



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101426929 B

(45) 授权公告日 2011.06.08

(21) 申请号 200580015262.4  
(22) 申请日 2005.05.12  
(30) 优先权数据  
60/570,317 2004.05.12 US  
(85) PCT申请进入国家阶段日  
2006.11.13  
(86) PCT申请的申请数据  
PCT/US2005/016728 2005.05.12  
(87) PCT申请的公布数据  
W02005/113820 EN 2005.12.01  
(73) 专利权人 麦克赛特股份有限公司  
地址 美国马里兰州  
(72) 发明人 S·泽库诺夫 N·肖帕斯 L·李  
(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100  
代理人 沙永生  
(51) Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01)  
(56) 对比文件  
US 4800163 A, 1989.01.24, 摘要, 说明书 1  
栏 50 行-2 栏 10 行, 6 栏 66 行-7 栏 48 行, 图 1、

6-7.  
US 4800163 A, 1989.01.24, 摘要, 说明书 1  
栏 50 行-2 栏 10 行, 6 栏 66 行-7 栏 48 行, 图 1、  
6-7.  
US 4800163 A, 1989.01.24, 摘要, 说明书 1  
栏 50 行-2 栏 10 行, 6 栏 66 行-7 栏 48 行, 图 1、  
6-7.  
US 5422272 A, 1995.06.06, 摘要, 说明书 2  
栏 44-48 行.  
WO 99/62592 A1, 1999.12.09, 说明书 5、  
10-11 页, 图 1、4, 权利要求 24.

审查员 李影

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 15 页

(54) 发明名称  
与可调流式电穿孔室相关的方法和装置

(57) 摘要

电穿孔室及其相关装置将作为歧管调节样品流动的电穿孔室的特征与流式电穿孔装置的特征结合在一起形成可调流式电穿孔装置。本发明还包括一种新型可调流式电穿孔室, 这种电穿孔室可改变条件使其中的样品在一个完全密封(无菌)的系统内以独立组分或独立体积的形式受到均一的处理。

1. 一种流式电穿孔装置,该装置包括:

a) 包含至少两个平行电极且具有顶部和底部的电穿孔室,所述电穿孔室形成在两个电极之间,且在所述电穿孔室的底部具有两个室接口,在所述电穿孔室的顶部具有两个室接口;

b) 至少一个通过位于所述电穿孔室底部的第一室接口与电穿孔室流体连通的样品容器,该电穿孔室通过位于所述电穿孔室顶部的第二室接口与样品容器流体连通,形成第一流动通路;

c) 至少一个通过位于所述电穿孔室底部的独立第三室接口与电穿孔室流体连通的产物容器,该电穿孔室通过位于所述电穿孔室顶部的独立第四室接口与产物容器流体连通,形成第二流动通路,

其中至少一个流动通路是无菌流动通路。

2. 如权利要求 1 所述的装置,其特征在于,所述产物容器也用作非样品气体储器。

3. 如权利要求 1 所述的装置,其特征在于,所述样品容器也用作非样品气体储器。

4. 如权利要求 1 所述的装置,该装置还包括与至少一个流动通路可操控连接的至少一个泵。

5. 如权利要求 1 所述的装置,其特征在于,所述产物容器是可折叠的、可扩张的或固定体积的。

6. 如权利要求 1 所述的装置,其特征在于,装置内的液流通过装置的一个或多个流动通路的开放或闭合来引导。

7. 如权利要求 1 所述的装置,其特征在于,所述第一和第二流动通路交替开放和闭合。

8. 如权利要求 6 所述的装置,其特征在于,所述液流由一个或多个泵装置调节。

9. 如权利要求 8 所述的装置,其特征在于,所述泵装置是泵。

10. 如权利要求 9 所述的装置,其特征在于,所述泵是蠕动泵。

11. 如权利要求 10 所述的装置,其特征在于,所述蠕动泵是全压缩蠕动泵。

12. 如权利要求 6 所述的装置,其特征在于,所述液流由阀门调节。

13. 如权利要求 6 所述的装置,其特征在于,所述液流由泵装置调节。

## 与可调流式电穿孔室相关的方法和装置

[0001] 发明背景

[0002] 本申请要求 2004 年 5 月 12 日提交的美国临时专利申请序列号 60/570,317 的优先权,该申请已完整纳入本文作为参考。

[0003] I. 发明领域

[0004] 本发明涉及用瞬时电场处理细胞的领域,更具体涉及细胞的电穿孔。更具体地说,本发明涉及用于可调流式电穿孔(flow electroporation)的方法、电穿孔室及相关装置。

[0005] II. 相关领域的描述

[0006] 自从 1970 年代早期开始电穿孔就被用于将分子插入到动物或植物细胞内。研究者证实,细胞暴露于短暂持续的高压电场中可导致细胞膜上形成通道,分子,其中包括大分子如蛋白质和 DNA,可通过该通道进入细胞内。这些通道被称为电孔洞(electropore),是由高压电场造成的细胞膜局部破裂引起的通透性升高区。这些孔洞存在的时间虽然短暂,但是足以满足大分子如质粒 DNA 分子进入细胞的需要。细胞虽然能够耐受这些孔洞的形成,但是,如果形成的孔洞过多,其产生的过程以及由此导入的分子也可能会杀死细胞。由于这种电穿孔过程会导致电流(虽然短暂)通过传导性的细胞悬液,因此,根据焦耳定律电极会产生热量。这种热量可使细胞悬液的温度升高,如果热量过多,会使细胞的温度升高到足以导致细胞死亡的程度。初期进行电穿孔时用的是特殊的容器,其中有彼此相对的电极,二者之间可产生基本均匀的电场。最方便的是用两个平板电极,分别固定在矩形容器或矩形室相对的两个壁上。将准备进行电穿孔的细胞悬液与操作者希望将其导入到细胞内的分子混合,加入到容器或室内,然后将其置于两个电极之间,这样细胞悬液就会混入到与电极接触的液体中。为了影响分子通过电穿孔导入到细胞内的效果,在电极上通以一次或多次短时间的高压电场脉冲,从而对电极之间的细胞悬液施以高压电场脉冲。目前市场上最常见的电穿孔容器的容积都有限,每次处理的细胞悬液量很小(通常低于 1ml)。如果每次加入到容器内进行电穿孔的细胞量很小,那么对大体积的细胞悬液进行电穿孔就是不切实际的。

[0007] 一般来说,对大体积的细胞进行电穿孔必须保持无菌。重复在容器内加样以及混合集中电穿孔的细胞是不可能保持无菌的。虽然这种电穿孔法方便而简单,能够满足许多研究者进行小规模细胞电穿孔的要求,但是,还需要寻找其他的方法,特别是能够方便地对大体积的细胞进行电穿孔,同时又能保持无菌环境的方法。在封闭的无菌环境内对大体积的细胞进行电穿孔可使电穿孔用于人类的细胞治疗。因此,在整个操作过程中能形成并保持封闭的无菌流动通路的方法和装置是我们最需要的。

[0008] 在 20 世纪 80 年代,有一些研究者开始研究用于处理大体积细胞的流式电穿孔法(美国专利 4,752,586,5,612,207,6,074,605,6,090,617,本文都已完整纳入作为参考)。一般来说,用于电穿孔的流动装置包含两个平行电极,要进行电穿孔的细胞悬液持续而稳定地流过两个电极之间,直到整个细胞悬液都进行了电穿孔。在细胞悬液稳定地流过两个电极之间时,高压脉冲被施加到细胞上。在电极上重复施加高压脉冲会导致热量的产生,因此必须通过冷却装置将热量带走,防止电极和细胞悬液的温度过高。流式电穿孔装置包含

带电极和接口的电穿孔室,细胞悬液可通过接口注入。电极与能给电极提供高压脉冲的电路相连。高压脉冲由程序控制计算机控制。现在已开发出了流式电穿孔系统,该系统能够对较大体积的细胞进行电穿孔,能够制备出已导入目的分子的活细胞。

[0009] 电穿孔的条件因细胞类型的不同而不同,还因期望导入到细胞内的分子的类型不同而不同。对于任何一个特定类型的细胞来说,都存在一个最佳的处理条件,其中包括最佳电压的最佳脉冲次数以及以最佳间隔时间进行脉冲的持续时间。为了使施加到细胞上的电脉冲次数达到最佳,在使用本领域所描述的流式电穿孔装置时,细胞悬液通过电穿孔室、在电极之间的流速以及脉冲的速率都是可以选择的,从而对一定体积的细胞悬液进行最佳次数的脉冲。例如,对于一个特定细胞来说,如果已知每个细胞上施加的最佳脉冲数是2,通过电穿孔室的体积是1ml,那么,流速就设定为每一单位时间1ml,每一单位时间内施加的脉冲次数为2。如果以这种方式进行电穿孔,在这个例子中每个细胞就会受到2次脉冲。但是,细胞悬液通过电穿孔室的水动力学流动不会导致细胞以相同的速率通过室以及在电极之间流动。由于离室壁远的地方比靠近室壁的地方流速高,因此,在电极之间向液流中心流动的细胞通过电极之间的区域所需要的时间会低于单位时间,其受到的脉冲次数可能会少于2次,而靠近室壁流动的细胞通过电极之间的区域所需要的时间会高于单位时间,其受到的脉冲次数可能高于2次。由于在这个例子中每个细胞受到的最佳脉冲次数为2次,但是,很明显并不是每个细胞都受到了最佳次数的脉冲,因此,细胞悬液的整体电穿孔效果就不是最佳的。

[0010] 如上所述,按照焦耳定律,电穿孔必然会在细胞悬液内产生热量。由于在流式电穿孔法中液流是稳定而持续的,其产生的热量也是持续的,因此,从电穿孔室中带走热量的装置必须能够平衡产生的热量从而避免电穿孔室的温度上升到不可接受的程度。在两次电穿孔之间进行冷却时这个过程可以不保持连续性。

[0011] 如上文所讨论的,电穿孔的最佳条件根据电穿孔的特定细胞类型以及想要通过电穿孔导入到细胞内的分子类型的不同而不同。利用试验的方法解决这个问题是可能的,利用静态的室有组织地改变电穿孔的条件,然后将确定于这些试验的最佳条件应用到流式电穿孔系统中。这个方法有两个缺点。第一,由于进行大量样品的静态室电穿孔需要耗费大量的时间,因此,用于每次静态电穿孔的细胞在试验中也会发生改变。第二,使用这种方法只是因为人们认为静态室电穿孔的最佳条件与流式电穿孔是一样的,但是并不知道这是否真实。我们期望的是利用一个细胞样品就能够确定使用同一个装置进行所有电穿孔试验的最佳条件,这个条件可用于治疗或其他目的所需的细胞大规模电穿孔。

[0012] 某些分子,其中最明显的是mRNA,在人们期望通过电穿孔将分子导入其内的细胞内是不稳定的。对于mRNA来说,这可能是由细胞培养基内或细胞表面上存在的核酶造成的。在这种情况下,我们希望分子在被导入到细胞内前处于此不稳定条件下的时间缩短到最短。在利用静态室进行电穿孔时,分子(如,mRNA)与细胞混合,然后手工加到室内,液体一旦注入到电穿孔装置内就马上进行电穿孔。在进行这些手工操作步骤期间,粘附到细胞上的某些分子可能被破坏。在电穿孔前立刻使被导入分子与细胞在封闭的无菌环境中自动混合的方法是我们所期望的。

[0013] 在本领域所描述的持续流动系统中,除了在电极上施加脉冲的时间与细胞在电极之间开始流动的时间需要协调之外,脉冲与细胞流动之间不需要“期间处理”的协调。

[0014] 既有持续流式电穿孔的优点,特别是能在无菌封闭系统内对大体积的细胞进行电穿孔,又能保证每个细胞都受到最佳次数的脉冲的方法和装置是我们所期望的。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明的实施方式包括电穿孔法以及能进行大体积电穿孔的相关电穿孔装置和设备。在某些方面,本发明能平衡热量的产生以避免室的温度升高到不可接受的程度。另外,电脉冲可以被优化以处理单位体积的目的样品和 / 或处理全部或部分目的样品。本文所用的术语“单位体积”或“单位”是指灌满或部分灌满电穿孔室所需的样品或液体的体积。一个单位一般是指暴露于一个特定电脉冲或一系列电脉冲的一部分样品。每一个单位都可以被称为样品的一个部分。单位可由操作者确定,并且可以通过注入或排出电穿孔室或者通过改变液体流过室的速率来调整单位的大小。每个单位都可以是样品的不连续部分,通过在两个或多个样品单位之间加入非样品气体或液体。在许多实施方式中,样品的处理可在闭合系统内进行,即,限制外部环境接触装置或设备容器的内部、流动通路和电穿孔装置的室的系统。这种封闭系统可用于保持无菌和样品的完整性。

[0017] 本发明的实施方式包括流式电穿孔处理方法,该方法包括调节样品流过电穿孔室的速率。一般来说,样品以单位的形式处理,该单位是由重复循环注满或排出电穿孔室而产生的。循环通过电穿孔室的每一个样品单位都暴露在相同或不同的电脉冲或条件下。在某些方面,样品的单位是通过在未处理和已处理的样品体积之间设置一个边界而形成的。边界可将非样品气体或液体循环到两个或多个样品单位或部分之间的室内而提供。非样品气体或液体一般由一定体积的未处理样品置换出室。可通过从电穿孔室中排出已处理的样品、将样品主动泵入电穿孔室、将非样品液体或气体主动泵入电穿孔室或上述过程的组合使非样品液体或气体流入电穿孔室。

[0018] “泵送”是指提供一个压力梯度从而给液体或气体施加一个运动力。例如,这种运动力可由重力或被泵入液体的表面张力所产生的力来提供。给气体或液体施加运动力的装置,特别是给细胞悬液施加运动力的装置,被称为泵装置。泵装置包括在系统内产生压力差以调节液体或气体在流动通路内流动速度的各种机器。已知的各种泵装置包括而限于旋转泵、摆动泵、离心泵、空运泵或喷射泵。泵装置可包括活塞、蠕动装置、横隔膜、体积可变的容器、压缩气体、螺旋辊、涡轮、螺丝、齿轮传动型机械以产生可调节的液体或气体流。

[0019] 在某些特殊的方面,循环是通过改变样品流过电穿孔室的 1、2、3、4 或更多接口的速度来产生的。“接口”是指液体流入或流出电穿孔室所通过的开口。应当考虑的是,电穿孔室可以作为歧管 (manifold) 来引导液体的流动,但是其他实施方式可以使用,可以使用或不使用不作为电穿孔室一部分的歧管。样品或非样品液体或气体的循环一般由 1、2、3、4、5、6 或更多个泵装置、阀门或其他液体调节装置的不同组合来调节。在一个实施例中,边界可通过将样品滴过室来提供,其中样品滴在通过两个电极之间时暴露于一个或多个电脉冲之下。

[0020] 本发明的其他实施方式包括流式电穿孔室,该电穿孔室包含带至少两个电极和至少 3 个接口的室,其中,(i) 第一接口用于样品流入室;(ii) 第二接口用于已处理样品流出室;和 (iii) 第三接口用于非样品液体或气体流入或流出室,其中,在样品流入室时非样品液体或气体流出室,在样品流出室时非样品液体或气体流入室。第一接口与一个或多个样品容器形成流体连通。第二接口与一个或多个已处理样品容器形成流体连通。第三接口与

一个储存容器形成流体连通,其中当室注满或部分注满样品时储存容器内盛有全部或部分非样品液体或气体。在某些实施方式中,室至少有四个接口。第四接口与样品容器、已处理样品容器、非样品气体或液体储器、试剂容器(如洗涤缓冲液、清洗溶液、冷却溶液等)或上述容器的组合形成流体连通。

[0021] 在其他实施方式中,流式电穿孔装置包含通过第一室接口与电穿孔室发生流体连通从而形成第一流动通路的至少 1、2、3、4 或更多个样品容器;通过第二室接口与电穿孔室发生流体连通从而形成第二流动通路的至少 1、2、3、4 或更多个已处理样品容器;以及通过第三室接口与电穿孔室发生流体连通从而形成第三流动通路的至少一个非样品液体或气体储器。非样品气体或液体储器可以是非样品气体或液体容器、样品容器的一部分、已处理样品容器的一部分、电穿孔室的一部分、或其不同组合。第二流动通路可以和第一流动通路的一个或多个样品容器及第三流动通路的非样品储存容器形成流体连通,后者相对于第二流动通路的已处理样品容器来说处于电穿孔室的远处。在某些方面,装置还包含可操控地连接到至少 1、2、3、4 或更多个流动通路上的至少 1、2、3、4 或更多个泵。样品容器、已处理样品容器、非样品液体或气体储器或上述容器的不同组合可以是可折叠的、可扩张的或固定体积的容器。在本发明的其他方面,装置内的液流可由装置的 1、2、3、4、5、6 或更多流动通路的开放或闭合来控制。不同流动通路可交替开放和闭合,优选的是从样品容器到电穿孔室的流动通路和从已处理容器到电穿孔室的流动通路交替开放和闭合,其中,在电穿孔循环期间二者不会同时开放。液流可由 1、2、3、4、5、6 或更多个阀门,1、2、3、4、5、6 或更多个泵装置,或者上述装置的不同组合来控制。在一个优选实施方式中,泵是蠕动泵,更优选的是,蠕动泵是全压缩蠕动泵。

[0022] 在其他的实施方式中,流式电穿孔装置可包含通过第一室接口与电穿孔室形成流体连通的至少 1、2、3、4 或更多个样品容器和通过第二室接口与样品容器形成流体连通的电穿孔室,形成第一流动通路;至少 1、2、3、4 或更多个已处理样品容器通过第三室接口与电穿孔室形成流体连通,电穿孔室通过第四室接口与已处理样品容器形成流体连通,形成第二流动通路。1、2、3、4 或更多个已处理样品容器还可作为非样品气体或液体储存容器。在某些方面,非样品气体或液体储存容器与样品容器或已处理样品容器结合在一起,或者和二者都结合在一起。装置还可以包含可操控地连接到至少 1、2、3、4、5、6 或更多个流动通路上的至少 1、2、3、4 或更多个泵装置。样品容器、已处理样品容器或者二者都可以是可折叠的、可扩张的或固定体积的容器。在许多方面,装置内的液流是由装置的一个或多个流动通路的开放或闭合来控制的。在某些实施方式中,第一和第二流动通路交替开放和闭合。液流通常由一个或多个泵装置调节或控制,优选的是泵,更优选的是蠕动泵,更优选的是全压缩蠕动泵。液流还可由阀门、泵装置或其组合的不同组合来调节或控制。

[0023] 应当注意的是,本文描述的所有方法或组合物的实现都与本文所描述的其他方法或组合物有关。

[0024] 单词“一”或“一个”与权利要求和/或说明书中的术语“包含”连用时是指“一个”,但是也可以指“一个或多个”、“至少一个”、以及“一个或一个以上”。

[0025] 权利要求中所用的术语“或”的意思是“和/或”,除非明确地指出只表示二者选一,或者二者是互相排斥的,尽管说明书支持只是二者选一和“和/或”的定义。

[0026] 本发明的其他目的、特征和优点通过阅读下面的详细说明就可以清楚。但是应当

理解的是,详细描述和特定的实施例在用于说明本发明的特殊实施方式的同时,只是以说明的方式提供,因为本领域的技术人员通过阅读这个详细说明就可以清楚地理解本发明精神和范围内的各种改变和修饰。

[0027]

## 附图简述

[0028] 下面的附图构成了本说明书的一部分,用于进一步证明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文所提供的特殊实施方式的详细描述可以更好地理解本发明。

[0029] 图 1 是电穿孔过程一个典型循环的示意图。

[0030] 图 2 是电穿孔过程第一典型构成的示意图。

[0031] 图 3 是电穿孔过程第二典型构成的示意图。

[0032] 图 4 是电穿孔过程第三典型构成的示意图。

[0033] 图 5 是电穿孔室的一个实施方式的图解。

[0034] 图 6 是电穿孔室的一个实施方式的分解图。

[0035] 图 7 是电穿孔室的另一个实施方式的分解图。

[0036] 图 8 是本发明电穿孔室的另一个公开实施方式的透视图。

[0037] 图 9 是本发明电穿孔室的另一个公开实施方式的分解透视图。

[0038] 图 10 是安装到电穿孔装置内的电穿孔室的示意图。

[0039] 图 11 描述的是 Jurkat 细胞在电穿孔后 24 小时进行碘化丙锭 (PI) 和 GFP 荧光分析的结果。

[0040] 图 12A-12C 描述的是 Jurkat 细胞在电穿孔后 24 小时通过 FACS 分析得到的荧光强度直方图。图 12A 是对照转染。图 12B 是 400  $\mu$  L 静态转染。图 12C 是 100mL 可变流式转染 (flow transfection)。

[0041] 图 13 描述的是连续循环的电穿孔所收集的各个组分的分析结果。

[0042] 图 14 描述的是包含活塞型泵装置的本发明的另一个实施方式。

[0043] 图 15 描述的是一个封闭的一次性单冲程泵送系统。

[0044]

## 说明性实施方式的描述

[0045] 本发明的实施方式包括用于电穿孔的各种新型设备和方法。更具体地说,某些实施方式提供了用于将分子、化合物或组合物导入到细胞或细胞组分内的流式电穿孔装置和方法,其中的细胞或细胞组分包括而限于细菌、真菌、植物细胞、动物细胞、培养的细胞、原代细胞、红细胞、白细胞、血小板、干细胞、基因改造的干细胞或干细胞的扩增群。在某些方面,瞬时高压电场如果使用太高的电压或持续时间过长会打乱细胞的代谢及杀死某些细胞。由于不同类型的细胞在用瞬时电场处理时所受到的瞬时电场的影响是不同的,例如通过电穿孔将分子加载或导入到细胞内的那些电场,因此,不同的细胞所受到的杀伤是不同的,因而某些细胞可能被从细胞群中清除。在另外一些方面,分子不需要被导入,但是样品通过暴露到电场中进行处理。在另外的实施方式中,目的不是将外源分子导入到细胞内,而是修饰被处理的细胞,即,在暴露到电场中之前、期间或之后使细胞接触某些其他的药理试剂或条件—杀死是修饰的极端例子。在另一个实施方式中,本发明的装置将进行细胞电穿孔的电穿孔室与装置内细胞悬液的可调流动或可变流动组合在一起,这种装置可使电穿孔室的重复注入和排空与电脉冲互相协调。优选的是,室与其相关的流动通路和容器形成一

个闭合无菌环境。本发明的其他优点包括装置能够提供更均匀的细胞脉冲。这种新型可调流式电穿孔室以单位体积的形式对细胞悬液进行电穿孔。各个组分或单位体积由流过电穿孔室的样品体积决定,其间由非样品气体或液体物理分隔,或者由其他方式如阀门的开放和闭合将其彼此分隔。样品体积之间的分隔有利于分别收集每一独立的体积,其中连续体积的样品可能不会经历相同的电穿孔条件,或者其中连续体积的样品可能会包含细胞和分子的不同组合来进行电穿孔加载。应当注意的是,本发明的方法和装置,其中包括电穿孔室,可用于包裹各种细胞群内的各种物质,也可用于使细胞暴露于已包含、正包含或将包含药理试剂或条件的电场中。暴露于电场本身就是对细胞进行处理。

[0046] 本发明的某些实施方式包括处理方法,其中有可调液流或气流通过室。因此,这个处理方法被称为连续流。但是,在某些实施方式中,样品流或已处理样品流在处理过程中流速可以减缓或停止,这样,液流或气流作为一个整体而不是作为特定的样品、液体或气体流过室被描述为连续流。电穿孔过程一般包含流过室的样品流,其中的样品以固定体积的部分或单位体积的形式被处理。在细胞悬液的两个部分进行电穿孔的间歇期由流入电穿孔室的非样品液体或气体将样品分隔成独立的组分。

[0047] 在某些实施方式中,样品可被分成多个组分。另外,每个被处理的样品组分可以被分别分类、收集和 / 或储存或分成特定的组。产物或已处理样品组分可以是几个已处理样品的混合物或者一次一个。在本发明中没有任何事情可干扰本技术的使用者用一个样品部分填满室,然后加入其他溶液,进行电穿孔,并收集得到的产物。

[0048] 在本发明的某些方面,不同样品组分可暴露于不同的脉冲或试剂中。例如,开始时全部或部分样品或同一组物质的一个样品用一个范围的条件处理以便于快速地确定最佳的电穿孔条件。另外,使用者可以希望得到细胞群或细胞的不同组分,其中包含已暴露于各种电穿孔条件下的细胞。

[0049] 在某些实施方式中,“在线混合”样品组分也是可以考虑的。例如,某些试剂可能对电穿孔混合物中的细胞或其他电穿孔靶标或试剂不稳定或有害。因此,我们希望在电脉冲前临时加入这些组分,即,不要提前混合,或者不要只在电穿孔前的短时间内混合电穿孔样品的一个或多个组分。

[0050] 本发明的其他实施方式包括新型可调流式电穿孔室,该电穿孔室可使细胞可调节地流入和流出电穿孔室,这样,细胞在接受高压脉冲时流入或流出室的速率要低于脉冲间隙或系列脉冲时。细胞的流速不需要降低到 0 以体现可调流的优势,但是在电穿孔期间降低流速是我们所期望的。本发明的实施方式还可以暂时协调为电极提供高压脉冲的电子元件和使细胞悬液在电极之间流动的装置。使细胞悬液流动的装置(给液体气体提供运动力)是指泵装置。泵装置包括在系统内产生压力差以调节液体或气体在流动通路内的流速的各种机器。已知的泵装置包括而限于重力泵、旋转泵、摆动泵、离心泵、空运泵或喷射泵,泵还可以包括活塞、蠕动装置、横隔膜、体积可变的容器、压缩气体、螺旋辊、涡轮、螺丝或齿轮传动型机械以产生可调节的液体或气体流。

[0051] 本发明还提供了可方便地在细胞悬液进行电穿孔的间歇期内冷却电穿孔室的装置。向电穿孔室内注入细胞悬液与从电穿孔室中排出细胞悬液之间的时间间隔是可以调节的,以确保在对细胞悬液进行电穿孔前电穿孔室的温度不要高于某个特定温度。

[0052] 与本文所描述的主要原则一致的对基本设计的其他修改也包括在本发明之内。在



各种实施方式中,样品和产物管道或流动通路只与室的空腔匹配,即,室可作为样品流动的歧管存在,在新的样品组分达到前室可完全或部分排空。本文所用的术语“流动通路”是指组件或部件的集成,通过隧道、管道、导管或通路的形式进行流体连通,流体如液体或气体可通过该通路。本文所用的术语“流体连通”是指流动通路的两个或多个部件之间直接或间接的功能性连接,该联通可使液体在部件之间及流动通路内流动。例如,如果液体能从样品容器流到室内,那么就可以说样品容器与室有“流体连通”。

[0053] 一个可产生流体连通的流动通路的例子是包括一个容器和一个室的通路,二者之间由带一个装置的管道相连,该装置用于调节液体或气体流过通路的速率,这种装置包括一个全压缩蠕动泵或者一个位于容器和室之间的阀门。调节装置可操控地连接到容器和室之间的任何位置上。术语“可操控地连接”与流速调节装置连用时是指调节装置与液体或气体之间的直接或间接联通,这样可以某种方式调节液体或气体的流速,如允许流动或禁止流动。调节装置不一定和液体或气体直接接触,如,可弯曲管上的夹子(例如,参见图15)。

[0054] 在某些实施方式中,装置的一个或多个流动通路可以是无菌通路。就是说,从样品源中流出的样品和从室流向已处理样品容器的已处理样品可以处于闭合系统内。封闭系统可在适当的无菌条件下准备,这样在处理过程中可以使样品保持无菌。另外,容器、管道、电穿孔室都是一次性的。本文所用的术语“一次性”是指所设计和组装的部件足够便宜,即使不是大多数使用者,也是很多使用者都认为在经济上没有重复使用该部件的必要,在使用一次后就可以将其丢弃。

[0055] 本发明的装置和方法还可以包含其他各种处理组分。例如,在循环中间或一定次数的循环之后用于洗涤、清洁或冷却室的溶液,如洗涤缓冲液。在装置停止使用时也可用洗涤缓冲液冷却电极和室。

[0056] I. 流式电穿孔法的描述

[0057] 图1是一个示意图,代表了本文所描述的可调或断续流式电穿孔法的一个典型电穿孔循环。框(panel)1描述的是非样品液体或气体从室中的排出,框2描述的是在非样品液体或气体从室中排出的同时将待电穿孔样品注入室。框3和4描述的是在样品从流入到流出的流动过程中对样品进行电穿孔。框5和6描述的是在已处理样品从室中排出的同时注入非样品液体或气体。本发明的方面包括通过电穿孔室的1、2、3、4、5、6或更多个接口所发生的流入、流出或者流入及流出。流入和流出可通过同一接口,也可以通过不同的接口。室本身可作为歧管使用,或者在室外样品源与室之间、收集点与室之间、或者两个样品源与收集点之间的位置上设置独立的歧管。本发明的实施方式并不要求都使用歧管。

[0058] 在样品注入室的过程中,液体可以是喷出并渗到室的空腔内。这种喷射可能会对细胞产生水动力学压力,或者会在细胞悬液内产生泡沫或气泡。在处理活细胞时最好要避免产生水动力学压力和泡沫或气泡。当我们希望提高电穿孔处理过程的通量时,液体喷射、水动力学压力和气泡形成就会成为问题。如果使用者想尽量缩短用细胞悬液注满和排空室所需的时间,可以选择会导致液体喷射的流速,但其负面效果比更快流速获得的优点更加显著。如下文所示,在某些条件下,液体可能会从入口喷入室内,并且可能会渗透到其本不应当存在的系统空腔内。避免出现这种问题的一个方法是根据水动力学领域的成熟原理设置一个笔直通道,或者制作一个测试室,可以从中观察注入的细胞悬液流,例如用透明材料制作室的表面。利用这种测试室可以观察液体喷射状况或者气泡或泡沫的产生情况,从而

有可能避免产生喷射或形成气泡或泡沫。

[0059] 在一种解决喷射问题的方法中,考虑使少量体积(一滴)的液体离开垂直放置的圆管上的开口。当液体处于管中时由泵或其他方式所产生的跨圆管两端的压力差推动。当液体从圆管中流出时继续延惯性方向流动。如果流动的方向是朝上,那么肯定对游离的液滴不会施加力,发明者能够根据能量守恒原理估算出其在空气中运行的距离,该原理认为液滴的动能与势能之和为常数(公式1):

$$[0060] \quad \text{公式 1: } \frac{mV(t)^2}{2} + mgh(t) = \text{常数}$$

[0061] 其中

[0062] m 是液滴的质量,

[0063] V(t) 是其速度,

[0064] g 是重力加速度,以及

[0065] h(t) 是液滴位于圆管开口上方的高度。

[0066] 由于液滴在离开圆管的那一刻所具有的全部机械能基本都是动能,因此常数等于  $1/2mV_0^2$ , 其中  $V_0$  是液流的平均线性速率,它等于体积流率与管道截面积之比。当液滴到达其最高点时,其速度为 0,利用关系式(公式 2)可计算出其高度。在设计系统时可以将这些力考虑进去,通过改变流动通路的形状、电穿孔室的几何构型以及调节系统内液流所使用的压力就可以使系统的设计达到最优化。

$$[0067] \quad \text{公式 2: } mgh_{\max} = \frac{mV_0^2}{2}, \text{ 或 } h_{\max} = \frac{V_0^2}{2g}$$

[0068] 例如,以 5mL/s 的速度泵送细胞悬液通过内径(ID)为 1/8 英寸的圆管。其平均线性速率就是 ~63cm/s,根据层流原理,圆管中心的最大线性速率将达到平均速率的两倍,因此  $V_0$  值可达 126cm/s。假设 g 等于 980cm/s<sup>2</sup>,那么可以得到  $h_{\max} = 8\text{cm}$ 。这个例子可比拟处理室的特征形状,因此,在指定的条件下喷射是可能的。

[0069] 解决喷射问题的方法包括而不限于下列例子:流速增加两倍  $h_{\max}$  就会增加 4 倍,在流速为 10mL/s 时喷射高度将达到 30cm 以上,这就意味着细胞悬液绝对是通过喷射进入室内而不是缓慢流进室内的。另一方面,管道的截面积增加 2 倍喷射高度将会下降 4 倍,因此,如果流速确定,我们所选择的供应管道和入口的直径应尽可能地大以使喷射和对悬液内细胞的干扰降低到最小。根据解决问题的这个原理,可以通过试验流速、接口直径、流动通路等的不同组合来确定更有效的解决方法。

[0070] 本发明的方法可利用具有不同构型的装置来实现。在第一个实施例中,装置的构型包括图 5 或图 8 所示的电穿孔室或其修改构型。参照图 2,样品源 30 通过第一流动通路 31 与室 11 形成流体连通,31 通过室接口 17 与室相连。从样品源 30 向室 11 的流动通过阀门 32 调节。室 11 与已处理样品储存罐 36 之间由第二流动通路 37 通过第二接口 18 相连。流动通路 37 内的流动由第二阀门 38 调节。非样品液体或气体源 35 通过第三流动通路 33 与室 11 形成流体连通。流动通路 33 提供了非样品气体或液体储存罐 35 与室 11 之间的流体连通。第三流动通路 33 包含驱动液体流入流动通路并与之连接的泵 34 或其他装置。第三流动通路 33 通过第三接口 19 连接到室 11 上。

[0071] 图 2 所示的是一个典型的系统初始构型,其中的室 11 含有非样品液体或气体,样

品源 30 包含靶细胞、靶物质、试剂或其不同组合的溶液。当阀门 32 开放而阀门 38 关闭时, 泵 34 可将室 11 内的非样品液体或气体排空。另外, 也可以将样品泵入室内以替换或压缩非样品液体或气体。当非样品气体离开室 11 或在室内被压缩时, 来自样品源 30 的样品流入室 11 内。一旦室 11 注满了样品, 就利用电极向室内发送电脉冲。暴露于电流之中的样品被认为是已处理样品。当阀门 32 关闭而阀门 38 开放时, 非样品液体或气体被泵入室 11 内。通过排空已处理样品可将非样品液体或气体主动泵入或吸入室内。已处理样品通过流动通路 37 流到标记为收集袋 36 的储存罐或收集点内。这个过程可循环数次, 其间可以改变电脉冲, 也可以不改变, 直到全部或部分起始体积的样品被处理完。

[0072] 参照图 3, 本发明的另一个实施方式包括通过第一流动通路 31 与室 11 形成流体连通的样品源 30, 31 通过室接口 17 与室 11 相连。从样品源 30 向室 11 的流动由标记为 32 的阀门调节。非样品液体或气体源与已处理样品储存罐或收集点结合形成非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39。室 11 由第二流动通路 37 通过第二接口 18 与非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39 相连。第二阀门 38 可调节流动通路 37 内的液流。非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39 通过第三流动通路 41 与室 11 形成流体连通。流动通路 41 在非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39 与泵 34 之间分叉形成第四流动通路 42。第三流动通路 41 可操控地与泵 34 或驱动液体在流动通路内流动的其他方式相连。第三通路 41 通过第三接口 19 与室 11 相连。

[0073] 图 3 所示的是一个典型的系统初始构型, 其中的室 11 和非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39 含有非样品液体或气体, 样品源 30 包含靶细胞、试剂、靶物质或其不同组合的溶液。当阀门 32 开放而阀门 38 关闭时, 泵 34 可驱动室 11 内的非样品液体或气体流过流动通路 42 进入样品源 30。当非样品气体离开室 11 时, 来自于样品源 30 的样品流入室 11。一旦室注满了样品, 就利用电极向室内发送电脉冲。暴露于电流之中的样品被认为是已处理样品。当阀门 32 关闭而阀门 38 开放时, 非样品液体或气体从非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39 通过流动通路 41 被泵入室 11 内。已处理样品流过流动通路 37 进入非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39。这个过程可循环数次, 直到全部或部分起始体积的样品被处理完。

[0074] 在其他的实施方式中, 电穿孔室 10 具有图 4 所示的构型。参照图 4, 样品源 30 通过流动通路 31 与室 11 形成流体连通, 后者通过室接口 17 与室相连。从样品源 30 向室 11 的流动由阀门 32 或泵 43 调节, 阀门 32 是可选的。室 11 由第二流动通路 37 通过第二接口 18 与非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39 相连。流动通路 37 内的流动由第二阀门 38 (可选的) 或第一泵 34 调节。非样品液体或气体源与已处理样品储存罐或收集点结合形成非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39。非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39 通过第三流动通路 44 与室 11 形成流体连通。第三流动通路 44 可操控地与第一泵 34 或驱动液体在流动通路内流动的其他方式相连。第三流动通路 44 通过第四接口 20 与室 11 相连。室 11 通过接口 19 和第四流动通路 45 与样品源 30 相连。第二泵 43 可操控地与第四流动通路 45 相连。

[0075] 图 4 所示的是一个典型的系统初始构型, 其中的室 11 和非样品液体或气体 / 已处理样品储存罐 39 含有非样品液体或气体, 样品源 30 包含靶细胞、试剂、靶物质或其不同组合的溶液。当阀门 32 开放而阀门 38 关闭时, 或者第一泵 34 抑制第二通路 37 和第三流动

通路 44 内的液流时,第二泵 43 可驱动室 11 内的非样品液体或气体流过流动通路 45 进入样品源 30。当非样品气体离开室 11 时,来自于样品源 30 的样品通过流动通路 31 流入室 11。一旦室注满了预定体积的样品,就利用电极向室内发送电脉冲。暴露于电流之中的样品被认为是已处理样品。当阀门 32 关闭或者第二泵 43 抑制第一流动通路 31 和第四流动通路 45 内的液流且阀门 38 开放时,非样品液体或气体由第一泵 34 从非样品液体或气体/已处理样品储存罐 39 通过流动通路 44 泵入室 11 内。这个过程可循环数次,直到全部或部分起始体积的样品被处理完。

[0076]

## II. 流式电穿孔装置的描述

[0077] 电穿孔室组件可用于选择性地区隔生物单位,如细胞,这些生物单位由外部源进入电穿孔室组件内。然后在生物或化学物质存在的情况下对生物单位进行电穿孔,使物质进入生物单位膜上瞬时开放的孔道内。生物单位被电穿孔后移出电穿孔室,进行下一步的处理,然后再对另一部分或单位体积的细胞悬液进行电穿孔。下面根据本发明的典型实施方式对电穿孔室的结构和构造进行详细描述。

[0078] 本发明的某些实施方式包括用于对粒子,尤其是活细胞的悬液进行电处理的电穿孔室,其中包含带有一个或多个流入口和一个或多个流出口的电穿孔室。电穿孔室包括两个或多个壁,其构型可接受并储存由一个或多个流入口流入的样品,如,悬液中的细胞,或非样品液体或气体。室还包括一对电极,一个电极至少形成室的一个壁。每个电极都与一个电源形成电子联通,从而使流过室的细胞悬液暴露于两个电极之间形成的电场中。

[0079] 图 5 所示的是本发明的一个典型电穿孔室。参照图 5,电穿孔室 10 包含室 11。壁 12 确定了室的形状,垫圈 13 位于壁 12 中间。壁 12 可以是电极板。垫圈 13 在壁 12 中间提供了一个空间形成室 11。壁 12 和垫圈 13 由固定装置 14 固定,14 有相连的电极间隔 15。固定装置 14 包括而限于螺钉、夹子、栓、铸模材料如铸模塑料等。在图 5 所示的实施方式中,电穿孔室 10 有 4 个接口:第一接口 17、第二接口 18、第三接口 19 和第四接口 20,在某些实施方式中第四接口 20 是可选的。每个接口都与样品源、非样品液体或气体、试剂源、已处理样品储存罐或储存各种溶液和试剂的各种容器形成流体连通。

[0080] 图 5 所示的电穿孔室 10 的分解图显示在图 6 中。参照图 6,电穿孔室 10 包含室 11。室 11 的形状由壁/电极 12 及位于壁之间的垫圈 13 确定。垫圈 13 在壁 12 之间提供一个空间形成室 11。壁 12 和垫圈 13 由固定装置 14 固定,14 有相连的间隔 15。固定装置 14 包括而限于螺钉、夹子、栓、铸模材料如铸模塑料等。在图 6 所示的实施方式中,室有 4 个接口:第一接口 17、第二接口 18、第三接口 19 和第四接口 20,在某些实施方式中第四接口 20 是可选的。每个接口都与样品源、非样品液体或气体、试剂源、已处理样品储存罐或各种容器形成流体连通。

[0081] 电穿孔室 10 的另一个实施方式的分解图显示于图 7 中。参照图 7,电穿孔室 10 包含室 11。室 11 的形状由室的壁/电极 12 及位于壁之间的垫圈 13 确定。垫圈 13 在壁 12 之间提供一个空间形成室 11。壁 12 和垫圈 13 由固定装置 14 固定,14 有相连的间隔装置 15。固定装置 14 包括而限于螺钉、夹子、栓、铸模材料如铸模塑料等。在图 5 所示的实施方式中,室有 4 个接口:第一接口 17、第二接口 18、第三接口 19 和第四接口 20,在某些实施方式中第四接口 20 是可选的。在这个实施方式中,接口(17、18、19、20)孔所处的平面和室 11 的壁 12 所处的平面是同一个平面。每个接口都与样品源、非样品液体或气体、试剂源、已

处理样品储存罐或各种容器形成流体连通。

[0082] 电穿孔室的另一个实施方式显示于图 8 中。参照图 8, 电穿孔室 21 包含三个接口 (17、18 和 19)。室的形状由壁 12 确定, 垫圈 13 位于壁 12 之间。壁 12 可以是电极, 或者其上连接电极。垫圈 13 在壁 12 之间提供一个空间形成室 11。壁 12 和垫圈 13 由固定装置 14 固定, 14 有相连的间隔 15。固定装置 14 包括而限于螺钉、夹子、栓、铸模材料如铸模塑料等。在图 8 所示的实施方式中, 室有 3 个接口: 第一接口 17、第二接口 18 和第三接口 19。每个接口都与下述的样品源、非样品液体或气体、试剂源、已处理样品储存罐或各种容器形成流体连通。

[0083] 参照图 9 所示的图 8 的分解图, 电穿孔室 21 包含室 11 和三个接口 (17、18 和 19)。室的形状由壁 12 确定, 垫圈 13 位于壁 12 之间。壁 12 可以是电极, 或者其上连接电极。垫圈 13 在壁 12 之间提供一个空间形成室 11。壁 12 和垫圈 13 由固定装置 14 固定, 14 有相连的间隔 15。固定装置 14 包括而限于螺钉、夹子、栓、铸模材料如铸模塑料等。在图 5 所示的实施方式中, 室有 3 个接口: 第一接口 17、第二接口 18 和第三接口 19。每个接口都与样品源、非样品液体或气体、试剂源、已处理样品储存罐或各种容器形成流体连通。

[0084] 在图 5-9 所示的本发明的实施方式中, 包含室 11 的垫圈 13 位于电极板 12 之间, 垫圈 13 的厚度与电极间隔 15 的厚度相同。垫圈 13 通常和相对的电极板 12 一起形成密封。垫圈 13 可由硅胶、其他合成或天然橡胶或其他聚合物、或者其他非导电性材料制成。垫圈 13 内的空间形成一个或多个室 11。垫圈 13 内的正方形、矩形或其他切割空间定义了室 11 的构型。室 11 的大小和形状与电极板 12 的大小和形状是成比例的。

[0085] 再参照图 5-9, 电穿孔室 10 或 21 可由两个相对的电极板 12 构建。一般来说, 电极板可由铁、钢、铜、铝或其他导电性金属或金属合金制成。电极板 12 还可以包被金、铂、锌、碳或其他电镀材料以增强其导电性。每个电极板 12 都有一个或多个电子终端 22 与流式电穿孔系统的电源线路联通。

[0086] 电极板 12 通常由一个或多个电极间隔 15 隔离。电极间隔 15 的厚度决定和固定了电极 12 之间的间隙。只需改变电极间隔 15 就可以将电极 12 之间的间隙调整到期望的数值。这种间隙的宽度可根据液体体积和电场强度来调整, 但是一般都要大于 3mm, 优选的是约 0.01mm 到 2cm, 更优选的是约 0.1mm 到 1cm。在其他实施方式中, 间隙的宽度大于 3mm, 优选的是约 4mm 到约 2cm, 更优选的是约 5mm 到约 1cm。图 14 描述的是本发明另一个实施方式的实施例, 其中至少带一个接口的活塞装置用作本文所描述的电穿孔室。在这个特殊类型的装置中, 活塞用于置换样品体积。根据该图所描述的基本原理产生的装置或方法不需要加入非样品气体或液体。

[0087] 电极间隔 15 通常由电绝缘材料制成, 如塑料、陶瓷、橡胶或其他非传导性聚合材料或其他材料。

[0088] 在一个实施方式中, 电穿孔室组件包括带有一个或多个孔洞的电极板 12。每个孔洞还可以是流入口、流出口、或者非样品液体或气体入口 / 出口, 分别作为连接流式电穿孔装置的流入 / 流出流动通路的接口。

[0089] 电穿孔室还可以包含一个或多个附件以便于使组件紧密组装。在本发明的不同实施方式中, 附件 14 包括紧固件如螺丝、螺栓、铆钉、螺杆或夹子, 用于将电极板 12 插到垫圈 13 和室 11 的预期位置上。在本发明的电穿孔室 11 的其他实施方式中, 附件 14 可通过粘

附、其他接合技术或封装装置固定。

[0090] 附件可以是附孔,其大小和位置可容纳螺杆。这种螺杆可直接插到附孔内或者插到电极板的套管内,螺杆可被固定以固定电穿孔室。在使用传导性电极间隔的实施方式中,相对的电极板之间的绝缘可通过绝缘的电极板套管来实现。

[0091] 在其他实施方式中,一个或两个相对的电极板 12 还可以包含带有冷却元件的界面。冷却元件可以是热电冷却元件,或者通过与水或其他冷却剂直接接触、通过散热装置通风来冷却,或者通过其他冷却装置驱散电穿孔过程中产生的热量,电穿孔过程通常都是产热过程。

[0092] 在本发明的另外一个方面,电穿孔室与一个封闭的一次性单冲程泵送系统可操控地连接在一起,这种泵送系统不需要止回阀,如图 15 所示。许多气泵都使用摆动的弹性膜,需要止回阀使空气定向流动。由于变速流系统的许多实施方式都有止回阀作为系统的一部分,因此电穿孔室的注入/排出过程可在带弹性膜的活塞的一个冲程中完成。

[0093] 因此,具有这个特征的处理室是很便宜的,并且是一个完全密封的单位,在变速流处理过程中可达到十分精确的样品运送。参照图 15,处理室的组件包括而限于硅胶垫圈 13、电极 12、塑料体 50 和弹性膜 52。电穿孔室 11 的壁和非样品液体或气体容器 35(见图 2)可由垫圈形成。垫圈 13 可以是单片结构的。在这种实施方式中,有活塞 54;由步进电机和装置表面上的计算机控制的压缩线性执行机构 56。带有这种单冲程活塞机器的本发明的实施方式包含两个挤压阀门,如上面的图 2 所描述(阀门 32 和 38)。接口 17、18 和 19 的典型位置也显示在图 15 中。

[0094] 本文所描述的特殊实施方式是以举例说明的方式描述本发明,不能解释为将本发明限制在特殊实施例上。

[0095] 本发明的某些方面包括在电穿孔装置(图 10)中插入本发明的电穿孔室和各种处理构件。在本发明的某些实施方式中,本发明的流式电穿孔装置包含如下构件:包含电穿孔室的组件;容纳样品、已处理样品和非样品液体或气体以及可用于本发明的其他试剂的各种容器;提供高压脉冲的电子元件和电路;控制电路和液流的计算机;以及与计算机连接的监视器,监视器可使操作者评估数据、向计算机输入数值或程序。

[0096] 本发明利用可调流式电穿孔开发出新的电穿孔法和电穿孔装置。本文所举例说明的及描述的方法包括细胞悬液的可调流动和电穿孔。本发明的室可以组装,因此其价值很低,可以一次性使用。不同构型的电穿孔室都可用于本发明中,如本文所描述的实施例。当细胞悬液处于电极之间时,细胞悬液接受预先确定电参数的一次或多次电脉冲,电参数包括电压、持续时间和脉冲之间的短暂间隙(如果有多次脉冲)。根据细胞类型的不同以及人们想通过电穿孔导入到细胞内的可能分子的不同,所选择的最佳电参数也是不同的。适宜的电参数是本领域所熟知的,利用试验确定适于新类型细胞的佳电参数的方法也是大家所熟知的。适于多种类型的哺乳动物细胞的一个典型参数是 1kV/cm,1ms 的脉冲宽度。目的分子、化合物或组合物随着浓度梯度和/或电梯度弥散到细胞内。本发明还能够给细胞施加一定强度范围内的电场。一般来说,用于本发明的电场强度要高于约 0.5kV/cm;优选约 1kV/cm 到 3.5kV/cm。

[0097] 处理过程开始于在电穿孔室上连接管道,管道与容器内的溶液和细胞悬液相通,这个过程应该在无菌环境中进行。电穿孔室可卡到装置的受位上,通过闭合可折面板将其

固定。细胞悬液和 / 或其他试剂的注入可通过给一个或多个泵、阀门或其组合下达指令使细胞悬液在适当的时间、以适当的速度流入电穿孔室而完成。当一部分细胞悬液位于电极之间的电穿孔室中时,给电极提供进而也给悬液中的细胞施加设定电压、持续时间和间歇时间的电脉冲。在施加所需的电脉冲后,给一个或多个泵、阀门或其组合下达指令,从电穿孔室中排出细胞悬液。另外也可以下达指令将一部分新的细胞悬液注入到电穿孔室内。已进行电穿孔的细胞悬液与未进行电穿孔的细胞分开收集。上述一系列事件可由计算机控制使其在时间上协调进行,计算机与提供电脉冲的电路以及影响和控制细胞悬液流入和流出电穿孔室的泵、阀门或其组合可操控地连接。操作者通过可操控地连接到计算机上的监视器的图形界面和键盘向计算机内输入给细胞悬液施加的电脉冲以及流入和流出电穿孔室的细胞悬液的流速和持续时间。下面将详细描述本发明的流式电穿孔系统的实施例。

[0098] A. 一次性电穿孔室及其相关组件 ( 一次性装置 )

[0099] 一次性装置包括本文所描述的各种容器 ( 如 PVC 袋 )、PVC 管、接头、硅胶泵管以及电穿孔室。与血液或其他细胞材料接触的所有塑料组件都可以用医用级 IV 类材料。

[0100] 电穿孔室 ( 见图 5 ) 包括两个电镀有约 100 微英寸纯金 ( 99.9% ) 的低碳钢 ( 99+% 铁 ) 电极。电极通常为 20mm 长、整体宽度为 77  $\mu$  m。当电极平行放置时,棒状电极之间的最大距离为 154  $\mu$  m。在组装过程中,一般将电极插到电极垫圈内,然后将其夹到隔板和平板之间。平行棒状电极之间的正常间隙为 3mm。电穿孔室的内容积约为 1.6mL。

[0101] 电极可用包被金属层或其他电传导性化合物的任何非传导性材料制备。

[0102] 在某些实施方式中,可有 1、2、3、4、5、6 或更多个容器或源连接到一次性装置上。容器包括而不限于可折叠的、可扩张的或固定体积的容器。第一容器被称为样品源或样品容器,可容纳细胞悬液,可以包含,也可以不包含通过电穿孔过程插入到细胞内的物质。如果不包含插入到细胞内的物质,那么就需要有第二容器来容纳这些物质,这些物质在进入电穿孔室前或者在电穿孔室内在线混合。第一容器 ( 也可以是第二容器 ) 与 PVC 或其他适宜的管线相连,如果其构型中包含阀门,那么液体可通过任何指定的阀门流入电穿孔室的第一接口 ( 流入口 )。在某些实施方式中,可以考虑使用带一个接口的电穿孔室来实现本发明。本发明的其他实施方式包含其他容器,这些容器与来自样品容器的管线相连,可向室内提供试剂或其他样品。汇聚的溶液可在到达电穿孔室之前、期间或之后混合。

[0103] 在其他的实施方式中,电穿孔室的第二接口 ( 流出口 ) 至少与 1、2、3、4 或更多个容器相通,可以有一个或多个介入装置引导溶液从电穿孔室流到适当的容器内。在其他的构型中,可以连接一个容纳废物的容器,该容器可容纳使用者希望丢弃的任何液体。第二或第三容器或袋被称为已处理样品容器或产物容器。已处理样品容器或产物容器可容纳经过电穿孔的细胞或经电穿孔处理的其他产物。

[0104] 第三或第四容器可容纳各种非样品液体或气体,非样品液体或气体用于将样品分隔成不连续的体积或单位体积。非样品液体或气体容器可与已处理样品容器或样品容器合并,这样可以将非样品液体或气体从已处理样品容器转移到另一个容器内,后者在样品处理过程中可以是样品源容器。在某些方面,容纳非样品液体或气体的储存罐可与室合并,只要非样品液体或气体可以被压缩以使电极处于正确的位置上进行电穿孔就可以。

[0105] 如较早前所提及的,其他各种容器都可以合并到本文所举例说明的构型内。这些其他的容器可供应其他的试剂、细胞等。其他的容器也可以用作废物容器或用作分隔已处

理样品的容器。在各种实施方式中,本发明的电穿孔室可包含 1、2、3 或更多对电极。在室包含一对以上电极的情况下,当施加脉冲时只有处于电极对之间的细胞悬液能被有效电穿孔或完全电穿孔。如果需要,可以设置多个电穿孔室以便于更快速地进行更大体积的电穿孔。本文所用的术语电穿孔区是指室内的一个区域,流过该区域的材料被暴露于强度足以影响电穿孔的电场中。根据本发明,我们希望确定电穿孔室电穿孔区相对壁至少一部分的两个成对电极形成了电穿孔区内那些相对壁的基本部分。如本文所述,如果电极所处的位置使在电极对上施加电压差时在它们之间存在基本均匀的电场,那么我们就说电极是一对。本文所用的术语基本部分是指大于约 50%,优选的是大于约 60%,更优选的是大于约 70%、80%、90%,最优选的是约 100%。

[0106] 优选的是,电穿孔室作为无菌单位供一次性使用。因此,电穿孔室的组件优选能用抵抗灭菌过程如高压灭菌、辐射灭菌或化学灭菌的材料制备。

[0107] 适用于本文所述的装置组件的材料包括被批准可用于接触内部体液的生物相容性医用材料,这些材料应该符合 US PV1 或 ISO 10993 标准。另外,材料在至少使用一次的过程中与本发明所用的溶剂接触时应当不会发生实质性降解。材料一般都可以通过辐射灭菌或环氧乙烷 (EtO) 灭菌方法灭菌。这种合适材料包括可拉伸的材料,例如用于制备管线时,和 / 或可浇铸的材料,例如用于制备硬容器时。用于制备本发明的各种组件的材料包括而不仅限于尼龙、聚丙烯、聚碳酸酯、丙烯酸酯、聚砜、聚偏(二)氟乙烯 (PVDF)、氟弹性体如 DuPont Dow Elastomers L. L. C. 的 VITON、热塑性的弹性体如 Monsanto 的 SANTOPRENE、聚氯乙烯 (PVC)、聚四氟乙烯 (PTFE)、聚苯醚 (PPE)、全氟烷氧基共聚物 (PFA) 如 E. I. du Pont de Nemours and Company 的 TEFLON PFA,以及上述物质的组合。

[0108] 在很多情况下,参考电穿孔处理的通量或在一定时间内处理的细胞悬液量是很重要的。由于电穿孔单位体积的细胞悬液需要一定量的能量,因此,在一定的时间内,电穿孔的细胞悬液体积越大,在相同的时间内所消耗的能量越多。给细胞悬液加上电压就会产生流经悬液的电流,细胞悬液是有电阻的。根据焦耳定律,这个电流会产生热量。由于给室及其内容物提供的大多数电能都转化成了热能,因此,给室及其内容物提供的电功率 (P) 与做功时间及室内所产生的热之间的关系式为  $P = Q/t$ ,其中 Q 为热, t 为时间。

[0109] 电穿孔所产生的热量可使细胞悬液的温度升高,至少是瞬时升高。由于我们不希望细胞的温度超过 45°C,因此最好提供一种冷却细胞悬液和电穿孔室的方法以避免细胞达到不可接受的温度。暴露于这种高温下所产生的损伤效应与暴露的时间长短有关,因此在进行电穿孔后要尽快冷却。由于在电穿孔过程中电穿孔室反复地接受高压脉冲进而产生热量,因此,冷却电穿孔室和已电穿孔的细胞是尤其重要的。但是,虽然在一般情况下是通过使细胞悬液与金属部分立刻接触进行冷却,金属部分由 Peltier 元件或气流或液流依次冷却,但是对冷却过程也有一些原则限制。在很多情况下,电穿孔过程的设计者忽视或忘记了这样一个事实,即金属的热传导性比水(或生物缓冲液)的热传导性要高的多,这就意味着热量从流动管道向冷却单位的转移总是受到水或细胞悬液自身热传导性的限制。在这种情况下,选择具有合适几何形状的流动管道是十分重要的,这样才能以最有效的途径完成热量转移。

[0110]

#### B. 样品流的调节

[0111] 与本发明相关的各种液体和 / 或气体流可由一个或多个泵装置、阀门或其他装置



调节,这些装置可促进、抑制或完全阻止流动,或者调节流动。这可通过一个或多个将细胞悬液或其他液体泵送到电穿孔室内的泵、一个或多个将细胞悬液或其他液体泵出电穿孔室的泵、或其组合来完成。另外还可以通过能够改变电穿孔室内的气压或容积的泵或其他装置使细胞悬液流入或流出电穿孔室。在某些实施方式中,重力可用于使单位体积的样品在一对电极之间移动。可用的阀门包括挤压阀、蝶形阀和 / 或球形阀,这些阀门可使流动通路完全或部分开放或闭合。在许多实施方式中,所使用的泵可调节和计量装置内流动的液体。许多装置内的液体泵送都是相似的。根据使用目的的不同,被转移、分散或计量的液体可以是试验样品,也可以是各种试剂和洗涤溶液。在将装置设计成可处理更小体积的液体时,就更需要十分精确的计量泵。

[0112] 有时可用离心泵或主动置换泵来完成液体转移。离心泵通过旋转涡轮将能量转移给液体,涡轮能转化成液压,液压可使液体流动。这种类型的泵是压力和液体依赖型的,一般不能用于计量,因为它们在改变进入和排出条件时不能维持很精确的液体流动。其优点在于在低压下就可以提供高流速。

[0113] 主动置换泵通过捕获固定体积的液体并利用齿轮、活塞、隔膜、叶片或其他装置移动此液体来运行。这些泵一般都以低速运行,对排出和抽吸条件的变化不敏感,只是通过调节速度和置换来控制流动。这些特征使主动转换泵成为计量液体的好装置。因此计量泵被定义为被设计成能够在特定容积范围内提供十分精确且可重复的流动的主动置换装置。主动置换计量泵通常被归类为旋转泵或往复泵。旋转泵包括齿轮泵、裂片泵、叶片泵和滚压泵(蠕动泵)。往复泵包括隔膜泵、活塞泵和风箱泵。

[0114] C. 其他组件

[0115] 电穿孔装置如本文所描述的那些电穿孔装置包含各种其他组件,如一个或多个电子模块接口、计算机、监视器以及其他电子电路和本领域技术人员很容易使用的软件。有关电穿孔系统的总体设计以及对这种系统的其他各种组件的描述见已公开的美国专利申请 No. 200400292240、20030073238、20030059945 和 20010001064,本文已纳入作为参考。

[0116] 实施例

[0117] 下面的实施例用于证明本发明的优选实施方式。本领域的技术人员应当理解的是,实施例中所描述的技术代表发明者所发现的能成功实现本发明的技术,因此应当被认为构成了用于实现本发明的优选模式。但是,本领域的技术人员通过阅读本说明书后应当理解,只要不偏离本发明的精神和范围,对本文所描述的特殊实施方式进行多种修改也能得到类似的或一致的结果。

[0118] 实施例 1 可变流式电穿孔

[0119] 我们利用可调或可变流式电穿孔进行了一个典型的电穿孔试验。Jurkat 细胞作为一个模型系统,GFP 表达载体作为转化的模型化合物。所有的细胞密度都为  $4 \times 10^7$  Jurkat 细胞 /mL,质粒浓度为每毫升 100 微克 pTM2 质粒 DNA(约 5Kb),该质粒可表达 eGFP(绿色荧光蛋白)。试验过程为:从室中排出非样品液体或气体;同时向室内注入含 Jurkat 细胞和 GFP 载体的样品。在样品从流入到流出的过程中对单位体积的样品进行电穿孔。从室内排出已处理的样品,同时注入非样品液体或气体。图 11 显示的是对照细胞、用 400  $\mu$ L 静态处理方法处理的细胞以及用 100mL 可变流动处理方法处理的细胞,检测碘化丙锭荧光或 GFP 荧光。图 12 是用直方图表示的对照细胞(图 12A)、用 400  $\mu$ L 静态处理方法处理的细胞(图 12B)

和用 100mL 可变流式方法处理的细胞（图 12C）的 GFP 荧光的 FACS 分析结果。图 13 显示的是利用可变流式电穿孔法处理 14 个连续样品组分所得到的单位样品与单位样品之间结果的一致性。通过分析 GFP 转染情况及细胞存活率将细胞分为死细胞、未转染的活细胞和已转染的活细胞。

[0120]

#### 参考资料

[0121] 以下参考资料被纳入本文作为参考,其程度为程序性地例举或对文中提到的内容进行补充。

[0122] 美国专利 4,752,586

[0123] 美国专利 5,612,207

[0124] 美国专利 6,074,605

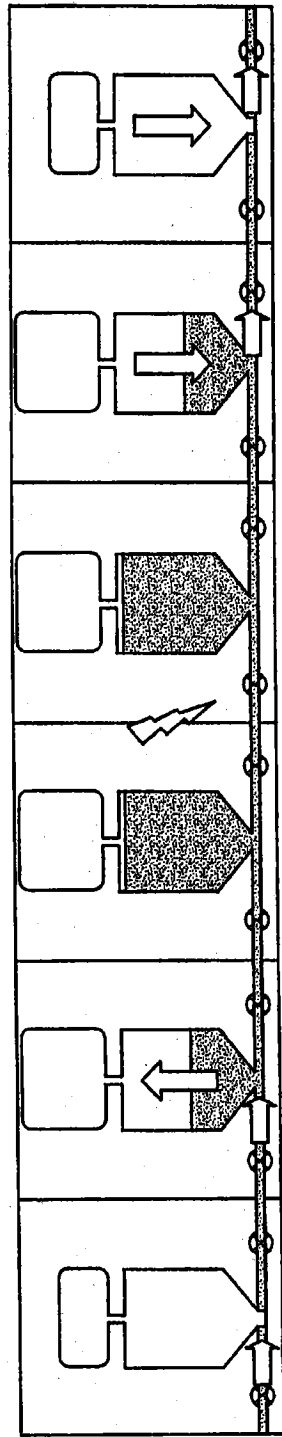
[0125] 美国专利 6,090,617

[0126] 美国专利申请 20010001064

[0127] 美国专利申请 20030059945

[0128] 美国专利申请 20030073238

[0129] 美国专利申请 200400292240



1



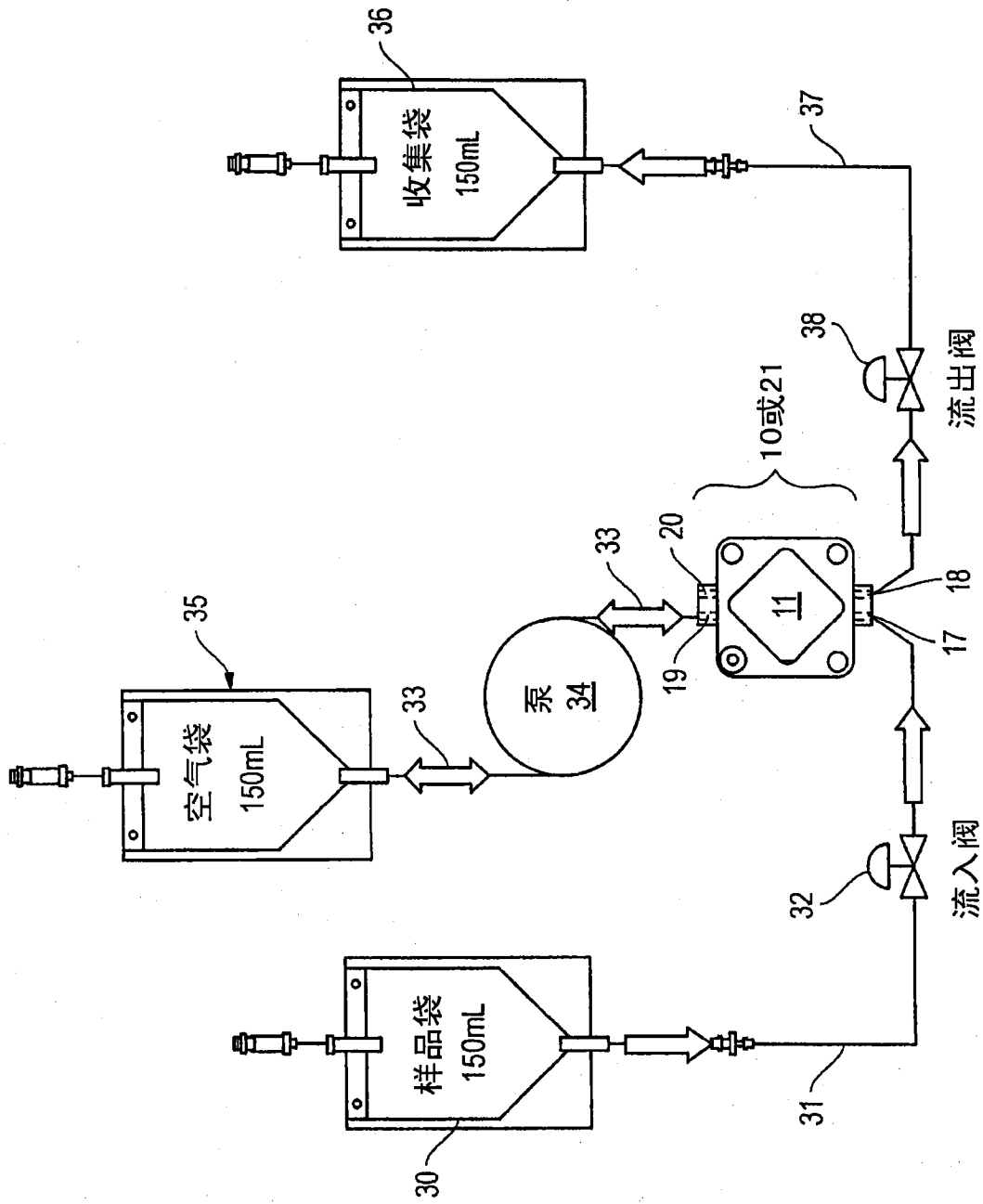


图 2

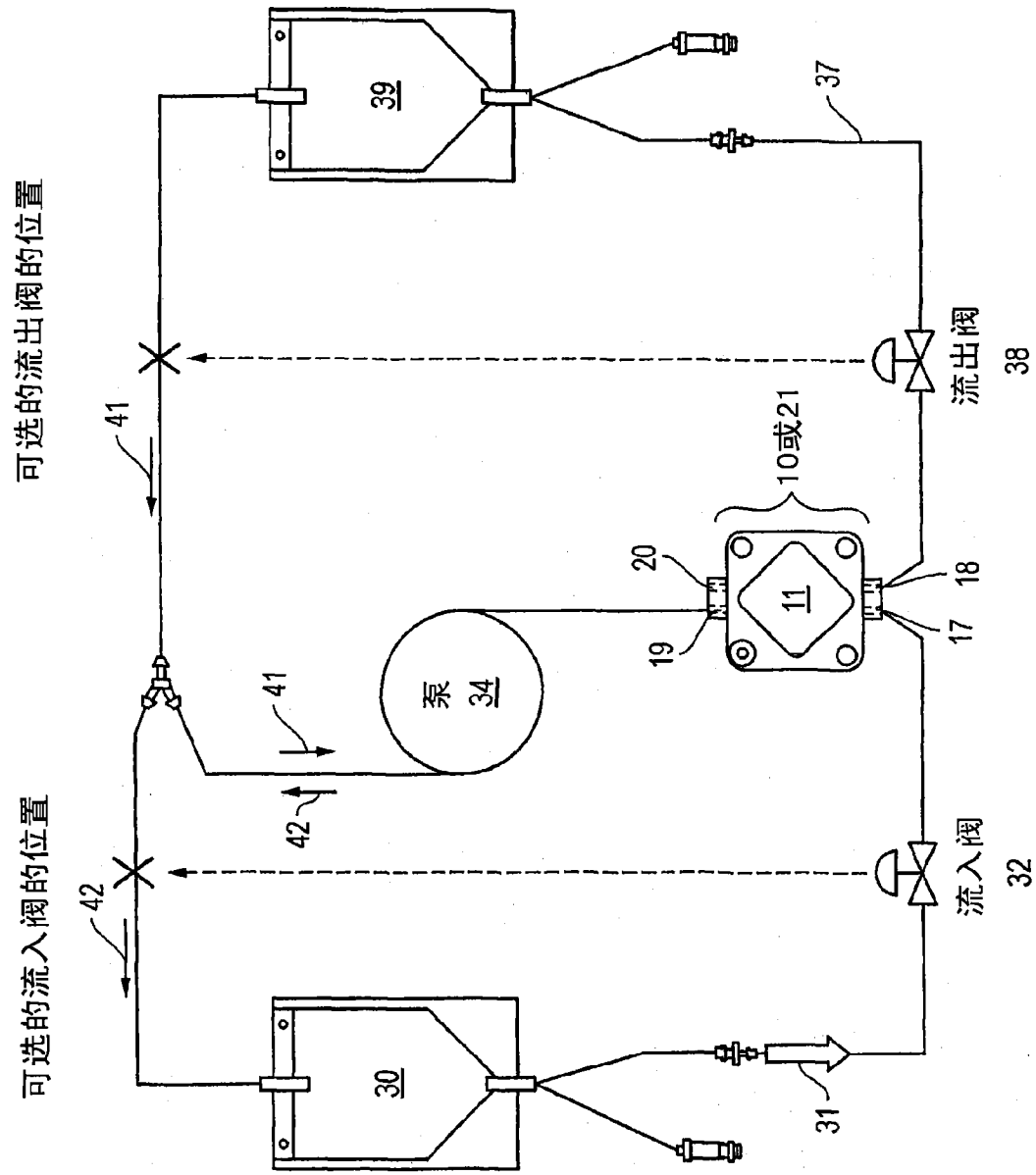


图 3

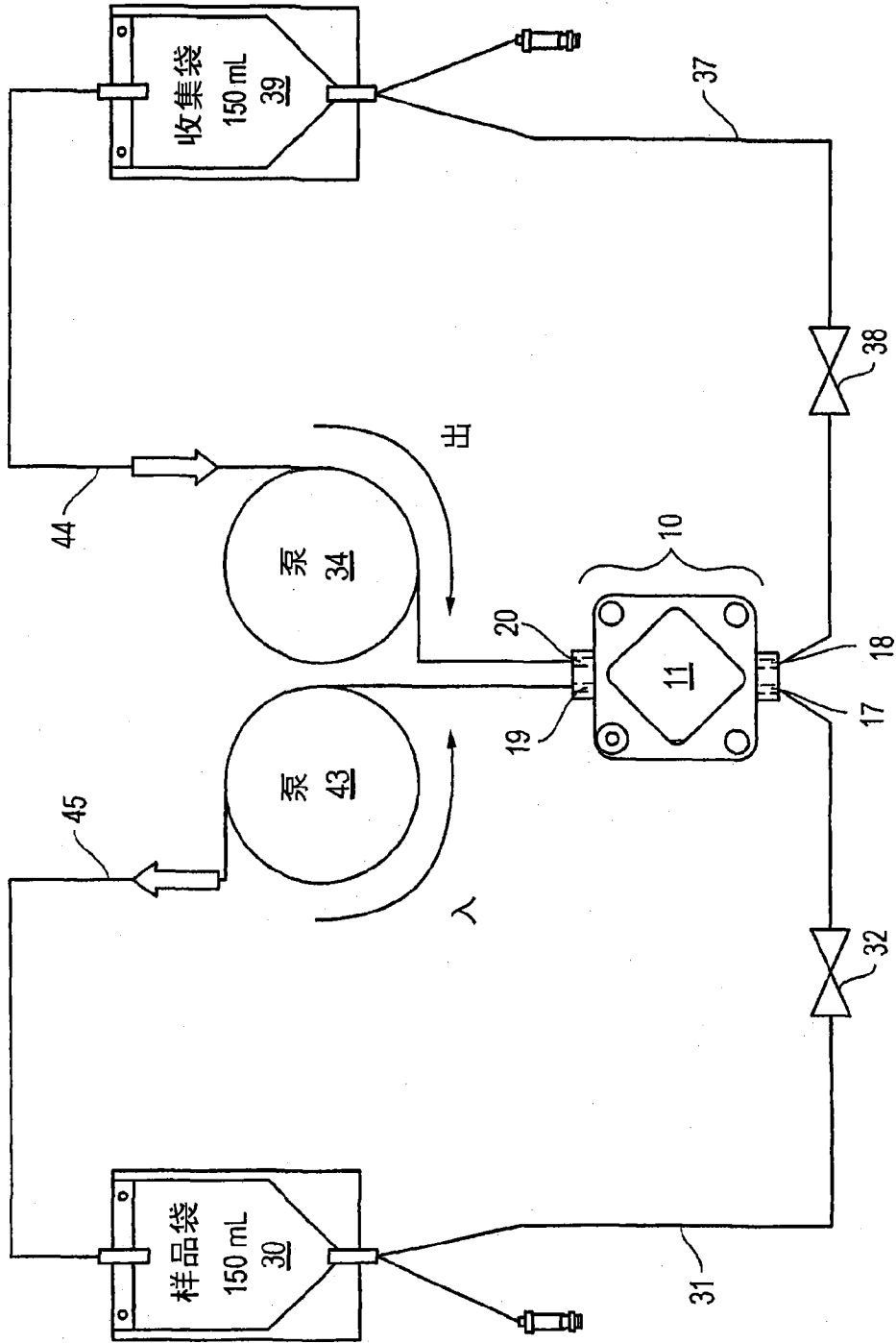


图 4

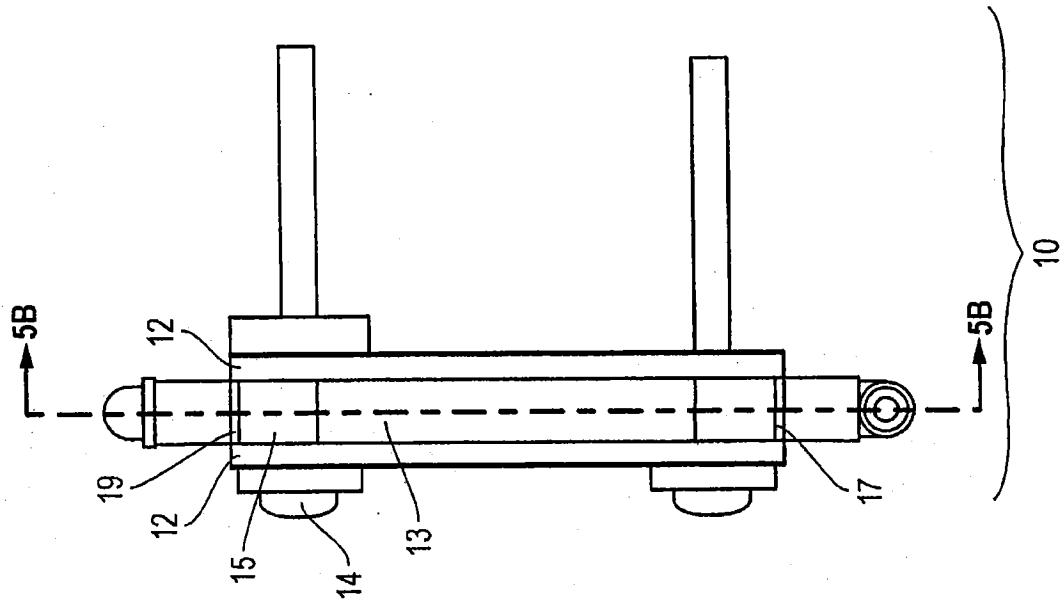


图 5A

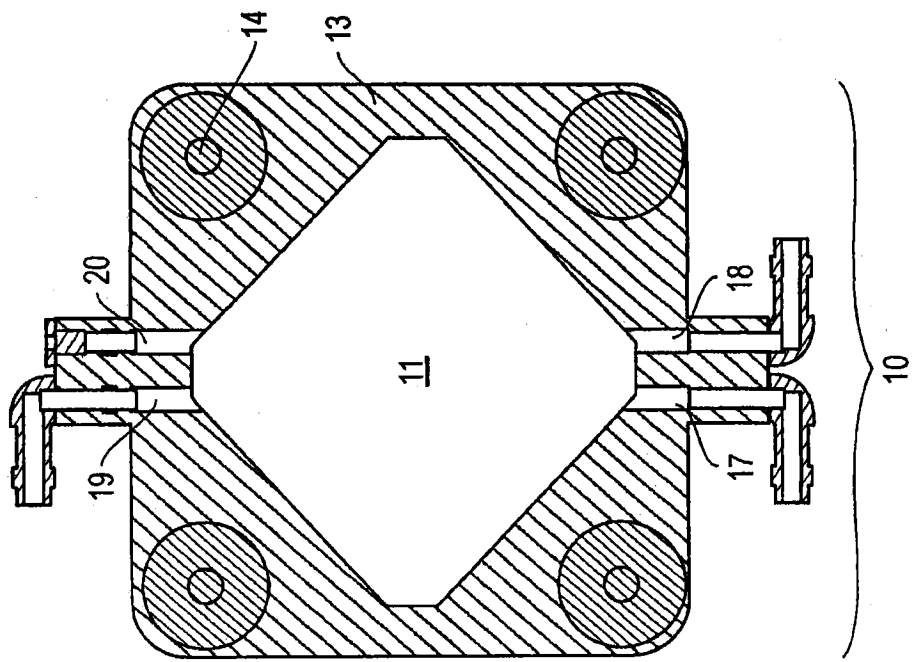


图 5B

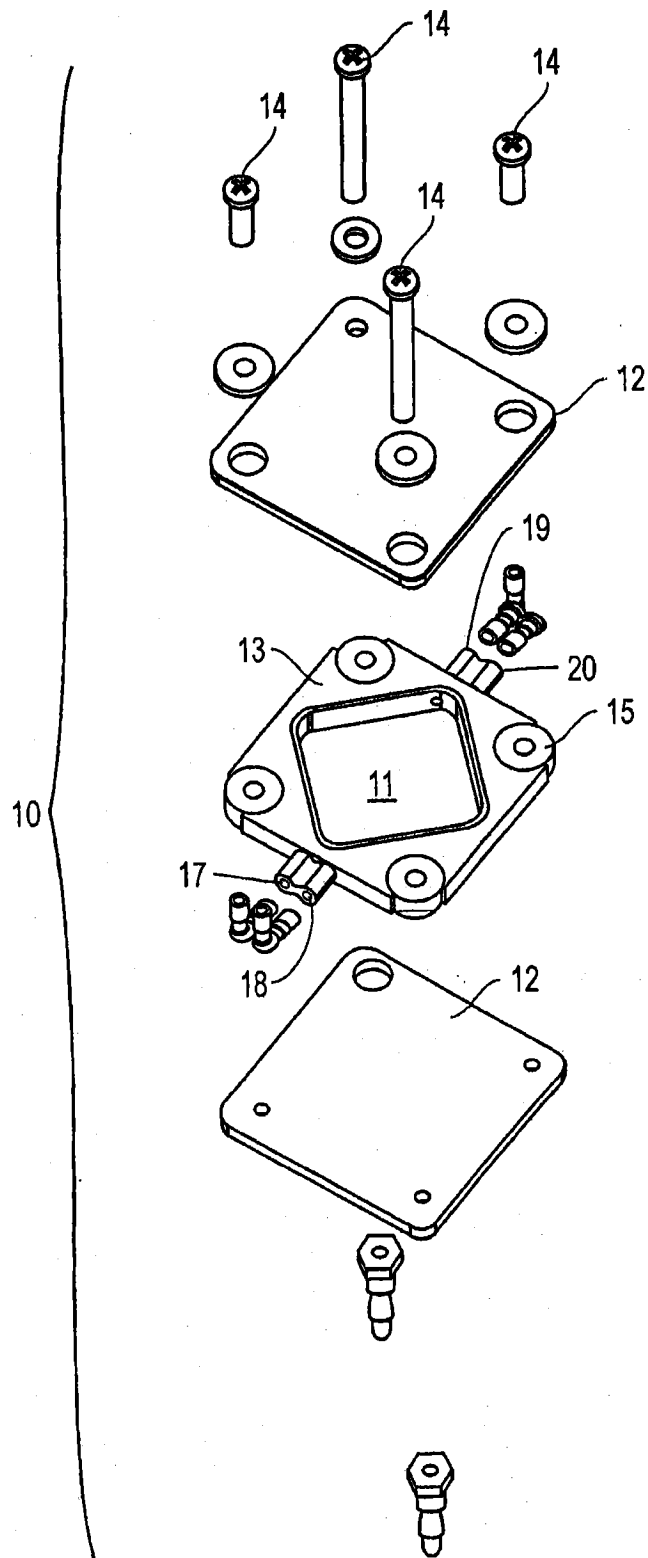


图 6



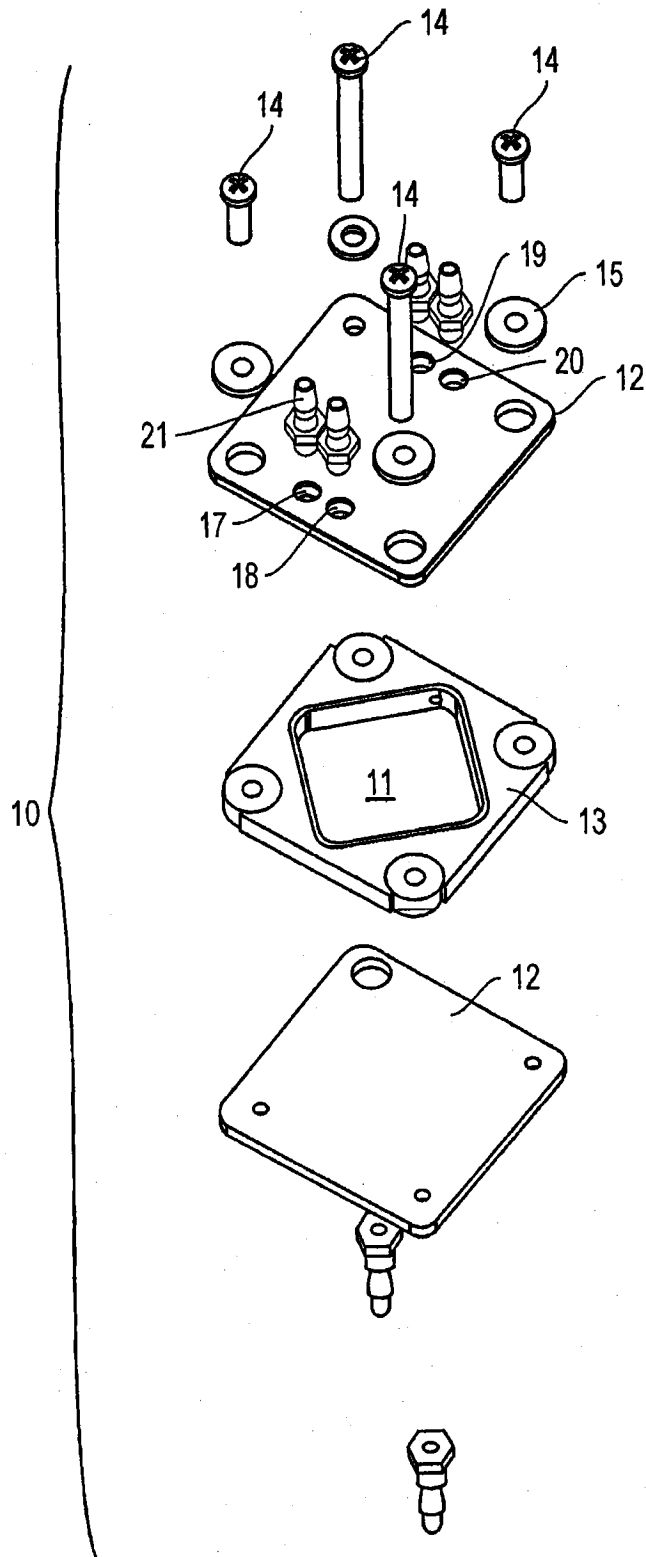


图 7

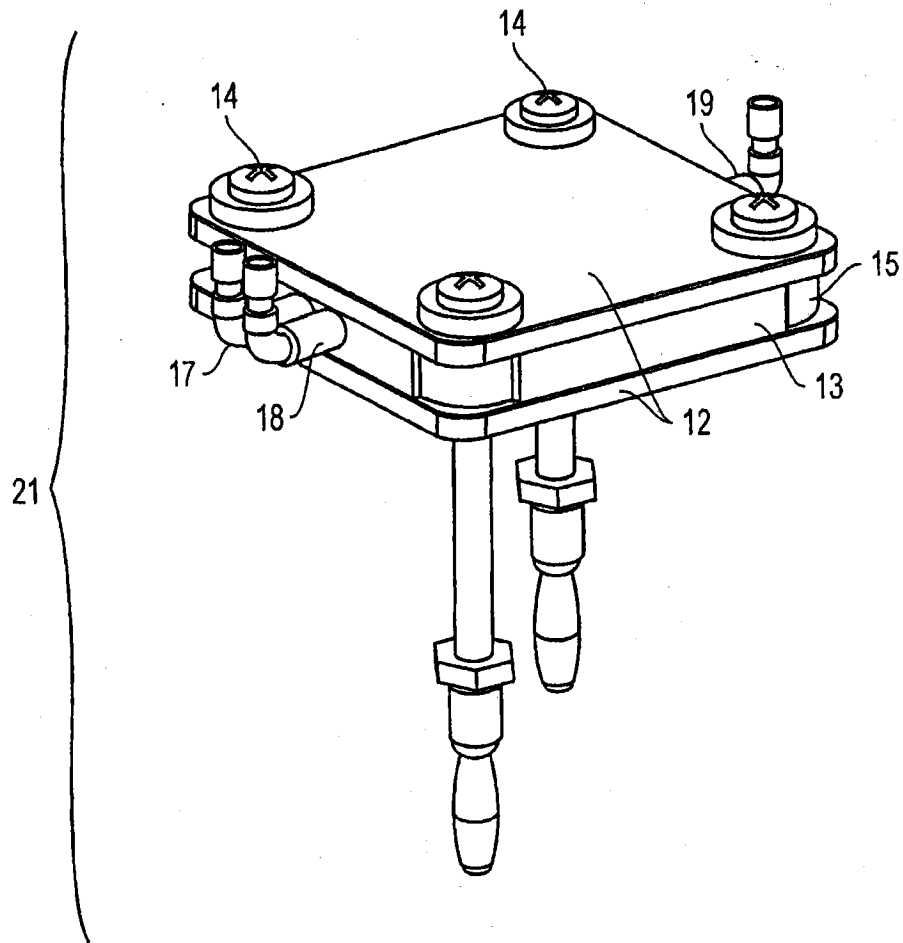


图 8

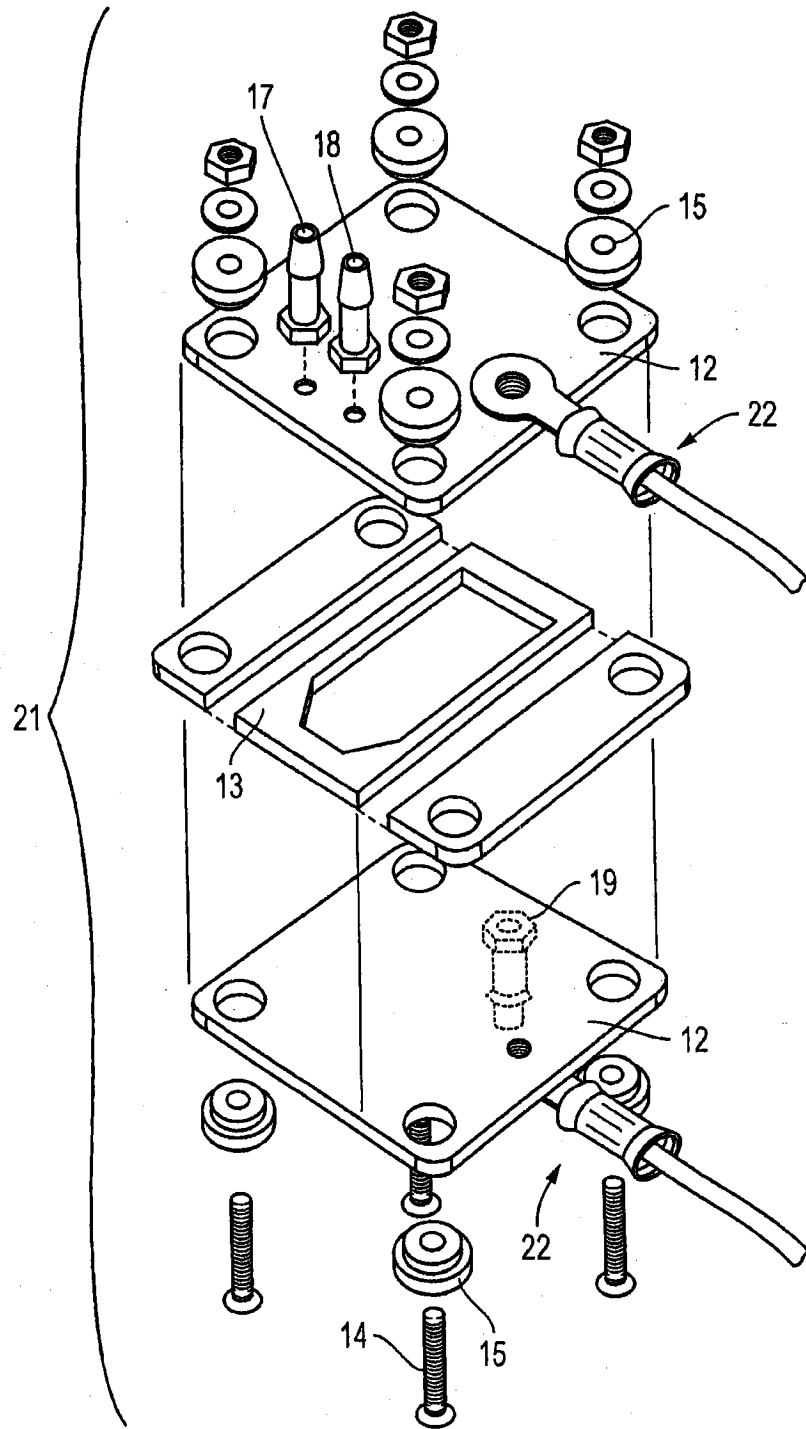


图 9

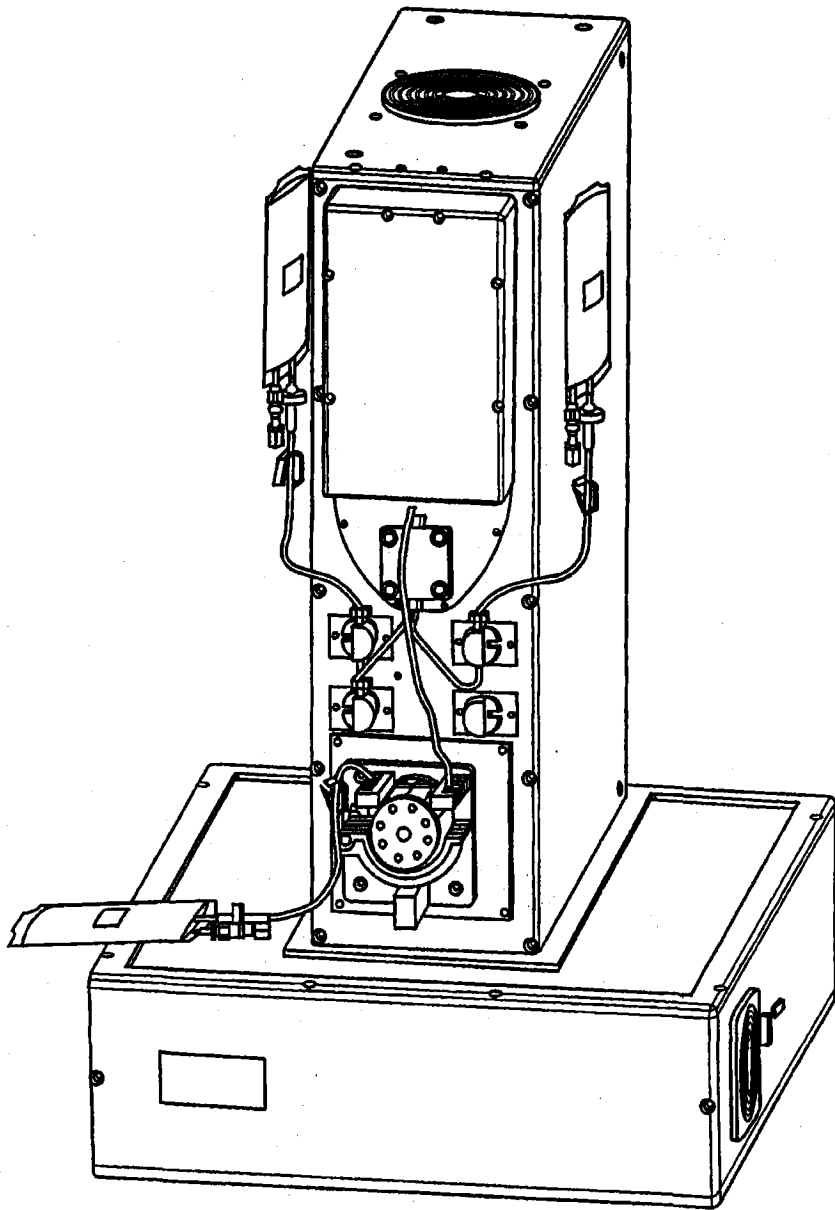


图 10

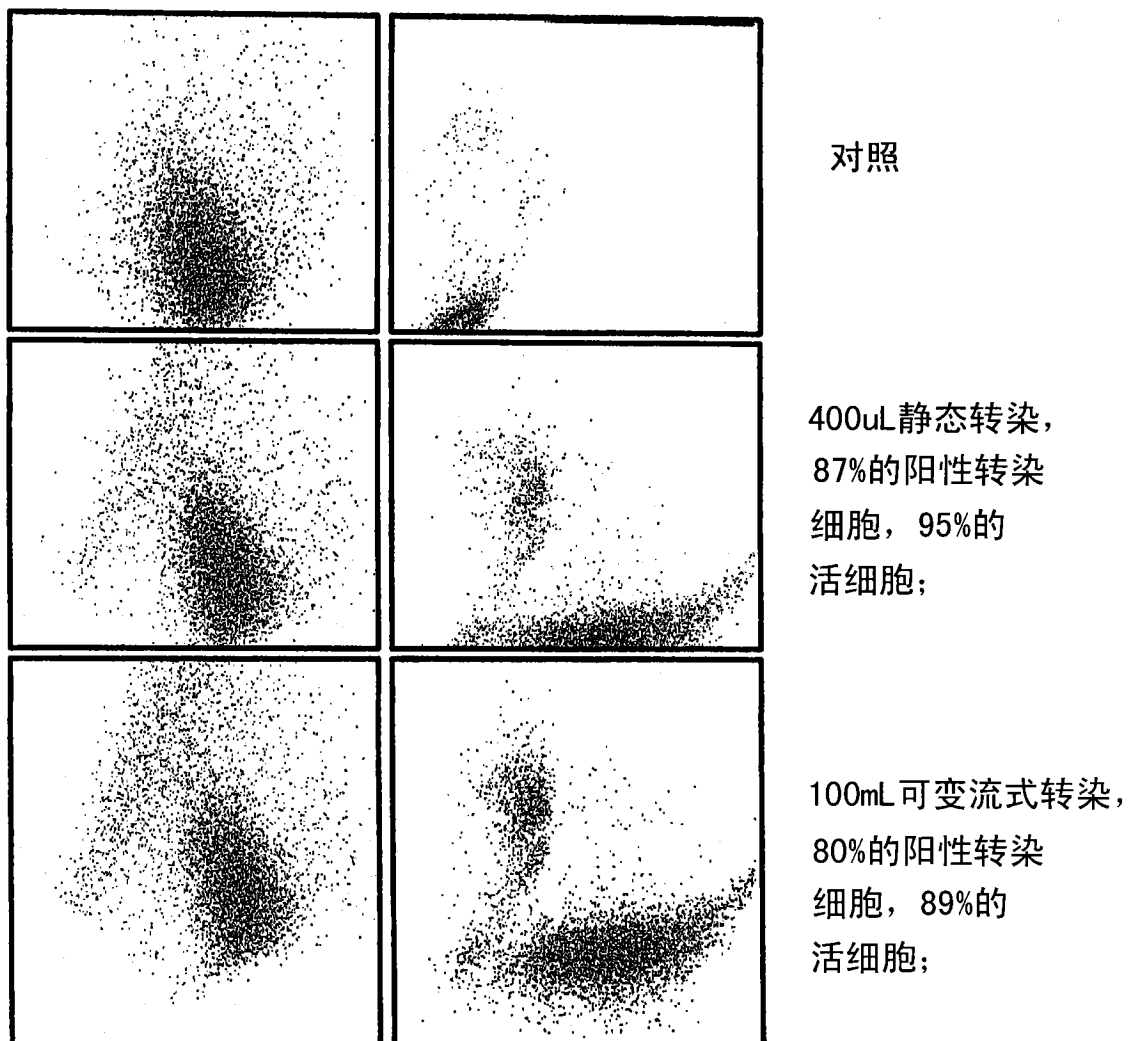


图 11

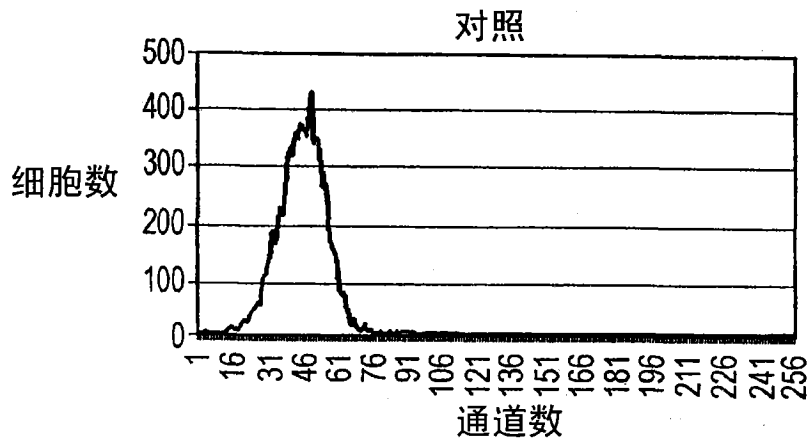


图 12A

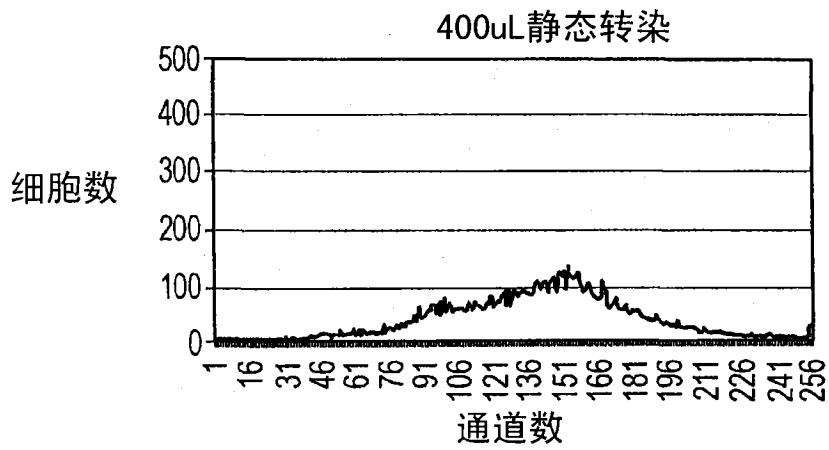


图 12B

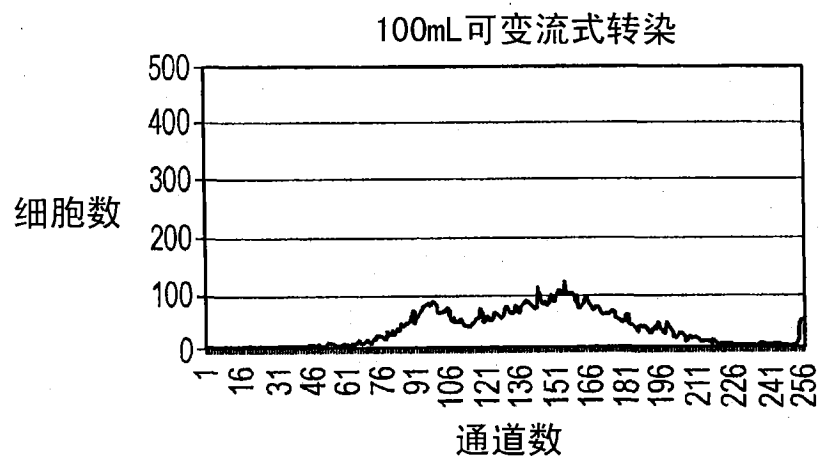


图 12C

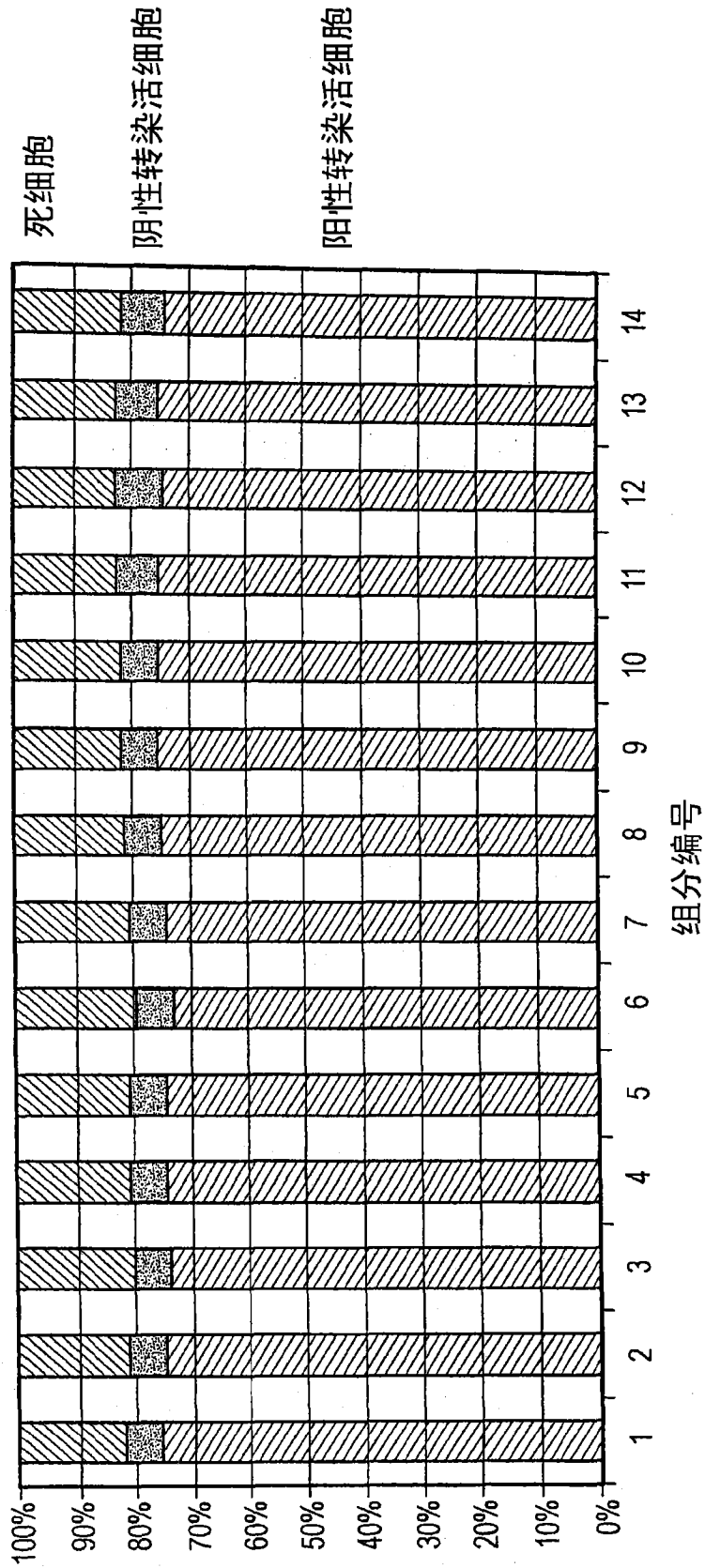


图 13

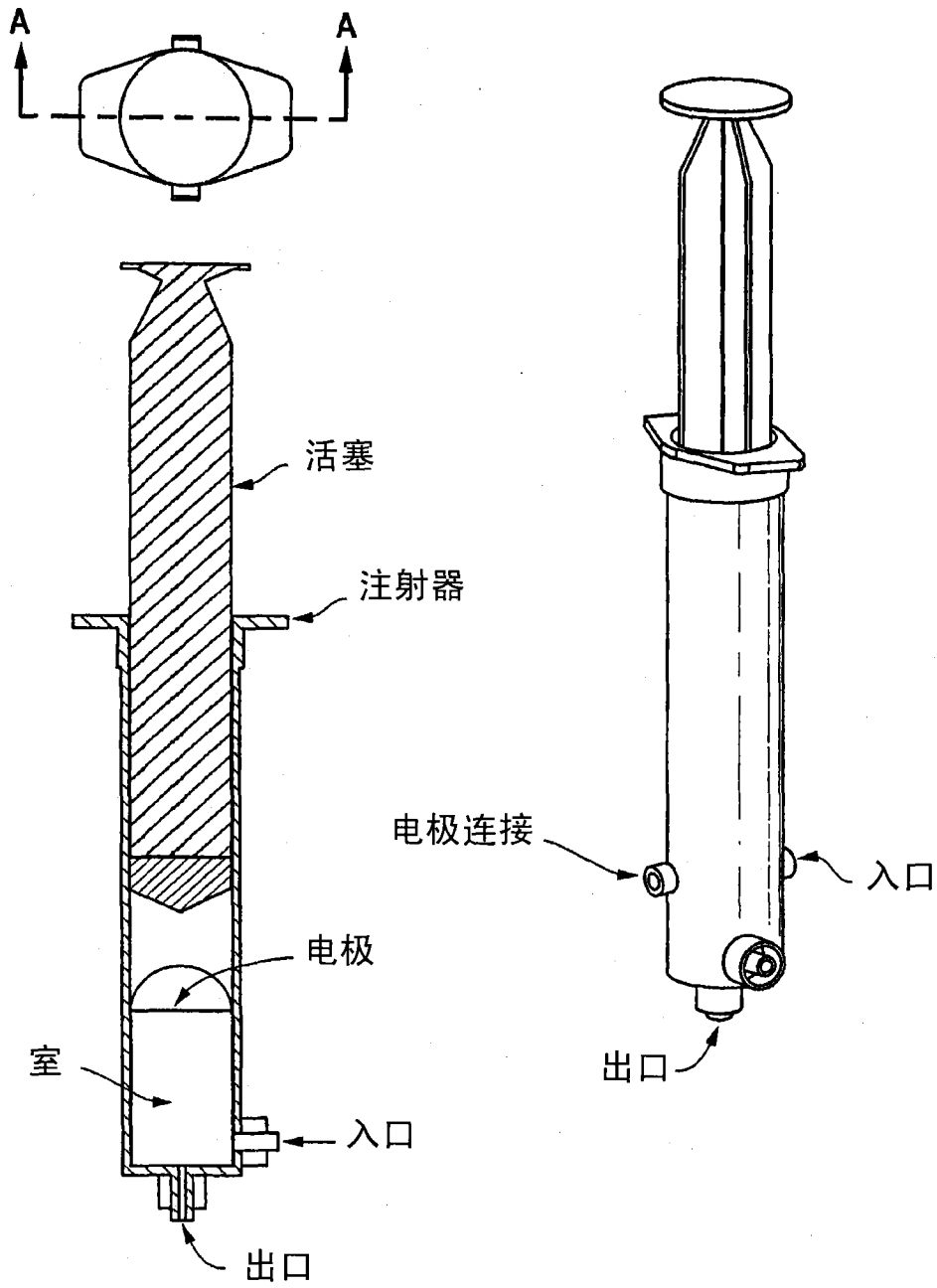


图 14



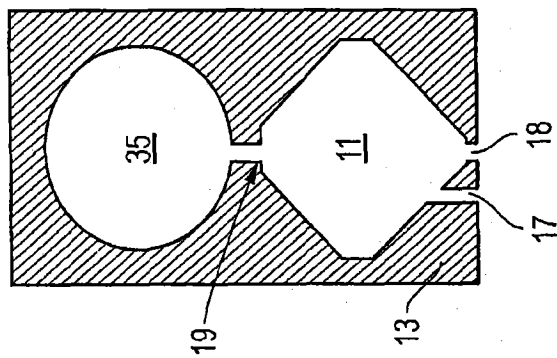


图 15A

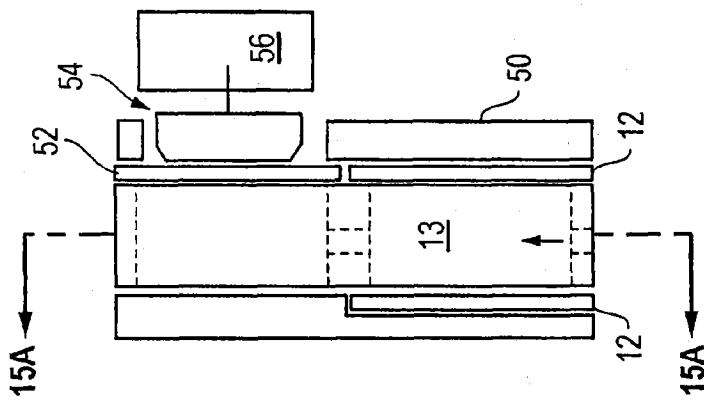


图 15B

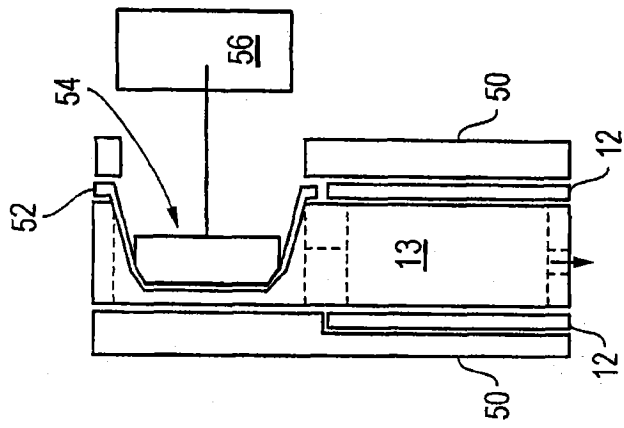


图 15C