(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105308452 B
(45)授权公告日 2018.02.06

(21)申请号 201380074324.3
(22)申请日 2013.11.20
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105308452 A
(43)申请公布日 2016.02.03
(30)优先权数据
61/848,424 2013.01.03 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/070910 2013.11.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/107240 EN 2014.07.10
(73)专利权人 布里格姆女子医院有限公司
地址 美国马萨诸塞州
专利权人 维尔纽斯大学
哈佛学院董事及会员团体
(72)发明人 J·伊塔利亚诺 L·玛祖提斯
J·N·松 D·A·维茨
(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 余颖 沈端
(51)Int.Cl.
G01N 33/48(2006.01)
G06F 19/12(2006.01)
(56)对比文件
US 2005009101 A1,2005.01.13,
US 2011000823 A1,2011.01.06,
MX 291726 B,2011.11.04,
CN 102058399 A,2011.05.18,
CN 102698672 A,2012.10.03,
CN 2726112 Y,2005.09.14,
审查员 于园园

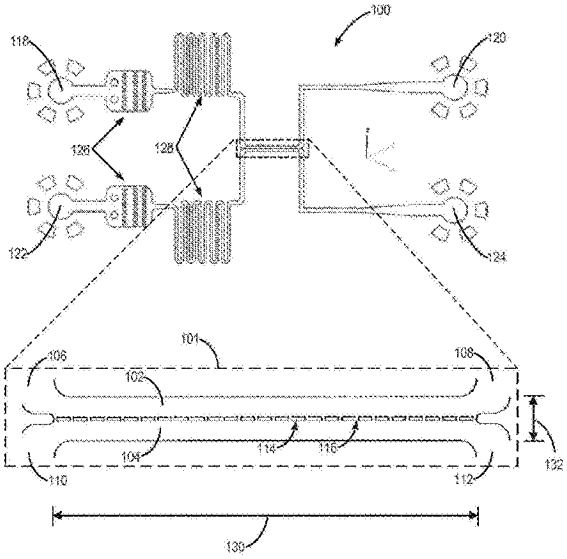
权利要求书3页 说明书15页 附图25页

(54)发明名称

仿生流体处理的系统和方法

(57)摘要

提供了用于收获目标生物物质的系统和方法。该系统包括基材和在基材中形成的第一和第二通道。这些通道彼此相互平行地纵向延伸。一系列间隙从第一通道通往第二通道由此形成一系列柱之间通过的流体连通路径的,这些柱以预定的间距纵向分隔。该系统还包括第一源和第二源,该第一源配置为以第一通道流速将第一生物组合物选择性地导入第一通道,该第二源配置为以第二通道流速将第二生物组合物选择性地导入第二通道。这些源配置为建立第一和第二通道之间的差异以生成限定在预定范围内的沿第二通道的生理剪切速率。



CN 105308452 B

1.一种仿生微流体系统,其包含:

基材;

所述基材中形成的第一通道,所述第一通道从第一入口向第一出口沿纵向维度延伸并且沿第一横向维度展开;

所述基材中形成的第二通道,所述第二通道从第二入口向第二出口沿纵向维度延伸并且沿第二横向维度展开,所述第一和第二通道的至少部分平行;

所述第一通道和第二通道之间的一系列柱;

一系列间隙,所述一系列间隙以预定的间距纵向分开所述柱,由此形成通道之间的流体连通路径,其中所述间隙调整为选择性捕获能生产目标生物物质的生物源材料;

与所述第一入口连接的第一源,所述第一源配置为以第一通道流速将至少一种第一生物组合物选择性导入所述第一通道,所述至少一种第一生物组合物包括所述生物源材料;和

与所述第二入口连接的第二源,所述第二源配置为以第二通道流速将至少一种第二生物组合物选择性导入所述第二通道;所述第一通道流速和所述第二通道流速在通道之间具有差异,其配置为生成沿所述第二通道的生理剪切速率,其诱导捕获的生物源材料生产所述目标生物物质。

2.如权利要求1所述的系统,所述一系列间隙和一系列柱使用在所述第一和第二通道之间设置的薄膜、膜和网格中的至少一种形成。

3.如权利要求1所述的系统,所述一系列间隙和一系列柱形成在所述第一通道和所述第二通道之间延伸的孔。

4.如权利要求1所述的系统,所述一系列间隙形成在所述第一通道和所述第二通道之间延伸的微通道。

5.如权利要求1所述的系统,所述预定的间距调整为能将多个血小板祖细胞捕获至所述一系列间隙周围。

6.如权利要求5所述的系统,所述多个血小板祖细胞包括巨核细胞。

7.如权利要求1所述的系统,所述第一和第二生物组合物包含半固体、固体、液体和细胞集合中的至少一种。

8.如权利要求1所述的系统,所生成的生理剪切速率在500s^{-1}至2,500s^{-1}的范围内,从而诱导多个血小板的生产。

9.如权利要求1所述的系统,所述生理剪切速率由下述至少之一来控制:所述第一通道速率、所述第二通道速率、所述纵向维度、所述第一通道横向维度、所述第二通道横向维度、所述第一生物组合物和所述第二生物组合物。

10.如权利要求1所述的系统,所述生理剪切速率的预定范围是100s^{-1}至10,000s^{-1}。

11.如权利要求1所述的系统,其中,所述系统还包含置于所述第一入口上游的第一流式过滤器,和置于所述第二入口上游的第二流式过滤器,其中上游相对于所述至少一种第一生物组合物和所述至少一种第二生物组合物的流动方向定义。

12.如权利要求11所述的系统,其中,所述系统还包含置于所述第一入口和所述第一流式过滤器之间的第一流阻,和置于所述第二入口和所述第二流式过滤器之间的第二流阻。

13.如权利要求1所述的系统,所述纵向维度是1000微米至30000微米。

14.如权利要求1所述的系统，所述第一和第二横向维度是100微米至3000微米。

15.如权利要求1所述的系统，所述柱纵向延伸1微米至200微米。

16.如权利要求1所述的系统，所述预定的间距是0.1微米至20微米。

17.如权利要求1所述的系统，所述预定的间距在预定距离范围中变化以改变所述间隙的尺寸。

18.一种产生生物物质的方法，所述方法包括：

提供仿生微流体系统，其包含：

基材；

所述基材中形成的第一通道，所述第一通道从第一入口向第一出口沿纵向维度展开和沿第一横向维度展开；

所述基材中形成的第二通道，所述第二通道从第二入口向第二出口沿纵向维度展开和沿第二横向维度展开，所述第一和第二通道的至少部分平行；

所述第一通道和第二通道之间的一系列柱，由预定的间距纵向分隔；

一系列微通道，所述一系列微通道使用所述一系列柱之间通过的流体连通路径将所述第一通道偶联至所述第二通道；

与所述第一入口连接的第一源；

与所述第二入口连接的第二源；

使用所述第一源以第一通道流速将第一生物组合物导入第一通道，所述至少一种第一生物组合物包括能生产目标生物物质的生物源材料；

使用所述第二源以第二通道流速将第二生物组合物导入第二通道；

控制所述第一和第二通道流速以将所述生物原材料选择性捕获至所述一系列微通道周围并在通道之间产生差异以诱导捕获的生物源材料生产所述目标生物物质；

使用所述第二生物组合物收回所述目标生物物质，用于收获。

19.如权利要求18所述的方法，所述预定的间距调整为能将多个血小板祖细胞捕获至所述一系列微通道周围。

20.如权利要求18所述的方法，所述第一和第二生物组合物包含半固体、固体、液体和细胞集合中的至少一种。

21.如权利要求18所述的方法，所述方法还包括产生所述差异以生成500s^{-1}至2,500s^{-1}范围内的生理剪切速率，从而从捕获的巨核细胞(MK)生产血液血小板。

22.如权利要求21所述的方法，所述生理剪切速率由下述至少之一来控制：所述第一通道速率、所述第二通道速率、所述纵向维度、所述第一通道横向维度、所述第二通道横向维度、所述第一生物组合物和所述第二生物组合物。

23.如权利要求18所述的方法，所述预定的间距是0.1微米至20微米。

24.如权利要求18所述的方法，所述目标生物物质包含血液血小板。

25.如权利要求1所述的系统，其中所述一系列柱中的各柱包括1微米至200微米的纵向维度。

26.如权利要求1所述的系统，其中所述一系列柱中的各柱包括1微米至200微米的横向维度。

27.一种生成血液血小板的方法，包括：

提供仿生微流体系统，包括：

基材；

所述基材中形成的第一通道，所述第一通道从第一入口向第一出口沿纵向维度延伸并且沿第一横向维度延伸；

所述基材中形成的第二通道，所述第二通道从第二入口向第二出口沿纵向维度延伸并且沿第二横向维度延伸，所述第一和第二通道的至少部分平行；

所述第一通道和第二通道之间的一系列柱，和从所述第一通道向所述第二通道延伸的一系列微通道，以形成所述柱之间通过的流体连通路径并通过预定的间距纵向分割所述柱；

与所述第一入口连接的第一源；

与所述第二入口连接的第二源；

使用所述第一源以第一通道流速将第一生物组合物导入第一通道，所述至少一种第一生物组合物包括能生成血液血小板(PLT)的巨核细胞(MK)；

使用所述第二源以第二通道流速将第二生物组合物导入第二通道；

控制所述流速以：

在第一通道中通过所述一系列微通道和所述一系列柱选择性捕获一种或多种巨核细胞；

允许从所述一种或多种巨核细胞形成的前血小板延伸通过所述微通道进入所述第二通道；

在通道之间形成差异，从而生成沿所述第二通道的生理剪切速率，其诱导从前血小板生产血小板；

使用所述第二生物组合物收回血小板。

仿生流体处理的系统和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明基于2013年1月3日提交且标题为“Biomimetic device for generating human platelets(生成人血细胞的仿生装置)”的美国临时专利申请号61/848,424并要求其权利,其通过引用全文纳入本文。

[0003] 关于联邦资助研究/开发的声明

[0004] 本发明是在政府支持下由国家卫生研究院(National Institutes of Health)授予的基金号1K99HL114719-01A1资助完成。政府对本发明拥有某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 本发明通常涉及流体系统,包括微流体装置、包含这类装置的系统和使用这类装置和系统的方法。更具体地,本发明涉及基于仿生平台生成功能性生物材料、物质或试剂的装置、系统和方法。

[0007] 血液血小板(PLT)对于止血、血管发生和先天免疫而言很重要,且当数目降低至低水平时,发生称作血小板减少症的病症,患者处于因出血而死亡的严重风险下。低血小板计数的一些原因包括手术、癌症、癌症治疗、再生障碍性贫血、毒性化学品、醇、病毒、感染、怀孕和特发性免疫血小板减少症。

[0008] 治疗这类病症的替代PLT通常完全来源于人供体,但存在由其免疫原性导致的严重临床问题和脓毒血症的相关风险。然而,需要更多PLT输注所导致的不足(以及近似静态的供体池和由于细菌测试和恶化产生的短储藏期)使得健康护理专业人员更难以为其患者提供合适的护理。此外,替代方法(如人工血小板替代品)目前尚不能替代生理血小板产品。

[0009] 在体内,PLT由祖细胞(称为巨核细胞(MK))生产。在骨髓(BM)中位于血管外,MK将长、分支的细胞结构(proPLT(前血小板))延伸至窦状腺血管内,其中其经历剪切速率并将PLT释放至循环中。虽然已在体外生长了功能性人PLT,但迄今为止的细胞培养方法仅生成约10%proPLT生产且每个人MK生成10-100个PLT。相反地,人中的几乎所有成年MK都必须各自生产大致1000-10000个PLT以得到循环的PLT的数目。这构成了离体血小板输注单元生产的主要瓶颈。虽然第二代细胞培养方法对PLT是否的生理驱动提供了进一步的认识,但其无法重建整个BM微环境,对胞外基质(ECM)组成、BM刚性、内皮细胞接触或血管剪切速率具有有限的个体控制;且未能成功地同步化proPLT生产,导致6-8天时间中不均匀的PLT释放。此外,高分辨率活细胞显微镜显示的不具有在生理相关条件下解决proPLT延伸和释放的能力显著阻碍了鉴定PLT生产的细胞骨架结构以促进药物开发和建立血小板减少症的新治疗方法的努力。因此,能够生成临床上显著数目的功能性人PLT的有效、供体不依赖的PLT系统是消除PLT获得和储存相关风险所必需的,并有助于满足日益增长的输注需要。

[0010] 基于上述考虑,持续而明确地需要利用特定平台的装置、系统和方法,该平台可再生血管生理学以精确地反映影响功能性人血液血小板的有效生产的过程、机制和条件。这类平台将证明高度适用于有效地生成人血小板的目的以用于输注,以及用于建立开发的临床前阶段中的相互作用和药物效果。

发明内容

[0011] 本发明通过提供一种仿生流体系统和方法克服了前述缺陷，例如用于使用代表生理上精确的条件、环境、结构和动力流的平台生成功能性人血液血小板。该方法适用于血小板缺乏病症(如血小板减少症)的输注治疗以及适用于药物开发应用。

[0012] 根据本发明的一个方面，提供了一种仿生微流体系统，其包含基材。该系统还包含基材内形成的第一通道，其从第一入口向第一出口并沿纵向维度延伸并且沿第一横向维度展开。该系统还包含基材内形成的第二通道，其从第二入口向第二出口沿纵向维度延伸并且沿第二横向维度展开。第一和第二通道基本平行地延伸。该系统还包含从第一通道通往第二通道的一系列间隙由此形成在一系列柱之间通过的流体连通路径。这些柱以预定的间距纵向分隔。值得注意的是，该预定间距可以是均匀的或可在一定的预定距离范围内变化使得间隙具有可变宽度。该系统还包含第一源，其与第一入口连接并配置为以第一通道流速将至少一种第一生物组合物选择性导入第一通道。该系统还包含第二源，其与第二入口连接并配置为以第二通道流速将至少一种第二生物组合物选择性导入第二通道。第一通道流速和第二通道流速具有差异，其配置为生成限定在预定范围内的沿第二通道的生理剪切速率并通过所述一系列间隙影响第一通道内的流动。

[0013] 在本发明的另一个方面中，公开了一种生成血管结构和骨髓中至少一种的物理模型的方法。该方法包括提供了一种仿生微流体系统，该系统包含基材和基材内形成的第一通道，该第一通道从第一入口向第一出口沿纵向维度延伸并且沿第一横向维度展开。该系统还包含基材内形成的第二通道，其从第二入口向第二出口沿纵向维度延伸并且沿第二横向维度展开。第一和第二通道基本平行地延伸。该系统还包含从第一通道通往第二通道的一系列间隙由此形成在一系列柱之间通过的流体连通路径。这些柱以预定的间距纵向分隔。该系统还包含与第一入口连接的第一源和与第二入口连接的第二源。该方法包括使用第一源以第一通道流速将第一生物物质导入上通道并使用第二源以第二通道流速将第二生物物质导入下通道以建立第一和第二通道流速之间的差异，从而生成限定在预定范围内的沿第二通道的生理剪切速率。该方法还包括收获通过生理剪切速率在间隙近端生成的目标生物物质。

[0014] 通过以下说明书可以清楚地了解本发明的上述和其他方面和优势。在以下说明书中，参照构成说明书的一部分的附图，其中以说明性方式显示了本发明的优选实施方式。这类实施方式不必然代表本发明的全部范围，而是因此对权利要求进行说明并在本文中解释本发明的范围。

[0015] 附图简要说明

[0016] 在后文中将参考附图描述本发明，其中同样的附图标记表示同样的元件。

[0017] 图1是本发明所述仿生微流体系统的示意图。

[0018] 图2A显示显微图像，显示具有骨髓和血管蛋白的各微流体通道的涂层用以再生胞外基质(ECM)组成，如本发明所述。

[0019] 图2B显示显微图像，显示选择性包埋于藻酸盐凝胶中的间隙或微通道中捕获的巨核细胞(MK)(白色箭头)，对3维ECM组织和生理骨髓(BM)刚性进行建模，如本发明所述。

[0020] 图2C显示人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的显微图像，其在纤维蛋白原包被的第二通

道中选择性培养以生成功能性血管，如本发明所述。

[0021] 图2D显示完整系统的组合图像。

[0022] 图2E显示本发明所述仿生微流体系统内模拟的剪切速率分布。

[0023] 图2F是对于若干输注速率而言与第一通道的横向(轴向)距离成函数的剪切速率的示意图，如本发明所述。

[0024] 图2G是作为阻断微通道(狭缝或孔)数目的函数的剪切速率的示意图，如本发明所述。

[0025] 图3A描绘0和18小时时培养的MK的直径分布，如本发明所述。

[0026] 图3B是静态培养物中MK的显微图像，显示纯化后6小时时proPLT的生产，如本发明所述。

[0027] 图3C显示生理剪切下MK的显微图像，显示捕获后立即发生的proPLT生产，如本发明所述。

[0028] 图3D显示与静态培养物相比生理剪切下生产proPLT的MK百分比的增加，如本发明所述。

[0029] 图3E显示与静态培养物相比生理剪切下proPLT延伸速率显著增加，如本发明所述。

[0030] 图4A是显微图像，显示MK挤压通过3μm宽的微通道，支持血管PLT生产的模型，如本发明所述。

[0031] 图4B是显微图像，显示MK延伸大片段通过3μm宽的微通道，支持血管PLT生产的模型，如本发明所述。

[0032] 图4C是显微图像，显示proPLT延伸，如本发明所述。

[0033] 图4D是显微图像，显示proPLT延伸和沿proPLT轴的不同位置处的切断事件，如本发明所述。

[0034] 图4E是显微图像，显示切断后所得proPLT末端在尖部形成新的PLT大小的膨胀，其随后被延伸和释放，重复该循环，如本发明所述。

[0035] 图4F是显微图像，显示生理范围内提高的剪切速率不会提高proPLT延伸速率，如本发明所述。

[0036] 图4G是显微图像，表明经逆转录病毒转染以表达GFP-β1微管蛋白的MK显示proPLT延伸并由外周MT组成，所属外周MT在PLT大小的末端处形成螺旋，如本发明所述。

[0037] 图4H显示5μM Jasplankinolide(Jas，肌动蛋白稳定剂)和1mM赤式-9-(3-[2-羟基壬基](EHNA，胞质动力蛋白抑制剂)抑制剪切诱导的proPLT生产，如本发明所述。

[0038] 图4I是显微图像，显示生理剪切下proPLT生产的药物诱导抑制，如本发明所述。

[0039] 图5A显示微流体装置来源的mFLC-PLT表现血液PLT的结构和功能性质，如本发明所述。

[0040] 图5B显示培养第4天分离后输注至微流体装置中的以及输注后2小时从微流体装置收集的流出液中的(GP)IX+mFLC-MK的相对浓度、正向/侧向散射和生物标记物表达，如本发明所述。

[0041] 图5C显示与静态培养物上清液相比，剪切的应用使得GPIX+产物向更多PLT尺寸的细胞变化，如本发明所述。

[0042] 图5D是显微图像，显示在微流体装置中mFLC-MK在2小时内转化为PLT，如本发明所述。

[0043] 图5E显示与静态培养物上清液相比，剪切的应用使得产物向更多PLT尺寸的β1微管蛋白+Hoescht细胞变化，如本发明所述。插入页显示流出物中游离细胞核的定量。

[0044] 图5F是显微图像，显示微流体装置mPLT在超微结构上类似于小鼠血液PLT且含有皮层MT螺旋、开放的小管系统、致密的微管系统、线粒体和特征性分泌颗粒，如本发明所述。

[0045] 图5G是显微图像，显示微流体装置mPLT和PLT中间体在形态上类似于小鼠血液PLT且显示可比的MT和肌动蛋白表达，如本发明所述。

[0046] 图6A显示微流体装置来源的hiPSC-PLT具有血液PLT的结构和功能性质，其中hiPSC-MK在培养第15天达到最大直径(20-60μm)，如本发明所述。

[0047] 图6B是显微图像，显示hiPSC-MK在超微结构上类似于原代人MK且含有分成小叶的细胞核、内陷的膜系统、糖原贮积、细胞器和特征性分泌颗粒，如本发明所述。

[0048] 图6C是显微图像，显示静态培养物中的hiPSC-MK在纯化后6小时开始生产proPLT并在18小时达到最大proPLT生产，如本发明所述。

[0049] 图6D是显微图像，显示生理剪切下(约500s^{-1})的hiPSC-MK在捕获后立即开始生产proPLT，并在培养的最初2个小时内延伸/释放proPLT，如本发明所述。

[0050] 图6E显示与静态培养物相比生理剪切下生产proPLT的hiPSC-MK百分比的显著增加，如本发明所述。

[0051] 图6F显示生理剪切下proPLT延伸速率是约19μm/分钟，如本发明所述。

[0052] 图6G是显微图像，显示微流体装置来源的hPLT在超微结构上类似于人血液PLT且含有皮层MT螺旋、开放的小管系统、致密的微管系统、线粒体和特征性分泌颗粒，如本发明所述。右上方插页显示外周MT螺旋。

[0053] 图6H是显微图像，显示微流体装置来源的hPLT在形态上类似于人血液PLT且显示可比的MT和肌动蛋白表达，如本发明所述。

[0054] 图6I是显微图像，显示微流体装置来源的mPLT激活形成丝状伪足/板状伪足并在玻璃表面上铺展，如本发明所述。

[0055] 图7显示活细胞显微图像，显示T-DM1通过诱导异常的微管蛋白构架来抑制MK分化并破坏proPLT形成，如本发明所述。

[0056] 发明详述

[0057] 血液血小板(PLT)在刺激凝块形成和血管损伤修复中起关键作用。低PLT计数所致出血导致的发病和死亡是许多病症(包括化疗和放疗、外伤、免疫性血小板减少性紫癜(ITP)、器官移植手术、严重烧伤、脓毒血症和遗传紊乱)所面临的一项主要临床问题。虽然其免疫原性和相关风险导致了严重的临床问题，同时具有高需求量和短储藏期导致的库存缺陷，但美国的PLT输注总量仍超过1000万单位/年。

[0058] PLT生产涉及巨核细胞(MK)的分化，巨核细胞位于骨髓(BM)中的窦状腺血管外并延伸长、分支的细胞结构(命名为proPLT)至循环中。proPLT经历血管剪切并作为PLT生产的组装线起作用，含有由薄胞质桥连接的串联排列的PLT尺寸的膨胀。虽然proPLT的详细表征仍不完整，但已在体外和体内识别了这些结构且在培养物中生产proPLT的MK生成了结构和功能上与血液PLT类似的PLT。PLT从proPLT尖端处连续释放。该机制高度依赖于功能为细胞

的分子支柱和主梁的微管蛋白和肌动蛋白丝的复杂网络。微管(MT)束与proPLT轴平行，且proPLT延长受在彼此上滑动的MT驱动。proPLT成熟期间，在MT远端上运输的细胞器和分泌颗粒沿轨道移动，从而被限制于proPLT尖端处。肌动蛋白促进proPLT分支和PLT端部扩增。鼠MK的活细胞显微观察对该理解至关重要，但迄今为止的大多数研究都在体外对静态MK培养物进行。

[0059] 已将促血小板生成素(TPO)鉴定为MK分化的主要调控因子，且其已被用于在培养物中生产富集的MK群体。在我们的参考中，已证明从生产proPLT的MK中体外生成的人PLT是功能性的。从那以后，已从多个来源分化MK，包括胎肝细胞(FLC)、脐带血干细胞(CBSC)、胚胎干细胞(ESC)和诱导的全能干细胞(iPSC)。然而，目前的2-D和液体MK培养物的数量级不足体内每个MK生成的预测约2000个PLT。最近，已在连续流体流下应用模块化3-D编织聚酯网格以在培养物中从100万个$CD34^+$人脐带血细胞中生成最多$6x10^6$个PLT/天。虽然表明可以获得临床上有用的PLT数目，但那些3-D灌注生物反应器没有精确再生BM微环境的流体特性和复合物结构，且其闭合的模块化设计无法观察proPLT生产，难以提供对PLT释放机制的理解。或者，已提出使用3-D聚二甲基硅氧烷(PDMS)生物芯片相邻的ECM包被的基于丝的导管来再生BM窦状腺并在体外研究MK分化和PLT生产。虽然这类装置在成熟期间再现了MK迁移，但其无法适用于高分辨率活细胞显微分析，并无法再生驱动MK分化所需的内皮细胞接触。

[0060] 虽然已在培养物中研究了MK分化，但对于刺激proPLT生产的条件仍知之甚少，特别是在体内中。MK发现于BM微环境(niche)中，且一些证据暗示BM间质的细胞-细胞、细胞-基质和可溶性因子相互作用参与proPLT形成和PLT释放。实际上，趋化因子SDF-1和生长因子FGF-4将MK招募至窦状腺内皮细胞。胞外基质(ECM)蛋白是BM血管微环境的另一主要组分，且证据暗示通过跨膜糖蛋白(GP)受体的信号转导调控proPLT形成、PLT数目和大小(在例如巨血小板综合征、血小板无力症中所见的缺陷)。胶原IV和玻连蛋白促进proPLT生产，其可被针对其偶联整联蛋白受体GPIbα的抗体抑制。同样地，纤维蛋白原调控通过GPIIbIIIa的PLT释放和proPLT形成。虽然这些发现说明了proPLT生产的环境决定因素，但其受限于简化论者(reductionist)方法。因此，整合了BM间质复杂性的限定因素的新模型是阐明MK至PLT的生理调控所需。

[0061] 在BM中，proPLT经历100至10,000s^{-1}或更具体地500至2500s^{-1}的壁剪切速率。虽然已研究了持续血流对于PLT血栓形成的作用，但令人吃惊的是，剪切力调控PLT释放的机制只受到很少关注。研究时，各实验在生理学上不具有代表性。一些初级研究在ECM包被的载玻片上灌注MK，其选择固定/粘附的MK而不区分ECM接触激活与剪切。或者，在孵育摇床中向心搅动释放的proPLT，其不再现循环层状剪切流，不提供血管剪切速率的精确控制，且不适用于高分辨率活细胞显微观察。虽然存在这些主要限制，但将MK暴露于高剪切速率似乎加速了proPLT生产并在不存在剪切的情况下培养proPLT时释放比流体剪切压力下所维持的更少的PLT。

[0062] 微流体装置提供了极佳的平台以生成和精确调节动态流体流，并从而模拟血管条件以将化学信号递送至细胞。已证明将微流体网络包埋在装载细胞的水凝胶中支持了通过3D支架的可溶性蛋白的有效对流运输。已生成了活的3D组织接触，其由琼脂糖中包封的肝细胞、使用初级软骨细胞接种的藻酸钙水凝胶和包埋在3D管状聚(乙二醇)水凝胶中的内皮细胞组成。因此，该技术已被应用于开发芯片器官(organs-on-a-chip)，包括肝、肾、肠和

肺。此外，已使用芯片微血管系统的新进研发成果体外研究心血管生物学和病理生理学。这些研究强调了模拟物理微环境和活器官的天然化学信号以研究细胞和生理发育的重要性。例如，这对于药物介导的PLT生产抑制而言特别重要。由于生产proPLT的MK在BM中位于紧靠血管的外侧，与BM的半固体ECM微环境和循环的流体微环境相互作用，仿生微流体生物芯片可实现模型系统以阐明相关生理机制，如负责药物诱导的血小板减少症的那些。

[0063] 现在参考图1，示意图显示了本发明的多个实施方式所述的仿生系统100的示例。该系统100包括基材101、第一通道102和第二通道104，各通道配置为携带任何流体介质流，其传输或由以下组分组成(但不限于此)：例如，颗粒、细胞、物质、微粒、材料、组合物等。在一个实施方式中，该系统100和/或基材101可使用细胞惰性硅基有机聚合物(如聚二甲基硅氧烷(PDMS))制备。

[0064] 该第一通道102包含第一通道入口106和第一通道出口108。类似地，该第二通道104包含第二通道入口110和第二通道出口112。该第一通道102和第二通道104沿基本纵向方向延伸，且具有纵向和横向维度(如同将解释的那样)以实现所需流动曲线、速度或速率，例如生理系统中存在的那样。在一个方面中，描述通道的纵向130和横向132维度的尺寸的范围与解剖学或生理学上的结构、组织、配置或设置(如骨髓和血管中的情况)一致。例如，该纵向130维度的范围可以是1000-30000微米或更具体地1000-3000微米，且该横向132维度的范围可以是100-3000微米或更具体地100-300微米，但也可使用其他数值。在另一个方面中，可制备、限定或制造各通道以接收、定位、捕获或容纳例如来自穿过的流体介质的颗粒、细胞、物质、微粒、材料、组合物等。

[0065] 该装置100还包括分离第一通道102和第二通道104的一系列柱114。柱114的长轴通常设置为与通道的纵向130维度平行，该一系列柱114延伸约等于通道的纵向130维度的距离。这些柱114被间隙分离，建立一系列如图所示可以是微通道116的间隙，该微通道116从第一通道102通往第二通道104由此形成在这些柱114之间通过的部分流体连通路径。然而，在指代间隙时，术语“微流体”不隐含特定宽度。例如，这些间隙可基本大于或小于微米范围。在一个实施方式中，这些柱114和微通道116具有维度以使颗粒、细胞、物质、微粒、材料、组合物等结合、粘附或受限于大致在柱114和微通道116附近的区域，并从而从靠近微通道116的区域收获。例如，这些柱114的纵向130和横向132维度的范围可以是1-200微米，而这些微流体116的纵向130维度(由柱114之间的间隙或间距所定义)的范围可以是0.1-20微米，但也可使用其他数值。

[0066] 通过配置为递送第一介质的第一源或入口118和配置为提取第一介质的第一出口120建立第一通道102中的流体。类似地，通过第二源或入口122到第二出口124建立第二通道104中第二流体介质的流体。该第一源或入口118和第二源或入口122可设置为包含用于递送受控流的泵或其他系统。在一种配置中，该第一出口120或第二出口124还可装备或后接设计为从第一或第二介质(如人血液血小板或凝血细胞)中捕获、储存和/或分离所需材料或物质的元件、组件、装置或系统。即，第一通道入口106与第一通道出口108之间的第一流体介质和第二通道入口110与第二通道出口112之间的第二流体介质的流动速度或流动速率可以通过任何数目的源(如微流体泵和引流管(drain))与系统100的流体连通建立，并可维持任何需要或必需的时间。流动的控制和操作可通过将元件(如阀门、源和引流管)与系统100整合来实现，或者可通过将系统100与用于流体致动和流量调节的多种组件外部连

接或偶联来实现。

[0067] 如下文所述，根据重现、塑造或复制生理成分、组分或条件(例如骨髓和血管中发现的那些)所需要或必需的那样，第一通道102中的流动速度或速率可配置为大致不同于第二通道104中的流动速度或速率。在另一个实施方式中，可以复制生理剪切速率和概况(如血管剪切速率和概况)的方式控制流动速度或速率。

[0068] 该系统100还可包括过滤元件126，其可以是任何形状或形式，沿第一和第二流体介质中每一个的路径设置并设计为从通过的流体介质中捕获或除去任何类型的碎片、灰尘和任何其他污染物或不需要的材料、成分或微粒。在一种配置中，过滤元件126的位置靠近第一入口118和第二入口122。该系统100还包括流量阻力元件128，其可以是各种形状或形式，沿第一和第二流体介质中每一个的路径设置并设计为控制流动力或减弱流动速率的波动。在一种配置中，流量阻力元件128可沿第一和第二流体介质中每一个的路径位于各过滤元件126后。

[0069] 在一种配置中，可通过单独或联合地使用骨粉、蛋白质(如Cl、CIV、FG、FN、VN、LN和VWF)、凝胶(如琼脂糖、藻酸盐和基质胶)或溶液(如PBS、HBS、DMEM EGM或其他介质)选择性填充第一通道102来离体重建人骨髓(BM)血管微环境。或者，在使用蛋白微米/纳米冲压(micro/nano-stamping)将生物芯片粘附于表面载片前，或在使用平行微流体流进行微流体装置组装后，可将ECM蛋白直接压制(pattern)在玻璃表面上。输注期间可通过调控微流体流流动速率来调节局部组分浓度，着重于对齐和3-D排列。

[0070] 在另一种配置中，可通过在37摄氏度和5％CO_2下与内皮细胞培养来选择性包被第二通道104，从而实现重现人BM血管系统。内皮细胞可使用4％甲醛固定，并探测细胞生物标记物以解析细胞定位和构造。可使用荧光或比色介质(如FITC-葡聚糖)或使用珠灌注内皮化BM生物芯片的第二通道104，并通过活细胞显微镜观察以评估样品/细胞/分子扩散和测定血管通透性。

[0071] 本发明所述系统100可提供用于通过使用仿生微流体装置复制人小静脉中发现的维度、环境和条件来重现生理条件(如人BM的那些)的平台。经历受控的环境和流动条件的由紧密隔开的柱分离的微流体通道代表可用于生产功能性PLT的实际生理模型。在这种方式中，可调节MK捕获、BM刚性、ECM组成、微通道尺寸、血液动力学血管剪切和内皮细胞接触以在体外再生人BM。

[0072] 下文详细描述了本发明中使用的材料和方法的特定实施例。应理解，实施例仅提供用于说明目的，并非旨在以任何方式限制本发明的范围。实际上，除了本文显示和描述的那些外，本发明的多种修改形式(如应用本发明以对血脑屏障建模或研究跨单独介质的分子扩散)在前文说明书和后文实施例的基础上对于本领域技术人员而言显而易见并落入所附权利要求书的范围内。例如，提供了特定的维度、配置、材料、细胞类型、微粒、流动介质和流动速率、制造方法和配方，以及成像、处理和分析方法等，但应理解也可以使用其他。

实施例

[0073] 微流体装置设计和制造

[0074] 如图1所示，使用软性平版印刷制造微流体装置，其由含有无源滤器的两个通道(用于捕获气泡和灰尘)以及后续的流体阻碍器(用于减弱操作期间产生的流动速率波动)

组成。这些通道合并到1300微米长、130微米宽和30微米深的矩形区域中，其被相隔3微米的一系列柱(10微米宽和90微米长)分离。为确保细胞培养期间有效的气体交换并支持高分辨率活细胞显微观察，可由与玻璃载玻片结合的细胞惰性硅基有机聚合物构建微流体装置。

[0075] 使用AutoCAD中的AutoDesk软件来设计需要的2D图案并打印在光刻铬掩模(photolithography chrome mask)上。使用SU-83025光刻胶(麦克罗化学公司(Michrochem)，马萨诸塞州牛顿市)旋涂硅晶片(大学晶片公司(University Wafers)，马萨诸塞州波士顿)至30微米薄膜厚度(劳瑞尔科技公司(Laurell Technologies)，宾夕法尼亚州北威尔士)，65摄氏度烘烤1分钟并95摄氏度烘烤5分钟，并通过铬掩模暴露于UV光(约10mJ cm^{-2})30秒。通过将基材浸入丙二醇单甲醚乙酸酯中7分钟来除去未结合的SU-8光刻胶。将聚二甲基硅氧烷(PDMS)倒在硅晶片的有图案的一侧上、脱气并65摄氏度下交联约12小时。固化后，对PDMS层脱模并使用0.75mm直径活检钻钻出入口和出口孔。通过将PDMS板粘结于玻璃盖片((#1.5,0.17x22x50mm，道康宁公司(Dow Corning)，比利时瑟内夫)随后用氧气等离子体(PlasmaPrep 2，加拉仪器公司(GaLa Instrumente GmbH)，德国巴德施瓦尔巴赫)处理来密封通道。使用配备27号针的1mL注射器(BD公司(Beckton Dickinson)，新泽西州富兰克林湖市)经由PE/2导管(科学商品公司(Scientific Commodities)，亚利桑那州哈瓦苏湖城)将样品注入微流体装置。通过注射器泵(PHD 2000，哈佛设备公司(Harvard Apparatus)，马萨诸塞州霍利斯顿)控制液体的流动速率。

[0076] 微流体装置操作

[0077] 使用0.22μm过滤的10％BSA溶液(密理博公司(Millipore)，马萨诸塞州比尔里卡)对装置包被30分钟以防止细胞直接接触玻璃。使用双注射器微流体泵(哈佛设备公司，马萨诸塞州霍利斯顿)以12.5μL/小时的速率分别在第一入口118和第二入口122中输注原代MK和培养基。当第一出口120关闭时，两种输入溶液都重定向至第二出口124，导致原代MK捕获。

[0078] 胞外基质组成模型(2D)

[0079] 通过使用若丹明偶联的纤维蛋白原(1mg/mL)或纤连蛋白(50μg/mL，细胞骨架公司(Cytoskeleon Inc.)，科罗拉多州丹佛市)对通道灌注30分钟来使用胞外基质蛋白选择性包被微流体装置。通过两个入口平行灌注样品并通过两个出口收集，使层状流体流不混合。装置使用1x PBS清洗并使用0.22μm过滤的(密理博公司，马萨诸塞州比尔里卡)10％BSA溶液(罗氏公司(Roche)，加利福尼亚州南旧金山)包被30分钟以包被任何剩余暴露的玻璃。

[0080] BM刚性建模(3D)

[0081] 将原代MK重悬于培养基中平均分子量为150-250kD的1％无菌藻酸盐(Pronova SLG100，FMC生物聚合物，挪威)中并跨微流体装置(第一入口118，第二出口124)直至MK被捕获。随后使用1xPBS选择性灌注第二通道以从该通道中除去藻酸盐。为制备均匀的藻酸盐凝胶，将30mM纳米颗粒碳酸钙(mkNANO公司，加拿大)用作钙源并溶解于60mM缓慢水解的D-葡萄糖酸-δ-内酯(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)，密苏里州圣路易斯)，其在溶液中释放钙(参见综述Khavari等NJP 2013)。沿第二通道灌注碳酸钙悬浮液直至第一通道中保留的藻酸盐溶液聚合(约20分钟)。随后使用1x PBS选择性清洗第二通道并使用培养基替换。为测定藻酸盐凝胶的机械性能，制备0.25％、0.5％、1.0％和2.0％藻酸盐凝胶并在37℃下通过流变学测量其频率依赖的剪切模量(Ares G2TA仪器公司(TA instruments)，特拉华

州纽卡斯尔)。

[0082] 窦状腺血管接触建模(3D)

[0083] 使用上文所述50μg/mL纤连蛋白(细胞骨架公司,科罗拉多州丹佛市)和10％BSA(罗氏公司,加利福尼亚州南旧金山)选择性包被微流体装置,并转移至37摄氏度、5％CO_2孵育器中。将EBM培养基中10,000,000HUVEC/mL(隆萨公司(Lonza),瑞士巴塞尔)的以12.5uL/小时接种于纤连蛋白包被的通道上并允许其在3小时的时间内粘附于该表面上。使用无细胞EBM培养基替代入口样品并通过通道灌注直至HUVEC实现融合(2-8天)。使用5μM CellTracker Red和1μg/mL Hoescht33342(英杰公司(Invitrogen),加利福尼亚州卡尔斯巴德)对细胞染色45分钟,在新鲜培养基中清洗或在4％甲醛中固定并通过共聚焦荧光显微镜观察。

[0084] 血管剪切速率建模(3D)

[0085] 使用微流体装置内的流体动力学计算机模型预测施加于MK上的剪切应力。使用有限元方法软件(COMSOL)来求解纳维-斯托克斯(Navier-Stokes)方程。不可压缩流体的稳态纳维-斯托克斯流体方程是:

[0086] $$\rho\left(\vec{v}\cdot\vec{\nabla}\vec{v}\right)=-\vec{\nabla}p+\mu\vec{\nabla}^2\vec{v}+f \qquad (1)$$

[0087] 其中ρ是流体密度,$\vec{v}$是流动速度,p是压力,μ是流体粘度且是f作用于流体上的体力。在复制微流体装置的精确维度的三维计算机域中对方程(1)求解。假定该装置中的流体具有水的粘度和密度(分别为0.001Pa s和1000kg/m3)。在通道壁处假定没有滑动边界条件。输注流动速率的范围是12.5-200μL/小时。使用三角网格(其在狭缝处更精细)来使域离散化。该模型含有315,317自由度。在251,101和415,309自由度之间发现网格独立性,如同剪切速率之间获得小于10％的差异所确认的那样。使用UMFPACK线性系统解算器获得稳态解。

[0088] 原代小鼠巨核细胞培养物

[0089] 小鼠FLC收集自WT CD1小鼠(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories),马萨诸塞州威尔明顿)并培养MK。

[0090] 电子显微分析

[0091] 使用含1.25％多聚甲醛、0.03％苦味酸、2.5％戊二醛的0.1-M二甲砷酸盐缓冲液(pH 7.4)对巨核细胞输入物和生物反应器流出物固定1小时,使用1％四氧化锇进行后固定,通过一系列醇进行脱水,使用环氧丙烷浸透,并包埋在环氧树脂中。对超薄切片染色并以80kV的加速电压使用Tecnai G2Spirit BioTwin电子显微镜(俄勒冈州希尔巴罗)检查。使用先进显微镜技术(AMT)2-K带电偶联装置显微镜记录图像,其中使用AMT数字获取和分析软件(先进显微镜技术公司(Advanced Microscopy Techniques),马萨诸塞州丹弗斯市)。

[0092] 免疫荧光显微分析

[0093] 纯化并探测巨核细胞、释放的proPLT或生物反应器流出物。将样品与5μM CellTracker Green(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)孵育45分钟,在新鲜培养基中清洗并通过活细胞荧光显微镜观察,或者在4％甲醛中固定并离心至聚-L-赖氨酸(1μg/mL)包被的玻片上。对于细胞骨架组分的分析,对样品使用0.5％曲通-X-100通透化,并在免疫荧光封闭缓冲液(含0.5g BSA、0.25ml 10％叠氮化钠、5ml FCS的50ml 1×PBS)中封闭过夜,

之后进行抗体标记(55)。为描绘微管细胞骨架,将样品与针对小鼠或人β1-微管蛋白的兔多克隆一抗孵育。为描绘肌动蛋白细胞骨架,将样品与Alexa 568鬼笔环肽(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)孵育。使用1μg/mL Hoescht 33342(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)标记细胞核。为校正背景荧光和非特异性抗体标记,将载玻片与二抗单独孵育,并相应调节所有图像。使用配备10x(数值孔径,0.30)Plan-Neofluar空气和63x(数值孔径,1.4)Plan-ApoChromat油浸物镜的Zeiss Axiovert 200(卡尔蔡司公司(Carl Zeiss),纽约州索恩伍德)检查样品,并使用CCD照相机(滨松光子学公司(Hamamatsu Photonics),马萨诸塞州波士顿)获取图像。使用Metamorph 7.7.2.0版图像分析软件(分子装置公司(Molecular Devices),美国加利福尼亚州日照谷)和ImageJ 1.47p版软件(NIH,http://rsb.info.nih.gov.ezp-prod1.hul.harvard.edu/ij/)分析图像。

[0094] 细胞尺寸和多态性测定

[0095] 对细胞单个地使用阈值进行选择并使用研究者编码的软件(列于下文)在ImageJ中进行高含量胞质面积和周长测量。通过手动观察所有样品来确认分析,并将未正确选择的细胞剔除出分析。从面积测量中计算MK直径以计算非圆形细胞。对各条件计数超过2000个细胞,并对至少三个独立样品进行MK面积和流出物组分的分析。使用成对样品的双尾斯氏t检验建立统计学显著性。误差线代表平均值的标准差。

[0096] 活细胞显微分析

[0097] 对于剪切培养物,将MK加载至'裸'微流体装置(仅BSA包被)上,并在2小时时间内使输注速率逐步倍增,从12.5μL/小时至200μL/小时。对于静态培养物,将分离的MK抽吸至腔体中并培养24小时,该腔体通过将3%BSA包被的玻璃玻片安装在具有1cm孔的10mm培养皿上来形成。将静态和剪切培养物都在37摄氏度和5%CO2下维持并使用配备10x(数值孔径,0.30)Plan-Neofluar空气物镜的Zeiss Axiovert 200(卡尔蔡司公司,纽约州索恩伍德)检查。以2秒(剪切培养物)或20分钟(静态培养物)间隔使用CCD照相机(滨松光子学公司,马萨诸塞州波士顿)获取微分干涉相衬(DIC)图像。使用Metamorph 7.7.2.0版图像分析软件(分子装置公司,美国加利福尼亚州日照谷)和ImageJ软件1.47p版分析图像。对来自至少三个独立样品的超过200个MK手动测定proPLT延伸速率。对于PLT铺展实验,2小时后从微流体装置中收集流出物并抽吸入未包被的静态培养物腔体中,如上文所述。通过重力沉降允许PLT接触玻璃并在5分钟时间内以5秒间隔捕获铺展。

[0098] GFP-β1微管蛋白逆转录转染

[0099] 将Dendra2融合的β1微管蛋白克隆至pMSCV质粒。将HEK 293细胞包装细胞在附加有10%胎牛血清(FBS)的DMEM中培养至30-50%融合。使用pMSCV载体中编码与Dendra2融合的β1微管蛋白、gag/pol和2μg vsvG的DNA质粒进行HEK 293细胞的转染。第二天更换培养基后,将细胞孵育72小时以进行病毒生产。通过0.22μm滤器(密理博公司,马萨诸塞州比尔里卡)过滤上清液并将等分试样储存于-80摄氏度。在培养的第二天,从上文所述胎肝培养物中分离的MK重悬于含有10%FBS、8μg/mL聚凝胺(西格玛公司)和逆转录上清液的DMEM中。将样品转移至6孔板,25摄氏度下800xg离心90分钟并随后在37摄氏度下孵育90分钟。孵育后,通过离心并重悬于含有10%FBS和TPO的新鲜DMEM中来清洗MK。允许MK成熟直至培养的第4天,随后通过BSA梯度分离,如前文所述。

[0100] 流式细胞术

[0101] 从静态MK培养物或生物反应器流出物的释放的proPLT组分中收集血小板并在静止状态下检查。使用针对CD42a或CD41/61的FITC偶联的抗体(安福莱特分析公司(Emfret Analytics),德国艾贝尔斯塔特)探测样品并在FACSCalibur流式细胞仪(BD公司)上运行。当PLT通过检测器时通过其特有的正向和侧向散射来进行门选,并在扣除FITC偶联的IgG抗体特异性对照(安福莱特分析公司)后计算其总荧光强度。通过将流出物收集期间的净GP IX+PLT生产除以净GP IX+MK消耗来测定PLT产率,并对至少三个独立样品进行。结果与GP IIbIIIa+细胞相同。

[0102] 图像分析

[0103] 使用ImageJ和Adobe Photoshop CS3(Adobe系统公司(Adobe Systems),加利福尼亚州圣何塞)分析Metamorph中获取的数字图像。分界线明确地区分单独的不同图像,或相同图像的单独区域。没有对图像内的特定特征进行增强、遮蔽、移动、移除或导入,且对亮度、对比度和色平衡的调节线性地应用于整个图像。

[0104] 人BM的微流体装置模型生理特性

[0105] 为重现生理条件,分别使用纤维蛋白原和纤连蛋白选择性包被各通道以再生血管微环境和BM的ECM组成(如图2A所示)。通过跨微流体装置流动,沿第一通道输注的原代MK在各柱之间被依次捕获并将proPLT延伸至第二通道(如图2B所示),再现了生理proPLT延伸。为对3D ECM组织和生理BM刚性(250Pa)进行建模,在微流体装置中聚合的1%藻酸盐溶液中输注MK,将MK选择性包埋在第一通道内的藻酸盐凝胶中并保留第二通道中的血管流。藻酸盐不抑制proPLT生产,并可控制MK与第二通道的距离。

[0106] 沿第二通道选择性接种人脐静脉内皮细胞(HUVEC),并生长至融合以生产功能性血管(如图2C所示)。此外,通过10x-150x放大、高分辨率活细胞显微镜监测MK行为,并从流出物中收集释放的PLT。图2D显示完整的系统,显示运行。表征层状流体剪切速率(如图2E所示),并使用两个微流体泵严格控制(一个用于第一通道且一个用于第二通道)。装置内的剪切速率与输注速率呈线性正比例并经调节以跨生理范围(500-2500s^{-1})。虽然空微通道连接部处的剪切速率随着与第一通道的距离而增加(如图2F所示),但在MK捕获后,流体被重定向至下一个可用的间隙从而使MK在这些位点处持续经历生理(760至780s^{-1})剪切速率(如图2G所示)。

[0107] 血管剪切触发proPLT生产、生理延伸和释放

[0108] 体内BM MK以血液流动的方向延伸proPLT并将PLT、proPLT、大的细胞质片段(prePLT)和甚至整个MK释放至窦状腺血管中,其可在肺微血管床中捕获,或在循环中成熟。为测定生理剪切对PLT生产的影响,在培养第4天分离小鼠胎肝培养物来源(mFLC)的MK并在输注入微流体装置前通过尺寸和多倍性表征(如图3A所示)。

[0109] 体外生产可输注PLT的主要挑战之一是鉴定触发proPLT生产的因子。在静态条件下,MK在分离后约6小时开始生产proPLT,并在18小时时达到最大proPLT生产(如图3B所示)。相比之下,生理剪切下(如图3C所示,约500s^{-1})的MK在捕获的数秒内开始生产proPLT,在培养的最初2个小时内达到最大proPLT生产和生物芯片饱和。生理剪切下的MK生成较少、较长的proPLT,其相对于静态培养物的高度支化程度较低。剪切培养中的proPLT均匀地延伸至下通道内并以相对血管通道壁流动的方向排列,再现了生理proPLT生产。生理剪切下生产proPLT的MK百分比是静态培养物的两倍,其比例为约90%(如图3D所示)。

[0110] 生成用于输注的临床数目的PLT的另一个主要挑战是体外培养以显著低于体内的速率延伸proPLT。在我们的微流体装置中应用生理剪切将proPLT延伸提高至高于静态培养物对照一个数量级(至大约30μm/分钟,如图3E所示),其符合活小鼠中活体显微研究的proPLT延伸速率生理预测并支持增加的体外proPLT生产。

[0111] 在人和小鼠中的早期组织学研究预测可挤压全MK以及MK片段通过BM血管内血管内皮中的间隙或穿孔以在肺循环床(pulmonary circulatory bed)中捕获。最近在血液中发现了称为prePLT的大PLT中间体,并且将mBM和FLC来源的MK和prePLT静脉输注至小鼠中在体内生成了PLT。在目前的研究中,常规地观察到100μm+直径MK挤压通过3μm(如图4A所示)和1.5μm间隙,或延伸大MK片段(如图4B所示),支持血管PLT生产的模型。此外,切断事件(abscission event)通常由高分辨率活细胞显微镜捕获并发生在沿proPLT轴的可变位置处,释放prePLT大小的中间体(3-10μm直径)和PLT(1.5-3μm直径)(如图4C和图4D所示)。每次切断后,所得proPLT末端在尖端形成新的PLT大小的膨胀,其随后被延伸和释放,重复该循环(如图4E所示)。

[0112] 当剪切速率保持恒定时,proPLT延伸速率在沿轴的不同位置处变化,预测存在一种受调控的细胞骨架驱动的proPLT延长机制(如图4C所示)。在生理范围内提高微流体剪切速率不影响培养物中proPLT延伸速率中值或proPLT延伸速率的分布(如图4F所示),且经逆转录病毒转染以表达GFP-β1的MK中的proPLT凸出由外周微管(MT)组成,该外周微管在PLT尺寸的末端处形成螺旋(如图4G所示)。proPLT达到超过5mm的长度并在体外耐受最高1000s^{-1}的剪切力;其从活体显微观察中重现了proPLT生产的生理示例,并显示剪切未导致切断事件。为确认剪切诱导的proPLT延伸是细胞骨架驱动的,在微流体装置中进行输注之前,将MK与5μM Jasplankinolide(Jas,肌动蛋白稳定剂)或1mM赤式-9-(3-[2-羟基壬基](EHNA,胞质动力蛋白抑制剂)孵育。在静态和生理剪切条件下,Jas和EHNA都抑制剪切诱导的proPLT生产(如图4H和图4I所示)和PLT释放。

[0113] 衍生的PLT表现血液PLT的结构和功能性质

[0114] PLT是直径为约1-3μm的无核盘状细胞,其在表面上表达生物标记物GP IX和IIbIIIa,并且以环绕基于肌动蛋白的细胞骨架网络的6-8个MT的皮质MT螺旋为特征。为确定PLT产率,培养第四天在我们的微流体装置中进行输注之前紧接通过流式细胞术测量糖蛋白(GP)IX+mFLC-MK的相对浓度和正向/侧向散射和生物标记物表达(如图5A所示)。在输注后2小时收集流出物并与mFLC-MK输入物比较(如图5B所示)。输入的MK和流出的PLT都在其表面上表达GP IX和IIbIIIa,并显示特征性正向/侧向散射。在相对于培养第五天分离的静态培养物上清液,剪切的应用使得流出物的细胞组成朝向更多PLT尺寸的GPIX+细胞变化(如图5C所示)。85±1%的MK在2小时内转化为PLT,其符合我们的proPLT生产百分比的定量(图3D)并与静态培养物相比显著改进(图5D)。在我们的微流体装置中在2小时内持续输注约500s^{-1}剪切生成了约21个PLT/MK并形成超过现有培养方法的PLT生产速率,现有培养方法在长得多的时间(6-8天)内生成类似的PLT数目。

[0115] 为定量我们的产品的形态组成(morphological composition),对来自我们的微流体装置的流出物探测β1微管蛋白(PLT特异性微管蛋白同种型)和Hoescht(细胞核染料),并通过免疫荧光显微镜进行分析。根据其形态和尺寸拣选细胞,并将其与静态MK培养物上清液比较。剪切的应用使得流出物的细胞组成朝向更多PLT尺寸的β1微管蛋白+Hoescht细

胞变化(如图5E所示),其符合流式细胞术数据(图5C)并形成在组成上更类似于全血中PLT中间体的分布的产物。流出物中游离细胞核的定量确认了相对于静态培养物增加的微流体装置介导的PLT生产并确定PLT产率为约20±12个PLT/MK,其符合流式细胞术数据。

[0116] 静止的PLT含有特征性的表面膜内陷(其形成开放的小管系统),闭合的残留内质网的通道网络(其形成致密的微管系统),细胞器,特化的分泌颗粒,并且在与玻璃接触激活后会变平/铺展。微流体装置生成的PLT无法通过薄片透射电子显微镜在超微结构上与小鼠血液PLT区分开;并且含有皮层MT螺旋、开放的小管系统、致密的微管系统、线粒体、α和致密颗粒(如图5F所示)。微流体装置生成的PLT和PLT中间体通过免疫荧光显微镜显示与小鼠血液PLT相比可比的MT和肌动蛋白组成(如图5G所示),并在与玻璃接触激活后正常铺展,形成丝状伪足和板状伪足。

[0117] 将微流体装置应用于人PLT生产

[0118] 为生成人PLT,使用hiPSC衍生的MK代替我们的微流体装置中的mFLC-MK,其提供了实际上用于输注的无限制MK来源。hiPSC-MK在培养第15天分离,前提是其达到20-60μm的最大直径(如图6A所示),并且在超微结构上类似于原代人MK(如图6B所示)。在静态培养物下,hiPSC-MK在分离后约6小时开始生产proPLT,并在18小时时达到最大proPLT生产(如图6C所示)。相比之下,生理剪切下(约500s^{-1})的hiPSC-MK在捕获后立即开始生产proPLT,并在培养的最初2个小时内延伸/释放proPLT(如图6D所示)。剪切下的生产proPLT的hiPSC-MK的百分比增加至约90%,显著超过静态培养物(约10%)(如图6E所示)。

[0119] proPLT延伸速率略低于mFLC-MK对照(约19μm/分钟对比30μm/分钟)(如图6F所示)且更接近生理对照。微流体装置生成的PLT显示正向和侧向散射,和人血液PLT的表面生物标记物表达特征,其无法通过薄片透射电子显微镜在超微结构上与人血液PLT区分开(如图6G所示),通过免疫荧光显微镜显示与人血液PLT相比可比的MT和肌动蛋白表达(如图6H所示),在与玻璃接触激活后正常铺展,并形成丝状伪足和板状伪足(如图6I所示)。总之,这些结果显示可将hiPSC-MK应用于我们的仿生微流体装置以生成潜在无限数目的功能性人PLT。

[0120] 将微流体装置应用于药物开发

[0121] 血小板减少症会突然并通常无意间发生,潜在地导致大量出血和死亡。已证明抗体和细胞介导的免疫应答导致血小板减少症。此外,血小板减少症可由多种药物触发,包括癌症药物,例如达沙替尼。动物模型通常是人中药物安全性和功效的较差预测物,而临床研究是耗时、昂贵且潜在有害的。设计为模拟人BM的微流体装置代表了具有重大临床重要性的创新领域,提供有效和实际的平台来研究多种药物对于BM和MK生物学的影响。

[0122] 通常通过使用流式细胞术的输注研究来测量PLT存活率和清除率。然而,proPLT生产的速率和程度的定量不适用于该方法,且需要直接观察以确定血小板生成在哪个阶段受到影响。相反地,微流体装置的应用提供了以研究药物对PLT生产的影响的重要平台,这会促进鉴定PLT生产的新调控因子并阐明临床上重要的药物诱导的血小板减少症的机制。

[0123] 作为概念验证,使用了高含量活细胞显微镜来鉴定曲妥珠单抗安木坦兴(trastuzumab emtansine,T-DM1)表达GFP·P1微管蛋白(活细胞显微)影响PLT生产的机制,该T-DM1是一种目前用于乳腺癌的临床研发中的抗体药物偶联物。这些研究表明T-DM1通过诱导异常的微管蛋白组织来抑制MK分化并破坏proPLT形成(如图7所示)。确定治疗剂

(如T-DM1)影响MK成熟和proPLT生产的通路可产生体内调控PLT生产和控制药物诱导的血小板减少症的策略。

[0124] 本发明的方法利用一种全新的微流体设计来离体再现人BM和血管生理学,并生成用于输注的功能性人PLT的替代性来源。虽然临床上想要满足日益增长的输注需要并规避目前与血小板获取和储存相关的风险,但用于治疗应用的供体非依赖性PLT的研发过程中一直存在两个主要的数量障碍:(1)生成足够数目(约$3x10^8$)的人MK以支持一个PLT输注单元(约$3x10^{11}$个PLT)的生产,以及(2)每个MK生成生理数目的功能性人PLT(约10^3-10^4)。人胚胎干细胞培养物(hESC)和更近期的人诱导多潜能干细胞培养物(hiPSC)的开发提供了潜在无限的祖细胞来源,其可在体外分化为人MK以解决第一个数量障碍。实际上,由于PLT是无核的,可在输注前辐照PLT微流体装置来源的单元,解决了来源于hESC或hiPSC的细胞产品可能是致癌或致畸形的问题。

[0125] 研究PLT生产的环境驱动因子的尝试受到简化论者方法的限制,且2D液体培养物的主要限制是其无法形成3D BM组成和硬度、proPLT延伸的定向和静脉内皮的接近度(proximity)。同样地,虽然进入窦状腺血管的生产proPLT的MK经历500至2500s^{-1}的壁剪切速率,通过在ECM包被的载玻片上输注MK来塑造血管流的尝试选择了固定/粘合的MK,并且无法区分ECM接触激活与剪切。或者,在孵育摇床中向心搅动释放的proPLT,其不再现BM血管中的层状剪切流,不提供血管剪切速率的精确控制,且不适用于高分辨率活细胞显微观察。然而,虽然存在这些限制,但将MK暴露于高剪切速率(1800s^{-1})加速了proPLT生产,并且与在约0.5Pa流体剪切压力下维持2小时的proPLT相比,不存在剪切的情况下培养的proPLT释放更少的PLT。此外,多光子活体显微技术的最新进展提供了提高的体内proPLT生产分辨率并确认血管流对于proPLT延伸和PLT释放的重要性。虽然这些研究提供了体内proPLT生产的生理学上精确的示例,但微环境的受限的控制和较差的分辨率阻止了BM微环境如何帮助PLT释放的进一步研究。

[0126] 证明细胞-细胞接触、胞外基质(ECM)组成和硬度、血管剪切速率、pO2/pH、可溶性因子相互作用和温度有助于proPLT形成和PLT释放的越来越多的证据表明,在3D微流体培养形态内再生BM和血管微环境是实现临床上重要的功能性人PLT数目所必需的。实际上,已在连续流体流下应用模块化3D编织聚酯网格以在培养物中从$1x10^6$个$CD34^+$人脐带血细胞中生成最多$6x10^6$个PLT/天。虽然表明可以获得临床上有用的培养物来源的人PLT数目,但那些3D灌注生物反应器没有精确地再生BM微环境的流体特性和复合物结构,且其闭合的模块化设计无法直接观察proPLT生产,难以提供对PLT释放机制的理解。或者,已提出使用3D PDMS生物芯片相邻的ECM包被的基于丝的导管来再生BM窦状腺并在体外研究MK分化和PLT生产。虽然能够在成熟期间再现了MK迁移,但该设计无法适用于高分辨率活细胞显微分析,并无法再生驱动MK分化所需的内皮细胞接触。

[0127] 相比之下,本发明的微流体装置设计提供了完整解决方案,允许PLT释放时间的显著改进和总PLT产率的增加。此外,在微流体装置内应用血管剪切速率诱导proPLT生产并再现生理proPLT延伸和释放。此外,在生理流动条件下,MK能够挤压通过小间隙以进入循环并释放prePLT中间体。在本发明的微流体装置中持续输注MK生成的产物达到了生理PLT浓度并表现血液PLT的结构和功能性质。最后,PLT微流体装置可应用于人MK培养物以生产功能性人PLT。虽然每个MK的PLT产率低于理论预测值,但MK培养物将大MK片段(prePLT、proPLT)

以及MK自身常规性释放至流出物通道内的观察表明，实际的PLT数目依赖于在支持性微环境(如肺和循环血液)中PLT中间体向PLT的进一步分化。实际上，在将mFLC来源的proPLT输注至小鼠时，其在12-24小时的时间内被迅速转化为PLT。有趣的是，虽然该研究中CMFDA标记的PLT在血液中容易检测，但prePLT中间体并非如此，表明其可能在肺的微循环中捕获。同样地，在将mFLC和BM来源的MK输注至小鼠中时，其几乎都定位至肺并在最初的两个小时内释放PLT。在这两种情况下，几乎可以确定血管剪切速率、血液中的可溶因子相互作用和内皮细胞接触调控该过程，且对这些组织中的局部微环境如何帮助末端PLT生产进行检验保证了进一步研究。

[0128] 通过在单个微流体系统中合并BM生理学的主要元素(包括3D ECM组成和硬度、细胞-细胞接触、血管剪切速率、pO2/pH、可溶性因子相互作用和温度)，本发明的方法提供了前所未见的对离体微环境的控制和用于药物开发的仿生平台。此外，高分辨率活细胞显微镜的支持允许在培养期间直接观察细胞并对较差表征的生理过程提供了窗口。最后，通过镜像复制(mirror)中央通道各侧上的流出物通道、延长装置以支持较多数目的柱并将多个单元平行定位在较大的微流体装置基质内，可容易地扩大微流体装置设计的规模。在较长的装置中持续收获hiPSC-MK可导致临床上重要的PLT数量以进行例如PLT功能的传统集合度测定，以及在免疫抑制的小鼠中进行体内异源-输注研究以测量PLT计数的增加，每次研究需要约10^8个PLT。

[0129] 总之，本发明显示了一种系统和方法以再生人BM和窦状腺血管，用于在适用于高分辨率成像的方法中生成人血小板。可使用与玻璃相连的PDMS制造仿生微流体系统，其配置为包括由一系列柱分隔的微流体通道。可以对这些通道选择性地包被ECM和人内皮细胞以刺激实际生理条件。沿一个通道输注的圆形或生产proPLT的MK可在这些柱之间被依次捕获，并将生产血小板的前血小板延伸至其他通道中。通过可控制的生理剪切速率和受控的微环境所进行的刺激，可从流出物中收集进入流体流的释放的PLT，并可通过高分辨率活细胞显微镜观察该过程。

[0130] 上文所述多种配置仅是示例而不旨在限制本发明的范围。本文所述各配置的变化形式对于本领域普通技术人员而言显而易见，这类变化形式在本发明的范围内。具体而言，可选择一个或多个上述配置的特征以建立替代性配置，其包含上文未明确描述的特征子组合。此外，可选择并合并一个或多个上述配置的特征以建立替代性配置，其包含上文未明确描述的特征组合。在通读本发明后，适用于这类组合和子组合的特征对本领域技术人员而言显而易见。本文和权利要求中所述主题旨在覆盖和包括技术中的所有适当变化。

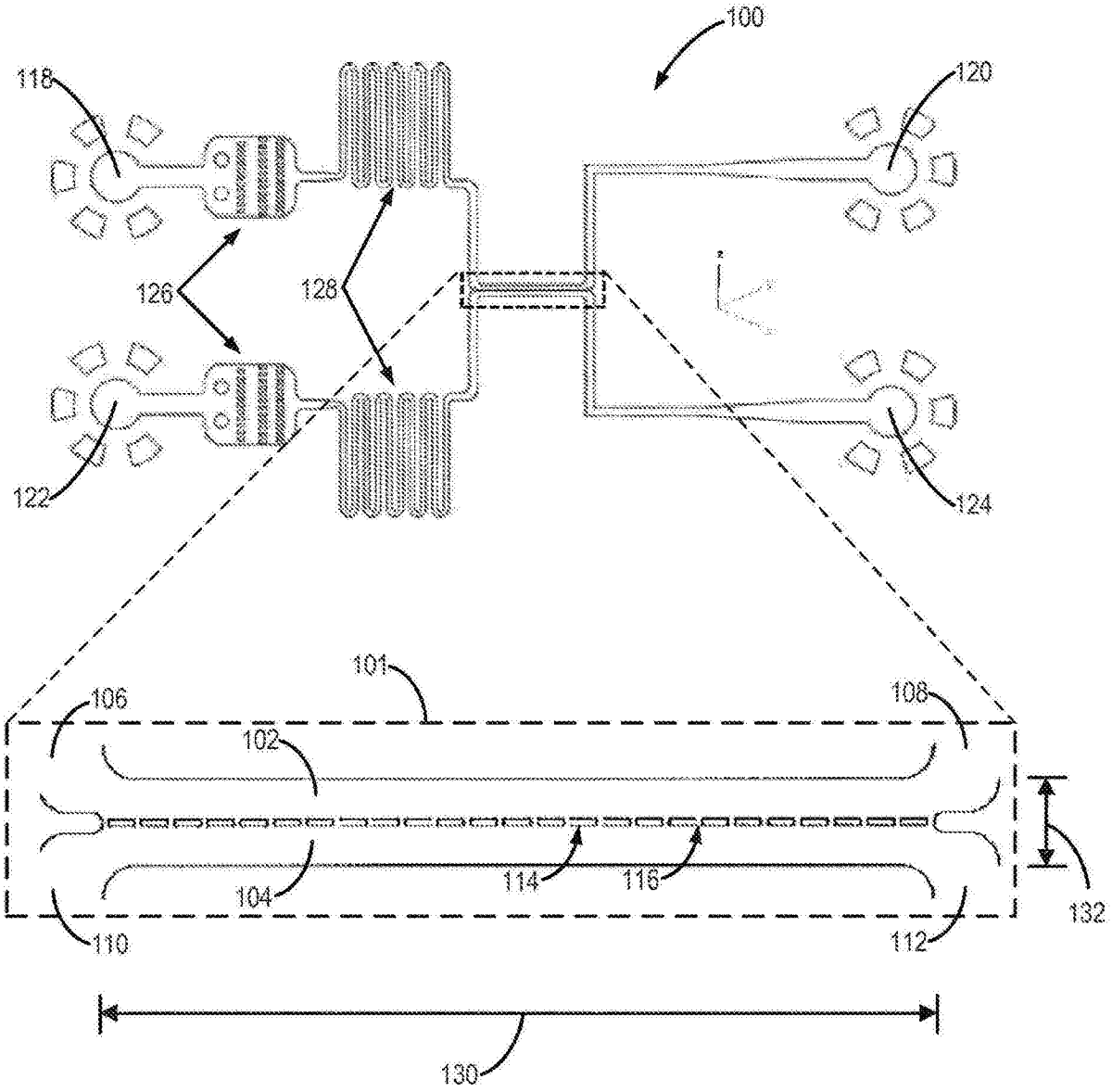

100
118
120
126
128
122
124
101
106
108
102
104
114
116
110
112
132
130

图1

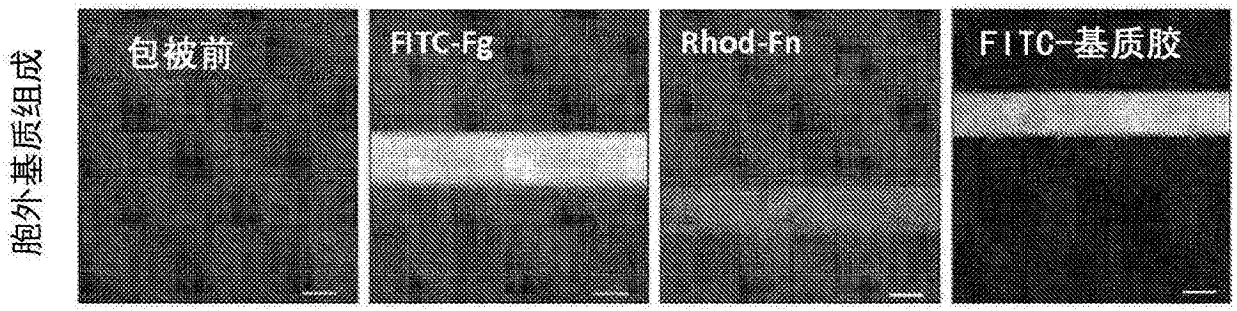

胞外基质组成
包被前
FITC-Fg
Rhod-Fn
FITC-基质胶

图2A

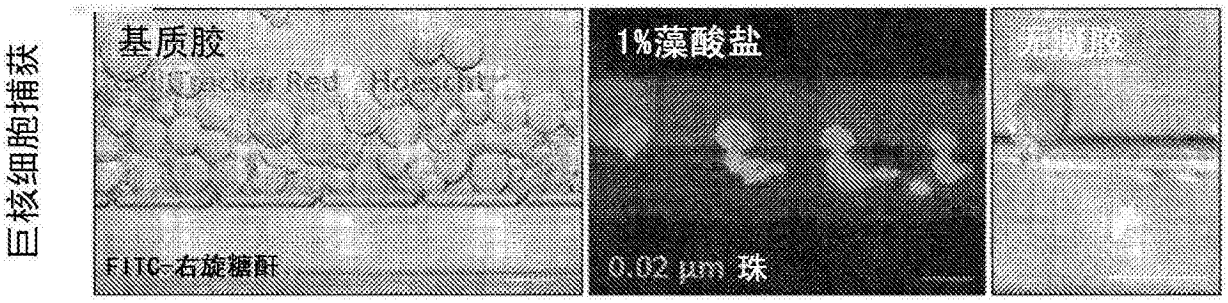

巨核细胞捕获
基质胶
1%藻酸盐
基质胶
FITC-右旋糖酐
0.02 μm 珠

图2B

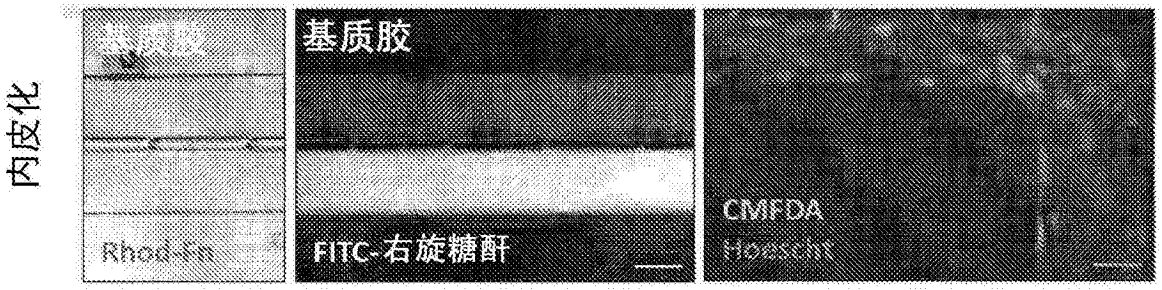

内皮化
基质胶
基质胶
FITC-右旋糖酐
CMFDA

图2C

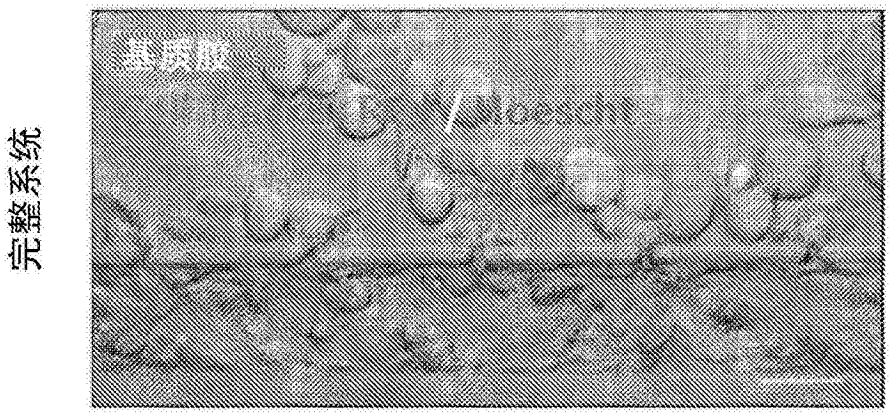

完整系统
基质胶

图2D

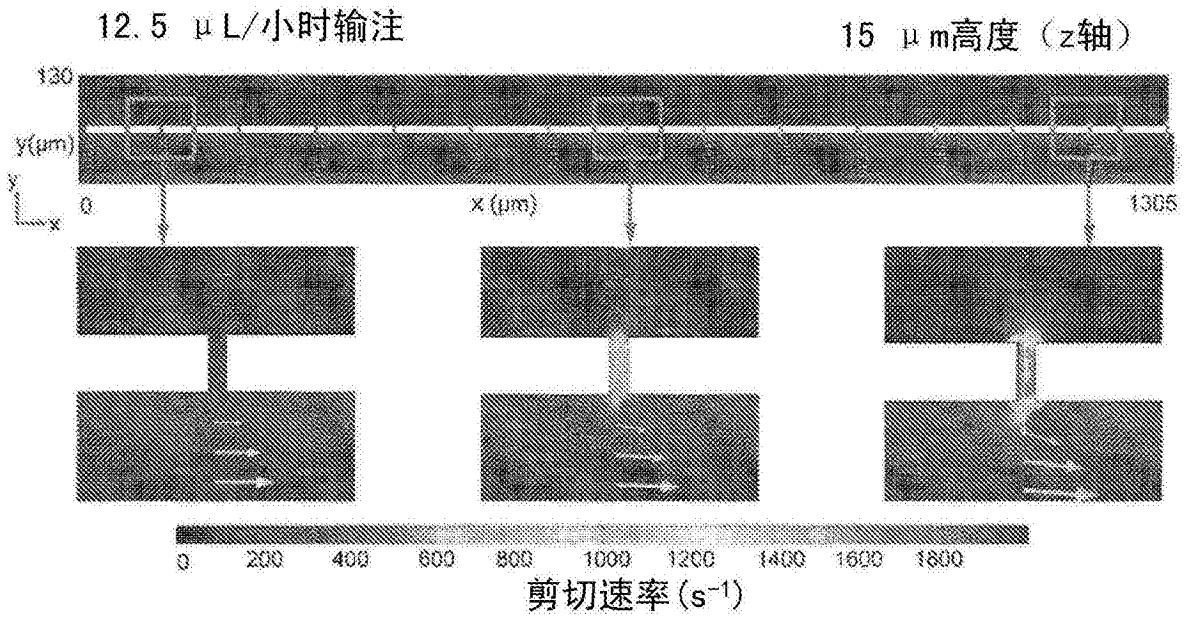

12.5 μL/小时输注
15 μm高度（z轴）
130
y(μm)
0
x(μm)
1305
0 200 400 600 800 1000 1200 1400 1600 1800
剪切速率(s-1)

图2E

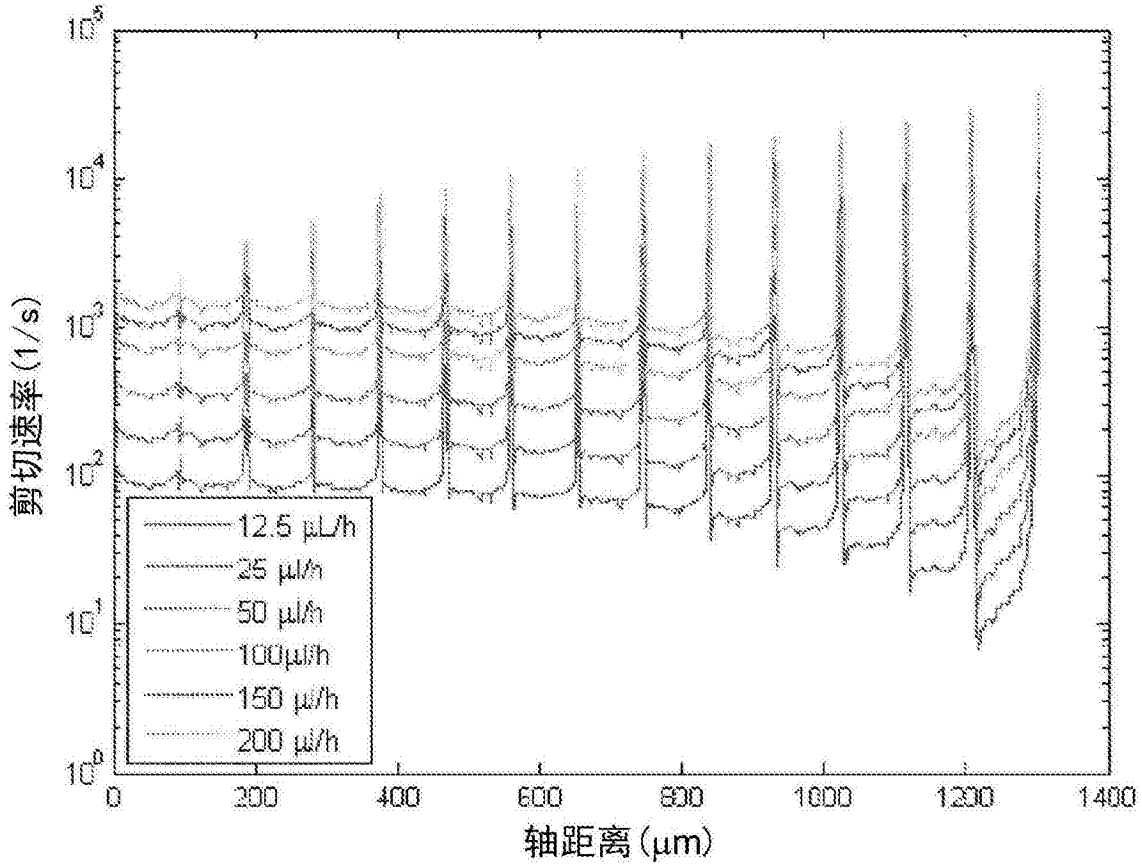

剪切速率(1/s)
轴距离(μm)
12.5 μL/h
25 μl/h
50 μl/h
100μl/h
150 μl/h
200 μl/h
0 200 400 600 800 1000 1200 1400

图2F

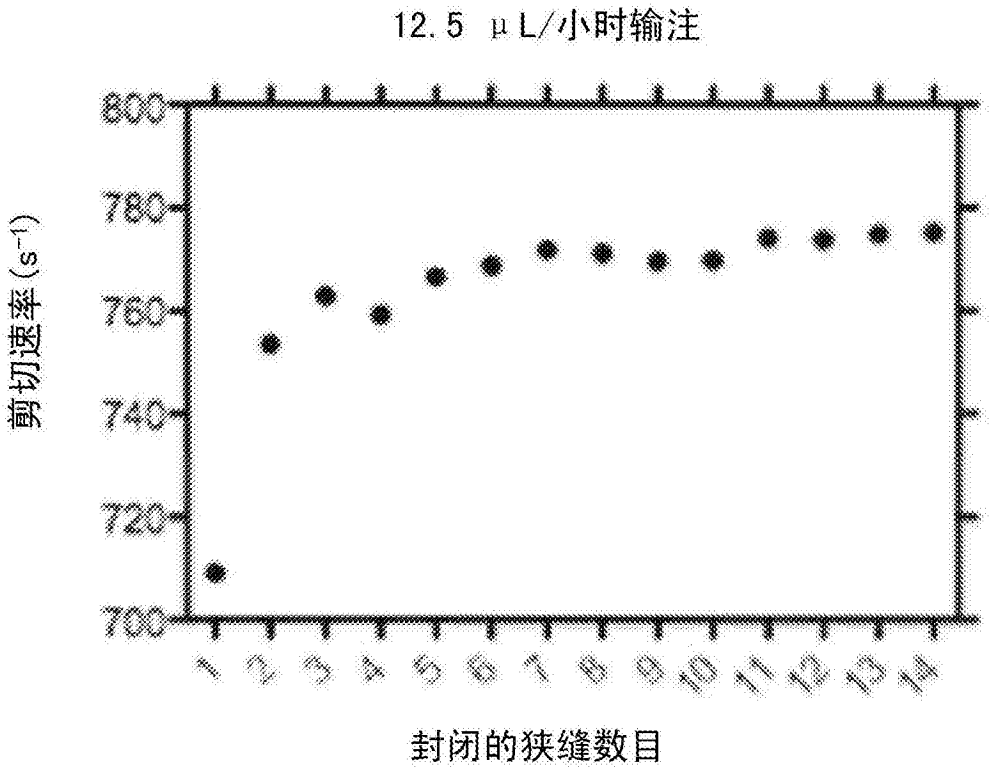

12.5 μL/小时输注
剪切速率(s^{-1})
800
780
760
740
720
700
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
封闭的狭缝数目

图2G

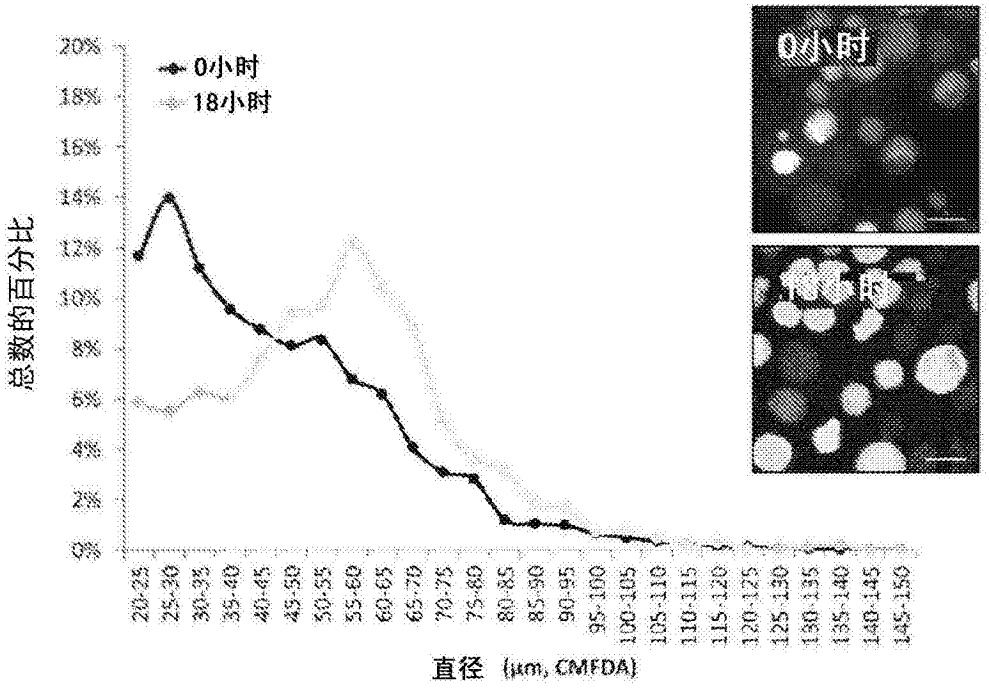

0小时
18小时
总数的百分比
20%
18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
20-25
25-30
30-35
35-40
40-45
45-50
50-55
55-60
60-65
65-70
70-75
75-80
80-85
85-90
90-95
95-100
100-105
105-110
110-115
115-120
120-125
125-130
130-135
135-140
140-145
145-150
直径 (μm, CMFDA)
0小时
18小时

图3A

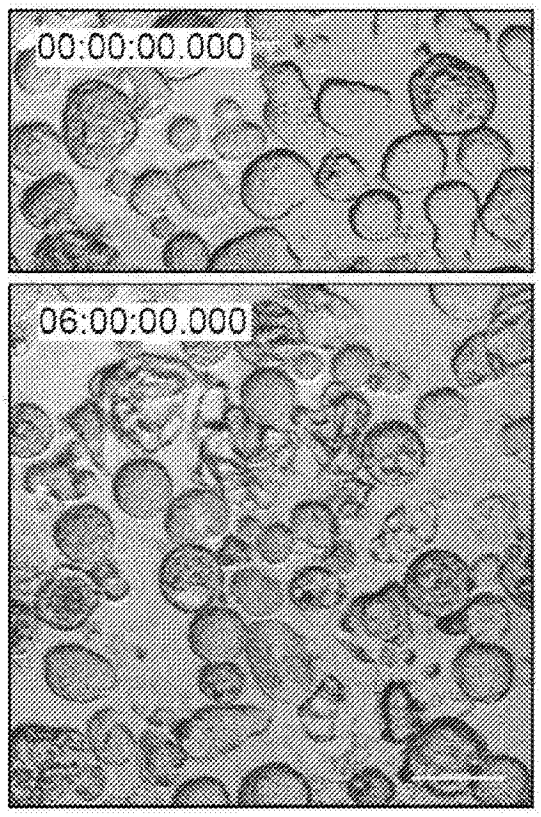


图3B

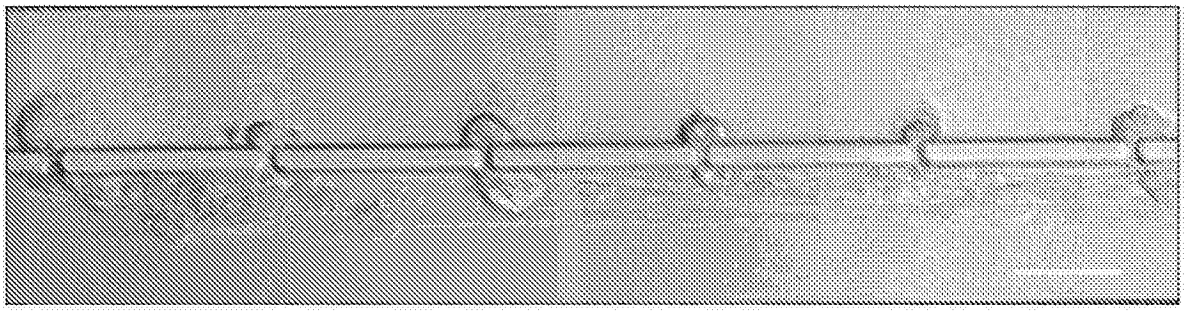


图3C

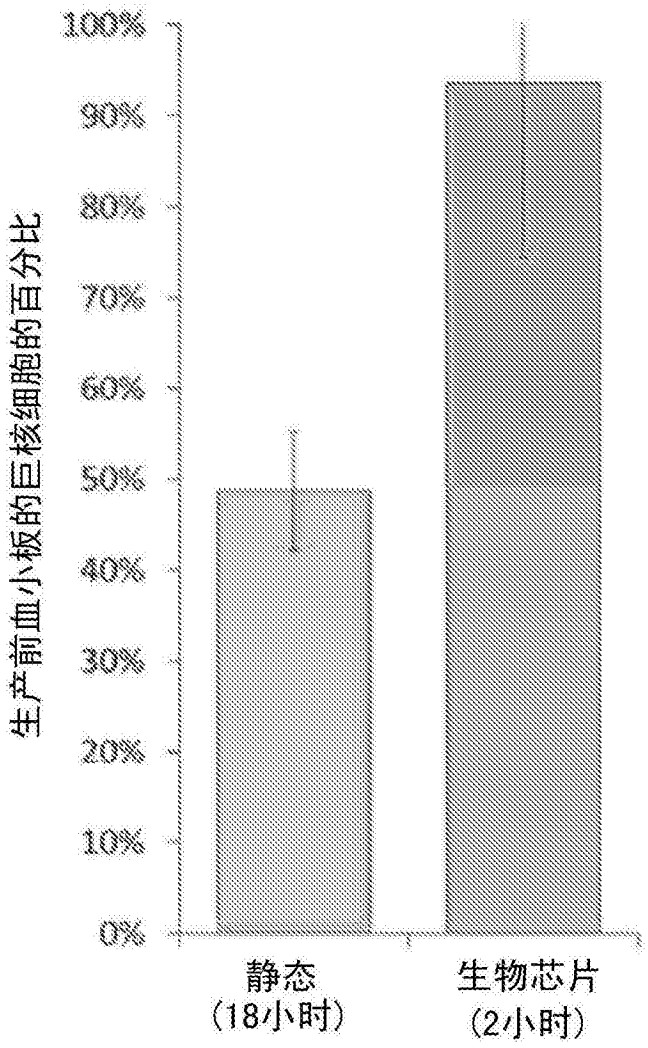

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
生产前血小板的巨核细胞的百分比
静态
(18小时)
生物芯片
(2小时)

图3D

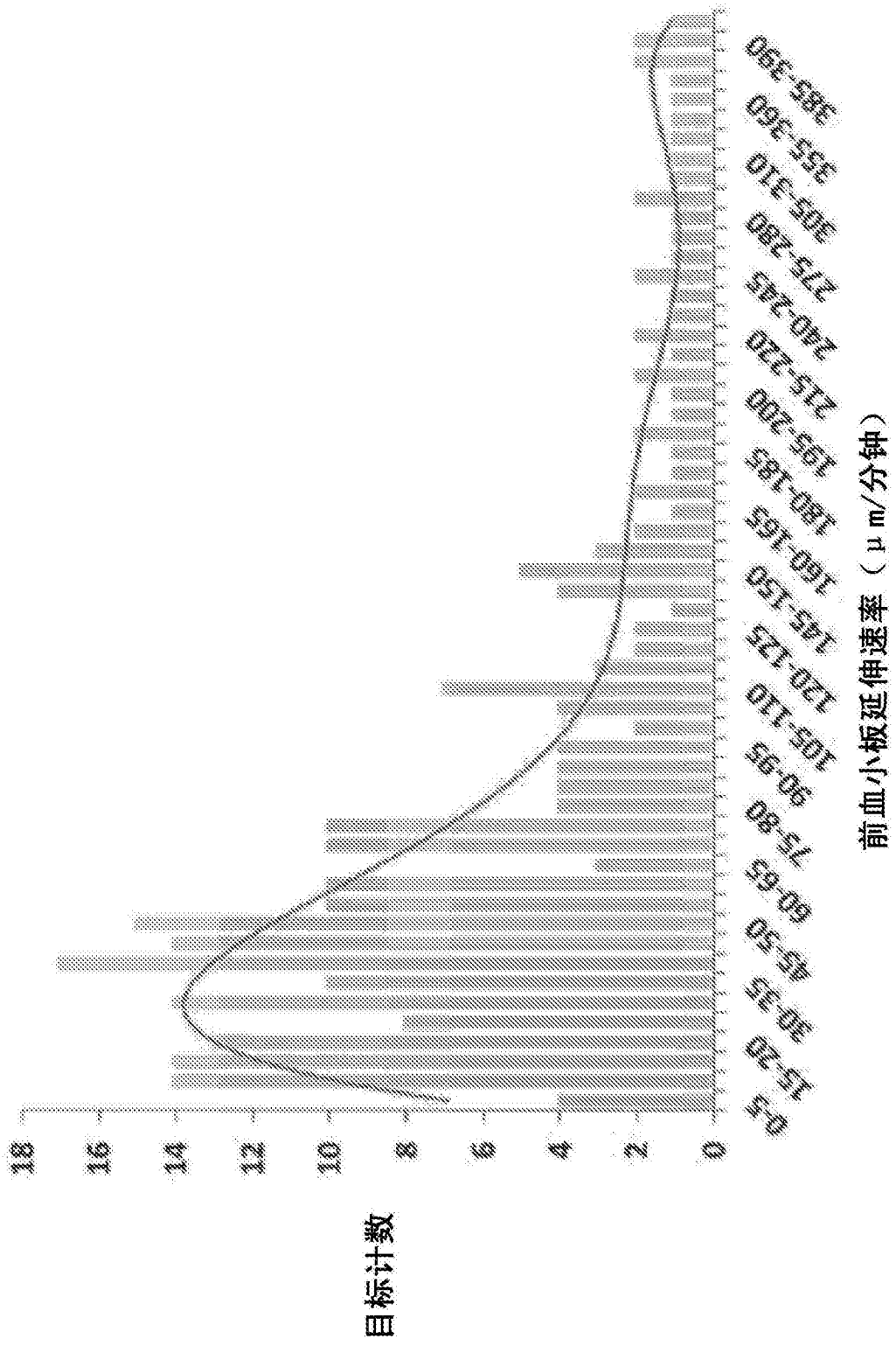

目标计数
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0-5
15-20
30-35
45-50
60-65
75-80
90-95
105-110
120-125
145-150
160-165
180-185
195-200
215-220
240-245
275-280
305-310
335-360
385-390
前血小板延伸速率（μm/分钟）

图3E

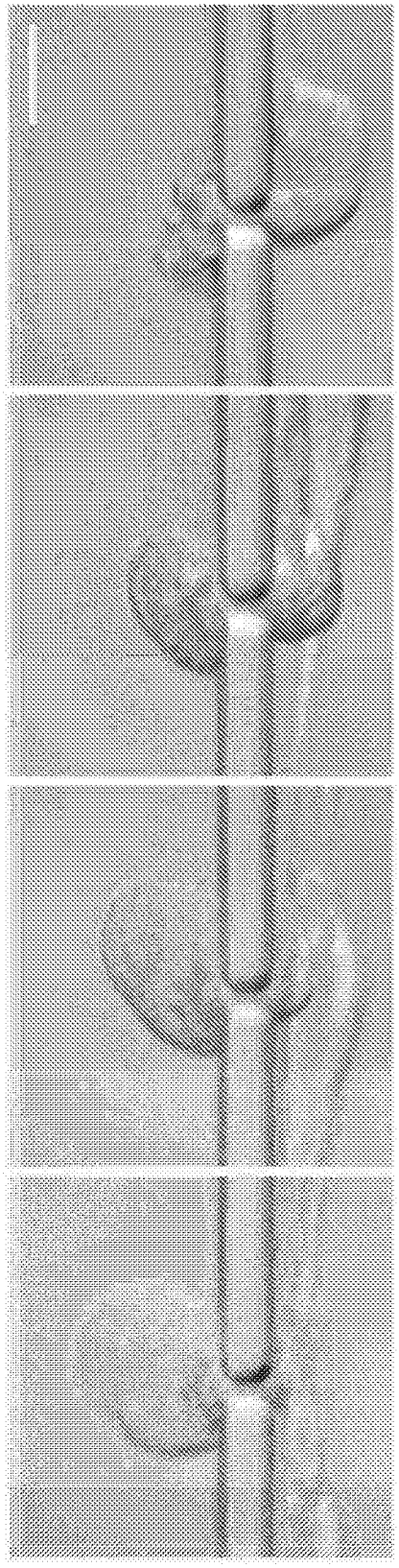


图4A

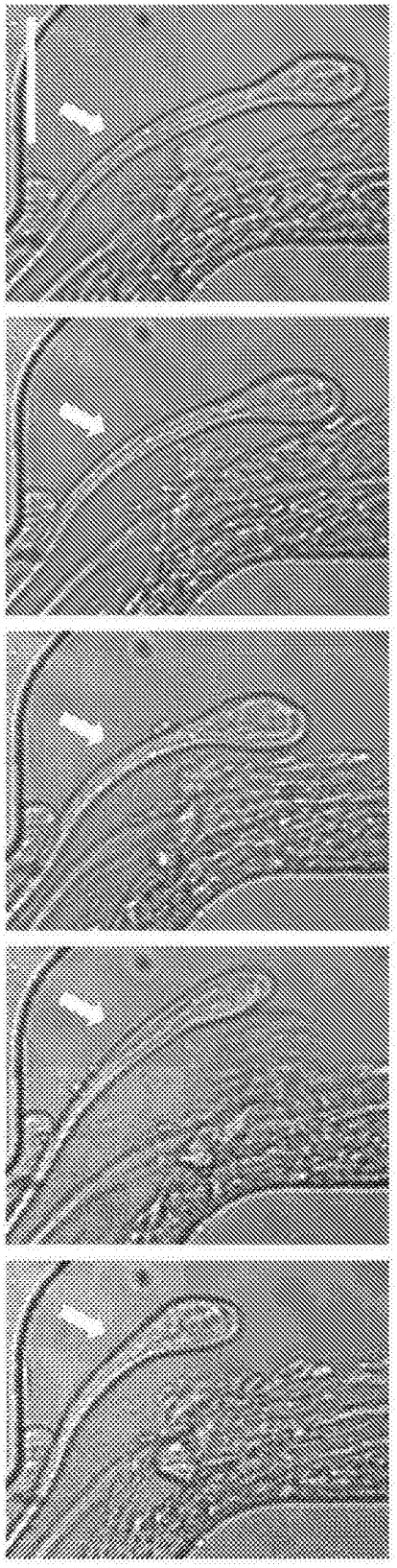


图4B

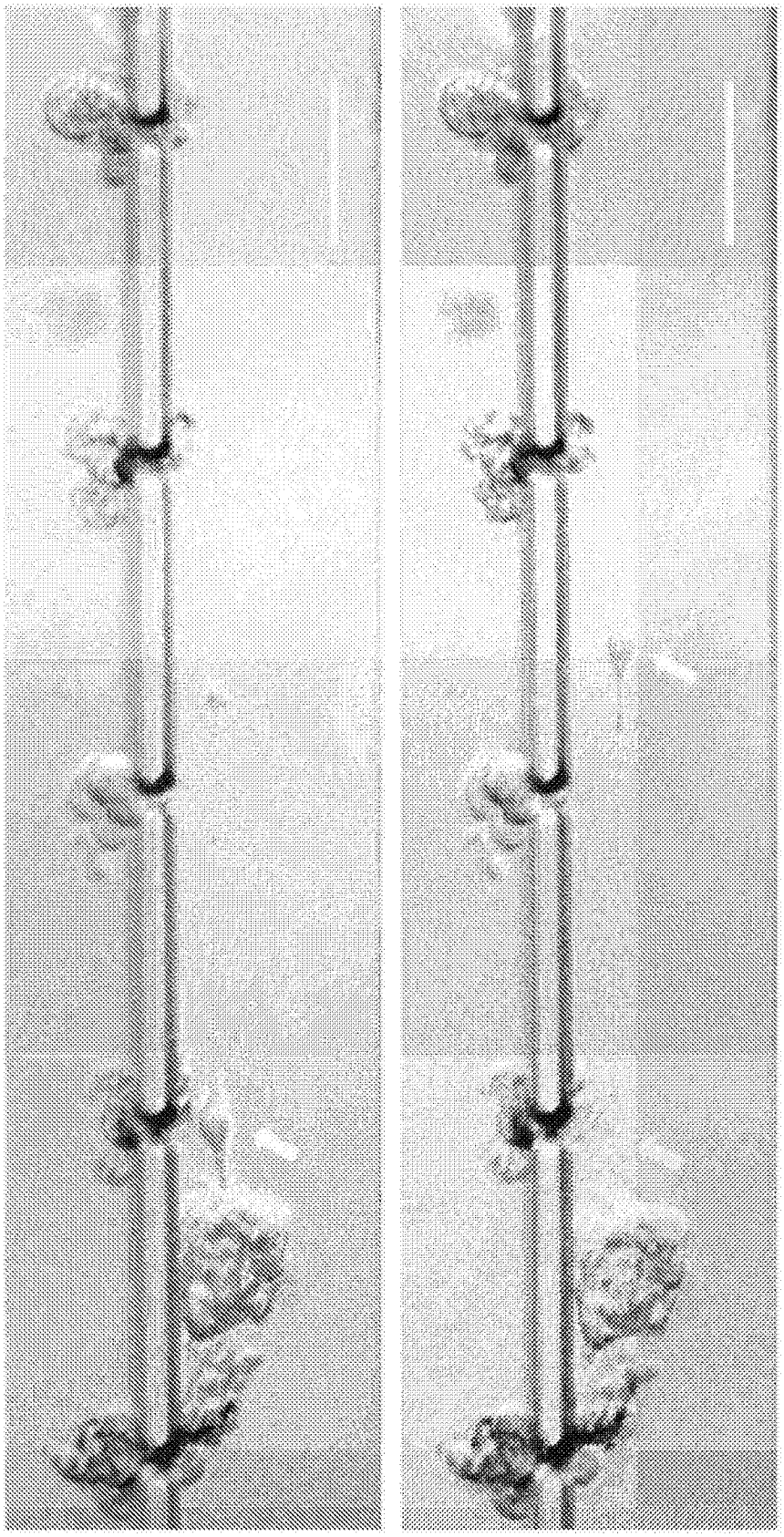


图4C

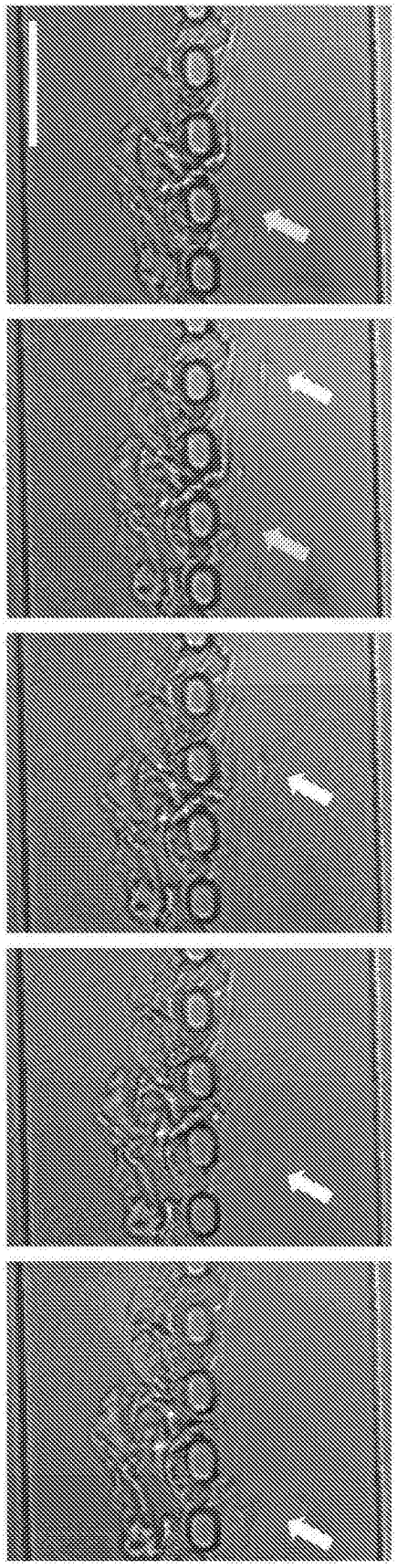


图4D

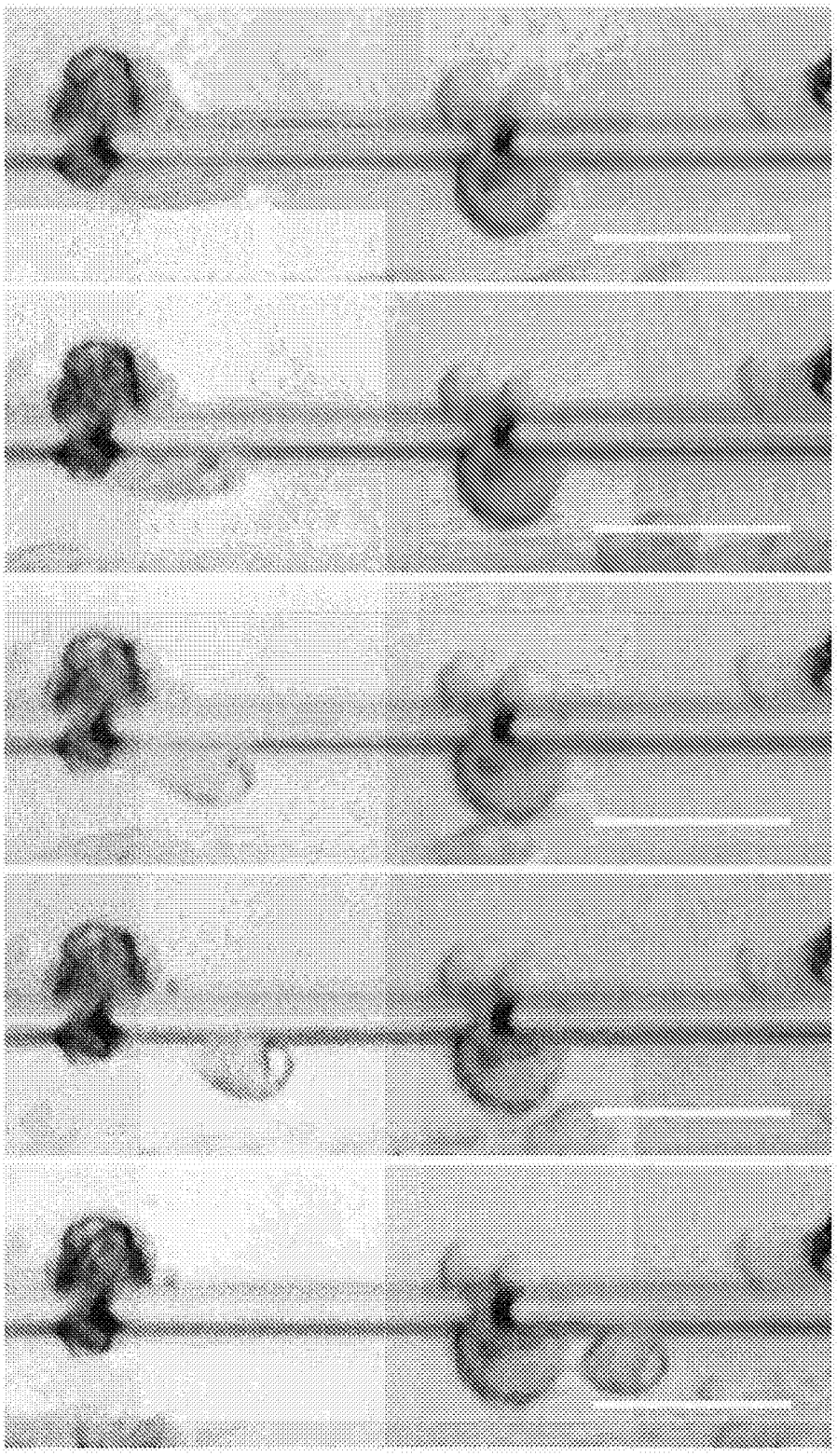


图4E

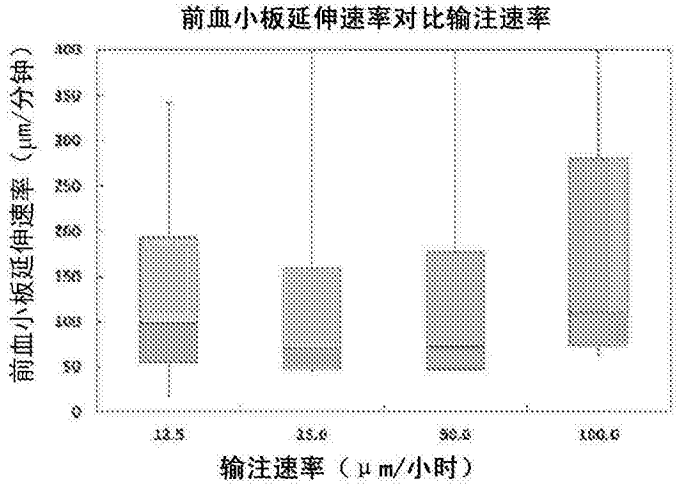

前血小板延伸速率对比输注速率
前血小板延伸速率（μm/分钟）
0
12.5
25.0
50.0
100.0
输注速率（μm/小时）

图4F

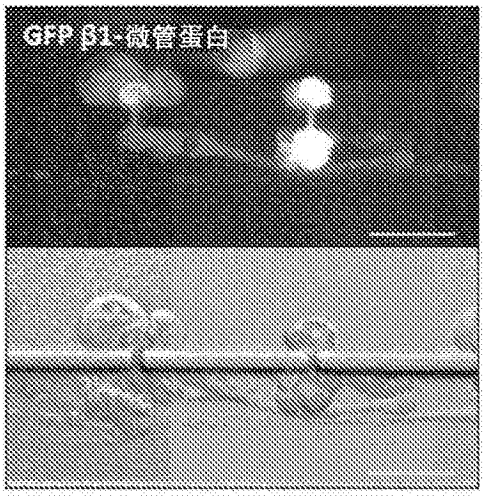

GFP β1-微管蛋白

图4G

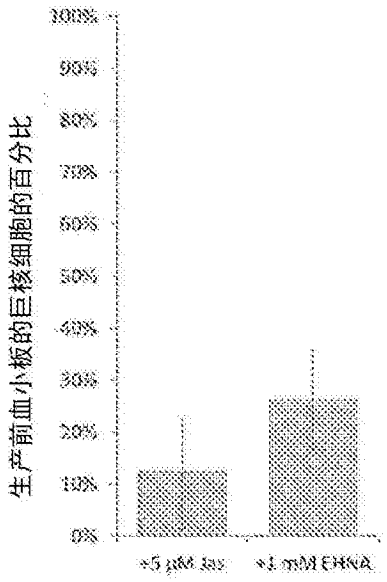

生产前血小板的巨核细胞的百分比
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
+5 μM Jas
+1 mM EHNA

图4H

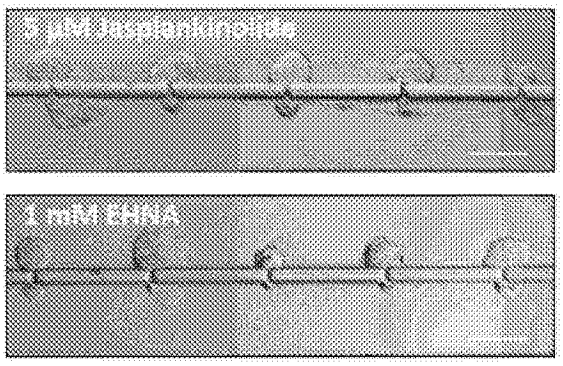

5 μM Jasplakinolide
1 mM EHNA

图4I

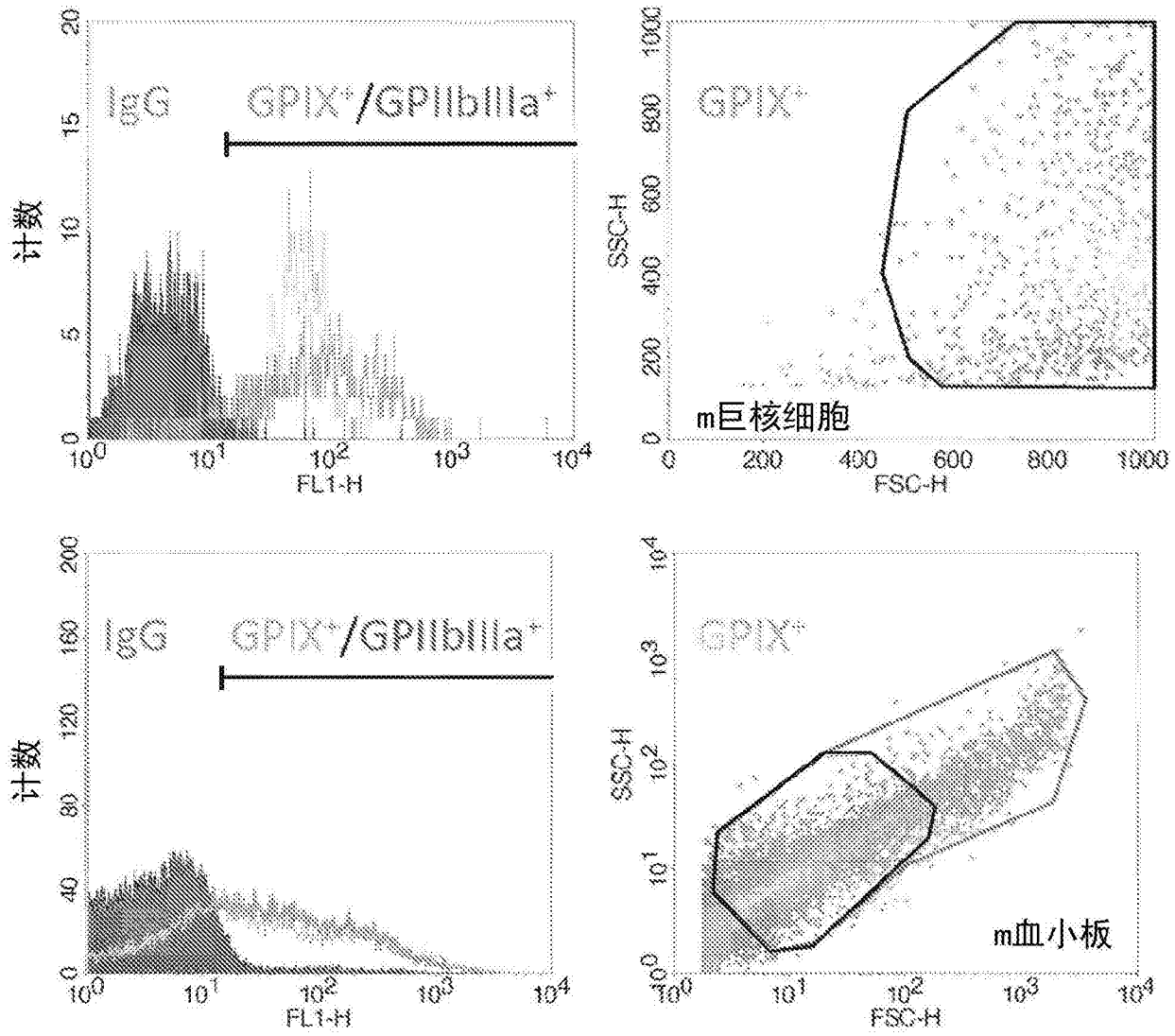

IgG
GPIX+/GPIIbIIIa+
计数
FL1-H
GPIX+
SSC-H
FSC-H
m巨核细胞
IgG
GPIX+/GPIIbIIIa+
计数
FL1-H
GPIX+
SSC-H
FSC-H
m血小板

图5A

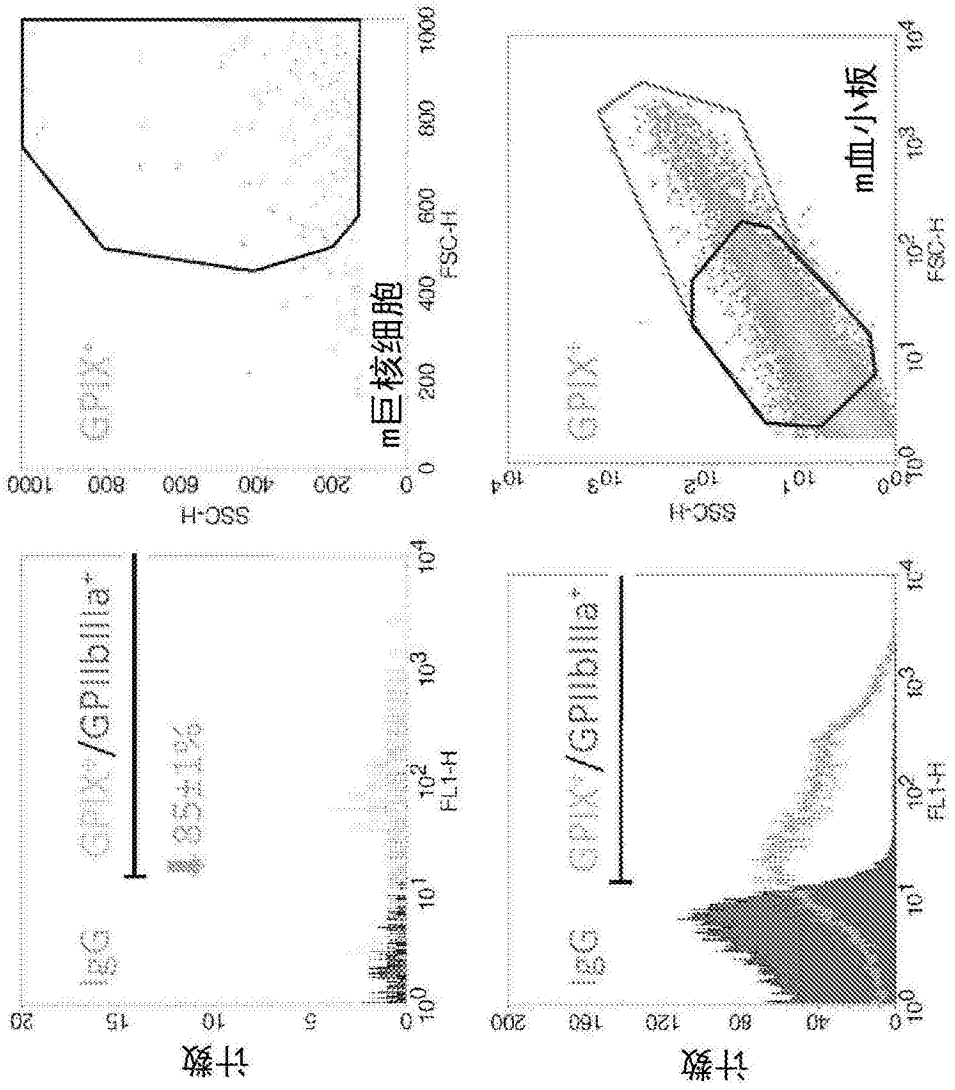

m巨核细胞
GPIX+
SSC-H
FSC-H
m血小板
GPIX+
SSC-H
FSC-H
计数
IgG
GPIX+/GPIIbIIIa+
85±1%
FL1-H
计数
IgG
GPIX+/GPIIbIIIa+
FL1-H

图5B

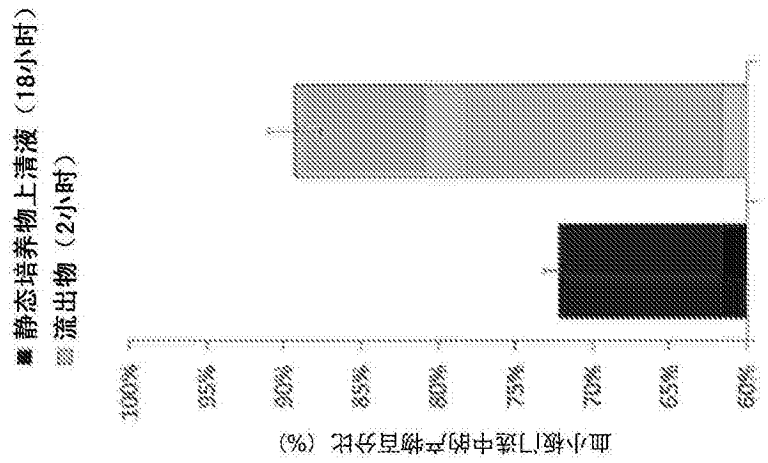

静态培养物上清液（18小时）
流出物（2小时）
血小板门选中的产物百分比（%）

图5C

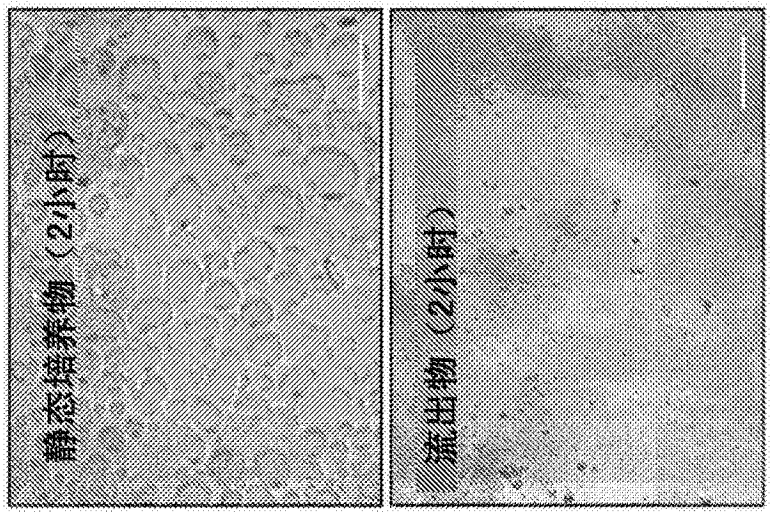

静态培养物（2小时）
流出物（2小时）

图5D

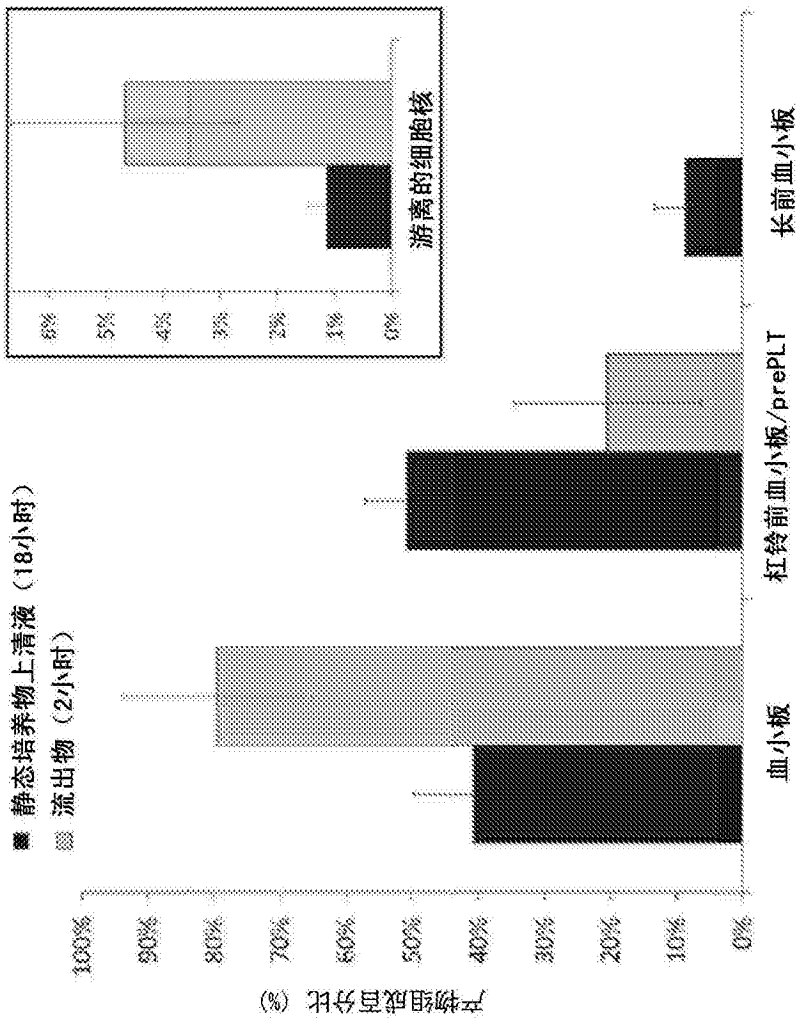

静态培养物上清液（18小时）
流出物（2小时）
游离的细胞核
6%
5%
4%
3%
2%
1%
0%
产物组成百分比（%）
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
血小板
杠铃前血小板/prePLT
长前血小板

图5E

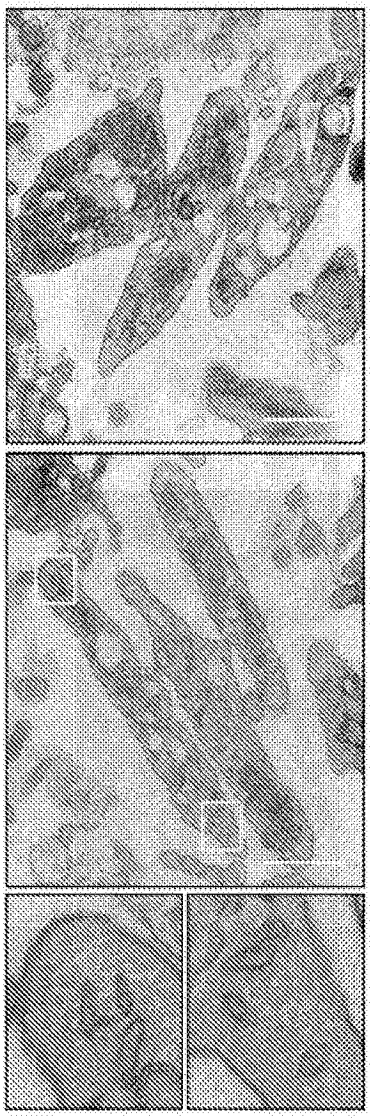


图5F

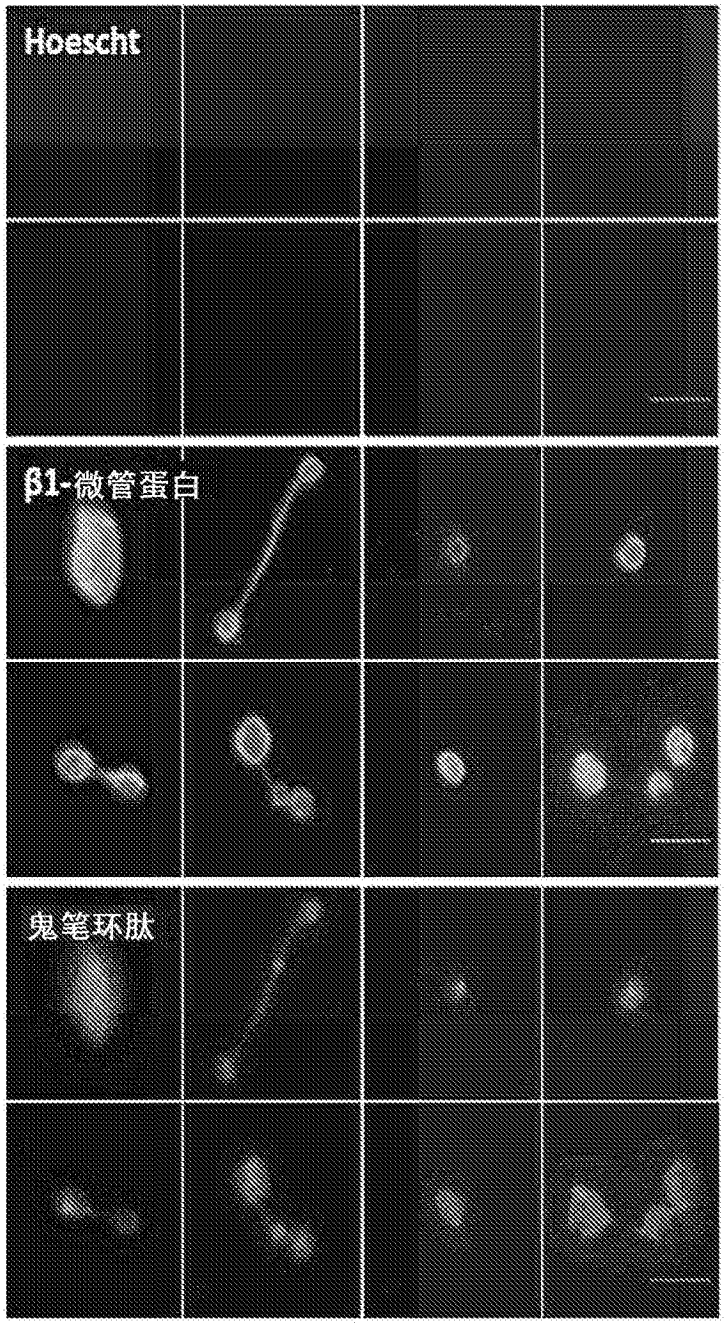


图5G

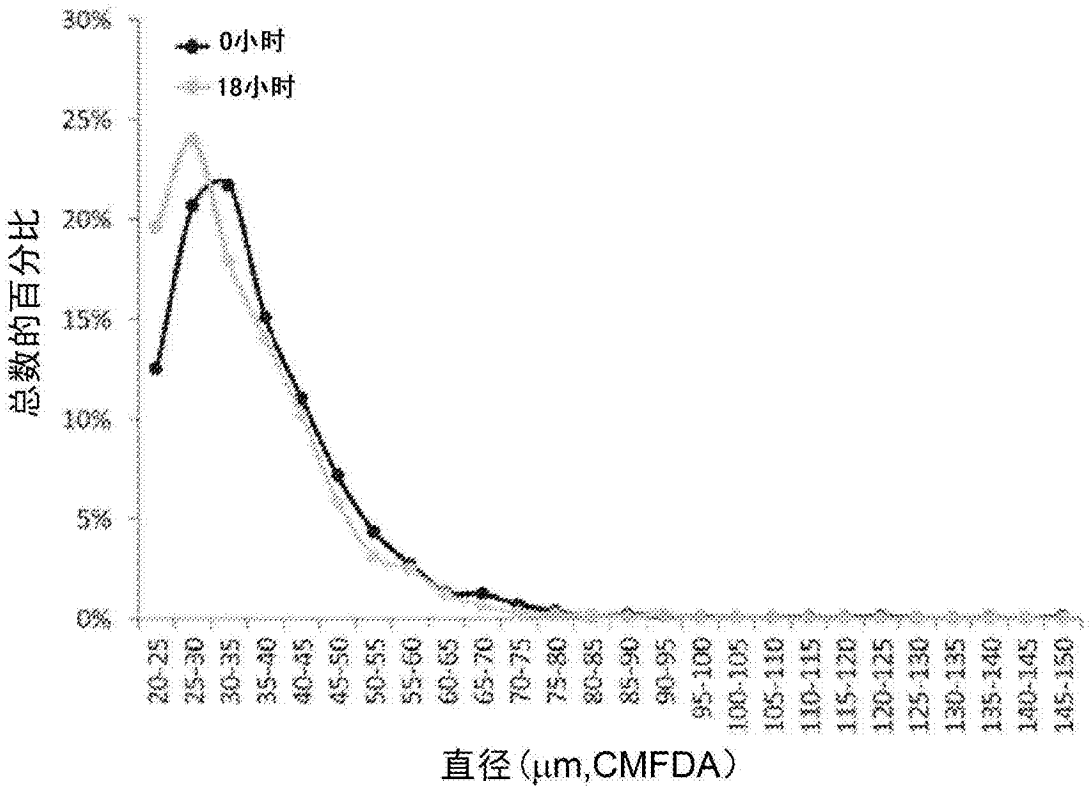

30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
0小时
18小时
总数的百分比
20-25
25-30
30-35
35-40
40-45
45-50
50-55
55-60
60-65
65-70
70-75
75-80
80-85
85-90
90-95
95-100
100-105
105-110
110-115
115-120
120-125
125-130
130-135
135-140
140-145
145-150
直径(μm,CMFDA)

图6A

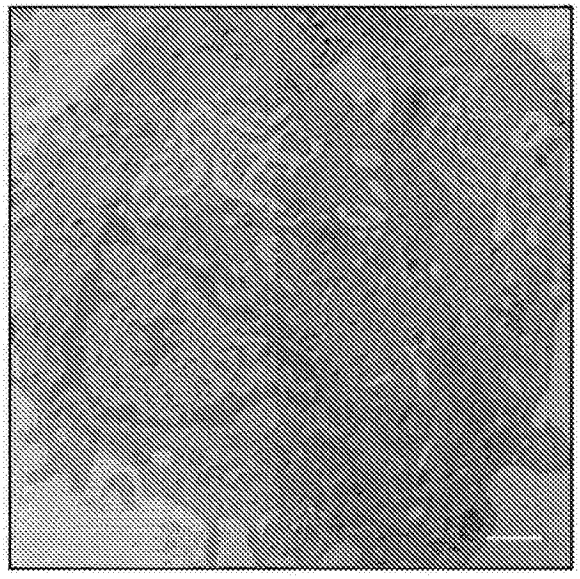


图6B

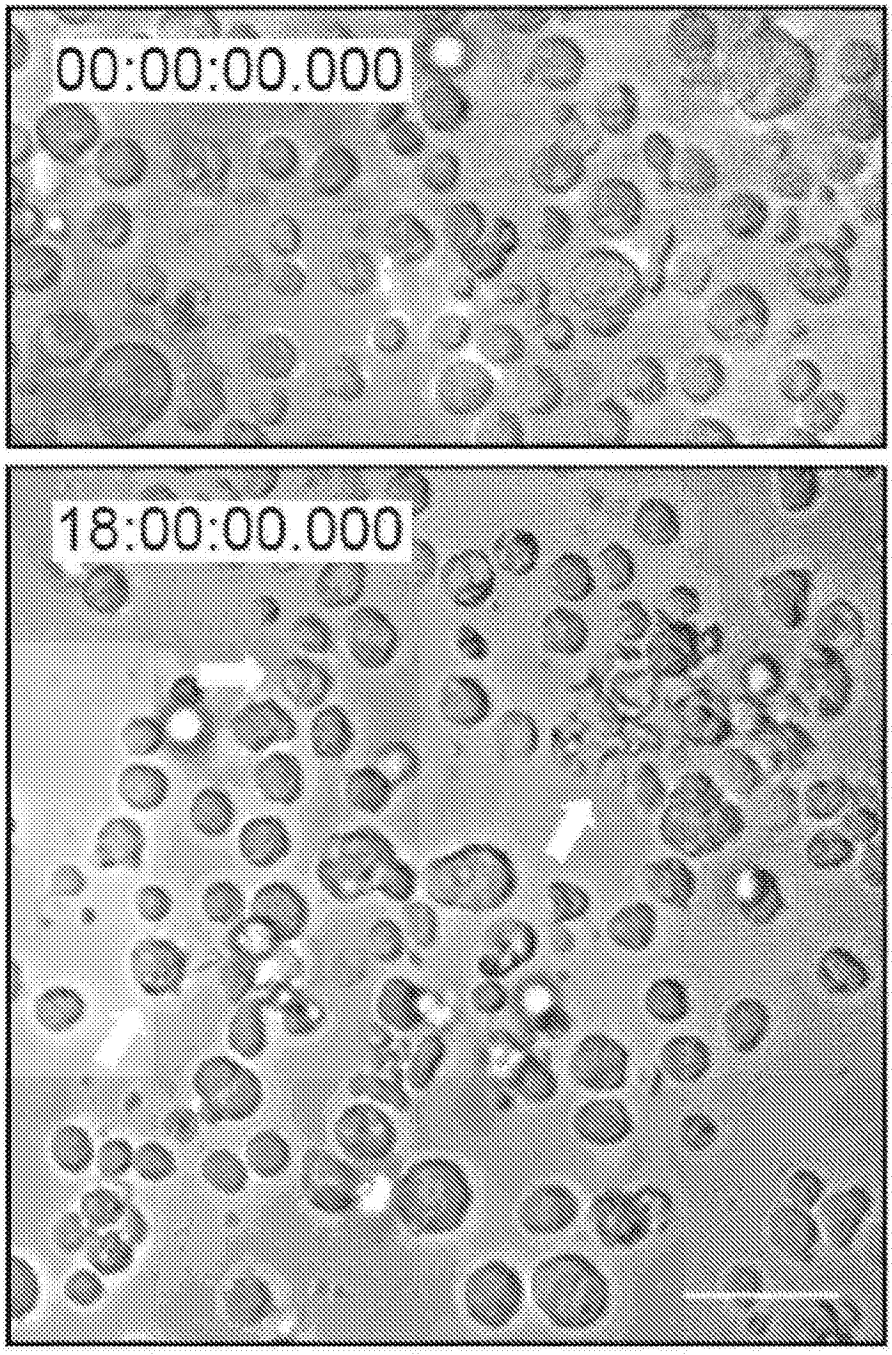


图6C

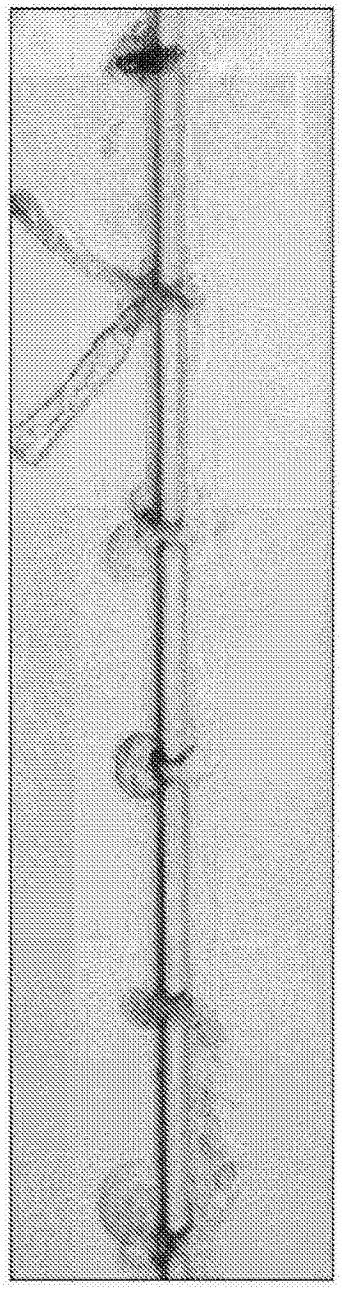


图6D

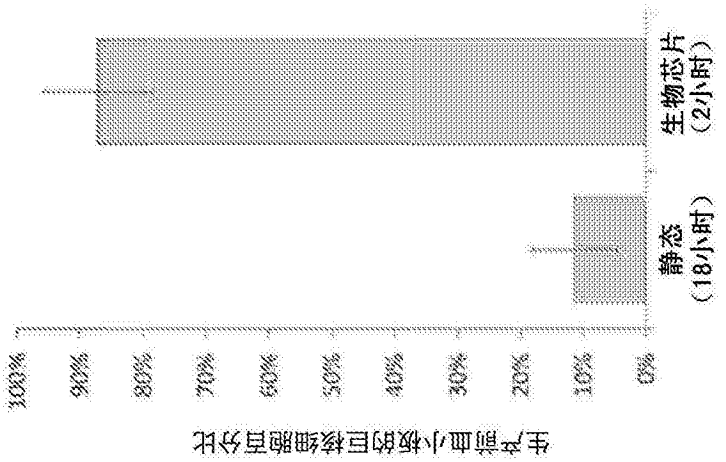

生物芯片
（2小时）
静态
（18小时）
0%
10%
20%
30%
40%
50%
60%
70%
80%
90%
100%
生产前血小板的巨核细胞百分比

图6E

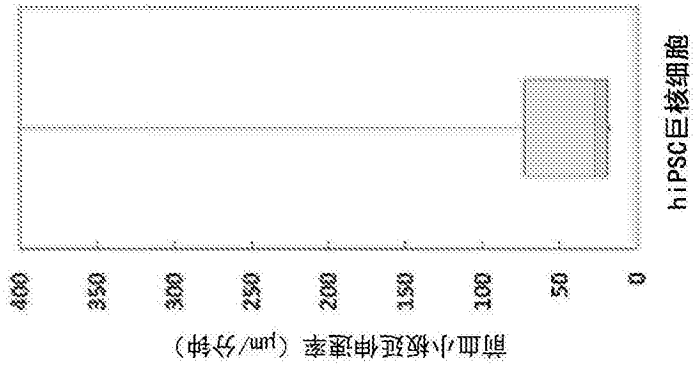

hiPSC巨核细胞
0
50
100
150
200
250
300
350
400
前血小板延伸速率（μm/分钟）

图6F

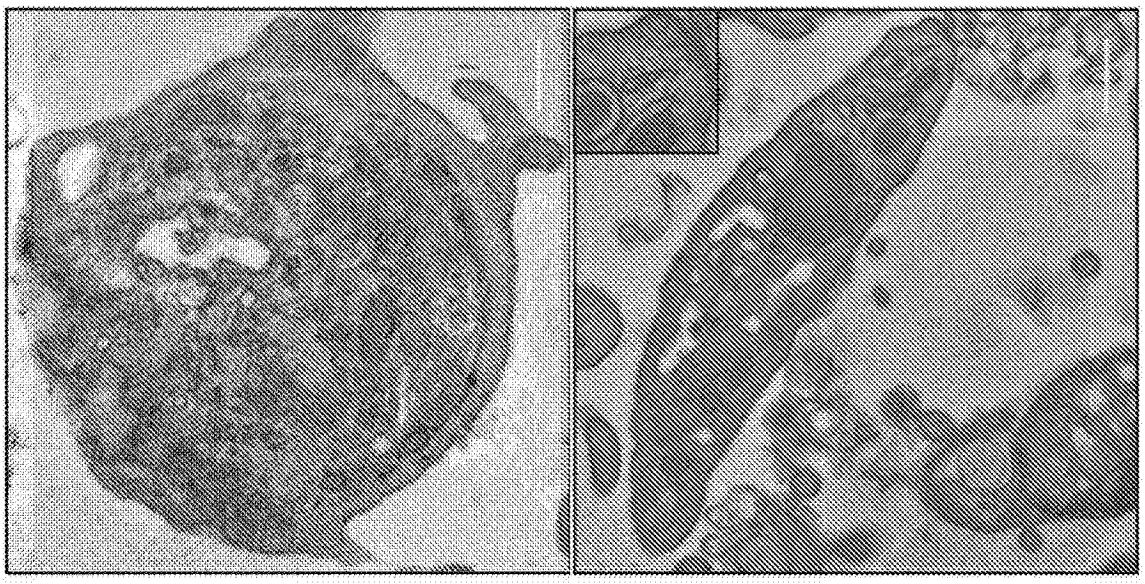


图6G

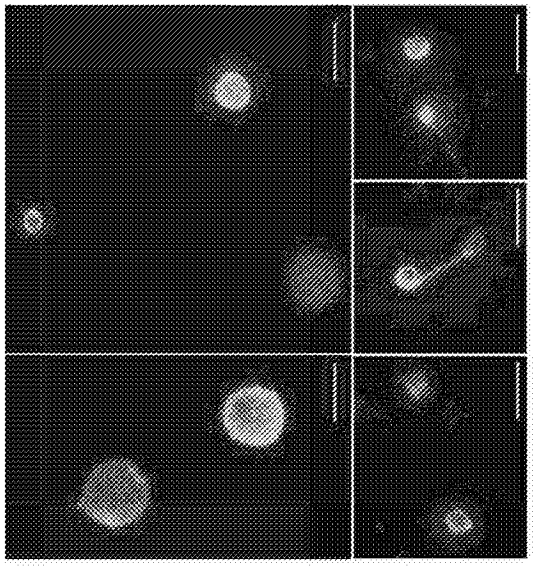


图6H

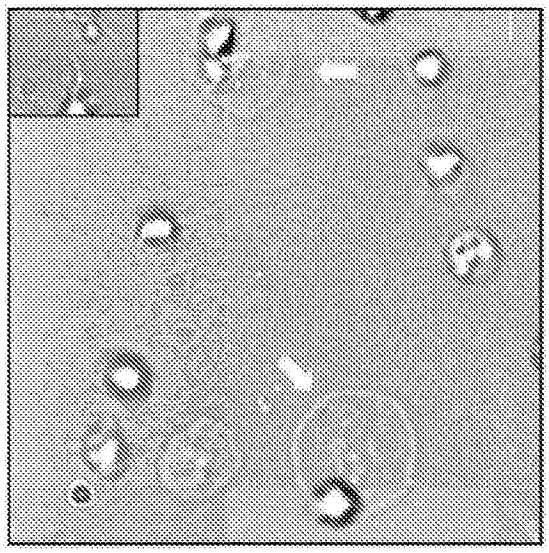


图6I

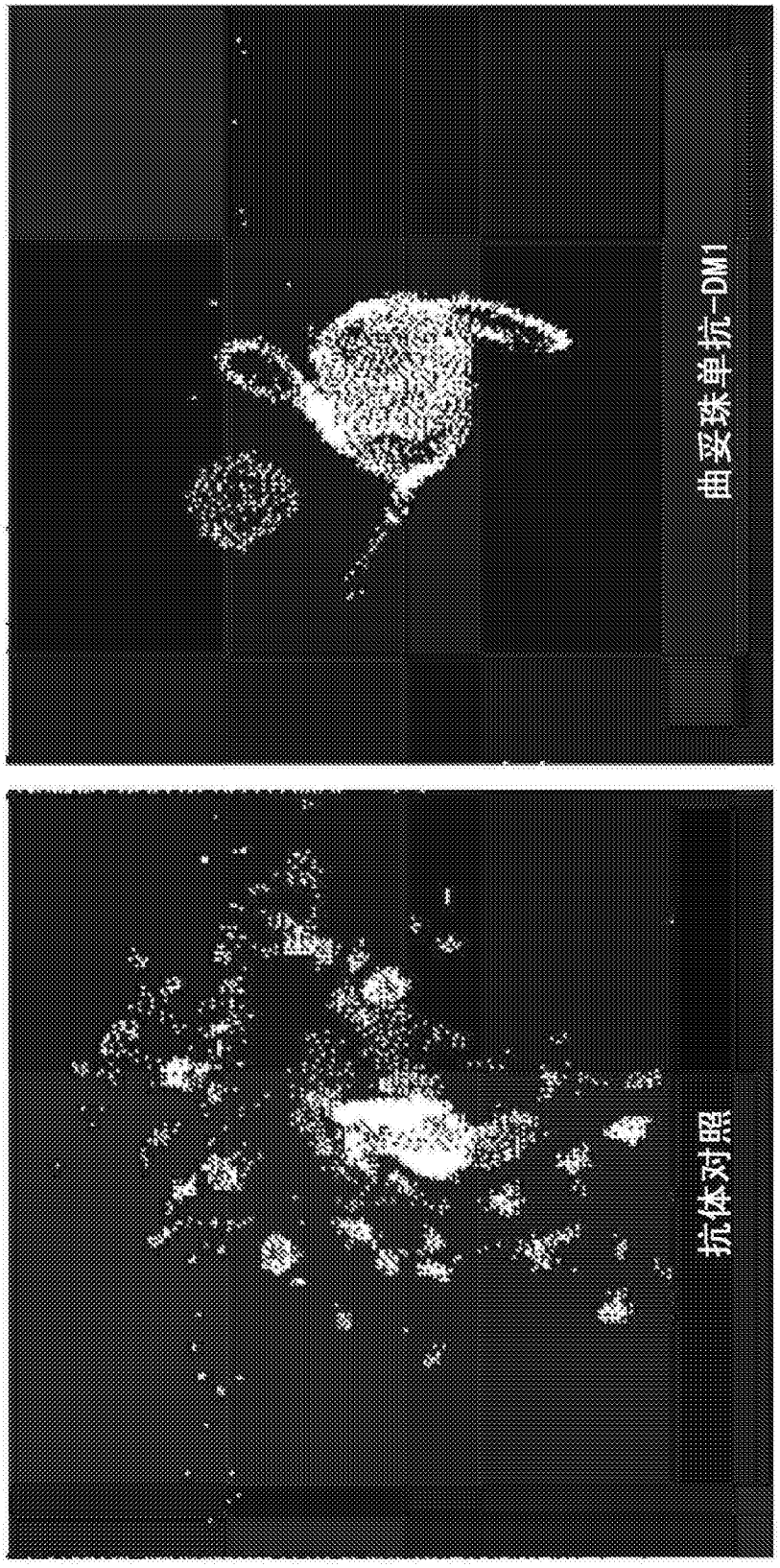


图7