

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4982489号
(P4982489)

(45) 発行日 平成24年7月25日(2012.7.25)

(24) 登録日 平成24年4月27日(2012.4.27)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 13/00 (2006.01) C 1 2 N 13/00
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 15 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2008-519864 (P2008-519864)	(73) 特許権者	503147734
(86) (22) 出願日	平成18年7月6日(2006.7.6)		ロンザ ケルン ゲーエムベーハー
(65) 公表番号	特表2008-544757 (P2008-544757A)		ドイツ連邦共和国 50829 ケルン
(43) 公表日	平成20年12月11日(2008.12.11)		ナッテルマンナリー 1
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/006620	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開番号	W02007/006487		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開日	平成19年1月18日(2007.1.18)	(74) 代理人	100096183
審査請求日	平成21年5月22日(2009.5.22)		弁理士 石井 貞次
(31) 優先権主張番号	05014758.6	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成17年7月7日(2005.7.7)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	ミュラー-ハルトマン, ヘルベルト
			ドイツ連邦共和国 50937 ケルン, ズルツバルクシュトラーセ 88

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 少量のサンプルを電流で処理する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

電流を用いて生物学的材料を処理する方法であって、以下のステップ：

少なくとも 1 0 0 m m o l / L のイオン強度を有する、5 0 μ L 以下のバッファー溶液を準備するステップ、

該バッファー溶液に生物学的材料を加えるステップ、

少なくとも 1 0 μ s の予め設定された持続時間にわたって該バッファー溶液に少なくとも 1 回の電圧パルスを印加して、少なくとも 1 k V / c m の電界強度を有する電界を生成するステップであって、該電圧パルスは少なくとも 1 0 0 μ s の持続時間にわたって少なくとも 1 回中断され、その後継続されること

を含む、上記方法。

【請求項 2】

前記電圧パルスが、2 回 ~ 1 0 回中断される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

2 0 0 μ s ~ 2 m s の持続時間が、前記電圧パルスの少なくとも 1 回の中断に対して予め設定されている、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記持続時間が、3 0 0 μ s、4 0 0 μ s、5 0 0 μ s、6 0 0 μ s、7 0 0 μ s、8 0 0 μ s、9 0 0 μ s、1 m s または 1 . 5 m s である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

生物学的材料を含む前記バッファー溶液が、1 ~ 50 μ Lの総体積を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記体積が、10 ~ 40 μ L、15 ~ 25 μ Lまたは10 ~ 20 μ Lである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記電圧パルスが、最大10 kV/cmの電界強度を有する電界を生成する、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記電界強度が、1 ~ 8 kV/cm、2 ~ 6 kV/cmまたは2 ~ 4 kV/cmである、請求項7に記載の方法。

10

【請求項9】

前記電圧パルスが、最大5 msの予め設定された持続時間を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記予め設定された持続時間が、20 μ s ~ 2 ms、100 ~ 1000 μ sまたは100 ~ 600 μ sである、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記電圧パルスが、5 μ s、10 μ s、20 μ s、30 μ s、40 μ s、50 μ s、60 μ s、100 μ sまたは200 μ sの電圧付加時間後に中断される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項12】

前記電界が2つの電極の間に生成され、該2つの電極間の距離が0.5 ~ 5 mmである、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記距離が、1 ~ 4 mmまたは1.5 ~ 2 mmである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記生物学的材料を反応容器中で処理し、該容器はほぼ正方形、長方形または円形の断面を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

30

反応容器が長方形の断面を有する反応チャンバを有し、該チャンバは、平面平行配置にある2つの電極により横方向に画定されており、該2つの電極は、反応チャンバの1ペアの向かい合わせの側壁の下側に配置されている、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学的材料を電流で処理する方法に関する。特に、生物学的材料は比較的高いイオン強度を有する少量のバッファー溶液に加えられ、このバッファー溶液中で、予め設定された持続時間にわたって、高電圧パルスにより強い電界が生成される。

【背景技術】

40

【0002】

例えばDNA、RNAまたはタンパク質などの生物学的に活性な分子の生細胞への導入は、これらの分子の生物学的な機能の分析のために重要なツールである。細胞への外来性分子の導入のための好ましい方法はエレクトロポレーションであり、これは、化学的な方法とは異なり、他の生物学的に活性な分子の同時輸送によるものではない。エレクトロポレーションでは、外来性分子は、細胞に合ったバッファー溶液から、または細胞培養培地から、短時間の電流により細胞に導入される。短い電流パルスの作用により、細胞膜が外来性分子に対して透過性にされる。また、細胞懸濁液は、多くの場合、いわゆるキュベット、すなわち上部が開放された狭い容器に入れられ、該キュベットの内部は、互いに平行かつ向かい合わせに配置された2ペアの側壁により形成される。キュベットの内部は細胞

50

懸濁液、すなわち通常はバッファー水溶液または細胞培養培地（処理対象の細胞が懸濁されている）を収容することができる。そのようなキュベットは、一般的には1ペアの向かい合わせの側壁の下側に1ペアの電極を備え、これにより電圧の印加が可能になる。これらの電極での放電は、電極間の、そして細胞懸濁液を通る電流をもたらす、核酸もしくは他の分子が細胞内に輸送されるようにするが、または選択された条件によっては細胞溶解を引き起こす。

【0003】

強い電界の短時間の付加、すなわち高密度電流の短いパルスにより、細胞、細胞派生物、細胞内粒子および/またはビヒクルが融合する場合もある。このいわゆるエレクトロフュージョン (electrofusion) では、細胞はまず、例えば不均一な交流電界を介して、膜が近接した接触状態に置かれる。続く電界パルスの印加は、膜の一部分の結合をもたらす、これにより結果として融合が起こる。エレクトロフュージョンには、エレクトロポレーションに用いるのと同類の装置を用いることができる。

10

【0004】

エレクトロポレーションの際には、生物学的に活性な分子は、最初に、細胞膜に一次的に開けられた「孔」(pore) を通って細胞質に入る。一部の場合には、該分子は目的とする機能を細胞質で既に発揮し、続いて、特定の条件では、核にも入る場合がある。特に、生物学的に活性な分子が核でのみ目的とする機能を発揮できる場合の用途、例えば、遺伝子の発現を解析しようとする場合、および特に、分裂しないか、するとしても低い分裂速度しか有しない細胞（例えば初代細胞）を用いる場合には、生物学的に活性な分子が直接的に核に輸送されるとすれば有利である。

20

【0005】

US 2004014220（参照によりその全文が本明細書中に組み入れられる）に開示されているエレクトロポレーション法から、上記のような場合には、高いトランスフェクション効率を達成するには、少なくとも2 kV/cmの電界強度を有する強い電界を、高電圧パルスにより少なくとも10 μsの予め設定された持続時間にわたってバッファー溶液中に生成する必要があることが公知になっている。

【0006】

高電流を用いて生物学的材料を処理する方法は、US 2005064596からも公知である（参照によりその全文が本明細書中に組み入れられる）。該文献に開示された方法では、生物学的材料を少なくとも200 mmol/Lのイオン強度を有するバッファー溶液に加えることにより、高いトランスフェクション効率を実現しながら細胞致死率を低くすることができる。

30

【0007】

第一に、複数の反応パッチを同時に、かつ可能な限り短い時間で試験しなければならない生化学用途および製剤学的用途、特にHT分析（HT = ハイスループット）では、可能な限り多数の反応チャンバ（例えば96または384）を準備することが必要である。この文脈で用いられる反応容器は、一般的には、マルチウェルプレート、マイクロタイタープレートまたはマルチウェルと呼ばれる。これらの容器の個々の反応チャンバ（「ウェル」）は、比較的小型で、したがって少量しか収容することができない。さらに、多くの場合、バッファーおよび細胞材料を節約するために、より少ないサンプル体積を用いることが有利である。また、特に、貴重な細胞材料（例えば初代細胞）の場合には、通常、少量の細胞しか利用することができない。よって、小さなサンプル体積を用いることは、大抵は望ましいことであり、一部の場合には必要なことである。

40

【0008】

電氣的加水分解は、液体中で強い電界を生じさせる場合には副次的効果として排除することができない。最も穏やかなケースで、電解は電極表面での気泡 (gas bubble) の発生により感知することができ、気泡の発生は続いて泡 (foam) の生成をもたらす。極端なケースでは、爆発型の気体の発生が起こり、これが、結果として生じる排除効果 (displacement effect) により電極間の領域からのサンプルの飛び出し (expulsion) を引き起こす

50

(以下では「飛び散り」(spattering)と称する)。後者は一般的にはサンプル損失か、または少なくとも予定している時間の間、電界中にサンプルが残っていない状態をもたらす。したがって、サンプルの飛び散りは、試験の結果もしくはサンプルの処理を定性的におよび/または定量的に損なわせ、さらに試験結果の再現性に悪影響を及ぼす。つまり、電界中での生物細胞の処理が必要な種々の用途では(特にエレクトロポレーションの際には)、電解は望ましくない副次的効果を構成する。

【0009】

理論上は、飛び散りの発生確率は電気伝導度を下げることにより低減することができるであろう。しかしながら、堅固な細胞壁を有しない高等生物の細胞は、通常は特定の浸透圧の溶液中でしか生存することができない。一般的には、電解質も浸透活性を有する溶解物質に含まれ、溶液に多少なりとも高い電気伝導度をもたらす。例えば、エレクトロポレーションを行うためには、通常は細胞懸濁液にイオンを含めることが必要とされ、また、US 2005064596(参照によりその全文が本明細書中に組み入れられる)に開示されているように、それは有利でもある。つまり、実施上の理由から、電気伝導度を低下させることにより飛び散りの発生確率を低下させることには限界がある。したがって、上記のような場合には、様々な程度での電解を予期することができる。

【0010】

ここで、飛び散りの発生は確率的な事象である。このことは、この現象を確率でしか説明できないことを意味する。指定された条件によっては、望ましくない飛び散りの発生頻度は、例えば5%よりも低い場合もあるし、また95%を超えることもあり得る。結果として、飛び散りの発生確率は、高い電流密度で少量を用いる場合に特に高い。1つのプロセスを製品製造段階に発展させるためには、適切な方法によりこの確率を低下させることが課題となり、適切な方法とは消費者により用いられて確率を例えば1%未満とするものである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

すなわち、本発明により解決しようとする課題は、電極間の領域からのサンプルの望ましくない飛び出しの発生頻度を著しく低下させる、上記のタイプの方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

上記の課題は、本発明の方法により解決される。該方法では、生物学的材料を、少なくとも約100mmol/Lのイオン強度を有する最大約50 μ Lのバッファー溶液に加え、該バッファー溶液中で、少なくとも約1kV/cmの電界強度を有する電界が、少なくとも1回の電圧パルスにより少なくとも10 μ sの予め設定された持続時間にわたって生成される。電圧パルスは、少なくとも約100 μ sの持続時間にわたって少なくとも1回中断され、その後継続される。ここで、電圧パルスの予め設定された持続時間は、中断を含めないパルスの現実の持続時間に対応する。すなわち、それは電流が実際に流れる合計時間に対応する。つまり、電圧パルスが中断される追加の時間の結果として、パルスの合計の持続時間は延長され、それにより、開始から終了までの電圧パルス、すなわち予め設定された持続時間に達するまでの電圧パルスは、実際には予め設定された持続時間よりも長くなる。本発明の方法では、電圧パルスを、予め決められた時間の後に予め決められた持続時間にわたって中断し、その後継続する。このプロセスを、電圧パルスの予め設定された持続時間に達するのに必要な回数、繰り返す。これに関して、電圧パルスは、バッファー溶液中の気体の発生を十分に低減して、電極間の領域からのサンプルの飛び出しを防止するのに十分な頻度で中断する必要がある。また、個々の中断の持続時間は、電極間の領域からのサンプルの飛び出しを防止するのに十分に長くする必要がある。つまり、電圧パルスを中断することにより、用いる方法の効率、特にトランスフェクション効率を維持したままで、上記以外は指定された条件の下で、飛び散りの発生頻度を顕著に低下させる

10

20

30

40

50

ことができる。

【0013】

望ましくない飛び散りの発生頻度は、一方で、例えばエレクトロポレーションの際には、電流密度（電界強度×比電気伝導度）および電界が印加される時間に正に依存する。ここで、電流密度および時間は、サンプル体積あたりに電解により生じる気体の量に直接的に関連する。電界強度および時間により、例えば高いトランスフェクション効率または分子の核への直接的な輸送が達成される条件が決定される。これら2つのパラメータのうち一方の、細胞タイプに特異的な最適条件からの低減は、通常、試験結果が定性的および/または定量的にはずれることにつながる。つまり、これらのパラメータのうち一方を低減することは不可能であるか、または限られた範囲でしか認められない。他方では、飛び散りの発生確率は、サンプルの体積（かさ（mass））に負に依存する。この依存は、より大きな体積がより不活性であることによる。短い時間枠の中では、比較的大きな体積はキュベット間隙中に残り易いように思われる。つまり、小さな体積では、それ以外は同等な条件であれば、飛び散りは特に頻繁に起こる。したがって、この飛び散りについての問題は、HTの分野の方法では特に重要な役割を持つ。しかしながら、特定の用途、特にハイスループットの分野では、サンプルの体積は大きくすることができない。また、増大する体積の多数のサンプルは自動液体操作システムでは扱うことができないか、または大きな費用を用いなければ扱うことができず、また、利用可能な細胞材料の量（および場合によっては試薬の量）は、それに伴うコストの面から制限される場合が多い。さらに、大きな体積の使用は、他の理由から不利である。細胞濃度の低下は、例えばエレクトロポレーションの際の細胞生存率に関して、またはエレクトロフュージョンの効率に関して、一部の点から、目立った劣悪な結果をもたらす。つまり、特にHT法では、体積の増加は、事実上、選択肢ではない。したがって、本発明の方法は、それ以外は既定の条件の下で、飛び散りの発生頻度を効率的かつ信頼性高く顕著に低減することを可能にする。

10

20

【0014】

本発明の有利な実施形態では、電圧パルスは2～10回中断され、3回、4回、5回、6回、7回、8回および/または9回がこれに含まれる。ここで、中断の回数は予め設定された条件に依存し、特に、電流密度、パルスの持続時間および利用可能な体積に依る。中断の最適回数は、多くの場合、個々の用途および/または用いる細胞タイプについて経験的に決定しなければならない。しかしながら、そのような経験的な決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。

30

【0015】

本発明によれば、少なくとも1回中断について、約200 μ s～2ms、好ましくは約300 μ s、約400 μ s、約500 μ s、約600 μ s、約700 μ s、約800 μ s、約900 μ s、約1msまたは約1.5msの持続時間を予め設定することができる。中断時間が一定の長さを超えない限り、方法の結果の質に悪影響を及ぼすことなく、サンプルの飛び散りを防止することができる。したがって、最適な中断の持続時間および/または中断回数は、それぞれ、通常は個々の用途および/または用いる細胞タイプについて経験的に決定しなければならない。しかしながら、そのような経験的な決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。飛び散りの発生確率の低減に必要なとされる持続時間はまた、特に予め設定された条件、すなわち電流密度、パルスの持続時間および利用可能な体積に依存する。

40

【0016】

生物学的材料を含むバッファ溶液の体積は、例えば、総量で約1～約50 μ L、好ましくは約10～約40 μ L、特に好ましくは約15～約25 μ L、特に約10～約20 μ Lとすることができる。また、用いる体積は一般的に、生物学的材料の利用可能性および/または化学的処理条件に依存する。

【0017】

本発明の別の有利な実施形態では、電圧パルスが最大約10kV/cm、好ましくは約1～約8kV/cm、特に好ましくは約2～約6kV/cm、特に約2～約4kV/cm

50

の電界強度を有する電界をつくり出す。そのような高電圧パルスは、真核細胞のエレクトロポレーション、とりわけ核への核酸の導入には特に好適である。

【0018】

本発明の別の有利な実施形態では、電圧パルスは最大約5ms、好ましくは約20 μ s～約2ms、特に好ましくは約100～約1000 μ s、特に約100～約600 μ sの予め設定された持続時間を有する。これに関して、予め設定された持続時間とは、中断を含めない電圧パルスの既定の長さ、すなわち、電流が実際に印加され、電流が流れている時間である。予め設定された持続時間は、一般的には経験的に決定される値であり、個々の用途および/または用いる細胞タイプに最適なものである。特に、本発明の方法により提供される電圧パルスの中断によって、効率がわずかに低下することが予想される用途では、そのような低下した効率は、一部のケースでは、例えば経験的に決定した値を超えて、一定の限度まで該予め設定した持続時間を延長することにより改善することができる。このようにして、電圧パルスを中断することの考えられる悪影響を個々の場合で相殺することが可能である。

10

【0019】

本発明の有利な実施形態では、さらに、電圧パルスは約5 μ s、約10 μ s、約20 μ s、約30 μ s、約40 μ s、約50 μ s、約60 μ s、約100 μ sまたは約200 μ sの電圧付加時間(voltage interval)の概ね後に中断される。これは、第1の電圧付加時間、または1回以上の後続の電圧付加時間に当てはめることができる。したがって、電圧付加時間とは、バッファー溶液中で電圧が印加され、電界が生成される時間であり、これには中断時間(interruption interval)が続くか、または中断時間がこれに先行する。特定の条件では、1回以上の電圧付加時間を短くすることにより、飛び散りの発生確率をさらに低下させるか、かつ/または最小化することができる。

20

【0020】

本発明によれば、電界は2つの電極の間に生成されるものであり得る。2つの電極間の距離は、本発明の特に有利な実施形態では、約0.5～約5mm、好ましくは約1～約4mm、特に約1.5～約2mmとすることができる。いずれの場合にも、電極間の距離は、用いる反応容器の形状により画定されるべきものであり、それにより利用可能なバッファー溶液の体積が電極間の領域を十分にぬらすことができる。

30

【0021】

本発明の有利な実施形態では、さらに、生物学的材料の処理を、ほぼ正方形、長方形または円形の断面を有する反応容器中で行う。また、反応容器がほぼ長方形の反応チャンバを備え、該チャンバは平面平行配置にある2つの電極により横方向に画定されていてもよい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

以下に、例として図面を参照して、本発明をさらに詳しく説明する。

【0023】

図面の簡単な説明

図1は、電圧に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。条件等は以下のとおりである：ハイスルーブットNucleofector(登録商標)(HT-beta, Amaxa GmbH)；細胞懸濁液の体積：20 μ L；キュベットのギャップ幅：1.5mm；バッファー溶液のイオン強度：203mmol/L(電気伝導度：11.3mS/cm)；黒く塗りつぶした領域は個々のサンプルの飛び散り発生頻度を表す。；n=サンプル数。

40

【0024】

図2は、パルス持続時間に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。条件等は以下のとおりである：ハイスルーブットNucleofector(登録商標)(HT-beta, Amaxa GmbH)；細胞懸濁液の体積：20 μ L；キュベットのギャップ幅：1.5mm；バッファー溶液のイオン強度：129mmol/L(電気伝導度：7.2

50

mS/cm) ; 黒く塗りつぶした領域は個々のサンプルの飛び散り発生頻度を表す。 ; n = サンプル数。

【0025】

図3は、電圧パルスの中断持続時間に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。条件等は以下のとおりである：ハイスルーブットNucleofector(登録商標)(HT-beta、Amaxa GmbH) ; 細胞懸濁液の体積：20 μ L ; キュベットのギャップ幅：1.5mm ; バッファー溶液のイオン強度：203mmol/L(電気伝導度：11.3mS/cm) ; 黒く塗りつぶした領域は個々のサンプルの飛び散り発生頻度を表す。 ; n = サンプル数。

【0026】

図4は、中断されない電圧付加時間の最大持続時間に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。条件等は以下のとおりである：ハイスルーブットNucleofector(登録商標)(HT-beta、Amaxa GmbH) ; 細胞懸濁液の体積：20 μ L ; キュベットのギャップ幅：1.5mm ; バッファー溶液のイオン強度：203mmol/L(電気伝導度：11.3mS/cm) ; 黒く塗りつぶした領域は個々のサンプルの飛び散り発生頻度を表す。 ; n = サンプル数。

【0027】

図5は、バッファー溶液の電気伝導度および/またはイオン強度に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。条件等は以下のとおりである：ハイスルーブットNucleofector(登録商標)(HT-beta、Amaxa GmbH) ; 細胞懸濁液の体積：20 μ L ; キュベットのギャップ幅：1.5mm ; 黒く塗りつぶした領域は個々のサンプルの飛び散り発生頻度を表す。 ; n = サンプル数 ; バッファー1 : イオン強度203mmol/L、電気伝導度：11.3mS/cm ; バッファー2 : イオン強度129mmol/L、電気伝導度：7.2mS/cm。

【0028】

図6は、細胞懸濁液の体積に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。条件等は以下のとおりである：ハイスルーブットNucleofector(登録商標)(HT-beta、Amaxa GmbH) ; キュベットのギャップ幅：1.5mm ; バッファー溶液のイオン強度：129mmol/L(電気伝導度：7.2mS/cm) ; 黒く塗りつぶした領域は個々のサンプルの飛び散り発生頻度を表す。 ; n = サンプル数。

【0029】

図7は、細胞懸濁液の体積に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。条件等は以下のとおりである：ハイスルーブットNucleofector(登録商標)(HT-beta、Amaxa GmbH) ; キュベットのギャップ幅：1.5mm ; バッファー溶液のイオン強度：203mmol/L(電気伝導度：11.3mS/cm) ; 黒く塗りつぶした領域は個々のサンプルの飛び散り発生頻度を表す。 ; n = サンプル数。

【0030】

図8は、電圧パルスの中断持続時間に依存したトランスフェクション効率の棒グラフである。条件等は以下のとおりである：ハイスルーブットNucleofector(登録商標)(HT-beta、Amaxa GmbH) ; キュベットのギャップ幅：1.5mm ; バッファー溶液のイオン強度：203mmol/L(電気伝導度：11.3mS/cm) ; トランスフェクション効率の検出のために、それぞれ 2×10^5 個のHEK293細胞を20 μ Lのバッファー溶液に入れ、0.1 μ gのpEGFP-C1(Invitrogen)を添加し、4kV/cmの電界に曝露する。次いで細胞をイーグル最小必須培地(ATCC)に入れ(培地は100 μ g/mLのストレプトマイシン、100U/mLのペニシリンおよび10%ウマ血清(ATCC)を含む)、湿潤化インキュベーター中で37 $^{\circ}$ C、5%CO₂にて24時間培養した。最後に、サンプルをフローサイトメトリーによりGFP発現について試験した(FACSCalibur、Becton Dickinson)。GFP発現細胞のパーセンテージのそれぞれ2回分の値を示している。棒グラフ中の文字は電界曝露の中断に関する ; すべてのデータは μ sで示し、最初と最後の数

10

20

30

40

50

字はそれぞれ中断されない電圧付加時間の持続時間を表し、水平の線の間の数字はその間の中断持続時間を表す (P = p a u s e) 。

【 0 0 3 1 】

図 9 は、電圧パルスの中断持続時間に依存したトランスフェクション効率の棒グラフである。条件等は以下のとおりである：ハイスルーブット N u c l e o f e c t o r (登録商標) (H T - b e t a , A m a x a G m b H) ; キュベットのギャップ幅：1 . 5 m m ; バッファー溶液のイオン強度：2 0 3 m m o l / L (電気伝導度：1 1 . 3 m S / c m) ; トランスフェクション効率の検出のために、それぞれ 2×10^5 個の j u r k a t E 6 . 1 細胞を 2 0 μ L のバッファー溶液に入れ、1 μ g の p m a x G F P (A m a x a) を添加し、1 . 2 5 k V / c m の電界に曝露する。次いで細胞を R P M I - 1 6 4 0 10
培地 (A T C C) に入れ (培地は 1 0 0 μ g / m L のストレプトマイシン、1 0 0 U / m L のペニシリンおよび 1 0 % F C S (A T C C) を含む) 、湿潤化インキュベーター中で 3 7 $^{\circ}$ C、5 % C O ₂ にて 2 4 時間培養した。最後に、サンプルをフローサイトメトリーにより G F P 発現について調べた (F A C S C a l i b u r , B e c t o n D i c k i n s o n) 。 G F P 発現細胞のパーセンテージのそれぞれ 2 回分の値を示している。棒グラフ中の文字は電界曝露の中断に関する；すべてのデータは μ s で示し、最初と最後の数字は中断されない電圧付加時間の持続時間を表し、水平の線の間の数字はその間の中断持続時間を表す (P = p a u s e) 。

【 実施例 】

【 0 0 3 2 】

種々の好ましい実施形態の詳細な説明

図 1 は、2 種類の異なる電圧パルスの比較の形での、それぞれ中断あり、または中断なしで実施した、電圧に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。第 1 の電圧パルスは外部印加電圧 8 0 0 V で 1 0 0 μ s の予め設定した持続時間を有する。これは約 4 k V / c m の電界強度をもたらす (電界強度は電圧および電極抵抗から算出することができる) 。第 2 の電圧パルスもまた 1 0 0 μ s の予め設定した持続時間を有するが、印加電圧は 1 0 0 0 V である。電界強度は約 5 k V / c m であり、これは電圧から算出することができる。2 種類の電圧パルスを、それぞれ 4 0 μ s 後 (T 1 m a x) に 2 回中断した。すなわち、パルスは 4 0 μ s 後に中断され、その後継続され、さらに 4 0 μ s 後に再度中断され、最後に電圧付加時間 2 0 μ s で完了し、それにより合計の予め設定された持続時間は 1 0 0 μ s に達した。中断の持続時間は、それぞれ 8 0 0 μ s である (T 1 p a u s e) 。したがって、全体として、電圧パルスは 3 回の電圧付加時間と 2 回の中断時間からなり、パルスの全体の持続時間は合計で 1 7 0 0 μ s である。ここで、予め設定された条件下で、より低い電圧および / または電界強度での電圧パルスの印加は、サンプルの飛び出しをもたらさないことが明らかである。すなわち、この場合には飛び散りは起こらない。それと比較して、比較的高い電圧および / または電界強度での電圧パルスは、サンプルの飛び出しを引き起こす (3 番目のバー) 。この望ましくない飛び散りは、電圧パルスを 2 回中断することにより防ぐことができる (最後のバー) 。したがって、一方では、それ以外は一定の条件下での飛び散りの発生確率は、電界強度を上げることにより高くなることが示され、他方では、反応容器からのサンプルの飛び出しは、非常に高い電界強度であっても、電圧パルスの中断により防ぐことができることが示されている。少なくとも、パルスの中断により、飛び散りの発生確率は顕著に低下している。 30
40

【 0 0 3 3 】

図 2 は、パルス持続時間に依存した飛び散りの発生頻度の棒グラフを示す。ここで、それぞれ 7 0 0 V の強さで (電界強度 3 . 5 k V / c m) 、2 0 0 μ s 、3 5 0 μ s 、4 0 0 μ s および 6 0 0 μ s と増大する、予め設定された持続時間を有する電圧パルスが用いられた。飛び散りの発生頻度のパーセンテージが、パルス持続時間の増大に伴い大きくなることが示された。しかしながら、6 0 0 μ s の最も長い持続時間を用いて、本発明により電圧パルスを中断すると、サンプルの飛び散りを効果的に防ぐことができた。このために、電圧パルスをそれぞれ 2 0 0 μ s 後 (T 1 m a x) に 2 回中断した。すなわち、パル 50

スは200 μ s後に中断され、その後継続され、さらに200 μ s後に再度中断され、最後に再度の200 μ sの電圧付加時間により完了され、それにより合計の予め設定された持続時間は600 μ sに達した。中断の持続時間はそれぞれ2.5ms (T1 pause)とした。全体として、各電圧パルスは3回の電圧付加時間と2回の中断時間からなり、パルスの全体の持続時間は合計で5.6msである。これにより、電圧パルスの比較的長い予め設定された持続時間では、サンプルの飛び出しに至る確率が高いことが明らかになっている(4番目のバー)。この望ましくない飛び散りは、電圧パルスを2回中断することにより防ぐことができる(最後のバー)。したがって、一方では、それ以外は一定の条件下での飛び散りの発生確率は、パルス持続時間が長くなると大きくなることが示され、他方では、反応容器からのサンプルの飛び出しは、比較的長い予め設定された持続時間であつても、電圧パルスを中断することにより防ぐことができることが示されている。

10

【0034】

図3は、電圧パルスの中断の持続時間に依存した飛び散りの発生頻度の棒グラフである。この実施例からは、少なくとも特定の用途および/または条件では、中断の持続時間を延長することにより、サンプルの飛び出しの発生確率をさらに低下させることができることが明らかである。700Vの電圧(電界強度3.5kV/cm)および600 μ sの予め設定された持続時間での電圧パルスを、中断しないで(1番目のバー)、400 μ sずつ11回中断して(2番目のバー)、または800 μ sずつ11回中断して(3番目のバー)用いた。したがって、中断されるパルスはそれぞれ50 μ sの長さ(T1 max)の12回の電圧付加時間と、それぞれ400 μ sまたは800 μ s (T1 pause)の11回の中断時間からなる。これらの条件下で本発明により電圧パルスを中断しない場合には、各試験および/または各サンプルで飛び散りが起こる。400 μ sの中断持続時間では、約70%のサンプルで飛び散りが起こるものの、中断持続時間を2倍にすることにより、これらの条件下で飛び散りを完全に防ぐことができる。自然な帰結として、バッファ溶液中の物質間の関係は、中断の長さが延長すると「落ち着き」(calm down)、それにより、中断に続く電圧付加時間の間、サンプル中で気体は全く発生しない。

20

【0035】

図4は、中断されない電圧付加時間の最大持続時間に依存した飛び散りの発生頻度の棒グラフを示す。この試験は、実際は図3の試験と同じ条件で行い、但し中断持続時間(T1 pause)を400 μ sで一定とし、電圧付加時間(T1 max)の最大長(すなわち、電界が生成されている持続時間)を変化させたことが異なる。T1 max = 100 μ sでの試験とT1 max = 40 μ sでの試験を比較すると、電圧付加時間(すなわち、電圧パルスが中断されるまでの時間)を短くすると、飛び散りの発生確率が低下することが明らかである。さらに、この実施形態では、ここでいくつかの要因により40 μ sと50 μ sとの間に閾値が存在すること、すなわち、この場合、飛び散りの発生頻度とT1 maxに比例的な従属関係がないことが示唆される。

30

【0036】

図5は、バッファ溶液の電気伝導度および/またはイオン強度に依存した飛び散りの発生頻度の棒グラフを示す。より高いイオン強度のバッファ(バッファ1:イオン強度203mmol/L、電気伝導度11.3mS/cm)を用いる場合には、より低いイオン強度のバッファ(バッファ2:イオン強度129mmol/L、電気伝導度7.2mS/cm)を用いる場合よりも、飛び散りのリスクが相当に大きくなる。しかしながら、示した両方の実施例で、本発明により電圧パルスを中断することにより、飛び散りを防ぐことができる。

40

【0037】

図6および図7は、それぞれ細胞懸濁液の体積に依存した飛び散りの発生頻度の棒グラフを示す。両方のグラフから、細胞懸濁液および/またはバッファ溶液の体積が小さくなるにつれ飛び散りの発生確率が高くなることが明らかである。これに関して、図6の実施例は、非常に小さい体積を用いる用途であつても、飛び散りの発生確率を事実上ゼロにまで低下させることができることを示している。

50

【0038】

図8および図9は、電圧パルスの中断持続時間に依存したトランスフェクション効率の棒グラフを示す。驚くべきことに、トランスフェクション効率は、本発明の電圧パルスの中断により悪影響を受けない。方法の効率は、電圧パルスが中断されたか否かに関わりなく常に概ね同じ高いレベルである（中断あり：2本ずつのバー2～5；中断なし：2本ずつのバー1および6）。

【0039】

したがって、全体として、それ以外は指定された条件（電界強度および/または電流密度、電圧パルスの予め設定された持続時間、バッファー溶液の体積）の下で、飛び散りの発生および/または反応容器からのサンプルの飛び出しの発生確率を十分に抑えるためには、電圧付加時間が特定の中断されない長さを超えてはならないことが示される。つまり、それ以外は予め設定された条件の下での飛び散りの問題は、中断されるパルスおよび/または臨界的な中断されない長さを超えない電圧付加時間により解決することができる。したがって、電圧パルスの中断は、方法の質、この場合は特にトランスフェクション効率を損なうことなく、飛び散りの発生確率を顕著に低下させる。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】電圧に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。

【図2】パルス持続時間に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。

【図3】電圧パルスの中断持続時間に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。

【図4】中断されない電圧付加時間の最大持続時間に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。

【図5】バッファー溶液の電気伝導度および/またはイオン強度に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。

【図6】細胞懸濁液の体積に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。

【図7】細胞懸濁液の体積に依存した飛び散り発生頻度の棒グラフである。

【図8】電圧パルスの中断持続時間に依存したトランスフェクション効率の棒グラフである。

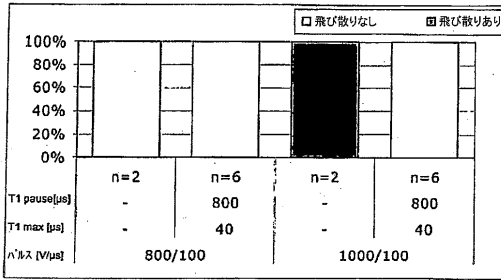
【図9】電圧パルスの中断持続時間に依存したトランスフェクション効率の棒グラフである。

10

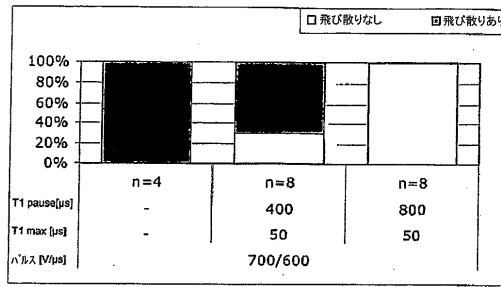
20

30

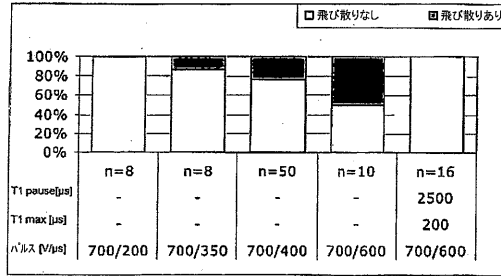
【 図 1 】



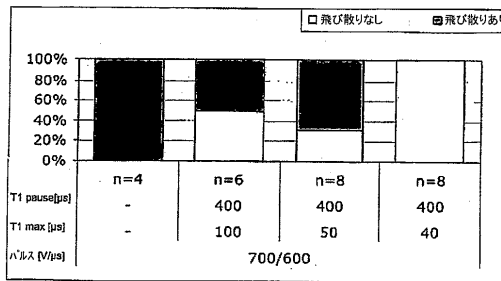
【 図 3 】



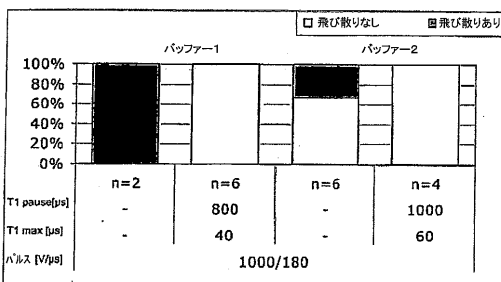
【 図 2 】



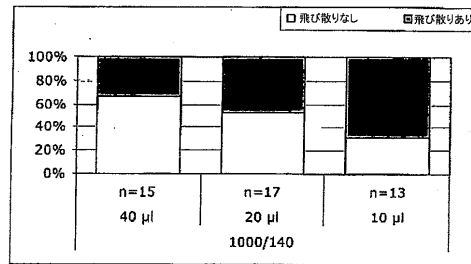
【 図 4 】



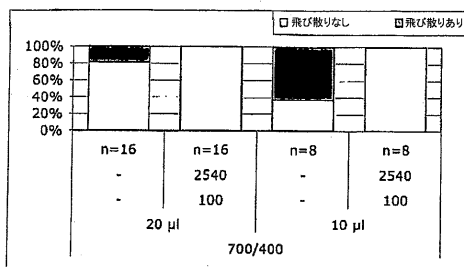
【 図 5 】



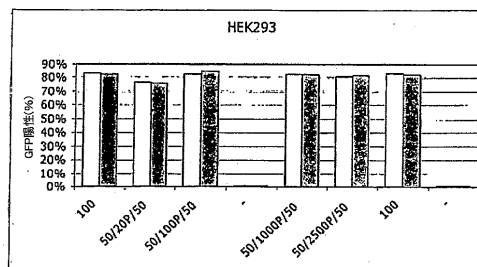
【 図 7 】



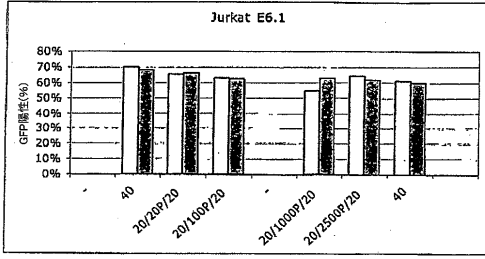
【 図 6 】



【 図 8 】



【 9 】



フロントページの続き

(72)発明者 ハビグ, ミハエル

スイス国 シーエイチ - 4 0 5 7 バーゼル, ブライザハ シュトラーセ 6 5

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 米国特許出願公開第2005/0064596(US, A1)

米国特許第05869326(US, A)

国際公開第2004/110371(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 13/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

WPI