞がその後さらされる圧力はより高い圧力になるという点で、圧力の低下が一時的に生じることを意味する。本発明のいくつかの実施形態では、圧力の一過的低下は、少なくとも10ナノ秒以上1ミリ秒以下の間、特定の曝露中に達する最低圧力に細胞がさらされることを意味する。この時間は、周囲の区域の最高圧力に細胞がさらされる時から周囲の区域の圧力と比較して低い圧力の区域の最低圧力に細胞がさらされる瞬間までの間の時間を含まないことが理解されよう。この時間は、低い圧力の区域の最低圧力に細胞がさらされる時から周囲の区域の最高圧力に細胞がさらされる瞬間までの間の時間も含まない。

10

【0102】

任意の1つの細胞型の圧力の一過的低下にさらすことができる時間は、有能な当業者であれば決定可能であろう。長すぎる曝露では非効率的となる場合がある一方で、短すぎる曝露では細胞内に外因性物質が導入されない場合がある。最適な曝露時間は、本出願の例への参照によって及び定型的な実験を通して特定の細胞に対して決定することができる。

【0103】

少なくとも10ナノ秒、少なくとも100ナノ秒、少なくとも1マイクロ秒または少なくとも1ミリ秒間、外因性物質の存在下で細胞を圧力の一過的低下にさらすことが好ましい。本発明のある実施形態において、少なくとも15ナノ秒、少なくとも20ナノ秒、少なくとも25ナノ秒、少なくとも30ナノ秒、少なくとも35ナノ秒、少なくとも40ナノ秒、少なくとも45ナノ秒、少なくとも50ナノ秒、少なくとも60ナノ秒、少なくとも70ナノ秒、少なくとも80ナノ秒、少なくとも90ナノ秒、少なくとも100ナノ秒、少なくとも150ナノ秒、少なくとも200ナノ秒、少なくとも250ナノ秒、少なくとも300ナノ秒、少なくとも350ナノ秒、少なくとも400ナノ秒、少なくとも450ナノ秒、少なくとも500ナノ秒、少なくとも550ナノ秒、少なくとも600ナノ秒、少なくとも650ナノ秒、少なくとも700ナノ秒、少なくとも750ナノ秒、少なくとも800ナノ秒、少なくとも850ナノ秒、少なくとも900ナノ秒、少なくとも950ナノ秒、少なくとも100マイクロ秒、少なくとも200マイクロ秒、少なくとも300マイクロ秒、少なくとも400マイクロ秒、少なくとも500マイクロ秒、少なくとも600マイクロ秒、少なくとも700マイクロ秒、少なくとも800マイクロ秒、または少なくとも900マイクロ秒間、細胞を圧力の一過的低下にさらす。

20

30

【0104】

「一過的」は、周囲の区域の最高圧力に細胞がさらされる時から比較的低い圧力の区域の最低圧力に細胞がさらされる瞬間までの間の時間が1秒未満であるという点で、圧力の低下が比較的急速に生じることも意味する。本発明の特定の実施形態において、周囲の区域の最高圧力に細胞がさらされる時から比較的低い圧力の区域の最低圧力に細胞がさらされる瞬間までの間の時間は1ミリ秒未満である。同様に、いったん比較的低い圧力の区域の最低圧力に細胞がさらされてから、細胞がこの最低圧力にさらされている時と周囲の区域の最高圧力に細胞がさらされる時との間の時間は、10秒、100秒または1分未満である。本発明において、細胞がこの最低圧力にさらされている時と周囲の区域の最高圧力に細胞がさらされる時との間の時間は、膜を透過化するのに十分であるが細胞を溶解しない。

40

【0105】

本発明の方法を実施する際、細胞は外因性物質の存在下で2回以上の圧力の一過的低下にさらされ得る。いくつかの実施形態において、細胞は2回以上の圧力の一過的低下にさらされ得るが、この場合、圧力の一過的低下は比較的低い圧力の区域と周囲の区域との間の圧力差に関して同一であるかまたは異なる。本発明の他の実施形態において、一過的低下を定める圧力差は、比較的低い圧力の区域の同一または異なる最低圧力に起因し得る。一過的低下を定める圧力差は、周囲の区域の同一または異なる最高圧力にも起因し得る。

50

【0106】

例えば、細胞は圧力差が10kPaである圧力の一過的低下にさらされ、その後、圧力差が同様に10kPaである第2の圧力の一過的低下にさらされ得る。第1の10kPaの圧力の一過的低下は、比較的低い圧力の区域の最低圧力が50kPaであり、周囲の区域の最高圧力が40kPaである結果であり得る一方で、第2の10kPaの圧力の一過的低下は、比較的低い圧力の区域の最低圧力が20kPaであり、周囲の区域の最高圧力が30kPaである結果であり得る。

【0107】

別の例では、細胞は圧力差が300kPaである圧力の一過的低下にさらされ、その後、圧力差が80kPaである第2の圧力の一過的低下にさらされ得る。第1の300kPaの圧力の一過的低下は、比較的低い圧力の区域の最低圧力が100kPaであり、周囲の区域の最高圧力が400kPaである結果であり得る一方で、第2の300kPaの圧力の一過的低下は、比較的低い圧力の区域の最低圧力が-50kPaであり、周囲の区域の最高圧力が250kPaである結果であり得る。

【0108】

本発明の実施形態において、外因性物質の存在下で細胞を圧力の一過的低下にさらすが、この際両方とも液体中にある。液体は、通常細胞の溶解を引き起こすことのない任意の液体であってよく、本発明のいくつかの実施形態では、本方法の間中細胞の生存力を維持することができる。外因性物質は液体に可溶性であるか、懸濁可能であるか、または分散可能であると好ましい。例えば、液体は細胞増殖培地、または緩衝生理食塩溶液、例えばリン酸緩衝生理食塩水、またはトリス緩衝生理食塩水などであり得る。液体は血液、血漿もしくは血清または別の体液、例えば全血、脊髄、骨髄または脂肪由来の体液などであり得る。血液または体液は処理の改善のために分画、分離及び／または希釈され得る。液体は細胞内への外因性物質の導入を促進する作用物質または化学物質を含有し得るが、液体は必ずしも細胞内への外因性物質の導入を促進する何らかの追加の作用物質または化学物質を含有する必要はない。例えば、本発明のある実施形態において、液体はいかなる追加のカチオン性脂質、カチオン性ポリマー、カルシウムイオン（例えば、塩化カルシウムもしくはリン酸カルシウムの形態）、マグネシウムイオン（例えば、塩化マグネシウムの形態）またはデンドリマーも含まない。これらの化学物質及び作用物質の多くは細胞にとって有毒であり、本発明の方法に用いられる液体におけるこれらの化学物質または作用物質の余分な量の不在または実質的な不在は、本発明の方法を実施する際の望ましくない細胞溶解または細胞死を防止し得ると理解されよう。

【0109】

「追加の」は、液体中に通常及び／または本来存在し得るものに加えた化学物質または作用物質の一切の追加の量を意味する。例えば、多くの体液、例えば血液などは本来カルシウムイオンを含むが、本発明の特定の実施形態において、本発明の方法における液体として用いる前に血液にリン酸カルシウムを一切加えない。別の例では、細胞増殖培地は通常マグネシウムイオンを含み得るが、本発明の特定の実施形態において、本発明の方法における液体として用いる前に増殖培地に塩化マグネシウムを一切加えない。

【0110】

本発明の好ましい実施形態において、外因性物質及び細胞を含む液体を通して流れさせるように構成された寸法のチャネル、好ましくは密閉チャネル内の液体中で、細胞を圧力の一過的低下にさらす。本発明との関係において、「チャネル」はある長さ及び2つ以上の端を有する任意の構成要素で、構成要素の長さにわたって延びる空洞を有し、空洞を通して、及び2つ以上の端の開口部を通して液体が流れることができるものを意味する。チャネルの寸法は、液体中の関連する細胞型が流れることを可能とするように構成されているだけでよい。チャネルの断面は任意の形状を有し得る。チャネルは少なくともいくつかの密閉区画を含むべきであるが、チャネル内に所要の圧力変化が生じ得る領域がある限り、必ずしもその長さ全体に沿って密閉されている必要はない。

【0111】

液体の流れは本質的にチャネルの一方の端から他方の端までであり、流れの方向が「上流」及び「下流」の方位を決定すると理解されよう。

【0112】

チャネルを通る流れは様々な手段によって引き起こされ得るが、これには、限定はしないが静水圧、流体力学的圧力及び／または電気浸透流が挙げられる。液体の流れは圧力源によって推進され得るが、これには、限定はしないが圧力ポンプ、ガスボンベ、コンプレッサポンプ、真空ポンプ、シリンジ、シリンジポンプ、蠕動ポンプ、ピストン、キャピラリーポンプ、心臓、筋肉または重力が挙げられる。

【0113】

液体がチャネルに入る際には、チャネルを通る液体の流れを発生させる圧力源が定常流、例えばほふく流または層流などをもたらすと好ましい。ほふく流は、液体の慣性力が液体の粘性力よりも著しく小さい液体の流れのことをいうと、当業者であれば理解していよう。層流は、液体内部の慣性力が液体の粘性力以上であるが、液体において遷移流または乱流を引き起こすほどには十分大きくない液体の流れのことをいう。

【0114】

チャネルを通る液体の流れはある速度を有し、この速度は、限定はしないがチャネルの構成、圧力源の強さ及び性質、液体の粘度、細胞型及び液体中の細胞密度及び／または外因性物質の性質及び量を含めた要因に影響され得る。

【0115】

本発明の好ましい実施形態において、液体の速度はチャネルを通して流れる際に変動し、この変動速度はチャネルを通して流れる際の液体の最大速度及び最小速度の観点から定義され得る。液体の速度は、液体がチャネルを通して流れる際に特定の最大速度と最小速度との間で変動し得る。好ましくは、チャネルを通して流れる液体の変動速度は 1 m/s 、またはより好ましくは 5 m/s の最小ピーク速度を有する。本発明の他の好ましい実施形態において、チャネルを通して流れる液体の変動速度は、 10 m/s の最大速度、 20 m/s の最大速度、 30 m/s の最大速度、 40 m/s の最大速度、 50 m/s の最大速度、 60 m/s の最大速度、 70 m/s の最大速度、 80 m/s の最大速度、 90 m/s の最大速度または 100 m/s の最大速度を有する。したがって、チャネルを通して流れる液体のピーク速度は $1\text{ m/s} \sim 100\text{ m/s}$ の範囲の間で変動し得ると理解されよう。

【0116】

液体がチャネルを通して流れる際には、変動速度を有する流れに加えて、流れの種類が変化し得る。例えば、流れは層流、ほふく流及び非定常流の間で交互に入れ替わり得るが、ここで、非定常流は層渦列、遷移渦列、乱渦列、遷移流または乱流のことをいう。当業者であれば、ほふく流、層流及び非定常流の間の違いを理解していよう。本発明の特定の実施形態において、液体の流れに影響を与え、その結果、チャネル内に液体の流れが層流である1つ以上の領域があるように、チャネル内に液体の流れがほふく流である1つ以上の領域があるように、及びチャネル内に液体の流れが非定常流である1つ以上の領域があるように、チャネルが構成される。

【0117】

流れの種類は2つの異なるレイノルズ数を計算することによって推定され得るが、1つは密閉チャネル及び／またはフローダイバータの間の領域を通る特定の流れ (Re_c) に対するものであり、1つは物体の周りの流れ (Re_o) に対するものである。例えば、ほふく流では、 Re_c は1よりも著しく小さく ($Re_c \ll 1$)、層流では、 Re_c は1と約2000との間 ($1 < Re_c < 2000$) である。例えば、物体の周りの非定常流では、 Re_o は約40より大きい ($Re_o > 40$)、または非定常流を引き起こすのに十分である。 Re_c は、液体の動粘度 (ν) に対する平均液体速度 (u) 及び水力直径 (D_h) の比として定義され得るが、この式は下記で定義される。幅が高さよりも著しく大きい (逆もまた同様) 幅広のチャネルでは、 D_h は短い方の距離の長さの2倍で置き換えられ得る。柱の間の流れのチャネルレイノルズ数 (Re_c) を計算する場合、この式が用いられ、チャネルの水力直径 (D_h) は柱の間のチャネルの水力直径のことをいい (図1)、平

10

20

30

40

50

均液体速度（ $\bar{u}$ ）は柱の間の平均速度のことをいう。

【数 1】

$$Re_c = \bar{u} D_h / \nu$$

$\bar{u}$: 平均液体速度

【0118】

本発明のある実施形態において、液体の流れが層流であるチャンネル内の領域の少なくとも1つにおける液体の流れのチャンネルレイノルズ数（ Re_c ）は、少なくとも100以上2000以下である。ある実施形態において、液体の流れが層流であるチャンネル内の領域の少なくとも1つにおける液体の流れのチャンネルレイノルズ数（ Re_c ）は、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも600、少なくとも700、少なくとも800、少なくとも900、少なくとも1000、少なくとも1100、少なくとも1200、少なくとも1300、少なくとも1400、少なくとも1500、少なくとも1600、少なくとも1700、少なくとも1800、少なくとも1900または約2000である。

10

【0119】

本発明の好ましい実施形態において、液体の流れはチャンネル内の1つ以上のフローダイバータに影響される。本明細書で用いる場合、「フローダイバータ」は、チャンネルを通る液体の流れを局所的領域においてそらし、任意により非定常流を伴って、圧力が低下した局所的領域をもたらす任意の要素または部材である。

20

【0120】

特定の実施形態において、フローダイバータはチャンネル内に配置された障害物である。用語「障害物」は、チャンネル内に配置された任意の物体のことをいい、液体の流れを物体の周りにそらし、障害物の実質的にすぐ下流に、圧力が低下した、または非定常流を伴う圧力が低下した局所的領域をもたらす。障害物は、細胞が障害物の先へとチャンネルを通じて進むことができるようにしなければならない。好ましい実施形態において、障害物は、チャンネルの長さに対してだいたい垂直の方向で、チャンネルの内面から外向きに延びている場合がある。障害物はチャンネルの長さの1つの面から別の面まで延びていてよい。あるいは、障害物はチャンネルの長さの1つの面から部分的に延びているだけでもよい。

30

【0121】

本発明のある実施形態において、障害物は10nm～1mmの幅及びこの間のすべての整数の幅を有する。好ましい実施形態において、障害物は50nm超、100nm超、500nm超、800nm超、1 μ m超、10 μ m超、50 μ m超、100 μ m超、200 μ m超、500 μ m超、800 μ m超または約1mmの幅を有する。好ましい実施形態において、障害物は1mm未満、800 μ m未満、500 μ m未満、200 μ m未満、100 μ m未満、50 μ m未満、10 μ m未満、1 μ m未満、800nm未満、500nm未満、100 μ m未満または50nm未満の幅を有する。特に好ましい実施形態において、障害物の幅は約20 μ mである。

40

【0122】

特定の実施形態において、障害物は柱である。本発明との関係において、「柱」である障害物は、その最大の幅以上の高さを有する角柱である障害物であり得る。柱は円柱形、三角形、正方形、多角形、翼形または任意の他の形状であってよく、具体的な形状は、圧力の一過的低下を所与のチャンネルレイノルズ数（ Re_c ）に、及び／または非定常流を物体レイノルズ数（ Re_o ）に調和させるように選択され得る。特に好ましい実施形態において、柱は円柱形である。

【0123】

チャンネルを通りフローダイバータのすぐ上流にある流れの平均速度は、圧力の一過的低

50

下がフローダイバータのすぐ下流で引き起こされるか、または圧力の一過的低下及び非定常流の局所的領域がフローダイバータのすぐ下流で引き起こされるような速度であり得る。フローダイバータが柱である本発明の実施形態において、平均上流速度の適切な誘導は、柱の周りの液体の流れに対するレイノルズ数 (Re_o) を用いて計算され得る。円柱の周りの液体の流れでは、おそらく少なくとも 40 ($Re_o \geq 40$) の Re_o が、柱の下流に非定常流を引き起こすのに必要である。他の柱の形状では、非定常流を発生させるのに必要な Re_o は柱の具体的な形状に依存し、(1) 十分な大きさの圧力の一過的低下、または (2) 非定常流及び十分な大きさの圧力の一過的低下を引き起こすように、平均上流液体速度が調整される必要があるであろう。 Re_o は以下に示すように、液体の動粘度 (ν) に対する平均上流速度 (u) 及び柱の代表長さ (l) の比と定義される。

10

【数 2】

$$Re_o = \bar{u} l / \nu$$

 $\bar{u}$: 平均上流速度

【0124】

本発明のある実施形態において、液体の流れが非定常流であるチャンネル内の領域の少なくとも 1 つにおける液体の流れの物体レイノルズ数 (Re_o) は、少なくとも 40 以上 2000 以下である。ある実施形態において、液体の流れが非定常流であるチャンネル内の領域の少なくとも 1 つにおける液体の流れの物体レイノルズ数 (Re_o) は、少なくとも 40 、少なくとも 50 、少なくとも 60 、少なくとも 70 、少なくとも 80 、少なくとも 90 、少なくとも 100 、少なくとも 200 、少なくとも 300 、少なくとも 400 、少なくとも 500 、少なくとも 600 、少なくとも 700 、少なくとも 800 、少なくとも 900 、少なくとも 1000 、少なくとも 1100 、少なくとも 1200 、少なくとも 1300 、少なくとも 1400 、少なくとも 1500 、少なくとも 1600 、少なくとも 1700 、少なくとも 1800 、少なくとも 1900 または約 2000 である。好ましい実施形態において、液体の流れが非定常流であるチャンネル内の領域の少なくとも 1 つにおける液体の流れの物体レイノルズ数 (Re_o) は、 50 未満、 60 未満、 70 未満、 80 未満、 90 未満、 100 未満、 200 未満、 300 未満、 400 未満、 500 未満、 600 未満、 700 未満、 800 未満、 900 未満、 1000 未満、 1100 未満、 1200 未満、 1300 未満、 1400 未満、 1500 未満、 1600 未満、 1700 未満、 1800 未満、 1900 未満または 2000 未満である。

20

30

【0125】

いかなる特定の理論にも縛られることを望むものではないが、非定常流の局所的領域がフローダイバータの実質的にすぐ下流にある本発明の実施形態において、細胞は次の 2 つの形の圧力の増加にさらされ得る：(1) 非定常流に起因する圧力の局所的増加；及び (2) 圧力の一過的低下に続く圧力の増加。これにより透過化した細胞膜を横断する圧力低下が生じ得るが、この場合、細胞外圧力が細胞内圧力よりも高く、細胞膜付近の外因性物質の能動送達を促進し得る、及び／または例えば局所細胞外環境からサイトゾルへの拡散もしくは流れによって、外因性物質が細胞内に導入され得る。

40

【0126】

チャンネル内の任意の障害物の位置決定により一般に、チャンネルの他の領域よりも高さ、幅または直径が小さい、細胞が通過しなければならない流路または間隙を有するチャンネルの領域が得られることになる。しかし、こうした小さい寸法の領域は、外因性物質及び細胞を含む液体が依然としてそれを通して流れることができるようにも構成されなければならないと理解されよう。これを容易とするために、外因性物質及び細胞を含む液体がそれを通して流れることを可能とする必要がある、障害物によってチャンネル内に形成された間隙はいずれも、少なくとも $1.01 \times$ 当該細胞の最小直径であると好ましい。細胞は一般に完全な球状ではなく、そのため、細胞の最小直径は細胞の最も短い断面をとった場合の細胞の最小幅となることが理解されよう。

50

【0127】

本発明の特定の実施形態において、間隙は少なくとも1.01×細胞の最小直径の幅及び高さ、または直径を有する。他の実施形態において、間隙は少なくとも2×、5×、10×または100×細胞の最小直径の幅及び高さ、または直径を有する。

【0128】

本発明はまた、液体中の細胞に外因性物質を導入するためのデバイスであって、液体に懸濁させた細胞及び外因性物質が通って流れるように構成された寸法のチャネル；ならびにチャネル内の1つ以上のフローダイバータ；を含み、フローダイバータがフローダイバータのすぐ下流に少なくとも1つの圧力が低下した領域をもたらしデバイスにも関する。

【0129】

本発明の特定の実施形態において、デバイスはマイクロ流体デバイスである。

【0130】

本発明の医薬組成物は、適切な医薬品として許容可能な担体、希釈剤、凍結保護剤、または賦形剤を含むことが好適である。好ましくは、医薬品として許容可能な担体、希釈剤または賦形剤は哺乳類への、及びより好ましくはヒトへの投与に適している。「医薬品として許容可能な担体」は、生物学的にまたはそれとは別様に望ましくないものでない物質からなる医薬品媒体を意味する、すなわち、この物質は、一切のまたは実質的な副作用を引き起こすことなく、厳選された活性剤とともに被検者に投与され得る。担体は賦形剤及び他の添加剤、例えば希釈剤、界面活性剤、着色剤、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、保存剤などを含み得る。医薬品として許容可能な担体、希釈剤及び賦形剤について記載している有用な参考文献は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N. J. USA, 1991) 及び Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Pharmaceutical Press, London, 22nd Edition, 2012) であり、これらを参照により本明細書に援用する。

【0131】

細胞懸濁液を企図する実施形態において、懸濁液の液体は、追加の成分を含む、または含まない、本発明の方法を実施した液体であり得ると理解されるであろう。細胞懸濁液は、当該技術分野において理解されるように、乾燥させた、または代替として凍結乾燥させた製剤のことをいう場合もある。

【0132】

別段の定義がない限り、本明細書において用いるすべての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または等価な任意の方法及び物質を本発明の実施または試験に用いることができるが、好ましい方法及び物質を記載する。本発明において、次の用語を以下に定義する。

【0133】

冠詞「a」及び「an」は本明細書において、その冠詞の文法的対象の1つまたは2つ以上（すなわち少なくとも1つ）を指すために用いる。例として、「an element（要素）」は1つの要素または2つ以上の要素を意味する。本明細書で用いる場合、別途明記しない限り、単数形の使用は複数形を包含する（逆もまた同様）。

【0134】

「約」は、参照の数量、レベル、値、数、周波数、割合、寸法、サイズ、量、重量または長さに対して15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1%ほど変動する数量、レベル、値、数、周波数、割合、寸法、サイズ、量、重量または長さを意味する。

【0135】

本発明との関係において、単語「comprise（含む）」、「comprising（含む）」などは、排他的な意味とは対照的に、包括的な意味に、すなわち「含むに限

10

20

30

40

50

定はしない」という意味に解釈されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】本発明の実施形態に従うデバイスのユニット形状の概観を示す。

【図2】本発明の方法の実施形態のシミュレーション中に発生する圧力変化の概観を示す。

【図3】20×の倍率の蛍光顕微鏡検査（左）及び光学顕微鏡検査（右）によって得られた実験的形質移入データの概観であり、表1に示すパラメータに従ってp c D N A 3.1をH E K 2 9 3細胞に形質移入した。上画像はカラー表示であり、下画像はカラー画像の白黒表示である。

10

【図4】本発明の一実施形態に従う3列の柱（ $n_c = 3$ ）及び4行の柱（ $n_r = 4$ ）を備えるマイクロ流体デバイスの概略図である。

【図5】本発明の別の実施形態に従う3列の柱（ $n_c = 3$ ）及び4行の柱（ $n_r = 4$ ）を備えるマイクロ流体デバイスの概略図である。

【図6】本発明のさらに別の実施形態に従う3列の柱（ $n_c = 3$ ）及び4行の柱（ $n_r = 4$ ）を備えるマイクロ流体デバイスの概略図である。

【図7】本発明のまたさらなる実施形態に従う3列の柱（ $n_c = 3$ ）及び4行の柱（ $n_r = 4$ ）を備えるマイクロ流体デバイスの概略図である。

【図8】本発明の好ましい実施形態に従うデバイスデザインの断面図である。パネルAはアレイデザインの分解図（3×倍率）であり、パネルBはアレイ上に存在する柱デザインの分解図（9×倍率）である。

20

【図9】本発明の別の好ましい実施形態に従うデバイスデザインの断面図である。パネルAはアレイデザインの分解図（3×倍率）であり、パネルBはアレイ上に存在する柱デザインの分解図（9×倍率）である。

【図10】本発明のさらに別の好ましい実施形態に従う断面図である。パネルAはアレイデザインの分解図（3×倍率）であり、パネルBはアレイ上に存在する柱デザインの分解図（9×倍率）である。図10における図表示は縮尺通りには描かれていない。

【0137】

いくつかの図はカラー表示または要素を含む。カラーの図は請求により出願人から、または該当する特許庁から入手可能である。特許庁から入手する場合には手数料が課される場合もある。

30

【発明を実施するための形態】

【0138】

本明細書で詳述したある実施形態を参照して本発明を記載したが、他の実施形態によっても同様のまたは類似の結果を得ることができる。本発明の変形及び修正が当業者には明らかであり、本発明はすべてのそのような修正及び均等物を包含すること意図する。

【0139】

本発明を、以下の非限定的な実施例によりさらに説明する。

【0140】

実施例1

40

緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するp c D N A 3.1（Invitrogen（商標））を細胞モデルに形質移入することによって、本発明の方法及びデバイス进行评估した。用いたデバイスは柱のアレイを備えた構成のマイクロ流体デバイスであり、柱の間隙は細胞直径よりも大きかった。

【0141】

方法

シミュレーション及び解析

表1に示すパラメータ及び図1に示すデバイス形状について、有限体積法での数値流体力学（CFD）によるシミュレーションを用いて柱の間隙周辺の微小環境を調べた。図1は本発明に従うデバイスのユニット形状の概観を示しており、入口において速度（Q

50

）の液体が液体に懸濁した直径（ d_c ）の細胞とともに密閉チャネルに入り、ここで、 d_c は間隙幅（ g ）未満である。他の変数は柱直径（ d_p ）、チャネル幅（ w ）及びチャネル高さ（ h ）を表す。解析目的で入口長さを $100\text{ }\mu\text{m}$ 、出口長さを $1000\text{ }\mu\text{m}$ としてSolidWorksで三次元形状を構築した。ICEM CFD 14.5で構造メッシュを構築し、行列式、角度及びアスペクト比を用いて要素品質をチェックした。3.20GHzのIntel Core i5-3470 CPU及び16.0GBのRAMを備えたWindows 7 Enterprise 64-bitコンピュータ上でANSYS FLUENT 14.5を用いて解を得た。連成圧力-速度ソルバーを用いて速度、圧力及びせん断応力コンターについて解いた。狭窄部の内部寸法及び以下の式を用いて、表1のパラメータに従ってチャネルレイノルズ数（ Re_c ）を計算した。

$$Re_c = 2\rho Q / \mu (g + h)$$

【0142】

チャネル上面、底面及び柱によって定められる壁面の境界条件は滑りなしに設定した。流体側壁の境界条件はせん断力0に設定した。入口速度を平均速度で定義し、出口を圧力0の境界条件に設定した。

【0143】

【表1】

表1：実験パラメータの概要。

パラメータ	値
細胞型	HEK293
細胞密度	1×10^5 細胞 ml^{-1}
細胞直径（ d_c ）	$13\text{ }\mu\text{m}$
蛍光分子	pcDNA 3.1（GFPプラスミド）
分子密度	890 ng ml^{-1}
チャネル高さ（ h ）	$40\text{ }\mu\text{m}$
チャネル幅（ w ）	$400\text{ }\mu\text{m}$
柱直径（ d_p ）	$20\text{ }\mu\text{m}$
柱間隙（ g ）	$30\text{ }\mu\text{m}$
行偏移（ s ）	$0\text{ }\mu\text{m}$
行ピッチ（ p_r ）	$50\text{ }\mu\text{m}$
行（ n_r ）	9柱
列ピッチ（ p_c ）	N/A
列（ n_c ）	1柱
媒体粘度（ μ ）	$7.987 \times 10^{-4}\text{ Pa s}$
媒体密度（ ρ ）	$1,006\text{ kg m}^{-3}$
流量（ Q ）	5 ml min^{-1}
チャネルレイノルズ数（ Re_c ）	375
物体レイノルズ数（ Re_o ）	131
振動周波数（ f ）	44.4 kHz

【0144】

形質移入

マイクロ流体デバイスのマスターモールドは標準的なフォトリソグラフィ技術を用いて製造し、一方で、デバイスはソフトリソグラフィを用いて複製し、酸素プラズマを用いてガラスに接合した。デバイスデザインの概観及び形質移入パラメータをそれぞれ図1及び表1に示す。

【0145】

HEK293（ヒト胎児腎293）細胞を細胞培地に 1×10^5 細胞 ml^{-1} で懸濁し、pCDNA3.1 GFPプラスミドを 890 ng ml^{-1} の密度で接種した。この懸濁液をシリンジの中に入れ、マイクロ流体デバイス中に 5 ml min^{-1} の流量で注入したが、フローセルは柱の間隙が $30 \mu\text{m}$ である $20 \mu\text{m}$ の直径の柱で隔てられた8ユニットのアレイを備えていたので、柱の間隙において375の Re_c に相当する。これは131の Re_o にも相当する。その後、細胞を6日間インキュベートしてから、蛍光及び光学顕微鏡検査の両方によって画像化して緑色蛍光タンパク質遺伝子発現を調べた。

【0146】

結果

10

シミュレーション及び解析

シミュレーションにより、高圧領域は図1のデバイス中の柱のすぐ上流に生じ、低圧領域は柱のすぐ下流に生じることが示された。これは、細胞が柱を通り過ぎて流れる際に、圧力の急な一過的低下にさらされることを意味する。加えて、これらのシミュレーションは非定常流が生じるかどうか確認するために一過的として実行した。図2は、本発明の方法の実施形態のシミュレーション中に発生する圧力変化の概観を示し、(a)圧力コンター、(b)速度の大きさ、(c)細胞速度を近似するのに用いることができる液体のx方向の速度、及び(d)非定常流に起因する交番ジェットを伴うy方向の液体速度を示す。図2に示すように、密閉チャンネル内には、y方向のバルク流に垂直のx方向の著しい流速が存在し、非定常流が生じていることを意味する。

20

【0147】

シミュレーションによれば、細胞は、デバイスの密閉チャンネル内に配置された柱の間隙を通過する際に、 43.5 kPa の局所的圧力を有する周囲の区域から移動し、 -50.8 kPa の最低圧力を有する比較的低い圧力の区域に入るので、 94.3 kPa の圧力の一過的低下にさらされる。圧力の一過的低下の大きさは振動の位相に応じて変化し得る。加えて、この圧力の一過的低下の間の液体中の細胞速度は 15 m s^{-1} と推定され、 $-35.4 \times 10^6 \text{ kPa s}^{-1}$ の圧力の一過的低下(dP/dt)に対して約 $40 \mu\text{m}$ の距離にわたって生じ、ここで、 dP/dt は時間変化(dt)で割った圧力変化(dP)である。 dP は極大と極小との間の圧力変化である。 dt は極大圧力と極小との間の時間変化である。

30

【0148】

次に、図2dに示すように、非定常流条件が細胞を、細胞が移動している方向(x方向)に直交する方向(y方向)の流速の急速な変化にさらし、ここで、ピークy方向速度は $-8.5 \text{ m s}^{-1} \sim 8.3 \text{ m s}^{-1}$ の範囲であり、こうした局所的非定常流は幅約 $20 \mu\text{m}$ である。局所的非定常流の大きさは、細胞が柱から離れるにつれて減衰し、約 $500 \mu\text{m}$ 後で完全に減衰するが、この間に、細胞は $3.4 \text{ m s}^{-1} \sim 8.5 \text{ m s}^{-1}$ の速度の大きさの非定常流のパルスを受取る。この期間中、細胞速度は $10 \text{ m s}^{-1} \sim 15 \text{ m s}^{-1}$ と推定され、非定常流の幅は約 $20 \mu\text{m}$ であり、パルス時間は $2.0 \mu\text{s} \sim 1.3 \mu\text{s}$ の範囲であることを示している。細胞が圧力の一過的低下及び非定常流のパルスにさらされた後、細胞がマイクロ流体デバイスから出るにつれて、または細胞が

40

間隙から離れるにつれて、圧力は出口と同じ圧力まで増加する。

【0149】

シミュレーションは、非定常流への曝露が、局所的細胞外圧力が局所的細胞内圧力よりも高い細胞膜を横断する圧力低下を引き起こし、それにより能動的(機械的)送達を促進することを示している。加えて、デバイス出口へ移動している最中の圧力の増加が、透過化した細胞膜を横断する圧力低下に起因する能動送達を適切に助長する。

【0150】

形質移入

図3に示すように、柱アレイを介した圧力の一過的低下及び非定常流の使用は、HEK293細胞にpCDNA3.1 GFPプラスミドを形質移入するために用いることが

50

できる。上段の画像は下段の画像と同視野で撮影したものである。パネルの左側の画像における明るい点は p c D N A 3. 1 の形質移入に成功した H E K 2 9 3 細胞を表しており、形質移入の 6 日後で生存可能であり、緑色蛍光タンパク質を発現し続けていた。

【0151】

シミュレーションにより非定常流が見込まれ、層流条件から非定常流条件への遷移に基づいて、どの速度が Re_0 の計算に最も適切であるかを決定するために予備シミュレーションを用いた。 Re_0 の計算に用いられる液体の速度は文献により異なるが、前述のシミュレーションにより、平均上流速度が適切な速度であるという確証が得られる。例えば、円柱の周りの液体の流れでは、物体レイノルズ数 (Re_0) は以下の式で計算され得る。

【数3】

$$Re_0 = \rho v_{\infty} d / \mu$$

v_{∞} は円柱に対するバルク液体の速度を指し、この場合、円柱より前の液体の平均上流速度である。これは、表 1 に示すパラメータでは 8.68 m/s となり、 131.2 の Re_0 が得られる。

【0152】

振動の周波数を推定するために、円柱の周りの液体の流れに適合するように Re_0 を $40 \sim 190$ として、以下に示す相関関係を用いる。ストローハル数 (Sr) (非定常流を記述するために用いられる無次元数) は、円柱の周りの流れについて以下の相関関係により Re_0 から計算され得る。

【数4】

$$Sr = 0.2665 - 1.018 / \sqrt{Re_0} \quad \text{ただし } (40 < Re_0 < 190)$$

【0153】

この計算の結果、 Sr は 0.17 となり、振動の周波数 (f) は、液体速度 (v) 及び柱の直径 (d_p) に等しい代表長さ (L) により以下の式で計算され得る。

【数5】

$$f = Sr v / d_p$$

【0154】

上記のパラメータに対して、非定常流は 44.4 kHz の周波数で振動すると推定される。こうした非定常振動は柱自身の内部の構造振動を誘起することも知られている。したがって、細胞は誘起された構造振動とともに圧力の一過的低下、 44.4 kHz の非定常流にさらされ得ると考えられる。

【0155】

1 つ以上のフローダイバータ、例えば (限定はしないが) 柱などの間の層流 ($Re \gg 1$) は、柱の実質的にすぐ下流に圧力が一過的に低下した領域を形成するために用いられ得る。これは、図 1、及び 4 ~ 10 に示すものなどのデバイスの柱を細胞が通り過ぎて流れる際に、細胞の周りの周囲圧力を急にかつ一過的に低下させるために用いられ得る。加えて、 $Re_0 > 40$ である場合、こうした流れ特性は非定常流を引き起こすことが知られており、上記の実施例において、これが細胞に (1) 圧力の一過的低下及び (2) 非定常流のパルスを与える。さらに、これは、閉塞の問題を緩和する細胞寸法よりも大きいチャネル寸法を用いて達成され得る。これにより、細胞膜を横断した細胞質内への外因性物質の移入が容易となる。Pawell et al (Pawell R. S., et al. (2013). Limits of parabolic flow theory in microfluidic particle separation: a computational study. ASME 4th International Conference on Micro/Nanoscale Heat and Mass Transfer, Hong Kong, China. December 11-14.) によると、柱の間の 100 より大きいチャネルレイノルズ数 ($Re_c > 100$) では、せん断応力が無視できる領域が形成される。すなわち、こうした条件の下では、膜透過化はせん断応力に起因せず、形質移入は圧力の一過的低下及び非

10

20

30

40

50

定常流条件、加えて、非定常流によって誘起される任意の条件、例えば Renfer et al. (Renfer A., et al. (2013) Vortex shedding from confined micropost arrays. Microfluidics and Nanofluidics. 15 (2): 231-242) によって観察されたような柱における構造振動などの結果であり得ることを示す。

【0156】

実施例 2

圧力の低下の大きさ及び持続時間が形質移入に影響を及ぼす程度を調べるために実験を行った。

【0157】

方法

HEK293細胞の2つの培養物を100,000細胞 ml^{-1} の密度で接種し、培養物1はHEK293細胞及び約900ng 10^{-5} 細胞の密度で接種した緑色蛍光タンパク質pCDNA 3.1を含んでおり、培養物2はHEK293細胞及び100ng 10^{-5} 細胞の密度で接種した25塩基対オリゴヌクレオチドを含んでいた。両方の培養物を真空デシケーター内に置き、圧力を2分かけて-95kPaに低下させた。その後、真空を解放し、10秒かけて大気圧に戻した。

【0158】

結果及び考察

圧力の長時間低下を用いたこの実験の結果、形質移入は起きなかった。GFPを発現した細胞はなく、オリゴヌクレオチド及び細胞の共局在化は無視できるものであった。実施例1と比較して、圧力の低下の大きさは相当大きかった（実施例1における20kPaの低下に対して95kPaの低下）。しかし、低下速度は大幅に遅かった。実施例1において、圧力の一過的低下が生じる速度(dP/dt)は $-35.4 \times 10^6 \text{ kPa s}^{-1}$ であると推定される。本実施例では、 dP/dt は約 -0.8 kPa s^{-1} である。したがって、細胞膜は気体透過性であり、そのため、 dP/dt が低すぎる場合、膜を透過化することなく細胞膜を通して自然に気体移動が生じるので、 dP/dt は細胞膜の透過化の一因となり得る。 dP/dt が十分となると、細胞膜の物理的性質が細胞内環境から細胞外環境への急速な気体移動に適応できなくなると考えられる。したがって、細胞膜に孔が形成される程度まで応力が加わり、それによって細胞内への外因性物質の導入が可能となり得る。

【0159】

実施例 3

図4は、3列の柱($n_c = 3$)及び4行の柱($n_r = 4$)を備えるマイクロ流体デバイスの概略図である。アレイは、柱の直径(d_p)が柱の間の間隙(g)と等しく($d_p = g$)、各列の柱が前の間隙からの流れを二分岐させるのに十分な距離だけ偏移しており、偏移距離(s)が行ピッチの半分に等しく($s = p_r / 2$)、列ピッチ(p_c)が行ピッチに等しい($p_c = p_r$)ように構成されている。チャンネルの幅、列の数(n_c)及び行の数(n_r)は、このまたは類似のデザインを用いた具体的なデバイスそれぞれで異なる。

【0160】

図5は、3列の柱($n_c = 3$)及び4行の柱($n_r = 4$)を備えるマイクロ流体デバイスの概略図である。アレイは、柱の直径(d_p)が柱の間の間隙(g)よりも大きく、各列の柱が前の間隙からの流れを二分岐させるのに十分な距離だけ偏移しており、偏移距離(s)が行ピッチの半分に等しく($s = p_r / 2$)、列ピッチ(p_c)が行ピッチに等しい($p_c = p_r$)ように構成されている。チャンネルの幅、列の数(n_c)及び行の数(n_r)は、このまたは類似のデザインを用いた具体的なデバイスそれぞれで異なる。

【0161】

図6は、3列の柱($n_c = 3$)及び4行の柱($n_r = 4$)を備えるマイクロ流体デバイ

10

20

30

40

50

スの概略図である。アレイは、柱の直径 (d_p) が柱の間の間隙 (g) よりも小さく ($d < g$)、各列の柱が前の間隙からわずかに偏移しており、偏移距離 (s) が行ピッチの半分よりも小さく ($s < p_r / 2$)、列ピッチ (p_c) が行ピッチよりも大きい ($p_c > p_r$) ように構成されている。チャンネルの幅、列の数 (n_c) 及び行の数 (n_r) は、このまたは類似のデザインを用いた具体的なデバイスそれぞれで異なる。

【0162】

図7は、3列の柱 ($n_c = 3$) 及び4行の柱 ($n_r = 4$) を備えるマイクロ流体デバイスの概略図である。アレイは、柱の直径 (d_p) が柱の間の間隙 (g) よりも小さく ($d_p < g$)、各列の柱が前の間隙からわずかに偏移しており、偏移距離 (s) が行ピッチの半分よりも小さく ($s < p_r / 2$)、偏移方向が各行で切り換わるように構成されている。列ピッチ (p_c) は行ピッチよりも大きい ($p_c > p_r$)。チャンネルの幅、列の数 (n_c) 及び行の数 (n_r) は、このまたは類似のデザインを用いた具体的なデバイスそれぞれで異なる。

【0163】

本発明のデバイスデザインの好ましい実施形態を図8、9及び10に示す。いずれの実施形態も、各図のパネルA及びBに具体的に示す異なる内部柱形体とともに単一の入口及び単一の出口を備える。これらの実施形態において、基板はすべて溶融シリカであり、基板の厚さ (t_s) は $700\ \mu\text{m}$ である。ユニットは2つのスルーホールを有する蓋を含み、スルーホールはそれぞれ $700\ \mu\text{m}$ の直径 (D_h) を有する。蓋及び基板の接合強度または破壊圧力は $10\ \text{atm}$ よりも大きく ($\gg 10\ \text{atm}$) すべきであり、接合されると、デバイス全体の厚さ (t_d) は $1.40\ \text{mm}$ となる。 $4.80\ \text{mm} \times 9.80\ \text{mm}$ のデバイス実装面積は $200\ \mu\text{m}$ のダイシング幅を考慮している。 $70\ \text{mm} \times 30\ \text{mm}$ ジグの全体にわたって、デバイスを 7×6 で合計42デバイス整列させることを企図している。デバイスの下部部品はディープ反応性イオンエッチングした溶融シリカであり、レーザー加工した溶融シリカウエハにバルク材接合を用いて接合した。図8及び9に示す実施形態では、 $1.5\ \text{mm}$ の幅、 $7.5\ \text{mm}$ の長さ及び $40.0\ \mu\text{m}$ の深さを有するチャンネルを形成するように基板がエッチングされている。図10に示す実施形態では、 $0.6\ \text{mm}$ の幅、 $5.5\ \text{mm}$ の長さ及び $40.0\ \mu\text{m}$ の深さを有するチャンネルを形成するように基板がエッチングされている。

【0164】

図8に示す実施形態において、アレイデザイン (パネルA) は、x方向に30本 (n_x) の柱及びy方向に1行 (n_y) の柱を、x方向のアレイピッチ (P_x ; 別途列ピッチ p_c とも呼ぶ) が $50.0\ \mu\text{m}$ で含む。この実施形態では、柱デザインはパネルBに示すように、柱の直径 ($d_p = 20\ \mu\text{m}$) が、この実施形態で存在する柱の間の $30.0\ \mu\text{m}$ の間隙 (間隙 = $P_x - d_p$) より小さいように構成される。

【0165】

図9に示す実施形態において、アレイデザイン (パネルA) は、x方向に30本 (n_x) の柱及びy方向に3行 (n_y) の柱を、x方向のアレイピッチ (P_x ; 別途列ピッチ p_c とも呼ぶ) が $50.0\ \mu\text{m}$ 、y方向 (P_y ; 別途行ピッチ p_r とも呼ぶ) が $750\ \mu\text{m}$ で含む。この実施形態では、柱デザインはパネルBに示すように、柱の直径 ($d_p = 20\ \mu\text{m}$) が、この実施形態で存在する柱の間の $30.0\ \mu\text{m}$ の間隙 (間隙 = $P_x - d_p$) より小さいように構成される。

【0166】

図10に示す実施形態において、アレイデザイン (パネルA) は、x方向に12本 (n_x) の柱及びy方向に3行 (n_y) の柱を、x方向のアレイピッチ (P_x ; 別途列ピッチ p_c とも呼ぶ) が $50.0\ \mu\text{m}$ 、y方向 (P_y ; 別途行ピッチ p_r とも呼ぶ) が $500\ \mu\text{m}$ で含む。この実施形態では、柱デザインはパネルBに示すように、柱の直径 ($d_p = 20\ \mu\text{m}$) が、この実施形態で存在する柱の間の $30.0\ \mu\text{m}$ の間隙 (間隙 = $P_x - d_p$) より小さいように構成される。

【0167】

図に示したような本発明の特に好ましい実施形態に適した範囲を以下に示す。

【0168】

柱直径の範囲 (d_p) : 10 nm ~ 5 mm ;

【0169】

列の数 (n_c) : 1 ~ 10, 000 ;

【0170】

行の数 (n_r) : 3 ~ 10, 000 ;

【0171】

間隙の範囲 (g) : 10 nm ~ 5 mm ;

【0172】

偏移 (s) : 0 ~ 5 mm ;

【0173】

列ピッチ (p_c) : 30 nm ~ 50 mm ; 及び

【0174】

行ピッチ (p_r) : 30 nm ~ 50 mm

【0175】

本明細書で引用したすべての特許、特許出願、及び刊行物の開示は、その全体を参照により本明細書に援用する。

【0176】

本明細書におけるいかなる参照文献の引用も、そのような参照文献が本出願の「先行技術」として利用可能であるという自認と解釈されるべきではない。

【0177】

本明細書全体を通して、いずれか1つの実施形態または特徴の特定の集合に本発明を限定することなく、本発明の好ましい実施形態を記載することを意図している。したがって、本開示を踏まえて、本発明の範囲から逸脱することなく、例示した特定の実施形態において様々な修正及び変更が可能であることを当業者であれば理解するであろう。すべてのそのような修正及び変更が添付の特許請求の範囲内に含まれることを意図する。

10

20

【図 1】

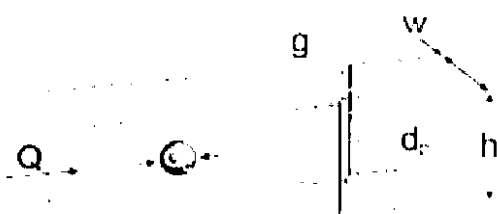
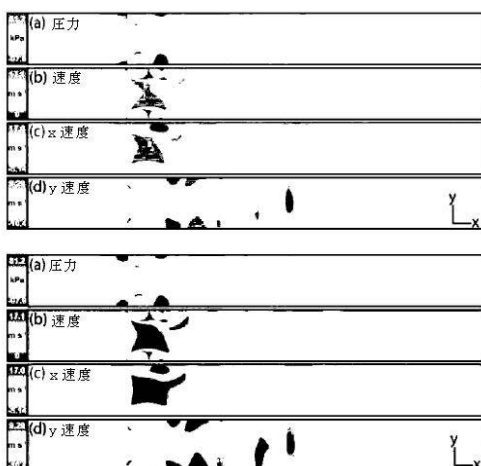
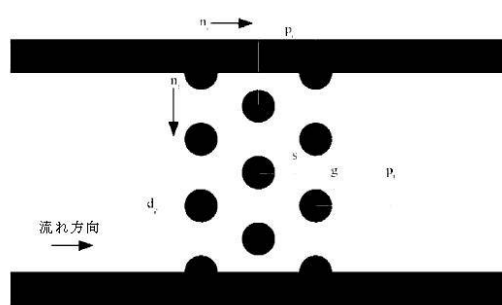


Figure 1

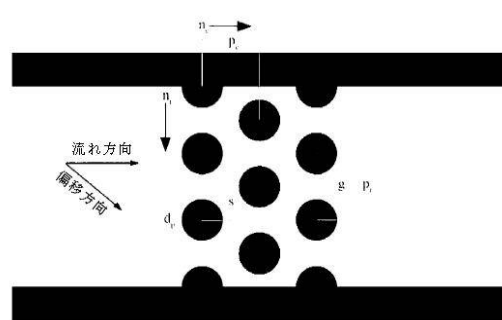
【図 2】



【図 4】



【図 5】



【図 3】

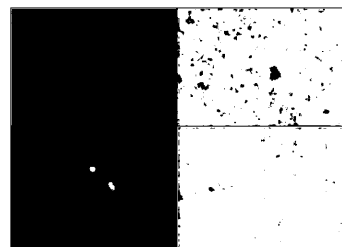
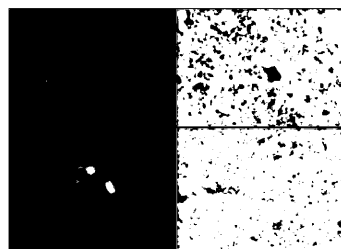
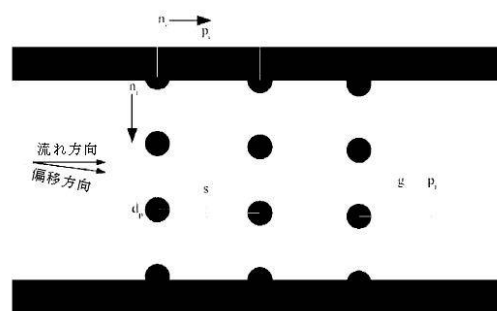
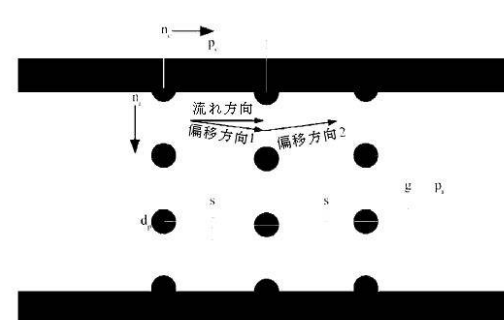


Figure 3

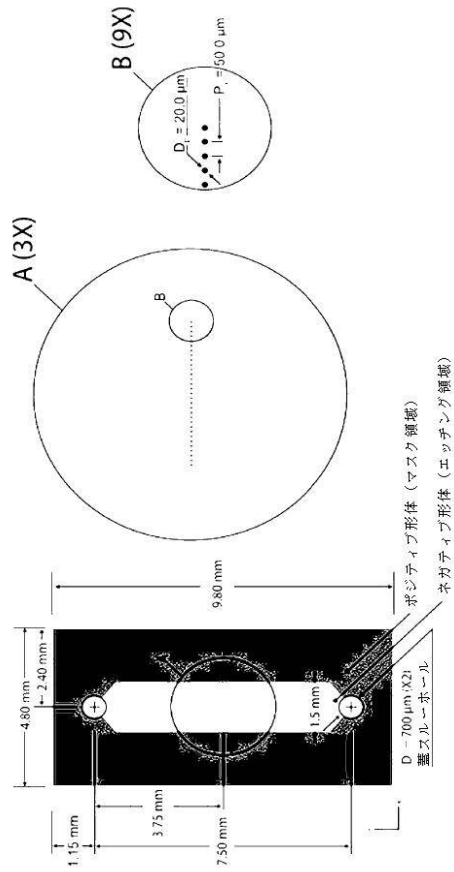
【図 6】



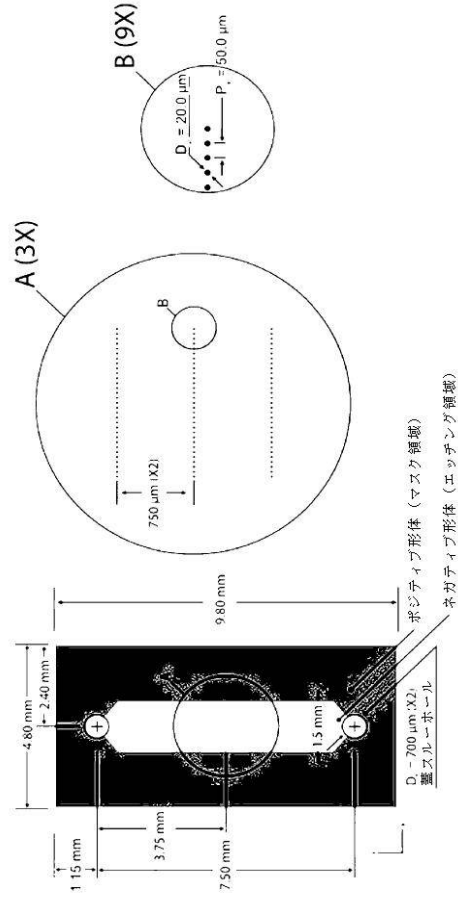
【図 7】



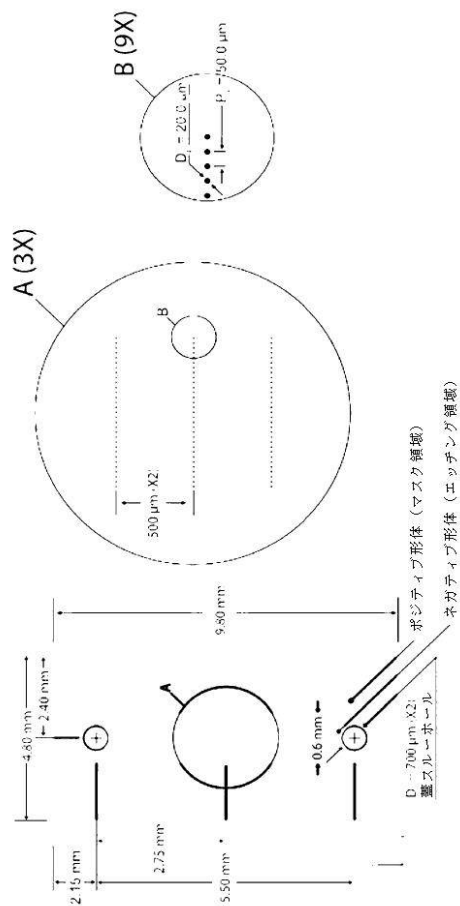
【図 8】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

(72)発明者 パウエル, ライアン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94104, サンフランシスコ, ジェシー ストリート 4
79

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 特開2005-287419 (JP, A)

特表2014-504509 (JP, A)

特表2014-533936 (JP, A)

特開2006-191877 (JP, A)

国際公開第2015/050205 (WO, A1)

特開2013-029391 (JP, A)

国際公開第01/005994 (WO, A1)

特表2005-500064 (JP, A)

特表2003-533974 (JP, A)

特表2006-501449 (JP, A)

Proc. Symp. Ultrason. Electron., 2006年, Vol.27, pp.371-374

生体医工学, 2005年, Vol.43, No.2, pp.211-215

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12M 1/00 - 3/10

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/BIOSIS (STN)