(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113646420 B
(45)授权公告日 2025.01.07

(21)申请号 201980090185.0
(22)申请日 2019.11.27
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113646420 A
(43)申请公布日 2021.11.12
(30)优先权数据
2022085 2018.11.28 NL
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/082803 2019.11.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/109421 EN 2020.06.04
(73)专利权人 米梅塔斯私人有限公司
地址 荷兰莱顿
(72)发明人 保罗·沃尔托
塞巴斯蒂安·约翰内斯·特里奇
托德·彼得·伯顿
(74)专利代理机构 北京三环同创知识产权代理有限公司 11349
专利代理师 邵毓琴 李晶
(51)Int.Cl.
C12M 1/32(2006.01)
C12M 3/06(2006.01)
C12N 5/071(2006.01)
B01L 3/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017216113 A2,2017.12.21
山田侑平等.オンチップ細胞機能制御のための圧電駆動型マイクロ細胞培養デバイスの開発－培養細胞への機械的ナノ振動刺激の付与－.《2011年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集》.2011,第993-994页.
审查员 李芳
权利要求书3页 说明书22页 附图11页

(54)发明名称

用于评估细胞内诱导的机械应变或由细胞诱导的机械应变的设备

(57)摘要

本文描述了一种包括微流体网络的微流体设备。该设备包括基底,微流体通道和盖子,所述基底包括形成所述微流体通道的内表面的至少一部分的隔膜。所述设备能够在评价细胞内诱导的机械应变或由细胞诱导的细胞应变的方法中使用,这些方法也在本文中进行了描述。

CN 113646420 B

1.一种微流体设备,其包括:

微流体网络,该微流体网络包括:

基底,微流体通道和盖子;

其中,所述基底包括形成所述微流体通道的内表面的至少一部分的无孔隔膜,并且,所述微流体通道包括至少部分由所述隔膜和所述微流体通道中的毛细管压力屏障界定的子空间,其中,所述隔膜包括弹性体。

2.如权利要求1所述的微流体设备,其中,所述盖子包括通向微流体通道的入口孔,并且,所述入口孔与所述隔膜基本对齐。

3.如权利要求1或2所述的微流体设备,其中,所述基底包括通向所述微流体通道的孔,所述隔膜延伸跨过该孔。

4.如权利要求1所述的微流体设备,其中,所述隔膜包括横截面比基底外周部分更薄的区域。

5.如权利要求1所述的微流体设备,其中,所述隔膜是透明的或者是视觉上澄清的。

6.如权利要求5所述的微流体设备,其中,所述隔膜的厚度小于1mm。

7.如权利要求1所述的微流体设备,其中,所述隔膜是包括一种或多种电极、传感器、探针、用于监测隔膜移动的参比标志物、铁磁颗粒、粘附分子或抗体的功能化隔膜。

8.如权利要求2所述的微流体设备,其中,所述子空间是第一子空间,并且,所述微流体通道还包括:

包括流体通道的第二子空间,和

第三子空间,所述第一子空间将第三子空间与所述第二子空间分隔开。

9.如权利要求8所述的微流体设备,其中,所述设备还包括具有井的顶层,并且,所述第一子空间和/或第三子空间通过所述入口孔延伸进入所述井。

10.如权利要求2所述的微流体设备,其中,所述毛细管压力屏障与所述入口孔基本对齐。

11.如权利要求8所述的微流体设备,其中,所述隔膜形成所述第一子空间的至少部分表面。

12.如权利要求8所述的微流体设备,其中,所述隔膜形成所述第三子空间的至少部分表面,所述第三子空间任选地由另一毛细管压力屏障界定。

13.如权利要求1所述的微流体设备,其中,所述基底被配置为将所述隔膜可操作地连接至如下元件中的一个或多个:

正向或负向压力来源;

物理驱动器;

电磁驱动器;和

可发泡泡沫。

14.如权利要求1所述的微流体设备,其中,所述毛细管压力屏障包括:

从微流体通道的内表面突出的材料脊;

微流体通道的拓宽部分;

微流体通道的内表面中的凹槽;

对微流体通道的内表面具有不同的润湿性的材料区域;

具有一定间隔的多个立柱。

15.如权利要求1所述的微流体设备,其中,所述微流体网络包括生物材料或生物模拟材料,该生物材料或生物模拟材料包括下列材料中的一种或多种:

a.设置在第一子空间中的凝胶、细胞外基质或支架;

b.衬于微流体通道的上皮细胞或内皮细胞;

c.位于凝胶、细胞外基质或支架内部的上皮细胞或内皮细胞;

d.凝胶、细胞外基质或支架内或上的基质细胞;

e.凝胶、细胞外基质或支架内或上的肌肉细胞;

f.选自多能细胞和中枢神经细胞,外周神经细胞,淋巴网状细胞,免疫细胞,泌尿细胞,呼吸细胞,生殖细胞,胃肠道细胞,内分泌细胞,皮肤细胞,肌肉骨骼细胞,心血管细胞和乳腺细胞类型中的一种或多种其他细胞类型。

16.一种评价细胞诱导的机械应变的方法,其包括:

将一种或多种类型的细胞或细胞聚集体引入至权利要求1至15中任一项所述的微流体设备的微流体网络中;

任选地,培养所述一种或多种类型的细胞或细胞聚集体;以及

使用设置于隔膜上的或者可操作地连接至隔膜的一种或多种电极、传感器、探针或用于监测隔膜移动的参比标志物监测隔膜的形变。

17.一种使一种或多种类型的细胞或细胞聚集体经历机械应变的方法,其包括:

将一种或多种类型的细胞或细胞聚集体引入至权利要求1至15中任一项所述的微流体设备的微流体网络中;

任选地,培养所述一种或多种类型的细胞或细胞聚集体;以及

通过向隔膜施加正向压力或负向压力使一种或多种类型的细胞或细胞聚集体经历机械应变。

18.如权利要求17所述的方法,其包括施加交替的正向压力和负向压力。

19.如权利要求17或18所述的方法,其中,所述机械应变以单一周期的形式或重复的形式随时间发生改变。

20.如权利要求17所述的方法,其中,所述设备包括与所述微流体通道接触的多个隔膜,并且,所述多个隔膜被配置成以预定模式对所述多个隔膜中的一个或多个进行多次刺激而在多次刺激循环过程中产生通过微流体网络的净流体移动。

21.如权利要求16或17所述的方法,其包括:

向微流体网络中引入一定体积的凝胶或凝胶前体;

使得所述一定体积的凝胶或凝胶前体固化或凝胶化以形成固化的凝胶;

向所述微流体网络加载液体;以及

培养一种或多种类型的细胞或细胞聚集体。

22.如权利要求17所述的方法,其中,所述方法包括:

向第一子空间中引入一定体积的凝胶或凝胶前体并且由所述毛细管压力屏障限制所述一定体积的凝胶或凝胶前体。

23.如权利要求16或17所述的方法,其还包括:

将一种或多种类型的细胞引入至微流体通道。

24.如权利要求21所述的方法,其还包括:

将一种或多种类型的细胞引入至第三子空间,并且使得所述一种或多种类型的细胞形成单层细胞或细胞聚集体。

25.如权利要求24所述的方法,其中,所述第三子空间与入口孔流体连接并且任选地至少部分由凝胶表面界定。

26.如权利要求16或17所述的方法,其包括培养如下细胞中的任何一种或其组合:

a.衬于微流体通道的、能够形成导管或血管的上皮细胞或内皮细胞;

b.位于凝胶,细胞外基质或支架内部,凝胶,细胞外基质或支架上或抵靠凝胶,细胞外基质或支架的上皮细胞或内皮细胞;

c.位于凝胶,细胞外基质或支架内部,凝胶,细胞外基质或支架上或抵靠凝胶,细胞外基质或支架的基质细胞;

d.位于凝胶,细胞外基质或支架内部,凝胶,细胞外基质或支架上或抵靠凝胶,细胞外基质或支架的肌肉细胞;

e.选自多能细胞和中枢神经细胞,外周神经细胞,淋巴网状细胞,免疫细胞,泌尿细胞,呼吸细胞,生殖细胞,胃肠道细胞,内分泌细胞,皮肤细胞,肌肉骨骼细胞,心血管细胞和乳腺细胞类型中的一种或多种其他细胞类型。

用于评估细胞内诱导的机械应变或由细胞诱导的机械应变的设备

技术领域

[0001] 本发明涉及微流体设备,具体而言,本发明涉及使用微流体设备诱导或评估细胞内的机械应变的方法。

背景技术

[0002] 为了在细胞培养物中尝试模拟更多的生理学相关症状,已经开发出了多种模型,例如,在用于评价药物疗效,ADME安全性的临床前基于细胞的模型中模拟灌注流,共培养,和机械应变。

[0003] 微流体由于其在使用过程中液体或培养基固有的流动而成为这种体外细胞培养模型的通用平台技术,并且微工程技术在制造复杂的微流体网络方面具有优势。然而,本领域仍然想要开发模拟或重现施加在例如肺或肠中的细胞上的机械应变的模型,这是因为由于呼吸运动和蠕动产生的气流/液流诱导了剪切应力。

[0004] 目前本领域中存在例如Emulate芯片肺,其中通过多孔膜将两个微流体通道分隔开,人肺泡上皮细胞在膜的一侧培养,人肺微血管内皮细胞在膜的另一侧培养(Science(2010)328,p 1662-1668)。该Emulate芯片肺也在Children's Medical Center Corporation的专利申请WO2010/009307中描述。然而,直接的细胞-细胞接触和可能的近分泌信号传导因膜的存在和孔的尺寸和分布而受到阻碍。

[0005] Alveolix(http://www.alveolix.com/technology/)具有不同类型的芯片肺,其在Universität Bern的专利申请WO2015/032889中作了部分描述。在该设备中,上皮细胞在自顶部开口的膜上培养。在膜的底侧,膜与微流体通道接触,该微流体通道具有在受到刺激后向第一膜施加拉伸力的隔膜。

[0006] 迄今为止,本领域还没有在如下装置结构中培养不同类型的细胞的方式,该装置结构同时允许例如微血管网络和上皮细胞层之间发生近分泌相互作用并同时仍然处于向上皮细胞层施加拉伸力的位置。这需要完全不同的不含人工膜的方式。

[0007] 因此,本领域需要用于模拟细胞中的机械应变的改进的设备。

发明内容

[0008] 在本发明的第一方面,本文提供一种微流体设备,其包括:

[0009] 微流体网络,所述微流体网络包括:

[0010] 基底,微流体通道和盖子;

[0011] 其中,所述基底包括形成微流体通道的内表面的至少一部分的无孔隔膜,并且,所述微流体通道包括至少部分由微流体通道中的隔膜和毛细管压力屏障界定的子空间。

[0012] 在本发明的第二方面,本文提供一种评估由细胞诱导的机械应变的方法,该方法包括:

[0013] 将一种或多种类型的细胞或细胞聚集体引入第一方面所述的微流体设备的微流

体网络中;

[0014] 任选地,培养所述一种或多种类型的细胞或细胞聚集体;以及

[0015] 使用设置于隔膜上的或可操作地与隔膜连接的一个或多个电极、传感器、探针、用于监测隔膜移动的参比标志物、铁磁颗粒或者抗体监测隔膜的形变。

[0016] 在本发明的第三方面,本文提供一种使一种或多种类型的细胞或细胞聚集体经受机械应变(即,在一种或多种类型的细胞或细胞聚集体中诱导机械应变)的方法,该方法包括:

[0017] 将一种或多种类型的细胞或细胞聚集体引入第一方面所述的微流体设备的微流体网络中;

[0018] 任选地,培养所述一种或多种类型的细胞或细胞聚集体;以及

[0019] 通过向隔膜施加正向压力或负向压力使一种或多种类型的细胞或细胞聚集体经受机械应变。

[0020] 根据本发明的第四方面,本文提供一种分析平板,其包括带有凝胶的第一方面所述的设备,所述凝胶由毛细管压力屏障限制在微流体通道的子空间中,任选地,其中,所述凝胶包括一种或多种细胞或细胞聚集体。

[0021] 根据本发明的第五方面,本文提供一种试剂盒,其包括:

[0022] 本发明第三方面所述的分析平板;和

[0023] 用于诱导血管生成的一种或多种促血管生成化合物。

[0024] 先前的研究已经显示了对上皮细胞的刺激以及对上皮细胞和内皮细胞这两者的刺激。然而,以近分泌的方式(即,直接细胞-细胞接触),以与上皮细胞相互作用的多个微血管的形式机械刺激血管化组织迄今被认为是不可能的或尚未被证实。为了实现该目的,需要不含诸如过滤膜之类的人工屏障的一些形式的初始模型,即,上皮细胞需要接种在与内皮细胞不同的位置,同时还要允许那些细胞发生直接相互作用。根据上文所述的各个方面中的任一方面的设备能够意想不到地机械刺激血管化组织,因此,促进了用于评价药物疗效或ADME安全性的改进的体外或离体模型系统的开发。

[0025] 释义

[0026] 在说明书全文和权利要求书中使用了涉及设备、方法、用途和本发明的其他方面的各种不同的术语。除非另有说明,这些术语具有本发明所属技术领域的常用含义。其他特别定义的术语被解释为与本文提供的定义一致。虽然与本文所述的那些方法和材料类似或等同的任何方法和材料可用于实施检测本发明,但是在本文中描述优选的材料和方法。

[0027] 除非另有明确说明,本文使用的单数形式的冠词(“a”,“an”和“the”)还包括复数指代物。因此,例如,单数形式的术语细胞“a cell”包括两个或多个细胞的组合等。

[0028] 在涉及诸如量、时间范围等的测量值时,本文使用的术语“约”和“大约”意在包括特定值的正负20%的变量,或正负10%的变量,更加优选地正负5%的变量,甚至更加优选地正负1%的变量,以及仍然更加优选地正负0.1%的变量,这样,这些变量适于进行本文公开的方法。

[0029] 本文使用的术语“包含(comprising)”被解释为包括在内的并且是开放式的,不是排除的。具体而言,该术语及其变化形式是指具体特征、步骤或成分被包括在内。这些术语不应被解释为排除其他特征、步骤或成分的存在。

[0030] 本文使用的术语“示例性的”是指作为实例,例子或示例并且不应当被解释为排除本文公开的其他配置方式。

[0031] 本文使用的术语“微流体通道”是指位于被上部基板或盖子覆盖的材料层上的通道或穿过该材料层的通道,或者是指位于设置于底板或基底上的材料之下的或穿过该材料的通道,该通道的长度、宽度或高度中的至少一种在亚毫米范围内。应当理解的是,该术语包括线性通道以及分支的通道或者在其通路上具有弯折或拐弯的通道。微流体通道通常包括用于施加一定体积的液体的入口。由微流体通道包封的体积通常在微升或亚微升范围内。微流体通道通常包括基底,其可能是下部材料的顶面;两个侧壁和顶部,该顶部可能是微流体通道上的顶部基板的下表面,并且,微流体通道可根据需要配置有入口、出口和/或通风孔。基底、侧壁和顶部均可称为微流体通道的内表面,并且可统称为内表面。在一些实施例中,微流体通道可具有圆形或半圆形横截面,微流体通道可被认为分别具有一个或两个内表面。

[0032] 本文使用的术语“隔膜”是指有弹性地被偏压的弹性和/或多孔膜,这样,该隔膜在施加压力的条件下是可形变的,但是一旦停止施加压力就会恢复到静止状态。针对隔膜使用的术语“刺激”、“位移”、“偏斜”或“扭曲”应当被理解为其等同于隔膜“形变”。

[0033] 本文使用的术语“液滴滞留结构(droplet retention structures)”和“毛细管压力屏障”可互换使用并且是指设备通过毛细管作用力在某一位置保持液体-气体或流体-流体弯液面的特性。毛细管压力屏障可被认为用于将具有V_0体积的微流体通道分隔为可向其中引入不同液体的两个亚体积V_1和V_2。换言之,毛细管压力屏障通过位于两个子空间之间的边界至少部分界定了微流体通道的子空间。

[0034] 在具体涉及毛细管压力屏障时本文使用的术语“基本对齐”(例如,基本与孔对齐)可被理解为是指在俯视微流体设备时相对于孔外周上的点毛细管压力屏障的位置没有发生显著偏离或位移。

[0035] 在具体涉及毛细管压力屏障时使用的术语“封闭的几何结构”是指不同于具有两个端部的线性毛细管压力屏障并且形成闭环的一种毛细管压力屏障。例如,当俯视时,具有封闭的几何结构的毛细管压力屏障可包括圆形毛细管压力屏障或多边形毛细管压力屏障,例如,三角形毛细管压力屏障,或正方形毛细管压力屏障,或五边形毛细管压力屏障,等等。在一些实施例中,毛细管压力屏障的封闭的几何结构也可以是指如下排布的两个线性毛细管压力屏障:这两个毛细管压力屏障相交于的同一壁或相交于微流体通道的壁并且由此封闭或界定了以两个线性毛细管压力屏障及其壁为外周的微流体通道区域。

[0036] 本文使用的术语“同轴的”可被理解为是指具有中心的且非圆形的毛细管压力屏障的任何封闭的几何结构或与另一毛细管屏障或孔的形状或结构对应的任何其他形状或结构与毛细管压力屏障同轴的,即,共-中心的。例如,术语“同轴的”也被理解为是指如下排布的两个线性毛细管压力屏障:这两个毛细管压力屏障相交于的同一壁或相交于微流体通道的壁并且由此封闭或界定了以两个线性毛细管压力屏障及其壁为外周的具有中心的微流体通道区域。

[0037] 本文使用的术语“线性”毛细管压力屏障不能解释成是直线的,而应解释成除了封闭几何结构之外的其他形状,即,如同线段那样具有两个端部,但是其可包括一个或多个弯曲或拐角。线性毛细管压力屏障通常在其每个端部与微流体通道的侧壁相交。

[0038] 本文使用的术语“应变腔室”和“细胞培养腔室”是指微流体网络的子空间,其至少部分由隔膜表面界定。子空间还可至少部分由位于微流体网络中的毛细管压力屏障来界定。

[0039] 本文使用的术语“内皮细胞”是指内皮器官的细胞或分化至如下状态的细胞,在该状态中,细胞表达将细胞识别为内皮细胞的标志物。

[0040] 本文使用的术语“上皮细胞”是指上皮器官的细胞或分化至如下状态的细胞,在该状态中,细胞表达将细胞识别为上皮细胞的标志物。

[0041] 本文使用的术语“液滴”是指一定体积的液体,其可能超过或没有超过微流体通道的高度并且其不必须为圆球形。具体而言,凝胶液滴是指在应变腔室中的一定体积的凝胶。

[0042] 本文使用的术语“生物组织”是指在本文所述的方法中培养和/或分析的功能上相互关联的相同类型、类似类型或不同类型的细胞的集合体。细胞可以是细胞聚集体,和/或来自患者的特定组织样本。例如,术语“生物组织”包括类器官、组织活检物、肿瘤组织、切除的组织材料、球体和胚胎体。

[0043] 本文使用的术语“细胞聚集体”是指与通常单层生长的表面贴附的细胞不同的3D细胞簇。3D细胞簇通常与更加类似于体内的情况相关联。相反,表面贴附的细胞可受到基板性质的显著影响并且可能会经历去分化或经历转变为其他细胞类型。

[0044] 本文使用的术语“形成内腔的细胞组分(lumened cellular component)”是指具有内腔的生物组织(即,由细胞构成的生物组织),例如,具有顶部和底部表面的微血管。

[0045] 本文使用的与隔膜相关的术语“无孔的”是指基本不透过液体或完全不透过液体的隔膜,具体而言,所述液体包含营养物或来自细胞培养实验的废弃物。

附图说明

[0046] 参考附图仅以举例说明的方式对本发明进行描述,其中,

[0047] 图1至图3显示了在本文所述的设备中使用的微流体网络的第一可能的结构的垂直横截面图(图1),水平俯视图(图2)和放大垂直横截面图(图3)。

[0048] 图4至图6显示了在本文所述的设备中使用的微流体网络的第二可能的结构的垂直横截面图(图4),水平俯视图(图5)和放大垂直横截面图(图6)。

[0049] 图7A至图7C显示了在本文所述的设备中使用的微流体网络的放大垂直横截面图,具体而言,显示了静止状态的隔膜(图7A),负向刺激下形变状态的隔膜(图7B)和正向刺激下形变状态的隔膜(图7C)。

[0050] 图8A至图8F显示了本文所述的方法中的示例性代表步骤。

[0051] 图9A至图9F显示了本文所述的可选的方法中的示例性代表步骤。

[0052] 图10A至图10C显示了在本文所述的设备中使用的微流体网络的可选结构的放大垂直横截面图。

[0053] 图11A和图11B显示了由本文所述的设备中使用的毛细管压力屏障固定的凝胶或细胞外基质以及由本文所述的设备中使用的不同结构的微流体网络的孔边缘固定的凝胶或细胞外基质。

[0054] 图12和图13显示了在本文所述的设备中使用的微流体网络的可选结构的使用。

[0055] 图14A和图14B显示了将隔膜固定至本文所述的微流体网络或设备的可选方式。

[0056] 图15显示了根据本发明的且由本文所述的微流体网络的多孔结构构成的设备的平面图。

[0057] 图16和图17显示了本文所述的且由微流体网络的多孔结构构成的设备的垂直横截面图。

具体实施方式

[0058] 微流体设备

[0059] 下文描述了微流体设备。所述微流体设备优选地为多阵列形式/多孔形式,从而使其能够应用于体外细胞分析、药物筛选分析、毒性分析等等,具体而言,所述微流体设备为高通量筛选形式。这些多孔培养平板可提供排布在矩形矩阵中的6个样品孔、12个样品孔、24个样品孔、48个样品孔、96个样品孔、384个样品孔和1536个样品孔,其中,在本文中,在微流体设备中存在本文所述的微流体网络的多阵列结构。在一个实施例中,微流体设备与标准ANSI/SLAS微量滴定板的一个或多个维度相兼容。在可选的实施方式中,微流体设备是具有显微镜载玻片尺寸的多阵列形式。

[0060] 因此,微流体设备优选地具有多个本文所述的微流体网络。在一个实施例中,所述多个微流体网络彼此非流体连接;换言之,每个微流体网络独立于微流体设备中存在的任何其他微流体网络运行。

[0061] 在一个实施例中,微流体设备包括:

[0062] 微流体网络,该微流体网络包括:

[0063] 基底,微流体通道和盖子;

[0064] 其中,所述基底包括形成所述微流体通道的内表面的至少一部分的隔膜,并且,其中,所述微流体通道包括至少部分由所述隔膜和所述微流体通道中的毛细管压力屏障界定的子空间。

[0065] 在一个实施例中,微流体设备包括:

[0066] 微流体网络,该微流体网络包括:

[0067] 包括细胞培养腔室的微流体通道;

[0068] 位于所述微流体通道上的盖子;和

[0069] 其上设置有所述微流体通道的基底,

[0070] 所述基底包括:通向所述细胞培养腔室的孔和延伸穿过所述孔的并由此形成所述细胞培养腔室的底板的至少一部分的隔膜。

[0071] 在一个实施例中,微流体设备包括:

[0072] 微流体网络,该微流体网络包括:

[0073] 包含应变腔室的微流体通道;

[0074] 位于所述微流体通道上的盖子;和

[0075] 其上设置有微流体通道的基底,

[0076] 所述基底包括:通向细胞培养腔室的孔和延伸穿过所述孔并由此形成所述应变腔室的底板的至少一部分的隔膜。

[0077] 在一个实施例中,微流体设备包括:

[0078] 微流体网络,该微流体网络包括:

[0079] 微流体通道;

[0080] 位于所述微流体通道上的盖子,所述盖子包括通向微流体通道的孔;和

[0081] 其上设置有所述微流体通道的基底;

[0082] 所述基底包括:形成所述微流体通道的底板的至少一部分的隔膜,其中,所述隔膜与所述孔基本对齐。

[0083] 在一个实施例中,微流体设备包括:

[0084] 微流体网络,该微流体网络包括:

[0085] 微流体通道;

[0086] 位于所述微流体通道上的盖子;和

[0087] 其上设置有所述微流体通道的基底,所述基底包括截面比基底外周部分薄的区域。

[0088] 在一个实施例中,微流体设备包括:

[0089] 微流体网络,该微流体网络包括:

[0090] 基底,具有内表面的微流体通道,和包括通向所述微流体通道的孔的盖子;

[0091] 其中,所述微流体通道包括第一和第二毛细管压力屏障,所述第一和第二毛细管压力屏障分别设置在相同的内表面上并且与盖子上的孔基本对齐并与盖子上的孔同轴。

[0092] 总体而言,微流体设备是至少包括具有微流体通道的微流体网络的微流体设备。微流体通道或网络的不同结构均可在本发明的范围内,但是还可包括例如微流体通道内的或与微流体通道流体连通的空间或子空间,其用于接受或限制凝胶,例如,细胞外基质。

[0093] 微流体设备总体上包括微流体网络,其在下文中将详细进行描述。

[0094] 微流体网络

[0095] 微流体设备的微流体网络总体上包括基底、微流体通道或微流体层以及盖子(在本文中也称为覆盖层)并且所述微流体网络可以多种方式制造。

[0096] 基底(在本文中也称为基底层或底板)优选地由基本上刚性的材料(例如,玻璃或塑料)形成并且用于为微流体网络的剩余部分提供支撑表面。在一个实施例中,基底的尺寸与标准ANSI/SLAS微量滴定板的孔区域的尺寸相同或类似。在一些实施例中,所述基底包括通向微流体层或微流体通道的孔,本文所述的隔膜延伸通过该孔。在一些实施例中,所述基底由具有足以支撑微流体设备的剩余部分的刚性的块状材料形成,但是该块状材料在薄片形式下作为弹性体。在这些实施例中,所述基底可包括比外周部分更薄的横截面区域,例如,基底的具有足够弹性的较薄横截面区域的剩余部分可发挥本文所述的隔膜的作用。

[0097] 在一个实施例中,基底层可包括夹在且层压在两片蚀刻的、激光钻孔的或研磨的玻璃之间的隔膜。

[0098] 在使用微流体设备的过程中,基底以刺激隔膜的方式发生相互作用。例如,所述基底可被配置成将所述隔膜可操作地连接至正向压力源或负向(空气)压力源(即,泵)、物理驱动器、电磁驱动器和可发泡泡沫中的一种或多种。刺激隔膜的这些方法是本领域已知的并且无需进一步讨论。

[0099] 微流体设备或微流体网络包括设置在基底上的微流体通道或微流体层。在一些实施例中,微流体通道可包括或可被分隔成多个子空间,例如由本文所述的毛细管压力屏障的存在而进行分隔。在一些实施例中,微流体通道可包括第一子空间,其可被称为应变腔室

或细胞培养腔室。在一些实施例中,应变腔室或细胞培养腔室可部分由微流体通道中存在的毛细管压力屏障和/或隔膜来界定。在一些实施例中,隔膜可形成第一子空间的表面或底板的至少一部分。

[0100] 在一些实施例中,微流体通道还包括第二子空间,其包括流体通道,以及由第一子空间从第二子空间中分隔出来的第三子空间。在一些实施例中,第二子空间的流体通道是正在使用的流体通道。第三子空间可以是第一子空间附近的正在使用的第二流体通道,或者从概念上来说,第三子空间可至少部分位于第一子空间上方,并且一旦第一子空间已经被例如凝胶或细胞外基质组合物填充第三子空间可留待被填充或占据。在一些实施例中,隔膜形成第三子空间的表面的至少一部分。第三子空间可由另一毛细管压力屏障来限定。

[0101] 制备微流体通道的典型方法是在模具上浇铸诸如聚二甲基硅氧烷之类的可模塑的材料,由此将微流体通道印在硅橡胶材料中,从而形成微流体层。带有嵌入的通道的橡胶材料随后放置于玻璃基底层上或相同的橡胶材料基底层上,从而进行密封。可选地,通道结构可蚀刻在诸如玻璃或硅之类的材料中,随后将其粘结至顶部基板或底部基板(也称为覆盖层和基底层)。粘结之后进行的塑料注塑或凸印是制造微流体通道网络的另一种方法。制造微流体通道网络的又一技术是在可曝光成像的聚合物(例如,SU-8或各种不同的其他干燥膜或液体光刻胶)中通过照相平版印刷形成微流体通道网络图案,随后进行粘合步骤。在进行粘合时,粘合是指由盖子或基底封闭通道。粘合技术包括阳极粘合,共价粘合,溶剂粘合,粘合剂粘合和热粘合,等等。

[0102] 从上述各种不同的制造方法中可以推断出,微流体层可包括包含设置在基底层上的微流体通道的亚层或者在覆盖层或基底层上形成该微流体层的图案。在使用方向上,微流体亚层设置在基底层的顶部表面上。微流体通道可形成为穿过设置在基底层上的材料亚层的通道。在一个实施例中,所述材料亚层是设置在基底层上的聚合物并且在该材料亚层中形成微流体通道图案。在一些实施例中,微流体层包括两个或多个微流体通道,其可以彼此流体连通。

[0103] 微流体网络包括覆盖微流体通道的盖子或覆盖层。所述盖子或覆盖层可由本领域已知的任何合适的材料形成,例如,与包括微流体通道的亚层粘合的玻璃层。在一个实施例中,所述覆盖层在界定的点设置有预先形成的孔。所述孔(其在本文中也称为入口孔)使得微流体层的微流体通道与其上设置的微流体设备的其他元件流体连通。总体而言,入口孔发挥与外部空间或设置在孔的顶部上的孔之间的界面。

[0104] 根据微流体设备的微流体网络的任何特定使用的需求,微流体通道可设置有一个或多个额外的流体入口,以及一个或多个出口或通风口。为了通过微流体网络填充液体、排空液体和灌注液体,微流体通道优选地设置有至少一个入口和至少一个出口或通风口。在一个实施例中,至少一个入口和至少一个出口或通风口中的每一个优选地为在覆盖层中预先形成的孔。应当理解的是,入口和出口之间没有几何上的差别并且在很多情况下入口和出口可互换使用。

[0105] 在一些实施例中,微流体设备还包括设置在上述覆盖层上的顶层,所述顶层具有一个或至少一个与微流体设备的其他部分流体连通的孔。在一些实施例中,顶层具有多个这样的孔,并且至少一个(例如,至少两个,例如,至少三个)孔与设备的微流体网络或通道连通。例如,顶层可包括通过设置在微流体网络的覆盖层中的入口孔与微流体网络流体连

通的孔,从而形成SLAS兼容孔板。孔和入口孔可与本文所述的微流体设备的隔膜基本对齐。在一些实施例中,具有至少一个孔的顶层和微流体层是一体成型的。例如,微流体通道可在具有至少一个孔的注塑微量滴定板的底面形成。

[0106] 隔膜

[0107] 在一些实施例中,本发明公开的微流体设备通常包括隔膜,其是弹性膜和/或无孔膜形式。本发明公开的隔膜的这些性质使其与微流体设备中的通常用于细胞培养的多种类型的膜相区别,所述通常用于细胞培养的多种类型的膜用作正在被培养的细胞的可渗透的支撑体同时其将细胞与提供营养物和/或除去废弃物的灌注通道隔离开,或者将细胞与其他共培养的细胞隔离开。

[0108] 本文所述的设备的隔膜的功能是模拟体内的肌肉刺激,例如,以重复的方式形变以模拟呼吸、蠕动或心跳,或者以非重复的方式形变以模拟血管的扩张或缩窄,或者模拟肌肉收缩/放松,例如虹膜。

[0109] 在一些实施例中,隔膜至少部分形成微流体通道的内表面,例如,底板。在一些实施例中,隔膜至少部分形成微流体通道的内表面,例如,微流体通道的底板,子空间(例如,第一子空间和/或第二子空间和/或第三子空间)。在一些实施例中,隔膜至少部分形成细胞培养腔室的内表面,例如,底板。在一些实施例中,隔膜至少部分形成应变腔室的内表面,例如,底板。在一些实施例中,隔膜与微流体设备的盖子中设置的入口孔基本对齐。

[0110] 在一些实施例中,基底包括两个亚层,这两个亚层之间夹有弹性体片。在这些实施例中,基底的两个亚层具有共对齐的孔,其中,弹性体完全延伸穿过孔从而形成隔膜。在其他实施例中,形成隔膜的弹性体片与孔的尺寸类似并且使用诸如粘合剂、夹子、表面拉伸、共价结合、锚定、模塑之类的标准结合技术或其他制造技术将形成隔膜的弹性体片粘附至基底的上表面,基底的下表面或孔的内侧壁。

[0111] 隔膜可以是生物相容性隔膜,其是指隔膜由生物相容性的并且适于细胞培养目的弹性体形成。本领域技术人员知晓满足采用何种要求的材料会被认为是生物相容性的并且适用于细胞培养,但是生物相容性的实例可包括良好的亲细胞性、低气体透过性、低细胞毒性、化学惰性、低过滤、低自发荧光。

[0112] 隔膜可包括选自如下材料的弹性体:聚异戊二烯,聚丁二烯,氯丁二烯,丁基橡胶,苯乙烯-丁二烯,腈类,乙烯丙烯,乙烯丙烯二烯,表氯醇,聚丙烯酸橡胶,硅树脂,聚二甲基硅氧烷,氟硅橡胶,氟代弹性体,全氟弹性体,聚醚嵌段酰胺,氯磺化聚乙烯,乙烯-醋酸乙烯酯,聚氨酯,聚硫化物,聚偏氟乙烯(PVDF),超低密度聚乙烯(ULDPE),乙烯醇(EVOH)。商售弹性体的实例包括:Viton®, Tecnoflon®, Fluorel®, Aflas®, Dai-ElTM, Tecnoflon®, Kalrez®, Chemraz®,和Perlast®。本领域技术人员将会知晓可逆形变的弹性材料可用作隔膜。

[0113] 在一些实施例中,隔膜是透明的或者是光学清澈的,并且优选地具有小于1mm的厚度,更优选地具有小于250μm的厚度,更优选地具有小于100μm的厚度。

[0114] 在一些实施例中,隔膜是包含一个或多个电极、传感器、探针、用于监控隔膜移动的参考标志物、铁磁颗粒,或用于促进细胞粘附至隔膜表面的粘附分子或抗体的功能化的隔膜。

[0115] 以这种方式使隔膜功能化能够通过实验来监测设置在隔膜上的细胞发出的机械

应变,并且通过监控相对于所应用的刺激作用力的形变程度来控制隔膜的外部刺激。

[0116] 隔膜的形状和/或基底上隔膜延伸穿过其中的孔不限于任何特定的形状,但是可以是例如,对应于圆形、椭圆形,矩形,圆角矩形,狗骨形或星形。

[0117] 隔膜的尺寸通常为1mm至2mm,用于384孔板排布。然而,较大的隔膜对于一些应用而言可能是有利的,尤其是例如与98孔微量滴定板联合使用。在后一情况下,隔膜为2mm至4mm或者更大可能是有利的。

[0118] 毛细管压力屏障

[0119] 微流体设备的微流体网络可包括毛细管压力屏障。

[0120] 在一些实施例中,毛细管压力屏障与盖子中的孔基本对齐。在一些实施例中,毛细管压力屏障将微流体通道分隔为第一子空间和第二子空间。在一些实施例中,毛细管压力屏障与隔膜联合至少部分界定微流体通道的子空间。

[0121] 毛细管压力屏障的功能和形式先前已经进行了描述,例如,在WO2014/038943A1中进行了描述。通过下文描述的示例性的实施方式可以清楚地看出,毛细管压力屏障(本文中也称为液滴滞留结构)不应当被理解为例如可被包含一个或多个细胞或细胞聚集体的液滴填充的壁或腔室,而是应当理解为其由如下结构构成或包含如下结构,该结构确保了这种液滴不会因为表面张力而扩散。这个概念称为弯液面固定。这样,可实现将包含一个或多个细胞或细胞聚集体的液滴稳定地限制在设备的微流体通道的子空间中。在一个实施例中,毛细管压力屏障可被称为限制相位,其被配置成在正常使用细胞培养设备的过程中或使用第一液体初始填充细胞培养设备的过程中不会发生溢出。液滴的限制特性将在下文中在描述本发明的方法时进行描述。

[0122] 在一个实施例中,毛细管压力屏障包括从微流体通道的内表面突出的材料边缘或材料脊或微流体通道的内表面中的凹槽,或者由其构成。边缘或脊的侧壁与边缘或脊的顶部呈α角度,该α角度优选地尽可能的大。为了提供良好的屏障,α角度应当大于70°,通常为约90°。脊的侧壁和其上设置有毛细管压力屏障的微流体通道的内表面之间的角度α也是如此。对形成为凹槽的毛细管压力屏障也有类似的要求。

[0123] 毛细管压力屏障的可选形式是对微流体通道的内表面具有不同润湿性的材料区域,该区域由于毛细管作用力/表面张力发挥停止扩散的作用。在一个实施例中,微流体通道的内表面包括亲水性材料并且毛细管压力屏障是疏水区域或者是亲水性较低的材料区域。在一个实施例中,微流体通道的内表面包括疏水材料并且毛细管压力屏障是亲水性区域或者疏水性较低的材料区域。

[0124] 因此,在本发明的特定实施方式中,毛细管压力屏障选自:边缘或脊,凹槽,孔或材料的疏水衬里或者其组合。在其他实施方式中,毛细管压力屏障可由微流体通道的拓宽或选定的间隔处的柱状物来形成,毛细管压力屏障的排布界定了待由凝胶占据的第一子空间或区域。在一个实施例中,柱状物延伸微流体通道的整个高度。

[0125] 由于毛细管压力屏障的存在,液体不会流动超过毛细管压力屏障并且能够在微流体通道中形成稳定限制的体积,例如,第一、第二或第三子空间中的一个或多个,这些子空间中的任何一个可被称为或充当应变腔室或细胞培养腔室。

[0126] 毛细管压力屏障可与覆盖层中的孔基本对齐,从而限制微流体网络中的流体液滴的扩散。在一个实施例中,毛细管压力屏障位于覆盖层底面上,基本靠近孔。在一个实施例

中,毛细管压力屏障至少部分由孔本身形成。

[0127] 在一个实施例中,毛细管压力屏障设置在微流体通道的内表面,面向盖子中的孔。在更加具体的实施方式中,毛细管压力屏障设置在微流体层的基底上或微流体通道的内表面上,基本与盖子中的孔相对或面向盖子中的孔。在一个实施例中,毛细管压力屏障如先前所描述的那样存在,从而将液滴限定在与盖子的孔对齐的微流体层的子空间中。

[0128] 在一个实施例中,毛细管压力屏障至少部分界定了微流体通道的第一子空间的表面(例如,底板),该第一子空间也可被称为细胞培养腔室或应变腔室。毛细管压力屏障被配置为将液体限定至微流体通道的第一子空间。在一个实施例中,毛细管压力屏障包括封闭的几何结构。在一个实施例中,毛细管压力屏障与覆盖层的孔是同轴的。

[0129] 在一个实施例中,由毛细管压力屏障的外周界定的直径或面积大于由盖子中的孔的外周界定的直径或面积,换言之,毛细管压力屏障的周长大于孔的周长。在另一实施例中,由孔的外周界定的直径或面积大于毛细管压力屏障的外周界定的直径或面积,换言之,孔的周长大于毛细管压力屏障的周长。不论何种形状,在优选的实施方式中,毛细管压力屏障描绘了引入微流体通道中的包括一个或多个细胞或细胞聚集体的液滴或凝胶组合物与微流体通道的基底的接触区域的轮廓(即,包括一个或多个细胞或细胞聚集体的液滴与微流体通道的基底的接触区域的外周)。

[0130] 在一个实施例中,毛细管压力屏障为基本线性的毛细管压力屏障,其跨过微流体通道的整个宽度并且其每个端部与微流体通道的侧壁相交。

[0131] 作为微流体网络的一部分,毛细管压力屏障将网络分隔为至少两个子空间。

[0132] 第二毛细管压力屏障

[0133] 在一些实施例中,设备的微流体网络设置有第二毛细管压力屏障,其形式和功能基本如上文所述的那样。为了避免混淆,当设备中存在第二毛细管压力屏障时,在提到“毛细管压力屏障”时其被理解为“第一毛细管压力屏障”。

[0134] 在一些实施例中,第二毛细管压力屏障与覆盖层中的孔基本对齐,从而限制微流体网络中液滴的扩散。在一个实施例中,第二毛细管压力屏障位于覆盖层的底面上,基本靠近孔。在一个实施例中,第二毛细管压力屏障至少部分由孔本身形成。

[0135] 在一个实施例中,第二毛细管压力屏障设置在微流体通道的内表面,面向盖子中的孔。在更加具体的实施方式中,第二毛细管压力屏障位于微流体层的基底上或微流体通道的内表面上,基本相对于或面向孔。在一个实施例中,第二毛细管压力屏障如前文所定义的那样相对于孔存在,从而将液滴限制在微流体层的与孔对齐的区域。

[0136] 在一个实施例中,第二毛细管压力屏障与第一毛细管压力屏障联合至少部分界定微流体层的基底上的,微流体通道的基底上的和/或隔膜上的应变腔室或细胞培养腔室的表面。第二毛细管压力屏障联合第一毛细管压力屏障被配置为将液体限制于包括应变腔室和/或细胞培养腔室的第一子空间。在一个实施例中,第二毛细管压力屏障包括封闭的几何结构。在一个实施例中,第二毛细管压力屏障与覆盖层的孔和/或第一毛细管压力屏障同轴。在一个实施例中,由第二毛细管压力屏障的外周界定的直径或面积大于由孔的外周和/或第一毛细管压力屏障的外周界定的直径或面积,换言之,第二毛细管压力屏障的周长大于第一毛细管压力屏障和/或孔。在一个实施例中,第二毛细管压力屏障与第一毛细管压力屏障同轴并且位于第一毛细管压力屏障的外周内。在另一实施例中,由孔的外周界定的直

径或面积大于第二毛细管压力的外周界定的直径或面积,换言之,孔的外周大于第二毛细管压力屏障的外周。无论何种形状,在优选的实施方式中,第二毛细管压力屏障描绘了包括引入至应变腔室的一个或多个细胞或细胞聚集体的液滴或凝胶组合物与应变腔室的基底的接触区域,即,包括一个或多个细胞或细胞聚集体的液滴与应变腔室的基底的接触区域的外周。

[0137] 在一个实施例中,第二毛细管压力屏障是基本线性的毛细管压力屏障,其跨过微流体通道的整个宽度并且其每个端部与微流体通道的侧壁相交。在该实施例中,第一和第二毛细管压力屏障联合与其相交的壁可界定与覆盖层的孔对齐的区域并且该区域还可与覆盖层的孔同轴。在该实施例中,第一毛细管压力屏障可被认为将微流体网络分隔为包括应变腔室或细胞培养腔室的第一子空间和包括微流体通道的第二子空间,其中,第二毛细管压力屏障将微流体网络分隔为包括细胞培养腔室或应变腔室的第一子空间和包括第二微流体通道的第三子空间。

[0138] 作为微流体网络的一部分,第二毛细管压力屏障将网络分隔为至少两个子空间,第一个为第一子空间,其是指上文所述的包括应变腔室或细胞培养腔室的子空间,以及第三子空间。在一个实施例中,第三子空间包括从第一子空间中分离出来的(即不包括在第一子空间内的)微流体通道的一部分。在一个实施例中,第三子空间被完全包括在第一子空间内,即,第一和第二毛细管压力屏障均为封闭的几何结构并且第二毛细管压力屏障被第一毛细管压力屏障完全包围。

[0139] 在一些实施例中,第一和第二毛细管压力屏障均设置在微流体通道的基底或底板上,或者位于微流体通道的上表面或顶面上。在一些实施例中,第一毛细管压力屏障界定了微流体通道与孔对齐的第一子空间。在一些实施例中,第一和第二毛细管压力屏障界定了微流体通道的第二子空间,其与第一子空间和孔同轴并且封闭了第一子空间。在一些实施例中,第一和第二毛细管压力屏障是封闭的几何结构(例如,圆形)并且第二毛细管压力屏障包围第一毛细管压力屏障。在一些实施例中,第一毛细管压力屏障包括第一对线性毛细管压力屏障,其设置在孔的相对侧并且延伸至相对的内表面以界定第一子空间,第二毛细管压力屏障包括第二对线性毛细管压力屏障,其设置在孔的相对侧,延伸至相对的内表面并且与第一毛细管压力屏障间隔开且位于第一毛细管压力屏障的外部,从而界定第二子空间和第三子空间。在这些实施例中,外部组织样品(例如组织切片)或类器官可放置在固定凝胶或ECM内产生的且由固定凝胶或ECM产生的腔室中,因为样品平面与血管化床是同一平面,因此,更加易于血管化(一旦凝胶已经被血管化)。对于整个体系的显影而言,这种结构还能够更好地定位组织,因为所有元件都位于相同的聚焦平面。

[0140] 储液器

[0141] 在一些实施例中,微流体网络包括与进入微流体通道的培养基流体连通的储液器或井。所述储液器可以保存一定体积的液体,例如培养基。在典型的实施方式中,储液器能够保存比微流体通道所保存的流体体积或可被微流体通道保存的流体体积更大的流体体积。所述储液器可以是与如下孔相邻的井,该孔与设置在微流体层的顶部的无底微量滴定板上的细胞培养腔室的入口孔对齐。在其他实施例中,储液器可以是位于相同微量滴定板上的井,但是在空间上远离应变腔室的孔。应当理解的是,储液器与应变腔室的孔的靠近程度并不是设备运行的关键,只要这两者通过微流体层流体连通即可。

[0142] 在一些实施例中,微流体网络包括多于一个,例如两个或多个,与微流体层流体连通并且与细胞培养腔室或应变腔室以及微流体网络中存在的任何其他储液器流体连通的储液器。每个储液器可酌情通过可称为入口或出口的微流体层的覆盖层中的孔与微流体层流体连通。在微流体网络中存在至少两个储液器的实施方式中,第一储液器可用于引导液体,例如将培养基引入微流体网络中,同时,第二储液器可充当通风口或用于接受执行本发明的方法的过程中的液体的溢流腔室。

[0143] 在一些实施例中,设备的微流体网络还包含生物材料或生物模拟材料,其包括如下成分中的一个或多个:

[0144] a.设置在例如第一子空间中的凝胶,细胞外基质或支架;

[0145] b.例如形成导管或血管的衬于微流体通道和/或凝胶的上皮细胞或内皮细胞;

[0146] c.位于凝胶、细胞外基质或支架的内部、位于凝胶、细胞外基质或支架上的或者抵靠凝胶、细胞外基质或支架的上皮细胞或内皮细胞,优选地,其形成内腔结构,更优选地形成血管床;

[0147] d.位于凝胶、细胞外基质或支架内部的、位于凝胶、细胞外基质或支架上的,或者抵靠凝胶、细胞外基质或支架的基质细胞;

[0148] e.位于凝胶、细胞外基质或支架内部的、位于凝胶、细胞外基质或支架上的,或者抵靠凝胶、细胞外基质或支架的肌肉细胞;

[0149] f.选自多能细胞、中枢神经细胞、外周神经细胞、免疫细胞、泌尿细胞、呼吸细胞、生殖细胞(男性和女性)、胃肠道细胞、内分泌细胞、皮肤细胞、肌肉骨骼细胞、心血管细胞和乳腺细胞中的一种或多种类型的细胞。

[0150] 因为细胞的存在,这些设备还可被认为是分析平板,例如以血管网络的形式以及设置在细胞外基质的顶部表面的任选的生物组织的形式,因此易于在本文所述的分析或方法中使用。如通过本文所公开的内容可以理解的,这些设备的产品可使用下文所述的任何方法来识别。在一个实施例中,内皮细胞芽延伸至细胞外基质凝胶中,形成血管床。任选地,这些细胞芽是血管生成或血管发生所产生的微血管。

[0151] 上述不同细胞类型中的任何一种或多种形式的生物组织可包括或可衍生自健康组织或患病的组织,并且可获自或衍生自患者。形成血管网络的内皮细胞可获自或衍生自患者,例如获得了生物组织或从其衍生得到了生物组织的相同的患者。在一个实施例中,内皮细胞包括血管自然发展的内皮细胞(例如Nature Protocols 7,1709-1715(2012)中所描述的)或者衍生自干细胞的内皮细胞,包括但不限于诱导多能干细胞。

[0152] 方法

[0153] 在一个实施例中,本文提供一种评估由细胞诱导的机械应变的方法,其包括:

[0154] 将一种或多种类型的细胞或细胞聚集体引入至本文所述的微流体设备的微流体网络;

[0155] 任选地,培养一种或多种类型的细胞或细胞聚集体;以及

[0156] 监控隔膜的形变,该监控采用设置于隔膜上或可操作地与隔膜连接的一个或多个电极、传感器、探针、用于监控隔膜移动的参比标志物、铁磁颗粒或抗体。

[0157] 在一个实施例中,本文提供一种使一种或多种类型的细胞或细胞聚集体经历机械应变的方法,即,在一种或多种类型的细胞或细胞聚集体中诱导机械应变的方法,其包括:

[0158] 将一种或多种类型的细胞或细胞聚集体引入至第一方面的微流体设备的微流体网络;

[0159] 任选地,培养一种或多种类型的细胞或细胞聚集体;以及

[0160] 通过向隔膜施加正向压力或负向压力使所述一种或多种类型的细胞或细胞聚集体经历机械应变。

[0161] 在一些实施例中,本文所述的方法包括:

[0162] 向微流体网络引入一定体积的凝胶或凝胶前体;

[0163] 使得所述一定体积的凝胶或凝胶前体固化或凝胶化以形成固化的凝胶;

[0164] 向微流体网络加载流体;以及

[0165] 培养一种或多种类型的细胞或细胞聚集体。

[0166] 在一些实施例中,本文所述的方法可包括:

[0167] 向第一子空间引入一定体积的凝胶或凝胶前体并且由毛细管压力屏障限制所述一定体积的凝胶或凝胶前体;

[0168] 使得所述一定体积的凝胶或凝胶前体固化或凝胶化以形成固化的凝胶;

[0169] 向微流体网络加载流体,以及

[0170] 培养一种或多种类型的细胞或细胞聚集体。

[0171] 在一些实施例中,所述一定体积的凝胶或凝胶前体可以是单个液滴或液滴大小的凝胶或凝胶前体。

[0172] 在一些实施例中,在向隔膜施加压力之后,监测到对机械应变的细胞响应。在一些实施例中,细胞响应可来自于凝胶液滴的上表面上形成的单层细胞或来自于凝胶内部形成的血管床。在一些实施例中,细胞响应可来自于包含在微流体设备的微流体通道内的内腔细胞组分。在一些实施例中,细胞响应可来自于隔膜表面上形成的内腔细胞组分。

[0173] 细胞响应可以本领域已知的任何方式进行监测。方法可包括监测pH值的一种或多种变化,监测分泌的因子(例如,代谢物、生长因子、细胞因子)的变化,对细胞和/组织进行采样并且监测特定蛋白质的上调或下调,或者监测反应性氧物质的水平。可选地,或者此外,细胞或组织响应可通过肉眼进行监测(使用显微镜),例如,基于免疫组化染色或其他杂交形式的染色。

[0174] 在一些实施例中,一种或多种类型的细胞或细胞聚集体可选自:用于衬于微流体通道的、可能形成导管或血管的上皮细胞或内皮细胞,位于凝胶、细胞外基质或支架内部的上皮细胞或内皮细胞(其优选地形成内腔结构,更优选地形成血管床),位于凝胶、细胞外基质或支架内或上的基质细胞,位于凝胶、细胞外基质或支架内或上的肌肉细胞,选自多能细胞、中枢神经细胞、外周神经细胞、免疫细胞、泌尿细胞、呼吸细胞、生殖细胞(男性和女性)、胃肠道细胞、内分泌细胞、皮肤细胞、肌肉骨骼细胞、心血管细胞和乳腺细胞类型中的一种或多种的细胞类型。

[0175] 凝胶或凝胶前体包括本领域已知的适用于细胞培养的任何凝胶。用于细胞培养的凝胶可由一系列大量天然材料和合成材料形成,其提供广谱机械特性和化学特性。用于凝胶合成的材料和方法的综述请参见Lee和Mooney的文章(Chem Rev 2001;101(7):1869-1880)。当凝胶由天然材料形成时,合适的凝胶促进细胞功能,当凝胶由合成材料形成时,合适的凝胶允许启动细胞功能。用于细胞培养的天然凝胶通常由蛋白质和ECM成分(例如,胶

原蛋白、纤维蛋白、透明质酸或基质胶)以及衍生自其他生物来源(例如,壳聚糖、海藻酸盐或纤丝)的材料形成。因为它们衍生自天然来源,所以这些凝胶本身固有生物相容性和生物活性。许可的合成凝胶可由纯的非天然分子(例如,聚乙二醇(PEG),聚乙烯醇和聚(2-羟基甲基丙烯酸乙酯))形成。PEG凝胶已经显示出维持包封的细胞的活力并且随着其降解允许ECM沉积,这说明合成的凝胶可充当3D细胞培养平台,甚至是在没有整合素结合的配体的条件下。这些惰性凝胶是高度可重复的,能够易于调节其机械性能,并且其是易于加工和生产的。

[0176] 凝胶前体可被提供至微流体细胞培养设备,例如上文所述的设备的应变腔室。在提供了凝胶之后,其被凝胶化,随后引入另一流体。合适的凝胶(凝胶前体)是本领域熟知的。例如,凝胶前体可以是水凝胶,并且其通常是细胞外基质(ECM)凝胶。ECM例如可包括胶原蛋白、纤维蛋白原、纤连蛋白和/或基底膜提取物(例如,基质胶或合成的凝胶)。例如,凝胶前体可被引入至带有吸液管的应变腔室。

[0177] 凝胶或凝胶前体可包括基底膜提取物,人或动物组织或者细胞培养衍生的细胞外基质,动物组织衍生的细胞外基质,合成的细胞外基质,水凝胶,胶原蛋白,软琼脂,蛋白和诸如基质胶之类的商售产品。

[0178] 包括基底薄层的基底膜是薄的细胞外基质,其是体内上皮细胞的基础并且是由细胞外基质构成的这样一种蛋白质和蛋白多糖。在一个实施例中,基底膜由IV型胶原蛋白、层粘连蛋白、巢蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白多糖以及多种其他微量成分构成(Quaranta et al,Curr.Opin.Cell Biol.6,674-681,1994)。这些成分和整个基底膜均为生物活性,它们促进细胞粘附,迁移,并且在许多情况下促进细胞生长和分化。基于基底膜的凝胶的实例称为基质胶(Matrigel,US 4829000)。这种材料在体外具有非常高的生物活性,作为上皮细胞的底层。

[0179] 在本发明的方法中使用的许多不同的合适的凝胶是商售的,包括但不限于包括如下成分的那些凝胶:基质胶rgf,BME1,BME1 rgf,BME2,BME2 rgf,BME3(所有基质胶变体),I型胶原蛋白,IV型胶原蛋白,I型胶原蛋白和IV型胶原蛋白的混合物,或者I型、IV型胶原蛋白与II型和III型胶原蛋白的混合物,puramatrix,水凝胶,Cell-Tak™,I型胶原蛋白,IV型胶原蛋白,Matrigel®基质,纤连蛋白,明胶,层粘连蛋白,骨桥蛋白,聚赖氨酸(PDL,PLL),PDL/LM和PLO/LM,PuraMatrix®或玻连蛋白。在一种优选的实施方式中,基质成分是商售的Corning® MATRIGEL®基质(Corning,NY 14831,USA)。

[0180] 凝胶或凝胶前体被引入至本文所述的设备并且由微流体设备中的毛细胞压力屏障限制,例如,限制至包括应变腔室的第一子空间中,该应变腔室具有作为其基底的设备隔膜,随后使得凝胶或凝胶前体进行凝胶化或允许凝胶或凝胶前体进行凝胶化。

[0181] 在一个实施例中,足够体积的液滴被引入,这样,固化的凝胶基本上整体均位于微流体层内的应变腔室的一部分中。在一个实施例中,凝胶化的液滴的体积为不会完全阻挡微流体覆盖层中的孔的体积,其中,孔的未被阻挡的区域或开放的区域用作通风口。因此,通风口通常包括覆盖层中的开口或孔,其在通过入口加载微流体通道时允许空气排出。在一个实施例中,足够体积的液滴被引入,这样,液滴被毛细管压力屏障限制并且大部分液体体积被包含在位于微流体层外部的应变腔室的一部分中,例如,其中,大部分液滴体积包含

在顶层的孔内。

[0182] 在一个实施例中,凝胶或凝胶前体预先加载有目标细胞,即,细胞存在于凝胶或凝胶前体的液滴中,随后将其引入微流体细胞培养设备中并且随后进行凝胶化。在另一实施例中,在将凝胶或凝胶前体的液滴引入微流体细胞培养设备(例如本文所述的设备的应变腔室)中之后,将细胞插入部分或完全固化的液滴中。因此,可选的方法包括将目标细胞接种在细胞培养凝胶的固化液滴中。在另一实施例中,将凝胶或凝胶前体引入至微流体细胞培养设备中,并随后进行凝胶化,将细胞混合物,组织或细胞聚集体放置于凝胶的顶部或放置于微流体通道的凝胶附近的区域。

[0183] 固化的凝胶内、固化的凝胶上或固化的凝胶旁边的细胞混合物、组织或细胞聚集体可包括上皮细胞或内皮细胞,基质细胞,肌肉细胞,选自多能细胞和中枢神经细胞,外周神经细胞,免疫细胞,泌尿细胞,呼吸细胞,生殖细胞(男性和女性),胃肠道细胞,内分泌细胞,皮肤细胞,肌肉骨骼细胞,心血管细胞和乳腺细胞类型中的一种或多种其他细胞类型。

[0184] 在一个实施例中,存在于凝胶或凝胶前体的液滴中或顶部上的至少一种类型的细胞或细胞聚集体包括上皮细胞,可能存在的其他细胞类型和细胞外基质,所述上皮细胞在培养过程中可基于培养基的组成而增殖和/或分化。因此,在使用水性培养基(优选地生长培养基)或使用凝胶(凝胶前体)将上皮细胞引入至微流体网络中之后,上皮细胞会进行增殖和/或分化。一种或多种类型的细胞或细胞聚集体(例如上皮细胞)的培养通过将培养基引入至微流体通道中并在合适的条件下进行培养而进行,这样即可对细胞进行培养。为了避免混淆,术语“液滴”的使用应当被认为是指引入本文所述的细胞培养设备中并随后被限制在细胞培养设备中的凝胶的体积。

[0185] 在一个实施例中,在微流体网络的第一子空间(例如,应变腔室)中的凝胶前体凝胶化之后,将一种或多种细胞或者细胞聚集体引入至微流体网络的第二子空间中,例如,微流体通道的临近凝胶的区域和毛细管压力屏障。一种或多种细胞或细胞聚集体可以是上皮细胞或内皮细胞。总体而言,已知内皮细胞是衬于从心脏至最小淋巴毛细管的整个循环系统的内表面的细胞。在与血液接触时,这些细胞被称为血管内皮细胞,并且在与淋巴系统接触时,这些细胞被称为淋巴内皮细胞。在特定的实施方式中,培养方法包括将内皮细胞引入至微流体网络的微流体通道中并且使所述内皮细胞衬于微流体通道(即,使内皮细胞形成微流体通道内的血管)的步骤。细胞或细胞聚集体可使用任何合适的培养基引入至微流体网络。

[0186] 将内皮细胞在合适的条件下(例如适于促进血管生成的条件)引入至微流体通道不仅仅可以形成衬于为炉体通道的内表面的血管组织,在一些情况下变得可渗透的细胞外基质凝胶的内表面还可以生长出新的微血管。适于促进血管生成的条件包括添加促血管生成的化合物,例如,成纤维细胞生长因子(FGF),血管内皮生长因子(VEGF),血管生成素-1(Ang1),血管生成素-2(Ang2),佛波醇十四烷酰-13-乙酸酯(PMA),鞘氨醇-1-磷酸酯(S1P),IGFBP-2,肝细胞生长因子(HGF),脯氨酰氢化酶抑制剂(PHi),单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和ephrin等等。

[0187] 当以梯度施加一种或多种促血管生成化合物时,所述一种或多种促血管生成化合物可被认为充当化学引诱物,其促进朝向限制的凝胶液滴和位于限制的凝胶液滴内的定向血管生成。以这种方式,在微流体层和凝胶内刺激内皮细胞形成血管组织层,该血管组织层

随后经历透化作用并导致新的微血管的生长。一种或多种促血管生长化合物可被添加至凝胶液滴或凝胶前体液滴中,随后将凝胶液滴或凝胶前体液滴引入至微流体网络,或者一种或多种促血管生长化合物可在凝胶形成之后添加,例如加至凝胶的顶部表面。在另一实施例中,一种或多种促血管生成化合物可通过微流体通道的另一入口添加至微流体网络中,例如,在引入培养基的入口的下游的入口和/或应变腔室的下游的入口。

[0188] 在一些实施例中,在微流体层和凝胶中形成血管组织之后,本发明的方法还可包括将一种或多种类型的细胞(优选地包括至少一种类型的上皮细胞)通过入口孔引入至微流体网络的第三子空间,并且使一种或多种类型的细胞形成单层或细胞聚集体。例如,一种或多种类型的细胞可在限制在第一子空间的凝胶的顶部形成单层细胞。

[0189] 在一种实施方式中,一种或多种细胞或细胞聚集体完全覆盖至少部分固化的凝胶的顶部表面,从而在至少部分固化的凝胶的顶部表面上形成组织屏障层。该屏障层可包括单层细胞或者多层细胞或细胞聚集体。在一种实施方式中,可对单层细胞或多层细胞进行培养以使得细胞进行增殖和/或分化,随后至少一种微血管进行血管生成进入至少部分固化的凝胶,或者在至少一种微血管进行血管生成进入至少部分固化的凝胶之后,可对单层细胞或多层细胞进行培养以使得细胞进行增殖和/或分化。平坦的层状组织的实例包括皮肤组织(包括例如角化细胞,脂肪组织和成纤维细胞),肠上皮细胞以及诸如肺和视网膜之类的其他上皮组织。

[0190] 培养基或分化培养基可添加至上文所述的微流体通道中,并且建立通过血管网络的流体流也可如上所述的那样实现,从而允许细胞增殖和/或分化。类似地,流体的组成也可如上所述的那样进行控制。因此,由本文所述的方法建立的血管化的可灌注的(perfusable)网络允许代谢物、营养物和氧在设备的微流体通道内的微血管中的流体和固化凝胶的顶部上的细胞或细胞聚集体之间进行自由交换。

[0191] 如先前已经解释的,使用毛细管压力屏障能够形成稳定限制体积的凝胶,例如,在微流体网络的子空间中,这样,在无需替换凝胶或其内含物的条件下可添加第二流体。因此,本发明的设备被配置成与上文所述的其他细胞在空间上受控的共培养并且提供控制周围培养基的组成的方式。这样,在本发明的方法中,加载至储液器(也称为井)中的流体是任何细胞培养基,检测溶液,缓冲液,其他水凝胶等等,并且可任选地包括细胞或细胞聚集体。

[0192] 通过控制引入至储液器中的组分,本发明的细胞培养设备能够实施不同模式的细胞培养。例如,引入至储液器或井中的流体的组成可进行改变。这种交换可以是通过在储液器中的一个中引入新的成分并且同时从相同的微流体网络中的另一储液器中除去流体进行梯度交换,直至完全进行交换。这种交换可以是不连续的,通过从储液器中抽出流体并用新的组合物填充该储液器。储液器中的流体体积比微流体通道中的流体体积大得多,并且储液器之间的流平几乎是瞬间发生的,从而确保新的流体冲刷微流体网络,无需在操作过程中排空微流体通道网络。

[0193] 在一个实施例中,在设备中第二毛细胞压力屏障的存在甚至允许层状凝胶组合物的形成。在该实施例中,第一毛细管压力屏障(例如圆形毛细管压力屏障)将包括第一凝胶或凝胶前体的液体组合物固定为微流体网络的基底层上(例如隔膜上)的静态液滴。在固定了该第一液体组合物之后,加载任选地包含细胞的第二凝胶或凝胶前体。该第二组合物将被第二毛细管压力屏障保持,该第二毛细管压力屏障是例如直径比第一毛细管压力屏障大

的圆形毛细管压力屏障并且其与第一毛细管压力屏障同轴且环绕第一毛细管压力屏障。通过这种配置,第二毛细管压力屏障防止所述第二组合物流入微流体通道中并且包封第一凝胶。两种毛细管压力屏障的存在相应地将微流体网络分隔为单独的空间并且赋予用户微流体网络空间配置的可能性。

[0194] 目前对方法的讨论已经描述了如何将细胞或细胞聚集体并入本文所述的微流体设备中。一旦设备已经加载了细胞或细胞聚集体并且对细胞进行了任何必需的培养,方法可包括使细胞经历机械应变和/或检测从细胞传出的机械应变的一种或多种步骤。

[0195] 使细胞经历机械应变的步骤可包括向隔膜施加正向压力或负向压力,在一个实施例中,向隔膜施加交替的正向压力和负向压力。施加压力将诱导隔膜向微流体通道内的形变(从隔膜的下部施加正向压力的情况)或诱导隔膜远离微流体通道进入基底层的形变(从隔膜的下部施加负向压力的情况)。在这些方法中,面向微流体通道的隔膜的表面可具有直接设置于其上的一种或多种细胞或细胞聚集体。此外或可选地,所述一种或多种细胞或细胞聚集体可设置在微流体通道的靠近隔膜的表面上,例如,衬于微流体通道的表面。所述一种或多种细胞或细胞聚集体还可设置在由微流体通道内的一个或多个毛细管压力屏障限制至隔膜表面的凝胶内或该凝胶上。所述一种或多种细胞或细胞聚集体通常设置在微流体网络内的位置,在该位置隔膜仍然可发生位移。可以知晓,来自于隔膜的细胞或细胞聚集体越多,所需要的位移就越大,从而在细胞上发挥作用。因此,在一个实施例中,一种或多种细胞或细胞聚集体存在于设置在面向微流体通道的隔膜表面上的凝胶内或该凝胶上。

[0196] 在本文所述的方法的一些实施例中,机械应变通过将隔膜以单一的循环模式或重复模式进行移动而随时间改变机械应变。也就是说,隔膜可以特定的节律或顺序多次发生位移。例如,隔膜可以类似呼吸的节律模式发生位移,从而在肺组织中重建机械应变。在另一实施例中,隔膜可以重建肠道组织的蠕动模式发生位移。

[0197] 使微流体设备中的隔膜发生位移或形变的方式是本领域已知的,并且已结合微流体设备在上文进行了讨论。在一些实施例中,设备可包括与微流体通道接触的多个隔膜。所述多个隔膜可配置成以预定的模式对多个隔膜中的一个或多个进行多次刺激而经过多次刺激循环过程使净流体移动通过微流体网络。

[0198] 在一些实施例中,隔膜位移的程度为使机械应变可施加于隔膜上表面存在的凝胶的上表面上的单层细胞的程度。如上文所述,机械应变可通过施加正向或负向空气压力而施加于这种单层细胞,或通过施加来自于机械启动器的作用力而施加于这种单层细胞。

[0199] 在本文所述的方法的一些实施例中,隔膜位移不是由外力刺激的,相反隔膜位移是由存在于微流体层中的一种或多种细胞或细胞聚集体诱导的或导致的,例如,存在于隔膜上的一种或多种细胞或细胞聚集体,例如隔膜上的凝胶内或凝胶上的一种或多种细胞或细胞聚集体或者隔膜上的ECM内的或其上的一种或多种细胞或细胞聚集体。一种或多种细胞或细胞聚集体还可直接设置在隔膜上,任选地,通过将细胞粘附分子涂覆于隔膜上而将一种或多种细胞或细胞聚集体直接设置在隔膜上。在这些实施例中,隔膜被一个或多个电极、传感器或用于检测隔膜移动的参比标志物有利地功能化。

[0200] 在一个实施例中,标志物印在隔膜的相同材料中,即,通过蚀刻,研磨或通过将标志物包括在形成膜的模具中。在另一实施例中,标志物、传感器或转换器可加至隔膜材料中,例如通过在制造过程中将其加至材料中。例如,磁珠可与制造隔膜的聚合物混合,随后

将其用于刺激或检测。可选地,线圈可嵌入聚合物中。在又一实施例中,通过材料的表面沉积(例如,溅射,等离子沉积,丝网印刷或其他形式的印刷或沉积)而将材料施加于隔膜上。这些工艺方法可用于由油墨,可用于监控偏移的金属或其他材料印刷标志物。

[0201] 分析平板

[0202] 本发明的进一步的方面提供一种分析平板,其包括本文所述的设备中的任何一种。在提到包括血管网络以及任选地还包括诸如单层细胞之类的生物成分的细胞培养设备时,也是指分析平板。

[0203] 在一个实施例中,本文提供一种分析平板,其包括本文所述的微流体设备以及由毛细管压力屏障限制至微流体通道的第一子空间的凝胶,其中,所述微流体网络包括存在于例如凝胶内或凝胶上和/或微流体通道内的一种或多种细胞或细胞聚集体。

[0204] 分析平板可包括由本文所述的方法培养的一种或多种细胞或细胞聚集体。在一个实施例中,分析平板的设备的微流体通道的至少一部分包括血管组织层,其包括延伸进入凝胶的内皮细胞。

[0205] 分析平板的尺寸可与标准ANSI/SLAS微量滴定板一致或与标准ANSI/SLAS微量滴定板相兼容。具体而言,分析平板的印迹尺寸或周长可与标准ANSI/SLAS微量滴定板一致。

[0206] 本文还描述了由本文所述的方法中的任何一种生产的分析平板或细胞培养设备。

[0207] 试剂盒

[0208] 本文公开的内容还提供了试剂盒以及使用本文所述的微流体设备和分析平板的制品。在一种实施方式中,试剂盒包括本文所述的设备或分析平板,以及用于诱导血管生成的一种或多种促血管生成化合物。在一些实施例中,试剂盒可包括本文所述的设备或分析平板以及如下物质中的一种或多种:凝胶,凝胶前体组合物或其他细胞外基质组合物,一种或多种细胞或细胞类型,生长培养基,以及包括一种或多种促血管生成化合物在内的一种或多种试剂组合物。

[0209] 细胞培养设备或试剂盒的分析平板优选地包括血管床,换言之,包括布置成接收待在细胞外基质凝胶的顶部表面上血管化的至少一种细胞的细胞外基质凝胶,以及衬于微流体通道的内表面的内皮细胞的血管网络。

[0210] 试剂盒还可包括包装材料和包括在包装材料内的标签或包装插页,所述标签或包装插页提供在细胞培养设备或分析平板中使用一种或多种促血管生成化合物诱导血管生成的说明。

[0211] 一种或多种促血管生成化合物可包括成纤维细胞生长因子(FGF),血管内皮生长因子(VEGF),血管生成素-1(Ang-1),血管生成素-2(Ang2),佛波醇十四烷酰-13-乙酸酯(PMA),鞘氨醇-1-磷酸酯(S1P),IGFBP-2,肝细胞生长因子(HGF),脯氨酰氢化酶抑制剂(PHi),单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和ephrin中的一种或多种。

[0212] 试剂盒还可包括配件组件,例如,包括合适的用于引入一种或多种促血管生成化合物的培养基和使用该培养基的说明书的第二容器。

[0213] 本发明将以举例说明的方式参考附图进行描述。

[0214] 微流体设备的第一实施例在图1至图3中示例性地显示。如图1所示,设备100通常包括基底101,微流体层中的微流体通道102以及盖子103(均以实线显示)。培养基入口104

存在于微流体层的覆盖层中。毛细管压力屏障105存在于设备的基底101上并且可通过盖子103中的孔107接近毛细管压力屏障。在该具体的实施例中,基底101上还设置有孔,隔膜106延伸穿过该孔。多孔无底平板形式的顶层108设置在覆盖层的顶部并且包括位于入口孔107和培养基入口104中的每一个的上方的孔109。

[0215] 如俯视图所示(图2),圆形毛细管压力屏障将微流体网络分为两个子空间。在该实施方式中,毛细管压力屏障的中央空间的一个子空间包括应变腔室或细胞培养腔室,并且由微流体通道102界定的第二子空间通向第一子空间并且围绕第一子空间。微流体通道102在图2中示例性地显示为围绕毛细管压力屏障的实线圆形,其中由虚线显示了孔107。

[0216] 彼此直接接触而没有任何诸如壁或膜之类的介入结构的两个子空间的形成是设备和分析平板的关键特征之一。此外,通过孔和微流体通道甚至能够控制和调节围绕凝胶的培养基,例如,在进行应变实验之前或在进行应变实验的过程中。图3提供了微流体网络的一部分的垂直横截面的放大图,其显示了基底上的毛细管压力屏障105和隔膜106。例如,毛细管压力屏障105的存在防止凝胶或凝胶前体在装载时填充了微流体通道,换言之,在使用过程中,凝胶或凝胶前体固定在毛细管压力屏障105上。图3还显示了将隔膜粘附至基底层的一种可能的结构,即,将隔膜固定至基底层的下表面。

[0217] 图2中的孔107在后续的图中也显示为圆形孔。然而,应当理解的是,孔可以具有任何形状,优选地为圆形和正方形。

[0218] 为了控制围绕由毛细管压力屏障界定的凝胶组合物的培养基组合物,还可存在微流体通道102的其他分支。一种这样的实施例在图4至图6中提供。在该实施方式中,中央应变腔室连接至交叉结构中的四个培养基入口104(参见图5),其中存在两个线性毛细管压力屏障105,其每一个部分界定了包括应变腔室的第一子空间。

[0219] 图7A至图7C显示了应变实验之前或应变实验过程中隔膜可存在的各种不同的状态。总体而言,隔膜以相对张紧的状态存在,如图7A所示,甚至在静止时隔膜以相对张紧的状态存在。图7B显示了张紧状态下的隔膜,在从隔膜下方施加负向压力(例如可使用真空泵施加该负向压力)之后其偏斜远离微流体通道102。然而,应当理解的是,从隔膜的上方施加正向压力也可实现相同的效果。图7C显示了可选的张紧状态下的隔膜,在从隔膜下方施加正向压力之后其可偏斜进入微流体通道102,例如,使用泵,诸如大头针或可膨胀的泡沫之类的机械启动器来施加正向压力。然而,应当理解的是,通过从隔膜上方施加负向压力也可实现相同的效果。

[0220] 在使用本文所述的设备的方法中的不同步骤在图8A至图8F中描述。在第一步骤中,引入凝胶或凝胶前体110的第一液滴,将其固定在毛细管压力屏障上并且使其固化(固化,凝胶化)。再者并且如上文所述,第一液体组合物通常包括凝胶或凝胶前体,例如,用于细胞培养的水凝胶(或其前体),并且包括本领域已知的且适用于本发明的目的的任何水凝胶。凝胶可任选地包括悬浮细胞。

[0221] 一旦凝胶液滴固化,微流体通道加载第二液体,由此将内皮细胞111引入至微流体通道(图8B)。这些可作为细胞培养基或生长培养基的成分而被引入,或者可顺序引入。在对由此接种的设备进行培养之后,基于第二液体(加载在微流体通道中的液体)的组成,内皮细胞114可血管化或衬于微流体通道的内表面,即,壁,基底和顶部,并且也可能在ECM凝胶表面。

[0222] 在进一步的步骤中,将包括促血管生成试剂添加至凝胶的顶部可允许或诱导在微流体通道内形成的血管发生血管生成(图8C),其中,凝胶液滴和/或其中形成的毛细血管的入侵形成了血管床。允许进行血管生成的培养条件是本领域技术人员已知的并且包括例如氧缺乏,机械刺激和使用诸如前文所述的促血管生成的蛋白质之类的促血管生成试剂的化学刺激。

[0223] 典型的喷动混合物(spouting mixture)包括37.5ng/ml至150ng/ml的VEGF,MCP-1,HGF,bFGF,PMA以及250nM至1000nM的S1P。可选的喷动混合物包括500nM的S1P,50ng/ml的VEGF,20ng/ml的FGF和20ng/ml的PMA。

[0224] 以这种方式,形成连接微流体通道的入口和出口的血管,其衬于通道的表面并且延伸进入凝胶。

[0225] 该方法的优选的结果是包括微血管的血管床的凝胶,所述微血管通过一个或多个微流体通道连接至较大的血管,通过所述微流体通道可施加生长培养基流、血清流或其他物质流。这样,使用本发明的设备能够共培养包括凝胶的微流体网络的第一限定子空间内的第一类型的细胞和包括微流体通道的第二子空间内的内皮细胞培养物,从而实现凝胶液滴内部或凝胶液滴顶部上存在的细胞聚集体的血管化模型,该血管化模型通过在微流体通道内部形成的内皮血管连接至储液器。

[0226] 为了实现血管床或血管化组织,不必须使用血管生成化合物的混合物。在产生血管床的可选的方法中,将组织放置于凝胶的顶部。组织自身分泌诱导血管生成的因子,这导致主血管的出芽以及血管床的形成或者甚至血管化的组织的形成。

[0227] 图8D显示了将细胞113添加至凝胶110顶部,随后细胞形成单层。细胞可以是任何类型,但是其通常为上皮细胞或内皮细胞,这取决于正在进行的应变实验。最后,图8E和图8F显示了应变实验过程中隔膜106的双向形变,这导致随后将应变施加于包括微血管的凝胶110的顶部的单层细胞114。

[0228] 图9A至图9F显示了图8A至图8F所示的方法的可选方法。在该可选的方法中,前两个步骤和最后三个步骤与图8的方法相同,唯一的不同之处在于(i)将细胞113加至凝胶110表面以及(ii)通过内皮细胞111使凝胶110血管化。

[0229] 图10A至图10C显示了微流体网络的可选结构的放大垂直横截面图。具体而言,图10A显示了其上延伸穿过了隔膜106的基底101内的孔,其中,毛细管压力屏障105位于孔的外部。在该特定实施方式中,隔膜106与入口孔107对齐,但是隔膜106的暴露的表面或可使用的表面比入口孔107的横截面窄,同时毛细管压力屏障105远离隔膜106并且位于入口孔107的外部。相反,在图10B的结构中,其上延伸穿过了隔膜106的孔的尺寸与入口孔107的尺寸基本相同,这样,隔膜的暴露的表面或可使用的表面的尺寸与入口孔107的横截面面积的尺寸基本相同,但是其中两个毛细管压力屏障105a,b位于盖子103的下面。最后,在图10C中,其上延伸穿过了隔膜106的孔大于入口孔107,这样,隔膜的暴露的表面或可使用的表面的面积大于入口孔107的横截面面积,其中,毛细管压力屏障105就在隔膜106旁边。总体而言,隔膜越大和/或孔越大,更多的上皮细胞可暴露于机械应变。相反,较小的隔膜将不会像较大的隔膜那样发生位移(施加相同的作用力),因此将会产生较小的位移和/或对应变组织产生较小的损伤,尤其是对围绕入口边缘的区域。应当理解的是,总体要求是使隔膜与入口孔基本对齐,以便于将材料引入设备。

[0230] 图11A和图11B分别显示了被毛细管压力屏障105a,b和图10B和图10A所示的微流体网络结构的孔107的边缘固定的凝胶或细胞外基质108。在这些结构中,凝胶没有被任何毛细管压力屏障固定,从而使凝胶以任何有意义的程度设置在隔膜上,相反,凝胶主要被固定在微流体通道内。在这些结构中,可将外部组织样本(例如组织切片)或类器官放置于固定的凝胶或ECM内产生的腔室内并且放置于由固定的凝胶或ECM产生的腔室内,并且,该外部组织样本(例如组织切片)或类器官在位于与血管床相同的平面时更加易于血管化(一旦凝胶被血管化)。该结果还能够更好地定位用于整体系统成像的组织,因为所有组分都处于相同的聚焦平面。

[0231] 图12和图13显示了在设备中使用的微流体网络的可选的结构的使用,具体而言,在该结构中盖子103上没有与隔膜对齐的孔。图12显示了测量细胞114产生的机械应变或细胞产生的移动(例如,肌肉细胞,成纤维细胞,心肌细胞的收缩)或者测量在脑细胞,骨细胞上诱导的压力或者其他生物组织的压缩的设置方式。图13显示了该结构的可选的使用方式,其中,细胞111能够在隔膜上形成带有腔室的结构,例如,围绕由毛细管压力屏障105固定的凝胶。细胞可包括形成血管的内皮细胞,形成肠道型内腔或肾小管型内腔的上皮细胞或者形成心房或心室型内腔的心肌细胞。因此,这种类型的设备能够监测或诱导由血管舒张/血管收缩,肠道蠕动,肾小管压缩,血管压缩和心肌细胞启动产生的机械应变或者模拟血管舒张/血管收缩,肠道蠕动,肾小管压缩,血管压缩和心肌细胞启动的机械应变,或者这种类型的设备真实地诱导上述这些活动。

[0232] 图14A和图14B显示了将隔膜固定至本文所述的微流体网络的基底或设备的基底的可选方式。图14A显示了夹在基底层的两个亚层101a,101b之间的隔膜106,而图14B显示了固定至基底层101的上表面的隔膜106。

[0233] 图15显示了根据本发明的多孔设备115的平面图,该多孔设备由本文所述的微流体网络的多孔结构构成。如图15所示,该设备优选地与ANSI/SLAS尺寸界定的微量滴定板的尺寸相兼容或以ANSI/SLAS尺寸界定的微量滴定板的尺寸为基础,图15显示了包含128个单独的微流体网络(例如图1所示的微流体网络)的这种平板的仰视图。在每个微流体网络的中央显示出了隔膜106。图16显示了图15的多孔结构的横截面,其中,在每个微流体网络中,每个隔膜均延伸跨过孔。图17显示了图16的多孔结构的可选结构,其中,单个弹性体片材延伸跨过设备115的整个宽度方向,由此,延伸跨过独立的微流体网络的各个孔。

[0234] 实施例

[0235] 下文将描述构建在设备中使用的基底层的方法。

[0236] 总体而言,基底层包括两层磨碎玻璃片材和柔性隔膜(例如,聚氨酯隔膜),其中,每一层磨碎玻璃片材具有多个直径为2mm的孔。所述隔膜位于两层玻璃片材之间并且玻璃片材对齐,从而使孔对齐。随后将这三层放置于4bar和95℃的高温和加压条件下。最终产品是用于微流体设备的基底层,该基底层由两片磨碎玻璃和层压的聚氨酯隔膜构成,该聚氨酯隔膜可提供对微流体网络的微流体通道的刺激。

[0237] 基底层可连接至包括10mm厚的聚碳酸酯片材和硅橡胶衬垫的歧管,其中,所述硅橡胶衬垫连接至加压供气来源。施加1bar的压力。在显微镜下进行观察和/或进行拍照确认被施加压力的隔膜均发生位移。

[0238] 上文的描述是为了教导本领域普通技术人员如何实施本发明,并无意细化在阅读

了本说明书之后明显知晓的所有改良和变化。然而,所有改良和变化均包括在由所附的权利要求书界定的本发明的范围内。

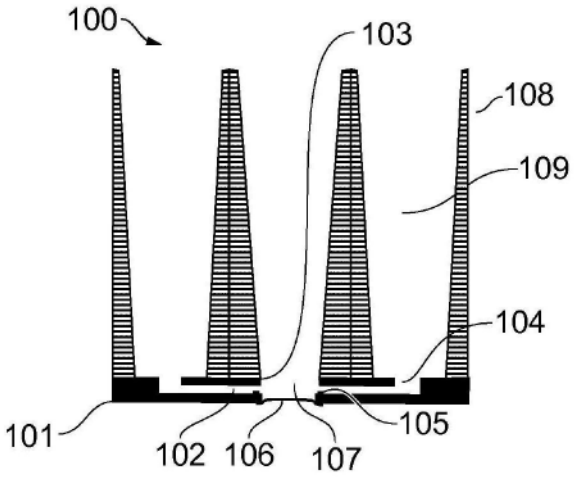

100
103
108
109
104
101
102
106
107
105

图1

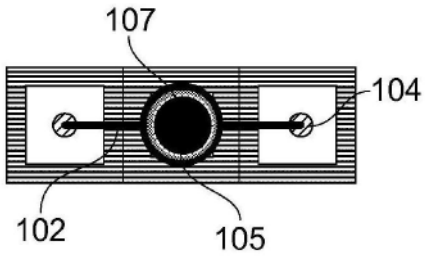

107
104
102
105

图2

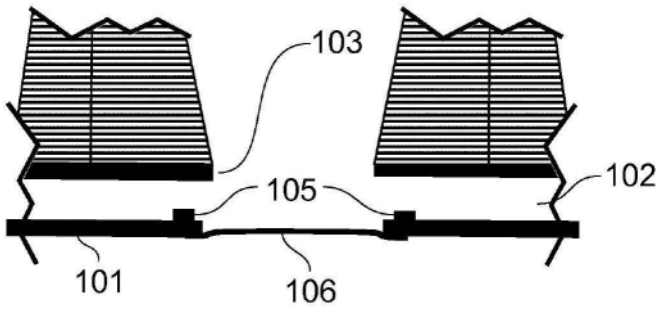

103
105
102
101
106

图3

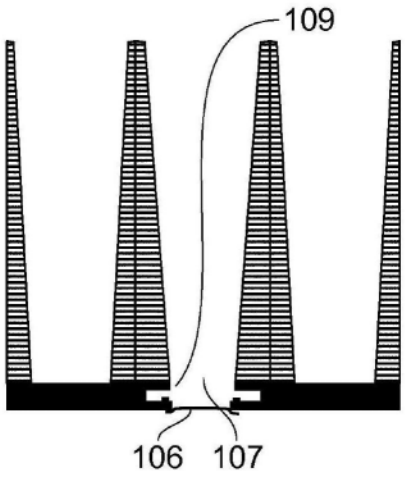


图4

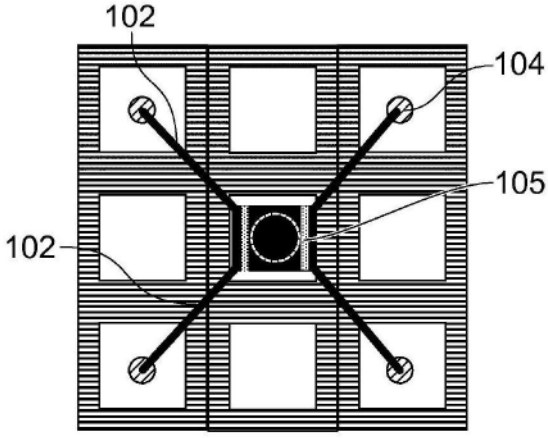


图5

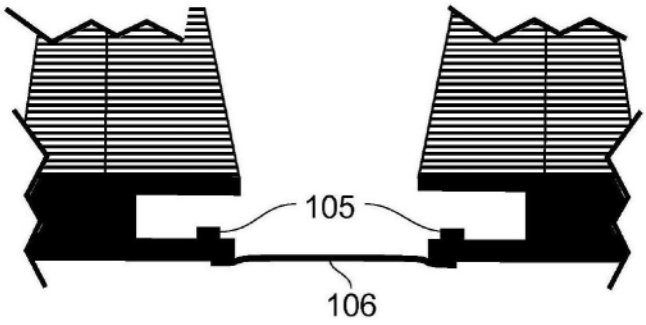


图6

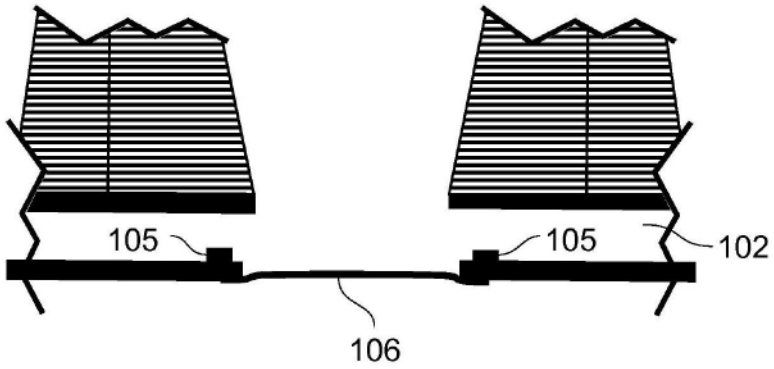


图7A

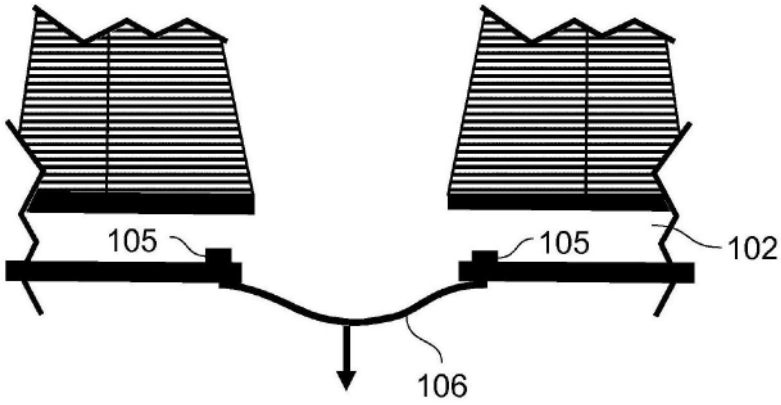


图7B

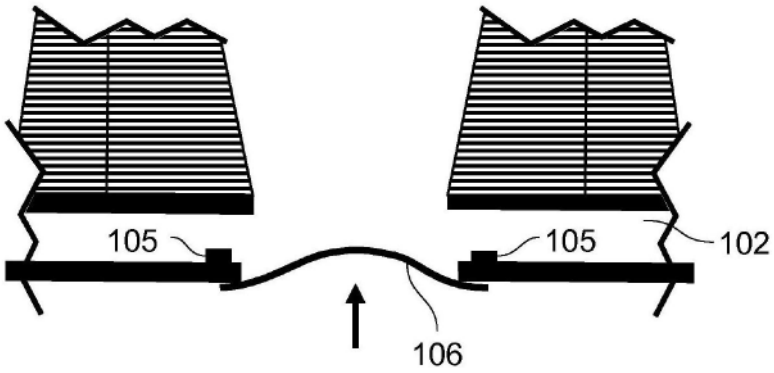


图7C

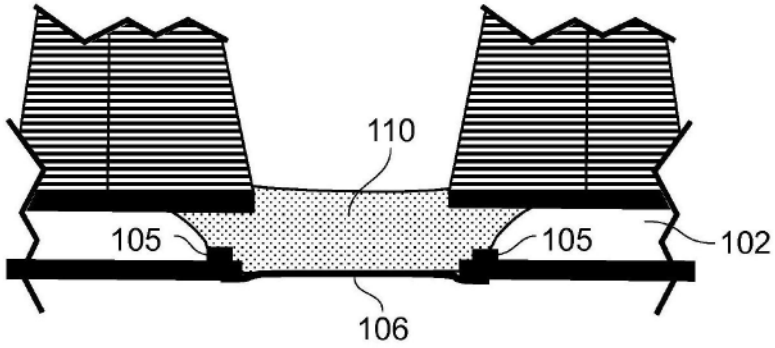


图8A

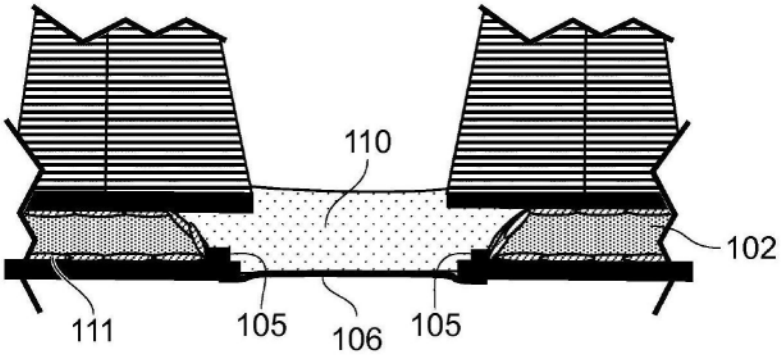


图8B

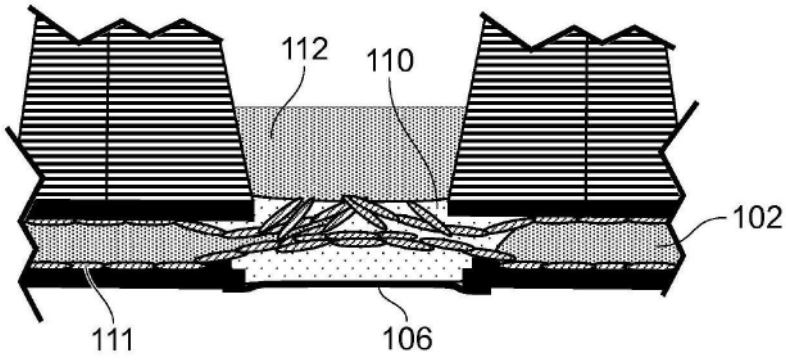


图8C

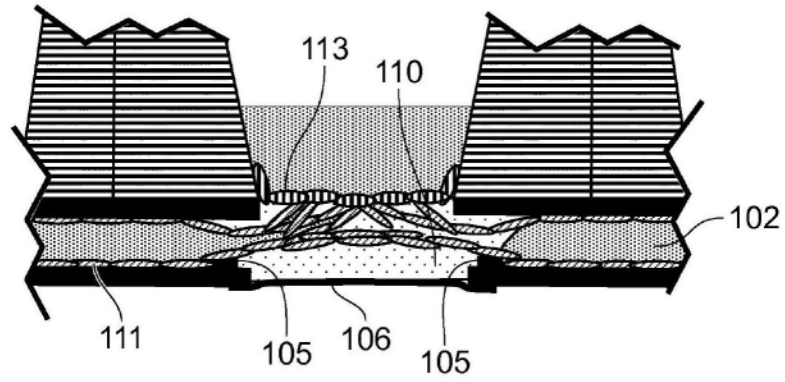

113
110
102
111
105
106
105

图8D

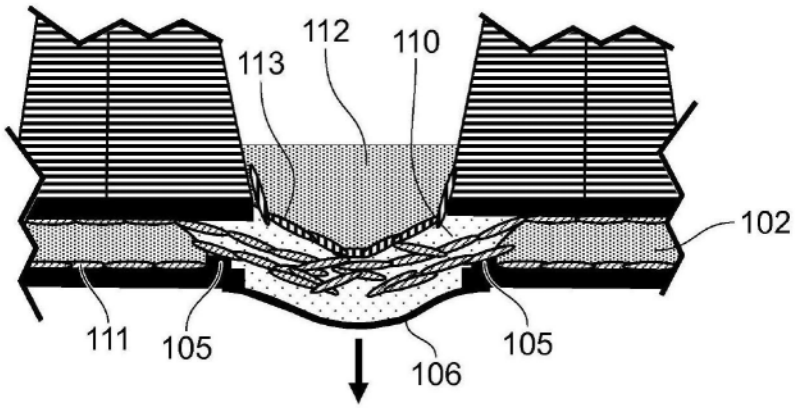

112
113
110
102
111
105
106
105

图8E

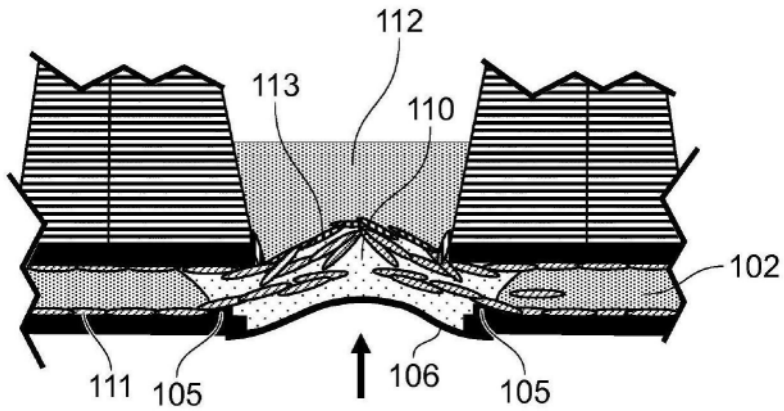

112
113
110
102
111
105
106
105

图8F

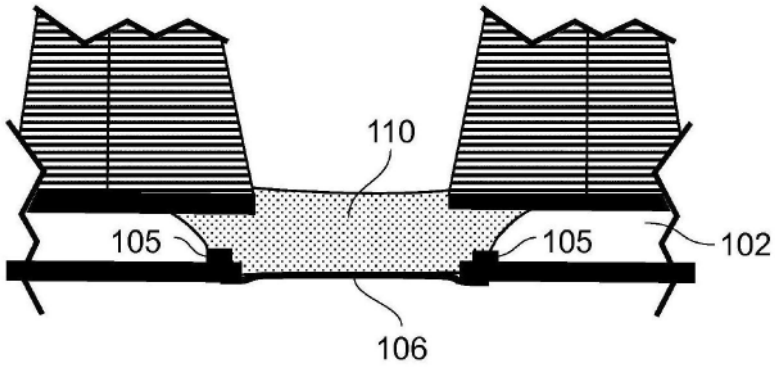

110
105
105
102
106

图9A

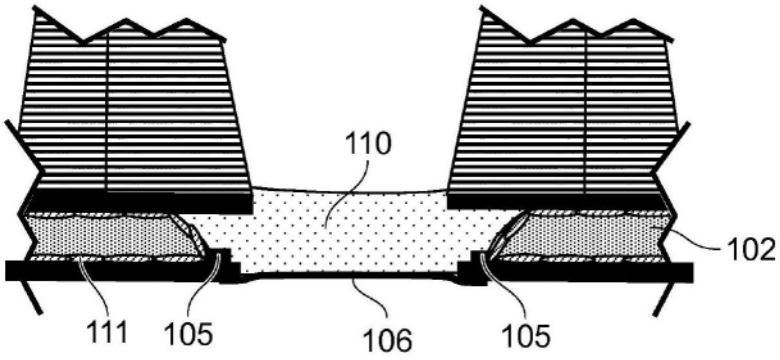

110
102
111
105
106
105

图9B

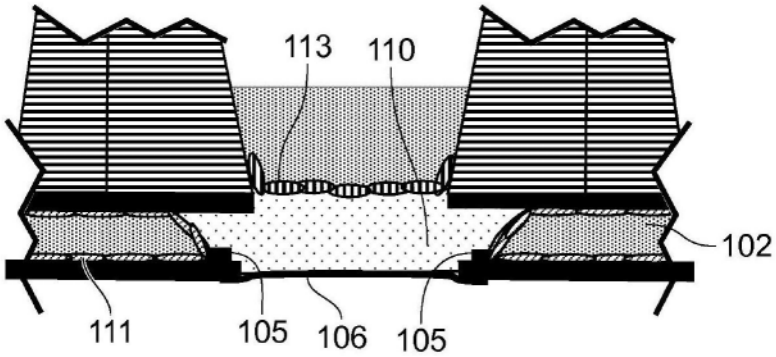

113
110
102
111
105
106
105

图9C

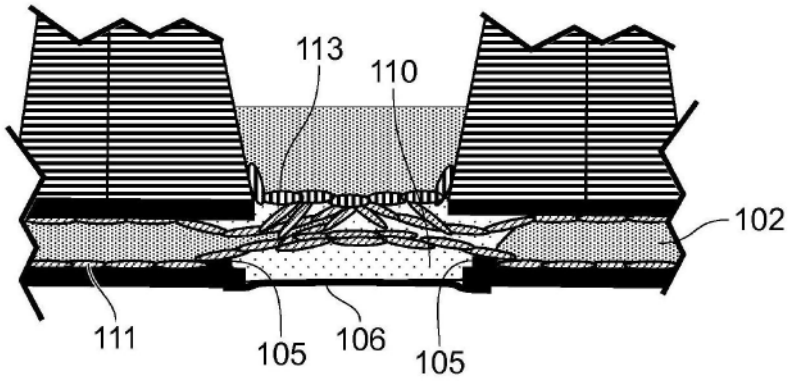

113
110
102
111
105
106
105

图9D

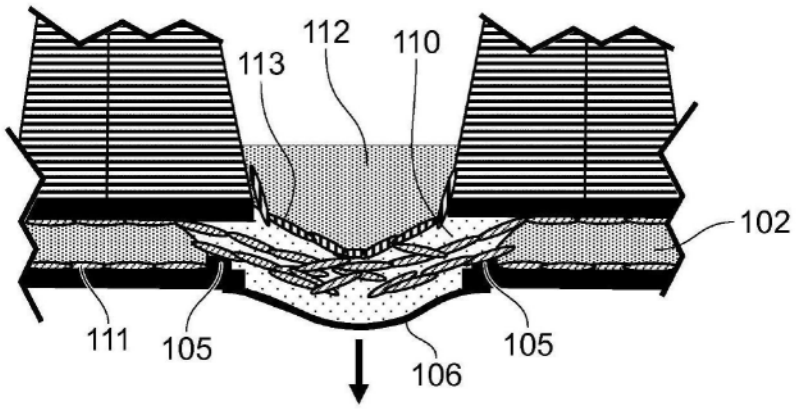

112
113
110
102
111
105
106
105

图9E

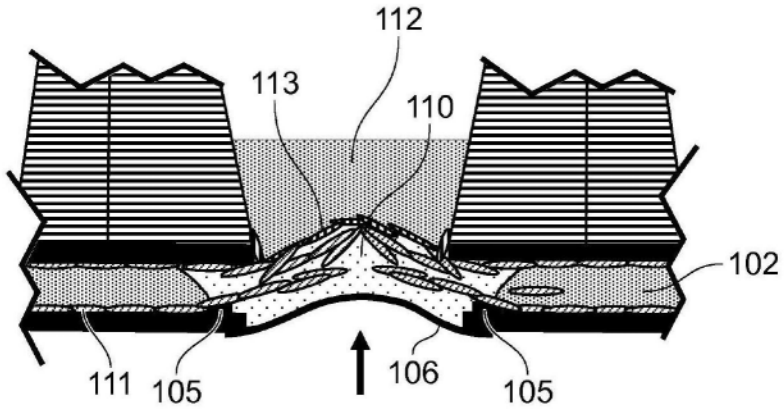

112
113
110
102
111
105
106
105

图9F

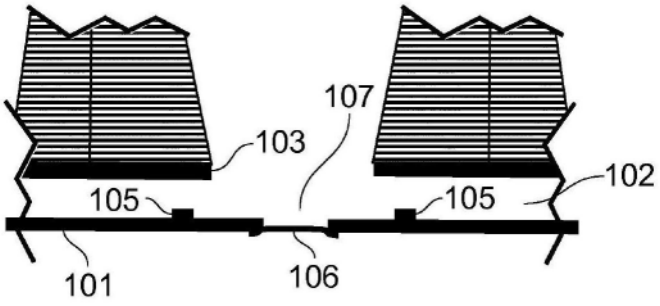


图10A

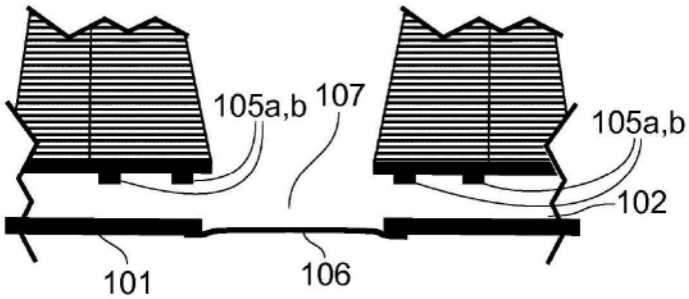


FIG. 10B

图10B

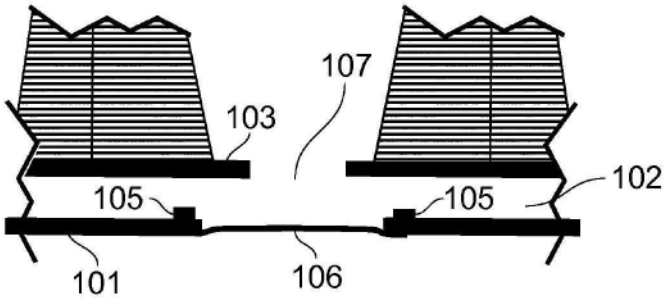


图10C

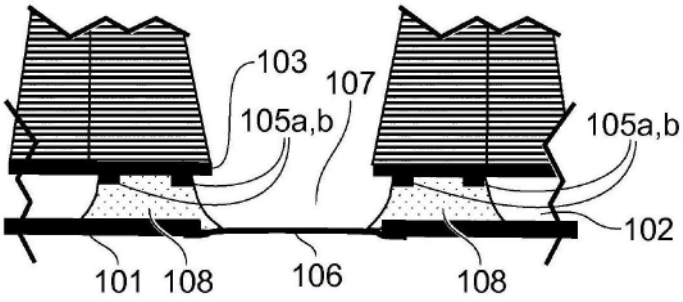


图11A

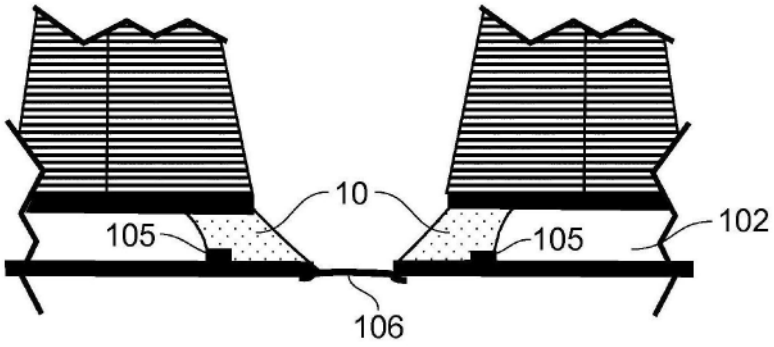


图11B

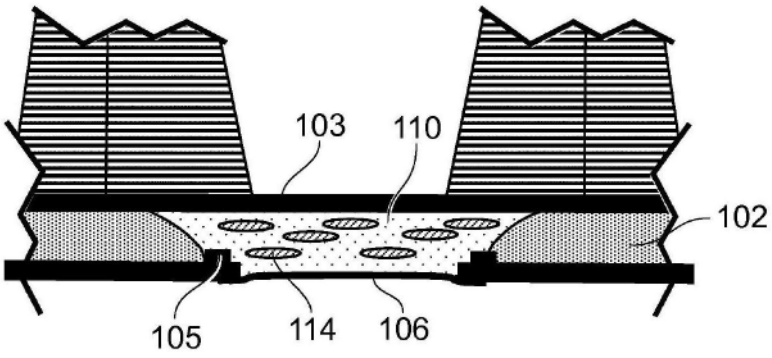


图12

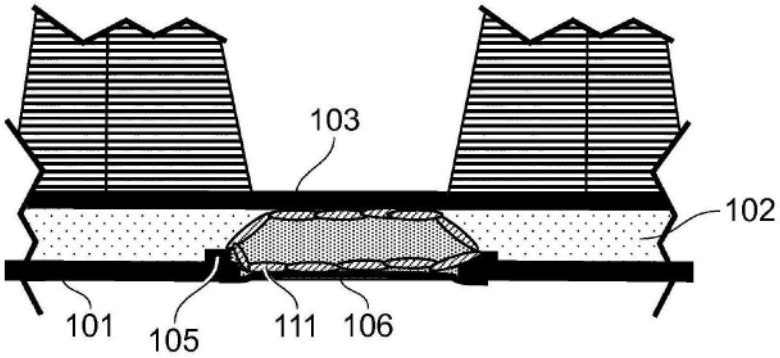


图13

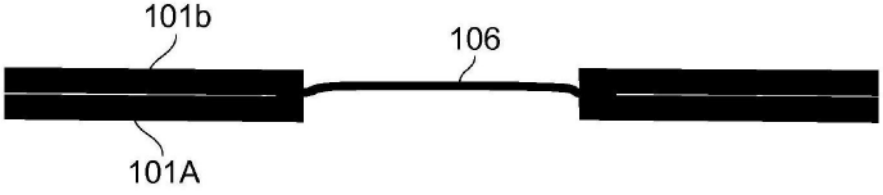


图14A

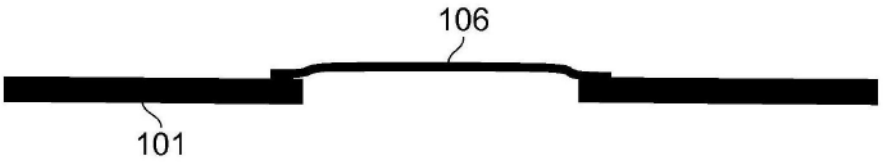


图14B

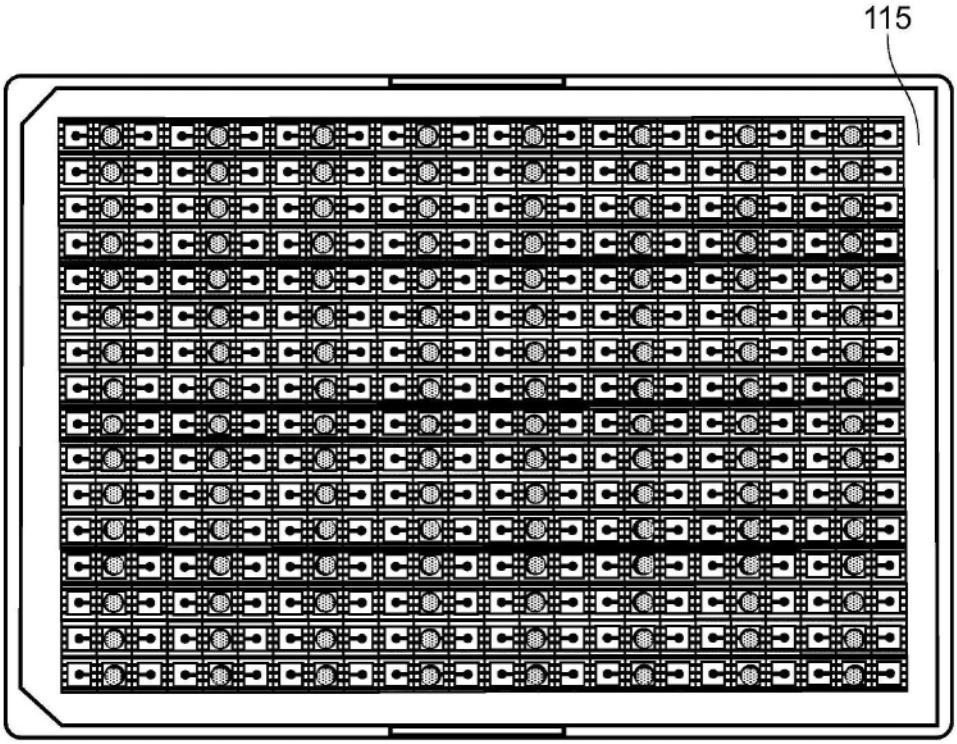


图15

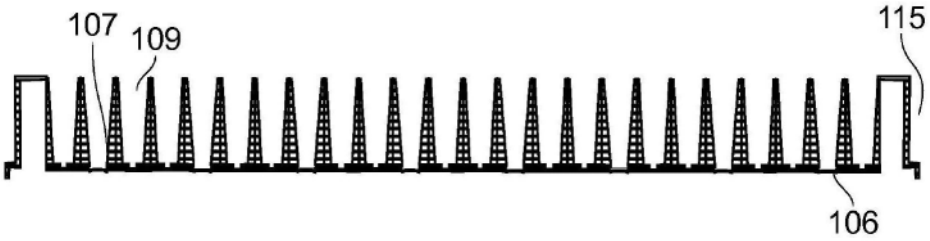


图16

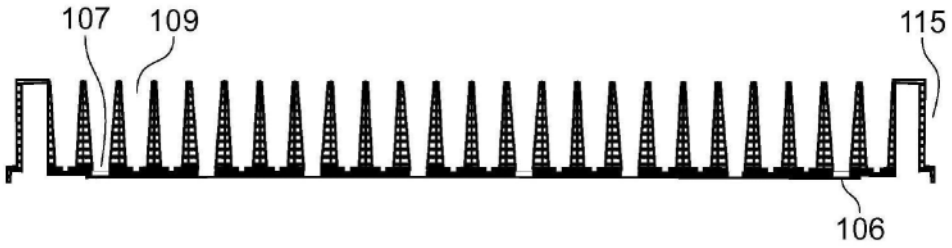


图17