



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201734207 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：106101314

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 13 日

(51)Int. Cl.：

C12N5/24 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

G01N33/547 (2006.01)

(30)優先權：2016/01/15

美國

62/279,341

2016/10/23

美國

62/411,690

2016/10/24

美國

62/412,092

(71)申請人：柏克萊燈光有限公司 (美國) BERKELEY LIGHTS, INC. (US)

美國

(72)發明人：查普曼 凱文 T CHAPMAN, KEVIN T. (US)；懷特 馬克 P WHITE, MARK P.

(US)；汪曉華 WANG, XIAOHUA (CN)；帕克 敏哈 PARK, MINHA (US)；史黛

勒 奇多 K STADLER, GUIDO K. (AT)；羅威 藍道爾 D 二世 LOWE, RANDALL

D. JR. (US)；關曉 GUAN, XIAO (CN)；麥克艾文 傑森 M MCEWEN, JASON M.

(US)；王鋼鋒 WANG, GANG (CN)；福克斯 喬治 L FOX, GEORGE L. (US)；瑞

斗 珮琪 A RADEL, PEGGY A. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：128 項 圖式數：8 共 140 頁

(54)名稱

製造患者專一性抗癌治療劑之方法及使用該治療劑之治療方法

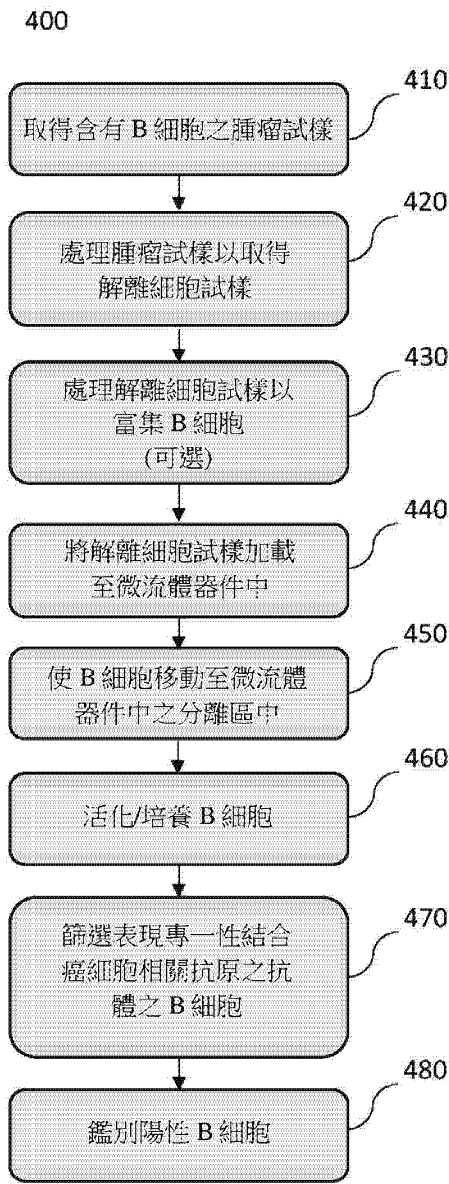
METHODS OF PRODUCING PATIENT-SPECIFIC ANTI-CANCER THERAPEUTICS AND
METHODS OF TREATMENT THEREFOR

(57)摘要

本發明提供一種製備抗體治療劑之方法，其包括：(a)提供來自至少一種自患者取得之實體腫瘤試樣之解離細胞試樣；(b)將該解離細胞試樣加載至具有流動區及至少一個在流體上連結至該流動區之分離區之微流體器件中；(c)使至少一種 B 細胞自該解離細胞試樣移動至該微流體器件中之至少一個分離區中，由此取得至少一種經分離 B 細胞；及(d)使用該微流體器件鑑別至少一種可製造能夠結合至癌細胞之抗體之 B 細胞。該等癌細胞可為患者之自有癌細胞。亦提供治療患者之方法、標記或檢測癌症之方法、包含抗體或其片段之經改造 T 細胞或 NK 細胞、及經改造抗體構築體。

A method of preparing an antibody therapeutic is provided comprising: (a) providing a dissociated cell sample from at least one solid tumor sample obtained from a patient; (b) loading the dissociated cell sample into a microfluidic device having a flow region and at least one isolation region fluidically connected to the flow region; (c) moving at least one B cell from the dissociated cell sample into at least one isolation region in the microfluidic device, thereby obtaining at least one isolated B cell; and (d) using the microfluidic device to identify at least one B cell that produces antibodies capable of binding to cancer cells. The cancer cells can be the patient's own cancer cells. Also provided are methods of treating patients, methods of labeling or detecting cancer, engineered T or NK cells comprising antibodies or fragments thereof, and engineered antibody constructs.

指定代表圖：



【圖4】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

製造患者專一性抗癌治療劑之方法及使用該治療劑之治療方法

【英文發明名稱】

METHODS OF PRODUCING PATIENT-SPECIFIC ANTI-CANCER THERAPEUTICS AND METHODS OF TREATMENT THEREFOR

【技術領域】

提供分離製造癌症專一性抗體之B細胞之方法以及使用該等抗體及/或其衍生物之治療方法。

【先前技術】

免疫療法係使用患者之自有免疫系統來幫助抵抗癌症之發展領域。已評估各種免疫療法策略，包含刺激患者之自有免疫系統以攻擊癌細胞或投與來自外部來源之免疫系統組份。舉例而言，單獨或以基因改造之構築體形式來投與經設計以在活體內攻擊癌細胞之單株抗體。另外，已探究CAR-T（嵌合抗原受體T細胞）療法。在此治療方式中，經基因改造之T細胞在其表面上表現含抗體融合蛋白，該等含抗體融合蛋白使T細胞靶向所論述癌症且容許T細胞殺死癌細胞。因CAR-T細胞可變得永久性植入患者之身體中，故此方式似乎尤其具有前景。然而，該等方式仍需要進一步改進。

單株抗體療法或CAR-T療法中之關鍵問題在於鑑別或設計向所論述患者提供最大益處之抗體，應記住，患者可在可開始治療之前或在需要治療成功之前具有極短時間窗以預防顯著發病率及死亡率。

本發明實施例提供以下解決方案：鑑別向所論述患者提供最大益處之抗體，最小化研究探究所需之時間量且容許儘可能快地開始治療。

【發明內容】

根據說明，製備抗體治療劑之方法包括：

- a) 提供來自至少一種自患者取得之實體腫瘤試樣之解離細胞試樣；
- b) 將解離細胞試樣加載至具有至少一個分離區之微流體器件中；
- c) 使至少一種B細胞自解離細胞試樣移動至微流體器件中之至少一個分離區中，由此取得至少一種經分離B細胞；
- d) 鑑別至少一種製造能夠結合至癌細胞相關抗原之抗體之經分離B細胞。

本文所闡述之此方法及其他方法提供以下優點：鑑別(在一些實施例中)患者自身已製造之B細胞以靶向患者所患有類型之癌症。藉由使用微流體器件來分離該等抗體，可在相對較快速分析形式中平行測試複數個B細胞且可鑑別所關注專一性B細胞，培養，且測序(或用於製造雜交瘤)。此使得探究者能夠製造患者專一性抗癌抗體，該等抗體可以單株抗體或其片段或基因改造之構築體(例如融合蛋白或CAR-T治療劑)形式來投與，或用於檢測方法中，等等。

其他實施例包含治療患有癌症之患者之方法，其包括使用藉由本文之方法製得之抗體或其片段治療患者。亦可使用偶聯至可檢測標記之抗體或其片段標記或檢測患者之癌症。對於用於治療之組合物而言，可提供包括顯示於表面上之抗體或其片段之經改造T細胞以及經改造抗體構築體，該經改造抗體構築體包括至少本文所鑑別抗體之重鏈CDR、至少重鏈及輕鏈CDR、至少重鏈可變區或至少重鏈及輕鏈可變區。

其他目標及優點將在下文說明中部分地加以陳述，且根據本說明將部分地顯而易見，或者可藉由實踐而知曉。該等目標及優點將藉助隨附申請專利範圍中特定指出之要素及組合來實現及達成。

應理解，前述一般說明及下列詳細說明兩者皆僅為實例性及解釋性且並不限制申請專利範圍。

併入本說明書中並構成本說明書之一部分的附圖圖解說明一個(若干個)實施例，且與本說明一起用於闡釋本文所闡述之原理。

【圖式簡單說明】

圖1A圖解說明根據本發明之一些實施例之微流體器件及與微流體器件一起使用之系統(包含相關控制設備)的一實例。

圖1B及1C分別圖解說明根據本發明之一些實施例之微流體器件之垂直及水平剖面圖。

圖2A及2B分別圖解說明根據本發明之一些實施例之具有分離欄之微流體器件的垂直及水平剖面圖。

圖2C圖解說明根據本發明之一些實施例之隔離室之詳細水平剖面圖。

圖2D圖解說明根據本發明之一些實施例之具有分離欄之微流體器件的部分水平剖面圖。

圖2E及2F圖解說明根據本發明之一些實施例之隔離室之詳細水平剖面圖。

圖2G圖解說明根據本發明之一實施例之具有含有複數個流動通道之流動區之微流體器件，每一流動通道在流體上連結至複數個隔離室。

圖2H圖解說明根據本發明之一些實施例之微流體器件之部分垂直剖

面圖，其中基底之面朝裡表面及蓋之面朝裡表面係條件化表面。

圖3A圖解說明根據本發明之一些實施例之經構形以與微流體器件操作性耦合之系統嵌套及相關控制設備的一具體實例。

圖3B圖解說明根據本發明之一些實施例之用於控制微流體器件之系統的光學元件串。

圖4圖解說明根據本發明之一些實施例用於鑑別表現專一性結合至癌細胞相關抗原之抗體之B細胞淋巴球之實例性工作流程的步驟。

圖5A-5C繪示包括複數個微流體通道之微流體器件，每一微流體通道與複數個隔離室在流體上連結。每一隔離室含有複數個小鼠脾細胞。圖5A係微通道器件之一部分之明場影像。圖5B及5C係使用德克薩斯紅濾光器(Texas Red filter)取得之螢光影像。在圖5B中，在開始實例1中所闡述之抗原專一性分析之後5分鐘取得影像。在圖5C中，開始實例1中所闡述之抗原專一性分析之後20分鐘取得影像。圖5C中之白色箭頭指向在分析中生成正信號之隔離室。

圖6顯示來自Jurkat細胞之各種部分之西方印漬(Western blot)。

圖7顯示經使用抗CD3、抗CD45或抗Na/K-ATPase抗體染色之Jurkat細胞膜部分塗覆之珠粒。

圖8顯示經使用與圖7中相同之抗體染色之HEK293細胞塗覆之珠粒。

【實施方式】

本申請案係在35 U.S.C. 119(e)下主張以下申請案之益處之非臨時申請案：2016年1月15日提出申請之美國臨時申請案第62/279,341號；2016年10月23日提出申請之美國臨時申請案第62/411,689號；及2016年10月24日提出申請之美國臨時申請案第62/412,092號，該等申請案者中之每一

者之揭示內容之全部內容以引用方式併入本文中。

I. 定義

本說明書闡述本發明之實例性實施例及應用。然而，本發明並不限於該等實例性實施例及應用，或並不限於實例性實施例及應用進行操作或於本文中所闡述之方式。此外，圖可顯示簡化或部分視圖，且圖中元件之尺寸可放大或另外不成比例。另外，在本文中使用術語「位於……上」、「附接至」、「連結至」、「耦合至」或類似詞語時，一種元件(例如材料、層、基板等)可「位於另一元件上」、「附接至」、「連結至」或「耦合至」另一元件，不論一種元件位於另一元件正上方、附接至、連結至或耦合至另一元件抑或在一種元件與另一元件之間存在一或多個插入元件。同樣，除非上下文另外指出，否則方向(例如上面、下面、頂部、底部、側、上、下、下方、上方、上部、下部、水平、垂直、「x」、「y」、「z」等)在提供時係相對關係且僅藉助實例提供，並便於闡釋及論述且並不具有限制意義。另外，在提及元件列表(例如元件a、b、c)之情形下，該提及意欲包含任一所列示元件本身、少於所有列示元件之任一組合及/或所有所列示元件之組合。說明書中之分段劃分僅係便於綜述且並不限制所論述元件之任一組合。

如本文中所使用，「實質上」意指足以適用於預期目的。術語「實質上」由此容許相對於絕對或完美狀態、尺寸、量測、結果或諸如此類之次要、不顯著變化，如由熟習此項技術者所預期但不顯著影響整體性能者。在針對數值或可表示為數值之參數或特性使用時，「實質上」意指在10%內。

術語「多個」意指一個以上。

如本文中所使用，術語「複數個」可為2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個。

如本文中所使用，術語「佈置」涵蓋於其含義「位於」內。

如本文中所使用，「微流體器件」或「微流體裝置」係包含一或多個經構形以容納流體之離散微流體迴路之器件，每一微流體迴路包括流體互連之迴路元件，該等迴路元件包含(但不限於)區域、流動路徑、通道、室及/或欄及至少兩個經構形以容許流體(及視情況懸浮於流體中之微小物體)流入及/或流出微流體器件之埠。通常，微流體器件之微流體迴路包含至少一個微流體通道及至少一個室，且容納小於約1 mL (例如小於約750、500、250、200、150、100、75、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3或2 μL)之流體體積。在某些實施例中，微流體迴路容納約1-2、1-3、1-4、1-5、2-5、2-8、2-10、2-12、2-15、2-20、5-20、5-30、5-40、5-50、10-50、10-75、10-100、20-100、20-150、20-200、50-200、50-250或50-300 μL 。

如本文中所使用，「奈米流體器件」或「奈米流體裝置」係微流體迴路含有至少一個經構形以容納小於約1 μL (例如小於約750、500、250、200、150、100、75、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 nL或更小)之流體體積之迴路元件之微流體器件類型。奈米流體器件可包括複數個迴路元件(例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10,000或更多個)。在某些實施例中，至少一個迴路元件中之一或多者(例如全部)經構形以容納約100

pL至1 nL、100 pL至2 nL、100 pL至5 nL、250 pL至2 nL、250 pL至5 nL、250 pL至10 nL、500 pL至5 nL、500 pL至10 nL、500 pL至15 nL、750 pL至10 nL、750 pL至15 nL、750 pL至20 nL、1 nL至10 nL、1 nL至15 nL、1 nL至20 nL、1 nL至25 nL或1 nL至50 nL之流體體積。在其他實施例中，至少一個迴路元件中之一或多者(例如全部)經構形以容納約20 nL至200 nL、100 nL至200 nL、100 nL至300 nL、100 nL至400 nL、100 nL至500 nL、200 nL至300 nL、200 nL至400 nL、200 nL至500 nL、200 nL至600 nL、200 nL至700 nL、250 nL至400 nL、250 nL至500 nL、250 nL至600 nL或250 nL至750 nL之流體體積。

本文所用之「微流體通道」或「流動通道」係指微流體器件中長度顯著長於水平及垂直尺寸之流動區。舉例而言，流動通道可至少5倍於水平或垂直尺寸之長度，例如至少10倍長度、至少25倍長度、至少100倍長度、至少200倍長度、至少500倍長度、至少1,000倍長度、至少5,000倍長度或更長。在一些實施例中，流動通道之長度在約50,000微米至約500,000微米範圍內，包含其間之任一範圍。在一些實施例中，水平尺寸在約100微米至約1000微米範圍內(例如約150微米至約500微米)且垂直尺寸在約25微米至約200微米範圍內(例如約40微米至約150微米)。應注意，流動通道可在微流體器件中具有各種不同空間構形，且由此並不限於完全線性元件。舉例而言，流動通道可包含一或多個具有下列構形中之任一者之分段：曲線、彎曲、螺旋、傾斜、下傾、分叉(例如多個不同流動路徑)及其任一組合。另外，流動通道可沿其路徑具有不同橫截面面積(變寬及收縮)以提供其中之期望流體流動。

如本文中所使用，術語「阻塞物」通常係指足夠大以部分地(但非完

全)阻礙目標微小物體在微流體器件中之兩個不同區域或迴路元件之間之移動的腫塊或類似類型結構。兩個不同區域/迴路元件可為(例如)微流體隔離室及微流體通道或微流體隔離室之連結區及分離區。

如本文中所使用，術語「收縮」通常係指微流體器件中之迴路元件(或兩個迴路元件之間之界面)之寬度變窄。收縮可發生於(例如)微流體隔離室與微流體通道之間之界面處，或發生於微流體隔離室之分離區與連結區之間之界面處。

如本文中所使用，術語「透明」係指容許可見光通過且在光通過時不實質上改變光之材料。

如本文中所使用，術語「微小物體」通常係指可根據本發明分離及收集之任一微型物體。微小物體之非限制性實例包含：無生命微小物體，例如微粒、微珠(例如聚苯乙烯珠粒、Luminex™珠粒或諸如此類)、磁珠、微棒、微絲、量子點及諸如此類；生物微小物體，例如細胞(例如胚胎、卵母細胞、卵子、精子細胞、自組織解離之細胞、真核細胞、原生生物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、人類細胞、免疫學細胞、雜交瘤、培養細胞、來自細胞系之細胞、癌細胞、感染細胞、轉染及/或轉變細胞、報告基因細胞、原核細胞及諸如此類)、生物細胞器、囊泡或複合物、合成囊泡、脂質體(例如自膜製劑合成或衍生)、脂質奈米載具(nanoraft) (如 Ritchie 等人 (2009) 「Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs,」 *Methods Enzymol.*, 464:211-231中所闡述)及諸如此類；或無生命微小物體及生物微小物體之組合(例如附接至細胞之微珠、經脂質體塗覆之微珠、經脂質體塗覆之磁珠或諸如此類)。珠粒可進一步具有以共價方式或非共價方式附接之其他部分/分子，例如

螢光標記、蛋白質、小分子信號傳導部分、抗原或能夠用於分析中之化學/生物物質。

如本文中所使用，術語「細胞」係指生物細胞，其可為植物細胞、動物細胞(例如哺乳動物細胞)、細菌細胞、真菌細胞或諸如此類。哺乳動物細胞可(例如)來自人類、小鼠、大鼠、馬、山羊、綿羊、牛、靈長類動物或諸如此類。

若生物細胞之群落中所有能夠繁殖之活細胞皆係源自單一親代細胞之子代細胞，則該群落係「純系性」。術語「純系細胞」係指同一純系群落之細胞。

如本文中所使用，生物細胞之「群落」係指2個或更多個細胞(例如2-20、4-40、6-60、8-80、10-100、20-200、40-400、60-600、80-800、100-1000或大於個1000細胞)。

如本文中所使用，術語「維持細胞」係指提供包括流體及氣態組份之環境及視情況提供保持細胞有活力及/或擴增之所需條件之表面。

流體介質之「組份」係存在於介質中之任一化學或生物化學分子，包含溶劑分子、離子、小分子、抗生素、核苷酸及核苷、核酸、胺基酸、肽、蛋白質、糖、碳水化合物、脂質、脂肪酸、膽固醇、代謝物或諸如此類。

如本文中所使用，在提及流體介質時，「擴散(diffuse及diffusion)」係指液體介質之組份沿濃度梯度向下之熱動力學移動。

片語「介質流動」意指流體介質主要由除擴散外之任一機制所致之本體移動。舉例而言，介質流動可涉及流體介質因兩點之間之壓力差而自一個點移動至另一點。該流動可包含液體之連續、脈衝、週期、隨機、間

歇或往復流動或其任一組合。在一種流體介質流入另一流體介質中時，介質可發生湍流及混合。

片語「實質上無流動」係指流體介質之流速隨時間平均而言小於材料(例如所關注分析物)之組份在流體介質中或流體介質內之擴散速率。此一材料之組份之擴散速率可取決於(例如)溫度、組份大小及組份及與流體介質之間之相互作用之強度。

如本文中所使用，在提及微流體器件內之不同區域時，片語「在流體上連結」意指，在不同區域實質上經流體(例如流體介質)填充時，每一區域中之流體發生連結以形成單一流體。此並不意味著，不同區域中之流體(或流體介質)需要具有相同組成。而是，微流體器件之不同之流體連結區中之流體可具有不同組成(例如溶質(例如蛋白質、碳水化合物、離子或其他分子)之不同濃度)，該等流體在溶質沿其各別濃度梯度向下移動及/或流體流經器件時處於流通狀態。

如本文中所使用，「流動路徑」係指界定且經受介質流軌跡之一或多個在流體上連結之迴路元件(例如通道、區域、室及諸如此類)。流動路徑由此係微流體器件之掃略區之實例。其他迴路元件(例如非掃略區)可與包括不經受流動路徑中之介質流之流動路徑之迴路元件在流體上連結。

如本文中所使用： μm 意指微米， μm^3 意指立方微米，pL意指微微升，nL意指毫微升，且 μL (或uL)意指毫升。

說明書中之分段劃分僅係便於綜述且並不限制所論述元件之任一組合。

II. 製備抗體治療劑之方法

可使用包括以下步驟之方法來製備抗體治療劑：

a)提供來自至少一種自患者取得之實體腫瘤試樣之解離細胞試樣；

b)將解離細胞試樣加載至具有流動區及至少一個在流體上連結至流動區之分離區之微流體器件中；

c)使至少一種B細胞自解離細胞試樣移動至微流體器件中之至少一個分離區中，由此取得至少一種經分離B細胞；及

d)鑑別至少一種製造能夠結合至癌細胞相關抗原之抗體之經分離B細胞。

鑑別抗體之此方法可以各種不同模式來實踐，應記住，一個潛在目標在於在製造抗體之B細胞及針對期望治療之患者引起問題之癌細胞之間確立關係。一種特定方法400概述於圖4中。

在某些情況下，該方法進一步包括測定來自所鑑別B細胞之配對重鏈及輕鏈可變結構域抗體序列。舉例而言，可在至少一種製造結合至癌細胞之抗體之B細胞自微流體器件輸出之後實施測序。在其他情況下，該方法包括自至少一種經分離B細胞生成雜交瘤。若測得抗體序列，則該方法亦可包括生成包括來自至少一種所鑑別B細胞之一些或全部配對重鏈及輕鏈可變結構域序列之抗體治療劑。舉例而言，方法可包括製備包括來自關於至少一種所鑑別B細胞之重鏈及輕鏈可變結構域序列之所有6個CDR之抗體或其功能部分。

A. 解離細胞試樣之製備

在某些情況下，該方法包含自實體腫瘤取得試樣之步驟。舉例而言，如圖4中之方法400之步驟410中所顯示。實體腫瘤試樣可為腫瘤生檢，例如手術切除之生檢或細針抽吸物(FNA)。在一些情況下，腫瘤具有三級淋巴樣結構，其可包括增殖性B細胞及/或B細胞毛囊。腫瘤可為乳

癌、泌尿生殖道癌、神經系統癌、腸癌、肺癌、黑素瘤或另一類型癌症。在一些實施例中，乳癌可為髓質乳癌。在一些實施例中，泌尿生殖道癌可為源於泌尿道中(例如在腎(例如腎細胞癌瘤)、輸尿管、膀胱或尿道中)之癌症。在一些實施例中，泌尿生殖道癌可為雄性生殖道之癌症(例如睪丸癌、前列腺癌或精囊、精管或陰莖之癌症)或雌性生殖道之癌症(例如卵巢癌、子宮癌、子宮頸癌、陰道癌或輸卵管癌)。在一些實施例中，神經系統之癌症可為神經胚細胞瘤。在一些實施例中，腸癌可為結腸直腸癌。在一些實施例中，肺癌可為間皮瘤。

在一些情況下，取得單一腫瘤試樣。在其他情況下，取得多個腫瘤試樣。在一情況下，所有腫瘤試樣皆係來自同一患者。舉例而言，可使用來自患者之一種腫瘤試樣(例如單一生檢)或可使用來自同一患者之多個腫瘤試樣(例如來自患者中之同一腫瘤或不同腫瘤之多個生檢)。

在其他情況下，可使用來自不同患者之腫瘤試樣。舉例而言，B細胞可來自第一患者且癌細胞(例如用作癌細胞相關抗原之來源之癌細胞)係來自第二患者。在一些該等模式中，B細胞係來自期望治療之患者。在一些該等模式中，癌細胞係來自癌細胞系。若試樣係來自不同患者，則亦可維持製造抗體之B細胞與癌細胞相關抗原之間之一定關係。舉例而言，若癌細胞相關抗原並非來自同一患者之癌細胞，則在一些實施例中，其可來自相同類型之癌症。在某些情況下，用於微流體器件中或另外用於提供癌症相關抗原之癌細胞展現一或多種描述患者所患有之腫瘤類型之標記物。舉例而言，癌細胞可具有一或多種該等亦存在於患者之腫瘤試樣中之標記物。

在某些情況下，該方法包含處理腫瘤試樣以製造解離細胞試樣之步

驟。舉例而言，如圖4中之方法400之步驟420中所顯示。解離細胞試樣可包括至少一種自腫瘤(例如腫瘤生檢或FNA)解離之單細胞。在一些情況下，所有細胞皆呈單細胞形式。在其他情況下，一些細胞並不呈單細胞形式，而係維持為2、3、4、5、6、7、8、9、10個或更多個細胞之團塊，但其他細胞係呈單細胞形式。解離細胞試樣包含以解離形式生長於培養物中之癌細胞系。因此，細胞可為主動解離(藉由取得至少一種實體腫瘤試樣且解離至少一個單細胞)或被動解離(藉由取得先前已解離或以解離形式生長之試樣)。

解離可以諸多方式來實施。舉例而言，可使用膠原酶以及DNA酶消解解離腫瘤試樣。亦可使用細胞解離儀器(例如來自Miltenyi Biotec之gentleMACS™儀器)解離腫瘤試樣。

在一些情況下，該方法進一步包括在加載之前對解離細胞試樣實施選擇以分離B細胞之百分比及/或濃度大於原始解離試樣之部分。舉例而言，如圖4中之方法400之步驟430中所顯示。若期望，則B細胞可選自使用至少一種標記物(例如選自CD19、CD20、IgM、IgD、CD38、CD27、CD138、PNA及GL7者)之解離細胞試樣。或者或另外，可實施負向選擇以去除非B細胞(例如使用至少一種不表現於B細胞上之標記物)。舉例而言，解離細胞試樣可消耗癌細胞(例如使用癌細胞專一性標記物)及/或T細胞(例如使用T細胞專一性標記物，例如CD3、CD4、CD8等)。在其他情況下，將解離細胞試樣未經處理以富集B細胞即加載至微流體器件中。

不論解離細胞試樣是否經處理以富集B細胞，皆將解離細胞試樣加載至微流體器件中。例如參見圖4中之方法400之步驟440。在一些情況下，可將單一解離細胞試樣加載於微流體器件上。單一解離細胞試樣可包括二

者B細胞及其他類型細胞(例如癌細胞)。在其他情況下，(i)可在不同時間加載單一解離細胞試樣之分開部分或(ii)不同解離細胞試樣(例如各自分開及/或以不同方式進行分級分離)。在一些情況下，可處理解離細胞試樣以製造癌細胞之百分比及/或濃度大於原始試樣之部分。癌細胞部分可為在選擇B細胞之後保留之部分，或反之亦然。

若期望，則癌細胞可選自使用至少一種描述癌症之標記物之解離細胞試樣。在一些情況下，可使用形態差異來分離細胞。癌細胞通常顯示不規則細胞大小(例如較大細胞大小或較小細胞)、較大細胞核，含有較多DNA，或含有細胞核結構變化。在許多情形下，可以目測方式及/或藉由影像分析(其可為自動化)來鑑別該等差異。為促進或增強該分析，可針對核酸(例如在使用結合核酸之染料染色時，癌細胞通常染色至亮於正常細胞)或針對與核膜、核仁及/或核基質締合之標記物來對解離細胞試樣進行染色。該等標記物之實例包含核纖層蛋白(例如A-或B型核纖層蛋白)、細胞核膜蛋白(例如核纖層相關蛋白，例如伊默菌素(emerin))、纖維蛋白、核孔蛋白(NUP，例如Nup153、Nup210等)、組織蛋白及核基質蛋白(例如p84))，其中之任一者可突出顯示細胞核結構之差異。

除形態差異外，業內已知可用於鑑別某些類型之癌細胞之各種標記物，包含(但不限於)：

對於乳癌而言，CD44、HLA-DR、Ki-67 (或MK167)、醛去氫酶1 (ALDH1)及神經節苷酯GD2往往存在於癌細胞中及/或使用升高，而雌激素受體(ER)、助孕酮受體(PR)、人類表皮生長因子受體2 (HER2)及CD24往往不存在於癌細胞中或有所減少；可使用ER⁻/PR⁻/HER2⁻/HLA-DR⁺來鑑別髓質乳癌；且可使用CD44^{hi}/CD24^{lo}/ALDH1^{hi}或

CD44^{hi}/CD24^{lo}/GD2^{hi}來鑑別乳癌幹細胞。

對於腎癌而言，C反應性蛋白、水通道蛋白-1 (AQP1)、脂肪組織分化相關蛋白(ADFP)、胰島素樣生長因子II mRNA結合蛋白3 (IGF2BP3或IMP3)、B7-H1 (或PD-L1),及 Ki-67 (MK167)往往存在於癌細胞中及/或有所升高。

對於膀胱癌而言，核有絲分裂器蛋白(NMP22)、膀胱腫瘤抗原(BTA)及纖維蛋白/纖維蛋白原降解產物往往存在於癌細胞中及/或有所升高，而脂肪細胞型脂肪酸結合蛋白(A-FABP)、麩胱甘肽S-轉移酶 μ (GST- μ)、前列腺素去氫酶(PGDH)及角蛋白13往往不存在或相對於正常細胞有所減少；在基因層面下，p16腫瘤抑制基因或9p21 基因座可在癌細胞中缺失。

對於尿路上皮癌而言，補體因子H相關蛋白(CFHrp)可在癌細胞中展現增加之含量及/或分泌；在細胞核層面下，端粒酶逆轉錄酶(TERT)往往在癌細胞中展現增加之mRNA表現。

對於子宮內膜癌而言，癌症抗原15-3 (CA15-3)、癌症抗原125 (CA125)、癌症抗原19.9 (CA19.9)、癌症抗原72.4 (CA72.4)及癌胚抗原(CEA)往往存在於癌細胞中及/或有所升高。

對於卵巢癌而言，腫瘤相關胰蛋白酶抑制劑(TATI)、癌症抗原125 (CA125)、密連蛋白5、人類副睪蛋白質4 (HE4)、癌胚抗原(CEA)、VCAM-1及miR-181a往往存在於癌細胞中及/或有所升高；TATI、CA125及密連蛋白5已組合用於診斷卵巢癌(如HE4及CA125)，且視情況與CEA及VCAM-1聯合；可使用STAT1來區分對化學療法具有反應之卵巢癌及無反應者。

對於子宮頸癌而言，人類乳頭瘤病毒(HPV) (例如類型16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、6、11、42、43及44)、p16^{INK4a}及胰島素樣生長因子II mRNA結合蛋白3 (IGF2BP3或IMP3)往往存在於癌細胞中及/或有所升高。

對於前列腺癌而言，前列腺專一性抗原(PSA)、肌胺酸(代謝物)、前列腺癌基因3 (PCA3)及TMPRSS2:ERG融合產物往往存在於癌細胞中及/或有所升高，而前列腺酸磷酸酶、纖維蛋白原 α 鏈前體、膠原 α -1 (III)、膠原 α -1 (I)、牛皮癬易感1候選基因2蛋白質、肝細胞癌相關蛋白TB6、組織蛋白H2BB、骨橋蛋白、聚合Ig受體、Na/K-傳輸ATPase γ 、跨膜分泌組份及精液凝固蛋白1往往不存在或相對於正常細胞有所減少。

對於神經胚細胞瘤而言，香草基苦杏仁酸(VMA)、高草香酸(HVA)及鐵蛋白之增加之含量及/或分泌與癌細胞有關，且神經元專一性烯醇酶(NSE)、乳酸去氫酶(LDH)及神經節苷酯GD2往往存在於癌細胞中及/或有所升高；在基因體層面下，染色體1p及11q部分之缺失及17q部分之複製與癌細胞有關。

對於結腸直腸癌而言，癌胚抗原(CEA)、癌症抗原19-9 (CA19-9)、結腸癌專一性抗原3 (CCSA-3)、結腸癌專一性抗原4 (CCSA-4)及B-Raf突變V600E往往存在於癌細胞中及/或有所升高；在基因層面下，結腸直腸癌細胞展現微衛星不穩定性及各種K-Ras突變。

對於小細胞肺癌瘤而言，神經節苷酯GD2往往存在於癌細胞中及/或有所升高；對於非小細胞肺癌瘤而言，B-Raf突變V600E往往存在於癌細胞中；對於間皮瘤而言，鈣視網膜蛋白、細胞角質蛋白5/6及WT1往往存在於癌細胞中及/或有所升高，而癌胚抗原(CEA)、上皮細胞黏著分子(Ep-

CAM)(例如如藉由MOC-31或Ber-EP4抗體所檢測)、Lewis Y血型(例如如藉由BG-8抗體所檢測)及藉由B72.3抗體檢測之腫瘤相關糖蛋白往往不存在或有所減少；且相反，對於肺腺癌而言，CEA、Ep-CAM (例如如藉由MOC-31或Ber-EP4抗體所檢測)、Lewis Y血型(例如如藉由BG-8抗體所檢測)及藉由B72.3抗體檢測之腫瘤相關糖蛋白往往存在於癌細胞中及/或有所升高，而鈣視網膜蛋白、細胞角質蛋白5/6及WT1往往不存在或有所減少。

對於黑素瘤而言，人類內源性逆轉錄病毒(HERV-K)、神經節苷酯GD2、B-Raf突變V600E、Hsp90、G蛋白信號傳導調節劑1 (RGS1)、骨橋蛋白、人類表皮生長因子受體3 (HER3)、細胞核受體共活化劑3 (NCOA3)及微小染色體維持蛋白複合組份4及6 (分別係MCM4及MCM6)往往存在於癌細胞中及/或有所升高，而生長抑制蛋白3及4 (分別係ING3及ING4)往往不存在或相對於正常細胞有所減少。

在一些情況下，癌細胞可選自使用至少兩種描述癌症之標記物之解離細胞試樣。舉例而言，兩種或更多種標記物可包含形態標記物、至少一種陽性標記物(例如存在於癌細胞中及/或有所升高之標記物)及/或至少一種陰性標記物(例如不存在或相對於正常細胞有所減少之標記物)或其任一組合。在某些模式中，B細胞(例如記憶B細胞、血漿B細胞或諸如此類及其組合)及/或癌細胞可藉由FACS選自解離細胞試樣。或者或另外，B細胞(例如記憶B細胞、血漿B細胞或諸如此類及其組合)及/或癌細胞亦可藉由使用基於磁珠之分選而選自解離試樣。該選擇可富集關於表現CD27 (或一些其他記憶B細胞標記物)之B細胞或關於表現CD138 (或一些其他漿細胞標記物)之B細胞之試樣。該選擇可為陽性(例如基於B細胞專一性或癌

細胞專一性標記物)。或者，該選擇可為陰性。舉例而言，可使用業內熟知之技術自解離細胞試樣消耗非B細胞細胞類型，例如使用DYNABEADS™未受損人類B細胞試劑(Thermo Fisher)、B細胞分離套組(Miltenyi)、RosetteSep人類B細胞富集混合劑(Stem Cell Technologies)或諸如此類處理試樣。作為另一實例，該選擇可消耗表現IgM抗體、IgA抗體、IgD抗體、IgG抗體或其任一組合之B細胞之試樣。或者或另外，可使用微流體器件選擇B細胞及/或癌細胞，如下文進一步所論述。

B. B細胞在微流體器件中及其內之加載及移動

可藉由使試樣細胞流經器件中之入口且進入流動區中來將解離細胞試樣(視情況如上文所論述進行分級分離)加載至微流體器件中。舉例而言，圖4中所顯示之方法400之步驟440將解離細胞試樣加載至微流體器件中。在一些實施例中，流動區包含流動通道(或微流體通道)，且加載解離細胞試樣包含使細胞流入流動通道中。

在將解離細胞試樣加載至微流體器件之流動區(或流動通道)中後，試樣中之B細胞可移動至微流體器件之分離區中。舉例而言，如方法400之步驟450中所圖解說明(圖4)，B細胞可自流動區(或流動通道)移動至一或多個分離區中，該一或多個分離區可位於與流動區(或流動通道)在流體上連結且通到流動區(或流動通道)之分離室內。B細胞可為(例如) CD27⁺ B細胞或CD138⁺ B細胞。在一些實施例中，B細胞係記憶B細胞。在其他實施例中，B細胞係漿細胞。如本文所概述，可藉由各種方式來移動B細胞，包含使用重力(例如藉由翻轉微流體器件)、誘導局部化流體流動(例如藉由按壓或抽拉微流體器件中位於毗鄰或鄰近分離區處之可變形表面)、施加介電電泳(DEP)力(例如藉由光電鑷夾(OET))或其任一組合。

在一些情況下，在加載解離細胞試樣之前，該方法進一步包括使用至少一種可檢測標記物標記解離細胞試樣中之B細胞。標記物可為B細胞專一性標記物，例如本文所揭示之任一B細胞標記物(例如CD19、CD20、IgM、IgD、CD38、CD27、CD138、PNA、GL7及諸如此類)。基於可檢測標記物之檢測(例如在藉由施加DEP力來移動B細胞之實施例中)，標記物可有助於選擇用於移動之B細胞。或者，可檢測標記物可結合至非B細胞標記物(例如T細胞標記物或癌細胞相關標記物)。在該等情況下，可基於可檢測標記物之缺乏來選擇用於移動之B細胞。

加載至微流體器件之分離區中之B細胞可包含不同B細胞類型(例如記憶B細胞、漿細胞及諸如此類)之混合物。在一些實施例中，可期望選擇漿細胞來移動至分離區中。在一些實施例中，可期望選擇表現IgG型抗體之B細胞來移動至分離區中。

在一些情況下，僅一種B細胞移動至每一分離區中，不論是否加載所有分離區。在其他情況下，B細胞可最初彙集至一或多個分離區中，且隨後分離至個別分離區中(亦即每一分離區具有一種B細胞)。在篩選用於製造結合至癌細胞之抗體之B細胞時，較後實施例容許較大通量。僅將一種B細胞置入每一分離區中容許B細胞之純系擴增，此可促進配對重鏈及輕鏈可變結構域序列之鑑別。

在某些實施例中，在將癌細胞相關抗原加載至微流體器件中之前，將B細胞加載至微流體器件中且使其移動至分離區中。在其他實施例中，在將癌細胞相關抗原加載至微流體器件中且使其移動至分離區中之後，將B細胞加載至微流體器件中且使其移動至分離區中。在其他實施例中，將B細胞及癌細胞相關抗原同時加載至微流體器件中(例如作為包含B細胞及

癌細胞之解離細胞試樣之一部分)。在一些實施例中，在將B細胞加載至分離區中後，其保留於其中直至已鑑別至少一種製造能夠結合至癌細胞相關抗原之抗體之B細胞之後為止。

C. 製造抗體之B細胞與癌細胞相關抗原之相互作用

所揭示方法包含檢測B細胞是否表現專一性結合至癌細胞相關抗原之抗體之步驟。例如參見圖4中之方法400之步驟470。為檢測該表現，所表現抗體必須容許與癌細胞相關抗原相互作用。

癌細胞相關抗原可係簡單或複雜的；抗原可為蛋白質、碳水化合物基團或鏈、除蛋白質或碳水化合物外之生物或化學試劑或其任一組合上之表位；表位可為線性或構象。癌細胞相關抗原可為獨特鑑別癌細胞(例如一或多種特定類型之癌細胞)或在癌細胞上與其表現於正常細胞上時相比有所上調之抗原。通常，癌細胞相關抗原存在於癌細胞之表面上，由此確保其可由抗體識別。抗原可與任一類型癌細胞(包含任一類型可發現於業內已知或本文所闡述之腫瘤中之癌細胞)有關。特定而言，抗原可與肺癌、乳癌、黑素瘤及諸如此類有關。如本文中所使用，在用於提及抗原時，術語「與癌細胞有關」意指，抗原係由癌細胞直接製造或源自癌細胞與正常細胞之間之相互作用。

可在本文所闡述之微流體器件中檢測B細胞表現之抗體是否專一性結合至癌細胞相關抗原。特定而言，微流體器件可包含具有流動區(例如微流體通道)及隔離室之包殼。隔離室可包含分離區及連結區，連結區提供分離區與流動區之間之流體連結。隔離室可具有約0.5 nL至約5.0 nl或其中之任一範圍之體積(例如約0.5 nl至約1.0 nl、約0.5 nl至約1.5 nl、約0.5 nl至約2.0 nl、約1.0 nl至約1.5 nl、約1.0 nl至約2.0 nl、約1.0 nl至約2.5

nl、約1.5 nl至約2.0 nl、約1.5 nl至約2.5 nl、約1.5 nl至約3.0 nl、約2.0 nl至約2.5 nl、約2.0 nl至約3.0 nl、約2.0 nl至約3.5 nl、約2.5 nl至約3.0 nl、約2.5 nl至約3.5 nl、約2.5 nl至約4.0 nl、約3.0 nl至約3.5 nl、約3.0 nl至約4.0 nl、約3.0 nl至約4.5 nl、約3.5 nl至約4.0 nl、約3.5 nl至約4.5 nl、約3.5 nl至約5.0 nl、約4.0 nl至約4.5 nl、約4.0 nl至約5.0 nl、約4.5 nl至約5.0 nl或由前述終點中之一者界定之任一範圍)。連結區可具有如本文所概述之寬度 W_{con} (例如約20微米至約100微米或約30微米至約60微米)。分離區可同樣具有如本文所概述之寬度 W_{iso} (舉例而言，分離區之寬度 W_{iso} 可大於連結區之寬度 W_{con})。在某些實施例中，分離區具有約50微米至約250微米之寬度 W_{iso} 。

流動區、隔離室及/或隔離室之分離區可包含至少一個經促進抗體表現B細胞(例如記憶B細胞或漿細胞)之存活力之塗覆材料塗覆的表面。如上下文中所使用，「促進存活」意指，B細胞在塗覆表面上之存活優於未塗覆之等效表面。在某些實施例中，流動區、隔離室及/或分離區具有複數個各自經促進B細胞之存活力之塗覆材料塗覆之表面。塗覆材料可為業內已知及/或本文所闡述之任一適宜塗覆材料。塗覆材料可(例如)包括親水性分子。親水性分子可選自由以下組成之群：包含聚乙二醇(PEG)之聚合物、包括碳水化合物基團之聚合物、包含胺基酸之聚合物及其組合。

流動區、隔離室及或隔離室之分離區可包含至少一個促進B細胞(例如記憶B細胞或漿細胞)之存活力之條件化表面。如上下文中所使用，「促進存活」意指，B細胞在條件化表面上之存活優於未條件化之等效表面。在某些實施例中，流動區、隔離室及/或分離區具有複數個表面各自能夠促進B細胞之存活力之條件化。條件化表面可包括以共價方式連接之分

子。以共價方式連接之分子可為業內已知及/或所本文揭示之任一適宜分子，包含(例如)以共價方式連接之親水性分子。親水性分子可選自由以下組成之群：包含聚乙二醇(PEG)之聚合物、包括碳水化合物基團之聚合物、包含胺基酸之聚合物及其組合。親水性分子可形成以共價方式連接之親水性分子之層，如本文所闡述。

檢測表現專一性結合至癌細胞相關抗原之抗體之B細胞可包含將癌細胞相關抗原引入微流體器件中，從而抗原位於B細胞近端。將癌細胞相關抗原引入微流體器件中可包含(例如)使含有癌細胞相關抗原之流體介質流入微流體器件之流動區中且在癌細胞相關抗原位於B細胞近端時停止流體介質流。B細胞之「近端」位置可位於B細胞之1毫米(mm)內(例如在B細胞之750微米內、600微米內、500微米內、400微米內、300微米內、200微米內、100微米內或50微米內)。

癌細胞相關抗原可提供為微小物體之一部分，微小物體可為業內已知及/或本文所闡述之任一適宜微小物體(例如細胞、脂質體、脂質奈米載具或珠粒)。因此，將癌細胞相關抗原引入微流體器件可包含將此一微小物體定位於毗鄰B細胞位於其中之隔離室之連結區或定位於其內。或者，引入癌細胞相關抗原可包含使此一微小物體移動至B細胞位於其中之隔離室之分離區中。

微小物體可包括自癌細胞分級分離之抗原，例如發現於癌細胞膜製劑中之膜相關抗原。該等經分離膜相關抗原可偶聯至珠粒以製造所揭示方法中所使用之微小物體。或者，微小物體可包括實質上純之抗原(例如純化蛋白)。將抗原分子(例如純化蛋白、細胞膜製劑及諸如此類)偶聯至珠粒之方法在業內已知及/或闡述於本文之實例中。在其他實施例中，微小

物體可為細胞，例如癌細胞(例如自患者試樣分離)或癌細胞系之細胞。

如上文所指示，可藉由使微小物體流經器件中之入口且進入流動區中來將微小物體(例如癌細胞或抗原偶聯之珠粒)加載至微流體器件中(用於檢測抗體結合)。在一些實施例中，流動區包含流動通道，且加載微小物體包含使微小物體流入流動通道中。

在一些實施例中，將微小物體加載至微流體器件之流動區(或流動通道)中且使其保留於流動區(或流動通道)中直至自微流體器件輸出為止。在一些實施例中，微小物體不進入分離區中。在一些實施例中，除滯留於流動區(或流動通道)中外，微小物體亦進入分離室之連結區中。在該等實施例中之任一者中，可以至少約 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 或 1×10^8 個微小物體/ml之濃度將微小物體(例如癌細胞或抗原偶聯珠粒)加載至流動區(或流動通道)中。

在一些實施例中，使微小物體移動至微流體器件中之至少一個分離區中。對於B細胞而言，可藉由各種方式來移動微小物體(例如癌細胞或抗原偶聯珠粒)，包含使用重力(例如藉由翻轉微流體器件)、誘導局部化流體流動(例如藉由按壓或抽拉微流體器件中位於毗鄰或遠離分離區處之可變形表面)、施加介電電泳(DEP)力(例如藉由光電鑷夾(OET))或其任一組合。在該等實施例中，可使一或多個(例如僅1、約2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個或約1至20、1至10、1至5、1至3、1至2)個微小物體移動至微流體器件中之個別分離區中，由此取得至少一個具有經分離微小物體或經分離微小物體之組之分離區。經分離微小物體及B細胞可置於相同分離區中。或者，經分離微小物體及B細胞可置於不同分離區中(例如在毗鄰分離區中)。

不論微流體器件中之微小物體之期望位置如何，可在將癌細胞加載至微流體器件中之前使用一或多種可檢測標記物來標記作為癌細胞之微小物體。若期望模式包含使至少一種癌細胞移動至至少一個分離區中，則可使用可檢測標記物來選擇至少一種用於移動之癌細胞。或者或另外，可使用細胞大小、細胞形狀、細胞核大小或細胞核結構之形態評價來選擇至少一種用於移動之癌細胞。亦可藉由細胞標記物之不存在且視情況與形態評價進行組合來選擇癌細胞。

在某些實施例中，癌細胞源自自獲取自患者之一或多種實體腫瘤試樣取得之解離細胞試樣，且由此係患者之自有癌細胞。如上文所論述，可自解離細胞試樣選擇(或分級分離)癌細胞及/或可將癌細胞作為含有B細胞之同一解離細胞試樣之一部分加載至微流體器件中。在某些實施例中，在針對製造能夠結合至癌細胞之抗體來分析B細胞之前，將癌細胞培養及/或選殖。該培養及/或選殖可在微流體器件內實施或在將癌細胞加載至微流體器件中之前實施(例如使用用於選擇、培養及/或選殖來自腫瘤試樣之癌細胞之習用技術)。無論如何，可將癌細胞選擇、培養及/或選殖至至少約 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 或 1×10^8 個細胞/ml 之濃度。

如業內所眾所周知，衍生自腫瘤之癌細胞群體可在構成群體之個別細胞之形態及基因特性方面相對異質。舉例而言，該群體可含有癌症幹細胞(其可緩慢分裂)及更大程度分化之癌細胞(其可更快速地分裂且可含有促癌突變之不同子組)。可使用癌細胞之基於標記物之選擇及/或選殖來提供較均質之細胞群體。因此，在某些實施例中，在一些實施例中，可將複數個異質癌細胞加載於微流體器件上。或者，可在加載於微流體器件上之前選擇及選殖個別癌細胞。因此，在其他實施例中，可將實質上均質之癌

細胞群體加載至微流體器件中且用於鑑別製造能夠結合至癌細胞之抗體之B細胞。實質上均質群體可為衍生自提供至少一種腫瘤之患者或來自不同患者之癌細胞系。

在其他實施例中，提供癌細胞相關抗原可涉及使包括可溶性抗原之溶液流經微流體器件之流動區且使可溶性抗原擴散至B細胞所位於之隔離室中。該可溶性抗原可以共價方式結合至可檢測標記(例如螢光標記)。

D. B細胞之結合檢測及處理

可以各種方式來檢測由B細胞所製造抗體至癌細胞相關抗原之結合。舉例而言，在將癌細胞引入微流體器件中時，可檢測細胞結塊，例如可發生於凝集分析中。或者，可添加二級抗體(例如偶聯至標記(例如螢光標記)之抗人類抗體)以標記已結合有抗體之微小物體(例如癌細胞或抗原偶聯之珠粒)。因此，在一些實施例中，該方法進一步包括在癌細胞相關抗原之前或同時提供經標記抗體結合劑。在該等實施例中，監測抗原至由B細胞所表現抗體之結合可涉及檢測經標記抗體結合劑至癌細胞相關抗原之間接結合。經標記抗體結合劑可為經標記抗IgG抗體，其可經螢光標記。在某些實施例中，以與癌細胞相關抗原之混合物形式來提供經標記抗體結合劑。在其他實施例中，在提供癌細胞相關抗原之後提供經標記抗體結合劑。

在某些實施例中，該方法可進一步包括鑑別至少一種表現抗體之B細胞(例如漿細胞或記憶B細胞)，如表現專一性結合至癌細胞相關抗原之抗體。如下文更詳細論述，微流體器件可包括容許觀察信號(例如癌細胞結塊或標記在微小物體表面處之累積)之成像器件。舉例而言，成像器件可使微流體器件週期性成像且可檢測該信號隨時間之任一增加。可(例如)每

數秒(例如每5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60秒或更長)或每數分鐘(例如每2、3、4、5、6、7、8、9、10分鐘或更長)來取得影像。在一些實施例中，可使複數個影像彼此上下疊加，由此產生「加和」影像，該影像具有平均化背景信號且在真實信號與背景信號之間產生較佳對比之一般效應。信號檢測可為人工(例如發生於人們審查影像時)或自動化(例如使用適當影像分析軟體)。

在檢測到癌細胞相關抗原與由B細胞所製造抗體之間之結合後，可立即鑑別製造該等抗體之B細胞且可描述及/或記錄其位置(例如其所位於之分離區或分離室)。視情況，在已檢測到抗體結合至癌細胞後，可立即沖洗流動區(或流動通道)。該沖洗可發生於鑑別製造結合至癌細胞相關抗原(例如癌細胞或抗原偶聯珠粒)之抗體之B細胞之前或之後。作為另一可選步驟，可自微流體器件棄除不製造能夠結合癌細胞相關抗原之抗體之B細胞。

在某些實施例中，可自微流體器件輸出鑑別為製造結合至癌細胞相關抗原之抗體之B細胞。舉例而言，為分離B細胞以用於測序(例如抗體重鏈及輕鏈可變區之測序)或雜交瘤製備，可自微流體器件輸出製造結合至癌細胞之抗體之B細胞。在一些情況下，個別地輸出每一細胞或選殖細胞之群體。

E. B細胞活化之刺激

在前述實施例中之任一者中，可在有助於製造抗體之條件下培育移動至微流體器件中之分離區中之B細胞。在一些情況下，彼等抗體可擴散穿過微流體器件中之介質到達癌細胞相關抗原(不論由癌細胞或抗原偶聯珠粒包括抑或呈溶液形式；及不論處於同一分離區、主要流動通道抑或毗

鄰分離區中)之位置。在毗鄰分離區之情況下，在一些微流體器件中，在兩個毗鄰分離區之間之薄壁中存在小間隙，從而容許抗體自一個分離區直接擴散至另一分離區中且無需進入主要流動通道中以擴散至毗鄰分離區中。該等小間隙容許抗體進行擴散，但不容許癌細胞或B細胞離開分離區。

在一些情況下，檢測表現專一性結合至癌細胞相關抗原之抗體之B細胞可包含使B細胞與刺激B細胞活化之刺激劑接觸的步驟。刺激劑可為CD40激動劑，例如CD40L、其衍生物或抗CD40抗體。因此，刺激劑可包括CD40L+餵養細胞、基本上由其組成或由其組成。CD40L+餵養細胞可為T細胞(例如Jurkat D1.1細胞)或其衍生物。或者，餵養細胞可為經CD40L表現構築體轉染/轉變之細胞系(例如NIH-3T3細胞)。刺激劑進一步包括類鐸受體(TLR)激動劑(例如TLR9激動劑)。TLR激動劑可為(例如)CpG寡核苷酸(例如CpG2006)。CpG寡核苷酸可以約1微克/mL至約20微克/mL(例如約1.5微克/mL至約15微克/mL、約2.0微克/mL至約10微克/mL或約2.5微克/mL至約5.0微克/mL)之濃度使用。可使B細胞與刺激劑接觸(例如實質上連續或週期性/間歇性)1至10天(例如兩天至八天、三天至七天或四天至六天)之時段。

檢測表現專一性結合至癌細胞相關抗原之抗體之B細胞可進一步包含向B細胞提供包括一或多種促進B細胞擴增之生長誘導劑之培養基的步驟。一或多種生長誘導劑可包含至少一種選自由以下組成之群之試劑：IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-21及BAFF。IL-2及/或IL-4可以約10 ng/mL至約1微克/mL之濃度提供。IL-6、IL-10及/或IL-21可以約10 ng/mL至約100 ng/mL之濃度提供。BAFF可以約10 ng/mL至約50 ng/mL

之濃度提供。在某些實施例中，將培養基提供至B細胞保持1至10天(例如兩天至八天、三天至七天或四天至六天)之時段。培養基可包括刺激劑(例如CD40激動劑及/或TLR激動劑)。因此，舉例而言，可與使B細胞與活化劑接觸同時來向B細胞提供培養基。在某些實施例中，使B細胞淋巴球與刺激劑接觸且向B細胞淋巴球提供培養基之步驟係在重疊時間內(例如經實質上伸及相同時間期)實施。另外，作為另一可選步驟，可在微流體器件中將B細胞培養成純系群體。該培養可發生(例如)約2至3天及/或直至細胞計數為約8至20個細胞。

III. 微流體器件

A. 微流體器件術語

在一些實施例中，微流體器件可包括「掃略」區及「非掃略」區。非掃略區可在流體上連結至掃略區，條件係流體連結經結構化以使得能夠發生擴散，但實質上介質在掃略區與非掃略區之間並無流動。微流體器件可由此經結構化以實質上分離非掃略區與掃略區中之介質流，同時使得能夠在掃略區與非掃略區之間實質上僅達成擴散性流體連通。

可在此一微流體器件中分析生物微小物體(例如生物細胞)製造特定生物材料(例如蛋白質，例如抗體)之能力。舉例而言，可將包括擬針對製造所關注分析物(例如抗體)進行分析之生物微小物體(例如B細胞)之試樣材料加載至微流體器件之掃略區中。可選擇某些具有特定特性之生物微小物體且佈置於非掃略區中。然後可使剩餘試樣材料流出掃略區且使分析材料流入掃略區中。因所選生物微小物體處於非掃略區中，故所選生物微小物體實質上不受剩餘試樣材料之流出或分析材料之流入影響。所選生物微小物體可容許製造所關注分析物，該所關注分析物可自非掃略區擴散至掃略

區中，其中所關注分析物可與分析材料發生反應以製造局部化可檢測反應，該等局部化可檢測反應中之每一者可與特定非掃略區相關。可分析與所檢測反應有關之任何非掃略區以測定非掃略區中之何種(若存在)生物微小物體係所關注分析物之充分製造者。

B. 包含微流體器件之系統

圖1A闡釋可用於在活體外分離及篩選腫瘤源B細胞之微流體器件100及系統150之一實例。顯示具有蓋110之部分剖視圖之微流體器件100之透視圖以提供微流體器件100之部分視圖。微流體器件100通常包括含有流體介質180可流經之流動路徑106之微流體迴路120，該流體介質視情況攜載一或多種微小物體(未顯示)進入及/或穿過微流體迴路120。儘管在圖1A中圖解說明單一微流體迴路120，但適宜微流體器件可包含複數個(例如2或3個)該等微流體迴路。無論如何，微流體器件100可構形為奈米流體器件。如圖1A中所圖解說明，微流體迴路120可包含複數個微流體隔離室124、126、128及130，其中每一隔離室具有一或多個與流動路徑106流體連通之開口。在圖1A之器件之一些實施例中，隔離室僅具有與流動路徑106流體連通之單一開口。如下文進一步所論述，微流體隔離室包括多個經最佳化以將微小物體保留於微流體器件(例如微流體器件100)中(即使在介質180流經流動路徑106時)之特徵及結構。然而，在轉向前文之前，提供微流體器件100及系統150之簡單闡述。

如圖1A中所大致圖解說明，微流體迴路120係由包殼102界定。儘管包殼102可在物理上以不同構形進行結構化，但在圖1A中所顯示之實例中，將包殼102繪示為包括支撐結構104 (例如基底)、微流體迴路結構108及蓋110。支撐結構104、微流體迴路結構108及蓋110可彼此附接。舉例

而言，微流體迴路結構108可佈置於支撐結構104之內表面109上，且蓋110可佈置於微流體迴路結構108上。微流體迴路結構108與支撐結構104及蓋110一起可界定微流體迴路120之元件。

支撐結構104可位於微流體迴路120底部且蓋110位於其頂部，如圖1A中所圖解說明。或者，支撐結構104及蓋110可以其他定向進行構形。舉例而言，支撐結構104可位於微流體迴路120頂部且蓋110位於其底部。無論如何，可存在一或多個埠107，每一埠包括進入或離開包殼102之通路。通路之實例包含閥門、閘極、貫孔或諸如此類。如所圖解說明，埠107係由微流體迴路結構108中之間隙產生之貫孔。然而，埠107可位於包殼102之其他組件(例如蓋110)中。在圖1A中僅圖解說明一個埠107，但微流體迴路120可具有兩個或更多個埠107。舉例而言，可存在用作流體進入微流體迴路120之入口之第一埠107，且可存在用作流體離開微流體迴路120之出口之第二埠107。埠107係用作入口抑或出口可取決於流體流經流動路徑106之方向。

支撐結構104可包括一或多個電極(未顯示)及基板或複數個互連基板。舉例而言，支撐結構104可包括一或多個半導體基板，其中之每一者電連結至電極(舉例而言，所有半導體基板或其子組可電連結至單一電極)。支撐結構104可進一步包括印刷電路板總成(「PCBA」)。舉例而言，半導體基板可於安裝PCBA上。

微流體迴路結構108可界定微流體迴路120之迴路元件。該等迴路元件可包括在微流體迴路120經流體填充時可流體互連之空間或區域，例如流動區(其可包含或為一或多個流動通道)、室、欄、捕集器及諸如此類。在圖1A中所圖解說明之微流體迴路120中，微流體迴路結構108包括框114

及微流體迴路材料116。框114可部分地或完全包封微流體迴路材料116。框114可為(例如)實質上環繞微流體迴路材料116之相對剛性結構。舉例而言，框114可包括金屬材料。

微流體迴路材料116可經空腔或諸如此類圖案化以界定微流體迴路120之迴路元件及互連。微流體迴路材料116可包括撓性材料，例如撓性聚合物(例如橡膠、塑膠、彈性體、聚矽氧、聚二甲基矽氧烷(「PDMS」)或諸如此類)，其可為透氣性。可構成微流體迴路材料116之材料之其他實例包含模製玻璃、可蝕刻材料(例如聚矽氧(例如光可圖案化聚矽氧或「PPS」))、光阻劑(例如SU8)或諸如此類。在一些實施例中，該等材料及由此微流體迴路材料116可為剛性及/或實質上不透氣。無論如何，微流體迴路材料116可佈置於支撐結構104上及框114內側。

蓋110可為框114及/或微流體迴路材料116之整合部分。或者，蓋110可為在結構上不同之元件，如圖1A中所圖解說明。蓋110可包括與框114及/或微流體迴路材料116相同或不同之材料。類似地，支撐結構104可與框114或微流體迴路材料116係單獨結構(如所圖解說明)或係框114或微流體迴路材料116之整合部分。同樣，框114及微流體迴路材料116可為單獨結構(如圖1A中所顯示)或相同結構之整合部分。

在一些實施例中，蓋110可包括剛性材料。剛性材料可為玻璃或具有類似性質之材料。在一些實施例中，蓋110可包括可變形材料。可變形材料可為聚合物，例如PDMS。在一些實施例中，蓋110可包括剛性材料及可變形材料。舉例而言，蓋110之一或多個部分(例如一或多個定位於隔離室124、126、128、130上方之部分)可包括與蓋110之剛性材料界接之可

變形材料。在一些實施例中，蓋110可進一步包含一或多個電極。一或多個電極可包括導電氧化物(例如氧化銦錫(ITO))，其可塗覆於玻璃或類似絕緣材料上。或者，一或多個電極可為包埋入可變形材料(例如聚合物(例如PDMS))中之撓性電極，例如單壁奈米管、多壁奈米管、奈米線、導電奈米顆粒團簇或其組合。可用於微流體器件中之撓性電極已闡述於(例如)U.S. 2012/0325665 (Chiou等人)中，該專利之納入以引用方式併入本文中。在一些實施例中，蓋110可經改質(例如藉由條件化向內面向微流體迴路120之表面之全部或一部分)以支持細胞黏著、存活及/或生長。改質可包含塗覆合成或天然聚合物。在一些實施例中，蓋110及/或支撐結構104可透光。蓋110亦可包含至少一種透氣材料(例如PDMS或PPS)。

圖1A亦顯示用於操作及控制微流體器件(例如微流體器件100)之系統150。系統150包含電源192、成像器件194及傾斜器件190。

電源192可向微流體器件100及/或傾斜器件190提供電力，從而視需要提供偏壓電壓或電流。電源192可(例如)包括一或多個交流電(AC)及/或直流電(DC)電壓或電流來源。成像器件194可包括用於捕獲微流體迴路120內之影像之器件(例如數位照相機)。在一些情況下，成像器件194進一步包括具有快速框速率及/或高敏感性之檢測器(例如用於低光應用)。成像器件194亦可包含用於將刺激輻射及/或光束引導至微流體迴路120中且收集自微流體迴路120 (或其中所含之微小物體)反射或發射之輻射及/或光束之機構。所發射光束可處於可見光譜中且可(例如)包含螢光發射。所反射光束可包含源自LED或寬光譜燈(例如汞燈(例如高壓汞燈)或氙弧燈)之反射發射。如針對圖3B所論述，成像器件194可進一步包含顯微鏡(或光學

元件串)，其可或可不包含目鏡。

系統150進一步包括經構形以使微流體器件100圍繞一或多個旋轉軸旋轉之傾斜器件190（傾斜模組166之一部分，論述於下文中）。在一些實施例中，傾斜器件190經構形以圍繞至少一個軸支撐及/或固持包括微流體迴路120之包殼102，從而微流體器件100（及由此微流體迴路120）可保持於水平定向（亦即相對於x軸及y軸為 0° ）、垂直定向（亦即相對於x軸及/或y軸為 90° ）或其間之任一定向。微流體器件100（及微流體迴路120）相對於軸之定向在本文中稱為微流體器件100（及微流體迴路120）之「斜度」。舉例而言，傾斜器件190可使微流體器件100相對於x軸傾斜 0.1° 、 0.2° 、 0.3° 、 0.4° 、 0.5° 、 0.6° 、 0.7° 、 0.8° 、 0.9° 、 1° 、 2° 、 3° 、 4° 、 5° 、 10° 、 15° 、 20° 、 25° 、 30° 、 35° 、 40° 、 45° 、 50° 、 55° 、 60° 、 65° 、 70° 、 75° 、 80° 、 90° 或其間之任一度數。水平定向（及因此指x軸及y軸）定義為與重力所界定之垂直軸垂直。傾斜器件亦可使微流體器件100（及微流體迴路120）相對於x軸及/或y軸傾斜超過 90° 之任一度數，或使微流體器件100（及微流體迴路120）相對於x軸或y軸傾斜 180° ，以完全倒轉微流體器件100（及微流體迴路120）。類似地，在一些實施例中，傾斜器件190使微流體器件100（及微流體迴路120）圍繞由流動路徑106或微流體迴路120之一些其他部分界定之旋轉軸發生傾斜。

在一些情況下，使微流體器件100傾斜成垂直定向，從而使流動路徑106定位於一或多個隔離室上方或下方。本文所用之術語「上方」表示，流動路徑106定位於高於由重力界定之垂直軸上之一或多個隔離室處（亦即，流動路徑106上方之隔離室中之物體之重力勢能高於流動路徑中之物

體)。本文所用之術語「下方」表示，流動路徑106定位於低於由重力界定之垂直軸上之一或多個隔離室處(亦即，流動路徑106下方之隔離室中之物體之重力勢能低於流動路徑中之物體)。

在一些情況下，傾斜器件190使微流體器件100依隨與流動路徑106平行之軸發生傾斜。此外，微流體器件100可傾斜至小於90°之角度，從而流動路徑106位於一或多個隔離室上方或下方，而且不會位於隔離室正上方或正下方。在其他情況下，傾斜器件190使微流體器件100依隨與流動路徑106垂直之軸發生傾斜。在其他情況下，傾斜器件190使微流體器件100依隨與流動路徑106既不平行亦不垂直之軸發生傾斜。

系統150可進一步包含介質源178。介質源178 (例如容器、儲槽或諸如此類)可包括多個分段或容器，每一分段或容器用於容納不同流體介質180。因此，介質源178可為位於微流體器件100外部且與其隔開之器件，如圖1A中所圖解說明。或者，介質源178可整體或部分對位於位於微流體器件100之包殼102內側。舉例而言，介質源178可包括作為微流體器件100之一部分之儲槽。

圖1A亦圖解說明構成系統150之一部分且可與微流體器件100聯合利用之控制及監測設備152之實例之簡化方塊圖繪示圖。如所顯示，該控制及監測設備152之實例包含主控制器154，該主控制器包括介質模組160 (用於控制介質源178)、動力模組162 (用於控制微流體迴路120中之微小物體(未顯示)及/或介質(例如介質液滴)之移動及/或選擇)、成像模組164 (用於控制用於捕獲影像(例如數位影像)之成像器件194 (例如照相機、顯微鏡、光源或其任一組合))及傾斜模組166 (用於控制傾斜器件190)。控制設備152亦可包含其他模組168以用於控制、監測或實施關於微流體器件

100之其他功能。如所顯示，設備152可進一步包含顯示器件170及輸入/輸出器件172。

主控制器154可包括控制模組156及數位記憶體158。控制模組156可包括(例如)舉經構形以根據儲存為記憶體158中之非暫時性資料或信號之機器可執行指令(例如軟體、韌體、源代碼或諸如此類)進行操作之數位處理器。或者或另外，控制模組156可包括硬連線數位電路及/或模擬電路。介質模組160、動力模組162、成像模組164、傾斜模組166及/或其他模組168可具有類似構形。因此，在本文中論述為針對微流體器件100或任一其他微流體裝置來實施之功能、製程動作、作用或製程步驟可藉由如上文所論述構形之主控制器154、介質模組160、動力模組162、成像模組164、傾斜模組166及/或其他模組168中之任一者或多者來實施。類似地，主控制器154、介質模組160、動力模組162、成像模組164、傾斜模組166及/或其他模組168可以通信方式耦合以傳輸及接收用於本文所論述之任一功能、製程、動作、作用或步驟中之資料。

介質模組160控制介質源178。舉例而言，介質模組160可控制介質源178以將所選流體介質180輸入包殼102中(例如經由入口埠107)。介質模組160亦可控制介質自包殼102之去除(例如經由出口埠(未顯示))。可由此將一或多種介質選擇性輸入微流體迴路120中及自其去除。介質模組160亦可控制流體介質180在微流體迴路120內側之流動路徑106中之流動。舉例而言，在一些實施例中，在傾斜模組166使傾斜器件190將微流體器件100傾斜至期望傾斜角度之前，介質模組160使介質180在流動路徑106中及穿過包殼102之流動停止。

動力模組162可經構形以控制微小物體(未顯示)在微流體迴路120中

之選擇、捕集及移動。如下文針對圖1B及1C所論述，包殼102可包括介電電泳(DEP)、光電鎔夾(OET)及/或光電潤濕(OEW)構形(未顯示於圖1A中)，且動力模組162可控制電極及/或電晶體(例如光電晶體)之激活以選擇及移動流動路徑106及/或隔離室124、126、128、130中之微小物體(未顯示)及/或介質液滴(未顯示)。

成像模組164可控制成像器件194。舉例而言，成像模組164可接收及處理來自成像器件194之影像資料。來自成像器件194之影像資料可包括任一類型由成像器件194所捕獲之資訊(例如微小物體、介質液滴之存在或不存在、標記(例如螢光標記)之累積等)。使用由成像器件194所捕獲之資訊，成像模組164可進一步計算物體(例如微小物體、介質液滴)之位置及/或該等物體在微流體器件100內之運動速率。

傾斜模組166可控制傾斜器件190之傾斜運動。或者或另外，傾斜模組166可控制傾斜速率及時序以最佳化微小物體經由重力至一或多個隔離室之轉移。傾斜模組166以通信方式與成像模組164耦合以接收闡述微小物體及/或介質液滴在微流體迴路120中之運動之資料。使用此資料，傾斜模組166可調節微流體迴路120之傾斜以調節微小物體及/或介質液滴在微流體迴路120中之移動速率。傾斜模組166亦可使用此資料來迭代調節微小物體及/或介質液滴在微流體迴路120中之位置。

在圖1A中所顯示之實例中，將微流體迴路120圖解說明為包括微流體通道122及隔離室124、126、128、130。每一欄包括通道122開口，但包封其他地方，從而欄可實質上分隔欄內側之微小物體及通道122之流動路徑106或其他欄中之流體介質180及/或微小物體。隔離室之壁自基底之內表面109延伸至蓋110之內表面以提供包殼。欄至微流體通道122之開口

定向於相對於流體介質180之流106呈一定角度處，從而並不將流106引導至欄中。流可為切向或垂直於欄開口之平面。在一些情況下，欄124、126、128、130經構形以物理包圍微流體迴路120內之一或多種微小物體。本發明隔離室可包括經最佳化以與DEP、OET、OEWS、流體流及/或重力一起使用之各種形狀、表面及特徵，如下文所詳細論述及顯示。

微流體迴路120可包括任一數量之微流體隔離室。儘管顯示5個隔離室，但微流體迴路120可具有更少或更多個隔離室。如本文中所使用，術語「隔離室」及「隔離欄」可互換使用。如所顯示，微流體迴路120之微流體隔離室124、126、128及130各自包括不同特徵及形狀，該等不同特徵及形狀可提供一或多種可用於檢測細胞專一性抗體分泌(例如分離一種B細胞與毗鄰B細胞)之益處。在一些實施例中，微流體迴路120包括複數個相同微流體隔離室。

在一些實施例中，微流體迴路120包括複數個微流體隔離室，其中兩個或更多個隔離室包括提供維持不同類型細胞之不同益處之不同結構及/或特徵。一非限制性實例可包含將B細胞維持於一類欄中，而將癌細胞維持於不同類型之欄中。

在圖1A中所圖解說明之實施例中，顯示單一通道122及流動路徑106。然而，其他實施例可含有多個通道122，每一通道經構形以包括流動路徑106。微流體迴路120進一步包括與流動路徑106及流體介質180流體連通之入口閥門或埠107，藉此流體介質180可經由入口埠107到達通道122。在一些情況下，流動路徑106包括單一路徑。在一些情況下，以Z字形圖案配置單一路徑，藉此流動路徑106以交替方向跨越微流體器件100兩次或更多次。

在一些情況下，微流體迴路120包括複數個平行通道122及流動路徑106，其中每一流動路徑106內之流體介質180在相同方向上流動。在一些情況下，每一流動路徑106內之流體介質在正向方向或反向方向中之至少一者中發生流動。在一些情況下，構形複數個隔離室(例如相對於通道122)，從而可向隔離室平行加載目標微小物體。

在一些實施例中，微流體迴路120進一步包括一或多個微小物體捕集器132。捕集器132通常以形成通道122之邊界之壁形成，且可定位於相對於微流體隔離室124、126、128、130中之一或多者之開口處。在一些實施例中，捕集器132經構形以接收或捕獲來自流動路徑106之單一微小物體。在一些實施例中，捕集器132經構形以接收或捕獲複數個來自流動路徑106之微小物體。在一些情況下，捕集器132包括大約等於單一目標微小物體之體積之體積。

捕集器132可進一步包括經構形以有助於靶定微小物體流入捕集器132中之開口。在一些情況下，捕集器132包括具有大約等於單一目標微小物體之尺寸之高度及寬度之開口，藉此防止較大微小物體進入微小物體捕集器中。捕集器132可進一步包括其他經構形以有助於使靶定微小物體滯留於捕集器132內之特徵。在一些情況下，使捕集器132與通道122中相對於微流體隔離室之開口之相對側對準且位於該側，從而在使微流體器件100圍繞平行於微流體通道122之軸傾斜時，所捕集微小物體以使得微小物體落入隔離室之開口中之軌跡離開捕集器132。在一些情況下，捕集器132包括小於目標微小物體之側通路134以促進流經捕集器132且由此增加將微小物體捕獲於捕集器132中之可能性。

在一些實施例中，經由一或多個電極(未顯示)將介電電泳(DEP)力施

加至流體介質180兩端(例如在流動路徑中及/或在隔離室中)以操縱、傳輸、分離及分選位於其中之微小物體。舉例而言，在一些實施例中，將DEP力施加至微流體迴路120之一或多個部分中以將單一微小物體自流動路徑106轉移至期望微流體隔離室中。在一些實施例中，使用DEP力來防止隔離室(例如隔離欄124、126、128或130)內之微小物體自其移位。另外，在一些實施例中，使用DEP力選擇性自隔離室去除先前根據本發明實施例所收集之微小物體。在一些實施例中，DEP力包括光電鉗夾(OET)力。

在其他實施例中，經由一或多個電極(未顯示)將光電潤濕(OEW)力施加至微流體器件100之支撐結構104 (及/或蓋110)中之一或多個位置(例如幫助界定流動路徑及/或隔離室之位置)以操縱、傳輸、分離及分選位於微流體迴路120中之液滴。舉例而言，在一些實施例中，將OEW力施加至支撐結構104 (及/或蓋110)中之一或多個位置以將單一液滴自流動路徑106轉移至期望微流體隔離室中。在一些實施例中，使用OEW力來防止隔離室(例如隔離室124、126、128或130)內之液滴自其移位。另外，在一些實施例中，使用OEW力選擇性自隔離室去除先前根據本發明實施例所收集之液滴。

在一些實施例中，將DEP及/或OEW力與其他力(例如流動及/或重力)進行組合以操縱、傳輸、分離及分選微流體迴路120內之微小物體及/或液滴。舉例而言，可使包殼102傾斜(例如藉由傾斜器件190)至位於其中之流動路徑106及微小物體高於微流體隔離室之位置，且重力可將微小物體及/或液滴傳輸至室中。在一些實施例中，可在其他力之前施加DEP及/或OEW力。在其他實施例中，可在其他力之後施加DEP及/或OEW力。在其

他情況下，可與其他力同時或與其他力以交替方式來施加DEP及/或OEW力。

圖1B、1C及2A-2H圖解說明可用於實踐本發明實施例之微流體器件之各個實施例。圖1B繪示微流體器件200構形為光學致動之電動力學器件之實施例。業內已知各自光學致動之電動力學器件，包含具有光電鎢夾(OET)構形之器件及具有光電潤濕(OEW)構形之器件。適宜OET構形之實例闡釋於下列美國專利文件(每一文件之全部內容以引用方式併入本文中)中：美國專利第RE 44,711號(Wu等人)(最初發行為美國專利第7,612,355號)；及美國專利第7,956,339號(Ohta等人)。OEW構形之實例闡釋於美國專利第6,958,132號(Chiou等人)及美國專利申請案公開案第2012/0024708號(Chiou等人)中，二者之全部內容以引用方式併入本文中。光學致動之電動力學器件之又一實例包含組合之OET/OEW構形，其實例顯示於美國專利公開案第20150306598號(Khandros等人)及第20150306599號(Khandros等人)中及其相應PCT公開案WO2015/164846及WO2015/164847中，其全部內容皆以引用方式併入本文中。

具有欄(其中可放置、培養及/或監測腫瘤源細胞(例如B細胞、T細胞或癌細胞))之微流體器件之實例已闡述於(例如)US 2014/0116881 (2013年10月22日提出申請之申請案第14/060,117號)、US 2015/0151298 (2014年10月22日提出申請之申請案第14/520,568號)及US 2015/0165436 (2014年10月22日提出申請之申請案第14/521,447號)中，其中之每一者之全部內容以引用方式併入本文中。美國申請案第14/520,568號及第14/521,447號亦闡述分析培養於微流體器件中之細胞之分泌之實例性方法。每一前述申請案進一步闡述經構形以製造介電電泳(DEP)力(例如光電鎢夾(OET))或

經構形以提供光電潤濕(OEW)之微流體器件。舉例而言，US 2014/0116881之圖2中所圖解說明之光電錄夾器件係可用於本發明實施例中以選擇及移動個別生物微小物體或生物微小物體組之器件的一實例。

C. 微流體器件動力構形。

如上所述，系統之控制及監測設備可包括動力模組以用於選擇及移動微流體器件之微流體迴路中之物體(例如微小物體或液滴)。端視所移動物體類型及其他考慮，微流體器件可具有各種動力構形。舉例而言，可利用介電電泳(DEP)構形來選擇及移動微流體迴路中之微小物體。因此，微流體器件100之支撐結構104及/或蓋110可包括DEP構形以用於在微流體迴路120中流體介質180中之微小物體上選擇性誘導DEP力且由此選擇、捕獲及/或移動個別微小物體或微小物體組。或者，微流體器件100之支撐結構104及/或蓋110可包括電潤濕(EW)構形以用於在微流體迴路120中流體介質180中之液滴上選擇性誘導EW力且由此選擇、捕獲及/或移動個別液滴或液滴組。

包括DEP構形之微流體器件200之一實例圖解說明於圖1B及1C中。儘管出於簡明目的圖1B及1C分別顯示具有區域/室202之微流體器件200之包殼102之一部分的側剖面圖及頂部剖面圖，但應理解，區域/室202可為流體迴路元件中具有較詳細結構之部分，例如生長室、隔離欄、流動區或流動通道。另外，微流體器件200可包含其他流體迴路元件。舉例而言，微流體器件200可包含複數個生長室或隔離欄及/或一或多個流動區或流動通道，例如本文針對微流體器件100所闡述者。可將DEP構形納入微流體器件200之任何該等流體迴路元件或其所選部分中。應進一步瞭解，可將上文或下文所闡述微流體器件組件及系統組件中之任一者納入微流體器件

200中及/或與其組合使用。舉例而言，上述包含控制及監測設備152之系統150可與微流體器件200一起使用，包含介質模組160、動力模組162、成像模組164、傾斜模組166及其他模組168中之一或多者。

如圖1B中可見，微流體器件200包含支撐結構104（其具有底部電極204及上覆於底部電極204上之電極激活基板206）及蓋110（其具有頂部電極210），其中頂部電極210與底部電極204間隔開。頂部電極210及電極激活基板206界定區域/室202之相對表面。區域/室202中所含之介質180含由此提供頂部電極210與電極激活基板206之間之電阻性連結。亦顯示電源212，其經構形以連結至底部電極204及頂部電極210且視需要在電極之間產生偏壓電壓以用於在區域/室202中生成DEP力。電源212可為（例如）交流電（AC）電源。

在某些實施例中，圖1B及1C中所圖解說明之微流體器件200可具有光學致動之DEP構形。因此，改變藉由動力模組162控制字來自光源216之光圖案218可選擇性激活及鈍化電極激活基板206之內表面208之區域214處DEP電極的改變圖案。（在下文中，具有DEP構形之微流體器件之區域214稱為「DEP電極區」。）如圖1C中所圖解說明，引導於電極激活基板206之內表面208上之光圖案可以一定圖案（例如正方形光圖案220）照射所選DEP電極區214a（以白色顯示）。未照射DEP電極區214（交叉陰影線）在下文中稱為「暗」DEP電極區214。貫穿DEP電極激活基板206（亦即自底部電極204直至電極激活基板206中與流動區106中之介質180界接之內表面208）之相對電阻抗大於在每一暗DEP電極區214處貫穿區域/室202中之介質180（亦即自電極激活基板206之內表面208至蓋110之頂部電極210）之相對電阻抗。然而，經照射DEP電極區214a展現貫穿電極激活基板206

之減小之相對阻抗，其小於在每一經照射DEP電極區214a處貫穿區域/室202中之介質180之相對阻抗。

在激活電源212時，前述DEP構形在經照射DEP電極區214a與毗鄰暗DEP電極區214之間之流體介質180中產生電場梯度，其繼而產生吸引或排斥流體介質180中之附近微小物體(未顯示)之局部DEP力。可由此在區域/室202之內表面208處之許多不同該等DEP電極區214藉由改變自光源216投射至微流體器件200中之光圖案218來選擇性激活及鈍化吸引或排斥流體介質180中之微小物體之DEP電極。DEP力吸引抑或排斥附近微小物體可取決於諸如電源212頻率及介質180及/或微小物體(未顯示)之介電性質等參數。

圖1C中所圖解說明之經照射DEP電極區214a之正方形圖案220僅係一實例。可藉由投射至微流體器件200中之光圖案218來照射(且由此活化)DEP電極區214之任一圖案，且可藉由改變或移動光圖案218來重複改變經照射/激活DEP電極區214之圖案。

在一些實施例中，電極激活基板206可包括光導電材料或由其組成。在該等實施例中，電極激活基板206之內表面208可為無特徵。舉例而言，電極激活基板206可包括氫化非晶型矽(a-Si:H)層或由其組成。a-Si:H可包括(例如)約8%至40%之氫(計算為 $100 \times \text{氫原子數} / \text{氫及矽原子之總數量}$)。a-Si:H層可具有約500 nm至約2.0 μm 之厚度。在該等實施例中，DEP電極區214可根據光圖案218於任一地方且以任一圖案產生於電極激活基板206之內表面208上。DEP電極區214之數量及圖案由此無需固定，但可對應於光圖案218。具有包括光導電層(例如上文所論述)之DEP構形之微流體器件之實例闡述於(例如)美國專利第RE 44,711號(Wu等人)(最

初發行為美國專利第7,612,355號)中，該專利之全部內容以引用方式併入本文中。

在其他實施例中，電極激活基板206可包括含有形成半導體積體迴路之複數個摻雜層、電絕緣層(或區域)及電導電層之基板，例如在半導體領域中所已知。舉例而言，電極激活基板206可包括複數個光電晶體(包含(例如)橫向雙極光電晶體)，每一光電晶體對應於DEP電極區214。或者，電極激活基板206可包括由光電晶體開關控制之電極(例如導電金屬電極)，其中每一該電極對應於DEP電極區214。電極激活基板206可包含該等光電晶體或光電晶體控制電極之圖案。舉例而言，圖案可為配置成列及行之實質上正方形光電晶體或光電晶體控制電極之陣列，例如圖2B中所顯示。或者，圖案可為形成六角形晶格之實質上六角形光電晶體或光電晶體控制電極之陣列。不論圖案如何，電路元件可在電極激活基板206之內表面208處之DEP電極區214與底部電極210之間形成電連結，且該等電連結(亦即光電晶體或電極)可由光圖案218選擇性激活及鈍化。在未激活時，每一電連結可具有高阻抗，從而貫穿電極激活基板206(亦即自底部電極204至電極激活基板206中與區域/室202中之介質180界接之內表面208)之相對阻抗大於在相應DEP電極區214處貫穿介質180(亦即自電極激活基板206之內表面208至蓋110之頂部電極210)之相對阻抗。然而，在藉由光圖案218中之光激活時，貫穿電極激活基板206之相對阻抗小於在每一經照射DEP電極區214處貫穿介質180之相對阻抗，由此激活如上文所論述相應DEP電極區214處之DEP電極。吸引或排斥介質180中之微小物體(未顯示)之DEP電極可由此在區域/室202中電極激活基板206之內表面208處之許多不同DEP電極區214處以取決於光圖案218的方式發生選擇性激

活及鈍化。

具有包括光電晶體之電極激活基板之微流體器件之實例已闡述於(例如)美國專利第7,956,339號 (Ohta等人)中(例如參見圖21及22中所圖解說明之器件300及其闡述)，該專利之全部內容以引用方式併入本文中。具有包括由光電晶體開關控制之電極之電極激活基板之微流體器件的實例已闡述於(例如)美國專利公開案第號2014/0124370 (Short等人)中(例如參見貫穿圖式所圖解說明之器件200、400、500、600及900及其闡述)，該專利之全部內容以引用方式併入本文中。

在DEP構形微流體器件之一些實施例中，頂部電極210係包殼102之第一壁(或蓋110)之一部分，且電極激活基板206及底部電極204係包殼102之第二壁(或支撐結構104)之部分。區域/室202可位於第一壁與第二壁之間。在其他實施例中，電極210係第二壁(或支撐結構104)之一部分且電極激活基板206及/或電極210中之一者或二者係第一壁(或蓋110)之一部分。此外，可或者使用光源216自下方照射包殼102。

對於具有DEP構形之圖1B-1C之微流體器件200而言，藉由將光圖案218投射至微流體器件200中以按環繞及捕獲微小物體之圖案(例如正方形圖案220)激活電極激活基板206之內表面208之DEP電極區214a之第一組的一或多個DEP電極，動力模組162可在區域/室202中選擇介質180中之微小物體(未顯示)。藉由相對於微流體器件200移動光圖案218以激活DEP電極區214處之第二組之一或多個DEP電極，動力模組162然後可移動原位生成之所捕獲微小物體。或者，可相對於光圖案218移動微流體器件200。

在其他實施例中，微流體器件200可具有不依賴於電極激活基板206

之內表面208處之DEP電極之光活化的DEP構形。舉例而言，電極激活基板206可包括相對於包含至少一個電極之表面(例如蓋110)定位之選擇性可定址及可激勵電極。可選擇性打開及關閉開頭(例如半導體基板中之電晶體開關)以活化或鈍化DEP電極區214處之DEP電極，由此在激活DEP電極附近之區域/室202中之微小物體(未顯示)上產生淨DEP力。端視諸如電源212頻率及區域/室202中之介質(未顯示)及/或微小物體之介電性質等特性，DEP力可吸引或排斥附近之微小物體。藉由選擇性激活及鈍化一組DEP電極(例如在形成正方形圖案220之一組DEP電極區214處)，區域/室202中之一或多種微小物體可捕集於區域/室202內且在其中移動。圖1A中之動力模組162可控制該等開關且由此激活及鈍化個別DEP電極以選擇、捕集及移動區域/室202周圍之特定微小物體(未顯示)。具有包含選擇性可定址及可激勵電極之DEP構形之微流體器件在業內已知且已闡述於(例如)中美國專利第6,294,063號(Becker等人)及第6,942,776號(Medoro)中，該等專利之全部內容以引用方式併入本文中。

作為又一實例，微流體器件200可具有電潤濕(EW)構形，其可代替DEP構形或可位於微流體器件200中與具有DEP構形之部分間隔開之部分中。EW構形可為光電潤濕構形或介電潤濕(EWOD)構形，二者皆在業內已知。在一些EW構形中，支撐結構104具有夾於介電層(未顯示)與底部電極204之間之電極激活基板206。介電層可包括疏水性材料及/或可經疏水性材料塗覆，如下文所闡述。對於具有EW構形之微流體器件200而言，支撐結構104之內表面208係介電層或其疏水性塗層之內表面。

介電層(未顯示)可包括一或多個氧化物層，且可具有約50 nm至約250 nm (例如約125 nm至約175 nm)之厚度。在某些實施例中，介電層可

包括氧化物(例如金屬氧化物(例如氧化鋁或氧化鉛))之層。在某些實施例中，除金屬氧化物外，介電層亦可包括介電材料，例如氧化矽或氮化矽。不論確切組成及厚度如何，介電層可具有約10千歐姆至約50千歐姆之阻抗。

在一些實施例中，介電層中向內面向區域/室202之表面經疏水性材料塗覆。疏水性材料可包括(例如)氟化碳分子。氟化碳分子之實例包含全氟聚合物，例如聚四氟乙烯(例如TEFLON®)或聚(2,3-二氟亞甲基-全氟四氫呋喃)(例如CYTOP™)。構成疏水性材料之分子可以共價方式鍵結至介電層之表面。舉例而言，疏水性材料之分子可藉助連接體(例如矽氧烷基團、膦酸基團或硫醇基團)以共價方式結合至介電層之表面。因此，在一些實施例中，疏水性材料可包括烷基封端之矽氧烷、烷基封端之膦酸或烷基封端之硫醇。烷基可為長鏈烴(例如具有至少10個碳或至少16、18、20、22或更多個碳之鏈)。或者，可使用氟化(或全氟化)碳鏈代替烷基。因此，舉例而言，疏水性材料可包括氟烷基封端之矽氧烷、氟烷基封端之膦酸或氟烷基封端之硫醇。在一些實施例中，疏水性塗層具有約10 nm至約50 nm之厚度。在其他實施例中，疏水性塗層具有小於10 nm (例如小於5 nm或約1.5 nm至3.0 nm)之厚度。

在一些實施例中，具有電潤濕構形之微流體器件200之蓋110亦經疏水性材料(未顯示)塗覆。疏水性材料可與用於塗覆支撐結構104之介電層之疏水性材料相同，且疏水性塗層可具有與支撐結構104之介電層上之疏水性塗層之厚度實質上相同的厚度。此外，蓋110可以支撐結構104之方式包括夾於介電層與頂部電極210之間之電極激活基板206。蓋110之電極激活基板206及介電層可與支撐結構104之電極激活基板206及介電層具有

相同組成及/或尺寸。因此，微流體器件200可具有兩個電潤濕表面。

在一些實施例中，電極激活基板206可包括光導電材料(例如闡述於上文中者)。因此，在某些實施例中，電極激活基板206可包括氫化非晶型矽(a-Si:H)層或由其組成。a-Si:H可包括(例如)約8%至40%之氫(計算為 $100 \times \text{氫原子數} / \text{氫及矽原子之總數量}$)。a-Si:H層可具有約500 nm至約2.0 μm 之厚度。或者，電極激活基板206可包括如上文闡述由光電晶體開關控制之電極(例如導電金屬電極)。具有光電潤濕構形之微流體器件在業內已知及/或可使用業內已知之電極激活基板來構築。舉例而言，美國專利第6,958,132號(Chiou等人) (其全部內容以引用方式併入本文中)揭示具有諸如a-Si:H等光導電材料之光電潤濕構形，而上文所提及之美國專利公開案第2014/0124370號(Short等人)揭示具有由光電晶體開關控制之電極之電極激活基板。

微流體器件200由此可具有光電潤濕構形，且可使用光圖案218來激活電極激活基板206中之光導電EW區域或光反應性EW電極。電極激活基板206之該等激活EW區域或EW電極可在支撐結構104之內表面208 (亦即上覆介電層或其疏水性塗層之內表面)處生成電潤濕力。藉由改變入射至電極激活基板206上之光圖案218 (或相對於光源216移動微流體器件200)，接觸支撐結構104之內表面208之液滴(例如含有水性介質、溶液或溶劑)可移動穿過存在於區域/室202中之不混溶流體(例如油介質)。

在其他實施例中，微流體器件200可具有EWOD構形，且電極激活基板206可包括不依賴於光活化之選擇性可定址及可激勵電極。電極激活基板206由此可包含該等電潤濕(EW)電極之圖案。舉例而言，圖案可為配置成列及行之實質上正方形EW電極之陣列，例如圖2B中所顯示。或者，圖

案可為形成六角形晶格之實質上六角形EW電極之陣列。不論圖案如何，EW電極可藉由電開關(例如半導體基板中之電晶體開關)選擇性激活(或鈍化)。藉由選擇性激活及鈍化電極激活基板206中之EW電極，接觸上覆介電層或其疏水性塗層之內表面208之液滴(未顯示)可在區域/室202內移動。圖1A中之動力模組162可控制該等開關且由此激活及鈍化個別EW電極以選擇及移動區域/室202周圍之特定液滴。具有EWOD構形且使用選擇性可定址及可激勵電極之微流體器件在業內已知且已闡述於(例如)美國專利第8,685,344號(Sundarsan等人)中，該專利之全部內容以引用方式併入本文中。

不論微流體器件200之構形如何，可使用電源212提供向微流體器件200之電路供電之電勢(例如AC電壓電勢)。電源212可與圖1中所提及之電源192相同或係其一部件。電源212可經構形以向頂部電極210及底部電極204提供AC電壓及/或電流。對於AC電壓而言，電源212可提供足以達成以下結果之頻率範圍及平均或峰功率(例如電壓或電流)範圍：生成足夠強以捕集及移動區域/室202中之個別微小物體(未顯示)之淨DEP力(或電潤濕力)(如上文所論述)；及/或改變區域/室202中之支撐結構104(亦即介電層及/介電層上之或疏水性塗層)之內表面208之潤濕性質(亦如上文所論述)。業內已知該等頻率範圍及平均或峰功率範圍。例如參見美國專利第6,958,132號(Chiou等人)、美國專利第RE44,711號(Wu等人)(最初發行為美國專利第7,612,355號)及美國專利申請案公開案第US2014/0124370號(Short等人)、第US2015/0306598號(Khandros等人)及第US2015/0306599號(Khandros等人)。

D. 隔離室。

一般隔離室224、226及228之非限制性實例顯示於圖2A-2C中所繪示之微流體器件230內。每一隔離室224、226及228可包括界定分離區240及連結區236（使分離區240在流體上連結至通道122）之分離結構232。連結區236可包括通向微流體通道122之近端開口234及通向分離區240之遠端開口238。可構形連結區236，從而自微流體通道122流入隔離室224、226、228之流體介質流（未顯示）之最大滲透深度不會延伸至分離區240中。因此，因連結區236，佈置於隔離室224、226、228之分離區240中之微小物體（未顯示）或其他材料（未顯示）可由此與微流體通道122中之介質流180分離且不受其實質上影響。

圖2A-2C之隔離室224、226及228各自具有直接通向微流體通道122之單一開口。隔離室之開口自微流體通道122側向開放。電極激活基板206下覆於微流體通道122及隔離室224、226及228上。電極激活基板206之位於隔離室包殼內（從而形成隔離室之底板）之上表面與電極激活基板206之位於微流體通道122（或在不存在通道時之流動區）內（從而形成微流體器件之流動通道（或分別地流動區）之底板）之上表面係佈置於相同位準或實質上相同位準。電極激活基板206可無特徵或可具有自最高隆起至最低凹陷變化小於約3微米、2.5微米、2微米、1.5微米、1微米、0.9微米、0.5微米、0.4微米、0.2微米、0.1微米或更小之不規則或圖案化表面。基板在微流體通道122（或流動區）及隔離室中之上表面之隆起變化可小於隔離室壁或微流體器件壁之高度的約3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.5%、0.3%或0.1%。儘管針對微流體器件200詳細闡述，但此亦適用於本文所闡述之微流體器件100、230、250、280、290及320中之任一者。

微流體通道122可由此為掃略區之一實例，且隔離室224、226、228之分離區240可為非掃略區之實例。如所述，微流體通道122及隔離室224、226、228可經構形以含有一或多種流體介質180。在圖2A-2B中所顯示之實例中，埠222連結至微流體通道122且容許流體介質180引入微流體器件230中或自其去除。在引入流體介質180之前，可使用諸如二氧化碳氣體等氣體來啟動微流體器件。在微流體器件230含有流體介質180後，可立即選擇性生成及停止微流體通道122中之流體介質180之流242。舉例而言，如所顯示，埠222可佈置於微流體通道122之不同位置(例如相對端)，且可自用作入口之一個埠222至用作出口之另一埠222產生介質之流242。

圖2C圖解說明本發明隔離室224之一實例之詳細視圖。亦顯示微小物體246之實例。

如所已知，通過隔離室224之近端開口234之微流體通道122中之流體介質180之流242可引起介質180的二級流244，該二級流進入及/或離開隔離室224。為使隔離室224之分離區240中之微小物體246與二級流244分離，隔離室224之連結區236之長度 L_{con} (亦即自近端開口234至遠端開口238)應大於二級流244進入連結區236中之滲透深度 D_p 。二級流244之滲透深度 D_p 取決於流體介質180流入微流體通道122中之速度及各種與微流體通道122及連結區236至微流體通道122之近端開口234之構形相關的參數。對於給定微流體器件而言，微流體通道122及開口234之構形係固定的，而流體介質180之流242在微流體通道122中之速率可變。因此，低於每一隔離室224而言，可確定確保二級流244之滲透深度 D_p 不超過連結區236之長度 L_{con} 之流體介質180之流242在通道122中的最大速度 V_{max} 。只要

流體介質180之流242在微流體通道122中之速率不超過最大速度 $V_{\max}$ ，所得二級流244可於微流體通道122及連結區236且保持遠離分離區240。微流體通道122中之介質180之流242由此不會將微小物體246抽吸遠離分離區240。而是，位於分離區240中之微小物體246將保留於分離區240中，不論微流體通道122中之流體介質180之流242如何。

此外，只要介質180之流242在微流體通道122中之速率不超過 $V_{\max}$ ，微流體通道122中之流體介質180之流242將不會將各種各樣之顆粒(例如微粒及/或奈米顆粒)自微流體通道122移動至隔離室224之分離區240中。使連結區236之長度 L_{con} 大於二級流244之最大滲透深度 D_p 可由此防止一種隔離室224經各種各樣之來自微流體通道122或另一隔離室(例如圖2D中之隔離室226、228)之顆粒污染。

因微流體通道122及隔離室224、226、228之連結區236可受微流體通道122中之介質180之流242影響，故微流體通道122及連結區236可視為微流體器件230之掃略(或流動)區。另一方面，隔離室224、226、228之分離區240可視為非掃略(或非流動)區。舉例而言，微流體通道122中之第一流體介質180之組份(未顯示)可與分離區240中之第二流體介質248進行混合，此混合實質上僅係藉由來自微流體通道122之第一介質180之組份擴散穿過連結區236且進入分離區240中之第二流體介質248中來進行。類似地，分離區240中之第二介質248之組份(未顯示)可與微流體通道122中之第一介質180進行混合，此混合實質上僅係藉由來自分離區240之第二介質248之組份擴散穿過連結區236且進入微流體通道122中之第一介質180中來進行。在一些實施例中，隔離室之分離區與流動區之間藉由擴散進行之流體介質交換程度大於流體交換之約90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%或大於約99%。第一介質180可與第二介質248係相同介質或不同介質。此外，第一介質180及第二介質248可開始相同，然後變為不同(例如經由藉由分離區240中之一或多種細胞條件化第二介質248，或藉由改變流經微流體通道122之介質180)。

如上文所提及，由微流體通道122中之流體介質180之流242引起之二級流244的最大滲透深度 D_p 可取決於諸多參數。該等參數之實例包含：微流體通道122之形狀(舉例而言，微流體通道可將介質引導至連結區236中，使介質自連結區236轉向，或沿實質上垂直於連結區236之近端開口234之方向將介質引導至微流體通道122中)；微流體通道122在近端開口234處之寬度 W_{ch} (或橫截面面積)；及連結區236在近端開口234處之寬度 W_{con} (或橫截面面積)；微流體通道122中之流體介質180之流242之速度 V ；第一介質180及/或第二介質248之黏度；或諸如此類。

在一些實施例中，微流體通道122及隔離室224、226、228之尺寸可如下所述針對微流體通道122中流體介質180之流242之矢量來進行定向：微流體通道寬度 W_{ch} (或微流體通道122之橫截面面積)可實質上垂直於介質180之流242；連結區236在開口234處之寬度 W_{con} (或橫截面面積)可實質上平行於微流體通道122中之介質180之流242；及/或連結區之長度 L_{con} 可實質上垂直於微流體通道122中之介質180之流242。前述內容僅係實例，且微流體通道122及隔離室224、226、228之相對位置可相對於彼此呈其他定向。

如圖2C中所圖解說明，連結區236之寬度 W_{con} 可自近端開口234至遠端開口238較為均勻。連結區236在遠端開口處之238寬度 W_{con} 可由此在本文針對連結區236在近端開口234處之寬度 W_{con} 所確定之任一範圍中。或

者，連結區236在遠端開口238處之寬度 W_{con} 可大於連結區236在近端開口234處之寬度 W_{con} 。

如圖2C中所圖解說明，分離區240在遠端開口238處之寬度可與連結區236在近端開口234處之寬度 W_{con} 實質上相同。分離區240在遠端開口238處之寬度可由此在本文針對連結區236在近端開口234處之寬度 W_{con} 所確定之任一範圍中。或者，分離區240在遠端開口238處之寬度可大於或小於連結區236在近端開口234處之寬度 W_{con} 。此外，遠端開口238可小於近端開口234且連結區236之寬度 W_{con} 可在近端開口234與遠端開口238之間變窄。舉例而言，使用各種不同幾何形狀(例如使連結區倒角、斜切連結區)，連結區236可在近端開口與遠端開口之間變窄。另外，連結區236之任一部分或子部分可變窄(例如連結區中毗鄰近端開口234之一部分)。

圖2D-2F繪示含有微流體迴路262及流動通道264之微流體器件250之另一實例性實施例，其係圖1A之各別微流體器件100、迴路132及通道134之變化形式。微流體器件250亦具有複數個隔離室266，該等隔離室係上述隔離室124、126、128、130、224、226或228之其他變化形式。特定而言，應瞭解，圖2D-2F中所顯示之器件250之隔離室266可代替器件100、200、230、280、290、300中之上述隔離室124、126、128、130、224、226或228中之任一者。同樣，微流體器件250係微流體器件100之另一變體，且亦可與上述微流體器件100、200、230、280、290、300以及本文所闡述其他微流體系統組件中之任一者具有相同或不同DEP構形。

圖2D-2F之微流體器件250包括支撐結構(在圖2D-2F中不可見，但可相同或大致類似於圖1A中所繪示器件100之支撐結構104)、微流體迴路結構256及蓋(在圖2D-2F中不可見，但可相同或大致類似於圖1A中所繪示器

件100之蓋122)。微流體迴路結構256包含框252及微流體迴路材料260，其可相同或大致類似於圖1A中所顯示器件100之框114及微流體迴路材料116。如圖2D中所顯示，由微流體迴路材料260界定之微流體迴路262可包括與多個隔離室266在流體上連結之多個通道264 (顯示兩個，但可為更多個)。

每一隔離室266可包括分離結構272、位於分離結構272內之分離區270及連結區268。自微流體通道264處之近端開口274至分離結構272處之遠端開口276，連結區268使微流體通道264在流體上連結至分離區270。通常，根據圖2B及2C之上述論述，通道264中之第一流體介質254之流278可產生來自微流體通道264之第一介質254之二級流282，該等二級流進入及/或離開隔離室266之各別連結區268。

如圖2E中所圖解說明，每一隔離室266之連結區268通常包含在通向通道264之近端開口274與通向分離結構272之遠端開口276之間延伸之區域。連結區268之長度 L_{con} 可大於二級流282之最大滲透深度 D_p ，在該情形下，二級流282將延伸至連結區268中且不會再引向分離區270 (如2D中所顯示圖)。或者，如圖2F中所圖解說明，連結區268可具有小於最大滲透深度 D_p 之長度 L_{con} ，在該情形下，二級流282將延伸穿過連結區268且再引向分離區270。在此後一情形下，連結區268之長度 L_{c1} 及 L_{c2} 之總和大於最大滲透深度 D_p ，從而二級流282將不會延伸至分離區270中。不論連結區268之長度 L_{con} 大於滲透深度 D_p 抑或連結區268之長度 L_{c1} 及 L_{c2} 之總和大於滲透深度 D_p ，通道264中不超過最大速度 V_{max} 之第一介質254之流278皆將製造具有滲透深度 D_p 之二級流，且隔離室266之分離區270中之微小物體 (未顯示，但可相同或大致類似於圖2C中所顯示之微小物體246)將不會由

通道264中之第一介質254的流278抽吸出分離區270。通道264中之流278亦不會將各種各樣之材料(未顯示)自通道264抽吸至隔離室266之分離區270中。因此，擴散係微流體通道264中之第一介質254中之組份可自微流體通道264移動至隔離室266之分離區270中之第二介質258中的唯一機制。同樣，擴散係隔離室266之分離區270中第二介質258中之組份可自分離區270移動至微流體通道264中之第一介質254中的唯一機制。第一介質254可與第二介質258係相同介質，或第一介質254可與第二介質258係不同介質。或者，第一介質254及第二介質258可開始相同，然後變為不同(例如經由藉由分離區270中之一或多種細胞條件化第二介質，或藉由改變流經微流體通道264之介質)。

如圖2E中所圖解說明，在微流體通道264中，微流體通道264之寬度 W_{ch} (亦即橫切於流體介質流經微流體通道之方向(藉由圖2D中之箭頭278所指示)來看)可實質上垂直於近端開口274之寬度 W_{con1} 且由此實質上平行於遠端開口276之寬度 W_{con2} 。然而，近端開口274之寬度 W_{con1} 及遠端開口276之寬度 W_{con2} 無需彼此實質上垂直。舉例而言，定向近端開口274之寬度 W_{con1} 之軸(未顯示)及定向遠端開口276之寬度 W_{con2} 之另一軸間的角度可不垂直且由此非 90° 。替代定向角度之實例包含在下列範圍中之任一者中之角度：約 30° 至約 90° 、約 45° 至約 90° 、約 60° 至約 90° 或諸如此類。

在隔離室(例如124、126、128、130、224、226、228或266)之各個實施例中，分離區(例如240或270)經構形以含有複數種微小物體。在其他實施例中，分離區可經構形以含有僅一種、兩種、三種、四種、五種或類似相對較小數量之微小物體。因此，分離區之體積可為(例如)至少 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 6×10^6 立方微米或更大。

在隔離室之各個實施例中，微流體通道(例如122)在近端開口(例如234)處之寬度 W_{ch} 可在下列範圍中之任一者內：約50-1000微米、50-500微米、50-400微米、50-300微米、50-250微米、50-200微米、50-150微米、50-100微米、70-500微米、70-400微米、70-300微米、70-250微米、70-200微米、70-150微米、90-400微米、90-300微米、90-250微米、90-200微米、90-150微米、100-300微米、100-250微米、100-200微米、100-150微米及100-120微米。在一些其他實施例中，微流體通道(例如122)在近端開口(例如234)處之寬度 W_{ch} 可在約200-800微米、200-700微米或200-600微米之範圍內。前述內容僅係實例，且微流體通道122之寬度 W_{ch} 可在其他範圍(例如由上文所列示之任一終點界定之範圍)內。此外，在微流體通道中除隔離室之近端開口外之區域中，微流體通道122之 W_{ch} 可選擇處於該等範圍中之任一者中。

在一些實施例中，隔離室具有約30微米至約200微米或約50微米至約150微米之高度。在一些實施例中，隔離室具有約 $1 \times 10^4 - 3 \times 10^6$ 平方微米、 $2 \times 10^4 - 2 \times 10^6$ 平方微米、 $4 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ 平方微米、 $2 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ 平方微米、 $2 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ 平方微米或約 $2 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 平方微米之橫截面面積。

在隔離室之各個實施例中，微流體通道(例如122)在近端開口(例如234)處之高度 H_{ch} 可在下列範圍中之任一者內：20-100微米、20-90微米、20-80微米、20-70微米、20-60微米、20-50微米、30-100微米、30-90微米、30-80微米、30-70微米、30-60微米、30-50微米、40-100微米、40-90微米、40-80微米、40-70微米、40-60微米或40-50微米。前述內容僅係實例，且微流體通道(例如122)之高度 H_{ch} 可在其他範圍(例如由上文所列

示之任一終點界定之範圍)內。在微流體通道中除隔離室之近端開口外之區域中，微流體通道122之高度 H_{ch} 可選擇處於該等範圍中之任一者中。

在隔離室之各個實施例中，微流體通道(例如122)在近端開口(例如234)處之橫截面面積可在下列範圍中之任一者內：500-50,000平方微米、500-40,000平方微米、500-30,000平方微米、500-25,000平方微米、500-20,000平方微米、500-15,000平方微米、500-10,000平方微米、500-7,500平方微米、500-5,000平方微米、1,000-25,000平方微米、1,000-20,000平方微米、1,000-15,000平方微米、1,000-10,000平方微米、1,000-7,500平方微米、1,000-5,000平方微米、2,000-20,000平方微米、2,000-15,000平方微米、2,000-10,000平方微米、2,000-7,500平方微米、2,000-6,000平方微米、3,000-20,000平方微米、3,000-15,000平方微米、3,000-10,000平方微米、3,000-7,500平方微米或3,000-6,000平方微米。前述內容僅係實例，且微流體通道(例如122)在近端開口(例如234)處之橫截面面積可在其他範圍(例如由上文所列示之任一終點界定之範圍)內。

在隔離室之各個實施例中，連結區(例如236)之長度 L_{con} 可在下列範圍中之任一者中：約1-600微米、5-550微米、10-500微米、15-400微米、20-300微米、20-500微米、40-400微米、60-300微米、80-200微米或約100-150微米。前述僅係實例，且連結區(例如236)之長度 L_{con} 可在不同於前述實例之範圍內(例如由上文所列示之任一終點界定之範圍)。

在隔離室之各個實施例中，連結區(例如236)在近端開口(例如234)處之寬度 W_{con} 可在下列範圍中之任一者中：20-500微米、20-400微米、20-300微米、20-200微米、20-150微米、20-100微米、20-80微米、20-60微米、30-400微米、30-300微米、30-200微米、30-150微米、30-100微

米、30-80微米、30-60微米、40-300微米、40-200微米、40-150微米、40-100微米、40-80微米、40-60微米、50-250微米、50-200微米、50-150微米、50-100微米、50-80微米、60-200微米、60-150微米、60-100微米、60-80微米、70-150微米、70-100微米及80-100微米。前述內容僅係實例，且連結區(例如236)在近端開口(例如234)處之寬度 W_{con} 可不同於前述實例(例如由上文所列表之任一終點界定之範圍)。

在隔離室之各個實施例中，連結區之近端開口之寬度 W_{pr} 可至少與隔離室中之微小物體(例如生物微小物體，例如細胞)之預期最大尺寸一樣大。舉例而言，寬度 W_{pr} 可為約50微米、約60微米、約100微米、約200微米、約300微米或可在約50-300微米、約50-200微米、約50-100微米、約75-150微米、約75-100微米或約200-300微米之範圍內。

在隔離室之各個實施例中，連結區(例如236)之長度 L_{con} 對連結區(例如236)在近端開口234處之寬度 W_{con} 之比率可大於或等於下列比率中之任一者：0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0或更大。前述內容僅係實例，且連結區236之長度 L_{con} 對連結區236在近端開口234處之寬度 W_{con} 之比率可不同於前述實例。

在微流體器件100、200、230、250、280、290、300之各個實施例中， V_{max} 可設定為約0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5微升/sec。

在具有隔離室之微流體器件之各個實施例中，隔離室之分離區(例如240)之體積可為(例如)至少 5×10^5 、 8×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 6×10^6 、 8×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或 8×10^8 立方微米或更大。在具有隔離室之微流體器件之各個實施例中，隔離室之體積可為約

5×10^5 、 6×10^5 、 8×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 8×10^6 、 1×10^7 、 3×10^7 、 5×10^7 或約 8×10^7 立方微米或更大。在一些其他實施例中，隔離室之體積可為約1毫微升至約50毫微升、2毫微升至約25毫微升、2毫微升至約20毫微升、約2毫微升至約15毫微升或約2毫微升至約10毫微升。

在各個實施例中，微流體器件具有如本文所論述之任一實施例所構形之隔離室，其中微流體器件具有約5至約10個隔離室、約10至約50個隔離室、約100至約500個隔離室、約200至約1000個隔離室、約500至約1500個隔離室、約1000至約2000個隔離室或約1000至約3500個隔離室。隔離室無需具有相同大小且可在隔離室內包含各種構形(例如不同寬度、不同特徵)。

圖2G圖解說明根據一實施例之微流體器件280。圖2G中所圖解說明之微流體器件280係微流體器件100之風格化圖。在實踐中，微流體器件280及其構成迴路元件(例如通道122及隔離室128)具有本文所論述之尺寸。圖2G中所圖解說明之微流體迴路120具有兩個埠107、四個不同通道122及四個不同流動路徑106。微流體器件280進一步包括複數個離開每一通道122之隔離室開口。在圖2G中所圖解說明之微流體器件中，隔離室具有類似於圖2C中所圖解說明之欄之幾何形狀且由此具有連結區及分離區。因此，微流體迴路120包含掃略區(例如通道122及連結區236中在二級流244之最大滲透深度 D_p 內之部分)及非掃略區(例如分離區240及連結區236中不在二級流244之最大滲透深度 D_p 內之部分)。

E. 系統嵌套

圖3A至3B顯示可用於操作及觀察本發明之微流體器件(例如100、200、230、250、280、290、300)之系統150之各個實施例。如圖3A中所

圖解說明，系統150可包含經構形以固持微流體器件100 (未顯示)或本文所闡述之任一其他微流體器件之結構(「嵌套」) 300。嵌套300可包含能夠與微流體器件320 (例如光學致動之電動力學器件100)界接且提供自電源192至微流體器件320之電連結之插孔302。嵌套300可進一步包含積體電信號生成子系統304。電信號生成子系統304可經構形以向插孔302供應偏壓電壓，從而在藉由插孔302固持微流體器件時將偏壓電壓施加於微流體器件320中之一對電極兩端。因此，電信號生成子系統304可為電源192之一部分。將偏壓電壓施加至微流體器件320之能力並不意味著，在藉由插孔302固持微流體器件320時總是施加偏壓電壓。而是，在大部分情形下，間歇性施加偏壓電壓，例如僅視需要施加以促進微流體器件320中之電動力學力(例如介電電泳或電潤濕)之生成。

如圖3A中所圖解說明，嵌套300可包含印刷電路板總成(PCBA) 322。電信號生成子系統304可安裝於PCBA 322上且電整合至其中。實例性支撐結構包含亦安裝於PCBA 322上之插孔302。

通常，電信號生成子系統304包含波形生成器(未顯示)。電信號生成子系統304可進一步包含示波器(未顯示)及/或經構形以放大自波形生成器接收之波形之波形放大電路(未顯示)。示波器(若存在)可經構形以量測供應至由插孔302固持之微流體器件320之波形。在某些實施例中，示波器量測鄰近微流體器件320 (且遠離波形生成器)之位置之波形，由此確保量測實際上施加至器件之波形之較大準確度。自示波器量測取得之資料可(例如)提供為波形生成器之反饋，且波形生成器可經構形以基於該反饋來調節其輸出。適宜組合波形生成器及示波器之一實例係Red Pitaya™。

在某些實施例中，嵌套300進一步包括控制器308 (例如用於感測及/

或控制電信號生成子系統304之微處理器)。適宜微處理器之實例包含Arduino™微處理器，例如Arduino Nano™。可使用控制器308實施功能及分析或可與外部主控制器154 (顯示於圖1A中)進行通信以實施功能及分析。在圖3A中所圖解說明之實施例中，控制器308經由界面310 (例如塞子或連結器)與主控制器154進行通信。

在一些實施例中， 嵌套300可包括電信號生成子系統304，該電信號生成子系統包括Red Pitaya™波形生成器/示波器單元(「Red Pitaya單元」)及放大由Red Pitaya單元生成之波形且將放大電壓傳送至微流體器件100之波形放大電路。在一些實施例中，Red Pitaya單元經構形以量測微流體器件320處之放大電壓且然後視需要調節其自有輸出電壓，從而微流體器件320處之所量測電壓係期望值。在一些實施例中，波形放大電路可具有+6.5V至-6.5V之電力供應(藉由一對安裝於PCBA 322上之DC-DC轉換器生成)，從而在微流體器件100處產生最高13 V_{pp}之信號。

如圖3A中所圖解說明，支撐結構300 (例如嵌套)可進一步包含熱控制子系統306。熱控制子系統306可經構形以調控由支撐結構300固持之微流體器件320之溫度。舉例而言，熱控制子系統306可包含帕耳帖(Peltier)熱電器件(未顯示)及冷卻單元(未顯示)。帕耳帖熱電器件可具有經構形以與微流體器件320之至少一個表面界接之第一表面。冷卻單元可為(例如)冷卻塊(未顯示)，例如液體冷卻之鋁塊。帕耳帖熱電器件之第二表面(例如與第一表面相對之表面)可經構形以與此一冷卻塊之表面界接。冷卻塊可連結至經構形以使冷卻流體循環穿過冷卻塊之流體路徑314。在圖3A中所圖解說明之實施例中，支撐結構300包括入口316及出口318以自外部儲槽(未顯示)接收冷卻流體，將冷卻流體引入流體路徑314中且使其穿過冷

卻塊，且然後將冷卻流體返回外部儲槽。在一些實施例中，帕耳帖熱電器件、冷卻單元及/或流體路徑314可安裝於支撐結構300之外殼312上。在一些實施例中，熱控制子系統306經構形以調控帕耳帖熱電器件之溫度來達成微流體器件320之目標溫度可(例如)藉由熱電熱力供應器(例如Pololu™熱電熱力供應器(Pololu Robotics and Electronics Corp.))來達成帕耳帖熱電器件之溫度調控。熱控制子系統306可包含反饋電路，例如由模擬電路提供之溫度值。或者，反饋電路可由數位電路提供。

在一些實施例中，嵌套300可包含具有反饋電路之熱控制子系統306，該反饋電路係包含電阻器(例如具有電阻1 kOhm $\pm$ 0.1 %、溫度係數 $\pm$ 0.02 ppm/C0)及NTC熱阻器(例如具有標稱電阻1 kOhm $\pm$ 0.01 %)之模擬分壓電路(未顯示)。在一些情況下，熱控制子系統306量測來自反饋電路之電壓且然後使用所計算溫度值輸入至板上PID控制循環算法。來自PID控制循環算法之輸出可驅動(例如)Pololu™驅動馬達(未顯示)上之方向及脈衝寬度調變信號接針以致動熱電功率供應器，由此控制帕耳帖熱電器件。

嵌套300可包含串聯埠324，該串聯埠容許控制器308之微處理器與外部主控制器154經由界面310 (未顯示)進行通信。另外，控制器308之微處理器可與電信號生成子系統304及熱控制子系統306進行通信(例如經由Plink工具(未顯示))。因此，經由組合控制器308、界面310及串聯埠324，電信號生成子系統304及熱控制子系統306可與外部主控制器154進行通信。以此方式，主控制器154可藉由實施縮比計算以用於輸出電壓調節而尤其有助於電信號生成子系統304。經由耦合至外部主控制器154之顯示器件170所提供之圖形使用者介面(GUI) (未顯示)可經構形以將分別

自熱控制子系統306及電信號生成子系統304取得之溫度及波形數據繪圖。或者或另外，GUI可容許更新控制器308、熱控制子系統306及電信號生成子系統304。

F. 系統成像器件

如上文所論述，系統150可包含成像器件194。在一些實施例中，成像器件194包括光調變子系統330 (參見圖3B)。光調變子系統330可包含數位鏡器件(DMD)或微快門陣列系統(MSA)，其中之任一者可經構形以接收來自光源332之光且將所接收光之子組傳輸至顯微鏡350之光學元件串中。或者，光調變子系統330可包含製造其自有光(且由此根據光源332之需要進行分配)之器件，例如有機發光二極體顯示器(OLED)、矽上液晶(LCOS)器件、矽上鐵電液晶器件(FLCOS)或透射液晶顯示器(LCD)。光調變子系統330可為(例如)投影機。因此，光調變子系統330可能夠發射結構化及未結構化光。適宜光調變子系統330之一實例係來自 Andor Technologies™之Mosaic™系統。在某些實施例中，系統150之成像模組164及/或動力模組162可控制光調變子系統330。

在某些實施例中，成像器件194進一步包括顯微鏡350。在該等實施例中，嵌套300及光調變子系統330可個別地經構形以安裝於顯微鏡350上。顯微鏡350可為(例如)標準研究級光顯微鏡或螢光顯微鏡。因此，嵌套300可經構形以安裝於顯微鏡350之載物台344上及/或光調變子系統330可經構形以安裝於顯微鏡350之埠上。在其他實施例中，本文所闡述之嵌套300及光調變子系統330可為顯微鏡350之整合元件。

在某些實施例中，顯微鏡350可進一步包含一或多個檢測器348。在一些實施例中，檢測器348係由成像模組164控制。檢測器348可包含目

鏡、電荷耦合器件(CCD)、照相機(例如數位照相機)或其任一組合。若存在至少兩個檢測器348，則一個檢測器可為(例如)快圖框速率照相機，而另一檢測器可為高敏感性照相機。另外，顯微鏡350可包含經構形以接收來自微流體器件320之反射及/或發射光且將至少一部分所反射及/或發射光聚焦於一或多個檢測器348處之光學元件串。顯微鏡之光學元件串亦可包含用於不同檢測器之不同套筒透鏡(未顯示)，從而每一檢測器上之最終放大率可不同。

在某些實施例中，成像器件194經構形以使用至少兩個光源。舉例而言，可使用第一光源332來製造結構化光(例如經由光調變子系統330)且可使用第二光源334來提供未結構化光。第一光源332可製造用於光學致動之電動力學及/或螢光激發之結構化光，且可使用第二光源334來提供明場照明。在該等實施例中，可使用動力模組164控制第一光源332且可使用成像模組164控制第二光源334。顯微鏡350之光學元件串可經構形以(1)接收來自光調變子系統330之結構化光且將結構化光至少聚焦於微流體器件(例如光學致動之電動力學器件，在器件由嵌套300固持時)中之第一區域中，及(2)接收來自微流體器件之反射及/或發射光且將至少一部分該反射及/或發射光聚焦於檢測器348上。光學元件串可另外經構形以接收來自第二光源之未結構化光且將未結構化光至少聚焦於微流體器件之第二區域中(在器件由嵌套300固持時)。在某些實施例中，微流體器件之第一區域及第二區域可為重疊區域。舉例而言，第一區域可為第二區域之子組。在其他實施例中，第二光源334可另外或替代地包含雷射，該雷射可具有任一適宜光波長。圖3B中所顯示之光學系統之代表圖僅係示意性代表圖，且光學系統可包含其他濾光器、陷波濾光器、透鏡及諸如此類。在第二光源

334包含一或多個用於明場及/或螢光激發以及雷射照明之光源時，光源之物理配置可能與圖3B中所顯示者有所變化，且可在光學系統內之任一適宜物理位置引入雷射照明。光源432及光源402/光調變子系統404之圖示位置亦可互換。

在圖3B中，第一光源332顯示向光調變子系統330供應光，該光調變子系統向成像器件194之顯微鏡350之光學元件串提供結構化光。第二光源334顯示經由光束分離器336向光學元件串提供未結構化光。來自光調變子系統330之結構化光及來自第二光源334之未結構化光自光束分離器336一起行進穿過光學元件串，到達第二光束分離器(或二向色濾光器338，端視由光調變子系統330提供之光而定)，其中光經反射向下穿過物鏡340到達試樣平面342。來自試樣平面342之經反射及/或發射光隨後返回行進穿過物鏡340，穿過光束分離器及/或二向色濾光器338，且到達二向色濾光器346。僅一部分到達二向色濾光器346之光通過並到達檢測器348。

在一些實施例中，第二光源334發射藍光。使用適當二向色濾光器346，自試樣平面342反射之藍光能夠通過二向色濾光器346，且到達檢測器348。反之，來自光調變子系統330之結構化光自試樣平面342發生反射，但不通過二向色濾光器346。在此實例中，二向色濾光器346濾除波長超過495 nm之可見光。若由該光調變子系統發射之光不包括任何短於495 nm之波長時，則光調變子系統330才能完全濾光(如所顯示)。實際上，若來自光調變子系統330之光包含短於495 nm之波長(例如藍色波長)，則有些來自光調變子系統之光將通過濾光器346到達檢測器348。在此等實施例中，濾光器346用於改變自第一光源332及第二光源334到達檢

測器348之光量之間的平衡。若第一光源332顯著強於第二光源334時，此點才有利。在其他實施例中，第二光源334可發射紅光，且二向色濾光器346可濾除紅光以外之可見光(例如波長短於650 nm之可見光)。

G. 塗覆溶液及塗覆劑。

不受限於理論，在對微流體器件之至少一個或多個內表面實施條件化或塗覆以存在提供微流體器件與其中所維持生物微小物體之間之主要界面的有機及/或親水性分子層時，可促進生物微小物體(例如生物細胞)在微流體器件(例如DEP構形及/或EW構形之微流體器件)內之維持(亦即，生物微小物體在微流體器件內展現增加之存活、較大擴增及/或較大可攜性)。在一些實施例中，可使用塗覆溶液及/或塗覆處理微流體器件之一或多個內表面(例如DEP構形微流體器件之電極激活基板之內表面、微流體器件之蓋及/或迴路材料之表面)或藉由塗覆溶液及/或塗覆劑進行改質以生成有機及/或親水性分子之期望層。

塗層可在引入生物微小物體之前或之後施加，或可與生物微小物體同時引入。在一些實施例中，可將生物微小物體輸入至微流體器件中之包含一或多種塗覆劑之流體介質中。在其他實施例中，在將生物微小物體引入微流體器件中之前，使用包括塗覆劑之塗覆溶液處理或「啟動」微流體器件(例如DEP構形微流體器件)之內表面。

在一些實施例中，微流體器件之至少一個表面包含塗覆材料，該塗覆材料提供適於維持及/或擴增生物微小物體之有機及/或親水性分子層(例如提供如下文所闡述之條件化表面)。在一些實施例中，微流體器件之實質上所有內表面皆包含塗覆材料。經塗覆內表面可包含流動區(例如通道)、室或隔離室之表面或其組合。在一些實施例中，複數個隔離室中之

每一者具有至少一個經塗覆材料塗覆之內表面。在其他實施例中，複數個流動區或通道中之每一者具有至少一個經塗覆材料塗覆之內表面。在一些實施例中，複數個隔離室中之每一者及複數個通道中之每一者之至少一個內表面經塗覆材料塗覆。

塗覆劑/溶液。可使用任何便利塗覆劑/塗覆溶液，包含(但不限於)：血清或血清因子、牛血清白蛋白(BSA)、聚合物、洗滌劑、酶及其任一組合。

基於聚合物之塗覆材料。至少一個內表面可包含含有聚合物之塗覆材料。聚合物可以共價方式或非共價方式結合(或可非專一性黏著)至至少一個表面。聚合物可具有各種結構式樣，例如參見嵌段聚合物(及共聚物)、星形聚合物(星形共聚物)及接枝或梳樣聚合物(接枝共聚物)，所有該等聚合物皆可適用於本文所揭示之方法。

聚合物可包含含有伸烷基醚部分之聚合物。眾多種含有伸烷基醚之聚合物可適用於本文所闡述之微流體器件中。含有伸烷基醚之聚合物之一個非限制性實例性種類係兩親性非離子型嵌段共聚物，該等共聚物以不同比率及聚合物鏈內位置包含聚環氧乙烷(PEO)及聚環氧丙烷(PPO)亞單元。Pluronic®聚合物(BASF)係此類型之嵌段共聚物且業內已知其適用於與活細胞接觸時。聚合物之平均分子量 M_w 可介於約2000Da至約20KDa之間。在一些實施例中，PEO-PPO嵌段共聚物可具有大於約10 (例如12-18)之親水性-親脂性平衡(HLB)。可用於得到經塗覆表面之特定Pluronic®聚合物包含Pluronic® L44、L64、P85及F127 (包含F127NF)。另一類含有伸烷基醚之聚合物係聚乙二醇(PEG $M_w < 100,000$ Da)或替代地聚環氧乙烷(PEO, $M_w > 100,000$)。在一些實施例中，PEG可具有約1000Da、

5000Da、10,000Da或20,000Da之 M_w 。

在其他實施例中，塗覆材料可包含含有羧酸部分之聚合物。羧酸亞單元可為含有烷基、烯基或芳香族部分之亞單元。一非限制性實例係聚乳酸(PLA)。在其他實施例中，塗覆材料可包含在聚合物主鏈之末端或懸垂於聚合物之主鏈含有磷酸鹽部分之聚合物。在其他實施例中，塗覆材料可包含含有磺酸部分之聚合物。磺酸亞單元可為含有烷基、烯基或芳香族部分之亞單元。一非限制性實例係聚苯乙烯磺酸(PSSA)或聚茴香腦磺酸。在其他實施例中，塗覆材料可包含含有胺部分之聚合物。聚胺基聚合物可包含天然聚胺聚合物或合成聚胺聚合物。天然聚胺之實例包含精胺、精脞及腐胺。

在其他實施例中，塗覆材料可包含含有醣部分之聚合物。在一非限制性實例中，多醣(例如黃原膠或右旋糖酐)可適於形成可減小或防止微流體器件中之細胞黏結之材料。舉例而言，可使用具有約3kDa大小之右旋糖酐聚合物來提供用於微流體器件內之表面之塗覆材料。

在其他實施例中，塗覆材料可包含含有核苷酸部分之聚合物(亦即核酸)，該聚合物可具有核糖核苷酸部分或去氧核糖核苷酸部分，從而提供聚電解質表面。核酸可僅含有天然核苷酸部分或可含有包括核鹼基、核糖或磷酸鹽部分類似物(例如(但不限於) 7-去氫雜腺嘌呤、戊糖、甲基膦酸鹽或硫代磷酸鹽部分)之非天然核苷酸部分。

在其他實施例中，塗覆材料可包含含有胺基酸部分之聚合物。含有胺基酸部分之聚合物可包含含有天然胺基酸之聚合物或含有非天然胺基酸之聚合物，其中之任一者皆可包含肽、多肽或蛋白質。在一非限制性實例中，蛋白質可為牛血清白蛋白(BSA)及/或包括白蛋白及/或一或多種其他

類似蛋白質作為塗覆劑之血清(或之組合多個不同血清)。血清可來自任一便利來源，包含(但不限於)胎牛血清、綿羊血清、山羊血清、馬血清及諸如此類。在某些實施例中，塗覆溶液中之BSA係以約1 mg/mL至約100 mg/mL範圍存在，包含5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、50 mg/mL、60 mg/mL、70 mg/mL、80 mg/mL、90 mg/mL或更高或其間之任一值。在某些實施例中，塗覆溶液中之血清可以約20% (v/v)至約50% v/v之範圍存在，包含25%、30%、35%、40%、45%更高或其間之任一值。在一些實施例中，BSA可以5 mg/mL存在以作為塗覆溶液中之塗覆劑，而在其他實施例中，BSA可以70 mg/mL存在以作為塗覆溶液中之塗覆劑。在某些實施例中，血清以30%存在以作為塗覆溶液中之塗覆劑。在一些實施例中，可將細胞外基質(ECM)蛋白提供於塗覆材料內以達成最佳化細胞黏著，從而引起細胞生長。可包含於塗覆材料中之細胞基質蛋白可包含(但不限於)膠原、彈性蛋白、含RGD肽(例如纖連蛋白)或層黏蛋白。在其他實施例中，生長因子、細胞介素、激素或其他細胞信號傳導物質可提供於微流體器件之塗覆材料內。

在一些實施例中，塗覆材料可包含含有一個以上以下部分之聚合物：環氧烷部分、羧酸部分、磺酸部分、磷酸鹽部分、醣部分、核苷酸部分或胺基酸部分。在其他實施例中，聚合物條件化表面可包含一種以上聚合物之混合物，每一聚合物具有環氧烷部分、羧酸部分、磺酸部分、磷酸鹽部分、醣部分、核苷酸部分及/或胺基酸部分且可獨立地或同時納入塗覆材料中。

以共價方式連接之塗覆材料。在一些實施例中，至少一個內表面包含以共價方式連接之分子，該等分子提供適於維持/擴增微流體器件內之

生物微小物體之有機及/或親水性分子層，從而提供用於該等細胞之條件化表面。

以共價方式連接之分子包含連接基團，其中連接基團以共價方式連接至微流體器件之一或多個表面，如下文所闡述。連接基團亦以共價方式連接至經構形以提供適於維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水性分子層之部分。

在一些實施例中，經構形以提供適於維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水性分子層之以共價方式連接之部分可包含烷基或氟烷基(其包含全氟烷基)部分；單糖或多醣(其可包含(但不限於)右旋糖酐)；醇(包含(但不限於)炔丙基醇)；多元醇，包含(但不限於)聚乙烯醇；伸烷基醚，包含(但不限於)聚乙二醇；聚電解質(包含(但不限於)聚丙烯酸或聚乙烯基膦酸)；胺基類(包含其衍生物，例如(但不限於)烷基化胺、羥基烷基化胺基、胍鎗及含有非芳香族化氮環原子之雜環基團(例如(但不限於)嗎啉基或六氫吡嗪基))；羧酸，包含(但不限於)丙炔酸(其可提供羧酸鹽陰離子表面)；膦酸，包含(但不限於)乙炔基膦酸(其可提供膦酸鹽陰離子表面)；磺酸鹽陰離子；羧基甜菜鹼；磺基甜菜鹼；胺基磺酸；或胺基酸。

在各個實施例中，經構形以提供適於維持/擴增微流體器件中之生物微小物體之有機及/或親水性分子層之以共價方式連接之部分可包含非聚合部分，例如烷基部分、經取代烷基部分(例如氟烷基部分(包含(但不限於)全氟烷基部分))、胺基酸部分、醇部分、胺基部分、羧酸部分、膦酸部分、磺酸部分、胺基磺酸部分或醣部分。或者，以共價方式連接之部分可包含聚合部分，該等部分可為上述任一部分。

在一些實施例中，以共價方式連接之烷基部分可包括形成直鏈之碳

原子(例如至少10個碳或至少14、16、18、20、22或更多個碳之直鏈)且可為無支鏈烷基部分。在一些實施例中，烷基可包含經取代烷基(舉例而言，烷基中之一些碳可經氟化或全氟化)。在一些實施例中，烷基可包含接合之第一區段(其可包含全氟烷基)及第二區段(其可包含未取代烷基)，其中第一區段及第二區段可直接或間接(例如藉助醚鏈接)接合。烷基之第一區段可位於連接基團遠端，且烷基之第二區段可位於連接基團近端。

在其他實施例中，以共價方式連接之部分可包含至少一種胺基酸，其可包含一種類型以上之胺基酸。因此，以共價方式連接之部分可包含肽或蛋白質。在一些實施例中，以共價方式連接之部分可包含可提供兩性離子表面以支持細胞生長、存活、可攜性或其任一組合之胺基酸。

在其他實施例中，以共價方式連接之部分可包含至少一個環氧烷部分，且可包含如上文所闡述之任一環氧烷聚合物。一個有用種類之含有伸烷基醚之聚合物係聚乙二醇(PEG $M_w < 100,000\text{Da}$)或替代地聚環氧乙烷(PEO, $M_w > 100,000$)。在一些實施例中，PEG可具有約1000Da、5000Da、10,000Da或20,000Da之 M_w 。

以共價方式連接之部分可包含一或多種醣。以共價方式連接之醣可為單醣、二醣或多醣。以共價方式連接之醣可經改質以引入允許偶合或精製用以附接至表面之反應性配對部分。實例性反應性配對部分可包含醛、炔烴或鹵基部分。可以隨機方式改質多醣，其中可改質每一醣單體或改質多醣內之僅一部分醣單體以提供可直接或間接偶合至表面之反應性配對部分。一實例可包含右旋糖酐多醣，其可經由無支鏈連接體間接偶合至表面。

以共價方式連接之部分可包含一或多種胺基。胺基類可為經取代胺

部分、胍部分、含氮雜環部分或雜芳基部分。含胺基部分可具有允許改變微流體器件內及視情況隔離室及/或流動區(例如通道)內之環境之pH之結構。

提供條件化表面之塗覆材料可包括僅一類以共價方式連接之部分或可包含一種以上不同種類之以共價方式連接之部分。舉例而言，氟烷基條件化表面(包含全氟烷基)可具有複數個以共價方式連接之部分，該等部分皆相同，例如具有相同連接基團(且共價附接至表面)、相同整體長度及構成氟烷基部分之氟亞甲基單元之相同數量。或者，塗覆材料可具有一類以上附接至表面之以共價方式連接之部分。舉例而言，塗覆材料可包含具有以共價方式連接之烷基或氟烷基部分(具有指定數量之亞甲基或氟亞甲基單元)之分子，且可進一步包含另一組具有以共價方式附接至烷基或氟烷基鏈(具有較大數量之亞甲基或氟亞甲基單元)之帶電部分之分子，該等分子可提供在經塗覆表面上存在較大部分之能力。在此情況下，具有不同、較小空間需求之末端及較少主鏈原子之第一組分子可幫助使整個基板表面功能化，且由此防止與構成基板本身之矽/氧化矽、氧化鈣或氧化鋁之不期望黏著或接觸。在另一實例中，以共價方式連接之部分可提供在表面上以隨機方式呈現交替電荷之兩性離子表面。

條件化表面性質。除條件化表面之組成外，其他因素(例如疏水性材料之物理厚度)可影響DEP力。許多因素可改變條件化表面之物理厚度，例如在基板上形成條件化表面之方式(例如氣相沈積、液相沈積、旋塗、沖洗及靜電塗覆)。在一些實施例中，條件化表面具有在以下範圍內之厚度：約1nm至約10nm、約1 nm至約7 nm、約1nm至約5nm或其間之任一個別值。在其他實施例中，藉由以共價方式連接之部分形成之條件化表面

可具有約10 nm至約50 nm之厚度。在各個實施例中，如本文所闡述製得條件化表面具有小於10nm之厚度。在一些實施例中，條件化表面之以共價方式連接之部分可在以共價方式連接至微流體器件之表面(例如DEP構形基板表面)時形成單層且可具有小於10 nm (例如小於5 nm或約1.5至3.0 nm) 的厚度。該等值不同於CYTOP® (Asahi Glass Co., Ltd. JP)氟聚合物旋塗塗層之值，後者具有在約30nm範圍內之厚度。在一些實施例中，條件化表面無需完全形成單層以達成用於DEP構形微流體器件內之操作之適宜功能。

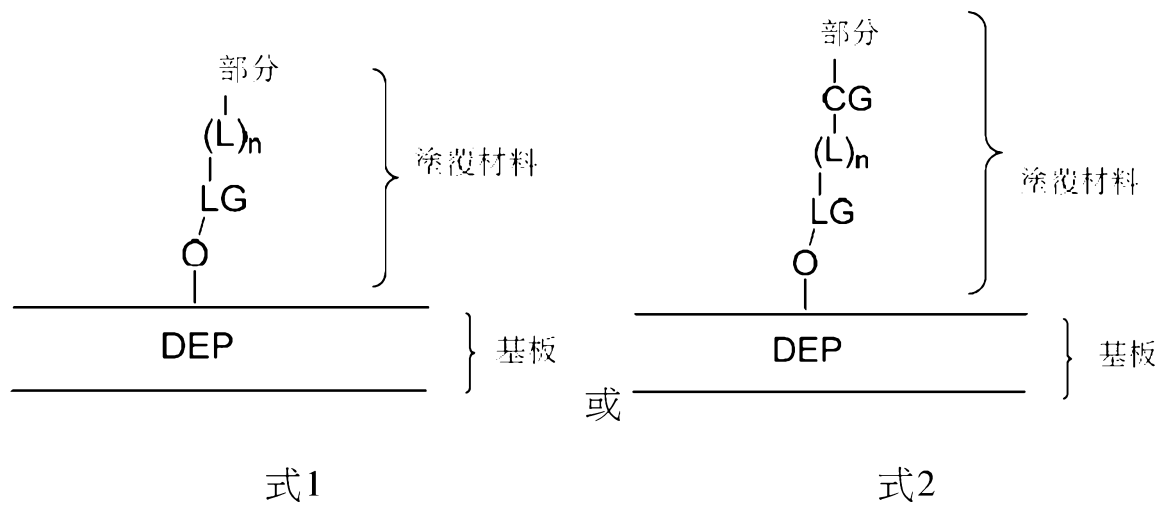
在各個實施例中，提供微流體器件之條件化表面之塗覆材料可提供期望電性質。不期望受限於理論，影響經特定塗覆材料塗覆之表面之穩健性之一種因素係固有電荷捕集。不同塗覆材料可捕集電子，此可導致裂解塗覆材料。塗覆材料中之缺陷可增加電荷捕集且導致塗覆材料之進一步裂解。類似地，不同塗覆材料具有不同介電強度(亦即產生介電裂解之最小施加電場)，此可影響電荷捕集。在某些實施例中，塗覆材料可具有減小或限制電荷捕集量之整體結構(例如緻密堆集之單層結構)。

除電性質外，條件化表面亦可具有有益於用於生物分子中之性質。舉例而言，含有氟化(或全氟化)碳鏈之條件化表面可相對於烷基封端之鏈提供減小表面結垢量之益處。本文所用之表面結垢係指微流體器件表面上之一定量紊亂材料之沈積，其可包含永久性或半永久性沈積生物材料(例如蛋白質及其降解產物、核酸及各別降解產物及諸如此類)。

單一或多部分條件化表面。可藉由已含有經構形以提供適於維持/擴增微流體器件中之生物微小物體之有機及/或親水性分子層之部分之分子的反應來形成以共價方式連接之塗覆材料，如下文所闡述。或者，可以兩

部分序列藉由以下方式來形成以共價方式連接之塗覆材料：使經構形以提供適於維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水性分子層之部分偶合至本身已以共價方式連接至表面之表面改質配體。

製備以共價方式連接之塗覆材料之方法。在一些實施例中，以共價方式連接至微流體器件之表面(例如包含隔離室及/或流動區之至少一個表面)之塗覆材料具有式1或式2之結構。在以一個步驟將塗覆材料引入表面中時，其具有式1結構，而在以多步驟製程引入塗覆材料時，其具有式2結構。



塗覆材料可以共價方式連接至DEP構形-或EW構形基板之表面之氧化物。DEP-或EW構形基板可包括矽、氧化矽、氧化鋁或氧化鉛。氧化物可作為基板之自然化學結構之一部分而存在或可如下文所論述來引入。

塗覆材料可經由連接基團(「LG」)附接至氧化物，連接基團可為自矽氧烷或磷酸基團與氧化物之反應形成之矽氧基或磷酸酯基團。經構形以提供適於維持/擴增微流體器件中之生物微小物體之有機及/或親水性分子層之部分可本文所闡述之任一部分。連接基團LG可直接或間接連結至經構形以提供適於維持/擴增微流體器件中之生物微小物體之有機及/或親水性分子層之部分。在連接基團LG直接連結至該部分時，可選連接體

(「L」)不存在且 n 為0。在連接基團LG間接連結至該部分時，連接體L存在且 n 為1。連接體L可具有直鏈部分(其中直鏈部分之主鏈可包含1至200個選自矽、碳、氮、氧、硫及磷原子之任一組合之非氫原子)且具有業內已知之化學鍵結限制。其可間雜有一或多個選自由以下組成之群之部分之任一組合：醚、胺基、羰基、醯胺基或磷酸酯基團、伸芳基、伸雜芳基或雜環基團。在一些實施例中，連接體L之主鏈可包含10至20個原子。在其他實施例中，連接體L之主鏈可包含約5個原子至約200個原子、約10個原子至約80個原子、約10個原子至約50個原子或約10個原子至約40個原子。在一些實施例中，主鏈原子皆係碳原子。

在一些實施例中，可以多步驟製程將經構形以提供適於維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水性分子層之部分添加至基板表面上，且該部分具有如上文所顯示之式2結構。該部分可為上述任一部分。

在一些實施例中，偶合基團CG代表來自反應性部分 R_x 及反應性配對部分 R_{px} (亦即經構形以與反應性部分 R_x 進行反應之部分)之反應之所得基團。舉例而言，一種典型偶合基團CG可包含羧醯胺基，其係胺基與羧酸衍生物(例如活化酯、醯氯或諸如此類)之反應結果。其他CG可包含伸三唑基、羧醯胺基、硫代醯胺基、肟、巰基、二硫化物、醚或烯基或可在反應性部分與其各別反應性配對部分進行反應後形成之任一其他適宜基團。偶合基團CG可位於連接體L之第二端(亦即，經構形以提供適於維持/擴增微流體器件中之生物微小物體之有機及/或親水性分子層之部分之近端)，該連接體可包含如上文所闡述之要素之任一組合。在一些其他實施例中，偶合基團CG可中斷連接體L之主鏈。在偶合基團CG係伸三唑基時，其可為源自點擊偶合反應之產物且可進一步經取代(例如二苯并環辛烯基稠合

伸三唑基)。

在一些實施例中，使用化學氣相沈積將塗覆材料(或表面改質配體)沈積於微流體器件之內表面上。可視情況(例如)藉由使用溶劑浴暴露、超音波處理或其組合預清洗蓋110、微流體迴路材料116及/或基板(例如DEP構形基板之電極激活基板206之內表面208或EW構形基板之支撐結構104之介電層)來改良氣相沈積製程。或者或另外，該預清洗可包含在氧電漿清洗劑中處理蓋110、微流體迴路材料116及/或基板，此可去除各種雜質，而同時引入經氧化表面(例如表面處之氧化物，其可如本文所闡述以共價方式進行改質)。或者，可使用液相處理劑(例如鹽酸及過氧化氫之混合物或硫酸及過氧化氫之混合物)(例如食人魚溶液(*piranha solution*)，其硫酸對過氧化氫之比率可在約3:1至約7:1範圍內)代替氧電漿清洗劑。

在一些實施例中，在組裝微流體器件200以形成界定微流體迴路120之包殼102之後，使用氣相沈積來塗覆微流體器件200之內表面。不受限於理論，將此一塗覆材料沈積於完全組裝之微流體迴路120上可有益於防止由微流體迴路材料116與電極激活基板206介電層及/蓋110之間之弱化鍵引起之脫層。在採用兩步驟製程之實施例中，可如上文所闡述經由氣相沈積來引入表面改質配體，且隨後引入經構形以提供適於維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水性分子層之部分。可藉由使經表面改質之微流體器件暴露於適宜偶合試劑之溶液來實施後續反應。

圖2H繪示具有提供條件化表面之以共價方式連接之實例性塗覆材料之微流體器件290的剖面圖。如所圖解說明，塗覆材料298(示意性顯示)可包括以共價方式結合至基底286(其可為DEP基板)之內表面294及微流體器件290中蓋288之內表面292之緻密堆集分子的單層。塗覆材料298可

佈置於鄰近及向內面向微流體器件290之包殼284之實質上所有內表面294、292(在一些實施例中且如上文所論述，包含用於界定微流體器件290內之迴路元件及/或結構之微流體迴路材料(未顯示)之表面)上。在替代實施例中，塗覆材料298可佈置於微流體器件290之僅一個或一些內表面上。

在圖2H中所顯示之實施例中，塗覆材料298可包含有機矽氧烷分子之單層，每一分子經由矽氧基連接體296以共價方式鍵結至微流體器件290之內表面292、294。可使用上述塗覆材料298中之任一者(例如烷基封端部分、氟烷基封端部分、PEG-封端部分、右旋糖酐封端部分或含有用於有機矽氧基部分之正電荷或負電荷之末端部分)，其中末端部分係在其面向包殼之末端(亦即塗覆材料298之單層中不結合至內表面292、294且鄰近包殼284之部分)處進行佈置。

在其他實施例中，用於塗覆微流體器件290之內表面292、294之塗覆材料298可包含陰離子、陽離子或兩性離子部分或其任一組合。不受限於理論，藉由在微流體迴路120之包殼284之內表面處存在陽離子部分、陰離子部分及/或兩性離子部分，塗覆材料298可與水分子形成強氫鍵，從而水合作用之所得水用作防止生物微小物體與非生物分子(例如基板之矽及/或氧化矽)發生相互作用之層(或「屏障」)。另外，在聯合使用塗覆材料298與塗覆劑之實施例中，塗覆材料298之陰離子、陽離子及/或兩性離子可與存在於包殼284中之介質180 (例如塗覆溶液)中之非共價塗覆劑(例如蛋白質溶液)之帶電部分形成離子鍵。

在其他實施例中，塗覆材料可在其面向包殼之末端處包括或經化學改質以呈現親水性塗覆劑。在一些實施例中，塗覆材料可包含含有伸烷基

醚之聚合物(例如PEG)。在一些實施例中，塗覆材料可包含多醣(例如右旋糖酐)。類似於上述帶電部分(例如陰離子、陽離子及兩性離子部分)，親水性塗覆劑可與水分子形成強氫鍵，從而水合作用之所得水用作防止生物微小物體與非生物分子(例如基板之矽及/或氧化矽)之相互作用之層(或「屏障」)。

適當塗層處理及修飾之其他細節可參見2016年4月22日提出申請之美國申請案第15/135,707號且其全部內容以引用方式併入本文中。

H. 用於維持微流體器件之隔離室內之細胞之存活的其他系統組份。

為促進細胞群體之生長及/或擴增，可藉由系統之其他組份來提供有助於維持功能細胞之環境條件。舉例而言，該等額外組份可提供營養物、細胞生長信號傳導物質、pH調節、氣體交換、溫度控制及來自細胞之廢物之去除。

IV. 其他實施例

A. 使用T細胞或NK細胞之實施例

在某些情況下，T細胞可存在於解離細胞試樣中。在該等情況下，該方法可進一步包括對解離細胞試樣實施選擇以分離T細胞之百分比或濃度大於原始解離試樣之部分。以此方式，可自同一患者之腫瘤試樣取得腫瘤浸潤淋巴球(TIL)。在其他情況下，可自同一患者之血液取得T細胞。舉例而言，T細胞可選自自同一患者取得之血樣(或末梢血單核細胞(PBMC)試樣)。在其他情況下，可自並非提供至少一種實體腫瘤之患者之個體(例如係血液供體或組織供體之個體)取得T細胞。可藉由使用至少一種選自CD4、CD8、CD25、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD69及CD3之T細胞標記物使T細胞與解離細胞試樣或血液/PBMC試樣中之其他細胞分離。

不論T細胞起源或所用選擇程序(若存在)如何，可在本文所揭示之方法中選殖及/或使用所得T細胞。舉例而言，可使用T細胞(不論係患者專一性抑或供體源)來製備CAR-T治療劑或用於其他類型免疫療法(例如涉及TIL及另一治療劑(例如根據本文所揭示之方法製得之抗體)之組合療法)。

類似於T細胞，可將天然殺手(NK)細胞用於本文所揭示之方法中。舉例而言，可使用NK細胞來製備CAR治療劑，如Topfer等人(2015), *J. Immunol.* 194(7):3201-3212中所闡述。可(例如)自血樣或組織試樣(例如自腫瘤取得之解離細胞試樣)取得NK細胞。可藉由使用至少一種NK標記物(例如CD56)使NK細胞與試樣中之其他細胞分離。

B. 依賴於外部細胞源之實施例

在一些實施例中，所有細胞源皆係來自單一患者。在其他實施例(例如論述於此自部分中者)中，細胞源可來自不同患者或不同來源。在一態樣中，該方法包括使用微流體器件鑑別至少一種製造能夠結合至患者癌細胞及來自另一來源之癌細胞之抗體之B細胞(例如以兩步驟製程)。在一實施例中，針對癌細胞系來測試B細胞，同時製備及/或培養患者之自有癌細胞(例如在將患者之癌細胞加載於微流體器件上之前)。亦可自同一患者或自不同來源取得T細胞或NK細胞。

C. 採用正常細胞之實施例

在期望時，可藉由比較結合癌細胞及非癌細胞(亦即正常細胞)之能力來評估由B細胞所製造抗體之專一性。因此，視情況，該方法可進一步包括使用微流體器件鑑別由B細胞製得之抗體是否能夠結合至非癌細胞。可自同一腫瘤試樣解離非癌細胞及癌細胞。或者，非癌細胞及/或癌細胞可源自除提供至少一種實體腫瘤試樣之患者外之個體。

可使用相同微流體器件來鑑別抗體至癌細胞及非癌細胞之結合。可將癌細胞及非癌細胞加載至微流體器件之不同部分中。舉例而言，可將癌細胞(或非癌細胞)與B細胞置於同一分離室中，且非癌細胞(或癌細胞)可流入流動通道中並不到達鄰近分離室向流動通道開放處之位置。在另一實例中，可將癌細胞(或非癌細胞)置於毗鄰含有B細胞之分離室之分離室中，且非癌細胞(或癌細胞)可流入流動通道中並到達鄰近含有B細胞之分離室向流動通道開放之位置。在再一實例中，可將癌細胞(或非癌細胞)與B細胞一起置於分離室中，且可將非癌細胞(或癌細胞)置於毗鄰含有B細胞之分離室之分離室中。不論如何放置癌細胞及/或非癌細胞，可使用相同微流體器件同時評價抗體(例如藉由B細胞製得者)是否結合至癌細胞及/或非癌細胞。在其他實施例中，可將癌細胞及非癌細胞依序加載於相同流動路徑(或相同分離區)中，從而容許依序檢測(1)抗體與癌細胞及(2)抗體與非癌細胞之間之結合。

V. 治療方法及治療組合物

可使用藉由本文所闡述之方法製得之抗體或其片段來治療癌症患者。在一情況下，腫瘤試樣係自所治療同一患者獲取。此方法之一個優點在於，可設計個人化治療用於給定患者，且在一些情況下，可在相對較短時間窗口中製得個人化治療劑，從而在由患者之疾病狀態所需之時間中達成治療效能。舉例而言，在一些實施例中，自取得腫瘤試樣至治療之時間可最多為約2個月。

在測得藉由B細胞所製造抗體之可變重鏈區及輕鏈區後，可立即製備含有所有或一些可變序列之各種不同抗體或抗體片段構築體。在一些情況下，可使用單鏈抗體治療患者。在其他情況下，可使用具有兩條重鏈及兩

條輕鏈之抗體或其片段治療患者。在一些實施例中，經改造抗體構築體包括Fab或Fab'(2)片段、scFv、多價scFv（例如二價抗體或三價抗體）、微小抗體（例如scFv-CH3二聚體）、雙專一性Ab或駱駝可變功能重鏈結構域。在其他實施例中，經改造抗體構築體包括藉由本文方法所鑑別抗體之任一變體。在一些實施例中，可以分離形式投與抗體或片段。

舉例而言，經改造抗體構築體可包括：(a)至少藉由本文方法所鑑別抗體之重鏈CDR；(b)至少藉由本文方法所鑑別抗體之重鏈及輕鏈CDR；(c)至少藉由本文方法所鑑別抗體之重鏈可變區；或(d)至少藉由本文方法所鑑別抗體之重鏈及輕鏈可變區。

在其他情況下，可使用抗體或片段來製備各種構築體。舉例而言，抗體可顯示於經改造T細胞或經改造NK細胞上。在一些實施例中，經改造T細胞係嵌合抗原受體T細胞。T細胞可在經改造以顯示抗體之前自同一患者取得，例如來自患者之腫瘤試樣或自患者取得之血樣。此一T細胞可經基因改造以表現抗體或其片段。類似地，在其他實施例中，經改造NK細胞係嵌合抗原受體NK細胞。NK細胞可在經改造以顯示抗體之前自同一患者取得，例如來自患者之腫瘤試樣或自患者取得之血樣。此一NK細胞可經基因改造以表現抗體或其片段。

在一些模式中，可組合投與抗體或其片段與另一療法。在此一情形下，組合療法可為手術、輻射、化學療法、CAR-T療法、T細胞療法（例如藉由簡單擴增患者之自有T細胞（例如TIL）且再引入其）、其他免疫療法（藉由使用功能阻斷抗體（例如針對PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、VISTA、BTLA或其任一組合之抑制抗體）靶向抑制T細胞功能之已知抗原）或投與免疫刺激劑（例如ICOS、OX40、41BB、抗腫瘤疫苗、

細胞介素或腫瘤專一性病毒)。

VI. 標記及檢測之方法

根據本文方法製得之抗體亦可用於檢測方法中。舉例而言，可使用可檢測標記來標記抗體且在活體內或在活體外用於檢測或標記癌細胞(包含患者之自有腫瘤細胞)。舉例而言，可使用螢光團偶聯抗體實施螢光引導手術以突出顯示腫瘤、改良手術切除及增加存活率。可使用諸如 Alexa Fluor 488 等螢光團。可經靜脈內注射抗體-螢光團偶聯物或可將其在手術期間施加至切除表面。本文所製得之抗體亦可用於檢測或標記之其他方法。

實例

實例1. 腫瘤生檢之處理及解離細胞試樣之分級分離

A. 腫瘤試樣之解離

自對腫瘤進行手術切除術之患者取得腫瘤試樣。在腫瘤切除術當天，在實驗室中於緊隨下列程序接收樣品。將樣品浸漬於無菌容器中之無菌鹽水中。在層流通風櫥中使用解剖刀及無菌鑷子自非活組織及健康(非癌)組織解剖活腫瘤組織。可取得活腫瘤組織之其他試樣用於其他評價。將用於解離之腫瘤試樣稱重且保持於50 ml含有少量無菌HBSS之離心管中。藉由使用10%人類血清(在56℃下熱滅活30分鐘)及最終濃度之青黴素(penicillin) G (100個單元/ml)、鏈黴素(streptomycin) (100 µg/ml)、慶大黴素(gentamicin) (50 µg/ml)、Hepes (25 mM)及2-巰基乙醇(5.5×10^{-5} M)補充RPMI 1640來製備用於培養細胞之培養基。

將組織樣品置於無菌切割表面(切割板或開放皮氏培養皿(Petri dish))上。使用無菌解剖刀及鑷子，將樣品切割成較小(3-5 mm)片段。將切割片

段轉移至gentleMACS[®] C管中。將酶培養基(EM)添加至管中(5 ml 0.2 – 2g組織及10 ml 2-5 g)且藉由旋轉蓋直至聽到輕微啞聲為止來將管安全封閉。使用EM幫助在gentleMACS[®]程式運行之間於短培育時段期間自手術樣品分散細胞。含酶培養基RPMI 1640不含血清，但含有青黴素G (100 個單元/ml)、鏈黴素(100 µg/ml)、慶大黴素(50 µg/ml)、Fungizone[®] (1.25 µg/ml)、膠原酶(1 mg/ml)及Pulmozyme[®] (約30個單元/ml)。酶儲備液係儲存於-20℃下之乾燥粉末。

將C管垂直且沿蓋側向下安裝至gentleMACs套管中。適當安裝可確保C管抵靠旋轉及軸向力保持於適當位置。藉由內部gentleMACS[®]解離器記憶體提供預定程式。程式之強度有所不同，從而端視擬處理組織之紋理來選擇適當程式。較軟組織需要較輕微旋轉(較低速度)且較硬組織需要較劇烈、較長旋轉。可實施多個解離試驗，且在試驗之間評估所實施解離之狀態。經由置於250 ml離心管頂部經高壓滅菌之漏斗中之經高壓滅菌之金屬絲網來過濾解離組織。使用無菌HBSS沖洗金屬絲網且使用額外無菌HBSS處理管。然後藉由在1500 rpm下離心10分鐘來將解離組織洗滌一次。抽吸上清液且將糰粒再懸浮於已知體積之HBSS中。

B. 用於腫瘤解離之替代程序

作為使用gentleMACS[®]儀器實施腫瘤解離之替代，可使用消解緩衝劑。使用鑷子將腫瘤組織撥開或切割成小片(2-5 mm)。將組織置於解離緩衝液(於RPMI及10%人類血清(在56℃下熱滅活30分鐘)中之100個單元/ml膠原酶及100 µg/ml DNA酶)中。在37℃下於培育器中進行消解30分鐘。在培育之後，使用吸量管上下吸取試樣以得到易於流動之單細胞懸浮液。

經由70微米過濾器過濾懸浮液並使用使用補充有10%人類血清(在56

℃下熱滅活30分鐘)之MACs分離緩衝液洗滌2次。將細胞懸浮液在400×g下離心10分鐘。使用10 ml MACs緩衝液沖洗糰粒且在相同設置下再次離心。然後將解離細胞再懸浮於100 µl MACs緩衝液中。

C. 細胞類型自解離細胞試樣之分級分離

在使用任一上述方案製得包括單細胞之解離細胞試樣之後，可自解離細胞試樣分級分離B細胞、T細胞、NK細胞及癌細胞。可使用抗CD20磁珠來選擇B細胞。可使用抗CD4及/或抗CD8磁珠來選擇T細胞。可使用抗CD56磁珠來選擇NK細胞。可使用附接至癌細胞專一性抗體之磁珠來選擇癌細胞或可使用形態評估人工去除癌細胞。

向解離細胞試樣中添加靶向擬分級分離之第一細胞類型之經抗體標記之微珠(大約10 µl/10⁸個細胞)。藉由輕微輕彈管且在4-8℃下培育15分鐘來充分混合管，且屏蔽光。藉由添加10 ml MACs緩衝液且在400 × g下離心10分鐘來洗滌細胞。傾倒(或抽吸)出上清液且將細胞再懸浮於500 µl MACs緩衝液中。將新管柱施加至磁力分離器中。藉由使用適當量用於所選管柱之MACs緩衝液進行沖洗來啟動管柱。在啟動管柱之後，將細胞懸浮液施加至管柱頂部，其中一根管柱用於每1 × 10⁸個細胞。收集任何未標記細胞(貫通)且保留用於分離不同細胞類型。對於第一洗滌而言，使用500 µl體積(總共1.5 ml至2.5 ml)流體洗滌液將管柱洗滌最少三次及最多五次。將流體流保存於管柱中且不容許其乾運行(乾運行可影響純度且導致損失細胞存活率)。

對於第二洗滌而言，使用包括膠原酶及DNA酶之解離緩衝液混合物洗滌管柱以沖洗掉來自死亡或頻死腫瘤細胞之黏性碎屑(於RPMI及10%人類血清(在56℃下熱滅活30分鐘)中之100個單元/ml膠原酶及100 µg/ml

DNA酶)。對於第三洗滌而言，再次使用MACs緩衝液直至洗滌液看起來完全澄清為止。

自磁力分離器取出管柱且置於適宜收集管上。將2 ml緩衝液置於管柱上且藉由穩定施加與管柱一起供應之柱塞來收集磁標記細胞。

或者，可藉由AutoMACS[®]實施磁力分離。

實施其他分離步驟以分離B細胞、T細胞、NK細胞及癌細胞中之每一者。在期望時，自細胞去除磁珠。

實例2. 在微流體器件中篩選用於分泌IgG抗體之小鼠脾細胞

實施篩選以鑑別分泌結合至人類CD45之IgG型抗體之小鼠脾細胞。

實驗設計包含下列步驟：

- 1. 生成CD45抗原塗覆珠粒；
- 2. 收穫小鼠脾細胞；
- 3. 將細胞加載至微流體器件中；及
- 4. 分析抗原專一性。

用於實驗之試劑包含顯示於表1中者。

表1 -試劑

	名稱	供應商	目錄編號	批號
1	Slide-A-Lyzer MINI透析器件，7K MWCO, 0.1mL	Thermo Pierce	69560	OJ189254
2	CD45蛋白	R&D Systems	1430-CD	112722
3	pH 7.2 PBS，含有Mg2+及Ca2+	Fisher	BP29404	

4	鏈黴抗生物素蛋白 (streptavidin)塗覆珠粒(8 μm)	Spherotech	SVP-60-5	AC01
5	EZ-Link NHS-PEG4-生 物素，免稱量型	Pierce	21329	
6	雜交瘤SFM培養基	Life Tech	12045-076	
7	胎牛血清	Hyclone	SH30084.03 號	
8	青黴素-鏈黴素(10,000 U/mL)	Life	15140-122	
9	山羊抗小鼠F(ab') ₂ -Alexa 568	Life	目錄編號 A11019	批號 1073003
10	鏈黴抗生物素蛋白-488	Life	目錄編號 S32354	批號 1078760
11	小鼠抗CD45 IgG ₁	R&D Systems	MAB1430	ILP0612061
12	BD Falcon™細胞過濾 器，40μm，藍色	BD	352340	

CD45抗原塗覆珠粒之生成

以下列方式生成**CD45**抗原塗覆微珠：

- 將50μg無載體**CD45**再懸浮於500 μL PBS (pH 7.2)中。
- 使用500 μL PBS沖洗slide-a-lyzer迷你杯中，然後添加至微量離心管中。
- 將50 μL 0.1 μg/μL **CD45**溶液添加至經沖洗slide-a-lyzer迷你杯中。
- 將170 μL PBS添加至2 mg NHS-PEG4-生物素中，然後將4.1 μL NHS-PEG4-生物素添加至含有**CD45**抗原之slide-a-lyzer迷你杯中。

- 將NGS-PEG4-生物素與CD45抗原一起在室溫下培育1小時。
- 在培育後，自微量離心管取出slide-a-lyser迷你杯，置於第二微量離心管中之1.3 ml PBS (pH 7.2)中，且在4℃及搖晃下培育第一1小時時段。隨後將slide-a-lyser迷你杯轉移至含有1.3 ml新鮮PBS (pH 7.2)之第三微量離心管中，且在4℃及搖晃下培育第二1小時時段。重複此最後步驟三次以上，且總共進行5次1小時培育。
- 將100 μ L生物素化CD45溶液(約50 ng/ μ L)吸取至標記管中。
- 將500 μ L Spherotech鏈黴抗生物素蛋白塗覆珠粒吸取至微量離心管中，在PBS (pH 7.4)中洗滌3次(1000 μ L/洗滌)，然後在3000 RCF下離心5 min。
- 將珠粒再懸浮於500 μ l PBS (pH 7.4)中，從而得到5 mg/ml之珠粒濃度。
- 將50 μ L生物素化蛋白質與再懸浮之Spherotech鏈黴抗生物素蛋白塗覆珠粒混合。將混合物在4℃及搖晃下培育2小時，然後在4℃及3000 RCF下離心5 min。棄除上清液且將CD45塗覆珠粒在1 mL PBS (pH 7.4)中洗滌3次。然後將珠粒在4℃及3000 RCF下再離心5 min。最後，將CD45珠粒再懸浮於500 μ L pH 7.4 PBS中且儲存於4℃下。

小鼠脾細胞收穫

收穫來自使用CD45實施免疫之小鼠之脾置於DMEM培養基+ 10% FBS中。使用剪刀切碎脾。

將切碎之脾置於40 μ m細胞過濾器中。經由細胞過濾器使用10 ml吸量管洗滌單細胞。使用玻璃棒進一步搗碎脾且迫使單細胞通過細胞過濾器，然後經由細胞過濾器使用10 ml吸量管再次洗滌單細胞。

使用商業套組裂解紅血球。

在200×G下旋轉細胞且使用10 ml吸量管以 2×10^8 個細胞/ml之濃度將原始脾細胞再懸浮於DMEM培養基+ 10% FBS中。

細胞在微流體器件中之加載

將脾細胞輸入微流體晶片中且加載至含有20-30個細胞/欄之欄中。使100微升培養基以1 $\mu\text{L/s}$ 流經器件以去除不期望細胞。將溫度設定於36 $^{\circ}\text{C}$ ，且以0.1 $\mu\text{L/sec}$ 灌注培養基30分鐘。

抗原專一性分析

製備含有1:2500山羊抗小鼠F(ab')₂-Alexa 568之細胞培養基。

將100 μL CD45珠粒再懸浮於22 μL 含有山羊抗小鼠F(ab')₂-Alexa 568之1:2500稀釋液之細胞培養基中。

接下來，使再懸浮CD45珠粒以1 $\mu\text{L/sec}$ 之速率流入微流體晶片之主通道中直至其位於毗鄰含有脾細胞之欄但只是位於該欄外側為止。然後停止流體流。

然後使微流體晶片在明場中成像以測定珠粒位置。

接下來，使用德克薩斯紅濾光器捕獲細胞及珠粒之影像。在1 hr內每5分鐘獲取影像，其中每一暴露持續1000 ms且增益為5。

結論

觀察到產生於珠粒上之正信號，從而反映IgG同型抗體擴散出某些欄且進入主通道中，其中其能夠結合CD45塗覆珠粒。抗CD45抗體至珠粒之結合容許二級山羊抗小鼠IgG-568與珠粒締合且產生可檢測信號。參見圖5C之白色箭頭。

使用本發明方法，每組與正信號有關之脾細胞可以單細胞形式分離

且移動至新欄中且再分析。以此方式，可檢測表現抗CD45 IgG抗體之單細胞。

實例3. 膜製劑及膜抗原至珠粒之偶聯

下列方案證實自所關注試樣細胞取得含有蛋白質(及其他生物分子)及尤其膜結合或膜締合蛋白之試樣之可行性。該方案係在Jurkat細胞上實施以使得能夠測試所得試樣中已知存在於該等細胞中之蛋白質。該方案可易於延伸至其他細胞類型(包含自腫瘤生檢分離之癌細胞)，由此得到含有腫瘤細胞專一性(或其他細胞類型專一性)抗原之可用於針對抗原反應性篩選免疫學細胞(例如B細胞)之試樣。

材料：

- Jurkat細胞(ATCC TIB-152)
- LiDS- 試樣緩衝液：0.02 g/mL LiDS、10% 甘油、0.51 mM EDTA、247 mM pH8.5 Tris (ThermoFisher B0008)
- Qiashtredder (Qiagen 79654)
- DPBS (含有鈣及鎂，ThermoFisher 14040-182)
- 超純水(ThermoFisher 10977-015)
- EZ-Link磺基-NHS-SS-生物素(ThermoFisher 21328)：儲存於-20℃下，取出且在使用之前於室溫下升溫約30 min；簡單旋轉以在管底收集每一物質；在即將使用之前，將164 µL超純水添加至1個含有1 mg磺基-NHS-SS-生物素之管中且上下吸取若干次以溶解(產生10 mM溶液)
- Complete Ultra mini (Sigma 5892791001)：製備20×溶液：藉由渦旋將1錠劑溶於500 µL水中(在4℃或-20℃下穩定4週)
- Minute血漿膜蛋白分離套組(Invent Biotechnologies SM-005)：在

使用之前，將溶液A及B解凍，且添加蛋白酶抑制劑：

- 對於每一試樣而言，500 μ L緩衝液A + 25 μ L 20 $\times$ 蛋白酶抑制劑
(儲存於冰上)

- 對於每一試樣而言，200 μ L緩衝液B + 10 μ L 20 $\times$ 蛋白酶抑制劑
(儲存於冰上)

- 對於冰上之每一試樣而言，製備1個濾芯

- BSA: Chromatopur牛白蛋白(MP Biomedicals 02180561)

- 鏈黴抗生物素蛋白塗覆之磁力微球體(Bangs實驗室CM01N 批號11806)，在使用之前，洗滌且阻斷：

- 渦旋珠粒，取出300 μ L/試樣且轉移至1.5 mL管中

- 使用PBS洗滌

- 再懸浮於0.5% BSA中且在4 $^{\circ}$ C下(旋轉)培育至少1 h

- 使用PBS洗滌，再懸浮於500 μ L DPBS (+蛋白酶抑制劑)/試樣中

- 抗- α 1鈉鉀ATPase (Na/K-ATPase)抗體(Abcam ab7671)

- 抗人類CD3抗體，純系SK7 (BioLegend 344802)

- 抗人類CD45抗體，純系HI30 (BioLegend 304002)

- F(ab')₂-山羊抗小鼠IgG (H+L)，Alexa Fluor 488 (ThermoFisher A-11017)

膜蛋白之生物素化：

- 計數Jurkat細胞

- 製備用於西方印漬分析之等分試樣：

- 離心2 $\times$ 10⁶個細胞

- 使用PBS洗滌

- 裂解於LiDS-試樣緩衝液中且經由Qiashredder管柱離心以剪切

DNA

- 在4℃下儲存數天，在-80℃下儲存更長時間
- 藉由離心使用DPBS洗滌多批次之 15×10^6 個細胞三次
- 將每一糰粒再懸浮於500 μ L DPBS中，轉移至1.5 mL管中且添加

10 μ L新製10 mM磺基-NHS-SS-生物素

- 在室溫下旋轉30 min
- 使用冷DPBS洗滌三次且使用細胞糰粒繼續進行以富集膜部分
- 用於西方印漬分析之製程1試樣(參見上文)。

圖6顯示針對Na/K-ATPase (存在於血漿膜中之蛋白質)及GAPDH (胞質蛋白)染色之實例性西方印漬。

使用**Minute**血漿膜分離套組富集膜部分：

- 在冰上實施所有步驟，在4℃下離心。
- 將糰粒再懸浮於緩衝液A中：在 $<5 \times 10^6$ 個細胞時200 μ l，在 $>5 \times 10^6$ 個細胞時500 μ l
- 在冰上培育10 min
- 劇烈渦旋10-30 sec，立即轉移至冰上之濾芯中
- 蓋上濾芯，在16,000 g下離心30 sec (若細胞裂解物不通過，則增加至2 min)
- 將糰粒再懸浮於收集管中，轉移至相同過濾器中且再次離心
- 棄除過濾液，藉由劇烈渦旋10 sec來再懸浮糰粒
- 在700 g下離心1 min (以沈澱完整細胞核)
- 在新1.5 ml管中以16,000 g/4℃將上清液離心30 min (→上清液含

有胞質溶膠中，糰粒=總膜蛋白部分)

- 藉由渦旋或上下吸取來將糰粒再懸浮於200 μ l緩衝液B中
- 在7,800 g / 4°C下離心20 min→糰粒含有細胞器膜蛋白
- 小心將上清液(膜部分)轉移至新2.0 ml管中

使膜部分結合至鏈黴抗生物素蛋白塗覆之磁力微球體：

- 將80 μ L每一膜部分添加至500 μ L珠粒中
- 在4°C下旋轉o/n
- 暴露未結合部分以用於藉由西方印漬進行分析
- 在0.5% BSA/PBS +蛋白酶抑制劑中旋轉30 min
- 使用PBS洗滌
- 再懸浮於250 μ L 0.1% BSA/PBS +蛋白酶抑制劑中
- 自珠粒釋放膜部分(使用DTT裂解S-S鍵)：
- 取出50 μ L珠粒之等分試樣
- 置於磁體上且去除溶液
- 將珠粒再懸浮於50 μ L含有50 mM DTT (1×還原劑，ThermoFisher

B0009)之LiDS-試樣緩衝液中

- 在室溫下培育2 hr (各混合約30 min)

抗體染色：

- 在下列稀釋液中針對每一抗體獲取50 μ L珠粒等分試樣(來自步驟

24)

- CD3 (1:200)
- CD45 (1:100)
- Na/K-ATPase (1:100)

- 無一級抗體
- 在4℃下旋轉30 min
- 添加800 μ L PBS以進行洗滌，使用PBS再洗滌1次
- 在4℃下於二級抗體(Alexa488偶聯山羊抗小鼠)中培育30 min (旋轉，體積：200 μ L，於0.5% BSA/PBS +蛋白酶抑制劑中)，1:300
- 添加800 μ L PBS以進行洗滌，使用PBS再洗滌1次
- 再懸浮於20 μ L 0.5% BSA/PBS +蛋白酶抑制劑中
- 螢光顯微鏡上之影像

圖7顯示使用針對CD3、CD45或Na/K-ATPase染色之Jurkat細胞膜部分塗覆之珠粒。與Na/K-ATPase (其表現為較弱斑點)相比，CD3及CD45皆強烈顯現。圖8顯示與HEK293細胞之對比。此處，Na/K-ATPase之染色相同，但CD3及CD45不存在。

結果顯示，自細胞膜製劑分離之蛋白質可成功偶合至珠粒。可混合該等珠粒與免疫學細胞以測定何種細胞對存在於細胞膜製劑中之抗原(不論蛋白質或其他物質)具有反應性。

實例4. 鑑別表現結合至珠粒偶聯癌細胞源抗原之抗體之B細胞

可實施篩選以鑑別表現結合至患者之自有髓質乳癌細胞之抗體之患者專一性B細胞。實驗設計可包含下列步驟：

- 收穫及選擇B細胞及癌細胞；
- 自癌細胞取得細胞膜製劑且將膜抗原偶聯至珠粒；
- 將B細胞加載至微流體器件中；
- 將偶聯至癌細胞源膜抗原之珠粒加載至微流體器件中；及
- 分析藉由B細胞製得之抗體至珠粒之結合。

A. 細胞收穫及選擇

自患者取得髓質乳癌腫瘤之生檢且解離生檢之細胞，如實例1中所闡述(上文)。B細胞係選自使用抗CD-20磁珠之所得解離細胞試樣，由此製造B細胞富集之細胞試樣。接下來，使用抗ER (雌激素受體)、抗PR (黃體酮受體)及抗HER2磁珠之混合物使保留於B細胞消耗性解離細胞試樣中之細胞消耗非髓質乳癌細胞以製造三陰性乳癌細胞富集之試樣。

B. 細胞膜自乳癌細胞之製備及膜抗原至珠粒之偶聯

自在部分A中取得之三陰性乳癌細胞富集之試樣開始，可製備來自癌細胞之細胞膜且偶聯至珠粒，如上文3中所闡述。

C. 細胞在微流體器件中之加載

接下來，藉由使1-3微升試樣以0.1-1.0微升/sec之速率流入流動通道中來將B細胞富集之細胞試樣加載至微流體晶片中。然後停止試樣流且，儘管試樣中之細胞位於流動通道中，但使用DEP力(例如OET)選擇性捕獲B細胞且移動至分離室中連結至流動通道之分離區中。將單一B細胞置於複數個分離室中之每一者中。端視所用微流體晶片之大小，可在單一晶片上個別地分離3000或更多個B細胞。一般而言，較少B細胞預計存在於試樣中。因此，可分離試樣中之所有B細胞。在使B細胞移動至分離室中後，立即使用新鮮培養基沖洗流動通道以清洗含有不期望細胞及碎屑之流動通道。

在清洗流動通道之後，將三陰性乳癌細胞富集試樣加載至晶片中。類似於B細胞富集試樣，使1-3微升癌細胞富集試樣以0.1-1.0微升/sec之速率流入流動通道中，然後停止該流。使用形態特徵，使用DEP力(例如OET)選擇複數個癌細胞(例如3-6個)且使其移動至含有B細胞之每一分離

室中。在使癌細胞移動至分離室中後，立即使用新鮮培養基沖洗流動通道以清洗含有不期望細胞及碎屑之流動通道。以此方式，向微流體晶片中之複數個分離室中加載單一B細胞及複數個髓質乳癌細胞。

D. 珠粒在微流體器件中之加載

在清洗流動通道之後，將偶聯至自三陰性乳癌細胞富集試樣取得之膜抗原之珠粒加載至晶片中。類似於B細胞富集試樣，使1-3微升癌細胞相關抗原偶聯珠粒以0.1-1.0微升/sec之速率流入流動通道中，然後停止該流。使珠粒移動至含有B細胞之每一分離室中。在使珠粒移動至分離室中後，隨後立即使用新鮮培養基沖洗流動通道以清洗含有不期望珠粒及碎屑之流動通道。以此方式，向微流體晶片中之複數個分離室中加載單一B細胞及複數個癌細胞相關抗原偶聯珠粒。或者，珠粒可保留於通道中，如上文實例2中所闡述。

E. 抗體結合分析

為測定任一經分離B細胞是否製造結合至癌細胞相關抗原之抗體，在有助於抗體表現之條件下培育微流體晶片中之B細胞。在該培育之後，使含有結合至人類抗體之恆定區之二級抗體之混合物之培養基流入微流體晶片中，然後停止。使抗體混合物中之抗體(其可含有經螢光標記之抗人類IgG抗體、抗人類IgM抗體及視情況針對人類IgA、IgE及/或IgD之抗體)擴散至分離室中且結合至由B細胞製得之抗體。若由B細胞製得之抗體結合至一或多種偶聯至相應分離室中之珠粒之癌細胞相關抗原，則抗人類二級抗體(及其標記)將可檢測地結合至珠粒表面。若珠粒保留於通道中，則可在使珠粒流入微流體器件中之前混合經螢光標記之二級抗體與珠粒。

在二級抗體培育步驟期間，使用用於檢測螢光信號之濾光器(例如德

克薩斯紅濾光器)使微流體晶片週期性成像。可在1 hr內每5分鐘獲取影像，其中每一暴露持續1000 ms。

F. 結論

可觀察到產生於含有B細胞(其表現結合至癌細胞相關抗原之抗體)之任一分離室中(或鄰近)之珠粒之表面上的正信號。使用此方法，可專一性鑑別表現所關注抗體之個別B細胞。可使不製造任何感興趣抗體之B細胞移動出其分離室且作為廢物輸出微流體晶片。可使鑑別為表現結合至患者髓質乳癌細胞源抗原之抗體之B細胞移動出分離室(例如使用DEP力，例如OET)且輸出以用於所表現抗體之重鏈及輕鏈可變區之放大及測序。若B細胞發生擴增同時被誘導表現抗體，則可輸出B細胞之純系群體以用於表現抗體之重鏈及輕鏈可變區之放大及測序。

實例5. 鑑別表現結合至癌細胞之抗體之B細胞

患者，可實施篩選以鑑別表現結合至患者之自有髓質乳癌細胞之抗體之患者專一性B細胞。實驗設計可包含下列步驟：

- 收穫及選擇B細胞及癌細胞；
- 將細胞加載至微流體器件中；及
- 分析藉由B細胞製得之抗體至癌細胞之結合。

A. 細胞收穫及選擇

自患者取得髓質乳癌腫瘤之生檢且解離生檢之細胞，如實例1中所闡述(上文)。B細胞係選自使用抗CD-20磁珠之所得解離細胞試樣，由此製造B細胞富集之細胞試樣。接下來，使用抗ER (雌激素受體)、抗PR (黃體酮受體)及抗HER2磁珠之混合物使保留於B細胞消耗性解離細胞試樣中之細胞消耗非髓質乳癌細胞以製造三陰性乳癌細胞富集之試樣。

B. 細胞在微流體器件中之加載

接下來，藉由使1-3微升試樣以0.1-1.0微升/sec之速率流入流動通道中來將B細胞富集之細胞試樣加載至微流體晶片中。然後停止試樣流且，儘管試樣中之細胞位於流動通道中，但使用DEP力(例如OET)選擇性捕獲B細胞且移動至分離室中連結至流動通道之分離區中。將單一B細胞置於複數個分離室中之每一者中。端視所用微流體晶片之大小，可在單一晶片上個別地分離3000或更多個B細胞。一般而言，較少B細胞預計存在於試樣中。因此，可分離試樣中之所有B細胞。在使B細胞移動至分離室中後，立即使用新鮮培養基沖洗流動通道以清洗含有不期望細胞及碎屑之流動通道。

在清洗流動通道之後，將三陰性乳癌細胞富集試樣加載至晶片中。類似於B細胞富集試樣，使1-3微升癌細胞富集試樣以0.1-1.0微升/sec之速率流入流動通道中，然後停止該流。使用形態特徵，使用DEP力(例如OET)選擇複數個癌細胞(例如3-6個)且使其移動至含有B細胞之每一分離室中。在使癌細胞移動至分離室中後，立即使用新鮮培養基沖洗流動通道以清洗含有不期望細胞及碎屑之流動通道。以此方式，向微流體晶片中之複數個分離室中加載單一B細胞及複數個髓質乳癌細胞。

C. 抗體結合分析

為測定任一經分離B細胞是否製造結合至癌細胞之抗體，在有助於抗體表現之條件下培育微流體晶片中之B細胞。在該培育之後，使含有結合至人類抗體之恆定區之二級抗體之混合物之培養基流入微流體晶片中，然後停止。使抗體混合物中之抗體(其可含有經螢光標記之抗人類IgG抗體、抗人類IgM抗體及視情況針對人類IgA、IgE及/或IgD之抗體)擴散至分離

室中且結合至由B細胞製得之抗體。若由B細胞製得之抗體結合至相應分離室中之一或多種癌細胞，則抗人類二級抗體(及其標記)將可檢測地結合至髓質乳癌細胞之表面。

在二級抗體培育步驟期間，使用用於檢測螢光信號之濾光器(例如德克薩斯紅濾光器)使微流體晶片週期性成像。在1 hr內每5分鐘獲取影像，其中每一暴露持續1000 ms。

D. 結論

可觀察到產生於含有表現結合至癌細胞之抗體之B細胞之任一分離室中之癌細胞表面上的正信號。使用此方法，可專一性鑑別表現所關注抗體之個別B細胞。可使不製造任何感興趣抗體之B細胞移動出其分離室且作為廢物輸出微流體晶片。可使鑑別為表現結合至患者髓質乳癌細胞之抗體之每一B細胞移動出分離室(例如使用DEP力，例如OET)且輸出以用於所表現抗體之重鏈及輕鏈可變區之放大及測序。若B細胞發生擴增同時被誘導表現抗體，則可輸出B細胞之純系群體以用於表現抗體之重鏈及輕鏈可變區之放大及測序。

實例6. 使用CAR-T及溶瘤病毒之組合療法

嵌合抗原受體(CAR)重置T細胞可在癌症治療中提供增加之益處。患有癌症(例如神經胚細胞瘤)之患者經受生檢或手術切除術且使用前述實例鑑別製造結合至癌症之抗體之B細胞。改造CAR-T細胞系以表現對應於由所鑑別B細胞製得之抗體之抗體或其片段(對應意指具有至少相同重鏈CDR、至少相同重鏈及輕鏈CDR、至少可變重鏈或至少可變重鏈及輕鏈)。對於此患者而言，改造CAR-T細胞系以表現scFv，其中藉由RT-PCR選殖編碼重鏈及輕鏈之可變區之基因。藉由交錯剪接PCR生成組合

scFv基因且然後接合至載體噬菌體DNA之限制位點。

將scFv序列框內選殖至逆轉錄病毒主鏈(例如SFG逆轉錄病毒主鏈)中。使用239T細胞製備逆轉錄病毒上清液。在48及72小時後收集含有逆轉錄病毒之上清液。為進行轉導，將使用OKT3 (Ortho Biotech, Bridgewater, NJ)及CD28 (Becton Dickinson, Mountain View, CA)抗體及重組人 IL-12 (100個單元/ml； Proleukin, Chiron, Emeryville, CA)活化之 0.5×10^6 /ml末梢血單核細胞(PBMC)平鋪於24孔板(經重組纖維連蛋白片段(FN CH-296, Retronectin, Takara Shuzo, Otsu, Japan)預塗覆)中之完整培養基(45% RPMI 1640、45% Click培養基及10%熱滅菌人類血清及2 mM L-麩醯胺酸)中。在添加病毒上清液之後，旋轉細胞且在37℃下於5% CO2中培育。在72小時後量測T淋巴球上之CAR表現且將細胞維持於完整培養基中之培養物中並每3天一次添加rIL-2 (50個單元/ml)。

將該等CAR-T細胞過繼性轉移至患者中且投與溶瘤病毒(例如溶瘤腺病毒)。溶瘤腺病毒可為Ad5D24，其視情況表現重組IL15、RANTES或其組合。患者預計具有顯著臨床改良。

等效內容

前述書面說明書可視為足以使得熟習此項技術者能夠實踐實施例。前述闡述及實例詳述某些實施例且闡述所涵蓋最佳模式。然而，應瞭解，無論前述內容可在文件中表現為如何詳細，可以許多方式來實踐實施例且應根據隨附申請專利範圍及其然後等效內容來進行解釋。

【符號說明】

- 100 微流體器件
- 102 包殼

104	支撐結構
106	流動路徑/流
107	入口閥門或埠
108	微流體迴路結構
109	內表面
110	蓋
114	框
116	微流體迴路材料
120	微流體迴路
122	微流體通道
124	微流體隔離室/隔離欄
126	微流體隔離室/隔離欄
128	微流體隔離室/隔離欄
130	微流體隔離室/隔離欄
132	微小物體捕集器
134	側通路
150	系統
152	控制及監測設備
154	主控制器
156	控制模組
158	數位記憶體
160	介質模組
162	動力模組

164	成像模組
166	傾斜模組
168	其他模組
170	顯示器件
172	輸入/輸出器件
178	介質源
180	流體介質/第一流體介質
190	傾斜器件
192	電源
194	成像器件
200	微流體器件
202	區域/室
204	底部電極
206	電極激活基板
208	內表面
210	頂部電極
212	電源
214	未照射DEP電極區/暗DEP電極區
214a	經照射DEP電極區
216	光源
218	光圖案
220	正方形圖案
222	埠

224	隔離室
226	隔離室
228	隔離室
230	微流體器件
232	分離結構
234	近端開口
236	連結區
238	遠端開口
240	分離區
242	流
244	二級流
246	微小物體
248	第二流體介質
250	微流體器件
252	框
254	第一流體介質
256	微流體迴路結構
258	第二介質
260	微流體迴路材料
262	微流體迴路
264	流動通道/微流體通道
266	隔離室
268	連結區

270	分離區
272	分離結構
274	近端開口
276	遠端開口
278	流/箭頭
280	微流體器件
282	二級流
284	包殼
286	基底
288	蓋
290	微流體器件
292	內表面
294	內表面
296	矽氧基連接體
298	塗覆材料
300	微流體器件/嵌套/支撐結構
302	插孔
304	積體電信號生成子系統
306	熱控制子系統
308	控制器
312	外殼
314	流體路徑
316	入口

318	出口
320	微流體器件
322	印刷電路板總成
330	光調變子系統
332	第一光源
334	第二光源
336	光束分離器
338	光束分離器及/或二向色濾光器
340	物鏡
342	試樣平面
344	載物台
346	二向色濾光器
348	檢測器
350	顯微鏡
D_p	滲透深度
L_{con}	長度
W_{ch}	寬度
W_{con}	寬度
W_{iso}	寬度
W_{CH}	寬度
W_{con1}	寬度
W_{con2}	寬度
L_{c1}	長度
L_{c2}	長度



201734207

申請日：106/01/13

【發明摘要】

IPC分類：**G12N 5/24** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/547 (2006.01)

【中文發明名稱】

製造患者專一性抗癌治療劑之方法及使用該治療劑之治療方法

【英文發明名稱】

METHODS OF PRODUCING PATIENT-SPECIFIC ANTI-CANCER THERAPEUTICS AND METHODS OF TREATMENT THEREFOR

【中文】

本發明提供一種製備抗體治療劑之方法，其包括：(a)提供來自至少一種自患者取得之實體腫瘤試樣之解離細胞試樣；(b)將該解離細胞試樣加載至具有流動區及至少一個在流體上連結至該流動區之分離區之微流體器件中；(c)使至少一種B細胞自該解離細胞試樣移動至該微流體器件中之至少一個分離區中，由此取得至少一種經分離B細胞；及(d)使用該微流體器件鑑別至少一種可製造能夠結合至癌細胞之抗體之B細胞。該等癌細胞可為患者之自有癌細胞。亦提供治療患者之方法、標記或檢測癌症之方法、包含抗體或其片段之經改造T細胞或NK細胞、及經改造抗體構築體。

【英文】

A method of preparing an antibody therapeutic is provided comprising: (a) providing a dissociated cell sample from at least one solid tumor sample obtained from a patient; (b) loading the dissociated cell sample into a microfluidic device having a flow region and at least one isolation region fluidically connected to the flow region; (c) moving at least one B cell from the dissociated cell sample into at least one

isolation region in the microfluidic device, thereby obtaining at least one isolated B cell; and (d) using the microfluidic device to identify at least one B cell that produces antibodies capable of binding to cancer cells. The cancer cells can be the patient's own cancer cells. Also provided are methods of treating patients, methods of labeling or detecting cancer, engineered T or NK cells comprising antibodies or fragments thereof, and engineered antibody constructs.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種製備抗體治療劑之方法，其包括：

- a.提供來自至少一種自患者取得之實體腫瘤試樣之解離細胞試樣；
- b.將該解離細胞試樣加載至具有至少一個流動區及至少一個在流體上連結至該流動區之分離區之微流體器件中；
- c.使至少一種B細胞自該解離細胞試樣移動至該微流體器件中之至少一個分離區中，由此取得至少一種經分離B細胞；
- d.鑑別至少一種可製造能夠結合至癌細胞相關抗原之抗體之經分離B細胞。

【第2項】

如請求項1之方法，其中該分離區包括至少一個促進B細胞淋巴球存活活力之條件化表面，該條件化表面包括以共價方式連接之分子。

【第3項】

如請求項1之方法，其中該分離區包括複數個促進B細胞淋巴球存活活力之條件化表面，每一條件化表面包括以共價方式連接之分子。

【第4項】

如請求項2或3之方法，其中該至少一個條件化表面或該複數個條件化表面之每一條件化表面包括一層以共價方式連接之親水性分子層。

【第5項】

如請求項4之方法，其中該等親水性分子係選自由以下組成之群：包含聚乙二醇(PEG)之聚合物、包含胺基酸之聚合物、及其組合。

【第6項】

如請求項1之方法，其中該分離區包括至少一個經促進B細胞存活力之塗覆材料塗覆之表面。

【第7項】

如請求項1之方法，其中該分離區包括複數個各自經促進B細胞存活力之塗覆材料塗覆之表面。

【第8項】

如請求項6或7之方法，其中該塗覆材料包含親水性分子。

【第9項】

如請求項8之方法，其中該等親水性分子係選自由以下組成之群：包含聚乙二醇(PEG)之聚合物、包含胺基酸之聚合物、及其組合。

【第10項】

如請求項1至9中任一項之方法，其中該至少一個分離區中之每一者形成該微流體器件中之死端，且其中在該流動區實質上經流動之第一流體介質填充且該(等)分離區實質上經第二流體介質填充時：

a. 該第二介質之組份能夠擴散至該第一介質中且該第一介質之組份能夠擴散至該第二介質中；且

b. 該第一介質實質上不會自該流動區流入該分離區中。

【第11項】

如請求項1至10中任一項之方法，其中該微流體器件之該流動區包括微流體通道。

【第12項】

如請求項11之方法，其中該至少一個分離區中之每一者係相應隔離室之一部分，且其中每一隔離室進一步包括使相應分離區在流體上連結至

該微流體通道之連結區。

【第13項】

如請求項12之方法，其中該連結區具有約20微米至約60微米之寬度 W_{con} 。

【第14項】

如請求項12或13之方法，其中該至少一個分離區中之每一者具有大於相應連結區寬度 W_{con} 之寬度 W_{iso} 。

【第15項】

如請求項14之方法，其中該至少一個分離區中之每一者具有約50微米至約250微米之寬度 W_{iso} 。

【第16項】

如請求項12至15中任一項之方法，其中該等隔離室中之每一者包括約0.5 nl至約2.5 nl之體積。

【第17項】

如請求項1至16中任一項之方法，其中使用重力及/或局部化流體流動使該至少一種B細胞移動至該至少一個分離區中。

【第18項】

如請求項1至17中任一項之方法，其中該微流體器件包括具有DEP組態之基板。

【第19項】

如請求項18之方法，其中使該至少一種B細胞移動至該至少一個分離區中包括使用DEP力移動該至少一種B細胞。

【第20項】

如請求項1至19中任一項之方法，其中在加載該解離細胞試樣之前，該方法進一步包括使用可檢測標記物標記該解離細胞試樣中之B細胞。

【第21項】

如請求項20之方法，其中使該至少一種B細胞移動至該至少一個分離區中包括基於該可檢測標記物之檢測選擇至少一種用於移動之B細胞。

【第22項】

如請求項1至21中任一項之方法，其中使至少一種B細胞移動至至少一個分離區中包括將複數個個別B細胞移動至相應複數個單獨分離區中。

【第23項】

如請求項1至22中任一項之方法，其進一步包括：

使該至少一種B細胞與刺激B細胞活化之刺激劑接觸。

【第24項】

如請求項23之方法，其中該刺激劑包括CD40激動劑。

【第25項】

如請求項24之方法，其中該CD40激動劑包括CD40L、其衍生物或抗CD40抗體。

【第26項】

如請求項23之方法，其中該刺激劑包括一或多種CD40L+餵養細胞。

【第27項】

如請求項26之方法，其中該一或多種CD40L+餵養細胞係T細胞或其衍生物。

【第28項】

如請求項23至27中任一項之方法，其中該刺激劑進一步包括類鐸

(toll-like receptor)受體(TLR)激動劑。

【第29項】

如請求項28之方法，其中該TLR激動劑係CpG寡核苷酸。

【第30項】

如請求項23至29中任一項之方法，其中使該至少一種B細胞與該刺激劑接觸1至10天之時段。

【第31項】

如請求項30之方法，其中使該至少一種B細胞與該刺激劑實質上連續接觸該1至10天之時段。

【第32項】

如請求項23至31中任一項之方法，其進一步包括：

向該至少一種B細胞提供培養基，其中該培養基包括一或多種促進B細胞擴增之生長誘導劑。

【第33項】

如請求項32之方法，其中該一或多種生長誘導劑包含至少一種選自由以下組成之群之試劑：IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-21及BAFF。

【第34項】

如請求項32或33之方法，其中該所提供培養基包括該刺激劑。

【第35項】

如請求項32至34中任一項之方法，其中向該至少一種B細胞提供培養基1至10天之時段。

【第36項】

如請求項32至35中任一項之方法，其中在該微流體器件之該分離區

中培養該至少一種B細胞之每一B細胞直至細胞計數為約8至20個細胞。

【第37項】

如請求項32至36中任一項之方法，其中使該至少一種B細胞與該刺激劑接觸且向該至少一種B細胞提供培養基之步驟係在實質上伸及相同時間期內實施。

【第38項】

如請求項23至37中任一項之方法，其中使該至少一種B細胞與該刺激劑接觸係在將該解離細胞試樣加載至該微流體器件中之前實施。

【第39項】

如請求項23至38中任一項之方法，其中使該至少一種B細胞與該刺激劑接觸係在將該至少一種B細胞移動至該至少一個分離區中之後實施。

【第40項】

如請求項23至39中任一項之方法，其中使該至少一種B細胞與該刺激劑接觸係在鑑別該至少一種可製造能夠結合至癌細胞相關抗原之抗體之經分離B細胞之步驟期間實施。

【第41項】

如請求項1至40中任一項之方法，其中該至少一種可製造能夠結合至該癌細胞相關抗原之抗體之經分離B細胞之鑑別包括將該癌細胞相關抗原引入該微流體器件中。

【第42項】

如請求項41之方法，其中將該癌細胞相關抗原引入該微流體器件中包括將包括該癌細胞相關抗原之流體介質引入該微流體器件中。

【第43項】

如請求項42之方法，其中該癌細胞相關抗原溶於該流體介質中。

【第44項】

如請求項41之方法，其中將該癌細胞相關抗原引入該微流體器件中包括將包括該癌細胞相關抗原之微小物體引入該微流體器件中。

【第45項】

如請求項44之方法，其中該等微小物體係選自細胞、脂質體、脂質奈米載具(nanoraft)及珠粒。

【第46項】

如請求項45之方法，其中該等微小物體係珠粒，且其中該癌細胞相關抗原偶聯至該等珠粒。

【第47項】

如請求項45或46之方法，其中該癌細胞相關抗原係存在於該至少一種腫瘤試樣中所存在癌細胞之細胞表面上之膜相關抗原。

【第48項】

如請求項47之方法，其中偶聯至該等珠粒之該癌細胞相關抗原係來自該至少一種腫瘤試樣所分離癌細胞取得之細胞膜製劑。

【第49項】

如請求項45之方法，其中該等微小物體係癌細胞。

【第50項】

如請求項49之方法，其中該等癌細胞展現由來自該患者之至少一種腫瘤試樣之癌細胞所展現之標記物。

【第51項】

如請求項49之方法，其中該等癌細胞係自該至少一種腫瘤試樣中分

離。

【第52項】

如請求項49或50之方法，其中該等癌細胞係從得自不同患者之一或多種腫瘤試樣中分離。

【第53項】

如請求項52之方法，其中自其取得至少一種實體腫瘤試樣之該患者及該不同患者已經診斷患有相同類型之癌症。

【第54項】

如請求項49或50之方法，其中該等癌細胞係來自癌細胞系。

【第55項】

如請求項41至54中任一項之方法，其中將該癌細胞相關抗原引入該微流體器件中包括：

使含有包括該癌細胞相關抗原之微小物體之流體介質流經該微流體器件之該流動區；及

當該介質中之至少一些該等微小物體位於該流動區中鄰近該至少一個分離區之部分中時，即停止該流體介質之流動。

【第56項】

如請求項54之方法，其中將該癌細胞相關抗原引入該微流體器件中進一步包括使至少一種微小物體移動至該微流體器件中之至少一個分離區中。

【第57項】

如請求項56之方法，其中使該至少一種微小物體移動至該微流體器件中之至少一個分離區中包括將至少一種微小物體移動至複數個分離區

中。

【第58項】

如請求項56或57之方法，其中將該至少一種微小物體移動至含有至少一種B細胞之至少一個分離區中，由此製造具有至少一種微小物體及至少一種B細胞之至少一個分離區。

【第59項】

如請求項56之方法，其中將該至少一種微小物體及該至少一種B細胞移動至不同分離區中。

【第60項】

如請求項59之方法，其中該等不同分離區在該微流體器件內彼此毗鄰。

【第61項】

如請求項41至60中任一項之方法，其中可製造能夠結合至癌細胞相關抗原之抗體之該至少一種經分離B細胞之鑑別進一步包括：

使含有經標記抗體結合劑之流體介質流經該微流體器件之該流動區；及

在該流體介質中之至少一些該經標記抗體結合劑位於該流動區中鄰近該至少一個分離區之部分中時，即停止該流體介質之流動；及

監測該經標記抗體結合劑與該癌細胞相關抗原之結合。

【第62項】

如請求項61之方法，其中該經標記抗體結合劑係經標記抗IgG抗體。

【第63項】

如請求項61或62之方法，其中該經標記抗體結合劑以共價方式結合

至螢光標記。

【第64項】

如請求項61至63中任一項之方法，其中該經標記抗體結合劑係以與該癌細胞相關抗原之混合物形式來提供。

【第65項】

如請求項61至63中任一項之方法，其中該經標記抗體結合劑係在提供該癌細胞相關抗原之後提供。

【第66項】

如請求項61至65中任一項之方法，其中該經標記抗體結合劑與該癌細胞相關抗原之結合之監測包括使該微流體器件成像。

【第67項】

如請求項66之方法，其中該成像包括螢光成像。

【第68項】

如請求項66或67之方法，其中該成像包括獲取複數個影像。

【第69項】

如請求項68之方法，其中該複數個影像係以固定時間間隔獲取。

【第70項】

如請求項1至69中任一項之方法，其中該解離細胞試樣係自一種實體腫瘤試樣取得。

【第71項】

如請求項1至69中任一項之方法，其中該解離細胞試樣係自多種實體腫瘤試樣取得。

【第72項】

如請求項1至71中任一項之方法，其中解離細胞試樣之提供包括取得該至少一種實體腫瘤試樣及自該至少一種實體腫瘤試樣解離單細胞。

【第73項】

如請求項1至72中任一項之方法，其中藉由以下方式自該至少一種腫瘤試樣解離該解離細胞試樣之個別細胞：

- a. 膠原酶加DNA酶消解；或
- b. 細胞解離儀器。

【第74項】

如請求項1至72中任一項之方法，其中在加載該解離細胞試樣之前，該方法進一步包括：

分級分離該解離細胞試樣，以分離B細胞濃度大於原始解離試樣之B細胞富集部分；及

將該B細胞富集部分加載至該微流體器件中。

【第75項】

如請求項74之方法，其中該分級分離包括使用至少一種選自CD19、CD20、IgM、IgD、CD38、CD27、CD138、PNA及GL7之標記物自該解離細胞試樣中選擇B細胞。

【第76項】

如請求項1至75中任一項之方法，其中在將該解離細胞試樣或該B細胞富集部分加載至該微流體器件中之前，該方法進一步包括使用可檢測標記物標記該解離細胞試樣中之癌細胞。

【第77項】

如請求項1至76中任一項之方法，其中在加載該解離細胞試樣之前，

該方法進一步包括：

分級分離該解離細胞試樣，以分離癌細胞濃度大於該原始解離試樣之癌細胞富集部分；及

將該癌細胞富集部分加載至該微流體器件中。

【第78項】

如請求項76之方法，其中該方法進一步包括選擇至少一種用於移動至至少一個分離區中之癌細胞。

【第79項】

如請求項77之方法，其中該方法進一步包括選擇至少一種用於移動至至少一個分離區中之癌細胞，且其中該至少一種癌細胞係基於該可檢測標記物之檢測來選擇。

【第80項】

如請求項79之方法，其中在將該等B細胞加載至該微流體器件中且移動至該等分離區中之前，將該至少一種癌細胞加載至該微流體器件中且移動至該微流體器件之該分離區中。

【第81項】

如請求項77之方法，其中在將該等B細胞加載至該微流體器件中且移動至該等分離區中之後，將該癌細胞富集部分加載至該微流體器件之該流動區中。

【第82項】

如請求項81之方法，其中該等癌細胞不進入該等分離區中。

【第83項】

如請求項76至82中任一項之方法，其中該等癌細胞係選自該解離細

胞試樣或使用至少一種對該癌症具有專一性之標記物進行富集。

【第84項】

如請求項76至83中任一項之方法，其中該等癌細胞係自該解離細胞試樣分離或使用形態差異進行富集。

【第85項】

如請求項76至84中任一項之方法，其中使用至少一種在癌細胞中下調之標記物自該解離細胞試樣選擇該等癌細胞，以分離正常細胞與該等癌細胞。

【第86項】

如請求項74至85中任一項之方法，其中藉由FACS，自該解離細胞試樣中選擇該等B細胞及/或癌細胞。

【第87項】

如請求項74至86中任一項之方法，其中藉由基於磁珠之分選法，自該解離細胞試樣中選擇該等B細胞及/或癌細胞。

【第88項】

如請求項1至87中任一項之方法，其中該實體腫瘤試樣係腫瘤生檢體。

【第89項】

如請求項1至88中任一項之方法，其中得到該至少一種腫瘤試樣之腫瘤具有三級淋巴樣結構。

【第90項】

如請求項1至89中任一項之方法，其中得到該至少一種腫瘤試樣之該腫瘤係乳癌、泌尿生殖道癌(例如源於泌尿道中之癌症，例如源於腎(例如

腎細胞癌瘤)、輸尿管、膀胱或尿道中之癌症；雄性生殖道之癌症(例如睪丸癌、前列腺癌或精囊、精管或陰莖之癌症)；或雌性生殖道之癌症(例如卵巢癌、子宮癌、子宮頸癌、陰道癌或輸卵管癌))、神經系統癌症(例如神經胚細胞瘤)、腸癌(例如結腸直腸癌)、肺癌、黑素瘤或另一類型癌症。

【第91項】

如請求項90之方法，其中該腫瘤係髓質乳癌。

【第92項】

如請求項90之方法，其中該腫瘤係間皮瘤。

【第93項】

如請求項1至92中任一項之方法，其中該方法進一步包括：

自該微流體器件輸出至少一種所鑑別B細胞或自其衍生之選殖B細胞群體。

【第94項】

如請求項93之方法，其中個別地輸出每一所鑑別B細胞或自其衍生之選殖B細胞群體。

【第95項】

如請求項1至94中任一項之方法，其進一步包括：

對該至少一種所鑑別B細胞或自其衍生之B細胞純系群體之一些或全部實施抗體測序。

【第96項】

如請求項95之方法，其中實施抗體測序包括測定來自該至少一種所鑑別B細胞或自其衍生之B細胞純系群體之一些或全部之配對重鏈及輕鏈

可變結構域抗體序列。

【第97項】

如請求項1至96中任一項之方法，其中該方法進一步包括生成包含來自該至少一種所鑑別B細胞之該等配對重鏈及輕鏈可變結構域序列之一些或全部之抗體治療劑。

【第98項】

如請求項1至97中任一項之方法，其中T細胞或NK細胞存在於該解離細胞試樣中。

【第99項】

如請求項98之方法，其中該方法進一步包括對該解離細胞試樣實施選擇，以分離T細胞或NK細胞濃度大於該原始解離試樣之部分。

【第100項】

如請求項98或99之方法，其中該等T細胞或NK細胞係自同一患者之實體腫瘤試樣所取得。

【第101項】

如請求項98至100中任一項之方法，其中：

a.藉由使用至少一種選自CD4、CD8、CD25、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD69及CD3之標記物，自該解離細胞試樣中分離該等T細胞，或

b.藉由使用CD56作為標記物自該解離細胞試樣所分離該等NK細胞。

【第102項】

如請求項98至101中任一項之方法，其中自該患者選擇且選殖個別T

細胞或NK細胞。

【第103項】

如請求項1至102中任一項之方法，其中該方法包括使用微流體器件鑑別至少一種可製造能夠結合至該患者之癌細胞及來自另一來源之癌細胞之抗體之B細胞。

【第104項】

如請求項1至103中任一項之方法，其中該方法進一步包括使用微流體器件鑑別由該(等) B細胞製得之該等抗體是否能夠結合至非癌細胞。

【第105項】

如請求項104之方法，其中該等非癌細胞及該等癌細胞係來自提供該至少一種腫瘤試樣之該患者。

【第106項】

如請求項104或105之方法，其中使用相同微流體器件來鑑別該等抗體至癌細胞與非癌細胞之結合。

【第107項】

如請求項106之方法，其中該等癌細胞及非癌細胞依序加載至相同流動路徑中。

【第108項】

一種治療癌症患者之方法，其包括使用藉由如請求項1至107中任一項之方法製得之抗體或其片段治療該患者。

【第109項】

如請求項108之方法，其中該腫瘤試樣係自接受治療之同一位患者取得。

【第110項】

如請求項108或109之方法，其中自取得該腫瘤試樣至治療之時間為至多約2個月。

【第111項】

如請求項108至110中任一項之方法，其中該抗體或其片段係單鏈抗體。

【第112項】

如請求項108至110中任一項之方法，其中該抗體或其片段具有兩條重鏈及兩條輕鏈。

【第113項】

如請求項108至111中任一項之方法，其中該抗體顯示於經改造T細胞或NK細胞上。

【第114項】

如請求項113之方法，其中該經改造T細胞係嵌合抗原受體T細胞或該經改造NK細胞係嵌合抗原受體NK細胞。

【第115項】

如請求項113或114之方法，其中該T細胞或NK細胞係在經改造以顯示該抗體之前自同一患者所取得。

【第116項】

如請求項115之方法，其中該T細胞或NK細胞係自該患者之腫瘤試樣所取得。

【第117項】

如請求項108至116中任一項之方法，其中將該抗體或其片段與另一

療法組合投與。

【第118項】

如請求項117之方法，其中該組合療法係手術、輻射、化學療法、CAR-T細胞療法、CAR-NK細胞療法、T細胞療法、其他免疫療法、或投與免疫刺激分子或腫瘤專一性病毒。

【第119項】

一種標記或檢測患者之癌症之方法，其包括投與偶聯至可檢測標記之抗體或其片段，其中該抗體或其片段係藉由如請求項1至107中任一項之方法製得。

【第120項】

一種經改造抗體構築體，其包括：

- a. 至少藉由如請求項1至107中任一項之方法鑑別之抗體之重鏈CDR；
- b. 至少藉由如請求項1至107中任一項之方法鑑別之抗體之重鏈及輕鏈CDR；
- c. 至少藉由如請求項1至107中任一項之方法鑑別之抗體之重鏈可變區；或
- d. 至少藉由如請求項1至107中任一項之方法鑑別之抗體之重鏈及輕鏈可變區。

【第121項】

一種經改造抗體構築體，其中該經改造抗體構築體與藉由如請求項1至107中任一項之方法鑑別之抗體不同。

【第122項】

如請求項120或121之經改造抗體構築體，其中該構築體係Fab、Fab'(2)、scFv、多價scFv、微小抗體、雙專一性抗體或駱駝可變功能重鏈結構域。

【第123項】

一種經改造T細胞或NK細胞，其包括顯示於其外部表面上之抗體或其片段，其中該抗體或其片段係藉由如請求項1至107中任一項之方法所鑑別。

【第124項】

如請求項123之經改造T細胞或NK細胞，其中該T細胞或NK細胞及該抗體或其片段係自同一位患者取得。

【第125項】

一種製備經改造T細胞之方法，該經改造T細胞包括顯示於其外部表面上之抗體或其片段，該方法包括：

- a. 根據如請求項1至107中任一項之方法來鑑別結合至腫瘤試樣之抗體；
- b. 基因改造T細胞，以表現該抗體或其片段。

【第126項】

如請求項125之方法，其中該T細胞、表現該抗體之B細胞及該腫瘤試樣係自同一位患者取得。

【第127項】

一種製備經改造NK細胞之方法，該經改造NK細胞包括顯示於其外部表面上之抗體或其片段，該方法包括：

- a. 根據如請求項1至107中任一項之方法來鑑別結合至腫瘤試樣之抗

體；

b. 基因改造NK細胞，以表現該抗體或其片段。

【第128項】

如請求項127之方法，其中該NK細胞、表現該抗體之B細胞及該腫瘤試樣係自同一位患者取得。

