

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-541337

(P2013-541337A)

(43) 公表日 平成25年11月14日(2013.11.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 2 9
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 U	4 B 0 6 5
	C 1 2 N 1/00 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2013-531762 (P2013-531762)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月28日 (2011. 9. 28)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年5月1日 (2013. 5. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/053646
 (87) 国際公開番号 W02012/050881
 (87) 国際公開日 平成24年4月19日 (2012. 4. 19)
 (31) 優先権主張番号 61/452, 283
 (32) 優先日 平成23年3月14日 (2011. 3. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/387, 604
 (32) 優先日 平成22年9月29日 (2010. 9. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502072134
 プレジデント アンド フェロウズ オブ
 ハーバード カレッジ
 President and Fello
 ws of Harvard Colle
 ge
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O
 2 1 3 8, ケンブリッジ, 17 クインシ
 ー ストリート
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノワイヤーを使用する分子の送達

(57) 【要約】

導電層でコーティングされた複数のナノワイヤー（例えば、Si NW）を含む分子送達デバイス。ナノワイヤーで媒介される電気穿孔によって分子を送達するための方法も開示されている。本発明は、振幅が10V未満の電圧波形により、一セットの導電性ナノワイヤーを集合的に細胞内電極として使用して、細胞を効率的に電気穿孔することができるという予期しない発見に基づく。一態様では、本発明は、(i)担体と、(ii)表面の表面に付着した複数のナノワイヤーとを含む分子送達デバイスの特徴とする。担体は導電性であり、ナノワイヤーは導電層でコーティングされている。

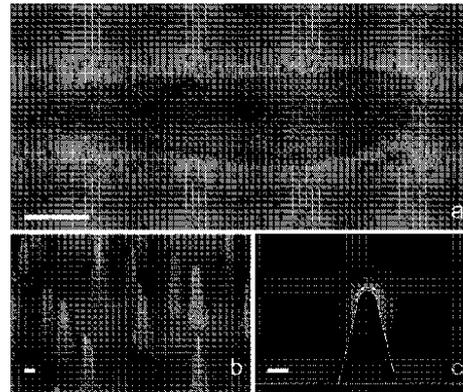


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面を有する担体と、
前記表面に付着した複数のナノワイヤーと
を備える分子送達デバイスであって、前記担体は、導電性であり、前記ナノワイヤーは、
導電層でコーティングされている、分子送達デバイス。

【請求項 2】

前記ナノワイヤーのそれぞれが、前記表面に対して実質的に垂直方向に沿って前記表面
に付けられている、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3】

前記ナノワイヤーのそれぞれが、半導体、化合物半導体、金属酸化物、金属、炭素、窒
化ホウ素、またはこれらの組合せから形成される、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4】

前記半導体がシリコンである、請求項 3 に記載のデバイス。

【請求項 5】

前記ナノワイヤーのそれぞれが、高さ 20 ~ 10,000 nm、および直径 10 ~ 500
nm である、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 6】

前記高さが 100 ~ 5,000 nm であり、前記直径が 50 ~ 250 nm である、請求
項 5 に記載のデバイス。

【請求項 7】

前記高さが 800 ~ 1,200 nm であり、前記直径が 70 ~ 180 nm である、請求
項 6 に記載のデバイス。

【請求項 8】

前記導電層が、金属、金属酸化物、半導体、化合物半導体、金属窒化物、またはこれら
の組合せから形成される、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記ナノワイヤーの密度が、 $0.05 \sim 10 \mu\text{m}^{-2}$ である、請求項 1 に記載のデバイ
ス。

【請求項 10】

前記密度が $0.1 \sim 5 \mu\text{m}^{-2}$ である、請求項 9 に記載のデバイス。

【請求項 11】

前記密度が $0.2 \sim 2 \mu\text{m}^{-2}$ である、請求項 10 に記載のデバイス。

【請求項 12】

細胞に分子を送達する方法であって、
表面を有する担体、および前記表面に付着した複数のナノワイヤーを提供するステップ
であって、前記担体およびナノワイヤーはともに導電性である、ステップと、

前記ナノワイヤーを前記細胞と接触させることによって、1つまたは複数のナノワイヤ
ーを前記細胞内に貫通させるステップであって、前記細胞は、前記分子を含有する浴溶液
中に浸漬されている、ステップと、

前記担体と前記浴溶液中の電極との間に電流波形または電圧波形を印加し、それによっ
て、前記分子が、細胞膜上に一過性に形成された孔を通じて前記細胞内に入るステップと
を含む、方法。

【請求項 13】

前記ナノワイヤーが導電層でコーティングされている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記分子が、DNA、RNA、タンパク質、多糖、または小分子である、請求項 12 に
記載の方法。

【請求項 15】

前記細胞が原核細胞または真核細胞である、請求項 12 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記真核細胞が、初代細胞、形質転換細胞、または癌性細胞である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記初代細胞が、ニューロン、神経芽細胞、細胞、筋細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、単球、免疫細胞、幹細胞、または卵母細胞である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記電圧波形の振幅が 0.1 ~ 10 V である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 19】

前記振幅が 3 ~ 7 V である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記振幅が 4 ~ 6 V である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

細胞に分子を送達する方法であって、

表面を有する担体、およびそれぞれが第 1 の端部および第 2 の端部を有する複数の導電性ナノワイヤーを提供するステップであって、前記担体、および前記ナノワイヤーのそれぞれは、前記ナノワイヤーのそれぞれの前記第 1 の端部および第 2 の端部を除いて電気絶縁層でコーティングされており、前記第 1 の端部は、前記表面に付けられており、前記第 2 の端部は、導電層でコーティングされている、ステップと、

前記ナノワイヤーを、前記分子を含有する浴溶液中に浸漬された前記細胞と接触させることによって、1 つまたは複数のナノワイヤーを前記細胞内に貫通させるステップと、

一方が前記ナノワイヤーのそれぞれの前記第 1 の端部に接続され、他方が前記浴溶液中に配置された 2 つの電極間に電流波形または電圧波形を印加し、それによって前記分子が、細胞膜上に一過性に形成された孔を通じて前記細胞内に入るステップとを含む、方法。

【請求項 22】

前記分子が、DNA、RNA、タンパク質、多糖、または小分子である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記細胞が原核細胞または真核細胞である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記真核細胞が、初代細胞、形質転換細胞、または癌性細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記初代細胞が、ニューロン、神経芽細胞、細胞、筋細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、単球、免疫細胞、幹細胞、または卵母細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記電圧波形の振幅が 0.1 ~ 10 V である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 27】

前記振幅が 3 ~ 7 V である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記振幅が 4 ~ 6 V である、請求項 27 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2010年9月29日に提出された米国仮出願第 61 / 387,604 号および 2011年3月14日に提出された米国仮出願第 61 / 452,283 号の両方の

10

20

30

40

50

優先権を主張する。これらの先の出願は、それらの全体が参考として本明細書に援用される。

【0002】

連邦政府によって資金を提供された研究についての声明

本発明は、National Institutes of Healthによって付与された契約番号1DP1OD003893-01の下、政府の支援を受けてなされた。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

細胞内への外因性遺伝物質の送達は、ウイルスによって（例えば、アデノ随伴ベクター、またはレンチウイルスベクターを使用して）、化学的に（例えば、リン酸カルシウム、リポソーム、またはポリカチオンを使用して）、機械的に（例えば、微量注入）、およびまたは物理的に（例えば、電気穿孔）達成することができる。

10

【0004】

これらの異なる送達方法の中で、電気穿孔は、2つの平行な電極の間に形成される均一電場内に細胞を配置することによって達成される。膜内外電位差が0.25~1V付近の閾値レベルを超えると、細胞膜の脂質二重層が再編成して親水性孔（一般に、直径が20~120nmの間）を形成する。孔サイズより小さいあらゆる分子が、電気泳動または拡散によって細胞内に流れることができる。一般的に、溶液中に懸濁された細胞を電気穿孔するために、数マイクロ秒~1ミリ秒続く1000V付近のパルス（細胞サイズによって変動する）が要求される。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

この方法は、ある特定の細胞について有効に機能するが、小さな免疫細胞およびニューロンの電気穿孔は、それほど成功していない。電気穿孔のために小さな細胞またはニューロンに均一電場が印加されるとき、細胞膜の大部分にわたる電位は、破壊電位を超え、低い細胞生存度をもたらす。これらの細胞のための改善された電気穿孔法を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

30

【0006】

本発明は、振幅が10V未満の電圧波形により、一セットの導電性ナノワイヤーを集合的に細胞内電極として使用して、細胞を効率的に電気穿孔することができるという予期しない発見に基づく。

【0007】

一態様では、本発明は、(i)担体(substrate)と、(ii)表面の表面に付着した複数のナノワイヤーとを含む分子送達デバイスの特徴とする。担体は導電性であり、ナノワイヤーは導電層でコーティングされている。

【0008】

上述したデバイスにおいて使用される導電性担体は、導電性材料でコーティングされた表面を有する非導電性材料または半導電性材料から作製された担体とすることができ、この表面は、ナノワイヤーと電氣的に連絡している。あるいは、これは、導電性材料から作製されてもよい。担体の材料の例として、半導体（例えば、SiおよびGe）、化合物半導体（例えば、InPおよびGaAs）、金属酸化物（例えば、ZnO、ITO、およびIr酸化物）、ならびに金属（例えば、Au、Pt、Ag、Ir、およびCr）が挙げられる。

40

【0009】

用語「ナノワイヤー」（または以下で「NW」）は、1nm~1μmの範囲の直径を有するワイヤー、ロッド、または錐体の形状での材料を指す。本明細書では、錐体は、0~90度（例えば、0~15度）の範囲の半角を有する。NWは、表面に対して実質的に垂

50

直方向（すなわち、60～90度）に沿って表面に付着していることが好ましい。これらは、20～10,000nm（例えば、100～5,000nm、および800～1,200nm）の高さ、10～500nm（例えば、50～250nm、および70～180nm）の直径、ならびに1 μm^2 当たり0.05～10ワイヤー（例えば、1 μm^2 当たり0.1～5ワイヤー、および1 μm^2 当たり0.2～2ワイヤー）の密度を有することができる。これらは、半導体（例えば、SiおよびGe）、化合物半導体（例えば、GaAsおよびInP）、金属酸化物（例えば、ZnO）、金属（例えば、Au、Ag、Ir、Pt）、炭素、窒化ホウ素、またはこれらの組合せから形成することができる。

【0010】

NW上にコーティングされる導電層、および担体は、金属（例えば、Au、Ag、Pt、Pd、Cr、Ni、Ir、Al、W、Ti、およびFe）、金属酸化物（例えば、Ir酸化物、ITO、およびZnO）、半導体（例えば、SiおよびGe）、化合物半導体（例えば、GaAs、GaP、InP、InAs、InGaAs、およびGaN）、金属窒化物（例えば、TiN、ZrN、およびTaN）、またはこれらの組合せから形成することができる。

10

【0011】

化合物半導体は、2種以上の元素から形成することができ、例えば、IV-IV半導体（例えば、SiCおよびSiGe）、III-V半導体（例えば、AlN、AlP、AlGaAs、GaN、GaAs、InP、およびInGaAs）、II-V半導体（例えば、Zn₃Sb₂およびCd₃As₂）、II-VI半導体（例えば、CdS、CdSe、およびCdTe）、IV-VI半導体（例えば、SnSおよびPbSnTe）、I-VI半導体（例えば、Cu₂S）、I-VII半導体（例えば、CuCl）、ならびに酸化物半導体（例えば、SnO₂、CuO、およびCu₂O）などである。別段の明言のない限り、本発明の電気デバイスに使用される半導体には、その固有形態（すなわち、純粋形態）、およびドープ形態（すなわち、1つまたは複数のドーパントを含有する）の両方が含まれる。用語「組合せ」は、2種以上の成分の混合物、合金、または適当な反応生成物を指す。例えば、「シリコンと金属の組合せ」は、シリコンと金属の混合物、または金属のケイ化物である場合がある。

20

【0012】

別の態様では、本発明は、細胞内に外因性分子を送達する方法に関する。この方法は、(i)表面を有する担体、およびこの表面に付着した複数のNWを提供するステップであって、担体およびNWのそれぞれは、導電性であるステップと、(ii)NWを細胞と接触させることによって、細胞内にNWを貫通させるステップと、(iii)浴溶液中で担体と電極の間に電流波形または電圧波形を印加するステップとを含む。結果として、分子は、細胞膜中に一過性に形成された孔を通じて細胞内に入る。導電性NWは、(1)導電性材料でコーティングされた表面を有し、この表面は、NWが付けられている担体の表面と電氣的にコミュニケーションしている非導電性材料もしくは半導電性材料製、または(2)導電性材料製とすることができる。

30

【0013】

この方法で使用されるデバイスは、この方法において使用されるNWが、導電層でコーティングされていても、コーティングされていなくてもよいことを除いて、上述したものと同一である。

40

【0014】

送達される分子は、核酸（例えば、DNA、ならびにsiRNAおよびマイクロRNAを含めたRNA）、タンパク質、多糖、または小分子とすることができる。用語「小分子」は、様々な薬物分子、蛍光色素、オリゴ糖、オリゴヌクレオチド、およびペプチドを含めた、1000Da未満の分子量を有する任意の分子を指す。

【0015】

細胞は、原核細胞（例えば、E.coli）であっても、真核細胞（例えば、酵母細胞およびヒト細胞）であってもよい。ヒト細胞は、初代細胞、形質転換細胞（例えば、HE

50

K細胞)、または癌性細胞(例えば、HeLa細胞)とすることができる。初代細胞は、卵母細胞、ニューロン、神経芽細胞、細胞、筋細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト(keratinocyte)、単球、免疫細胞、または幹細胞とすることができる。免疫細胞は、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、T細胞、およびB細胞、および樹状細胞とすることができる。幹細胞は、胚性幹細胞であっても、成体幹細胞(例えば、造血幹細胞および間葉幹細胞)であってもよい。各生物学的な細胞は、2つ以上のNWによって貫通されることが好ましい。

【0016】

電気シグナルは、電流シグナルまたは電圧シグナルとすることができる。電圧波形の振幅は、0.1~10V(例えば、3~7Vおよび4~6V)である。用語「波形」は、時間の関数としての電圧(または電流)振幅のプロットである。これは、正方形、三角形、のこぎり歯、または正弦曲線の形状におけるパルスについての一般用語である。

10

【0017】

本発明のさらに別の態様は、外因性分子を細胞内に送達する方法に関する。この方法は、(i)電氣的に絶縁された層でコーティングされた表面を有する担体と、それぞれが第1の端部および第2の端部を有し、第1の端部および第2の端部を除いて電気絶縁層でコーティングされた複数の導電性ナノワイヤーであって、第1の端部が表面に付けられ、第2の端部が導電層でコーティングされた導電性ナノワイヤーとを提供するステップと、(ii)ナノワイヤーを、分子を含有する浴溶液中に浸漬された細胞と接触させることによって、1つまたは複数のナノワイヤーを細胞内に貫通させるステップと、(iii)一方がナノワイヤーのそれぞれの第1の端部に接続され、他方が浴溶液中に配置された2つの電極間に電流波形または電圧波形を印加するステップとを含む。結果として、分子は、細胞膜上に一過性に形成された孔を通じて細胞内に入る。

20

【0018】

この方法で使用される担体は、半導体(例えば、Si)、化合物半導体(例えば、GaAs、InP、GaN、およびGaP)、またはダイヤモンドで形成することができる。これは、電氣的に絶縁された層でコーティングされている。この方法で使用されるNWは、NWのそれぞれの2つの端部間の領域が電氣的に絶縁された層でコーティングされていることを除いて、上述したものと同一である。さらに、各NWは、電圧波形によって個々にアドレス可能となり得る。電気絶縁層は、酸化物(例えば、シリカ、アルミナ、およびハフニウム酸化物)、窒化物(例えば、窒化ケイ素)、またはこれらの組合せから形成される。あるいは、電気絶縁層は、有機物質、例えば、パリレン(例えば、パリレンC、N、AF-4、SF、HT、A、AM、VT-4、またはCF)、ポリジメチルシロキサン、メタクリル酸メチル、フォトレジスト(例えば、SU-8)、および電子ビームレジスト(例えば、ポリメチルメタクリレート、ZEP-520、および水素シルセスキオキサン)などから形成される。

30

【0019】

細胞は、上述したように、原核細胞および真核細胞とすることができる。送達される分子は、核酸、タンパク質、多糖、または小分子とすることもできる。電気シグナルは、電流シグナルまたは電圧シグナルとすることができる。電圧波形の振幅は、0.1~10V

40

【0020】

2つの上述したNWベースの電気穿孔法の1つの利点は、分子送達を達成するのに要求される低い電圧波形、すなわち、振幅が10V未満であることである。これは、商業的な電気穿孔システムによって使用されるものの約100分の1である。要求電圧を下げることは、器具使用をより手軽にするだけでなく、これは、細胞死を引き起こし得るアーク放電の可能性も減少させる。さらに、これらの方法は、これらの形状(例えば、サイズ)、または電圧パルス(例えば、振幅およびパルス持続時間)を変更することによって、ほとんどすべての真核細胞および原核細胞に分子を送達するのに使用することができる。

【0021】

50

原核細胞に移行すると、大規模な並列の抗生物質スクリーニングを含めた豊富な新規用途が可能になる。シリコンウエハー上のNWは、量産することができる。このハイスループット、低コスト生産は、本発明の送達方法の広範囲の用途を可能にする。

【0022】

1つまたは複数の実施形態の詳細を、以下の付随する説明において示す。他の態様、特徴、および利点は、以下の図面、実施形態の詳細な説明、およびまた、添付の特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1aは、垂直Si NWのアレイの頂部で培養され、固定されたヒト線維芽細胞の走査型電子顕微鏡(SEM)画像であり、図1bは、白金コーティングされたSi NWのSEM画像であり、図1cは、導電性NWの先端部における電場増強の有限要素シミュレーションを示すピクチャーである。スケールバー：(a) 10 μm、(b) 200 nm、および(c) 200 nm。

10

【図2】図2aおよび図2bは、それぞれ、いずれのパルスも印加していない(対照)、および5.75 Vの振幅を有する一連の電圧パルス印加した、HEK293細胞のHoechst核標識を示す2つの蛍光画像であり、図2cおよび図2dは、それぞれ、パルスをまったく印加しない(対照)後、および5.75 Vの振幅を有する一連の電圧パルス印加した後のHEK293細胞中の非膜浸透性緑色蛍光色素(カルセイン)の非存在および存在を示す2つの蛍光画像であり、図2eおよび図2fは、それぞれ、パルスをまったく印加しない(対照)後、および5.75 Vの振幅を有する一連の電圧パルス印加した後の死細胞の染色を示す2つの蛍光画像であり、図2gは、細胞の蛍光強度を示すヒストグラムであり、図2hは、トランスフェクション効率および細胞生存度を示す棒グラフである。

20

【図3】図3aは、シリコンオンインシュレーターで製作した、一セットの先端がPtのNW電極の走査電子画像であり(挿入図は、NW電極の拡大図であり、絶縁酸化物の末端を、NWの基部に見ることができる)、図3bは、NW電極の頂部で培養されたHEK293細胞の微分干渉コントラスト画像である。左下から近づいていることが見られるパッチピペットを使用することによって、電気穿孔を介して細胞内に注入される電流をモニターする。図3cは、Si NW電極に印加された電圧波形を示す図であり、図3dおよび図3eは、それぞれ、4.5 Vおよび5.5 Vの振幅を有する電圧波形に反応して細胞内に注入された電流の振幅を示す図である。

30

【図4】図4aは、頂部で培養されたHEK293細胞を有するSi NW電極を示す明視野像であり、図4bは、赤色蛍光色素が電気穿孔を介して単一の細胞に送達された後の同じ領域の蛍光画像であり、図4cは、核の対応する蛍光画像であり、図4dは、上記3つの画像の重ね合わせである。矢印は、Si NWの位置を表す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、NWベースの電気穿孔デバイス、および細胞内に外因性分子を電気穿孔する方法に関する。

40

【0025】

本発明において使用されるNWは、導電性であり、好ましくは、担体に垂直に付けられる。in vitro電気穿孔について、細胞は、このようなNW担体上で直接培養し、または別の担体上で培養し、NWと密接に接触させることができる。あるいは、このようなNW担体を、in vivoまたはin situ生体分子送達のために移植することができる。

【0026】

1つまたは複数のNWの一方の端部は、細胞の基底膜を貫通し、その内部に位置する。細胞内部にその端部がある一セットのこれらのNWは、細胞が浸漬された浴溶液中で、細胞外電極と対になった細胞内電極または傍細胞電極として集合的に作用する。電位または

50

電流がこの対の電極にわたって印加されるとき、各NWの細胞内端部は、NW先端部の曲率半径と同等の領域（一般的に、直径が100nm未満）に電場を集束させることができる。電場のこのナノスケール集束は、電気穿孔プロトコルの開発に追加の自由度を加える。電場分布は、垂直NWの密度、アスペクト比、および曲率半径をリソグラフィで調整することによって制御することができる。閾値電位を超える細胞膜の部分的範囲を決定し、したがって、細胞、特に、トランスフェクトすることが困難な細胞（例えば、幹細胞および免疫細胞）の効率的で低毒性の電気穿孔を可能にすることができる。さらに、電圧および電流レベル、パルス持続時間、ならびにパルス数を最適化することによって、所望レベルの効率および生存度を達成することができる。

【0027】

一実施形態では、NWおよびこれらの担体の両方が導電性である。NWは、担体上に均等に広げられている。NWは、(Shalekら、2010年、Proceedings of the National Academy of Sciences、107巻、1870~1875年)に記載されているように、ハイスルーブット様式で導電性Siウエハー上に製作することができる。次いでこれらのNWを金属でコーティングすることができ、これにより、NWの導電率が増強される。分子送達は、NW担体の頂部で細胞を培養し、担体と浴溶液中の電極との間に電流波形または電圧波形を印加することによって達成することができる。生体分子送達に要求される振幅は、わずかに数ボルトである。担体頂部の細胞のほとんどすべてが電気穿孔され、生存可能なままである。

【0028】

NWおよび担体は、導電性材料、半導体材料、および絶縁材料、例えば、シリコン、酸化ケイ素、窒化ケイ素、炭化ケイ素、酸化鉄、酸化アルミニウム、酸化イリジウム、タングステン、ステンレス鋼、銀、白金、金、およびガラスなどを含めた任意の材料から形成することができる。導電層は、細胞毒性が低い材料（例えば、金、銀、および白金）から形成される。

【0029】

別の実施形態では、Si NWは、個々のセットが、細胞内に生体分子を部位特異的に送達することを可能にするように、担体上で成長させられる。各個々のセットは、他のセットから電気的に絶縁されている。同じセット内のNWのみが、他のセットから独立して電気的に接続され、電圧波形によってアドレス可能である。細胞のクラスターの中で、1個の細胞のみが垂直NWの1つの個々にアドレス可能なセットの頂部にあり、電気穿孔を介して蛍光色素を受け取る。このようにして、相互作用系内で個々の細胞に特定の摂動をもたらすことによって、細胞間相互作用または細胞-ネットワーク相互作用を試験することができる。

【0030】

NWの上にコーティングされる絶縁層は、細胞毒性が低い材料（例えば、酸化ケイ素、酸化アルミニウム、および窒化ケイ素）から形成される。

【0031】

担体上にNWのアレイを得るために、2つの手法が広く使用されている。1つは、前駆体材料からNWを成長させることを本質的に伴う、いわゆるボトムアップ手法である。例えば、化学蒸着法(CVD)を採用して、NW成長プロセスは、担体の頂部に触媒またはシード粒子（通常、1nmから数百ナノメートルの直径を有する）を配置またはパターン形成することから始まり、次に、前駆体材料が触媒またはシード粒子に添加され、粒子が前駆体で飽和した状態になると、NWは、デバイスのエネルギーを最小にする形状で成長し始める。前駆体、担体、触媒/シード粒子（例えば、担体上のサイズ、密度、および堆積方法）、ならびに成長条件を変更することによって、NWを、選択した部位に、様々な材料、サイズ、および形状で作製することができる。別の手法であるトップダウンプロセスは、支持担体から既定の構造を除去する（例えば、エッチングによって）ことを本質的に伴う。例えば、NWが形成される部位がソフトマスク（例えば、フォトレジスト）中に、最初にパターン形成され、このソフトマスクは、後続のエッチングの間にNWが形成さ

10

20

30

40

50

れる部位を保護するか、またはハードマスクをパターン形成するのに使用され、エッチングステップがその後実施されることによって（湿式または乾式）、パターン形成された部位が3次元ワイヤーにされる。

【0032】

異なる細胞型への分子送達の効率は、NWサイズまたは密度を変更することによって操作することができる。

【0033】

上述した電気穿孔法の企図された使用には、以下のことが含まれる。

【0034】

(1) 特に、トランスフェクトすることが困難な細胞へのハイスループット生体分子送達。用途には、トランスフェクション、細胞の再プログラミング、幹細胞分化、ならびに細胞内および細胞間シグナル伝達カスケードのプロベリングが含まれる。

10

【0035】

(2) 相互作用している細胞のネットワークまたはシステム内の生体分子の細胞特異的送達。

【0036】

(3) 再懸濁することが難しい接着細胞（ニューロンなど）の電気穿孔。

【0037】

(4) 同じ細胞への異なる用量の同じ分子、または様々な用量の異なる分子を用いた、異なる時点での繰り返しの電気穿孔。細胞内電極として細胞膜を貫通するNWは、細胞生存度を損なわないので、これらの細胞は電気穿孔と電気穿孔との間でNW担体上に残ることができる。

20

【0038】

さらに詳述することなく、上記説明は、本発明を適切に使用可能にしたと考えられる。したがって以下の実施例は、単に例示的であり、形はどうあれ決して本開示の残りを限定するものでない解釈されるべきである。本明細書に引用される刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【実施例】

【0039】

(実施例1)

30

電気穿孔のためのNW電極担体の製作

シリコン担体上のNWのアレイを、厚さ200nmの熱的に成長させた酸化ケイ素層でコーティングされたシリコンウエハーをドライエッチングすることによって形成した。大きい面積にわたってNWを製作するために、コロイド金ナノ粒子（平均直径100nm、Ted Pellaから購入、購入した試料を約17倍濃縮した後に使用）を、3%のポリメチル-メタクリレート（PMMA）のクロロベンゼン溶液中に再懸濁して懸濁液を形成した。次いで、シリコンウエハーに懸濁液を3000RPMでスピンコーティングすることによって、ウエハー表面上に厚さ100nmのPMMA-ナノ粒子膜を生成した。次いで、ウエハーを、反応性イオンエッチング（RIE）デバイス（NEXX DEVICES CIRCUS 150）内で、CF₄プラズマで3分間処理することによって、金ナノ粒子の直下にはない領域内の酸化ケイ素をエッチングした。次いで、金ナノ粒子をTFA金エッチング液でエッチングにより除去して、分離された酸化ケイ素ドットのパターンを生成した。シリコンウエハーを覆うパターンは、垂直NWを形成するのにウエハーをエッチングするためのマスクとして作用した。ウエハーを、別のRIEデバイス（SURFACE TECHNOLOGY DEVICES ICP RIE）内で、誘導結合HBr:O₂プラズマで10分間エッチングすることによって、垂直に整列したSi NWのアレイを形成した（平均長：1000nm；平均直径：150nm；密度：0.5ワイヤー/μm²）。5:1の緩衝酸化液エッチング液中にウエハーを浸漬することによって、酸化ケイ素マスクを除去した。ウエハーを電子ビーム蒸発器内に直ちに装填し、そこで、NWおよび担体の表面を100nmのPtでコーティングした。ウエハーの裏面への金

40

50

属接触を、同様の様式で作製した。

【0040】

(実施例2)

NWアレイ上での細胞のプレATING (plating)

80~100%の間でコンフルエントなHEK293細胞または線維芽細胞を、トリプシン処理を5分間行うことによって、培養フラスコから取り出した。培地で酵素をクエンチした後、細胞を再懸濁して100万細胞/mLの濃度にした。次に、実施例1で調製された、垂直にエッチングされたNWを有するシリコン担体が入っている48ウェル細胞培養プレートの各ウェルに細胞懸濁液200 μ Lを添加した。細胞培養プレートをインキュベーター(5%のCO₂、90%の相対湿度)内に配置した。インキュベーションを15分行った後、追加の培地150 μ Lを添加した。追加のインキュベーションを18時間行った後、試料を画像化した。図1aに示したように、ヒト線維芽細胞は、担体に付着し、多数のNWによって貫通されているにもかかわらず生細胞として広がっていた。

10

【0041】

(実施例3)

NW電気穿孔を介した分子送達

上述した方法を使用して、実施例1で調製された、垂直にエッチングされたNWを有するシリコン担体の頂部に、HEK293細胞をプレATINGおよび培養した。担体への裏面電気接触を形成することによって、NW電極を接地した。細胞培養液を囲繞するPDMSウェルを使用することによって、1nMの膜不透過性色素(カルセイン)を含有するリン酸緩衝食塩水(PBS)の溶液を閉じ込めた。Ag/AgCl対電極を、NW担体の約0.5cm上に、PBS中に配置した。二相性100Hzの矩形波電圧トレインを、対電極とNW担体の間に0.4秒間印加し、30秒後に電圧トレインを繰り返した。30秒後に、色素が加えられたPBSから担体を取り出し、清潔なPBSに通して洗浄し、画像化した。電圧パルスの振幅は、対照実験および送達実験について、それぞれ0Vおよび5.75Vであった。細胞生存度をアッセイするために、電気穿孔した後に、EthD-1中で、室温で20分間細胞をインキュベートし、蛍光で画像化した。膜が電気穿孔から回復しなかった、またはさもなければ多孔質であった細胞は、EthD-1が核DNAに結合しているために強い核蛍光を示す。これらの細胞は、死んでいるとしてカウントし、Hoechst核標識を介してカウントした細胞の全数と比較した。

20

30

【0042】

図2に示したように、このNW電気穿孔法は、HEK293細胞内への膜不浸透性色素(カルセイン)の送達において97%超の効率を呈し、85%超の細胞生存度を維持した。さらに、細胞は、NW担体頂部で生存可能なままであり、必要であれば、繰り返して電気穿孔することができた。

【0043】

(実施例4)

個々にアドレス可能なNW電極の製作

シリコン担体上のSi NWのアレイを、いくつかのリソグラフィーステップ、エッチングステップ、および堆積ステップを介して形成した。

40

【0044】

最初に、電子ビームリソグラフィ(EBL)を介してエッチマスクを画定した。シリコンオンインシュレーターウエハーに、XR-1541 6%固体ネガティブEビームレジスト(Dow Corning)を2000RPMでコーティングすることによって、厚さ約200nmのレジストの層を生成した。次いで、ウエハーを225 $^{\circ}$ Cで2分間ベークした後、電子ビームに曝露した。Rai th-150 EBLツールを使用することによって、NW形成が望まれる位置に直径100nmの円を画定した。1000 μ C/cm²の線量で曝露した後、ウエハーを225 $^{\circ}$ Cで4分間、再びベークした。次いでパターンを、25%のテトラメチルアンモニウムヒドロキシド(TMAH)中で15秒間現像した。現像後に残ったレジストは、後続のエッチングプロセスのためのハードマスクとして作

50

用した。HBr : O₂ の誘導結合プラズマ (ICP) を ICP - RIE システム (SURFACE TECHNOLOGY SYSTEMS) 内で 10 分間印加することによって、Si NW のアレイを得た (平均長 : 1000 nm ; 平均直径 : 150 nm ; 密度 : 0.5 ワイヤ / μm²)。次いで、49% のフッ化水素酸中にウエハーを浸漬することによって、レジストマスクを除去した。次いで、800 で SiO₂ の低圧化学蒸着法 (LPCVD) を使用して NW を絶縁した。NW 先端部の SiO₂ を除去するために、S1818 フォトリソレジスト (Microchem) を 3000 RPM でスピニングし、O₂ プラズマ (Unaxis RIE) を使用してストリップバック (strip back) し、Si 担体上に 500 nm の膜を残した。次いで、この層の上に突出する NW の先端部を、CF₄ プラズマを使用してエッチングすることによって (STS ICP - RIE)、先端部を覆っている SiO₂ を除去した。次いで、デバイスを 1 分の O₂ プラズマデスカムで処理し、その後、緩衝酸化剤エッチング液 (buffered oxide etch) (BOE) 5 : 1 中に 10 秒間浸漬した。次いで担体を熱蒸発器内に装填し、そこで電子ビーム蒸発器を使用して 70 nm 蒸着した。次いでレジストを、80 で Remover PG (Microchem) を使用して数時間溶解させ、NW 先端部のみに金属層を残した。

【0045】

個々にアドレス可能な NW 電極を作製するために、3000 PRM でウエハー上に S1818 フォトリソレジスト (Microchem) をスピニングすることによって、電極路 (electrode tract) をパターン形成した。115 で 1 分間ウエハーをベークした後、UV 接触リソグラフィーを使用して電極同士の領域を露光した。次いで、露光されたレジストを、MF - 319 (Microchem) を使用して現像した。残っているレジストは、C₄F₈ : SF₆ プラズマを使用する Si 担体の ICP - RIE エッチング (STS) のためのマスクとして役割を果たした。Remover PG を用いてレジストをストリップした後、原子層堆積 (ALD) (Cambridge NanoTech) を使用して、担体を 100 nm の Al₂O₃ でコーティングした。接触リソグラフィーを使用して、直径 20 ミクロンの面積を NW の周囲で露光し、ならびに接触パッドのための 1 × 0.5 mm の面積を露光した。現像後、これらの領域中の Al₂O₃ を、Trans Etch (Transene) を使用して除去した。フォトリソレジストを除去し、再び塗布し、接触領域単独を露光および現像した。BOE 5 : 1 を使用してこれらの領域中の SiO₂ をストリップした後、Pt 層を以前のように蒸着し、フォトリソレジストをストリップした。

【0046】

(実施例 5)

電気穿孔を介して注入されるイオン電流

実施例 4 で調製した個々にアドレス可能なセットの垂直 NW を有するシリコン担体頂部に HEK293 細胞をプレーティングおよび培養した。電圧パルスは NW 電極 (細胞外溶液中の Ag / AgCl 電極から約 0.5 cm 離れた) に印加しながら、電圧クランプモードで従来のパッチクランプ測定を実施することによって膜貫通電流を測定した。図 3 に示したように、5.5 V の低い振幅を有する外部電圧波形は、透過化された細胞膜を通るイオン電流を作り出す。

【0047】

(実施例 6)

部位特異的生体分子送達

実施例 4 で調製した個々にアドレス可能なセットの垂直 NW を有するシリコン担体頂部に HEK293 細胞をプレーティングおよび培養した。細胞特異的送達は、4.5 V の振幅を用いて、図 3 と同様の電圧刺激の後に達成された。細胞外溶液は、1 mg / mL の膜不透過性蛍光色素 (Alexa 647) を含有する PBS であった。電圧パルスの後、PBS を通して細胞を数回洗浄した後、蛍光画像化を行った。図 4 に示したように、細胞不透過性蛍光色素は、電圧波形を印加した後、個々にアドレス可能なセットの垂直 NW の

頂部の個々の H E K 2 9 3 細胞に送達された。

【 0 0 4 8 】

他の実施形態

本明細書に開示した特徴のすべては、任意の組合せで組み合わせることができる。本明細書に開示した各特徴は、同じ目的、等価な目的、または同様の目的を果たす代替の特徴によって置き換えることができる。

【 0 0 4 9 】

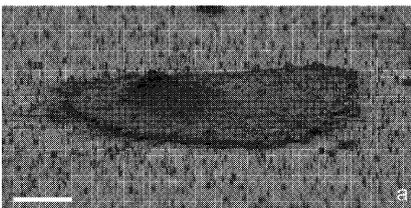
したがって、別段の特別な明言のない限り、開示した各特徴は、単に、一般的な一連の等価な特徴または同様の特徴の例である。

【 0 0 5 0 】

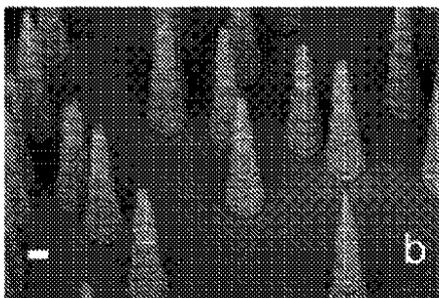
上記説明から、当業者は、本発明の本質的な特性を容易に確認することができ、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の様々な変更および改変を行うことによって、本発明を様々な使用法および条件に適応させることができる。したがって、他の実施形態も、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

10

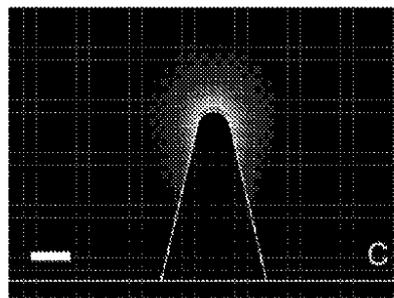
【 図 1 a 】



【 図 1 b 】



【 図 1 c 】



【 図 2 】

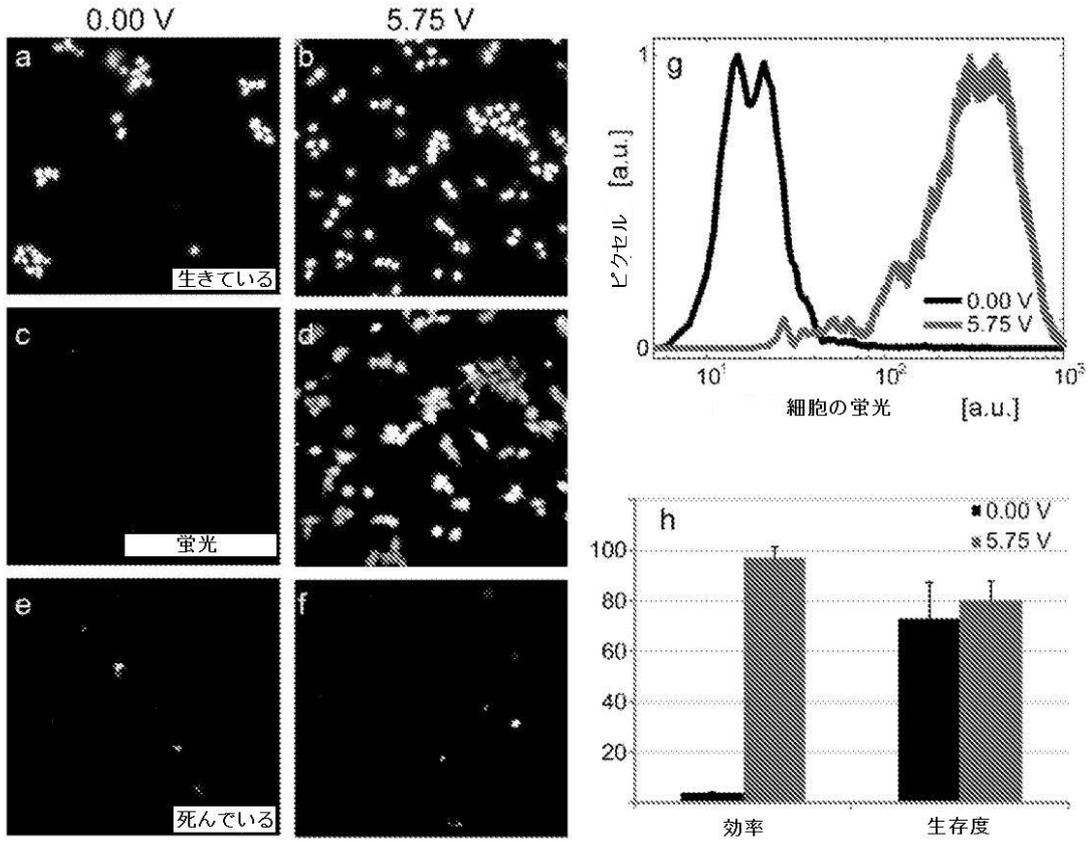


Figure 2

【 図 3 】

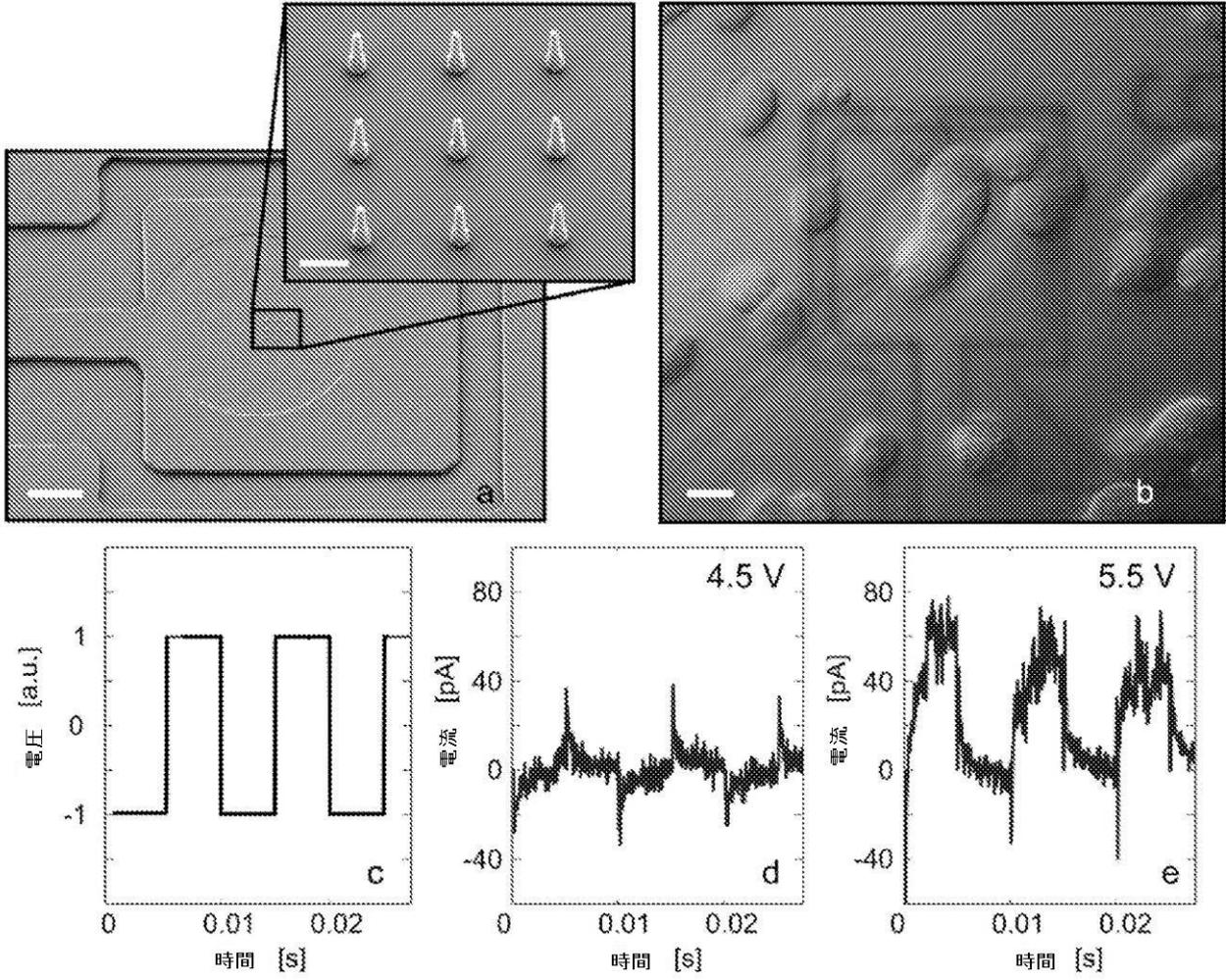


Figure 3

【 図 4 】

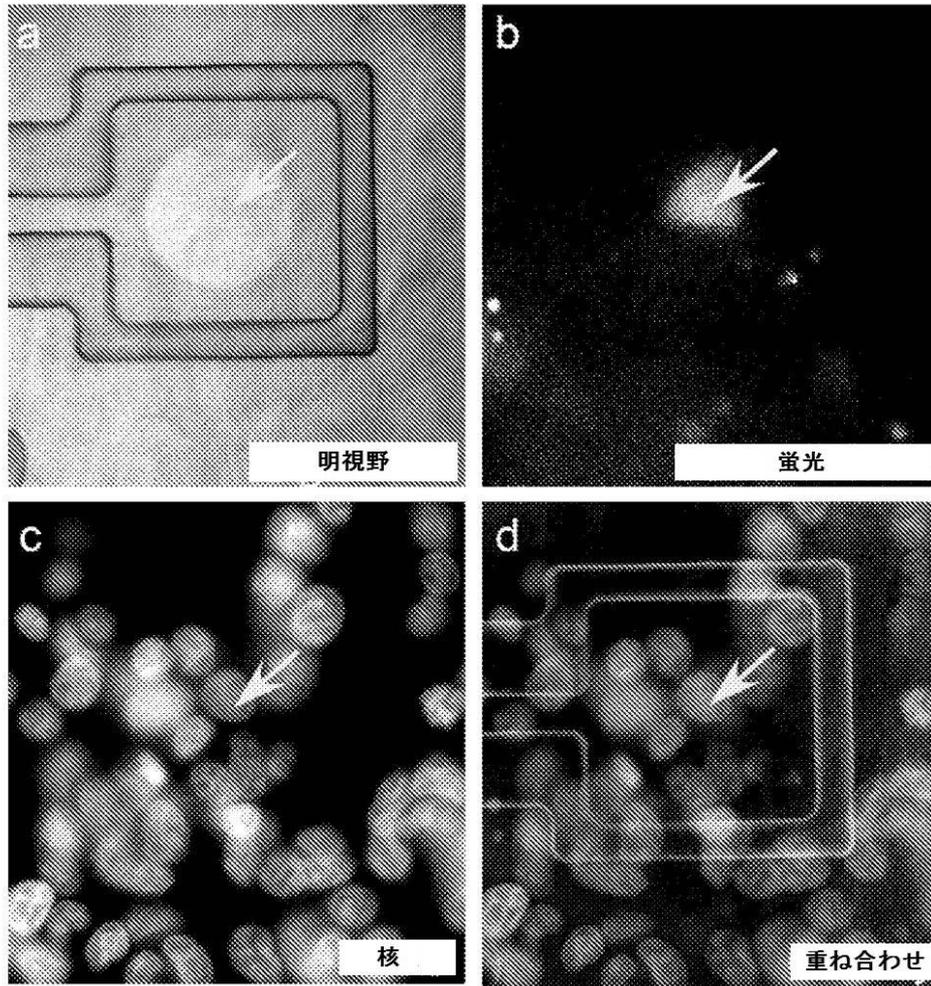


Figure 4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2011/053646
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61N1/32 G01N33/53 C12N5/00 B82Y5/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61N G01N C12N B82Y		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/050168 A1 (UNIV LOUVAIN [BE]; FERAIN ETIENNE [BE]; MAGNIN DELPHINE [BE]; DEMOUSTI) 23 April 2009 (2009-04-23)	1-3,5-7, 9-11
Y	figures 1A-1B page 10 - page 17	4,8
Y	WOONG KIM ET AL: "Interfacing Silicon Nanowires with Mammalian Cells", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 129, no. 23, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 7228-7229, XP55002725, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja071456k page 7228, left-hand column page 7229, right-hand column	4,8
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 June 2012		11/07/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gentil, Cédric

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/053646

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/003062 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; JIN SUNGHO [US]; OH SEUNGHAN [US]; BRAMMER KARLA) 7 January 2010 (2010-01-07) the whole document -----	1-11
A	US 2005/221072 A1 (DUBROW ROBERT S [US] ET AL) 6 October 2005 (2005-10-06) the whole document -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/053646**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos. :
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos. : 12-28
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos. :
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2011/053646

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 12-28

Rule 39.1(iv) PCT - Method of treatment of the human or animal being by therapy. Claims 12-20 and 21-28 are directed to methods of delivering a molecule to a cell, and may cover subject-matter relating to the curing of diseases or malfunctions of the human or animal body (see description, page 7, lines 4-5) in order to restore or maintain health (see e.g. claims 16 and 24, "cancerous cell"). It is therefore considered that claims 12-28 define two methods of treatment of the human or animal body by therapy, for which no international search needs to be carried out (Rule 39.1(iv) PCT)

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/053646

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009050168	A1	23-04-2009	CA 2700552 A1 23-04-2009 EP 2205291 A1 14-07-2010 JP 2011500184 A 06-01-2011 US 2010233226 A1 16-09-2010 WO 2009050168 A1 23-04-2009
WO 2010003062	A2	07-01-2010	US 2011159070 A1 30-06-2011 WO 2010003062 A2 07-01-2010
US 2005221072	A1	06-10-2005	NONE

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T
J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R
O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H
U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI
, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 パーク, ホンクン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, オックスフォード ストリ
ート 12

(72)発明者 ロビンソン, ジェイコブ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, オックスフォード ストリ
ート 12

(72)発明者 サットン, アミー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, オックスフォード ストリ
ート 12

(72)発明者 ジョルゴリ, マルセラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, オックスフォード ストリ
ート 12

(72)発明者 シャレック, アレクサンダー カン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, オックスフォード ストリ
ート 12

Fターム(参考) 4B029 AA24 BB01 BB11 CC02 CC08 DG10
4B065 AA90X BA03 BD39 BD50 CA60