

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-540567

(P2022-540567A)

(43)公表日 令和4年9月16日(2022.9.16)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
G 0 1 N 30/72 (2006.01)	G 0 1 N 30/72	C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全202頁)

(21)出願番号	特願2021-577975(P2021-577975)	(71)出願人	318012012
(86)(22)出願日	令和2年6月26日(2020.6.26)		エミュレート, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年2月25日(2022.2.25)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(86)国際出願番号	PCT/US2020/039830		2 1 0 - 2 3 8 2, ボストン, ドライ
(87)国際公開番号	WO2020/264303		ドック 2 7
(87)国際公開日	令和2年12月30日(2020.12.30)	(74)代理人	100114775
(31)優先権主張番号	62/867,543		弁理士 高岡 亮一
(32)優先日	令和1年6月27日(2019.6.27)	(74)代理人	100121511
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 小田 直
	米国(US)	(74)代理人	100202751
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 岩堀 明代
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(	(74)代理人	100208580
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		弁理士 三好 玲奈
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR	(74)代理人	100191086
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		弁理士 高橋 香元
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マイクロ流体デバイスにおける化合物分布

(57)【要約】

本発明は、マイクロ流体デバイス及びそれらの関連システム内のマイクロ流体及び化合物分布の分野に関する。一実施形態では、本発明は、マイクロ流体デバイス内のガス輸送を過度に制限することなく、実験室設備、マイクロ流体デバイス及びそれらの関連インフラストラクチャを構成する材料への分子及び化合物吸収性の問題を解決することを目的とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロ流体デバイスが製造する方法であって、

- a) チャンネルを含むマイクロ流体デバイスを提供することと、
 - b) 多孔度のガス交換器を選択することであって、前記多孔度がガス輸送速度を決定することと、
 - c) 前記チャンネルを前記ガス交換器でキャッピングすることと、
- を含む、方法。

【請求項 2】

前記チャンネルが、膜によって分離された第 1 のチャンバ及び第 2 のチャンバを含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記マイクロ流体デバイスが、流体流の有無にかかわらず、一定のガス輸送速度を維持することができる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ガスが、酸素を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ガス交換器が、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ガス交換器が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記ガス交換器が、第 1 のガス不透過性基材を含むデバイスであり、前記第 1 のガス不透過性基材が、(i) 第 1 の側面、(ii) 第 2 の側面、及び (iii) 前記第 1 の側面と前記第 2 の側面との間にある 1 つ又は複数のガス透過性領域を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ガス交換器が、フィルムである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記領域が、細孔である、請求項 7 に記載の方法。 30

【請求項 10】

前記領域が、前記第 1 の側面及び前記第 2 の側面の少なくとも一方に接触する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記チャンネルが、開放チャンネルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ガス交換器が、ガス透過性材料で充填された細孔を含み、前記細孔が前記多孔度を画定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ガス交換器が、ガス不透過性領域及びガス透過性領域を含み、前記ガス透過性領域が、前記ガス交換器の体積の 10 % 未満を占める、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 14】

前記マイクロ流体デバイスが、細胞を更に含み、前記ガス輸送速度が前記細胞の生存能力を維持するように選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ガス輸送速度が、前記マイクロ流体デバイス内にガス濃度プロファイルを生成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記マイクロ流体デバイスが、肝臓細胞を更に含み、前記ガス濃度プロファイルが肝臓 50

酸素ゾネーションである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記マイクロ流体デバイスが、癌細胞を更に含み、前記ガス濃度プロファイルが低酸素環境である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記マイクロ流体デバイスが結腸細胞を更に含み、前記ガス濃度プロファイルが低酸素管腔環境である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ガス交換器が、前記マイクロ流体デバイスへのガスの流れを制限する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ガス交換器が、前記マイクロ流体デバイスへのガスの流れを増加させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

流体デバイスであって、前記流体デバイスが、開放チャンネルを有する第 1 の基材と、ガス交換器を含む第 2 の基材とを含み、前記第 2 の基材が、少なくとも部分的に囲まれたチャンネルを形成する前記第 1 の基材をキャッピングする、流体デバイス。

【請求項 22】

前記ガス交換器が、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ガス交換器が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記ガス交換器が、ガス不透過性材料を含むデバイスであって、前記ガス不透過性材料が、（i）第 1 の側面、（ii）第 2 の側面、及び（iii）前記第 1 の側面と前記第 2 の側面との間にある 1 つ又は複数のガス透過性領域を有する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

前記材料が、フィルムである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記領域が、細孔である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記領域が、前記第 1 の側面及び前記第 2 の側面の少なくとも一方に接触する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

前記領域が、前記ガス交換器の体積の 10 % 未満を占める、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 29】

前記デバイスが、マイクロ流体デバイスである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 30】

前記ガス交換器が、ガス透過性材料とガス不透過性材料との複合材を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 31】

前記ガス交換器が、第 1 のガス透過性基材及び第 2 のガス不透過性基材を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 32】

ガス輸送を制御する方法であって、

a) 本体と、前記本体に接触するガス交換器とを含む流体デバイスを提供することであって、前記ガス交換器が、ガス透過性領域を有するガス不透過性ポリマー基材を含み、前記基材が、第 1 及び第 2 の側面を含み、前記領域が、多孔度を形成する、流体デバイスを提供することと、

10

20

30

40

50

b) 前記基材の前記第 1 の側面にガスを導入することであって、前記第 2 の側面へのガス輸送速度が前記多孔度によって制御されることと、
を含む、方法。

【請求項 33】

前記ポリマーが、ポリエチレンテレフタレート (PET) を含み、前記領域が、ポリジメチルシロキサン (PDMS) を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記流体デバイス本体が、ガス透過性である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

前記流体デバイス本体が、ガス不透過性である、請求項 32 に記載の方法。

10

【請求項 36】

前記ガス交換器が、前記基材の前記第 1 の側面と接触するガス透過性ポリマー層を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 37】

前記流体デバイスが、少なくとも 1 つのチャンネルを含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 38】

前記ガス交換器は、前記少なくとも 1 つのチャンネルの少なくとも 1 つの壁を含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】

前記流体デバイスが、細胞を含む、請求項 32 に記載の方法。

20

【請求項 40】

前記ガスが、酸素を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 41】

前記ガス交換器が、前記マイクロ流体デバイスへのガス輸送速度を低下させる、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 42】

前記ガス交換器が、前記マイクロ流体デバイスへのガス輸送速度を増加させる、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 43】

前記ガス交換器が、前記チャンネル内の流体流の有無にかかわらず、前記マイクロ流体デバイス内へのガス輸送速度を維持する、請求項 32 に記載の方法。

30

【請求項 44】

前記ガス交換器が、フィルム、シート、複合体、ガス交換膜、積層体、細孔充填基材、細孔充填フィルム、細孔充填膜、及び細孔充填複合体を含むリストから選択される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 45】

前記領域が、細孔、導管、圧痕、穴、及びチャンネルを含むリストから選択される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 46】

前記領域が、前記第 1 の側面及び前記第 2 の側面の少なくとも一方に接触する、請求項 32 に記載の方法。

40

【請求項 47】

前記領域が、前記ガス交換器の体積の 10 % 未満を占める、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 48】

ガス交換器を製造する方法であって、

a) 細孔を有するガス不透過性ポリマー基材を提供することであって、前記基材が第 1 及び第 2 の表面を含み、前記細孔が多孔度を形成することと、

b) 未硬化ガス透過性ポリマーが前記細孔を貫通するように、前記第 1 の表面を前記未硬化ガス透過性ポリマーでコーティングすることと、

c) 前記第 1 の表面及び前記第 2 の表面が前記未硬化ポリマーを実質的に含まず、前記

50

細孔が前記未硬化ガス透過性ポリマーで充填されるように、前記第 1 の表面及び前記第 2 の表面から過剰な未硬化ポリマーを除去することと、

d) 前記細孔内で前記未硬化ガス透過性ポリマーを硬化させて、実質的にガス不透過性のガス交換器を製造することと、
を含む、方法。

【請求項 49】

請求項 48 に記載のガス交換器を含む、マイクロ流体デバイス。

【請求項 50】

前記ガス不透過性ポリマー基材がポリエチレンテレフタレート (PET) を含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 51】

前記ガス透過性ポリマーがポリジメチルシロキサン (PDMS) を含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 52】

前記細孔が、100 μ L 未満の体積のガス透過性ポリマーを含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 53】

前記細孔が、50 μ L 未満の体積の前記ガス透過性ポリマーを含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 54】

前記細孔が、10 μ L 未満の体積の前記ガス透過性ポリマーを含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 55】

前記細孔が、1 μ L 未満の体積の前記ガス透過性ポリマーを含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 56】

前記未硬化ガス透過性ポリマーを脱気するステップを更に含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 57】

ガス交換器を製造する方法であって、

a) (i) 細孔を有する第 1 のガス不透過性ポリマー基材であって、前記基材が第 1 及び第 2 の表面を含み、前記細孔が多孔度を形成する、第 1 のガス不透過性ポリマー基材、及び (ii) 第 2 のガス透過性ポリマー基材を提供することと、

b) 前記ガス透過性ポリマー基材が前記細孔を覆うように、前記第 1 の表面を前記第 2 のガス透過性ポリマー基材で積層することと、
を含む、方法。

【請求項 58】

前記第 1 のガス不透過性ポリマー基材がポリエチレンテレフタレート (PET) を含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記第 2 のガス透過性ポリマー基材が、ポリジメチルシロキサン (PDMS) を含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 60】

前記第 1 又は第 2 の基材が、フィルムである、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 61】

前記第 1 又は第 2 の基材が、膜である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 62】

ガス交換器を製造する方法であって、

a) (i) 細孔を有する第 1 のガス不透過性ポリマー基材であって、前記基材が第 1 及び第 2 の表面を含み、前記細孔が多孔度を形成する、第 1 のガス不透過性ポリマー基材、

10

20

30

40

50

及び (i i) 第 2 のガス透過性ポリマー基材を提供することと、

b) 前記ガス透過性ポリマー基材が前記ガス不透過性ポリマー基材を形成して前記細孔を覆うように、前記第 1 の表面を前記第 2 のガス透過性ポリマー基材と接触させることと、

を含む、方法。

【請求項 6 3】

前記第 1 のガス不透過性ポリマー基材がポリエチレンテレフタレート (PET) を含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記第 2 のガス透過性ポリマー基材が、ポリジメチルシロキサン (PDMS) を含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記第 1 又は第 2 の基材が、フィルムである、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記第 1 又は第 2 の基材が、膜である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 7】

システム内の化合物分布を分析する方法であって、

a) システム及び前記システムと共に使用するための第 1 の実験プロトコルを提供することであって、前記第 1 の実験プロトコルが、化合物を前記システムに導入し、1 つ又は複数の時点で行動を起こすことを含む、第 1 の実験プロトコルを提供することと、

b) 第 1 の修正された実験プロトコルを生成するために前記第 1 の実験プロトコルを修正することと、

c) 前記第 1 の実験プロトコルからの前記時点の 1 つ又は複数における化合物濃度を測定することと、

d) 前記第 1 の修正された実験プロトコルを実行することと、

e) 前記化合物の濃度の前記測定値を使用して、前記システム全体の化合物分布を分析することと、

を含む、方法。

【請求項 6 8】

f) 前記第 1 の実験プロトコルを実行するステップを更に含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記システムが、1 つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記システムが、輸液チューブを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記システムが、シリンジを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記システムが、1 つ又は複数の生物学的要素を含み、前記第 1 の実験プロトコルが、前記 1 つ又は複数の生物学的要素の少なくとも 1 つを除外するように修正される、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記第 1 の実験プロトコルが、前記生物学的要素に対する化合物試験を含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記第 1 の実験プロトコルが、細胞を含み、前記第 1 の修正された実験プロトコルが、細胞を含まない、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記システムが、コーティングを含み、前記第 1 の実験プロトコルが、コーティングを

10

20

30

40

50

除外することによって修正される、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記第 1 の修正された実験プロトコルが、前記第 1 の実験プロトコルの 1 つ又は複数の時点で行動を起こすことを含まない、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記濃度の測定を実行することが、1 つ又は複数の時点における前記行動を起こすことに取って代わる、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記第 1 の修正された実験プロトコルが、前記第 1 の実験プロトコルと比較して、入力化合物濃度のサブセットのみが前記修正された実験プロトコルに含まれるという点で修正される、請求項 6 7 に記載の方法。

10

【請求項 7 9】

前記第 1 の実験プロトコルと比較して多孔質要素が除外されるという点で、前記第 1 の修正された実験プロトコルである、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記システムが、細孔を有する第 1 の膜を含む第 1 のマイクロ流体デバイスを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記システムが、前記修正された実験プロトコルにおいて第 2 のシステムで置き換えられ、前記第 2 のシステムが、前記第 1 の膜が細孔を含む少なくとも 1 つの領域に細孔のない膜を含まない第 2 のマイクロ流体デバイスを含む、請求項 7 9 に記載の方法。

20

【請求項 8 2】

前記第 1 の実験プロトコルが、前記システム内で流体を流すことを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記システムが、前記システムへの流体入力を可能にするように構成された入力ポートを含む、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記システムが、前記システムからの流体出力を可能にするように構成された出力ポートを含む、請求項 8 2 に記載の方法。

30

【請求項 8 5】

前記第 1 の実験プロトコルが、前記入力ポートに流入することを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記第 1 の実験プロトコルが、前記出力ポートから第 1 のサンプルを収集することを含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記化合物の濃度の前記測定が、前記出力ポートからサンプルを収集することと、前記サンプル中の前記化合物の前記濃度を定量することと、を含む、請求項 8 4 に記載の方法。

40

【請求項 8 8】

前記第 1 の修正された実験プロトコルが、前記システムに吸収される前記化合物の割合を更に定量する、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記システムに流体流を導入するステップを更に含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記行動を起こすことが、流出物をサンプリングすることを含む、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記第 1 の実験プロトコルが、見かけの代謝産物値を達成するために前記流出物をアッ

50

セイすることを更に含む、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

前記化合物の濃度の前記測定値を使用して、前記見かけの代謝産物値を補正することを更に含む、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記化合物の濃度の前記測定値を使用して、前記見かけの代謝産物値の変動性を決定することを更に含む、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 94】

前記濃度の測定値を使用して、前記第 1 の実験プロトコルを実行するかどうかを決定することを更に含む、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 95】

(i) 前記化合物の濃度の前記測定値を使用して、第 2 の修正された実験プロトコルを生成することと、(ii) 前記第 2 の修正された実験プロトコルを実行することと、を更に含む、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 96】

前記第 1 の実験プロトコルが、生細胞を含む、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 97】

システム内の化合物分布を決定する方法であって、

a) 第 1 のシステム及び前記第 1 のシステムのための第 1 の実験プロトコルを提供することであって、前記第 1 のシステムが、

i) 第 1 流体流路と、

ii) 第 2 の流体チャネルと、

iii) 前記第 1 の流体チャネルと前記第 2 の流体チャネルとの間に配置される第 1 の膜であって、前記第 1 の膜が、細孔を含む、第 1 の膜と、
を含み、

前記第 1 の実験プロトコルが、化合物を前記第 1 のシステムに導入し、1つ又は複数の時点で行動を起こすことを含む、第 1 の実験プロトコルを提供することと、

b) 前記第 1 の膜を第 2 の膜で置き換えることによって、第 1 の修正された実験プロトコルを生成するように前記第 1 の実験プロトコルを修正することであって、前記第 2 の膜が細孔を欠いている、第 1 の実験プロトコルを修正することと、

c) 前記修正された実験プロトコルを実行することと、

d) 前記第 1 の実験プロトコルの前記時点の 1つ又は複数で、前記化合物の濃度の測定を実行することと、

e) 前記化合物の濃度の前記測定値を前記化合物の濃度と比較して、前記システム中の化合物分布を決定することと、
を含む、方法。

【請求項 98】

前記行動を起こすことが、流出物をサンプリングすることを含む、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 99】

前記流出物をアッセイすることを更に含む、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 100】

前記実験プロトコルが、1つ又は複数の生物学的要素を含む、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 101】

前記第 1 の実験プロトコルが、前記生物学的要素の少なくとも 1つを除外することによって修正される、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

前記生物学的要素が、細胞を含む、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 103】

10

20

30

40

50

前記生物学的要素が、生物学的コーティングを含む、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 104】

前記修正された実験プロトコルが、前記実験プロトコルの設定に吸収される前記化合物の割合を計算することによって前記システムへの化合物吸収を決定する、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 105】

前記実験プロトコルが、前記 1 つ又は複数の生物学的要素を前記化合物と接触させることを含む、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 106】

システム内の化合物分布を決定する方法であって、

10

a) 1 つ又は複数の生物学的要素を含むシステム及び前記システムのための実験プロトコルを提供することであって、前記 1 つ又は複数の生物学的要素が、化合物と接触していることと、

b) 前記 1 つ又は複数の生物学的要素の少なくとも 1 つを除外することによって前記実験プロトコルを修正することと、

c) 前記修正された実験プロトコルを実行することと、

d) 前記システム中の前記化合物の濃度を測定することによって、前記システム中の前記化合物の分布を決定することと、

を含む、方法。

【請求項 107】

20

前記実験プロトコルが、流体流を前記システムに導入することを含む、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

前記実験プロトコルが、流出物を収集することを含む、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

前記実験プロトコルが、前記流出物をアッセイすることを含む、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 110】

前記生物学的要素が、細胞を含む、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 111】

30

前記生物学的要素が、生物学的コーティングを含む、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 112】

前記システムが、1 つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 113】

前記化合物の前記分布が、前記実験プロトコルからの結果についてのエラーバーを計算するために使用される、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 114】

前記化合物の割合分布が、前記実験プロトコルについての半数阻害濃度 (IC₅₀) を計算するために使用される、請求項 106 に記載の方法。

40

【請求項 115】

システム内の化合物分布を評価する方法であって、

a) システム及び前記システムのための第 1 の実験プロトコルを提供することであって、前記第 1 の実験プロトコルは、化合物を前記システムに導入することを含む、第 1 の実験プロトコルを提供することと、

b) 修正された実験プロトコルを生成するために前記第 1 の実験プロトコルを修正することであって、前記修正された実験プロトコルが、

i) 第 1 の濃度を使用して前記化合物を導入することと、

ii) 前記化合物の濃度の第 1 の測定を実行することと、

を含む、第 1 の実験プロトコルを修正することと、

50

c) 前記修正された実験プロトコルを実行することと、
d) 前記化合物の濃度の前記測定値を閾値と比較することと、
e) 前記濃度の測定値が前記閾値を超える場合、前記第 1 の実験プロトコルを実行することと、
を含む、方法。

【請求項 1 1 6】

前記第 1 の実験プロトコルが、流体流を前記システムに導入することを更に含む、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記第 1 の実験プロトコルが、1 つ又は複数の時点で流出物を収集することを含む、請求項 1 1 6 に記載の方法。 10

【請求項 1 1 8】

前記第 1 の実験プロトコルが、前記流出物をアッセイすることを含む、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記生物学的要素が、細胞を含む、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記生物学的要素が、生物学的コーティングを含む、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記システムが、1 つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む、請求項 1 1 5 に記載の方法。 20

【請求項 1 2 2】

前記第 1 の測定が、前記第 1 の実験プロトコルの前記 1 つ又は複数の時点の少なくとも 1 つで行われる、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

閾値に対する前記化合物の濃度の前記測定値が、前記第 1 の測定値を前記第 1 の濃度で除算し、第 1 の比率を得ることによって比較される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記閾値が、1 0 %、2 0 %、3 3 %、5 0 %、6 6 %、及び 7 5 % のうちの 1 つを上回る第 1 の比率値である、請求項 1 2 3 に記載の方法。 30

【請求項 1 2 5】

前記修正された実験プロトコルが、入力化合物濃度を測定することを更に含み、前記第 1 の測定値が、測定された前記入力濃度で除算されて、測定された比率を得る、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

化合物分布を評価する方法であって、

a) 流体回路に流れを導入することであって、前記流れが化合物の初期濃度を含む、流れを導入することと、

b) 前記流体回路から 1 つ又は複数の流出物サンプルを収集することと、

c) 測定された濃度を生成するように、前記 1 つ又は複数の流出物サンプル中の前記化合物の濃度を決定することと、 40

d) 前記測定された濃度を前記化合物の初期濃度と比較し、それによって前記流体回路内の化合物吸収を評価することと、

を含む、方法。

【請求項 1 2 7】

前記流体回路が、1 つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記 1 つ又は複数のマイクロ流体デバイスの各々が、少なくとも 1 つの入口及び／又は 1 つの出口を含む、請求項 1 2 6 に記載の方法。 50

【請求項 1 2 9】

前記流体回路が、前記 1 つ又は複数のマイクロ流体デバイスと流体連通する 1 つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを含む、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記流体回路が、輸液チューブを含む、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記流体回路が、1 つ又は複数のシリンジを含む、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記流体回路が、小分子を吸収するポリマーを含む、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

1 つ又は複数の流出物サンプル中の前記化合物の濃度が、クロマトグラフィ及び／又は分光分析を使用して決定される、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

1 つ又は複数の流出物サンプル中の前記化合物の前記濃度が、液体クロマトグラフィ質量分析 (LCMS) を使用して決定される、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記化合物が、小分子化合物である、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記化合物が、薬物である、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

生物学的機能を監視するための流体デバイスであって、(i) 第 1 のチャンネルと、(i i) 第 2 のチャンネルと、(i i i) 前記第 1 のチャンネルと第 2 のチャンネルとの間に配置された膜と、(i v) 前記流体デバイスへのガス輸送速度を制御することができるように構成された、前記第 1 及び第 2 のチャンネルの少なくとも一方と接触するガス交換器と、を含む、流体デバイス。

【請求項 1 3 8】

前記流体デバイスが、マイクロ流体デバイスである、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 3 9】

前記第 1 及び第 2 のチャンネル層が、ガス不透過性である、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 4 0】

前記第 1 及び第 2 のチャンネル層が、小分子の吸収に抵抗性である、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 4 1】

前記第 1 及び第 2 のチャンネル層の少なくとも一方が、(環状オレフィンコポリマー) COP を含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 4 2】

前記第 1 及び第 2 のチャンネルの少なくとも一方が、細胞を含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 4 3】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 1 4 2 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 4 4】

前記ガス交換器が、前記流体デバイスに機械的安定性を提供する、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 4 5】

前記ガス交換器が、前記第 1 のチャンネル又は前記第 2 のチャンネルの少なくとも一方を少なくとも部分的に囲む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 4 6】

前記ガス交換器が、前記第 1 のチャンネル又は前記第 2 のチャンネルの少なくとも一方と少

10

20

30

40

50

なくとも部分的に隣接する、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 4 7】

前記ガス交換器が、2つのポリマー層を含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 4 8】

前記ガス交換器が、ポリメチルペンテン（PMP）を含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 4 9】

前記ガス交換器が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 5 0】

前記ガス交換器が、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 5 1】

前記ガス交換器が、ポリテトラフルオロエテン（PTFE又はテフロン）を含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 5 2】

前記ガス交換器が、ポリ〔4, 5-ジフルオロ-2, 2-ビス（トリフルオロメチル）-1, 3-ジオキソール-コ-テトラフルオロエチレン〕（テフロンAF2400）を含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 5 3】

前記ガス交換器が、複数の細孔を含むポリマーフィルムを含み、前記複数の細孔が、多孔度を画定する、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 5 4】

前記多孔度が、0.05%～15%である、請求項 1 5 3 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 5 5】

前記多孔度が、ガス輸送速度を調節する、請求項 1 5 3 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 5 6】

前記複数の細孔が、ガス透過性ポリマーで充填されている、請求項 1 5 3 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 5 7】

前記ガス透過性ポリマーが、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 1 5 6 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 5 8】

前記ポリマーフィルムが、ポリエチレンテレフタレート（PET）である、請求項 1 5 3 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 5 9】

前記ガス交換器が、複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性フィルムを含み、前記複数の細孔が、多孔度を画定する、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 6 0】

前記ガス交換器が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）よりもガス透過性が低い、請求項 1 5 9 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 6 1】

前記ガス交換器が、0.025～1 μ L未満の体積の多孔度を含む、請求項 1 5 6 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 6 2】

前記ガス交換器が、前記第1のチャンネル又は前記第2のチャンネルの少なくとも一方の長さに沿って延びる、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 6 3】

前記ガス交換器が、前記第1のチャンネル又は前記第2のチャンネルの少なくとも一方の長さに沿って一定のガス輸送速度を提供するように構成されている、請求項 1 6 2 に記載の

10

20

30

40

50

流体デバイス。

【請求項 1 6 4】

前記膜が、ガス透過性ポリマーを含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 6 5】

前記膜が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 6 6】

前記膜が、複数の細孔を含み、前記複数の細孔が、多孔度を画定する、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 6 7】

前記膜の前記多孔度が、5%～10%である、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 6 8】

前記多孔度が、前記膜を通るガス輸送速度を調節する、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 6 9】

1 つ又複数のセンサを更に含む、請求項 1 3 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 7 0】

少なくとも 1 つのセンサが、酸素センサである、請求項 1 6 9 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 7 1】

前記流体デバイスが、前記第 1 及び第 2 のチャンネルの前記少なくとも一方において低酸素環境を含む、請求項 1 4 2 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 7 2】

生物学的機能を監視するための流体デバイスであって、（i）第 1 のチャンネルを含む第 1 のチャンネル層と、（ii）第 2 のチャンネルを含む第 2 のチャンネル層と、（iii）前記第 1 のチャンネル層と第 2 のチャンネル層との間に位置する膜と、（iv）ガス流を前記流体デバイスに導入することができるように構成された前記第 1 及び第 2 のチャンネルの少なくとも一方と接触するガス交換器と、を含む、流体デバイス。

【請求項 1 7 3】

前記流体デバイスが、マイクロ流体デバイスである、請求項 1 7 2 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 7 4】

前記第 1 及び第 2 のチャンネル層が、ガス不透過性である、請求項 1 7 2 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 7 5】

前記第 1 及び第 2 のチャンネル層が、小分子の吸収に抵抗性である、請求項 1 7 2 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 7 6】

前記第 1 及び第 2 のチャンネル層の少なくとも一方が、（環状オレフィンコポリマー）COPを含む、請求項 1 7 2 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 7 7】

前記第 1 及び第 2 のチャンネルの少なくとも一方が、細胞を含む、請求項 1 7 2 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 7 8】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 1 7 7 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 7 9】

前記ガス交換器が、前記流体デバイスに機械的安定性を提供する、請求項 1 7 2 に記載の流体デバイス。

【請求項 1 8 0】

前記ガス交換器が、前記第 1 のチャンネル又は前記第 2 のチャンネルの少なくとも一方を少なくとも部分的に囲む、請求項 1 7 2 に記載の流体デバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 181】

前記ガス交換器が、前記第1のチャンネル又は前記第2のチャンネルの少なくとも一方と少なくとも部分的に隣接する、請求項172に記載の流体デバイス。

【請求項 182】

前記ガス交換器が、2つのポリマー層を含む、請求項172に記載の流体デバイス。

【請求項 183】

前記ガス交換器が、ポリメチルペンテン（PMP）を含む、請求項172に記載の流体デバイス。

【請求項 184】

前記ガス交換器が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項172に記載の流体デバイス。 10

【請求項 185】

前記ガス交換器が、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含む、請求項172に記載の流体デバイス。

【請求項 186】

前記ガス交換器が、ポリテトラフルオロエテン（PTFE又はテフロン）を含む、請求項172に記載の流体デバイス。

【請求項 187】

前記ガス交換器が、ポリ〔4,5-ジフルオロ-2,2-ビス（トリフルオロメチル）-1,3-ジオキサソール-4-イル〕（テフロンAF2400）を含む、請求項172に記載の流体デバイス。 20

【請求項 188】

前記ガス交換器が、複数の細孔を含むポリマーフィルムを含み、前記複数の細孔が、多孔度を画定する、請求項172に記載の流体デバイス。

【請求項 189】

前記多孔度が、0.05%～15%である、請求項188に記載の流体デバイス。

【請求項 190】

前記多孔度が、ガス輸送速度を調節する、請求項188に記載の流体デバイス。

【請求項 191】

前記複数の細孔が、ガス透過性ポリマーで充填されている、請求項188に記載の流体デバイス。 30

【請求項 192】

前記ガス透過性ポリマーが、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項191に記載の流体デバイス。

【請求項 193】

前記ポリマーフィルムが、ポリエチレンテレフタレート（PET）である、請求項188に記載の流体デバイス。

【請求項 194】

前記ガス交換器が、複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性フィルムを含み、前記複数の細孔が、多孔度を画定する、請求項172に記載の流体デバイス。 40

【請求項 195】

前記ガス交換器が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）よりもガス透過性が低い、請求項194に記載の流体デバイス。

【請求項 196】

前記ガス交換器が、0.025～1μL未満の体積の多孔度を含む、請求項188に記載の流体デバイス。

【請求項 197】

前記ガス交換器が、前記第1のチャンネル又は前記第2のチャンネルの少なくとも一方の長さに沿って延びる、請求項172に記載の流体デバイス。

【請求項 198】

前記ガス交換器が、前記第1のチャンネル又は前記第2のチャンネルの少なくとも一方の長さに沿って一定のガス輸送速度を提供するように構成されている、請求項196に記載の流体デバイス。

【請求項199】

前記膜が、ガス透過性ポリマーを含む、請求項172に記載の流体デバイス。

【請求項200】

前記膜が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項172に記載の流体デバイス。

【請求項201】

前記膜が、複数の細孔を含み、前記複数の細孔が、多孔度を画定する、請求項172に記載の流体デバイス。 10

【請求項202】

前記膜の前記多孔度が、5%～10%である、請求項201に記載の流体デバイス。

【請求項203】

前記多孔度が、前記膜を通るガス輸送速度を調節する、請求項201に記載の流体デバイス。

【請求項204】

1つ又複数のセンサを更に含む、請求項172に記載の流体デバイス。

【請求項205】

少なくとも1つのセンサが、酸素センサである、請求項204に記載の流体デバイス。 20

【請求項206】

前記流体デバイスが、前記第1及び第2のチャンネルの前記少なくとも一方において低酸素環境を含む、請求項177に記載の流体デバイス。

【請求項207】

灌流マニホールドアセンブリであって、(i)(ii)1つ又は複数の流体リザーバの上部として機能するように構成された蓋と、(iii)前記流体リザーバの下の小分子の吸収に抵抗性であるガスケット層と、(iv)前記流体リザーバの下にあり、前記流体リザーバと流体連通する流体バックプレーンと、(v)前記流体バックプレーンの上の小分子の吸収に抵抗性であるキャッピング層と、(vi)前記マイクロ流体デバイスと係合するための突出部材と、を含む、灌流マニホールドアセンブリ。 30

【請求項208】

前記ガスケット層が、パリレン被覆SEBSを含む、請求項207に記載の灌流マニホールドアセンブリ。

【請求項209】

前記キャッピング層が、COPから製造される、請求項207に記載の灌流マニホールドアセンブリ。

【請求項210】

ガス輸送を制御する方法であって、

a)チャンネル又はチャンバ内に剛性ポリマー及び生細胞を含む実質的にガス不透過性のマイクロ流体デバイスを提供することであって、前記生細胞がガス消費速度を有する、提供することと、 40

b)前記チャンネル又はチャンバに、ある流量で培養培地を導入することであって、前記培養培地が、ガスを担持し、前記生細胞へのガス輸送速度が、前記流量によって制御され、前記ガス輸送速度が、前記ガス消費速度を満たすか又は超える、培地を導入することと、

を含む、方法。

【請求項211】

前記剛性ポリマーが、0.1GPa～150GPaの弾性率を有する、請求項210に記載の方法。

【請求項212】

前記剛性ポリマーが、ポリカルボナートである、請求項 2 1 0 に記載の方法。

【請求項 2 1 3】

前記流量が、 $40\ \mu\text{L}/\text{時}$ を超える、請求項 2 1 0 に記載の方法。

【請求項 2 1 4】

c) ガス輸送速度を増加させるために流量を増加させることを更に含む、請求項 2 1 0 に記載の方法。

【請求項 2 1 5】

c) 薬物又は薬物候補を前記チャネル又はチャンバに導入することを更に含み、前記剛性ポリマーが、PDMSへの吸収の程度と比較して、前記薬物又は薬物候補の吸収を少なくとも約70%以上減少させる、請求項 2 1 0 に記載の方法。

【請求項 2 1 6】

c) 細胞アッセイ及び／又は目視検査によって前記細胞の生存能力を評価するステップを更に含む、請求項 2 1 0 に記載の方法。

【請求項 2 1 7】

ガス輸送を制御する方法であって、

a) i) 表面上の生細胞と、ii) 入口及び出口ポートとを含み、前記入口及び出口ポートがiii) 再循環経路と流体連通している、実質的にガス不透過性のマイクロ流体デバイスを提供することと、

b) ガスを含む培養培地を、ある方向に前記マイクロ流体デバイスの前記入口ポートに、ある流量で流し、それによって流体を前記マイクロ流体デバイスの前記出口ポートから出て前記再循環経路に入らせ、それによって流体流の方向を反転させることなく前記培養培地を再循環させ、前記再循環によって前記生細胞へのガス輸送速度が増加することと、を含む、方法。

【請求項 2 1 8】

前記剛性ポリマーが、 $0.1\text{ GPa} \sim 150\text{ GPa}$ の弾性率を有する、請求項 2 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1 9】

前記流量が、 $40\ \mu\text{L}/\text{時}$ 以下である、請求項 2 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2 0】

ガス輸送を制御する方法であって、

a) i) 表面上の生細胞と、ii) 入口及び出口ポートとを含み、前記入口及び出口ポートがiii) 往復運動アクチュエータと流体連通している、実質的にガス不透過性のマイクロ流体デバイスを提供することと、

b) ガスを含む培養培地を、ある方向に前記マイクロ流体デバイスの前記入口ポートに、ある流量で流し、それによって流体を前記出口ポートの方向に移動させることと、

c) 前記往復運動アクチュエータを用いて前記流体を往復運動させ、それによって流体流の方向を反転させ、前記往復運動によって前記生細胞へのガス輸送速度が増加することと、

を含む、方法。

【請求項 2 2 1】

前記剛性ポリマーが、 $0.1\text{ GPa} \sim 150\text{ GPa}$ の弾性率を有する、請求項 2 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2 2】

前記流量が、 $40\ \mu\text{L}/\text{時}$ 以下である、請求項 2 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

ガス輸送を制御する方法であって、

a) i) ガス交換器と、ii) チャネル又はチャンバ内の生細胞とを含む、実質的にガス不透過性のマイクロ流体デバイスを提供することであって、前記デバイスが剛性ポリマーを含む、マイクロ流体デバイスを提供することと、

b) 前記チャネル又はチャンバに、ある流量で培養培地を導入することであって、前記

10

20

30

40

50

培養培地が、ガスを担持し、前記生細胞へのガス輸送速度が、前記ガス交換器によって制御される、培地を導入することと、

を含む、方法。

【請求項 2 2 4】

前記剛性ポリマーが、ポリカルボナートである、請求項 2 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 2 5】

前記剛性ポリマーが、0.1 GPa ~ 150 GPa の弾性率を有する、請求項 2 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 2 6】

前記ガス交換器が、前記チャンネル又はチャンバの下方に配置されたポリジメチルシロキサン (PDMS) のフィルムを含む、請求項 2 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 2 7】

前記ガス交換器が、ガス透過性細孔を有する非透過性ポリマーのフィルムを含み、前記フィルムが、前記チャンネル又はチャンバの下方に配置される、請求項 2 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 2 8】

ガス不透過性基材を含む装置であって、前記ガス不透過性基材が、(i) 第 1 の表面、(ii) 第 2 の表面、及び (iii) 1 つ又は複数のガス透過性領域を含む、装置。

【請求項 2 2 9】

前記基材が、フィルムである、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 0】

前記基材が、シートである、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

前記基材が、積層体である、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 2】

前記基材が、複合材である、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 3】

前記基材が、ガス交換膜である、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 4】

前記基材が、ガス交換膜である、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 5】

前記基材が、細孔充填基材である、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 6】

前記基材が、細孔充填フィルムである、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 7】

前記基材が、細孔充填ガス交換膜である、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 8】

前記基材が、細孔充填複合材である、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 9】

前記領域が、細孔である、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 4 0】

前記領域が、導管である、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 4 1】

前記領域が、圧痕である、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 4 2】

前記領域が、前記第 1 の表面及び前記第 2 の表面の少なくとも一方と接触する、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 4 3】

前記領域が、前記第 1 の表面と前記第 2 の表面とを架橋する、請求項 2 2 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4 4】

前記ポリマーが、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含み、前記細孔が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 2 2 8 に記載の非透過性フィルム。

【請求項 2 4 5】

エラストマー性細孔を含む、剛性ポリマーフィルム。

【請求項 2 4 6】

前記剛性ポリマーフィルムが、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含み、前記エラストマー性細孔が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 2 4 5 に記載の剛性ポリマーフィルム。

【請求項 2 4 7】

マイクロ流体デバイスにおけるガス輸送を制御する方法であって、

a) 0.1 GPa ~ 150 GPa の弾性率を有する実質的にガス不透過性のポリマーを含む複数の外側と、第 1 のチャンネルと第 2 のチャンネルとの間に配置された実質的にガス透過性の内膜とを含む実質的にガス不透過性のマイクロ流体デバイスを提供することと、

b) 前記第 1 のチャンネル又は前記第 2 のチャンネルの前記少なくとも一方に、ある流量で流体を導入することであって、前記実質的にガス透過性の内膜が、前記第 1 のチャンネルと前記第 2 のチャンネルとの間のガス輸送を可能にするように構成される、流体を導入することと、

を含む、方法。

【請求項 2 4 8】

流体デバイスであって、(i) 複数の外側、(ii) 前記本体内に配置された第 1 のチャンネル、(iii) 前記本体内に配置された第 2 のチャンネル、(iv) 前記第 1 のチャンネルと第 2 のチャンネルとの間に配置された膜、及び (v) 前記複数の外側のうちの 1 つ又は複数の接触する 1 つ又は複数のガス不透過性マスクを含む、流体デバイス。

【請求項 2 4 9】

ガス輸送を制御する方法であって、

a) i) 複数の外側及び ii) 内側チャンネル又はチャンバ内の生細胞を含む実質的にガス透過性のマイクロ流体デバイスであって、0.1 GPa 未満の弾性率を有する弾性ポリマーと、0.1 GPa ~ 150 GPa の弾性率を有する 1 つ又は複数のガス不透過性マスクとを含むマイクロ流体デバイスを提供することと、

b) 前記複数の外側のうちの少なくとも 1 つをガス不透過性マスクと接触させることと、

c) 非酸素化培養培地を、ある流量で前記チャンネル又はチャンバに導入することと、を含む、方法。

【請求項 2 5 0】

流体デバイスであって、(i) 複数の外側、(ii) 前記本体内に配置された第 1 のチャンネル、(iii) 前記本体内に配置された第 2 のチャンネル、(iv) 前記第 1 のチャンネルと第 2 のチャンネルとの間に配置された膜、(v) 前記第 1 のチャンネル及び第 2 のチャンネルの少なくとも一方に接触するガス交換器、及び (vi) 前記複数の外側のうちの 1 つ又は複数の接触する 1 つ又は複数のガス不透過性マスクを含む、流体デバイス。

【請求項 2 5 1】

ガス輸送を制御する方法であって、

a) i) 複数の外側、ii) ガス交換器、及び iii) 内側チャンネル又はチャンバ内の生細胞を含む実質的にガス透過性のマイクロ流体デバイスであって、0.1 GPa 未満の弾性率を有する弾性ポリマーを含むデバイスを提供することと、

b) 前記ガス交換器をマスキングすることなく、前記複数の外側の少なくとも 1 つに実質的にガス不透過性のマスクを追加することと、

c) 非酸素化培養培地を、ある流量で前記チャンネル又はチャンバに導入することであって、前記生細胞へのガス輸送速度が前記ガス交換器によって制御される、非酸素化培地を導入することと、

10

20

30

40

50

を含む、方法。

【請求項 2 5 2】

前記実質的にガス不透過性のマスクが、ポリエチレンテレフタレート（PET）フィルムを含む、請求項 2 5 1 に記載の方法。

【請求項 2 5 3】

0.1 GPa 未満の弾性率を有する実質的にガス透過性ポリマーを含む複数の外側、及び前記複数の外側の少なくとも 1 つに取り付けられた実質的にガス不透過性のマスクを含む、マイクロ流体デバイス。

【請求項 2 5 4】

前記実質的にガス不透過性のマスクが、ポリエチレンテレフタレート（PET）フィルムを含む、請求項 2 5 3 に記載のデバイス。

【請求項 2 5 5】

0.1 GPa ~ 150 GPa の弾性率を有する実質的にガス不透過性のポリマーを含む複数の外側、及び実質的にガス透過性の内側チャンネル壁を含む、マイクロ流体デバイス。

【請求項 2 5 6】

前記実質的にガス透過性の内側チャンネル壁が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 2 5 5 に記載のデバイス。

【請求項 2 5 7】

0.1 GPa ~ 150 GPa の弾性率を有する実質的にガス不透過性のポリマーを含む複数の外側、及び実質的にガス透過性の内膜を含む、マイクロ流体デバイス。

【請求項 2 5 8】

前記実質的にガス透過性の内膜が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 2 5 7 に記載のデバイス。

【請求項 2 5 9】

前記ポリジメチルシロキサン（PDMS）膜が、伸張するように構成されている、請求項 2 5 8 に記載のデバイス。

【請求項 2 6 0】

a) 0.1 GPa ~ 150 GPa の弾性率を有する実質的にガス不透過性のポリマーを含む複数の外側、及び実質的にガス透過性の内膜を含むマイクロ流体デバイスを提供することと、b) 前記膜を伸張することと、を含む、方法。

【請求項 2 6 1】

前記実質的にガス透過性の内膜が、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 2 6 0 に記載の方法。

【請求項 2 6 2】

前記伸張が、前記膜を横切る差圧を加えることによって達成される、請求項 2 6 0 に記載の方法。

【請求項 2 6 3】

前記マイクロ流体デバイスが、ガス交換器を更に含む、請求項 2 6 0 に記載の方法。

【請求項 2 6 4】

マイクロ流体デバイスであって、

a) 1 つ又は複数の流体チャンネルと、

b) ガス透過性壁によって前記 1 つ又は複数の流体チャンネルから分離された、前記 1 つ又は複数の流体チャンネルの周囲の少なくとも一部の周りのガスチャンネルと、

を含む、マイクロ流体デバイス。

【請求項 2 6 5】

前記マイクロ流体デバイスが、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む、請求項 2 6 4 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 2 6 6】

前記マイクロ流体デバイスが、前記ガスチャンネルと接触するバルブを更に含む、請求項 2 6 4 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 2 6 7】

前記マイクロ流体デバイスが、センサを更に含む、請求項 2 6 4 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 2 6 8】

前記ガスチャンネルが、前記作業チャンネルの全周囲にある、請求項 2 6 4 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 2 6 9】

ガス輸送を制御する方法であって、

a) i) 1 つ又は複数の流体チャンネル、及び (i i) ガス透過性壁によって前記流体チャンネルから分離された、前記 1 つ又は複数の流体チャンネルの周囲の少なくとも一部の周りのガスチャンネルを含むマイクロ流体デバイスを提供することと、

c) 前記 1 つ又は複数の流体チャンネルに、ある流量で流体を導入することと、

b) 前記流体への前記ガス輸送を制御するために、前記ガスチャンネルに非酸素ガスを導入することと、

を含む、方法。

【請求項 2 7 0】

マイクロ流体デバイスであって、(i) 第 1 のチャンネル及び第 2 のチャンネルであって、前記第 1 のチャンネル及び第 2 のチャンネルの各々が複数の壁を含み、前記壁の少なくとも 1 つが、0.1 GPa 未満の弾性率を有するガス透過性であり、前記壁の少なくとも 1 つが 0.1 GPa ~ 150 GPa の弾性率を有するガス不透過性である、第 1 のチャンネル及び第 2 のチャンネルと、(i i) 前記第 1 のチャンネルと第 2 のチャンネルとの間に配置されたガス透過性膜であって、0.1 GPa 未満の弾性率を有する膜と、を含む、マイクロ流体デバイス。

【請求項 2 7 1】

マイクロ流体デバイスであって、第 1 のチャンネルと、ガス交換チャンネルと、前記第 1 のチャンネルと前記ガス交換チャンネルとの間のガス交換器とを有する本体を含む、マイクロ流体デバイス。

【請求項 2 7 2】

前記第 1 のチャンネル内に膜を更に含む、請求項 2 7 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 2 7 3】

前記第 1 のチャンネル内に細胞を更に含む、請求項 2 7 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 2 7 4】

前記本体が、ガス不透過性である、請求項 2 7 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 2 7 5】

方法であって、(i) 少なくとも 1 つのチャンネル及び前記チャンネル内に膜を含むマイクロ流体デバイスを提供することと、(i i) 前記少なくとも 1 つのチャンネルにガス交換器を適用することと、を含む、方法。一実施形態では、前記チャンネルは細胞を含む。

【請求項 2 7 6】

前記少なくとも 1 つのチャンネルが、細胞を含む、請求項 2 7 5 に記載の方法。

【請求項 2 7 7】

少なくとも 1 つのチャンネルを有するマイクロ流体デバイスを含むシステムであって、前記マイクロ流体デバイスが、ガス環境に配置される、システム。

【請求項 2 7 8】

前記ガス環境が、インキュベータによって制御される、請求項 2 7 7 に記載のシステム。

【請求項 2 7 9】

ガス環境が、ガス制御インキュベータによって制御される、請求項 2 7 7 に記載のシステム。

【請求項 2 8 0】

前記ガス環境が、低酸素環境である、請求項 277 に記載のシステム。

【請求項 281】

前記ガス環境が、高酸素環境である、請求項 277 に記載のシステム。

【請求項 282】

前記システムが、前記マイクロ流体デバイス内のガス濃度を前記ガス環境が制御するように構成される、請求項 277 に記載のシステム。

【請求項 283】

前記マイクロ流体デバイスが、ガス透過性である、請求項 277 に記載のシステム。

【請求項 284】

前記チャンネルが、膜を含む、請求項 277 に記載のシステム。

10

【請求項 285】

前記チャンネルが、細胞を含む、請求項 277 に記載のシステム。

【請求項 286】

マイクロ流体デバイス内のガス濃度を制御する方法であって、

(i) 少なくとも 1 つのチャンネルを含むマイクロ流体デバイスを提供することと、

(ii) 前記少なくとも 1 つのチャンネルがガス環境のガス濃度をとるように、前記マイクロ流体デバイスを前記ガス環境に配置することと、

を含む、方法。

【請求項 287】

前記方法が、インキュベータを更に提供し、前記ガス環境が、前記インキュベータによって制御される、請求項 286 に記載の方法。

20

【請求項 288】

インキュベータが、ガス制御インキュベータである、請求項 287 に記載の方法。

【請求項 289】

前記ガス環境が、低酸素環境である、請求項 286 に記載の方法。

【請求項 290】

前記ガス環境が、高酸素環境である、請求項 286 に記載の方法。

【請求項 291】

前記マイクロ流体デバイスが、ガス透過性である、請求項 286 に記載の方法。

【請求項 292】

前記チャンネルが、膜を含む、請求項 286 に記載の方法。

30

【請求項 293】

前記チャンネルが、細胞を含む、請求項 286 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイクロ流体細胞培養システムの分野に関する。材料構成への小分子吸収を制限する様々なマイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリが考えられる。吸収キット又は化合物分布キットはまた、実験系又は臨床系内の化合物の移動を特徴付けることも企図される。ガス交換器はまた、周囲環境からマイクロ流体デバイスの内部へなど、ある領域から別の領域へのガス流の速度を制御することも企図される。

40

【背景技術】

【0002】

新しいマイクロ流体技術は、エキスピゴで細胞を研究するための有用な実験ツールを提供する。従来の培養システムと比較して、マイクロ流体デバイスは、Breslauer による刊行物「Microfluidics-based systems biology」に記載されているように、より一定で可溶性の微小環境を維持することができる流体流を生成することによって、より生理学的に関連する細胞環境を提供することができる。二次元 (2D) 単層細胞培養系は、生物学的研究において長年使用されてきた。最も一般的な細胞培養プラットフォームは、ペトリ皿又はフラスコ内の二次元 (2D) 単層細胞

50

胞培養である。そのような2Dインビトロモデルは動物モデルよりも安価であり、細胞生理学の系統的かつ再現性のある定量的研究（例えば、創薬及び開発において）に役立つが、インビトロ系とインビボ状態との生理学的関連性は疑問視されることが多く、そのような研究からの結果は妥当性を欠くことが多い。三次元（3D）細胞培養マトリックスは、2D単層細胞培養では観察されない多くの生物学的関連機能を促進することが現在広く受け入れられている。言い換えれば、2D細胞培養系は、生体組織の構造、機能及び生理学をインビボで正確に再現しない。

【0003】

米国特許第8,647,861号は、ある流量で培養流体に曝露されたマイクロチャネル内の膜上に生細胞を含むマイクロ流体「organ-on-chip」デバイスを記載している。静的2D培養とは対照的に、マイクロチャネルは、インビトロ研究中に細胞培養物全体にわたって細胞培養培地の灌流を可能にし、したがって、よりインビボ様の物理的環境を提供する。簡単に言えば、入口ポートは、細胞を含むマイクロ流体チャネル又はチャンバへの細胞培養培地の注入を可能にし、したがって栄養素及び酸素を細胞に送達する。次いで、出口ポートは、残りの培地並びに有害な代謝副産物の排出を可能にする。

【0004】

米国特許出願第15/248,690号は、体内の器官の少なくとも1つの機能を模倣する細胞を含む「organ-on-chips」などの1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを保持し、任意選択的にチューブを使用せずに、当該マイクロ流体デバイスの灌流及び任意選択的に機械的作動を可能にする灌流マニホールドアセンブリを記載している。灌流マニホールドアセンブリは、「organ-on-chip」デバイスなどの1つ又は複数のマイクロ流体デバイスの灌流及び任意選択的に機械的作動を可能にする培養モジュールと相互作用する。培養モジュールは、「organ-on-chip」デバイスなどのマイクロ流体デバイスの灌流を可能にする圧力マニホールドを含む。

【0005】

これらのマイクロ流体デバイス又は「organ-on-chip」デバイスを製造するために使用される材料、及び灌流マニホールドアセンブリなどのそれらの関連するインフラストラクチャは、しばしば、化合物の誤った分布及びそれらが非吸収的に接合するように設計された小分子化合物の吸収を起こしやすい。マイクロ流体デバイス及びそのインフラストラクチャを構築するために使用されるKratonによって製造されたポリジメチルシロキサン（PDMS）及びスチレン系ブロックコポリマー（SEBS）などの材料は、広く利用可能であり、安価であり、マイクロ流体デバイス製造に修正可能である傾向があるが、それらは、創薬及び開発など、そうでなければそれらが理想的であろう特定の様々な研究を妨げている。創薬及び開発の目的のために、マイクロ流体デバイスの吸収性は、患者細胞、動物細胞、微生物細胞、小生物などのマイクロ流体デバイス内の対象への薬物曝露の変動性をもたらし得る。治療予測を可能にするために、検体が曝露される化合物の濃度に高い信頼性が必要である。

【0006】

吸収性の問題にもかかわらず、マイクロ流体デバイスを製造するために使用されるPDMSなどの材料はまた、マイクロ流体デバイス内部の対象の生存能力及び機能をサポートするのに不可欠なガスの輸送を促進する傾向がある。特に、外部環境からの酸素をマイクロ流体デバイスの内部に透過／通過させ、呼吸に必要な酸素を細胞に供給する。同様に、細胞呼吸中に放出される二酸化炭素は、マイクロ流体デバイスの内部から外部環境に材料を通過することができ、これにより、この廃棄物が蓄積して細胞にとって有毒になることが防止される。多くの硬質プラスチックなどの非吸収性又は低吸収性材料は、これらのガスのマイクロ流体デバイスへの輸送及びマイクロ流体デバイスからの輸送を妨げる傾向がある。必要とされているのは、マイクロ流体デバイスで使用される材料において、医薬の研究におけるこれらのデバイスの用途を制限する吸収性から、生物学的生存能力及び機能をサポートするために必要とされるガス透過性を切り離すための解決策である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許第8,647,861号

【特許文献2】米国特許出願第15/248,690号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Breslauerら「Microfluidics-based systems biology」

【発明の概要】

【0009】

本発明は、マイクロ流体の分野に関する。一実施形態では、本発明は、マイクロ流体デバイス内のガス輸送を制限することなく、実験室設備、マイクロ流体デバイス及びそれらの関連インフラストラクチャを構成する材料への分子及び化合物吸収性の問題を解決することを目的とする。医薬品及び化学物質などの化合物は、輸液チューブ、シリンジ、組織培養実験器具、及びピペットチップを含む頻繁な厄介の原因によって、インビボ及びインビトロ実験の設定の様々な構成要素に吸収されるか、結合するか、又はその中にあまり分布しない可能性がある。そのような吸収結合及び不十分な分布は、気付かれないことが多く、それによって変動性及び定量的実験結果の歪みに寄与する（例えば、用量反応曲線）。マイクロ流体デバイスも例外ではない。完全にガス透過性の材料から製造されたマイクロ流体デバイスは、データを破壊する小分子化合物を吸収する傾向があり、それによって、それらのマイクロ流体デバイスを使用して収集されたデータを混乱させる。例えば、材料ポリジメチルシロキサン（PDMS）は高吸収性であり、特にその吸収が理解されていない場合、実験に悪影響を及ぼす可能性がある。マイクロ流体デバイスを構成するバルク材料への小分子の吸収は、細胞及び小生物などのマイクロ流体デバイス内の検体と接触する可能性があるこれらの小分子の濃度を低下させる。

【0010】

小分子化合物は、（1）検出可能なレベルで吸収しない化合物、（2）検出可能なレベルでいくらか吸収する化合物、及び（3）高度に又は完全に吸収する化合物の3つのカテゴリーの吸収のうちの1つに入ると推定される。小分子化合物の約40%は吸収しないと推定され、第1のカテゴリーに入る。小分子化合物の約40%がいくらか吸収すると推定され、第2のカテゴリーに入る。小分子化合物の約20%が完全に吸収し、第3の最も困難なカテゴリーに入ると推定される。このように、小分子化合物の約60%が、科学的実験の間だけでなく、実際の患者への投与の間にも潜在的に問題となり得ると推定される。

【0011】

小分子は、生体異物としても知られ得る。Xenoは、外来性を意味する。生体異物は、典型的には人体には生じない化学物質として古典的に考えられるものである傾向がある。生体異物は、生物製剤と比較してより小さい分子である傾向がある。タンパク質及び抗体などの生物製剤は、天然にヒト体内に存在し、生体異物と比較してより大きな分子である傾向がある。実際には、ほとんどの生体異物は分子量が1kDa未満である。本発明の目的のために、分子量が1kDa未満の分子は小分子とみなされ得る。

【0012】

いくつかの材料は、他の材料よりも材料の吸収を起こしやすい。ポリマーは、一般に、剛性又はエラストマー性として見ることができる。ポリマーは、曲げ弾性率としても知られ、弾性率としても知られる、それらのヤング率に基づいて剛性又はエラストマー性として測定され得る。実際には、0.1GPaを超える弾性率を有する任意のポリマーは、確実にマイクロ流体デバイス製造の目的のために、有効に剛性又は非可撓性であるとみなされる。剛性ポリマーは、0.1GPa～150GPaの範囲内であってもよい。金属は、通常、少なくとも30GPa以上の弾性率値を有する。例えば、アルミニウムは、最大約69GPaの弾性率値を有することができる。いくつかの実施形態では、材料及び／又は生体適合性材料の剛性又は可撓性は、材料硬度によって決定することができる。例えば、

10

20

30

40

50

材料の硬度は、典型的には、静的負荷下での圧痕に対する抵抗によって測定することができる。最も一般的に使用される測定値は、ショア硬さ及びロックウェル硬さである。両方とも経験的な相対的尺度である。ショア硬さは、エラストマーの曲げ弾性率の代用として使用されることが多い尺度である。ショア A スケールは、通常、軟質エラストマーに使用され、ショア D スケールは、硬質エラストマー又は軟質硬質熱可塑性材料に使用される。単なる例として、ポリプロピレンなどの剛性であるがより柔らかい熱可塑性材料は、ショア D スケールで 75 ～ 85 の典型的な値を有することができる。アクリルなどのより硬質の熱可塑性材料は、通常、ロックウェル M スケールで特徴付けることができる。例えば、アクリルのロックウェル M 値は 85 ～ 105、ポリカルボナートは 72、ポリスチレンは 68 ～ 70、ポリスルホン は 70 であってもよい。

10

【0013】

可撓性又はエラストマー性と剛性との間にある材料はほとんどない。言い換えれば、弾性率を見ると、エラストマー性又は剛性である場合に曖昧になる範囲にある材料はごくわずかである。ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 又はテフロン、及びフッ素化エチレンプロピレン (FEP) を含む、可撓性又はエラストマー性と剛性との間にあるとみなされ得る材料が試験され、吸収性であることが見出されている。したがって、剛性材料のみを一般に低吸収性とみなすことができる。別のクラスの可撓性ポリマーはゴムであり、プラスチックとは異なる。ゴムも柔軟である傾向がある。ゴムには、天然ゴム及び液体シリコンゴムが含まれる。しかし、ゴムは一般に小分子も吸収する傾向があることが分かっている。

20

【0014】

剛性ポリマーと弾性ポリマーの両方を広範に調査した後、剛性ポリマーは低吸収性であるが、弾性ポリマーは小分子を吸収しやすいことが一般に分かっている。理論に束縛されるものではないが、弾性ポリマー内の分子又はモノマーは、一般に、剛性ポリマー内の分子よりも高い移動度を有する。ポリマーは、モノマー、又は重合によって一緒になってポリマーを形成する分子から構成される。剛性ポリマー内の分子又はモノマーはそれほど移動性ではないため、分子が剛性ポリマーに吸収又は拡散することはより困難である。逆に、弾性ポリマー内の分子又はモノマーがより移動性であるため、分子が弾性ポリマーに吸収又は拡散することはそれほど困難ではない。したがって、他の有益な特性、例えば伸張能力のために弾性ポリマーを使用する場合、他の分子のポリマーへの吸収又は拡散を止めるために、物理的パラメータよりも化学的パラメータに大きく依存しなければならない。化学的パラメータは、コーティングだけでなく、分散、極性、及び水素結合などのポリマーの化学的特性も伴い得る。

30

【0015】

Charles M. Hansen によって開発されたハンセン溶解度パラメータは、ある材料が別の材料に溶解するかどうかを予測した。本明細書における使用のために、ハンセン溶解度パラメータは、分子の固体への溶解度を予測するのに役立つ。3つのハンセン溶解度パラメータは、分散 (δ_D)、極性 (δ_P) 及び水素結合 (δ_H) である。ファンデルワールス力としても知られる分散力は、引力及び反発力などの分子間の距離依存性相互作用である。極性は、化合物中の様々な原子間の不均一な部分電荷分布である。水素結合は、窒素、酸素及びフッ素などの非常に電気陰性度の高い原子に共有結合した水素原子と別の非常に電気陰性度の高い原子との間の引力である。ハンセン溶解度パラメータが類似する材料は、互いに溶解しやすい。以下の式を使用して、材料のハンセン溶解度パラメータを決定することができる。

40

【0016】

$$(Ra)^2 = 4(\delta_{D2} - \delta_{D1})^2 + (\delta_{P2} - \delta_{P1})^2 + (\delta_{H2} - \delta_{H1})^2$$

ここで、Ra は、ハンセン空間におけるハンセンパラメータ間の距離である。ハンセンパラメータが近いほど、2つの材料が互いに溶解する可能性が高い。 δ_{D1} は、第1の材料の分散力である。 δ_{P1} は、第1の材料の極性である。 δ_{H1} は、第1の材料の水素結合である。 δ_{D2} は、第2の材料の分散力である。 δ_{P2} は、第2の材料の極性である。

50

δ_{H2} は、第 2 の材料の水素結合である。

【0017】

弾性ポリマー及び剛性ポリマーの両方を詳細かつ数学的に調査した結果、多目的マイクロ流体デバイスの本体を構成し得るポリマーは見出されなかった。マイクロ流体デバイスは、インビボ生理学をよりよくエミュレートするために、低吸収性であり、伸張することができ、生体適合性であることが望ましい。前述のように、剛性ポリマーは吸収しない傾向がある。弾性ポリマーは可撓性である。このように、それ自体で分子吸収に抵抗し、伸張もするエラストマー性又は剛性ポリマーは依然として見出されていない。したがって、弾性ポリマーと剛性ポリマーとの戦略的組合せを使用して、一実施形態では、低吸収性マイクロ流体デバイスを製造することができる。

10

【0018】

マイクロ流体デバイスの本体への吸収は、細胞代謝などの実験的読み出しに悪影響を及ぼす。マイクロ流体デバイスを使用する場合の課題は、細胞が候補化合物と接触しているときに生成される代謝の速度及び生じる代謝産物を理解及び定量することである。例えば肝臓細胞の場合の薬物の固有クリアランスを推定するために、親化合物の代謝又は損失が測定されることが多い。固有クリアランスは、血中の細胞又はタンパク質への流動又は結合などの制限がない場合に、肝臓が薬物を除去する能力である。代謝速度が遅いと、マイクロ流体デバイスが非吸収性であっても、親化合物の損失を検出することが困難になる可能性がある。最も重要なことに、吸収は、化合物損失が代謝又は吸収に起因するかどうかを推定することを不可能にし得る。簡単に言えば、細胞が低濃度の親化合物を消費する場合、その損失を定量することは困難である。LC/MS装置における検出感度の実用レベルは±25%である。したがって、代謝を効果的に定量するためには、親化合物の濃度の減少は少なくとも25%、理想的には、はるかに大きい必要がある。代謝の定量は、親化合物の吸収によってより困難になる。PDMSなどの物質への吸収が有意である場合、観察された見かけの代謝速度（化合物損失の全てが代謝に起因する場合）は、化合物濃度の減少が代謝に誤って起因するため、実際の細胞媒介性代謝を過大評価することになる。場合によっては、親化合物の全てが材料によって枯渇する可能性がある。この場合、全ての化合物が失われており解析するデータがないので、吸収は可能な上限代謝速度の推定さえも妨げる。材料吸収は、全ての親化合物が材料によって枯渇していない限り、材料中の吸収の速度及び程度、投与濃度及び流量などの実験パラメータ、並びにマイクロ流体デバイスの幾何学的形状などの材料-化合物特性に関する所与の情報を計算的にモデル化し、説明することができる。しかし、計算モデリングには、化合物-材料相互作用を特徴付けるための広範な研究、並びに化合物の損失又は消失に対する材料吸収の寄与を「差し引く」ためのシステムの計算コストの高いモデルが必要である。化合物損失が完全である場合、これらのモデルは、化合物損失が完全であるため、吸収の寄与を説明することができない。

20

30

【0019】

本発明は、複数の特有の実施形態から構成される。本発明の一実施形態は、マイクロ流体デバイスのチャンネルに重要なガスを導入するために、高流量（例えば、 $40\mu\text{L}/\text{時超}$ ）の剛性マイクロ流体デバイスを使用する方法である。本発明の別の実施形態は、使用される流体の体積を減少させると共に、細胞シグナルなどのマイクロ流体デバイス内で使用するための流体内の流体内の重要な化学物質及び生物学的物質を維持するために、再循環流体（一実施形態では、高流量で流れる）を有する剛性マイクロ流体デバイスを使用する方法である。本発明の別の実施形態は、実験設定を簡略化し、使用される流体の体積を減少させ、細胞シグナルなどのマイクロ流体デバイス内で使用するための流体内の重要な化学物質及び生物学的物質も維持するために、往復運動する流体（一実施形態では、高流量で流れる）を有する剛性マイクロ流体デバイスを使用する方法である。本発明の別の実施形態は、マイクロ流体デバイスのチャンネルにガスを導入するためのガス交換器を含む剛性マイクロ流体デバイスである。本発明の別の実施形態はガス交換器であり、ガス交換器は、細孔を含む剛性ポリマーで構成され、細孔は弾性ポリマーで充填されている。本発明の

40

50

別の実施形態は、ガス交換器及び剛性ポリマーマスクを含むエラストマー性マイクロ流体デバイスである。本発明の別の実施形態は、ガスと作業チャンネルとの間のガス流を促進するために、マイクロ流体デバイスの作業チャンネルの周囲に沿ってガスチャンネルを含む、「ハロチップ」としても知られるマイクロ流体デバイスである。本発明の別の実施形態は、エラストマー性チャンネル壁と、第1のチャンネルと第2のチャンネルとの間のエラストマー性膜とを含む剛性マイクロ流体デバイスである。本発明の別の実施形態は、第1のチャンネルと第2のチャンネルとの間にエラストマー性膜を含む剛性マイクロ流体デバイスであり、それにより、エラストマー性膜を横切って差圧が加えられたときにエラストマー性チャンネルが伸張する。本発明の別の実施形態は、マイクロ流体デバイスの周りの流体インフラを表す低吸収性灌流マニホールドアセンブリである。本発明の別の実施形態は、実験系及び臨床系を構成する材料への化合物の吸収を決定するために使用される化合物分布キットである。本明細書に提示されるマイクロ流体デバイス及び低吸収性灌流マニホールドアセンブリは、小分子の吸収を最小限に抑えることを目的としているが、マイクロ流体デバイスはまた、周囲ガスが、生細胞を含むマイクロ流体チャンネルなどのデバイスの実験領域にアクセスすることを可能にすることを目的としている。マイクロ流体デバイス、それらを使用する方法、及び低吸収性灌流マニホールドアセンブリは全て、多くのエラストマー性材料が、多くの化合物（薬物、化学物質、化粧品など）に見られるものなどの小分子を吸収するという驚くべき発見に従って設計された。米国特許第8,647,861号は、マイクロ流体デバイス、又は有機模倣デバイス、又は器官の機能を模倣することができるデバイスを記載しており、このデバイスは、その中に中央マイクロチャンネルを有する本体、並びに第1のマイクロチャンネル及び第2のマイクロチャンネルを形成するように構成された少なくとも部分的に多孔性の膜を含み、第1の流体は、当該第1のマイクロチャンネルを介して適用されてもよく、第2の流体は、当該第2のマイクロチャンネルを介して適用されてもよく、膜は、複数の生細胞の接着を支持する少なくとも1つの接着分子で任意選択的にコーティングされてもよく、多孔性膜は、少なくとも部分的に可撓性である。一実施形態では、デバイスは、第1のマイクロチャンネル壁によって第1及び第2の中央マイクロチャンネルを分離した第1の動作チャンネルを更に含み、膜は、第1のチャンバマイクロチャンネル壁に固定され、第1の動作チャンネルに圧力を加えることにより、膜が第1の所望の方向に屈曲して、第1及び第2の中央マイクロチャンネル内の平面に沿って膨張又は収縮する。米国特許第8,647,861号のマイクロ流体デバイスは、PDMSなどの弾性ポリマーから製造することができる。

10

20

30

【0020】

本発明の一実施形態は、剛性ポリマー薄膜又はマスクを適用することである。薄い剛性ポリマーフィルム又はマスクは、周囲環境からマイクロ流体デバイスの本体へのガス輸送を制限するのに役立つ。米国特許第8,647,861号におけるマイクロ流体デバイスの1つの使用は、低酸素環境に固有の特定の種類の腸細胞などの播種細胞を研究することである。多くの弾性ポリマーは、ガス輸送に対して非常に透過性であるため、いくつかの種類の細胞は、それらを収容するマイクロ流体デバイスへのガス輸送が制限された状態で、より高いレベルの生存能力を発現する。したがって、剛性ポリマーから製造された薄膜又はマスクは、マイクロ流体デバイスの本体へのガスの輸送を制限するために、弾性ポリマーから製造されたマイクロ流体デバイスの外面と接触させることができる。剛性ポリマーとしては、ポリエチレンテレフタレート（PET）、環状オレフィンコポリマー（COP）、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレート及びポリ塩化ビニル、アクリル、ポリスチレン、ポリカルボナート、ガラス、エポキシ繊維ガラス、セラミック及び金属が挙げられるが、これらに限定されない。外側表面、及び剛性ポリマーの1つ又は複数の薄膜を含むエラストマー性マイクロ流体デバイスを提供し、剛性ポリマーの当該1つ又は複数の薄膜を当該外側表面と接触させる方法が企図される。剛性ポリマーの薄膜と、膜によって分離された第1のチャンネル及び第2のチャンネルとを含むエラストマー性マイクロ流体デバイスを提供し、剛性ポリマーの当該薄膜を当該エラストマー性マイクロ流体デバイスの外面と接触させる方法が企図される。膜によって分離され

40

50

た1つ又は複数のチャンネル、外面、及び当該外面の少なくとも1つと接触している剛性ポリマーの薄膜を含むエラストマー性本体を含む流体デバイスが企図される。膜によって分離された第1のチャンネル及び第2のチャンネル、及び1つ又は複数の外面を含むマイクロ流体デバイスを含むシステムが企図され、当該外面は剛性ポリマーの1つ又は複数の薄膜と接触する。当該薄膜はマスクとみなすことができる。本明細書の目的のために、マスクは、ガス又は分子の輸送を制限又は許容するためのポリマーの層とみなすことができる。

【0021】

流体デバイスであって、当該流体デバイスは、(i)複数の外側、(ii)当該本体内部に配置された第1のチャンネル、(iii)当該本体内部に配置された第2のチャンネル、(iv)当該第1のチャンネルと第2のチャンネルとの間に配置された膜、及び(v)当該複数の外側のうちの1つ又は複数の外側に接触する1つ又は複数のガス不透過性マスクを含む。

10

【0022】

ガス輸送を制御する方法が企図され、a) i) 複数の外側及び ii) 内側チャンネル又はチャンバ内の生細胞を含む実質的にガス透過性のマイクロ流体デバイスであって、0.1 GPa未満の弾性率を有する弾性ポリマーと、0.1 GPa～150 GPaの弾性率を有する1つ又は複数のガス不透過性マスクとを含むマイクロ流体デバイスを提供することと、b) 当該複数の外側のうちの少なくとも1つをガス不透過性マスクと接触させることと、c) 非酸素化培養培地を、ある流量で当該チャンネル又はチャンバに導入することと、を含む。

【0023】

流体デバイスが企図され、当該流体デバイスは、(i)複数の外側、(ii)当該本体内部に配置された第1のチャンネル、(iii)当該本体内部に配置された第2のチャンネル、(iv)当該第1のチャンネルと第2のチャンネルとの間に配置された膜、(v)当該第1のチャンネル及び第2のチャンネルの少なくとも一方に接触するガス交換器、及び(vi)当該複数の外側のうちの1つ又は複数の外側に接触する1つ又は複数のガス不透過性マスクを含む。

20

【0024】

ガス輸送を制御する方法であって、a) i) 複数の外側、ii) ガス交換器、及び iii) 内側チャンネル又はチャンバ内の生細胞を含む実質的にガス透過性のマイクロ流体デバイスであって、0.1 GPa未満の弾性率を有する弾性ポリマーを含むデバイスを提供することと、b) 当該ガス交換器をマスクングすることなく、当該複数の外側の少なくとも1つに実質的にガス不透過性のマスクを追加することと、c) 非酸素化培地を、ある流量で当該チャンネル又はチャンバに導入することであって、当該生細胞へのガス輸送速度が当該ガス交換器によって制御される、非酸素化培養培地を導入することと、を含む。一実施形態では、当該実質的にガス不透過性のマスクは、ポリエチレンテレフタレート(PET)フィルムを含む。

30

【0025】

本明細書に提示される本発明の一実施形態は、米国特許第8,647,861号においてマイクロ流体デバイスを製造するために最も一般的に使用される材料(例えばPDMS)が、生体異物及び小分子に対して高吸収性である可能性を有するという発見に続く、米国特許第8,647,861号に提示されたマイクロ流体デバイスの改良である。

40

【0026】

マイクロ流体デバイスが企図され、0.1 GPa未満の弾性率を有する実質的にガス透過性ポリマーを含む複数の外側、及び当該複数の外側の少なくとも1つに取り付けられた実質的にガス不透過性のマスクを含む。一実施形態では、当該実質的にガス不透過性のマスクは、ポリエチレンテレフタレート(PET)フィルムを含む。

【0027】

本発明の一実施形態は、コーティングを適用することである。マイクロ流体デバイス、灌流マニホールドアセンブリ、及び／又はそれらの構成要素は、コーティングされてもよい。コーティングは、スルーフィルム、刷毛塗り、スプレーコーティング、スピンコーティング、蒸着、ロールオン、めっき、浸漬コーティングなどの様々な方法で適用すること

50

ができる。コーティングは、基材を完全に覆う全面的なものであってもよく、或いはコーティングは基材の一部又は部分のみを覆ってもよい。コーティングは、吸収抵抗、ガス抵抗、水和性、接着性、耐食性、水和性、導電性などの基材の表面特性を変化させるために適用されてもよい。コーティングは、指定された厚さとして適用されてもよい。コーティングは、液体、気体又は固体として適用されてもよい。

【0028】

米国特許第8,647,861号明細書に開示されているようなマイクロ流体デバイスの本体への吸収の問題を克服するために、マイクロ流体デバイスは、ガラス、環状オレフィンコポリマー(COP)などであるがこれらに限定されない剛性材料から構築されるように再設計された。これらの剛性マイクロ流体デバイスは、PCT/US2014/071570に詳述されている。一実施形態では、本明細書に提示される本発明は、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスを含む。簡単に言えば、マイクロ流体デバイスは、マイクロ流体デバイスのバルク内への小分子吸収並びにガス流を制限する。一実施形態では、この低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、剛性ポリマーから製造される。一実施形態では、本明細書に提示される本発明は、膜によって分離された第1のチャンネル及び第2のチャンネルを含む剛性マイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、1つ又は複数のマイクロ流体チャンネルを含む固体基材を含む。低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスへの途中で設計されているが、様々な有用な用途を有する独特の発明である。一実施形態では、剛性又は低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、複数のマイクロ流体チャンネルを含む。例示的な実施形態では、剛性又は低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、a) 1つ又は複数のマイクロ流体チャンネルを含む基材、及びb) 当該1つ又は複数のマイクロ流体チャンネルを1つ又は複数の第1のチャンバ及び第2のチャンバに分離する多孔質膜を含む。マイクロ流体デバイスは、基材、膜、チャンバ又はチャンネル構成によって制限されることを意図しない。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンバは、垂直に向けられている。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンバは、水平に向けられている。当該第1及び第2のチャンバはまた、チャンネルと呼ばれてもよい。当該第1及び第2のチャンバは、水平に向けられている場合、上部及び底部チャンバ又はチャンネルと呼ばれてもよい。第1の流体は、当該第1のチャンバを通して適用されてもよい。第2の流体は、当該第2のチャンバを通して適用されてもよい。

【0029】

低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、ガラス、環状オレフィンコポリマー(COP)などのものであるがこれらに限定されない剛性又は低吸収性ガス不透過性材料を使用して製造することができる。低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスとは異なり、一般に小分子の吸収に抵抗性であるため、PDMSを含むエラストマー性材料から製造されたものなどの高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスに有利であるとみなすことができる。別の方法では、剛性マイクロ流体デバイスは、小分子又は生体異物の吸収に対して不透過性であると考えられ得るので、剛性マイクロ流体デバイスは、エラストマー性マイクロ流体デバイスに有利であるとみなすことができる。いくつかの実施形態では、剛性材料は、PDMSへの分子の吸収の程度と比較して、例えば少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%以上を含む、分子の吸収を少なくとも約10%以上減少させることができる。

【0030】

マイクロ流体デバイスが企図され、0.1 GPa~150 GPaの弾性率を有する実質的にガス不透過性のポリマーを含む複数の外側、及び実質的にガス透過性の内側チャンネル壁を含む。一実施形態では、当該実質的にガス透過性の内側チャンネル壁は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を含む。

【0031】

これらの利点及び実験プロトコルを修正してこれらの低吸収性ガス不透過性マイクロ流

体デバイスを可能にする能力にもかかわらず、これらは、周囲ガス流の不足に悩まされる。いくつかの一般的に使用されるマイクロ流体デバイスは、P D M S 及び他のガス透過性又は多孔性又はエラストマー性材料などのエラストマー性又はガス透過性材料から製造される。科学者はマイクロ流体デバイスのバルク材料を通して周囲ガスを導入するために、P D M S などのこれらの材料のガス透過性特性に頼ることが多い。場合によっては、完全にガス不透過性のマイクロ流体デバイスは、酸素などの周囲ガスにアクセスすることができないため、細胞などの検体に害を及ぼす可能性がある。いくつかの種類の細胞培養物などの特定の検体は、生理学的に関連するために、又は生存するためにさえ、特定のレベルの特定のガスを必要とする。しかし、実験プロトコルは、より高流量及びより高いガス濃度を有する培地の使用などの技術の使用を通じて、より高いレベルの所望のガスが低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスに導入され得るように適合されてもよい。

10

【0032】

マイクロ流体デバイスへのガス送達を増加させるためのいくつかの方法がある。これらの方法は、マイクロ流体デバイス内への培地の流量を増加させて、時間と共に細胞上を流れるガス含有培地の体積を増加させること、マイクロ流体デバイスを通して流れる培地の溶解ガス含有量を増加させること、培地の再循環、高濃度の周囲ガスを有する環境からデバイスのガス不透過性／ガス消費内部への、次いで再び戻る培地の往復運動、及びマイクロ流体デバイスバルク材料を介して外部周囲環境からマイクロ流体デバイスの内部にガスを送達することを含む。

【0033】

したがって、本発明は、これらの剛性又は低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスを使用するためのいくつかのプロトコルを企図する。第1のプロトコルは、流体又は培地の溶解ガスを介してマイクロ流体デバイスのチャンネル内にガスを輸送するために、これらの剛性又は低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスを高流量の流体又は培地で灌流することである。一実施形態では、マイクロ流体デバイスへのガス輸送の増加は、酸素などの重要なガスを含む培地のより高流量をマイクロ流体デバイスに使用することによって達成することができる。この実施形態では、培地の流量が高いほど、設定された時間量でより多くの培地がマイクロ流体デバイスに導入され、したがってより多くの所望のガスがマイクロ流体デバイスに導入される。ガス輸送を増加させるためのマイクロ流体デバイスにおける高流量の使用は、そうでなければガスがマイクロ流体デバイス内に元来拡散しない可能性があるため、ガス不透過性マイクロ流体デバイスにおいて有用である。流量の増加はまた、呼吸の副産物として細胞によって生成される二酸化炭素などの望ましくないガスを除去する。興味深いことに、流速が増加すると、マイクロ流体デバイス内の化合物分布も著しく改善される可能性があり、その結果、小分子の大部分はチャンネルの第1の部分に吸収されない。これらの実験を行っている者は、チャンネル全体にわたる薬剤、薬物などの分布を改善する際に、流量をわずかでも増加させることがどれほど効果的であるかに驚いた。

20

30

【0034】

多くの場合、これらの剛性又は低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、細胞呼吸を受けている細胞を含むものなどの特定の実験に必要な酸素を送達するために、培地をほぼ連続的に灌流しなければならない。酸素は、バルク材料を直接通るガス透過性マイクロ流体デバイスのより効率的な経路とみなされ得るものとは対照的に、マイクロ流体デバイスに入る培地に溶解した酸素を介して送達される。効率は、マイクロ流体デバイスの本体への分子吸収を制限するために放棄される。例えば、細胞を含むマイクロ流体デバイスが静止したままである場合、すなわち、酸素を含む培地による灌流がない場合、長期間にわたって、細胞は、生存能力及び機能が低下し、重篤な場合には、アポトーシス又は壊死を生じる。驚くべき発見において、マイクロ流体デバイス内で培養された肝臓の肝細胞の場合、肝細胞は、流体流を停止してから数分以内に酸素欠乏という負の結果を経験することが発見された。肝細胞は、高度に代謝的に活性な細胞型である。同様に、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスにおいて細胞の生存能力及び機能を確保するのに十分な酸

40

50

素を送達するためには、肝細胞の培養に通常使用される流量よりも高流量でデバイスを灌流する必要があることが見出された。この課題を軽減するために、これらのマイクロ流体デバイスにおける肝細胞の培養に通常使用されるよりも高流量が利用されており、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスが静止したままである、すなわち培地灌流がない時間が最小限に抑えられた。実験により、典型的には流体流がない又は静的条件下で行われる細胞播種ステップの多くを短縮することができ、通常使用されるよりも高流量を装置に利用することができることが発見された。例えば、これらの剛性又は低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、マイクロ流体デバイスへの適切な細胞の付着のために長期間静止している必要はないことが見出された。例えば、特定の試験では、マイクロ流体デバイス内の細胞を膜に付着させるために、マイクロ流体デバイスを流れのない状態で反転させる必要があり得る。この場合、細胞は流れがなくてもよく、したがって細胞が必要とする酸素がなくてもよい。しかし、この場合であっても、マイクロ流体デバイスは、必ずしも長期間にわたって流れのない状態で反転させる必要はないことが見出された。驚くべきことに、これらの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスを、播種直後に、たとえ高流量であっても流れに接続しても、デバイス内で培養された細胞に対する悪影響は最小限であった。気泡を除去するために使用され得る、時々の高流量のサイクルはまた、内部の細胞層に対して明らかな負の結果を伴わずに、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス上で使用され得る。更に、時間を節約し、マイクロ流体デバイスが静的なままである時間を最小限に抑えるために、内皮細胞の播種及び細胞外マトリックスの適用を同じステップで行うこと、播種プロトコル全体を凝縮すること、これらのマイクロ流体デバイスの使用を他のマイクロ流体デバイス設計よりもユーザフレンドリで有利にすることを含む、いくつかの時間集約的で連続的なステップを組み合わせることができることが見出された。

10

20

30

40

50

【0035】

ガス輸送を制御する方法が企図され、a) チャネル又はチャンバ内に剛性ポリマー及び生細胞を含む実質的にガス不透過性のマイクロ流体デバイスを提供することであって、当該生細胞がガス消費速度を有する、マイクロ流体デバイスを提供することと、b) 当該チャネル又はチャンバに、ある流量で培地を導入することであって、当該培養培地が、ガスを担持し、当該生細胞へのガス輸送速度が、当該流量によって制御され、当該ガス輸送速度が、当該ガス消費速度を満たすか又は超える、培養培地を導入することと、を含む。一実施形態では、当該剛性ポリマーは、0.1～150 GPaの弾性率を有する。一実施形態では、当該剛性ポリマーは、ポリカルボナートである。一実施形態では、当該流量は、40 μ L/時より大きい。一実施形態では、方法は、ガス輸送速度を増加させるために流量を増加させることを更に含む。一実施形態では、方法は、薬物又は薬物候補を当該チャネル又はチャンバに導入することを更に含み、当該剛性ポリマーは、PDMSへの吸収の程度と比較して、当該薬物又は薬物候補の吸収を少なくとも約70%以上減少させる。一実施形態では、方法は、細胞アッセイ及び／又は目視検査によって当該細胞の生存能力を評価することを更に含む。

【0036】

しかし、マイクロ流体デバイスへの培地の流量を増加させることは、インピボでの流体が特定の流量で流れるため、生理学的に関連しない可能性がある。通常、細胞などの検体を、インピボで見られるのと同様のインピトロ条件に曝露することが望ましい。流体流量は剪断に直接関係しており、マイクロ流体デバイスへの培地の流量を増加させると、細胞などの検体が過度のレベルの剪断に曝露される可能性がある。過度のレベルの剪断は、特に高剪断が、典型的には低剪断／流体流に曝露されるか、又は剪断／流体流に曝露されない細胞を含むチャネル内にある場合に、悪影響を及ぼし得る。デバイスを通る培地の流速は、マイクロ流体チャネルに分泌された細胞因子を介して細胞が互いに連通する能力に影響を与える。特に、過度に高流量では、これらのサイトカイン及び他の溶解因子は、マイクロ流体デバイスを通過する大量の培地に希釈される。高流量は、因子を効果的に洗い流し、細胞がシグナルを感知することを防止することができ、したがって、再現しようとする適切なインピボ応答を妨害又は防止することができる。同様に、シグナル伝達因子がよ

り高流量によって希釈され得るのと同様に、細胞によって排出される種々の因子もまた、定量されている流出培地に排出され得る。例えば、代謝速度が評価されている場合、投与された化合物の代謝された形態の濃度は、非常に希薄であり得るので、その濃度が分析機器の検出下限を下回る場合、培地中で効果的に検出できない。投与される化合物の枯渇によって代謝が検出されている場合、高流量は、マイクロ流体デバイスを通ずる際に親化合物の濃度の変化を減少させ、この変化の検出も不可能にする可能性がある。言い換えれば、高流量は、分析機器のノイズのレベルまで感知されている「シグナル」を減少させ、定量を不可能にする可能性がある。原理は、細胞間シグナル伝達についても同様であり、放出された因子は、他の細胞が検出し応答することができる濃度未満に希釈される。最後に、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス内の細胞には培地流を介して酸素が供給されるため、このアプローチの主な制限は、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスが流体流から除去された場合にデバイス内の細胞が酸素を受け取らないことである。マイクロ流体デバイスは、デバイス内の細胞を顕微鏡下で画像化し、また、灌流マニホールドアセンブリの入口及び出口培地リザーバに培地を補充するために、流れを停止する周期的な期間を必要とすることが多いため、内部の細胞に悪影響を及ぼすことなく低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスを流れから除去することができないことは、大きな実用上の制限を提示する。実際、細胞層への酸素の送達、細胞の基本的な機能に不可欠であり、生存能力を維持するために必要であり、培地の流れが長期間停止すると、剛性の低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス内の細胞が死滅する傾向がある。

10

20

【0037】

細胞を播種したマイクロ流体デバイスにおいて流体を高流量で流すことの欠点を考慮して、他の代替物が開発された。本明細書における本出願の別の実施形態は、再循環流体と共に米国特許出願第15／105,388号の剛性マイクロ流体デバイスを使用するためのプロトコルである。この実施形態では、マイクロ流体デバイスを出る流体は、マイクロ流体デバイスの入口に再循環されてもよい。この設定は、必要な流体又は培地の量を減少させるだけでなく、マイクロ流体デバイスに再導入された場合に有益となる培地内の重要な化学的又は生化学的マーカーを保存する。例えば、細胞は、パラクリンシグナル及びオートクリンシグナルなどのシグナルを分泌する。細胞シグナルを無駄にせず、代わりに細胞と連続的に接触させることが有利である。

30

【0038】

一実施形態では、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスが企図され、i) 表面上の細胞と、ii) 入口及び出口ポートであって、当該入口及び出口ポートが再循環経路と流体連通している、入口及び出口ポートと、2) 培養培地を当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスにある方向に流すことによって、流体を当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスの当該出口ポートから流出させ、当該再循環経路に流入させ、当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスの当該入口ポートの方向に移動させることと、を含む。一実施形態では、当該流体は、当該入口ポートの方向に移動して当該入口ポートに到達し、それによって流体流の方向を反転させることなく当該培養培地を再循環させる。再循環培地中の分泌因子及び廃棄産物は細胞に再循環されるが、非再循環培地では、分泌因子及び廃棄産物は永久的に除去される。再循環が望まれる場合、所与の体積の培養培地（例えば、その全て、その一部など）が再循環されるが、非再循環灌流では、培養培地はシステムを通して灌流され、廃棄物に直接送られる。再循環培地中の分泌因子及び廃棄産物を、全培養培地体積（ただし、これは第2のリザーバの使用によって回避することができ、第2のリザーバはチューブを使用することによって回避することができる）に希釈する。一実施形態では、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスを通して流れた培地を回収し、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスを通して再循環させることができる。一実施形態では、培地は1回再循環される。別の実施形態では、培地は複数回再循環される。再循環培地は、3つの問題である、マイクロ流体デバイス内の検体が、培地に投入された実験化合物に更に曝露される可能性があること、培地が、再循環の間に栄養素で再充填することができること、細胞シグナル伝達因子及び分析的に定量化される因子の両方が、シングルパスの高流

40

50

量溶液に必要な高容量によって細胞の読み出しが希釈されないことを解決する。流量を増加させても、デバイスが流体流から除去されると、酸素の送達及びCO₂の除去が停止するという実用的な問題は解決されない。

【0039】

再循環設定の一実施形態では、培地は低吸収性ガス透過性チューブを通して流れ、そこでマイクロ流体デバイスに流入する前に周囲ガスと接触する可能性がある。マイクロ流体デバイスの内部にある間に、検体によって周囲のガスが枯渇した培地は、周囲環境と急速に平衡する。

【0040】

一実施形態では、培地が細胞を通過すると、細胞呼吸のために培地中の酸素濃度が枯渇する。マイクロ流体デバイス内で両方の酸素レベルを所望の流量に維持する一実施形態では、再循環実験設定を使用することができる。一実施形態では、マイクロ流体デバイスを通して再循環され、CO₂が培地から除去される前に、培地を再酸素化することができるように再循環設定が使用される。別の実施形態では、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス内の細胞が、所望の流速を維持しながら、投与化合物への長時間の曝露を受けるように、再循環設定が使用される。この設定では、往復運動によって可能にされる小さな体積により、長い曝露時間が可能になる。一実施形態では、高い剪断速度を必要とする細胞に低クリアランス化合物を投与する。低クリアランス化合物は細胞でゆっくり代謝される。高流量を使用して、細胞に高い剪断力を生じさせ、細胞に送達される酸素の量を増加させることができる。しかし、高流量が使用される場合、細胞は、一般に、有意な量の代謝が起こるのに十分に長い間、低クリアランス化合物に曝露されず、この代謝の定量化は、検出はもちろんのこと、不可能である。再循環設定を使用して、代謝を検出及び定量するのに十分な長さで細胞を低クリアランス化合物に曝露しながら、高流量を維持することができる。

【0041】

別の実施形態では、マイクロ流体デバイスを通して流れる培地の溶解ガス含有量をマイクロ流体デバイスに入る前に増加させることができる。一実施形態では、培地を通してガスを吹き込むことによって、培地の溶解ガス含有量をマイクロ流体デバイスに入る前に増加させることができる。このガス混合物の含有量は、達成しようと試みる目的に基づいて決定することができ、溶存酸素を増加させることを目的とする場合、高濃度の酸素を含有するガス混合物を利用することができる（例えば、100%の酸素を培地に吹き込むと、21%の酸素のみである大気と比較して培地の酸素含有量が5倍増加する）。別の実施形態では、培地の溶解ガス含有量は、所望のガス又は所望のガスのキャリアで培地を加圧することによって、マイクロ流体デバイスに入る前に増加させることができる。大気圧は約101 kPaであり、一例として、202 kPaで加圧することにより、ガス濃度は二倍に増加する。一実施形態では、培地内の酸素の濃度は、大気レベルよりも高い酸素濃度で培地を加圧することによって、又はヘモグロビン、パーフルオロカーボン系酸素キャリア、ヘモシアニンなどの培地内の酸素キャリアを使用することによって増加させることができる。一実施形態では、培地を加圧するガスはガスブランケットであってもよい。しかし、培地の溶解ガス含有量を単に増加させることは、インピボの流体が特定の濃度のガスを含有するので、生理学的に関連しない可能性がある。通常、細胞などの検体を、インピボで見られるのと同様のインピボ条件に曝露することが望ましい。酸素キャリアは一般に、溶存酸素を増加させることなく酸素運搬能力を増加させるので（追加の酸素はキャリアに結合し、培地に溶解しない）、この制限を受けない。より高流量で培地を流すこと及び培地の溶存ガス含有量を増加させることの両方はまた、以下の重大な欠点がある。培地がマイクロ流体デバイスを通して流れる際に、チャンネルの開始部の検体は、所望のガスのレベルが高くなる。次いで、チャンネルの開始部の検体は、高レベルの当該ガスを取り込み、検体のためのより低いレベルの所望のガスをチャンネル内に更に残すことができる。細胞酸素曝露レベルの空間的勾配は、細胞応答の勾配をもたらす可能性があり、これは、マイクロ流体デバイスからの流出物がマイクロ流体デバイスを通過する際に培地のプールされた

10

20

30

40

50

サンプルであるため、評価が困難である。この解決策も、一旦培地の灌流が停止すると、酸素の送達及びCO₂の除去も停止するという実際的な問題を解決しない。

【0042】

しかし、再循環システムは、設定及び使用が困難である可能性がある。例えば、蠕動ポンプは、再循環設定に必要であることが多い。蠕動ポンプの欠点としては、サイズの制限、及び可撓性チューブを必要とすることが多いことが挙げられる。可撓性チューブは、弾性ポリマーで作られることが多い。前述のように、弾性ポリマーは材料吸収を受けやすい。したがって、本発明の一実施形態は、往復運動する流体と共に米国特許出願第15／105,388号の剛性マイクロ流体デバイスを使用するためのプロトコルである。本明細書で使用される場合、往復運動は、マイクロ流体デバイスを通して流体を一方向に流し、その流体を収集し、次いでマイクロ流体デバイスを通して同じ流体を他の方向に流すことである。マイクロ流体デバイスを介した流体又は培地の往復移動は明らかではないか、又は直感的な流体は身体を通して往復運動しない。しかし、驚くべきことに、マイクロ流体デバイス内の細胞は、マイクロ流体デバイス内で培地を往復させた際に高レベルの生存能力を示した。流体がマイクロ流体デバイス内で往復運動する際に、単純な二方向ポンプを使用することができ、少量の培地を使用することができ、周囲ガスレベルをマイクロ流体デバイスのチャンネルに導入することができ、培地は細胞によって分泌されたシグナルを保持する。

10

【0043】

ガス輸送を制御する方法であって、a) i) 表面上の生細胞と、ii) 入口及び出口ポートとを含み、当該入口及び出口ポートがiii) 再循環経路と流体連通している、実質的にガス不透過性のマイクロ流体デバイスを提供することと、b) ガスを含む培養培地を、ある方向に当該マイクロ流体デバイスの当該入口ポートに、ある流量で流し、それによって流体を当該マイクロ流体デバイスの当該出口ポートから出て当該再循環経路に入らせ、それによって流体流の方向を反転させることなく当該培養培地を再循環させ、当該再循環によって当該生細胞へのガス輸送速度が増加することと、を含む。一実施形態では、当該剛性ポリマーは、0.1～150 GPaの弾性率を有する。一実施形態では、当該流量は、40 uL／時以下である。

20

【0044】

ガス輸送を制御する方法であって、a) i) 表面上の生細胞と、ii) 入口及び出口ポートとを含み、当該入口及び出口ポートがiii) 往復運動アクチュエータと流体連通している、実質的にガス不透過性のマイクロ流体デバイスを提供することと、b) ガスを含む培養培地を、ある方向に当該マイクロ流体デバイスの当該入口ポートに、ある流量で流し、それによって流体を当該出口ポートの方向に移動させることと、c) 当該往復運動アクチュエータを用いて当該流体を往復運動させ、それによって流体流の方向を反転させ、当該往復運動によって当該生細胞へのガス輸送速度が増加することと、を含む。一実施形態では、当該剛性ポリマーは、0.1～150 GPaの弾性率を有する。一実施形態では、当該流量は、40 uL／時以下である。

30

【0045】

高流量、再循環及び往復運動の利点にもかかわらず、サンプルを採取し、顕微鏡下で画像化し、新しい細胞型を追加するなどのために、これらの剛性のマイクロ流体デバイスを流れから取り外す必要がある場合がある。流れのない状態が数分続いただけで、マイクロ流体デバイス内のいくつかの細胞型は酸素不足に陥り始めることが分かっている。この発見に続いて、剛性ポリマーと弾性ポリマーとの戦略的組合せから製造されたマイクロ流体デバイスが、マイクロ流体デバイスが伸張できることを確実にするため、ほとんどより重要なことには、マイクロ流体デバイス内のチャンネルが周囲ガスにアクセスすることができることを確実にするために開発された。往復運動は、国際特許出願第PCT／US2019／25449号に教示されており、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0046】

流量の柔軟性、培地中のガスの制御された一貫した生理学的に関連する溶解濃度、物理

50

的に関連する環境が望まれる場合、及び／又はマイクロデバイスを流体流から短期間除去することを可能にするユーザフレンドリなワークフローの場合、低吸収性及びガス透過性の両方であるマイクロ流体デバイスが有利である。したがって、低吸収性であるが制御可能なガス透過性を有するように製造されたマイクロ流体デバイスは、試験される重要な化合物の吸収性を低下させ、実験中に細胞が周囲ガスにアクセスすることを可能にするため、完全にガス不透過性のマイクロ流体デバイスと比較して有利である。一実施形態では、ガス透過性材料とガス不透過性材料との戦略的組合せから製造されたマイクロ流体デバイスが企図される。次いで、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスを使用して収集された結果に基づいて、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスが所望された。いくつかの実施形態では、このマイクロ流体デバイスの材料構成は、PDMSへの分子の吸収の程度と比較して、例えば少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%以上を含む、分子の吸収を少なくとも約10%以上減少させることができる。

10

20

30

【0047】

得られる低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスが企図され、内部に少なくとも1つのチャンネルを有する本体を含み、当該チャンネルがチャンネル壁及び膜を有し、当該チャンネル壁及び膜の少なくとも一方がエラストマー性である。マイクロ流体デバイスは、エラストマー性壁及びエラストマー性膜を含むチャンネルを有しながら、主に剛性であってもよい。膜は、当該膜の両側でのガス輸送を容易にするためにエラストマー性であってもよい。チャンネルの壁は、必要に応じて膜の伸張を容易にするためにエラストマー性であってもよい。しかし、いくつかの実施形態では、差圧を使用して当該膜を伸張させることができ、その場合、本体及びチャンネル壁は剛性であってもよいが、単純に膜はエラストマー性である。膜のみがエラストマー性である実施形態では、膜が一実施形態における膜の小さな体積を表し得るので、吸収材料の量は最小限に抑えられ得る。一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、内部に少なくとも1つのチャンネルを有する本体を含み、当該チャンネルは、エラストマー性壁及びエラストマー性膜を有し、当該本体の少なくとも一部は剛性である。更に、エラストマー性チャンネル壁及び膜を含む実施形態は、本体が完全に剛性である実施形態よりも更なる製造ステップを必要とし得る。一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、内部に少なくとも1つのチャンネルを有する本体を含み、当該チャンネルは、剛性壁及びエ

【0048】

得られる別の低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスは、内部にチャンネルを有する本体と、ガス交換器とを含むマイクロ流体デバイスである。低吸収性マイクロ流体デバイスは、本体が分子を吸収しない一方で、ガス輸送が依然としてマイクロ流体デバイス内で起こることができるように、剛体及びガス交換器を含むことができる。ガス交換器はマイクロ流体デバイスの任意の部分にあってもよいが、例示的な実施形態では、ガス交換器は、ガスが周囲環境からチャンネル内の細胞培養物と交換することができるように、チャンネルと接触している。

【0049】

一実施形態では、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスは、チャンネルを有する低吸収性本体を含み、当該チャンネルはチャンネル壁を有し、当該チャンネル壁は周囲環境と接触するガス交換器を含む。一実施形態では、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスは、チャンネルを有する低吸収性剛性本体を含み、当該チャンネルはチャンネル壁を有し、当該チャンネル壁は周囲環境と接触するガス透過性材料を有するガス交換器を含む。

【0050】

一実施形態では、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスは、1つ又は複数のマイクロ流体チャンネルを含む固体基材を含む。一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、複数のマイクロ流体チャンネルを含む。例示的な実施形態では、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスは、a) 単一のマイクロ流体チャンネルを含む固体基材、b) 当該単一のマイク

40

50

口流体チャネルを第1のチャンバと第2のチャンバとに分離する多孔質膜、及びc) マイクロ流体デバイスの外側の周囲環境からマイクロ流体デバイスへのガス輸送を可能にするガス交換器を含む。マイクロ流体デバイスは、基材、膜、チャンバ又はチャネル構成によって制限されることを意図しない。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンバは、垂直に向けられている。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンバは、水平に向けられている。当該第1及び第2のチャンバはまた、チャネルと呼ばれてもよい。当該第1及び第2のチャンバは、水平に向けられている場合、上部及び底部チャンバ又はチャネルと呼ばれてもよい。

【0051】

一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、第1及び第2のチャネル層から製造される。当該第1のチャネル層は、第1の表面及び第2の表面を含むことができる。当該第2のチャネル層は、第3の表面及び第4の表面を含むことができる。マイクロ流体チャンバ又はチャネルは、当該表面上に配置することができる。例えば、チャンバは、基材表面上にエッチング、成形、又は切断されてもよい。一実施形態では、当該第1の表面は、当該第1のチャンバを含む。一実施形態では、当該第3の表面は、当該第2のチャンバを含む。当該第1のチャネル層は、第1の層又は第1の基材と呼ぶことができる。当該第2の基材は、第2の層又は第2のチャネル層と呼ぶことができる。第1及び第2のチャンバ又はチャネルが垂直に向けられている場合、当該第1のチャネル層は、最上層又は上部基材と呼ぶことができる。第1及び第2のチャンバ又はチャネルが垂直に向けられている場合、当該第2のチャネル層は、底部層又は底部基材と呼ぶことができる。

【0052】

例示的な実施形態では、膜は、第1及び第2のチャネル層の間に挟まれてもよい。第1及び第2のチャネル層、膜及びガス交換器は、恒久的又は一時的に取り付けられてもよい。第1の流体は、当該第1のチャンバを通して適用されてもよい。第2の流体は、当該第2のチャンバを通して適用されてもよい。一実施形態では、層は、プラズマ活性化結合によって取り付けられる。米国特許第8,647,861号に提示されているマイクロ流体デバイスとは異なり、本明細書に提示されているマイクロ流体デバイスは、機械的作動のための作業チャネルを任意選択的にのみ含むことができる。

【0053】

一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、器官のマイクロバイオームの特性評価に使用される。一実施形態では、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスを使用して、薬剤、食品、化学物質、化粧品、生理学的刺激薬ストレスなどが細胞系に及ぼす影響を試験することができる。異なる細胞型は、増殖するために異なる量の酸素を必要とすることがある。細胞の健康が目標である場合、細胞が必要なだけの酸素にアクセスできることを保証するために、デバイスに入る酸素は、マイクロ流体デバイス内の酸素取り込み速度よりも大きくなければならない。例えば、肝臓の肝細胞は、大気レベルの酸素を必要とすることが多く、腸内の一部の細菌培養物は必要とする酸素が非常に少ない。したがって、マイクロ流体デバイス、特に細胞生物学における用途を有するマイクロ流体デバイスは、必要なレベルの酸素がマイクロ流体デバイス内の細胞、実験などに到達することを依然として可能にしながら、低吸収性であることによって利益を得る。しかし、多くの場合、低吸収材料はガス不透過性である傾向がある。このようにして、材料吸収性の量を最小限に抑えるマイクロ流体デバイスは、ガス透過性及びガス不透過性構成要素の組合せを用いて設計することができる。

【0054】

考慮されるべきマイクロ流体デバイス材料の選択の別の重要な態様は、透明性である。光透過性は、複数の理由からマイクロ流体デバイスにおいて有利である。透明性は画像化に有利である。一実施形態では、本明細書に記載の低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスは、倒立顕微鏡、正立顕微鏡、共焦点顕微鏡、光学顕微鏡、電子走査顕微鏡などの顕微鏡と共に使用することができる。透明性はまた、光遺伝学的に活性な細胞の使用にも有利である。一実施形態では、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの細胞層は、光遺

伝学的に活性な細胞の層を含む。一実施形態では、マイクロ流体デバイスを構成する材料も生体適合性である。本明細書に提示されるマイクロ流体デバイスの例示的な使用は、細胞を培養するための使用であるため、生体適合性が重要である可能性がある。

【0055】

顕微鏡上でマイクロ流体デバイスを画像化することにより、科学者は細胞相互作用、表現型などについて詳細な視点を得ることができる。不透明であることで、科学者は、必要に応じて周囲の光から実験を保護することができる。一実施形態では、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスは、不透明材料から製造される。したがって、本明細書に提示されるマイクロ流体デバイスは、実験及び特定の実施形態の必要性に応じて、部分的又は全体的に透明又は全体的に不透明であってもよい。

10

【0056】

第1及び第2のチャンネル層は、流体の移動及び実験ハウジングのための1つ又は複数のチャンネル又は経路を含む基材を含む。各チャンネル層は、1つ又は複数のマイクロ流体チャンネルを含むことができる。別の実施形態では、各チャンネル層は複数のチャンネルを含むことができる。マイクロ流体デバイスが垂直方向に組み立てられる一実施形態では、第1のチャンネル層は上部チャンネル層とみなすことができ、第1又は上部チャンネルを含み、第2のチャンネル層は底部チャンネル層とみなすことができ、第2又は底部チャンネルを含む。特定の実施形態では、第1のチャンネルは、膜の上方のその位置のために上部チャンネルと呼ぶことができ、第2のチャンネルは、膜の下方のその位置のために底部チャンネルと呼ぶことができる。そのような実施形態では、膜が第1及び第2のチャンネルを分離する。

20

【0057】

チャンネル内に含まれる実験には、細胞増殖及び試験が含まれる。一実施形態では、細胞層を形成するように、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスのチャンネル内で細胞を増殖させる。一実施形態では、上皮細胞が、上部チャンネル層における第1のチャンネルにおいて増殖させられ、内皮細胞が、底部チャンネル層における第2のチャンネルにおいて増殖させられる。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンネル内で培養された上皮及び内皮細胞は、膜によって分離される。

【0058】

チャンネル層内のチャンネルは、チャンネル層自体の高さに等しくすること、又はチャンネル層全体を切断することを含むがこれらに限定されない様々な異なる高さであってもよい。一実施形態では、第1のチャンネルの高さは、チャンネルを含むチャンネル層の高さよりも低い。一実施形態では、第2のチャンネルの高さは、チャンネルを含むチャンネル層の高さよりも低い。第1のチャンネル及び第2のチャンネルの高さは、所望の用途の必要に応じて変えることができる。一実施形態では、チャンネルの高さは、特定の細胞のサイズに適合するように選択される。一実施形態では、チャンネルの高さは、特定の剪断力レベルに適合するように選択される。一実施形態では、チャンネルの高さは、10 μm ~ 5000 μm である。一実施形態では、チャンネルの高さは、100 μm ~ 1000 μm である。一実施形態では、「通常の」チャンネルの高さは100 μm であってもよく、「高い」チャンネルの高さは1000 μm であってもよい。一実施形態では、第1のチャンネルの高さは、チャンネルを含むチャンネル層の高さに等しい。一実施形態では、第2のチャンネルの高さは、チャンネルを含むチャンネル層の高さに等しい。一実施形態では、第1のチャンネルの高さ及び第2のチャンネルの高さは同じである。一実施形態では、第1のチャンネルの高さ及び第2のチャンネルの高さは異なる。一実施形態では、第1のチャンネルの高さは、第2のチャンネルの高さよりも高い。一実施形態では、第1のチャンネルの高さは1000 μm であり、第2のチャンネルの高さは100 μm である。一実施形態では、上皮細胞は第1のチャンネルに播種され、内皮細胞は第2のチャンネルに播種されるため、第1のチャンネルの高さは第2のチャンネルの高さよりも高い。上皮細胞のいくつかの種類は、より大きく、したがって、内皮細胞よりも多くの空間を必要とし得る。第1のチャンネル及び第2のチャンネルの高さの特定の比は、特定の細胞株及び剪断力のレベルに有利である。一実施形態では、第1のチャンネルの高さは、第1のチャンネル全体にわたって一貫している。一実施形態では、第2のチャンネルの高さは、第2のチャ

30

40

50

ネル全体にわたって一貫している。一実施形態では、第1のチャンネルの高さは、第1のチャンネルの長さに沿って一貫していない。一実施形態では、第2のチャンネルの高さは、第2のチャンネルの長さに沿って一貫していない。一実施形態では、第1のチャンネルの高さは、第1のチャンネル内の非細胞培養領域と比較して、細胞培養領域においてより大きい。一実施形態では、第2のチャンネルの高さは、第2のチャンネルの非細胞培養領域と比較して、細胞培養領域においてより大きい。例えば、第1のチャンネルと第2のチャンネルの高さ比は1:1より大きく、例えば1.1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1より大きい。いくつかの実施形態では、第1のチャンネルと第2のチャンネルの高さ比は、1.1:1~約50:1、又は約2.5:1~約50:1、又は2.5~約25:1、又は約5:1~約25:1の範囲であってもよい。一実施形態では、第1のチャンネルと第2のチャンネルとの高さ比は、約10:1~約20:1の範囲である。

10

20

30

40

50

【0059】

異なる実施形態は、異なるチャンネルアライメントを有するマイクロ流体デバイスを含む。チャンネルは、様々なレベルの細胞相互作用を達成するために異なって整列されてもよい。例えば、細胞が膜の2つの対向する側のチャンネル内で培養される場合、膜の両側のチャンネルは、細胞の50%のみが互いに相互作用し得るように、それらが50%のみ重なり合うように整列されてもよい。一実施形態では、膜の第1の側の第1のチャンネルと膜の第2の側の第2のチャンネルとが整列される。一実施形態では、膜の両側の第1及び第2のチャンネルは整列していない。一実施形態では、第1及び第2のチャンネルは部分的に整列される。一実施形態では、流体をマイクロ流体デバイスに導入することができるように、第1又は第2のチャンネルの両端にポート又はパイアがある。一実施形態では、マイクロ流体デバイスインフラストラクチャは、これらのポートを介してマイクロ流体デバイスと流体連通するようにすることができる。第1及び第2のチャンネル層は、同じ又は異なる材料から製造することができる。一実施形態では、第1又は上部のチャンネル層及び第2又は底部のチャンネル層は、同じ材料から製造される。一実施形態では、第1のチャンネル層及び第2のチャンネル層は、異なる材料から製造される。一実施形態では、第1のチャンネル層は、単一の材料で構成される。一実施形態では、第2のチャンネル層は、単一の材料で構成される。一実施形態では、第1のチャンネル層は、複数の材料で構成される。一実施形態では、第2のチャンネル層は、複数の材料で構成される。一実施形態では、第1のチャンネル層は、1つ又は複数のガス透過性材料から製造される。一実施形態では、第1のチャンネル層は、1つ又は複数のガス不透過性材料から製造される。一実施形態では、第2のチャンネル層は、1つ又は複数のガス透過性材料から製造される。一実施形態では、第2のチャンネル層は、1つ又は複数のガス不透過性材料から製造される。低吸収性であることも示されているガス不透過性材料としては、環状オレフィンコポリマー（COP）、環状オレフィンポリマー（COP）、ポリカルボナート、ポリエチレン（PE）、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン（PS）、（PET）ガラスなどが挙げられる。一実施形態では、第1及び第2のチャンネル層は、ガス透過性材料から完全に又は部分的に製造され、吸収性を制限するような方法で改質される。一実施形態では、第1及び第2のチャンネル層は、ガス不透過性材料から部分的に製造されることによって低吸収性を達成することができる。一実施形態では、第1及び第2のチャンネル層は、物質でコーティングすることによって低吸収性を達成することができる。一実施形態では、第1及び第2のチャンネル層は、それらの表面を不透過性に達するように改質させることによって低吸収性を達成することができる。

【0060】

膜は、膜の両側の第1及び第2のチャンネルの間に拡散障壁を提供する。膜はガス不透過性であってもよいが、多くの場合、膜を通る酸素拡散を可能にすることが有益である。したがって、一実施形態では、膜はガス透過性である。一実施形態では、膜はPDMSから製造される。しかし、一実施形態では、膜はガス不透過性である。例えば、上部チャンネル

及び底部チャネルの細胞型は、ガスを交換することから利益を得ることができる。この拡散性の理由から、ガス透過性は、膜層における低吸収性よりも優先されてもよい。いくつかの実施形態では、膜は、上部及び底部チャネル層並びにガス交換器などのマイクロ流体デバイスの他の構成要素の体積と比較してより小さい体積であってもよい。膜が他の成分よりも小さい体積を有する場合、実験化合物の多くを吸収せず、吸収性の影響を最小限に抑える。他の実施形態では、膜は、上部及び底部チャネル環境と棲息生物との間の物理的接触を制限するために非多孔質である。いくつかの実施形態では、膜は、上部及び底部チャネル環境と棲息生物との間の接触を可能にするために多孔質である。一実施形態では、膜層は、層全体にわたって均一／多孔質であるなど、均質である。別の実施形態では、膜層は、上部及び底部チャネルと重なる領域においてのみ多孔質であるなど、不均一である。いくつかの実施形態では、膜は、伸張することを可能にするように可撓性である。この実施形態では、伸張する能力又は作動を達成する能力は、インビボ細胞上の機械的歪みを複製することができるので、膜に付着した細胞を含む実験に有益である。いくつかの実施形態では、伸張又は作動は、マイクロ流体デバイス内の任意の作業チャネル内で真空を使用することによって達成される。いくつかの実施形態では、伸張又は作動は、膜を低圧チャネルの方向に押すように、上部及び底部チャネルに圧力差を有することによって達成される。圧力差によって達成される伸張又は作動は、細胞層に圧力を加えない真空チャネルによる膜の作動よりも生理学的に関連し得るので有利であってもよい。実際、この伸張機構は、圧力差を含む細胞及び組織の機械的伸張のための生理学的機構をよりよく再現する。例えば、動脈は、心臓が拍動し、血液を心室内から動脈管腔に放出するにつれて拡張する傾向がある。この拡張（及び血管系壁を構成する細胞に対する結果として生じる歪み）は、バルーンが空気で加圧されたときに拡張するのと同様に、拍動する心臓によって生成される圧力のために生じる。膜を屈曲させ、これらのインビボ関連株を作製するのに必要な圧力は、一実施形態では、肺の毛細血管床に見られるのと同様の圧力である。より簡単に言えば、一実施形態では、細胞層が曝露される圧力と伸張の両方が、同時に生理学的に関連するように調整される。更に、この実施形態では、膜がチャネル内に物理的に変位し、直線変位とは対照的に円弧の形状をとる（すなわち、膜は伸張するにつれて上下に移動する）ので、この伸張の形状は、血管及び肺胞囊に見られる拡張部の形状をよりよくエミュレートする。

10

20

30

【0061】

前述のように、マイクロ流体デバイス内の重要なガスの低レベルを克服するために、並びに高い連続的に適用される流量及び培地内の高い溶解ガス濃度の使用を回避するために、酸素などの重要なガスがマイクロ流体デバイスを通して拡散することを依然として可能にしながら、分子、物質及び／又は実験化合物の吸収を促進しないような方法で、ガス交換器をマイクロ流体デバイスに組み込むことができる。一実施形態では、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスは、ガス交換器を含む。一実施形態では、ガス交換器の目的は、マイクロ流体デバイスに周囲ガスを導入することである。一実施形態では、ガス交換器の目的は、選択されたガスをマイクロ流体デバイスに導入することである。

【0062】

周囲環境又は所望のガス源と接触するマイクロ流体デバイスの構造要素として、ガス交換器をマイクロ流体デバイスに組み込むことができる。一実施形態では、ガス交換器は、ガス交換器がマイクロ流体デバイス内の1つ又は複数のチャネルを囲むように、チャネルキャッピング層であってもよい。したがって、一実施形態では、ガス交換器は、1つ又は複数のチャネルをキャップする。一実施形態では、ガス交換器は、底部チャネル層に対して床を形成するように、マイクロ流体デバイスの底部に取り付けられる。この実施形態では、底部チャネルの天井は膜であり、底部チャネルの基部はガス交換器である。

40

【0063】

ガス交換器は、単一の材料又は材料の組合せを含むことができる。ガス交換器を製造するために使用される材料は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、室温加硫（RTV）シリコーン、テフロンAF2400、ポリメチルペンテン（PMP）、ポリエチレンテレ

50

フタラート（PET）、ポリカルボナート（PC）、環状オレフィンポリマー（COP）などから選択されてもよい。

【0064】

一実施形態では、室温加硫（RTV）シリコンをガス交換器に使用することができる。一実施形態では、RTVシリコンをマイクロ流体デバイスの本体に噴霧して、ガス交換器を製造することができる。

【0065】

別の実施形態では、テフロンAF2400は、ガス交換器材料として使用することができる。テフロンAF2400は、透明でガス透過性であり、低吸収から非吸収であるため、優れた材料である。一実施形態では、ガス交換器は、ガス透過性及び／又はガス不透過性材料から製造され、次いでテフロンAF2400でコーティングされてもよい。

10

【0066】

別の実施形態では、三井化学の商標名である、一般にTPXと呼ばれるポリメチルペンテン（PMP）をガス交換器として使用することができる。PMP又はTPXは、透明でガス透過性で低吸収性であるため、別の例外的な材料である。ポリメチルペンテン（PMP）は、良好な光学特性、低コスト、射出成形可能、及び多くの溶媒に対する抵抗性など、いくつかの他の有利な特性を有する。アッセイは過酷な溶媒を使用することが多いので、マイクロ流体デバイスがアッセイ中に使用される場合、溶媒に対する抵抗性が重要である可能性がある。溶媒に対する抵抗性は、マイクロ流体デバイスをより広い範囲のアッセイで使用することを可能にすることができる。テフロンAF2400とPMPの両方は、剛性材料であるという追加の利点を有し、通常マイクロデバイスに関連する手動操作に対して安定／堅牢である。PMPは、液体形態及び固体形態の両方で製造され得る。

20

【0067】

いくつかの実施形態では、本発明者らは、TPX又はPMPが結合することが困難である可能性があることを見出した。したがって、他の実施形態では、ガス交換器はPDMSを含む。PDMSは、製造に使用するのが簡単であり、良好に結合するので有利である。一実施形態では、ガス交換器はPDMSの層であってもよい。PDMSは、様々な方法を使用して適用することができる。一実施形態では、PDMSのシート又は層をマイクロ流体デバイスの本体に適用することができる。一実施形態では、PDMSのシート又は層は、スピンコーティングされてもよい。一実施形態では、PDMSのシートは $2\mu\text{m}\pm 0.4\mu\text{m}$ であってもよい。一実施形態では、PDMSは、当該マイクロ流体デバイス上にコーティングされてもよい。一実施形態では、PDMSはスプレーコーティングされてもよい。この方法に関して、本発明者らは、PDMSを溶媒に溶解し、マイクロ流体デバイスの本体をスプレーコーティングした。一実施形態では、ガス交換器は、分子吸光度を最小にするために、PDMSの薄層である。しかし、本発明者らは、PDMSの薄層が場合によっては壊れやすいことを見出した。一実施形態では、ガス交換器は、より耐久性があるようするために、PDMSの厚い層である。しかし、本発明者らは、PDMSのより厚い層がより吸収性であることを見出した。

30

【0068】

一実施形態では、ガス交換器は、上記の欠点を克服するために、異なる材料の組合せであってもよい。ガス交換器の例示的な実施形態では、ガス交換器は、低吸収材料とガス透過性材料との組合せを含むことができる。低吸収材料は、ガスが周囲環境からガス透過性材料を通して流れ、次いで低吸収材料の細孔を通して流れることができるように、多孔質であってもよい。

40

【0069】

一実施形態では、ガス交換器は、PDMSとポリエチレンテレフタレート（PET）又はポリカルボナート（PC）との2層の組合せである。PDMSはガス透過性及び吸収性である。PETはガス不透過性及び非吸収性である。一実施形態では、PETは多孔質であってもよい。

【0070】

50

ガス交換器は、以下のように例示的なプロトコルでマイクロ流体デバイスの本体に製造及び結合することができる。PDMSのシートは、 $2\mu\text{m} \pm 0.4\mu\text{m}$ の厚さまでスピニングコーティングされてもよい。PDMSシートから適切なサイズを切り出すことができる。次いで、PDMSのシートを、PET又はPCなどの多孔質フィルムの対応するサイズに接着することができる。結合は、シラン結合を介して行うことができる。化合物（ビス（3-トリエトキシシリルプロピル）アミン）を100%イソプロピルアルコール（IPA）と混合し、次いで、これを乾燥させる前に多孔質膜にコーティングすることができる。混合物が乾燥したら、PDMSをプラズマ処理することができる。次いで、2つの層を接触によって接着することができる。

【0071】

一実施形態では、ガス交換器の1つの層又は材料は、上述のように多孔質であってもよい。一実施形態では、多孔度はトラックエッチングによって形成される。一実施形態では、ガス交換器の構成要素（PET又はPCなど）の多孔度は、1%~50%である。一実施形態では、多孔度は1%~40%である。一実施形態では、多孔度は1%~5%である。一実施形態では、多孔度は1%である。一実施形態では、多孔度は3%である。一実施形態では、多孔度は11.4%である。一実施形態では、多孔度は40%である。1%、3%、11.4%、及び40%の多孔度は全て、本明細書のマイクロ流体デバイスで調査されている。0.3%、1.6%、3%、5%、5.7%、7.9%、11%、12.5%、14.1%、18.8%、21.2%を含むがこれらに限定されない多孔度も同様に市販されている。更に、任意の割合の多孔度を製造して使用することができる。膜の多孔度は、実験のために調整することができる。膜の多孔度を使用して、マイクロ流体デバイス内の酸素輸送速度を制御することができる。例えば、マイクロ流体デバイス内の細胞の酸素取り込み速度に基づいて、特定の多孔度を有する膜を使用することができる。

【0072】

上述の実施形態では、トラックエッチングされたPETは、ガス交換器に機械的安定性及び低吸収性を与えるための透明なスキャフォールドとして機能し、ガス透過性PDMSの薄層は、デバイスの内部からデバイスの外部への流体の漏れに対してPET細孔を封止する。PDMSと多孔質PETの組合せは、吸収を最小限に抑えながら、ガス交換特性を提供する。この実施形態では、小分子化合物の一部はPETの細孔を介してPDMSに吸収され得るが、ガス交換器が完全に吸収性の材料から製造されていることと比較して、この吸収性は多くの場合無視できるとみなすことができる。更に、ガス交換器のこの実施形態では、多孔質トラックエッチングされたPET及びPDMSガス交換器は、完全にガス不透過性のマイクロ流体デバイスと比較してガス輸送を増加させることができるだけでなく、流体流からガス輸送を切り離すこともできる。

【0073】

ガスケットは、例えば漏れを防止し、又は圧縮を提供するために、2つの合わせ面の間の空間を満たす機械的シールとして定義することができる。一実施形態では、マイクロ流体デバイスはガスケット層を有する。一実施形態では、マイクロ流体デバイスの上面上のガスケット層。一実施形態では、ガスケット層は、第1のチャンネル層の第1のチャンネルから出るポートと相互作用する4つのポートを有する。特定の実施形態では、ガスケット層は、上部チャンネル層の上部チャンネルから出るポートと相互作用する4つのポートを有する。ガスケットは、マイクロ流体デバイスと、関連するインフラストラクチャとの間の緊密な流体接続を確実にするために使用することができる。ガスケット層を含むことは、ガスケット層を含まないマイクロ流体デバイスと比較して漏れの可能性を減少させるため有利である。一実施形態では、ガスケットは圧縮性材料から作製される。別の実施形態では、ガスケットは接着材料から作製される。ガスケットは、灌流マニホールドなどの既存のマイクロ流体デバイス付属品に適合するために、マイクロ流体デバイスをその吸収性先行品と同じサイズに保つために使用することができる。ガスケットは、圧縮嵌めにぴったり合うようにマイクロ流体デバイスの高さを所望のレベルまで上昇させるために、複数の高さで具現化することができる。ガスケットはガス透過性である必要はなく、したがって、ガ

10

20

30

40

50

スケットがそのポートの壁に小分子化合物を吸収しないように、より容易に非吸収性にすることもできる。ガスケットは、部分的又は全体的にガス不透過性の材料から作製されること、ガス不透過性の非吸収性物質でコーティングされること、不透過性に達するようにその表面が改質されること（プラズマ処理など）などによって、非吸収性を達成することができる。一実施形態では、ガスケットはマイクロ流体デバイスの表面全体を覆う。別の実施形態では、ガスケットは、マイクロ流体デバイスの表面の一部のみを覆う。

【0074】

一実施形態では、ガス交換器を特徴とする低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスを使用して、マイクロ流体デバイス内にガス濃度勾配を導入し維持することができる。この実施形態では、特定の濃度のガスをガス交換器に導入することができる。次いで、ガスは、内皮細胞層及び上皮細胞層などの細胞層によって枯渇し、低酸素の第1のチャンネル、上部チャンネル、又は管腔チャンネルをもたらす。例示的な一実施形態では、ガスは酸素である。別の実施形態では、ガスは二酸化炭素である。別の実施形態では、ガスは窒素である。ガス勾配は、様々な透過性の細胞層を導入することによって変更することができる。マイクロ流体デバイスを通るガスの垂直勾配は、マイクロ流体デバイスの全長に沿ってガスの長手方向の濃度を維持する。ガス交換器を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスに酸素勾配が導入される実施形態では、マイクロ流体デバイスの全長に沿った長手方向の酸素濃度が維持される。一実施形態では、選択されたガスを隣接する作業チャンネルを通して流すことによって、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにガス勾配が導入される。一実施形態では、化学反応を使用してガス交換器を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにガス勾配が導入される。別の実施形態では、PETスキャフォールドの多孔度を変化させて、マイクロ流体デバイスの内外により大きなガス流束を供給する。

【0075】

一実施形態では、1つ又は複数のセンサを使用して、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス内のガス勾配を測定することができる。例示的な酸素勾配の実施形態では、1つ又は複数の酸素センサを使用して、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス内の酸素勾配を測定することができる。一実施形態では、センサは電気センサである。一実施形態では、センサは光学センサである。一実施形態では、1つ又は複数のセンサは、マイクロ流体デバイスの外部にある。一実施形態では、1つ又は複数のセンサは、マイクロ流体デバイスのポート又はバイアに挿入される。一実施形態では、1つ又は複数のセンサは、マイクロ流体デバイスに埋め込まれる。一実施形態では、1つ又は複数のセンサは、マイクロ流体デバイスの本体を構成する材料に挿入される。一実施形態では、1つ又は複数のセンサは第1のチャンネル内にある。一実施形態では、1つ又は複数のセンサは第2のチャンネル内にある。一実施形態では、1つ又は複数のセンサは、第1のチャンネルと第2のチャンネルの両方にある。一実施形態では、1つ又は複数のセンサは、上部チャンネルと底部チャンネルの両方にある。複数のセンサは、当該マイクロ流体デバイス内の勾配を測定するために、本明細書に提示されるマイクロ流体デバイスで使用する可以使用。複数のセンサは、酸素勾配を測定するために使用することができる。一実施形態では、センサは、マイクロ流体デバイス内の1つ又は複数のチャンネルの長さに沿って見出すことができ、チャンネルの長さに沿って酸素濃度測定などの測定を行う。

【0076】

ガス交換器自体は、独自の発明とみなすことができる。ガス交換器は、マイクロフルイディクスの分野以外でも多くの用途がある。ガス交換器は、ある領域から別の領域へのガスの輸送、又はガスの交換速度又は流れの制御に有用であり得る。ガス交換器を使用して、ガス流量を維持し、ガス流量を減少させ、又はガス流量を増加させることができる。

【0077】

ガス交換器は、一実施形態では、細孔を含むガス不透過性基材であってもよく、細孔はガス透過性材料で充填される。例示的な実施形態では、ガス交換器は、ガス不透過性ポリマーとガス透過性ポリマーとの戦略的組合せから製造される。ガス透過性及びガス不透過性ポリマーの相対体積は、望ましい特性のガス交換器を製造するために適合させることが

できる。例えば、ガス交換器を使用して、例えば周囲環境からマイクロ流体デバイスへのガス流量を増加させる場合、より大量のガス透過性ポリマーを使用することができる。例えば、ガス交換器を使用して、例えば周囲環境からマイクロ流体デバイスへのガス流量を減少させる場合、より少量のガス透過性ポリマーを使用することができる。

【0078】

ガス不透過性基材を含む装置が企図され、当該ガス不透過性基材は、(i)第1の表面、(ii)第2の表面、及び(iii)1つ又は複数のガス透過性領域を含む。一実施形態では、当該基材はフィルムである。一実施形態では、当該基材はシートである。一実施形態では、当該基材は積層体である。一実施形態では、当該基材は複合材である。一実施形態では、当該基材はガス交換膜である。一実施形態では、当該基材はガス交換膜である。一実施形態では、当該基材は細孔充填基材である。一実施形態では、当該基材は細孔充填フィルムである。一実施形態では、当該基材は細孔充填ガス交換膜である。一実施形態では、当該基材は細孔充填複合材である。一実施形態では、当該領域は、細孔である。一実施形態では、当該領域は導管である。一実施形態では、当該領域は圧痕である。一実施形態では、当該領域は、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方と接触する。一実施形態では、当該領域は、当該第1の表面と当該第2の表面とを架橋する。一実施形態では、当該ポリマーは、ポリエチレンテレフタレート(PET)を含み、当該細孔はポリジメチルシロキサン(PDMS)を含む。

10

【0079】

剛性ポリマーフィルムが企図され、エラストマー性細孔を含む。一実施形態では、当該剛性ポリマーフィルムはポリエチレンテレフタレート(PET)を含み、当該エラストマー性細孔はポリジメチルシロキサン(PDMS)を含む。

20

【0080】

一実施形態では、ガス交換器は、1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、1つ又は複数の可撓性又はエラストマー性領域を含む剛性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性基材である。

30

【0081】

一実施形態では、当該ガス交換器は、細孔を含むガス不透過性膜であり、当該細孔はガス透過性材料で少なくとも部分的に充填されている。一実施形態では、当該ガス交換器は、細孔を含むガス不透過性フィルムであり、当該細孔はガス透過性材料で少なくとも部分的に充填されている。一実施形態では、当該ガス交換器は、細孔を含む硬質膜であり、当該細孔はエラストマー性材料で少なくとも部分的に充填されている。一実施形態では、当該ガス交換器は、細孔を含むガス不透過性フィルムであり、当該細孔はガス透過性材料で少なくとも部分的に充填されている。一実施形態では、当該ガス交換器は、細孔を含む硬質フィルムであり、当該細孔はエラストマー性材料で少なくとも部分的に充填されている。一実施形態では、当該ガス交換器は、細孔を含むガス不透過性ポリマー膜であり、当該細孔はガス透過性ポリマーで少なくとも部分的に充填されている。一実施形態では、当該ガス交換器は、細孔を含む剛性ポリマー膜であり、当該細孔は弾性ポリマーで少なくとも部分的に充填されている。一実施形態では、当該ガス交換器は、細孔を含むガス不透過性

40

50

ポリマーフィルムであり、当該細孔はガス透過性ポリマーで少なくとも部分的に充填されている。一実施形態では、当該ガス交換器は、細孔を含む剛性ポリマーフィルムであり、当該細孔は弾性ポリマーで少なくとも部分的に充填されている。

【0082】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性基材である。

10

【0083】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性膜である。

20

【0084】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性シートである。

30

【0085】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のガス透過性フィルムを含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域を含むガス不透過性フィルム

40

50

である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のエラストマー性領域を含む剛性フィルムである。

【0086】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性膜である。

10

【0087】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性フィルムである。

20

【0088】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のエラストマー性細孔を含む剛性シートである。

30

40

【0089】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性膜であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔はポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性膜であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔はポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、及び当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性膜であ

50

り、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔はポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。

【0090】

更に、ガス交換器は、結合を強化するために、特定の材料のフィルムでコーティングされてもよく、又は特定の材料のフィルムを有してもよい。例えば、多孔質ガス不透過性基材を含むガス交換器は、ガス透過性材料で充填された細孔を有するだけでなく、その上にガス透過性材料の層又はコーティング又はフィルムを有してもよい。

【0091】

「同類は同類を溶かす」は、いくつかの溶媒が溶質とどのように相互作用するかを記憶するために化学者によって使用される一般的な表現である。これは、「極性」及び「無極性」溶媒及び溶質を指す。例えば、水は極性であり、油は非極性である。同類は同類ほどよく溶解しない、これは水が油を溶解しないことを意味する。例えば、水は極性であり、塩（NaCl）はイオン性である（これは極めて極性であると考えられる）。同類は同類を溶かし、これは極性が極性を溶解することを意味するので、水は塩を溶解する。同じように、「同類は同類に結合する」である。材料は、化学処理、プラズマ処理などによって、より容易に結合することが見出されている。例えば、PDMSは、他のポリマーと比較してPDMSに容易に結合する。したがって、一実施形態では、ガス交換器は、他の構造により容易に結合することを可能にするコーティング、フィルム、又は層を有することができる。

【0092】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材である。

【0093】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。

【0094】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜である。

【0095】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。

10

【0096】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートである。

20

【0097】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。

30

【0098】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムである。

40

【0099】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性領

50

域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性領域、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該領域及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。

【0100】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材である。

10

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材である。

【0101】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性基材であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。

20

【0102】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜である。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜である。

30

【0103】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性膜であり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポ

40

50

リジメチルシロキサン（PDMS）を含む。

【0104】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートである。

10

【0105】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性シートであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。

20

【0106】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムである。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムである。

30

【0107】

一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面と当該第2の表面との間の1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、ガス交換器は、第1の表面、第2の表面、当該第1の表面及び当該第2の表面の少なくとも一方に接触する1つ又は複数のガス透過性細孔、及び当該第1の表面上のガス透過性コーティングを含むガス不透過性フィルムであり、当該膜は環状オレフィンコポリマー（COP）を含み、当該細孔及びコーティングはポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。

40

【0108】

本発明の一実施形態は、生物学的機能を監視するための流体デバイスであって、（i）第1のチャンネル、（ii）第2のチャンネル、（iii）当該第1のチャンネルと第2のチャンネルとの間に配置された膜、及び（iv）当該流体デバイスへのガス輸送速度を制御することができるように構成された、当該第1及び第2のチャンネルの少なくとも一方と接触す

50

るガス交換器を含む。一実施形態では、当該流体デバイスは、マイクロ流体デバイスである。一実施形態では、第1及び第2のチャンネル層は、ガス不透過性である。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンネル層は、小分子の吸収に抵抗性である。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンネル層の少なくとも一方は、(環状オレフィンコポリマー)COPを含む。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンネルの少なくとも一方は、細胞を含む。一実施形態では、当該細胞は、ヒト細胞である。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該流体デバイスに機械的安定性を提供する。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該第1のチャンネル又は当該第2のチャンネルの少なくとも一方を少なくとも部分的に囲む。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該第1のチャンネル又は当該第2のチャンネルの少なくとも一方と少なくとも部分的に隣接する。一実施形態では、当該ガス交換器は、2つのポリマー層を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリメチルペンテン(PMP)を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリエチレンテレフタレート(PET)を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリテトラフルオロエテン(PTFE又はテフロン)を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリ[4,5-ジフルオロ-2,2-ビス(トリフルオロメチル)-1,3-ジオキソール-4-イル]コ-テトラフルオロエチレン(テフロンAF2400)を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、複数の細孔を含むポリマーフィルムを含み、当該複数の細孔は多孔度を画定する。一実施形態では、当該多孔度は、0.05%~15%である。一実施形態では、当該多孔度は、ガス輸送速度を調節する。一実施形態では、当該複数の細孔は、ガス透過性ポリマーで充填されている。一実施形態では、当該ガス透過性ポリマーは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を含む。一実施形態では、当該ポリマーフィルムは、ポリエチレンテレフタレート(PET)である。一実施形態では、当該ガス交換器は、複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性フィルムを含み、当該複数の細孔は多孔度を画定する。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)よりもガス透過性が低い。一実施形態では、当該ガス交換器は、0.025~1 μ L未満の体積の多孔度を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該第1のチャンネル又は当該第2のチャンネルの少なくとも一方の長さに沿って延びる。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該第1のチャンネル及び当該第2のチャンネルの少なくとも一方の長さに沿って一定のガス輸送速度を提供するように構成される。一実施形態では、当該膜は、ガス透過性ポリマーを含む。一実施形態では、当該膜は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を含む。一実施形態では、当該膜は、複数の細孔を含み、当該複数の細孔は多孔度を画定する。一実施形態では、当該膜の多孔度は、5%~10%である。一実施形態では、当該多孔度は、膜を通るガス輸送速度を調節する。一実施形態では、当該デバイスは、1つ又は複数のセンサを更に含む。一実施形態では、少なくとも1つのセンサは、酸素センサである。一実施形態では、当該流体デバイスは、当該第1及び第2のチャンネルの当該少なくとも一方において低酸素環境を含む。

10

20

30

40

50

【0109】

生物学的機能を監視するための流体デバイスが企図され、(i)第1のチャンネルを含む第1のチャンネル層、(ii)第2のチャンネルを含む第2のチャンネル層、(iii)当該第1のチャンネル層と第2のチャンネル層との間に位置する膜、及び(iv)ガス流を当該流体デバイスに導入することができるように構成された当該第1及び第2のチャンネルの少なくとも一方と接触するガス交換器を含む。一実施形態では、当該流体デバイスは、マイクロ流体デバイスである。一実施形態では、第1及び第2のチャンネル層は、ガス不透過性である。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンネル層は、小分子の吸収に抵抗性である。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンネル層の少なくとも一方は、(環状オレフィンコポリマー)COPを含む。一実施形態では、当該第1及び第2のチャンネルの少なくとも一方は、細胞を含む。一実施形態では、当該細胞は、ヒト細胞である。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該流体デバイスに機械的安定性を提供する。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該第1のチャンネル又は当該第2のチャンネルの少なくとも一方を少なくとも部分的に囲む。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該第1のチャンネル又は当該第2

のチャンネルの少なくとも一方と少なくとも部分的に隣接する。一実施形態では、当該ガス交換器は、2つのポリマー層を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリメチルペンテン（PMP）を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE又はテフロン）を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリ〔4，5-ジフルオロ-2，2-ビス（トリフルオロメチル）-1，3-ジオキソール-コ-テトラフルオロエチレン〕（テフロンAF2400）を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、複数の細孔を含むポリマーフィルムを含み、当該複数の細孔は多孔度を画定する。一実施形態では、当該多孔度は、0.05%～15%である。一実施形態では、当該多孔度は、ガス輸送速度を調節する。一実施形態では、当該複数の細孔は、ガス透過性ポリマーで充填されている。一実施形態では、当該ガス透過性ポリマーは、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該ポリマーフィルムは、ポリエチレンテレフタレート（PET）である。一実施形態では、当該ガス交換器は、複数のガス透過性細孔を含むガス不透過性フィルムを含み、当該複数の細孔は多孔度を画定する。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）よりもガス透過性が低い。一実施形態では、当該ガス交換器は、0.025～1μL未満の体積の多孔度を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該第1のチャンネル又は当該第2のチャンネルの少なくとも一方の長さに沿って延びる。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該第1のチャンネル及び当該第2のチャンネルの少なくとも一方の長さに沿って一定のガス輸送速度を提供するように構成される。一実施形態では、当該膜は、ガス透過性ポリマーを含む。一実施形態では、当該膜は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該膜は、複数の細孔を含み、当該複数の細孔は多孔度を画定する。一実施形態では、当該膜の多孔度は、5%～10%である。一実施形態では、当該多孔度は、膜を通るガス輸送速度を調節する。一実施形態では、本方法は、1つ又は複数のセンサを更に含む。一実施形態では、少なくとも1つのセンサは、酸素センサである。一実施形態では、当該流体デバイスは、当該第1及び第2のチャンネルの当該少なくとも一方において低酸素環境を含む。

10

20

30

40

50

【0110】

本発明の別の実施形態は、その材料に吸収される小分子化合物の量を最小限に抑えるアップグレードされた灌流マニホールドアセンブリである。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリは、i) i i) 1つ又は複数の流体リザーバの上部として機能するように構成されたカバー又は蓋アセンブリ、i i i) 当該流体リザーバの下のカセット層、i v) 当該流体リザーバの下にあり、当該流体リザーバと流体連通する流体バックプレーン、v) 当該流体バックプレーンの上のキャッピング層、及びv i) マイクロ流体デバイス又はマイクロ流体デバイスを含むキャリアに係合するための突出部材又はスカートを含む。

【0111】

本発明の一実施形態は、マイクロ流体デバイスを製造する方法であって、a) チャンネルを含むマイクロ流体デバイスを提供すること、b) 多孔度のガス交換器を選択することであって、当該多孔度がガス輸送速度を決定すること、及びc) 当該チャンネルを当該ガス交換器でキャッピングすることを含む。一実施形態では、当該チャンネルは、膜によって分離された第1のチャンバ及び第2のチャンバを含む。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、流体流の有無にかかわらず、一定のガス輸送速度を維持することができる。一実施形態では、当該ガスは、酸素を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、第1のガス不透過性基材を含むデバイスであり、当該第1のガス不透過性基材は、(i) 第1の側面、(i i) 第2の側面、及び(i i i) 当該第1の側面と当該第2の側面との間にある1つ又は複数のガス透過性領域を有する。一実施形態では、当該ガス交換器は、フィルムである。一実施形態では、当該領域は、細孔である。一実施形態では、当該領域は、当該第1の

側面及び当該第2の側面の少なくとも一方と接触する。一実施形態では、当該チャンネルは、開放チャンネルである。一実施形態では、当該ガス交換器は、ガス透過性材料で充填された細孔を含み、当該細孔は当該多孔度を画定する。一実施形態では、当該ガス交換器は、ガス不透過性領域及びガス透過性領域を含み、当該ガス透過性領域は、ガス交換器の体積の10%未満を占める。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、細胞を更に含み、当該ガス輸送速度は当該細胞の生存能力を維持するように選択される。一実施形態では、当該ガス輸送速度は、当該マイクロ流体デバイス内にガス濃度プロファイルを生成する。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、肝臓細胞を更に含み、当該ガス濃度プロファイルは肝臓の酸素ゾネーションである。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、癌細胞を更に含み、当該ガス濃度プロファイルは低酸素環境である。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、結腸細胞を更に含み、当該ガス濃度プロファイルは低酸素内腔環境である。一実施形態では、当該ガス交換器は、マイクロ流体デバイスへのガスの流れを制限する。一実施形態では、当該ガス交換器は、マイクロ流体デバイスへのガスの流れを増加させる。

10

20

30

40

50

【0112】

本発明の一実施形態は、開放チャンネルを有する第1の基材及びガス交換器を含む第2の基材を含む流体デバイスであって、当該第2の基材は、少なくとも部分的に囲まれたチャンネルを形成する当該第1の基材をキャッピングする。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ガス不透過性材料を含むデバイスであり、当該ガス不透過性材料は、（i）第1の側面、（ii）第2の側面、及び（iii）当該第1の側面と当該第2の側面との間にある1つ又は複数のガス透過性領域を有する。一実施形態では、当該材料は、フィルムである。一実施形態では、当該領域は、細孔である。一実施形態では、当該領域は、当該第1の側面及び当該第2の側面の少なくとも一方と接触する。一実施形態では、当該領域は、ガス交換器の体積の10%未満を占める。一実施形態では、当該デバイスは、マイクロ流体デバイスである。一実施形態では、当該ガス交換器は、ガス透過性材料とガス不透過性材料との複合材を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、第1のガス透過性基材及び第2のガス不透過性基材を含む。

【0113】

本発明の一実施形態は、ガス輸送を制御する方法であって、a) 本体と、当該本体に接触するガス交換器とを含む流体デバイスを提供することであって、当該ガス交換器が、ガス透過性領域を有するガス不透過性ポリマー基材を含み、当該基材が、第1及び第2の側面を含み、当該領域が、多孔度を形成する、流体デバイスを提供すること、及びb) 当該基材の当該第1の側面にガスを導入することであって、当該第2の側面へのガス輸送速度が当該多孔度によって制御されることを含む。一実施形態では、当該ポリマーは、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含み、当該領域はポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該流体デバイス本体は、ガス透過性である。一実施形態では、当該流体デバイス本体は、ガス不透過性である。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該基材の当該第1の面と接触するガス透過性ポリマー層を含む。一実施形態では、当該流体デバイスは、少なくとも1つのチャンネルを含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該少なくとも1つのチャンネルの少なくとも1つの壁を含む。一実施形態では、当該流体デバイスは、細胞を含む。一実施形態では、当該ガスは、酸素を含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該マイクロ流体デバイスへのガス輸送速度を低下させる。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該マイクロ流体デバイスへのガス輸送速度を増加させる。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該チャンネル内の流体流の有無にかかわらず、当該マイクロ流体デバイス内へのガス輸送速度を維持する。一実施形態では、当該ガス交換器は、フィルム、シート、複合体、ガス交換膜、積層体、細孔充填基材、細孔充填フィルム、細孔充填膜、及び細孔充填複合体を含むリストから選択される。一実施形態では、当該領域は、細孔、導管、圧痕、穴、及びチャンネルを含むリストから選択される。一実施

形態では、当該領域は、当該第1の側面及び当該第2の側面の少なくとも一方と接触する。一実施形態では、当該領域は、ガス交換器の体積の10%未満を占める。

【0114】

本発明の一実施形態は、ガス交換器を製造する方法であって、a) 細孔を有するガス不透過性ポリマー基材を提供することであって、当該基材が第1及び第2の表面を含み、当該細孔が多孔度を形成すること、b) 未硬化ガス透過性ポリマーが当該細孔を貫通するように、当該第1の表面を当該未硬化ガス透過性ポリマーでコーティングすること、c) 当該第1の表面及び当該第2の表面が当該未硬化ポリマーを実質的に含まず、当該細孔が当該未硬化ガス透過性ポリマーで充填されるように、当該第1の表面及び当該第2の表面から過剰な未硬化ポリマーを除去すること、及びd) 当該細孔内で当該未硬化ガス透過性ポリマーを硬化させて、実質的にガス不透過性のガス交換器を製造することを含む。本発明の一実施形態は、当該製造されたガス交換器を含むマイクロ流体デバイスである。一実施形態では、当該ガス不透過性ポリマー基材は、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含む。一実施形態では、当該ガス透過性ポリマーは、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該細孔は、100 μ L未満の体積のガス透過性ポリマーを含む。一実施形態では、当該細孔は、50 μ L未満の体積の当該ガス透過性ポリマーを含む。一実施形態では、当該細孔は、10 μ L未満の体積の当該ガス透過性ポリマーを含む。一実施形態では、当該細孔は、1 μ L未満の体積の当該ガス透過性ポリマーを含む。一実施形態では、本方法は、当該未硬化ガス透過性ポリマーを脱気するステップを更に含む。

10

20

【0115】

本発明の一実施形態は、ガス交換器を製造する方法であって、a) (i) 細孔を有する第1のガス不透過性ポリマー基材であって、当該基材が第1及び第2の表面を含み、当該細孔が多孔度を形成する、第1のガス不透過性ポリマー基材、及び(ii) 第2のガス透過性ポリマー基材を提供すること、並びにb) 当該ガス透過性ポリマー基材が当該細孔を覆うように、当該第1の表面を当該第2のガス透過性ポリマー基材で積層することを含む。一実施形態では、当該第1のガス不透過性ポリマー基材は、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含む。一実施形態では、当該第2のガス透過性ポリマー基材は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該第1又は第2の基材は、フィルムである。一実施形態では、第1又は第2の基材は、膜である。

30

【0116】

本発明の一実施形態は、ガス交換器を製造する方法であって、a) (i) 細孔を有する第1のガス不透過性ポリマー基材であって、当該基材が第1及び第2の表面を含み、当該細孔が多孔度を形成する、第1のガス不透過性ポリマー基材、及び(ii) 第2のガス透過性ポリマー基材を提供すること、並びにb) 当該ガス透過性ポリマー基材が当該ガス不透過性ポリマー基材を形成して当該細孔を覆うように、当該第1の表面を当該第2のガス透過性ポリマー基材と接触させることを含む。一実施形態では、当該第1のガス不透過性ポリマー基材は、ポリエチレンテレフタレート（PET）を含む。一実施形態では、当該第2のガス透過性ポリマー基材は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該第1又は第2の基材は、フィルムである。一実施形態では、当該第1又は第2の基材は、膜である。

40

【0117】

ガス輸送を制御する方法であって、a) i) ガス交換器及びii) チャンネル又はチャンバ内の生細胞を含む、実質的にガス不透過性のマイクロ流体デバイスを提供することであって、当該デバイスが剛性ポリマーを含む、マイクロ流体デバイスを提供すること、及びb) 当該チャンネル又はチャンバに、ある流量で培養培地を導入することであって、当該培養培地が、ガスを担持し、当該生細胞へのガス輸送速度が、当該ガス交換器によって制御される、培地を導入することを含む。一実施形態では、当該剛性ポリマーは、ポリカルボナートである。一実施形態では、当該剛性ポリマーは、0.1~150 GPaの弾性率を有する。一実施形態では、当該ガス交換器は、当該チャンネル又はチャンバの下に配置され

50

たポリジメチルシロキサン（PDMS）のフィルムを含む。一実施形態では、当該ガス交換器は、ガス透過性細孔を有する非透過性ポリマーのフィルムを含み、当該フィルムは当該チャンネル又はチャンバの下に配置される。

【0118】

マイクロ流体デバイスにおけるガス輸送を制御する方法であって、a) 0.1 GPa ~ 150 GPaの弾性率を有する実質的にガス不透過性のポリマーを含む複数の外側と、第1のチャンネルと第2のチャンネルとの間に配置された実質的にガス透過性の内膜とを含む実質的にガス不透過性のマイクロ流体デバイスを提供すること、及びb) 当該第1のチャンネル又は当該第2のチャンネルの当該少なくとも一方に、ある流量で流体を導入することであって、当該実質的にガス透過性の内膜が、当該第1のチャンネルと当該第2のチャンネルとの間のガス輸送を可能にするように構成される、流体を導入することを含む。

10

【0119】

マイクロ流体デバイスが企図され、0.1 GPa ~ 150 GPaの弾性率を有する実質的にガス不透過性のポリマーを含む複数の外側、及び実質的にガス透過性の内膜を含む。一実施形態では、当該実質的にガス透過性の内膜は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該ポリジメチルシロキサン（PDMS）膜は、伸張するように構成される。

【0120】

方法が企図され、a) 0.1 GPa ~ 150 GPaの弾性率を有する実質的にガス不透過性のポリマーを含む複数の外側、及び実質的にガス透過性の内膜を含むマイクロ流体デバイスを提供すること、及びb) 当該膜を伸張することを含む。一実施形態では、当該実質的にガス透過性の内膜は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）を含む。一実施形態では、当該伸張は、当該膜を横切って差圧を加えることによって達成される。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、ガス交換器を更に含む。

20

【0121】

マイクロ流体デバイスが企図され、(i) 第1のチャンネル及び第2のチャンネルであって、当該第1のチャンネル及び第2のチャンネルの各々が複数の壁を含み、当該壁の少なくとも1つが、0.1 GPa未満の弾性率を有するガス透過性であり、当該壁の少なくとも1つが0.1 GPa ~ 150 GPaの弾性率を有するガス不透過性である、第1のチャンネル及び第2のチャンネル、及び(ii) 当該第1のチャンネルと第2のチャンネルとの間に配置されたガス透過性膜であって、0.1 GPa未満の弾性率を有する膜を含む。

30

【0122】

本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の実施形態のガス交換器又はガス輸送膜を任意のマイクロ流体細胞培養システムに適用することである。科学者の固有のニーズに応じて、市場の様々なマイクロ流体デバイスへのガス交換をより良好に制御することが望ましい場合がある。マイクロ流体培養における細胞への酸素送達は、特に製造業者が熱可塑性物質を採用する際に、その製造がより容易であり、及び／又はガス吸収がより低いため、産業全体の問題である。本明細書に記載のように壁（例えば、デバイスの底部）の1つをガス交換器で置き換えるという考えは、この主要な問題に対する優れた解決策である。

【0123】

例えば、本明細書に記載のガス交換器の実施形態は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第10,532,355号のMimetasのマイクロ流体デバイスに適用することができる。マイクロ流体デバイス内のガス濃度に対するより良好な制御を達成するために、Organoplate（登録商標）2レーン、Organoplate（登録商標）3レーンなどのMimetasのマイクロ流体製品の底部をガス交換器で置き換えることができる。ガス交換器は、マイクロ流体デバイスの任意の構造要素を置き換えることができる。特に、ガス交換器は、マイクロ流体デバイス内のチャンネルと接触する構造要素を置き換えることができる。マイクロ流体デバイスが2つ以上のチャンネルを有する場合、ガス交換器はマイクロ流体デバイスのチャンネル間に配置されてもよい。Aim Bio Techのマイクロ流体デバイス（例えば、米国特許出願公開第20180327

40

50

700号)及びマサチューセッツ工科大学のMechanobiology Labのマイクロ流体デバイス(例えば、米国特許第9,121,847号及び米国特許第9,261,496号)と有利に組み合わせることができるマイクロ流体デバイスの他の例示的な実施形態。これらの3つの特許出願は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0124】

方法が企図され、(i)マイクロ流体デバイス及びガス交換器を提供すること、並びに(i i)当該ガス交換器を当該マイクロ流体デバイスに適用して、当該マイクロ流体デバイスのガス透過性を変化させることを含む。方法が企図され、(i)マイクロ流体デバイス及びガス交換器を提供すること、(i i)当該マイクロ流体デバイスの基材を除去すること、並びに(i i i)当該基材を当該ガス交換器と置き換えて、当該マイクロ流体デバイスのガス透過性を変化させることを含む。方法が企図され、(i)少なくとも1つのチャンネル及び当該チャンネル内に膜を含むマイクロ流体デバイスを提供すること、及び(i i)当該少なくとも1つのチャンネルにガス交換器を適用することを含む。一実施形態では、当該チャンネルは、細胞を含む。

10

【0125】

マイクロ流体デバイスがチャンネルの数によって制限されることは意図されておらず、適用されるガス交換器を有するマイクロ流体デバイスは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つなどのチャンネルを有することができる。

【0126】

本発明の別の実施形態は、その材料に吸収される小分子化合物の量を最小限に抑えるアップグレードされた灌流マニホールドアセンブリである。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリは、i) i i) 1つ又は複数の流体リザーバの上部として機能するように構成されたカバー又は蓋、i i i) 当該流体リザーバの下のガasket層、i v) 当該流体リザーバの下にあり、当該流体リザーバと流体連通する流体バックプレーン、v) 当該流体バックプレーンの上のキャッピング層、及びv i) マイクロ流体デバイス又はマイクロ流体デバイスを含むキャリアに係合するための突出部材又はスカートを含む。

20

【0127】

カバー又は蓋アセンブリは、リザーバを漏出及び汚染の両方から保護することを補助することができる。一実施形態では、蓋アセンブリは、蓋、フィルタ、蓋ガasketを含む。リザーバ内の流体の無菌性を補助するために、フィルタを蓋アセンブリ内に構成することができる。一実施形態では、フィルタは、フラットフィルタである。これらの薄いフィルタは、平坦な基材材料から切断することができる。一実施形態では、フィルタは、厚いフィルタである。これらの厚いフィルタは、厚い基材材料から切断することができる。蓋アセンブリが蓋ガasketを含む実施形態では、蓋ガasketは、様々な実施形態をとることができる。一実施形態では、蓋ガasketは、圧縮可能である。一実施形態では、蓋ガasketは、接着性である。蓋ガasketは、リザーバを外部環境から最適に封止するために、厚さが異なってもよい。或いは、他の実施形態では、蓋ガasketは、別個のフィルタを有する代わりに、フィルタを含む。一実施形態では、蓋ガasketは、多孔性である。別の実施形態では、蓋ガasketは、非多孔性である。一実施形態では、蓋ガasketは、リザーバが最初に押圧された後、リザーバの形状に恒久的に適合する。別の実施形態では、蓋ガasketは、蓋ガasketがリザーバに押圧されるたびに、リザーバの形状に一時的に適合する。更に別の実施形態では、蓋ガasketは、リザーバの形状に適合しない。カバー又は蓋アセンブリを取り外すことができ、灌流マニホールドアセンブリを依然として使用することができる。一実施形態では、蓋アセンブリは、半径方向シールを使用してリザーバ上に保持される。シールを形成するために、加えられる圧力は必ずしも必要ではない。別の実施形態では、蓋アセンブリは、1つ又は複数のクリップ、ねじ又は他の保持機構を使用してリザーバ上に保持される。

30

40

【0128】

流体バックプレーンを使用して、リザーバからマイクロ流体デバイスなどのマイクロ流体デバイスに流体を送ることができる。一実施形態では、アセンブリは、流体バックプレ

50

ーンの底部に配置された流体ポートを更に含む。一実施形態では、流体バックプレーンは、1つ又は複数の流体抵抗器を含む。いかなる特定の機構の理論にも束縛されるものではないが、これらの抵抗器は、リザーバから来る流体の流れを安定させる役割を果たし、その結果、安定した流れをマイクロ流体デバイスに送達することができ、及び／又はリザーバ圧力を灌流流量に変換するための手段を提供する役割を果たすと考えられる。

【0129】

本発明の以前の解釈では、キャッピング及びガスケット化の両方を担う単一の層があった。本明細書に提示される本発明は、2つの別個の層を提案する。1つはガスケット用であり、もう1つは流体バックプレーンをキャッピングするためである。一実施形態では、流体リザーバ及び流体バックプレーンの両方は、硬質プラスチックから製造され、したがって、流体接続部位での漏れから保護するために、それらの間に圧縮性ガスケットを必要としてもよい。2つの別個の層を有することは、流体バックプレーンをキャッピングし、流体バックプレーンとリザーバとの間のガスケットを分離することができるので有利である。ガスケット、特に透明ガスケットとして使用するのに必要な特性を有する材料は、吸収性の問題を有することが多い。前の単一層の機能を分離することによって、吸収材料の量を灌流マニホールドアセンブリ内で最小化し、ガスケット化を担う層に分離／隔離することができる。一実施形態では、キャッピング層及びガスケット層の両方が透明である。流体バックプレーンを必要に応じて顕微鏡上で画像化することができるように、透明なキャップ及びガスケット層を有することが有利である可能性がある。本発明の一実施形態では、ガスケット層はSEBSなどの圧縮性材料で構成され、キャッピング層はCOPなどの非圧縮性材料で構成される。別の実施形態では、圧縮性材料で構成されたガスケット層は、バルク可撓性、したがって、流体層をリザーバに封止又はガスケットする能力を依然として維持しながら非吸収性にするために、パリレンなどの非圧縮性材料の薄層でコーティングすることができる。キャッピング層は、パリレン中で部分的に又は完全にコーティングすることができる。例示的な実施形態では、COPから製造された部分的にコーティングされたキャッピング層が、SEBSから製造されたガスケット層と共に使用される。部分的にパリレンでコーティングされたCOPキャッピング層とSEBSガスケット層との組合せは、単一の完全なパリレン被覆COP層よりも有利である。パリレンは結合することが困難であるが、COPは、COPから作製された他の部品を含む他の材料に良好に結合する。2つの層を使用することにより、流体バックプレーンをパリレン被覆COPキャッピング層に材料結合によって密封し、キャッピング層をSEBSガスケット層でリザーバに封止することができる。更に、2つの層を使用する場合、吸収を首尾よく防止するために、SEBSの小片のみをパリレンでコーティングする必要がある。単層が使用される場合、任意の流体接触面がパリレンでコーティングされる必要があってもよく、これは、ポート、封止される構成要素の面（リザーバなど）、及び灌流マニホールドアセンブリ内の流体ルーティングチャネルの全長がコーティングされる必要があることを意味する。COPキャッピング層の多くをコーティングすることは困難である。パリレンがコーティングされている場合、部品はアキレスの踵のようにどこかに保持される必要がある。

【0130】

一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリは、突出部材又はスカートを含む。一実施形態では、突出部材又はスカートは、マイクロ流体デバイスと係合する。一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、第1のチャネル、第2のチャネル、並びに当該第1及び第2のチャネルの少なくとも一部を分離する膜を含む。マイクロ流体デバイスが垂直に向けられている別の実施形態では、マイクロ流体デバイスは、上部チャネル、底部チャネルと、並びに当該上部チャネル及び底部チャネルの少なくとも一部を分離する膜を含む。一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、膜上及び／又はチャネル内若しくはチャネル上に細胞を含む。突出部材又はスカートは、流体バックプレーンが接続マイクロ流体デバイスと容易に位置合わせできるように設計することができる。一実施形態では、突出部材又はスカートは、培養系と相互作用するように設計することができる。

【0131】

灌流マニホールドアセンブリは、いくつかの方法によって一緒に取り付けることができる。一実施形態では、ねじを使用して、灌流マニホールドアセンブリを固定することができる。別の実施形態では、クリップを使用して、灌流マニホールドアセンブリを固定する。別の実施形態では、接着剤を使用して、灌流マニホールドアセンブリを固定する。別の実施形態では、表面改質を使用して、灌流マニホールドアセンブリを固定する。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリは、互いに恒久的に結合される。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリは、互いに一時的に結合される。

【0132】

これらの上述の灌流マニホールドアセンブリを低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスと共に使用する場合、灌流マニホールドアセンブリの設計を使用して、所望のガス濃度をマイクロ流体デバイスに導入することができる。前述の一実施形態では、培地の溶解ガス含有量は、培地を所望のガスで加圧することによって、又は所望のガスのキャリアを培地に添加することによって、マイクロ流体デバイスに入る前に増加させることができる。前述の一実施形態では、培地内の酸素の濃度は、培地を酸素の濃度で加圧することによって、又は加圧ガス混合物中の酸素の濃度を増加させることによって、若しくはヘモグロビン又はヘモシアニンなどの酸素キャリアを培地に添加することによって増加させることができる。前述の一実施形態では、培地を加圧するガスは、ガスブランケットであってもよい。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリリザーバ内の培地の溶解ガス含有量は、リザーバ内の培地をリザーバのヘッドスペース内の所望のガス又はガスのキャリアで加圧することによって、マイクロ流体デバイスに入る前に増加させることができる。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリリザーバ内の培地中の酸素の濃度は、リザーバのヘッドスペース内の培地を酸素で加圧することによって、又はヘモグロビンなどの酸素キャリアを培地に添加することによって増加させることができる。

【0133】

灌流マニホールドアセンブリが企図され、(i) (ii) 1つ又は複数の流体リザーバの上部として機能するように構成された蓋、(iii) 当該流体リザーバの下の小分子の吸収に抵抗性であるガスケット層、(iv) 当該流体リザーバの下にあり、当該流体リザーバと流体連通する流体バックプレーン、(v) 当該流体バックプレーンの上の小分子の吸収に抵抗性であるキャッピング層、及び(vi) 当該マイクロ流体デバイスと係合するための突出部材を含む。一実施形態では、当該ガスケット層は、パリレン被覆SEBSを含む。一実施形態では、当該キャッピング層は、COPから製造される。

【0134】

インビトロ及びインビボ実験の両方において、研究者らは、分布が曝露細胞が真に経験する化合物の濃度を決定するので、生物学的モデル及び実験設定内の化合物分布を考慮しなければならない。分布の体積は、典型的には、インビボ研究において評価され、説明されるが、輸液チューブ、シリンジ、組織培養プレート及びピペットチップなどのシステム構成要素の影響は、見落とされることが多い。吸収は誤った化合物分布の主要な構成要素であるが、望ましくない化合物分布はまた、実験設定の1つの領域における化合物のプール、吸着、及び化合物が理論的にあるべき場所又はユーザが望む場所にはない、他の状況も含む。例えば、誤った化合物分布は、化合物がシステム全体に均一に分布していない場合であってもよい。例えば、誤った化合物分布は、細胞培養チャンネルの前者の部分の細胞が化合物を代謝し、細胞培養チャンネルの後者の部分の細胞が化合物と接触できない場合であってもよい。

【0135】

マイクロ流体デバイス実験では、化合物分布に多くの方法で対処することができる。これらのうちのいくつかが本明細書に取り込まれており、実験条件は化合物曝露を最適化するように選択されている。更に、分布及び化合物曝露を直接評価する化合物分布キットが開発されている。インビボ分布研究と同様に、このキットを使用して特定のクラスの化合物の分布を評価することが推奨されてもよい。1 kDa未満の分子量を有する小分子は、化合物分布キットを使用して評価すべきであり、1 kDaより大きい分子は、それらが「

粘着性」であるか、又は開発中に実験で使用された材料を吸収又は吸着する傾向があることが既に証明されていない限り、典型的には懸念されない。モノクローナル抗体などの生物製剤は、懸念される可能性は低い、特に「粘着性」であるか、又は実験で使用される材料を吸収又は吸着する可能性があることが知られている場合にも評価することができる。

【0136】

分布の評価を補助することに加えて、化合物分布キットを使用して、分布効果を定量的に説明することもできる。分布効果の定量的な説明は、キットに含まれる計算機を使用し行われ、各実験の結果に適用することができる。

【0137】

化合物分布キットは、一実施形態では、使用者が、投与された化合物に対する可能なバイオモデル曝露濃度の範囲を経時的に概算することを可能にするキットである。化合物分布キットは、例えば、マイクロ流体デバイスなどの実験機器又は臨床機器における化合物の吸収を決定するために使用することができる。一実施形態では、化合物分布キットは、意図された研究の前に、吸収対照実験である特殊な対照実験として使用されることを意図している。したがって、吸収キットの内容物は、一実施形態では、意図された研究の構成要素を反映することができ、使用方法は、意図された研究の簡略版であってもよい。例えば、化合物分布キットは、意図された研究又は実験と同じ投与、灌流、及びサンプリング設計を使用することができる。これらのガイドラインに従う実施形態では、化合物分布キットは、意図する実験に関連する同じ時点及び同じ実験条件下で化合物分布（例えば、化合物損失又は増加）を評価することができる。

【0138】

マイクロ流体デバイスを構成する材料が吸収されやすいだけではない。実験及び臨床用途で 사용되는多くの材料は小分子を吸収する。例えば、静脈内輸液及び／又薬物を投与するために使用される輸液チューブは、大量の小分子化合物を吸収する可能性がある。別の例として、シリンジのゴムガasketは、小分子化合物を吸収することも知られている。小分子化合物を輸送するために使用されるインフラストラクチャの材料への小分子化合物の吸収は、小分子化合物が、例えば、患者の治療のために試験されているか、又は積極的に使用される薬物である場合に特に問題となる。患者が小児である場合、問題は悪化する。小児患者には、より低い用量又は濃度の薬物が投与される。成人患者と小児患者の両方を治療するために同じ流体輸送設定（すなわち、輸液チューブの長さ）が使用されている場合、小児患者には成人よりも更に少ない薬物が投与される。多くの場合、科学者及び臨床医は小分子吸収を認識していない。医師及び臨床科学者は、その化合物に物質が吸収されやすいかどうかを理解し、吸収される場合には、それらのシステムに吸収されている化合物の量を定量化することができる必要がある。一実施形態では、化合物分布キットは、1000 Da未満の化合物を伴う実験の前に使用されることが推奨される。しかし、問題の化合物がプレートベースのシステムで吸収又は吸着を受けることが示される場合、化合物分布は、1000 Daより大きい生物製剤及び小分子に使用されるべきである。

【0139】

薬物濃度はアッセイ結果に関連する。一般に、実験を行う場合、多くの化合物用量が使用される。例えば、薬物化合物を使用する実験では、多くの薬物化合物用量を試行することができる。実験及び関連するアッセイの後、化合物に対するシステム応答に基づいて曲線を作成する。曲線は一般にシグモイドを有する。シグモイドは、化合物が例えば細胞からの排泄を多かれ少なかれもたらすかに基づいて、上向き又は下向きであってもよい。したがって、システムに吸収している化合物の割合は、アッセイ結果に直接影響する。

【0140】

現在、システムへの化合物吸収を推定又は定量化する主な方法は、プログラム COMSOL Multiphysics (COMSOL) などを用いてシステムの計算モデリングを行うことである。しかし、計算モデルは、理想的な解決策ではないことが多い。いくつかの化合物は完全に吸収するため、計算モデルは機能しない可能性がある。すなわち、

システムが非常に低濃度の化合物に曝露される場合、曝露レベルを予測することができたとしても、有用な補正には低すぎる可能性がある。一部の状況でしかデータを補正することができないにもかかわらず、計算モデルはまた、複雑なワークフローを必要とする場合がある。計算モデリングを機能的にするために、システムに導入された全ての化合物の吸収は、材料特性評価研究において最初に定量化されるべきである。材料特性評価研究は、非常に時間がかかる可能性がある。更に、システムを完全に特性評価することは、大規模な実験には実現不可能であり、又は臨床設定は必ずしも実現可能ではない。同様に、計算モデルは、細胞によって導入された変数を含む多数の変数のために、多くの実験においてデータを正確にデコンボリューションすることができない可能性がある。これらの変数の多くを説明するために計算モデルを使用しても、吸収の存在下では、インビトロからイン

10

【0141】

したがって、科学者及び臨床医にシステムへの化合物吸収を容易に知らせることができただけでなく、いくつかの実施形態では、吸収を減少させるための改善を推奨することもできる化合物分布キットが本明細書に提示される。本明細書に提示される本発明は、計算モデリングを使用して科学者及び臨床医の貴重な時間及び費用を節約することができる。

【0142】

いくつかのレベルの化合物分布キットが考えられる。最も単純なレベルでは、化合物分布キットは、科学者及び臨床医に肯定的又は否定的な結果を提供し、システムでの吸収が許容されるか否かを警告することができる。わずかにより詳細なレベルでは、化合物分布

20

【0143】

一実施形態では、化合物分布キットは、科学者又は臨床医が使用するシステムを特性評価する。しかし、好ましい実施形態では、化合物分布キットは、簡略化されたシステムを特性評価する。ユーザが、非常に高価な実験システム又は臨床システムであってもよいものを設定するために貴重な時間又は費用を費やす必要がないように、簡略化されたシステムが好ましい場合がある。一例として、透析装置の流体インフラストラクチャを試験する場合、保持タンクを人体の代わりに使用することができる。別の例として、多孔質膜を覆う培養細胞を含むマイクロ流体デバイスの代わりに、2つのチャンネルを分離する無孔膜を有するマイクロ流体デバイスを使用することができる。この例では、科学者らは、化合物がマイクロ流体デバイス内の細胞に対して毒性であるかどうかを見出すことを目的とする場合、同じ培地を使用し、同じ時点でサンプルを採取するなどすることができる。場合によっては、臨床的又は実験的設定の一部のみを理解する必要がある、したがって、そのシステムの他の構成要素は、化合物分布キットで使用するために簡略化することができる。一実施形態では、アッセイのために採取されるサンプリングは、化合物濃度分析のために採取されるサンプリングと置き換えることができる。

30

【0144】

一実施形態では、ユーザは、理想的なプロトコル又は実験を設計し、次いで化合物分布キットと共に使用するためにそれに応じて修正する。一実施形態では、ユーザは、化合物分布キットの結果を使用して、実験が価値があるかどうかを決定することができる。一実施形態では、化合物分布キットの結果を使用して、流体流量を変更したり、より少量の吸収材料を使用したりするなど、実験を修正する。一実施形態では、化合物分布キットの結果を使用して、実際のプロトコルの結果にエラーバーに影響を与えることができる。例えば、吸収された化合物の割合は、化合物分布キットから計算することができ、それらの割合は、修正されていないプロトコルを用いた実際の実験後のエラーバーに寄与する可能性がある。

40

【0145】

前述のように、化合物濃度はアッセイ結果に直接関係する。アッセイ結果を使用して、

50

半数阻害濃度の計算 IC_{50} を生成する。一実施形態では、化合物分布キットの結果を使用して、実際のプロトコルの完了後に IC_{50} に影響を与えることができる。 IC_{50} は、特定の生物学的又は生化学的機能を阻害する化合物の効力の尺度である。言い換えれば、 IC_{50} は、生物学的プロセスを阻害するために化合物がどの程度必要であるかの定量的尺度である。 IC_{50} は、マイクロ流体デバイスなどのインピットで 50 % 阻害又は最大効果に必要な化合物の濃度を表す。例えば、意図された研究が $1 \mu M$ の投与濃度で IC_{50} を示す場合、化合物分布キットの結果は、実際の IC_{50} が $0.6 \mu M \sim 1 \mu M$ の範囲の曝露濃度であることを示してもよい。

【0146】

例えば、マイクロ流体デバイス内の細胞を使用する特定のプロトコルでは、24 時間点での IC_{50} は $1 \mu M$ であってもよい。最悪の場合、化合物の損失の 50 % 全てがマイクロ流体デバイスの上流で発生する。その最悪の場合、マイクロ流体デバイス内の細胞は、 IC_{50} で $0.5 \mu M$ の化合物しか見られなかった。化合物がマイクロ流体デバイスに入る前に 50 % の化合物損失が起こったことを知ることは、 IC_{50} グラフを調整するのに役立つ。最良の場合には、吸収の全てがマイクロ流体デバイスの下流で発生する。その最良の場合、マイクロ流体デバイス内の細胞は、化合物用量の 100 % が見られた。吸収の全てがマイクロ流体デバイスの下流で起こることを知ることは、 IC_{50} グラフを調整する必要がないことを意味する。別の場合では、化合物はマイクロ流体デバイス自体に吸収される。マイクロ流体デバイス自体に吸収する化合物の場合、 IC_{50} のグラフは、前述の最悪の場合と最良の場合との間のどこかで調整されることになる。化合物分布キットの結果を使用して、 IC_{50} グラフにエラーバーを追加することもできる。同様に、化合物分布キットの結果を使用して、アルブミン、乳酸デヒドロゲナーゼなどのアッセイのグラフにエラーバーを調整又は追加することができる。

【0147】

一実施形態では、化合物分布キットのワークフロー又は使用方法は、(1) 実験設定を調製するステップ、(2) 投与溶液を調製するステップ、(3) 用量実験を設定するステップ、(4) 1 つ又は複数の時点で流出物を収集するステップ、(5) 流出物サンプル濃度を決定するステップ、及び (6) 実験設定を構成する材料への投与溶液の吸収を評価するステップを含むことができる。

【0148】

化合物分布キットは、本明細書に提示されるマイクロ流体デバイスのいずれかと共に使用することができる。化合物分布キットは、高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス、及び低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスを含むシステム又は実験への化合物吸収を決定するために使用することができる。化合物分布キットはまた、低吸収及び高吸収の灌流マニホールドアセンブリへの化合物吸収を決定するために使用することができる。化合物分布キットは、任意のシステムへの化合物の吸収に関心がある科学者は誰でも使用することができるが、本明細書で論じられるマイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリに特有の実施形態が提示される。

【0149】

マイクロ流体デバイスを使用するための化合物分布キットは、物理的及び／又はデジタル構成要素を含むことができる。一実施形態では、化合物分布キットの物理的構成要素は、1 つ又は複数のマイクロ流体デバイス、1 つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリ、1 つ又は複数のフィルタ (Millapore ブランドの Steriflip (登録商標) フィルタなど)、及びクイックスタートガイドを含む。一実施形態では、化合物分布キットのユーザはまた、以下の、培養モジュール、ガスミキサ、インキュベータ、バイオフィューエルキャビネット、液体クロマトグラフィ質量分析計 (LCMS)、エタノール (70 % エタノールなど)、少なくとも 1 個の 150 mm ペトリ皿、少なくとも 1 個の 50 mL コニカルチューブ、少なくとも 10 個のエッペンドルフ (登録商標) チューブ、ピペットチップ、ピペットエイド又はガン、アスピレータ、アスピレータチップ、培地、ワイプ、及びジメチルスルホキシド (DMSO) のいずれかを必要とする可能性がある。一実施形

態では、当該マイクロ流体デバイスは、a) 単一のマイクロ流体チャネルを含む固体基材、及びb) 当該単一のマイクロ流体チャネルを第1のチャンバと第2のチャンバとに分離する非多孔質膜を含む。クイックスタートガイドは、ユーザが従えば化合物分布キットを容易に使用することができるように、ユーザに対する説明書であってもよい。フィルタを使用して、化合物分布キットで使用される流体を平衡化することができる。例示的な実施形態では、化合物分布キットのデジタル構成要素は、コミュニティポータル上の計算機及びデジタルプロトコルのライブラリを含む。デジタルプロトコルのライブラリは、1つ又は複数のプロトコルを含むことができる。

【0150】

本発明が培地又はストック溶液の種類によって限定されることは意図されていない。非投与培地又はストック溶液は、ジメチルスルホキシド (DMSO)、水、イーグル最小必須培地 (EMEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) などであってもよい。任意の溶媒又は細胞培養培地が想定される。一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、チャネルあたり200 μ Lで洗浄される。一実施形態では、当該灌流マニホールドアセンブリは、入口リザーバ内の3 mLの培地及び出口リザーバ内の200 μ Lの培地でプライミングされる。

【0151】

灌流マニホールドアセンブリが少なくとも1つの培養モジュールに流体接続される実施形態では、システム内の気泡の体積を減少させるために、実験を開始する直前に調整サイクルを実行することが推奨される。調整サイクル又は気泡除去サイクルは、米国特許出願第15/647,727号に包含され、その全体が本明細書で参照される。

【0152】

サンプルは、ユーザが望む任意の時点で採取されてもよい。例示的な時点では、灌流マニホールドアセンブリの入口リザーバ及び出口リザーバの各々から実験の開始時に採取したサンプルを含む6つの時点でサンプルを採取する。例えば、2つの入口リザーバ及び2つの出口リザーバを含む灌流マニホールドアセンブリから6つのサンプルが採取される場合、その灌流マニホールドアセンブリに対して合計24個のサンプルが採取される。例示的な実施形態では、より良好な実験結果を達成するために、少なくとも3つの灌流マニホールドアセンブリが使用される。例えば、各々が2つの入口リザーバ及び2つの出口リザーバを含む3つの灌流マニホールドアセンブリの各々から6つのサンプルが採取される場合、その実験に対して合計72個のサンプルが採取される。投与溶液を調製する場合、両方のストック (又はブランク) 溶液の一部を後の溶液分析のために確保する必要がある。好ましい実施形態では、200 μ Lのストック溶液及び投与溶液を後で分析するために確保する。

【0153】

検量線は、標準曲線としても知られており、未知の物質を、1:10、1:100、1:1000の希釈液、並びに非投与サンプル及び完全投与サンプルなどの既知の濃度の標準サンプルのセットと比較することによって、サンプル中の物質の濃度を決定するための一般的な方法である。例示的な実施形態では、サンプル溶液は、5点標準曲線用に調製される。例示的な実施形態では、サンプル溶液は、希釈されていない投与溶液、1:10の投与溶液対サンプル溶液希釈物、1:100の投与溶液対サンプル溶液希釈物、1:1000の投与溶液対サンプル溶液希釈物、及びストック溶液を含む。一実施形態では、実験誤差を低減するために、複数の各サンプル溶液が存在する。一実施形態では、マイクロ流体デバイスの各チャネルに対して標準曲線が作成される。一実施形態では、各灌流マニホールドアセンブリは、マイクロ流体デバイスの各チャネルに対応する1つの入口及び1つの出口リザーバを有する。例えば、単一の2チャネルマイクロ流体デバイス並びに各マイクロ流体デバイスチャネルに1つの入口及び1つの出口リザーバを有する対応する灌流マニホールドアセンブリに対して5点較正が行われ、各サンプルが2つ複製されている場合、較正曲線を完成させるには合計20個のサンプルが必要となる。

【0154】

化合物分布キットは、標準曲線に必要なサンプルとシステム吸収分析に必要なサンプルとの間に多数の試料を必要とする場合がある。例えば、各々が1つの入口リザーバ及び1つの出口リザーバを有する3つの2チャンネルマイクロ流体デバイス及び3つの灌流マニホールドアセンブリを使用する実験では、5点、2回の反復較正を行い、灌流マニホールドアセンブリごとに2つの入口リザーバ及び2つの出口リザーバの各々で6つの時点のサンプルを採取する場合、最大92個のサンプルが必要となる。サンプルをすぐに使用しない場合は、冷凍庫などの冷蔵庫に保管する必要がある。

【0155】

実験中に培養モジュールを高流量で作動させる（又はフラッシングする）ことは、灌流マニホールドアセンブリをプライミングするために使用することができる。一実施形態では、培養モジュールを600 μL / 時で5分間実行して、1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを完全に洗浄又はプライミングする。

10

【0156】

サンプル化合物濃度の定量は、当技術分野で公知の任意の方法で行うことができる。一実施形態では、サンプル化合物濃度は、分光法、クロマトグラフィ、又は他の分離技術を使用して定量することができる。分光分析としては、質量分析（MS）、液体クロマトグラフィ質量分析（LCMS）などを挙げることができる。クロマトグラフィとしては、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）、薄層クロマトグラフィ（TLC）、ガスクロマトグラフィ（GC）、向流クロマトグラフィ（CCC）、イオンクロマトグラフィ、ペーパークロマトグラフィなどを挙げることができる。他の分離技術としては、遠心分離、電気泳動、液液抽出、固相抽出、結晶化、蒸留、フィールドフローフラクショネーション、乾燥、デカンテーションなどが挙げられる。

20

【0157】

或いは、計算機は、吸収計算機として知られていてもよい。一実施形態では、計算機は、化合物分布キットの最終結果を出力する。一実施形態では、計算機は、ユーザがより高い精度の実験を行うための指針となるような結果を出力する。計算機を使用して、複数の当該較正溶液中の化合物の濃度を1つ又は複数のサンプル溶液中の化合物の濃度と比較することによって、化合物吸収を分析的に評価することができる。計算機は、Microsoft Excel 計算機、MATLAB 計算機などの計算プログラム又はソフトウェアであってもよい。計算機はまた、Python、C、C++、Javaなどのコードのスク립トであってもよい。例えば、LCMS 結果及び投与方法を計算機の「ユーザ入力」セクションに入力して、化合物分布結果を生成することができる。一実施形態では、計算機はグラフを出力する。一実施形態では、回収（流出物）濃度は、上部及び底部チャンネルの両方について時間に対してプロットされる。任意の所与の時点で1に近い回収された濃度は、システムによってほとんど化合物が吸収されなかったことを意味することができる。曲線は、吸収及び吸着プロセスを推進する勾配が減少するにつれて経時的に上昇してもよい。潜在的な細胞曝露濃度の範囲は、1つ又は複数のチャンネルの各収集期間についてプロットすることができる。例えば、全ての化合物損失が細胞の上流で発生した場合、細胞は、化合物損失が細胞の完全に下流で発生した場合よりも低い化合物濃度に曝露される（この場合、細胞は完全な投与濃度に曝露される）。化合物がほとんど吸収されない場合、ユーザはグラフの上部付近のより狭い範囲を観察することができ、これは細胞が投与された化合物の大部分に曝露されると予想されることを意味する。計算機はまた、1つ又は複数のチャンネルにおける細胞曝露の範囲又は投薬値の一部を示すなど、結果のテーブルをエクスポートすることもできる。

30

40

【0158】

計算機の結果に基づいて、ユーザは、例えば、薬物研究をそのまま進めるか、研究を修正する（流速又は投与時間を変更するなど）か、又は研究をまとめて中止するかを選択することができる。化合物分布キットの結果に基づいて、ユーザは、所望の影響に応じて、任意の数の薬物試験実験条件を個別に又は組み合わせて変更することを選択することができる。例えば、ユーザは、マイクロ流体デバイスの長さに沿って又は経時的に、より一貫

50

した化合物曝露濃度を生成するために流量を調整することができる。実際、流量を増加させることにより、化合物を含有する培地が吸収材料に曝露される時間が最小限に抑えられ、これにより、マイクロ流体デバイスの長さに沿った化合物の損失が最小限に抑えられ、化合物に対する細胞のより均一な曝露がもたらされる。ユーザはまた、単独で、又は流量の増加と協調して、高吸収性化合物の投与濃度を増加させることを選択することができる。同様に、ユーザは、早い時点からの結果を破棄することを決定することができ、なぜなら、これは、吸収による化合物損失の程度が最も高く、したがってその効果が最も影響を与えるときであるためである。したがって、後の時点で、システムが化合物で飽和し始めた可能性があり、特定の目的の化合物の吸収特性に応じて、投与された化合物の濃度が上昇し始めた後、システムからのデータは、より信頼性が高く、正確で、一貫性がある。例えば、6時間から24時間の期間における±18%の不確実性は、いくつかの研究では許容される可能性があるが、他の研究では許容されない可能性がある。なお、ユーザが生物学的研究を進めている場合、ユーザは流出化合物濃度も測定する必要がある。計算機は、ユーザに応じて様々なレベルの吸収データを出力することが想定される。最も広い目的では、計算機は、研究における吸収レベルが許容可能であるか否か、すなわち、吸収レベルが実験データに悪影響を及ぼすほど十分に高いか否かを出力する。許容される吸収レベルは、この研究では有意ではない。計算機出力の広範な目的は、単純又は小規模な実験の結果に基づいて、化合物の実験の実行／中止を決定するものと考えられる。わずかににより詳細なレベルで、計算機は、曝露濃度の信頼区間を報告することができる。更により詳細なレベルでは、計算機は、異なる時点で定量化された吸収レベルを出力し、それにより、ユーザは、実験の期間中にシステムへの化合物の吸収を視覚化することができる。別の実施形態では、計算機は、異なる時点での潜在的な化合物曝露濃度をユーザに通知する。例えば生物製剤を含まない吸収試験の結果を使用して、例えば生物製剤を含む実際の薬物試験における曝露濃度にエラーバー又は信頼区間を設定することができる。曝露濃度の信頼区間は、実験期間と共に減少し、後の時点では信頼性が低下する。計算機は、ユーザが見るためのチャートを出力することができる。チャートの例としては、最小吸収チャート、ほぼ完全な吸収チャート、化合物の出口濃度チャート、細胞曝露範囲範囲、用量反応信頼区間チャートなどが挙げられる。例えば、ユーザは化合物のシステム入力及び出力濃度を入力し、計算機は薬物への細胞曝露のおおよその範囲を出力する。

10

20

30

40

50

【0159】

計算機はまた、吸収性を低下させるための実験的提案を出力することができる。一実施形態では、計算機は、流量の増加又はシステムが定常状態に達したときなどのサンプル採取の後の時点までの待機など、吸収を最小限に抑えるように修正された実験プロトコルを出力する。

【0160】

再び、化合物分布キットのデジタル構成要素は、ユーザのための1つ又は複数のプロトコルを含むことができる。一実施形態では、化合物分布キットのデジタル構成要素は、培養モジュールで薬物研究を実行するためのプロトコルを含み、それは、投与溶液調製プロセス、サンプリング方向、実験期間の推奨される時点を定義する。例えば、3時間未満の実験の場合、0.5、1、1.5、2、及び3時間でシステムをサンプリングすることを提案することができる。例えば、6時間の実験の場合、0.5、1、2、4、及び6時間でシステムをサンプリングすることを提案することができる。例えば、12時間の実験の場合、1、3、6、9、及び12時間でシステムをサンプリングすることを提案することができる。例えば、24時間の実験の場合、1、3、6、12、及び24時間でシステムをサンプリングすることを提案することができる。例えば、48時間の実験の場合、1、3、6、24、及び48時間でシステムをサンプリングすることを提案することができる。例えば、72時間を超える実験の場合、1、6、24、48、及び72時間でシステムをサンプリングすることを提案することができる。化合物分布キットのデジタル構成要素はまた、頻出する質問のカatalogを含むことができる。

【0161】

例示的な方法は、意図された実験又は研究の方法に従うことができる。一例として、化合物分布キットは、マイクロ流体デバイスと共に使用することができる。マイクロ流体デバイスで使用するための例示的な方法は、コーティングなし、細胞播種なし、及び化合物投与回数の減少という変更を伴う意図された研究方法に従うことができる。一実施形態では、実験の生物学的側面に関連するコーティングをマイクロ流体デバイスに行う必要はない場合がある。特に、コーティングが化合物吸収性に影響を及ぼし得る場合、マイクロ流体デバイス材料の構成の化学的性質を変化させるものなどのいくつかのコーティングを行う必要がある可能性がある。一実施形態では、コーティングは、ユーザの裁量で化合物分布キットを用いて行われる。一実施形態では、細胞播種は不要である。一実施形態では、意図された研究プロトコルが試験化合物のいくつかの濃度を比較する場合、吸収制御実験は、これらの濃度のうちの1つについてのみ行う必要がある。一実施形態では、定量（例えばLCMS）感度を最大化するために、意図された研究のために計画された最高の化合物濃度を使用することが推奨される。しかし、化合物の溶解度限界又はより高い濃度で溶液から沈殿する化合物についての懸念がある場合、より低い濃度の試験化合物を選択することができる。溶液からの沈殿は、溶液中の溶質の濃度が、溶質が沈殿する点に達したときである。一実施形態では、化合物は、意図されたプロトコル、実験又は研究に従って、同じマイクロ流体チャンネル内で同じ持続時間、同じ流速で投与される。すなわち、意図された研究が、第2のチャンネルに化合物を含まず、第1のチャンネルでのみ投与することを指定している場合、化合物分布キットの使用中に同じ方法が適用される。一実施形態では、培地及び溶液は、化合物分布キットの使用で、意図された研究と同じであるべきである。一実施形態では、培地組成物及び添加剤と同じ培地又は溶液、並びに任意の添加剤又はサプリメントは、試験化合物と相互作用（例えば、タンパク質結合）することができる。一実施形態では、培地又は溶液はまた、脱気及び予熱などの同じ方法で平衡化されるべきである。一実施形態では、化合物分布キットの使用で収集された流出物サンプルは、意図された研究と同時に収集されるべきである。化合物分布は非常に動的なプロセスであってもよく、したがって、そのようなマッチング時点は、化合物分布キットの結果が意図された研究に厳密に対応することを確実にすることができる可能性がある。灌流マニホールドアセンブリが使用されている実施形態では、培地を交換する直前に流出物サンプルが収集されると同時に、入力培地交換器ごとに1回、各入力リザーバからサンプルを収集することもでき、化合物の衝突又は光分解などの予期しない手段によって化合物がシステムから消失しないことを確実にするのに役立つ。例示的な実施形態では、LCMS分析のための標準曲線を生成することが推奨される。一実施形態では、サンプルあたり少なくとも50 μ Lの体積を使用して三連で5点標準曲線を使用することができる。第1のチャンネル及び第2のチャンネルで使用される培地の段階希釈を調製することができる。LCMSを使用して、入口、流出物、ブランク培地及び標準曲線サンプルを分析することができる。結果は、一実施形態では、化合物分布又は吸収計算機に入れることができる。

【0162】

一実施形態では、吸収実験の結果が意図された実験中に収集されるように、第1の実験プロトコルに付加的に修正を含めることが可能である可能性がある。この代替実施形態は依然として非常に有用であり、化合物濃度の追加測定値を使用して意図された研究の結果を補正することを依然として可能にする。2回ではなく1回の実験を行うことがより効率的であると考えられることができる。

【0163】

化合物分布キットの例示的な使用方法は以下の通りである。

【0164】

1. 培地のガス平衡

1. 50 mL コニカルチューブ中の第1のチャンネルの培地及び第2のチャンネルの培地を水又はビーズ浴中37℃で少なくとも1時間加温する

a. マイクロ流体デバイスごとに各培地タイプを少なくとも4 mL 調製する。化合物ごとに少なくとも3つのマイクロ流体デバイスを試験することが推奨される

b. 培地は、この段階で試験される化合物を除いて、全ての培地成分／サプリメントと適合する化合物を細胞に投与するときに使用される培地と同じ方法で調製されるべきである

2. コニカルチューブをバイオセーフティキャビネット（BSC）に移し、直ちに Sterilip 培地に移す：

a. 0.45 μm の Sterilip ユニットをコニカルチューブに接続し、組み立てられたユニットを反転させる前に 10 秒間真空にする

b. 組み立てられた Sterilip を反転させ、培地が連続流でフィルタを確実に通過するようにする

c. 各 10 mL の培地がフィルタを通過するのに約 2 秒かかるはずである－それよりも長くかかる場合、培地が適切に平衡化されないので、停止してトラブルシューティングプロトコルを参照する

3. 濾過した培地を真空下に 5 分間放置する

4. 依然として真空下にある間に Sterilip ユニットから培地を含むコニカルチューブを取り外し、次いでポンプをオフにする。BSC 内部の蓋を交換し、直ちにインキュベータ又は浴に入れて温度を維持する

5. 使用前にインキュベータ内でキャップをわずかに緩めて、この培地を保存する

【0165】

2. マイクロ流体デバイスの洗浄

1. BSC 内のガンマ線照射マイクロ流体デバイスをパッケージ解除し、150 mm 培養皿に入れる

2. 各チャネルを 200 μL の平衡培地で洗浄する

a. ピペットチップをチャネル入口に対して垂直に配置する

b. チップがポート内にぴったり合っていることを確認し、培地を上部及び底部チャネルに導入する

c. マイクロ流体デバイスの出口から流出液体を吸引する

3. マイクロ流体デバイスの表面から余分な培地を吸引して廃棄するが、チャネルは培地で満たされたままにする

4. マイクロ流体デバイスのチャネル又はポートのどこかに気泡が観察された場合、各マイクロ流体デバイスのポートを吸引してチャネルから培地を除去し、次いで培地を再導入する。

5. 各入口及び出口に平衡化された小さな培地液滴を置く

6. 培養皿を覆い、ポッドがプライミングされるまでインキュベータ内に置く

【0166】

3. 灌流マニホールドアセンブリのプライミング

1. 灌流マニホールドアセンブリパッケージの外側を 70 % エタノールで消毒し、灌流マニホールドアセンブリを BSC に移す

2. 培養モジュールからトレイを回収し、BSC に移す前にエタノールで消毒する

a. ハンドル付きトレイを BSC 内のユーザの左側に向ける

3. 灌流マニホールドアセンブリパッケージを BSC 内で開き、灌流マニホールドアセンブリをトレイ内に配置する

4. 3 mL の平衡化培地を適切な入口リザーバに添加する

5. 300 μL の平衡化培地を適切な出口リザーバに、各出口を直接通過させて添加する

6. 培養モジュール内の灌流マニホールドアセンブリをプライミングする

a. 回転ダイヤルを使用してプライミングサイクルを強調する

b. ダイヤルを押して、プライムサイクルを選択する

c. ダイヤルをスタートオブションまで回転させ、再びダイヤルを押してサイクルを開始する

d. インキュベータのドアを閉め、サイクルが完了するまで 1 分間待つ

10

20

30

40

50

- e. ステータスバーに「Ready」と表示され、サイクルが完了したことを確認する
- 7. トレイをBSCに移す
- 8. 各灌流マニホールドアセンブリの下側を検査する－液滴が4つ全てのポートに形成されたことを観察する
- a. 灌流マニホールドアセンブリが液滴を示さない場合、それらの灌流マニホールドアセンブリ上でプライムサイクルを再実行する
- 9. 灌流マニホールドアセンブリを脇に置き、マイクロ流体デバイスをインキュベータから取り出す

【0167】

- 4. モジュールを培養し、調節するためのマイクロ流体デバイス
- 1. 利き手ではない方の手で灌流マニホールドアセンブリを持つ
- 2. マイクロ流体デバイスが利き手にある状態で、マイクロ流体デバイスキャリアが灌流マニホールドアセンブリに完全に着座するまで、マイクロ流体デバイスキャリアのアームを灌流マニホールドアセンブリの下側のトラックにスライドさせる
- 3. 親指をキャリアタブ上に置き、タブをゆっくりと押し込んで上に上げ、タブを灌流マニホールドアセンブリと係合させる
- 4. 灌流マニホールドアセンブリのウィンドウから過剰な培地を吸引する
- 5. マイクロ流体デバイスを備えた灌流マニホールドアセンブリをトレイに入れ、リザーバを後壁に沿って置く
- 6. 各灌流マニホールドアセンブリ及びマイクロ流体デバイスキャリアについて繰り返す、装填されたトレイをZoeに移す
- 7. Zoeで流量設定を選択する
- a. 流量：上部及び底部チャネル30 μ L／時
- 8. 調節サイクルを実行して気泡形成を減少させる
- a. サイクルは完了するまで2時間かかり、その後、培養モジュールは設定された流量に切り替わる

【0168】

- 5. 第2の調整サイクル
- 1. 調整サイクルを実行した翌朝、ベイの上に配置された銀起動ボタンを押すことによって培養モジュールを一時停止する
- 2. トレイをスライドさせてBSCに移す
- 3. 灌流マニホールドアセンブリの蓋を取り外し、200 μ Lピペットを使用して、各入口及び出口灌流マニホールドアセンブリリザーバに対してバイア洗浄を行う：
 - a. 灌流マニホールドアセンブリリザーバ内の培地を使用して、バイアの上部の真上に200 μ Lの培地をピペットで移して、存在し得る気泡を除去する
 - b. 4つの灌流マニホールドアセンブリリザーバの各々についてこの洗浄ステップを繰り返す
- 4. 灌流マニホールドアセンブリの蓋を交換し、トレイを培養液に戻す
- 5. 調整サイクルを再度実行する
- 6. 第2の調整サイクルの完了後に投与を開始する準備ができている

【0169】

- 6. 投与溶液の調製
- 注1：システム吸収試験のためのマイクロ流体デバイス研究を実行するために使用されるサプリメントを含む同じ培地を使用する。
- 1. プロトコルのこの部分の研究設計及びデータ処理については計算機を参照されたい
 - a. 「USER INPUTS」タブで、指定された空間（流量、研究期間、濃度の単位、化合物を投与するチャネル）で計画された投与実験の詳細を追加する。
 - b. ドロップダウンメニューを使用して、化合物を投与するチャネルを選択する
 - i. 第1
 - ii. 第2

i i i . 第 1 及び 第 2

2 . 計算機に示された投与量に基づいて、選択された溶媒に溶解することによって化合物のストック溶液を調製する

3 . ストック溶液を適切なガス平衡化培地で希釈する

【 0 1 7 0 】

7 . 投与及びサンプル収集

1 . 培養モジュールを一時停止する

2 . トレイを B S C に移す

3 . 吸引器の先端がバイアに近づきすぎるのを確実に回避するように、培地を入口及び出口から吸引する（バイアの近くに少量の培地が残し、これは許容可能である）。

4 . 計算機を参照し、研究を完了するために必要な総培地容量を灌流マニホールドアセンブリの上部及び底部入口リザーバに添加する。

5 . 各灌流マニホールドアセンブリの上部及び底部入口リザーバから 5 0 μ L のサンプルを採取して、 $t = 0$ の投与培地濃度を捕捉する。

6 . 標準曲線調製のために、コニカルからの 2 0 0 μ L の投与培地並びに化合物を含まない「ブランク」培地を準備する

a . ユーザの標準的な慣行に従ってこれらのサンプルを保存する

7 . トレイを培養モジュールに戻し、流量を 6 0 0 μ L / 時に設定することによって投与培地でシステムをプライミングし、5 分間実行する。これにより、マイクロ流体デバイス内の培地が投与溶液に置き換えられる。

8 . 培養モジュールを一時停止し、トレイを B S C に移す

9 . 後の時点で収集された化合物流出物を希釈しないように、流出リザーバに収集された流出物を完全に吸引する。

1 0 . トレイを培養モジュールに戻し、研究で指示された流量に設定する。培養モジュール上で流れが開始されると、サンプル収集のタイミングを開始する

1 1 . 残りの投与溶液を使用して、標準校正曲線用のサンプルとして段階希釈を調製する

a . 以下の比（投与溶液：培地）を使用した上部及び底部培地の連続希釈を使用して、5 0 μ L の体積の三連で 5 点標準曲線用のサンプルを生成することが推奨される。

i . 化合物を含む希釈されていない培地

i i . 1 : 1 0 希釈

i i i . 1 : 1 0 0 希釈

i v . 1 : 1 0 0 0 希釈

v . ブランク（化合物を含まない培地）

b . ユーザの標準的な慣行に従ってこれらのサンプルを保存する

1 2 . 試験の終了までの残りの時点で入口及び出口リザーバから 5 0 μ L をサンプリングする

a . 最初及び最後の時点を除いて、その後のサンプル時間は入口リザーバのサンプリングを必要としない

b . ユーザの標準的な慣行に従ってサンプルを取り扱い、処理する

c . 灌流マニホールドアセンブリを培養モジュールに戻す前に出口を完全に吸引する

注：収集された体積が 5 0 μ L 未満である場合、収集された体積を記録する。

1 3 . 投与実験が完了したら、サンプルを L C M S に送る。

8 . データ解析

1 4 . L C M S によるサンプル分析時に、濃度データを計算機のカラム D、E、F の「U s e r I n p u t s」シートに適切なセルに入力する

1 5 . マークされた適切なタブで結果を表示する。

a . 回収された濃度を、上部及び底部チャンネルの両方について経時的にプロットする。

b . 潜在的な細胞曝露濃度の範囲を、各収集期間及び両方のチャンネルについてプロットする。

c. 表は、両チャンネルにおける経時的な細胞曝露濃度の範囲（最大値及び最小値）、並びに投与濃度の割合として表される曝露を示す。

【0171】

本発明の一実施形態は、システム内の化合物分布を分析する方法であって、a) システム及び当該システムと共に使用するための第1の実験プロトコルを提供することであって、当該第1の実験プロトコルが、化合物を当該システムに導入し、1つ又は複数の時点で行動を起こすことを含む、第1の実験プロトコルを提供すること、b) 第1の修正された実験プロトコルを生成するために当該第1の実験プロトコルを修正すること、c) 当該第1の実験プロトコルからの当該時点の1つ又は複数における化合物濃度を測定すること、d) 当該第1の修正された実験プロトコルを実行すること、及びe) 当該化合物の濃度の当該測定値を使用して、当該システム全体の化合物分布を分析することを含む。一実施形態では、本方法は、f) 当該第1の実験プロトコルを実施するステップを更に含む。一実施形態では、当該システムは、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該システムは、輸液チューブを含む。一実施形態では、当該システムは、シリンジを含む。一実施形態では、当該システムは、1つ又は複数の生物学的要素を含み、当該第1の実験プロトコルは、当該1つ又は複数の生物学的要素の少なくとも1つを除外するように修正される。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、当該生物学的要素に対する化合物試験を含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、細胞を含み、当該第1の修正された実験プロトコルは、細胞を含まない。一実施形態では、当該システムは、コーティングを含み、当該第1の実験プロトコルは、コーティングを除外することによって修正される。一実施形態では、当該第1の修正された実験プロトコルは、当該第1の実験プロトコルの1つ又は複数の時点で行動を起こすことを含まない。一実施形態では、当該濃度の測定を実行することは、1つ又は複数の時点で当該行動を起こすことに取って代わる。一実施形態では、当該第1の修正された実験プロトコルは、当該第1の実験プロトコルと比較して、入力化合物濃度のサブセットのみが当該修正された実験プロトコルに含まれるという点で修正される。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルと比較して多孔質要素が除外されるという点で、当該第1の修正された実験プロトコルである。一実施形態では、当該システムは、細孔を有する第1の膜を含む第1のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該システムは、当該修正された実験プロトコルにおいて第2のシステムで置き換えられ、当該第2のシステムは、当該第1の膜が細孔を含む少なくとも1つの領域に細孔のない膜を含まない第2のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、当該システム内で流体を流すことを含む。一実施形態では、当該システムは、システムへの流体入力を可能にするように構成された入力ポートを含む。一実施形態では、システムは、システムからの流体出力を可能にするように構成された出力ポートを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、当該入力ポートに流入することを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、当該出力ポートから第1のサンプルを収集することを含む。一実施形態では、当該化合物の濃度の当該測定は、当該出力ポートから試料を収集すること、及びサンプル中の当該化合物の当該濃度を定量することを含む。一実施形態では、当該第1の修正された実験プロトコルは、当該システムに吸収される当該化合物の割合を更に定量する。一実施形態では、本方法は、当該システムに流体流を導入するステップを更に含む。一実施形態では、当該行動を起こすことは、流出物をサンプリングすることを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、見かけの代謝産物値を達成するために当該流出物をアッセイすることを更に含む。一実施形態では、本方法は、当該化合物の濃度の当該測定値を使用して当該見かけの代謝産物値を補正することを更に含む。一実施形態では、本方法は、当該化合物の濃度の当該測定値を使用して、当該見かけの代謝産物値の変動性を決定することを更に含む。一実施形態では、本方法は、当該濃度の測定値を使用して、当該第1の実験プロトコルを実行するかどうかを決定することを更に含む。一実施形態では、本方法は、(i) 当該化合物の濃度の当該測定値を使用して、第2の修正された実験プロトコルを生成すること、(ii) 当該第2の修正された実験プロトコルを実行することを更に含む。一実施形

10

20

30

40

50

態では、当該第1の実験プロトコルは、生細胞を含む。

【0172】

システム内の化合物分布を決定する方法であって、a) 第1のシステム及び当該第1のシステムのための第1の実験プロトコルを提供することであって、当該第1のシステムが、i) 第1流体流路、ii) 第2の流体チャネル、及びiii) 当該第1の流体チャネルと当該第2の流体チャネルとの間に配置される第1の膜であって、当該第1の膜が、細孔を含む、第1の膜を含み、当該第1の実験プロトコルが、化合物を当該第1のシステムに導入し、1つ又は複数の時点で行動を起こすことを含む、第1の実験プロトコルを提供すること、b) 当該第1の膜を第2の膜で置き換えることによって、第1の修正された実験プロトコルを生成するように当該第1の実験プロトコルを修正することであって、当該第2の膜が細孔を欠いている、第1の実験プロトコルを修正すること、c) 当該修正された実験プロトコルを実行すること、d) 当該第1の実験プロトコルの当該時点の1つ又は複数で、当該化合物の濃度の測定を実行すること、及びe) 当該化合物の濃度の当該測定値を当該化合物の濃度と比較して、当該システム中の化合物分布を決定することを含む。一実施形態では、当該行動を起こすことは、流出物をサンプリングすることを含む。一実施形態では、本方法は、当該流出物を更に含む。一実施形態では、当該実験プロトコルは、1つ又は複数の生物学的要素を含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、当該生物学的要素の少なくとも1つを除外することによって修正される。一実施形態では、当該生物学的要素は、細胞を含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、生物学的コーティングを含む。一実施形態では、当該修正された実験プロトコルは、当該実験プロトコルの設定に吸収される当該化合物の割合を計算することによって当該システムへの化合物吸収を決定する。一実施形態では、当該実験プロトコルは、当該1つ又は複数の生物学的要素を当該化合物と接触させることを含む。

10

20

【0173】

システム内の化合物分布を決定する方法であって、a) 1つ又は複数の生物学的要素を含むシステム及び当該システムのための実験プロトコルを提供することであって、当該1つ又は複数の生物学的要素が、化合物と接触していること、b) 当該1つ又は複数の生物学的要素の少なくとも1つを除外することによって当該実験プロトコルを修正すること、c) 当該修正された実験プロトコルを実行すること、及びd) 当該システム中の当該化合物の濃度を測定することによって、当該システム中の当該化合物の分布を決定することを含む。一実施形態では、当該実験プロトコルは、流体流を当該システムに導入することを含む。一実施形態では、本方法は、流出物を収集することを更に含む。一実施形態では、当該実験プロトコルは、当該流出物をアッセイすることを含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、細胞を含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、生物学的コーティングを含む。一実施形態では、当該システムは、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該化合物の当該分布は、当該実験プロトコルからの結果のエラーバーを計算するために使用される。一実施形態では、当該化合物の割合分布は、当該実験プロトコルについての半数阻害濃度 (IC₅₀) を計算するために使用される。

30

【0174】

システム内の化合物分布を評価する方法であって、a) システム及び当該システムのための第1の実験プロトコルを提供することであって、当該第1の実験プロトコルは、化合物を当該システムに導入することを含む、第1の実験プロトコルを提供すること、b) 修正された実験プロトコルを生成するために当該第1の実験プロトコルを修正することであって、当該修正された実験プロトコルが、i) 第1の濃度を使用して当該化合物を導入すること、及びii) 当該化合物の濃度の第1の測定を実行することを含む、第1の実験プロトコルを修正すること、c) 当該修正された実験プロトコルを実行すること、d) 当該化合物の濃度の当該測定値を閾値と比較すること、e) 当該濃度の測定値が当該閾値を超える場合、当該第1の実験プロトコルを実行することを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、流体流を当該システムに導入することを更に含む。一実施形態では、第1の実験プロトコルは、1つ又は複数の時点で流出物を収集することを更に含む。一

40

50

実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、当該流出物をアッセイすることを含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、細胞を含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、生物学的コーティングを含む。一実施形態では、当該システムは、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該第1の測定は、当該第1の実験プロトコルの当該1つ又は複数の時点のうちの少なくとも1つで行われる。一実施形態では、閾値に対する当該化合物の濃度の当該測定値は、当該第1の測定値を当該第1の濃度で除算し、第1の比を得ることによって比較される。一実施形態では、当該閾値は、10%、20%、33%、50%、66%、及び75%のうちの1つを上回る第1の比率値である。一実施形態では、当該修正された実験プロトコルは、入力化合物濃度を測定することを更に含み、当該第1の測定値は、測定された当該入力濃度で除算されて、測定された比率を得る。

10

【0175】

本発明の一実施形態は、化合物分布を評価する方法であって、a) 流体回路に流れを導入することであって、当該流れが化合物の初期濃度を含む、流れを導入すること、b) 当該流体回路から1つ又は複数の流出物サンプルを収集すること、c) 測定された濃度を生成するように、当該1つ又は複数の流出物サンプル中の当該化合物の濃度を決定すること、及びd) 当該測定された濃度を当該化合物の初期濃度と比較し、それによって当該流体回路内の化合物吸収を評価することを含む。一実施形態では、当該流体回路は、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスは、少なくとも1つの入口及び／又は1つの出口を含む。一実施形態では、流体回路は、当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスと流体連通する1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを更に含む。一実施形態では、当該流体回路は、輸液チューブを含む。一実施形態では、当該流体回路は、1つ又は複数のシリンジを含む。一実施形態では、当該流体回路は、小分子を吸収するポリマーを含む。一実施形態では、1つ又は複数の流出物サンプル中の当該化合物の当該濃度は、クロマトグラフィ及び／又は分光分析を使用して決定される。一実施形態では、1つ又は複数の流出物サンプル中の当該化合物の当該濃度は、液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)を使用して決定される。一実施形態では、当該化合物は、小分子化合物である。一実施形態では、当該化合物は、薬物である。

20

【0176】

システムへの化合物吸収を評価する方法が企図され、a) システムの実験プロトコルを定義すること、b) 生物学的要素を除外するために当該実験プロトコルを修正すること、c) 当該修正された実験プロトコルを実行して、当該システムへの化合物吸収を評価することを含む。システムへの化合物吸収を評価する方法が企図され、a) 1つ又は複数の多孔質要素を含む1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含むシステムの実験プロトコルを定義すること、b) 1つ又は複数の多孔質要素を含む当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを非多孔質要素を含む1つ又は複数のマイクロ流体デバイスに置き換えるように、当該実験プロトコルを修正すること、c) 当該修正された実験プロトコルを実行して、当該システムへの化合物吸収を評価することを含む。システムへの化合物吸収を評価する方法が企図され、a) システムの実験プロトコルを定義すること、b) 生物学的要素を除外することによって当該実験プロトコルを修正すること、c) 当該修正された実験プロトコルを実行して、経時的な当該システムへの化合物の吸収割合を評価することであって、当該化合物の当該吸収割合を使用して、実験の期間にわたって当該実験プロトコルのエラー計算を計算する、吸収割合を評価することを含む。

30

40

【0177】

化合物吸収を評価する方法が企図され、a) 化合物の使用を含むシステムの実験プロトコルを定義すること、b) 生物学的要素を除外するために当該実験プロトコルを修正すること、c) 当該化合物の当該システムへの吸収を評価するために、当該修正された実験プロトコルを実行すること、及びd) 当該化合物の50%未満が、目的の時点で当該システムに吸収される場合、当該実験プロトコルを実行することを含む。一実施形態では、当該

50

実験プロトコルは、流出物を収集することを含む。一実施形態では、当該実験プロトコルは、当該流出物をアッセイすることを含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、細胞を含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、生物学的コーティングを含む。一実施形態では、当該システムは、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該システムへの化合物吸収は、40%未満である。一実施形態では、当該システムへの化合物吸収は、30%未満である。一実施形態では、当該システムへの化合物吸収は、20%未満である。一実施形態では、当該システムへの化合物吸収は、10%未満である。一実施形態では、当該システムへの化合物吸収は、5%未満である。

【0178】

システムにおける化合物分布を評価する方法が企図され、a) 実験系又は臨床系を提供すること、b) システムの第1の実験プロトコルを定義することであって、当該第1の実験プロトコルが、化合物を当該システムに導入すること及び1つ又は複数の時点で行動を起こすことを含む、第1の実験プロトコルを定義すること、c) 修正された実験プロトコルを生成するために当該第1の実験プロトコルを修正することであって、当該修正された実験プロトコルが、当該第1の実験プロトコルからの当該時点のうちの1つ又は複数における当該化合物の濃度の測定を実施することを含む、当該第1の実験プロトコルを修正すること、d) 当該修正された実験プロトコルを実行すること、及びe) 当該化合物の濃度の当該測定値を使用して、化合物分布を評価することを含む。一実施形態では、本方法は、f) 当該第1の実験プロトコルを実施するステップを更に含む。一実施形態では、当該システムは、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該システムは、輸液チューブを含む。一実施形態では、システムは、シリンジを含む。一実施形態では、当該システムは、ピペットチップを更に含む。一実施形態では、当該システムは、培養プレートを含み、当該第1の実験プロトコルは、生物学的要素を除外するように修正される。一実施形態では、当該実験プロトコルは、当該生物学的要素に対する化合物試験を含む。一実施形態では、当該システムは、細胞を含み、当該第1の実験プロトコルは、細胞を除外することによって修正される。一実施形態では、当該システムは、コーティングを含み、当該第1の実験プロトコルは、コーティングを除外することによって修正される。一実施形態では、当該実験プロトコルは、1つ又は複数の時点で、当該行動を起こすことを除去することによって修正される。一実施形態では、当該行動を取ることは、当該摂取行為の濃度の測定を行うことである。一実施形態では、当該実験プロトコルは、入力化合物濃度のサブセットのみが当該修正された実験プロトコルに含まれるという点で修正される。一実施形態では、当該実験プロトコルは、多孔質要素を除外することによって修正される。一実施形態では、当該システムは、細孔を有する第1の膜を含む第1のマイクロ流体デバイスを含み、当該システムを第2のシステムで置き換えることを更に含み、当該第2のシステムは、当該第1の膜が細孔を含む少なくとも1つの領域に細孔のない膜を含まない第2のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、当該システム内で流体を流すことを含む。一実施形態では、当該システムは、システムへの流体入力を可能にするように構成された入力ポートを含む。一実施形態では、システムは、システムからの流体出力を可能にするように構成された出力ポートを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、当該入力ポートに流入することを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、当該出力ポートから第1のサンプルを収集することを含む。一実施形態では、当該修正された実験プロトコルの当該化合物の濃度の測定を行うことは、当該出力ポートから濃度サンプルを収集することを含む。一実施形態では、当該修正された実験プロトコルは、当該システムに吸収される当該化合物の割合を更に評価する。一実施形態では、当該行動を起こすことは、流出物をサンプリングすることを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、結果を達成するために当該流出物をアッセイすることを更に含む。一実施形態では、当該化合物の濃度の当該測定は、当該結果を補正するためのものである。一実施形態では、当該化合物の濃度の当該測定は、当該結果の変動性を決定するためのものである。一実施形態では、濃度の当該測定は、当該第1の実験プロトコル

10

20

30

40

50

を実行するかどうかを決定するためのものである。一実施形態では、本方法は、(i) 当該化合物の濃度の当該測定値を使用して、第2の修正された実験プロトコルを生成すること、(ii) 当該第2の修正された実験プロトコルを実行することを更に含む。一実施形態では、当該システムは、生細胞を含む。

【0179】

システム内の化合物分布を評価する方法が企図され、a) 第1のシステムのための第1の実験プロトコルを定義することであって、当該第1のシステムが、i) 第1の流体チャネル、ii) 第2の流体チャネル、及びiii) 当該第1の流体チャネルと当該第2の流体チャネルとの間の少なくとも1つの領域に散在する第1の膜であって、当該第1の膜が、細孔を含む、第1の膜を含み、当該第1の実験プロトコルが、化合物を当該第1のシステムに導入し、1つ又は複数の時点で行動を起こすことを含む、第1の実験プロトコルを定義すること、b) 当該第1の膜を第2の膜で置き換えることによって、修正された実験プロトコルを生成するように当該第1の実験プロトコルを修正することであって、当該第2の膜が、当該第1の膜が細孔を含む少なくとも1つの対応する領域に細孔を欠いており、当該修正された実験プロトコルが、当該第1の実験プロトコルの当該時点の1つ又は複数で当該化合物の濃度の測定を実施することを含む、第1の実験プロトコルを修正すること、c) 当該修正された実験プロトコルを実行すること、及びd) 化合物吸収を評価するために当該化合物の濃度の当該測定値を使用することを含む。一実施形態では、当該行動を起こすことは、流出物をサンプリングすることを含む。一実施形態では、本方法は、当該流出物をアッセイすることを更に含む。一実施形態では、当該実験プロトコルは、生物学的要素を除外することによって修正される。一実施形態では、当該生物学的要素は、細胞を含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、生物学的コーティングを含む。一実施形態では、当該修正された実験プロトコルは、当該実験プロトコルの設定に吸収される当該化合物の割合を評価することによって当該システムへの化合物吸収を評価する。一実施形態では、当該実験プロトコルは、当該生物学的要素に対する化合物試験を含む。

【0180】

システム内の化合物分布を評価する方法が企図され、a) システムの実験プロトコルを定義すること、b) 生物学的要素を除外することによって当該実験プロトコルを修正すること、c) 当該修正された実験プロトコルを執行して、当該システムへの化合物の吸収割合を評価することであって、当該化合物の当該吸収割合は、当該実験プロトコルの結果を計算することである、吸収割合を評価することを含む。一実施形態では、当該実験プロトコルは、流出物を収集することを含む。一実施形態では、当該実験プロトコルは、当該流出物をアッセイすることを含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、細胞を含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、生物学的コーティングを含む。一実施形態では、当該システムは、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該実験プロトコルは、化合物を含む。一実施形態では、当該実験プロトコルは、当該生物学的要素に対して化合物を試験することを含む。一実施形態では、当該化合物の当該吸収割合は、当該実験プロトコルからの当該結果のエラーバーを計算するために使用される。一実施形態では、当該化合物の当該吸収割合は、当該実験プロトコルについての半数阻害濃度 (IC50) を計算するために使用される。

【0181】

システム内の化合物分布を評価する方法であって、a) システムのための第1の実験プロトコルを定義することであって、当該第1の実験プロトコルが、化合物を当該システムに導入することを含む、第1の実験プロトコルを定義すること、b) 修正された実験プロトコルを生成するために当該第1の実験プロトコルを修正することであって、当該修正された実験プロトコルが、i) 第1の濃度を使用して当該化合物を導入すること、及びii) 当該化合物の濃度の第1の測定を実行することと、を含む、第1の実験プロトコルを修正すること、c) 当該修正された実験プロトコルを実行すること、d) 当該化合物の濃度の当該測定値を閾値と比較すること、及びe) 当該濃度の測定値が当該閾値を超える場合、第1の実験プロトコルを実行することを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロト

コルは、流出物を収集することを含む。一実施形態では、当該第1の実験プロトコルは、当該流出物をアッセイすることを含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、細胞を含む。一実施形態では、当該生物学的要素は、生物学的コーティングを含む。一実施形態では、当該システムは、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該第1の測定は、第1の実験プロトコルと同じ時点の1つ又は複数で行われる。一実施形態では、(d)の当該比較は、当該第1の測定値を当該第1の濃度で除算して第1の比率を得ることを含む。一実施形態では、当該閾値は、10%、20%、33%、50%、66%、及び75%のうちの1つを上回る第1の比率値である。一実施形態では、当該修正された実験プロトコルは、入力化合物濃度を測定することを更に含み、当該第1の測定値は、測定された当該入力濃度で除算されて、測定された比率を得る。

10

【0182】

化合物吸収を評価する方法が企図され、a)化合物を流体回路に導入すること、b)当該流体回路から1つ又は複数の流出物サンプルを収集すること、c)測定された濃度を生成するように、当該1つ又は複数の流出物サンプル中の当該化合物の濃度を決定すること、及びd)当該測定された濃度を当該化合物の濃度と比較し、それによって当該流体回路内の化合物吸収を評価することを含む。一実施形態では、当該流体回路は、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む。一実施形態では、当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスの各々は、少なくとも1つの入口を含む。一実施形態では、当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスの各々は、少なくとも1つの出口を含む。一実施形態では、当該流体回路は、当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスと流体連通する1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを含む。一実施形態では、当該流体回路は、輸液チューブを含む。一実施形態では、当該流体回路は、1つ又は複数のシリンジを含む。一実施形態では、当該流体回路は、小分子を吸収するポリマーを含む。一実施形態では、1つ又は複数の流出物サンプル中の当該化合物の当該濃度は、クロマトグラフィ及び/又は分光分析を使用して決定される。一実施形態では、1つ又は複数の流出物サンプル中の当該化合物の当該濃度は、液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)を使用して決定される。一実施形態では、当該化合物は、小分子化合物である。一実施形態では、当該化合物は、薬物である。一実施形態では、当該流体回路は、1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを更に含む。一実施形態では、当該流体回路は、少なくとも1つの入口を更に含む。

20

【0183】

一実施形態では、化合物分布キットのワークフロー又は使用方法は、(1)培養モジュールと共に使用するためのマイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリを調製するステップ、(2)校正のための1つ又は複数の投与溶液を調製するステップ、(3)マイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリを投与するステップ、(4)所望の時点で流出物を収集するステップ、(5)流出化合物濃度を定量するステップ、及び(6)化合物のシステム吸収を評価するステップを含むことができる。化合物吸収を評価する方法が企図され、a)化合物、ストック溶液、並びに流体デバイス及び少なくとも1つの入口及び少なくとも1つの出口を含む流体回路を提供すること、b)投与溶液及び複数の校正溶液を調製するように、当該化合物と当該ストック溶液とを組み合わせること、c)当該投与溶液の少なくとも一部を当該少なくとも1つの入口の1つ又は複数で当該流体デバイスに導入すること、d)当該少なくとも1つの出口の1つ又は複数から1つ又は複数の流出物サンプルを収集すること、e)測定された濃度を生成するために、当該1つ又は複数の流出物サンプル中の当該化合物の濃度を決定すること、及びf)当該測定された濃度を当該複数の校正溶液中の当該化合物の濃度と比較し、それによって当該流体回路内の化合物吸収を評価することを含む。一実施形態では、1つ又は複数の流出物サンプル中の当該化合物の当該濃度は、クロマトグラフィ及び/又は分光分析を使用して決定される。一実施形態では、1つ又は複数の流出物サンプル中の当該化合物の当該濃度は、液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)を使用して決定される。一実施形態では、当該化合物は、小分子化合物である。一実施形態では、当該化合物は、薬物である。一実施形態では、当該校正溶液は、5点校正を含む。一実施形態では、当該流体回路は、1つ又は複

30

40

50

数の灌流マニホールドアセンブリを更に含む。

【0184】

フローシステムへの化合物吸収を評価する方法が企図され、a. 1つ又は複数のマイクロ流体デバイス、1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリ、1つ又は複数の培養モジュール、化合物、及びストック溶液を提供すること、b. 当該ストック溶液に当該化合物を投与することによって、1つ又は複数の投与溶液及び1つ又は複数の校正溶液を調製すること、c. 当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイス及び当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを当該ストック溶液でプライミングすること、d. 当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイス、当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリ、及び当該1つ又は複数の培養モジュールを流体接続して、フローシステムを作成すること、e. 当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイス及び当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリにおいて当該ストック溶液を当該投与溶液と置き換えること、f. 1つ又は複数の時点で複数の流出溶液を収集すること、g. 当該複数の流出溶液中の当該化合物の濃度を決定すること、及びh. 当該複数の流出溶液及び当該1つ又は複数の校正溶液中の当該化合物の濃度を比較し、それによって当該フローシステムへの化合物吸収を評価することを含む。一実施形態では、当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスは各々、少なくとも1つの入口及び少なくとも1つの出口を含む。一実施形態では、当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリは各々、少なくとも1つの入口及び少なくとも1つの出口を含む。一実施形態では、当該複数の流出物サンプル中の当該化合物の当該濃度は、クロマトグラフィ及び／又は分光分析を使用して決定される。一実施形態では、当該複数の流出物サンプル中の当該化合物の当該濃度は、液体クロマトグラフィー質量分析（LCMS）を使用して決定される。一実施形態では、当該化合物は、小分子化合物である。一実施形態では、当該化合物は、薬物である。一実施形態では、当該1つ又は複数の校正溶液は、5点校正を含む。

10

20

【0185】

フローシステムへの化合物吸収を評価する方法が企図され、a. 1つ又は複数のマイクロ流体デバイス、1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリ、少なくとも1つの培養モジュール、化合物、及びストック溶液を提供すること、b. i. 当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを当該ストック溶液でプライミングすること、及びii. 当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリに流体接続し、当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを当該少なくとも1つの培養モジュールに流体接続して、フローシステムを生成することによって、当該1つ又は複数の培養モジュールと共に使用するための当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイス及び当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを調製すること、c. 当該ストック溶液に当該化合物を投与することによって、投与溶液及び1つ又は複数の校正溶液を調製すること、d. i. 当該少なくとも1つの培養モジュールから当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを流体的に分離すること、ii. 当該ストック溶液を当該投与溶液と置き換えること、iii. 当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを当該少なくとも1つの培養モジュールに流体接続することによって、当該投与溶液を当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスに導入すること、e. 当該フローシステムからの流出物を1つ又は複数の時点でサンプリングして、1つ又は複数の流出物サンプルを生成すること、d. 当該1つ又は複数の校正溶液、当該1つ又は複数の流出物サンプル、当該投与溶液、及び当該ストック溶液中の当該化合物の濃度を決定すること、並びにe. 当該1つ又は複数の校正溶液、当該1つ又は複数の流出物サンプル、当該投与溶液、及び当該ストック溶液中の当該化合物の濃度を比較し、それによって当該フローシステムへの化合物吸収を評価することを含む。

30

40

【0186】

フローシステムへの化合物吸収を評価する方法が企図され、a. 1つ又は複数のマイクロ流体デバイス、各々が少なくとも1つの入口リザーバ及び少なくとも1つの出口リザーバを含む1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリ、少なくとも1つの培養モジュール

50

、化合物、及びストック溶液を提供すること、b. i. フィルタを使用して当該ストック溶液を脱気すること、i i. 当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを当該ストック溶液で洗浄すること、i i i. 当該少なくとも1つの入口リザーバ及び当該少なくとも1つの出口リザーバを、当該脱気されたストック溶液で部分的又は完全に充填することによって、1つ又は複数の灌流モジュールアセンブリをプライミングすること、並びにi v. 当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリと流体接続し、当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを当該少なくとも1つの培養モジュールと流体接続して、フローシステムを作成することによって、当該少なくとも1つの培養モジュールと共に使用するためのマイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリを調製すること、c. 当該ストック溶液に当該化合物を投与することによって投与溶液を調製すること、d. i. 当該少なくとも1つの培養モジュールから当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを流体的に切断し、当該少なくとも1つの入口リザーバに残っている当該ストック溶液のいずれかを除去すること、i i. 当該少なくとも1つの入口リザーバを当該投与溶液で部分的又は完全に充填し、当該投与溶液及び当該ストック溶液の各々の一部を取っておくこと、i i i. 当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを当該少なくとも1つの培養モジュールに流体接続し、当該少なくとも1つの培養モジュールを高流量で少なくとも5分間フラッシングすること、i v. 当該少なくとも1つの培養モジュールの稼働を停止し、当該少なくとも1つの培養モジュールから当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを流体的に切断し、当該少なくとも1つの出口リザーバから得られた流出物を吸引すること、v. 当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを当該少なくとも1つの培養モジュールに流体接続し、当該少なくとも1つの培養モジュールを低流量で所望の期間稼働させること、並びにv i. 計画された時点で、当該少なくとも1つの入口リザーバ及び当該少なくとも1つの出口リザーバからサンプリングして、1つ又は複数のサンプルを得ることによって、当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイス及び当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリに当該投与溶液を導入すること、e. 5点標準曲線用の複数の校正溶液を調製することであって、当該複数の校正溶液が、i. 希釈されていない投与溶液の少なくとも1つのサンプル、i i. 1:10希釈の当該投与溶液対当該ストック溶液の少なくとも1つのサンプル、i i i. 1:100希釈の当該投与溶液対当該ストック溶液の少なくとも1つのサンプル、i v. 1:1000希釈の当該投与溶液対当該ストック溶液の少なくとも1つのサンプル、及びv. 当該ストック溶液の少なくとも1つのサンプルを含む、校正溶液を調製すること、f. クロマトグラフィ及び／又は分光分析を使用して、当該複数の校正溶液、当該1つ又は複数のサンプル、当該投与溶液、及び当該ストック溶液中の当該化合物の濃度を決定すること、g. 当該1つ又は複数の校正溶液、当該1つ又は複数のサンプル、当該投与溶液、及び当該ストック溶液中の当該化合物の濃度を比較し、それによって当該フローシステムへの化合物吸収を評価することを含む。

10

20

30

40

50

【0187】

一実施形態では、化合物分布キットのためのワークフロー又は使用方法は、(1) (a) 当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを培地で洗浄するステップ、及び(b) 当該1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを少なくとも培養モジュールと流体接続することによって、培養モジュールと共に使用するための1つ又は複数のマイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリを調製するステップ、(2) (a) ストック溶液を調製すること、及び(b) 当該ストック溶液に化合物を投与することによって、1つ又は複数の投与溶液を調製するステップ、(3) (a) 当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを当該少なくとも1つの培養モジュールから流体的に切断すること、(b) 当該培地を当該少なくとも1つの投与溶液で置き換えること、及び(c) 当該少なくとも1つの培養モジュールから当該1つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを流体接続することによって、当該マイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリを投与するステップ、(4) (a) 1つ又は複数の時点で、当該出口リザーバからサンプル溶液を採取すること、(b) 校正曲線用の複数の校正溶液を調製すること、及び(c) 当該サンプル溶液及び

当該複数の校正溶液の全てにおける当該化合物の濃度を分析的に定量することによって、サンプル化合物濃度を定量するステップ、並びに（５）当該複数の当該校正溶液中の当該化合物の濃度を当該１つ又は複数のサンプル溶液中の当該化合物の濃度と比較することによって、化合物吸収を分析的に評価するステップを含むことができる。

【０１８８】

一実施形態では、化合物分布キットのためのワークフロー又は使用方法は、（１）（a）フィルタを使用して培地を脱気すること、及び（b）当該１つ又は複数のマイクロ流体デバイスを当該脱気された培地で洗浄すること、並びに（c）（i）当該少なくとも１つの入口リザーバ及び少なくとも１つの出口リザーバを培地で充填することによって、１つ又は複数の灌流モジュールアセンブリを当該脱気された培地でプライミングすること、（i i）当該１つ又は複数のマイクロ流体デバイスを当該１つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリと流体接続すること、及び（i i i）当該１つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを少なくとも１つの培養モジュールと流体連通して配置することによって、当該１つ又は複数のマイクロ流体デバイスを当該培養モジュールと流体接続することによって、培養モジュールと共に使用するための少なくとも１つの入口リザーバ及び少なくとも１つの出口リザーバを含むマイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリを調製するステップ、（２）（a）ストック溶液を調製すること、及び（b）投与溶液を生成するために当該ストック溶液に化合物を投与することによって、投与溶液を調製するステップ、（３）（i）当該少なくとも１つの培養モジュールから当該１つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを流体的に切断し、当該少なくとも１つの入口リザーバに残っている任意の培地を除去すること、（i i）当該少なくとも１つの入口リザーバを当該投与溶液で充填し、当該投与溶液及び当該ストック溶液の各々の一部を取っておくこと、（i i i）当該灌流マニホールドアセンブリを当該少なくとも１つの培養モジュールに流体接続し、当該少なくとも１つの培養モジュールを高流量で５分間フラッシングすること、（i v）当該記少なくとも１つの培養モジュールの稼働を停止し、当該少なくとも１つの培養モジュールから当該１つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを除去し、当該少なくとも１つの出口リザーバから得られた流出物を吸引すること、（v）当該１つ又は複数の灌流マニホールドアセンブリを当該少なくとも１つの培養モジュールに流体接続すること、並びに（v i）計画された時点で、当該入口及び出口リザーバからサンプリングし、１つ又は複数のサンプル溶液を得ることによって、マイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリを投与するステップ、（４）（a）５点標準曲線用の複数の校正溶液を調製することであって、当該複数の校正溶液が、（i）希釈されていない投与溶液の少なくとも１つのサンプル、（i i）１：１０希釈の当該投与溶液対当該ストック溶液の少なくとも１つのサンプル、（i i i）１：１００希釈の当該投与溶液対当該ストック溶液の少なくとも１つのサンプル、（i v）１：１０００希釈の当該投与溶液対当該ストック溶液の少なくとも１つのサンプル、及び（v）当該ストック溶液の少なくとも１つのサンプルを含む、校正溶液を調製すること、（b）当該複数の校正溶液及び当該１つ又は複数のサンプル溶液にわたる当該化合物の濃度を分析的に定量することによって、サンプル化合物濃度を定量するステップ、並びに（５）吸収計算機を使用して、当該複数の当該校正溶液中の当該化合物の濃度を当該１つ又は複数のサンプル溶液中の当該化合物の濃度と比較することによって、化合物吸収を分析的に評価するステップを含むことができる。

【０１８９】

本発明はまた、マイクロ流体デバイス内のガス分布に関する。マイクロ流体デバイス内のガス分布を制御するためのいくつかの方法が企図される。

【０１９０】

ガスを制御することが企図される一実施形態は、ガス又は液体のいずれかの流体を流し、ガス源とマイクロ流体デバイス内の別の１つ又は複数のチャンネルとの間でガスを交換するための１つ又は複数のガス交換チャンネルを含むマイクロ流体デバイスである。ガス制御マイクロ流体デバイスは、ガス透過性マイクロ流体デバイス内のガス濃度を制御することができる。酸素、窒素、ヘリウム、二酸化炭素、それらの混合物、煙、蒸気などのガスを

マイクロ流体デバイスのガスチャンネルに導入することができる。マイクロ流体デバイスの本体は、PDMSなどの透過性材料を含む。ガスは、マイクロ流体デバイスの本体を通してマイクロ流体デバイスの作業チャンネル又は細胞チャンネルに輸送することができる。細胞生存能力は、細胞がインビボで経験するのと同様の環境で細胞を培養した場合に改善することができる。したがって、マイクロ流体デバイス内の細胞にインビボに適したガス濃度を導入する能力により、科学者がより良好な実験結果を達成することができる。例えば、チャンネルに嫌気性環境が望まれる場合、窒素をガスチャンネルに流すことができる。別の例では、チャンネルに高度に酸素化された環境が望まれる場合、酸素をガスチャンネルに流すことができる。

【0191】

一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、培養チャンネル、ガス交換チャンネル、及び当該培養チャンネルと当該ガス交換チャンネルとの間のガス交換器を有する本体を含む。

【0192】

ガスを制御することが企図される別の実施形態は、マイクロ流体デバイスのチャンネル内に所望のガス環境を作成する能力を有するマイクロ流体デバイスである「ハロチップ」である。「ハロチップ」又はガス制御マイクロ流体デバイスは、マイクロ流体デバイスの作業チャンネル又は細胞チャンネルの周囲に延びるガスチャンネルを有する。

【0193】

ガス制御マイクロ流体デバイスはまた、ガスがマイクロ流体デバイスから出ることを可能にする逆止弁を含むことができる。更に、ガス制御マイクロ流体デバイスはまた、真空チャンネルを含むことができる。真空が真空チャンネルに適用されると、マイクロ流体デバイスは伸張してインビボで細胞生理学をエミュレートすることができる。ガス制御はまた、マイクロ流体デバイス内のガスレベルを監視するために、酸素センサなどのセンサを含むことができる。

【0194】

マイクロ流体デバイスが企図され、a) 1つ又は複数の流体チャンネル、b) ガス透過性壁によって当該1つ又は複数の流体チャンネルから分離された、当該1つ又は複数の流体チャンネルの周囲の少なくとも一部の周りのガスチャンネルを含む。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を含む。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、当該ガスチャンネルと接触するバルブを更に含む。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、センサを更に含む。一実施形態では、当該ガスチャンネルは、当該作業チャンネルの全周囲にある。

【0195】

ガス輸送を制御する方法であって、a) i) 1つ又は複数の流体チャンネル、及び(ii) ガス透過性壁によって当該流体チャンネルから分離された、当該1つ又は複数の流体チャンネルの周囲の少なくとも一部の周りのガスチャンネルを含むマイクロ流体デバイスを提供すること、c) 当該記1つ又は複数の流体チャンネルに、ある流量で流体を導入すること、b) 当該流体への当該ガス輸送を制御するために、当該ガスチャンネルに非酸素ガスを導入することを含む。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を含む。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、当該ガスチャンネルと接触するバルブを更に含む。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、センサを更に含む。一実施形態では、当該ガスチャンネルは、当該作業チャンネルの全周囲にある。

【0196】

マイクロ流体デバイス内のガスを制御することが企図される別の実施形態は、嫌気性細胞培養インキュベータを使用することである。ガス透過性マイクロ流体デバイスは、いくつかの実施形態では、灌流マニホールドアセンブリ及び培養モジュールと共に、ガス制御又は嫌気性細胞培養インキュベータを使用して制御することができる。PDMSなどのシリコン材料は、マイクロ流体デバイスの小さな体積と比較してインキュベータの体積／ガス供給が無限であると考えられるため、マイクロ流体デバイス内のチャンネルとマイクロ流体デバイスの外部環境との間の迅速なガス交換を可能にする。インキュベータの条件は

10

20

30

40

50

、ほとんどの場合、流体流量にかかわらず、マイクロ流体デバイス内の細胞が経験するガス微小環境を定義する。マイクロ流体デバイス内のガス輸送には、一般に、インキュベータ／環境空気、マイクロ流体デバイスに入る流動流体／培地中の溶存ガス、及び細胞代謝／プロセスの3つの主要な供給源がある。

【0197】

細胞のガスの取り込み及び放出は、ガス微小環境の重要な因子であり、細胞型によって異なる。細胞培養培地のみを通じた酸素送達は、多くの細胞型を維持するには不十分であり、したがって、主な酸素源はガス透過性材料を通じた輸送である。文献値に基づき、米国特許第8,647,861号のマイクロ流体デバイスの細胞培養領域にスケーリングされた、マイクロ流体デバイスにおける最大肝細胞取り込み速度は、 $88\text{ nmol}/\text{時}$ であると考えることができる。文献値に基づき、米国特許第8,647,861号のマイクロ流体デバイスの培養領域にスケーリングされた、マイクロ流体デバイスにおける結腸酸素取り込み速度は、 $2,020\text{ nmol}/\text{時}$ であると考えることができる。しかし、培地流のみを通じた酸素送達、水の酸素運搬能力及び $30\text{ }\mu\text{L}/\text{時}$ の流量に基づいて計算すると、わずか $5.8\text{ nmol}/\text{時}$ である。米国特許第8,647,861号に記載されているものなどのPDMSマイクロ流体デバイスを介した酸素送達は、 $574\text{ nmol}/\text{時}$ であると考えことができ、これは培地流のみの酸素送達速度よりも著しく改善されている。少なくとも1つのチャンネルを有するガス透過性マイクロ流体デバイスを含むシステムが企図され、当該ガス透過性マイクロ流体デバイスは、ガス環境に配置される。一実施形態では、当該ガス環境は、インキュベータによって制御される。一実施形態では、当該ガス環境は、低酸素インキュベータによって制御される。一実施形態では、当該ガス環境は、低酸素環境である。一実施形態では、当該ガス環境は、高酸素環境である。一実施形態では、当該システムは、当該ガス透過性マイクロ流体デバイス内のガス濃度を当該ガス環境が制御するように構成される。一実施形態では、当該チャンネルは、膜を含む。一実施形態では、当該チャンネルは、細胞を含む。

【0198】

マイクロ流体デバイス内のガス濃度を制御する方法が企図され、(i)少なくとも1つのチャンネルを含むマイクロ流体デバイスを提供すること、(ii)当該少なくとも1つのチャンネルがガス環境のガス濃度をとるように、当該マイクロ流体デバイスを当該ガス環境に配置することを含む。一実施形態では、当該方法は、インキュベータを更に提供し、当該ガス環境は、当該インキュベータによって制御される。一実施形態では、当該インキュベータは、ガス制御インキュベータである。一実施形態では、当該ガス環境は、低酸素環境である。一実施形態では、当該ガス環境は、高酸素環境である。一実施形態では、当該マイクロ流体デバイスは、ガス透過性である。一実施形態では、当該チャンネルは、膜を含む。一実施形態では、当該チャンネルは、細胞を含む。一実施形態では、当該細胞は、上皮細胞を含む。一実施形態では、当該細胞は、内皮細胞を含む。

【0199】

定義

本明細書で使用される場合、「マイクロ流体」という用語は、1つ又は複数の寸法が 1 mm 以下（マイクロスケール）である、移動する流体が1つ又は複数のチャンネル内に拘束されるか、又は1つ又は複数のチャンネルを通して方向付けられる構成要素に関する。マイクロ流体デバイスは、米国特許第8,647,861号明細書及び国際特許出願第PCT/US 2014/071611号に記載されており、各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる（そのようなマイクロ流体デバイスは、本明細書では「チップ」とも呼ばれる）。マイクロ流体チャンネルは、1つ又は複数の方向においてマイクロスケールより大きくてもよいが、チャンネルは、少なくとも1つの方向においてマイクロスケール上にある。いくつかの例では、マイクロ流体チャンネルの形状は、チャンネルを通る流体流量を制御するように構成することができる（例えば、剪断を低減するためにチャンネルの高さを増加させる）。マイクロ流体チャンネルは、チャンネルを通る流量を幅広く確保するために様々な形状で形成することができる。

【0200】

本明細書で使用される場合、「に接続された」、「に結合された」、「と接触している」、及び「と連通している」という語句は、機械的、電氣的、磁氣的、電磁的、流体的、及び熱的相互作用を含む、2つ以上の実体間の任意の形態の相互作用を指す。例えば、一実施形態では、マイクロ流体デバイスのチャンネルは、流体リザーバなどの流体源と流体連通している。2つの構成要素は、互いに直接接触していなくても、互いに結合されてもよい。例えば、2つの構成要素は、中間構成要素（例えば、チューブ又は他の導管）を介して互いに結合されてもよい。したがって、剛性容器内の作動流体は、チューブ又は他の導管を介して作動流体リザーバと流体連通することができる。

【0201】

本明細書で使用される場合、「チャンネル」という用語は、液体及び気体の移動を可能にする媒体（例えば、シリコン）を通る経路（直線、曲線、単一、複数、ネットワーク内など）である。したがって、チャンネルは、他の構成要素を接続することができ、すなわち、構成要素を「連通して」、より具体的には「流体連通して」、更により具体的には「液体連通して」保つことができる。そのような構成要素としては、液体吸入ポート及び通気口が挙げられるが、これらに限定されない。マイクロチャンネルは、1ミリメートル未満かつ1ミクロン超の寸法を有するチャンネルである。

【0202】

「マイクロチャンネル」は、1ミリメートル未満かつ1ミクロン超の寸法を有するチャンネルである。更に、本明細書で使用される場合、「マイクロ流体」という用語は、1つ又は複数の寸法が1mm以下（マイクロスケール）である、移動する流体が1つ又は複数のチャンネル内に拘束されるか、又は1つ又は複数のチャンネルを通して方向付けられる構成要素に関する。マイクロ流体チャンネルは、1つ又は複数の方向においてマイクロスケールより大きくてもよいが、チャンネルは、少なくとも1つの方向においてマイクロスケール上にある。いくつかの例では、マイクロ流体チャンネルの形状は、チャンネルを通る流体流量を制御するように構成することができる（例えば、剪断を低減するためにチャンネルの高さを増加させる）。マイクロ流体チャンネルは、チャンネルを通る流量を幅広く確保するために様々な形状で形成することができる。

【0203】

本発明は、マイクロ流体デバイス、灌流マニホールドアセンブリ（マイクロ流体デバイスを伴わない）、及びマイクロ流体デバイスと係合される灌流マニホールドアセンブリを含むが、それらに限定されない、様々な「マイクロ流体デバイス」を企図する。しかし、（例えば、液滴間接続によって）マイクロ流体デバイスを係合するため、及びマイクロ流体デバイスを灌流するための本明細書に記載される方法は、本明細書に記載されるマイクロ流体デバイスの特定の実施形態に限定されず、一般に、マイクロ流体デバイス、例えば1つ又は複数のマイクロチャンネル及びポートを有するデバイスに適用することができる。

【0204】

表面又は表面上の領域は、水に対して約90度より大きい（例えば前進）接触角を示す場合、「疎水性」である（多くの場合、前進接触角及び後退接触角の両方が約90度より大きいことが好ましい）。一実施形態では、本発明の疎水性表面は、約90～約110度の水に対する前進接触角を示す。別の実施形態では、疎水性表面は、約110度より大きい水に対する前進接触角を示す領域を有する。別の実施形態では、疎水性表面は、約100度より大きい水に対する後退接触角を示す領域を有する。一部の液体、特に一部の生物学的液体は、表面を濡らした後に表面をコーティングし、それによってその疎水性に影響を及ぼす可能性がある元素を含有することに留意することが重要である。本発明の文脈において、表面が意図された用途の液体からのそのようなコーティングに抵抗すること、例えば、そのようなコーティングが、当該液体によって表面が濡れたままである期間にわたって90度未満の前進及び／又は後退接触角を生成しないことが重要である可能性がある。

【0205】

表面又は表面上の領域は、水に対して約 90 度未満、より一般的には約 70 度未満の（例えば、前進）接触角を示す場合、「親水性」である（多くの場合、前進接触角及び後退接触角の両方が約 90 度又は約 70 度未満であることが好ましい）。

【0206】

測定された「接触角」は、いわゆる前進（最大）接触角から後退（最小）接触角までの範囲に入ることができる。平衡接触は、これらの値の範囲内であり、これらから計算することができる。

【0207】

疎水性表面は、水性液体による「濡れに抵抗する」。材料上の第 1 の液体によって形成される接触角が 90 度より大きい場合、材料は第 1 の液体による濡れに抵抗すると言われる。表面は、水性液体及び非水性液体、例えば油及びフッ素化液体による濡れに抵抗することができる。一部の表面は、水性液体及び非水性液体の両方による濡れに抵抗することができる。疎水性挙動は、一般に、35 ダイン/cm 未満の臨界表面張力を有する表面によって観察される。最初に、臨界表面張力の低下は、親油性挙動、すなわち炭化水素油による表面の濡れに関連する。臨界表面張力が 20 ダイン/cm 未満に低下すると、表面は炭化水素油による濡れに抵抗し、疎油性並びに疎水性と考えられる。

【0208】

親水性表面は、水性液体による「濡れを促進する」。材料は、材料上の第 1 の液体によって形成される接触角が 90 度未満、より一般的には 70 度未満である場合、第 1 の液体による濡れを促進と言われる。

【0209】

本明細書で使用される場合、「剪断応力」という用語は、一般に、表面要素に平行に作用する、単位面積当たりに加えられる力を指す。「剪断」又は「剪断応力」は、物体の面に平行な物体にかかる力を指す。剪断応力は、主に、流体粘度に関連する流体粒子間の摩擦、及び剪断歪みの成分によって引き起こされる。 τ （ギリシャ語：タウ）は、応力が表面に垂直である場合の垂直応力とは対照的に、応力が材料の表面に平行である場合の粘度及び相対速度の複合効果を指す。剪断応力は、表面上の流体の動きに関連し、剪断応力（ σ ）の発生をもたらす。一例として、細胞の表面を横切る流体流は、当該細胞に剪断応力を及ぼす可能性がある。

【0210】

本明細書で使用される場合、「剪断速度」又は「剪断歪み」という用語は、流体の 1 つの層が隣接する層の上を通過する速度の変化率を指す。「剪断速度」は、 γ （ギリシャ語：ガンマ G）又は「剪断の速度」とも呼ばれる。血液などの非ニュートン流体では、剪断応力と剪断速度との間の関係が異なる。

【0211】

「ガス交換器」は、ガスの輸送を可能にする、マイクロ流体デバイス内に含まれるものなどの機械的又は化学的構成要素を指す。或いは、ガス交換器は、「ガス輸送膜」、「ガス交換膜」、又は「ガス制御膜」として知られていてもよい。

【0212】

「代謝」は、生命を維持するために、細胞などの生物内で起こる化学プロセスである。「細胞代謝」は、細胞に特異的な「代謝」である。例えば、細胞は、医薬化合物を代謝することができる。

【0213】

「マニホールド」は、流体（気体又は液体）を取り込み、その流体の流れを複数の流れ経路に分割するシステムの物理的構成要素である。「マニホールド」の例は、いくつかの新しい開口部に分岐するパイプ、チャンバ、又はチャンネルである。

【0214】

「培地の流れ」という語句は、主に拡散以外の任意の機構による流体培地のバルク運動を意味する。例えば、培地の流れは、ポイント間の圧力差に起因して、あるポイントから別のポイントへの流体培地の移動を含むことができる。そのような流れは、液体の連続的

10

20

30

40

50

な、パルス状の、周期的な、ランダムな、断続的な、若しくは往復の流れ、又はそれらの任意の組合せを含むことができる。1つの流体培地が別の流体培地に流入すると、培地の乱流及び混合が生じる可能性がある。往復流を使用することが有利な場合があり、これは、ある体積の流体がマイクロ流体デバイス、又はチャネル又はチャンバなどのマイクロ流体デバイスの一部に交互に導入され、次いでマイクロ流体デバイスから引き出されることを意味する。そのような場合、往復流は、マイクロ流体デバイス又はマイクロ流体デバイスの一部と接続又は流体連通するデバイスによって駆動することができる。

【0215】

本明細書で使用される場合、用語「分子」、「粒子」及び「微粒子」は、生存可能及び非生存可能の両方の物質の成分を広く指す。一例として、粒子は、健康患者の血液中に通常存在する細胞（白血球、赤血球、血小板など）、循環腫瘍細胞などの血流中に通常存在しない細胞の両方を含む、流体内の細胞などの細胞を指す。しかし、流体は、血液に限定されず、すなわち、細胞は、肺流体中に見出されるマクロファージなどの流体中に見出される。別の例として、粒子は、微生物、例えば、孢子、ビリオン、細菌、例えば、正常な細菌中に見出されるか、又は疾患状態で存在するもの、及び汚染物質が挙げられるが、これに限定されない微視的な物理的粒子／微粒子、並びに血流又は他の体液に入ることができる任意の物理的粒子／微粒子を指す。粒子はまた、ビーズなども含み、これは、いくつかの実施形態では、測定を行うために、又は他の方法でパラメータ、例えば流量、浮力、粘度、剪断などを評価するために、細胞の代わりに好都合に使用することができる。

【0216】

「小分子」という用語は、1 kDa未満の分子量の分子を指す。

【0217】

「生体異物」は、典型的には人体に存在しない分子であり、化学物質と考えることができる。生体異物は、典型的には、人体に天然に存在することが典型的に見出される生物製剤よりも小さい。生体異物は、一般に、1 kDa未満のサイズである。

【0218】

「剛性」という用語は、ポリマーに適用される場合、0.1 GPaを超える弾性率、又はヤング率、又は曲げ弾性率を有するポリマーを指す。

【0219】

「エラストマー性」又は「可撓性」という用語は、ポリマーに適用される場合、0.1 GPa未満の弾性率、又はヤング率、又は曲げ弾性率を有するポリマーを指す。

【0220】

「ガス透過性」という用語は、その材料構成を通してガスの輸送を大部分許容するポリマーを指す。

【0221】

「ガス不透過性」という用語は、その材料構成を通してガスの輸送をほとんど許容しないポリマーを指す。

【0222】

「低吸収性」という用語は、その材料構成への生体異物又は小分子の吸収をほとんど許容しないポリマーを指す。

【0223】

「吸収性」という用語は、その材料構成への生体異物又は小分子の吸収を大きく許容するポリマーを指す。本明細書で使用される場合、「固体基材」という用語は、粒子、ストランド、沈殿物、ゲル、シート、チューブ、球、容器、毛細管、パッド、スライス、フィルム、プレート、スライドなどとして存在する、生物学的、非生物学的、有機、無機、又はこれらのいずれかの組合せであってもよい基材を指す。固体基材は、好ましくは平坦であるが、代替の表面構成をとることができる。例えば、固体基材は、マイクロ流体チャネル及び／又は入口ポート及び出口ポートなどの隆起領域又は沈降領域を含むことができる。例えば、基材は、官能化ガラス、Si、Ge、GaAs、GaP、ジオキシゲン、SiN₄、修飾シリコン、ニトロセルロース及びナイロン膜、又は（ポリ）テトラフルオロエ

10

20

30

40

50

チレン、(ポリ)ビニリデンジフルオリド、ポリスチレン、ポリカルボナート、又はそれらの組合せなどの様々なゲル又はポリマーのいずれか1つであってもよい。他の適切な固体基材材料は、当業者には容易に明らかである。固体基材の表面はまた、カルボキシル、アミノ、ヒドロキシル、チオールなどであってもよい反応基を含むことができる。より好ましくは、表面は光学的に透明であり、シリカ表面に見られるような表面Si-OH官能基を有する。

【0224】

本明細書で使用される場合、「多孔質膜」という用語は、ガス及び小さな化学物質の交換のみを可能にするのに十分な大きさ、又は大きなタンパク質及び／又はその一部の移動及び流路通過を可能にするのに十分な大きさの孔を有する可撓性、弾性、又はそれらの組合せである材料を指す。膜はまた、溝及び隆起部などのマイクロ及び／又はナノスケールのパターンを含むように設計又は表面パターン化されてもよく、それによって、パターンの任意のパラメータ又は特性は、所望のサイズ、形状、厚さ、充填材料などに設計することができる。

10

【0225】

本明細書で使用される場合、「チャンバ」という用語は、多孔質膜によって分離されたマイクロチャンネルの単離された領域を指す。例えば、多孔質膜は、マイクロチャンネルの中間点を長手方向に下方に延び、それによって上部チャンバ及び下部チャンバを提供することができる。

【0226】

「培地」という用語は、物質を搬送するための液体を指す。一実施形態では、物質は、例えば培養培地中で栄養性である。

20

【0227】

「バルブ」という用語は、流体流を制御することができる機械的構成要素を指す。ダイヤフラムバルブ(又は膜バルブ)は、2つ以上のポートを有するバルブ本体、ダイヤフラム、及びダイヤフラムがバルブを閉じる「堰又はサドル」又はシートからなる。

【0228】

本明細書で使用される場合、「レオロジー」という用語は、機械力の影響下での流体、ガス及び固体の流れ及び変形を指す。言い換えれば、レオロジーは、液体、軟質固体、固体及び気体の非ニュートン流及びニュートン流に関する物理学と呼ばれることがある。

30

【0229】

本明細書で使用される場合、「生体模倣の」又は「生体模倣」という用語は、生物学的プロセス又は生物学的成分、例えば血液、腸内容物、肺液などを模倣する機能を有する材料、例えば流体、膜など、合成システム、合成デバイス、機械などを指す。

【0230】

「透明」という用語は、一般に、光が通過する能力を指す。例えば、マイクロ流体デバイスは、光がマイクロ流体デバイスの本体を通過することができ、チャンネルの内容物を標準的な光学顕微鏡によって見ることができる場合に透明であるとみなすことができる。

【0231】

「クラッシュアウト」又は「溶液からのクラッシュアウト」という用語は、溶液中の溶質又は化合物の濃度が、溶質又は化合物が溶液から沈殿して固体を形成する点に達するときを指す。

40

【0232】

本発明が圧痕の性質によって限定されることは意図されていない。本明細書で使用される場合、「圧痕」という用語は、表面に形成された空間、空洞、へこみ、クレータ、ウェル、窪み、中空、凹部又は痕跡を指す。好ましい実施形態では、圧痕は表面の厚さ全体を貫通していない。穴は圧痕であってもよいが、穴は表面を完全に貫通しないことが好ましい。一実施形態では、当該圧痕の各々は、当該第1又は第2の要素の中間点まで延びる深さ(すなわち、圧痕の深さは、表面の厚さの半分以下である)を有する。一実施形態では、当該第2の表面は凹凸状であり、ギャップは当該圧痕を含む。別の実施形態では、圧痕

50

は隆起した縁部を有する。「隆起した縁部」という用語は、圧痕の縁が表面の平面より上に隆起することを意味する。一実施形態では、圧痕に粒子（例えばビーズ）が存在する。本発明は、圧痕が製造される方法によって限定されることを意図しない。一実施形態では、表面を処理すること（例えば、ガラス、シリコン、又は他の方法でエッチング可能な表面の表面をエッチングすること）によって、圧痕が表面に導入される。別の実施形態では、圧痕は、鑄造又は成形によって導入される。好ましい実施形態では、圧痕は、ポリマー表面（例えば、プラスチック）を使用して一体的に成形される。本明細書で使用される場合、「一体的に成形」という用語は、特徴が一体構造であるように鑄造する方法を指す。「一体構造」という用語は、更なる統合を必要とせずと同じ原材料片から形成されるような要素（例えば、表面及び圧痕）の会合を指す。一実施形態では、第1の表面はプラスチックを含み、圧痕を有する。一実施形態では、当該第1の表面はエラストマー性である。

10

【0233】

本明細書で使用される場合、「ガス輸送」という用語は、材料を通るガスの通過、又はある領域から別の領域へのガスの通過を指す。「ガス輸送速度」は、材料を通る、又はある領域から別の領域へのガスの流れの尺度を指す。速度は、体積流量又は質量流量のいずれかを指すことができる。体積流量は、単位時間当たり通過する流体の体積である。質量流量は、単位時間当たり通過する物質の質量である。

【0234】

「拡散」という用語は、高濃度の領域から低濃度の領域への分子又は原子の移動を指す。

20

【0235】

「勾配」という用語は、特性の大きさの増加又は減少を指す。例えば、化学ポテンシャル勾配は、システム全体の化学ポテンシャルの変化である。

【0236】

「吸着」という用語は、固体が気体又は液体又は溶質の分子をその表面上に膜として保持するプロセスを指す。

【0237】

本明細書で使用される場合、「流体」という用語は、固定形状を保持することができず、外圧に対して容易に屈する液体又は気体のいずれかを指す。本明細書で使用される場合、「流体流」という用語は、流体の移動を指す。本明細書で使用される場合、「流体流量」という用語は、流体の流れの尺度を指す。

30

【0238】

チャネルは、チャネルの少なくとも一部に少なくとも1つの壁がない場合に「開いている」と考えることができる。同様に、開放チャネルは、別の物体又は材料で「キャップ」又は覆われてもよい。

【0239】

本明細書で使用される場合、「多孔性」という用語は、多孔性である、又は孔を含む性質を指す。「細孔」という用語は、それらの穴を指す。「多孔質要素」という用語は、細孔を含み、したがって多孔性を有するシステムの成分を指す。

【0240】

「キャップ」は、別のものを覆うか、又は「キャップ」する物体又は材料である。「キャッピング層」は、本発明の構成要素を覆うシート又はフィルムである。

40

【0241】

「チャネル壁」などの「壁」は、中空領域のバリア又はエンクロージャである。

【0242】

本明細書で使用される場合、「表面」という用語は、別の構成要素と接触している物体の部分などの物体の最も外側の部分を指す。例えば、流体はチャネルの表面に接触することができ、その表面はチャネルの壁である。

【0243】

本明細書で使用される場合、「層」という用語は、平坦又は薄い構成要素、材料、又は

50

物体を指す。例えば、シート又はフィルムは、層と呼ばれることがある。

【0244】

本明細書で使用される場合、「側面」という用語は、一般に別の表面に対向する表面を指す。「表面」はまた、物体又は中心点の左又は右の位置であってもよい。

【0245】

本明細書で使用される場合、「膜」という用語は、分子、流体、細胞などの通過を可能にする構成要素又は材料を指す。

【0246】

本明細書で使用される場合、「シート」という用語は、薄い材料を指す。本明細書で使
用される場合、「フィルム」という用語はまた、薄い材料を指すことができる。シート及
びフィルムという用語は、本明細書では交換可能である。「フィルム」という用語はまた
、細菌などの生物学的材料の非常に薄い液体又は層を指すことができる。「薄膜」という
用語は、10 μm 未満などの著しく薄いフィルムを指す。

10

【0247】

「維持する」という用語は、ガス輸送速度又は培地の流量などの物品又は変数を比較的
一定に保つことを指す。

【0248】

「抵抗性」という用語は、一般に別の物質による操作に対して不浸透性である材料又は
構成要素を指す。しかし、抵抗性という用語は、材料又は構成要素が別の物質の大部分に
よって操作されないように、大部分が不浸透性であるとみなされる。完全に完璧な材料又
は構造は存在しない。例えば、ポリマーは小分子吸収に抵抗性であってもよい。そのポリ
マーの抵抗性は、吸収することが知られているポリマーと比較される。

20

【0249】

「細胞」という用語は、ヒトなどの生物の最小の構造及び機能単位を指す。細胞は、マ
イクロ流体デバイス内などの表面又は環境で「培養」又は増殖させることができる。

【0250】

「ガス濃度プロファイル」は、体積中のガス分子の勾配、又はガスの濃度をその体積中
の位置に対してプロットしたときに得られる曲線を指す。

【0251】

肝臓酸素ゾネーションは、肝臓環境内の酸素化の勾配である。その勾配は、一部が好気
性とみなされ、一部が嫌気性とみなされるように、レベルに分けたり、又は指定すること
ができる。

30

【0252】

本明細書で使用される場合、「低酸素」という用語は、酸素が少ない環境を指す。

【0253】

本明細書で使用される場合、「管腔」という用語は、管状構造の内部空間を指す。

【0254】

本明細書で使用される場合、「接触」という用語は、1つの材料、物質、流体、物体な
どが別のものに接触することを指す。例えば、チャンネル内の流体は、チャンネルの壁に接触
する。例えば、チューブは、マイクロ流体デバイスの入口に接触してもよい。

40

【0255】

本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」という用語は、分子、流体、特定の
ガスなどの物質の濃度が低い環境を指す。

【0256】

本明細書で使用される場合、「貫通する」という用語は、1つの材料が別の材料を充填
するか、又は別の材料に入ることを指す。

【0257】

本明細書で使用される場合、「硬化」又は「硬化した」という用語は、ポリマーなどの
材料の固化、強靱化、硬化、及び／又は架橋を指す。硬化は、熱、放射線、電子ビーム、
化学添加剤によって、特定の化合物又はガスが存在しないことなどによって開始すること

50

ができる。逆に、「未硬化」という用語は、未だに硬化、固化、強靱化、硬化、及び／又は架橋されていない材料を指す。

【0258】

「コーティング」という用語は、別のものを覆う1つの材料又は物質を指す。「生物学的コーティング」という用語は、本質的に生物学的であるか、又は細胞と相互作用するなどの生物学的目的に役立つコーティングを指す。

【0259】

「過剰」という用語は、材料、構成要素又は物質の余剰を指す。

【0260】

「製造する」という用語は、マイクロ流体デバイスを製造するためなどの、構成要素の作成、構築、組み立て又は製造を指す。

【0261】

本明細書で使用される場合、「体積」又は「体積パーセント」という用語は、物体又は溶液の総体積に関する、濃度などの値の尺度を指す。

【0262】

本明細書で使用される場合、「実験プロトコル」という用語は、実験をどのように設定し実行するかに関する指示を指す。

【0263】

本明細書で使用される場合、「修正された実験プロトコル」という用語は、その元の形態から変更された実験プロトコルを指す。

【0264】

本明細書で使用される場合、「設定」という用語は、機器又は実験が編成され、計画され、及び／又は配置される方法を指す。

【0265】

本明細書で使用される場合、「意図された研究」という用語は、実行又は実施することが提案されているため、研究としても知られる実験プロトコルを指す。

【0266】

本明細書で使用される場合、「輸液チューブ」という用語は、静脈内薬物を投与するために使用されるチューブを指す。

【0267】

本明細書で使用される場合、「シリンジ」という用語は、使用されるノズル及びピストン又はバルブを含み、液体を流れの中で吸ったり吐いたりする医療機器及び実験機器の部品を指す。

【0268】

本明細書で使用される場合、「生物学的要素」という用語は、細胞又は細胞外マトリックスなどの本質的に生物学的である本発明の成分を指す。

【0269】

本明細書で使用される場合、「行動を起こす」という用語は、方法のユーザによって取られるアクティブなステップを指す。

【0270】

本明細書で使用される場合、「濃度」という用語は、定義された空間当たりの化合物又は薬物などの物質の量を指す。「見かけの濃度」という用語は、システムへの吸収などの変動性を考慮しない物質の濃度を指す。

【0271】

本明細書で使用される場合、「入力」という用語は、システムの入口又はシステムに入れられるものを指す。

【0272】

本明細書で使用される場合、「出力」という用語は、システムの出口又はシステムを出るものを指す。

【0273】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「サンプル」という用語は、サンプルが除去されたものに関する情報を抽出することを意図した少量のものを指す。一例として、アッセイされる流体実験からサンプルを採取することができる。

【0274】

本明細書で使用される場合、「流出物」という用語は、システムから流出した流体を指す。「流出物サンプル」という用語は、流出物から採取されたサンプルを指す。「流出物」及び「流出物サンプル」という用語は交換可能であってもよい。

【0275】

「流入物」という用語は、システムに流入する流体を指す。「流入物サンプル」という用語は、流入物から採取されたサンプルを指す。「流入物」及び「流入物サンプル」という用語は交換可能であってもよい。

10

【0276】

「定量化」という用語は、観察結果を数量にカウント及び測定することを指す。例えば、流体中の化合物の濃度を数値化して定量化を行うことができる。

「吸収割合」という用語は、それらが接触するシステムに吸収される化合物又は物質の割合を指す。

【0277】

本明細書で使用される場合、「アッセイ」という用語は、分析物などの標的実体の存在、量、又は機能活性の定性的又は定量的測定を指す。「アッセイする」という用語は、標的実体のアッセイを行う行為を指す。

20

【0278】

「分析物」という用語は、その化学成分を同定及び／又は測定することができる物質を指す。

【0279】

本明細書で使用される場合、「代謝産物」という用語は、代謝において形成されるか、又は代謝に必要な物質を指す。「見かけの代謝産物」という用語は、システムへの吸収などの変動性を考慮しない、見かけ上の代謝産物を指す。

【0280】

本明細書で使用される場合、「代謝」という用語は、生命を維持するために生体内で起こる化学プロセスを指す。

30

【0281】

「スキャフォールド」という用語は、その生態がインビボであるかインビトロであるかにかかわらず、生態と正に相互作用するように操作された材料を指す。例えば、膜はスキャフォールドとみなすことができる。

【0282】

本明細書で使用される場合、「変動性」という用語は、実験で見られる総変動を指し、プロセス及び生物学的集団の不一致を含むがこれらに限定されない様々な原因に由来する可能性がある。

【0283】

本明細書で使用される場合、「導入する」という用語は、流体又は材料又は生物学的要素などをシステムに入力することを指す。

40

【0284】

本明細書で使用される場合、「決定する」という用語は、次のステップ、結果などを確認又は確立する能動的なステップを指す。

【0285】

本明細書で使用される場合、「エラーバー」という用語は、そのデータの不確実性又は誤差を表す、軸の1つに平行なグラフ上の点を通る線を指す。本明細書に提示される発明は、エラーバーを低減することができるか、又は科学者がそれらを正確にするのを助けることができる。

【0286】

50

本明細書で使用される場合、「半数阻害濃度（IC₅₀）」という用語は、特定の生物学的又は生化学的機能を阻害する際の化合物の効力の尺度を指す。言い換えれば、IC₅₀は、生物学的プロセスを阻害するために化合物がどの程度必要であるかの定量的尺度である。IC₅₀は、マイクロ流体デバイスなどのインビトロで50%阻害又は最大効果に必要な化合物の濃度を表す。例えば、意図された研究が1 μMの投与濃度でIC₅₀を示す場合、化合物分布キットの結果は、実際のIC₅₀が0.6 μM～1 μMの範囲の曝露濃度であることを示してもよい。

【0287】

本明細書で使用される場合、「閾値」という用語は、特定の反応、現象、結果、又は状態の結果を比較することができる大きさを指す。例えば、化合物吸収が特定の閾値を超える場合、意図された研究は完了する価値がない可能性がある。

10

【0288】

本明細書で使用される場合、「時点」という用語は、実験又は臨床手順中に行動がとられた時点を示す。

【0289】

本明細書で使用される場合、「測定」という用語は、物体又は事象への数値特性の割り当てを指す。例えば、システム吸収又はシステム内の化合物分布の測定を行うことができる。

【0290】

本明細書で使用される場合、「比率」という用語は、一方の値が他方を含むか、又は他方に含まれる回数を示す2つの量の間の定量的関係を指す。比率は、比較に役立つ。

20

【0291】

本明細書で使用される場合、「流体回路」という用語は、流体が流れることができるチューブ、チャネル、導管、動脈、静脈、チャンバ、タンク、ダクト、溝、幹線、通路、トラフ、パイプ、導管、入口、出口などを含む接続のシステムを指す。流体回路が連続システムに限定されることは意図されていない。流体回路は、バルブ、気泡、又は空きスペースなどの流れの遮断を含むことができる。

【0292】

本明細書で使用される場合、「クロマトグラフィ」という用語は、成分が異なる速度で移動する培地を溶液中又は蒸気として通過させることによる混合物の分離を指す。

30

【0293】

「分光測定」という用語は、物理現象のスペクトル成分の分離及び測定を指す。本明細書で使用される場合、分光測定を使用して、システム内の分析物及び／又は代謝産物を定量することができる。

【0294】

本明細書で使用される場合、「薬物」という用語は、生物システムに導入された場合に生理学的効果を有する薬剤又は他の物質を指す。「医薬品」という用語は、医療目的の薬物を指す。「薬物候補」という用語は、十分な標的選択性及び効力、並びに好ましい医薬ライン特性を有することが示されており、更なる開発を正当化する分子を指す。

【0295】

本明細書で使用される場合、「化合物」という用語は、多くの分子で構成される化学的、生物学的及び／又は医薬物質を指すことができる。

40

【0296】

本明細書では、「物質」という用語は、均一な特性を有する物質を指す。

【0297】

本明細書で使用される場合、「化合物分布」という用語は、システム全体にわたる化合物の濃度を指す。

【0298】

本明細書で使用される場合、「ポリマー」という用語は、互いに結合した多数の類似の単位から主に又は全体的になる分子構造を有する物質を指す。

50

【0299】

本明細書で使用される場合、「プラスチック」という用語は、ポリマーで構成された合成材料を指す。プラスチックはポリマーの一種である。

【0300】

本明細書で使用される場合、「調節する」という用語は、プロセス及び／又はシステムの制御又は調整を指す。

【0301】

本明細書で使用される場合、「充填」という用語は、空の空間が物質によって占められている場合を指す。

【0302】

本明細書で使用される場合、「長さに沿って延びる」という用語は、1つの材料、物質、構成要素などが別の材料、物質、構成要素などの長さと協調して配置される場合を指す。例えば、チャンネルは、基材の長さに沿って延びることができる。

【0303】

本明細書で使用される場合、「一定」という用語は、ある期間にわたって連続的に起こるアクション及び／又はプロセスを指す。

【0304】

本明細書で使用される場合、「センサ」という用語は、物理的特性を検出又は測定する構成要素を指す。センサの例としては、流量センサ、ガスセンサ、蛍光センサなどが挙げられる。

【0305】

「酸素センサ」という用語は、酸素の存在を検出する、又は酸素の濃度を測定するセンサを指す。

【0306】

本明細書で使用される場合、「機械的安定性」という用語は、材料及び／又は構成要素の物理的強度を指す。

【0307】

本明細書で使用される場合、「少なくとも部分的に」という用語は、一部のみから完全に及ぶ範囲を指す。

【0308】

本明細書で使用される場合、「境界」という用語は、縁部又は境界又はその近くの部分を指す。構成要素は、別の構成要素に隣接してもよい。構成要素はまた、境界を有してもよい。

【0309】

本明細書で使用される場合、「囲む」という用語は、別のものを取り囲む構成要素又は材料又は物質を指す。構成要素は、部分的に囲まれていてもよく、又は完全に囲まれていなくてもよい。

【0310】

「リザーバ」又は「流体リザーバ」という用語は、流体が集まる容器を指す。

【0311】

「流体連通」という用語は、システム内の連続的な流体接触を指す。例えば、2つの構成要素が各々流体を含み、それらの流体が接触している場合、2つの構成要素は流体連通することができる。

【0312】

「バックプレーン」という用語は、機械的安定性のために使用される材料又は構成要素を指す。バックプレーンは、突出部又はチャンネルなど、バックプレーン上に支持された追加の特徴を有することができる。

【0313】

「ガスケット」又は「ガスケット層」という用語は、2つの表面間の接合部を封止するために使用される材料又は構成要素を指す。例えば、ガスケット層を流体バックプレーン

10

20

30

40

50

とリザーバとの間に使用することができる。

【0314】

「突出部材」という用語は、システム又はデバイスの本体から突出する構成要素を指す。

【0315】

「キャップ」又は「キャッピング層」という用語は、トッピング又は被覆に使用される材料又は構成要素を指す。例えば、バックプレーン内のチャンネルは、キャッピングすることができ、又はキャッピング層で覆うことができる。

【0316】

「培地」という用語は、生物システムで使用するための液体を指す。例えば、細胞を培養する際に細胞培地が必要とされることが多い場合である。「培養培地」という用語は、細胞又は細菌などの生物製剤を培養するために使用される培地を指す。「細胞培地」又は「細胞培養培地」という用語は、特に細胞を培養するために使用される培地を指す。

【0317】

本明細書で使用される場合、「添加剤」という用語は、何かを改善する、保存する、又は他の目的で何かに添加される物質を指す。例えば、より良好な増殖を得るために添加剤を培養培地に添加することができる。

【0318】

「溶媒」という用語は、他の物質又は流体又は溶質を溶解するために使用することができる流体を指す。

【0319】

「溶質」という用語は、溶質に溶解することができる添加剤などの物質を指す。

【0320】

ヤング率としても知られ、曲げ弾性率としても知られる「弾性率」という用語は、応力が加えられた際に弾性的に（非永久的に）変形することに対する物体又は材料又は物質の抵抗の測定値を指す。ポリマーは、その弾性率に基づいて剛性又はエラストマー性として測定することができる。本明細書では、0.1 GPaを超える弾性率を有する任意のポリマーは、確実にマイクロ流体デバイス製造の目的のために、有効に剛性又は非可撓性であるとみなされる。剛性ポリマーは、0.1 GPa～150 GPaの範囲内であってもよい。金属は、通常、少なくとも30 GPa以上の弾性率値を有する。例えば、アルミニウムは、最大約69 GPaの弾性率値を有することができる。

【0321】

本明細書では、「再循環」という用語は、流体回路などのシステムを通して流体を再び循環させるプロセスを指す。

【0322】

「再循環経路」という用語は、再循環に使用されるチューブ及び／又はチャンネルの流体回路又は流体経路又はシステムを指す。

【0323】

本明細書では、「往復運動」という用語は、流体が当該システムを通して前後に流れる流体システムにおけるプロセスを指す。

【0324】

「往復運動経路」という用語は、往復運動に使用されるチューブ及び／又はチャンネルの流体回路又は流体経路又はシステムを指す。

【0325】

「往復運動アクチュエータ」という用語は、往復運動中及び／又は往復運動経路中に流体の方向を変えるために使用される機械的構成要素又はアクチュエータを指す。

本明細書では、「アクチュエータ」という用語は、システムの機構の移動及び制御を担う機械的構成要素を指す。

【0326】

本明細書では、「本体」という用語は、システム又はデバイスの物理的構造を指す。例

10

20

30

40

50

えば、マイクロ流体デバイスの本体は、例えばポリマーから構築されたデバイスの主構造である。

【0327】

本明細書では、「生存能力」という用語は、機能又は作業の修正を行う能力のことである。例えば、培養細胞の生存能力は、正しい形態を有する細胞、均一な単層を形成する細胞、正しい遺伝子及びマーカーを発現する細胞、正しいレベルの代謝産物を出力する細胞などによって判断することができる。

【0328】

「酸素担持成分」という用語は、酸素を含むことができる物質を広く指す。一実施形態では、酸素担持成分は、天然又は修飾ヘモグロビンである。本明細書で使用される場合、「ヘモグロビン」という用語は、酸素を運ぶことができる赤血球に一般的に見られる呼吸タンパク質を指す。修飾ヘモグロビンとしては、架橋、重合、又は化学基（例えば、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン、又は他の付加物）の付加などの化学反応によって変化したヘモグロビンが挙げられるが、これらに限定されない。同様に、修飾ヘモグロビンとしては、リボソームに封入されたヘモグロビンが挙げられる。例えば、ヘモグロビンは、動物及びヒトに由来してもよく、ヘモグロビンの好ましい供給源はウシ及びヒトである。更に、ヘモグロビンは、組換え技術を含む他の方法によって産生することができる。本発明の最も好ましい酸素担持成分は、「ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン」である。「ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン」という用語は、ポリエチレングリコールと会合するように修飾されたヘモグロビンを指し、一般的に言えば、修飾は、ヘモグロビンへのポリエチレングリコール（PEG）の共有結合を伴う。

【0329】

「非酸素担持成分」という用語は、例えば赤血球損失を一時的に補うために投与することができる血漿膨張剤のような物質を広く指す。本発明の好ましい実施形態では、非酸素担持成分は、コロイド（すなわち、気体、液体又は固体の培地中に分散された微細化された状態の分子を含む物質）であり、これはコロイド浸透圧（コロイド浸透圧は、例えば、血漿の流体が毛細管から間質液に漏れるのを防ぐ）を有する。コロイドの例としては、ヘタスターチ、ペンタスターチ、デキストラン-70、デキストラン-90、及びアルブミンが挙げられる。

【0330】

実施例以外、又は他に示される場合、本明細書で使用される成分又は反応条件の量を表す全ての数は、全ての場合において「約」という用語によって修飾されていると理解されるべきである。「約」という用語は、本発明を説明するために使用される場合、百分率に関連して±5%を意味する。

【0331】

本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、基準と同一である必要がない類似の寸法（例えば、高さ、幅など）又は類似の特徴（例えば、多孔性、直線性など）、例えば好ましくは寸法又は特徴の少なくとも80%、より典型的には少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも97%、又は少なくとも99%以上を示すために使用することができる相対的な用語である。

【図面の簡単な説明】

【0332】

【図1】ガス交換器を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの一実施形態を示す図である。

【図2】低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの一実施形態を示す分解図である。分解図は、マイクロ流体デバイスがガスカート、上部チャネル層、膜、底部チャネル層、上部チャネル、底部チャネル及びガス交換器を含むことを示している。

【図3】ガスカート、上部層、膜、底部層、上部チャネル、底部チャネル、及びガス交換器を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの一実施形態を示す断面図である。

【図4】PDMSから製造された吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスを示す図である

。

【図 5】COP 及び SEBS ガasket 層から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスを示す図である。

【図 6】ガasket、上部チャンネル層、細胞培養膜、及び底部チャンネル層を含む、COP 及び SEBS から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスの分解図である。

。

【図 7】別個のガasket 層及びキャッピング層を含む灌流マニホールドアセンブリの実施形態を示す図である。灌流マニホールドアセンブリの実施形態はまた、蓋、異なる種類のフィルタ、蓋ガasket、リザーバ、流体バックプレーン、スカート及びねじを含む。

。

【図 8】1つのガasket 及びキャッピング層を含む灌流マニホールドアセンブリを示す図である。灌流マニホールドアセンブリはまた、蓋、異なる種類のフィルタ、蓋ガasket、リザーバ、流体バックプレーン、スカート及びねじを含む。

【図 9】治療薬が身体とどのように相互作用するかの理解を深める重要な態様を含む、薬物開発トライアングルを示す図である。要約すると、薬物動態の研究は、特定の用量又は質量の化合物が、体内の様々な器官によってどのように処理されて、曝露濃度を生成するかをどのようにして理解し、定量的に予測することを目的とする。薬力学は、曝露濃度が所与の効果（有効性又は毒性のいずれか）をどのようにもたらすかを理解及び予測することを目的とする。Organ-Chip は、薬物動態学及び薬力学の両方を研究するために使用することができ、使用しており、使用されており、これは、マイクロ流体デバイス中の化合物の濃度を理解及び制御することの重要性を強調しており、これは、濃度が両方の分野にとって重要であり、したがって、医薬品が人体とどのように相互作用するかを理解し予測するために重要であるためである。

【図 10 A】マイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリを含むマイクロ流体システムの様々な実施形態における小分子（ブプロピオン）の吸収を示す図である。

【図 10 B】代謝酵素 CYP2B6 による肝臓代謝についての同じ設定におけるその同じ化合物の試験の結果を示す図である。PDMS から製造された吸収性マイクロ流体デバイス及び COP から製造されたガス不透過性低吸収性マイクロ流体デバイスの両方における肝臓細胞による薬物の見かけの代謝が示されており、代謝産物の産生によって定量化された場合の見かけの代謝速度に対する吸収の効果を実証している。高吸収系は、非吸収系及び低吸収系よりも代謝の過小予測が大きいことが見出される。

【図 11】PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにおける化合物分布プロファイルを示す図である。このモデルは、高吸収性化合物であるミダゾラムが $150 \mu\text{L} / \text{時}$ でマイクロ流体デバイスの上部チャンネルと底部チャンネルの両方を通して灌流されていることを示している。

【図 12】薬物応答曲線及びそれに対する吸収の影響を示す図である。吸収は、細胞への薬物の曝露濃度（X 軸）が吸収により調節されるにつれて、観察された用量応答曲線をシフトさせる。

【図 13】（PDMS などの吸収材料を含む）時間依存性材料吸収試験の試験プロトコルを示す図である。この研究は、薬物吸収材料、PDMS などの固有の材料-化合物相互作用特性を決定することを目的とする。

【図 14】様々な拡散性の化合物について、異なる時点後の PDMS の設定体積から回収された化合物濃度の精密元素分析又は計算モデルを示す図である。図 13 に示すような時間依存性材料吸収試験からのデータを、本明細書に示すグラフのようなグラフと比較し、本明細書では拡散性、又は化合物損失の速度の決定である、試験した材料への化合物特異的吸収を定義する基本パラメータを決定するために使用する。

【図 15 A】材料 PDMS 及び COP の両方への薬物ジアゼパムの吸収を、材料が含有されるガラスバイアルに含有される流体中に残存するジアゼパムの回収された濃度に基づいて、経時的に示す図である。

【図 15 B】材料 PDMS 及び COP の両方への薬物ジアゼパムの吸収を、材料が含有さ

10

20

30

40

50

れるガラスバイアルに含有される流体中に残存するジアゼパムの回収された濃度に基づいて、経時的に示す図である。これは、材料に対する経時的な化合物「損失」を示す。

【図 1 6】細胞培養培地に懸濁したタンパク質への化合物のタンパク質結合又は「損失」を示す図である。この場合、ウシ胎児血清（FBS）の濃度を増加させる形態で、より多くのタンパク質が培地に添加されるにつれて、化合物の損失が増加する。

【図 1 7】上部チャンネル、底部チャンネル、及び当該上部チャンネル（3）及び底部チャンネルの少なくとも一部を分離する膜を含むマイクロ流体デバイスの計算吸収モデルを構築したことを示す図である。このモデルは、材料の透過性、材料の吸光度、上部及び底部チャンネル内の流体の流量、流体中の化合物の拡散性などを含む様々な変数を変更することを可能にする。

【図 1 8 A】マイクロ流体デバイス吸収の計算モデル予測と試験化合物クマリンの実験結果との比較を示す図である。

【図 1 8 B】マイクロ流体デバイス吸収の計算モデル予測と試験化合物クマリンの実験結果との比較を示す図である。PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにクマリンを流し、底部及び上部チャンネルの回収された濃度をサンプリングした。図 1 8 Aに見られる $60 \mu\text{L}/\text{時}$ 及び図 1 8 Bに見られる $150 \mu\text{L}/\text{時}$ の 2 つの異なる流速で実験を行った。これらの結果は、クマリンについて測定された材料吸収パラメータ及び 2 つの流量をモデル入力として、上記のようにマイクロ流体デバイスの COMSOL モデルの出力に対してプロットされた。データとモデルはよく一致している。

【図 1 9】吸収がない場合であっても、吸収マイクロ流体デバイスの内部における化合物配置の動態のモデル化及び理解の複雑さを示す図である。これには、受動的な細胞透過性、代謝及び膜を通過する輸送などの生物学的／生理学的因子が含まれる。

【図 2 0 A】多くの異なる小分子化合物の吸収試験の結果、並びに物理化学的パラメータ「 $\log P$ 」又はオクタノール分配と「 $\log K$ 」又は PDMS 分配との間の関係を示す図である。

【図 2 0 B】多くの異なる小分子化合物の吸収試験の結果、並びに物理化学的パラメータ「 $\log P$ 」又はオクタノール分配と「 $\log K$ 」又は PDMS 分配との間の関係を示す図である。なお、 R^2 値が 0.515 であることは、両パラメータ間の相関が弱いことを示すことに留意されたい。単独で考えると、 $\log P$ を使用して PDMS 分配を予測することはできない。吸収を $\log P$ と分子量の両方について同時に考慮した場合、二元の吸収「する／しない」とこれらの 2 つのパラメータとの間の相関がより少ないことが見出される。

【図 2 2】細胞層及び代謝のような含まれる細胞プロセスによって生成されたバリアを完全に含む、インシリコでの実行中のマイクロ流体デバイス研究を使用するための二次元マイクロ流体デバイス計算モデルの描写を示す図である。これらのモデルは、吸収の影響を最小限に抑える実験を設計することを含む、材料特性及び細胞プロセスの予想される速度に基づいて細胞ベースのマイクロ流体デバイス実験を設計するために使用することができる。このように実行すると、モデルは予想される実験結果（例えば、投与された化合物のマイクロ流体デバイス流出物濃度）を出力する。逆に、場合によっては、吸収による化合物損失の寄与を「補正」するために実験データが生成された後にモデルを実行することができる。例えば、肝臓細胞代謝は、PDMS 吸収が化合物損失を引き起こすのと同様に、化合物損失をもたらす。固有の材料特性を考慮すると、PDMS 吸収によって失われると予想される化合物の量は、細胞代謝の速度を推定するために、吸収及び細胞代謝の両方によって失われる全化合物から「差し引く」ことができる。

【図 2 3】ポリマーの表及びそれらの特性、最も顕著にはそれらの曲げ弾性率又は弾性率のリストを示す図である。表中のいくつかのポリマーは、エラストマー性の特性を示すものとして強調されている。エラストマー性とみなされ得るこれらのポリマーは、0.1 GPa 未満の弾性率を有する。塩素化（ポリ塩化ビニル）PVC も、その表面硬度のためにエラストマー性として特徴付けられている。

【図 2 4】本発明の異なる実施形態及びそれらの発明につながる問題のチャートを示す図

10

20

30

40

50

である。高吸収性でガス透過性であるエラストマー性マイクロ流体デバイスは、米国特許第 8, 647, 861 号に記載されている。弾性ポリマー（PDMS）から製造されたこのマイクロ流体デバイスは、ガス透過性が高く、小分子又は生体異物を吸収しやすいことに留意されたい。いくつかの例では、マイクロ流体デバイスはガス透過性が高すぎた。言い換えれば、マイクロ流体デバイスの本体及びチャネルは、エラストマーの透過性に起因して周囲環境のガス濃度に過度に影響されやすかった。この発見から、2つの異なる実施形態が発明された。第1のものは、図93及び図94に示すように、作業チャネルの周りを走るガスチャネルを有するエラストマー性マイクロ流体デバイスであった。ガスを作業チャネルに輸送するために、窒素などのガスをガスチャネルに流すことができる。ガスチャネルを作業チャネルから分離する壁はガス透過性が高いため、ガスチャネルは、マイクロ流体デバイスの両方のバルクの酸素濃度を設定するように作用し、チャネルは、例えば、ガスチャネルを通して窒素を流動させることによって、酸素、又はそれに関する任意の他のガスを枯渇することができる。或いは、ガスチャネルはまた、一実施形態では、マイクロ流体デバイス内の酸素の濃度が周囲環境よりも高くなるように、より多くの酸素をマイクロ流体デバイスに導入するように機能することができる。エラストマー性高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの高い透過性から生じる第2の実施形態は、マイクロ流体デバイスのバルクを通るガス輸送を制限するために、マイクロ流体デバイスの外面を剛性又はガス不透過性ポリマーの薄膜又はマスクと接触させることであった。米国特許第 8, 647, 861 号のマイクロ流体デバイスが小分子を非常に吸収しやすいという発見の結果として、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスの一実施形態が剛性材料から製造された。次いで、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、いくつかの実験ではガス不透過性でありすぎることが発見された。ガス不透過性を克服するための一実施形態は、培地又は流体のガス運搬能力を増大させる（例えば増加させる）ためなど、培地又は流体にサプリメントを添加することであった。しかし、これらのサプリメントは、時には使用が困難であることが見出された。ガス不透過性を克服する別の実施形態は、より高い濃度の溶存酸素をマイクロ流体デバイスのチャネルに導入するために、流体又は培地を高流量で流すことであった。残念ながら、流体又は培地の廃棄物を含む高流量にはいくつかの欠点がある。細胞がマイクロ流体デバイス内で培養される場合、重要な細胞シグナルを洗い流すことができる。更に、より高流量は、より高レベルの剪断をもたらし、これは必ずしも好ましいとは限らない。これらの欠点を克服するために、流体又は培地を再循環させることができる。しかし、時には、再循環装置はかさばり、使用が困難な機器を必要とすることがある。これらの場合、流体は、デバイスを通して往復移動するか、又は前後に流れることができる。インビボでの流体は2つの方向に流れないので、細胞をインビトロで研究する場合の往復運動は自明ではない。驚くべき発見は、インビトロで細胞が往復培地で高レベルの生存能力及び器官特異的機能を示したことであった。最後に、剛性マイクロ流体デバイスのガス不透過性に対する別の解決策は、ガス交換器をマイクロ流体デバイスに導入することであった。一実施形態では、ガス交換器は、テフロン（PTFE）などの材料から構築することができる。しかし、テフロンなどの材料は、接着が困難であるか、又は透明でないことが多い。一実施形態では、ガス交換器は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）の薄片を含む。しかし、PDMSの薄片は、壊れやすいことが多い。一実施形態では、ガス交換器は、PDMSの厚い片を含む。しかし、PDMSの厚い片は、吸収性であることが多い。一実施形態では、ガス交換器は、ガス透過性領域又は細孔を有するガス不透過性基材を含むことができる。ガス不透過性材料は、剛性ポリマーであってもよい。ガス透過性材料は、弾性ポリマーであってもよい。ガス透過性領域を有するガス不透過性基材自体が、任意の流体デバイスで使用するための新規な実施形態であると考えられる。最後に、米国特許第 8, 647, 861 号のエラストマー性高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの問題を解決するための別の実施形態は、当該ガス交換器で当該マイクロ流体デバイスの1つ又は複数のチャネルを封入すると共に、周囲環境からマイクロ流体デバイス内へのガス輸送を制限するために、剛性ポリマーの薄膜又はマスクを、ガス交換器ではない当該マイクロ流体デバイスの当該外側部分と接触させることとの両方を行うこと

10

20

30

40

50

である。

【図 2 5 A】組み合わせられたガスケット層及びキャッピング層、又は別個であるが、まだ結合している低吸収性キャッピング層及び低吸収性ガスケット層のいずれかを含む灌流マニホールドアセンブリの流体層アセンブリの蛍光画像を示す図である。

【図 2 5 B】ガスケット層及びキャッピング層、又は別個であるが、まだ結合している低吸収性キャッピング層及び低吸収性ガスケット層のいずれかを含む灌流マニホールドアセンブリの流体層アセンブリの蛍光画像を示す図である。蛍光シグナルは、システム成分に曝露された化合物ローダミンによって発せられる。画像中の明るい白色は、化合物が吸収した領域を示す。図 2 5 A は、吸収することが知られている蛍光性小分子ローダミンへの曝露後に、組み合わせられたガスケット層及びキャッピング層で得られた蛍光を示す。図 2 5 B は、別個の低吸収ガスケット層及び低吸収キャッピング層を含む流体層アセンブリで得られた蛍光を示す。

10

【図 2 6】複数の実施形態についての流体層アセンブリ小分子吸収の全ての結果の包括的な画像を示す図である。吸収性灌流マニホールドアセンブリを試験した。COP キャッピング層及び被覆されていないSEBS ガスケット層を含む、おそらく低吸収の灌流マニホールドアセンブリを試験した。COP キャッピング層及びパリレン被覆SEBS ガスケット層を含む5つの低吸収性灌流マニホールドアセンブリも試験した。画像中の明るい白色は、蛍光分子が吸収した領域を示す。

【図 2 7 A】それぞれSEBS 及びCOP でキャップされた抵抗器 (27) における蛍光分子吸収を示す図である。

20

【図 2 7 B】それぞれSEBS 及びCOP でキャップされた抵抗器 (27) における蛍光分子吸収を示す図である。図 2 7 B では、明るい白線は、蛍光の発光とは対照的に、光学アーチファクト (チャネルの壁による光の反射) を表すことに留意されたい。

【図 2 8 A】COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスに肝臓細胞を播種した実験の結果を示す図である。

【図 2 8 B】COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスに肝臓細胞を播種した実験の結果を示す図である。図 2 8 A は、培養7日目にCOP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスにおける肝臓細胞を示す。図 2 8 B は、低吸収性マイクロ流体デバイス及び吸収性マイクロ流体デバイスの両方における肝臓細胞での、同等のアルブミン産生、すなわち肝機能の読み出しを示す。

30

【図 2 9 A】プレート及びCOP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスの両方において、PDMS で高度に吸収することが知られている薬物ジアゼパムの枯渇を示す図である。

【図 2 9 B】プレート及びCOP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスの両方において、PDMS で高度に吸収することが知られている薬物ジアゼパムの枯渇を示す図である。図 2 9 A は、インビボ薬物クリアランスデータ (肝臓代謝) から計算されたプレート培養物中の薬物ジアゼパムの予想枯渇モデルを黒い実線で示す。データ点は、プレート実験における濃度低下を示し、点線の黄色線は、データに最も適合する線である。予想されるように、減少は時間に関して対数線形であり、化合物損失の主な推進要因として代謝を示している。この線の傾きは、代謝速度又は固有クリアランスを示す。データは予測されたモデルよりも低い勾配を有するので、グラフから、プレートにおける代謝の測定速度がインビボよりもはるかに低かったことを見出すことができる。図 2 9 B は、文献からのインビボデータに基づくマイクロ流体デバイスの一実施形態における薬物ジアゼパムの予想枯渇モデルを同様に示す。実際の細胞ベースの実験からのデータは、高吸収PDMS デバイスから製造されたデバイスとCOP から製造された低吸収性マイクロ流体デバイスの両方について示されている。両方のデータセットを通して最適線が引かれ、勾配は代謝速度を示す。容易に明らかのように、COP マイクロ流体デバイス (本明細書では「New Liver-Chip」と呼ばれる) は、PDMS デバイスよりもはるかに密接にインビボ予測値と一致する。しかし、PDMS デバイスは、より急な勾配に基づいて、より高い代謝速度を有するようである。代謝が化合物損失の唯一の推進要因であっ

40

50

た場合に予想されるように、PDMS Liver-Chip データは対数スケールの線で十分に近似されていないことに留意することも重要である。実際、まとめると（すなわち、ジアゼパムがPDMSに吸収されることを知って、代謝曲線に対するデータの適合が不十分であることを確認し、化合物損失の予想される速度よりも高い速度を観察すると）、これは、PDMSデバイスにおける代謝の過剰予測及び非吸収システムにおける正確な予測を明確に実証する。

【図30】PDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイス（12）及びCOPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（13）で測定された、プレート上で測定されたクリアランスのインビボでのジアゼパムの予測クリアランスを示す図である。グラフに見られるように、本明細書では「New Liver-Chip」と呼ばれる低吸収デバイスは、インビボ速度に最もよく適合し、したがって最も予測的である。

10

【図31】ローダミンBに曝露された後のパリレン被覆PDMSガasketの顕微鏡画像を示す図である。わずかにピンクがかった色相が見られ、これは、おそらく縁部のコーティングが不十分であるために、ガasketの角部にいくらかの吸収が存在することを示している。

【図32】ローダミンBに曝露された後のパリレン被覆PDMSガasketの顕微鏡画像を示す図である。わずかにピンク色の色相が見られ、これは、いくらかの最小限の吸収が存在することを示している。しかし、吸収は主に鋭い角を有する領域に局在化する。バイアの内側にいくらかの吸収を見ることができ、それは最小限であり視覚化が困難であり、吸収とは無関係の光学的アーチファクトである可能性が非常に高かった。

20

【図33】パリレン被覆材料への吸収に関する研究の結果を示す図である。

【図33A】溶液から回収されたクマリンの画分を示す図である。

【図33B】吸収することが知られている2つの材料上の様々な厚さのコーティングについての溶液から回収されたローダミンBの画分を示す図である。図33Aは、異なるコーティング厚さを有するコーティングされたPDMS及びSEBSの両方によって、一部のクマリンが吸収されたことを示す。図33Bは、最小ローダミンBが、異なるコーティング厚でPDMS及びSEBSによって吸収されたことを示す。

【図34】テフロンAF2400、TPX、及び多孔質PETを含むいくつかの異なる種類のガス交換器を示す図である。

【図35A】作業チャンネルへの真空適用を介して伸張される、完全に可撓性の吸収性マイクロ流体デバイスにおける、膜の中心とポートに近い膜の部分との間の伸張の差を示す図である。

30

【図35B】作業チャンネルへの真空適用を介して伸張される、完全に可撓性の吸収性マイクロ流体デバイスにおける、膜の中心とポートに近い膜の部分との間の伸張の差を示す図である。図35Aは、膜を伸張する前であっても、灌流マニホールドアセンブリとの係合によるチャンネルの変形を示している。図35Bは、伸張中のこの同じデバイスを示している。このように作動する吸収性マイクロ流体デバイスでは、チャンネル長に沿って、特に限定されないが、作業チャンネルの縁部に向かって作業チャンネルから遠く離れた領域に沿って、不均一な伸張プロファイルがあることを見出すことができる。

【図36】吸収性マイクロ流体デバイスの長さにわたる伸張の差を示す図である。伸張のこの実施形態では、培養領域の約20%のみが、予備研究に基づいて適用された伸張下にある。

40

【図37】圧力差が上部チャンネル及び底部チャンネルにわたって加えられる前後の膜を示す図である。いくつかの実施形態では、伸張は、膜を低圧チャンネルの方向に押すように、上部チャンネル及び底部チャンネルとの間に圧力差を有することによって達成される。

【図38】異なる圧力差で共焦点顕微鏡で画像化された、蛍光ビーズが埋め込まれた厚さ50 μm のPDMS膜の側面図である。膜は、デバイスの上部チャンバ内に曲がる。蛍光膜は、PDMSの層を蛍光ビーズでスピンコーティングすることによって製造した。図38では、圧力差が大きいほど、膜の伸張のレベルが大きくなることが分かる。

【図39】加えられた圧力と歪みとの間の関係を得るための曲線に適合させた、厚さ50

50

μm のPDMS膜にかけられた様々なレベルの差圧と測定された歪みとの散布図である。予想通り、試験した圧力レジームでは、関係は線形である。

【図40】共焦点顕微鏡で画像化されたPDMS膜全体の圧力差から生じる厚さ $20\mu\text{m}$ のPDMS膜の作動を示す図である。

【図41】加えられた圧力と歪みとの間の関係を得るための曲線に適合させた、厚さ $20\mu\text{m}$ のPDMS膜にかけられた様々なレベルの差圧と測定された歪みとの散布図である。予想通り、試験した圧力レジームでは、関係は線形である。

【図42】加えられた膜貫通圧力差からの歪みを、モデル予測及び支配的な物理学に基づく異なる伸張レジームの表示と共に示す図である。

【図43】最も生理学的に関連する圧力範囲（すなわち、インビボで見られる圧力）である圧力範囲である、機械的優位領域／レジームにおける適用された膜貫通圧力差からの歪みを示す図である。

【図44】血管系に見られる生理学的に関連する圧力を示す図である。実際、多くのOrgan-Chipがエミュレートしようとする毛細管内では、インビボ関連圧力は $2.5\sim 4\text{kPa}$ である。

【図45A】肝臓検証実験で使用するためのマイクロ流体デバイスを示す図である。

【図45B】肝臓検証実験で使用するためのマイクロ流体デバイスを示す図である。図45Aは、 11% 多孔質PET及びPDMS薄膜ガス交換器を含むガス透過性低吸収性マイクロ流体デバイスを示す。図45Bは、PDMS薄膜ガス交換器を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスを示す。

【図46A】連続した日にPDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイスにおける肝臓細胞（肝細胞）層の形態を示す図である。

【図46B】連続した日にPDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイスにおける肝臓細胞（肝細胞）層の形態を示す図である。

【図46C】連続した日にPDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイスにおける肝臓細胞（肝細胞）層の形態を示す図である。

【図46D】連続した日にPDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイスにおける肝臓細胞（肝細胞）層の形態を示す図である。図46Aは、1日目の単層を示す。図46Bは、3日目の単層を示す。図46Cは、6日目の単層を示す。図46Dは、10日目の単層を示す。単層は10日目まで維持されているようであるが、わずかな形態学的低下を伴っていた。

【図47A】COPから構築された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（13）における細胞単層（33）の形態を示す図である。

【図47B】COPから構築された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（13）における細胞単層（33）の形態を示す図である。

【図47C】COPから構築された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（13）における細胞単層（33）の形態を示す図である。

【図47D】COPから構築された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（13）における細胞単層（33）の形態を示す図である。図47Aは、1日目の単層（33）を示す。図47Bは、3日目の単層（33）を示す。図47Cは、6日目の単層（33）を示す。図47Dは、10日目の単層（33）を示す。単層（33）は10日間にわたって急速に減少しているようであり、大部分の細胞は10日目までに完全に死んでいるか、又は死滅した。

【図48A】多孔質PET及び薄膜PDMSガス交換器（9）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（1）における細胞単層（33）の形態を示す図である。

【図48B】多孔質PET及び薄膜PDMSガス交換器（9）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（1）における細胞単層（33）の形態を示す図である。

【図48C】多孔質PET及び薄膜PDMSガス交換器（9）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（1）における細胞単層（33）の形態を示す図である。

【図48D】多孔質PET及び薄膜PDMSガス交換器（9）を備えた低吸収性ガス透過

10

20

30

40

50

性マイクロ流体デバイス（１）における細胞単層（３３）の形態を示す図である。図４８Ａは、１日目の単層（３３）を示す。図４８Ｂは、３日目の単層（３３）を示す。図４８Ｃは、６日目の単層（３３）を示す。図４８Ｄは、１０日目の単層（３３）を示す。単層（３３）は１０日目まで維持されているようであり、わずかな形態学的低下を伴っていた（図４６のガス透過性であるが吸収デバイスと同様）。

【図４９Ａ】薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）における細胞単層（３３）の形態を示す図である。

【図４９Ｂ】薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）における細胞単層（３３）の形態を示す図である。

【図４９Ｃ】薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）における細胞単層（３３）の形態を示す図である。

【図４９Ｄ】薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）における細胞単層（３３）の形態を示す図である。図４９Ａは、１日目の単層（３３）を示す。図４９Ｂは、３日目の単層（３３）を示す。図４９Ｃは、６日目の単層（３３）を示す。図４９Ｄは、１０日目の単層（３３）を示す。単層（３３）は１０日目まで維持されているようであり、わずかな形態学的低下を伴っていた（図４６のガス透過性であるが吸収デバイスと同様）。

【図５０Ａ】１４日目の全条件の毛様体管のＭＲＰ２シグナルを示す図である。

【図５０Ｂ】１４日目の全条件の毛様体管のＭＲＰ２シグナルを示す図である。

【図５０Ｃ】１４日目の全条件の毛様体管のＭＲＰ２シグナルを示す図である。

【図５０Ｄ】１４日目の全条件の毛様体管のＭＲＰ２シグナルを示す図である。図５０Ａは、１４日目のＰＤＭＳから構築された吸収性マイクロ流体デバイス（１２）の毛細胆管ＭＲＰ２シグナルを示す。図５０Ｂは、１４日目のＣＯＰから構築された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）の毛細胆管ＭＲＰ２シグナルを示す。図５０Ｃは、１４日目の多孔質ＰＥＴ及び薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）の毛細胆管ＭＲＰ２シグナルを示す。図５０Ｄは、１４日目の薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）の毛細胆管ＭＲＰ２シグナルを示す。１４日目に、いずれの条件についてもＭＲＰ２シグナルはなかった。

【図５１Ａ】４日目、９日目及び１３日目の４つの異なるマイクロ流体デバイス条件における平均アルブミン分泌を示す図である。

【図５１Ｂ】４日目、９日目及び１３日目の４つの異なるマイクロ流体デバイス条件における平均アルブミン分泌を示す図である。アルブミン分泌は、多孔質ＰＥＴ及び薄膜ＰＤＭＳガス交換器を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスと、薄膜ＰＤＭＳガス交換器を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの両方において、ＰＤＭＳから構築された吸収性マイクロ流体デバイスよりも低い。しかし、ガス不透過性かつ非吸収性である、ＣＯＰから構築された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスからは、大きな改善が見られる。

【図５２】酸素に富む周囲環境に対する拡散障壁を生成しながら、当該ガス交換器を使用して脈管構造チャネルのみからマイクロ流体デバイスにガスを選択的に導入する、ガス交換器を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスに酸素勾配を導入する方法を示す図である。

【図５３】低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにおける細胞型Ｃａｃｏ－２の形態を示す図である。これは、脈管構造チャネルから、腸管腔を表す頂端チャネルへの酸素勾配の生成から利益を得ることができる腸細胞株である。

【図５４】上部チャネル入口ポート、上部チャネル出口ポート、底部チャネル入口ポート及び底部チャネル出口ポートの４つの異なるポートでサンプリングされた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの酸素濃度プロファイルを示す図である。この実験では、酸素富化培地を頂端入口と基底入口の両方に灌流した。ガス交換器のために、基底チャネルは酸素化されたままであったが、頂端チャネルは酸素がほぼ枯渇した。これは、インビボ状

10

20

30

40

50

態を模倣するのに必要な、結腸に見られる酸素勾配を再現するので、非常に望ましく、求められる結果である。具体的には、これは、腸細胞に恒常性を維持するのに必要なレベルを供給するのに十分な酸素レベルを維持しながら、クロストリジウム・シンビオサム (*clostridium symbiosum*) などの嫌気性細菌が増殖する管腔を表すチャンネルに低酸素環境を作り出すために重要である。

【図 5 5 A】細胞層増殖の 1 日目、2 日目及び 3 日目の、COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス及び PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの両方における肝細胞の付着及び形態を示す図である。

【図 5 5 B】細胞層増殖の 1 日目、2 日目及び 3 日目の、COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス及び PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの両方における肝細胞の付着及び形態を示す図である。

【図 5 5 C】細胞層増殖の 1 日目、2 日目及び 3 日目の、COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス及び PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの両方における肝細胞の付着及び形態を示す図である。

【図 5 6 A】細胞層増殖の 1 日目、2 日目及び 3 日目の、COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス及び PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの両方における肝細胞の付着及び形態を示す図である。

【図 5 6 B】細胞層増殖の 1 日目、2 日目及び 3 日目の、COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス及び PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの両方における肝細胞の付着及び形態を示す図である。

【図 5 6 C】細胞層増殖の 1 日目、2 日目及び 3 日目の、COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス及び PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの両方における肝細胞の付着及び形態を示す図である。図 5 5 A は、1 日目の COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスにおける肝細胞の付着及び形態を示す。図 5 5 B は、2 日目の COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスにおける肝細胞の付着及び形態を示す。図 5 5 C は、3 日目の COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスにおける肝細胞の付着及び形態を示す。図 5 6 A は、1 日目の PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにおける肝細胞の付着及び形態を示す。図 5 6 B は、2 日目の PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにおける肝細胞の付着及び形態を示す。図 5 6 C は、3 日目の PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにおける肝細胞の付着及び形態を示す。

【図 5 7 A】PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにおける 9 日目の肝細胞及び LSEC の形態を示す図である。

【図 5 7 B】PDMS から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにおける 9 日目の肝細胞及び LSEC の形態を示す図である。図 5 7 A は、PDMS から製造された高吸収性マイクロ流体デバイスにおける 9 日目の肝細胞の形態を示す。図 5 7 B は、PDMS から製造された高吸収性マイクロ流体デバイスにおける 9 日目の LSEC の形態を示す。

【図 5 8 A】COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスにおける 9 日目の肝細胞及び LSEC の形態を示す。

【図 5 8 B】COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスにおける 9 日目の肝細胞及び LSEC の形態を示す。図 5 8 A は、COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスにおける 9 日目の肝細胞の形態を示す。図 5 8 B は、COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイスにおける 9 日目の LSEC の形態を示す。肝細胞と LSEC の両方は、9 日目に、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス及び高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの両方で、同等の形態を示し、単層を維持した。

【図 5 9 A】2 つの異なるマイクロ流体デバイスでの細胞層培養の 9 日目の MRP 2 による毛細胆管蛍光染色を示す図である。

【図 5 9 B】2つの異なるマイクロ流体デバイスでの細胞層培養の9日目のMRP2による毛細胆管蛍光染色を示す図である。図 5 9 Aは、細胞層培養の9日目に、20倍顕微鏡対物レンズを使用して、PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスのMRP2による毛細胆管の蛍光染色を示す。図 5 9 Bは、細胞層培養の9日目に、20倍顕微鏡対物レンズを使用して、COPから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスのMRP2による毛細胆管の蛍光染色を示す。

【図 6 0】4つの条件にわたるアルブミン産生の概要を示す図である。試験されたマイクロ流体デバイスには、 $0\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $300\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有するCOPから製造された5つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス、 $10\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $300\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有するCOPから製造された5つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス、 $10\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $30\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有するPDMSから製造された5つの吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス、並びに $10\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $300\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有するPDMSから製造された5つの高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスが含まれる。

【図 6 1】図 6 0に示すマイクロ流体デバイスの溶解後14日目のCYP1A2レベルを示す図である。

【図 6 2】図 6 0に示すマイクロ流体デバイスの溶解後14日目のCYP3A4レベルを示す図である。

【図 6 3】図 6 0に示すマイクロ流体デバイスの溶解後14日目のCYP2A6レベルを示す図である。

【図 6 4】Liver-Chipの生存能力及び機能を維持することを目的とした最適化研究のために、全ての実験条件が見られ得る実験マトリックスを示す図である。マイクロ流体デバイスは、培地が100%酸素で平衡化された（すなわち、培養モジュール上で実行され、 100kPa 、 CO_2 平衡化なし、 $150\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $150\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有する）、COPから製造された3つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス；培養モジュール上で実行され、21%の酸素培地平衡及び5%の二酸化炭素、 $150\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $150\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有する、COPから製造された3つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス；培養モジュール上で実行され、培地が21%酸素及び5%二酸化炭素に平衡化され、 $150\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $150\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有し、培地をpH緩衝するために培地中に15mM HEPESを更に有する、COPから製造された3つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス；シリンジポンプ上で実行され、培地が21%酸素及び5%二酸化炭素に平衡化され、 $300\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $300\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有する、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス；シリンジポンプ上で実行され、培地が21%酸素及び5%二酸化炭素に平衡化され、 $300\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $300\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有する、PDMSから製造された2つの高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス；並びに培養モジュール上で実行され、培地が21%酸素及び5%二酸化炭素に平衡化され、 $30\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $30\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有する、PDMSから製造された2つの高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスを含んでいた。

【図 6 5】図 6 4に示す各条件でのアルブミン産生を示す図である。

【図 6 6 A】培地の往復運動のための実験設定を示す。

【図 6 6 B】培地の往復運動のための実験設定を示す。

【図 6 6 C】培地の往復運動のための実験設定を示す。この設定は、シリンジポンプを使用してCOPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス又は高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスを通して培地を圧送することを含む。培地は、出口ポートに接続された外部リザーバに集まる。このリザーバは外部環境に対して「開いている」ので、培地は空気中の周囲酸素濃度と平衡することができる。デバイス内の細胞が培地中の酸

素を枯渇させた場合、酸素は急速に培地中に拡散し、溶存酸素で再飽和する。大部分の培地がシリンジから送り出されると、シリンジポンプは方向を反転させ、外部リザーバからシリンジに培地を送り返し始める。

【図 6 7】図 6 6 A、図 6 6 B 及び図 6 6 C に示される実験設定のフロープロセスを示す図であり、培地は、シリンジ及び外部リザーバからマイクロ流体デバイスを通して前後に押される。図 6 7 では、培地は、最初に外部リザーバからマイクロ流体デバイスを通してシリンジに引き込まれる。次いで、培地は、任意選択的に、図の中央パネルのシリンジ内で静止状態に保持される。次いで、培地はシリンジから押し出され、マイクロ流体デバイスを通して外部リザーバに戻される。或いは、外部リザーバは、リザーバ又は流体リザーバとして知られてもよい。

【図 6 8】パリレン被覆 S E B S 及びパリレン被覆 E 1 4 0 の吸収を、ガラス及び C O P などの既知の低吸収材料、並びに材料と接触していない薬物（高吸収性であることが知られているクマリン）の対照溶液の吸収と比較して評価した実験の結果を示す図である。被覆されていない材料のみが吸収することが分かった。

【図 6 9】チャンネル構成要素が C O P（吸収しないことが知られている）から製造され、ガスケット材料がパリレンコーティング（吸収しないことが知られているコーティング）を有する P D M S から製造される低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの一実施形態を示す図である。マイクロ流体デバイスを灌流マニホールドアセンブリと連結するための灌流マニホールドアセンブリマイクロ流体デバイスキャリアの一実施形態も示されている。マイクロ流体デバイスのこの実施形態は、デバイス／灌流マニホールドアセンブリの 1 つの好ましい実施形態における面封止ガスケット化方法と適合する。

【図 7 0】ガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン、P D M S、S E B S 及び C O P を含む様々な材料と接触していた溶液からの吸収することが知られている小分子であるミダゾラムの回収された濃度を示す図である。

【図 7 1】ガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン、P D M S、S E B S 及び C O P を含む様々な材料と接触していた溶液からの吸収することが知られている化合物であるブフロールの回収された濃度を示す図である。データは P D M S についてプロットされているが、回収された濃度は検出の下限未満であった（すなわち、化合物は材料に効果的に完全に吸収され、投与溶液から除去された）ことに留意されたい。

【図 7 2】P D M S から製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスへのミダゾラム吸収の計算モデルを示す図である。図 7 2 は、吸収に関する課題のうちの 1 つを示す図であり、上部及び底部チャンネルの両方に化合物を投与し、流量（150 μ L／時）が典型的にこれらのマイクロ流体デバイスで実行される流量よりも高い場合（すなわち、「最良のシナリオ」）でも、細胞培養チャンネルの開始時の細胞のみが、P D M S に吸収される前に薬物と接触する。マイクロ流体デバイスの後半では、曝露される化合物の濃度はほぼ「0」である。

【図 7 3】高吸収ガス透過性マイクロ流体デバイスが灌流マニホールドアセンブリに流体接続することができるように、マイクロ流体デバイスホルダ又はクリップ内の高吸収ガス透過性マイクロ流体デバイスの例示的な実施形態を示す図である。

【図 7 4】灌流マニホールドアセンブリの例示的な実施形態を示す図である。

【図 7 5】小分子の分布、及び小分子が周囲の材料に吸収される可能性を示す図である。以前に試験された小分子の約 40% は吸収しない。小分子の約 40% がいくらか吸収する。O r g a n - C h i p の時間及び長さスケールで小分子の約 20% が完全に吸収する。

【図 7 6】吸収について試験された化合物、それらの分子量（MW）、それらの物理化学的パラメータの 1 つ（log P）、並びに P D M S 及び灌流マニホールドアセンブリ（ポッド）の材料への吸収のレベルについての分配係数のリストを示す図である。

【図 7 7 A】化合物分布キットの物理的構成要素の選択を示す図である。

【図 7 7 B】化合物分布キットの物理的構成要素の選択を示す図である。

【図 7 7 C】化合物分布キットの物理的構成要素の選択を示す図である。一実施形態では、化合物分布キットの物理的構成要素は、無孔膜、複数の灌流マニホールドアセンブリ、

10

20

30

40

50

複数のフィルタ、及びクイックスタートガイドを含む複数のマイクロ流体デバイスを含む。図 77A は、マイクロ流体デバイスホルダ又はキャリア内の 3 つのマイクロ流体デバイスと、3 つのマイクロ流体デバイスを元々収容していた 3 つの開放滅菌バッグとを示す。図 77B は、滅菌容器内の 3 つの灌流マニホールドアセンブリを示す。図 77C は、無菌包装の 2 つのフィルタを示す。

【図 78】 計算機又は吸光計算機の一例を示す図である。図 78 は、計算機が Microsoft Excel 計算機である一実施形態を示す。計算機は、化合物分布キットのデジタル構成要素の一部である。

【図 79】 化合物分布キットのタイムラインの一実施形態を示す図である。第 1 のステップは、一実施形態では Emulate Zoe (商標) である培養モジュールを設定することである。第 2 のステップは、投与溶液及び較正のために更に必要なものを調製することである。第 3 のステップは、所望の時点でマイクロ流体デバイス (チップ) 及び灌流マニホールドアセンブリ (ポッド) を投与することである。第 4 のステップは、例えば LCM を用いて流出物サンプル (化合物) 濃度を定量することである。第 5 のステップは、細胞曝露化合物濃度を評価することである。図 79 はまた、培養モジュールに流体接続されるように準備する灌流マニホールドアセンブリ、溶液の 2 つのチューブ、並びに計算機及びグラフィック計算機の結果の例を示す。

【図 80】 培養モジュールに流体接続されるように準備する 3 つの灌流マニホールドアセンブリの一実施形態を示す図である。

【図 81】 蓋が取り外された 3 つの灌流マニホールドアセンブリを示す図である。図 81 では、灌流マニホールドアセンブリは各々、2 つの入口リザーバ及び 2 つの出口リザーバを有し、2 つの入口リザーバは流体で満たされて示されている。

【図 82】 培養モジュールの例示的な実施形態を示す図である。

【図 83】 5 点較正に許容される 2 組の希釈液を示す図である。

【図 84】 化合物分布キットのデジタル構成要素の一部として吸収データを出力する Microsoft Excel 計算機を示す図である。

【図 85】 培養モジュールと共に使用するためのマイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリの調製のフローチャートを示す図である。図 85 は、最初に、滅菌包装されているか、又は最近滅菌包装から取り出された灌流マニホールドアセンブリ及びマイクロ流体デバイス (キャリア又はホルダ内) を示す。次いで、図 85 は、灌流マニホールドアセンブリに流体接続される向きのマイクロ流体デバイスを示す。次いで、図 85 は、灌流マニホールドアセンブリに流体接続されたマイクロ流体デバイスと、流体で充填された灌流マニホールドアセンブリの入口リザーバとを示す。最後に、図 85 は、培養モジュールに流体接続される向きの灌流マニホールドアセンブリを示す。

【図 86A】 最小吸収のための化合物分布キット出力の例を示す図である。

【図 86B】 最小吸収のための化合物分布キット出力の例を示す図である。図 86A は、最小曝露の場合のマイクロ流体デバイスの 1 つのチャンネルにおける出口濃度のグラフを示す。図 86B は、図 86A のデータを使用して、マイクロ流体デバイス内の細胞によって「見られる」化合物の最小及び最大可能濃度を計算する、最小吸収の場合のマイクロ流体デバイスの 1 つのチャンネルにおける細胞曝露範囲のグラフを示す。

【図 87A】 化合物のほぼ完全な吸収のための化合物分布キット出力の例を示す図である。

【図 87B】 化合物のほぼ完全な吸収のための化合物分布キット出力の例を示す図である。図 86A は、ほぼ完全に吸収された場合のマイクロ流体デバイスの 1 つのチャンネルにおける出口濃度のグラフを示す。図 86B は、ほぼ完全に吸収された場合のマイクロ流体デバイスの 1 つのチャンネルにおける細胞曝露範囲のグラフを示す。

【図 88A】 化合物ローダミンの例示的な計算機出力を示す図である。

【図 88B】 化合物ローダミンの例示的な計算機出力を示す図である。

【図 88C】 化合物ローダミンの例示的な計算機出力を示す図である。

【図 88D】 化合物ローダミンの例示的な計算機出力を示す図である。図 88A は、1 つ

10

20

30

40

50

又は複数のマイクロ流体デバイスの第1のチャンネルにおけるローダミンの出口濃度を示す。図88Bは、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスの第1のチャンネルにおけるローダミンの細胞曝露濃度範囲を示す。図88Cは、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおけるローダミンの出口濃度を示す。図88Dは、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおけるローダミンの細胞曝露濃度範囲を示す。

【図89】細胞を含まない吸収試験マイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリからの結果を示す図である。結果を使用して、細胞を用いた実際の薬物研究における曝露濃度にエラーバー又は信頼区間を設定することができる。曝露濃度の信頼区間は、回収された濃度が上昇するにつれて実験期間と共に減少し、その後の時点では信頼区間がより狭くなる。

10

【図90A】化合物分布キット計算機のローダミンの例示的な用量反応曲線を示す図である。

【図90B】化合物分布キット計算機のローダミンの例示的な用量反応曲線を示す図である。図90Aは、6時間の時点についてのローダミンの用量反応信頼区間チャートを示す。図90bは、72時間の時点についてのローダミンの用量反応信頼区間チャートを示す。

【図91】目的の化合物研究の詳細によって定義される実験期間が与えられた、推奨される培地収集時点を詳述するチャートを示す図である。

【図92】静的バイアル試験から得られたパラメータに基づいて化合物の出口濃度を予測することができるCOMSOLモデルを示す図である。COMSOLモデルは、流量及び

20

【図93】マイクロ流体デバイスのチャンネル内に所望のガス環境を作成する「ハロチップ」又はマイクロ流体デバイスを示す図である。図93に示すマイクロ流体デバイスは、マイクロ流体デバイスの作業チャンネル又は細胞チャンネルの周囲に延びるガスチャンネルを有する。窒素又は酸素などのガスをマイクロ流体デバイスのガスチャンネルに流すことができる。マイクロ流体デバイスの本体は、PDMSなどの透過性材料を含む。ガスは、マイクロ流体デバイスの本体を通してマイクロ流体デバイスの作業チャンネル又は細胞チャンネルに輸送することができる。例えば、チャンネルに嫌気性環境が望まれる場合、窒素をガスチャンネルに流すことができる。別の例では、チャンネルに高度に酸素化された環境が望まれる場合、酸素をガスチャンネルに流すことができる。図93に示すマイクロ流体デバイスはまた、ガスがマイクロ流体デバイスから出ることを可能にする逆止弁を含むことができる。更に、図93のマイクロ流体デバイスはまた、真空チャンネルを含むことができる。真空が真空チャンネルに適用されると、マイクロ流体デバイスは伸張してインピボで細胞生理学をエミュレートすることができる。図93のマイクロ流体デバイスはまた、マイクロ流体デバイス内のガスレベルを監視するために、酸素センサなどのセンサを含むことができる。

30

【図94】図93の図に示す、製造された「ハロチップ」又はマイクロ流体デバイスを示す図である。図94に示すマイクロ流体デバイスは、マイクロ流体デバイス内の作業チャンネル又は細胞チャンネルにガス環境を導入するためのガスチャンネルを含む。酸素、窒素、ヘリウム、二酸化炭素、それらの混合物、煙、蒸気などのガスをマイクロ流体デバイスのガスチャンネルに導入することができる。次いで、そのガスは、マイクロ流体デバイスの本体を通してマイクロ流体デバイスの作業チャンネル又は細胞チャンネルに拡散することができる。細胞生存能力は、細胞がインピボで経験するのと同様の環境で細胞を培養した場合に改善することができる。したがって、マイクロ流体デバイス内の細胞にインピボに適したガス濃度を導入する能力により、科学者がより良好な実験結果を達成することができる。図94に示すマイクロ流体デバイスはまた、マイクロ流体デバイスを伸張させるための真空チャンネル、バルブ、センサ、チャンネル入口、チャンネル出口などを含むことができる。

40

【図95】小分子化合物ローダミンについての計算(COMSOL)モデル流動研究結果と実際のフロー研究結果との比較を示す図である。図95は、流れの結果が化合物の出口濃度についてCOMSOLモデルに適合することを示す。ローダミンは、より低い吸収速度を有する傾向があるが、より高い程度の吸収を有し、その結果、ローダミンはその周囲

50

を経時的に飽和させる。この重要性は、最初にローダミンの大きな損失が見られたにもかかわらず、一定期間後にローダミンの損失率が著しく低下することである。

【図 9 6 A】小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す図である。

【図 9 6 B】小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す図である。図 9 6 A は、マイクロ流体デバイスの第 1 のチャンネルに対する小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲の実験結果を示す。図 9 6 B は、マイクロ流体デバイスの単一チャンネルに対する小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲の計算 (COMSOL) モデル結果を示す。図 9 6 A 及び 9 6 B のチャートは、計算 (COMSOL) モデルがマイクロ流体デバイス、特に PDMS を構成する材料へのローダミン吸収を正確に予測したことを示す。

10

【図 9 7 A】小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す図である。

【図 9 7 B】小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す図である。図 9 7 A は、マイクロ流体デバイスの第 2 のチャンネルに対する小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲の実験結果を示す。図 9 7 B は、マイクロ流体デバイスの第 2 のチャンネルに対する小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲の計算 (COMSOL) モデル結果を示す。図 9 7 A 及び図 9 7 B のチャートは、計算 (COMSOL) モデルがマイクロ流体デバイス、特に PDMS を構成する材料への小分子吸収を正確に予測することを示す。

20

【図 9 8 A】小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す図である。

【図 9 8 B】小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す図である。図 9 8 A は、マイクロ流体デバイスの第 1 のチャンネルに対する小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲の実験結果を示す。図 9 8 B は、マイクロ流体デバイスの第 1 のチャンネルに対する小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲の計算 (COMSOL) モデル結果を示す。計算 (COMSOL) モデルは、マイクロ流体デバイスの外側のフローシステムの残りの部分を考慮していないため、吸収を正確に予測しないことが見出された。この実験のために、マイクロ流体デバイスは、灌流マニホールドアセンブリと流体連通していた。化合物クマリンは、灌流マニホールドアセンブリ、SEBS を構成する材料の 1 つへの吸収を特に受けやすかった。したがって、計算 (COMSOL) モデルは、フローシステム全体への吸収を正確に予測しなかった。

30

【図 9 9 A】小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す図である。

【図 9 9 B】小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す図である。図 9 9 A は、マイクロ流体デバイスの第 2 のチャンネルに対する小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲の実験結果を示す。図 9 9 B は、マイクロ流体デバイスの第 2 のチャンネルに対する小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲の計算 (COMSOL) モデル結果を示す。計算 (COMSOL) モデルは、マイクロ流体デバイスの外側のフローシステムの残りの部分を考慮していないため、吸収を正確に予測しないことが見出された。この実験のために、マイクロ流体デバイスは、灌流マニホールドアセンブリと流体連通していた。化合物クマリンは、灌流マニホールドアセンブリ、SEBS を構成する材料の 1 つへの吸収を特に受けやすかった。したがって、計算 (COMSOL) モデルは、フローシステム全体への吸収を正確に予測しなかった。

40

【図 1 0 0】 $60 \mu\text{L} / \text{時}$ の流量での、PDMS 膜を含む 2 チャンネルマイクロ流体デバイスにおける小分子化合物ローダミンの細胞曝露の実験結果を示す図である。

【図 1 0 1】 $60 \mu\text{L} / \text{時}$ の流量での、細孔を有さない PDMS 膜を含む 2 チャンネルマイクロ流体デバイスにおける小分子化合物ローダミンの細胞曝露の実験結果を示す図である。

【図 1 0 2】 $150 \mu\text{L} / \text{時}$ の流量での、PDMS 膜を含む 2 チャンネルマイクロ流体デバ

50

イスにおける小分子化合物クマリンの細胞曝露の実験結果を示す図である。

【図103】細孔を有さないPDMS膜を含む2チャンネルマイクロ流体デバイスにおける小分子化合物クマリンの細胞曝露の実験結果を示す図である。

【図104】60 μ L / 時の流量での、ガス交換器を通して低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスの本体内に流入するガス、この場合は酸素の片側又は一方向の流れを示す。

【図105】2つの小分子化合物、薬物X及び薬物Yのフロー試験のタイムラインを示す。薬物Xの用量濃度は10 μ Mであり、薬物Yの用量濃度は1 μ Mであった。図105に示す実験では、エンドポイント分析は液体クロマトグラフィー質量分析であった。

【図106A】2チャンネルマイクロ流体デバイスの第1のチャンネルにおける薬物Xの流動研究の概要を示す図である。

10

【図106B】2チャンネルマイクロ流体デバイスの第1のチャンネルにおける薬物Xの流動研究の概要を示す図である。図106Aは、経時的な薬物Xの出口濃度を示す。図106Bは、第1のチャンネルにおける細胞曝露範囲を示す。図106A及び106Bは、薬物Xがシステムに吸収されたことを示す。ほぼ全ての化合物が72時間で回収可能であるため、薬物Xの損失はより低い吸収分子と一致しており、マイクロ流体デバイス材料が飽和したことを示している。図106A及び106Bは、薬物Xへの経時的な細胞曝露が80～100%に達することを示す。図106A及び106Bの薬物Xを担持する培地はまた、2%ウシ胎児血清(FBS)を含有した。

【図107A】2チャンネルマイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおける薬物Xの流動研究の概要を示す図である。

20

【図107B】2チャンネルマイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおける薬物Xの流動研究の概要を示す図である。図107Aは、経時的な薬物Xの出口濃度を示す。図107Bは、第1のチャンネルにおける細胞曝露範囲を示す。図107A及び107Bは、薬物Xがシステムに完全に吸収されたことを示す。化合物吸収量を減少させるために、第2のチャンネル流量を増加させることができる。

【図108A】マイクロ流体デバイスの第1のチャンネルにおける薬物Yの流動研究の概要を示す図である。

【図108B】マイクロ流体デバイスの第1のチャンネルにおける薬物Yの流動研究の概要を示す図である。図108Aは、経時的な薬物Yの出口濃度を示す。図108Bは、経時的なマイクロ流体デバイスの第1のチャンネルにおける細胞曝露の範囲を示す。化合物損失は、マイクロ流体デバイスを構成する材料が飽和するにつれて、ほぼ全ての化合物が流出物中で72時間にわたって回収されるので、中程度に吸収する分子と一致する。時間が経つにつれて、薬物Yの細胞曝露は80～100%になる。図108A及び108Bの薬物Yを担持する培地はまた、2%ウシ胎児血清(FBS)を含有した。

30

【図109A】マイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおける薬物Yの流動研究の概要を示す図である。

【図109B】マイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおける薬物Yの流動研究の概要を示す図である。図109Aは、経時的な薬物Yの出口濃度を示す。図109Bは、経時的なマイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおける細胞曝露の範囲を示す。マイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおける化合物損失は、吸収を指す。流量を増加させて、おそらく化合物の吸収を減少させることができる。

40

【図110】ガス交換器の複数の実施形態を示す図である。図示の実施形態では、基材は、別の材料で充填された領域を含む。領域は、細孔であってもよい。細孔は、全体的に充填されていてもよく、又は部分的に充填されていてもよい。更に、細孔は、被覆されているだけでなく、充填されていてもよい。細孔は、片面又は両面が被覆されていてもよい。

【図111A】2つのリザーバ間の再循環方法の複数の実施形態を示す図であり、図中では「流入」リザーバ及び「流出」リザーバである。

【図111B】2つのリザーバ間の再循環方法の複数の実施形態を示す図であり、図中では「流入」リザーバ及び「流出」リザーバである。

【図111C】2つのリザーバ間の再循環方法の複数の実施形態を示す図であり、図中で

50

は「流入」リザーバ及び「流出」リザーバである。

【図 1 1 1 D】 2つのリザーバ間の再循環方法の複数の実施形態を示す図であり、図中では「流入」リザーバ及び「流出」リザーバである。

【図 1 1 1 E】 2つのリザーバ間の再循環方法の複数の実施形態を示す図であり、図中では「流入」リザーバ及び「流出」リザーバである。

【図 1 1 1 F】 2つのリザーバ間の再循環方法の複数の実施形態を示す図であり、図中では「流入」リザーバ及び「流出」リザーバである。

【図 1 1 1 G】 2つのリザーバ間の再循環方法の複数の実施形態を示す図であり、図中では「流入」リザーバ及び「流出」リザーバである。図 1 1 1 A～図 1 1 1 G は、シリコンバルブの有効性を実証する。図 1 1 1 A は、アンプレラバルブを使用する再循環設定の一実施形態を示す。図 1 1 1 B は、ダックビルバルブを使用する再循環設定の一実施形態を示す。図 1 1 1 C～図 1 1 1 E は、チューブ及びダックビルバルブを使用する再循環設定の複数の実施形態を示す。図 1 1 1 F は、チューブ及びダックビルバルブを使用する再循環設定の一実施形態を示す。図 1 1 1 G は、チューブ及びアンプレラバルブを使用する再循環設定の一実施形態を示す。

10

【図 1 1 2】 流体を往復させる前後の肝臓細胞を含む PDMS 及び COP マイクロ流体デバイスにおけるアルブミン産生のグラフを示す図である。図 1 1 2 では、流体を往復させることは、シングルパス流と比較してアルブミン産生の増加をもたらすことが分かる。

【図 1 1 3】 流体を往復させる前後の肝臓細胞を含む PDMS マイクロ流体デバイスにおけるアルブミン産生を示す図である。往復運動する流体はアルブミン産生の増加をもたらすことが分かる。

20

【図 1 1 4】 主チャンネルを有する剛体、そのチャンネル内に配置されたエラストマー性膜、作業チャンネル又はガスチャンネル、及び当該主チャンネルと当該作業チャンネル又はガスチャンネルとの間のエラストマー性壁を含む低吸収性マイクロ流体デバイスの実施形態を含む図である。或いは、図 1 1 4 は、主チャンネルを有する低吸収体、可撓性膜、作業チャンネル又はガスチャンネル、及び当該主チャンネルと当該作業チャンネル又はガスチャンネルとの間の可撓性壁を含むマイクロ流体デバイスを示す。或いは、図 1 1 4 は、チャンネルを有する実質的に剛性の本体を含むマイクロ流体デバイスを示し、当該チャンネルは可撓性膜を含み、当該膜は、1 つ又は複数の可撓性壁によって当該チャンネルから分離された作業チャンネル又はガスチャンネルによって伸張することができる。

30

【図 1 1 5 A】 化合物分布キットを使用して、肝臓細胞を含む PDMS マイクロ流体デバイスにおける、本明細書では化合物 Z と呼ばれる化合物の吸収を試験した実験の結果を示す図である。

【図 1 1 5 B】 化合物分布キットを使用して、肝臓細胞を含む PDMS マイクロ流体デバイスにおける、本明細書では化合物 Z と呼ばれる化合物の吸収を試験した実験の結果を示す図である。

【図 1 1 5 C】 化合物分布キットを使用して、肝臓細胞を含む PDMS マイクロ流体デバイスにおける、本明細書では化合物 Z と呼ばれる化合物の吸収を試験した実験の結果を示す図である。

【図 1 1 5 D】 化合物分布キットを使用して、肝臓細胞を含む PDMS マイクロ流体デバイスにおける、本明細書では化合物 Z と呼ばれる化合物の吸収を試験した実験の結果を示す図である。図 1 1 5 A は、30 μ L / 時などの低流量での化合物 Z のほぼ完全な吸収を示す。図 1 1 5 B は、150 μ L / 時などの高流量での化合物 Z の有意な吸収（ほぼ 80 % の損失）を示す。図 1 1 5 C は、30 μ L / 時での化合物の当該第 1 のチャンネルにおける化合物 Z の細胞曝露を示す。図 1 1 5 D は、150 μ L / 時での化合物の当該第 1 のチャンネルにおける化合物 Z の細胞曝露を示す。化合物損失を補償するために、より高い濃度で実験を行った。化合物 Z の投与濃度を増加させ、回収した出口濃度を有効「細胞曝露濃度」として使用した。投与濃度を増加させると、偽陽性（化合物は毒性ではないが、マイクロ流体デバイスに毒性作用が見られる）の可能性が高まるが、偽陰性（化合物は実際には毒性であるが、マイクロ流体デバイスはいかなる毒性応答も示さない）の可能性は排除

40

50

される。

【図 1 1 6】様々なヒト器官における酸素分圧を示す図である。酸素、二酸化炭素、及び様々なガスは、細胞の生物学的機能に影響を及ぼすことが知られており、組織及び様々な疾患状態に大きな影響を及ぼす可能性がある。例えば、酸素分圧は器官全体で人体において劇的に異なるが、伝統的な細胞培養技術はこれを考慮していない。

【図 1 1 7】PDMS マイクロ流体デバイスにおけるガス交換を示す図である。図 1 1 7 を参照すると、マイクロ流体デバイスにおけるガス輸送の方法は、インキュベータとマイクロ流体デバイス材料との間、マイクロ流体デバイス材料と細胞培養培地との間、及び細胞培養培地と細胞との間のガス交換を含む。

【図 1 1 8】細胞培養インキュベータ内にある間の様々な酸素相に対するマイクロ流体デバイス応答の結果を示す図である。培養モジュール内で $30 \mu\text{L}/\text{時}$ の流量で流れているマイクロ流体デバイス出口の酸素測定を行い、流れは入口への 18.5% 酸素を伴う。図 1 1 8 に見られるように、インキュベータは、大気酸素レベル（加湿インキュベータ内で 18.5% ）で開始し、 1% 酸素設定点に到達し（ロングテールエンドで見られる）、インキュベータが大気に開放されると大気酸素に戻る。

【図 1 1 9】 1% 酸素インキュベータ内の 18.5% 酸素（酸素化）又は $1 \sim 5\%$ 酸素（低酸素）濃度のいずれかを有する培養モジュールにおける $100 \mu\text{L}/\text{時}$ の水流下でのマイクロ流体デバイス出口の実験的酸素測定の結果を示す図である。マイクロ流体デバイス及びシステムを、 12 時間前にインキュベータ環境に平衡化した。

【図 1 2 0】酸素化培地を用いた同じ条件の PDMS マイクロ流体デバイスの第 1 のチャンネル及び第 2 のチャンネル体積平均の COMSOL Multiphysics シミュレーションプロットの結果を示す図である。

【図 1 2 1】 1% 酸素インキュベータ内の酸素化入口水を用いた $30 \mu\text{L}/\text{時}$ 及び $100 \mu\text{L}/\text{時}$ の流量に対する PDMS マイクロ流体デバイスの第 1 及び第 2 のチャンネル体積平均の COMSOL Multiphysics シミュレーションプロットの結果を示す図である。

【図 1 2 2】インキュベータのドアを開いた際の回復時間の結果の図を示す。酸素測定は、 1% 酸素に設定したインキュベータ内の培養モジュール内で $100 \mu\text{L}/\text{時}$ の水流下でマイクロ流体デバイスの出口で行った。マイクロ流体デバイス、培養モジュール、及びシステムの残りの部分を、 12 時間前にインキュベータ環境に平衡化した。インキュベータのドアを 5 秒間開いてから測定を開始した。

【図 1 2 3】 1% 酸素に平衡化され、大気酸素に曝露された静的 PDMS マイクロ流体デバイスの PDMS マイクロ流体デバイスの第 1 及び第 2 のチャンネル体積平均の COMSOL Multiphysics シミュレーションプロットの結果を示す図である。

【図 1 2 4】 $100 \mu\text{L}/\text{時}$ の水流量での培養条件又は 18.5% 酸素インキュベータ及び 18.5% 酸素入口水における播種 Caco-2 細胞を有するマイクロ流体デバイスの PDMS マイクロ流体デバイスの第 1 及び第 2 のチャンネル体積平均の COMSOL Multiphysics シミュレーションプロットの結果を示す図である。

【図 1 2 5】Caco-2 細胞を添加した PDMS マイクロ流体デバイス酸素微小環境を示す図である。図 1 2 5 は、マイクロ流体デバイスの中心における水の酸素濃度の断面表面ポットを示す。

【図 1 2 6】ガスをマイクロ流体デバイスの本体に導入するために使用されるガス交換チャンネルを含むガス交換マイクロ流体デバイスの一実施形態を示す図である。図 1 2 6 の実施形態は、培養チャンネル、ガス交換チャンネル、及び当該培養チャンネルと当該ガス交換チャンネルとの間のガス交換器を有する本体を含む。図 1 2 6 の実施形態は、図 3 の装置とよく似ているが、所望の濃度のガスをマイクロ流体デバイスのチャンネルと交換するために、ガス交換器と接触するガス交換チャンネルも含む。

【発明を実施するための形態】

【0333】

マイクロ流体デバイス内の化合物分布及び吸収性を改善するためのいくつかの実施形態

が本明細書に提示される。

【0334】

本発明の1つの例示的な実施形態は、細胞及びその他の実験を行うための低吸収性マイクロ流体デバイスである。本発明の別の例示的な実施形態は、マイクロ流体デバイスの周りの流体インフラを表す低吸収性灌流マニホールドアセンブリである。低吸収性マイクロ流体デバイス及び低吸収性灌流マニホールドアセンブリの両方は、周囲ガスがマイクロ流体チャンネルなどのデバイスの実験領域にアクセスすることを可能にしながら、小分子吸収を最小限に抑えることを目的とする。

【0335】

米国特許第8,647,861号は、マイクロ流体デバイス、又は有機模倣デバイス、又は臓器機能を模倣する使用のためのマイクロ流体デバイスを記載しており、このデバイスは、その中に中央マイクロチャンネルを有する本体、並びに第1の中央マイクロチャンネル及び第2の中央マイクロチャンネルを形成するように当該中央マイクロチャンネルを分離するように構成され、中央マイクロチャンネル内に平面に沿って配置された少なくとも部分的に多孔質の膜を含み、第1の流体は、第1の中央マイクロチャンネルを介して適用され、第2の流体は、第2の中央マイクロチャンネルを介して適用され、膜は、複数の生細胞の接着を支持する少なくとも1つの接着分子でコーティングされ、多孔性膜は、少なくとも部分的に可撓性であり、デバイスは、第1のマイクロチャンネル壁によって第1及び第2の中央マイクロチャンネルから分離された第1の動作チャンネルを更に含み、膜は、第1のチャンバマイクロチャンネル壁に固定され、第1の動作チャンネルに圧力を加えることにより、膜が第1の所望の方向に屈曲して、第1及び第2の中央マイクロチャンネル内の平面に沿って拡張又は収縮する。本発明の多くの実施形態は、米国特許第8,647,861号においてマイクロ流体デバイスを製造するために最も一般的に使用される材料が吸収性であるという驚くべき発見に続いて、米国特許第8,647,861号に提示されたマイクロ流体デバイスの改善とみなすことができる。低吸収性マイクロ流体デバイスを製造するプロセスにおいて、ガス不透過性及びガス透過性の両方の選択肢が設計及び製造された。

【0336】

いくつかの例では、例えば嫌気性細菌が培養されている場合、高透過性材料から製造されたマイクロ流体デバイスは望ましくないことがある。したがって、本発明の一実施形態は、非透過性材料のフィルムでマイクロ流体デバイスをマスクすることである。

【0337】

ガスを制御することが企図される一実施形態は、ガス又は液体のいずれかの流体を流し、ガス源とマイクロ流体デバイス内の別の1つ又は複数のチャンネルとの間でガスを交換するための1つ又は複数のガス交換チャンネルを含むマイクロ流体デバイスである。ガス制御マイクロ流体デバイスは、ガス透過性マイクロ流体デバイス内のガス濃度を制御することができる。酸素、窒素、ヘリウム、二酸化炭素、それらの混合物、煙、蒸気などのガスをマイクロ流体デバイスのガスチャンネルに導入することができる。マイクロ流体デバイスの本体は、PDMSなどの透過性材料を含む。ガスは、マイクロ流体デバイスの本体を通してマイクロ流体デバイスの作業チャンネル又は細胞チャンネルに輸送することができる。細胞生存能力は、細胞がインビボで経験するのと同様の環境で細胞を培養した場合に改善することができる。したがって、マイクロ流体デバイス内の細胞にインビボに適したガス濃度を導入する能力により、科学者がより良好な実験結果を達成することができる。例えば、チャンネルに嫌気性環境が望まれる場合、窒素をガスチャンネルに流すことができる。別の例では、チャンネルに高度に酸素化された環境が望まれる場合、酸素をガスチャンネルに流すことができる。

【0338】

一実施形態では、ガス交換チャンネルは、ガス交換器と共に使用することができる。一実施形態では、図126に示すように、培養チャンネル、ガス交換チャンネル、及び当該培養チャンネルと当該ガス交換チャンネルとの間のガス交換器を有する本体を含むマイクロ流体デバイスが企図される。図126の実施形態は、図3の装置とよく似ているが、所望の濃度の

ガスをマイクロ流体デバイスのチャンネル（３、４）と交換するために、ガス交換器（９）と接触するガス交換チャンネル（４５）も含む。

【０３３９】

ガスを制御することが企図される別の実施形態は、図９３及び図９４に示すように、マイクロ流体デバイスのチャンネル内に所望のガス環境を作成する能力を有するマイクロ流体デバイスである「ハロチップ」である。「ハロチップ」又はガス制御マイクロ流体デバイスは、マイクロ流体デバイスの作業チャンネル又は細胞チャンネルの周囲に延びるガスチャンネルを有する。図９３は、マイクロ流体デバイスのチャンネル内に所望のガス環境を作成する「ハロチップ」又はマイクロ流体デバイス（４７）を示す。図９３に示すマイクロ流体デバイスは、マイクロ流体デバイスの作業チャンネル又は細胞チャンネル（３、４）の周囲に延びるガスチャンネル（４５）を有する。窒素又は酸素などのガスをマイクロ流体デバイスのガスチャンネルに流すことができる。マイクロ流体デバイスの本体は、ＰＤＭＳなどの透過性材料を含む。ガスは、マイクロ流体デバイスの本体を通してマイクロ流体デバイス（４７）の作業チャンネル又は細胞チャンネル（３、４）に輸送することができる。例えば、チャンネル（３、４）に嫌気性環境が望まれる場合、窒素をガスチャンネル（４５）に流すことができる。別の例では、チャンネルに高度に酸素化された環境が望まれる場合、酸素をガスチャンネルに流すことができる。図９３に示すマイクロ流体デバイス（４７）はまた、ガスがマイクロ流体デバイスから出ることを可能にする逆止弁（４６）を含むことができる。更に、図９３のマイクロ流体デバイス（４７）はまた、真空チャンネルを含むことができる。真空が真空チャンネルに適用されると、マイクロ流体デバイス（４７）は伸張してインビボで細胞生理学をエミュレートすることができる。図９３のマイクロ流体デバイスはまた、マイクロ流体デバイス内のガスレベルを監視するために、酸素センサなどのセンサを含むことができる。

10

20

【０３４０】

図９４は、図９３に示す「ハロチップ」又はマイクロ流体デバイス（４７）の異なる図を示す。図９４に示すマイクロ流体デバイス（４７）は、マイクロ流体デバイス内の作業チャンネル又は細胞チャンネル（３、４）にガス環境を導入するためのガスチャンネル（４５）を含む。酸素、窒素、ヘリウム、二酸化炭素、それらの混合物、煙、蒸気などのガスをマイクロ流体デバイス（４７）のガスチャンネル（４５）に導入することができる。次いで、そのガスは、マイクロ流体デバイスの本体を通してマイクロ流体デバイス（４７）の作業チャンネル又は細胞チャンネル（３、４）に拡散することができる。細胞生存能力は、細胞がインビボで経験するのと同様の環境で細胞を培養した場合に改善することができる。したがって、マイクロ流体デバイス内の細胞にインビボに適したガス濃度を導入する能力により、科学者がより良好な実験結果を達成することができる。図９４に示すマイクロ流体デバイス（４７）はまた、マイクロ流体デバイスを伸張させるための真空チャンネル、バルブ、センサ、チャンネル入口、チャンネル出口などを含むことができる。

30

【０３４１】

いくつかの例では、特に小分子剤を含むものでは、ＰＤＭＳへの吸収性が問題となる。当該吸収性を克服するために本明細書に提示される本発明の第１の反復の１つは、ガス不透過性低吸収性マイクロ流体デバイスである。ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、内部に少なくとも１つのチャンネルを有する本体、及びそのチャンネル内に配置された膜を含む。ガス不透過性マイクロ流体デバイスであって、その中に中央マイクロチャンネルを有する本体、及び中央マイクロチャンネル内に平面に沿って配置された少なくとも部分的に多孔質の膜を含み、膜は、中央マイクロチャンネルを分離して、第１の中央マイクロチャンネル、すなわち底部チャンネルと、第２の中央マイクロチャンネル、すなわち上部マイクロチャンネルとを形成するように構成され、第１の流体は、第１の中央マイクロチャンネルを介して適用され、第２の流体は、第２の中央マイクロチャンネルを介して適用される。図５は、ＣＯＰ及びＳＥＢＳガasket層などのガス不透過性材料から完全に製造されたマイクロ流体デバイスの実施形態を示す。ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）は、低薬物吸収性であるためにＣＯＰから製造された本体を有する。図６は、異なる層を見るために分解され

40

50

た完全にガス不透過性の材料から製造されたマイクロ流体デバイスの同じ実施形態を示す。ガス不透過性マイクロ流体デバイスは、上述の吸収性マイクロ流体デバイス（１２）又は本明細書に提示される低吸収性マイクロ流体デバイス（１）と同様の層を含むことができる。これらの要素としては、上部チャネル（３）を含む上部チャネル層（６）、底部チャネル（４）を含む底部チャネル層（８）、及び上部チャネル層（６）と底部チャネル層（８）との間の膜（７）が挙げられるが、これらに限定されない。図６に示す実施形態は、図１に示すようにマイクロ流体デバイス（１３）の上面全体を覆う１つのガスケット（５）の代わりに２つのガスケット（５）を含む。ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）のフォーマットは、米国特許第８，６４７，８６１号に記載されている吸収性マイクロ流体デバイス（１２）のインフラストラクチャと互換性がある。図５のガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）の実施形態は、米国特許第８，６４７，８６１号に記載されている吸収性マイクロ流体デバイス（１２）よりも大規模製造に適しており、その理由は、ガス不透過性マイクロ流体デバイスが熱可塑性射出成形プロセスに適しているためである。硬質材料から製造されたマイクロ流体デバイスは、培養チャネル壁も硬質であるため、作業チャネルを使用して伸張することができないため、この設計には作業チャネルが特に欠けている。膜がエラストマー性である場合、差動伸張が可能である。後者の実施形態は、後に更に詳細に説明される。

【０３４２】

いくつかの実験的追跡では、使用するマイクロ流体デバイスの伸張が有利である。完全に剛性の材料から製造されたマイクロ流体デバイスは、膜が作業チャネルを通して伸張されることを可能にするように修正された。低吸収性マイクロ流体デバイスの一実施形態は、作業チャネル又はガスチャネルを含み、当該作業チャネル又はガスチャネルで膜を伸張させることができるように製造された。図１１４は、エラストマー性膜（７）及びエラストマー性チャネル壁（４８）を含むこの低吸収性マイクロ流体デバイス（４９）の一実施形態を示す。低吸収性マイクロ流体デバイス（４９）は、エラストマー性壁及びエラストマー性膜（７）を含む主チャネルを有しながら、主に剛性であってもよい。主チャネルは、第１のチャネル（３）及び第２のチャネル（４）を含むことができる。膜（７）は、当該膜の両側でのガス輸送を容易にするためにエラストマー性であってもよい。チャネル（４８）の壁は、必要に応じてガス又は作業チャネル（３２）の使用によって膜（７）の伸張を容易にするためにエラストマー性であってもよい。しかし、いくつかの実施形態では、差圧を使用して当該膜（７）を伸張させることができ、その場合、本体及びチャネル壁は剛性であってもよいが、単純に膜（７）はエラストマー性である。膜のみがエラストマー性である実施形態では、膜が一実施形態における膜の小さな体積を表し得るので、吸収材料の量は最小限に抑えられ得る。一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、内部に少なくとも１つのチャネル（３、４）を有する本体を含み、当該チャネルは、エラストマー性壁（４８）及びエラストマー性膜（７）を有し、当該本体の少なくとも一部は剛性である。更に、エラストマー性チャネル壁（４８）及び膜（７）を含む実施形態は、本体が完全に剛性である実施形態よりも更なる製造ステップを必要とし得る。一実施形態では、マイクロ流体デバイスは、内部に少なくとも１つのチャネル（３、４）を有する本体を含み、当該チャネルは、剛性壁及びエラストマー性膜（７）を有し、当該本体の少なくとも一部は剛性である。しかし、エラストマー性チャネル壁を用いて製造された実質的に剛性のマイクロ流体デバイスは、更なる製造ステップを必要とし、積層製造は効果的に使用することができない。

【０３４３】

前述のように、完全に剛性の材料から製造されたマイクロ流体デバイスは、差動伸張を容易にするためにエラストマー性膜を有するように修正することができる。差動伸張を図３７Ａ及び図３７Ｂに示す。図３７Ａ及び図３７Ｂに示すマイクロ流体デバイスは、膜（７）がエラストマー性である限り、任意の材料の本体（６、８）を有することができる。

【０３４４】

場合によっては、これらの完全にガス不透過性のマイクロ流体デバイスは、呼吸などの

本質的な生物学的機能に必要な酸素などの周囲ガスにアクセスすることができないため、細胞などの検体の死を引き起こす。

【0345】

剛性材料とエラストマー性材料の両方から作成されたマイクロ流体デバイスの低酸素レベルを克服するために、いくつかの新しい技術が企図され、次いで使用された。ガス不透過性を克服するための一実施形態は、培地又は流体のガス運搬能力を増大させる（例えば増加させる）ためなど、培地又は流体にヘモグロビンなどのサプリメントを添加することであった。しかし、これらのサプリメントは、時には使用が困難であることが見出された。

【0346】

ガス不透過性を克服する別の実施形態は、より高い濃度の溶存酸素をマイクロ流体デバイスのチャンネルに導入するために、流体又は培地を高流量で流すことであった。残念ながら、流体又は培地の廃棄物を含む高流量にはいくつかの欠点がある。細胞がマイクロ流体デバイス内で培養される場合、重要な細胞シグナルを洗い流すことができる。更に、より高流量は、より高レベルの剪断をもたらし、これは必ずしも好ましいとは限らない。

【0347】

これらの欠点を克服するために、流体又は培地を再循環させることができる。再循環は、マイクロ流体デバイスを介して実質的に同じ培地を少なくとも2回循環させることを含む。培地は、各循環の間で酸素化されてもよい。更に、いくつかの実験は高剪断を必要とする。例えば、いくつかの実験では、血管細胞を高剪断流に曝露する必要がある。高剪断用途は、「高速再循環」、したがって大量の流体を必要とする。図111A～図111Gは、図7に示すような灌流マニホールドアセンブリを使用して、図5に示すようなマイクロ流体デバイスを介して培地を再循環させるために提案されたいくつかの実施形態を示す。図111A～図111Gは、2つのリザーバ間の再循環方法の複数の実施形態を示す図であり、図中では「流入」リザーバ及び「流出」リザーバである。企図される一般的な技術は、図7のもの（19）など、入口リザーバを出口リザーバに接続するバルブ及びチューブを有することである。壁によって分離された2つのリザーバが図111A～図111Gに示されている。これらのリザーバは、灌流マニホールドアセンブリ（14）内のリザーバ（19）であってもよい。リザーバは、その中に流体／液体／培地を有する。図111Aは、アンブレラバルブ（50）を使用する再循環設定の一実施形態を示す。マイクロ流体デバイスを通る流れの間、バルブは閉じたままであり、「OUT」はマイクロ流体デバイスを通る流れを介して流体で満たされる。これは、通常、一方向（逆止）弁によって遮断される、リザーバ間の穴又はチャンネルを通した、「OUT」リザーバからの培地による入口リザーバの不連続で迅速ではあるが再充填である。小型バルブが漏出することが知られているため、アンブレラバルブ（50）などのより大きな逆止弁を再循環中に使用することができると考えられる。図111Bは、ダックビルバルブ（51）を使用する再循環設定の一実施形態を示す。図111C～図111Eは、チューブ（53）及びダックビルバルブ（51）を使用する再循環設定の複数の実施形態を示す。図111Fは、チューブ（53）及びダックビルバルブ（51）を使用する再循環設定の一実施形態を示す。図111Fに示す再循環設定を試験し、培養モジュール（82）及び灌流マニホールドアセンブリ（14）との良好な適合性及び成功を示した。図111Gは、チューブ（53）及びアンブレラバルブ（50）を使用する再循環設定の一実施形態を示す。図111A～図111Gは、シリコンバルブの有効性を実証する。同様に、必要に応じて、より高流量及びより低剪断を可能にするために、より低い抵抗器を使用することが企図された。再循環は、灌流マニホールドアセンブリの残留チャンネル内のミニバルブを使用して達成することができる。再循環はまた、再循環につながるバルブを「破裂」させるために出口への圧力の不連続的な印加を使用して達成することができる。バルブが「破裂」すると、バルブは流体を出口リザーバから入口リザーバに流入させる。

【0348】

再循環のための潜在的な使用事例には、生理学的に関連するキャピラリーゲル剪断速度

10

20

30

40

50

、低灌流マニホールドアセンブリ剪断であるが高マイクロ流体デバイス剪断を伴う好中球動員、及び低灌流マニホールドアセンブリ剪断であるがマイクロ流体デバイス内の高剪断を伴うマイクロ流体デバイス内の血栓症再現が含まれる。

【0349】

しかし、時には、再循環装置はかさばり、使用が困難な機器を必要とすることがある。これらの場合、流体は、デバイスを通して往復移動するか、又は前後に流れることができる。インビボでの流体は2つの方向に流れないので、細胞をインビトロで研究する場合の往復運動は自明ではない。驚くべき発見は、インビトロで細胞が往復培地で高レベルの生存能力及び器官特異的機能を示したことであった。往復運動はまた、図82に見られるように、培養モジュール(42)内のマイクロ流体デバイス上で行うこともでき、培養モジュール(42)上の低クリアランス化合物に対する肝臓細胞の代謝速度を評価するための実験の一部として試験されている。実験では、化合物含有培地とマイクロ流体デバイス内の細胞層との間の接触時間を最大にするために、「低容量」(200 μ L)を、マイクロ流体デバイスを通して「前後に」迅速に往復させた。これは、細胞を含まないマイクロ流体デバイスで24時間以上達成可能であった。

【0350】

異なる細胞型は、増殖するために異なる量の酸素を必要とし得る。細胞の健康が目標／要件である場合、細胞が必要なだけの酸素にアクセスできることを保証するために、マイクロ流体デバイスに入る酸素の速度は、マイクロ流体デバイス内の酸素取り込み速度よりも速くなければならない。例えば、肝臓の肝細胞は、大気レベルの酸素を必要とし得るが、腸内の一部の細菌培養物は、非常に低い酸素濃度を必要とし得、大気レベルは有毒である。したがって、マイクロ流体デバイス、特に細胞生物学における用途を有するマイクロ流体デバイスは、必要なレベルの酸素がマイクロ流体デバイス内の細胞、実験などに到達することを依然として可能にしながら、低吸収性であることによって利益を得る。しかし、多くの場合、低吸収材料はガス不透過性である傾向がある。このようにして、材料吸収性の量を最小限に抑えるマイクロ流体デバイスは、ガス透過性及びガス不透過性構成要素の組合せを用いて設計することができ、同時に、吸収を最小化し、必要なガスを細胞層に供給する。

【0351】

Organ-on-a-chipのためのマイクロ流体デバイスを使用するための用途は、細胞が候補化合物と接触しているときに産生される得られた代謝産物を理解することである。薬物の固有クリアランスを推定するために、例えば、親化合物の代謝又は損失を定量する必要があることが多い。代謝を定量する際の最初の課題は、代謝が低い場合である。代謝速度が遅いと、マイクロ流体デバイスが非吸収性であっても、親化合物の損失を検出することが困難になる可能性がある。LC/MS装置における検出の実際的な限界は $\pm 25\%$ である。したがって、代謝を確実に検出／定量するためには、親化合物の濃度の減少は約25%である必要がある。代謝を定量する際の別の課題は、親化合物の物質吸収である。PDMsなどの物質への吸収が有意である場合、観察された見かけの代謝速度(化合物損失の全てが代謝に起因する場合)は、化合物濃度の減少が代謝に誤って起因するため、実際の細胞媒介性代謝を過大評価することになる。場合によっては、親化合物の全てが材料によって枯渇する可能性がある。この場合、全ての化合物が失われており解析するデータがないので、吸収は可能な上限代謝速度の推定さえも妨げる。材料吸収は、全ての親化合物が材料によって枯渇していない限り、材料中の吸収の速度及び程度、投与濃度及び流量などの実験パラメータ、並びにマイクロ流体デバイスの幾何学的形状などの材料-化合物特性に関する所与の情報を計算的にモデル化し、説明することができる。しかし、これには、化合物-材料相互作用を特徴付けるための広範な研究、並びに化合物の損失又は消失に対する材料吸収の寄与を「差し引く」ためのシステムの計算コストの高いモデルが必要である。しかし、繰り返すと、化合物損失が完全である場合、これらのモデルは、化合物損失が完全であるため、吸収の寄与を説明することができない。

【0352】

例えば、任意のシステムにおけるジアゼパム及びアミトリプチリンの代謝を定量することは困難である。ジアゼパム及びアミトリプチリンはいずれも低クリアランス化合物であり、これは、肝臓によってゆっくり代謝されることを意味する。第1の課題は、ジアゼパム及びアミトリプチリンの両方が、Liver-Chipなどのマイクロ流体デバイスにおいて長い曝露時間を必要とすることが多いことである。代謝を定量化するために、かなりの化合物枯渇を見るためには、長い曝露時間が必要である。長い曝露時間は、細胞に供給される培地量が非常に少ないことを意味することが多く、これは栄養素も提供し、廃棄物を運び去る。炭素成分及び溶存酸素などの培地栄養素が枯渇し、廃棄物が十分に除去されない場合、細胞は損傷を受けるか、又は死滅する可能性がある。第2の課題は、ジアゼパム及びアミトリプチリンの両方が、一般的なマイクロ流体デバイス製造材料であるPDMSに吸収されることである。長い曝露時間はまた、薬物がPDMSとより長く接触していることを意味し、吸収による化合物損失を悪化させる。化合物のPDMS吸収は、代謝の定量化をマスクすることができる。図15A及び15Bは、ジアゼパムのPDMSへの吸収の深刻さを示す。図15Aに見られるように、化合物を含有する培地が、高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)を含むPDMS材料のサンプルに曝露されると、化合物濃度の減少は、規模及び速度において顕著である。曝露の12時間以内に、ジアゼパムの濃度はほぼ2/3まで低下した。対照的に、図15Bでは、ジアゼパムの投与濃度のいずれも、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)のバルク材料に失われなかったことが分かる。実験は、PDMSとCOPとの間の大きな吸光度差を強調している。ジアゼパムを使用する実験もマイクロ流体デバイスで行った。図29Aは、プレート培養物から収集した実際のデータに対するインビボ薬物クリアランスデータから計算されたプレート培養物中の薬物ジアゼパムの予想枯渇モデルを示す。図29Bは、吸収材料-PDMSから製造されたマイクロ流体デバイス、及びCOPから製造された低吸収性マイクロ流体デバイス(13)からの結果と比較して、吸収が存在しない場合(理論的)(12)のマイクロ流体デバイスにおける薬物ジアゼパムの予想される枯渇モデルを示す。COPマイクロ流体デバイス(13)とプレート培養の両方が、予想されるように対数線形の枯渇動態を有するが、非吸収性マイクロ流体デバイスにおいてのみ、文献のインビボ値によって予測された値に近い値である。PDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイスからの結果は、文献値から予測された結果から外れているだけでなく、代謝が化合物損失の唯一の推進要因であった場合に予想されるように、グラフの形状は対数線形ではない。実際、ジアゼパムの非線形枯渇は、化合物損失、すなわち発生することが知られている物質吸収の別の力学を明確に示している。図30は、PDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイス(12)及びCOPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)で測定された、プレート上のインビボでのジアゼパムの予測クリアランスを示す。要約すると、プレート培養はクリアランスを過小予測し、吸収マイクロ流体デバイスはクリアランスを過大予測し、本明細書では「New Liver-Chip」と呼ばれる非吸収マイクロ流体デバイスは固有クリアランスを正確に予測する。

【0353】

したがって、ガス透過性材料とガス不透過性材料との戦略的組合せから製造されたマイクロ流体デバイスは、試験される重要な化合物の吸収性を低下させ、実験が周囲ガスにアクセスすることを可能にするため、以前に製造されたマイクロ流体デバイスと比較して有利である。

【0354】

得られた本発明の第1の構成要素は、実験の必要性を満たすために、上部(6)チャネル層と底部(8)チャネル層との間のガス透過性膜(7)、並びにマイクロ流体デバイスの外側の周囲環境からマイクロ流体デバイスへのガス輸送を可能にするガス交換器(9)を含む、低吸収性2チャネルマイクロ流体デバイス(1)である。本発明の一実施形態が図1に示されており、結合された低吸収性マイクロ流体デバイス(1)を見ることができる。図2は、ガス交換器(9)がデバイスの底部にあり、底部チャネル層(8)に結合さ

れ、膜（７）に結合され、上部チャネル層（６）に結合され、ガスケット（５）に結合された、層の可能な構成の一実施形態を示す。図２に見られる構成は、１つの可能な構成にすぎない。底部層と上部層が膜によって分離されている限り、層の任意の構成が考慮される。上部チャネル層（６）及び底部チャネル層（８）、膜（７）及びガス交換器（９）は、恒久的又は一時的に取り付けられてもよい。一実施形態では、層は、プラズマ活性化結合によって取り付けられる。一実施形態では、マイクロ流体デバイス（１）は、マイクロ流体デバイス（１）の構成要素をシランでコーティングすることによって恒久的に結合される。一実施形態では、マイクロ流体デバイス（１）は、器官のマイクロバイオームの特性評価に使用される。図３は、本明細書で企図される低吸収性マイクロ流体デバイスの一実施形態の断面図を示す。図３は、この実施形態において、ガスケット（５）のポート（２）が上部チャネル層（６）のポートとどのように整列するかを示している。同様に、図３は、この実施形態において、上部チャネル層（６）の上部チャネル（３）が、膜（７）によって分離された底部チャネル層（８）の底部チャネル（４）の上に直接ある様子を示す。図３はまた、膜が膜孔（１０）を有し、ガス交換器がガス交換器孔（１１）を有する実施形態を示す。

10

【０３５５】

マイクロ流体デバイスを使用して、薬剤、食品、化学物質、化粧品、生理学的刺激薬ストレスなどが細胞系に及ぼす影響を試験することができる。肝臓細胞などの細胞内の化合物の代謝を定量化するために、生物と化合物との相互作用、材料の損失、デバイス全体の勾配、タンパク質結合、輸送体の更新／流出、膜（７）を介した受動拡散、並びに他の可能なパラメータなどのいくつかの要因を理解する必要がある。図９は、薬物開発トライアングルを示す。

20

【０３５６】

図９は、治療薬が身体とどのように相互作用するかの理解を深める重要な態様を含む、薬物開発トライアングルを示す。要約すると、薬物動態の研究は、特定の用量又は質量の化合物が、体内の様々な器官によってどのように処理されて、曝露濃度を生成するかをどのようにして理解し、定量的に予測することを目的とする。定量的薬物動態は、インビボ及びインビトロでの医薬品の移動、例えば医薬品の吸収、分布、代謝及び排泄に焦点を当てている。薬力学は、曝露濃度が所与の効果（有効性又は毒性のいずれか）をどのようにもたらすかを理解及び予測することを目的とする。定量的薬力学は、インビボ及びインビトロでの医薬品の効果及びそれらの作用機序に焦点を当てている。薬力学的試験の例としては、親化合物の用量反応及び代謝産物の用量反応が挙げられ、次いで、医薬の毒性及び有効性に焦点を当てている。マイクロ流体デバイスは、薬物動態学及び薬力学の両方を研究するために使用することができ、使用しており、使用されており、これは、マイクロ流体デバイス中の化合物の濃度を理解及び制御することの重要性を強調しており、これは、濃度が両方の分野にとって重要であり、したがって、医薬品が人体とどのように相互作用するかを理解し予測するために重要であるためである。実際、薬物開発トライアングルの基礎、又は実験中に収集されるべき最も基本的なデータは濃度であり、細胞が濃度に及ぼす影響（薬物動態）及び細胞が曝露された濃度（薬力学）の両方の観点からである。繰り返すと、一般にマイクロ流体デバイス及びインビトロシステムを使用して治療予測を可能にするために、システム内の化合物の濃度における高い信頼性、並びにその濃度がどのように変化しているか及びなぜ変化しているかの理由の理解が必要である。

30

40

【０３５７】

細胞を研究するために使用される典型的なマイクロ流体デバイスは、完全にガス透過性の材料から製造されることが多い。これらの完全にガス透過性のマイクロ流体デバイスは、ガス透過性材料がデータを破壊する小分子化合物を吸収する傾向があるため、重大な結果の変動を引き起こす可能性がある。図１１は、PDMSから製造された吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１２）における標識化合物分布プロファイルを示す。このモデルは、高吸収性化合物であるミダゾラムが $150\mu\text{l}/\text{時}$ でマイクロ流体デバイスの上部チャネルと底部チャネルの両方を通して灌流されていることを示している。図１１に見ら

50

れるように、小分子医薬品などの化合物が導入されているポート（２）に最も近い細胞のみが、予想濃度又は「投与された」濃度を見る。細胞に作用する平均濃度は、マイクロ流体デバイス（１２）の長さに沿った濃度勾配から生じる入力濃度とは異なる。したがって、流れ及び吸収の存在下で化合物の薬力学（例えば、 EC_{50} 、検体からの最大応答の半分を与える薬物の濃度）を評価することは困難である。更に複雑なことに、吸収の速度及びレベルは、曝露時間と共に変化する。したがって、空間－時間勾配が発生し、これは特性評価及び説明が非常に困難である。実際には、移動する標的（濃度は長さに沿って変化する）がヒットされようとしている一方で、標的のサイズも変化している（濃度は時間と共に変化する）。吸収は、特に、毒性及び有効性を正確に予測するシステムの能力を低下させる。図１２は、常同的シグモイド薬物応答曲線及びそれに対する吸収の影響を示す。細胞が、システムに入る全ての薬物（又は酵素など）と接触していると仮定する場合、細胞は、システムに入る用量に基づいて、得られた化合物を代謝していると仮定される。しかし、細胞が実際には低レベルの薬物とのみ接触している場合（システム成分への化合物の吸収又は損失に起因して）、薬物（又は酵素など）の有効濃度は過剰予測される。言い換えれば、科学者は、所与の効果をもたらすために、必要量よりも多い薬物（又は酵素など）が有利であり得ると考える。マイクロ流体デバイス吸収性に起因する薬物（又は酵素など）の過剰使用は、データを歪め、予測を信頼できなくするだけでなく、薬物開発及び発見のための不必要なコストを追加する。しかし、より重要なことには、 EC_{50} 又は TC_{50} 、或いは５０％の毒性効果が見られる濃度の不正確な予測は、（インビトロデータに基づく）臨床試験を含むインビボ研究のための投与濃度の決定が不十分になる可能性がある。毒物学の基本原理は、*Sola dosis facit venenum*、つまり「用量が毒を作る」というものである。言い換えれば、十分に高い濃度では、ほとんどの化合物が毒性になり、毒性を引き起こす濃度（ TC_{50} ）を過剰評価することは、毒性濃度の化合物を患者に誤って投与することをもたらす可能性がある。したがって、吸収化合物の安全性評価は、吸収によって著しく妨げられる。

10

20

【０３５８】

図４は、米国特許第８，６４７，８６１号に記載されているマイクロ流体デバイスの一実施形態を示す。吸収性マイクロ流体デバイス（１２）は、一実施形態ではＰＤＭＳで製造した。ＰＤＭＳ及び同様の製造材料は、医薬科学者がマイクロ流体デバイス内で試験することを望む非常に多くの化合物を吸収する。

30

【０３５９】

マイクロ流体デバイス材料の選択の別の重要な態様は、透明性である。透明性は、顕微鏡でマイクロ流体デバイスを撮像する能力を科学者に提供し、細胞相互作用、表現型などについて詳細な視点を得ることができる。不透明であることで、科学者は、必要に応じて周囲の光から実験を保護することができる。したがって、マイクロ流体デバイスは、実験の要件に応じて、部分的又は全体的に透明又は全体的に不透明であってもよい。

【０３６０】

上部チャンネル層（６）及び底部チャンネル層（８）は、上部チャンネル（３）及び底部チャンネル（４）などのチャンネル、又は流体移動及び実験ハウジングのための経路を含む基材を含む。チャンネル内に含まれる実験には、細胞増殖及び試験が含まれる。チャンネル層内の上部チャンネル（３）及び底部チャンネル（４）などのチャンネルは、チャンネル層自体の高さに等しくすること、又はチャンネル層全体を切断することを含むがこれらに限定されない様々な異なる高さであってもよい。上部チャンネルの各端部にはポート（２）又はパイアがあり、流体をマイクロ流体デバイスに導入することができる。同様に、マイクロ流体デバイスインフラストラクチャは、これらのポート（２）を介してマイクロ流体デバイスと流体連通するようにすることができる。上部チャンネル層（６）及び底部チャンネル層（８）は、同じ又は異なる材料から製造することができる。いくつかの実施形態では、これらの材料は、化合物吸収性を制限するためにガス不透過性である。低吸収性であることも示されているガス不透過性材料としては、環状オレフィンコポリマー（ＣＣＰ）、環状オレフィンポリマー（ＣＯＰ）、ポリカルボナート、ポリエチレン（ＰＥ）、ポリエチレンテレフタラー

40

50

ト、ポリスチレン（PS）、（PET）ガラスなどが挙げられる。上部チャンネル層（6）及び底部チャンネル層（8）はまた、部分的にガス不透過性の材料から製造され、ガス不透過性物質でコーティングされ、不透過性に達するように表面が改変されていることなどによって、ガス不透過性、及びデフォルトでの低吸収を達成することができる。

【0361】

膜（7）は、上部チャンネル（3）と底部チャンネル（4）との間に拡散障壁を提供する。膜（7）はガス不透過性であってもよいが、多くの場合、膜（7）を通る酸素拡散を可能にすることが有益である。したがって、いくつかの実施形態では、ガス透過性膜（7）を有することが有益である。例えば、上部チャンネル（3）及び底部チャンネル（4）の細胞型は、ガスを交換することから利益を得ることができる。この拡散性の理由から、ガス透過性は、膜層（7）における低吸収性よりも優先されてもよい。いくつかの実施形態では、膜（7）は、上部チャンネル層（6）及び底部チャンネル層（8）並びにガス交換器（9）などのマイクロ流体デバイス（1）の他の構成要素の体積と比較してより小さい体積であってもよい。膜（7）が他の成分よりも小さい体積を有する場合、実験化合物の多くを吸収せず、吸収性の影響を最小限に抑える。他の実施形態では、膜（7）は、上部チャンネル（3）及び底部チャンネル（4）環境と棲息生物との間の物理的接触を制限するために非多孔質である。いくつかの実施形態では、膜（7）は、上部チャンネル（3）と底部チャンネル（4）環境と棲息生物との間の接触を可能にするために、膜孔（10）を含む多孔質であるとみなすことができる。一実施形態では、膜層（7）は、層全体にわたって均一に多孔質であるなど、均質である。別の実施形態では、膜層（7）は、上部チャンネル層（6）及び底部チャンネル層（8）上の上部チャンネル（3）及び底部チャンネル（4）と重なる領域においてのみ多孔質であるなど、不均一である。いくつかの実施形態では、膜（7）は、伸張することを可能にするように可撓性である。この実施形態では、伸張する能力は、インビボで見られるように、細胞上の機械的歪みを複製することができるので、膜（7）に付着した細胞を含む実験に有益である。いくつかの実施形態では、この伸張は、吸収性マイクロ流体デバイスの図4に見られるものなどのマイクロ流体デバイスにおいて、任意の作業チャンネル（15）で真空を使用することによって達成される。一実施形態では、作業チャンネル（32）は、それ自体の入口ポート（14）を有する。膜（7）の機械的作動及び伸張を誘発するために作業チャンネル（32）を使用すると、膜（7）全体に歪み差が生じ、マイクロ流体デバイス（12）の中心の歪みはポート（2）付近の歪みよりも著しく大きい。図35A及び図35Bは、作業チャンネルへの真空適用を介して伸張される、可撓性の吸収性マイクロ流体デバイスにおける、膜（7）の中心とポート（2）に近い膜（7）の部分との間の伸張の差を示す。図35Aは、膜を伸張する前であっても、灌流マニホールドアセンブリとの係合によるチャンネルの変形を示している。図35Bは、伸張中のこの同じデバイスを示している。このように作動する吸収性マイクロ流体デバイスでは、チャンネル長に沿って、特に限定されないが、作業チャンネルの縁部に向かって作業チャンネルから遠く離れた領域に沿って、不均一な伸張プロファイルがあることを見出すことができる。

【0362】

図36は、吸収性マイクロ流体デバイスの長さ にわたる伸張の差を示す。伸張のこの実施形態では、培養領域の約20%のみが、予備研究に基づいて適用された伸張下にある。

いくつかの実施形態では、伸張は、膜（7）を低圧チャンネルの方向に押すように、上部チャンネル（3）及び底部チャンネル（4）との間に圧力差を有することによって達成される。図37A及び図37Bは、圧力差が加えられる前後の膜（7）を示し、この場合、圧力は底部チャンネルに加えられ、チャンネルを上部チャンネル内に曲げる。伸張が望ましくない場合、入口ポート（2）は加圧されてもよく、出口ポート（2）は加圧されなくてもよい。伸張が望まれる場合、底部チャンネル（4）内の圧力が上部チャンネル（3）の圧力よりも大きくなるように、底部ポート（2）を加圧することができる。図38は、異なる圧力差で共焦点顕微鏡で画像化された、蛍光ビーズが埋め込まれた厚さ50µmのPDMS膜（7）の側面図を示す。膜は、マイクロ流体デバイスの上側チャンバ内に曲がる。蛍光膜は、PDMSの層を蛍光ビーズでスピンコーティングすることによって製造した。図38では

、圧力差が大きいほど、膜（７）の伸張のレベルが大きくなることが分かる。ビーズの共焦点画像化は、様々なレベルの印加圧力に対する散乱プロットを示した。曲線をプロットに当てはめ、理論値と比較した。結果を図３９に見ることができ、これは、３ｋＰａの圧力が、５０μｍのＰＤＭＳ膜厚に対して約４％の歪みに対応することを示している。厚さ２０μｍのＰＤＭＳ膜（７）について実験を繰り返した。図４０は、共焦点顕微鏡で画像化された厚さ２０μｍのＰＤＭＳ膜（７）の作動を示す。図４１は、試験した圧力レジームに対して予想される線形曲線フィットを有する、厚さ２０μｍのＰＤＭＳ膜にわたって測定された歪みに対する印加圧力の様々なレベルの散布図を示す。図４１は、加えられた圧力の３ｋＰａが、２０μｍの厚さを有する膜の約１１％の歪みに対応することを示す。図４２は、支配的な物理学に基づいて、様々な数学的モデルを使用して歪みパーセント対印加圧力を予測し、異なる伸張レジームのプロット対実際のデータを予測する、印加された膜貫通圧力差からの歪みを示す。モデル及びデータはよく一致しており、膜で経験される機構及び力の完全な理解を示している。図４３は、最も生理学的に関連する圧力範囲（すなわち、インビボで見られる圧力）である圧力範囲である、図４２の拡大版である「機械的優位領域」における適用された膜貫通圧力差からの歪みを示す。これらのグラフをまとめると、加えられた圧力に対して膜内で達成される歪みに関してリターンの減少が示され、圧力が直線的に増加するにつれて、追加の伸張量は減少し始める。低圧レジームでは、小さな圧力でも歪みに大きな変化をもたらす。モデルから抽出された予想データの範囲及び実験データは、図４２及び図４３の両方によく示されているように適合する。作動のこの実施形態は、前述の培養モジュールに適合する。

10

20

【０３６３】

圧力差によって膜（７）を作動させることは、作業チャンネル（３２）内の真空を介して膜を機械的に作動させることよりもいくつかの利点を有する。第１に、作業チャンネルを含まないマイクロ流体デバイスは、製造がより容易である。マイクロ流体デバイスにおける作動のこの実施形態はまた、細胞層に圧力を加えない他の方法よりも生理学的に関連し得るので有利であってもよい。実際、この伸張機構は、圧力差を含む細胞及び組織の機械的伸張のための生理学的機構をよりよく再現する。例えば、動脈は、心臓が拍動し、血液を心室内から動脈管腔に放出するにつれて拡張する傾向がある。この拡張（及び血管系壁を構成する細胞に対する結果として生じる歪み）は、バルーンが空気で加圧されたときに拡張するのと同様に、拍動する心臓によって生成される圧力のために生じる。膜を屈曲させ、これらのインビボ関連株を作製するのに必要な圧力は、一実施形態では、肺の毛細血管床に見られるのと同様の圧力である。より簡単に言えば、一実施形態では、細胞層が曝露される圧力と伸張の両方が、同時に生理学的に関連するように調整される。更に、この実施形態では、膜がチャンネル内に物理的に変位し、直線変位とは対照的に円弧の形状をとる（すなわち、膜は伸張するにつれて上下に移動する）ので、この伸張の形状は、血管及び肺胞囊に見られる拡張部の形状をよりよくエミュレートする。図４４は、血液が大動脈から小さな毛細血管に流れ、次いでより大きな静脈血管に流れて血液を心臓に戻す際に、内皮－上皮障壁で経験される生理学的に関連する圧力差を示す。多くのＯｒｇａｎ－Ｃｈｉｐは、この上皮－内皮界面をモデル化又は模倣しようとするので、インビボで経験される圧力差を捕捉することは、機械的微小環境を更に再現するために非常に有利であってもよい。様々な供給源によれば、肺血管系内の細動脈毛細血管圧は約３．３ｋＰａであり、間質圧は－０．８ｋＰａに近い。肺胞がモデル化されるＯｒｇａｎ－Ｃｈｉｐの特定の実施形態では、上部チャンネルは肺胞間質を表し、底部チャンネルは肺毛細血管床を表す。底部チャンネルに３ｋＰａの加えられた圧力では、インビボで見られる圧力差が正確に加えられるだけでなく、生じる膜の伸張（約１１％）もまた、呼吸中の肺の拡張に起因して肺胞で経験されるであろう機械的歪みのタイプを正確に再現する。

30

40

【０３６４】

マイクロ流体デバイスへのガス輸送を増加させるためのいくつかの方法がある。これらの方法は、マイクロ流体デバイスへの流体／培地流量を増加させること、マイクロ流体デバイスを通して流れる培地の溶存ガス含有量を増加させること、及びマイクロ流体デバイ

50

スのバルク材料を介してマイクロ流体デバイスの内部にガスを送達することを含む。

【0365】

一実施形態では、マイクロ流体デバイスへのガス輸送の増加は、酸素などの重要なガスを含む培地のより高流量をマイクロ流体デバイスに使用することによって達成することができる。この実施形態では、培地の流量が増加するにつれて、設定された時間量でより多くの培地がマイクロ流体デバイスに導入され、したがってより多くの所望のガスがマイクロ流体デバイスに導入される。ガス輸送を増加させるためのマイクロ流体デバイスにおける高流量の使用は、そうでなければガスがマイクロ流体デバイス内に拡散しない可能性があるため、ガス不透過性マイクロ流体デバイス（13）において有用である。しかし、マイクロ流体デバイスへの培地の流量を増加させることは、インピボでの流体が容器に応じて特定の流量及び速度で流れるため、生理学的に関連しない可能性がある。通常、細胞などの検体を、インピボで見られるのと同様のインピトロ条件に曝露することが望ましい。マイクロ流体デバイスへの培地の流量を増加させると、例えば、細胞などの検体が過度のレベルの剪断に曝露される可能性がある。マイクロ流体Organ-Chipにおいて、酸素輸送によって特定の流量に制限されることが非常に不利であり、なぜなら、これは、再現しようとする多くの条件のうちの1つにすぎず、流速によって少なくとも部分的に制御され得るからである。

10

【0366】

別の実施形態では、マイクロ流体デバイスを通して流れる培地の溶解ガス含有量をマイクロ流体デバイスに入る前に増加させることができる。一実施形態では、培地を通してガスを吹き込むことによって、培地の溶解ガス含有量をマイクロ流体デバイスに入る前に増加させることができる。別の実施形態では、培地の溶解ガス含有量は、所望のガスのブラケット下で、大気圧よりも高い圧力まで、又は周囲大気環境で通常見られるよりも高い特定のガスの濃度で培地を加圧することによって、マイクロ流体デバイスに入る前に増加させることができる。しかし、培地の溶解ガス含有量を増加させることは、インピボの流体が特定の濃度のガスを含むるので、生理学的に関連しない可能性がある。実際、文献では、過剰な酸素濃度への曝露は、活性酸素種の形成に起因して、組織に著しい損傷を引き起こし得ることが実証されている。通常、細胞などの検体を、インピボで見られるのと同様のインピトロ条件に曝露することが望ましい。前述の実施形態の両方とも、より高流量で培地を流すこと及び培地の溶存ガス含有量を増加させることはまた、重大な欠点がある。培地がマイクロ流体デバイスを通して流れるとき、デバイスの開始時の検体は、デバイスを通して流れるガスの全てではないにしても少なくとも一部を消費するので、チャンネルの開始時の検体は、出口における検体よりも高いレベルの所望のガスを経験する。次いで、チャンネルの開始部の検体は、高レベルの当該ガスを取り込み、検体のためのより低いレベルの所望のガスをチャンネルの更に下流に残すことができる。

20

30

【0367】

マイクロ流体デバイスにおける低レベルの重要なガスを克服するために、並びに培地の高流量及びガス濃度の使用を回避するために、酸素などの重要なガスがマイクロ流体デバイスを通して均一に拡散することを依然として可能にしながら、小分子化合物吸収を促進しないような方法で、ガス交換器（9）をマイクロ流体デバイスに組み込むことができる。一実施形態では、ガス交換器（9）は、底部チャンネル層に対して床を形成するように、マイクロ流体デバイス（1）の底部に取り付けられる。この実施形態では、底部チャンネル（4）の天井は細胞培養膜（7）であり、底部チャンネル（4）の基部はガス交換器（9）である。一実施形態では、ガス交換器（9）は、PDMSとポリエチレンテレフタレート（PET）との2層の組合せである。PDMSはガス透過性及び吸収性である。PETはガス不透過性及び非吸収性である。一実施形態では、PETは、ガス交換器孔（11）を含むなど、多孔質であってもよい。一実施形態では、多孔度はトラックエッチングによって形成される。一実施形態では、PETの多孔度は0.1%～50%である。この実施形態では、トラックエッチングされたPET又はPCは、ガス交換器（9）に機械的安定性及び低吸収性を与える透明なスキャフォールドとして機能し、ガス透過性PDMSの薄層

40

50

はPET細孔を封止する。

【0368】

別の実施形態では、剛性ポリマーから製造された、逆にガス交換膜として知られるトラックエッチングされたスキャフォールドは、弾性ポリマーで「シルクスクリーニング」することができる。PETなどの剛性ポリマーから製造されたトラックエッチングされたスキャフォールド又はガス交換器膜は、弾性ポリマーがトラックの細孔に浸透又は含浸するように、PDMSなどの弾性ポリマーでコーティングされてもよい。次いで、トラックエッチングされたスキャフォールド又はガス交換膜を「スキージ」又は拭き取り、過剰の弾性ポリマーを除去することができる。次いで、弾性ポリマーを細孔内で硬化させて、ガス透過性細孔を有する実質的に剛性のガス交換器を作製することができる。ここでの利点は、弾性ポリマーの体積が最小限に抑えられ、したがって吸収が最小限に抑えられることである。ガス交換器は、ほとんど剛性ポリマーの複合材料である。剛性材料は、少量の弾性ポリマーを保持するためのスキャフォールドを含む。

10

【0369】

更に、ガス交換器は、結合を強化するために、特定の材料のフィルムでコーティングされてもよく、又は特定の材料のフィルムを有してもよい。例えば、多孔質ガス不透過性基材を含むガス交換器は、ガス透過性材料で充填された細孔を有するだけでなく、その上にガス透過性材料の層又はコーティング又はフィルムを有してもよい。

【0370】

「同類は同類を溶かす」は、いくつかの溶媒が溶質とどのように相互作用するかを記憶するために化学者によって使用される一般的な表現である。これは、「極性」及び「無極性」溶媒及び溶質を指す。例えば、水は極性であり、油は非極性である。同類は同類ほどよく溶解しない、これは水が油を溶解しないことを意味する。例えば、水は極性であり、塩(NaCl)はイオン性である(これは極めて極性であると考えられる)。同類は同類を溶かし、これは極性が極性を溶解することを意味するので、水は塩を溶解する。同じように、「同類は同類に結合する」である。材料は、化学処理、プラズマ処理などによって、より容易に結合することが見出されている。例えば、PDMSは、他のポリマーと比較してPDMSに容易に結合する。したがって、一実施形態では、ガス交換器は、他の構造により容易に結合することを可能にするコーティング、フィルム、又は層を有することができる。図110は、ガス交換器の複数の実施形態を示し、その一部は当該コーティングを示す。図示の実施形態では、基材は、別の材料で充填された領域を含む。領域は、細孔であってもよい。細孔は、全体的に充填されていてもよく、又は部分的に充填されていてもよい。更に、細孔は、コーティングなどで被覆されているだけでなく、充填されていてもよい。細孔は、片面又は両面がコーティング又は被覆されていてもよい。

20

30

【0371】

PDMSと多孔質PETの組合せは、吸収を最小限に抑えながら、ガス交換特性を提供する。この実施形態では、小分子化合物の一部はPETの細孔を介してPDMSに吸収され得るが、ガス交換器(9)が完全に吸収性の材料から製造されていることと比較して、この吸収性は多くの場合無視できるとみなすことができる。更に、ガス交換器(9)のこの実施形態では、多孔質トラックエッチングされたPET及びPDMSガス交換器(9)は、完全にガス不透過性のマイクロ流体デバイス(13)と比較してガス輸送を増加させることができるだけでなく、流体流からガス輸送を切り離すこともできる。別の実施形態では、テフロンAF2400は、ガス交換器(9)材料として使用することができる。テフロンAF2400は、透明でガス透過性であり、低吸収から非吸収であるため、優れた材料である。一実施形態では、ガス交換器(9)は、ガス透過性及び／又はガス不透過性材料から製造され、次いでテフロンAF2400でコーティングされてもよい。別の実施形態では、三井化学の商標名である、一般にTPXと呼ばれるポリメチルペンテン(PMP)を使用することができる。TPXは、透明でガス透過性で低吸収性であるため、別の例外的な材料である。ポリメチルペンテン(PMP)は、良好な光学特性、低コスト、射出成形可能、及び多くの溶媒に対する抵抗性など、いくつかの他の有利な特性を有する。

40

50

アッセイは過酷な溶媒を使用することが多いので、マイクロ流体デバイスがアッセイ中に使用される場合、溶媒に対する抵抗性が重要である可能性がある。溶媒に対する抵抗性は、マイクロ流体デバイスをより広い範囲のアッセイで使用することを可能にすることができる。図34は、テフロンAF2400、TPX、及び多孔質PETを含むいくつかの異なる種類のガス交換器(9)を示す。

【0372】

30 μL /時の流量での酸素に対する水の運搬能力に基づいて計算される、培地流のみを介したマイクロ流体デバイスへの酸素の理論的送達は、5.8 nmol/時である。肝臓細胞を播種したマイクロ流体デバイスにスケーリングされた文献値を介して計算された酸素の理論的最大肝細胞取り込み速度は、88 nmol/時である。これらの2つの値の間には83.2 nmol/時の不一致があり、これは、流体流が肝細胞の維持、代謝、又は他の機能を支援するのに十分な酸素を提供しないことを意味する。肝細胞が十分な酸素を受けない場合、肝細胞はアポトーシス又は壊死を起こし、死滅する。

【0373】

PDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイス(12)における理論的酸素流量は574 nmol/時であり、225 nmol/時 $\pm$ 9.43 nmol/時であると測定され、これは、高度に酸素を消費する肝細胞の細胞型にも十分な酸素を供給するのに十分以上である。主にCOPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)におけるバルク材料を通る理論的酸素流量は0 nmol/時であり、酸素輸送の測定によって0 nmol/時 $\pm$ 0.63 nmol/時であることが確認された。ガス不透過性材料及びガス透過性材料の戦略的組合せから製造され、11.3%多孔質PETから作製されたガス交換器を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(1)における理論的酸素流量は65.2 nmol/時であり、21.8 nmol/時 $\pm$ 6.74 nmol/時であると測定され、これは肝細胞の酸素取り込み速度を十分に上回る。ガス不透過性材料及びガス透過性材料との戦略的組合せから製造され、40%多孔質PETから作製されたガス交換器を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(1)における理論的酸素流量は231 nmol/時である。ガス不透過性材料及びガス透過性材料の戦略的組合せから製造され、テフロンAF2400から作製されたガス交換器を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(1)における測定された酸素流量は、48 nmol/時 $\pm$ 1.80 nmol/時であった。ガス不透過性材料及びガス透過性材料との戦略的組合せから製造され、TPXから作製されたガス交換器を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(1)における理論的酸素流量は241 nmol/時であり、265 nmol/時 $\pm$ 40.9 nmol/時であると測定された。これらの送達速度は全て、細胞酸素取り込み速度によって定義されるように、必要な酸素送達速度を十分に超える。これは、バルク材料を介した酸素送達が、細胞機能に必要なとされる十分な量の酸素を供給するだけでなく、デバイスの全長に沿って一貫した酸素飽和環境を維持することを意味する。

【0374】

ガス交換器(9)は、他の実施形態では、マイクロ流体デバイス(1)の他の部分に組み込まれてもよい。一実施形態では、ガス交換器(9)は、マイクロ流体デバイス(1)の外壁の周りに構成される。別の実施形態では、ガス交換器(9)は、上記の実施形態で説明したように底部チャネル層(8)の代わりに上部チャネル層(6)と接合する。更に別の実施形態では、マイクロ流体デバイス(1)内の様々な位置に構成された複数のガス交換器(9)がある。ガス交換器(9)は、マイクロ流体デバイス(1)をよりカスタマイズ可能にするために、科学者が好みでガス透過性からガス不透過性に切り替えることができるように構築することができる。

【0375】

実際、多孔質PETスキャフォールドが利用される実施形態では、スキャフォールドの多孔度が大部分、バルク材料を通る酸素送達速度を規定する。したがって、特定の多孔度を選択することによって、酸素送達速度を二元的な様式でオン及びオフにすることができるだけでなく、用途の仕様に応じて様々な送達速度に「調整」することもできる。同様に

、特定の実施形態におけるPET膜の位置は、特定のレベルの独立性で各チャンネル内のガス曝露を選択的に調整するように選択することができる。例えば、ヒト肝臓のゾーン1は、インビボで高レベルの酸素に曝露される。この場合、ユーザは、高い多孔度のPET膜を選択するように助言され得る。逆に、肝臓のゾーン3は血中酸素レベルが低いことが知られている。本明細書では、酸素送達をインビボで見られる低いレベルに抑制するために、多孔度が非常に低い膜を選択することが推奨される。同様に、癌性腫瘍は低酸素環境を生成する傾向があり、上部チャンネル構成要素の上部及び底部チャンネル構成要素の底部に低多孔性PET膜を接着することが推奨され得る。逆に、腸、特に結腸に見られる低酸素環境を模倣するために、血管系を表す底部チャンネルでは高い酸素濃度が望ましいかもしれないが、腸内腔を表す上部チャンネルでは低い酸素環境が有利である。これを達成するために、酸素を血管系に送達するために底部チャンネルの底部に接着されるように適度な多孔性PET膜を選択し、バルク材料を通る酸素輸送を最小限に抑え、所望の低酸素環境を生成するために上部チャンネルの上部に選択された非透過性膜を選択することができる。

10

【0376】

いくつかの実施形態では、マイクロ流体デバイスは、上部チャンネル(3)を出るポート(2)と相互作用する4つのポート(2)を有するガasket層(5)を上部に有する。ガasket(5)は、マイクロ流体デバイス(1)と、関連するインフラストラクチャとの間の緊密な流体接続を確実にするために使用することができる。一実施形態では、ガasket(5)は圧縮性材料から作製される。別の実施形態では、ガasket(5)は接着材料から作製される。ガasket(5)は、灌流マニホールドなどの既存のマイクロ流体デバイス付属品に適合するために、マイクロ流体デバイス(1)をその吸収性先行品(12)と同じサイズに保つために使用することができる。ガasket(5)は、圧縮嵌めにぴったり合うようにマイクロ流体デバイス(1)の高さを所望のレベルまで上昇させるために、複数の高さで具現化することができる。ガasket(5)は、そのポート(2)の壁に小分子化合物を吸収しないように、ガス不透過性であってもよい。ガasket(5)は、部分的又は全体的なガス不透過性材料から製造されること、ガス不透過性物質でコーティングされること、不透過性及び低吸光度に達するようにその表面が改質されること(プラズマ処理など)などによって、ガス不透過性、したがって低吸光度を達成することができる。一実施形態では、ガasket(5)はマイクロ流体デバイス(1)の表面全体を覆う。別の実施形態では、ガasket(5)は、マイクロ流体デバイス(1)の表面の一部のみを覆う。

20

30

【0377】

一実施形態では、ガス交換器(9)を特徴とする低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(1)を使用して、マイクロ流体デバイス(1)内にガス勾配を導入し維持することができる。この実施形態では、特定の濃度のガスをガス交換器(9)に導入することができる。次いで、ガスは、内皮細胞層及び上皮細胞層などの細胞層(33)によって枯渇され、低酸素上部チャンネル(3)又は管腔チャンネルー又はマイクロ流体デバイスの全長に沿って一貫している、マイクロ流体デバイスの底部から上部へのガスの勾配をもたらす。例示的な一実施形態では、ガスは酸素である。別の実施形態では、ガスは二酸化炭素である。別の実施形態では、ガスは窒素である。ガス勾配は、様々な透過性の細胞層(33)を導入することによって変更することができる。マイクロ流体デバイス(1)を通るガスの垂直勾配は、マイクロ流体デバイス(1)の全長に沿ってガスの長手方向の濃度を維持する。ガス交換器(9)を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(1)に酸素勾配が導入される実施形態では、マイクロ流体デバイス(1)の全長に沿った長手方向の酸素濃度が維持される。図52は、酸素に富む周囲環境に対する拡散障壁を生成しながら、当該ガス交換器(9)を使用して血管チャンネルのみからマイクロ流体デバイス(1)にガスを選択的に導入する、ガス交換器(9)を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(1)に酸素勾配を導入する方法を示す。次いで、器官特異的細胞を含むチャンネルは、クロストリジウム・シンビオサム(*clostridium symbiosum*)などの細菌(36)が増殖することができるように、より低い、更には嫌気性の環境を有して

40

50

もよい。一実施形態では、選択されたガスを隣接する作業チャンネル（３２）を通して流すことによって、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）にガス勾配が導入される。一実施形態では、化学反応を使用してガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）にガス勾配が導入される。

【０３７８】

図５２に示すガス交換器の利点は、特殊なガス制御インキュベータを必要とせずに、マイクロ流体デバイス内のガス濃縮を通常の細胞培養インキュベータ内で行うことができることである。図１１７～図１２５に示すように、ガス透過性マイクロ流体デバイスのガス濃度を制御するためにガス制御インキュベータを使用することができるが、より多くの研究室は、ガス制御なしで、通常の細胞培養インキュベータにのみアクセスできる。したがって、本明細書に提示されるガス交換器は、大気以外のガス環境を必要とする細胞を培養する者にとって非常に有効である。

10

【０３７９】

一実施形態では、センサを使用して、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）内のガス勾配を測定することができる。例示的な酸素勾配の実施形態では、酸素センサを使用して、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）内の酸素勾配を測定することができる。一実施形態では、センサは電気センサである。一実施形態では、センサは光学センサである。一実施形態では、センサはガス感受性色素を含む。一実施形態では、ガス感受性色素は酸素感受性色素である。一実施形態では、センサは、マイクロ流体デバイス（１）の外部にある。一実施形態では、センサは、マイクロ流体デバイス（１）に埋め込まれる。一実施形態では、センサは、上部チャンネル（３）内にある。一実施形態では、センサは、底部チャンネル（４）内にある。一実施形態では、センサは、上部チャンネル（３）と底部チャンネル（４）の両方にある。

20

【０３８０】

本発明の別の実施形態は、その材料に吸収される小分子化合物の量を最小限に抑えるアップグレードされた灌流マニホールドアセンブリ（１４）である。灌流マニホールドアセンブリ（１４）は、図７に見ることができる。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリ（１４）は、*i i i*）１つ又は複数の流体リザーバ（１９）の上部として機能するように構成されたカバー又は蓋アセンブリ（２５）、*i i i*）当該流体リザーバ（１９）の下のカセット層（２０）、*i v*）当該流体リザーバ（１９）の下にあり、当該流体リザーバ（１９）と流体連通する流体バックプレーン（２２）、*v*）当該流体バックプレーン（２２）の上のキャッピング層（２１）、及び *v i*）マイクロ流体デバイス（１）又はマイクロ流体デバイス（１）を含むキャリアに係合するための突出部材又はスカート（２３）を含む。

30

【０３８１】

本発明の別の実施形態は、その材料に吸収される小分子化合物の量を最小限に抑えるアップグレードされた灌流マニホールドアセンブリである。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリは、*i i i*）１つ又は複数の流体リザーバの上部として機能するように構成されたカバー又は蓋、*i i i*）当該流体リザーバの下のカセット層、*i v*）当該流体リザーバの下にあり、当該流体リザーバと流体連通する流体バックプレーン、*v*）当該流体バックプレーンの上のキャッピング層、及び *v i*）マイクロ流体デバイス又はマイクロ流体デバイスをを含むキャリアに係合するための突出部材又はスカートを含む。

40

【０３８２】

カバー又は蓋アセンブリ（２５）は、リザーバを漏出及び汚染の両方から保護することを補助することができる。一実施形態では、蓋アセンブリ（２５）は、蓋（１５）、フィルタ、蓋カセット（１８）を含む。リザーバ（１９）内の流体の無菌性を補助するために、フィルタを蓋アセンブリ（２５）内に構成することができる。一実施形態では、フィルタは、フラットフィルタ（１６）である。これらの薄いフィルタ（１６）は、平坦な基材材料から切断することができる。一実施形態では、フィルタは、厚いフィルタ（１７）である。これらの厚いフィルタ（１７）は、厚い基材材料から切断することができる。蓋

50

アセンブリ（２５）が蓋ガasket（１８）を含む実施形態では、蓋ガasketは、様々な実施形態をとることができる。一実施形態では、蓋ガasketは、圧縮可能である。一実施形態では、蓋ガasketは、接着性である。蓋ガasketは、リザーバ（１９）を外部環境から最適に封止するために、厚さが異なってもよい。或いは、他の実施形態では、蓋ガasket（１８）は、別個のフィルタを有する代わりに、フィルタを含む。一実施形態では、蓋ガasket（１８）は、多孔性である。別の実施形態では、蓋ガasket（１８）は、非多孔質である。一実施形態では、蓋ガasket（１８）は、リザーバ（１９）が最初に押圧された後、リザーバ（１９）の形状に恒久的に適合する。別の実施形態では、蓋ガasket（１８）は、蓋ガasket（１８）がリザーバに押圧されるたびに、リザーバの形状に一時的に適合する。更に別の実施形態では、蓋ガasket（１８）は、リザーバ（１９）の形状に適合しない。カバー又は蓋アセンブリ（２５）を取り外すことができ、灌流マニホールドアセンブリ（１４）を依然として使用することができる。一実施形態では、蓋アセンブリ（２５）は、半径方向シールを使用してリザーバ上に保持される。シールを形成するために、加えられる圧力は必ずしも必要ではない。別の実施形態では、蓋アセンブリ（２５）は、１つ又は複数のクリップ、ねじ又は他の保持機構を使用してリザーバ上に保持される。

10

【０３８３】

流体バックプレーン（２２）を使用して、リザーバからマイクロ流体デバイスなどのマイクロ流体デバイスに流体を送ることができる。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリ（１４）は、流体バックプレーンの底部に配置された灌流マニホールドアセンブリポート（２８）を更に含む。一実施形態では、流体バックプレーン（２２）は、１つ又は複数の流体抵抗器（２７）を含む。一実施形態では、１つ又は複数の流体抵抗器（２７）は、細長い蛇行チャネルからなる。いかなる特定の機構の理論にも束縛されるものではないが、これらの抵抗器（２７）は、リザーバ（１９）から来る流体の流れを安定させる役割を果たし、その結果、安定した流れをマイクロ流体デバイス（１）に送達することができ、及び／又はリザーバ（１９）圧力を灌流流量に変換するための手段を提供する役割を果たすと考えられる。

20

【０３８４】

本発明の以前の解釈では、キャッピング及びガasket化の両方を担う単一のキャッピング及びガasket層（２６）があった。以前の解釈は図８に見ることができ、本明細書に提示される本発明はそれを改善する。本明細書に提示される本発明は、２つの別個の層を提案する。１つはガasket（２０）用であり、もう１つは流体バックプレーンをキャッピング（２１）するためである。一実施形態では、流体リザーバ（１９）及び流体バックプレーン（２２）の両方は、硬質プラスチックから製造され、したがって、流体接続部位での漏れから保護するために、それらの間に圧縮性ガasket（２０）を必要としてもよい。２つの別個の層を有することは、封止及び圧縮を分離することができるので有利であり、封止は圧縮を必要とせず、吸収性材料を必要としない可能性が高い。逆に、ガasket、特に透明ガasketとして使用するのに必要な特性を有する材料は、吸収性の問題を有することが多い。一実施形態では、キャッピング層（２１）及びガasket層（２０）の両方が透明である。流体バックプレーン（２２）を必要に応じて顕微鏡上で画像化することができるように、透明なキャッピング（２１）及びガasket（２０）層を有することが有利である可能性がある。本発明の一実施形態では、ガasket層（２０）はＳＥＢＳなどの圧縮性材料で構成され、キャッピング層（２１）はＣＯＰなどの非圧縮性材料で構成される。別の実施形態では、圧縮性材料で構成されたガasket層（２０）は、ガス不透過性にするためにパリレンなどでコーティングされてもよい。キャッピング層は、パリレン中で部分的に又は完全にコーティングすることができる。例示的な実施形態では、ＣＯＰから製造された部分的にコーティングされたキャッピング層が、ＳＥＢＳから製造されたガasket層と共に使用される。部分的にパリレンでコーティングされたＣＯＰキャッピング層とＳＥＢＳガasket層との組合せは、単一の完全なパリレン被覆ＣＯＰ層よりも有利である。パリレンは結合することが困難であるが、ＣＯＰは、ＣＯＰから作

30

40

50

製された他の部品を含む他の材料に良好に結合する。2つの層を使用することにより、流体バックプレーンをパリレン被覆COPキャッピング層に材料結合によって密封し、キャッピング層をSEBSガスケット層でリザーバに封止することができる。更に、2つの層を使用する場合、吸収を首尾よく防止するために、SEBSの小片のみをパリレンでコーティングする必要がある。単層が使用される場合、任意の流体接触面がパリレンでコーティングされる必要があってもよく、これは、ポート、封止される構成要素の面（リザーバなど）、及び灌流マニホールドアセンブリ内の流体ルーティングチャンネルの全長がコーティングされる必要があることを意味する。COPキャッピング層の多くをコーティングすることは困難である。パリレンがコーティングされている場合、部品はアキレスの踵のようにどこかに保持される必要がある。図69は、チャンネル構成要素がCOP（吸収しないことが知られている）から製造され、ガスケット材料がパリレンコーティング（吸収しないことが知られているコーティング）を有するPDMSから製造される低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスを示す。別の実施形態では、マイクロ流体デバイスを灌流マニホールドアセンブリと連結するための灌流マニホールドアセンブリマイクロ流体デバイスキャリアが好ましい。マイクロ流体デバイスのこの実施形態は、デバイス／灌流マニホールドアセンブリの1つの好ましい実施形態における面封止ガスケット化方法と適合する。

10

【0385】

一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリ（14）は、突出部材又はスカート（23）を含む。一実施形態では、突出部材又はスカート（23）は、マイクロ流体デバイス（1）と係合する。一実施形態では、マイクロ流体デバイス（1）は、上部チャンネル（3）、底部チャンネル（4）、上部チャンネル（3）及び底部チャンネル（4）の少なくとも一部を分離する膜（7）を含む。一実施形態では、マイクロ流体デバイス（1）は、膜（7）上及び／又はチャンネル内若しくはチャンネル上に細胞を含む。突出部材又はスカート（23）は、流体バックプレーン（22）が接続マイクロ流体デバイス（1）と容易に位置合わせできるように設計することができる。一実施形態では、突出部材又はスカート（23）は、培養系と相互作用するように設計することができる。

20

【0386】

灌流マニホールドアセンブリ（14）は、いくつかの方法によって一緒に取り付けることができる。一実施形態では、ねじ（24）を使用して、灌流マニホールドアセンブリ（14）を固定することができる。別の実施形態では、クリップを使用して、灌流マニホールドアセンブリ（14）を固定する。別の実施形態では、接着剤を使用して、灌流マニホールドアセンブリ（14）を固定する。別の実施形態では、表面改質を使用して、灌流マニホールドアセンブリ（14）を固定する。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリ（14）は、互いに恒久的に結合される。一実施形態では、灌流マニホールドアセンブリ（14）は、互いに一時的に結合される。

30

【0387】

実験

1. 材料に対する吸収実験

特定の小分子のポリマーへの吸収を確認する方法を開発した。この方法の出力は、試験材料への特定の化合物の吸収を完全に定義する基本パラメータであり、特に、拡散率及び分配係数が確認される。試験装置を図13A及び図13Bに示す。この吸収を確認するためのステップは以下の通りである。

40

【0388】

1. 小分子を水相（培地）に溶解し、溶液（30）を試験材料（31）と共に、バイアル（29）などでインキュベートする。インキュベーションは、拡散が吸収を制限せず、材料への輸送が材料から水相への化合物の輸送と平衡になるように十分に長くなければならない。

2. いくつかの時点でバイアルから培地をサンプリングする。

3. サンプリングされた培地から、質量分析計、プレートリーダーなどを使用して、水相（30）に残存する小分子の濃度を測定する。

50

4. 吸収及び拡散パラメータを定量化するために測定データを曲線当てはめする。

【0389】

各実験は、いくつかの対照及び試験条件を含む。複数の対照及び試験条件を使用することにより、バイアル及びウェルプレートへの吸収を特性評価すること、並びに試験材料への吸収対吸着を特性評価すること、並びに材料への吸収の時間依存性をもたらすことが可能になる。対照は、バイアル（29）のガラスへの吸着によって引き起こされる化合物の損失を定量化するために、水相（30）に溶解した小分子のみで充填されたバイアル（29）を含む。実験の目的は、化合物の分配、又は平衡時の化合物損失（動態学）を直接定量化すること、及び化合物の拡散又は時間依存性化合物損失（動力学）を直接定量化することである。開発された方法は、薬物特異的進行及び化合物損失の程度を定量化すること

10

【0390】

単一の時点の実験は、動力学ではなく動態学を抽出することしかできない。時間依存研究は、平衡終点（K）だけでなく、時間依存変化／動態（D）も捕捉する。一次元計算モデルを使用して、時間依存性研究の実験結果を適合させる。図14は、様々な拡散性の化合物について、異なる時点後のPDMSの設定体積から回収された化合物濃度の有限要素解析モデル、又は漸増的に解かれる計算モデルを示す。拡散性が高いほど、化合物は周囲の透過性材料に速く吸収される。結果は、化合物の拡散性が高いほど、PDMSなどの透過性材料を用いて任意の時間を費やした後の化合物の回収された濃度が低くなることを示している。この結果はまた、PDMSなどの透過性材料を用いて費やされる時間が長いほど、化合物の回収された濃度が低くなることを実証している。図14に描かれているもの

20

【0391】

図20A及び図20Bは、特にPDMSにおけるパラメータ分配係数について、医薬品などの多くの異なる小分子化合物に対する吸収試験の結果を示す。多くの化合物を複数の産業共同研究者から試験した。図76の結果は、PDMS及び灌流マニホールドアセンブリ（ポッド）の材料への吸収レベルを示す。試験化合物には、既に市場に出ている承認された化合物、並びに依然として医薬品開発パイプラインにある候補の両方が含まれる。化合物は、吸収を示す2つの物理化学的パラメータである分子量及び親油性（log P）の範囲をカバーする。次いで、材料試験の結果をこれらのパラメータに対してプロットした。結果は、小分子の大部分が有意なPDMS吸収のリスクがあることを示した。しかし、吸収の程度は、log P又は分子量数学モデル単独では十分に予測されず、強く示されるだけである。試験した化合物の約60%がPDMSに吸収されるが、化合物はいずれもCOPに吸収されないことが見出された。驚くべきことに、化合物の約50%はまた、以前に提示された灌流マニホールドアセンブリ（14）の一実施形態における好ましい材料であるSEBSにもある程度吸収することが見出された。約1kDaを超える大きな分子は、吸収のリスクが低い。

30

【0392】

ミダゾラムは、麻酔、鎮静、てんかんの治療、及び睡眠補助薬として使用される小分子医薬品である。ミダゾラムは、3.89のlog P値、201のPDMS分配値（K）及び4.05のSEBS分配値（K）を有する。図70は、ガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン、PDMS、SEBS及びCOPを含む様々な材料と接触していた溶液からのミダゾラムの回収された濃度を示す。回収された濃度をデフォルト投与濃度と比較した。ミダゾラムは、ガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン又はCOPに有意に吸収されなかった。ミダゾラムはSEBSにいくらか吸収された。ミダゾラムはPDMSに有意に吸収された。図72は、PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスへのミダゾラム吸収の計算モデルを示す。図72は、培地がマイクロ流体デバイスチャネルを

40

50

M Sに吸収される前に薬物と接触することを示す。

【0393】

ブフラロールは、小分子 β 遮断薬である。ブフラロールは、3.5のlog P値、216より大きいPDMS分配値(K)、及び4.77のSEBS分配値(K)を有する。図71は、ガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン、PDMS、SEBS及びCOPを含む様々な材料と接触していた溶液からのブフラロールの回収された濃度を示す。回収された濃度をデフォルト投与濃度と比較した。ブフラロールは、投与した化合物のほぼ100%の回収率によって示されるように、ガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン又はCOPに有意に吸収されなかった。ブフラロールはSEBSにいくらか吸収された。ブフラロールはPDMSにほぼ完全に吸収されたため、PDMS実験からの回収された濃度はLCMSの検出下限を下回った。LCMSで化合物を検出することができないことは、PDMSからなるデバイス中で小分子を用いて作業するという課題の深刻さを強調している。

10

【0394】

材料実験を、PDMS及びCOPの両方に対して薬物ジアゼパムを用いて行った。図15A及び図15Bは、材料PDMS及びCOPの両方への薬物ジアゼパムの吸収を、材料が含有されるガラスバイアルに含有される流体中に残存するジアゼパムの回収された濃度に基づいて、経時的に示す。これは、材料に対する経時的な化合物「損失」を示す。図15Aは、最大72時間PDMSと接触した場合の、投与濃度と、ジアゼパムを含有する溶液からの化合物回収率との差を示す。12時間までに、ジアゼパムのほぼ2/3がPDMSによって吸収された。7つの時点で採取されたサンプルを一致させるための計算モデリングも図15Aに示されている。図15Bは、最大72時間COPと接触した場合の、投与濃度と、ジアゼパムを含有する溶液からの化合物回収率との差を示す。72時間にわたって、COPへの吸収は、あったとしても最小限であった。実験は、PDMSとCOPとの間の大きな吸光度差を強調している。

20

【0395】

材料コーティングも試験して、一般的に使用されるマイクロ流体デバイス構造材料を吸収から保護する際のそれらの有効性を測定した。パリレンは、化学蒸着によって材料をコーティングするために使用することができる様々なポリ(p-キシリレン)ポリマーの商標名である。堆積されたパリレンの層は剛性であるが、その下の材料の可撓性が可撓性を維持することを可能にするのに十分に薄いので、PDMS又はSEBSなどのパリレンコーティング材料は、低吸収であるが可撓性のマイクロ流体デバイスを構築するために効果的に使用することができるので、パリレンは重要である。

30

【0396】

パリレン被覆PDMSガasketを蛍光分子ローダミンBに曝露し、蛍光画像化した。図31は、ローダミンBに曝露された後のパリレン被覆PDMSガasketの顕微鏡画像を示す。わずかにピンクがかった色相のみが見え、角部のいくつかにおいてのみ、いくらかの吸収が存在するが、完全にコーティングされていない可能性がある領域に局在していることを示す。しかし、吸収は主に鋭い角を有する領域に局在化する。チャンネルに通じるマイクロ流体デバイスポート内に吸収は見られず、必要とされる実際の領域は低吸収性である。パリレンコーティングの初期定性分析は有望であることが見出された。

40

【0397】

パリレン被覆SEBSガasketを蛍光分子ローダミンBに曝露し、同様に蛍光画像化した。図32は、ローダミンBに曝露された後のパリレン被覆PDMSガasketの顕微鏡画像を示す図である。わずかにピンク色の色相が見られ、これは、いくらかの最小限の吸収が存在することを示している。しかし、吸収は主に鋭い角を有する領域に局在化する。バイアの内側にいくらかの吸収を見ることができるが、それは最小限であり視覚化が困難であり、吸収とは無関係の光学的アーチファクトである可能性が非常に高かった。

【0398】

小分子吸収性の最小化におけるその有効性を評価するために、パリレン被覆材料について2つの定量的研究を行った。第1の研究では、パリレン被覆SEBS及びパリレン被覆

50

P D M S の両方をローダミン B 及びクマリンに曝露した。第 2 の研究では、パリレン被覆 S E B S 及びパリレン被覆 E 1 4 0 の吸収を、ガラス及び C O P などの既知の低吸収材料の吸収と比較した。

【 0 3 9 9 】

吸収研究の第 1 ラウンドでは、S E B S 及び P D M S ガasket を 2 つの厚さである 2 μ m 及び 8 μ m でパリレンでコーティングした。パリレン被覆ガasket をローダミン B 及びクマリンに 0、1 4、4 0 及び 7 2 時間曝露した。曝露溶液中のローダミン B 及びクマリンの残存濃度をプレートリーダーで測定した。各条件を 2 つのガasket で試験した。実行される条件の数に起因して、限られた反復が利用可能であった。この「ショットガンアプローチ」は、多くのコーティング条件を試し、最良の選択肢を迅速に決定するために使用された。図 3 3 A は、パリレン被覆材料への吸収に関する研究の結果を示し、溶液から回収されたクマリンの画分を示す。図 3 3 B は、吸収することが知られている 2 つの材料上の様々な厚さのコーティングについての溶液から回収されたローダミン B の画分を示す。図 3 3 A は、異なるコーティング厚さを有するコーティングされた P D M S 及び S E B S の両方によって、一部のクマリンが吸収されたことを示す。図 3 3 B は、最小ローダミン B が、異なるコーティング厚で P D M S 及び S E B S によって吸収されたことを示す。実験からの 1 つの観察は、パリレンが亀裂を生じ、ガasket の吸収につながる可能性があることであった。実験からの別の観察は、P D M S 及び S E B S へのパリレン接着が不十分であり、パリレンの容易な除去をもたらしたことであった。最後に、パーレンコーティングは極めて疎水性であり、したがって「滑りやすい」ため、部品の取り扱いが困難であった。これらのコーティングの問題は、マスク除去の前に亀裂又は断裂を防止するためにマスキング戦略を最適化すること、鋭い縁部を除去するためにガasket の幾何学的形状を最適化すること、及びバルクガasket の体積を減少させて、マイクロ流体デバイスの機能的構成要素のみがガasket の代わりに灌流マニホールドアセンブリと接触するようにすることによって、解決することができる。それにもかかわらず、パリレンは P D M S と S E B S の両方の吸収性の問題を改善することが示された。

10

20

【 0 4 0 0 】

吸収研究の第 2 ラウンドでは、パリレンコーティングプロセスの最適化後、パリレン被覆 S E B S 及びパリレン被覆 E 1 4 0 の吸収を、ガラス及び C O P などの既知の低吸収材料の吸収、並びに材料と接触していない薬物の対照溶液の両方と比較した。被覆材料を、既知濃度の薬物クマリンを含む溶液に曝露した。溶液は、クマリンの残存濃度を定量化するために、材料に曝露する前、2 2 時間及び 9 2 時間の 3 回の試験を行った。実験の結果は、対照溶液と比較した場合、ガラス及び C O P が吸収しなかったことを示した。実験の結果は、コーティングされていない S E B S 及び E 1 4 0 の両方が小分子を吸収することを示した。S E B S は、E 1 4 0 よりも多くの化合物を吸収した。実験の結果は、パリレンでコーティングされた材料が有意な量の小分子を吸収しないことを示している。図 6 8 は実験の結果を示し、この実験では被覆されていない材料のみが吸収されることが見られた。

30

【 0 4 0 1 】

2. 高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスに関する吸収性実験

40

上部チャンネル (3)、底部チャンネル (4)、及び当該上部チャンネル (3) 及び底部チャンネル (4) の少なくとも一部を分離する膜 (7) を含むマイクロ流体デバイスの計算吸収モデルを構築した。モデルは、材料の透過性 (D) 及び材料の吸光度又は分配係数 (K) (両方とも材料試験実験から推定される)、流体の流量、流体中の化合物の拡散性、マイクロ流体デバイスチャンネル及び材料の幾何学的形状、能動的及び受動的輸送並びに代謝などの細胞現象を含む様々な変数を変更することを可能にする。上部チャンネル、底部チャンネル、並びに当該上部チャンネル (3) 及び底部チャンネルの少なくとも一部を分離する膜を含むマイクロ流体デバイスの計算モデルの描写は、図 1 7 に見ることができる。吸収モデルは、一般的に使用される化合物又はツール化合物で検証することができる。スタンドアロンの吸収実験は、薬物吸収を予測することが証明された。薬物吸収を数学的にモデル化す

50

る能力は、材料の透過性、材料の吸光度、上部及び底部チャネルの流体の流量、流体中の化合物の拡散性などを含む実験を設計する際に有用である。実験を実行する前に、実験及び可能性のある結果を理解することにより、科学者は資金と時間をよりよく節約することができる。

【0402】

実験設計を知らせるための吸収モデリングを、化合物クマリンを使用して試験した。クマリンを吸収性マイクロ流体デバイス（13）に流し、底部チャネル内の回収された濃度をサンプリングした。図18Aに見られる60 μL / 時及び図18Bに見られる150 μL / 時の2つの異なる流速で実験を行った。実験の結果は、より少ない化合物がより速い流速でPDMSに吸収されることを示しただけでなく、吸収モデリングが合理的な程度の誤差内で結果を正確に仮定し、アプローチを検証した。

10

【0403】

しかし、計算モデルは、必ずしも十分ではないことが多い。いくつかの化合物は完全に吸収するため、計算モデルは全く機能しない可能性がある。実際、モデルを使用して吸収性マイクロ流体デバイス実験（細胞を使用）からのデータを補正する場合、モデルは全吸収を説明することができない。すなわち、細胞が非常に低濃度の化合物に曝露される場合、たとえこの曝露レベルを予測することができたとしても、有用な補正には低すぎる可能性がある。一部の状況でしかデータを補正することができないにもかかわらず、計算モデルはまた、複雑なワークフローを必要とする場合がある。計算モデリングを機能させるために、システムに導入された全ての化合物の吸収は、材料特性評価研究において最初に定量化されるべきである。同様に、吸収を最小限に抑えるように実験を設計するために各実験の前に複数の計算モデルを実行し、次いで、発生した吸収を補正又は説明するために追加のモデルセットを実行することは、特に多くの条件を伴う大規模実験では持続可能ではない。同様に、計算モデルは、細胞によって導入された変数を含む多数の変数のために、細胞ベースの実験においてデータを正確にデコンボリューションすることができない可能性がある。例えば、吸収性マイクロ流体デバイスの長さに沿った吸収による濃度勾配、及び濃度も時間と共に変化するという事実は、濃度を「移動目標」にする。これらの変数の多くを説明するために計算モデルを使用しても、吸収の存在下では、インビトロからインビボへの外挿（IVE）における結果の全体的な信頼性が依然として低下している。

20

【0404】

図19は、デバイス内の化合物の濃度を変化させる細胞機能のみに関連する吸収性マイクロ流体デバイス（13）の内部における化合物堆積のダイナミクスのモデル化及び理解の複雑さを示す。実際、吸収の複雑さが増していなくても、このようなマイクロ流体デバイスの動態は、受動的な細胞透過性、代謝、及び膜を通過する輸送などの生物学的／生理学的因子を含み得るため、モデル化が困難である。

30

【0405】

図29Aは、プレート培養物から収集した実際のデータに対するインビボ薬物クリアランスデータから計算されたプレート培養物中の薬物ジアゼパムの予想枯渇モデルを示す。図29Bは、吸収材料-PDMSから製造されたマイクロ流体デバイス、及びCOPから製造された低吸収性マイクロ流体デバイス（13）からの結果と比較して、吸収が存在しない場合（理論的）（12）のマイクロ流体デバイスにおける薬物ジアゼパムの予想される枯渇モデルを示す。COPマイクロ流体デバイス（13）とプレート培養の両方が、予想されるように対数線形の枯渇動態を有するが、非吸収性マイクロ流体デバイスにおいてのみ、文献のインビボ値によって予測された値に近い値である。PDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイスからの結果は、文献値から予測された結果から外れているだけでなく、代謝が化合物損失の唯一の推進要因であった場合に予想されるように、グラフの形状は対数線形ではない。実際、ジアゼパムの非線形枯渇は、化合物損失、すなわち発生することが知られている物質吸収の別の力学を明確に示している。図30は、PDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイス（12）及びCOPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（13）における、プレート上のインビボでのジアゼ

40

50

パムの予測クリアランスを示す。要約すると、プレート培養はクリアランスを過小予測し、吸収マイクロ流体デバイスはクリアランスを過大予測し、本明細書では「New Liver-Chip」と呼ばれる非吸収マイクロ流体デバイスは固有クリアランスを正確に予測する。

【0406】

実験出力は、濃度 C (μM) 及び時間 t (分) を含んだ。次いで、反応速度 k_e を、以下の式を使用して計算した。

【数1】

$$k_e = \frac{\ln\left(\frac{C_1}{C_2}\right)}{(t_2 - t_1)} \quad 10$$

【0407】

次いで、通過する培地から化合物を除去するマイクロ流体デバイスの能力の尺度であるチップクリアランス (CL) を、以下の式を使用して計算した。

$$CL = k_e * V_{Media}$$

【0408】

次いで、器官を通過する血液から化合物を除去する $organ$ の能力である固有クリアランス (CL_{int}) を、以下の式を使用して計算した。

【数2】

$$CL_{int} = \frac{CL}{f_{u_{media}}} * \frac{\#Cells_{organ}}{\#Cells_{chip}} \quad 20$$

【0409】

次いで、インビトロシステムにおいてクリアランスを決定するための、文献で以前に公開された方法と一致する固有クリアランスの支配方程式を示す。

【数3】

$$CL_{int} = \frac{\ln\left(\frac{C_1}{C_2}\right)}{(t_2 - t_1)} * V_{Media} * \frac{1}{f_{u_{media}}} * \frac{\#Cells_{organ}}{\#Cells_{chip}} \quad 30$$

【0410】

マイクロ流体デバイスクリアランスを親化合物枯渇の関数として定量した。インビボ値を使用して、2つのマイクロ流体デバイスタイプから得られたジアゼパム肝固有クリアランス又は CL_{int} 値を比較した。PDMSマイクロ流体デバイス値は、吸収に起因して人為的に高いことが見出され、これは、代謝に誤って起因する化合物損失を引き起こす。したがって、PDMSマイクロ流体デバイスではクリアランスの過大評価があった。プレート培養値は、クリアランスの過小予測に起因してインビボ値よりも有意に低かった。

【0411】

図72は、薬物ミダゾラムを含有する溶液を、PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)に $150 \mu L$ / 時で数時間の短時間流した計算実験を示す。図72では、チャンネルの開始時の細胞のみがミダゾラムと接触することが分かる場合があり、これは、PDMSが薬物を急速に吸収し、その結果、チャンネル内の後の方にある細胞が薬物と相互作用することができないためである。更に、より低い培地流量、例えば $30 \mu L$ / 時を使用することは、より生物学的に適切であり、より費用効果が高い。これらのより低い流速では、より高流量での培地と比較した場合、培地はより長い期間にわたって、チャンネルの最初にある吸収材料と接触するので、更により少ない細胞が小分子薬

物と接触する。P D M Sなどの吸収材料から製造されたマイクロ流体デバイスを使用すると、代謝を決定するために定量化されるものに応じて、インビボ代謝の過大評価又は過小評価を100倍も引き起こす可能性がある。代謝を推定するために化合物の枯渇が使用される場合、代謝は過大評価される。代謝産物の定量化が代謝の読み出しとして使用される場合、代謝は過小評価される。更に、化合物－物質相互作用及び流量も代謝系の理解に関与するので、どの程度の代謝が過剰又は不足しているかを知ることが困難である。特にミダゾラムについては、代謝産物の定量化が読み出しとして使用された高流量の場合、10倍～100倍の間のどこかで代謝の一貫した過小評価があり、より低い流量ではより大きな過小評価があった。低吸収性マイクロ流体デバイスは、マイクロ流体デバイスにおける代謝速度がインビボで見られるものと同様であると仮定して、インビボ薬物代謝を正確に推定することが示唆される。

10

【0412】

図22は、吸収性マイクロ流体デバイス(12)のCOMSOL計算モデルを示す。

【0413】

P D M Sから製造され、2つの細胞層(33)を含む吸収性マイクロ流体デバイス(13)を表す二次元計算モデルを作成した。マイクロ流体デバイスは、上部チャンネル(3)、底部チャンネル(4)、上部チャンネル(3)及び底部チャンネル(4)の少なくとも一部を分離する膜(7)を含む。代表的な小分子化合物を底部チャンネル(4)にのみ投与した。吸収は、底部チャンネル層(8)上のP D M Sバルクが上部チャンネル層(6)上のP D M Sバルクよりも薄いので、上部チャンネル(3)の代わりに底部チャンネル(4)が投与される際に最小化される。底部チャンネル層(8)上のP D M Sが少ないため、小分子化合物が吸収される体積が少ない。

20

【0414】

本明細書で論じられるマイクロ流体デバイスの計算モデルが作成され、分析された後、細胞層を含むマイクロ流体デバイスへの吸収を評価するために物理的実験室実験が行われた。

【0415】

肝臓細胞の生存能力及び機能を評価するために、C O Pから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)、P D M Sから製造された吸収性マイクロ流体デバイス(12)及び細胞培養プレートに、肝細胞を含む様々な肝臓細胞を播種した。図28Aは、培養7日目にC O Pから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)における肝臓細胞を示す。図28Bは、C O Pから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)及びP D M Sから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)の両方における肝臓細胞における同等のアルブミン産生を示す。プレート培養におけるアルブミン産生は、両方のマイクロ流体デバイスよりも有意に低かった。図28Bに示すデータを作成するために、肝細胞への酸素送達を増加させるプロトコルを使用した。そのようなプロトコルの1つは、マイクロ流体デバイスに入る流量を増加させることを含む。

30

【0416】

マイクロ流体デバイスの上部及び／又は底部チャンネル内の高流量がマイクロ流体デバイスのバルク材料への吸収に影響を及ぼすかどうかを評価するために実験も行った。マイクロ流体デバイスの4つの条件に、2種類のヒト肝臓細胞、肝細胞及びL S E Cを播種し、底部又は基底チャンネルのより高流量で酸素を送達した。細胞層(33)は生存及び／又は機能するために特定の酸素濃度又は送達速度を要求することが多いので、マイクロ流体デバイス内の細胞層(33)への酸素送達は非常に重要である。いくつかの実施形態では、細胞層(33)は、高レベルの酸素を必要とし得る。他の実施形態では、細胞層(33)は、非常に低いレベルの酸素を必要とし得る。試験されたマイクロ流体デバイスには、0 μ L／時の上部チャンネル流量及び300 μ L／時の底部チャンネル(4)流量を有するC O Pから製造された5つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)、10 μ L／時の上部チャンネル(3)流量及び300 μ L／時の底部チャンネル(4)流量を有するC

40

50

OPから製造された5つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)、 $10\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル(3)流量及び $30\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル(4)流量を有するPDMSから製造された5つの低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)、並びに $10\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル(3)流量及び $300\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル(4)流量を有するPDMSから製造された5つの高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスが(12)含まれる。全てのマイクロ流体デバイスは、上部チャンネル(3)に播種されたヒト肝細胞及び底部チャンネル(4)に播種されたヒトLSECを有していた。全てのマイクロ流体デバイスは、培養モジュールとは対照的にシリンジポンプ上で実行された。実験によって回答されるべき1つの疑問は、マイクロ流体デバイスが肝臓細胞の生存能力及び機能をサポートするかどうかであった。実験の読み出しには、位相結像、アルブミン産生、CYP540産生及びRNAエンドポイント分析が含まれた。

10

【0417】

図55A、図55B及び図55Cは、細胞層(33)増殖の1日目、2日目及び3日目の、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)及びPDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)の両方における肝細胞の付着及び形態を示す。図55Aは、1日目のCOPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)における肝細胞の付着及び形態を示す。図55Bは、2日目のCOPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)における肝細胞の付着及び形態を示す。図55Cは、3日目のCOPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)における肝細胞の付着及び形態を示す。図56Aは、1日目のPDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)における肝細胞の付着及び形態を示す。図56Bは、2日目のPDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)における肝細胞の付着及び形態を示す。図56Cは、3日目のPDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)における肝細胞の付着及び形態を示す。1日目、2日目及び3日目に、肝細胞の付着及び形態は、両方のマイクロ流体デバイス設計において類似していた。

20

【0418】

図57A及び図57Bは、PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)における9日目の肝細胞及びLSECの形態を示す。図57Aは、PDMSから製造された高吸収性マイクロ流体デバイス(12)における9日目の肝細胞の形態を示す。図57Bは、PDMSから製造された高吸収性マイクロ流体デバイス(12)における9日目のLSECの形態を示す。図58A及び図58Bは、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)における9日目の肝細胞及びLSECの形態を示す。図58Aは、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)における9日目の肝細胞の形態を示す。図58Bは、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)における9日目のLSECの形態を示す。肝細胞とLSECの両方は、9日目に、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)及び高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)の両方で、同等の形態を示し、単層を維持した。

30

【0419】

実験の一部は、低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)が、依然として低吸収性を提供しながら、ヒト肝臓細胞の形態を維持することができることを実証している。低吸収性は、高吸収性マイクロ流体デバイス(12)のように小分子研究に悪影響を及ぼさないので有利である。

40

【0420】

図59A及び図59Bは、2つの異なるマイクロ流体デバイスでの細胞層(33)培養の9日目のMRP2による毛細胆管蛍光染色を示す。図59Aは、細胞層(33)培養の9日目に、20倍顕微鏡対物レンズを使用して、PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)のMRP2による毛細胆管の蛍光染色を示す。図59Bは、細胞層(33)培養の9日目に、20倍顕微鏡対物レンズを使用して、COPから

50

製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１３）のMRP2による毛細胆管の蛍光染色を示す。PDMS及びCOPから製造されたマイクロ流体デバイスの両方で、毛細胆管の同様の発達があったが、どちらも理想的ではなかった。理想的な細胞層（３３）は、相互接続されたネットワークを示す。

【０４２１】

図６０は、４つの条件にわたるアルブミン産生の概要を示す。試験されたマイクロ流体デバイスには、 $0\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $300\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル（４）流量を有するCOPから製造された５つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）、 $10\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル（３）流量及び $300\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル（４）流量を有するCOPから製造された５つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）、 $10\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル（３）流量及び $30\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル（４）流量を有するPDMSから製造された５つの吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１２）、並びに $10\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル（３）流量及び $300\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル（４）流量を有するPDMSから製造された５つの高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスが（１２）含まれる。アルブミンレベルは、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）で有意に減少した。流れのないマイクロ流体デバイスは、ガス CO_2 と共に炭酸水素ナトリウムで培地を曝露することによって培地を適切に緩衝することができないため、酸素の不足及び生理学的に適切でないpHに悩まされた。

【０４２２】

図６１は、マイクロ流体デバイスの溶解後１４日目のCYP1A2酵素レベルを示す。PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１２）は、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）よりも高いレベルのCYP1A2を示した。COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）は、PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１２）に見られる代謝機能の多くを欠いている。

【０４２３】

図６２は、マイクロ流体デバイスの溶解後１４日目のCYP3A4レベルを示す。PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１２）は、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）よりも高いレベルのCYP3A4を示した。COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）は、PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１２）に見られる代謝機能の多くを欠いている。

【０４２４】

図６３は、マイクロ流体デバイスの溶解後１４日目のCYP2A6レベルを示す。PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１２）は、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）よりも高いレベルのCYP2A6を示した。COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）は、PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１２）に見られる代謝機能の多くを欠いている。

【０４２５】

頂端又は上部チャンネル（３）におけるより高い流量の影響を評価するために、様々な条件の１７個のマイクロ流体デバイスにヒト肝臓細胞を播種した。マイクロ流体デバイスは、培地が１００％酸素で平衡化された（すなわち、培養モジュール上で実行され、 100kPa 、 CO_2 平衡化なし、 $150\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $150\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有する）、COPから製造された３つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス；培養モジュール上で実行され、２１％の酸素培地平衡及び５％の二酸化炭素、 $150\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $150\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有する、COPから製造された３つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス；培養モジュール上で実行され、培地が２１％酸素及び５％二酸化炭素に平衡化され、 $150\mu\text{L}/\text{時}$ の上部チャンネル流量及び $150\mu\text{L}/\text{時}$ の底部チャンネル流量を有し、培地をpH緩衝する

ために培地中に15 mM HEPESを更に有する、COPから製造された3つの低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス；シリンジポンプ上で実行され、培地が21%酸素及び5%二酸化炭素に平衡化され、300 μ L/時の上部チャネル流量及び300 μ L/時の底部チャネル流量を有する、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス；シリンジポンプ上で実行され、培地が21%酸素及び5%二酸化炭素に平衡化され、300 μ L/時の上部チャネル流量及び300 μ L/時の底部チャネル流量を有する、COPから製造された2つの高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス；並びに培養モジュール上で実行され、培地が21%酸素及び5%二酸化炭素に平衡化され、30 μ L/時の上部チャネル流量及び30 μ L/時の底部チャネル流量を有する、COPから製造された2つの高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスを含んでいた。図64は、マイクロ流体デバイスにおける肝臓細胞の生存能力及び機能を維持することを目的とした最適化研究のために、全ての実験条件が見られ得る実験マトリックスを示す。

10

【0426】

合計17個のマイクロ流体デバイス、3つの培養モジュール及び1つのシリンジポンプを使用した。3つの培地であるWEM(-)2%FBS；15 mM HEPESを含むWEM(-)2%FBS；及びCSC 2%FBSを使用した。HEPESを、その細胞毒性を評価するために試験した。実験の目的は、マイクロ流体デバイス内の酸素灌流の反映として細胞機能性を試験することであった。時点分析には、明視野画像化、アルブミン分泌分析、LDH分泌分析及びCYP450分析が含まれた。図65は、図64に示す各条件でのアルブミン産生を示す。グラフは、より高流量が底部チャネル(4)のみにある場合と比較して、上部チャネル(3)及び底部チャネル(4)の両方でより高流量があった場合、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)でアルブミン産生の改善があったことを示している。アルブミンの産生は、上部チャネル(3)及び底部チャネル(4)の流量が150 μ L/時で、COPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(13)において、上部チャネル(3)及び底部チャネル(4)の流量が30 μ L/時で、PDMSから製造された高吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)とほぼ同じであった。

20

【0427】

肝臓細胞を播種したPDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイス(12)におけるタンパク質結合もまた、異なる濃度のウシ胎児血清(FBS)について定量化した。化合物が材料に吸収されるだけでなく、培地内のタンパク質も化合物に結合して、化合物が細胞を通過し、化合物に曝露されないため、効果的な化合物損失を引き起こす可能性がある。これらの実験では、小分子化合物としてジアゼパムを使用した。図16は、実験の結果を示す。FBSの濃度が高いほど、タンパク質結合による細胞への化合物の利用可能性が低くなる。この実験は、吸収実験における吸収のための化合物濃度の利用可能な割合を確立するために重要であるが、更なる「損失」を引き起こす吸収がなくても、細胞に利用可能な化合物の割合も確立するために重要である。迅速平衡透析(RED)装置を使用して結合を特性評価した。1%FBSを含む培地の場合、ジアゼパムの化合物利用可能性は67%であった。タンパク質結合データを使用して、上記の式に見られるように代謝速度を固有クリアランスに変換した。

30

40

【0428】

細胞培養培地の往復運動を試験して、培地の酸素化及び細胞が少量の培地中の薬物の全投与濃度と確実に接触することを含む潜在的な利点を評価した。図66A、図66B及び図66C培地の往復運動のための実験設定を示す。この設定は、シリンジポンプ(38)を使用してCOPから製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス(12)を通して培地を圧送することを含む。培地は、出口ポート(2)に接続された外部リザーバに集まる。大部分の培地がシリンジ(37)から送り出されると、シリンジポンプ(38)は方向を反転させ、外部リザーバ(39)からシリンジ(37)に培地を送り返し始める。培地を前後に圧送するプロセスにおいて、一実施形態では、培地はガス透過性チューブを通して流れ、周囲ガスが培地にアクセスすることを可能にする。別の実施形態では、

50

出口リザーバに収集された培地は、周囲大気環境に曝露され、空気中のガス濃度に迅速に平衡化することを可能にし、この場合、細胞が適切に機能するために必要な酸素レベルを供給する。このリザーバは外部環境に対して「開いている」ので、培地は空気中の周囲酸素濃度と平衡することができる。デバイス内の細胞が培地中の酸素を枯渇させた場合、酸素は急速に培地中に拡散し、溶存酸素で再飽和する。実験設定は低吸収性であるだけでなく、重要なことに、システムの体積を減少させる。図 6 7 は、図 6 6 A、図 6 6 B 及び図 6 6 C に示される実験設定のフロープロセスを示し、培地は、シリンジ (3 7) 及び外部リザーバ (3 9) からマイクロ流体デバイス (1 3) を通して前後に押され、必要なガス濃度に培地を曝露する。図 6 7 では、培地は、最初に外部リザーバからマイクロ流体デバイスを通してシリンジに引き込まれる。次いで、培地は、任意選択的に、図の中央パネルのシリンジ内で静止状態に保持される。次いで、培地はシリンジから押し出され、マイクロ流体デバイスを通して外部リザーバに戻される。或いは、外部リザーバは、リザーバ又は流体リザーバとして知られてもよい。

10

【0 4 2 9】

3. 低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスに関する吸収性実験

異なるマイクロ流体環境での生存能力を評価するために、4つの異なる種類のマイクロ流体デバイスのそれぞれ3つに異なる種類の肝臓細胞を播種して「Liver-On-Chip」又は「Liver Chip」を形成した。上部チャネル (3) にヒト肝細胞細胞を播種し、底部チャネル (4) にヒト類洞内皮細胞を播種した。第1の条件は、米国特許第 8, 647, 861 号に記載されている PDMS から製造された吸収性マイクロ流体デバイス (1 2) であった。吸収 PDMS マイクロ流体デバイス (1 2) は陰性対照を表した。第2の条件は、COP から製造された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス (1 3) であった。ガス不透過性の低吸収性マイクロ流体デバイス (1 3) は、陽性対照を表した。第3の条件は、11%多孔質 PET スキャフォールド及び PDMS 薄膜ガス交換器 (9) を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス (1) であった。第4の条件は、PDMS 厚膜ガス交換器 (9) を含むが多孔質 PET スキャフォールドを含まない低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス (1) であった。培地を 30 μ L / 時でマイクロ流体デバイスに流した。実験の機能的な読み出しには、形態、アルブミン産生及び毛細胆管構造が含まれた。明視野画像化を用いて形態を決定した。アルブミン産生を、流出物収集及び ELISA 試験で定量した。適切な毛細胆管構造の存在を免疫蛍光で評価して、MRP 2 発現を可視化した。ガス交換器 (9) を通るより良好な酸素輸送を達成するために、使用した培養モジュールのトレイにスリットを入れた。図 4 5 A は、11%多孔質 PET 及び PDMS 薄膜ガス交換器 (9) を含むガス透過性低吸収性マイクロ流体デバイス (1) を示す。図 4 5 B は、PDMS 厚膜ガス交換器 (9) を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス (1) を示す。

20

30

【0 4 3 0】

図 4 6 A、図 4 6 B、図 4 6 C 及び図 4 6 D は、吸収性マイクロ流体デバイス (1 2) における細胞単層 (3 3) の形態を示す。図 4 6 A は、1 日目の単層 (3 3) を示す。図 4 6 B は、3 日目の単層 (3 3) を示す。図 4 6 C は、6 日目の単層 (3 3) を示す。図 4 6 D は、10 日目の単層 (3 3) を示す。単層 (3 3) は 10 日目まで維持されているようであるが、わずかな形態学的低下を伴っていた。

40

【0 4 3 1】

図 4 7 A、図 4 7 B、図 4 7 C、及び図 4 7 D は、COP から構築された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス (1 3) における細胞単層 (3 3) の形態を示す。図 4 7 A は、1 日目の単層 (3 3) を示す。図 4 7 B は、3 日目の単層 (3 3) を示す。図 4 7 C は、6 日目の単層 (3 3) を示す。図 4 7 D は、10 日目の単層 (3 3) を示す。単層 (3 3) は 10 日間にわたって急速に減少しているようであり、大部分の細胞は 10 日目までに完全に死んでいるか、又は死滅した。

【0 4 3 2】

図 4 8 A、図 4 8 B、図 4 8 C 及び図 4 8 D は、多孔質 PET 及び薄膜 PDMS ガス交

50

換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）における細胞単層（３３）の形態を示す。図４８Ａは、１日目の単層（３３）を示す。図４８Ｂは、３日目の単層（３３）を示す。図４８Ｃは、６日目の単層（３３）を示す。図４８Ｄは、１０日目の単層（３３）を示す。単層（３３）は１０日目まで維持されているようであり、わずかな形態学的低下を伴っていた（図４６のガス透過性であるが吸収デバイスと同様）。

【０４３３】

図４９Ａ、図４９Ｂ、図４９Ｃ及び図４９Ｄは、薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）における細胞単層（３３）の形態を示す。図４９Ａは、１日目の単層（３３）を示す。図４９Ｂは、３日目の単層（３３）を示す。図４９Ｃは、６日目の単層（３３）を示す。図４９Ｄは、１０日目の単層（３３）を示す。単層（３３）は１０日目まで維持されているようであり、わずかな形態学的低下を伴っていた（図４６のガス透過性であるが吸収デバイスと同様）。

10

【０４３４】

図５０Ａ、図５０Ｂ、図５０Ｃ及び図５０Ｄは、１４日目の全条件の毛様体管のＭＲＰ２シグナルを示す。図５０Ａは、１４日目のＰＤＭＳから構築された吸収性マイクロ流体デバイス（１２）の毛細胆管ＭＲＰ２シグナルを示す。図５０Ｂは、１４日目のＣＯＰから構築された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）の毛細胆管ＭＲＰ２シグナルを示す。図５０Ｃは、１４日目の多孔質ＰＥＴ及び薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）の毛細胆管ＭＲＰ２シグナルを示す。図５０Ｄは、１４日目の薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）の毛細胆管ＭＲＰ２シグナルを示す。１４日目に、いずれの条件についてもＭＲＰ２シグナルはなかった。

20

【０４３５】

図５１Ａ及び図５１Ｂは、４日目、９日目及び１３日目の４つの条件の各々における平均アルブミン分泌を示す。アルブミン分泌は、多孔質ＰＥＴ及び薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）と、薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）の両方において、ＰＤＭＳから構築された吸収性マイクロ流体デバイス（１２）よりも低い。しかし、ＣＯＰから構築された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）からは、大きな改善が見られる。

30

【０４３６】

ＰＤＭＳから構築された吸収性マイクロ流体デバイス（１２）は驚くほど良好に機能しなかったが、細胞層（３３）は１４日目に生存していた。ＣＯＰから構築された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）は、驚くべきことに、１日目に依然として生存していたが、驚くべきことではないが、１４日目に死滅した。多孔質ＰＥＴ及び薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）と、薄膜ＰＤＭＳガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）の両方が、ＣＯＰから構成された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（１３）と比較して改善を示した。

【０４３７】

40

ガス交換器を含む低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスを使用して、上部及び底部チャンネルとしても知られる細胞培養チャンネルに酸素勾配を作り出すことができるかどうかを確認するために実験を行った。ガス交換器（９）を備えた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）に、Ｃａｃｏ－２細胞を播種した。マイクロ流体デバイス（１）には内皮細胞を播種しなかった。全ての培地を５％酸素環境で２４時間平衡化した。低酸素インキュベータを、５％酸素環境又は５ｋＰａ分圧を維持するように設定した。

【０４３８】

概念実証研究は、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）が、Ｃａｃｏ－２上皮増殖及び分化を支持するマイクロ流体デバイスの高さに沿った酸素微小勾配、並びに頂端チャンバ内の低酸素環境を確立することを実証する。図５３は、血管チャンネルから、腸

50

管腔（１）を表す頂端チャネルへの酸素勾配の生成から利益を得る、低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイスにおけるＣａｃｏ－２形態を示す。図５４は、上部チャネル（３）入口ポート（２）、上部チャネル（３）出口ポート（２）、底部チャネル（４）入口ポート（２）及び底部チャネル（４）出口ポート（２）の４つの異なるポート（２）でサンプリングされた低吸収性ガス透過性マイクロ流体デバイス（１）の酸素濃度プロファイルを示す。腸管腔に特徴的な微小嫌気性環境を再現することにより、粘膜宿主組織とヒト腸の優勢な選好性共生微生物種との同種共培養が可能になる。ヒトの腸の選好性共生微生物種の一例はファーミキューテスである。

【０４３９】

４．灌流マニホールドアセンブリに対する吸収実験

蛍光分子ローダミンＢ（ＰＤＭＳ及びＳＥＢＳにも中程度に吸収する蛍光分子）を緩衝液に溶解し、灌流マニホールドアセンブリ（１４）、及びＰＤＭＳから作製した吸収性マイクロ流体デバイス（１２）を通して、培養モジュール上で３０μＬ／時で３８時間流した。灌流マニホールドアセンブリ（１４）を蛍光分子を含まない緩衝液で２００μＬ／時で１時間すすいだ後、実験を開始した。

【０４４０】

実験に続いて、灌流マニホールドアセンブリ（１４）を分解し、キャッピング、ガスケット及びバックプレーンアセンブリ又は流体層アセンブリ（３４）のバイア（３５）、並びに灌流マニホールドアセンブリ（１４）抵抗器（２７）を蛍光顕微鏡で画像化した。図２５Ａは、組み合わせられたガスケット層及びキャッピング層（２６）を含む吸収性灌流マニホールドアセンブリ（１４）の流体層アセンブリ（３４）において得られた蛍光を示す。図２５Ｂは、本明細書に記載の本発明の一態様で得られた蛍光、低吸収キャッピング及び低吸収ガスケット層の両方を含む低吸収性灌流マニホールドアセンブリを示す。実験で使用した灌流マニホールドアセンブリ（１４）の実施形態では、キャッピング層をＣＯＰから作製し、ガスケット層をパリレンでコーティングしたＳＥＢＳから作製した。図２５Ａ及び図２５Ｂの明るい白色は、蛍光分子ローダミンＢのより大きな吸収度と相関する。

【０４４１】

図２５Ａは、流体層アセンブリ（３４）内の４つのバイア（３５）の各々の周りの蛍光分子の吸収のサンプル画像を示す。図２５Ｂは、流体層アセンブリ（３４）内の４つのバイア（３５）の各々の周りの蛍光分子の吸収がほとんど又は全くないサンプル画像を示す。

【０４４２】

図２６は、全ての実験条件のより包括的な画像を示す。吸収性灌流マニホールドアセンブリ（１４）を試験した。ＣＯＰキャッピング層（２１）及び被覆されていないＳＥＢＳガスケット層（２０）を含む、おそらく低吸収の灌流マニホールドアセンブリ（１４）を試験した。ＣＯＰキャッピング層（２１）及びパリレン被覆ＳＥＢＳガスケット層（２０）を含む５つの低吸収性灌流マニホールドアセンブリ（１４）も試験した。図２６は、組み合わせられたガスケット層及びキャッピング層（２６）を含む灌流マニホールドアセンブリ（１４）が蛍光分子を吸収したことを示す。画像中の明るい白色は、蛍光分子ローダミンが吸収された領域を示す。図２６は、ＣＯＰキャッピング層及び被覆されていないＳＥＢＳガスケット層を含む灌流マニホールドアセンブリ（１４）が蛍光分子を吸収したことを示す。ＳＥＢＳが小分子を吸収することはこれまで知られていなかったもので、この結果は驚くべきことである。図２６は、ＣＯＰキャッピング層及びパリレン被覆ＳＥＢＳガスケット層を含む灌流マニホールドアセンブリ（１４）が有意な量の蛍光分子を吸収しなかったことを示す。

【０４４３】

図２７Ａ及び図２７Ｂは、それぞれＳＥＢＳ及びＣＯＰでキャップされた抵抗器（２７）における蛍光分子吸収を示す。図２７Ａは、ＳＥＢＳでキャップされた抵抗器が、驚くべきことに、蛍光小分子を比較的高い程度まで吸収することを示す。図２７Ｂは、ＣＯＰ

10

20

30

40

50

でキャップされた抵抗器が蛍光小分子ローダミンをほとんど吸収しないことを示す。図 27 Bでは、明るい白線は、ローダミン蛍光の発光とは対照的に、光学アーチファクト（チャンネルの壁による光の反射）を表すことに留意されたい。

【0444】

低吸収性キャッピング層（21）及び低吸収性ガasket層（20）を含む灌流マニホールドアセンブリ（14）は、単一の吸収キャップ及びガasket層（26）を含む灌流マニホールドアセンブリ（14）よりも小分子の吸収が著しく少ない。この吸収研究は、COPなどの低吸収材料から製造された、又はパリレンなどの低吸収コーティングで処理された灌流マニホールドアセンブリを有することの重要性を視覚的に実証している。

【0445】

細胞層を播種したマイクロ流体デバイスを用いて、灌流マニホールドアセンブリ全体を使用して実験を行った。

【0446】

図10Aは、マイクロ流体デバイス及び灌流マニホールドアセンブリを含むマイクロ流体システムの様々な実施形態における小分子（ブプロピオン）の吸収を示し、図10Bは、代謝酵素CYP2B6による肝臓代謝についての同じ設定におけるその同じ化合物の試験の結果を示す。PDMSから製造された吸収性マイクロ流体デバイス及びCOPから製造されたガス不透過性低吸収性マイクロ流体デバイスの両方における肝臓細胞による薬物の見かけの代謝が示されており、代謝産物の産生によって定量化された場合の見かけの代謝速度に対する吸収の効果を実証している。高吸収系は、非吸収系及び低吸収系よりも代謝の過小予測が大きいことが見出される。

【0447】

多くの場合、細胞が酵素と接触すると、二次化合物を生成し、次いでバイオ医薬品の製造に使用することができる。肝臓細胞が酵素CYP2B6にアクセスして代謝できると、化合物OH-ブプロピオンを産生する。マイクロ流体デバイス及び接続されたインフラストラクチャへの酵素の吸収、並びにOH-ブプロピオンの形成の両方を測定した。マイクロ流体デバイスの吸収性が実験中に無視される場合、細胞はマイクロ流体デバイスに投与された酵素の濃度と接触していたと考えられる。しかし、マイクロ流体デバイスのバルク材料が酵素を吸収している場合、細胞は酵素と接触している際に予想される化合物を生成していないように見える。

【0448】

結果は、吸収性マイクロ流体デバイス（12）、組み合わせられたガasket層及びキャッピング層（26）を含む灌流マニホールドアセンブリ（14）、及び培養モジュールを含む試験設定におけるOH-ブプロピオン代謝の有意な過小予測を示している。COPから作製された低吸収性ガス不透過性マイクロ流体デバイス（13）を使用するなど、マイクロ流体デバイスのバルクへの酵素吸収の変動が実験から排除されると、OH-ブプロピオン代謝をより正確に予測することができる。

【0449】

5. 化合物分布キットの検証実験

化合物分布キットの有効性を検証するために、COMSOL Multiphysics（COMSOL）などの計算モデルからの結果を、本明細書に提示される化合物分布キットからの結果と比較することができる。COMSOLモデルを示す図92は、静的バイアル試験から得られたパラメータに基づいて化合物の出口濃度を予測することができる。COMSOLモデルは、流量及び他の実験パラメータを知らせるのに役立つことができる。吸収研究は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）などの材料を特性評価するために、バイアル中でこれらの材料に対して行うことができる。材料に関するこれらの吸収研究からの結果は、マイクロ流体デバイスの計算モデルに入力することができる。計算モデルは、流量及び他の実験パラメータを知らせるのに役立つことができる。

【0450】

特定の材料について吸収研究が行われると、それらを計算モデルと比較することができ

10

20

30

40

50

る。図 9 5 は、小分子化合物ローダミンについての計算 (COMSOL) モデル流動研究結果と実際のフロー研究結果との比較を示す。図 9 5 は、流れの結果が化合物の出口濃度について COMSOL モデルに適合することを示す。ローダミンは、より低い吸収速度を有する傾向があるが、より高い程度の吸収を有し、これは、その周囲を経時的に飽和させる可能性がある。この重要性は、最初にローダミンの大きな損失が見られたにもかかわらず、一定期間後にローダミンの損失率が著しく低下することである。

【0451】

図 9 6 A 及び図 9 6 B は、小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す。図 9 6 A は、マイクロ流体デバイスの第 1 のチャンネルに対する小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲の実験結果を示す。図 9 6 B は、マイクロ流体デバイスの単一チャンネルに対する小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲の計算 (COMSOL) モデル結果を示す。図 9 6 A 及び 9 6 B のチャートは、計算 (COMSOL) モデルがマイクロ流体デバイス、特に PDMS を構成する材料へのローダミン吸収を正確に予測したことを示す。

10

【0452】

図 9 7 A 及び図 9 7 B は、小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す。図 9 6 A は、マイクロ流体デバイスの第 2 のチャンネルに対する小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲の実験結果を示す。図 9 6 B は、マイクロ流体デバイスの第 2 のチャンネルに対する小分子化合物ローダミンの細胞曝露範囲の計算 (COMSOL) モデル結果を示す。図 9 7 A 及び図 9 7 B のチャートは、計算 (COMSOL) モデルがマイクロ流体デバイス、特に PDMS を構成する材料への小分子吸収を正確に予測することを示す。

20

【0453】

図 9 8 A 及び図 9 8 B は、小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す。図 9 8 A は、マイクロ流体デバイスの第 1 のチャンネルに対する小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲の実験結果を示す。図 9 8 B は、マイクロ流体デバイスの第 1 のチャンネルに対する小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲の計算 (COMSOL) モデル結果を示す。計算 (COMSOL) モデルは、マイクロ流体デバイスの外側のフローシステムの残りの部分を考慮していないため、吸収を正確に予測しないことが見出された。この実験のために、マイクロ流体デバイスは、灌流マニホールドアセンブリと流体連通していた。化合物クマリンは、灌流マニホールドアセンブリ、SEBS を構成する材料の 1 つへの吸収を特に受けやすかった。したがって、計算 (COMSOL) モデルは、フローシステム全体への吸収を正確に予測しなかった。

30

【0454】

図 9 9 A 及び図 9 9 B は、小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲についての計算 (COMSOL) モデル結果と実際の実験結果との比較を示す。図 9 9 A は、マイクロ流体デバイスの第 2 のチャンネルに対する小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲の実験結果を示す。図 9 9 B は、マイクロ流体デバイスの第 2 のチャンネルに対する小分子化合物クマリンの細胞曝露範囲の計算 (COMSOL) モデル結果を示す。計算 (COMSOL) モデルは、マイクロ流体デバイスの外側のフローシステムの残りの部分を考慮していないため、吸収を正確に予測しないことが見出された。この実験のために、マイクロ流体デバイスは、灌流マニホールドアセンブリと流体連通していた。化合物クマリンは、灌流マニホールドアセンブリ、SEBS を構成する材料の 1 つへの吸収を特に受けやすかった。したがって、計算 (COMSOL) モデルは、フローシステム全体への吸収を正確に予測しなかった。

40

【0455】

図 100 は、 $60 \mu\text{L} / \text{時}$ の流量での、PDMS 膜を含む 2 チャンネルマイクロ流体デバイスにおける小分子化合物ローダミンの細胞曝露の実験結果を示す。

【0456】

図 101 は、 $60 \mu\text{L} / \text{時}$ の流量での、細孔を有さない PDMS 膜を含む 2 チャンネルマイクロ流体デバイスにおける小分子化合物ローダミンの細胞曝露の実験結果を示す。

50

【0457】

図102は、150 μ L / 時の流量での、PDMS膜を含む2チャンネルマイクロ流体デバイスにおける小分子化合物クマリンの細胞曝露の実験結果を示す。

【0458】

図103は、細孔を有さないPDMS膜を含む2チャンネルマイクロ流体デバイスにおける小分子化合物クマリンの細胞曝露の実験結果を示す。

【0459】

図105は、2つの小分子化合物、薬物X及び薬物Yのフロー試験のタイムラインを示す。薬物Xの用量濃度は10 μ Mであり、薬物Yの用量濃度は1 μ Mであった。図106に示す実験では、エンドポイント分析は液体クロマトグラフィー質量分析であった。

10

【0460】

図106A及び図106Bは、2チャンネルマイクロ流体デバイスの第1のチャンネルにおける薬物Xの流動研究の概要を示す。図106Aは、経時的な薬物Xの出口濃度を示す。図106Bは、第1のチャンネルにおける細胞曝露範囲を示す。図106A及び106Bは、薬物Xがシステムに吸収されたことを示す。ほぼ全ての化合物が72時間で回収可能であるため、薬物Xの損失は高吸収性分子と一致しており、マイクロ流体デバイス材料が飽和したことを示している。図106A及び図106Bは、薬物Xへの経時的な細胞曝露が80～100%であることを示す。図106A及び106Bの薬物Xを担持する培地はまた、2%ウシ胎児血清(FBS)を含有した。

【0461】

20

図107A及び図107Bは、2チャンネルマイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおける薬物Xの流動研究の概要を示す。図107Aは、経時的な薬物Xの出口濃度を示す。図107Bは、第1のチャンネルにおける細胞曝露範囲を示す。図107A及び図107Bは、薬物Xがシステムに吸収されたことを示す。化合物吸収を減少させるために、第2のチャンネル流量を場合によっては増加させることができる。

【0462】

図108A及び図108Bは、マイクロ流体デバイスの第1のチャンネルにおける薬物Yの流動研究の概要を示す。図108Aは、経時的な薬物Yの出口濃度を示す。図108Bは、経時的なマイクロ流体デバイスの第1のチャンネルにおける細胞曝露の範囲を示す。化合物損失は、マイクロ流体デバイスを構成する材料が飽和するにつれて、ほぼ全ての化合物が流出物中で72時間にわたって回収されるので、高吸収性分子と一致する。時間が経つにつれて、薬物Yの細胞曝露は80～100%になる。図108A及び108Bの薬物Yを担持する培地はまた、2%ウシ胎児血清(FBS)を含有した。

30

【0463】

図109A及び図109Bは、マイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおける薬物Yの流動研究の概要を示す。図109Aは、経時的な薬物Yの出口濃度を示す。図109Bは、経時的なマイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおける細胞曝露の範囲を示す。マイクロ流体デバイスの第2のチャンネルにおける化合物損失は、吸収を指す。流量を増加させて、おそらく化合物の吸収を減少させることができる。

【0464】

40

化合物分布キットを使用して、細胞を用いたOrgan-Chipにおいて薬物研究を開始するか否かを決定することに成功した。細胞(肝臓、皮膚、肺、腎臓など)を播種したマイクロ流体デバイス中のカンナビジオール(CBDオイル)を毒性、有効性、及び/又はADMEについて試験することが企図された。化合物分布キットを実行して、いくつかの流量での能力を評価した。化合物分布キットは、完全にPDMSから製造されたマイクロ流体デバイス中の化合物の完全/全体的な吸収又は損失を発見し、これは、PDMSマイクロ流体デバイス中の細胞でCBDを試験することが、最も高流量であっても支持されない可能性が最も高い(化合物損失が大きすぎた)ことを示した。測定された化合物(CBD)の出口濃度は「0」であり、何も検出できなかった。完全にPDMSから製造されたマイクロ流体デバイスでCBDの試験を続行しないことが決定された。しかし、本明

50

細書で論じられる他の低吸収の実施形態は、細胞に対するCBDオイルの効果を試験するための優れたプラットフォームである。

【0465】

図115A～図115Dは化合物分布キットを使用して、肝臓細胞を含むPDMSマイクロ流体デバイスにおける、本明細書では化合物Zと呼ばれる化合物の吸収を試験した実験の結果を示す。図115Aは、30 μ L/時などの低い流量での化合物Zのほぼ完全な吸収を示す。図115Bは、150 μ L/時などの高流量での化合物Zの有意な吸収（ほぼ80%の損失）を示す。図115Cは、30 μ L/時での化合物の当該第1のチャンネルにおける化合物Zの細胞曝露を示す。図115Dは、150 μ L/時での化合物の当該第1のチャンネルにおける化合物Zの細胞曝露を示す。化合物損失を補償するために、より高い濃度で実験を行った。化合物Zの投与濃度を増加させ、回収した出口濃度を有効「細胞曝露濃度」として使用した。投与濃度を増加させると、偽陽性（化合物は毒性ではないが、マイクロ流体デバイスに毒性作用が見られる）の可能性が高まるが、偽陰性（化合物は実際には毒性であるが、マイクロ流体デバイスはいかなる毒性応答も示さない）の可能性は排除される。これらの実験では肝臓細胞を使用した、任意の細胞型及び関連する読み出しが企図されることに留意されたい。

10

【0466】

検証実験を通して、いくつかの変動性の源が同定された。これらの変動性の源は、化合物分布キットの全変動性を減少させるために標的化することができる。変動性は、気泡の形成を含むがこれに限定されない、経時的な培養モジュール間の差から生じる可能性がある。変動性はまた、投与濃度の問題（沈殿、計量誤差、希釈誤差など）、サンプルのプールをもたらす時点間で灌流マニホールドアセンブリ出口リザーバを吸引しないこと、サンプルの希釈をもたらす点火フラッシュ後の実験の開始時に灌流マニホールドアセンブリ出口リザーバを吸引しないこと、ピペッティングエラー、プロトコルの逸脱など、ユーザの不整合から生じる可能性がある。変動性はまた、PDMSから製造されたマイクロ流体デバイス対他のポリマーから製造されたマイクロ流体デバイス、又は処理された若しくは処理されていないマイクロ流体デバイスなどの材料同等性から生じる可能性がある。変動性はまた、化合物分布キットの使用を容易にするために特定の成分を除外することから生じる可能性がある。例えば、試験細胞と共に使用するためにマイクロ流体デバイス上で化合物分布キットを使用する場合、細胞は除外され得る。しかし、細胞の排除は、わずかな変動性を生じる可能性がある。

20

30

【0467】

6. 往復運動実験

肝臓細胞含むCOP及びPDMSマイクロ流体デバイスの両方に灌流マニホールドアセンブリを介して培地を往復させることが肝臓の再現性を改善する、かどうかを調べるために実験を行った。肝細胞のアルブミン産生を、肝臓細胞の健康状態の読み出しとして測定した。任意の細胞型が企図されるが、使用するために肝臓細胞を選択した。

【0468】

図112は、流体を往復させる前後の肝臓細胞を含むPDMS及びCOPマイクロ流体デバイスにおけるアルブミン産生のグラフを示す。図112では、流体を往復させることは、シングルパス流と比較してアルブミン産生の増加をもたらすことが分かる。

40

【0469】

図112に示される結果は驚くべきものであり、全く予想外であった。予想は、アルブミン産生速度が保存され、肝細胞機能の低下を示すので、低下しないというものであった。アルブミン産生速度の増加は、代謝機能の増加を示す。迅速な往復運動がアルブミン産生の増加をもたらすという理解を確認することが望まれた。これを行うために、科学者らは、結果／アルブミンの傾向を再現することを期待して、図112に示すデータを達成するために使用される実験計画を繰り返し、マイクロ流体デバイスをシングルパス／単方向の流れに戻した後（24時間往復させた後）、追加のアルブミンサンプルを採取した。図112に示された結果が妥当である場合、以下の実験の結果は、以前の実験で行われたよ

50

うに、マイクロ流体デバイスを24時間往復運動させた後のアルブミン産生の同様の増加を予測し、マイクロ流体デバイスをシングルパス流に戻した後、アルブミン産生レベルが低下する可能性があることが分かる。

【0470】

図113は、流体を往復させる前後の肝臓細胞を含むPDMSマイクロ流体デバイスにおけるアルブミン産生を示す。図113の結果は、往復運動プロトコルとアルブミン産生増加との関連を確認し、現象の可逆性を示している。

【0471】

図112及び図113に示すデータに基づいて、往復運動はCOP及びPDMSマイクロ流体デバイスの両方でアルブミン産生を改善することが分かった。更に、アルブミン産生は、往復運動の使用後、COP及びPDMSマイクロ流体デバイスの両方において生理学的に適切なレベルであった。

【0472】

7. インキュベータ実験を使用したガス透過性マイクロ流体デバイスのガス制御

前述のように、マイクロ流体デバイス内のガス濃度は、ガス制御インキュベータを使用して制御することができる。以下に記載される実験は、米国特許第8,647,861号のマイクロ流体デバイスなどのガス透過性材料から製造された完全にガス透過性のマイクロ流体デバイス(12)に関することに留意されたい。

【0473】

細胞が曝露される様々なガスのうち、酸素又はその欠乏は、多くの基本的な細胞の特性及びプロセスに参与する。図116は、様々なヒト器官における酸素分圧を示す。酸素、二酸化炭素、及び様々なガスは、細胞の生物学的機能に影響を及ぼすことが知られており、組織及び様々な疾患状態に大きな影響を及ぼす可能性がある。例えば、酸素分圧は器官全体で人体において劇的に異なるが、伝統的な細胞培養技術はこれを考慮していない。

【0474】

ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)の酸素微小環境を修正するために、ガス制御インキュベータを所望の酸素設定点に設定し、所望の細胞培養プロトコルに従うことができる。図117は、ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)におけるガス交換の図を示す。図117を参照すると、ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)におけるガス輸送の方法は、インキュベータとマイクロ流体デバイス材料との間、マイクロ流体デバイス材料と細胞培養培地との間、及び細胞培養培地と細胞(33)との間のガス交換を含む。ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)がインキュベータの酸素と平衡化されると、第1のチャンネル(3)及び第2のチャンネル(4)は同等の酸素濃度を経験するとみなすことができる。更に、シリコンから製造されたものなどの高透過性マイクロ流体デバイス(12)を使用する場合、灌流マニホールドアセンブリリザーバ内の入口培地酸素濃度及び流量は、ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)内の酸素微小環境に大きく影響しない。細胞(33)及び微生物(36)の添加は、細胞の酸素消費に基づいて独立してチャンネル酸素濃度を変化させることに留意されたい。

【0475】

計測に関して、いくつかの例示的な機器が実験によって見出された。Thermo Scientific(商標)Heracell(商標)240iは、信頼性及び効率のための最良のガス制御インキュベータであることが見出された。一般に、任意の標準的な細胞培養インキュベータが別個のガスコントローラと共に使用され得ることが見出された。BioSpherix ProOx 360は、窒素を注入してインキュベータ内の酸素を置換し、インキュベータ内に配置された酸素センサによって調節される最良のガスコントローラであることが見出された。

【0476】

実験を開始するために、インキュベータは大気条件にある。インキュベータ、したがってガス透過性マイクロ流体デバイス(12)、灌流マニホールドアセンブリ(14)、及び培養モジュール(42)に低酸素を誘導するには、図118に見られ得るようにかなり

の時間がかかる場合がある。図 1 1 8 は、細胞培養インキュベータ内にある間の様々な酸素相に対するガス透過性マイクロ流体デバイス (1 2) 応答の結果を示す図である。培養モジュール内で $30 \mu\text{L}/\text{時}$ の流量で流れているガス透過性マイクロ流体デバイス (1 2) 出口の酸素測定を行い、流れは入口への 18.5% 酸素を伴う。図 1 1 8 に見られるように、インキュベータは、大気酸素レベル (加湿インキュベータ内で 18.5%) で開始し、 1% 酸素設定点に到達し (ロングテールエンドで見られる)、インキュベータが大気に開放されると大気酸素に戻る。

【0 4 7 7】

ガス透過性マイクロ流体デバイス (1 2) において平衡が達成されると、マイクロ流体デバイス (1 2) が高透過性マイクロ流体デバイス材料から製造される場合、第 1 (3) 及び第 2 (4) のチャネルガス濃度は、流体又は培地を流す際にインキュベータ酸素設定点を維持する。したがって、マイクロ流体デバイスが高度に透過性である場合、入口流体又は培地濃度はほとんど重要ではない。この点は、図 1 1 9 に見られるように、実験中に証明された。図 1 1 9 は、 1% 酸素インキュベータ内の 18.5% 酸素 (酸素化) 又は $1 \sim 5\%$ 酸素 (低酸素) 濃度のいずれかを有する培養モジュールにおける $100 \mu\text{L}/\text{時}$ の水流下でのマイクロ流体デバイス出口の実験的酸素測定の結果を示す。ガス透過性マイクロ流体デバイス (1 2) 及びシステムを、12 時間前にインキュベータ環境に平衡化した。 $100 \mu\text{L}/\text{時}$ で完全酸素化水又は低酸素 ($1 \sim 5\%$ 酸素) 水を流すと、第 1 (3) 及び第 2 (4) のチャネル酸素出力は、数分以内に $1.5 \sim 2\%$ 酸素未満に達する。実験はまた、図 1 2 0 に示すように、有限要素解析ソフトウェア COMSOL Multiphysics を使用して、三次元ガス透過性マイクロ流体デバイスモデルでシミュレート及び確認された。図 1 2 0 は、酸素化培地を用いた同じ条件の PDMS マイクロ流体デバイスの第 1 のチャネル及び第 2 のチャネル体積平均の COMSOL Multiphysics シミュレーションプロットの結果を示す。したがって、ガス制御インキュベータを使用して完全にガス透過性のマイクロ流体デバイス (1 2) 内のガス濃度を制御することは非常に効果的であることが分かる。

【0 4 7 8】

更に、 $1000 \mu\text{L}/\text{時}$ 未満の流量は、これらのマイクロ流体デバイス (1 2) 及びインキュベータ自体を構成する高透過性材料の高い拡散速度のために、チャネル酸素濃度にあまり寄与しない。酸素は、流動培地内で置換されている酸素よりもはるかに速く流体又は培地から拡散する。図 1 2 1 は、 1% 酸素インキュベータ内の酸素化入口水を用いた $30 \mu\text{L}/\text{時}$ 及び $1000 \mu\text{L}/\text{時}$ の流量に対する PDMS マイクロ流体デバイスの第 1 及び第 2 のチャネル体積平均の COMSOL Multiphysics シミュレーションプロットの結果を示す。図 1 2 1 では、培養モジュール (4 2) 内のガス透過性マイクロ流体デバイス (1 2) のガス環境を制御する際に、流量は実質的に可変ではないことが分かる。

【0 4 7 9】

更に、インキュベータドアを開き、インキュベータ内の酸素レベルをリセットすることを含む、図 7 の流体リザーバ (1 9) などの流体リザーバを補充する必要があるため、高流量はあまり実用的ではない。図 1 1 8 は、ガス透過性マイクロ流体デバイス (1 2) 内の酸素レベルに対するインキュベータドアを開く影響を示す。流量を変更するためにドアを開く、マイクロ流体デバイスにアクセスする、別の実験にアクセスするなど、インキュベータ環境が乱れると、マイクロ流体デバイスの平衡は流動する。ガス透過性マイクロ流体デバイス (1 2) 内の酸素の拡散は数分で起こるため、チャネル (3、4) は、インキュベータの酸素濃度が上昇し、設定点に戻るまで低下する間に再平衡化する。素早くドアを開けると、嫌気性インキュベータ内でわずかな酸素上昇及び比較的短いマイクロ流体デバイスの回収時間 (数時間の範囲内) のみを引き起こす可能性があり、図 1 2 2 に見られるように、5 秒間ドアを開けた場合、ガス透過性マイクロ流体デバイス (1 2) 酸素濃度が 2% 未満に達するまでに、更に 1.5 時間かかる。図 1 2 2 は、インキュベータのドアを開いた際の回復時間の結果の図を示す。酸素測定は、 1% 酸素に設定したインキュベ

タ内の培養モジュール内で $100\mu\text{L}/\text{時}$ の水流下でマイクロ流体デバイスの出口で行った。マイクロ流体デバイス、培養モジュール、及びシステムの残りの部分を、12時間前にインキュベータ環境に平衡化した。インキュベータのドアを5秒間開いてから測定を開始した。大型のシングルドアインキュベータは、マルチドア又は高窒素圧力入力システムよりも効率が悪い、酸素回収時間はインキュベータ及びガス制御システムに大きく依存する。

【0480】

低酸素インキュベータ及び灌流マニホールドアセンブリ(14)の外側でのガス透過性マイクロ流体デバイスの取り扱いは、ガス透過性マイクロ流体デバイスでの低酸素実験中に可能な限り迅速に行われなければならない。低酸素実験中にガス透過性マイクロ流体デバイス(12)に非常に短い時間しかアクセスできないことは、マイクロ流体デバイスに細菌を接種するなど、マイクロ流体デバイスに直接アクセスする必要があるプロトコルステップに影響を与える可能性がある。COMSOLシミュレーションは、図123に見られるように、酸素濃度が数分以内に連続的に倍増し、30分以内に大気酸素に達することを示している。図123は、1%酸素に平衡化され、大気酸素に曝露された静的PDMSマイクロ流体デバイス(12)のPDMSマイクロ流体デバイス(12)の第1(3)及び第2(4)のチャネル体積平均のCOMSOL Multiphysicsシミュレーションプロットの結果を示す。実験結果は、培養モジュール(42)及び灌流マニホールドアセンブリ(14)の外側のガス透過性マイクロ流体デバイス(12)について約6分の酸素半減期を結論付けた。5回の半減期の後、定常状態に達したと考えられ(定常状態の97%)、これは約30分に相当し、COMSOLシミュレーションが確認される。

【0481】

ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)、灌流マニホールドアセンブリ(14)、及び培養モジュール(42)を含む本システムの実験タイミングが見出された。細胞培養インキュベータは、低酸素又は嫌気性酸素レベルに達するのに2~5時間かかることが見出された。ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)は、灌流マニホールドアセンブリ(14)及び培養モジュール(42)に接続したインキュベータ内にある場合、3時間で低酸素又は嫌気性酸素平衡に達することが見出され、酸素の半減期は、その実験設定でガス透過性マイクロ流体デバイス(12)では35分であることが見出された。ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)は、灌流マニホールドアセンブリ(14)及び培養モジュール(42)に接触せずにインキュベータ内にある場合、30分で低酸素又は嫌気性酸素平衡に達することが見出され、酸素の半減期は、インキュベータ内のガス透過性マイクロ流体デバイス(12)単独では6分であることが見出された。

【0482】

細胞の酸素消費は、ガス透過性マイクロ流体デバイス(12)内の全酸素の枯渇に大きく寄与することができる。2020nmol/時の酸素取り込み速度を特徴とする結腸上皮細胞などの高度に代謝性の細胞を考慮すると、チャネル酸素レベルは、標準的な酸素化細胞培養条件下で異なる。COMSOLを使用すると、図124に見られるように、平均上部及び底部チャネル酸素濃度は、それぞれ14%及び12%に達する。図124は、 $100\mu\text{L}/\text{時}$ の水流量での培養条件又は18.5%酸素インキュベータ及び18.5%酸素入口水における播種Caco-2細胞を有するマイクロ流体デバイスのPDMSマイクロ流体デバイスの第1及び第2のチャネル体積平均のCOMSOL Multiphysicsシミュレーションプロットの結果を示す。しかし、酸素濃度が細胞層の近くで減少し、図125に見られるように細胞層の中央で2%程度の低い酸素に達する局所的な微小勾配も形成される。図125は、Caco-2細胞を添加したPDMSマイクロ流体デバイス酸素微小環境を示す。図125は、マイクロ流体デバイスの中心における水の酸素濃度の断面表面ポットを示す。図124及び図125に示される結果をもたらししたシミュレーションは、実験を設計する際に細胞の酸素取り込み及び放出を考慮することの重要性を強調している。

【0483】

上記の研究は、ガス透過性マイクロ流体デバイスのガス環境が、ガス制御インキュベータ内に配置された培養モジュールによって容易に修正することができることを実証している。他の応用としては、高酸素環境（高酸素）又は様々なガス状伝達物質の導入が挙げられる。第1及び第2のチャンネルを独立して制御することは困難であり、細胞代謝を考慮しない場合、マイクロ流体デバイス全体が同じガス組成を経験することに留意されたい。細胞代謝は、ガス微小環境に大きく寄与し、局所的なガス勾配を導入することさえある。低酸素条件のための低酸素染色を組み込むなど、ガス制御実験を行う場合、追加のエンドポイント及び対照を考慮すべきである。

【図面】

【図 1】

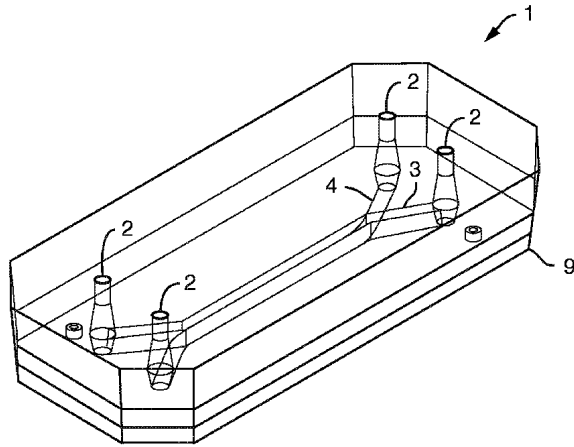


FIG. 1

【図 2】

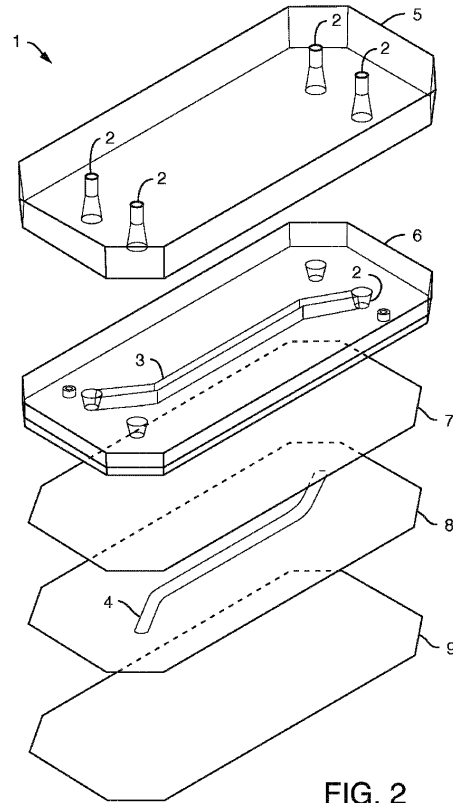


FIG. 2

10

20

30

40

50

【図 3】

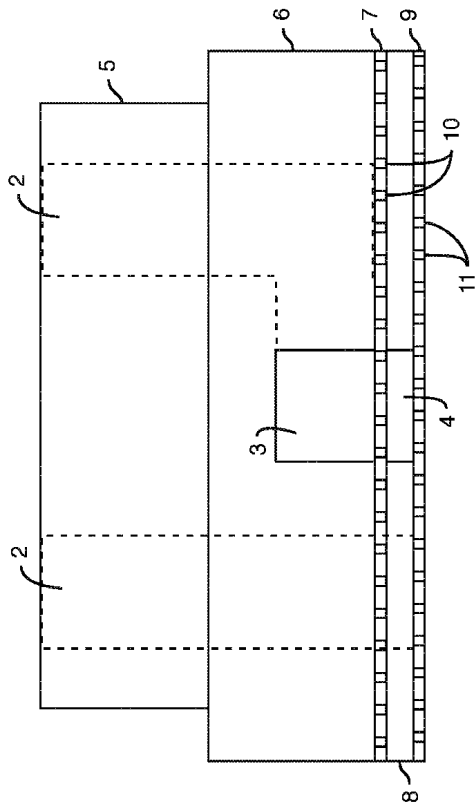


FIG. 3

【図 4】

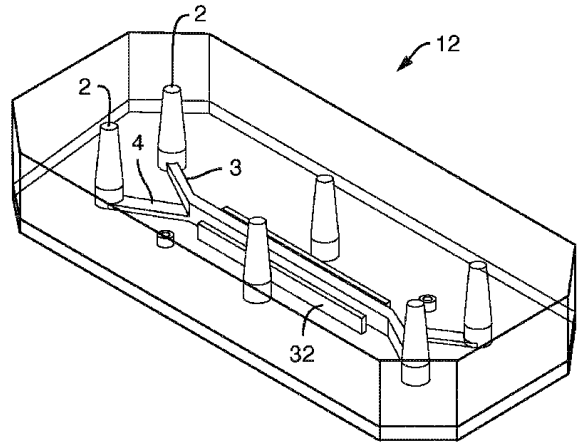


FIG. 4

【図 5】

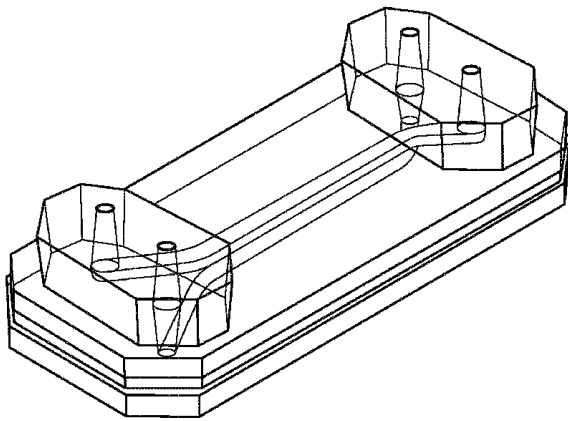


FIG. 5

【図 6】

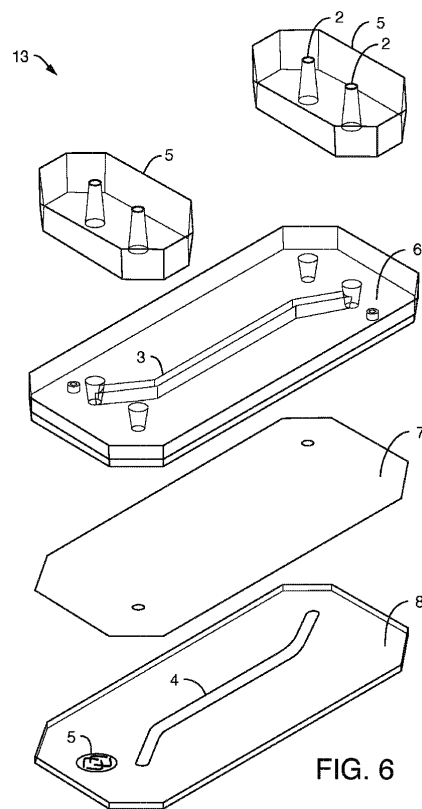


FIG. 6

10

20

30

40

50

【図 7】

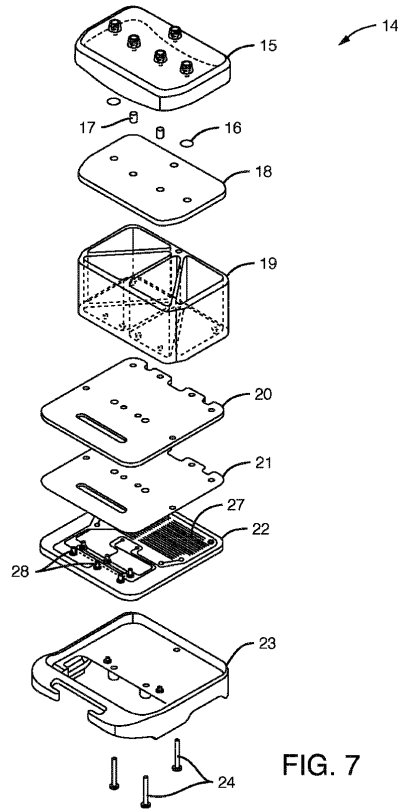


FIG. 7

【図 8】

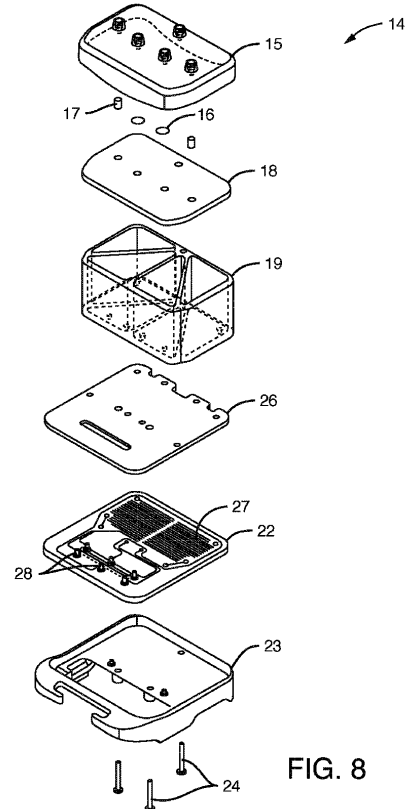
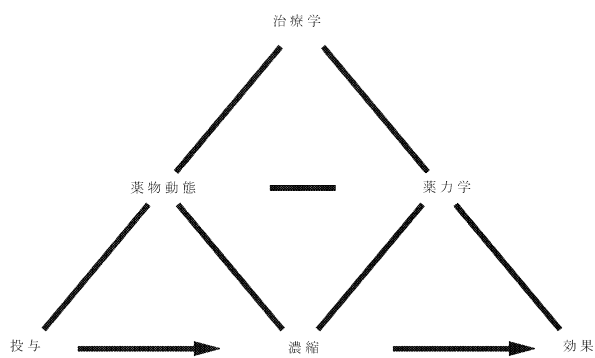
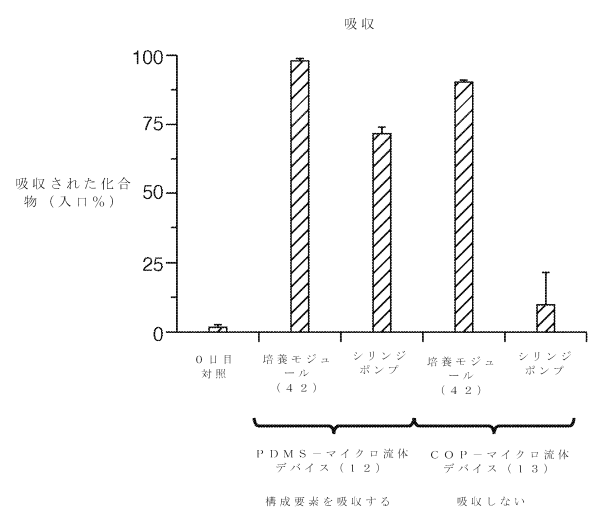


FIG. 8

【図 9】



【図 10 A】



10

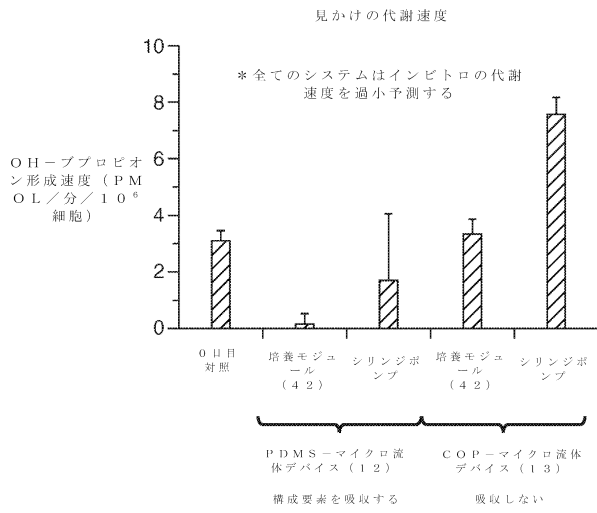
20

30

40

50

【図 10 B】



【図 11】

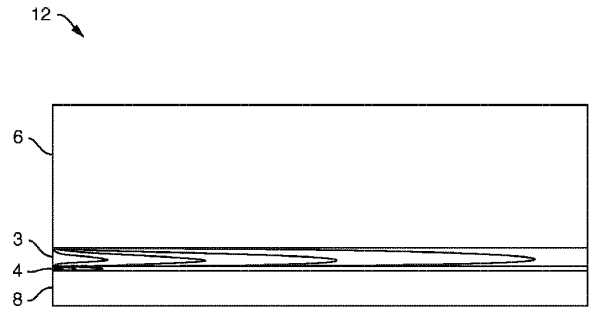
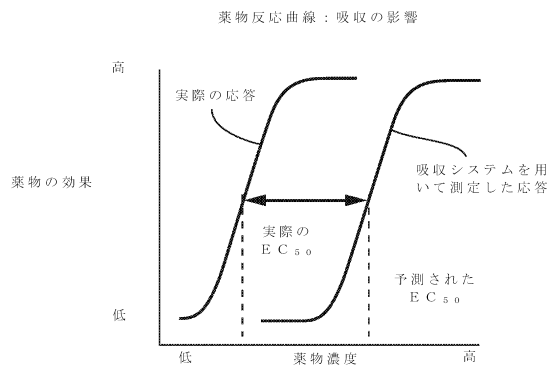


FIG. 11

10

【図 12】



【図 13 A】

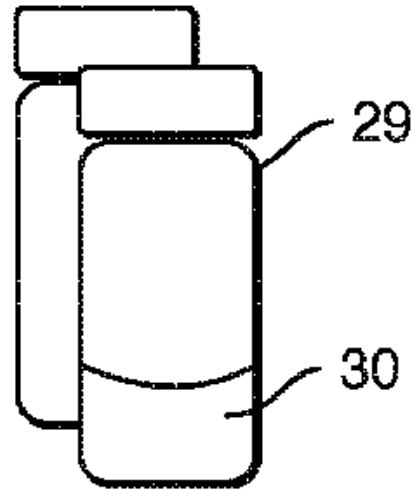


FIG. 13A

20

30

40

50

【図 13 B】

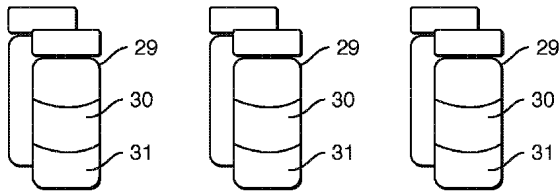
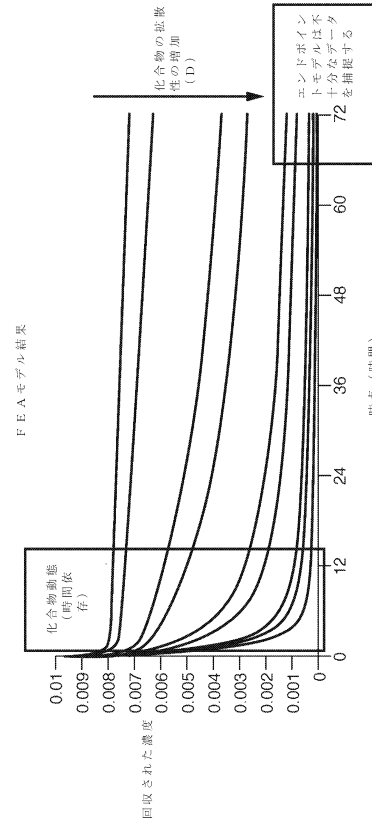
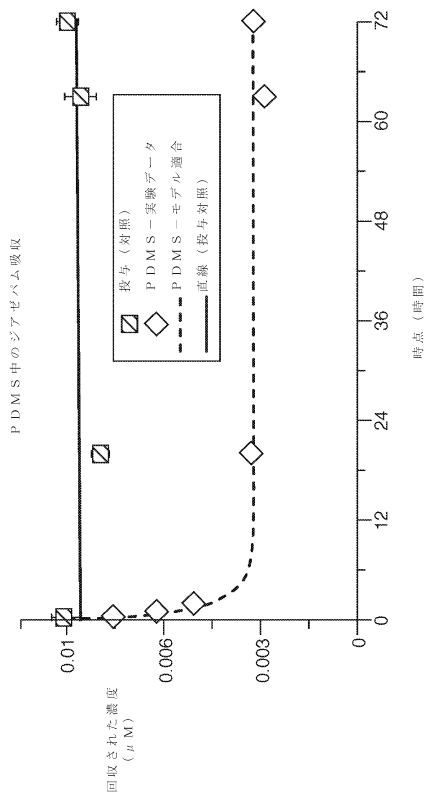


FIG. 13B

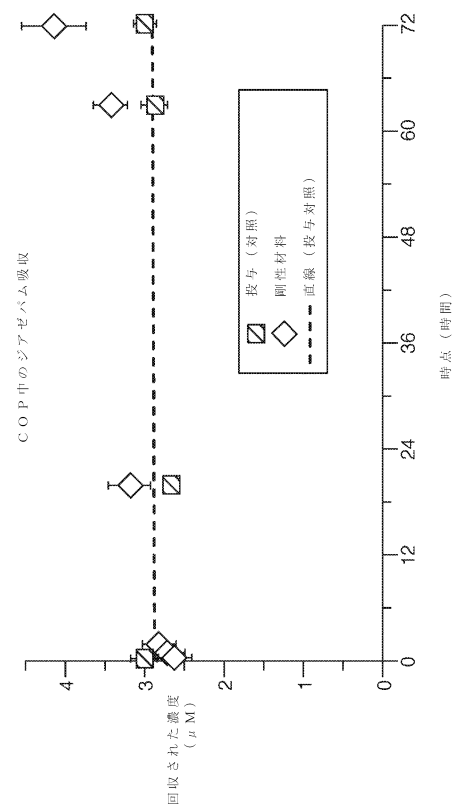
【図 14】



【図 15 A】



【図 15 B】



10

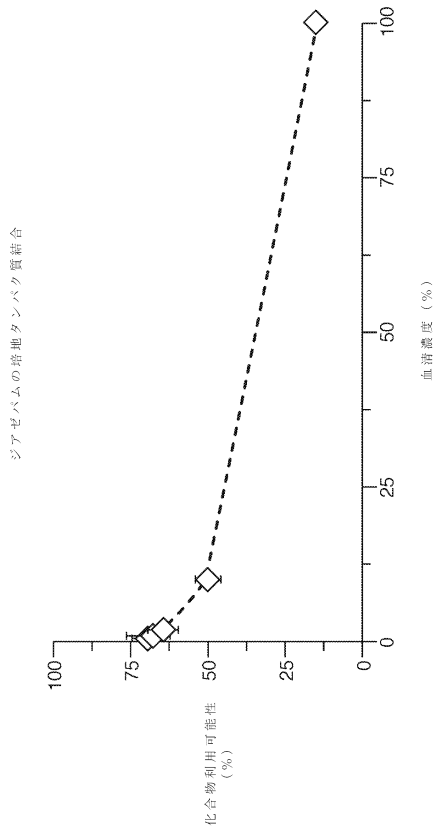
20

30

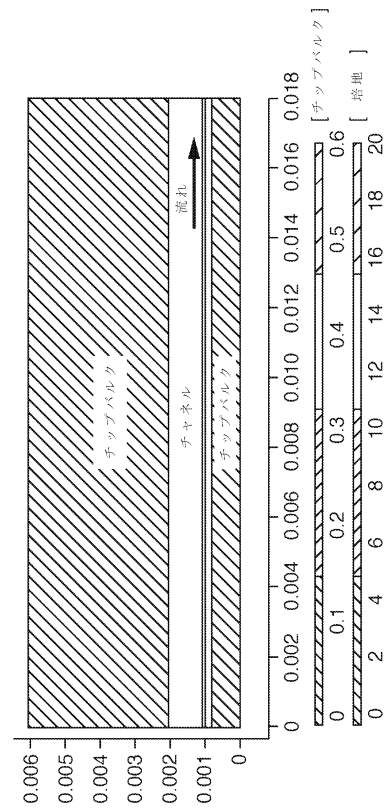
40

50

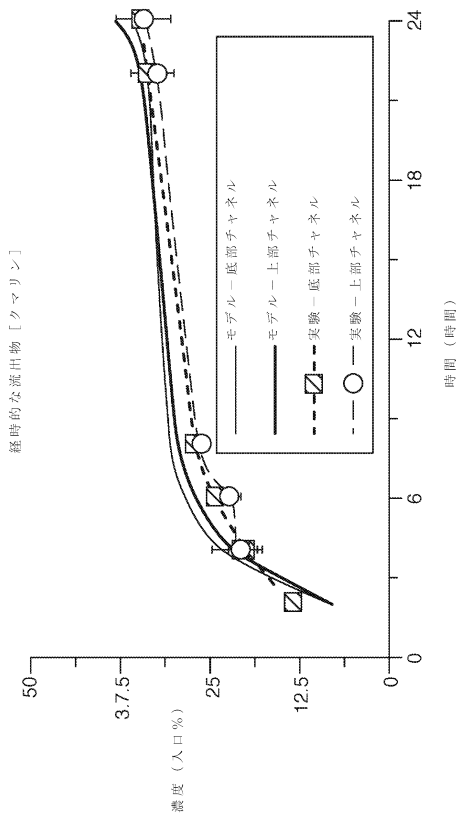
【図 1 6】



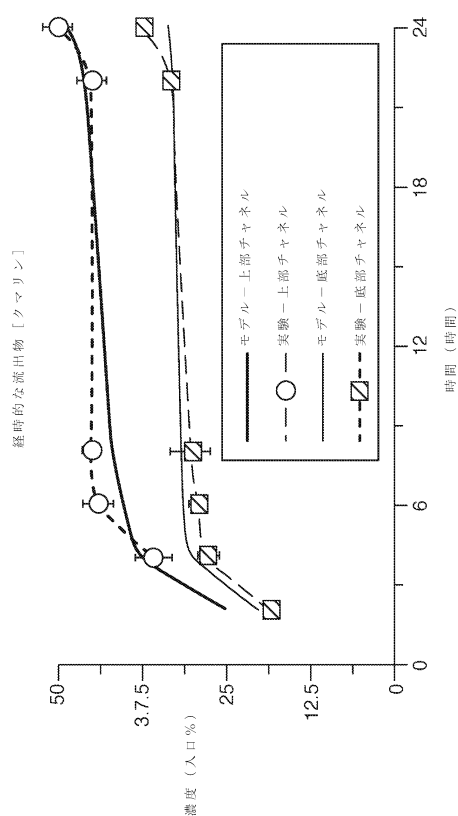
【図 1 7】



【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



10

20

30

40

50

【図 19】

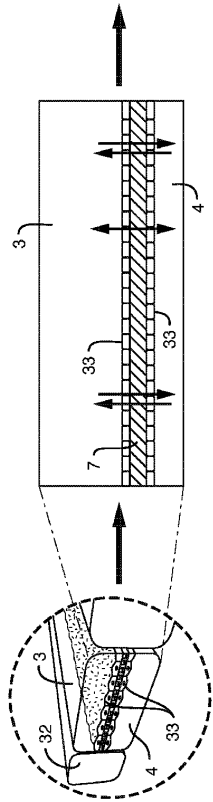
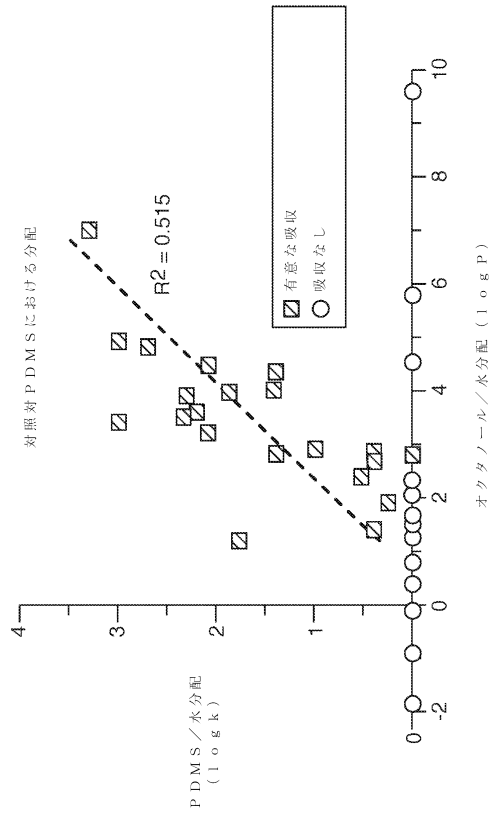
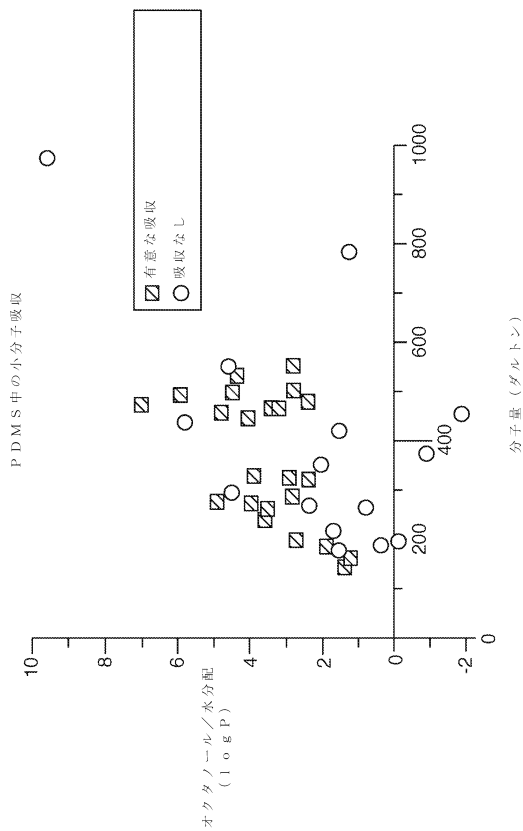


FIG. 19

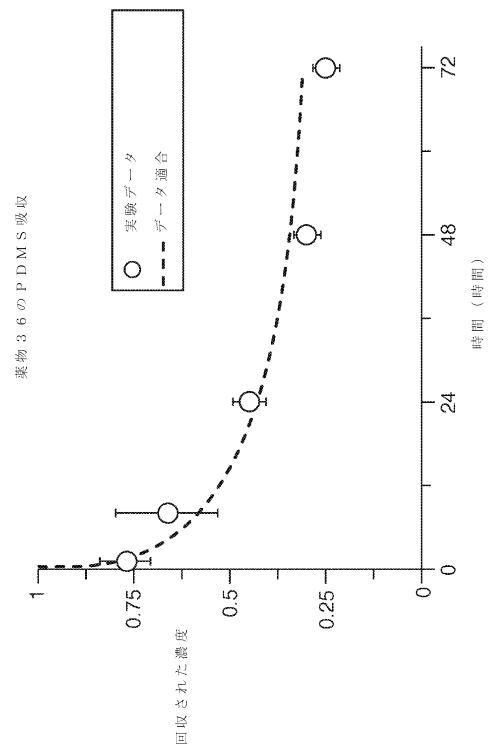
【図 20 A】



【図 20 B】



【図 21 A】



10

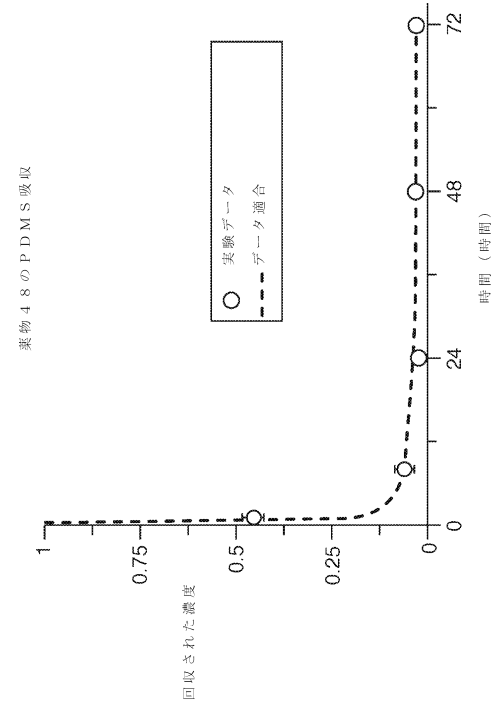
20

30

40

50

【図 2 1 B】



【図 2 2】

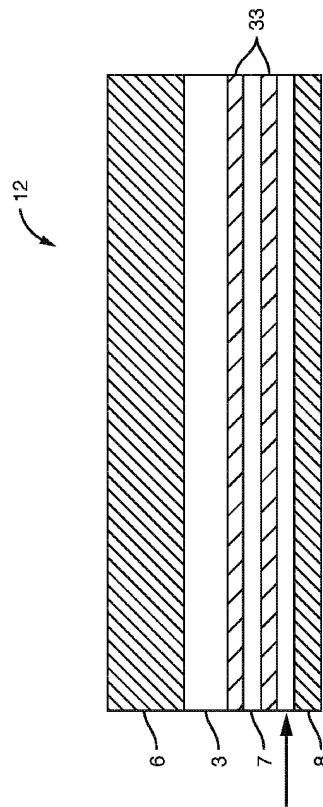


FIG. 22

【図 2 3 - 1】

表 1 . 1 . ポリマーの機械的特性					
ポリマー	伸張強度 (M P A)	曲げ強度 (M P A)	破断点伸び (%)	降伏点 (%)	ノッチ付きアイ ソッドの衝撃強 度
樹脂 / 表面 - 含有ポリマー					
低密度ポリエチレン (L D P E)	10	0.25	400	19	1.064
高密度ポリエチレン (H D P E)	32	1.25	150	15	0.15
架橋ポリエチレン (P E)	18	0.5	350	N Y	1.064
ポリプロピレン (P P)	26	2	80	N Y	0.05
エチレン-プロピレン	26	0.6	500	N Y	0.15
ポリメチルペンテン	28	1.5	15	6	0.04
スチレン-ブタジエン	28	1.6	50	N Y	0.08
スチレン-エチレン ブチレン-スチレン	6	0.02	800	N Y	1.064
超弾性ポリスチレン (P S)	42	2.1	2.5	1.8	0.1
P S , 一般の目的	34	3	1.6		

図 2 3

【図 2 3 - 2】

樹脂 - 含有ポリマー									
エポキシ、 一般	600	80	1.3	N A	0.5				R M 113
アセタール (ポリオキシメチレン)	50	27	20	8	0.10				R M 109
ポリスチレン (ビスフェノール)、 ポリスチレンラミナート	280	16	1.5	N A	1.064				R M 125
ポリエスカル (電気絶縁樹脂)	40	9	2	N A	0.4				R M 125
ポリプロピレンアタラート	52	2.1	250	4	0.06				R M 70
ポリエチレンテレフタラート (P E T)	55	2.3	300	3.5	0.02				R M 30
ポリエーテルエーテルケトン (P E E K)	92	3.7	S O	4.3	0.083				R M 99
ジアリルイソフタラート	82	11.3	0.9	N A	0.37				R M 112
ジアリルフタラート	70	10.6	0.9	N A	0.41				R M 112
アルキド樹脂ガラス繊維、強化	72	8.6	0.8	N A	0.24				R M 125
ポリアラタート	68	2.2	50	8.8	0.29				R R 125
ポリカルボナート (P C)	S O	2.1	200	3.5	0.05				R M 70
ポリフエニレンオキシド	65	2.5	60	4.5	0.16				R R 119
フェノール-ホルムアルデヒド	45	6.5	1.2	N A	0.024				R M 114

図 2 3 . 1
続き

【図 2 3 - 3】

スチレン-マレイン酸	52	3	1.8	2	0.03	RL 105
酢酸セルロース	30	1.7	60	4	0.26	RR 71
プロピオン酸セルロース	35	1.76	60	4	0.13	RR 94
酢酸酢酸セルロース	70	2.9	2.5	N/A	0.02	RM 92
エチレン酢酸ビニル	17	0.02	750	N/A	1.064	SA 85
炭素-含有ポリマー						
ポリアミド (PA) 6	40	1	60	4.5	0.25	SD 75
PA 4,6	100	1	30	11	0.1	SD 85
PA 11	52	0.9	320	20	0.05	RR 105
PA 6,9	SO	1.4	15	10	0.06	SD 78
PA 12	SO	1.4	200	6	0.06	RR 105
PA 6,6	59	1.2	60	4.5	0.11	RR 90
PA 6,12	51	1.4	300	7	0.04	RR 105
ナイロン/アクリロニトリル-ブタジエンスチレン (ABS) アロイ	47	2.14	270	6	0.85	RR 99
PA-イミド	185	4.58	12	8	0.13	RM 109
ポリイミド	72	2.45	8	4	0.08	RM 100
ポリエーテルイミド	105	3.3	60	8	0.1	RM 109

図 2 3 . 2
続き

【図 2 3 - 4】

ポリウレタン (PU) 熱可塑性エラストマー	24	0.003	700	N/A	1.064	SA 70
エーテルエポキシアルキドエラストマー	57	10	0.6	N/A	0.02	RM 115
炭素粉末/アルデヒド	72	3.6	2.4	3.5	0.02	RM 80
スチレン/アクリロニトリル	34	2.1	6	2	0.18	RR 96
ABS	35	2.5	10	3.3	0.1	RR 106
アクリラート-スチレン/アクリロニトリル	フッ素-含有ポリマー					
ポリトリブチルエーテル	25	0.70	400	70	0.16	RM 69
ポリビニルフルオリド	40	1.4	150	30	0.18	SD 80
ポリビニルデンフルオリド	100	5.5	6	N/A	0.12	SD 90
ペルフルオロアルキルエーテル	29	0.7	300	85	1.064	SD 80
エチレン/トリブチルフルオリド/エチレン	28	1.4	150	15	1.064	RR 80
エチレン/トリブチルフルオリド/エチレン	30	1.7	200	5	1.064	RR 93
フルオロエチレン/トリブチルフルオリド	14	0.6	150	6	1.064	RR 45

図 2 3 . 3 続き

【図 2 3 - 5】

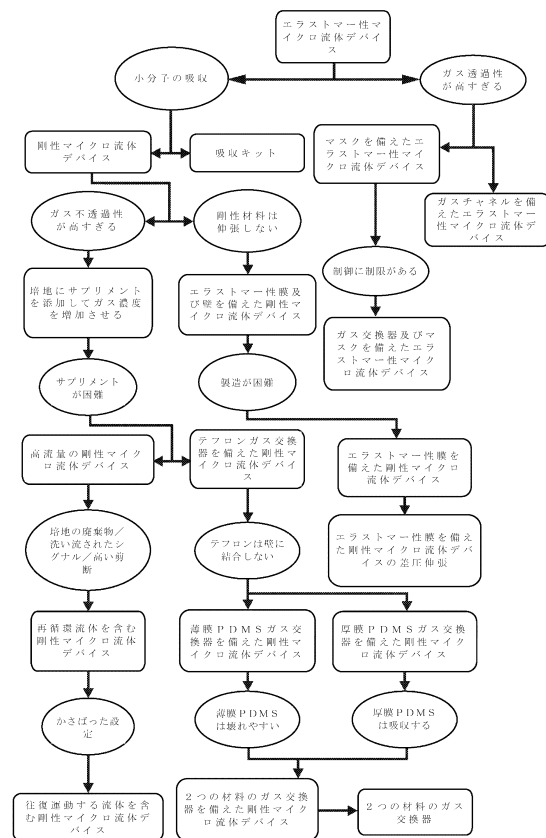
塩素化（ポリ塩化ビニル）PVC	58	3.1	30	5	0.06	SA 70
無塩 PVC（UPVC）	51	3	60	3.5	0.08	RR 110
可塑 PVC	14-20	0.007 0.03	280-9S	NY	1.05+	SA 85
塩素 - 含有ポリマー						
ポリフエニレンスルフィド	91	13.8	0.6	NA	0.6	RR 121
ポリスルホン	70	2.6S	80	5.5	0.07	RM 69
ポリエーテルスルホン	84	2.6	60	6.6	0.084	RM 85
シリコン - 含有ポリマー						
シリコン	28	3.5	2	NA	0.02	RM 80
ポリジメチルシロキサン		0.001 - 0.002				

※ノッチ付きアイソゾット衝撃強度の典型的な値である。アイソゾット試験で破壊されない材料は、1、0.6 + KJ/M の値であり、+は、試験が作成できるより低い衝撃エネルギーを有することを示す。

N/A = 材料が脆く、降伏点を示さない場合
N/Y = 材料が脆性であり、脆化点を示さない場合
RM = ロックウェール M 12.3 硬度（硬）
RR = ロックウェール R 11.2 硬度
SA 6.5 = ショア A 6.5 硬度（軟）
SD 7.5 = ショア D 7.5 硬度

図 2 3 . 4 続き

【図 2 4】



【図 25 A】

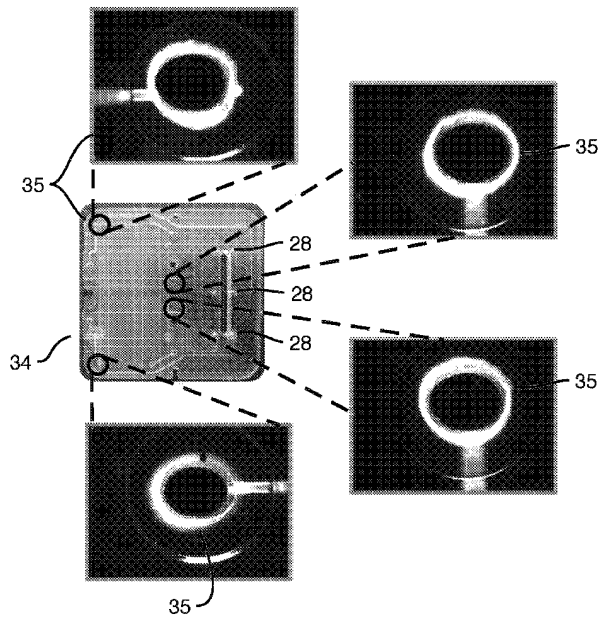


FIG. 25A

【図 25 B】

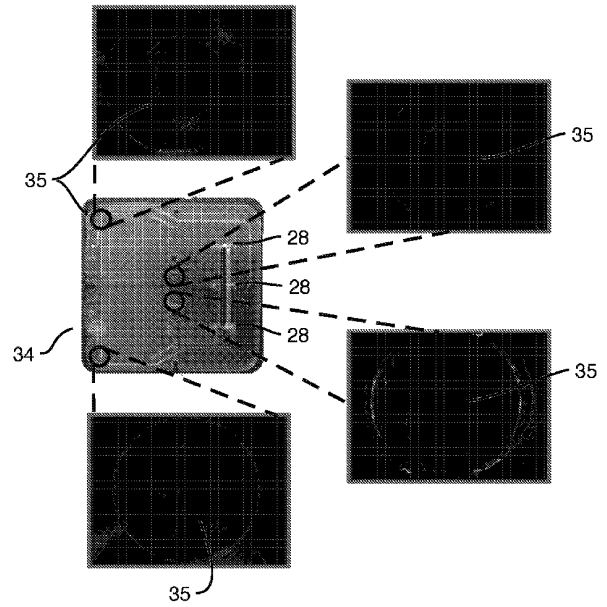
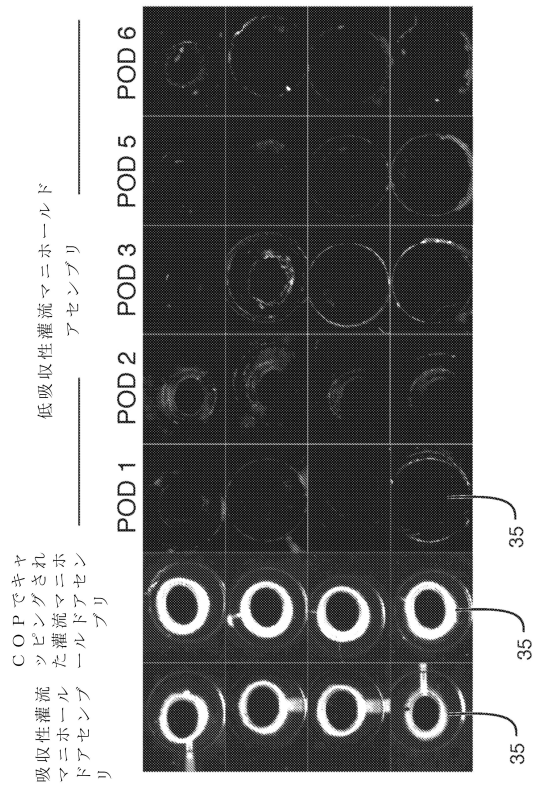


FIG. 25B

10

20

【図 26】



【図 27 A】

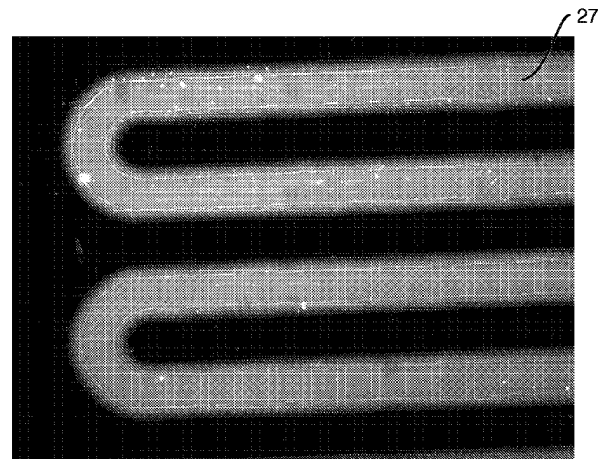


FIG. 27A

30

40

50

【図 27 B】

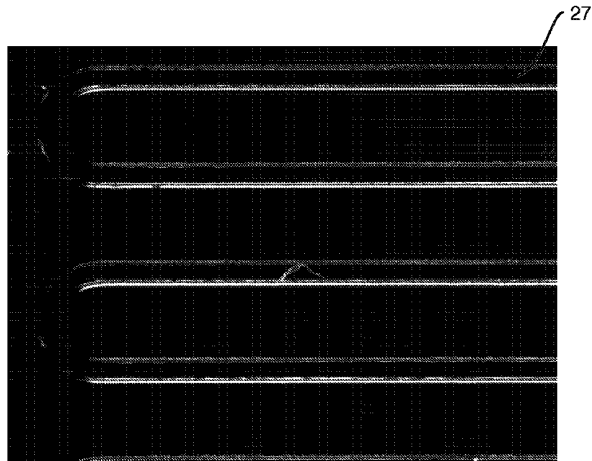


FIG. 27B

【図 28 A】

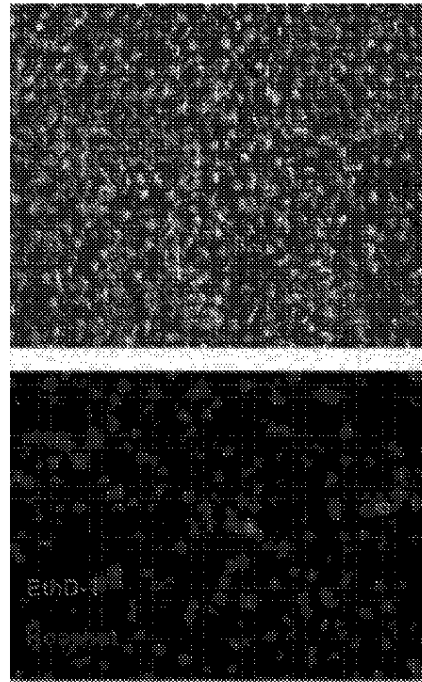
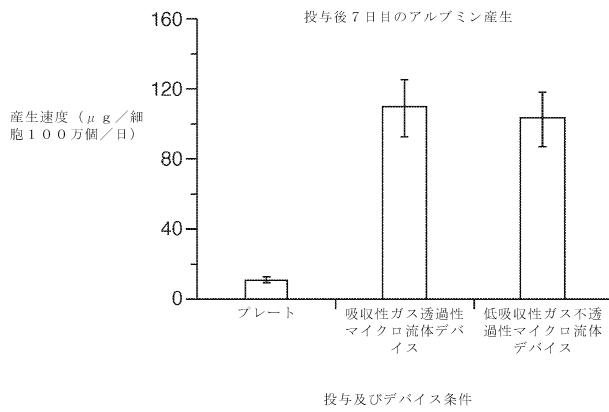
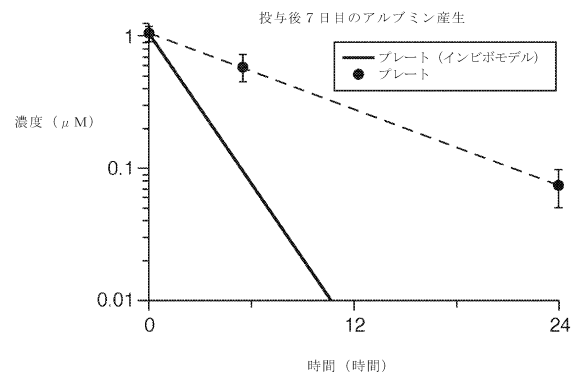


FIG. 28A

【図 28 B】



【図 29 A】



10

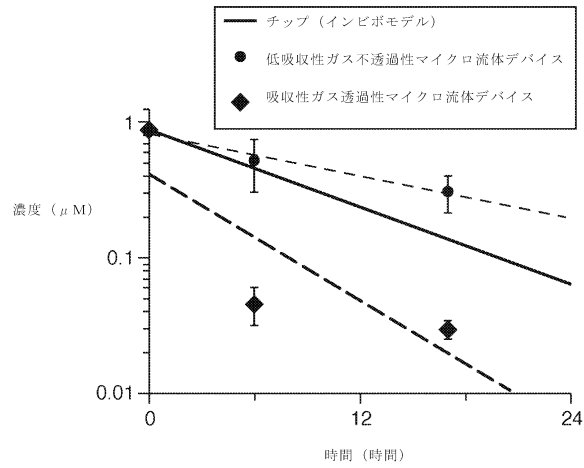
20

30

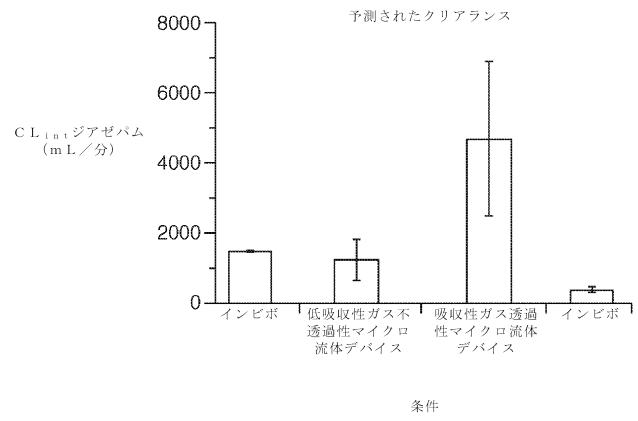
40

50

【図 29 B】



【図 30】



10

【図 31】

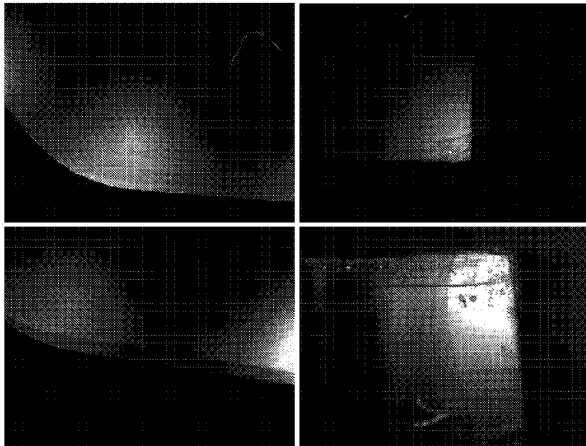


FIG. 31

【図 32】

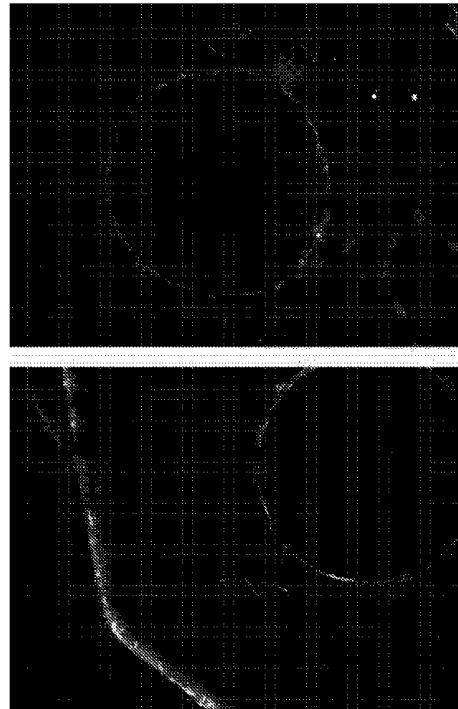


FIG. 32

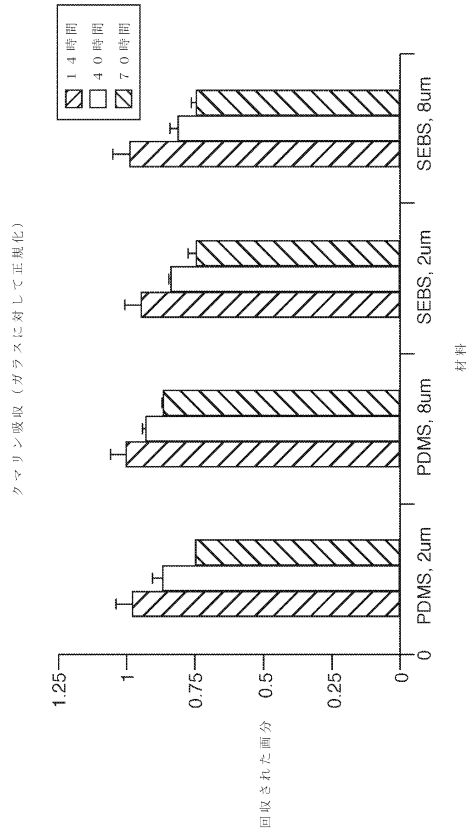
20

30

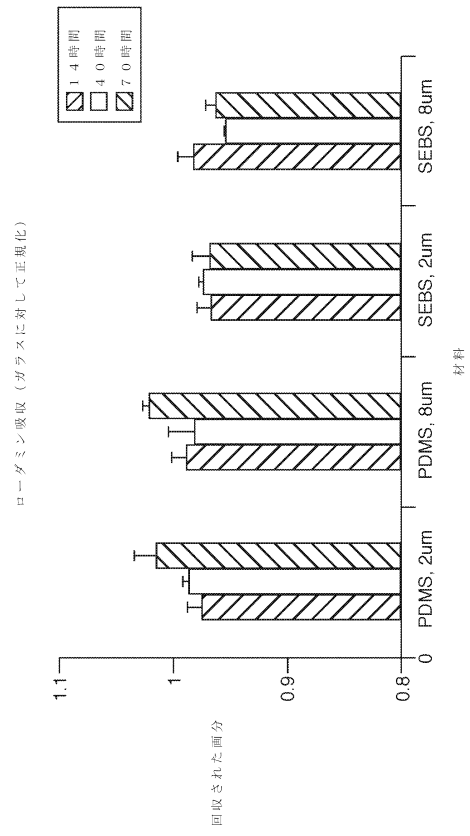
40

50

【図 3 3 A】



【図 3 3 B】



【図 3 4】

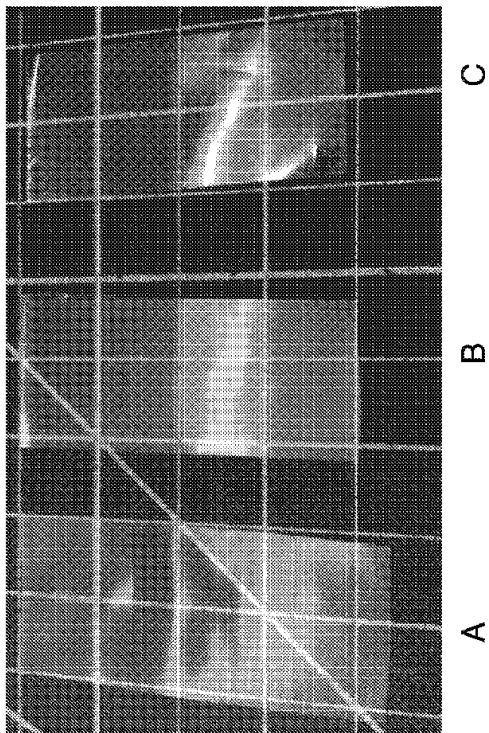


FIG. 34

【図 3 5 A】

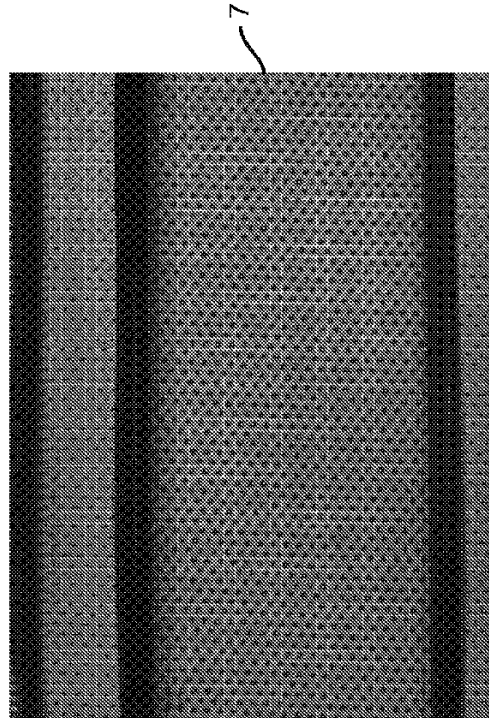


FIG. 35A

10

20

30

40

50

【図 3 5 B】

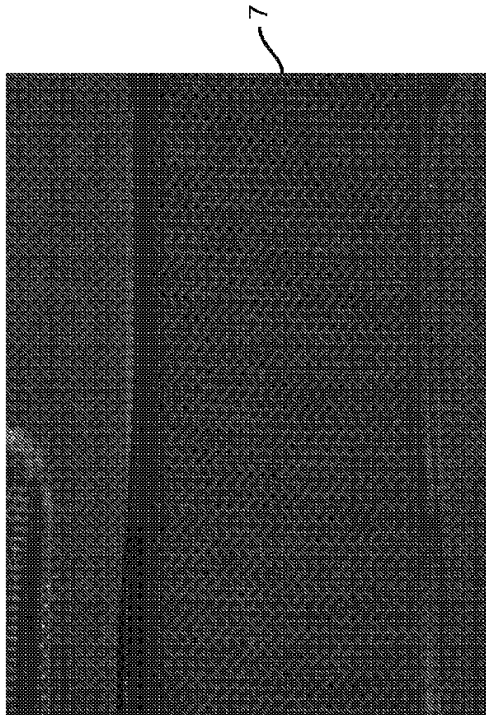
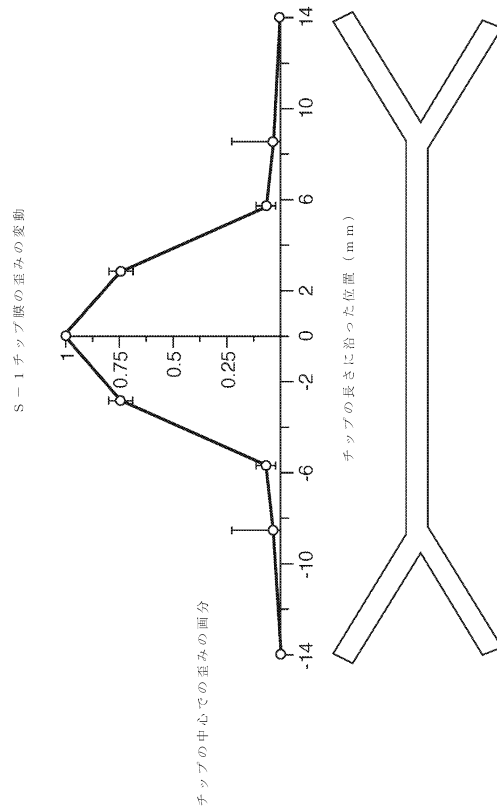


FIG. 35B

【図 3 6】



10

20

【図 3 7 A】

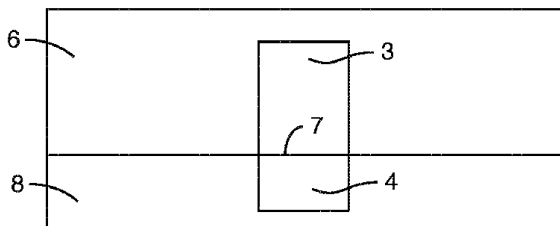


FIG. 37A

【図 3 7 B】

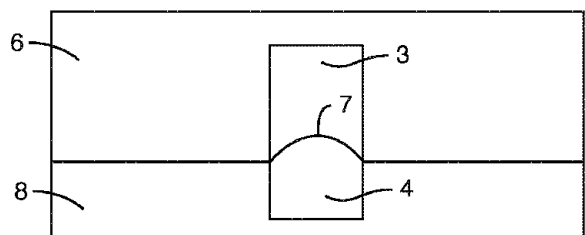


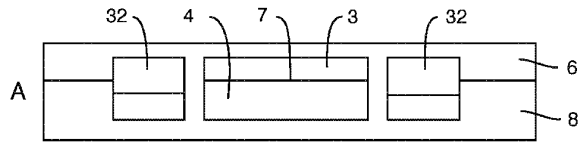
FIG. 37B

30

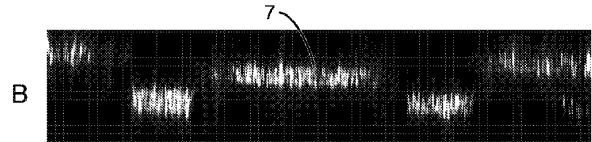
40

50

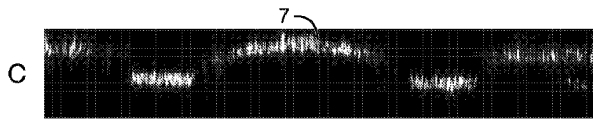
【図 38 A】



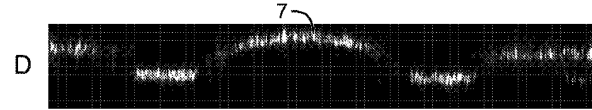
【図 38 B】



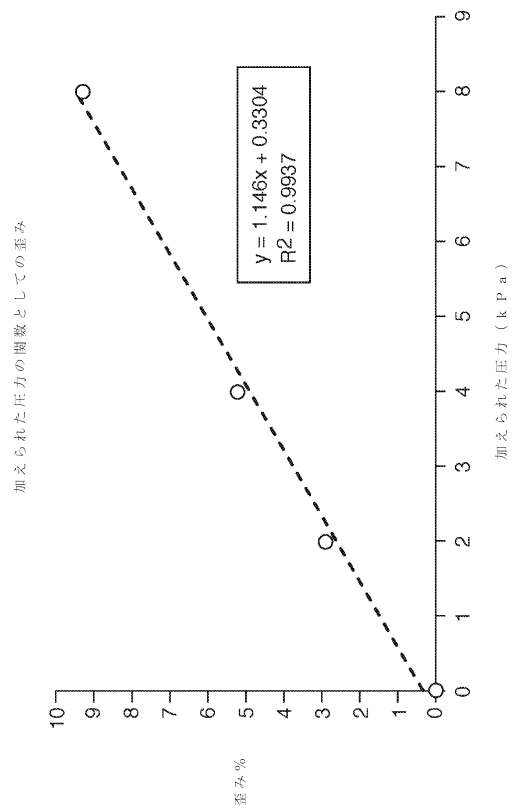
【図 38 C】



【図 38 D】



【図 39】



【図 40】

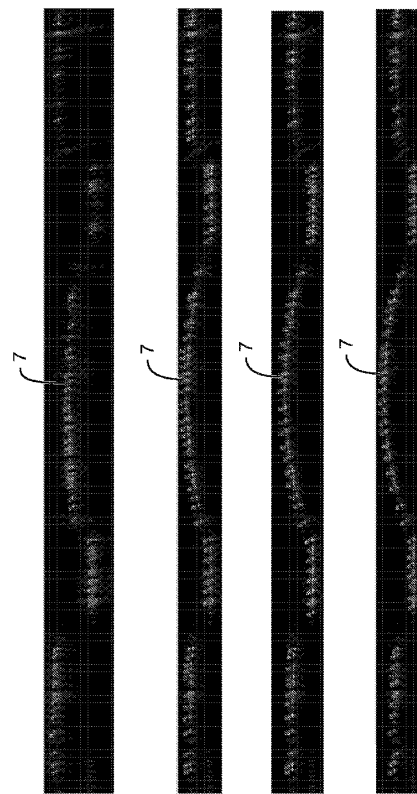


FIG. 40

10

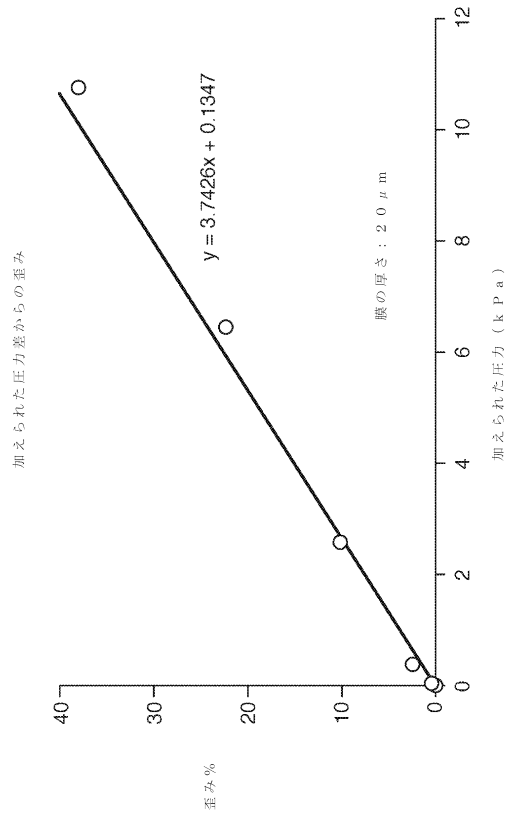
20

30

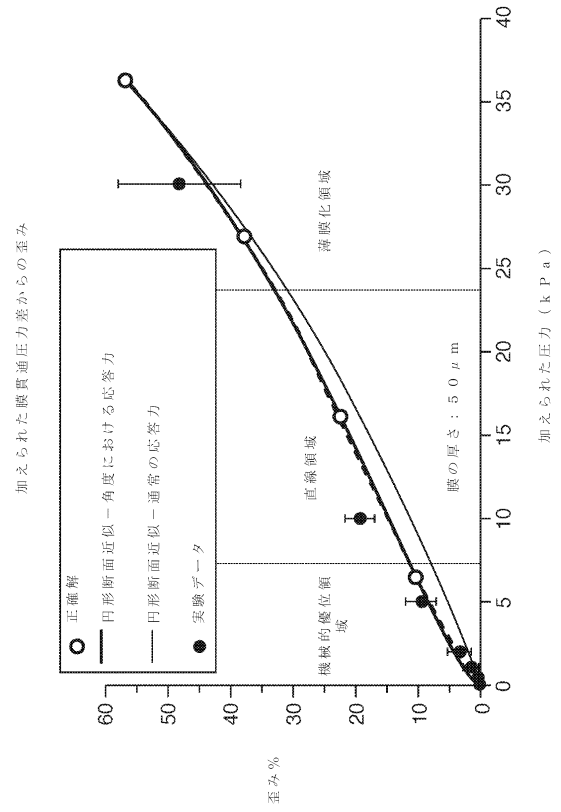
40

50

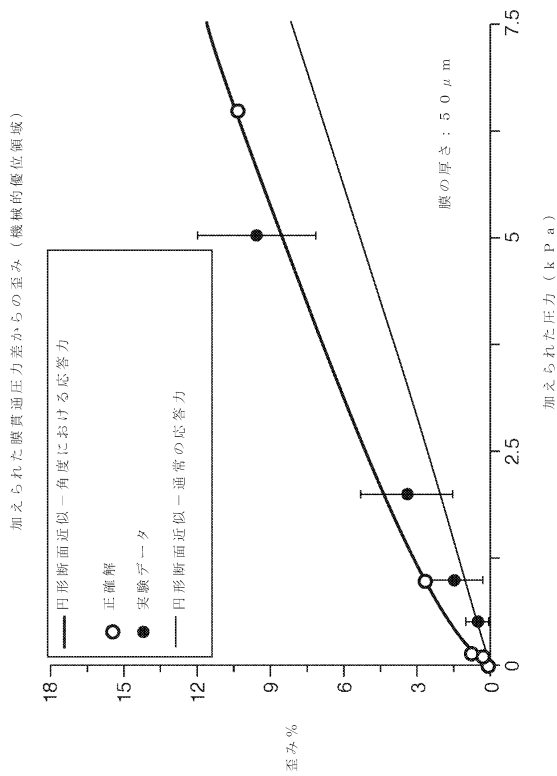
【図 4 1】



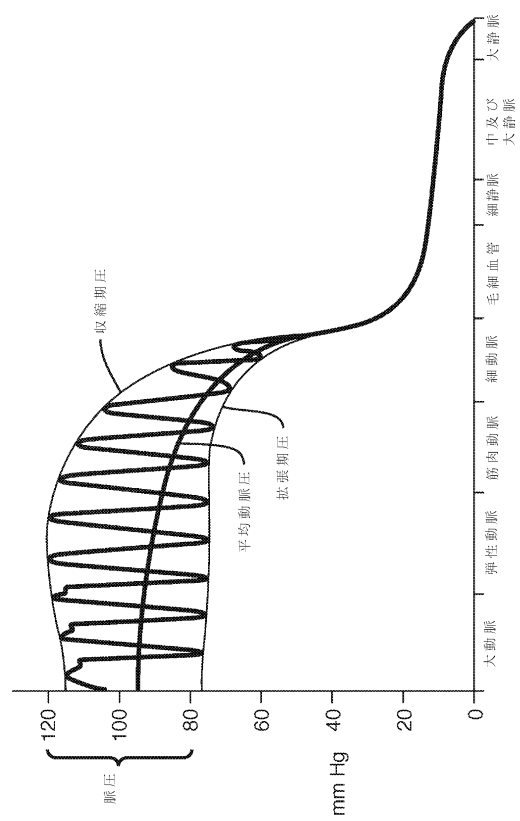
【図 4 2】



【図 4 3】



【図 4 4】



10

20

30

40

50

【図 45 A】

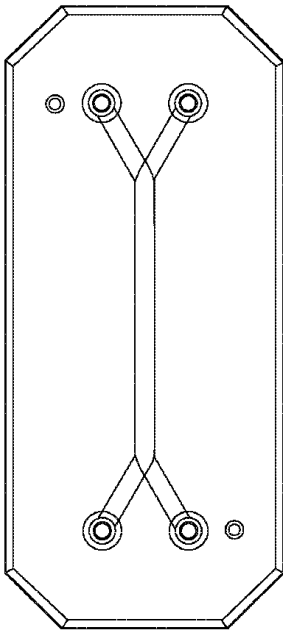


FIG. 45A

【図 45 B】

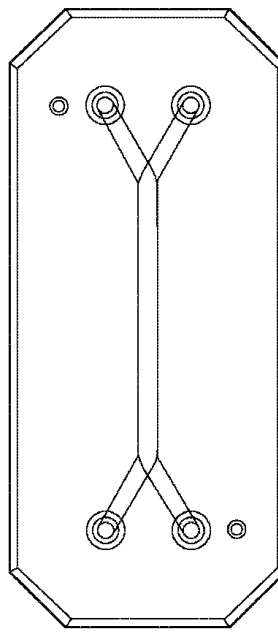


FIG. 45B

【図 46 A】

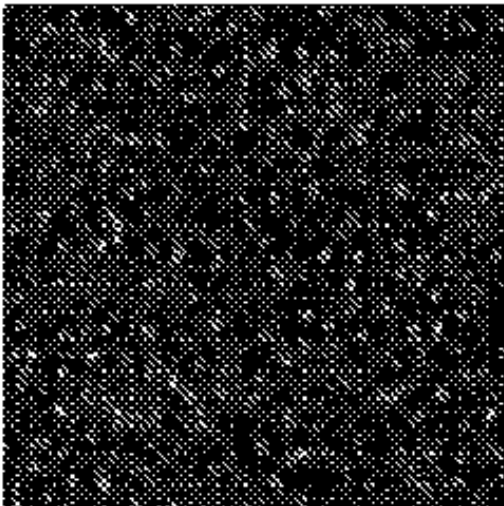


FIG. 46A

【図 46 B】

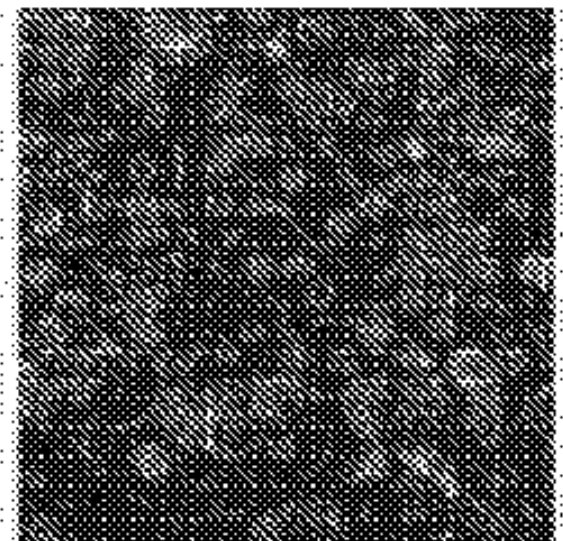


FIG. 46B

10

20

30

40

50

【図 46 C】

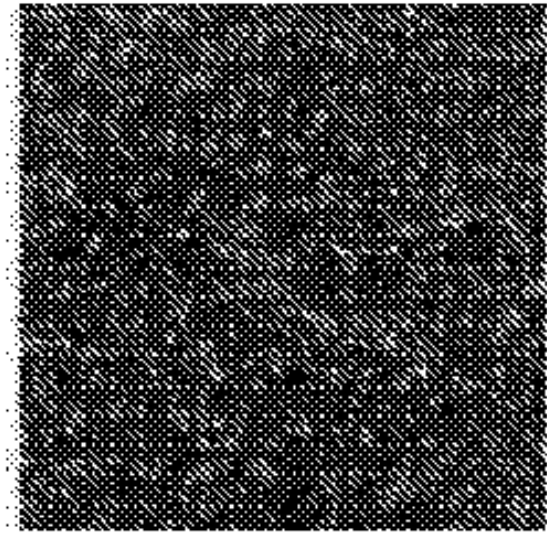


FIG. 46C

【図 46 D】

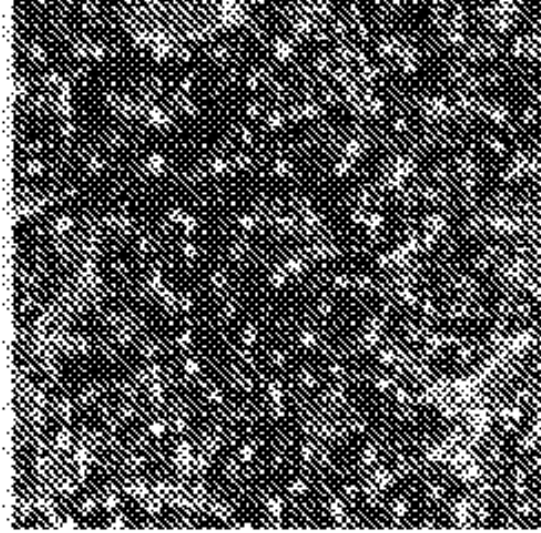


FIG. 46D

10

20

【図 47 A】

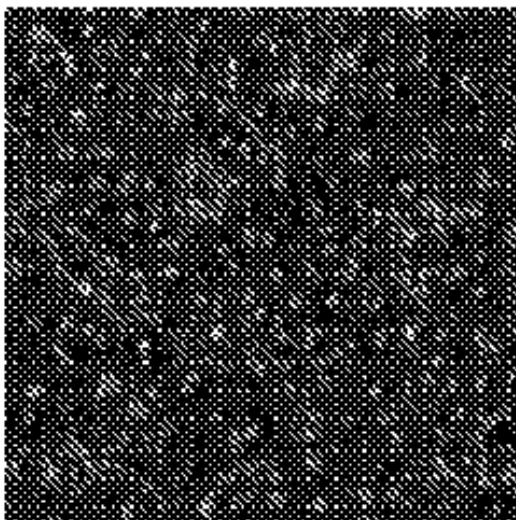


FIG. 47A

【図 47 B】

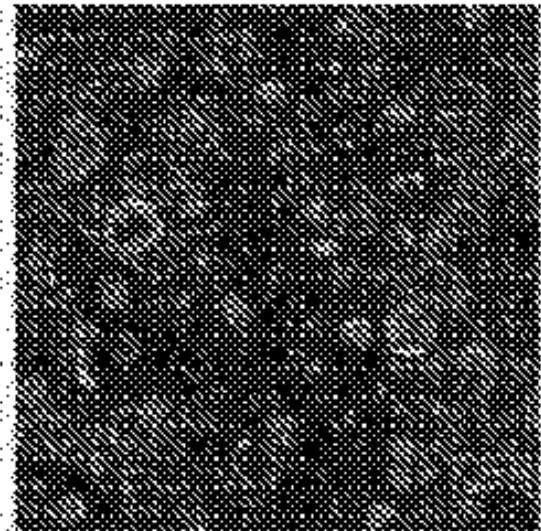


FIG. 47B

30

40

50

【図 47 C】

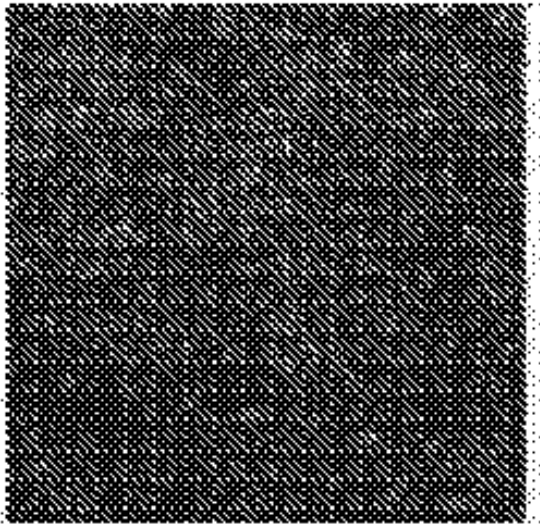


FIG. 47C

【図 47 D】

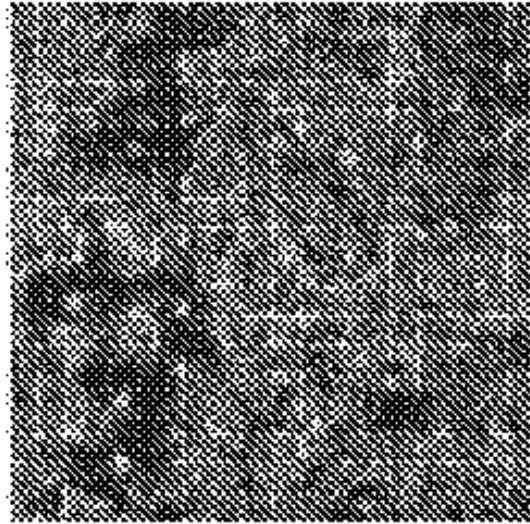


FIG. 47D

10

20

【図 48 A】

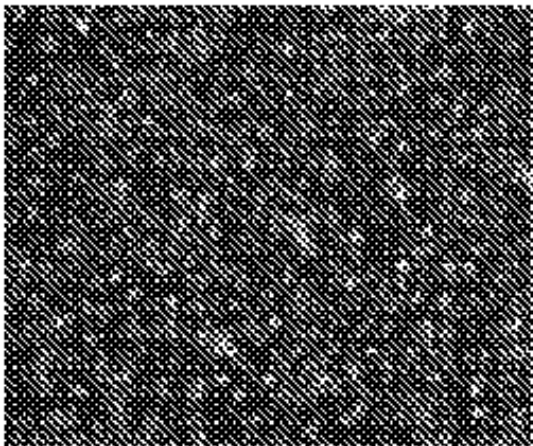


FIG. 48A

【図 48 B】

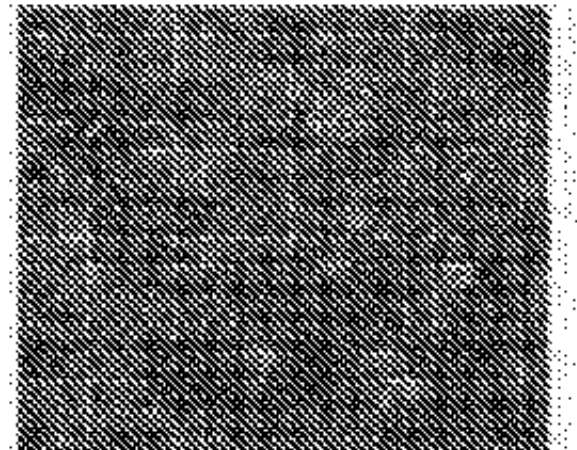


FIG. 48B

30

40

50

【図 48 C】

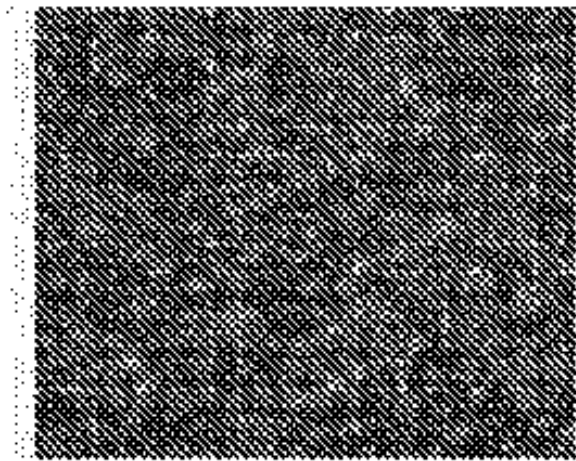


FIG. 48C

【図 48 D】

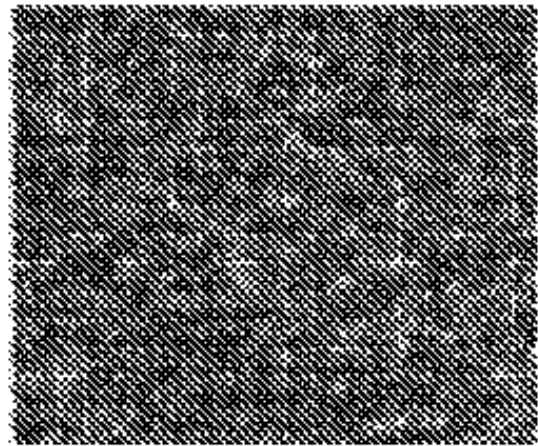


FIG. 48D

10

20

【図 49 A】

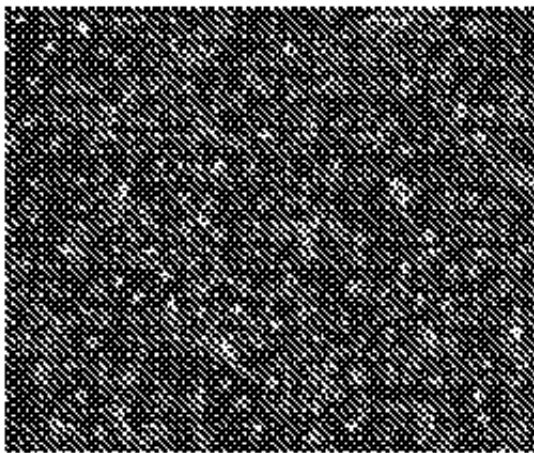


FIG. 49A

【図 49 B】

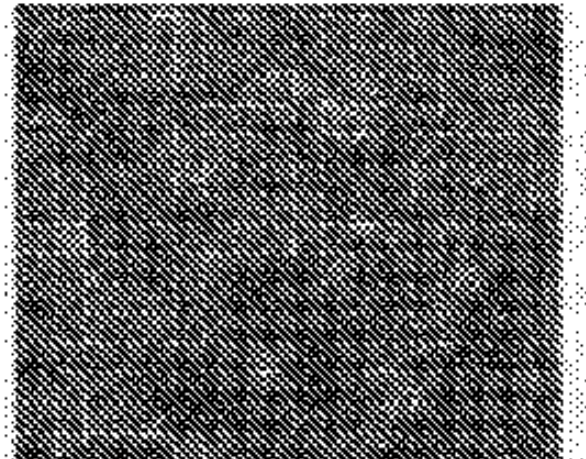


FIG. 49B

30

40

50

【図 49 C】



FIG. 49C

【図 49 D】

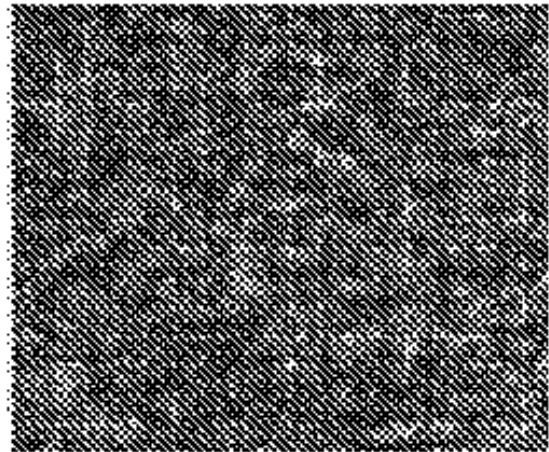


FIG. 49D

10

20

【図 50 A】

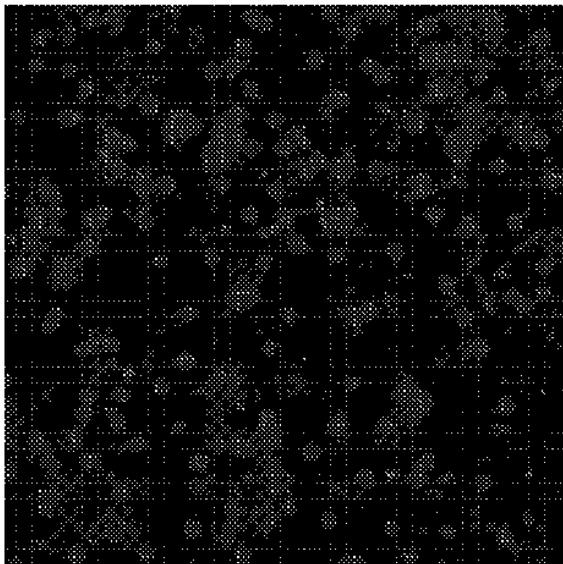


FIG. 50A

【図 50 B】

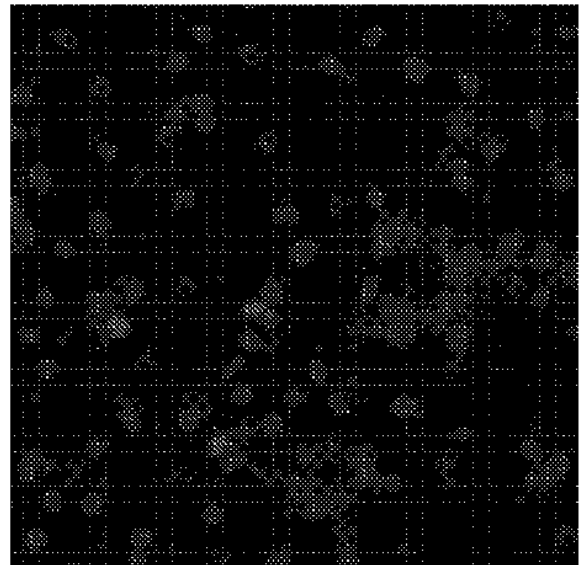


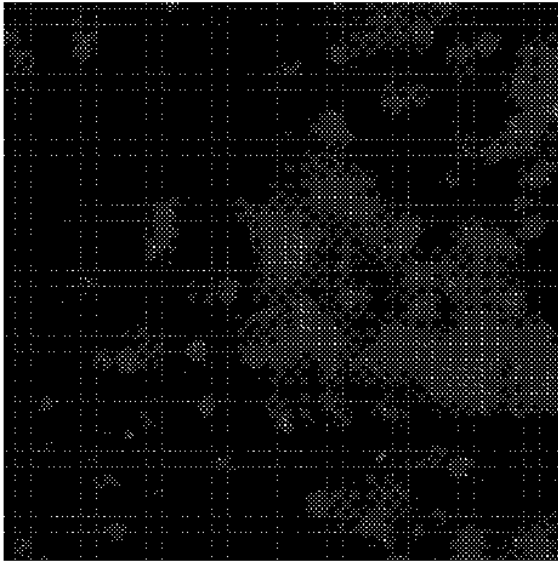
FIG. 50B

30

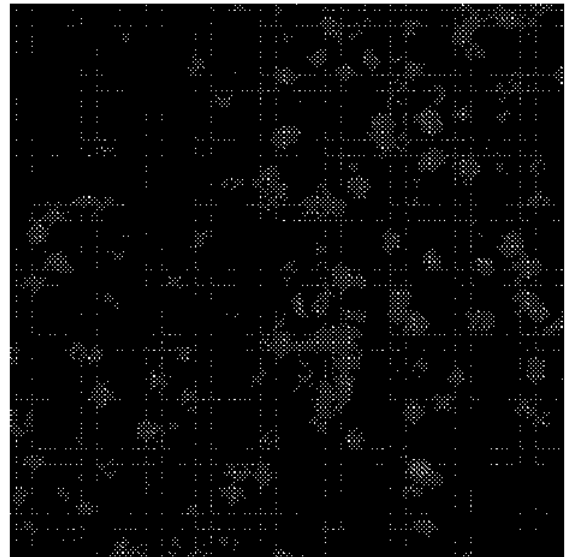
40

50

【図 50 C】



【図 50 D】



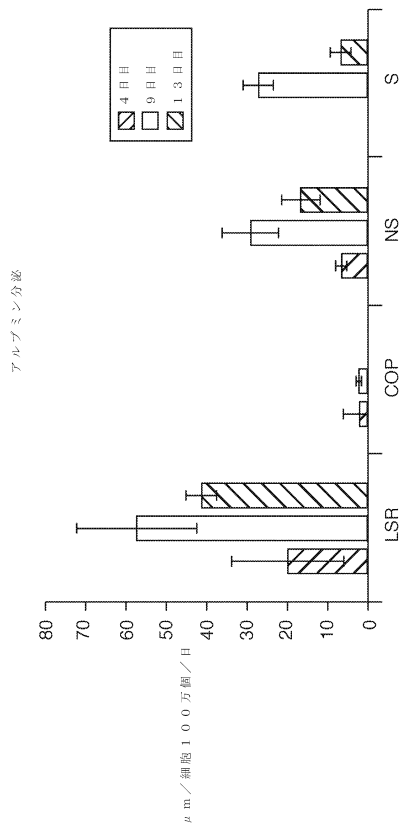
10

FIG. 50C

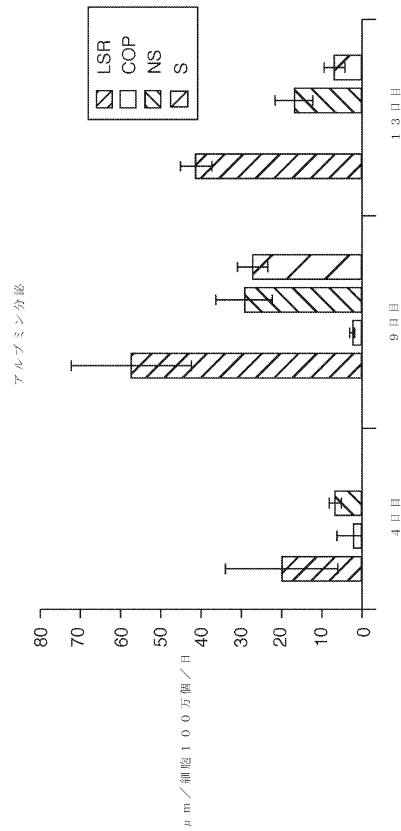
FIG. 50D

20

【図 51 A】



【図 51 B】

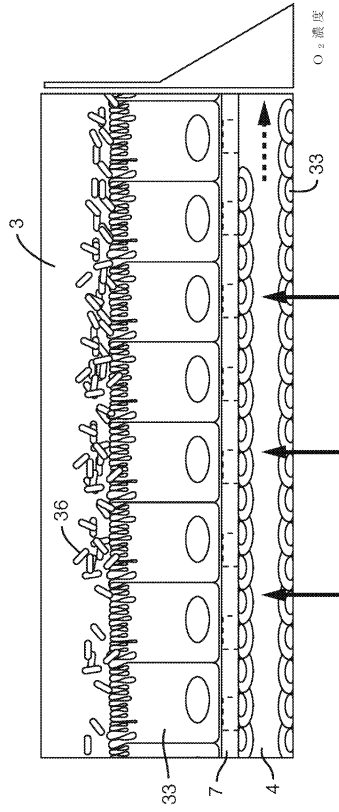


30

40

50

【図 5 2】



【図 5 3】

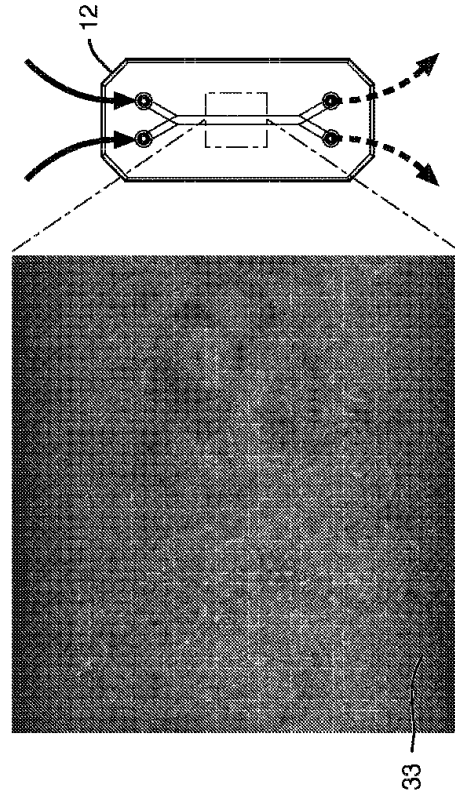
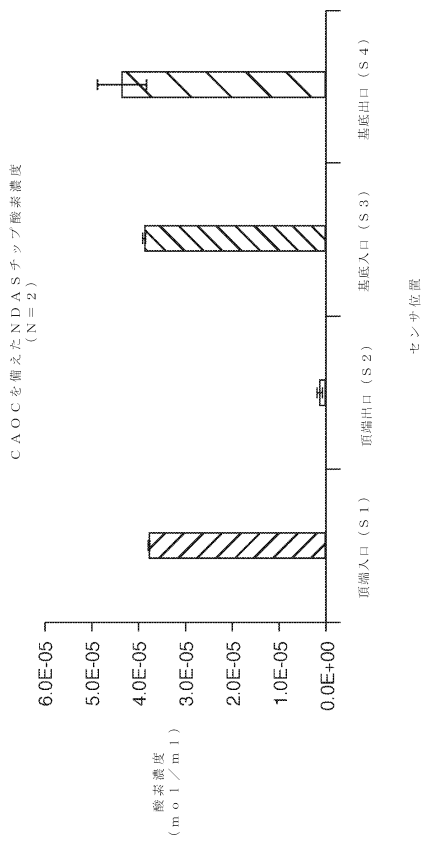


FIG. 53

【図 5 4】



【図 5 5 A】



FIG. 55A

10

20

30

40

50

【図 5 5 B】

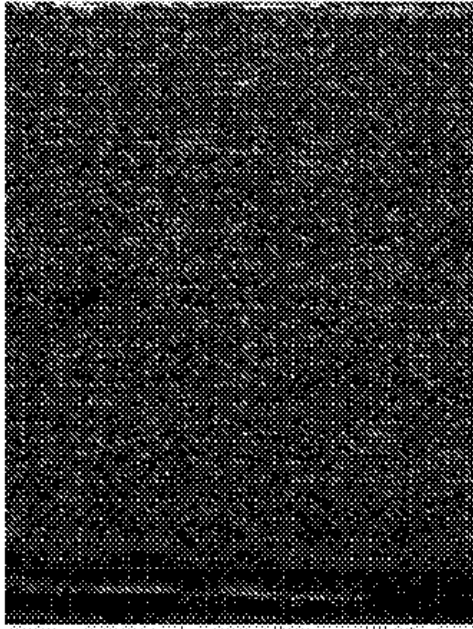


FIG. 55B

【図 5 5 C】

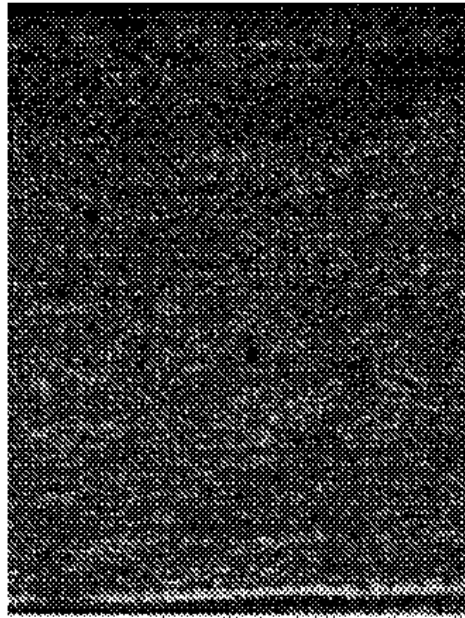


FIG. 55C

10

20

【図 5 6 A】

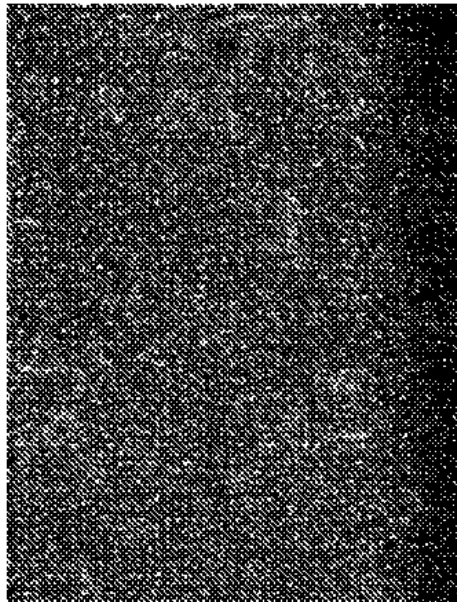


FIG. 56A

【図 5 6 B】

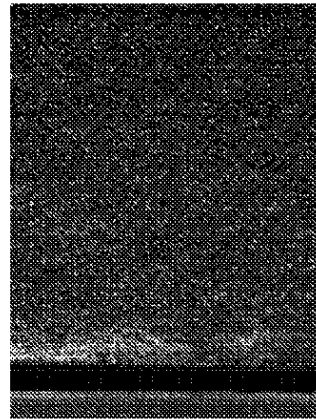


FIG. 56B

30

40

50

【図 5 6 C】

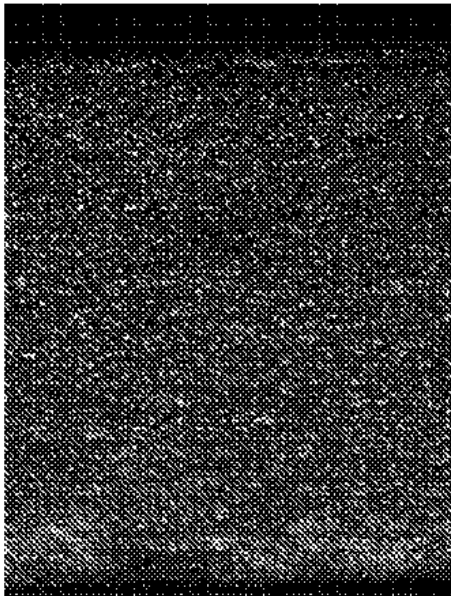


FIG. 56C

【図 5 7 A】

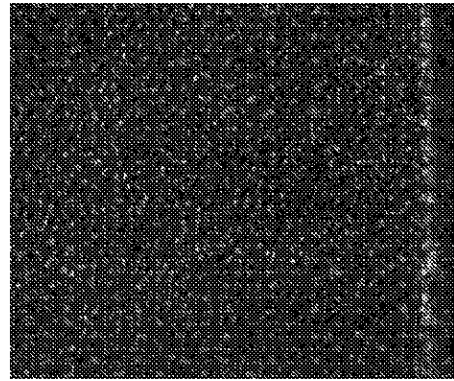


FIG. 57A

10

【図 5 7 B】

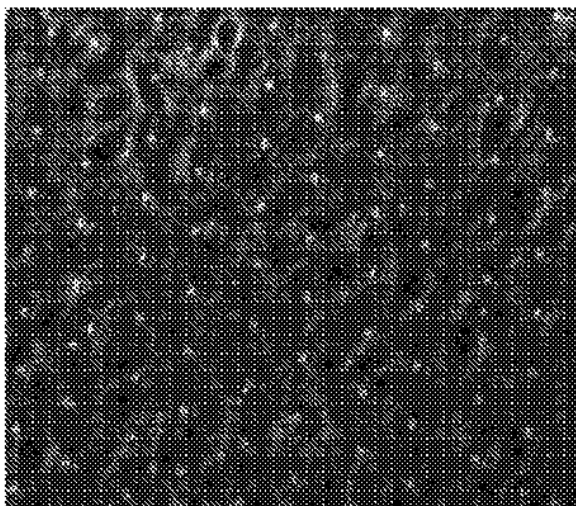


FIG. 57B

【図 5 8 A】

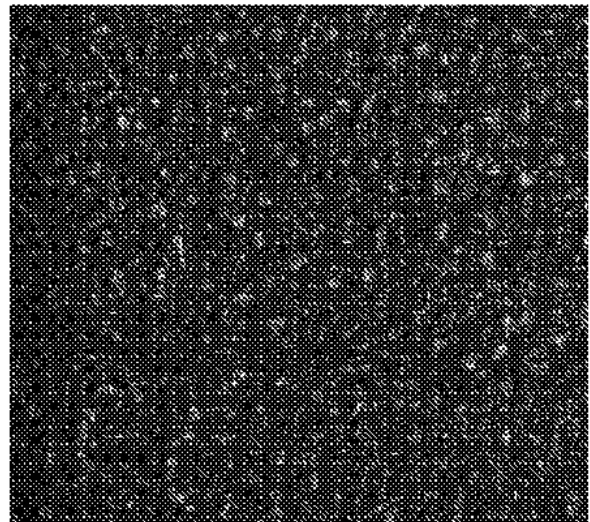


FIG. 58A

20

30

40

50

【図 58 B】

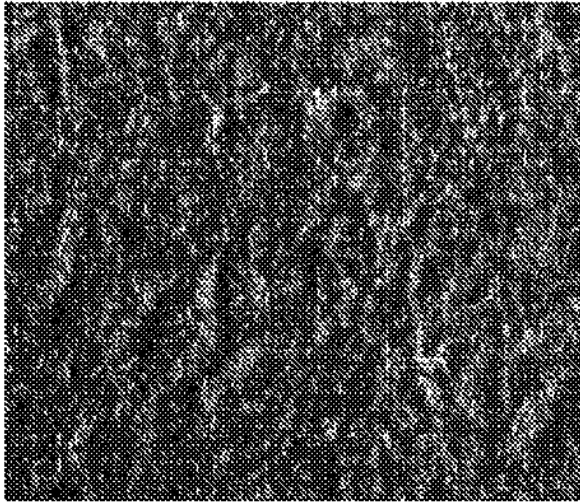


FIG. 58B

【図 59 A】

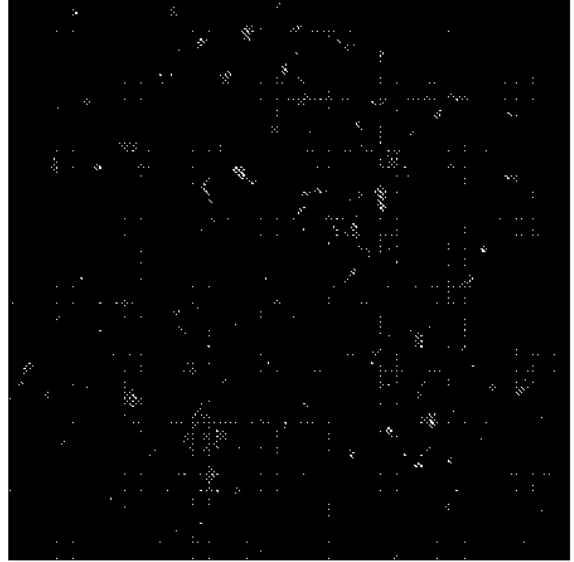


FIG. 59A

【図 59 B】

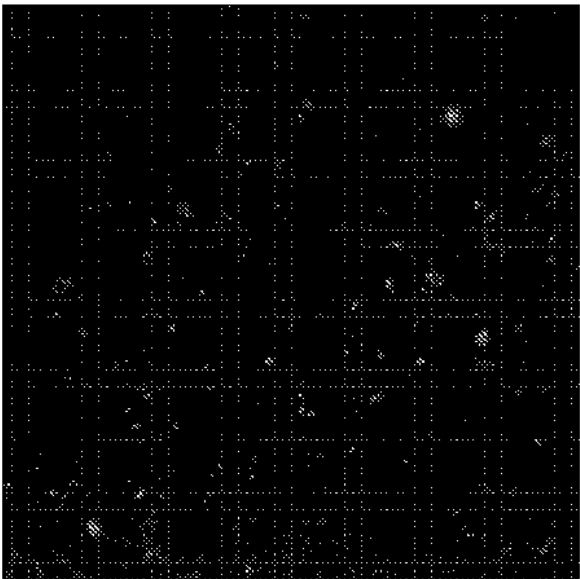
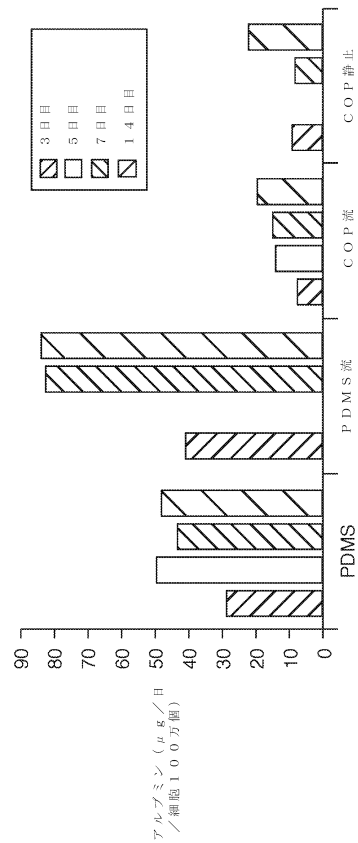


FIG. 59B

【図 60】



10

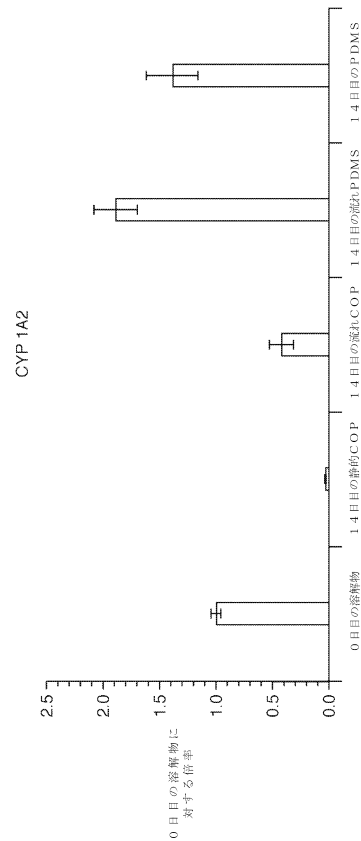
20

30

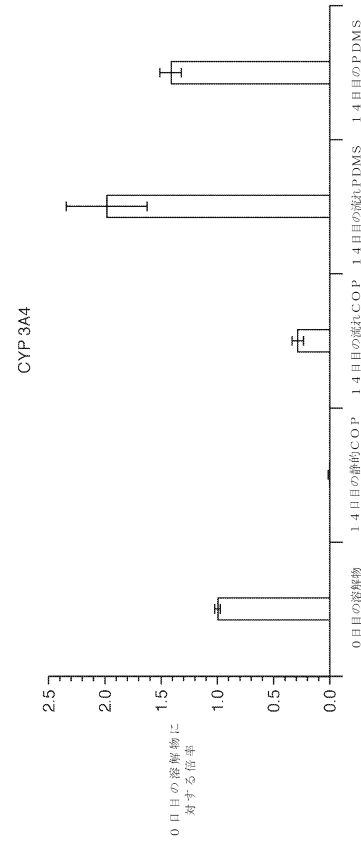
40

50

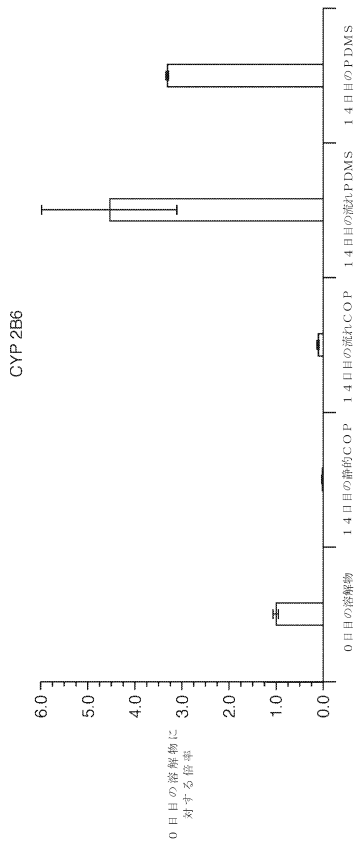
【図 6 1】



【図 6 2】



【図 6 3】



【図 6 4】

n	チップ	条件	流量 [μL / 時]	細胞型	装置
3	COP	100% O2 高流量	T: 150 B: 150	T : 肝細胞 B: LSEC	培養モジュール
3	COP	5% CO2 高流量	T: 150 B: 150	T : 肝細胞 B: LSEC	培養モジュール
3	COP	5% CO2 15mM HEPES 高流量	T: 150 B: 150	T : 肝細胞 B: LSEC	培養モジュール
3	COP	5% CO2 より高流量	T: 300 B: 300	T : 肝細胞 B: LSEC	シリンジボ ンブ
2	PDMS	5% CO2 より高流量	T: 300 B: 300	T : 肝細胞 B: LSEC	シリンジボ ンブ
3	PDMS	5% CO2 対照	T: 30 B: 30	T : 肝細胞 B: LSEC	培養モジュール

10

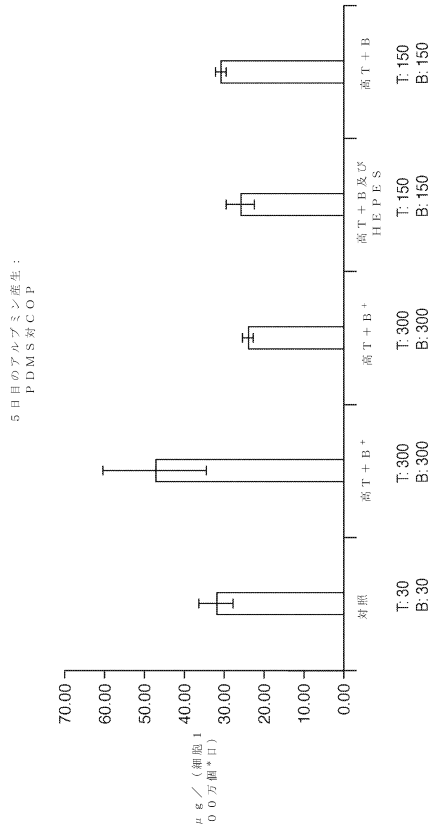
20

30

40

50

【図 6 5】



【図 6 6 A】

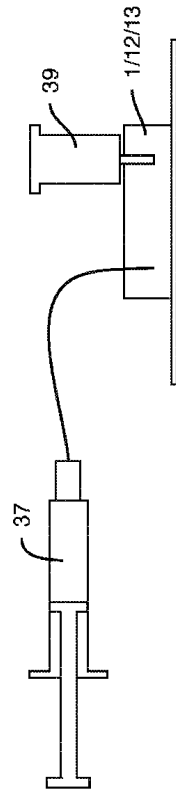


FIG. 66A

【図 6 6 B】

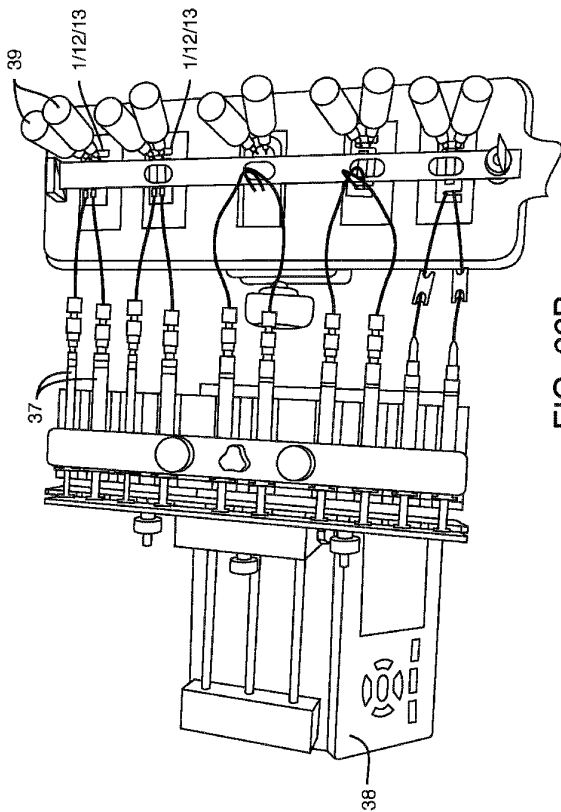


FIG. 66B

【図 6 6 C】

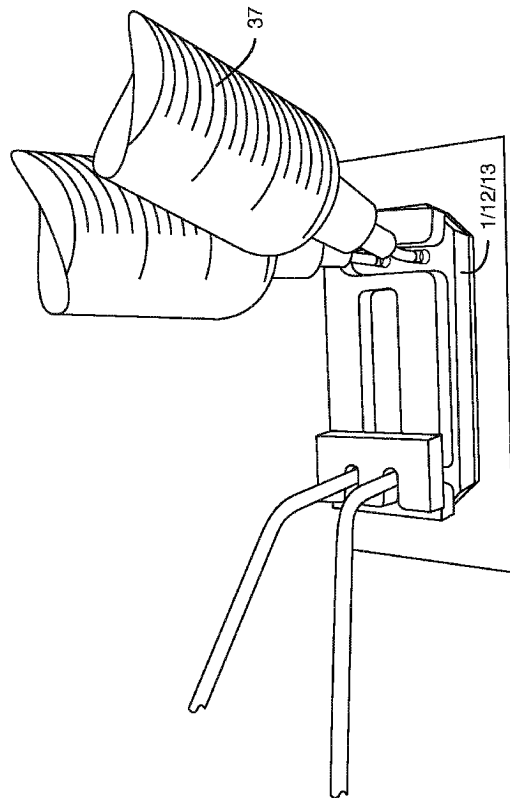


FIG. 66C

10

20

30

40

50

【圖 6 7】

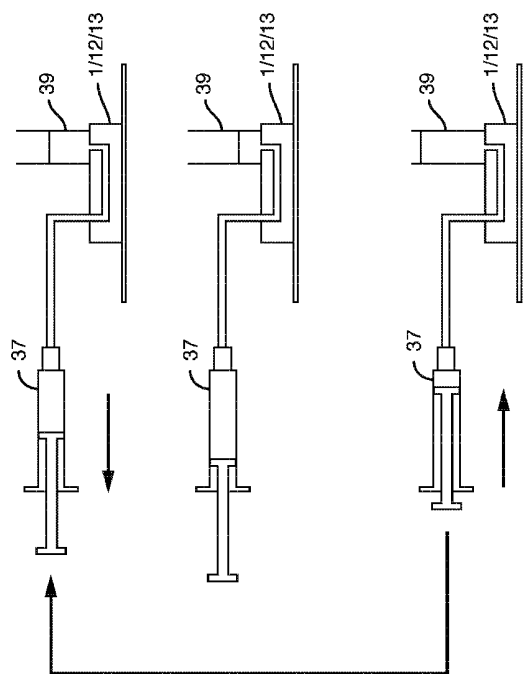
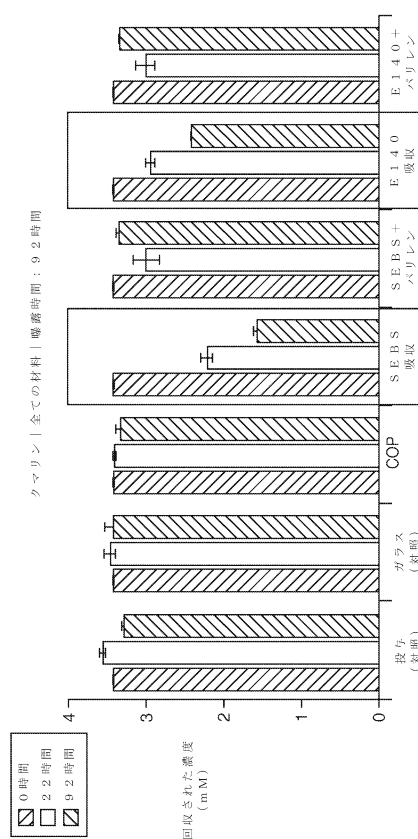


FIG. 67

【圖 68】



【圖 69】

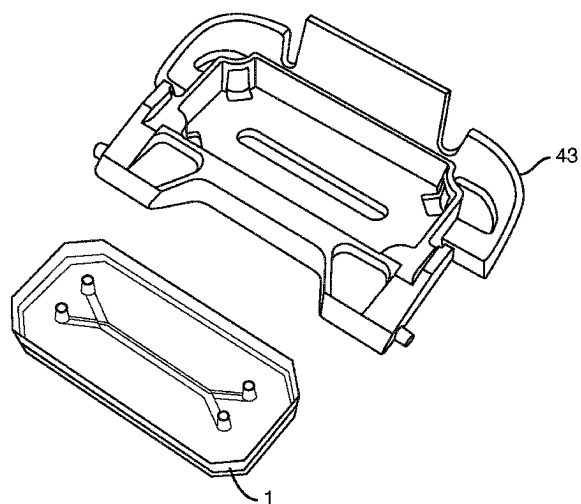
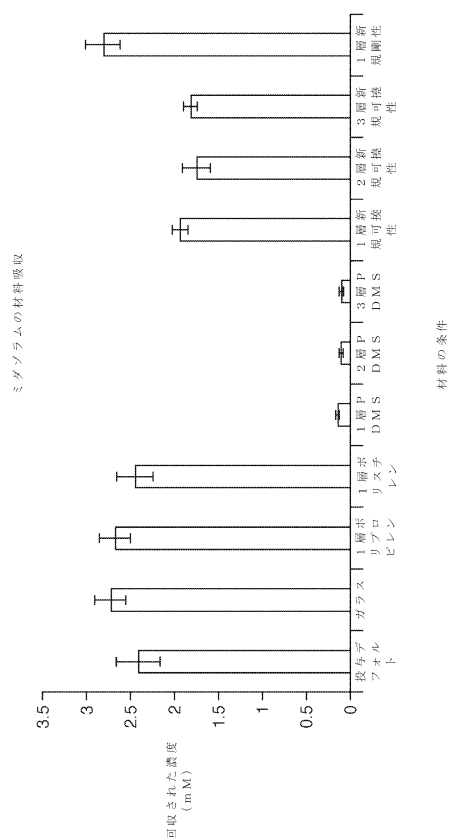
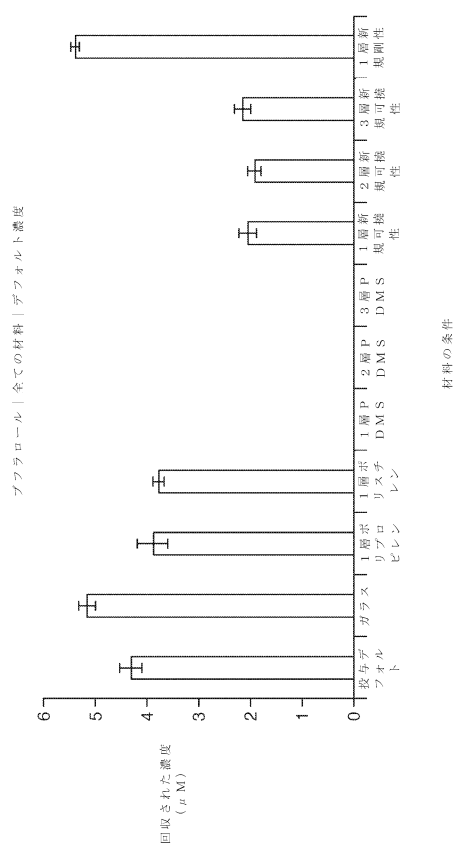


FIG. 69

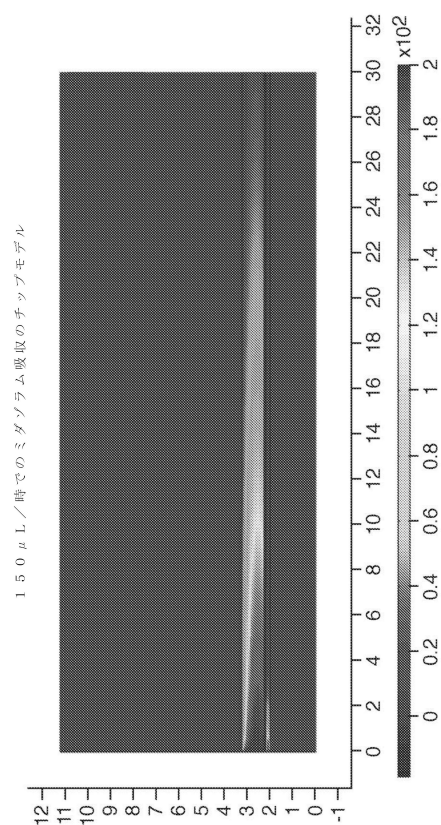
【図 70】



【図 7 1】



【圖 7 2】



【圖 7 3】

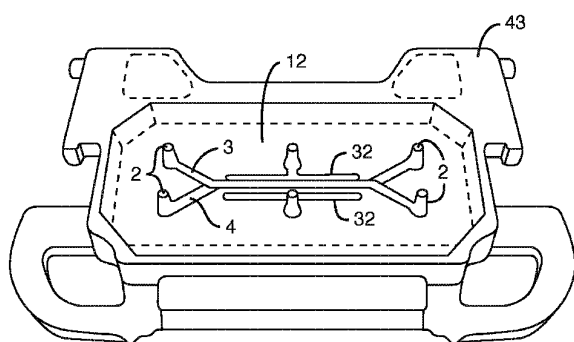


FIG. 73

【圖 7 4】

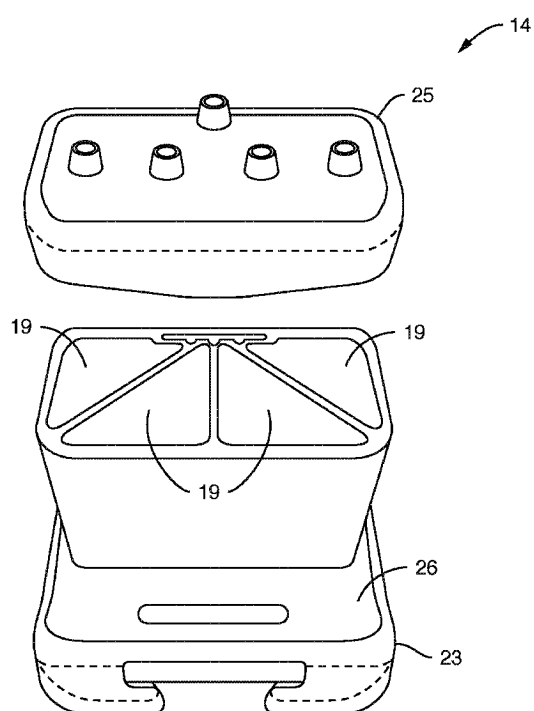
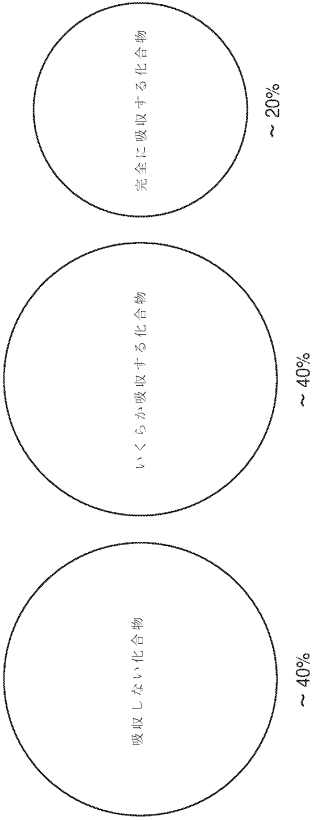


FIG. 74

【図 7 5】



【図 7 6 - 1】

化合物	分子量	logP	PDMS-チップ材料 (分配係数)	POD材料 (分配係数)
メトトレキサート	454	-1.85	最小	試験せず
フィラルグリジン	372	-0.9	最小	試験せず
カフエイン	194	-0.1	最小	最小
シクロホスファミド	261	0.8	最小	最小
アンチピリン	188	0.38	最小	最小*
ジゴキシン	781	1.26	最小	最小
トボテカン	421	1.52	最小	最小
フェナセチン	179	1.58	最小	最小
メフェニトイン	218	1.69	最小	最小
トルブタミド	270	2.34	最小	試験せず
3-硫酸エストロン	350	3.83	最小	最小
ジクロフェナク	296	4.51	最小	最小
バルサルタン	436	5.8	最小	最小
ナビトクラククス	975	9.6	最小	最小
バルドキソロン	492	5.92	定性的吸収	試験せず
サセニタン	552	2.8	1	試験せず
ピルフェニドン	185	1.9	1.75	1.3
フェキシソフェナジン	502	2.8	2.5	試験せず

図 7 6

【図 7 6 - 2】

化合物	分子量	logP	PDMS-チップ材料 (分配係数)	POD材料 (分配係数)
タマリン	146	1.4	2.5	3
タクリン	198	2.7	2.5	0.3
ロラゼパム	321	2.39	3.5	1.2
ローダミンB	479	2.4	3.5	最小
キニジン	324	2.9	9.8	最小
ジアゼパム	285	2.82	25	11
ケトロコゾノール	5331	4.35	25	試験せず
ニコチン	162	1.2	60	1.5
デキストロメトルフファン	271	3.97	75	試験せず
スクロースポリン	467	3.2	123	6
ミダゾラム	326	3.89	201	4.05
プロロゼオン	240	3.6	>160	9.46
プロラロール	261	3.5	>216	4.77
アミトリプチリン	277	4.92	>1000	175
シサプリド	466	3.4	>1000	1000
テルフェナジン	472	7	>2000	試験せず

図 7 6 続き

【図 7 7 A】

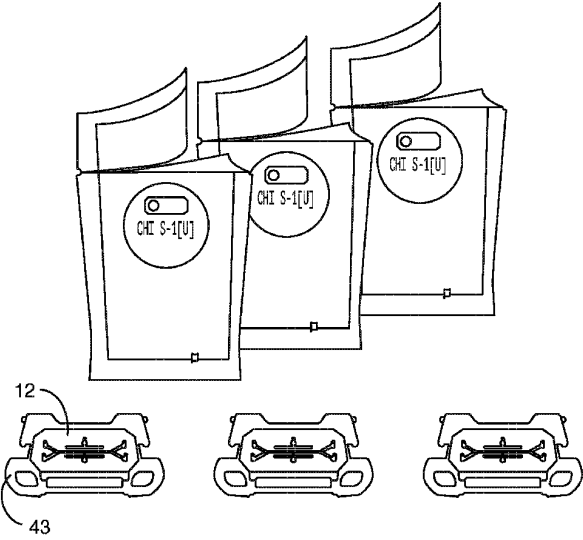


FIG. 77A

【図 77 B】

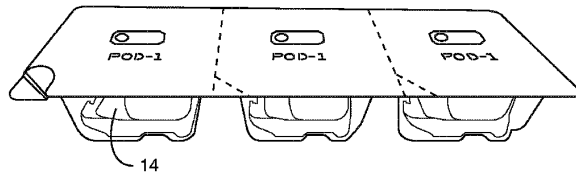


FIG. 77B

【図 77 C】

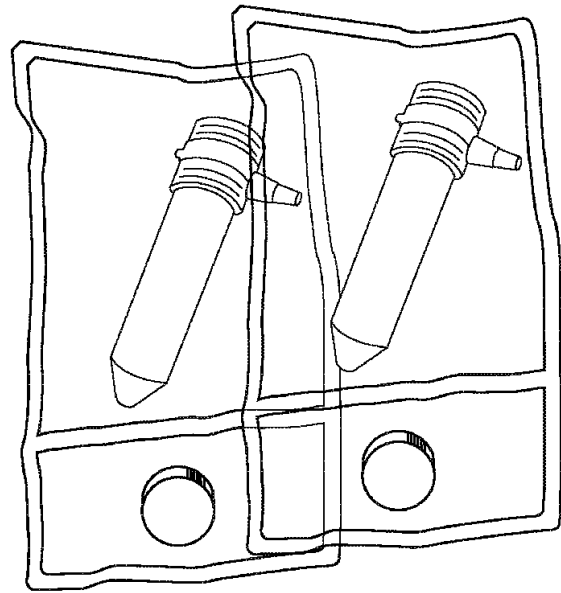


FIG. 77C

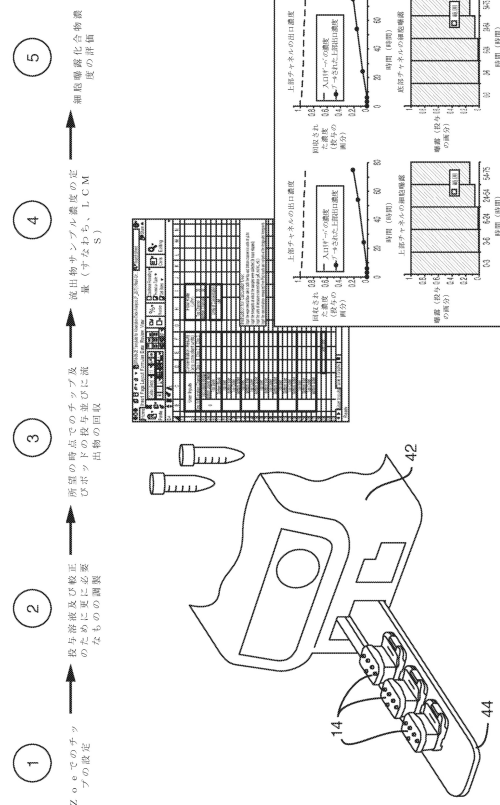
10

20

【図 78】

2018-09-28 版取7-分析のための177シート JF-JSD(読取...)													
Home Insert Page Layout Formulas Data Review View													
Paste X B I U Font Color Background Color Conditional Formatting Font as Table Cells Editing													
D4 x f1													
	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1													
2		ユーザ入力	読取結果										
3		位置 (チャネル)	サンプル1	サンプル2	サンプル3								
4		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
5		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
6		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
7		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
8		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
9		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
10		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
11		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
12		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
13		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
14		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
15		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
16		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
17		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
18		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
19		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
20		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
21		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
22		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
23		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
24		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
25		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
26		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
27		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
28		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
29		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
30		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								
31		位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)	位置 (チャネル)								

【図 79】



30

40

50

【図 80】

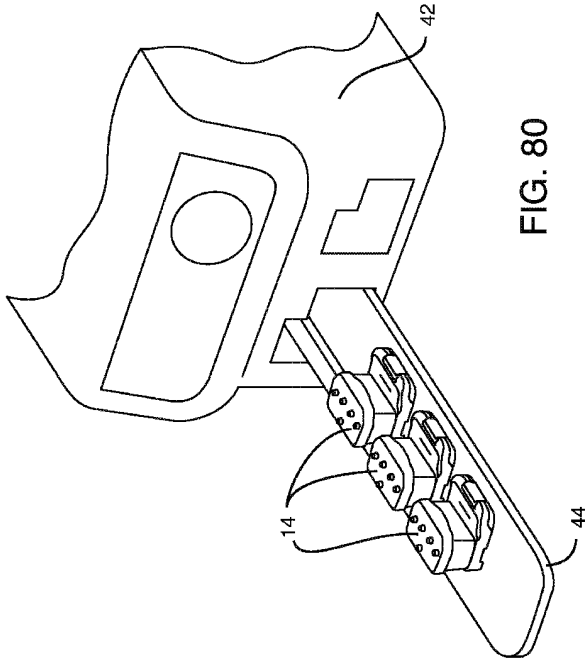


FIG. 80

【図 81】

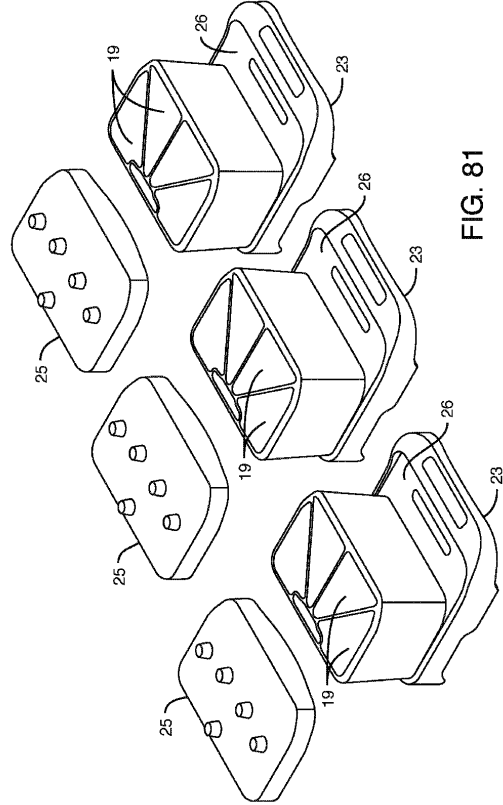


FIG. 81

【図 82】

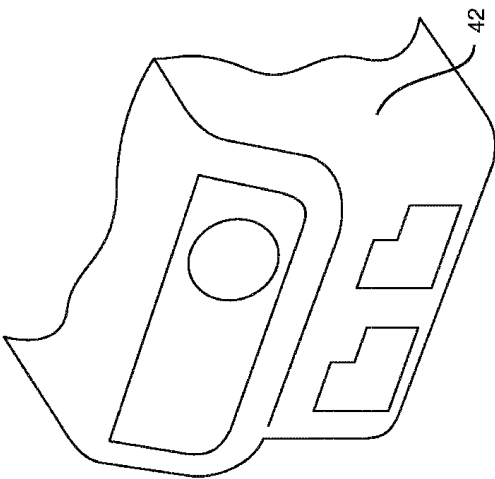
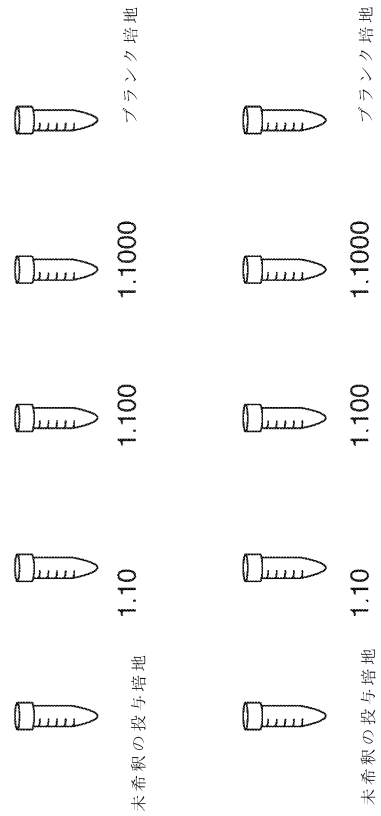


FIG. 82

【図 83】



10

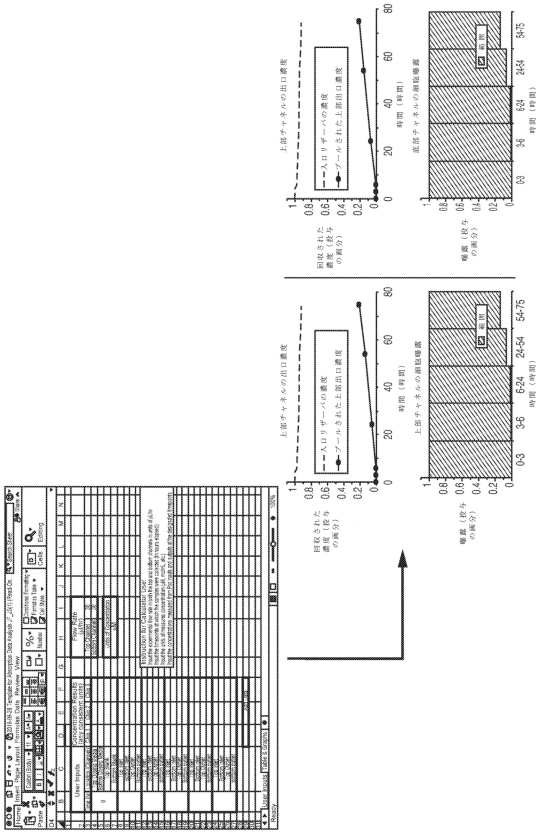
20

30

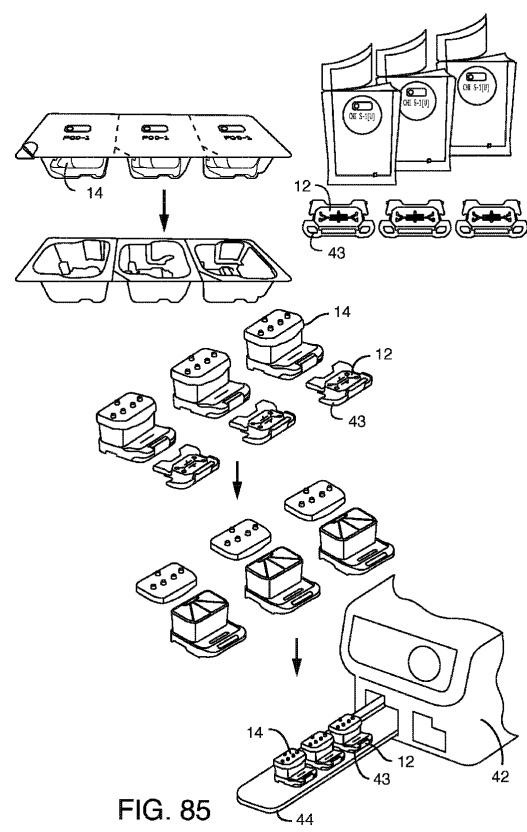
40

50

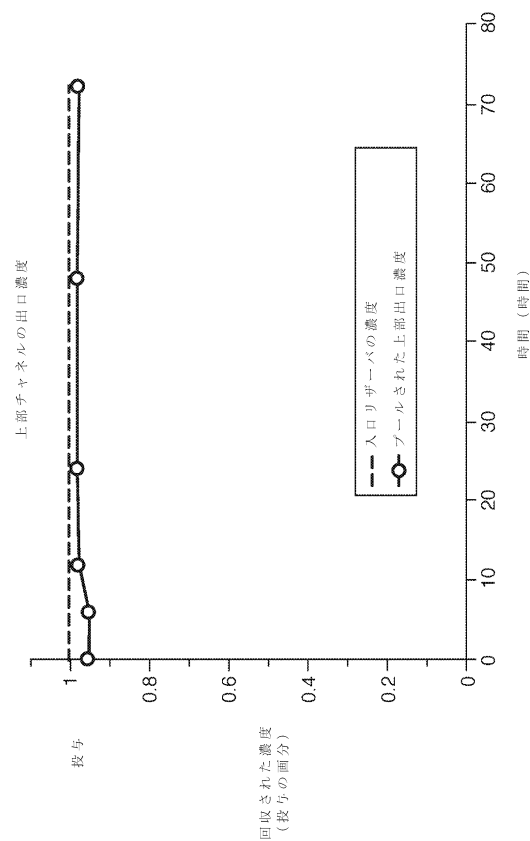
【図 8 4】



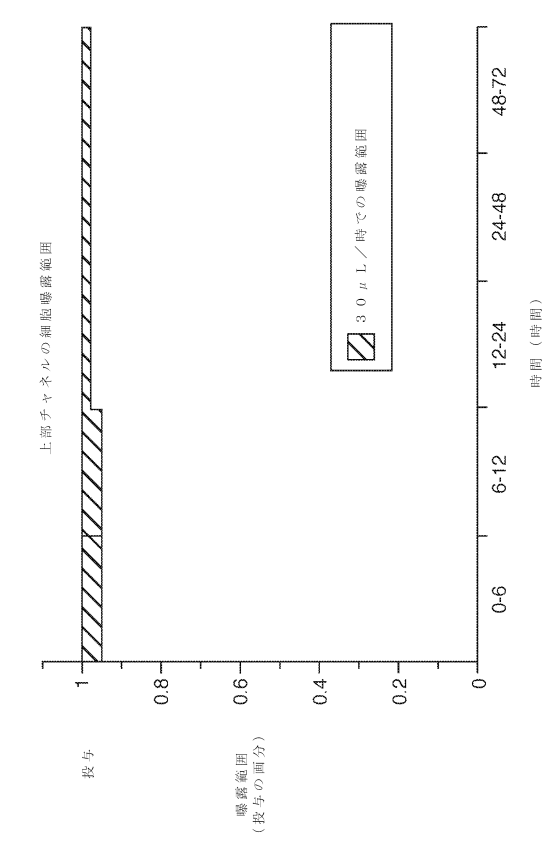
【図 8 5】



【図 8 6 A】



【図 8 6 B】



10

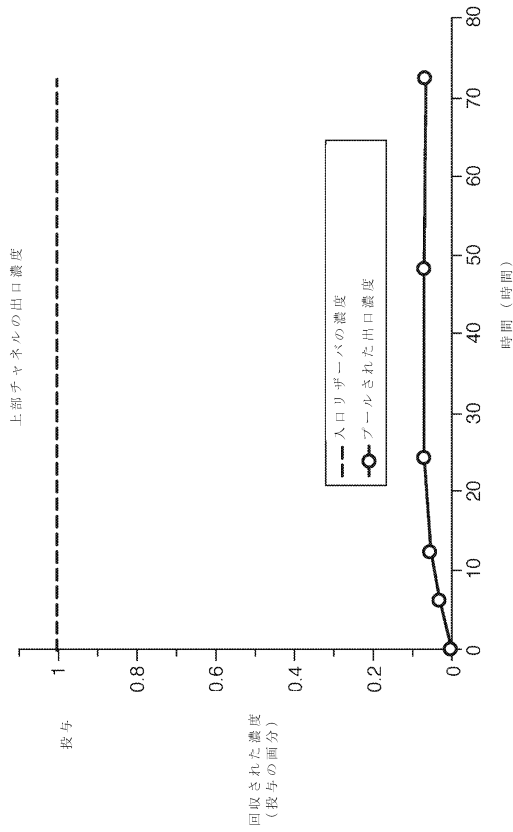
20

30

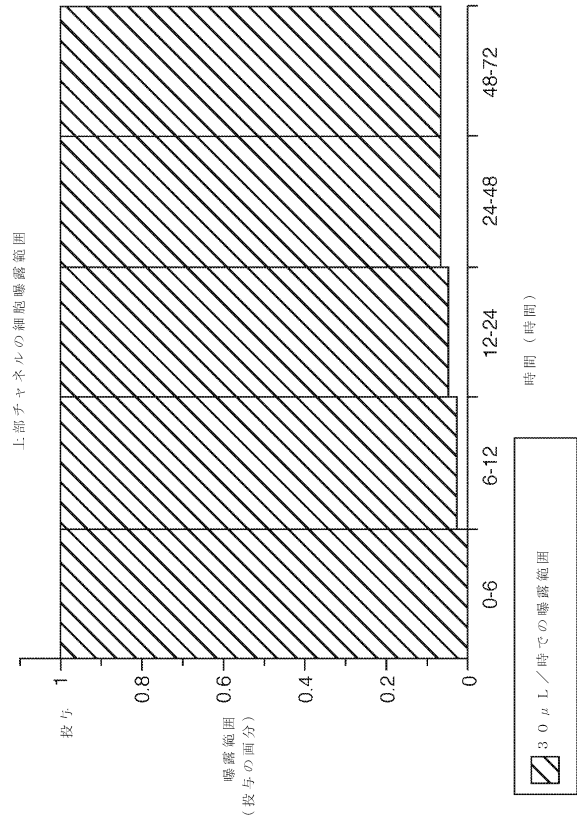
40

50

【図 8 7 A】



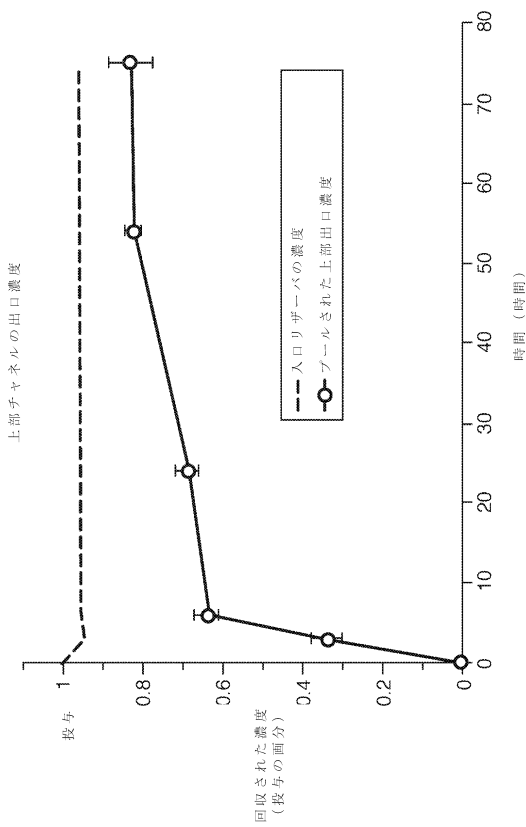
【図 8 7 B】



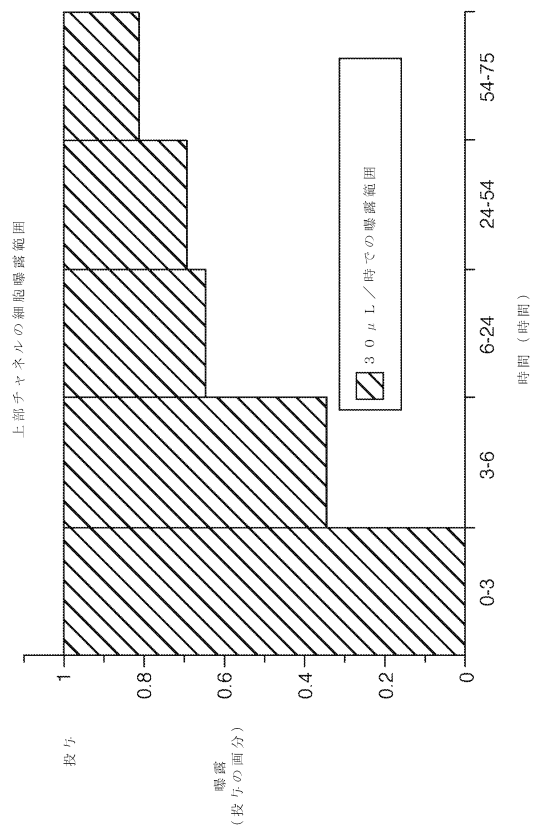
10

20

【図 8 8 A】



【図 8 8 B】

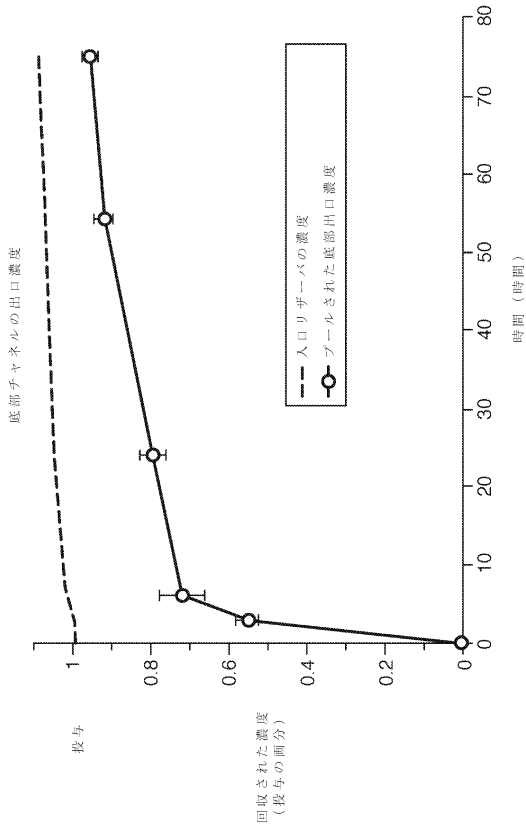


30

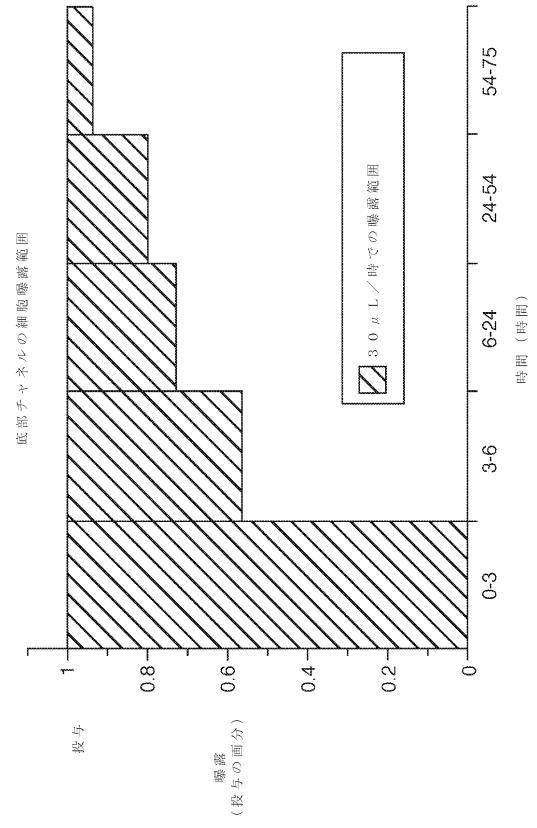
40

50

【図 8 8 C】



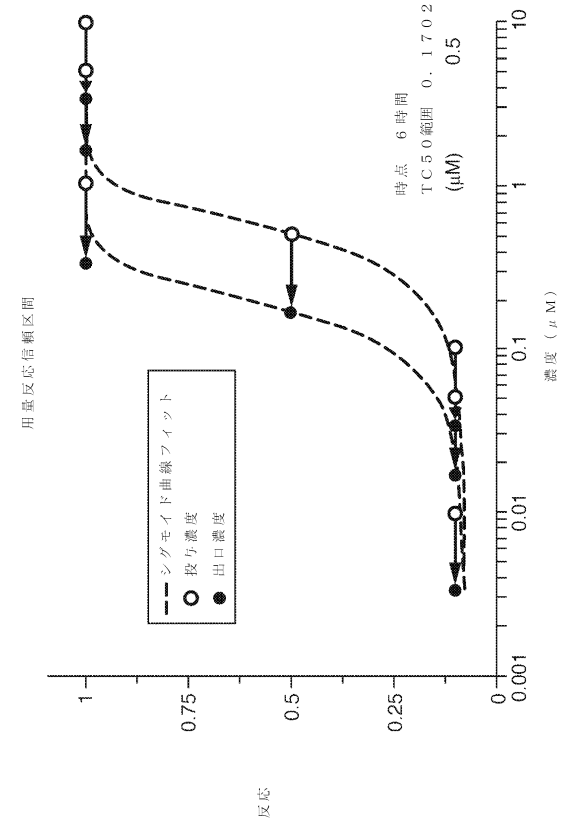
【図 8 8 D】



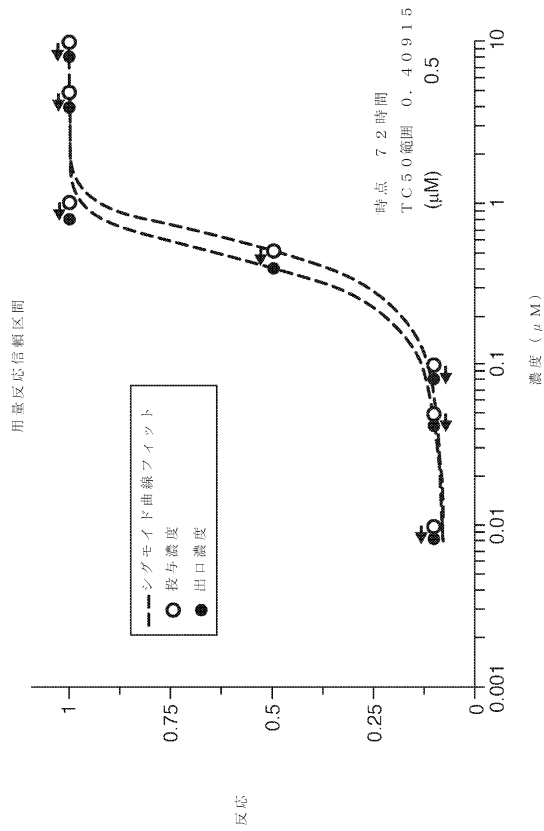
【図 8 9】

潜在的な細胞曝露濃度の範囲 (μM)				
曝露期間 (時間)	上部チャネル		底部チャネル	
	最小	最大	最小	最大
3 - 6	0.171	102.000	0.150	93.900
6 - 24	34.733	102.000	52.247	93.900
24 - 54	65.100	102.000	67.733	93.900
54 - 75	70.033	102.000	75.067	93.900
75+	83.467	102.000	86.700	93.900

【図 9 0 A】



【図 90 B】



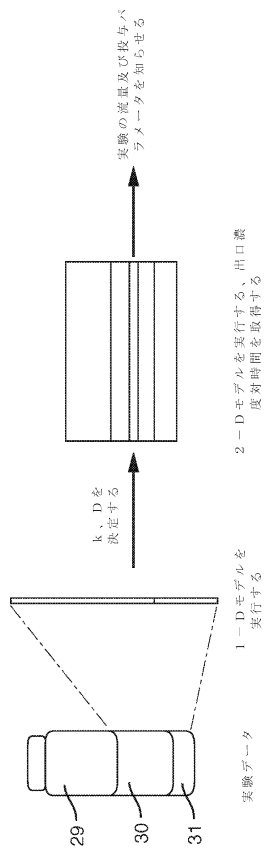
【図 9 1】

投与期間 (時間)	推奨される時点 (時間)
< 3	0.5, 1, 1.5, 2, 3
6	0.5, 1, 2, 4, 6
12	1, 3, 6, 9, 12
24	2, 3, 6, 12, 24
48	1, 3, 6, 24, 48
72+	1, 6, 24, 48, 72

10

20

【図 9 2】



【図 9 3】

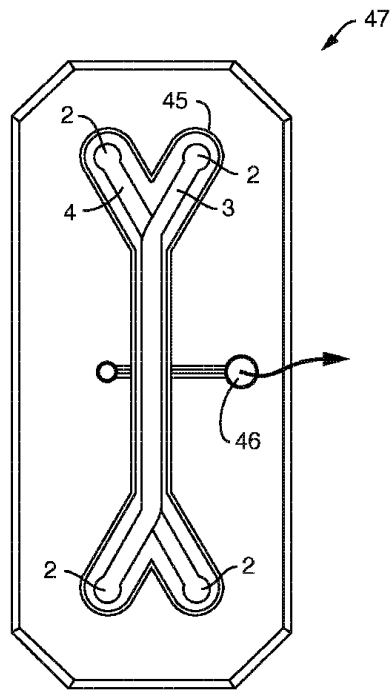


FIG. 93

30

40

50

【図 9 4】

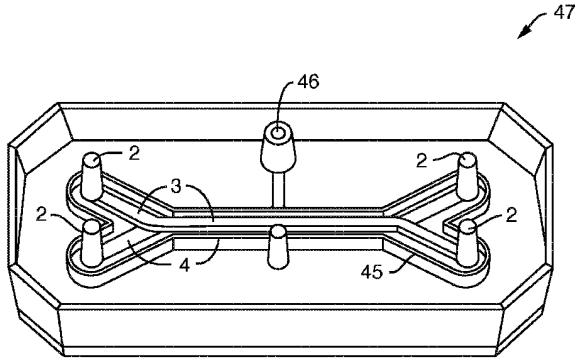
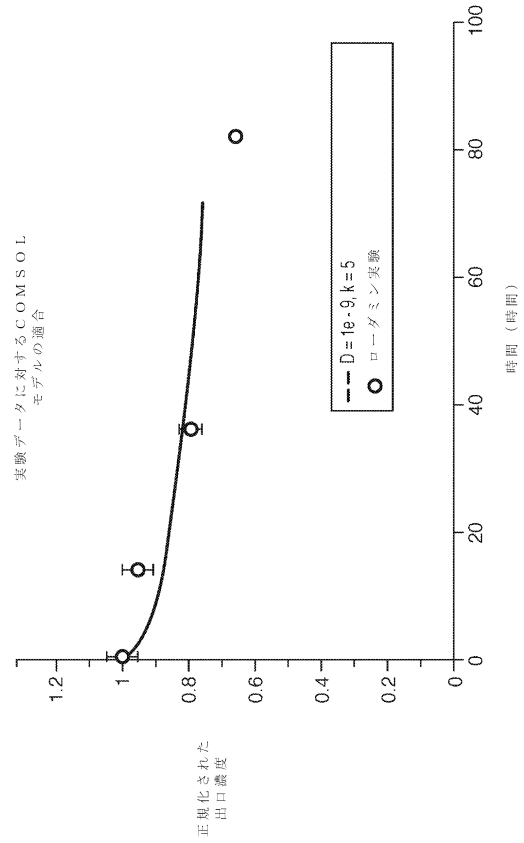
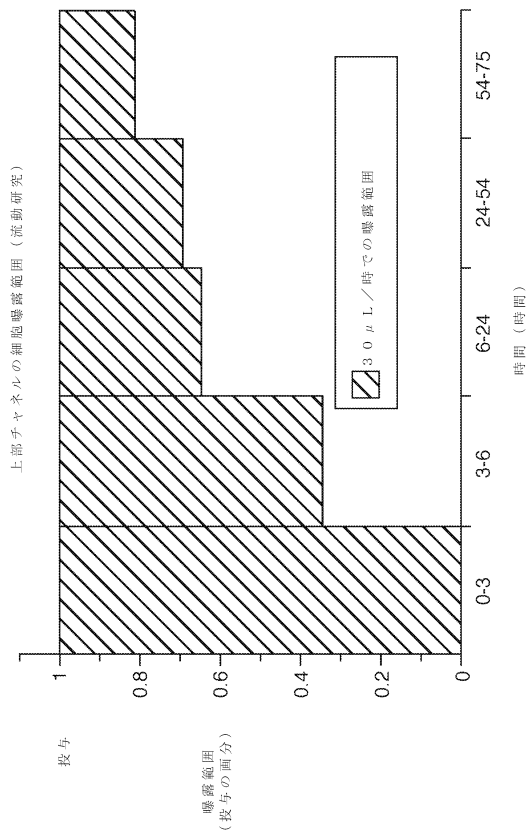


FIG. 94

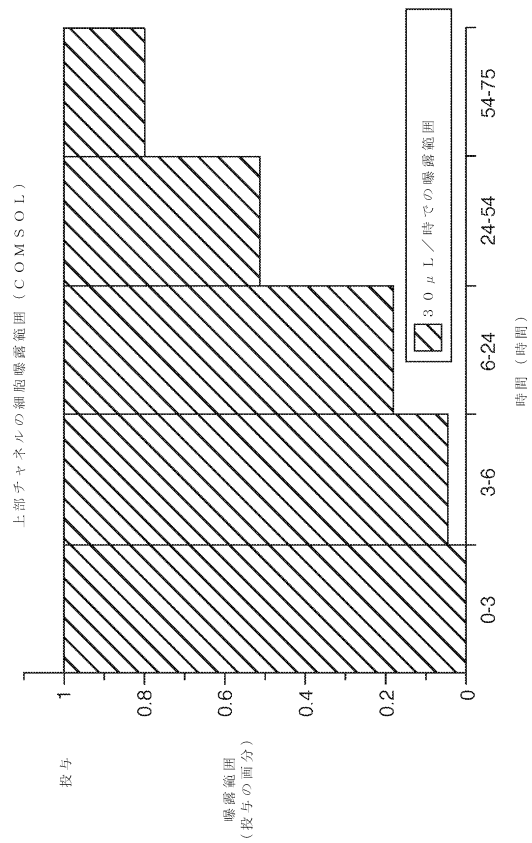
【図 9 5】



【図 9 6 A】



【図 9 6 B】



10

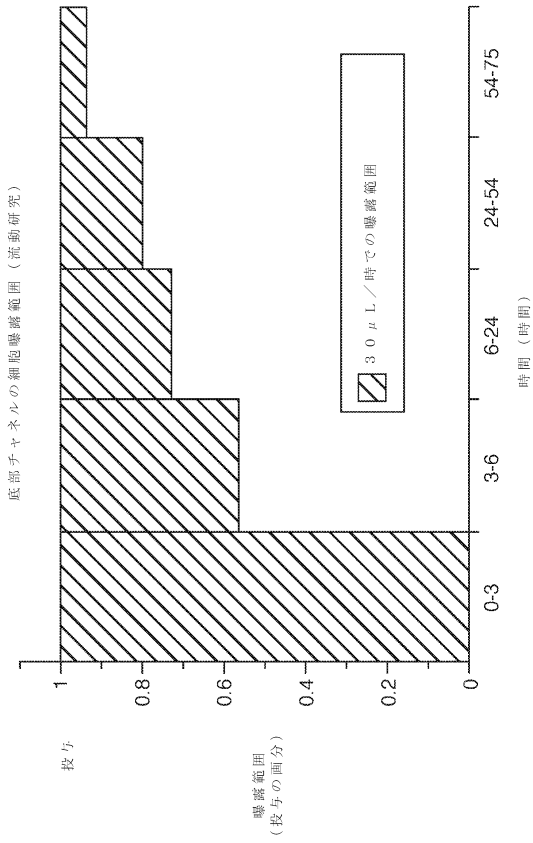
20

30

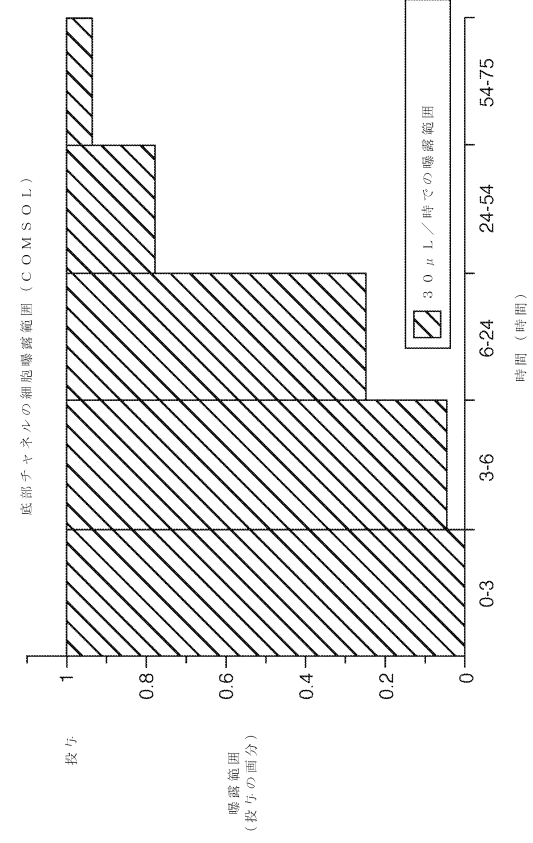
40

50

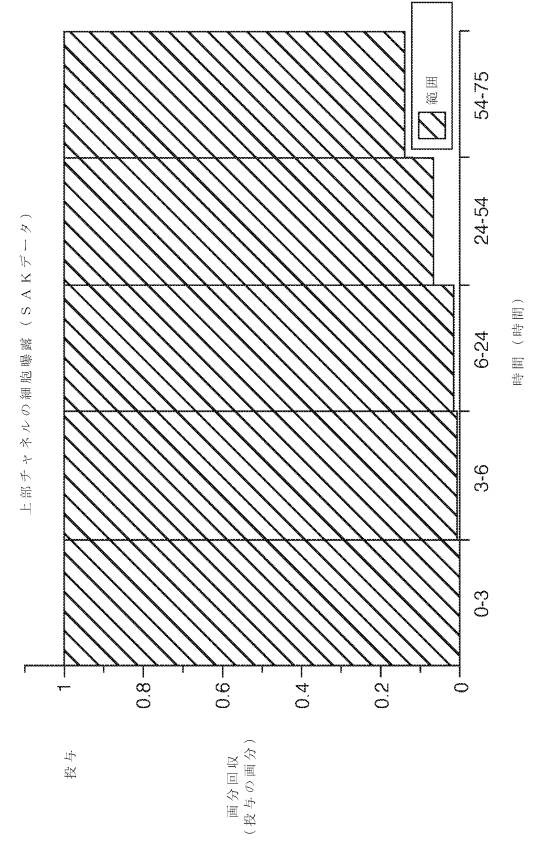
【図 9 7 A】



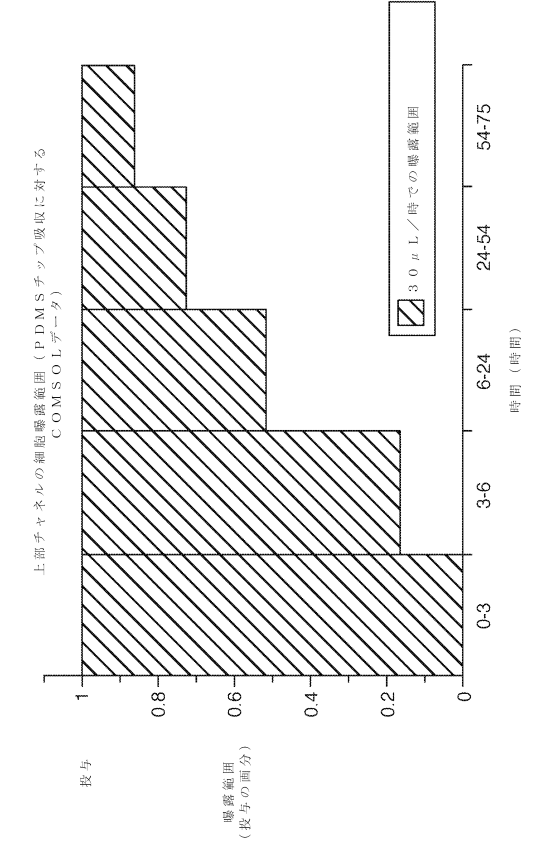
【図 9 7 B】



【図 9 8 A】



【図 9 8 B】



10

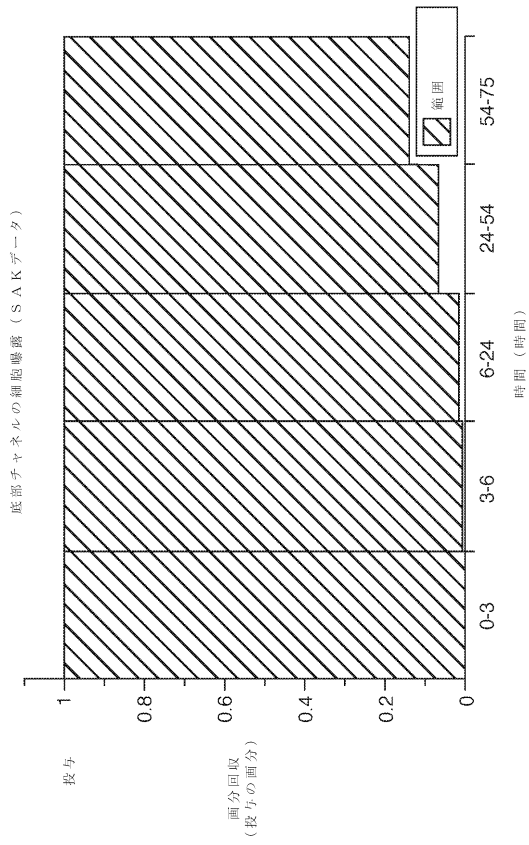
20

30

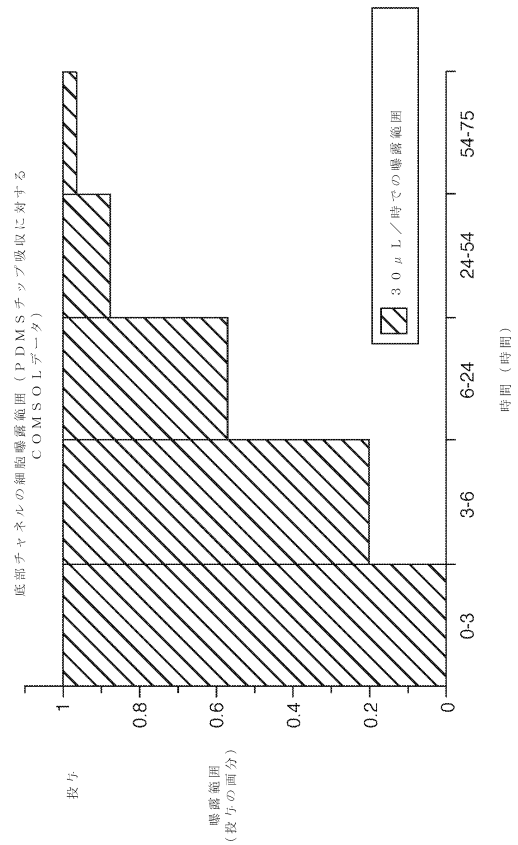
40

50

【図 99 A】



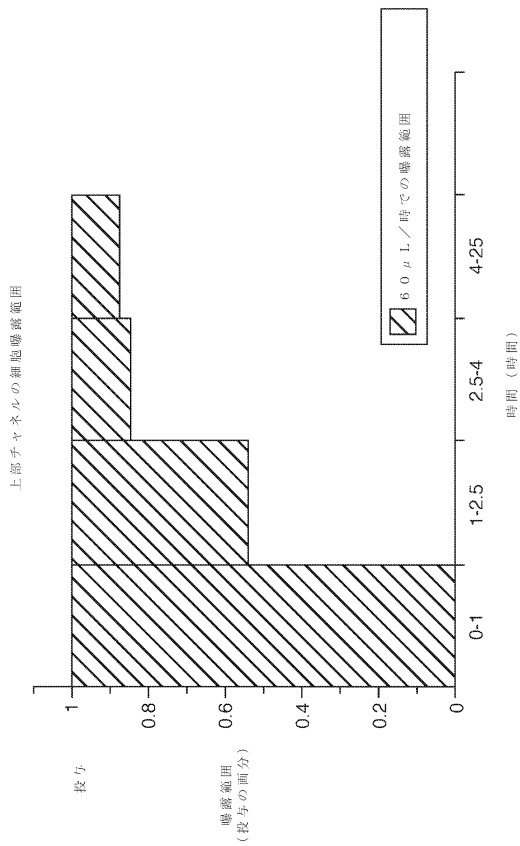
【図 99 B】



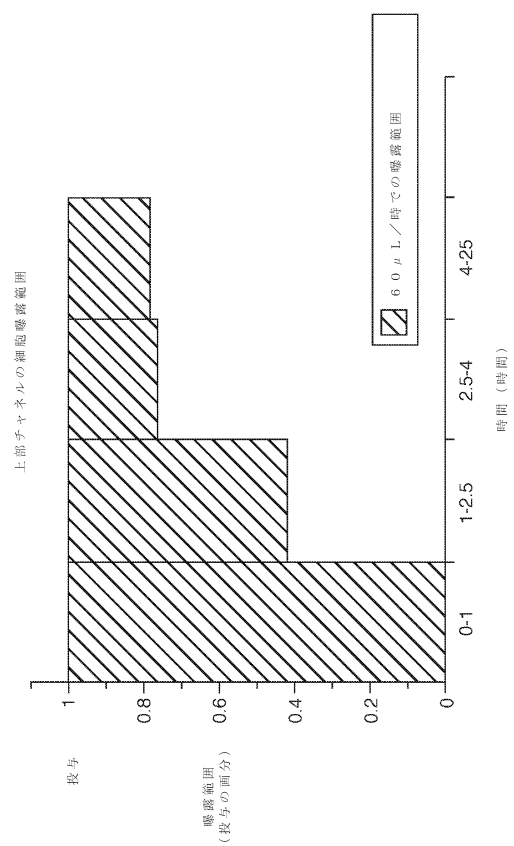
10

20

【図 100】



【図 101】

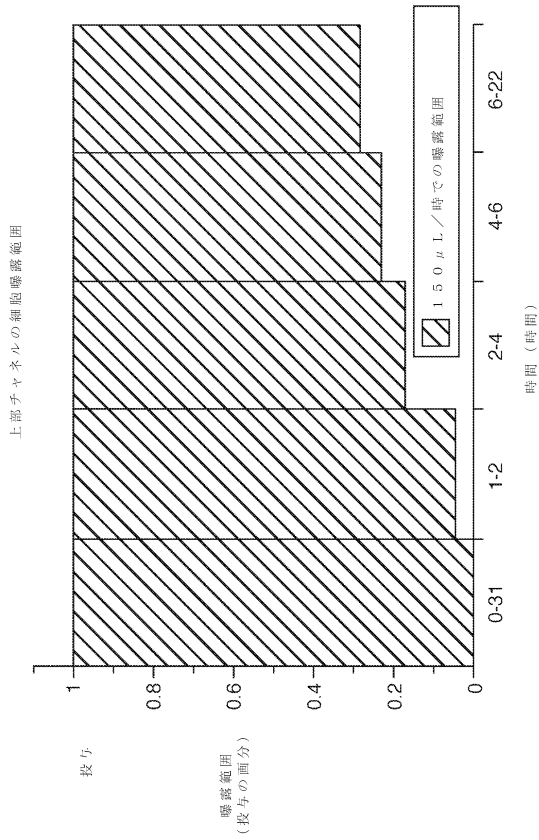


30

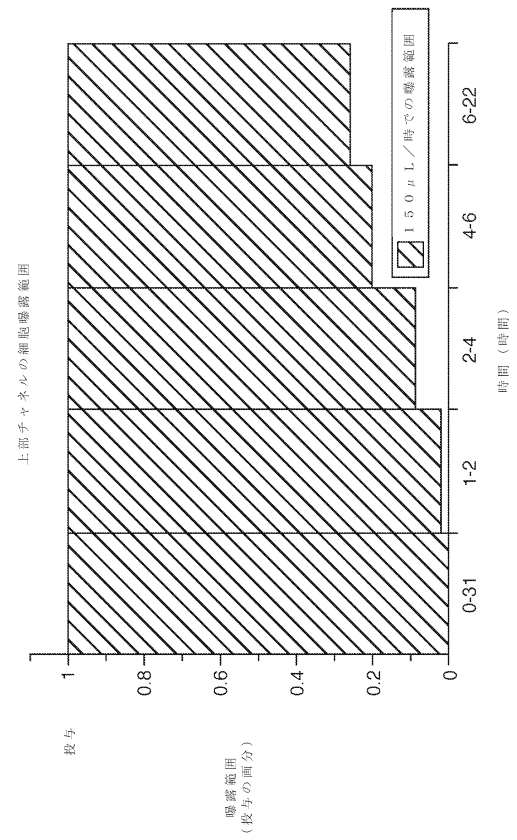
40

50

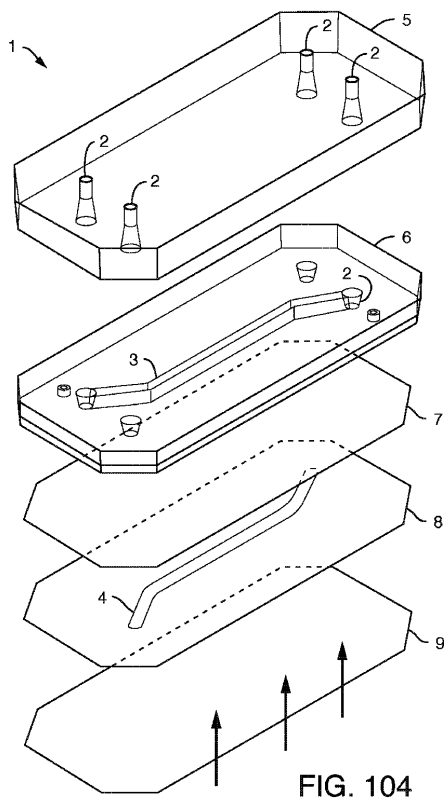
【図 1 0 2】



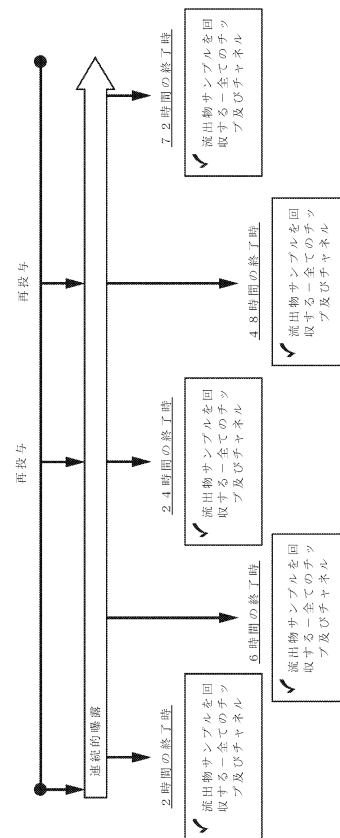
【図 1 0 3】



【図 1 0 4】



【図 1 0 5】



10

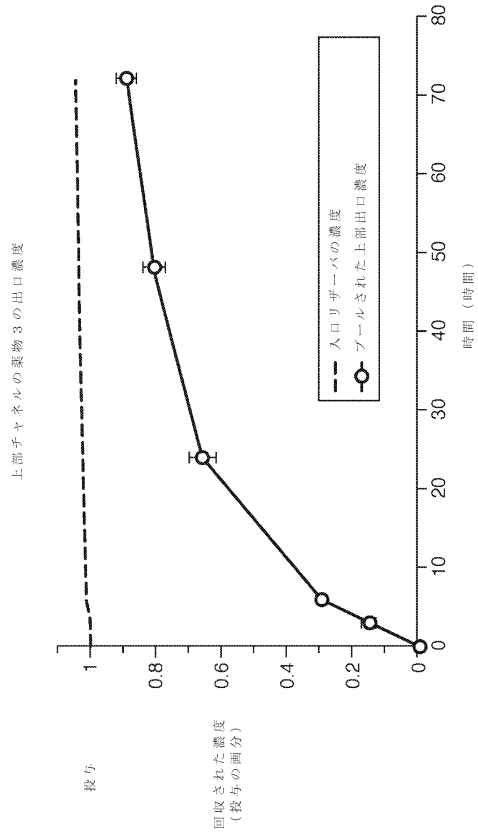
20

30

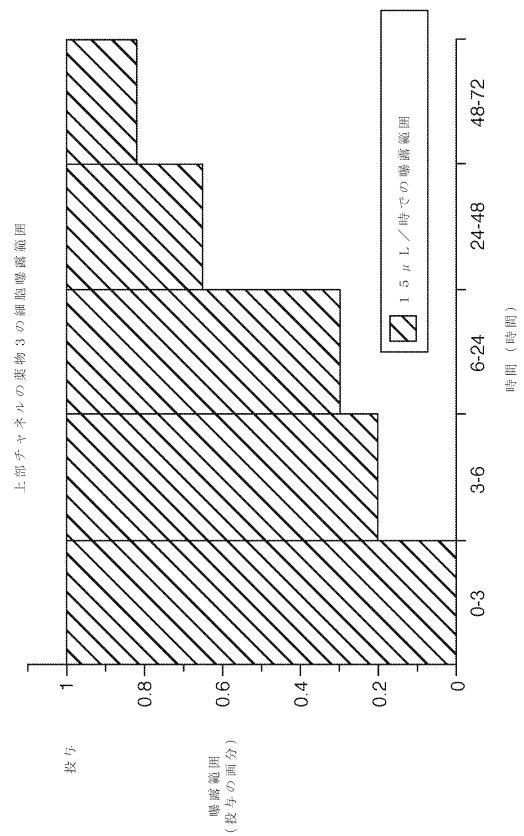
40

50

【図 106 A】



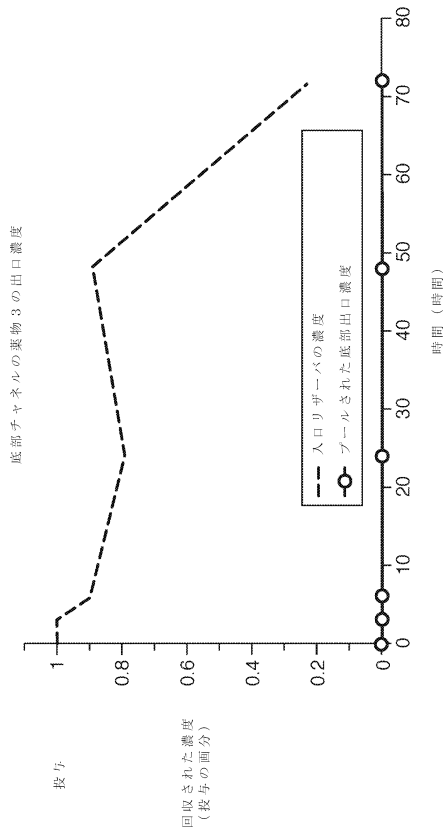
【図 106 B】



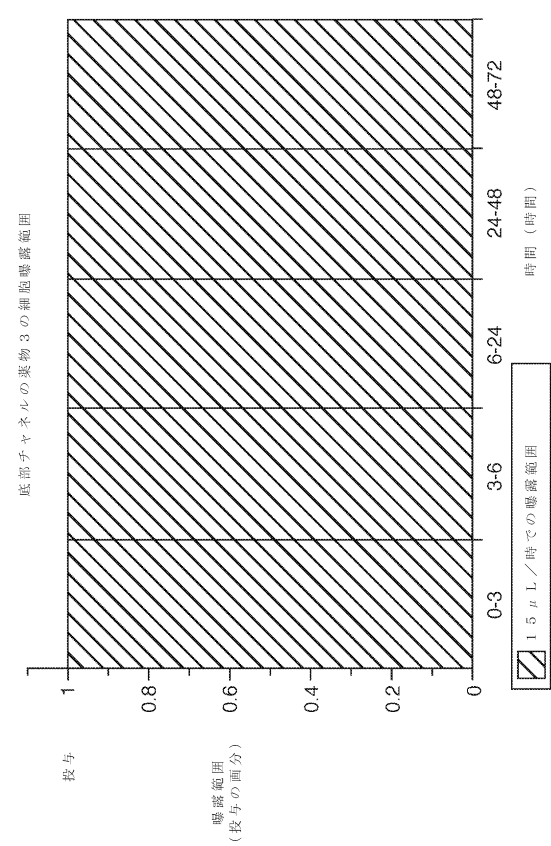
10

20

【図 107 A】



【図 107 B】

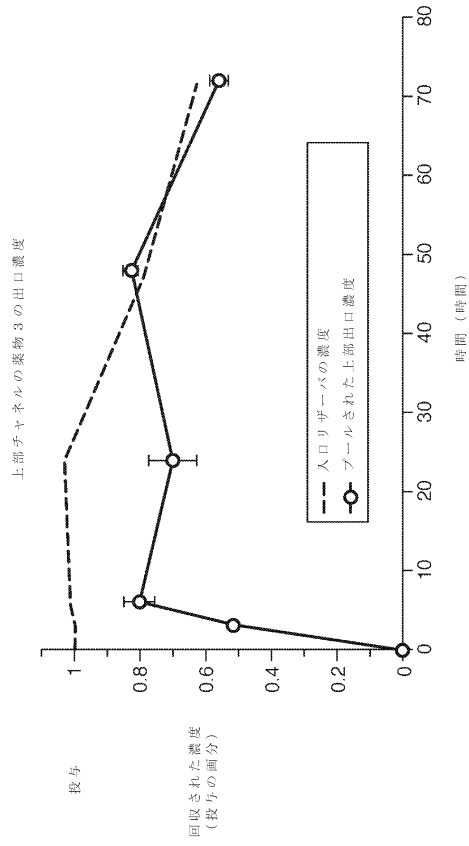


30

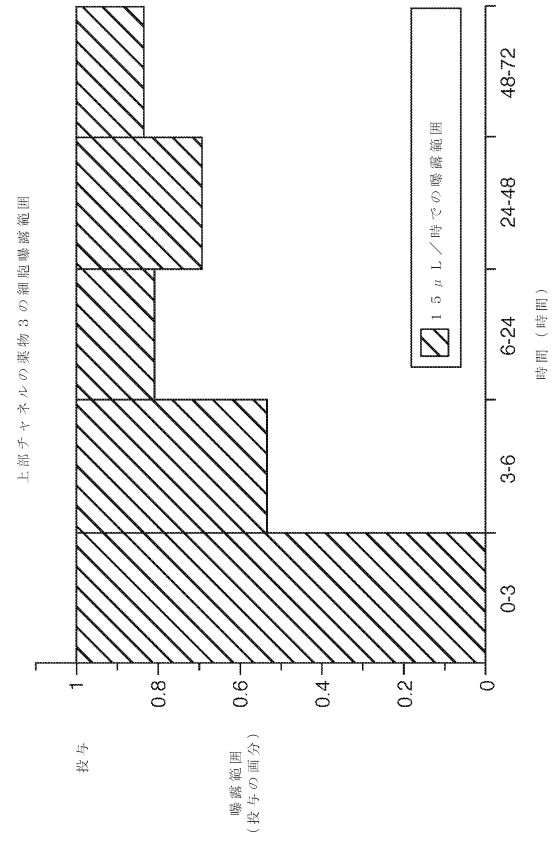
40

50

【図 108 A】



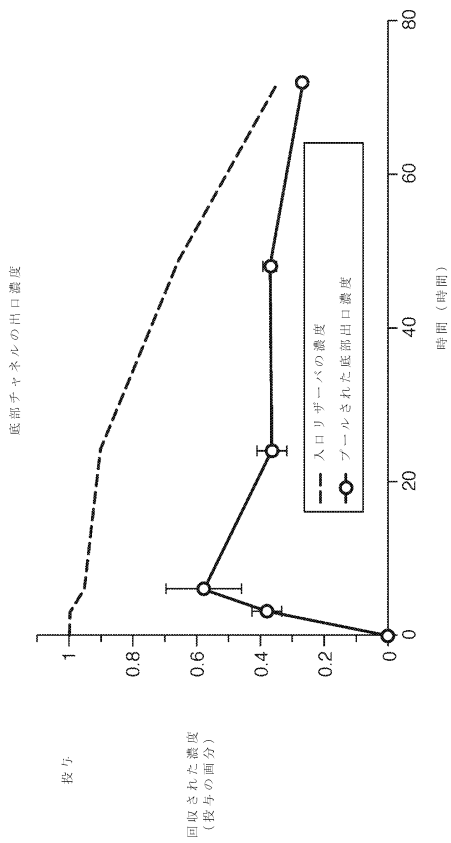
【図 108 B】



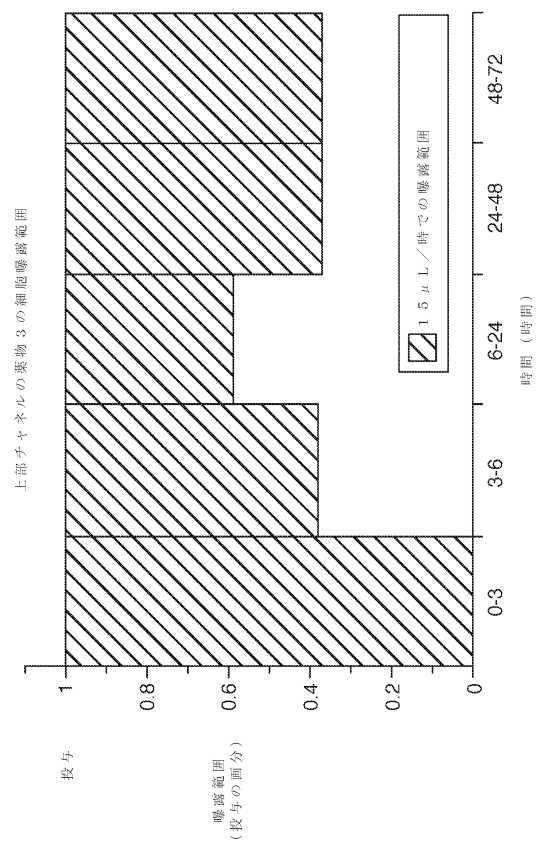
10

20

【図 109 A】



【図 109 B】



30

40

50

【図 1 1 0】

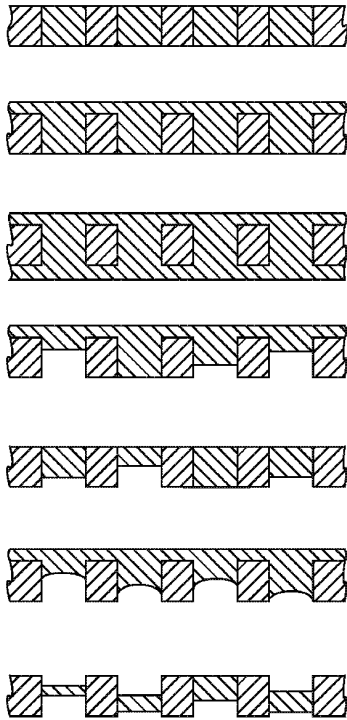
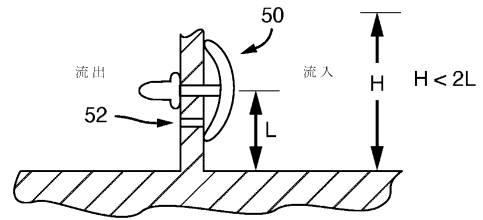


FIG. 110

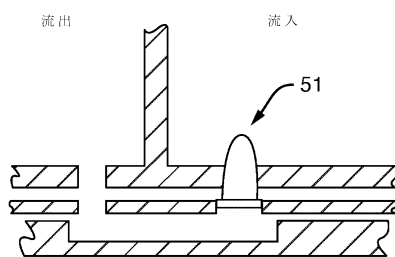
【図 1 1 1 A】



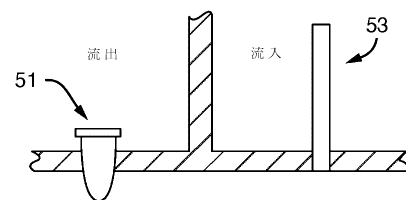
10

20

【図 1 1 1 B】



【図 1 1 1 C】

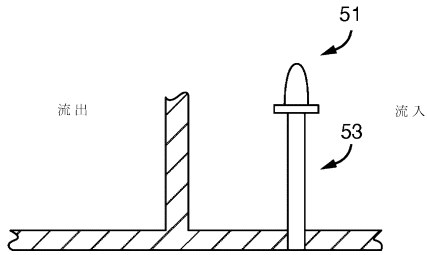


30

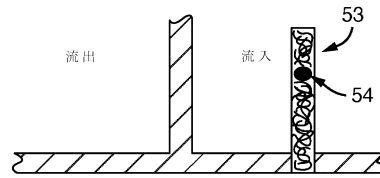
40

50

【図 1 1 1 D】

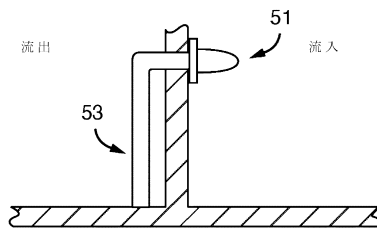


【図 1 1 1 E】

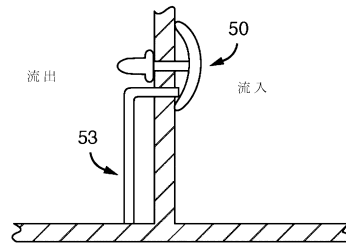


10

【図 1 1 1 F】

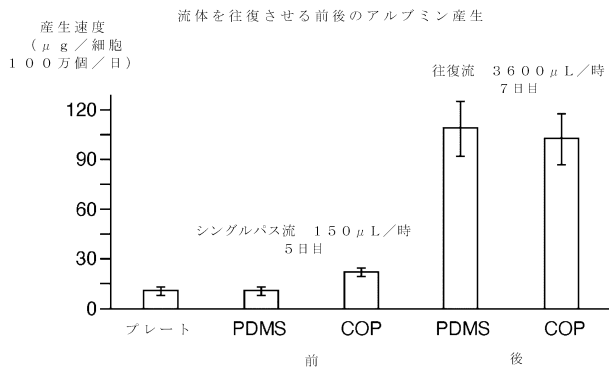


【図 1 1 1 G】

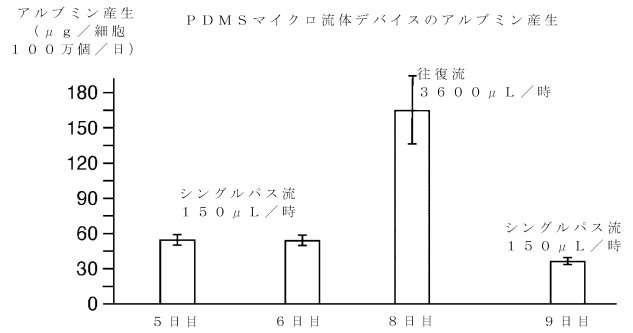


20

【図 1 1 2】



【図 1 1 3】



30

40

50

【図 1 1 4】

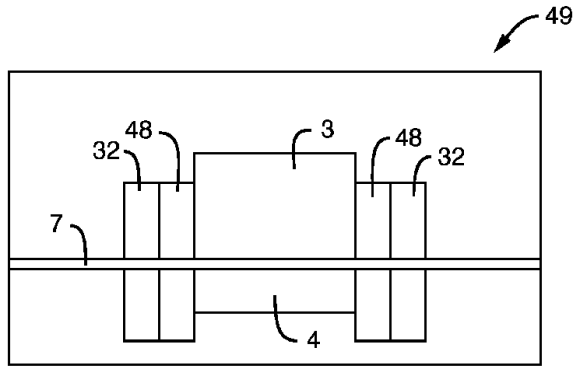
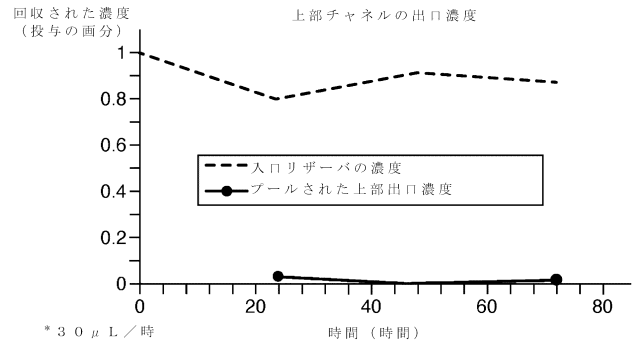


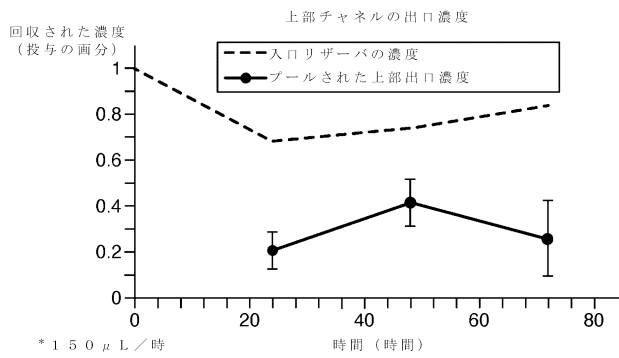
FIG. 114

【図 1 1 5 A】

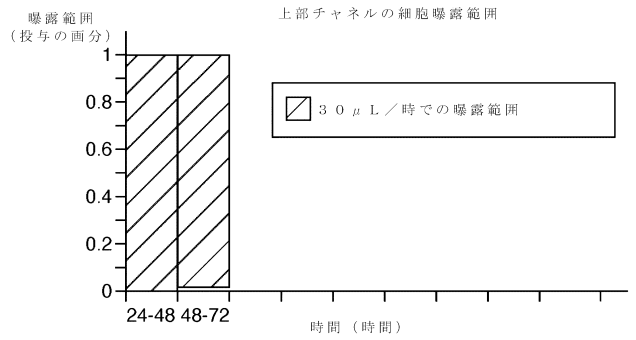


10

【図 1 1 5 B】



【図 1 1 5 C】



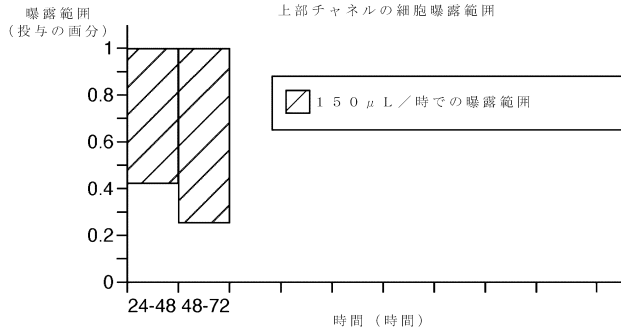
20

30

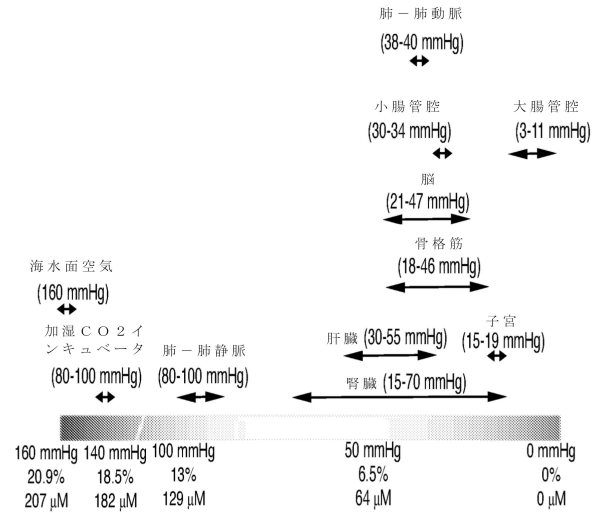
40

50

【図 1 1 5 D】

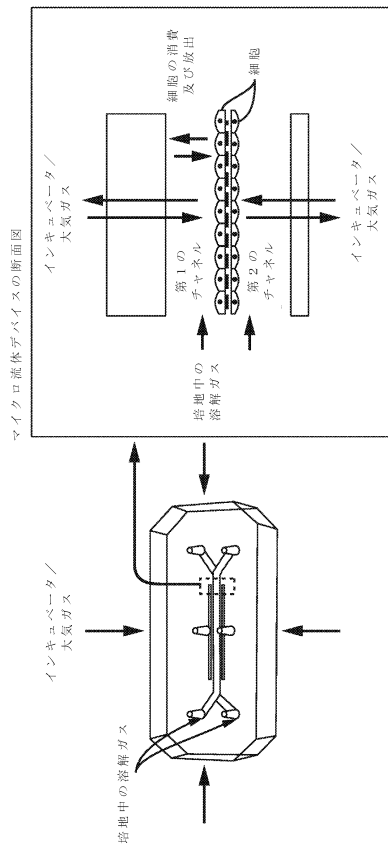


【図 1 1 6】

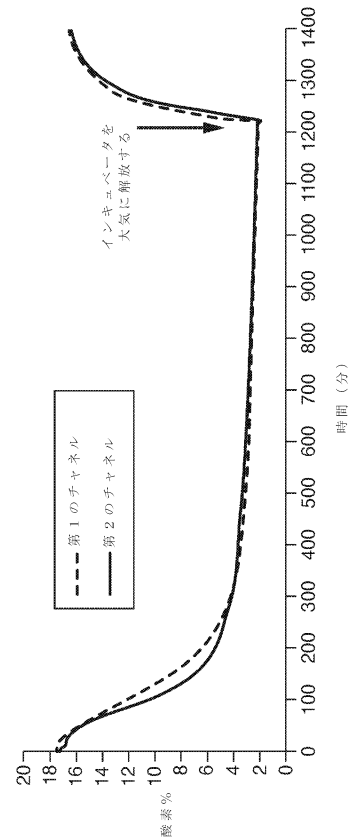


10

【図 1 1 7】



【図 1 1 8】



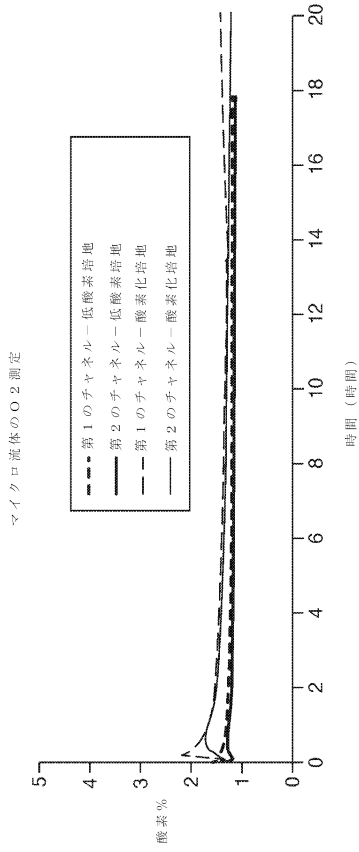
20

30

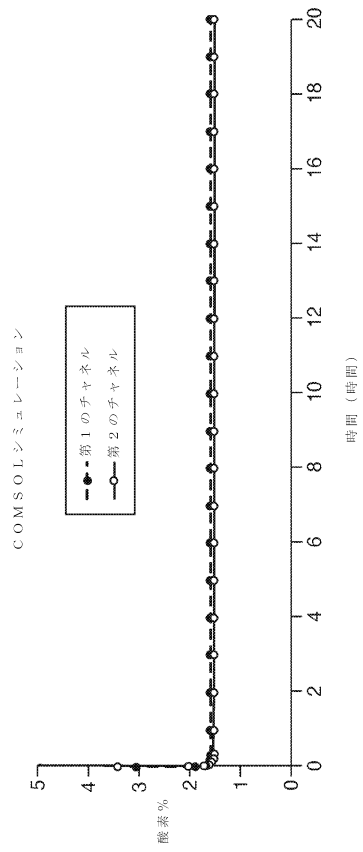
40

50

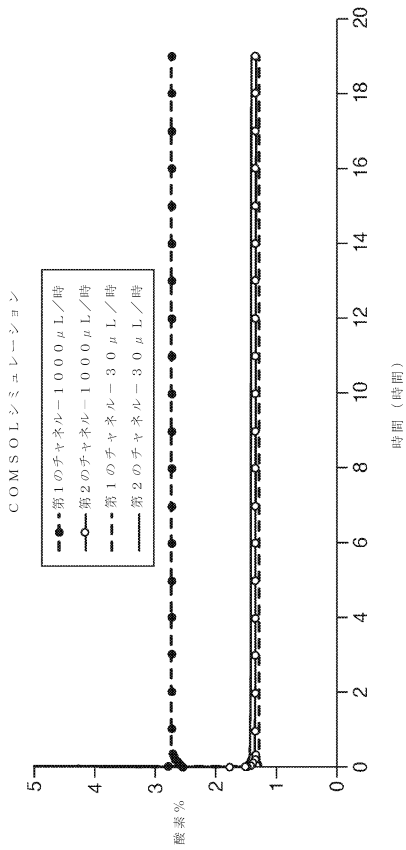
【図 1 1 9】



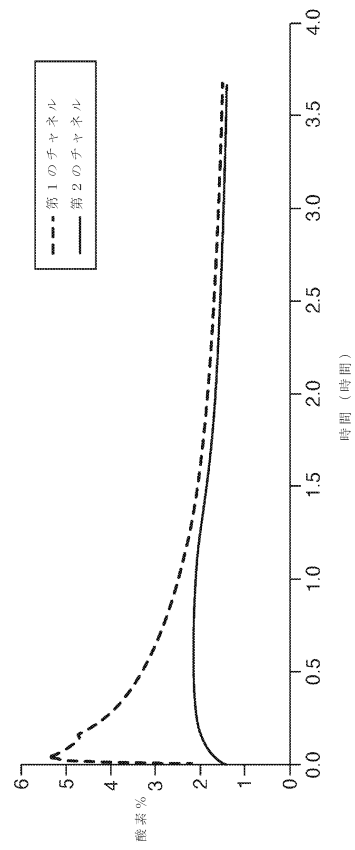
【図 1 2 0】



【図 1 2 1】



【図 1 2 2】



10

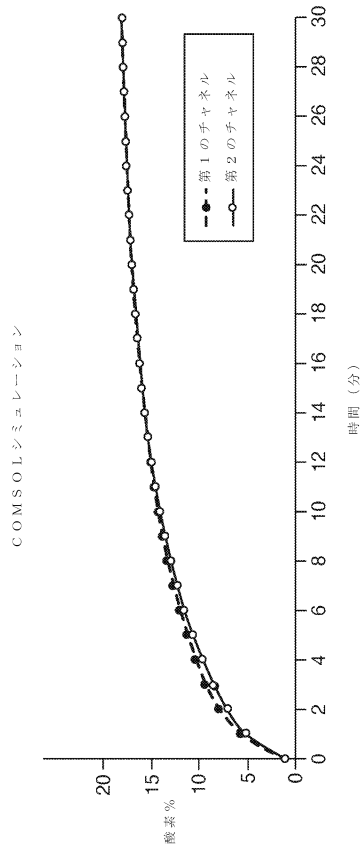
20

30

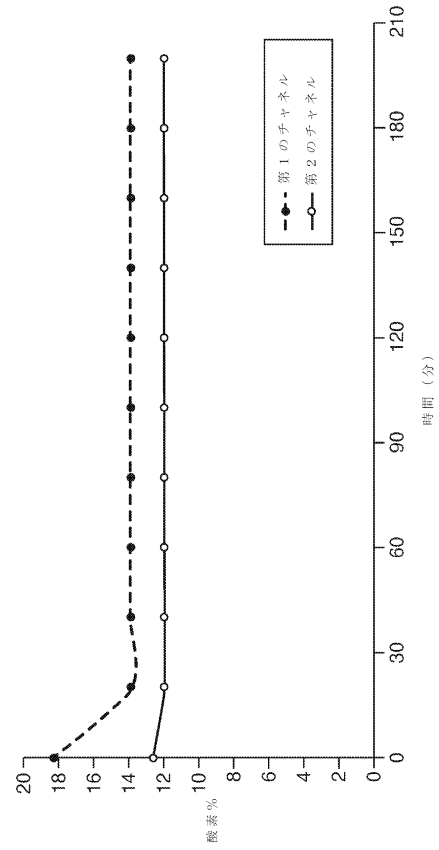
40

50

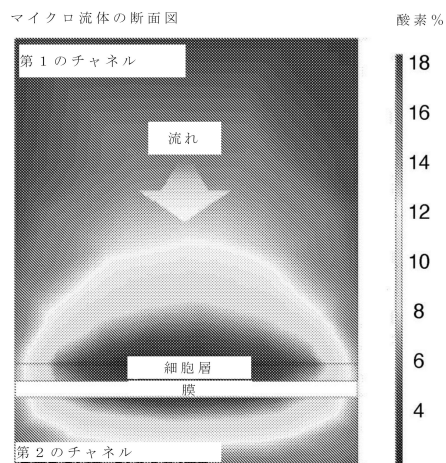
【図 1 2 3】



【図 1 2 4】



【図 1 2 5】



【図 1 2 6】

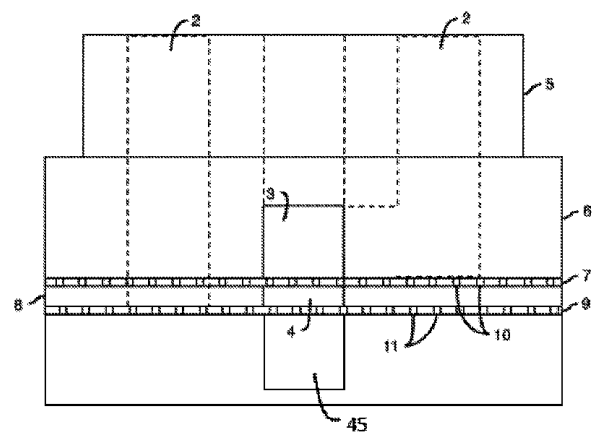


FIG. 126

【手続補正書】

【提出日】令和4年3月3日(2022.3.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

システム内の化合物分布を分析する方法であって、

10

a) システム及び前記システムと共に使用するための第1の実験プロトコルを提供することであって、前記第1の実験プロトコルが、化合物を前記システムに導入し、1つ又は複数の時点で行動を起こすことを含む、第1の実験プロトコルを提供することと、

b) 第1の修正された実験プロトコルを生成するために前記第1の実験プロトコルを修正することであって、前記第1の修正された実験プロトコルが、前記第1の実験プロトコルからの前記時点のうちの1つ又は複数における化合物濃度を測定することを含む、前記第1の実験プロトコルを修正することと、

c) 前記第1の修正された実験プロトコルを実行することと、

d) 前記化合物の濃度の前記測定値を使用して、前記システム全体の化合物分布を分析することと、

20

を含む、方法。

【請求項2】

e) 前記第1の実験プロトコルを実行するステップを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記システムが、1つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記システムが、輸液チューブを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記システムが、シリンジを含む、請求項1に記載の方法。

30

【請求項6】

前記システムが、1つ又は複数の生物学的要素を含み、前記第1の実験プロトコルが、前記1つ又は複数の生物学的要素の少なくとも1つを除外するように修正される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記第1の実験プロトコルが、前記生物学的要素に対する化合物試験を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記第1の実験プロトコルが、細胞を含み、前記第1の修正された実験プロトコルが、細胞を含まない、請求項1に記載の方法。

40

【請求項9】

前記システムが、コーティングを含み、前記第1の実験プロトコルが、コーティングを除外することによって修正される、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記第1の修正された実験プロトコルが、前記第1の実験プロトコルの1つ又は複数の時点で行動を起こすことを含まない、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記濃度の測定を実行することが、1つ又は複数の時点における前記行動を起こすことに取って代わる、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

50

前記第 1 の修正された実験プロトコルが、前記第 1 の実験プロトコルと比較して、入力化合物濃度のサブセットのみが前記修正された実験プロトコルに含まれるという点で修正される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記第 1 の実験プロトコルと比較して多孔質要素が除外されるという点で、前記第 1 の修正された実験プロトコルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記システムが、細孔を有する第 1 の膜を含む第 1 のマイクロ流体デバイスを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記システムが、前記修正された実験プロトコルにおいて第 2 のシステムで置き換えられ、前記第 2 のシステムが、前記第 1 の膜が細孔を含む少なくとも 1 つの領域に細孔のない膜を含まない第 2 のマイクロ流体デバイスを含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記第 1 の実験プロトコルが、前記システム内で流体を流すことを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記システムが、前記システムへの流体入力を可能にするように構成された入力ポートを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記システムが、前記システムからの流体出力を可能にするように構成された出力ポートを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記第 1 の実験プロトコルが、前記入力ポートに流入することを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記第 1 の実験プロトコルが、前記出力ポートから第 1 のサンプルを収集することを含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記化合物の濃度の前記測定が、前記出力ポートからサンプルを収集することと、前記サンプル中の前記化合物の前記濃度を定量することと、を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第 1 の修正された実験プロトコルが、前記システムに吸収される前記化合物の割合を更に定量する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記システムに流体流を導入するステップを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記行動を起こすことが、流出物をサンプリングすることを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記第 1 の実験プロトコルが、見かけの代謝産物値を達成するために前記流出物をアッセイすることを更に含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記化合物の濃度の前記測定値を使用して、前記見かけの代謝産物値を補正することを更に含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記化合物の濃度の前記測定値を使用して、前記見かけの代謝産物値の変動性を決定することを更に含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記濃度の測定値を使用して、前記第 1 の実験プロトコルを実行するかどうかを決定することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

(i) 前記化合物の濃度の前記測定値を使用して、第 2 の修正された実験プロトコルを生成することと、(ii) 前記第 2 の修正された実験プロトコルを実行することと、を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

前記第 1 の実験プロトコルが、生細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

システム内の化合物分布を決定する方法であって、

a) 1 つ又は複数の生物学的要素を含むシステム及び前記システムのための実験プロトコルを提供することであって、前記 1 つ又は複数の生物学的要素が、化合物と接触していることと、

b) 前記 1 つ又は複数の生物学的要素の少なくとも 1 つを除外することによって前記実験プロトコルを修正することと、

c) 前記修正された実験プロトコルを実行することと、

d) 前記システム中の前記化合物の濃度を測定することによって、前記システム中の前記化合物の分布を決定することと、

を含む、方法。

【請求項 32】

前記実験プロトコルが、流体流を前記システムに導入することを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記実験プロトコルが、流出物を収集することを含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記実験プロトコルが、前記流出物をアッセイすることを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 35】

前記生物学的要素が、細胞を含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 36】

前記生物学的要素が、生物学的コーティングを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 37】

前記システムが、1 つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 38】

前記化合物の前記分布が、前記実験プロトコルからの結果についてのエラーバーを計算するために使用される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 39】

前記化合物の割合分布が、前記実験プロトコルについての半数阻害濃度 (IC₅₀) を計算するために使用される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 40】

システム内の化合物分布を評価する方法であって、

a) システム及び前記システムのための第 1 の実験プロトコルを提供することであって、前記第 1 の実験プロトコルは、化合物を前記システムに導入することを含む、第 1 の実験プロトコルを提供することと、

b) 修正された実験プロトコルを生成するために前記第 1 の実験プロトコルを修正することであって、前記修正された実験プロトコルが、

i) 第 1 の濃度を使用して前記化合物を導入することと、

ii) 前記化合物の濃度の第 1 の測定を実行することと、

を含む、第 1 の実験プロトコルを修正することと、

10

20

30

40

50

c) 前記修正された実験プロトコルを実行することと、
d) 前記化合物の濃度の前記測定値を閾値と比較することと、及び
e) 前記濃度の測定値が前記閾値を超える場合、前記第 1 の実験プロトコルを実行することと、
を含む、方法。

【請求項 4 1】

前記第 1 の実験プロトコルが、流体流を前記システムに導入することを更に含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記第 1 の実験プロトコルが、1 つ又は複数の時点で流出物を収集することを含む、請求項 4 1 に記載の方法。 10

【請求項 4 3】

前記第 1 の実験プロトコルが、前記流出物をアッセイすることを含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記生物学的要素が、細胞を含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記生物学的要素が、生物学的コーティングを含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記システムが、1 つ又は複数のマイクロ流体デバイスを含む、請求項 4 0 に記載の方法。 20

【請求項 4 7】

前記第 1 の測定が、前記第 1 の実験プロトコルの前記 1 つ又は複数の時点の少なくとも 1 つで行われる、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 8】

閾値に対する前記化合物の濃度の前記測定値が、前記第 1 の測定値を前記第 1 の濃度で除算し、第 1 の比率を得ることによって比較される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記閾値が、1 0 %、2 0 %、3 3 %、5 0 %、6 6 %、及び 7 5 % のうちの 1 つを上回る第 1 の比率値である、請求項 4 8 に記載の方法。 30

【請求項 5 0】

前記修正された実験プロトコルが、入力化合物濃度を測定することを更に含み、前記第 1 の測定値が、測定された前記入力濃度で除算されて、測定された比率を得る、請求項 4 0 に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/39830

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-20, drawn to a method of fabricating a microfluidic device.
Group II: Claims 21-31, 228-244, 248, 250, drawn to fluidic devices.
Group III: Claims 32-47, 210-227, 247, 249, 251-293, drawn to methods of controlling gas transport using microfluidic devices.
Group IV: Claims 48-66, 245-246, drawn to methods of fabricating a gas exchanger.
Group V: Claims 67-136, drawn to methods of analyzing compound distribution.
Group VI: Claims 137-206, drawn to a fluidic device for monitoring biological function.
Group VII: Claims 207-209, drawn to a perfusion manifold assembly.

-- Please See Supplemental Box --

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-20, 67-136
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/39830

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - B01L 3/00, B01D 19/00, B01D 53/22, C12M 3/06, C12M 1/04, G01N 1/40 (2020.01)

CPC - B01L 3/5027, B01L 3/502784, B01L 9/527, B01D 19/0031, B01D 19/0409, B01D 53/228, B01D 63/088, B01D 2201/18, B01D 2201/184, B01D 2201/291, B01D 2201/306, B01L 2300/048, C12M 1/08, C12M 23/24, C12M 29/04, G01N 1/40, G01N 30/38, G01N 33/0067, G01N 2001/002, G01N 2021/7709, G01N 2291/02809, G05B 19/045, G05B 2219/32306, G05B 2219/32343

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y -- A	US 2012/0070878 A1 (FINK et al.) 22 March 2012 (22.03.2012), Figs. 5-6; para [0005], [0032]-[0044], [0057], [0082]	1, 4-12, 14-15, 19-20 2-3, 13, 16-18 67-125
X -- Y -- A	US 2013/0165900 A1 (BRAIG et al.) 27 June 2013 (27.06.2013), para [0007], [0016], [0071]-[0073], [0076]-[0078], [0090], [0093], [0158], [0160], [0208], [0269], [0272], [0304]-[0306], [0322]	126, 130-131, 133, 135-136 127-129, 132, 134 67-125
Y -- A	US 2014/0087362 A1 (SZALAY et al.) 27 March 2014 (27.03.2014), para [0035], [0146], [0249], [0323], [0327]-[0331], [0388], [0407]	2-3, 13, 16-18 67-125
Y -- A	WO 2004/059299 A1 (CYTODISCOVERY, INC.) 15 July 2004 (15.07.2004), para [0015]-[0017], [0022], [0025], [0031], [0040], [0088], [00104], [00130], [00164], [00168], [00174], [00187], [00190], [00192]	127-129, 132, 134 67-125
A	WO 03/074994 A2 (EVOTEC OAI AG) 12 September 2003 (12.09.2003), pg 1, para 1; pg 18, para 3-4; pg 19, para 1-2; pg 26, para 2	67-125

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 October 2020

Date of mailing of the international search report

20 NOV 2020

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/39830

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,285,073 A (SCHELLEN et al.) 08 February 1994 (08.02.1994), col 2, ln 44-66; col 4, ln 31-55	67-125

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 20/39830

Continued from Box No. III, Observations where unity of invention is lacking.

The inventions listed as Groups I, II, III, IV, V, VI, and VII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Groups II, III, IV, V, VI, and VII do not require a method of fabricating a microfluidic device, comprising: a) providing a microfluidic device comprising a channel; b) selecting a gas exchanger of a porosity, wherein said porosity determines a rate of gas transport; and c) capping said channel with said gas exchanger, as required by Group I.

Groups I, III, IV, V, VI, and VII do not require a fluidic device, said fluidic device comprising a first substrate having an open channel and a second substrate comprising a gas exchanger, wherein said second substrate caps the first substrate forming an at least partially enclosed channel; a device comprising a gas-impermeable substrate, said gas-impermeable substrate comprising (i) a first surface, (ii) a second surface, and (iii) one or more gas-permeable regions; a fluidic device, said fluidic device comprising (i) a plurality of outer sides, (ii) a first channel disposed within said body, (iii) a second channel disposed within said body, (iv) a membrane disposed between said first channel and second channel, and (v) one or more gas-impermeable masks contacting one or more of said plurality of outer sides; a fluidic device, said fluidic device comprising (i) a plurality of outer sides, (ii) a first channel disposed within said body, (iii) a second channel disposed within said body, (iv) a membrane disposed between said first channel and second channel, (v) a gas exchanger contacting at least one of said first channel and second channel, and (vi) one or more gas-impermeable masks contacting one or more of said plurality of outer sides, as required by Group II.

Groups I, II, IV, V, VI, and VII do not require a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a fluidic device comprising body and a gas exchanger contacting said body, said gas exchanger comprising a gas-impermeable polymer substrate with gas-permeable regions, said substrate comprising first and second sides, said regions creating a porosity; and b) introducing gas on said first side of said substrate, wherein the rate of gas transport to said second side is controlled by said porosity; a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a substantially gas-impermeable microfluidic device comprising a rigid polymer and living cells in a channel or chamber, said living cells having a gas consumption rate; and b) introducing culture media into said channel or chamber at a flow rate, said culture media carrying gas, wherein the rate of gas transport to said living cells is controlled by the flow rate, and said rate of gas transport meets or exceeds said gas consumption rate;

a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a substantially gas-impermeable microfluidic device comprising i) living cells on a surface and ii) inlet and outlet ports, said inlet and outlet ports in fluidic communication with iii) a recirculation pathway, and b) flowing culture media carrying gas at a flow rate into said inlet port of said microfluidic device in a direction, thereby causing fluid to exit said outlet port of said microfluidic device and enter said recirculation pathway, thereby recirculating said culture media without reversing the direction of fluid flow, wherein the rate of gas transport to said living cells is increased by said recirculating;

a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a substantially gas-impermeable microfluidic device comprising i) living cells on a surface and ii) inlet and outlet ports, said inlet and outlet ports in fluidic communication with iii) a reciprocation actuator, and b) flowing culture media carrying gas at a flow rate into said inlet port of said microfluidic device in a direction, thereby causing fluid to move in the direction of said outlet port; and c) reciprocating said fluid with said reciprocation actuator, thereby reversing the direction of fluid flow, wherein the rate of gas transport to said living cells is increased by said reciprocating;

a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a substantially gas-impermeable microfluidic device comprising i) a gas exchanger and ii) living cells in a channel or chamber, said device comprising a rigid polymer; and b) introducing culture media into said channel or chamber at a flow rate, said culture media carrying gas, wherein the rate of gas transport to said living cells is controlled by said gas exchanger; a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a substantially gas-impermeable microfluidic device comprising i) living cells on a surface and ii) inlet and outlet ports, said inlet and outlet ports in fluidic communication with iii) a recirculation pathway, and b) flowing culture media carrying gas at a flow rate into said inlet port of said microfluidic device in a direction, thereby causing fluid to exit said outlet port of said microfluidic device and enter said recirculation pathway, thereby recirculating said culture media without reversing the direction of fluid flow, wherein the rate of gas transport to said living cells is increased by said recirculating;

a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a substantially gas-impermeable microfluidic device comprising i) living cells on a surface and ii) inlet and outlet ports, said inlet and outlet ports in fluidic communication with iii) a reciprocation actuator, and b) flowing culture media carrying gas at a flow rate into said inlet port of said microfluidic device in a direction, thereby causing fluid to move in the direction of said outlet port; and c) reciprocating said fluid with said reciprocation actuator, thereby reversing the direction of fluid flow, wherein the rate of gas transport to said living cells is increased by said reciprocating;

a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a substantially gas-impermeable microfluidic device comprising i) a gas exchanger and ii) living cells in a channel or chamber, said device comprising a rigid polymer; and b) introducing culture media into said channel or chamber at a flow rate, said culture media carrying gas, wherein the rate of gas transport to said living cells is controlled by said gas exchanger;

a method of controlling gas transport in a microfluidic device, comprising: a) providing a substantially gas-impermeable microfluidic device comprising a plurality of outer sides comprising substantially gas-impermeable polymer having a modulus of elasticity between 0.1 and 150 GPa, and a substantially gas-permeable inner membrane disposed between a first channel and a second channel; and b) introducing a fluid into said at least one of said first channel or said second channel at a flow rate, wherein said substantially gas-permeable inner membrane is configured to allow gas transport between said first channel and said second channel;

a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a substantially gas-permeable microfluidic device comprising i) a plurality of outer sides and ii) living cells in an inner channel or chamber, said microfluidic device comprising an elastomeric polymer having a modulus of elasticity below 0.1 GPa; and one or more gas-impermeable masks having a modulus of elasticity between 0.1 and 150 GPa; b) contacting at least one of said plurality of outer sides with a gas-impermeable mask; and c) introducing non-oxygenated culture media into said channel or chamber at a flow rate; ... (continued)

-- Please See Supplemental Box --

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/39830

Continued from Box No. III, Observations where unity of invention is lacking,

(Continued from Previous Supplemental Box) ... a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a substantially gas-permeable microfluidic device comprising i) a plurality of outer sides, ii) a gas exchanger and iii) living cells in an inner channel or chamber, said device comprising an elastomeric polymer having a modulus of elasticity below 0.1 GPa; b) adding a substantially gas-impermeable mask to at least one of said plurality of outer sides without masking the gas exchanger; and c) introducing non-oxygenated culture media into said channel or chamber at a flow rate, wherein the rate of gas transport to said living cells is controlled by said gas exchanger;

a microfluidic device comprising a plurality of outer sides comprising substantially gas-permeable polymer having a modulus of elasticity below 0.1 GPa, and a substantially gas-impermeable mask attached to at least one of said plurality of outer sides;

a microfluidic device comprising a plurality of outer sides comprising substantially gas-impermeable polymer having a modulus of elasticity between 0.1 and 150 GPa, and a substantially gas-permeable inner channel wall;

a microfluidic device comprising a plurality of outer sides comprising substantially gas-impermeable polymer having a modulus of elasticity between 0.1 and 150 GPa, and a substantially gas-permeable inner membrane;

a method comprising: a) providing a microfluidic device comprising a plurality of outer sides comprising substantially gas-impermeable polymer having a modulus of elasticity between 0.1 and 150 GPa, and a substantially gas-permeable inner membrane; and b) stretching said membrane;

a microfluidic device, comprising: a) one or more fluidic channels; b) gas channels around at least a portion of the perimeter of said one or more fluidic channels, separated from said one or more fluidic channels by a gas-permeable wall;

a method of controlling gas transport, comprising: a) providing a microfluidic device comprising i) one or more fluidic channels, and (ii) gas channels around at least a portion of the perimeter of said one or more fluidic channels, separated from said fluidic channels by a gas-permeable wall; c) introducing a fluid into said one or more fluidic channels at a flow rate;

b) introducing a non-oxygen gas into said gas channels as to control the gas transport into said fluid; a microfluidic device comprising: (i) a first channel and a second channel, each of said first channel and second channel comprising a plurality of walls, wherein at least one of said walls are gas-permeable having a modulus of elasticity below 0.1 GPa and at least one of said walls are gas-impermeable having a modulus of elasticity between 0.1 and 150 GPa, and (ii) a gas-permeable membrane disposed between said first and second channel, said membrane having a modulus of elasticity less than 0.1 GPa;

a microfluidic device comprising: a body having a first channel, a gas-exchange channel, and a gas exchanger between said first channel and said gas-exchange channel;

a method comprising: (i) providing a microfluidic device comprising at least one channel and a membrane within said channel; and (ii) applying a gas exchanger to said at least one channel. In one embodiment, said channel comprises cells;

a system comprising: a microfluidic device having at least one channel, wherein said microfluidic device is disposed in a gaseous environment;

a method of controlling the gas concentration within a microfluidic device comprising: (i) providing a microfluidic device comprising at least one channel; (ii) placing said microfluidic device in a gaseous environment, such that said at least one channel assumes the gas concentration of said gaseous environment, as required by Group III.

Groups I, II, III, V, VI, and VII do not require a method of fabricating a gas exchanger comprising: a) providing a gas impermeable polymer substrate with pores, said substrate comprising first and second surfaces, said pores creating a porosity; b) coating said first surface with an uncured gas-permeable polymer, such that said uncured gas-permeable polymer penetrates said pores; c) removing excess uncured polymer from said first and second surfaces, such that said first and second surfaces are substantially free of said uncured polymer, while said pores are filled with said uncured gas-permeable polymer; and d) curing said uncured gas-permeable polymer in said pores to fabricate a substantially gas impermeable gas exchanger;

a method of fabricating a gas exchanger comprising: a) providing (i) a first gas-impermeable polymer substrate with pores, said substrate comprising first and second surfaces, said pores creating a porosity, and (ii) a second gas-permeable polymer substrate; and b) laminating said first surface with said second gas-permeable polymer substrate, such that said gas-permeable polymer substrate covers said pores;

a method of fabricating a gas exchanger comprising: a) providing (i) a first gas-impermeable polymer substrate with pores, said substrate comprising first and second surfaces, said pores creating a porosity, and (ii) a second gas-permeable polymer substrate; and b) contacting said first surface with said second gas-permeable polymer substrate, such that said gas-permeable polymer substrate forms to said gas-impermeable polymer substrate, covering said pores; and a rigid polymer film comprising elastomeric pores, as required by Group IV.

Groups I, II, III, IV, VI, and VII do not require a method of analyzing compound distribution in a system, comprising: a) providing a system and a first experimental protocol for use with said system, said first experimental protocol comprising introducing a compound into said system and taking actions at one or more timepoints; b) modifying said first experimental protocol to generate a first modified experimental protocol; c) measuring compound concentration at one or more of said timepoints from said first experimental protocol; d) performing said first modified experimental protocol; and e) using said measurement of concentration of said compound to analyze compound distribution across said system;

a method of determining compound distribution in a system, comprising: a) providing a first system and a first experimental protocol for a said first system, said first system comprising: i) first fluidic channel; ii) a second fluidic channel; and iii) a first membrane disposed between said first fluidic channel and said second fluidic channel, said first membrane comprising pores; wherein said first experimental protocol comprises introducing a compound into said first system and taking actions at one or more timepoints; b) modifying said first experimental protocol to generate a first modified experimental protocol, by substituting said first membrane with a second membrane, said second membrane lacking pores; c) performing said modified experimental protocol; d) performing a measurement of the concentration of said compound at one or more of said timepoints of said first experimental protocol; and e) comparing said measurement of concentration of said compound to the concentration of said compound to determine compound distribution in said system;

a method of determining compound distribution in a system, comprising: a) providing a system and an experimental protocol for said system comprising one or more biological elements; wherein said one or more biological elements are contacted by a compound; b) modifying said experimental protocol by excluding at least one of said one or more biological elements; c) performing said modified experimental protocol; and d) determining the distribution of said compound in said system using by measuring the concentration of said compound in said system; ... (continued)

-- Please See Supplemental Box --

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/39830

Continued from Box No. III, Observations where unity of invention is lacking.

(Continued from Previous Supplemental Box) ... a method of assessing compound distribution in a system, comprising: a) providing a system and a first experimental protocol for said system, said first experimental protocol comprising introducing a compound into said system; b) modifying said first experimental protocol to generate a modified experimental protocol, said modified experimental protocol comprising: i) introducing said compound using a first concentration; and ii) performing a first measurement of the concentration of said compound; c) performing said modified experimental protocol; d) comparing said measurement of the concentration of said compound to a threshold; e) performing said first experimental concentration surpasses said threshold protocol if said measurement of concentration surpasses said threshold; a method of assessing compound distribution, comprising: a) introducing a flow to a fluidic circuit, said flow comprising an initial concentration of a compound; b) collecting one or more effluent samples from said fluidic circuit; c) determining the concentration of said compound in said one or more effluent samples so as to generate measured concentrations; and d) comparing said measured concentrations with the initial concentration of said compound, thereby assessing compound absorption in said fluidic circuit, as required by Group V.

Groups I, II, III, IV, V, and VII do not require a fluidic device for monitoring biological function, said fluidic device comprising (i) a first channel, (ii) a second channel, (iii) a membrane disposed between said first channel and second channel, and (iv) a gas exchanger contacting at least one of said first and second channel configured to be able to control the rate of gas transport into said fluidic device; a fluidic device for monitoring biological function, said fluidic device comprising (i) a first channel layer including a first channel, (ii) a second channel layer including a second channel, (iii) a membrane located between said first channel layer and second channel layer, and (iv) a gas exchanger contacting at least one of said first and second channels configured to be able to introduce gas flow into said fluidic device, as required by Group VI.

Groups I, II, III, IV, V, and VI do not require a perfusion manifold assembly comprising (i) a lid configured to serve as the top of (ii) one or more fluid reservoirs, (iii) a gasketing layer resistant to absorption of small molecules under said fluid reservoir(s), (iv) a fluidic backplane under, and in fluidic communication with, said fluid reservoirs, (v) a capping layer resistant to the absorption of small molecules over said fluidic backplane, and (vi) a projecting member for engaging the microfluidic device, as required by Group VII.

Shared Common Features

The only feature shared by Groups I, II, III, V, VI, and VII that would otherwise unify the groups is a fluidic device. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by US 2015/0209783 A1 (President and Fellows of Harvard College). President and Fellows of Harvard College discloses a fluidic device (para [0030], [0032]).

The only feature shared by Groups I, II, III, IV, and VI that would otherwise unify the groups is rate of gas exchange. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by US 2006/0200100 A1 (Rosati). Rosati discloses a rate of gas exchange (para [0010], [0016], rate of gas transfer for a membrane.).

The only feature shared by Groups I, II, III, V, and VI that would otherwise unify the groups is a channel. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by President and Fellows of Harvard College. President and Fellows of Harvard College discloses a channel (para [0009]).

The only feature shared by Groups I, II, and VII that would otherwise unify the groups is a cap. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by President and Fellows of Harvard College. President and Fellows of Harvard College discloses a cap (para [0037], top layer).

The only feature shared by Groups I, III, and IV that would otherwise unify the groups is porosity. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by President and Fellows of Harvard College. President and Fellows of Harvard College discloses porosity (para [0041]).

The only feature shared by Groups I, III, and VI that would otherwise unify the groups is gas transport. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by President and Fellows of Harvard College. President and Fellows of Harvard College discloses gas transport (para [0030], [0031], air or gas bubbles removed from fluid.).

The only feature shared by Groups I, III, and VII that would otherwise unify the groups is microfluidic. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by President and Fellows of Harvard College. President and Fellows of Harvard College discloses microfluidic (para [0032]).

The only feature shared by Groups II, III, and IV that would otherwise unify the groups is a gas-impermeable polymer and a substrate. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by Rosati. Rosati discloses a gas-impermeable polymer (para [0017]) and a substrate (para [0044]-[0046], laminate film.)

The only feature shared by Groups II and III that would otherwise unify the groups is a mask and sides. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by Rosati. Rosati discloses a mask (para [0010]) and sides (para [0059]).

The only feature shared by Groups III and V that would otherwise unify the groups is concentration. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by President and Fellows of Harvard College. President and Fellows of Harvard College discloses concentration (para [0054]).

-- Please See Supplemental Box --

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/39830

Continued from Box No. III, Observations where unity of invention is lacking.

The only feature shared by Groups IV and V that would otherwise unify the groups is pores. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by President and Fellows of Harvard College. President and Fellows of Harvard College discloses pores (para [0041]).

The only feature shared by Groups VI and VII that would otherwise unify the groups is layers. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by President and Fellows of Harvard College. President and Fellows of Harvard College discloses layers (para [0044]).

As the technical features were known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I, II, III, IV, V, VI, and VII therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

2. MATLAB

3. JAVA

(72)発明者 スリズ, ジョサイア

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02118, ボストン, アpartment 4, 5 グリーン
ウィッチ パーク

(72)発明者 レブナー, ダニエル

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02446, ブルックライン, 5C, 55 スーワル アベ
ニュー

(72)発明者 ザッカーマン, ブライアン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, 12 ウースター ストリート

(72)発明者 ウェン, ノーマン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02132, ウェスト ロックスベリー, ユニット 118
, 4975 ワシントン ストリート

(72)発明者 ルビンス, ジョナサン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, 121 チェリー ストリート
#1

(72)発明者 シュロフ, タンビ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, ユニット 2, 205 ハーバ
ード ストリート

(72)発明者 イノホサ, クリストファー デイビッド

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02148, モールデン, 136 エルウェル ストリート

(72)発明者 アーン, グレース

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02155, メッドフォード, 19 スタンレー アベニュー

(72)発明者 アントンツェフ, ビクター

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02143, サマービル, アpartment 2, 9 ゴール
ド アベニュー

(72)発明者 ブエルタ, ジェファーソン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02148, モールデン, 18 ジェニファー レーン

(72)発明者 コネリアノ, デイビッド

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02116, ボストン, アpartment 102, 8 ギャ
リソン ストリート

(72)発明者 カーンズ, エス. ジョーダン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 01867, レディング, 7 ヘリテージ ドライブ

Fターム (参考) 4B029 AA08 BB11 FA12