



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 95262

(13) C2

(51) МПК

G01N 27/02 (2006.01)

A61N 1/32 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**(54) СИСТЕМА З ВИСОКИМ ІМПЕДАНСОМ ДЛЯ ГЕНЕРУВАННЯ ЕЛЕКТРИЧНИХ ПОЛІВ І СПОСІБ ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ**

1

(21) а200807394
(22) 31.10.2006
(24) 25.07.2011
(86) PCT/US2006/042712, 31.10.2006
(31) 60/732,888
(32) 02.11.2005
(33) US
(31) 11/551,584
(32) 20.10.2006
(33) US
(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.
(72) МЕЙ УЕЙН А., US, РУБЕН ПІТЕР, СА
(73) МЕЙ-РУБЕН ТЕХНОЛОДЖІЗ, ІНК., СА
(56) UA 62133 A; 15.12.2003
UA 12570 U; 15.02.2006
US 5983131A; 09.11.1999
US 6868289 B; 15.03.2005
JP2004202086 A; 22.07.2004
JP 2004248653 A; 09.09.2004
US 6692456 B; 17.02.2004
US 6689380 B; 10.02.2004
(57) 1. Система з високим імпедансом для генерування електричного поля, яка містить:
пару електродів, що містять діелектричний матеріал, в якій кожний електрод має щонайменше одну поверхню, покриту електропровідним матеріалом, і в якій діелектричний матеріал утворює бар'єр, що відділяє провідне покриття від оброблюваного середовища при його обробці;
канал або простір для середовища, сформований між парою електродів так, що електропровідний матеріал знаходиться на тій поверхні електрода, яка не контактує з оброблюваним середовищем в каналі чи просторі;
джерело змінної у часі, незмінної у часі або імпульсної напруги, що з'єднане з електродами; і
корпус, що містить цю пару електродів, при цьому корпус виконаний з можливістю утримувати оброблюване статичне або динамічне середовище в каналі або просторі.
2. Система за п. 1, в якій діелектричний матеріал має в сукупності статичну діелектричну проникність більше $8,8 \times 10^{-11}$ Фм⁻¹ при $\leq 1,0$ кГц, об'ємний питомий опір більше $1,0 \times 10^4$ Ом/см, і максимально допустиму напруженість електричного поля більше $1,0$ кВ/мм.

2

3. Система за п. 1, в якій електроди виконані подовженими, мають квадратний переріз і розташовані паралельно.
4. Система за п. 3, в якій канал або простір для середовища розміщений між електродами.
5. Система за п. 1, в якій електроди є подовженими трубками, що мають різні діаметри.
6. Система за п. 5, в якій електроди розміщені коаксіально, при цьому електрод меншого діаметра розташований всередині електрода більшого діаметра, утворюючи між ними кільцевий канал.
7. Система за п. 6, в якій зовнішня поверхня електрода більшого діаметра і внутрішня поверхня електрода меншого діаметра покриті електропровідним матеріалом.
8. Система за п. 1, в якій діелектричним бар'єрним матеріалом є кераміка з високою діелектричною проникністю, композит з твердих частинок і епоксидної смоли або інший відповідний діелектричний матеріал.
9. Система за п. 1, в якій оброблюване середовище знаходиться в рідкій, газовій або твердій фазі.
10. Система за п. 1, яка додатково містить засіб для подачі імпульсної акустичної енергії в оброблюване середовище.
11. Система за п. 1, яка додатково містить електроакустичний або механоакустичний перетворювач, що виконаний з можливістю подавання акустичної енергії в оброблюване середовище.
12. Система за п. 1, в якій електроди виконані з п'єзоелектричного матеріалу, що виконаний з можливістю подавання акустичної енергії в оброблюване середовище.
13. Система з високим імпедансом для генерування електричного поля, яка містить:
пару електродів, що містять діелектричний матеріал, в якій кожний електрод має щонайменше одну поверхню, покриту електропровідним матеріалом, при цьому діелектричний матеріал утворює бар'єр, що відділяє провідне покриття від оброблюваного середовища, і має діелектричну проникність більше $8,8 \times 10^{-11}$ Фм⁻¹ при $\leq 1,0$ кГц, об'ємний питомий опір більше $1,0 \times 10^4$ Ом/см, і максимально допустиму напруженість електричного поля більше $1,0$ кВ/мм;

(13) C2

(11) 95262

(19) UA

канал або простір для середовища, що сформований між парою електродів так, що електропровідний матеріал знаходиться на тій поверхні електрода, яка не контактує з оброблюваним середовищем в каналі чи просторі;

джерело змінної у часі, не змінної у часі або імпульсної напруги, що з'єднане з електродами, в якому діелектричний матеріал розташований паралельно або коаксіально, утворюючи послідовний ємнісний ланцюжок з оброблюваним або тестованим середовищем, яке концентрує або інтенсифікує електричне поле, що подається в згадане середовище, і

корпус, що містить пару електродів і виконаний з можливістю утримувати статичне або динамічне середовище в згаданому каналі або просторі.

14. Система за п. 13, в якій діелектричний бар'єрний матеріал ізолює середовище від електропровідного покриття, по суті перешкоджаючи протіканню фарадєївського струму і електрохімічним реакціям на інтерфейсі середовище/електрод.

15. Система за п. 13, в якій діелектричний бар'єрний матеріал додатково ізолює середовище від електропровідного покриття, по суті перешкоджаючи виникненню електронного і іонного струму провідності і омичного нагрівання системи.

16. Система за п. 13, яка додатково містить пристрій для подачі імпульсної акустичної енергії в середовище, оброблюване або тестоване електричним полем, при цьому акустична енергія подається, співпадаючи у часі або в просторі і/або чергуючись у часі або просторі, і/або послідовно у часі або просторі відносно подачі електричного поля.

17. Система за п. 13, яка додатково містить електроакустичний або механоакустичний перетворювач, що виконаний з можливістю подавання акустичної енергії в оброблюване середовище.

18. Система за п. 13, в якій електроди виконані з п'єзоелектричного матеріалу, що виконаний з можливістю подавання акустичної енергії в оброблюване середовище.

19. Спосіб обробки середовища електричним полем, при якому:

формують канал або простір для середовища між парою електродів, причому ці електроди містять діелектричний матеріал і кожний електрод має щонайменше одну поверхню, покриту електропровідним матеріалом, при цьому діелектричний матеріал утворює бар'єр, що відділяє провідне покриття від оброблюваного або тестованого середовища, і провідний матеріал, що знаходиться на поверхні електрода, не вступає в контакт з оброблюваним середовищем в каналі або просторі;

поміщують електроди в корпус так, щоб утримати оброблюване середовище в статичному або динамічному стані в каналі або просторі, підключають джерело незмінної у часі, змінної у часі або імпульсної напруги до кожної поверхні електрода, що покрита провідним матеріалом, тим самим утворюючи електричне поле, що проходить крізь середовище, що знаходиться в каналі або просторі, і

вводять середовище в канал або простір так, що середовище піддається впливу електричного поля і, тим самим, обробляється або тестується.

20. Спосіб за п. 19, який додатково включає крок, при якому вибирають діелектричний матеріал, що має діелектричну проникність більше $8,8 \times 10^{-11} \text{ Фм}^{-1}$ при $\leq 1,0 \text{ кГц}$, об'ємний питомий опір більше $1,0 \times 10^4 \text{ Ом/см}$, і максимально допустиму напруженість електричного поля більше $1,0 \text{ кВ/мм}$, тим самим електрично ізолюючи оброблюване середовище і по суті запобігаючи виникненню фарадєївського струму, струму провідності і електрохімічних реакцій на інтерфейсі середовище/електрод, а також омичне нагрівання оброблюваного або тестованого матеріалу.

21. Спосіб за п. 19, який додатково включає два діелектричних електроди, що утворюють канал або простір для середовища між двома паралельними подовженими електродами, в якому електроди мають квадратний або прямокутний переріз і де паралельна геометрія електродів утворює ємнісний ланцюжок з оброблюваним середовищем, тим самим концентруючи або посилюючи електричне поле, що проходить крізь оброблюване середовище.

22. Спосіб за п. 19, який додатково включає два діелектричних електроди, що утворюють канал або простір для середовища між двома трубчастими розташованими коаксіально електродами, причому коаксіальна геометрія електродів утворює ємнісний ланцюжок з оброблюваним середовищем, тим самим концентруючи або посилюючи електричне поле, що проходить крізь оброблюване середовище.

23. Спосіб за п. 19, в якому оброблюване або тестоване середовище знаходиться в рідкій, газовій або твердій фазі.

24. Спосіб за п. 19, який додатково включає крок, при якому подають в оброблюване або тестоване середовище акустичну енергію одночасно, чергуючись між імпульсами і/або після подачі електричного поля.

25. Високоімпедансний спосіб експонування оброблюваного середовища електричним полем, при якому:

формують канал або простір між парою електродів, в якій електроди містять діелектричний матеріал і в якій кожний електрод має щонайменше одну поверхню, що покрита електропровідним матеріалом, і в якій діелектричний матеріал утворює бар'єр, що відділяє провідне покриття від оброблюваного або тестованого середовища, при цьому провідний матеріал, поміщений на поверхню електрода, не контактує з середовищем в каналі або просторі;

поміщують електроди в корпус так, щоб утримувати оброблюване середовище в статичному або динамічному стані в каналі або просторі, підключають джерело незмінної у часі, змінної у часі або імпульсної напруги до електродів, при якій діелектричний матеріал розташований в паралельній або коаксіальній геометрії, утворюючи послідовний ємнісний ланцюжок з оброблюваним або тестованим середовищем, що концентрує або ін-

тенсифікує електричне поле, що подається в середовище, і

вводять середовище в канал або простір так, що середовище експонується електричним полем.

26. Спосіб за п. 25, який додатково включає діелектричний матеріал, що ізолює середовище від електропровідного покриття, тим самим по суті запобігаючи виникненню фарадеївського струму, струму провідності і електрохімічні реакції на інтерфейсах середовище/електрод.

27. Спосіб за п. 25, в якому діелектричний матеріал є керамікою з високою діелектричною проникністю, композитом з твердих частинок і епоксидної смоли або іншим відповідним матеріалом.

28. Спосіб за п. 25, який додатково включає крок, при якому в середовище подають акустичну енергію, при цьому акустичну енергію подають одночасно, по чергово і/або послідовно відносно подачі електричного поля.

Варіанти даного винаходу стосуються системи для застосування змінної у часі, не змінної у часі або імпульсної напруги до послідовного ємнісного ланцюжка для створення або генерування іншим чином однорідних або неоднорідних електричних полів, які, в свою чергу, використовуються для різних цілей. Більш конкретно, у варіантах застосовуються діелектричні матеріали з конкретними електричними властивостями, що розміщені або іншим чином сконфігуровані для формування послідовних ємнісних ланцюжків, які ділять або іншим чином розподіляють прикладений потенціал між протилежними електродами, що приводить до концентрації електричного матеріалу в матеріалі-об'єкті (або до іншого проходження електричного поля крізь нього).

Статичні, змінні у часі і імпульсні електричні поля, разом з компонентом магнітного поля або без нього, що вважаються слабкими або інтенсивними для конкретної задачі, використовуються в різних галузях промисловості для вирішення широкого кола задач. У деяких існуючих задачах і там, де за допомогою варіантів даного винаходу використовуються змінні у часі прикладені напруги, носії заряду можуть рухатися відносно лабораторної системи координат (lab frame), тому електричне поле супроводжує компонент магнітного В-поля, однак у варіантах даного винаходу релевантним є тільки електричне поле. До прикладів використання електричного поля належать, крім іншого:

- електрофорез: і гелевий, і капілярний використовують електричний струм через середовище зависі, який є резистивним навантаженням, що утворює електричне поле, яке використовується для сепарації, диференціації і фракціонування ДНК, протеїнів і інших молекул;

- електропорація (також відома як електрошокова стимуляція мембранної проникності): інтенсивні електричні поля, часто імпульсні з різною формою хвилі і частотою імпульсів, використовуються для діелектричного руйнування мембран живих клітин, і таким чином впливають на оборотну і необоротну порацію і/або стимулювання проникності для цілей трансфекції, пастеризації або стерилізації, і

- фракціонування в потоці при наявності електричного поля (FFF, також відоме як EFFF, μ -EFF, SuEFF та інші): використовує електричне поле, що є ортогональним до потоку текучого середовища

для сепарації, фракціонування і диференціації великих молекул і/або дрібних частинок від рідини-об'єкта.

По суті, процес або ефект, який приводиться в дію, підтримується або полегшується дією електричного поля, можна прискорити або поліпшити іншим чином або збільшивши інтенсивність поля для даної прикладеної напруги, або, навпаки, зменшивши прикладену напругу для даної інтенсивності поля. Це викликано співвідношенням між такими властивостями матеріалу, як діелектрична проникність, об'ємний питомий опір і максимальна допустима напруга поля, і впливом, який здійснюють ці параметри на діакритичні елементи ланцюга, до яких належать інтенсивність поля, пробій діелектрика, геометрія поля, струм і споживання енергії. Задачі, що вирішуються за рахунок впливу або безпосереднього впливу електричного поля, обмежені небажаними ефектами омичного нагрівання, електрохімічними ефектами (фарадеївське перенесення заряду), екранування поля формуванням подвійного шару електроліту, електричної поляризації і споживання енергії.

Електричний струм є обмежуючим чинником для інтенсивності прикладеного поля в електрофорезі, електропорації і при фракціонуванні в потоці в присутності поля, що пояснюється омичним нагріванням робочого середовища (звичайно для таких задач використовується рідина або гель) і небажаною електрохімією на інтерфейсі (інтерфейсах) між середовищем і електродом (фарадеївське перенесення заряду). Наприклад, в останні два десятиріччя багато зусиль було затрачено для застосування процесу клінічної електропорації (що головним чином застосовується для трансфекції живих біологічних клітин) для комерційної ізоtermічної пастеризації (широко відома як PEF - Pulsed Electric Field non-thermal pasteurization). Оборотна електропорація є не летальною і виконується шляхом ретельного керування інтенсивністю прикладеного поля і часом експозиції, тоді як необоротна електропорація спричиняє загибель клітини, інактивацію метаболізму або апоптоз. Оскільки системи PEF, в яких оголені провідні електроди сполучені з оброблюваним текучим середовищем, внаслідок своєї природи мають низький імпеданс, для зменшення середньої енергії, омичного нагрівання і небажаної електрохімії на інтерфейсі середовище/електрод, застосовувалися імпульси напруги. Те ж справедливо і для способів і при-

строїв, що застосовуються для електрофорезу і фракціонування в потоці в присутності електричного поля (EFFF). Хоча збільшення інтенсивності поля підвищує ефективність і/або швидкість процесу, підвищення прикладеної напруги як засобу для збільшення інтенсивності поля приводить до виникнення надмірного електричного струму і до супутнього омичного нагрівання, небажаних електрохімічних реакцій та інших небажаних реакцій, що згадані вище. У випадку EFFF, нещодавно були зроблені спроби зменшити висоту каналу для текучого середовища з використанням технологій мікрообробки і мікроелектроніки, тим самим ефективно зменшуючи розміри поля між електродами і, отже, збільшуючи інтенсивність поля і, одночасно, зменшуючи потік електричного струму. Оскільки збільшення інтенсивності електричного поля також вимагає збільшення прикладеної напруги і/або зменшення відстані між електродами, пробій діелектрика робочого середовища, є воно газом, рідиною або твердим тілом, є додатковим обмежуючим чинником для усіх задач.

Хоча покриття або з'єднання звичайних діелектричних матеріалів між традиційними електродами, що проводять електрику, і оброблюваним середовищем дозволяє прикладати підвищену напругу, що приводить до збільшення інтенсивності електричного поля, цей ефект нівелюється значно більшим падінням напруги на використовуваних діелектричних матеріалах, що приводить до зменшення інтенсивності електричного поля в оброблюваному середовищі. Це виникає через спосіб, яким падіння напруги і, отже, електричне поле, ділиться або розподіляється в послідовних ємнісних ланцюжках.

Розробка системи для генерування електричного поля, яка б істотно зменшила або повністю усунула небажані ефекти попередніх систем і способів, дала б суттєві переваги.

Короткий опис винаходу

Відповідно, один з варіантів даного винаходу включає систему з високим імпедансом для генерування електричного поля, яка містить: пару електродів, що містять діелектричний матеріал, в якій кожний електрод має щонайменше одну поверхню, що покрита провідним матеріалом; і в якій такий діелектричний матеріал утворює бар'єр, що розділяє провідне покриття і оброблюване середовище; при цьому між парою електродів сформований канал або простір для середовища так, що провідний матеріал знаходиться на поверхні електрода, і не має контакту з середовищем в каналі або просторі; з електродами з'єднане джерело змінної у часі, незмінної у часі або імпульсної напруги; і корпус, що містить цю пару електродів, який сконфігурований для утримання оброблюваного статичного або динамічного середовища в цьому каналі або просторі.

Один з варіантів способу за даним винаходом належить до способу впливу на середовище електричним полем, який включає кроки, при яких: утворюють канал для середовища між парою електродів, в якому електроди містять діелектричний матеріал, і в якому кожний електрод має щонайменше одну поверхню, що покрита провідним ма-

теріалом, при цьому провідний матеріал розташований на поверхні електрода, що не знаходиться в каналі для середовища; встановлюють електроди так, щоб оброблюване статичне або динамічне середовище утримувалося в цьому каналі; з'єднують джерело змінної у часі, незмінної у часі або імпульсної напруги до кожної поверхні електродів, що покрита провідним матеріалом, тим самим створюючи електричне поле; і вводять середовище в канал так, щоб середовище піддавалося впливу електричного поля.

Система і спосіб для генерування електричного поля використовують діелектричні матеріали з високим імпедансом, що мають набір трьох обов'язкових властивостей: висока діелектрична проникність (ϵ), високий об'ємний питомий опір (ρ) і висока максимально допустима напруженість електричного поля (ϕ), і фізичну геометрію, в якій використовуються переваги способу, за допомогою якого електричні поля діляться або розподіляються в послідовних ємнісних ланцюжках.

Інші версії, варіанти і ознаки даного винаходу будуть очевидні з нижченаведеного докладного опису, креслень і формули.

Короткий опис креслень

Фіг.1 ілюструє першу діелектричну конфігурацію за даним винаходом, що має паралельну геометрію.

Фіг.2 ілюструє другу діелектричну конфігурацію за даним винаходом, що має циліндричну геометрію.

Фіг.3 - три діелектричні секції, що розташовані для формування послідовного ємнісного ланцюжка.

Фіг.4 - ланцюг, еквівалентний діелектричній геометрії за Фіг.3;

Фіг.5 - два бруски з титанатної кераміки, які покриті з одного боку тонкою плівкою металевого срібла, що утворює на обох брусках поверхню електропровідного електрода.

Фіг.6 - вигляд в перспективі електродів за Фіг.5, що прикріплені до полікарбонатної балочної опори з простором між ними, який утворює канал для середовища.

Фіг.7 - вигляд зверху електродів за Фіг.6.

Фіг.8 - протилежна балочна опора, що прикріплена до іншої сторони конструкції за Фіг.6 і 7.

Фіг.9 - одна конфігурація пристрою з високим імпедансом для створення електричного поля за даним винаходом.

Фіг.10 - еквівалентна схема геометрії паралельної пластини за Фіг.6 і 7.

Фіг.11 і 12 - одна ілюстративна конфігурація системи згідно з варіантами даного винаходу, і

Фіг.13 - еквівалентна схема для конфігурації, що показана на Фіг.11 і 12.

Здійснення винаходу

Для того, щоб краще зрозуміти принципи, на яких засновані варіанти даного винаходу, далі іде опис варіантів, що показані на доданих кресленнях, і для їх опису буде використана специфічна мова. Проте, потрібно розуміти, що це не накладає на об'єм винаходу ніяких обмежень. Будь-які зміни і додаткові модифікації показаних тут ознак винаходу і будь-яке додаткове використання показаних

принципів винаходу, очевидні фахівцям, що ознайомилися з описом, повинні вважатися такими, що входять в об'єм захисту заявленого винаходу.

Хоча варіанти даного винаходу можуть використовуватися для вирішення множини різних задач, далі іде опис одного варіанта для електропорації біологічних клітин. Термін електропорація, іноді в патентній і академічній літературі замінюваний на "електрошокова стимуляція мембранної проникності", широко використовується для позначення явища, яке пов'язане з впливом електричного поля на мембрану живої клітини. Електропорація клітин, завислих в рідкому електроліті, грає важливу роль в біології клітини, генній інженерії, лікарській терапії і також в біотехнологічних процесах, таких як пастеризація і стерилізація. Залежно від інтенсивності поля, часу експозиції і форми хвилі, прикладені електричні поля можуть викликати оборотні або необоротні утворення пор, а також інші структурні дефекти в ліпідних мембранах, включаючи мембрани бактерій, грибів, спор, вірусів і соматичних клітин ссавців. У випадку оборотної електропорації, це явище характеризується тимчасовим збільшенням дифузійної проникності мембрани, яка десятиріччями використовувалася для трансфекції ДНК, ліків, барвників, протеїнів, пептидів та інших молекул. Коли прикладене електричне поле наводить критичну трансмембранну напругу (для багатьох типів бактерій $F_c \approx 1V$) протягом досить тривалого часу, сформовані пори і інші дефекти мембрани стають необоротними, що приводить до смерті клітини і/або постійної інактивації метаболізму, тобто, відбувається пастеризація або стерилізація.

Пристрої і способи електропорації для клінічного і лабораторного використання використовуються вже декілька десятиріч, і можуть бути легко придбані для трансфекції, пастеризації і стерилізації порцій невеликого об'єму (від 1 мкл до 100 мл). У останні 20 років багато зусиль було витрачено на адаптацію цих клінічних і лабораторних способів до комерційного застосування, де потрібні безперервні потоки з великою витратою, а не порції малого об'єму. Пропонувалися, впроваджувалися і патентувалися багато пристроїв і способів, однак у всіх існуючих і попередніх пристроях загальною ознакою є використання електропровідних електродів з низьким імпедансом, що з'єднані безпосередньо з оброблюваним середовищем. Тому еквівалентні ланцюги таких пристроїв являють собою резистивні ланцюжки в сталому режимі, з усіма супутніми параметричними характеристиками, такими як провідний струм, омичне нагрівання, перенесення заряду на інтерфейсі, формування подвійного шару, електрохімічні реакції і надмірне споживання енергії. Така параметрика резистивного навантаження є причиною повсюдного використання імпульсних сигналів в традиційних пристроях для електропорації. Використання імпульсних сигналів (які іноді називають REF), уніполярних, біполярних або інших, незалежно від часу наростання і часу спаду, викликає бажання зменшити вищезгадані небажані ефекти резистивних ланцюгів з низьким імпедансом, що є загальними для існуючих і попередніх систем. У разі

спроб адаптувати ці технології до задач комерційної пастеризації, омичне нагрівання, небажані електрохімічні реакції і надмірне споживання енергії ставали особливо проблематичними.

Варіант даного винаходу, якому винахідники дали назву "Високоімпедансна Електропорація" (далі "ВЕ") дозволяє зменшити багато небажаних ефектів, при цьому система залишається незмінною або навіть більш ефективною, ніж попередні системи та способи і для порційної, і для безперервної обробки з високою витратою.

На Фіг.1 і 2 показана паралельна діелектрична конфігурація 100 і циліндрична діелектрична конфігурація 150, відповідно, які можуть бути використані для реалізації варіантів способу за даним винаходом. Кожна конфігурація показує діелектричний матеріал 105, 155, електропровідне покриття 110, 160 і матеріал 115, 165, що піддається тестуванню або впливу електричного поля.

Для ємнісних елементів, що утворюють послідовний ланцюжок, використовуваний для реалізації варіантів даного винаходу, зміщення заряду зберігається, а градієнт потенціалу (падіння напруги), а також електричне поле розподіляються пропорційно діелектричній проникності кожного матеріалу перед релаксацією заряду для кожної секції матеріалу в ланцюжку. На Фіг.3 розглянуті три діелектричні секції 170, 175 і 180, що розташовані так, щоб утворити послідовний ємнісний ланцюжок 125. Показані електричні поля 130, 135, що проходять через кожну секцію. На Фіг.4 представлена схема 140, що представляє ланцюжок 125 за Фіг.3.

У конструкції, що показана на Фіг.3, якщо діелектрична проникність секцій C_1 170 і C_1 180 значно більше, ніж у секції C_1 175 на перехідному відрізьку імпульсу (ступінчаста функція), потенціал і електричне поле через C_1 170 і C_1 180 буде дуже невеликим в порівнянні з потенціалом і електричним полем через C_1 175. Таке співвідношення ефективно концентрує загальний градієнт потенціалу, що існує для створення поля, в центральній секції (в цьому прикладі C_1 175). Таке ж співвідношення діє для ланцюжків, що складені з 2, 4 або множинних геометрій діелектричних секцій. У результаті, до матеріалу, що проходить тест або обробку, можна прикласти поле набагато більш високої напруги, ніж в системах і методах за попереднім рівнем техніки. Додатково, використання діелектричних електродів з високим об'ємним питомим опором обмежує електричний струм, омичне нагрівання і споживання енергії, а також переважні електрохімічні реакції на інтерфейсах електродів.

Винахідники продемонстрували ефективність варіантів за даним винаходом конфіденційними експериментами. Далі іде опис експериментів і використовуваного обладнання і методології. Однак, фахівцям зрозуміло, що об'єм даного винаходу не обмежений експериментальними системами і/або використаною методологією.

На Фіг.5 показані два високоімпедансних діелектричних електрода 200, що виконані з кераміки на основі титанату свинцю-магнію-свинцю. Можна також використовувати інші матеріали, наприклад композит частинок з високою діелектричною проникністю і епоксидною смолою, або матеріали, що

мають подібні властивості. Ці два бруски 200 з кераміки титанату були покриті з одного боку тонкою плівкою металевого срібла, що утворює провідну поверхню 210. В одному варіанті електроди мали розмір $10 \times 10 \times 100$ мм, а діелектрична кераміка мала наступні електричні властивості матеріалу:

- діелектрична проникність: $5,3 \cdot 10^8$ [Fm⁻¹] (відносна діелектрична проникність $\epsilon_r=6,000$);
- об'ємний питомий опір $\approx 10^{12}$ [Ом/см]; і
- максимально допустима напруженість поля $9,0 \cdot 10^6$ [Вм⁻¹].

Як показано на Фіг.6 і 7, електроди 200 були прикріплені до полікарбонатної балочної опори 220, з простором між ними, що утворює канал 230, глибиною 1 мм, шириною 10 мм і довжиною 100 мм, для середовища об'ємом 1000 мм³ або 1 мл. Отвір 255 для рідини дозволяє направляти потік або виводити потік оброблюваного середовища. Оскільки сила притягання, що створюється полем між електродами 200, коли система заряджена, важкопереборна, балочні опори 220 грають роль конструктивного розвантажувального елемента для електродів 200. Потрібно зазначити, що електроди 200 розташовані так, щоб утворити послідовний ємнісний ланцюжок, який сполучений з оброблюваною рідиною. Стрілкою А на Фіг.7 показаний напрямок електричного поля, що генерується. На Фіг.8 показана протилежна балочна опора 250, що завершує непроникний для рідини канал. Як показано на Фіг.9, електроди 200 і балочні опори 220 поміщені в корпус 260 (наприклад, в полівінілхлоридну трубу діаметром дюйм з чвертю), який при високій напрузі заповнений діелектричною епоксидною смолою 265. До корпусу прикріплені кабельні вводи 270, 275 для плюсового і мінусового високовольтних кабелів і штуцери 280, 285,

і всі разом ці компоненти утворюють остаточний пристрій ВЕ 300 (винахідники назвали його "засіка").

Оброблювана завязь бактерій в рідині пропускала через канал по трубках, що сполучені з вхідним штуцером 280 і вихідним штуцером 285, відповідно, як показано на кресленні. Плюсовий і мінусовий кабелі високої напруги 290, 295 (показані на Фіг.11) були введені через відповідні кабельні вводи 270 і 275 і введені в безпосередній контакт зі срібним провідним шаром 210 на кожному відповідному електроді 200, утворюючи електричне з'єднання для зарядки системи. На Фіг.10 показана еквівалентна схема 210, і легенда для такої геометрії паралельної плити.

На Фіг.11 і 12 показана одна повна конфігурація системи 350. З причин безпеки, пристрій ВЕ 300 встановлений на діелектричній перегородці, що розрахована на високу напругу (наприклад лист карбонату товщиною чверть дюйма, 7,62 мм), і підключений до джерела живлення 310 на 120 кВ постійного струму. Перша мензурка 320 місткістю 600 мл була встановлена вертикально над пристроєм ВЕ 300 так, щоб під впливом сили тяжіння інокульована рідина стікала у впускний отвір 280 і протікала через пристрій ВЕ 300. Друга мензурка 325 місткістю 600 мл була встановлена нижче пристрою ВЕ 300 і в неї з впускного отвору 285 стікала оброблена рідина. На Фіг.13 показана еквівалентна електрична схема 360 для джерела живлення 310 і пристрою ВЕ 300.

Перед використанням системи з тестовою рідиною, інокульованою бактеріями, пристрій ВЕ 300 був заповнений стерильним трипсиносоевим бульйоном і були виміряні його електричні властивості. У Таблиці 1 показані прогнозні і виміряні величини.

Таблиця 1

	C_t [пФ]	R_t [Ом]	E_1 [Вм ⁻¹]	Φ_a [ΔВ]	I_s [А]
Прогноз	6,00E+02	2,50E+11	7,82E+07	1,00E+05	4,00E-07
Вимірювання	6,52E+02	2,20E+11	8,50E+07	1,00E+05	4,55E-07

де:

C_t - загальна ефективна місткість, пікофарад,

R_t - загальний послідовний опір, Ом,

E_1 - електричне поле через тестовану рідину, вольт на метр,

Φ_a - прикладена напруга постійного струму, вольт,

I_s - послідовний струм, ампер (перехідний струм зміщення не вимірювався).

Під час імпульсу тривалістю 1 мс, максимальне електричне поле через тестовану рідину складало порядку $8,5 \cdot 10^7$ Вм⁻¹, що дорівнює 850 кВ/см, що є гігантським електричним полем. Струм через пристрій ВЕ 300, однак, складав порядку $4,5 \cdot 10^{-7}$ ампер, що є надзвичайно малим струмом для такої інтенсивності сгенерованого електричного поля (в цю цифру не входить перехідний струм зміщення). Виміряні дані представляють середнє значення за трьома окремими тестами. Між тестами джерело живлення вимикалося і пристрій ВЕ 300 повністю спорожнювався.

Система 350 для тесту на електропорацію використовувалася з прикладеною напругою (Φ_a) 10 кВ. Електричне поле E_1 , що було подане на інокульовану рідину в процесі випробування при такій напрузі, становило $7,82 \cdot 10^6$ Вм⁻¹, або приблизно 78 кВ/мс. При фізичному масштабі бактерії *E. coli* це поле дорівнює $7,82$ Вмкм⁻¹ і було достатнім для досягнення критичного трансмембранного потенціалу (тобто $\Phi_c \sim 1$ В), що часто наводиться як поріг для мембранної електропорації. Струм провідності (I_a) через пристрій ВЕ 300 під час тесту складав приблизно $4,6 \cdot 10^{-8}$ ампер (0,0046 мікроампер). Середня потужність, що споживається, тільки на

одному пристрої BE 300 без урахування втрат в джерелі живлення і кабелях, складала порядку $4,6\text{e-}04$ Вт (460 мкВт). Оскільки об'єм оброблюваної рідини становив 600 мл, і загальний час до повного протікання становив приблизно 480 секунд, загальне розсіювання енергії U_j склало порядку $2,2\text{e-}1$ Дж (221 міліджоулів), що дає питома споживання енергії U_s $1,75\text{e-}03$ кДж/лR_{log} ($1,75$ джоулів/літра на логарифм зменшення).

Накопичений час експонування (t_x) склав приблизно 800 мс в середньому за витратами при загальному часі обробки 480 сек. Бактеріальне навантаження в тестовій рідині було зменшене на 38% (частка загибелі (kill fraction) для колонієутворюючих одиниць на мл), або логарифм зменшення приблизно $-0,21\log_{10}$. Вказана частка загибелі (kill fraction) є середньою по семи пробах, що були відібрані з рівними інтервалами за час тесту. Хоча величина зменшення $-0,21\log$ не є істотною для цілей комерційної пастеризації, вона істотна для цілей демонстрації ефективності варіантів даного винаходу, що застосовуються в галузі електропорації живих клітин. Не було виявлено спроб визначити або виміряти ступінь оборотної електропорації (тобто, тимчасового підвищення проникності

мембрани), але враховуючи велику частку загибелі (kill fraction) ефекти електрошокової стимуляції мембранної проникності на частку виживання співмешканців (cohabitant survival fraction) залишаються незмінними.

У комерційній, академічній і патентній літературі, що належить до галузі пристроїв, способів і теорії електропорації, розкриті різні прикладені напруги, величини інтенсивності поля, форми імпульсів, частоти імпульсів, профілі підйому і спаду, геометрії і схем потоку середовища. У попередньому рівні техніки застосовуються низькоімпедансні електропровідні електроди, сполучені безпосередньо з оброблюваною рідиною, тим самим застосовуючи переважно резистивне навантаження в сталому режимі (однак, в усіх резистивних ланцюжках є ємнісні і індуктивні елементи, і ці елементи не релевантні даному дослідженню). Це справедливо для клінічних, лабораторних комерційних систем. Однак, варіанти даного винаходу містять послідовний ємнісний ланцюжок. У нижченаведеній таблиці показані критичні електричні параметри вивчених працюючих систем і пристроїв для електропорації (діапазон деяких величин вельми широкий, але показовий).

Таблиця 2

	Φ _a [КВ]	E ₁		t _p [мкс]	f _p [Гц]	U _s [кДж/лR _{log}]
		[Вм ⁻¹]	[кВсм ⁻¹]			
Мінімальна опублікована величина	<0,1	5,00E+02	0,005	0,001	100	25
Максимальна опублікована величина	75	8,7E+06	87	300	1,0E+06	11300

де:

Φ_a - прикладена напруга, кіловольт,

E₁ - інтенсивність поля, вольт на метр і кіловольт на сантиметр,

t_p - ширина імпульсу, мікросекунд,

f_p - частота імпульсів Герц (як імпульсів в секунду, а не циклів в секунду),

U_s - питома енергія, кілоджоулів на літр на логарифм зменшення.

Дані, зібрані в цьому дослідженні, охоплюють широкий спектр і оборотних (перехідне стимулювання проникності), і необоротних (смерть) ефектів електропорації, декілька типів бактерій, і включають системи з коаксіальною (циліндричною) і паралельною геометрією каналів для середовища, а також схеми порційної і безперервної обробки. Однак, дані про питому енергію U_s, що вимагається пристроєм або способом для впливу на досягнуту частку загибелі, публікувалися рідко (остання колонка в таблиці 2). Дослідження, проведені винахідниками, що часто вимагало розрахунків, які знаходяться за межами звітів, що вивчаються, показало, що споживання енергії відносно частки загибелі, як і показано, вельми високе. Навпаки, високоімпедансний пристрій 300 для електропорації, виготовлений для демонстрації, споживав питому енергію (U_s) порядку $75\text{e-}03$ кДж/лR_{log}, тобто на чотири порядки менше, ніж найменша з опублікованих величин питомої енергії (U_s), і на 6 порядків менше, ніж найбільша з опублікованих величин (U_s) питомої енергії. Таке низьке споживання енергії на літр на логарифм зменшення за-

вдяки високому імпедансу елементів за даним винаходом додатково повністю вирішує проблеми електрохімії середовища/електрода і омичного нагрівання, що викликане струмом, наявні в пристроях і способах за попереднім рівнем техніки.

Фахівцям зрозуміло, що, незважаючи на те, що для підживлення пристрою BE 300 в момент демонстрації використовувалася незмінна у часі постійна напруга (прямокутні імпульси), можна використовувати і змінну у часі напругу. Додатково, хоча для геометрії послідовних ємностей використовувалася геометрія паралельної пластини, в рівній мірі можна використовувати і інші геометрії, наприклад, коаксіальну (циліндричні послідовні ємності).

Додатково до використання високоімпедансного генерування поля для електропорації біологічних клітин, винахідники виявили конкордантний вплив при застосуванні акустичної енергії і електропорації. Акустична енергія може подаватися будь-якими бажаними засобами. Наприклад, акустична енергія може подаватися 1) впливом п'єзоелектричного перетворювача, що прикріплений до

пристрою ВЕ 300 так і в такій конфігурації, щоб подавати акустичну енергію в середовище, що знаходиться в каналі 230 або в прилеглому просторі, одночасно з прикладеним імпульсом електричного поля, між імпульсами електричного поля; або 2) п'єзоелектричною реакцією діелектричного електрода 200, в якому матеріал, що вибраний як бар'єрний матеріал, має відповідні діелектричні властивості і також є п'єзоелектричним матеріалом. У цьому випадку, акустична енергія має таку ж тривалість імпульсів і інтервали між імпульсами, що і прикладене поле. Можна також використовувати обидва засоби подачі акустичної енергії в єдиній системі. Тобто, діелектричний електрод, що сформований з п'єзоелектричного матеріалу, одночасно впливає електричним полем і акустичною енергією на оброблюване середовище, а другий спеціалізований електроакустичний або магнітоакустичний перетворювач розташований і сконфігурований таким чином, щоб подавати акустичну енергію в оброблюване середовище або одночасно з полем, що подається, або до або після подачі поля, або між імпульсами поля.

Застосування імпульсного подовжнього фронту акустичної хвилі до біологічної клітини під час електропорації або відразу після неї створює періодичний радіаційний тиск на мембрану клітини. Оскільки електропорація приводить до розвитку відкритих пор крізь мембрану клітини, вплив радіаційного тиску, представленого як сила, перпендикулярна полярній осі мембрани клітини, приводить до деформації клітини. З урахуванням механічної інерції клітини і в'язкості супернатанту, клітина сплющується на полюсі під впливом сили радіації. Коли клітинна мембрана сплющується на полюсі (полярна вісь проходить паралельно вектору сили

радіації), кут падіння між вектором радіації і ділянками мембрани, що є радіальними відносно полярної осі, поступово зменшується, тобто стає більш перпендикулярним вектору сили, тим самим сприяючи процесу сплющення. Цей процес сплющення продовжується доти, поки протидіючі сили інерції і в'язкості не подолають силу радіації, і клітина не почне рухатися. Під час сплющення, однак, відносно геометрії клітини діє один або обидва з наступних чинників: 1) внутрішній об'єм клітини зменшується або 2) площа мембрани збільшується (за рахунок розтягнення). Сила, що виникає внаслідок нормального тиску акустичного подовжнього випромінювання з плоскою хвилею, є явищем сталого режиму, тому сплющення відбувається тільки один раз, після чого форма клітини намагається відновитися, а потім уся клітина намагається рухатися разом з фронтом хвилі. Однак, якщо акустична енергія є імпульсною, цикл сплющення/відновлення відбувається з частотою цих імпульсів, якщо частота імпульсів нижче, ніж час механічного відновлення форми клітини. Оскільки деформація періодично зменшує і збільшує внутрішній об'єм клітини, результатом є "викачування". Це викачування приводить до викачування цитоплазми з клітини і до закачування в клітину міжклітинної рідини (супернатанту). Це приводить до прискорення клітинного паролічу, що веде до смерті і/або інактивації метаболізму організму, тим самим підвищуючи ефективність і/або частку загинелі для даної інтенсивності електричного поля і часу експозиції.

Хоча даний винахід був детально описаний з посиланнями на декілька варіантів, існують додаткові варіанти і модифікації, що входять в об'єм і винахідницьку ідею даного винаходу, як визначено в прикладеній формулі.

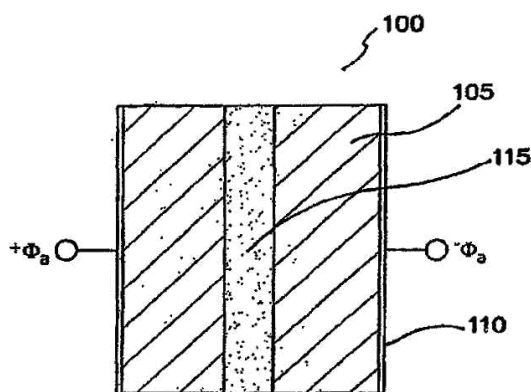


Fig. 1

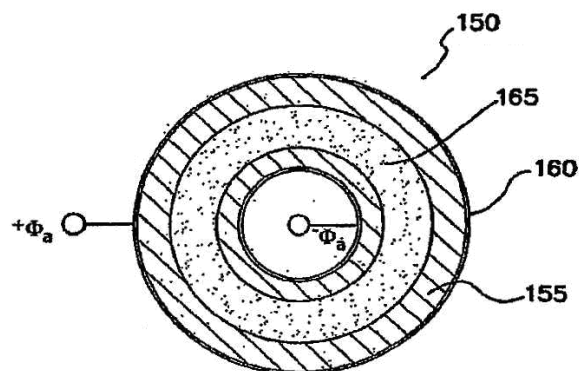


Fig. 2

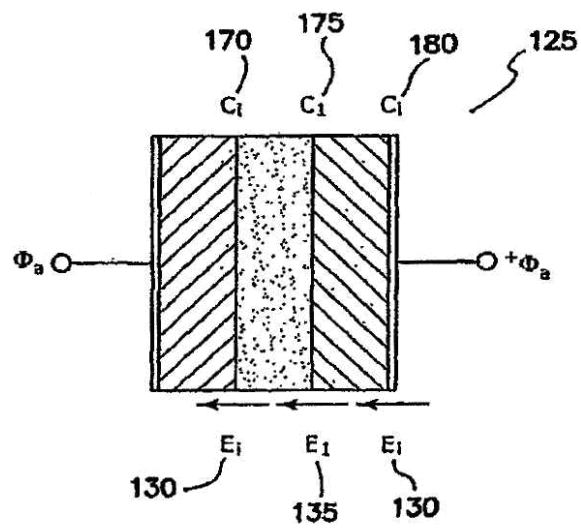


Fig. 3

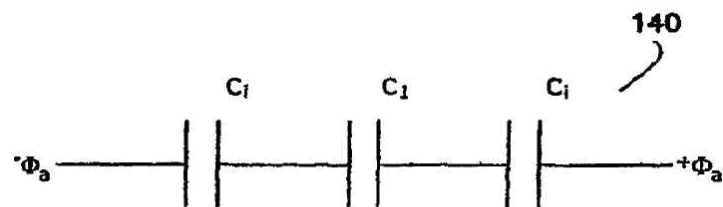


Fig. 4

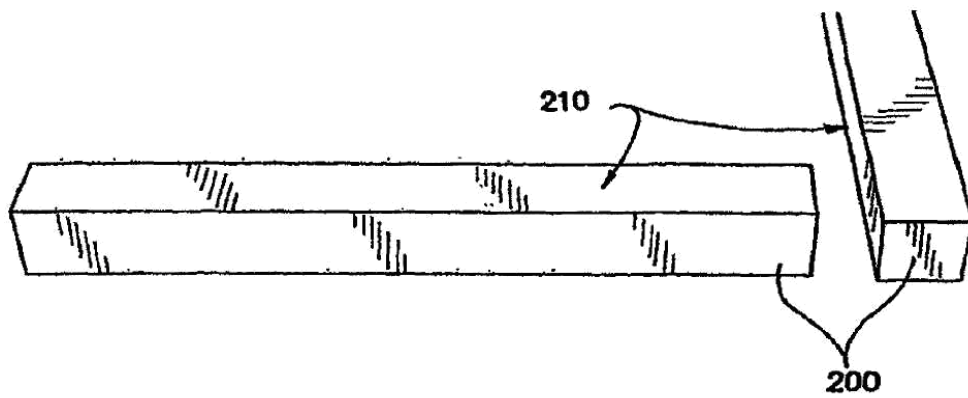


Fig. 5

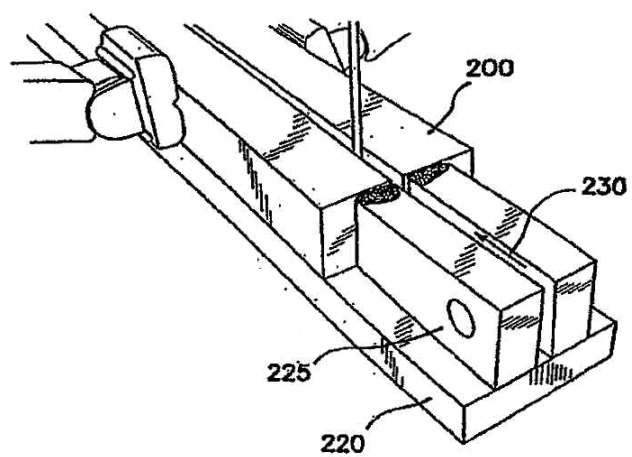


Fig. 6

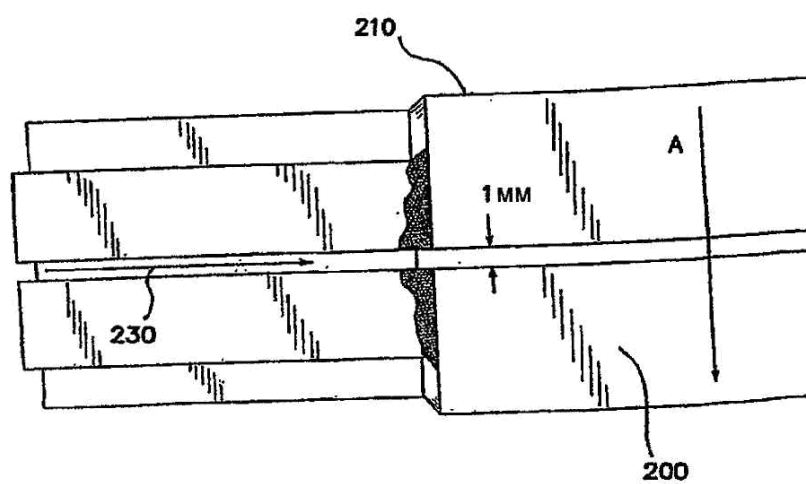


Fig. 7

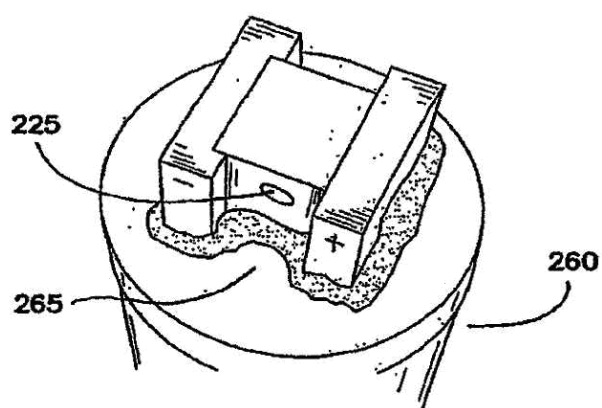
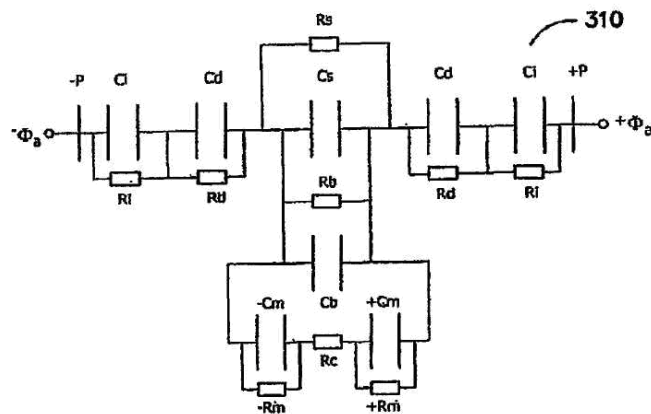
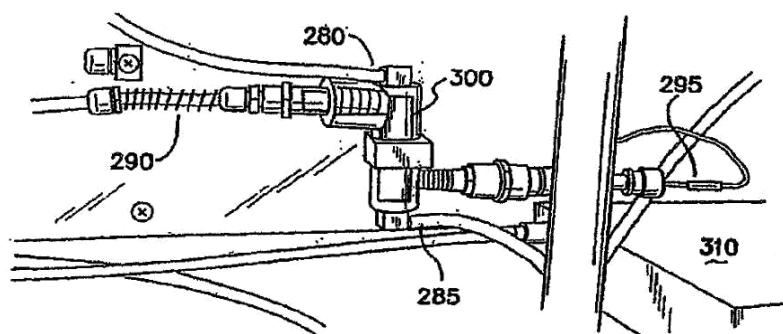


Fig. 8

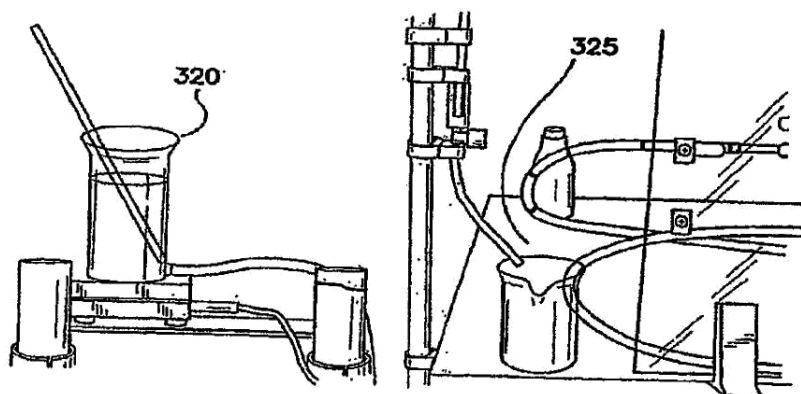


$C_{\text{д}}$	Ємнісний елемент, діелектричні ізолюючі бруски (кераміка)
$C_{\text{с}}$	Ємнісний елемент, електролітичний подвійний шар
$C_{\text{в}}$	Ємнісний елемент, рідкий оброблюваний супернатант
$-C_{\text{м}}$	Паралельно підключена ємність, суспензія бактеріальної фракції (сумарно)
$+C_{\text{м}}$	Ємнісний елемент (ефект Максвелла-Вагнера на поверхні розділення), клітинна мембрана, сторона +
$-R_{\text{д}}$	Ємнісний елемент (ефект Максвелла-Вагнера на поверхні розділення), клітинна мембрана, сторона –
$R_{\text{д}}$	Резистивний елемент, діелектричні ізолюючі бруски (кераміка)
$R_{\text{с}}$	Резистивний елемент, електролітичний подвійний шар
$R_{\text{в}}$	Резистивний елемент, суспензія в рідкому супернатанті
$-R_{\text{м}}$	Паралельно підключений опір, суспензія бактеріальної фракції (сумарно)
$+R_{\text{м}}$	Резистивний елемент клітинної мембрани на стороні – бактерії (сумарно)
$R_{\text{с}}$	Резистивний елемент клітинної мембрани на стороні + бактерії (сумарно)
$R_{\text{е}}$	Цитоплазматичний резистивний елемент

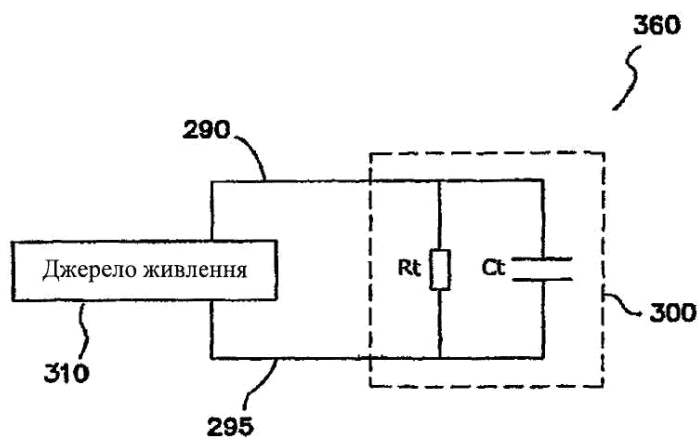
Fig.10



Фіг. 11



Фіг. 12



Фіг. 13