



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107250341 A

(43)申请公布日 2017. 10. 13

(21)申请号 201580062211.0

(22)申请日 2015.09.17

(30)优先权数据

62/051,497 2014.09.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/050604 2015.09.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/044537 EN 2016.03.24

(71)申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

申请人 新加坡国立大学

(72)发明人 M·埃博拉西米沃齐亚尼 韩宗润

K·P·A·泰 关国峰

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 钱文字 陈扬扬

(51)Int.Cl.

C12M 1/00(2006.01)

C12M 3/00(2006.01)

C12M 3/04(2006.01)

C12N 5/02(2006.01)

权利要求书4页 说明书12页 附图10页

(54)发明名称

用于灌注生物反应器细胞保留的方法及微流体系统

(57)摘要

提供用于灌注生物反应器的细胞保留的微流体系统。所述系统包含设定为接收待处理的生物反应混合物的至少一个入口。至少一个曲线形微通道与所述至少一个入口通过流体流动连接，所述至少一个曲线形微通道适于在生物反应混合物中，基于细胞大小，沿着所述至少一个曲线形微通道的横截面的至少一部分来分离细胞。至少两个出口与所述至少一个曲线形微通道通过流体流动连接。所述至少两个出口的至少一个出口经设定来使待回收的分离的细胞流至灌注生物反应器中。

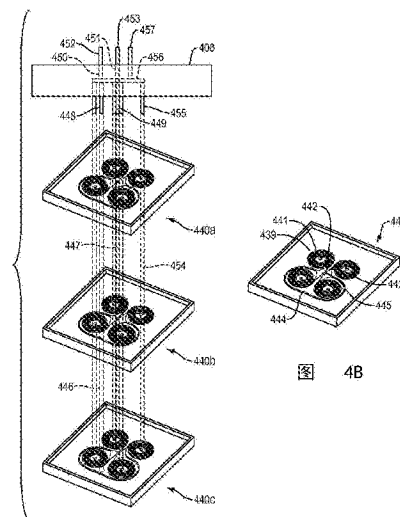


图 4A

图 4B

1. 一种用于灌注生物反应器的细胞保留的微流体系统,所述系统包括:
至少一个入口,其经设定以接收待处理的生物反应混合物;
至少一个曲线形的微通道,其与所述至少一个入口流体流动连接,所述至少一个曲线形微通道适于基于细胞大小,沿着所述至少一个曲线形微通道的横截面的至少一部分,分离所述生物反应混合物中的细胞;以及
至少两个出口,其与所述至少一个曲线形微通道流体流动连接,所述至少两个出口中的至少一个出口经设定以供待回收的分离的细胞流至所述灌注生物反应器。
2. 如权利要求1所述的微流体系统,其中,所述至少一个曲线形微通道包含至少一个螺旋通道。
3. 如权利要求1或2所述的微流体系统,其中,所述至少一个曲线形微通道包含多个曲线形微通道;
所述多个曲线形微通道中的各曲线形微通道的至少一个入口与所述微流体系统的共用入口流体流动连接;以及
所述多个曲线形微通道中的各曲线形微通道的至少两个出口与所述微流体系统的至少两个相应的共用出口流体流动连接。
4. 如权利要求3所述的微流体系统,其中,所述系统包含彼此贴附的多个通道层,所述多个通道层中的各通道层包含所述多个曲线形微通道中的至少一些曲线形微通道;
所述系统还包含贴附于所述多个通道层的引导层,所述引导层包含用于所述多个曲线形微通道的共用入口和至少两个共用出口。
5. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述至少两个出口中的至少另一个出口经设定以供以下至少一种物料流动:来自所述灌注生物反应器的废料,和,所述灌注生物反应器的产物。
6. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其经设定以:在至少一个入口处接收生物反应混合物的连续流,
并且向所述至少两个出口的至少另一个出口提供分离的培养基的连续流,
并且向所述灌注生物反应器提供待回收的分离的细胞的连续流。
7. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述至少一个曲线形微通道适于以仅由于所述至少一个曲线形微通道中的水动力分离细胞,而不在所述微流体系统中使用膜。
8. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述至少一个曲线形微通道具有长度,并且横截面具有限定纵横比的高度和宽度,从而所述曲线形微通道通过所述长度和横截面以适于沿着所述通道横截面的部分,基于细胞大小,分离所述生物反应混合物中的细胞。
9. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述至少一个曲线形微通道的横截面是由径向内侧、径向外侧、底侧和顶侧限定的梯形横截面,所述梯形横截面具有a) 高度不相等的径向内侧与径向外侧,或b) 高度相等的径向内侧与径向外侧,且其中所述顶侧具有至少两个连续平整部分,每个平整部分与所述底侧的宽度不相等。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的微流体系统,其中,所述至少一个曲线形微通道适于过滤所述生物反应混合物。

11. 如权利要求10所述的微流体系统,其中,所述至少一个曲线形微通道适于通过在所述至少一个曲线形微通道的一侧附近分离生物反应混合物中的悬浮颗粒来过滤所述生物反应混合物,并且适于在所述至少一个曲线形微通道的另一侧收集干净的过滤物,所述悬浮颗粒包括细胞。

12. 如权利要求1-9中任一项所述的微流体系统,其中,所述至少一个曲线形微通道适于分级分离所述生物反应混合物。

13. 如权利要求12所述的微流体系统,其中,所述至少一个曲线形微通道适于通过在所述至少一个曲线形微通道的外壁附近分离所述生物反应混合物中的至少一种类型的较小颗粒,并且在所述至少一个曲线形微通道的内壁附近分离所述生物反应混合物中的至少一种类型的较大颗粒,来分级分离所述生物反应混合物。

14. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述至少一个曲线形微通道适于分离哺乳动物细胞和酵母细胞中的至少一种。

15. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述灌注生物反应器的产物包含药物、蛋白质和生物燃料中的至少一种。

16. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述灌注生物反应器的产物包含单克隆抗体、重组蛋白和病毒疫苗中的至少一种。

17. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述待处理的生物反应混合物包含水,用于水预处理。

18. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述生物反应混合物包含生物燃料。

19. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述生物反应混合物包含血液。

20. 如前述权利要求中任一项所述的微流体系统,其中,所述细胞包含癌细胞、胎儿细胞和干细胞中的至少一种。

21. 一种用于灌注生物反应器的细胞保留的方法,所述方法包括:

使待处理的生物反应混合物流动通过所述灌注生物反应器的微流体细胞保留系统的至少一个入口;

使所述生物反应混合物从所述至少一个入口流动通过与所述至少一个入口流体流动连接的细胞保留系统的至少一个曲线形微通道,从而基于细胞大小,沿着所述至少一个曲线形微通道的横截面的至少一部分分离所述生物反应混合物中的细胞;和

使待回收的分离的细胞通过所述细胞保留系统的至少两个出口的至少一个出口流至所述灌注生物反应器,所述细胞保留系统与所述至少一个曲线形微通道流体流动连接。

22. 如权利要求21所述的方法,其中,所述至少一个曲线形微通道包含至少一个螺旋通道。

23. 如权利要求21或22所述的方法,其中,所述至少一个曲线形微通道包含多个曲线形微通道;

所述多个曲线形微通道中的各曲线形微通道的至少一个入口与所述细胞保留系统的共用入口流体流动连接;以及

所述多个曲线形微通道中的各曲线形微通道的至少两个出口与所述细胞保留系统的

至少两个相应的共用出口流体流动连接。

24. 如权利要求23所述的方法, 其中, 所述细胞保留系统包含彼此贴附的多个通道层, 所述多个通道层中的各通道层包含所述多个曲线形微通道中的至少一些曲线形微通道;

所述细胞保留系统还包含贴附于所述多个通道层的引导层, 所述引导层包含用于大量曲线形微通道的共用入口和至少两个共用出口。

25. 如权利要求21-24中任一项所述的方法, 所述方法包括: 使以下至少一种物料流动通过至少两个出口中的至少另一个出口: 来自所述灌注生物反应器的废料, 和, 所述灌注生物反应器的产物。

26. 如权利要求21-25中任一项所述的方法, 其包括: 使生物反应混合物持续地流动通过所述至少一个入口;

向所述至少两个出口的至少另一个出口提供分离的培养基质的连续流;

并且, 向所述灌注生物反应器提供待回收的分离的细胞的连续流。

27. 如权利要求21-26中任一项所述的方法, 所述方法包括: 在所述至少一个曲线形微通道中仅由于所述至少一个曲线形微通道中的水动力分离所述细胞, 而不在所述微流体系统中使用膜。

28. 如权利要求21-27中任一项所述的方法, 其中, 所述至少一个曲线形微通道具有长度, 并且所述横截面具有限定纵横比的高度和宽度, 从而所述曲线形微通道通过所述长度和横截面以适于沿着所述通道横截面的部分, 基于细胞大小, 分离所述生物反应混合物中的细胞。

29. 如权利要求21-28中任一项所述的方法, 其中, 所述至少一个曲线形微通道的横截面是由径向内侧、径向外侧、底侧和顶侧限定的梯形横截面, 所述梯形横截面具有a) 高度不等的径向内侧与径向外侧, 或b) 高度相等的径向内侧与径向外侧, 且其中所述顶侧具有至少两个连续平整部分, 每个平整部分与所述底侧的宽度不相等。

30. 如权利要求21-29中任一项所述的方法, 其包括: 使用所述至少一个曲线形微通道来过滤所述生物反应混合物。

31. 如权利要求30所述的方法, 其包括, 通过如下方式过滤所述生物反应混合物: 在所述至少一个曲线形微通道的一侧附近的分离所述生物反应混合物中的悬浮颗粒, 和, 在所述至少一个曲线形微通道的另一侧收集干净的过滤物, 所述悬浮颗粒包括细胞。

32. 如权利要求21-29中任一项所述的方法, 其包括, 使用所述至少一个曲线形微通道来分级分离所述生物反应混合物。

33. 如权利要求32所述的微流体系统, 其包含, 通过如下方式, 利用所述至少一个曲线形微通道, 分级分离所述生物反应混合物: 在所述至少一个曲线形微通道的外壁附近分离所述生物反应混合物中的至少一种类型的较小颗粒, 并在所述至少一个曲线形微通道的内壁附近分离所述生物反应混合物中的至少一种类型的较大颗粒。

34. 如权利要求21-33中任一项所述的方法, 其包括: 分离哺乳动物细胞和酵母细胞中的至少一种。

35. 如权利要求21-34中任一项所述的方法, 其中, 所述灌注生物反应器的产物包含药物、蛋白质和生物燃料中的至少一种。

36. 如权利要求21-35中任一项所述的方法, 其中, 所述灌注生物反应器的产物包含单

克隆抗体、重组蛋白和病毒疫苗中的至少一种。

37. 如权利要求21-36中任一项所述的方法,其包括,处理水,用于水预处理。

38. 如权利要求21-37中任一项所述的方法,其中,所述生物反应混合物包含生物流体。

39. 如权利要求21-38中任一项所述的方法,其中,所述生物反应混合物包含血液。

40. 如权利要求21-39中任一项所述的方法,其中,所述细胞包含癌细胞、胎儿细胞和干细胞中的至少一种。

用于灌注生物反应器细胞保留的方法及微流体系统

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2014年9月17日提交的美国临时申请第62/051,497号的权益,其全部内容通过引用纳入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明在ARPA-E授予的DE-AR0000294下由政府支持完成,题名为“用于咸水和重金属污染水的可放大的,自动力的纯化技术(Scalable, Self-Powered Purification Technology for Brackish and Heavy-Metal Contaminated Water)”。美国政府享有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 哺乳动物细胞培养物广泛用于制造大型且复杂的化学物质,例如用于生物技术和医药的药物和蛋白质[1]。对于这些产物越来越多的需求导致对“上游”(生物反应器操作)改进的不断推动[2]。出于此目的,已广泛使用灌注生物反应器,因为它们能以营养物质的连续馈给和废料的去除,以及对于pH和其它条件的更好控制,来维持高细胞数量。连续灌注生物反应器的设计和操作的主要挑战是细胞保留装置的成本和可靠性。已有多种技术用于细胞保留或回收,然而它们均多多少少存在一些缺点[3]。

[0006] 哺乳动物细胞可用于合成大且复杂的化学物质,例如用于生物技术和医药目的的药物和蛋白质,因为它们能以药物形式准确地产生人体所需的复杂结构[3]。在过去的十年间,哺乳动物细胞已用于多种诊断性和治疗性产品的大规模生产,例如单克隆抗体[4,5],重组蛋白[6](例如糖蛋白),以及抗脊髓灰质炎[1]、乙型肝炎和麻疹的病毒疫苗。在其它地方详细介绍了哺乳动物细胞的产品[7,8]。细胞(酵母,藻类和其它细胞)也用于生产生物燃料和其它有用的化学物质,预计这在美国和其它国家的国内能源生产中发挥越来越大的作用。照惯例,哺乳动物和酵母细胞(用于发酵)的大规模培养可用多种方式完成,例如悬浮(例如分批、分批补料或灌注),滚瓶以及微载体[1,2]。然而,自二十世纪八十年代面世以来,悬浮培养已广泛地用于生物制药和生物燃料工业,这归因于其可扩大性,细胞均匀浓度、营养成分、代谢产物和产品[9]。

[0007] 有三种以不同模式操作的生物反应器类型,即分批,分批补料和灌注。这些操作模式在进行营养物质补充和代谢物移除的方式上基本不同,这可直接影响产品质量、生产率和最终成本[1]。虽然目前分批补料工艺仍是生物制药生产和生物燃料发酵中最受欢迎的选择,但是最近的研究显示,在不久的将来,灌注生物反应器会占主导地位。灌注生物反应器对于制造目的而言是理想的选择,因为它可以通过连续馈给营养物质和去除废料/产物来维持高细胞数量,并且可以仔细调节如温度和pH的参数,以使细胞生长最大化并确保产品批次一致性。此外,它们可以长时间连续地从大小有限的(可扩大的)生物反应器生产大量的产物,降低资本成本[10]。相反,由于缺少营养物质和废料的交换,分批和分批补料模式相容性较低,这大大限制了生产率并且需要大型容器。此外,需要大规模的离心系统从培养后的产物分子分离细胞,这会导致高资本成本,且难以保持无菌[11]。特别是在第二代生

物燃料中,使用的生物体对产物和废料限制的生长更敏感,并且,一些较新的生物燃料(例如丁醇)对细胞是有毒的[12]。因此,对于这些工艺,预计未来将愈发需要从分批培养转换到灌注培养。

[0008] 成功灌注的关键参数是生物反应器中大多数细胞的保留。这允许以一致的产品质量/稳定性以及细胞的最佳使用,在相对较高的流速下进行操作。在制药业中已使用几种不同的细胞保留技术来在灌注培养过程中分离生物反应器中的细胞。它们通常基于离心作用(离心机、水力旋流器),过滤(交叉流过滤器、中空纤维、涡流过滤器),重力/声沉降,超声和双向电泳分离[1,13]。良好的保留系统必须具有的重要因素是[1]:

[0009] -高分离效率(约100%)和高通量(100-1000L/天)

[0010] -该装置须对细胞造成最小的伤害(归因于剪切力)以维持高的细胞活力

[0011] -该装置必须稳定可靠,并且可用于长期操作(7-12天)

[0012] 该装置应该是可清洁、可灭菌和可重复使用的。

[0013] -成本节约型(资本和试剂成本低)

[0014] 保留装置的第一重要类型基于物理过滤。在这一类别中,有不同种过滤方式,例如交叉流(或切向)过滤、涡流滤器、旋转滤器以及中空纤维滤器。尽管用微过滤器的物理过滤一直是支持大多数分离技术的主力,但是在该保留模式中存在一些主要的缺陷,例如细胞破裂、细胞聚集、膜堵塞和结垢,这使它们的大规模可用性复杂化[2]。

[0015] 在制药工业中起重要作用的另一个重要的类别是离心。离心是一种使用离心机,用离心力来使混合物沉降的方法。尽管使用简单,离心装置难以保持无菌,并且不能适应连续流生产[14]。据报道,500g的高加速度强度可以阻碍高达50%的细胞生长[1],并且可对抗体生产速率产生不利影响[15]。

[0016] 分离装置的另一种类型是水力旋流器。最近,研究者将水力旋流器应用于哺乳动物细胞的分离,这种技术以前用于从酒精发酵液中分离酵母。离心力是由将细胞悬液切向地引入装置的圆柱形部分产生的,其一般压差高达4-6巴,细胞在该体系中承受约1000g。由于流体的强涡旋运动,当澄清的培养基在溢流中流出时,浓集细胞悬液在底流中流出。用与常规离心机(离心场沉淀)相同的分离原理,水力旋流器用于生物技术行业具有许多优势,例如简易、安全以及不存在移动部分。研究者提出了关于水力旋流器在灌注能力方面的性能的有趣结果,但是必须建立该技术与剪切敏感性细胞的相容性[1,2]。此外,因为当前水力旋流器系统无法有效捕获那些较小的细胞,所以较小的细胞(直径小于约10 μ m)的使用通常受到限制[16,17]。

[0017] 重力沉降器可能是最简单的装置,其已在工业中被用于保留细胞。相较于过滤、离心和水力旋流器,重力沉降法不易于因高剪切力损伤细胞和堵塞过滤器[27]。然而,重力沉降法所需的长处理时间是关键问题。此外,沉降器的规模扩大也仍是一个问题,特别是对持续处理而言。

[0018] 除了上述技术以外,还有一些工业正在探索用于灌注培养中细胞保留的新方法。已经证明了超声细胞保留法,但是这种技术所需的巨大振动幅度会导致局部温度升高,使得它与热敏感的哺乳动物细胞和不耐热产物不相容。导致共振器声学特性不均匀的温度异质性也降低了该技术的生产率[1]。

[0019] 最近已经测试了双向电泳方法用于细胞保留的性能。该技术显示了活细胞和死细

胞之间分离效率的不同。然而,必须调整用于每种细胞类型的最佳频率和流速,并且还没有在灌注培养中使用这项技术的工业规模。

[0020] 可用于细胞保留的其它方法包括电荷和表面性质。

发明内容

[0021] 根据本发明的一个实施方式,提供了用于灌注生物反应器的细胞保留的微流体系统。所述系统包含至少一个入口,其经设定以接收待处理的生物反应混合物;至少一个曲线形微通道,其与所述至少一个入口流体流动连接,所述至少一个曲线形微通道适于基于细胞大小,沿着所述至少一个曲线形微通道的横截面的至少一部分,分离所述生物反应混合物中的细胞;和,至少两个出口,其与所述至少一个曲线形微通道流体流动连接,所述至少两个出口中的至少一个出口经设定以供待回收的分离的细胞流至所述灌注生物反应器。

[0022] 在其他相关实施方式中,所述至少一个曲线形微通道可包括至少一个螺旋通道。所述至少一个曲线形微通道可包括多个曲线形微通道;所述多个曲线形微通道的各曲线形微通道的至少一个入口与微流体系统的共用入口流体流动连接;以及,所述多个曲线形微通道的各曲线形微通道的至少两个出口与微流体系统的至少两个相应的共用出口流体流动连接。该系统可包括彼此贴附的多个通道层,所述多个通道层的各通道层包括所述多个曲线形微通道的至少一些曲线形微通道;该系统还包括贴附于所述多个通道层的引导层,所述引导层包括用于所述多个曲线形微通道的共用入口和至少两个共用出口。至少两个出口中的至少另一个出口可被设定以供以下至少一种物料流动:来自灌注生物反应器的废料,和,灌注生物反应器的产物。微流体系统可被设置以在至少一个入口接收生物反应混合物的连续流,并且提供分离的培养基连续流至至少两个出口中的至少另一个出口,并且提供待回收的分离细胞连续流至所述灌注生物反应器。

[0023] 在其它相关的实施方式中,所述至少一个曲线形微通道可适于仅由于至少一个曲线形微通道中的水动力分离细胞,而不在微流体系统中使用膜。所述至少一个曲线形微通道可具有长度,并且所述横截面可具有限定纵横比的高度和宽度,从而所述曲线形微通道通过所述长度和横截面以适于沿着通道横截面的部分,基于细胞大小,分离所述生物反应混合物中的细胞。所述至少一个曲线形微通道的横截面可以是由径向内侧、径向外侧、底侧和顶侧限定的梯形横截面,所述梯形横截面具有a)高度不等的径向内侧与径向外侧,或b)高度相等的径向内侧与径向外侧,且其中所述顶侧具有至少两个连续平整部分,每个平整部分与所述底侧的宽度不相等。

[0024] 在其它相关的实施方式中,所述至少一个曲线形微通道可适于过滤生物反应混合物,例如通过在所述至少一个曲线形微通道的一侧的附近分离生物反应混合物中的悬浮颗粒,所述悬浮颗粒包括细胞,并且可适于在至少一个曲线形微通道的另一侧收集干净的过滤物。所述至少一个曲线形微通道可适于分级分离(fractionate)生物反应混合物,例如通过在所述至少一个曲线形微通道的外壁的附近分离生物反应混合物中的至少一种类型的较小颗粒,以及在所述至少一个曲线形微通道的内壁附近分离生物反应混合物中的至少一种类型的较大颗粒。所述至少一个曲线形微通道可适于分离哺乳动物细胞和酵母细胞中的至少一种。灌注生物反应器的产物可包括药物、蛋白质和生物燃料中的至少一种。灌注生物反应器的产物可包括单克隆抗体、重组蛋白和病毒疫苗中的至少一种。待处理的生物反应

混合物可包括水,用于水预处理。生物反应混合物可包括生物流体,例如血液。细胞可包括癌细胞、胎儿细胞和干细胞中的至少一种。

[0025] 提供其它相关的方法。

附图说明

[0026] 通过本发明的示例性实施方式更为具体的描述使得前述内容是更为清楚的,在所示附图中,对于所有不同视图,相似附图标记表示相同部件。附图不一定是成比例的,进行了突出强调来显示本发明的实施方式。

[0027] 图1说明了根据本发明的一个实施方式多层惯性过滤系统的制造过程的步骤,如图1A至1H中的每一附图所示。图1A中,使用SolidWorks进行模具设计。在图1B中,使用常规的微铣削法在铝上制造模具。在图1C中,使用制造的模具将软性平版印刷品和图案转移到单层PDMS上。在图1D中,进行两个单独层的氧等离子体的结合(即图案的手动对准)以及使用精密打孔机进行穿孔。在图1E中,显示了穿孔之后将两组单独的两层结合在一起,以形成4层装置。在图1F中,重复所述步骤,结合两组单独的四层以制得8层装置(即所述步骤可持续以制出具有高达100层的装置的设备)。在图1G中,3D打印引导层置于设备中,用于流体传送。图1H显示了包含使用管道连接到蠕动泵的15层PDMS(总共60个螺旋通道)和3D打印引导层的高通量装置。

[0028] 图2是根据本发明的一个实施方式,用于具有一个入口和两个出口的,哺乳动物细胞的过滤和/或分级分离的单螺旋微流体芯片的构造和操作机理的示意图

[0029] 图3A是根据本发明的一个实施方式,由多层PDMS片组成的高通量系统的光学图像,其具有结合在一起用于大样品体积中连续细胞保留的凹凸微通道(即120个螺旋微通道)。图3B是根据本发明的一个实施方式的样品处理工作流程,其显示了使用来自模拟灌注生物反应器条件的旋转瓶的高通量过滤系统的细胞富集过程。

[0030] 图4A是显示了具有引导层的多层螺旋通道堆叠组件的分解示意图,而图4B是根据本发明的一个实施方式的单层堆叠的示意图。

[0031] 图5是根据本发明的一个实施方式,显示用于从灌注生物反应器中细胞保留的高通量微量过滤系统的特征的图。图5A显示不同细胞系的回收效率。图5B显示随细胞浓度变化的分离效率。图5C显示了操作期间细胞的活力和密度。图5D显示了操作期间,由杂交瘤细胞生产IgG的速率。

[0032] 图6是根据本发明的一个实施方式,显示实验中由流式细胞仪(Accuri C6,美国的BD生物科学公司(BD Biosciences,USA))获得的FACS数据的图,其显示了在两种不同的浓度下,模拟灌注生物反应器的条件,使用高通量惯性过滤系统的CHO细胞的分离结果。

[0033] 图7是根据本发明的一个实施方式,通过惯性微过滤系统的对照(未分选)CHO细胞(a-c)和分选细胞(d-f)的培养的相差(phase contrast)显微图。

[0034] 图8是根据本发明的一个实施方式,用于系统中的曲线形微通道的替代性横截面的图。

[0035] 发明详述

[0036] 以下描述了示例性实施方式。

[0037] 本发明的一个实施方式提供一种用惯性微流体学以极高产量进行超高通量(以

升/分钟级别)的细胞分离的无膜、无阻塞的微过滤平台。根据本发明的一个实施方式开发的系统是高度多重的微流体装置,其由具有凹凸的微通道(即,多达500个螺旋)的多层PDMS片组成,其结合在一起用于从大体积生物样品基于大小连续分离细胞。该技术利用存在于曲线形微通道中水动力进行细胞集中和分选。

[0038] 在根据本发明的一个实施方式的一个系统中,细胞仅由于由外部驱动流体驱动的流体相互作用而分离,所以所述系统本质上是无阻塞的,并且无需膜过滤器更换或外力场就可持续运作。为了表征根据本发明的一个实施方式的系统,当模拟灌注生物反应器的条件时,使用250mL一次性旋转瓶在三个不同细胞系的加湿培养箱内进行细胞培养。每天通过使用根据本发明的一个实施方式的惯性过滤系统,在无菌环境中将产物从细胞中分离来进行微过滤测试,同时,在每个实验之后将新鲜培养基和富集的细胞一起加入每个瓶中。分别监测各样品的细胞密度、活力、葡萄糖、抗体效价和pH。使用不同细胞浓度的微过滤测试揭示了该系统可用于以超过95%的分离效率的有效性持续从生物反应器中分离细胞。分选细胞的活力与未分选的(对照)相似,且超过90%的细胞排除染料,这表明最小的由分离造成的物理损伤。细胞生产力也通过用酶学实验测量分泌的IgG蛋白质的活性来评估。结果表明细胞的可持续生长和为期10天的抗体生产,指示这一用于将动物细胞从培养基中分离的新技术的价值。本文提出的高通量的微过滤系统可使用常规的微细铣削(micro-milling)和PDMS浇铸,以极低的成本生产。相较于膜过滤器,该系统不会经受过滤器的进行性蛋白质和细胞污染,并且可不停地运作很长的时间而不降低通量。这一平台预期将结合高通量、低成本、可扩大以及小足迹,使得其本质上适合多种微过滤应用。

[0039] 微流体学是许多新兴的应用和学科,主要是生物、工程和医药领域所需的技术。因其具有匹配细胞级别的合适长度量级,普遍认为微流体学为细胞生物学作出巨大贡献[18]。近年来,利用微流体学平台分选细胞和颗粒已经是兴盛的研发领域[19]。最近,已报道了基于曲线形微通道中颗粒的惯性移动分选高通量惰性颗粒并作为一种有效微流体学细胞分离方法已引起广泛的关注[20,21]。使用水动力分离颗粒的惯性微流体学装置仅依靠微通道的尺寸、流体力学和颗粒大小来实现分离。最近,它们已用于多种应用,包括癌细胞分离、颗粒分离和血液分级分离[21,22]。由于使用强大的容错物理效应和高运行率,惯性微流体学系统将对制药行业、环境清理和生理学流体处理中的高通量分离应用产生重大影响[23]。

[0040] 根据本发明的一个实施方式,证明了微流体学在大规模过滤应用中的可用性。表1总结了上文背景技术部分中讨论的细胞保留的现有方法,其基于五个重要的选择标准,并伴以优缺点;与根据本发明的一个实施方式的微流体技术相比(参见标记为“螺旋系统”的列):

[0041] 表1. 生物反应器细胞保留的现有技术(取自参考文献[1]和[2])

[0042]

技术/标准	过滤	离心	水力旋流	重力沉降	超声/电泳	螺旋系统
细胞活力(%)	50-90	70-85	80-85	88-100	70-95	>95
通量	中	高	高	低	低	高
运行成本	高	高	低	低	极高	低
可扩大性	好	好	一般	差	差	好
分离效率(%)	63-95	95-100	>85	>85	>95	>95
细胞浓度 (10^5 细胞/mL)	3-30	3-17	3	3-15	20-50	20-40
优点	适用于所有 细胞类型	分离效率 率高	低成本,持 续处理	低成本,细 胞活力高	分离效率高	分离效率高,低 成本,无阻塞
缺点	细胞活力低, 阻塞	资本成 本高	不适用于 较小细胞	太慢	低通量,资本 成本高	N.A.

[0043] 根据本发明的一个实施方式的集成微流体系统由具有凹凸微通道(即,高达500个具有梯形横截面的螺旋微通道)的多层PDMS片组成,其结合在一起,用于从大体积临床/生物样品连续、无标记/阻塞地分离细胞。为了简化操作,这一系统中的流体通道内部连接,其中流体流可以经由共享的入口分布通过所有的螺旋通道,并通过集合出口离开系统。图1说明了根据本发明的一个实施方式多层惯性过滤系统的制造过程的步骤,如图1A至1H中的每一附图所示。图1A中,使用SolidWorks进行模具设计100。图1B中,用常规的微铣削法在铝上制造模具,以生产铝模具101。在图1C中,使用制造的模具101将软性平版印刷品和图案转移到单层聚二甲基硅氧烷(PDMS) 102上。在图1D中,进行两个单独层103、104的氧等离子体结合(即,图案的手动对准),并使用精密打孔机进行孔105a-f的穿孔。在图1E中,显示了穿孔之后将两组单独的两层结合在一起,以制成4层装置,其中4层如106处所示。在图1F中,重复所述步骤,结合两组单独的4层以制成8层装置,其中8层如107处所示。可持续所述步骤,制得具有高达例如100层装置的设备。在图1G中,3D打印引导层108置于设备中,用于流体传送。图1H显示了包含使用管道连接到蠕动泵的15层109PDMS(总共60个螺旋通道,其中各15层上有四个螺旋通道)和3D打印引导层108的高通量装置。

[0044] 图2是根据本发明的一个实施方式,具有一个入口211和两个出口——一个内部出口212和一个外部出口213——的用于哺乳动物细胞的过滤和/或分级分离的微流体芯片的单螺旋通道210的构造和操作机理的示意图。

[0045] 如图2示意性地所示,根据本发明的实施方式,例如,该系统可设计用于两种不同的应用。一种是用于过滤目的,如图214a和214b所示。此时,当流体在通道的入口211附近流动时,流体中初始时随机分布的所有的悬浮颗粒215(如组图214a所示)可聚集在微通道210的一侧附近,即通常在有强烈涡流的外壁216的附近;并且可从另一侧,例如内壁217,收集干净的过滤物(见组图214b)。这样的聚集导致颗粒被引导至一个出口,例如外部出口213,并且干净的过滤物被引导至另一个出口,例如内部出口212。可调整流体经过通道的流速来实现这样的过滤;例如,如组图214b所示,使用6mL/分钟的流速来实现颗粒在通道外部出口213附近处的聚集。该系统可设计应用的另一个目的是用于分级分离目的,如组图214c和

214d所示。此时,当流体在通道的入口211附近流动时,悬浮颗粒218是随机分布的,如组图214c所示;但是,经过螺旋通道210的流体,如组图214d所示,使得较小的颗粒218a在迪恩涡旋(Dean vortices)中被捕获,并保留在通道的外壁219附近,而较大的颗粒218b在通道的内壁220附近聚集,所以使得颗粒在内部212和外部213出口处分离。可调整流体经过通道的流速来实现这样的过滤;例如,如组图214d所示,使用2mL/分钟的流速来使颗粒在内部212和外部213出口附近聚集。虽然图2显示,螺旋通道210在流体从入口211流到出口212和213时向内螺旋,但该通道也可能具有处于螺旋中心的入口211以及处于通道的外边缘的出口212和213,从而当流体从入口流至出口时,螺旋通道210向外螺旋。此外,如图2所示,通道210可具有梯形横截面,其具有径向内侧220、径向外侧219、底侧221和顶侧222,其中径向内侧220和径向外侧219的高度不相等。或者,如图8的实施方式所示,通道810可具有高度相等的径向内侧820和径向外侧819,同时顶侧具有至少两条连续平整部分821a和821b,每一条的宽度与底侧822不等。

[0046] 图3A是根据本发明的一个实施方式,由具有凹凸微通道的30片PDMS片的多层323(即,120螺旋微通道,其中每一片上有4个螺旋通道)组成的高通量系统的光学图像,其结合在一起用于大体积样品在灌注生物反应器的连续、高通量的细胞保留。显示引导层308在层323旁边,其中可以看出,入口和出口柱(inlet and outlet posts)324延伸出引导层308的底侧,以插入用于多层323上的螺旋通道的共有入口和出口的孔305中(在下文附图4A和4B中讨论)。通过这种方法,共有入口和出口可连接至与引导层308的其它侧相连的入口和出口管道。图3B是根据本发明的一个实施方式的样品处理工作流程,其显示了使用来自模拟灌注生物反应器条件的旋转瓶的高通量过滤系统的细胞富集过程。将新鲜饲料325加入旋转瓶326中,从其中将细胞悬浮液327泵入根据本发明的一个实施方式的惯性过滤系统328。澄清培养基329被引导出系统328,而浓集的细胞回收物330被引导回旋转瓶326。泵331和332用于使流体从新鲜饲料325流至旋转瓶326,并从旋转瓶326流至过滤系统328。应当理解,根据本发明的实施方式,替代性流动排布可用于其它操作,例如分级分离。

[0047] 图4A是显示了具有引导层的多层螺旋通道堆叠组件的分解示意图,而图4B是根据本发明的一个实施方式的单层堆叠的示意图。在图4B中可看出,与附图2的螺旋通道相似的多螺旋通道439在单层堆叠440上合并在一起。此时,四个这样的螺旋通道439在层440上合并,尽管每层可能使用不同的数量。在图4B中显示的螺旋通道439,每一个都具有处在螺旋通道中心的入口441,以及从每个螺旋外缘出现的两个出口通道442和443。或者,每个螺旋通道439可具有一个在螺旋外部的入口,以及两个在螺旋中心出现的出口通道(如图2的实施方式所示)。在层440内,来自层上的每个螺旋通道439的出口通道442和443接合至每一层440上的两个共用出口点444和445,其可以通过该层的孔的形式而被穿孔。如附图4A中,当多层440a、440b、440c连接在一起以形成堆叠时,通过每堆上的每个共用出口点444和445(参见图4B)的孔可以接合在一起,以形成两个共用出口通道446、447,其垂直延伸穿过整堆以到达引导层408。在引导层的底部,两个出口销448、449从引导层408的底部延伸以待插入该堆叠的顶层440a中;并且连接到延伸穿过引导层408的出口通道450、451,其连接到从引导层408的顶部延伸的出口端452和453,使得将系统与生物反应器的其他组件连接的管道(未示出)能够连接,例如图3B的布局。相似地,入口441(参见图4B)可以通过每一层440的孔的形式而被穿孔,其可在堆叠440a、440b、440c接合于一起时连接在一起,使得四个(例如)

共用入口通道454延伸通过堆叠。入口销455从引导层408的底部延伸以待插入堆叠的顶层440a。引导层408的内部入口通道456接合在一起以使流体流入单一入口端457,其可用于连接外部管道(未示出),含有细胞悬浮液的流体通过该外部管道流入系统。通过这种方式,可使用共用入口端457来向系统中的多个不同层440a、440b、440c上的各多螺旋通道439的各入口441提供入口流体;而对于系统中的各多螺旋通道439,一个共用出口端452从一个出口(例如螺旋通道的内部出口212(参见图2))接收流体,另一个共用出口端453从另一个出口(例如外部出口213(参见图2))接收流体。应当理解,图4A和4B的螺旋通道具有处在螺旋通道中心的入口,而图2的螺旋通道具有处于螺旋通道外边缘上的入口,但可以使用任一构造。

[0048] 在图4A和4B的实施方式中,入口457经设定以接收待处理的生物反应混合物。螺旋通道439,或其它曲线形微通道,与入口457流体流动连接,并且适于基于细胞大小,沿着通道439的横截面的至少一部分,分离生物反应混合物中的细胞。两个出口452和453与通道439流体流动连接,其中出口452和453中的至少一个经设定以供待回收的分离的细胞流至灌注生物反应器。出口452和453的至少另一个可被设定以从灌注生物反应器流出废料或流出灌注生物反应器的产物。可以向入口457提供生物反应混合物的连续流,同时使分离的培养基的连续流流到出口452和453之一,并将分离的细胞的连续流回收至灌注生物反应器。通道439适于以仅由于至少一个曲线形微通道中的水动力分离细胞,而不在微流体系统中使用膜。具体而言,通道439具有长度,并且其横截面具有限定纵横比的高度和宽度,使得通道439通过其长度和横截面而适于沿着通道439横截面的部分,基于细胞大小,分离生物反应混合物中的细胞,例如图2所示。

[0049] 实验

[0050] 根据本发明的一个实施方式,为了评估细胞分离系统的性能,使用了三种不同的细胞系,其广泛应用于抗体生产工业。这些细胞以悬浮模式培养,以准确模拟生物反应器条件。培养基包含6.3g/L葡萄糖,并补充8mM的L-谷氨酰胺和100 μ g/mL的抗生素溶液。将冷冻细胞(CHO\MDA-MB-231和杂交瘤)解冻并转移到具有化学限定培养基的T-25瓶中并使其增殖。当培养的细胞达到90%融合时,其采用根据本发明的一个实施方式的微过滤系统在无菌环境中过滤,然后转移到旋转瓶中长期培养(参见图3B)。这一步骤持续10天,以达到高至 1×10^8 的细胞密度,与现有灌注生物反应器相似。

[0051] 图5是根据本发明的一个实施方式,显示用于灌注生物反应器中细胞保留的高通量微量过滤系统的特征的图表。图5A显示不同细胞系的回收效率。图5B显示随细胞浓度变化的分离效率。图5C显示了操作期间细胞的活力和密度。图5D显示了操作期间,由杂交瘤细胞生产IgG的速率。

[0052] 图5A描绘了在根据本发明的一个实施方式的实验中多种细胞系的分离效率。可见使用该系统可达到高水平分离(>90%),无关细胞类型。还已证明,该系统可在类似于灌注生物反应器的高水平细胞浓度下工作(参见图5B和6),包括高达 10^6 个细胞/mL或更高,例如 10^7 和 10^8 个细胞/mL。根据本发明的一个实施方式,图5C显示了在三个独立的实验中细胞的生长和活力,其中观察到细胞密度(细胞/mL)增加,而活力(百分比)显示为最小程度地下降。可见可实现持续的细胞生长,确认在过滤期间对细胞造成最小的损伤。细胞生产力(图5D)也通过用酶学实验测量分泌的IgG蛋白质的活性来评估。观察到IgG蛋白质浓度(μ g/ml)

在10天内稳定地上升。结果表明细胞的可持续生长和持续10天的抗体生产,指示这一用于将动物细胞从培养基中分离的新技术的价值。分选细胞的活力与未分选的(对照)相似,且超过90%的细胞排除染料,这表明归因于分离的最小物理损伤(参见图7)。

[0053] 图6是根据本发明的一个实施方式,显示实验中由流式细胞仪(Accuri C6,美国的BD生物科学公司)获得的FACS数据的图表,其显示了在两种不同的浓度下,模拟灌注生物反应器的条件,使用高通量惯性过滤系统的CHO细胞的分离结果。在组图633中,在入口处可观察到浓度为 10^6 细胞/mL,系统能够在内部出口处(参见组图634)得到0.01%的浓度,即细胞几乎完全被清理,并在外部出口处(参见组图635)获得99.9%的浓度。相似的,在组图636中,在入口处可观察到浓度为 10^7 细胞/mL,在内部出口处(组图637)为3.7%的低浓度,并且在外部出口处(组图638)为96.7%的高浓度。

[0054] 图7是根据本发明的一个实施方式,通过惯性过滤系统的对照(未分选)CHO细胞(a-c)和分选细胞(d-f)的培养的相差显微图。图像表明细胞的形态和增殖速率之间没有明显的差异,表明高活力和无菌性。

[0055] 根据本发明的一个实施方式,高通量的微过滤系统可使用常规的微铣削法和PDMS浇铸,用极低的成本生产。相较于膜过滤器,该系统不会经受过滤器的进行性蛋白质和细胞污染,并且可不停止的运作很长的时间而不降低通量。这一平台预期将结合高通量、低成本、可扩大以及小足迹,使得其本质上适合多种微过滤应用。在生物验证实验中,已成功显示了该系统用于从生物反应器(1000mL/分钟)大规模地保留哺乳动物细胞,分离酵母和分级分离干细胞的可用性。设计的简单使得这一装置与灌注生物反应器中的其它下游工艺进行串联整合或用作独立、高通量、微过滤/分级分离装置是理想的。

[0056] 根据本发明的一个实施方式的新型无膜的微过滤系统是一个用于高通量颗粒的分离/分级分离的低成本的平台,并且可应用于许多需要细胞或颗粒分离的工业中,例如酿酒、医药和水工业。作为概念验证,已证明从用于抗体生产从灌注生物反应器分离动物细胞。这一平台可用于水工业中的水的预处理或可用于啤酒酿造/葡萄酒酿造中的酵母从发酵液移除。此外,该系统有用于生物医药应用的潜力,所述生物医药应用需要从大量生物流体(如血液)中分离稀有细胞(如癌细胞,胎儿细胞、干细胞)。

[0057] 本文所用,“曲线形微通道”是指沿着微通道的流动方向的纵轴偏离直线的微通道,并且例如,可以是螺旋型或正弦曲线型通道。

[0058] 如本领域普通技术人员所理解的,通道可具有各种各样的形状(如,弯曲、螺旋、多环、s型、线性),使得通道的尺寸适于基于细胞的大小,沿着至少一个曲线形微通道的横截面的至少一部分,分离生物反应混合物中的细胞。

[0059] 在一个方面中,该通道是弯曲的。在一个具体的方面中,该通道是螺旋的。螺旋通道的高度可在大约 $10\mu\text{m}$ – $200\mu\text{m}$ 的范围内,例如大约为 $100\mu\text{m}$ – $140\mu\text{m}$ 。螺旋通道的宽度可在大约 $100\mu\text{m}$ – $500\mu\text{m}$ 的范围内。螺旋通道的长度可在大约1cm–10cm的范围内。

[0060] 在一个方面中,螺旋通道可以是双环螺旋通道。在另一个方面中,螺旋通道可以是2环螺旋通道。在另一个方面中,螺旋通道可以是3环螺旋通道。在另一个方面中,螺旋通道可以是4环螺旋通道。在另一个方面中,螺旋通道可以是5环螺旋通道,等。

[0061] 螺旋通道的半径可适于产生约1–10的范围内的迪恩数(Dean number),例如约1cm的半径产生约等于5的迪恩数。螺旋通道的长度可大于或等于3cm,例如大约为9cm,大约为

10cm, 大约为15cm, 以及大约为20cm。螺旋通道的宽度可在大约100 μm –1000 μm 的范围内, 例如大约为200 μm , 大约为300 μm , 大约为400 μm , 大约为500 μm , 大约为600 μm , 大约为700 μm , 大约为800 μm , 以及大约为900 μm 。螺旋通道的高度可在大约20 μm –200 μm 的范围内, 例如大约为30 μm , 大约为40 μm , 大约为50 μm , 大约为60 μm , 大约为70 μm , 大约为80 μm , 大约为90 μm , 大约为100 μm , 大约为110 μm , 大约为120 μm , 大约为130 μm , 大约为140 μm , 大约为150 μm , 大约为160 μm , 大约为170 μm , 大约为180 μm , 以及大约为190 μm 。螺旋通道的纵横比可在大约0.1–1的范围内, 例如大约为0.12, 大约为0.2, 大约为0.3, 大约为0.4, 大约为0.5, 大约为0.6, 大约为0.7, 大约为0.8, 以及大约为0.9。

[0062] 本文所用的“纵横比”是指, 通道的高度除以其宽度的比, 并提供了适当的通道横截面, 以基于细胞大小, 沿着至少一个曲线形微通道的横截面的至少一部分, 分离生物反应混合物中的细胞。

[0063] 根据本发明的一个实施方式, 可以使用包括螺旋微通道的微通道, 其描述于Lim等的美国专利申请公开号2013/0130226A1中, 其整个公开内容通过引用纳入本文。例如, 其中, 可利用流速、宽度、高度、纵横比和长度以及其它与细胞的水动力分离相关的条件的描述。

[0064] 参考文献

[0065] 1.Castilho,L.R.和R.A.Medronho,用于悬浮细胞灌注培养的细胞保留设备(Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures),刊于《生化工程科学的工具和应用2002》(Tools and Applications of Biochemical Engineering Science2002),斯普林格出版社(Springer.),第129–169页。

[0066] 2.Voisard,D.等,悬浮哺乳动物细胞大规模高密度灌注培养的细胞保留技术的潜力(Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells),Biotechnology and Bioengineering,2003,82(7),第751–765页。

[0067] 3.Langer,E.S.,灌注生物反应器的趋势(Trends in Perfusion Bioreactors),BioProcess International,2011.9(第10号),第18–22页。

[0068] 4.Banik,G.G.和C.A.Heath,基于过滤均质灌注反应器中的部分和总细胞保留(Partial and total cell retention in a filtration-based homogeneous perfusion reactor),Biotechnology progress,1995.11(5),第584–588页。

[0069] 5.Deo,Y.M.,M.D.Mahadevan和R.Fuchs,用于单克隆抗体生产的基于旋转过滤器的生物反应器的造作和放大的实际注意事项(Practical Considerations in Operation and Scale-up of Spin-Filter Based Bioreactors for Monoclonal Antibody Production),Biotechnology progress,1996.12(1),第57–64页。

[0070] 6.Low,D.,R.O’Leary和N.S.Pujar,抗体纯化的未来(Future of antibody purification),Journal of Chromatography B,2007.848(1),第48–63页。

[0071] 7.Freshney,R.I.,特定细胞类型的培养(Culture of specific cell types)2005:威利在线图书馆(Wiley Online Library)。

[0072] 8.Pretlow,T.G.和T.P.Pretlow,细胞分离(Cell separation),刊于《方法和选择的应用》(Methods and selected applications)第21983卷:学术出版社有限公司

(Academic Press, Inc)。

[0073] 9.Wurm,F.M.,治疗性重组蛋白在培养的哺乳动物细胞中的生产(Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells),Nature biotechnology,2004.22(11),第1393-1398页。

[0074] 10.Yang,J.D.等,通过喂养可控的灌注生物反应器实现高细胞密度和高抗体生产力(Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process),Biotechnology and bioengineering,2000.69(1),第74-82页。

[0075] 11.Bicalho,I.C.等,在小型水力旋流器中从酒精发酵物中分离酵母(Separation of yeast from alcoholic fermentation in small hydrocyclones),Separation and Purification Technology,2012.87,第62-70页。

[0076] 12.Weber,C.等,木质纤维素生物醇燃料的微生物生产中的趋势和挑战(Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels),Applied Microbiology and Biotechnology,2010.87(4),第1303-1315页。

[0077] 13.Hu,W.-S.和J.G.Aunins,大规模哺乳动物细胞培养(Large-scale mammalian cell culture),Current opinion in biotechnology,1997.8(2),第148-153页。

[0078] 14.Ohashi,R.,V.Singh和J.-F.R.Hamel,一次性生物反应器中灌注细胞培养(Perfusion cell culture in disposable bioreactors),刊于《动物细胞技术:从目标到市场2002》(Animal Cell Technology:From Target to Market 2002),斯普林格出版社,第403-409页。

[0079] 15.Takamatsu,H.等,用于使用多沉降区离心机的悬浮哺乳动物细胞的大规模灌注培养步骤(Large-scale perfusion culture process for suspended mammalian cells that uses a centrifuge with multiple settling zones),Applied microbiology and biotechnology,1996.45(4),第454-457页。

[0080] 16.Habibian,M.等,用于从酒精发酵液中去除酵母的水力旋流器的应用(Application of hydrocyclone for removal of yeasts from alcohol fermentations broth),Chemical Engineering Journal,2008.138(1-3),第30-34页。

[0081] 17.Yoshida,H.等,圆锥形长度对通过电动水力旋流器分离亚微米颗粒的表现的影响(Effect of conical length on separation performance of sub-micron particles by electrical hydro-cyclone),Powder Technology,2012.219(0),第29-36页。

[0082] 18.Bhagat,A.A.S.等,用于细胞分离的微流体学(Microfluidics for cell separation),Medical&biological engineering&computing,2010.48(10),第999-1014页。

[0083] 19.Karimi,A.,S.Yazdi和A.Ardekani,微流体中捕获细胞和颗粒的水动力机制(Hydrodynamic mechanisms of cell and particle trapping in microfluidics),Biomicrofluidics,2013.7(2),第021501页。

[0084] 20.Hou,H.W.等,使用离心力分离和回收循环肿瘤细胞(Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces),Scientific

Reports, 2013.3:1259。

[0085] 21. Majid, E.W. 等, 用于循环肿瘤细胞的超高速、无标记分离的倾斜螺旋微流体 (Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells), Lab Chip, 2013。

[0086] 22. Bhagat, A.A.S., S.S. Kuntaegowdanahalli 和 I. Papautsky, 使用迪安流体和不同迁移, 在螺旋微通道中持续的颗粒分离 (Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration), Lab on a Chip, 2008.8 (11), 第1906-1914页。

[0087] 23. Di Carlo, D., 惯性微流体学 (Inertial microfluidics), Lab on a Chip, 2009.9 (21), 第3038-3046页。

[0088] 本文引用的所有专利、公开申请和参考文献的全部教导都通过引用全文纳入本文。

[0089] 虽然参照实施方式对本发明进行了具体展示和描述, 但本领域技术人员应理解, 可在不背离所附权利要求所包含的本发明范围的情况下对形式和细节作出各种改变。

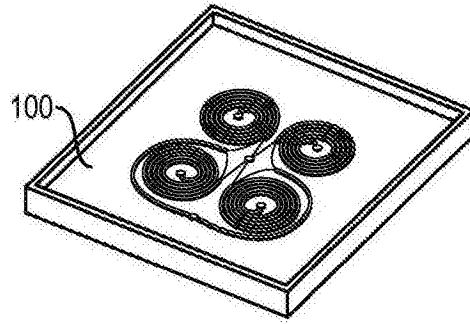


图1A

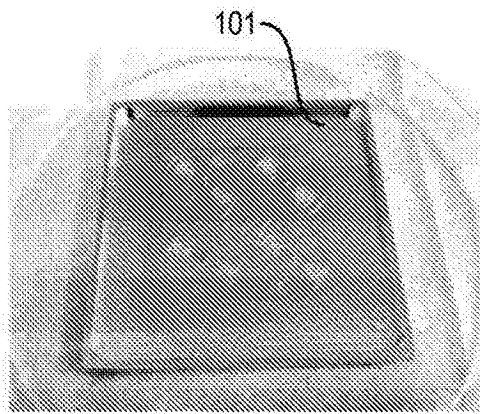


图1B

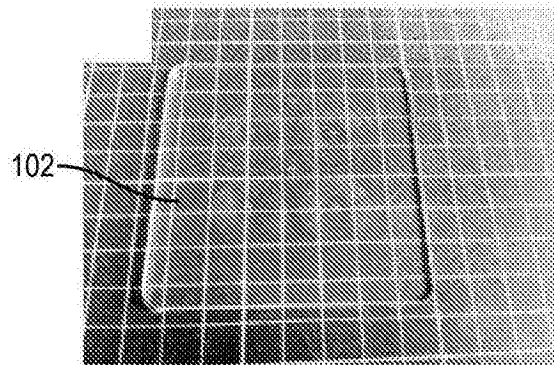


图1C

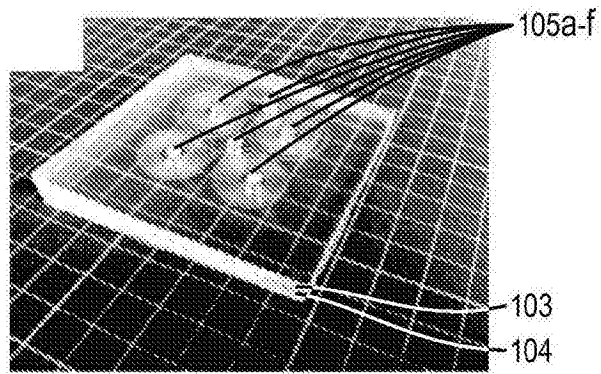


图1D

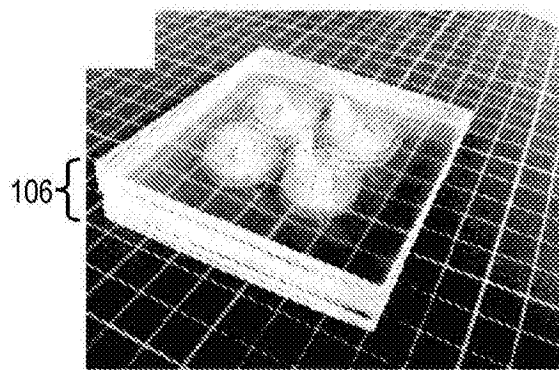


图1E

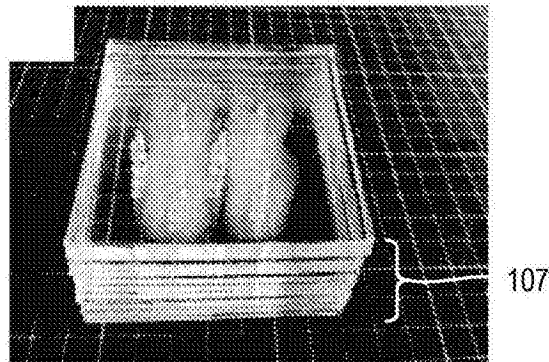


图1F

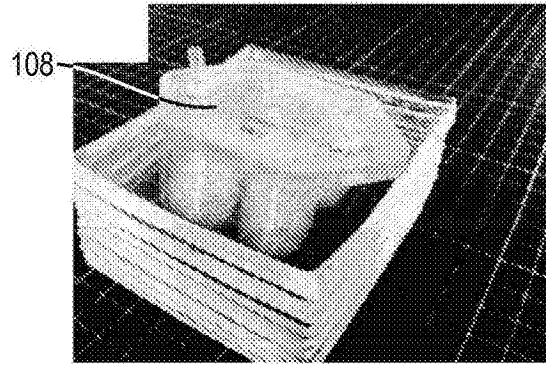


图1G

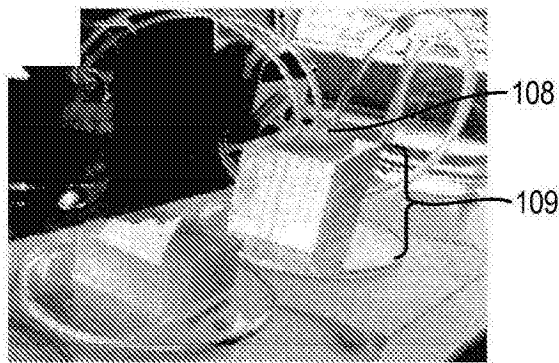


图1H

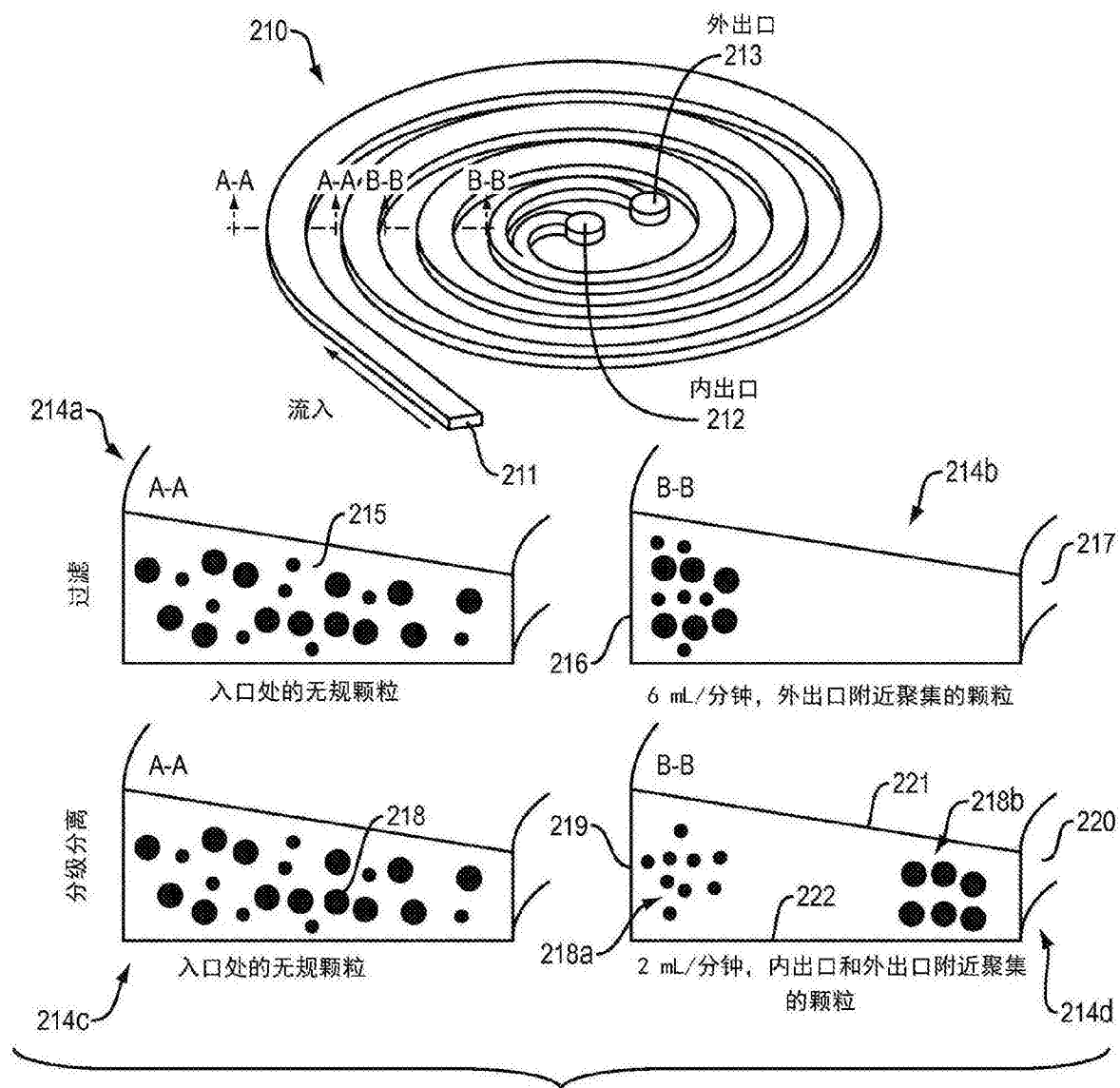


图2

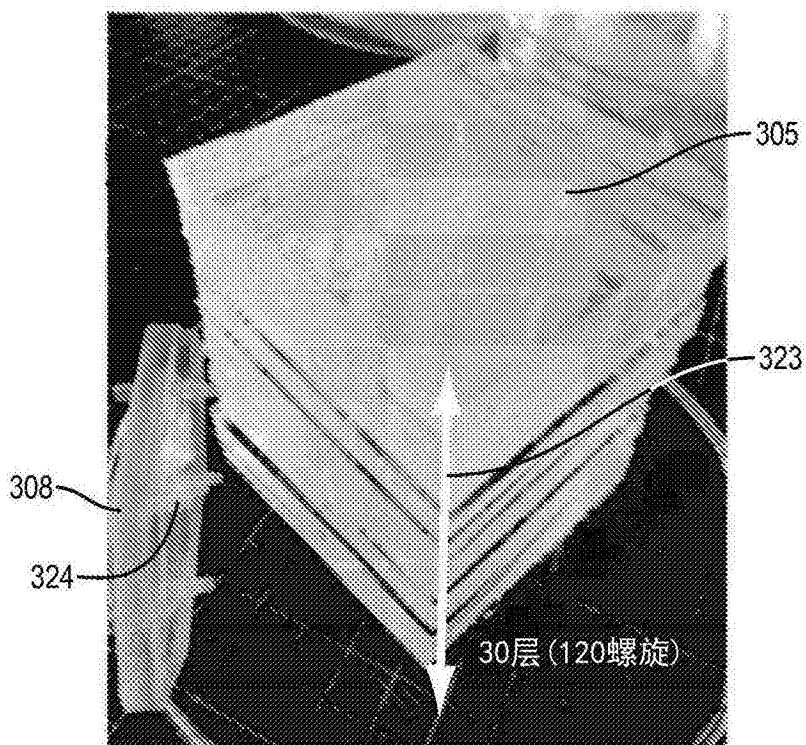


图3A

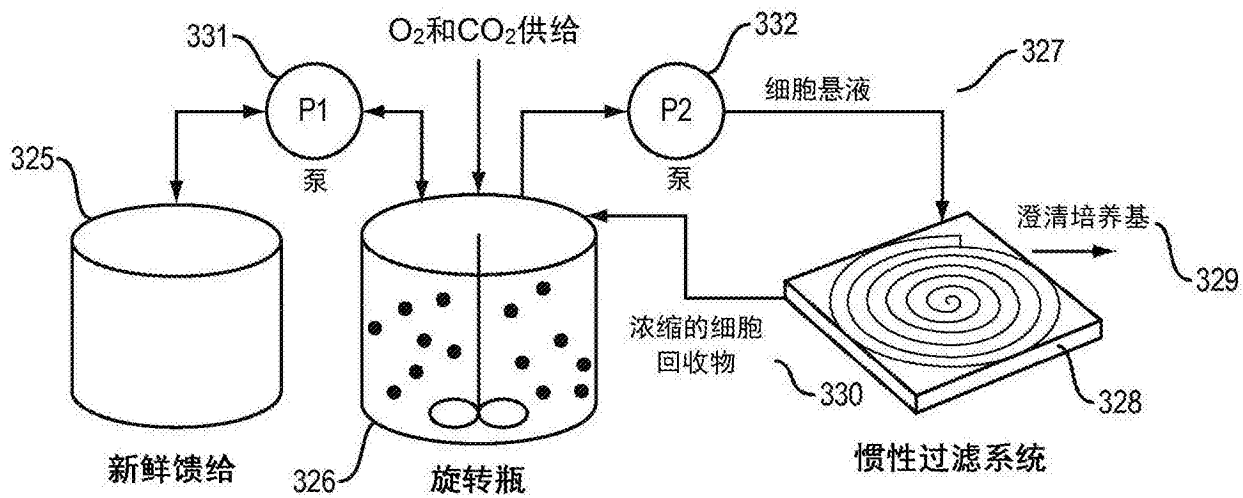


图3B

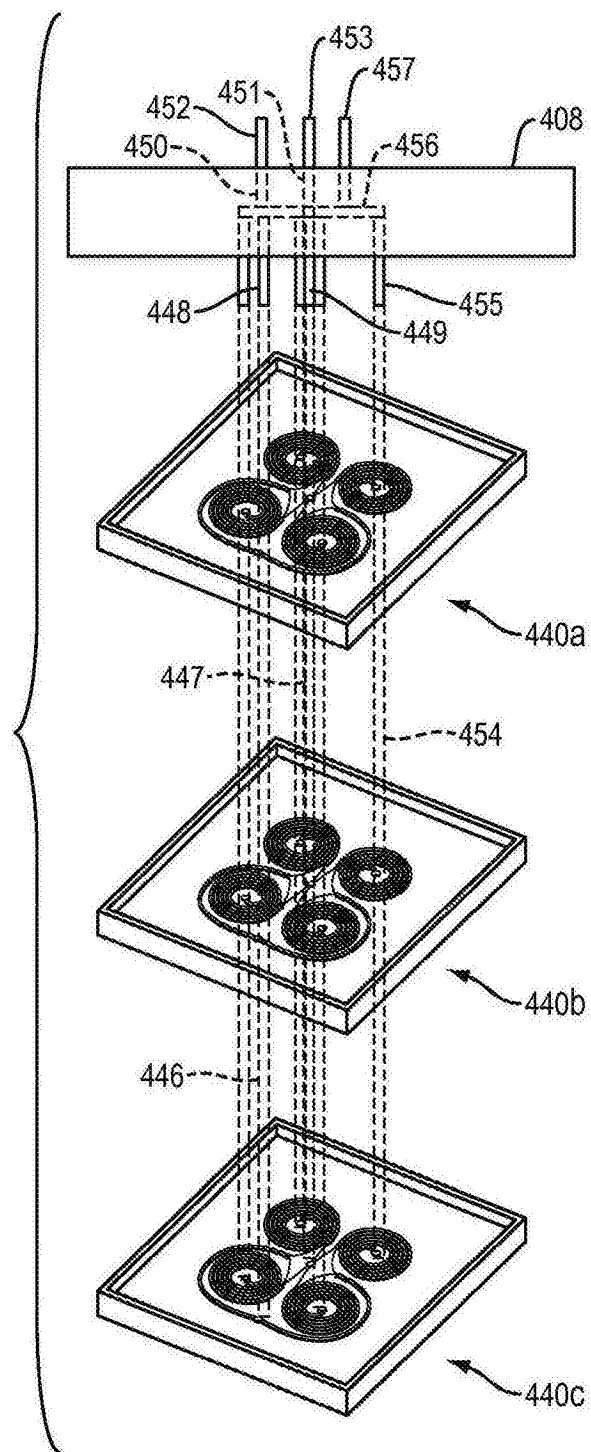


图4A

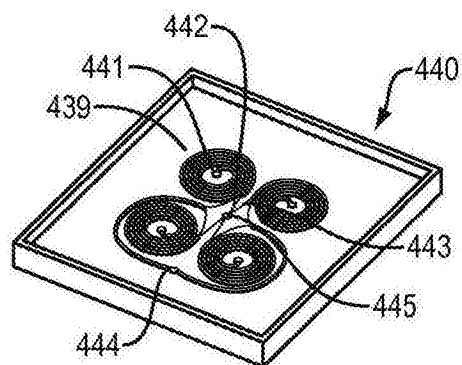


图4B

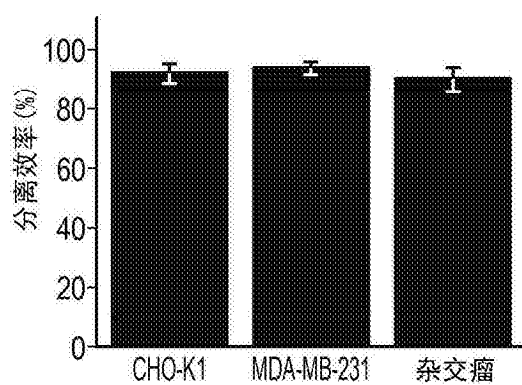


图5A

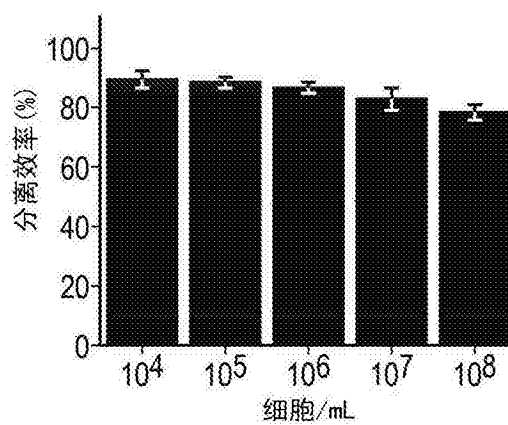


图5B

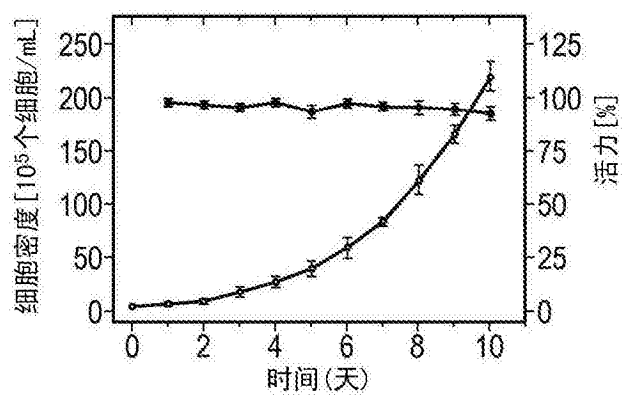


图5C

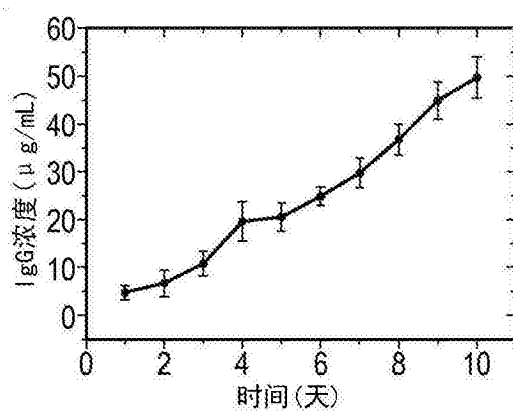


图5D

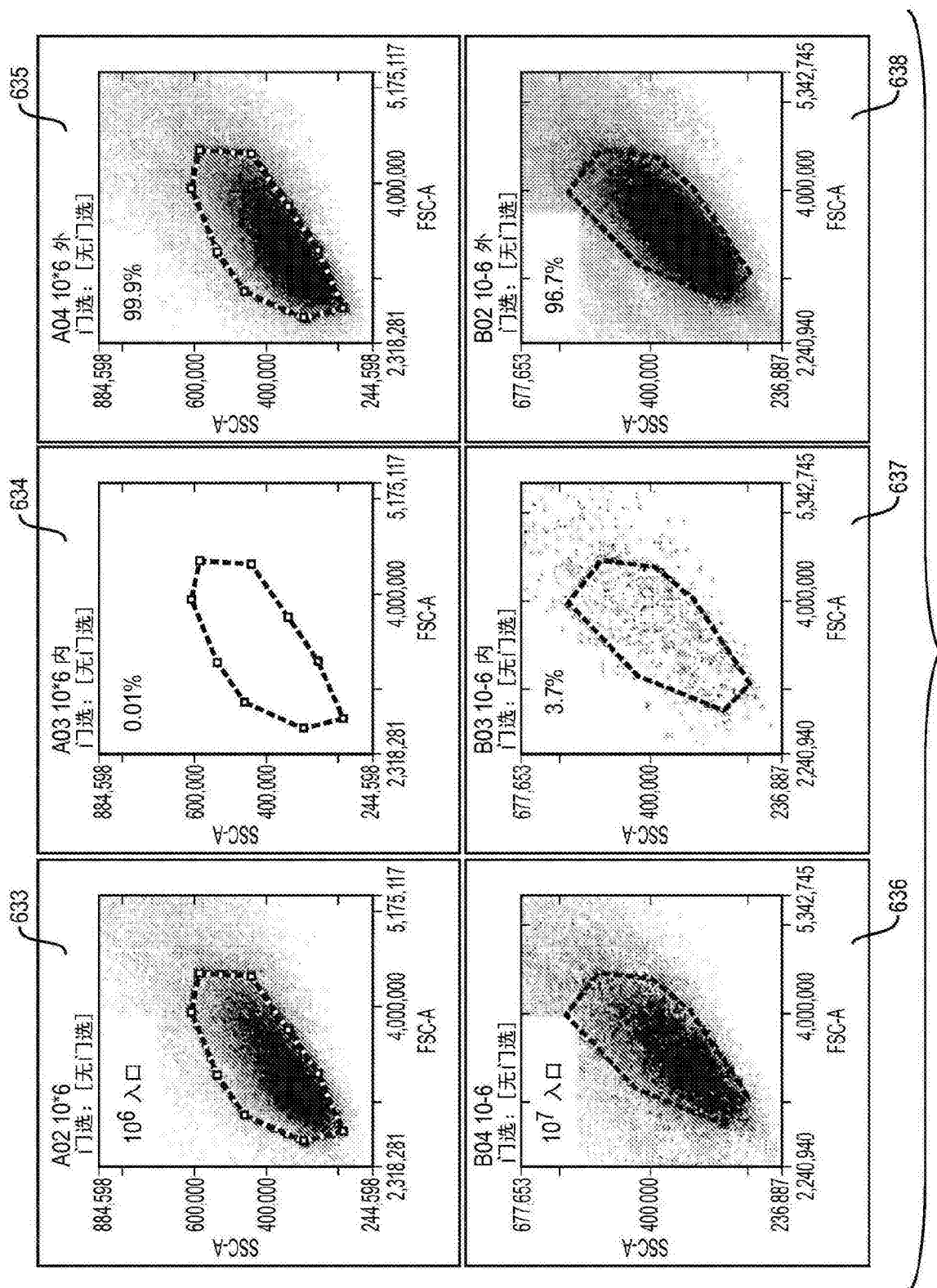


图6

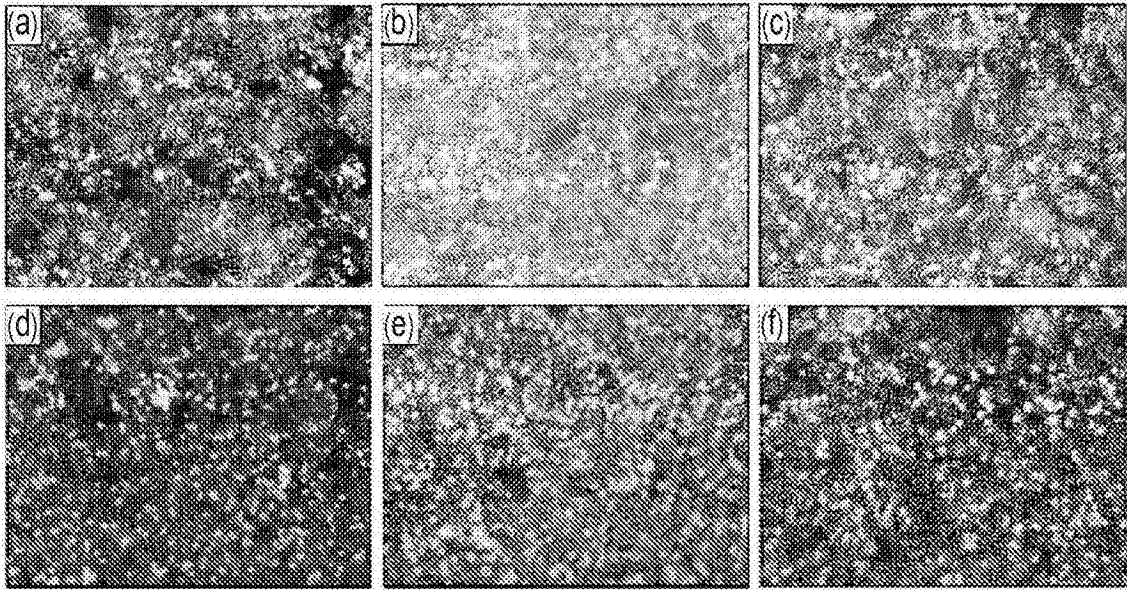


图7

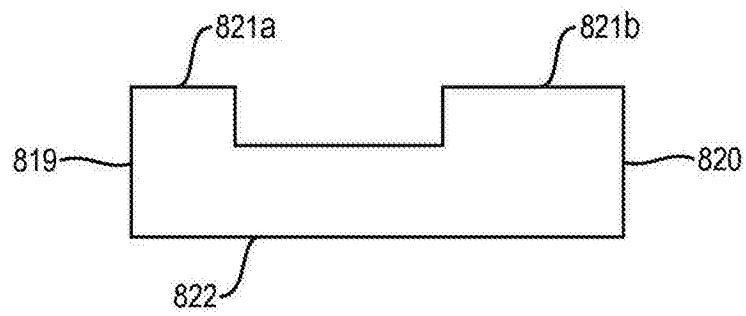


图8