



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104837982 B

(45)授权公告日 2017. 11. 21

(21)申请号 201380056928.5

(22)申请日 2013.09.27

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104837982 A

(43)申请公布日 2015.08.12

(30)优先权数据

61/707,907 2012.09.29 US

61/721,002 2012.10.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.04.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/062307 2013.09.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/052835 EN 2014.04.03

(73)专利权人 诺莫思公司

地址 美国华盛顿

(72)发明人 T·诺伊曼

A·A·图鲁乌斯卡咿亚

M·E·福弗 G·克莱默

E·阿斯普 H·曼恩

(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司

公司 11283

代理人 严政 李婉婉

(51)Int.Cl.

C12M 1/00(2006.01)

A01N 1/02(2006.01)

审查员 穆飞航

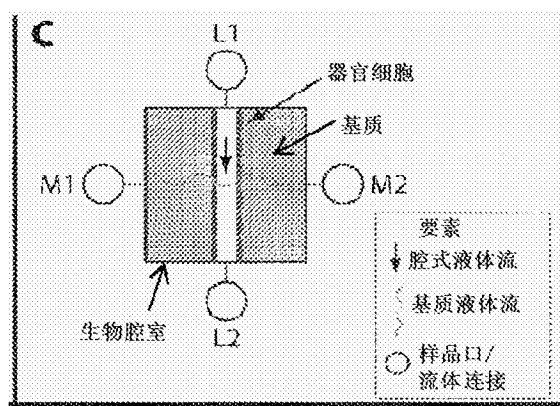
权利要求书3页 说明书14页 附图22页

(54)发明名称

用于体外组织和器官的再生功能单元的微流体系统

(57)摘要

一种用于形成体外组织和器官的腔室化的微环境以及用于独立地灌注腔室的微流体系统。一种微流体装置包括至少第一灌注路径和第二分离灌注路径;所述微流体装置还具有含有基质的腔室,其中,所述基质环绕着至少一种空腔,该空腔的管腔专门与第一灌注路径流体连接,其中,所述至少一种空腔能够填充有至少一种细胞类型,按照该种方式,该细胞与所述基质直接接触,以及,所述基质专门与所述第二分离灌注路径流体连接。



1. 一种用于形成体外组织和器官的腔室化的微环境的微流体系统, 该微流体系统包括:

具有至少第一灌注路径和第二分离灌注路径的微流体装置;

该微流体装置还具有包括至少一种腔管室和至少一种基质室的至少两种分离、各自独立的灌注腔室, 其中每种腔管室都具有壁且纵贯周围的基质室, 每种基质室都含有基质材料; 以及

其中每种腔管室的壁都填充有至少一种细胞类型的细胞, 所述细胞与形成细胞屏障的所述基质直接接触, 该细胞屏障从腔管室将周围的基质室分离开。

2. 根据权利要求1所述的系统, 其中, 所述至少一种腔管室由选自营养液、测试物质、血液成分、血液替代物以及溶液中的细胞组成的组中的材料来灌注。

3. 根据权利要求1所述的系统, 其中, 所述微流体装置由选自聚合有机硅化合物、硅、聚二甲基硅氧烷、环烯烃共聚物、聚苯乙烯和聚碳酸酯组成的组中的聚合物来制造。

4. 根据权利要求3所述的系统, 其中, 所述腔室、至少一种腔管室和周围的基质室嵌入在夹于玻璃片和聚碳酸酯片之间的基底中。

5. 根据权利要求1所述的系统, 其中, 所述基质选自胶原蛋白I、血纤蛋白、胶原蛋白IV、透明质酸及其组合物组成的组。

6. 根据权利要求1所述的系统, 其中, 所述的填充到所述至少一种腔管室中的细胞衍生于由肠、肝脏、肾脏和血-脑屏障组织组成的组。

7. 根据权利要求1所述的系统, 其中, 所述微流体装置含有两个或更多个分离的腔管室。

8. 根据权利要求7所述的系统, 其中, 将上皮细胞填充到腔管室中的其中一个以形成微血管发芽。

9. 根据权利要求8所述的系统, 其中, 采用营养液灌注所述微血管能够支持填充到所述腔管室中的其中一个的细胞的增长。

10. 一种用于再生体外组织和器官功能性单元的微流体系统, 该微流体系统包括:

具有至少第一灌注路径和第二分离灌注路径的多个微流体装置;

每一个所述的微流体装置还具有含有基质的腔室, 其中, 所述基质围绕着至少一种腔管室, 该腔管室中的管腔专门与所述第一灌注路径流体连接, 其中, 所述至少一种腔管室具有壁, 所述壁填充有至少一种细胞类型的细胞, 该细胞与形成细胞屏障的所述基质直接接触, 该细胞屏障从腔管室将周围的基质室分离开;

其中, 所述基质专门与所述第二分离灌注路径流体连接; 以及

其中, 所述的多个微流体装置与平台集成一体, 从而生成集成的多器官平台。

11. 根据权利要求10所述的系统, 其中, 所述的器官模块选自肠、肝脏、肾脏和血-脑屏障模块组成的组。

12. 根据权利要求10所述的系统, 其中, 所述的多个微流体装置连接在一起以形成一个复杂系统, 每一个微流体装置代表着不同的器官类型。

13. 根据权利要求11所述的系统, 其中, 中心的两腔室肝脏模块与肾脏模块、肠模块和至少一种血-脑屏障 (BBB) 模块连接在一起。

14. 根据权利要求10所述的系统, 其中, 器官模块共享一个代表着血管流的共同流体路

径。

15. 根据权利要求11所述的系统,其中,所述的系统进一步包括:

一种耦合到至少一条路径的用于氧气扩散的进口;

一种耦合到至少一条路径的用于注射被肠细胞管吸收并传递到血管细胞管的营养物的接口;

一种耦合到至少一条路径的用于提取的接口;

一种耦合到至少一条路径的用于注射由肝脏模块缓冲/吸收的化合物的接口;

一种耦合到至少一条路径的用于提取由肝脏模块过滤的液体的接口;

一种耦合到至少一条路径的用于由肝脏模块提取的胆汁的接口;

一种耦合到至少一条路径的用于注射化合物以进行血-脑屏障测试的接口;

一种耦合到至少一条路径的用于将含氮物质注射到肾脏模块的接口;以及

一种耦合到腔管室的用于注射细胞的接口。

16. 根据权利要求11所述的系统,其中,该系统进一步包括用于控制液体流经所选定的器官模块的多个固定的关闭阀。

17. 一种用于再生体外组织-工程化的微环境的系统,包括:

具有至少第一灌注路径和第二分离灌注路径的微流体装置;

该微流体装置还具有含有基质的腔室,其中,所述基质围绕着至少一种腔管室,该腔管室中的管腔专门与所述第一灌注路径流体连接,其中,所述至少一种腔管室填充有至少一种无脊椎动物细胞类型的细胞,该细胞与形成细胞屏障的所述基质直接接触,该细胞屏障从腔管室将周围的基质室分离开;以及

其中,所述基质专门与所述第二分离灌注路径流体连接。

18. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述无脊椎组织-工程化的微环境用于培养寄生虫。

19. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述无脊椎动物细胞选自由蚊子细胞、原生的无脊椎动物细胞、培养的无脊椎动物细胞、苍蝇细胞、昆虫细胞、扁虱细胞和果蝇细胞组成的组。

20. 根据权利要求18所述的系统,其中,所述无脊椎动物细胞选自由恶性疟原虫、间日疟原虫、伯氏疟原虫和约氏疟原虫组成的组。

21. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述腔管室用蚊子中肠细胞填充以生成类似体内器官生理学的蚊子中肠结构。

22. 根据权利要求18所述的系统,其中,所述系统进一步包括用于测试潜在的候选疟疾疫苗、传播阻断候选疫苗或者其它抗疟疾化合物的测试微环境。

23. 根据权利要求17所述的系统,其中,填充到所述至少一种腔管室中的所述细胞为肝细胞以及所述微环境用于培养疟疾寄生虫恶性疟原虫、间日疟原虫、伯氏疟原虫、恶性疟原虫、卵形疟原虫、卵形疟原虫、三日疟原虫、诺氏疟原虫和/或约氏疟原虫的红细胞前期。

24. 根据权利要求23所述的系统,其中,所述微环境用于测试潜在的候选疟疾疫苗、传播阻断候选疫苗或者抗疟疾化合物。

25. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述腔管室种植有来自蚊子唾腺的细胞。

26. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述至少一种腔管室种植有来自自己构建的昆虫

细胞株的细胞。

27. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述至少一种腔管室涂覆有多聚赖氨酸。

28. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述腔管室填充有无限增殖化的蚊子细胞,该无限增殖化的蚊子细胞由蚊子幼体的细胞制备衍生,并且已事先发表和保藏在ATCC/MR4中。

29. 根据权利要求28所述的系统,其中,所述细胞含有无限增殖化蚊子细胞(4A-3B细胞)。

30. 根据权利要求17或19所述的系统,其中,所述至少一种腔管室灌注有选自由营养液、测试物质、血液成分和血液替代物组成的组中的材料。

31. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述微流体装置由选自由聚合有机硅化合物、硅、聚二甲基硅氧烷、环烯烃共聚物、聚苯乙烯和聚碳酸酯组成的组中的聚合物来制造。

32. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述腔室和路径嵌入在夹于玻璃片和聚碳酸酯片之间的基底中。

33. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述基质选自由胶原蛋白I、血纤蛋白、胶原蛋白IV、透明质酸及其组合物组成的组。

用于体外组织和器官的再生功能单元的微流体系统

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请涉及且要求来自申请案(co-pending)美国临时申请No.61/707,907的、诺依曼(Neumann et al.)等人2012年9月29日提交的、申请名称为“用于体外组织和器官的再生功能单元的微流体系统”的优先权,该申请的内容将通过引用并入本申请中;以及进一步要求来自申请案美国临时申请No.61/721,002的、诺依曼等人2012年10月31日提交的优先权,该申请的内容将通过引用并入本申请中。

技术领域

[0003] 本申请涉及用于体外组织和器官的再生功能单元的方法,以及,更具体地,本申请涉及包括切片上的组织工程化的微环境的系统。

背景技术

[0004] 尽管投资医药研究上的调查和开发已经获得了指数增长,但是由FDA批准的新的药物的数目在过去60年仍没有变化。在研发的临床前阶段以及临床阶段,接近于95%的新的候选药物主要是由于药物相关毒性而不及格。显然,需要较好的临床前药物筛选测定。候选药物的当前的药物代谢动力学以及毒性评价主要依靠于动物测试系统,明显表示出用于临床疗效和毒性的仅具有非常有限的预测值。另外,维护动物模型大幅地推高了药物开发的成本。还有一些高通量的常常应用于药物开发中的二维(2D)细胞系模型。由于生理方面的损失,它们的预测值是非常有限的。正在开发的从培养三维(3D)细胞到切片上的器官的更复杂的人性化的基于细胞的测定能够解决培养2D细胞的限制以及减少或甚至可能完全替代动物模型。在3D细胞培养模型中的细胞在3D微环境内生长。3D微环境模拟在体内发现的结构、生化和机械方面的微环境。这种培养基恢复体内相应的组织特定的生化和形态特征特点是已知的。传统稳固的3D培养基的实例包括水凝胶-内置于胶囊内的细胞、“三明治”培养基、多细胞球状体和生长在微载体和微机构支撑体上的细胞。虽然功能强大,这些模型仍然缺乏药代动力学研究所需的复杂性以及具有许多其他的缺点:1)有限的营养供给和堆积代谢废物产物可以混淆细胞对药物的反应,2)无法模拟存在于体内的时空生化梯度,3)缺乏机械线索如流量、灌注、压力、机械应力,4)难于探测,5)存在问题的实时成像,以及6)由于反应扩散现象在活细胞内不能实施的生化分析。此外,至今还没有可以设计与活跃血管导管和屏障组织集成的多个器官/组织类似物的微系统。

[0005] 结果,有一个既定的系统,但该系统尚未满足用于药物研究、开发疫苗和其他类型的医学研究的更便宜、更复杂、更可控的需要。本发明提供了用于该种可控系统的新颖方法,该方法包括一种集成血管细胞和器官细胞以再生体内组织和器官的功能性单元的系统。这些以及其他重要的新的教导从以下说明书和以上权利要求中可见。

[0006] 在寄生虫病疫苗的研发的医学研究上不仅仅需要可利用的和可获得的体外寄生虫细胞,而且还要有能力制备寄生虫的宿主生物体模型。人类疟原虫传染给蚊子,反过来,作为载体又将疾病传染给人类。为了研发且有效地识别疟疾疫苗,研究人员需要一个模型

系统,其中,能够在蚊子中肠的环境中研究疟疾寄生虫,该环境为疟疾寄生虫自然生活的地方。然而,目前没有系统可用于培养人类疟疾寄生虫疟原虫科恶性流行在体外的研发昆虫阶段。此外,研究疟疾寄生虫、孢子的传染阶段,取决于不准确的和难以控制的方法,该方法涉及活的受感染的蚊子。该方法在分析过程中引入了许多不期望的变量。例如,活的蚊子不受制于血液摄取参数以及药物效果分析必须通过解剖蚊子肠道的相对主观人工检测进行。

[0007] 结果,有一个既定的系统,但该系统尚未满足用于药物和疫苗研究、开发疫苗和如与疟疾相关疾病的医学研究的其它类型的更便宜和更可控的需要,该系统用于体外培养系统以生产所有寄生虫昆虫阶段,包括,例如,寄生虫蚊子阶段,以及用于测试平台。本发明提供了用于该种可控系统的新颖方法,该方法包括一种用于蚊子中肠系统的再生功能单元,以及疟疾寄生虫于其中培养的模式。其它的重要的新教导从以下说明书和以上权利要求中可见。

发明内容

[0008] 本摘要提供了以简化形式介绍概念的选择,其在下述详细的说明书中进一步描述。该摘要不是用于确定权利要求主题的重要特征,也不是以确定权利要求主题的范围为目的。

[0009] 本发明公开了一种用于形成体外组织和器官的腔室化的微环境以及用于独立地灌注腔室的微流体系统。一种微流体装置包括至少第一灌注路径和第二分离灌注路径。该微流体装置还具有含有基质的腔室,其中,所述基质环绕着至少一种空腔(void),该空腔的管腔专门与第一灌注路径流体连接,其中,所述至少一种空腔能够填充有至少一种细胞类型,按照该种方式,该细胞与所述基质直接接触,以及所述基质专门与所述第二分离灌注路径流体连接。

[0010] 另一方面,本发明公开了一种用于再生体外无脊椎动物的功能性单元的方法,作为用于培养寄生虫的组织工程化的微环境,该方法提供了一种具有至少第一灌注路径和第二分离灌注路径的微流体装置,该微流体装置还具有一种腔室。所述腔室中充满基质,其中,所述基质环绕着至少一种空腔,该空腔的管腔专门与第一灌注路径流体连接,其中,所述至少一种空腔能够填充有至少一种细胞类型,按照该种方式,该细胞与所述基质直接接触,以及所述基质专门与所述第二分离灌注路径流体连接。所述至少一种空腔播种无脊椎动物细胞,以及将所述无脊椎动物细胞灌注以增殖并产生无脊椎动物器官或组织。将寄生虫阶段于微环境中栽培以提供测试用微环境。

附图说明

[0011] 尽管在随附的权利要求中具体详尽地解释了本发明的新颖的特征,但是,本发明将结合附图在组织和内容上详细地描述,以更好地理解 and 明白其它发明目的和特征。

[0012] 图1A和图1D分别显示了两腔室和三腔室(单细胞管和双细胞管)的TEM切片。

[0013] 图1B和图1E说明了两种TEM切片类型的技术设计。

[0014] 图1C和图1F分别图示了用于管腔液体流动的单流体管道和双流体管道。

[0015] 图2A显示了嵌入在环绕着类似为微脉管的细胞管的基质中的细胞的实例,该细胞

管包括嵌入在由人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 组成的微脉管的周边的人脑星形胶质细胞和周细胞。

[0016] 图2B显示了嵌入环绕着类似为微微脉管的细胞管的基质中的细胞的实例,其中,周细胞和人脑星形胶质细胞补充到该微脉管的管壁。

[0017] 图2C和图2D说明了HUVECs的刺激产物。

[0018] 图3A、图3B和图3C显示了表明具有在四天以上由HUVECs产生的HEK293-管的肾髓质和相对应的血管细胞管的三腔室模块的实例。

[0019] 图4A至图4C显示了包括具有由HT29细胞株产生的细胞管的肠模块和相对应的由HUVECs产生的血管细胞管的三腔室设置的实例。

[0020] 图5A显示了表明具有由hep-G2细胞产生的肝脏细胞管的肝脏模块和由HUVECs产生的血管细胞管的三腔室模型的实例。

[0021] 图5B显示了嵌入在环绕着血管的基质中的肝细胞。

[0022] 图6A至图6F显示了血-脑-屏障模型的实例,尤其是说明了在两腔室装置中穿过血管细胞管(主要由人微血管内皮细胞中产生)的管壁的旁细胞渗透性。

[0023] 图7A和图7B显示了在由hCMEC/D3(人脑微血管细胞株)和嵌入ECM的周细胞和人脑星形胶质细胞(主要人脑细胞)组成的BBB模型中的细胞的重组。

[0024] 图8A至图8F联合显示了在7天以上的肿瘤血管内皮细胞的相互作用的两腔室模型的实例。图8D、图8E和图8F显示了不同焦平面的同样标本以说明趋向于癌细胞簇生长的多个新芽。

[0025] 图9A至图9D联合显示了肿瘤血管内皮细胞相互作用的三腔室模型的实例。

[0026] 图10A和图10B联合显示了癌细胞外渗的实例。

[0027] 图11说明了形成复杂系统的四连接的TEM切片而每个切片表示不同器官的实例。

[0028] 图12说明了用于连接四TEM切片以形成复杂系统的替代的系统结构的实例,每一个TEM切片代表着不同的器官。

[0029] 图13说明了利用多个生理学模块结合为一个线路的替代的系统结构的实例。

[0030] 图14A至图14C显示了表明具有在5天以上研发的蚊子4A-3A涂布细胞小管的细胞管的两腔室蚊子中肠切片的实例。

[0031] 图15A至图15F显示了在初期培养环境中的早期卵囊的实例。

[0032] 图16图示了中肠切片的实例。

[0033] 图17A至17D显示了富含GFP表达恶性疟原虫动合子 (*Plasmodium falciparum* ookinete) 在RBC's悬浮液中受精48小时后的实例。

[0034] 图17E至17F是包括具有注入GFP表达的寄生虫的4A-3B细胞管于受精卵,发展并且生长为成熟动合子阶段的实例。

[0035] 在附图中,相同的参考数字确定相类似的要素或元件。在附图中要素的尺寸和相应位置没有必须依据比例尺绘制。例如,各个要素的形状和角度没有依据比例尺绘制,以及任意扩大和配置了一些要素以提高绘图清晰度。此外,要素的具体尺寸如图所示,不在于表达一些与具体要素的实际形状相关的信息,仅在于在附图中易于识别选择。

具体实施方式

[0036] 本发明中所展示的实例是为了进一步理解本发明的目的。该实例用于说明本发明,但并不限于该实施例。

[0037] 除非上下文需要,否则,在整个说明书和权利要求中,所述术语“组成”及其变异,例如,“包含”和“含有”用于解释公开,包括理解为,即“包括,但并不限于”。

[0038] 整个说明书所引用的“一个实例”或“一个实施例”、“一种具体实施方式”、“一个具体实施方式”或组合和/或这些术语的变异意味着具体的特征、结构或特性,其在具体实施方式的相关内容中描述且包括在本发明的至少一种具体实施方式中。因此,在整个说明书的各个地方出现的短语“在一种具体实施方式中”或“在一个具体实施方式中”没有必要全部指同一个具体实施方式。此外,具体的特征、结构或特性可以以任何适合的方式在一个或多个具体实施方式中并存。

[0039] 说明书

[0040] 通常,如在本发明中所使用的,除非上下文启示,否则下述术语具有下述意思:

[0041] 如在本发明中所使用的,“BBB”可理解为意味着血-脑屏障,由脑部具体的血管内皮形成。

[0042] 如在本发明中所使用的,“ELISA”具有其通常所公认的意思以及可理解为意味着酶联免疫吸附测定。

[0043] 如在本发明中所使用的,“HUVEC”具有其通常所公认的意思以及可理解为意味着人脐静脉内皮细胞。

[0044] 如在本发明中所使用的,“PDMS”具有其通常所公认的意思以及可理解为意味着聚二甲基硅氧烷。

[0045] 如在本发明中所使用的,“多数”可理解为意味着多于一个。例如,多数指至少3、4、5、70、1000、10000或更多。

[0046] 如在本发明中所使用的,“TEM”可理解为意味着组织工程化的微环境。

[0047] 如在本发明中所使用的,“组织”被定义为来自相同起源的一种或多种类似细胞与细胞外基质分泌的总效果,将其专门化以进行一种或多种特定功能。

[0048] 如在本发明中所使用的,“器官”意味着由多种组织组成的组织结构的较高水平,其中,一个器官功能仅可能由多个组织相互作用产生。

[0049] 实施例

[0050] 发明人已研发出用于产生组织工程化的微环境(TEM)的微流体装置。这些装置含有充满三维基质的腔室。该基质含有管状的空腔,该空腔中能够填充有多种细胞类型,结果形成管状细胞结构。这些细胞管与该装置的流体路径腔式(lumenally)连接,因此,能够将营养液、测试物质、细胞溶液或其它液体灌注其中。腔式灌注,和灌注或扩散流经该基质,允许在装置内严格控制微环境条件。液体压力和剪切应力已知会影响着细胞形状、繁殖、分化和蛋白质表达。

[0051] 该流体装置被设计成由聚二甲基硅氧烷(PDMS)夹在玻璃片和聚碳酸酯片之间制成的小切片。这些组织工程化的微环境切片(TEM-切片)被设计成用于产生体外模型,该体外模型再生各个组织和器官的微结构和功能性参数。由于该构建导致了完全由基质(例如胶原凝胶I、血纤维蛋白,或胶原凝胶I、IV的组合,和/或透明质烷)环绕的管状细胞结构,阻止了细胞与非生物材料直接接触。已表明与组织-衍生蛋白质接触用于维持体外生理行为。

另一方面,与非生物材料接触可有害地影响细胞反应。

[0052] TEM切片的结构允许形成两个或多个组织腔室,其能够各自独立地灌注以及可以通过如细胞屏障或其它屏障将其与另一个分离开。例如,在胶原凝胶基质中的单一管状细胞结构表示一种两腔室系统,由细胞管内部的管腔和由周围基质带包含的附加的管腔腔室组成。两个腔室通过一层细胞分离开,该一层细胞在“内部”和“外部”之间形成屏障。这种腔室化的构建模拟了许多组织和器官的微结构,例如,微血管、肾小管,以及输送精子的细胞管。重要地,这种构建使细胞两极分化,其对具有屏障功能的组织尤其重要。

[0053] III. TEM-切片设计

[0054] 在本发明的实例中使用以及考虑接受的TEM切片在视觉上清晰的,以及以该方法构建的TEM切片能够与荧光成像、共焦的、亮视野的以及相差显微镜成像相兼容。从流体进口或出口的任意处收集流体样品,可使用脱机技术例如液相色谱法、质谱分析、ELISA或凝胶电泳分析该流体样品。在多个腔室的TEM切片中,可在细胞管中单独灌注所选择的用于细胞种植、营养液和培养基维护的介质。这些介质可以生物活性剂(例如抗体、药物、毒素或疫苗)来补充。为了某种研究,该灌注液可以为血液、血液成分,或血液替代物。该腔管流体路径还可以用于实施微粒、纳米粒子、单细胞,或细胞聚集体(例如血液细胞、癌细胞、细胞球状体),或微生物(病毒、细菌,或寄生虫)。可使用流体样品的出口收集所有的灌注液以用于进一步分析。另外,可从装置中提取细胞以评价基因或蛋白质表达。

[0055] 现参考图1A至图1F,分别显示了两腔室和三腔室(单细胞管和双细胞管)的TEM切片的实例。图1A至图1C展示了两腔室切片,以及图1D至图1F展示了三腔室切片。

[0056] 现具体地参考图1B和图1E,其中,显示了两类型的TEM切片的技术设计:L1-L2表示流体连接以腔式灌注器官细胞管型。L3-L4表示用于灌注血管细胞管的连接。T1表示由器官细胞形成的细胞管;T2表示由血管细胞形成的细胞管。B1至B4表示磁泡陷阱(bubble traps)。N1-N4表示可以设置隔片的区域,可使空心隔片针(non-coring septum needle)插入以用于注射流体或流体取样。N1和N4还具体地表示细胞注射口,其中,将细胞注射,流入生物基质的空腔中;因此,形成细胞管或固体细胞介质(T1,T2)。M1-M2表示流体连接到细胞外的生物基质,其中,流体流动或注入的化合物发生扩散。在该装置中表明,用于在生物基质中形成空腔的优选的方法是使用芯棒,在通过M1或M2生物基质注入之前,该芯棒插入至该装置的L2处直至其到达N1(或L4至N4)。在该基质形成胶体之后,将该芯棒去除,在该基质中留下空腔,该空腔与L1-L2或L3-L4流体连接。

[0057] 如在图1C所示的单个切片中,有两个分离部分,各自独立地灌注腔室:一个腔管室,以及一个基质室。由细胞管形成的细胞屏障将腔室分隔开。图1F显示了三腔室切片示意图,其中,除了基质室外,该两个细胞管中的每一个都具有分隔的、各自独立的流体连接。

[0058] 如在某个应用中所使用的,可使用多腔室的TEM切片来使体外器官或组织的结构单元和/或功能单元结合在一起。例如,三腔室的TEM切片能够将由血管细胞形成的管与由组织/器官特定细胞形成的管结合在一起。通过将腔式灌注血管结构包括到该系统中,能够为组织/器官特定细胞提供营养以及能够将代谢产物去除,模拟体内血管功能。将来自各种细胞源的具有和不具有血管组织的其他的管结合起来是可能的。

[0059] 该基质腔室模拟体内细胞间隙,其对细胞、组织和系统水平起着重要且复杂的作用。除了将细胞种植在管式空腔中之外,该基质腔室中能够填充有细胞类型,将附加的灵活

性添加到该微环境结构的设计中,例如可以选择星形胶质细胞、周细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、肝细胞用于集成到细胞外基质。将来自各种起源的许多其他细胞类型作为潜在候选细胞,或者以单独形式,或者以结合形式,嵌入到细胞外基质。可以将细胞均匀地分散于整个基质中或将细胞与基质沉积在特定的位置。所述细胞可以特定的布置被分组,结合其他细胞类型,或嵌入作为预先成形的结构(如球状体)。如使用TEM切片的初步研究中所示,将特定细胞类型添加到细胞外基质室中会影响对含有细胞管的细胞的细胞反应。

[0060] 现参考图2A、图2B、图2C和图2D,其中,这些图所示的是在环绕由HUVECs产生的血管-细胞管的基质中的细胞的嵌入实例。图2A显示嵌入到血管-细胞管周边的人脑星形胶质细胞和周细胞。图2B显示了补充到血管-细胞管的管壁上且刺激HUVEC发芽(如在图2C和图2D中很好的展示)的周细胞和星形胶质细胞。将该图整体考虑,能够发现细胞反应是如何受其他细胞类型的存在而影响。此外,也可以将非细胞成分(如微粒子和纳米粒子、网状物,或缓释材料)添加到该基质中。

[0061] IV. 组织/器官-特定模型的实例

[0062] TEM切片系统的重点是将系统与人类细胞(原生的或培养的)使用,为了研究人类心理学、病理学,或对生物活性化合物例如医药品、疫苗、化妆品或毒性化合物的反应。然而,TEM切片还可用于使用动物细胞,例如用于研究动物的心理学和病理学,用从实验室动物中获得数据来比较药物反应,以及用于研究由动物传染给人类的疾病。

[0063] 为了建立理论依据,研发了大量的TEM切片系统。这些TEM切片系统包括:

[0064] -肾脏、肠,以及肝脏3D组织微环境作为体外的血管化器官模拟“单器官”功能性子单元;

[0065] -用于证实多细胞屏障型系统功能性的血管-脑屏障模型;

[0066] -展示了在瘤生物学中测定的适用性以及用于研究瘤-上皮细胞相互作用的血管化瘤;以及

[0067] -用于研究循环肿瘤细胞经血管迁移形成转移的能力的外溢模型。

[0068] 用于研究功能性器官子单元的实例模型的系统可以构建在两腔室TEM切片或三腔室TEM切片上,具有一种代表血管的细胞管。在三腔室TEM切片中,介于血管细胞管和器官细胞管之间的距离保持在 $<0.5\text{mm}$,以促进化合物从血管-细胞管分散至类似组织/器官的细胞管或者反之亦然,以及如果需要,用于研发介于血管芽和器官细胞之间的细胞-细胞的直接接触。然而,按照需要,可易于调整该距离。

[0069] 肾脏模型

[0070] 现参考图3A、图3B和图3C,该图显示了一种三腔室模型的实例,其示出了具有HEK293管的肾脏模型,以及显示了在四天以上由HUVECs产生的相应的血管细胞管。为了说明所显示的比例尺长度 $=150\mu\text{m}$ 。为了预测药物和其他物质的肾清除率,捕获多细胞复杂性以及人类肾脏的三维结构的体外模型是高度可取。通过将人胚肾细胞(HEK-293)种植在胶原蛋白I内的两个管式腔管的其中一个中以产生肾脏TEM切片。然后,将原生的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)种植在第二腔管内且用细胞培养基连续灌注培养。

[0071] 仍参考图3A、图3B和图3C,在该实验中显示了故意没有灌注肾脏结构;仅提供了通过血管-细胞管的营养物和代谢终产物的交换。往返于血管细胞管扩散的营养物足以保养所培养的肾脏细胞至少一个星期。为了评价功能性,可以使用腔式灌注来检测从腔管到细

胞的最高吸收和从细胞进入腔管的最高排泄,同时可使用基质灌注以评价基底外侧的运输功能。

[0072] 肠模型

[0073] 现参考图4A-图4C,该图显示了构建三腔室的实例,该三腔室构建包括具有由HT29细胞株产生的具有细胞管的肠模型,以及由HUVECs产生的相对应的血管细胞管。为了说明所显示的比例尺长度=150 μ m。

[0074] 连同肝脏一起,肠道涉及药物或毒素去除的首次通过(first-pass),且其是调节口头给药的吸收性的一个重要屏障。该肠屏障包含通过紧密连接而彼此键合的细胞的上皮单层。物质最先通过膜扩散穿过该屏障。预测给药的化合物从肠经循环系统转移到消化道中的输送对评价候选药物是重要的。然而,没有可用的肠屏障体外模型含有血管成分。该肠TEM切片包括用于研究药物和毒性吸收的功能性血管成分和肠道上皮细胞。

[0075] 现更具体地参考图4A和图4B,使用人类结肠癌衍生的HT-29和Caco-2细胞形成细胞管,该细胞管产生类似肠的TEM。与肾脏模型相似,将肠细胞种植在管式空腔中且使其传播。将HUVEC细胞种植在第二空腔中且在培养基的恒流下进行培养。没有灌注具有肠细胞的细胞管且通过往返于血管细胞管扩散的代谢物来保养该具有肠细胞的细胞管(如见图4C)。

[0076] 肝脏模型

[0077] 现参考图5A,表明具有由Hep-G2细胞产生的肝脏-细胞管的肝脏模型和由HUVECs产生的血管细胞管的三腔室模型的实例;表明第三腔室将两个腔室分隔开。图5B显示了嵌入在周围环有血管的基质中的肝细胞。为了说明所显示的比例尺长度=150 μ m。

[0078] 肝脏调节着重要的过程如血糖体内平衡、血浆蛋白质合成、解毒、胆汁产生和输送。由于肝脏的复杂性,例如肝脏的亚细胞组织匀浆、以及通常用来评价药物的生物转化性的原生肝细胞培养的体外模型未能保持肝细胞的体外特定功能。研发肝脏心理学的体外模型是至关重要的,该肝脏心理学的体外模型模拟3D微环境,包括肝细胞极性和与其它没有薄壁(non-parenchymal)肝脏细胞的相互作用。此外,系统中的特别的兴趣是允许肝脏模型与其它器官模型相合并在一起,尤其是与胃肠屏障模型和/或肾脏模型相固结在一起。与肝脏一起这些器官消除药物和其他化合物。

[0079] 在肝脏TEM切片中,使用人类肝癌细胞(Hep-G2),HUVEC细胞和胶原蛋白-I基质作为主要成分。为了模拟肝正弦曲线,将HUVECs种植在其中一种胶原蛋白空腔中。将Hep-G2种植在另一种胶原蛋白空腔中且允许增殖和长大(如图5A所示)。在致力于产生类似于体内肝细胞板的结构的过程中,还将肝细胞嵌入在周围环有细胞管的基质中(如图5B所示)。通过将血管细胞管灌注来保养该培养。该模型适合用来研究疟疾的红细胞前期。在最初的感染之后,疟疾寄生虫传播到肝脏,在肝脏这里疟疾寄生虫繁殖且经历了复制的第一阶段。由于寄生虫繁殖的阶段代表着疟疾疫苗开发最有希望的目标,所以这阶段对调查员而言是极其关切的。在所采用的肝脏切片中,将该空腔种植上原生的人类肝细胞或既定肝癌细胞株如HepG2和HC-04。在种植之后,可使这些细胞增殖以及长大以形成细胞管。为了产生结构接近于类似体内的正弦曲线肝脏组织,还能将肝细胞嵌入在周围环有细胞管的基质中。能够将细胞管本身补充上其它的肝脏正弦曲线细胞如由所既定的肝细胞共培养细胞株衍生的库普弗细胞(Kupffer cell)。然后,将寄生虫注射到所既定的肝组织切片中,侵入肝细胞以形成肝脏阶段,发育成成熟且产生裂殖子(merozoite)的肝阶段(裂殖schizonts),而由肝细

胞管的灌注或周围基质带被保持。

[0080] 在一种使用肝脏细胞的实施例中,可以使用微环境来培养疟疾寄生虫恶性疟原虫(*plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*plasmodium vivax*)、伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)、恶性疟原虫、卵形疟原虫(*plasmodium ovale curtisi*)、卵形疟原虫(*plasmodium ovale wallikeri*)、三日疟原虫(*plasmodium malarias*)、诺氏疟原虫(*plasmodium knowlesi*)和/或约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)的红细胞前期。

[0081] 血-脑屏障模型

[0082] 现结合图6A-图6F参考,这些图显示了血-脑屏障模型的实例,尤其是具体说明了在二腔室装置中通过血管细胞管(原生人类微血管内皮细胞设计)的壁的旁细胞通透性。

[0083] 图6A显示了斜光照明下的显微图像。图6B-图6D是在5分钟灌注后血管-细胞管的广泛领域内的荧光图像。图6B显示了用Oregon Green, MW 368灌注。图6C显示了用Alexa Fluor 488-dextran, MW 4KDa灌注。图6D显示了用Alexa Fluor 594-dextran, MW 10KDa灌注。在该实施例中,发现在测试的28例血管-细胞管中有14例不可渗透到BSA(牛血清白蛋白)中,同时计算通过该血管-细胞管壁的平均通透性为 1×10^{-6} cm/s (N=28),该值是相对于所分离的哺乳动物小静脉而言($\sim 2 \times 10^{-6}$ cm/s; Yuan, W. et al, 2009)。相对于所报道的大鼠脑内皮细胞-星形胶质细胞共培养的值为(1.1×10^{-5} cm/s; Blasig, I. et al, 2001),渗透到Oregon Green中的血管-细胞管的通透性为(2.5×10^{-5} cm/s, N=22)。发现渗透到10K dextran中的通透性与体内类似,为 2.7×10^{-7} cm/s (N=6)。标记VE-钙粘着蛋白(如图6E所示)和PECAM(如图6F所示)的内皮细胞的表达证实了血管-细胞管壁的完全覆盖。

[0084] 将血-脑屏障模型设计为两腔室TEM切片。血-脑屏障模型由含有人类脑神经血管单元的细胞型所构建,该人类脑神经血管单元包括微血管内皮细胞、周细胞和星形胶质细胞。这种类似组织的微环境含有嵌入在支持着血管-细胞管的3D细胞外基质(ECM)的人脑周细胞和星形胶质细胞,因而模拟体内系统结构且允许不同细胞型之间的物理接触。这种血管-细胞管暴露于腔管流动。可将测试药物添加到流经血管的流体路径中。通过分析从该血管外收集到的液体(ECM冲洗)或采用荧光示踪剂可视化该药物能够测量药物穿过该血管的渗透。

[0085] 现参考图7A和图7B,显示了在由hCMEC/D3(人类脑微血管细胞株)和EMC嵌入式周细胞和星形胶质细胞(原生人类脑细胞)组成的BBB模型中细胞的再组合。具体地,图7A显示了星形胶质细胞和周细胞,嵌入基质中导致这些细胞类型与内皮细胞密切关联,造成血管直径逐渐减少如图7B所示。

[0086] 结果证明了该血管-细胞管显示了体内微血管内皮细胞的形态和功能特征。介于血管-细胞管内的细胞具有内皮细胞形态且表明典型的内皮细胞标记的细胞外周定位(如图6A-图6F所示)。细胞与抑制接触形态形成一层紧密堆砌的层。基质-嵌入式星形胶质细胞和周细胞补充到血管-细胞管中且对其形态产生深远的影响(如图7A和图7B所示)。由BBB模型获得的屏障功能相同于或高于其它体内BBB模型上公开的数据。

[0087] 癌模型

[0088] 研发癌TEM切片以用于研究癌细胞和微血管内皮细胞的相互作用,例如血管内和外渗,肿瘤血管生成,和由新血管表达的标记物的过程中的寻靶信号。重要地,该模型可用于抗癌药物的筛选和用于评价其它治疗如辐射对癌细胞和肿瘤血管的效果。在三腔室切片

中,能够将其一种细胞管以细胞管或细胞圆柱体(上述所示参考图3A、图3B和图3C)的形式填充在癌细胞中,同时能够将其其它细胞管同内皮细胞种植以繁殖具有朝癌细胞管生长的能力的血管细胞管(见下面更详细讨论的图8A-图8F和图9A-图9D)。

[0089] 现参考图8A-图8F,肿瘤-内皮细胞相互作用7天以上的两腔室模型的实例的体外图像。具体地,参见图8A,显示了嵌入在接近于产生管状的空腔的心轴的胶原蛋白中的BT-474细胞(胸部癌细胞株)的癌细胞束。然后,将HUVECs种植在如图8B所示的空腔中。图8C-图8F为从“母”HUVEC管朝癌细胞管生长出来的新芽的特写视图。为了说明所显示的比例尺长度=150 μ m。

[0090] 现参考图9A-图9D,这些图共同显示了肿瘤-内皮细胞相互作用的三腔室模型16天以上的实例。图9A表明在HUVEC管(顶管)形成之后,沉积在胶原蛋白空腔(底管)的Caco-2(人类大肠腺癌human colorectal adenocarcinoma)细胞。图9B表明在种植四天之后,由母HUVEC血管中形成的新芽。图9C和图9D表明沉积在底部胶原蛋白通道中的人类肝脏癌细胞(Hep-G2细胞株)以及种植在顶部通道中的HUVECs。为了说明所显示的比例尺长度=150 μ m。

[0091] 人类胸部癌细胞(BT-474)、大肠腺癌细胞(Caco-2)和肝癌细胞(Hep-G2)被用于实验。将癌细胞种植在两个管状空腔的其中一个里面,以及将HUVECs种植在另一里面。仅通过血管-细胞管(HUVEC管)灌注来维持该培养;填充癌细胞的细胞管没有被灌注。如上所述,例如,在图8C和图9D中,该血管-细胞管发展新芽直接朝癌-细胞结构。

[0092] 癌细胞外渗模型

[0093] 现结合图10A和图10B,显示了癌细胞外渗的实例。具体地,参考图10A,荧光标记的前列腺癌(PC3)细胞腔式地施于HUVEC管中,其中,如箭头10所标识,其细胞粘合在内皮细胞新芽的内壁上。

[0094] 现参考图10B,能够不断监控外渗的进展。如箭头10'所标识的右侧的图像,在种植20小时后,PC3细胞通过内皮细胞迁移至ECM周围。

[0095] 外渗是使肿瘤细胞循环经血管迁移以形成转移的能力。在癌细胞研究进展中,肿瘤细胞渗透到内皮细胞连接处仍是其中一个最不理解机理,部分归咎于缺乏适当的模型。影响肿瘤细胞渗透到内皮细胞层的机理的因素的研究预计转变为新颖癌治疗。目前,用于研究外渗仅一种体外模型是商业获得的:在20世纪60年代由Boyden研发的用于研究趋化性的Boyden-室/Transwell-侵蚀检测(Boyden-Chamber/Transwell-Invasion-Assay)。同时价廉以及易于执行,该检测不需要即时观测肿瘤细胞和内皮细胞。另外,该检测在固定条件下将肿瘤细胞迁移,不受介于内皮细胞和循环肿瘤细胞以及肿瘤细胞损坏之间的相互作用上的剪切力的重要作用的影响。该TEM切片可在腔式流动存在下在类似组织的基质中使用微血管发芽即时研究肿瘤细胞外渗。此外,该模型可添加以及可改变重要的要素,例如额外的细胞、细胞外基质、生长因子、以及灌注参数和其它物理条件。例如,能够将该基质填充到不同的基质细胞(普通、活性,或衰老),不同癌细胞型,或病人-特定细胞(用于个人化药物测试)。

[0096] 使用两腔室和三腔室设置设计出癌细胞外渗TEM切片。在该两腔室装置中,构建出单“母”血管-细胞管,随后,将其诱导至血管发芽。在该系统中,为了测试其外渗潜能,将荧光标记(例如,采用CellTracker dyes)高转移性PC-3前列腺癌细胞(最好见图10A)的悬浮液添加至腔式液体流且沉积在血管新芽中。通过在某一时间段内确定经内皮细胞籽苗迁移

至基质中的癌细胞的分数来测量外渗潜力,其相对于仍陷入在新芽中的癌细胞分数。

[0097] 在三腔室装置中构建了两个“母”血管-细胞管,其新芽随后汇合且形成毛细血管网络。能够规定液体流从一个“母”细胞管通过毛细血管网络被路由到第二个“母”细胞管-类似于配有动脉和静脉的血管床。癌细胞可以通过血管床循环以评估癌细胞转移的潜能。然后,癌细胞通过内皮小管管壁的移动能够不断地或在时间间隔内被监控。

[0098] 不同组织/器官模块的一体化

[0099] 该TEM切片设计可使用单一切片作为能够与其它结合为一个大的平台的单个模组,因而构建了具有生理学和病理学意义的多器官设置,例如肠、肝脏和肾脏模组的结合。建议具有两个、三个以及高达10个TEM切片的平台,每一个代表相同或不同的组织/器官型以用于开发。

[0100] 这些集成的多-器官平台代表着研究毒物学对候选药物和其它成分的影响的新方法,不仅仅是对单一器官培养基,而且是对以相对应的排序的多器官模型的复杂的器官系统(例如,肠、肝脏和肾脏)。这种设置可以包括同一器官(例如,与肾小管末梢最接近的)或不同器官(例如,肝脏肠屏障和血-脑-屏障)的结构/功能子单元组合。设计了循环的和单向的流动系统。图11-图13示范了结合4至10个TEM切片的液体设置如下文所讨论。

[0101] 现参考图11,说明了一个复杂系统的四个连接的TEM切片的实例,其中,每一个切片代表不同的器官。一种中心的、两腔室肝脏TEM切片,与肾脏、肠和BBB TEM切片相连接。研究者可以按其意愿添加其它的器官型TEM。所有的模块分享一个代表着血管(“血”)流的共同流体路径。可以将氧气灌注到该流体中以代替不存在的生理系统,例如肺。I1代表着用于注射营养物的接口,该营养物将被肠细胞管吸收并传递到血管细胞管。E1代表着提取液体的接口以用于分析,例如葡萄糖监控。注意,传感器可直接插在这些点进行测量(例如:氧气,pH)。I2代表着用于注射化合物的接口,该化合物由肝脏缓冲/吸收;E2代表着用于提取液体的接口,该液体由肝脏切片过滤的;研究所述化合物的浓度变化及其动力学表明前期的肝脏功能。I3-E3代表着从肝脏模组中提取胆汁的接口。I4代表着注射用于血-脑屏障测试的化合物的接口,其中,接口E4和E5被采样为用于测量屏障功能。I5代表着注射的接口,例如将含氮的物质注射到肾脏切片中。接口E7从这种肾脏模块的最接近的管被采样,以及为含氮物质作分析。其它的肾脏功能可以透过于接口16中注入葡萄糖溶液,让接口E6向大气打开以及检查葡萄糖溶液是否在基质腔室中收集。

[0102] 现参考图12,说明了一个连接四个TEM切片至一个复杂系统的备选结构的实例,每一个TEM切片代表着不同的器官。一种中心的、三腔室肝脏切片,与肾脏、肠和BBB TEM切片相连接。

[0103] 现参考图13,备选结构的实例说明了一个采用多个有更多的生理模组集成到一个电路中的备选结构的实例。在任何给定时间内,三个切断阀对中的其中一个是活跃的。可能需要一个用于切断部分的循环泵(没有显示)。

[0104] 到目前为止,已经描述了用于产生体外组织和器官的多腔室化微环境的微流体系统。上述公开的系统允许分隔的腔室的独立灌注。所设计的系统产生体外组织和器官的模型模拟体内功能性。

[0105] 简要概述,微流体装置含有填充基质的腔室,该基质环绕至少一种空腔。该装置的流体通道与所述腔室以一种方式连接,即,液体流经所述空腔没有与所述基质连接以及液

体流经所述基质没有与所述空腔连接。可将多种细胞型种植在所述空腔中,其中,所述细胞能够形成功能性组织或器官单元。位于所述空腔内的细胞与所述基质通过细胞膜分隔开,从而形成屏障。因此,不需要人工材料用于细胞粘附或细胞支架。该系统的重要特征包括:所述的腔室化设置,缺乏人工材料,以及独立灌注的能力。

[0106] 总之,这些特征使所述系统更接近地模拟体内环境以及可使使用者灵活研究组织生物学的多个方面。尤其是,独立地灌注由细胞膜分隔开的腔室的能力允许使用者实施此前不可行的实验。这些包括与细胞屏障相关的实验,例如调查具体细胞对不同刺激的反应的屏障能力以及调查不同化合物穿过细胞屏障的传输。此外,调查者能够独立地采样多个腔室以隔离不同的细胞输出,如细胞因子或药品代谢物。从一种空腔中能够产生梯度,以及在分隔组织或细胞填充第二空腔中研究细胞作用。最后,该系统允许使用者研究介于多个组织之间的相互作用。当以多个微流体装置连接来理解不同组织和刺激是如何相互作用时,其是尤其重要的。使用该系统,该模组将会分享代表血管(“血”)流体的共同流体路径,以使调查者具有准确预测化合物将如何代谢以及组织功能对多种刺激的反应的能力。

[0107] 用于再生作为寄生虫的培养环境的无脊椎组织和器官的功能性单元的应用说明

[0108] 上述已描述了基本的微流体装置,现将探讨这些装置的更具体的应用,具体地与疫苗研究有关的应用。尽管本实施例说明了蚊子中肠切片和细胞,但是本发明并不限于此。本领域技术人员可理解为本公开的优势在于其它无脊椎细胞可以被采用于各种其它应用中。例如,为分析与蜱传播疾病例如莱姆病(Lyme)和其它条件相关的有潜力药物原故,可以考虑在蜱细胞切片中使用蜱细胞。类似地,可以使用果蝇的细胞来制备测试切片以用于寄生虫寄生虫病,包括疟疾和其他。尽管本发明的实施例说明了蚊子中肠环境的总结概述,也可以用于产生其它无脊椎组织,例如用于培养疟原虫子孢子的蚊子唾腺微环境。

[0109] 现再参见图1A-图1C,该图显示了TEM切片设计的实例,其中,图1A表明了易于装配的TEM切片照片,以及图1B展示了由Nortis, Inc. (华盛顿州西雅图) 构建的两腔室系统的示意图。在如图1C所示的单一切片中,有两个分隔的各自独立的灌注室,一个腔室和一个基质室。由细胞管形成的细胞屏障将腔室分隔开。在Nortis切片中,该基质室含有细胞外基质,其以血管结缔组织或间质组织的形式自然地围绕着组织和血管。总之,两腔室结果导致所培养装置的独一无二的结构,且产生实质性优势,其对该系统而言是新颖且独一无二的:如果需要,细胞管构成肠组织能够经介质提供营养物,该介质从侧面灌注口且围绕着细胞管流经,而不是通过设计的细胞管被应用。来自组织-特定细胞的流体和细胞管腔管的这种空间上的分离保护两者免受损害及免受从介质流体的剪切应力引起的干扰,与此同时,这种空间上的分离通过扩散以提供通过扩散的最佳营养供给。

[0110] 除了在管式空腔中种植细胞之外,可根据需要将细胞填充在细胞外基质室中进行个别的实验设计。能够从所述细胞管独立地灌注这腔室以及能够提取样品进行细胞分析或生化分析。可选择原生的蚊子中肠细胞或来自所构建的蚊子细胞株的细胞进行一体化以及嵌入到细胞外基质中。来自各种起源的其它细胞类型(例如,D.melanogaster),或者单独的或者以结合的方式,作为潜在的候选也被嵌入到细胞外基质中。

[0111] 选择填充基质腔室的附加细胞以及细胞类型允许实验条件的额外变化,例如细胞培养基的刺激条件和环境,导致细胞增殖,生长和组织的操控。如在最初的研究其它组织微环境中所表明的,将特定细胞类型添加到细胞外基质室中(典型的做法是将细胞混合至生

物基质中)影响含有细胞管的细胞的细胞反应。

[0112] 实施例1:蚊子中肠微环境

[0113] 本发明所公开的TEM切片系统的重点是为了使用蚊子中肠细胞(原生的或培养的)以便形成类似蚊子中肠生理学以及构建可成功培养恶性疟原虫(*plasmodium falciparum*)昆虫阶段的微环境。然而,本发明描述的TEM切片还能够用来培养其它的疟原虫科类,例如间日疟原虫(*plasmodium vivax*)或鼠寄生虫类的伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*),恶性疟原虫,以及约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)。这种系统将会提供优化的平台用于测试候选的潜在疟疾疫苗,传播阻断候选疫苗或者其它抗疟疾化合物,以及在体外疟疾寄生虫培养和典型膜进料检测的当前的“金标准”有实质性改进。

[0114] 为了建立适合于作为蚊子细胞的培养环境的TEM切片的原理的依据,研发了初步的系统,其中,将来自所构建的蚊子细胞株的细胞种植在TEM切片中且融合培养。这种系统是建立在具有代表着类似蚊子中肠结构的细胞管的两腔室切片中。

[0115] 所述细胞外基质室是由胶原蛋白I组成,以及在细胞种植之前,空腔的内部、表面涂覆有多聚赖氨酸(poly-L Lysine)。在室温和0.25-5ul/min的流速下,用10ug/ml的多聚赖氨酸溶液腔式灌注所述胶原蛋白空腔1小时来完成胶原蛋白I表面的涂层。

[0116] 通过培养形成细胞管,由蚊子幼体的细胞制备中衍生出无限增殖化蚊子细胞(4A-3B细胞),然后事先发表(published)且沉积在ATCC/MR4上(George K.Christophodes, Imperial College,London,2002)。在轻微的胰蛋白酶作用后从细胞培养容器中收获细胞,且在浓度为若1mio/ml下经N1隔膜注入,以及在常温和流速为5ml/min下循环若15分钟。4A-3B细胞的培养物以Schneiders昆虫培养基进行维持,在原始培养容器和TEM切片内部两者中填充10%的非活性的胎牛血清。在种植之后,通宵保持新鲜介质的流速,以及将细胞留下以粘附在胶原蛋白空腔的腔壁上。随后,将切片中的细胞在新鲜介质的稳定流速0.25-5ul/min下培养多达另外5天以确保切片中具有生存能力,持久的细胞粘附和细胞保养。

[0117] 结果,从这些蚊子细胞中产生的组织形成一个循环,单细胞单层涂覆细胞管管腔的内表面,因而正如预期的形成所需的细胞管。该细胞通过经细胞管管腔的灌注来提供营养物。

[0118] 使用无限增殖化的胚胎蚊子细胞的初步实验已经显示出巨大的承诺,可确定的是其他蚊子-衍生细胞类型将会与所述切片中的具有同等功能。因此,计划将从新鲜的进行解剖的蚊子中肠直接隔离的原生的或构建的细胞用于将来的实验,来确保该设计的蚊子中肠环境具有最接近原生组织的相似度。

[0119] 现同时参考图14A-图14C,两腔室蚊子中肠切片的实施例显示具有蚊子4A-3B细胞涂覆的管的细胞管在5天以上的发展。该图像表明种植有蚊子细胞的蚊子细胞切片和在TEM切片中形成的蚊子细胞管。图14A显示具有在第1天种植的细胞的胶原蛋白空腔。图14B显示与图14A相同在两(2)天后的细胞管具有蚊子细胞粘附和散布。图14C显示相同的在第5天的细胞管仍具有粘附和生长至汇合的细胞。

[0120] 实施例II:恶性疟原虫培养环境

[0121] 在一种有益的实施方式中,设计了用于构建上述描述的在蚊子中肠切片中疟原虫昆虫阶段的培养环境的切片模型。目标终结点阶段为子孢子-制备的孢子虫卵囊,在寄生虫生命循环的后期阶段需要完成许多可见的早期阶段,因而需要在最佳的培养环境中进行。

在无性生殖的生命循环过程中疟原虫寄生虫经历在宿主血液流中的红血球中 (RBCs) 发生的反复的复制。

[0122] 随着时间的推移,许多研发的寄生虫发展到性阶段和长眠阶段,而不是进展至进一步的复制无性阶段。一旦在血餐之后转移至蚊子中肠中,成熟的性阶段(配子体)离开 RBCs,互相受精并转化为能动的动合子。这些细胞主动经通道穿过中肠上皮细胞离开中肠环境且定居在介于上皮和基底膜周边之间的外部界面,反过来,其由蚊子血淋巴围绕。在那里,动合子将转化为卵囊且开始生长,然后,繁育和最终会释放孢子子的传染性阶段,然后,其通过蚊子转移到下一宿主,延续周期。因而,为了构建培养环境以供孢子虫卵囊发展,必须提供可用于受精和动合子形成的环境。在以往的项目中,由另一个实验室已采用且优化的前研究是可用的,以及引导识别这些条件和使我们在最初步培养环境中生产出早期阶段的卵囊(见以下所述的图15A-图15F)。

[0123] 现同时参考图15A-图15F,显示了在最初步的培养环境中早期卵囊的实例。

[0124] 现具体参考图15A,显示了使用图1所示的设置产生的GFP表达卵囊的图像的实例。

[0125] 现具体参考图15B,显示了体外产生的卵囊的图像的实例,表明采用膜种植测定法其与在的体内产生的卵囊具有相同的尺寸和形状。

[0126] 先具体参考图15C-图15F,图15F显示了体外产生的卵囊表达环孢子蛋白(CSP)的实例,其是适当研发的指标。(图15C)相位对比,(图15D)DAPI,(图15F)CSP标签,(图15E)覆盖;图15C所示的比例尺长度=10微米。

[0127] 为了促进更好理解本发明的方法和系统,下面首次公开采用先前确定的蚊子中肠切片的培养条件的更复杂的方法。

[0128] 初步的研究已经显示蚊子细胞与寄生虫共同培养的优势以及由几种因子富集的培养基的应用,其中的因子从红血球和蚊子蛹中提取。通过使用Nortis TEM切片,基本上可以迎合所有的这些需求以及能够提供培养环境,该培养环境进一步由另一种紧要特征来优化。与所有其它的先前公开的方法相比,在蚊子中肠TEM切片中的共同培养的细胞具有使其细胞的系统结构极化至细胞表面组件的“内部”和“外部”的能力,因而,将细胞表面受体的全部技能提供给迁移的动合子,其比在任何先前的工作中获得的更接近于原生环境。

[0129] 为了能够易于将培养的寄生虫形象化,将使用组成地表达荧光素酶和绿色荧光蛋白(GFP)的转染的寄生虫,以及其先前在不同的实验室里生产。将具有富足的高浓度的成熟寄生虫的配子体或富足的寄生虫动合子(见图17A-17F)的红血球的悬浮液注射到蚊子中肠切片的腔管中,直至达到密集堆积状态的RBCs完全填充到所产生的中肠的腔管中。使用先前议订的规约将会生产出配子体。在37℃下培养性确定的寄生虫的16天培养物将会培养至成熟体。随后以及在注射之前,将寄生虫富集以允许更高的出丝率、受精效率、以及动合子产量。通过在MACS列(Miltenyi)之上磁性地浓缩寄生虫来获得富集。这种便利的方法是可能的,因为铁疟原虫色素寄生虫含量。这种技术产生含寄生虫的红血球的比例高达50%。将温度降低至26℃,将会诱导寄生虫出丝,当条件最佳时,其将会导致在RBC堆积的中肠腔管中受精和动合子形成。

[0130] 在如下第一个24小时内,根据所发表的规约,用“动合子介质”灌注来使所述的培养物二次孕育得以维持。或者通过细胞管或者通过侧面的灌注口来使培养介质灌注得到维持。在24-26℃,在24小时之后,动合子应该完全发展、游动和离开中肠腔管;我们预期一种

方法,其能够在显微镜下以及实时监控培养物的方法,这方法不会因为TEM切片的透明干净材料干扰所述培养物。

[0131] 在动合子发展完成之后,将该介质替换为“卵囊介质”,先前由组发展,以及通过侧面口和管围绕的基质来灌注。如上,在该过程中,在细胞管里发展中的培养物会被继续监控。一旦固着在中肠管壁的近腔侧(abluminal side),寄生虫预计将转化为卵囊;然而,可以调节培养条件以及与蚊子细胞的共培养以获得最佳结果,例如,通过在管围绕的基质的内部种植附加的蚊子细胞以进一步调节所述的培养基质。在10-12天连续培养之后,可以以人手方式或以自动化方式计算每个蚊子中肠切片中发展的卵囊的数量,由于GFP表达寄生虫会发射出强烈的荧光,所以能够易于由自动的显微镜和摄像软件检测到。见图16说明如下一个示意性图像展示该系统在第12天如何预计发展的投影。

[0132] 现具体参考图16,该图示意性地显示了中肠切片的实例。由蚊子中肠上皮细胞162构建的细胞管腔管160中填满感染疟疾的红血球的悬浮液。寄生虫164经过有性繁殖以及经中肠上皮迁移至周围基质带170中,在此,其转化为卵囊(OC) 172。OCs显现出明亮的荧光球(约20微米直径)。检测读出的是在中肠近腔侧的OCs的数目:OC数量越小,所测试的化合物的传播阻断活性越高。采用介质生长灌注来维持所述的微环境。

[0133] 一旦强劲建立可行性,中肠切片和培养条件可以被优化以增加每个中肠微环境中的卵囊的产量,从而增加了每个切片实验可能性的统计相关性。除了优化培养条件之外,Nortis TEM切片的特征及其制造方法可构建较长的中肠管或在一个切片中排列多个中肠管。这样能够增加整个培养容量和用于卵囊定居和发展的表面。因此,在每个切片中能够获得数百个卵囊。

[0134] 随着卵囊培养规约建立,能够将系统应用到研究开发疟疾疫苗或传播阻断疫苗的化合物。然而,随着卵囊发展为成熟状态,该系统将会提供曾描述的生产大量体外恶性疟原虫孢子第一选择-生产急需的疟疾疫苗的重要步骤。

[0135] 现参考图17A-17D,显示了在RBC悬浮液中受精后48小时的富集GFP-表达恶性疟原虫动合子的实例。图17A和图17C为在GFP荧光下获得。图17B和图17D为使用透射光获得。

[0136] 现参考图17E-17F,该图显示了包括注射有在受精卵阶段和发展阶段的GFP-表达寄生虫的4A-3B细胞的细胞管和成熟的动合子的实例。图17E为在GFP荧光下获得。图17F为使用透射光获得。

[0137] 为了遵从专利法规和为本领域技术人员提供所需要的信息来完成本发明的新方法,以及为了束缚和使用等同的实施例和具体实施方式,本发明相当详细地描述了上述内容。然而,可以理解的是本发明可以使用具体的不同的设备来进行,以及在不偏离本发明的精神实质和范围下,装置和重建算法,以及各种修改,设备的详细和操作规程均可以实施。

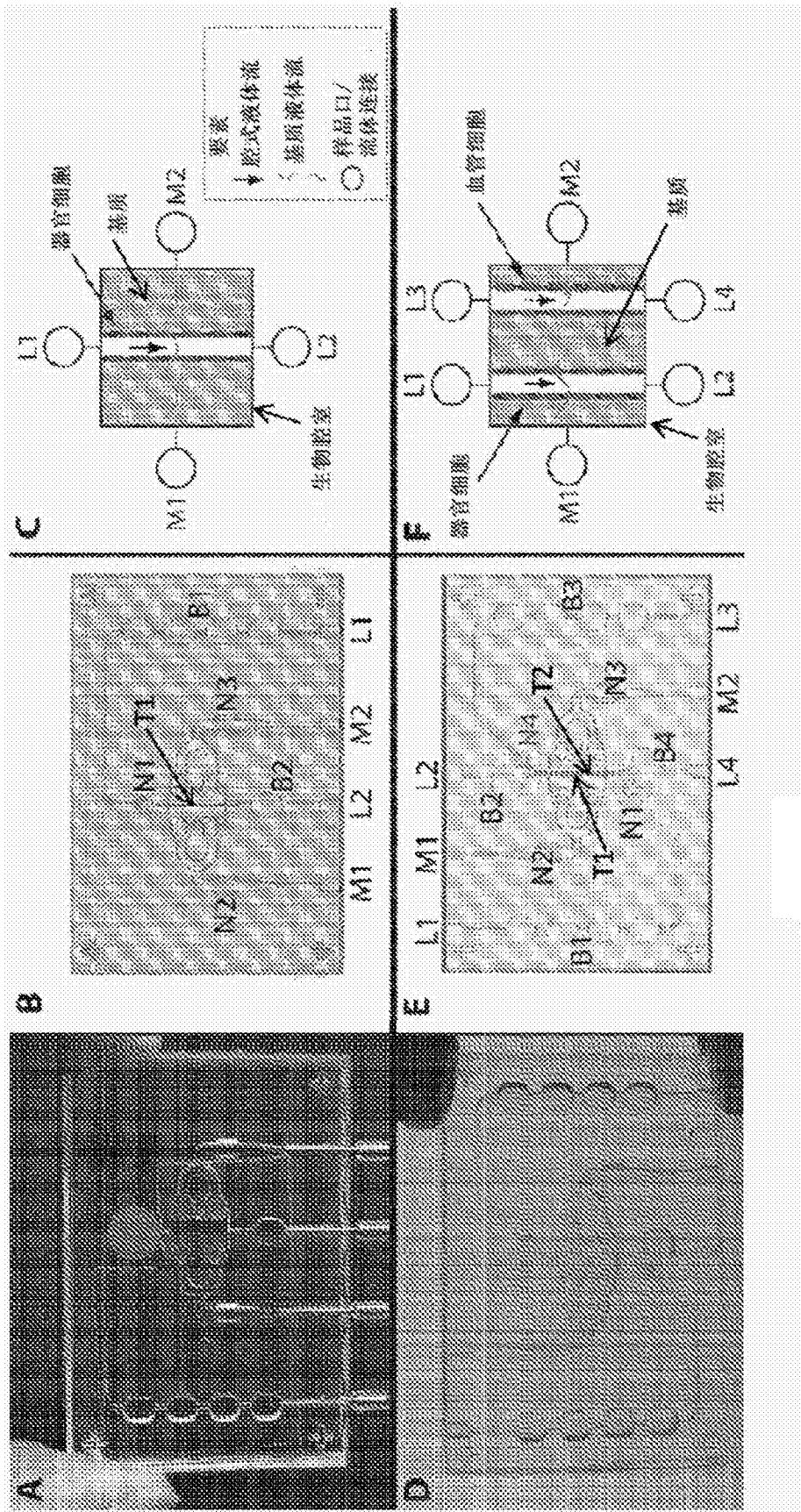


图1

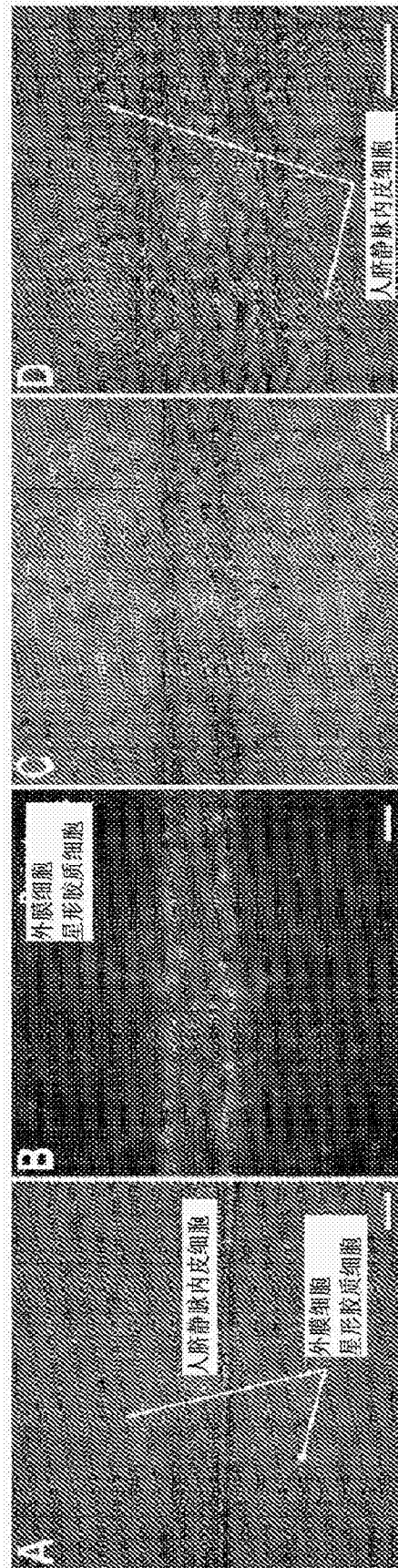


图2

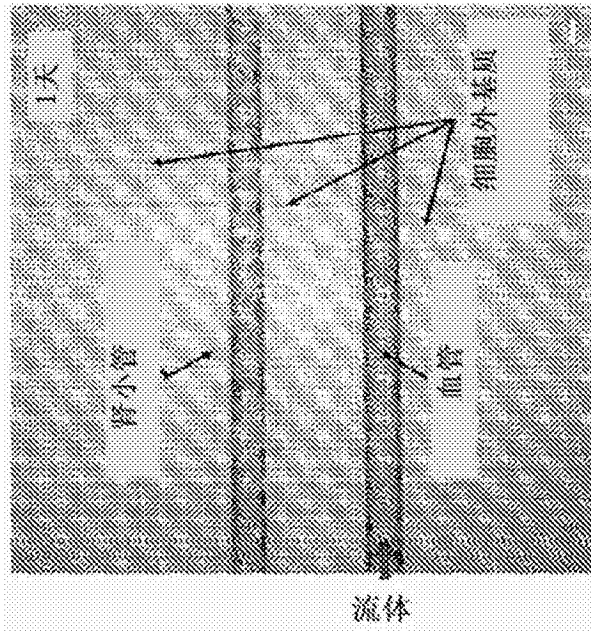


图3A

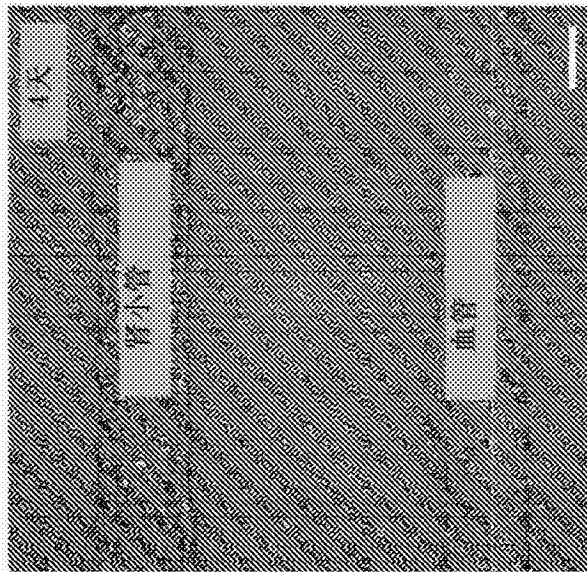


图3B

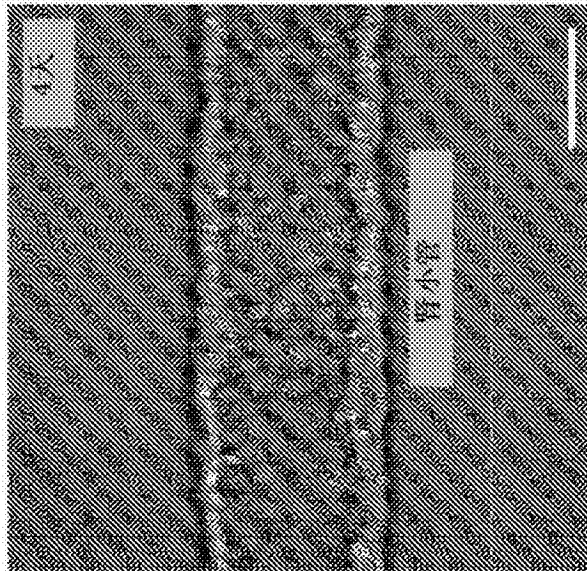


图3C

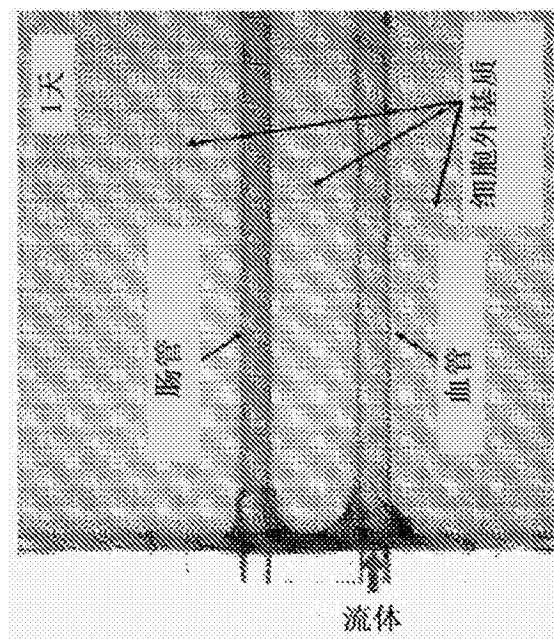


图4A

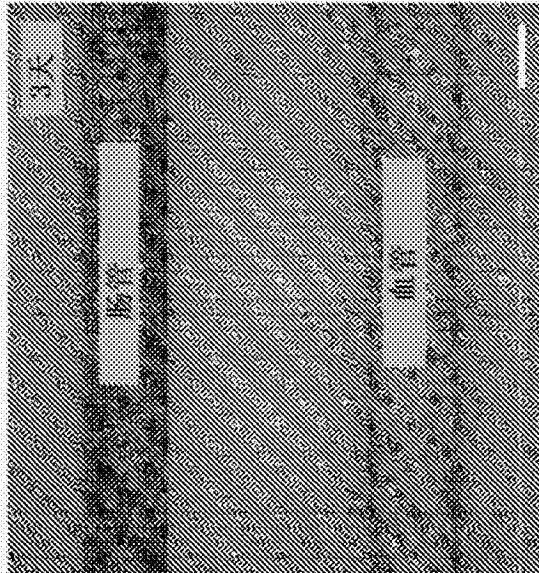


图4B

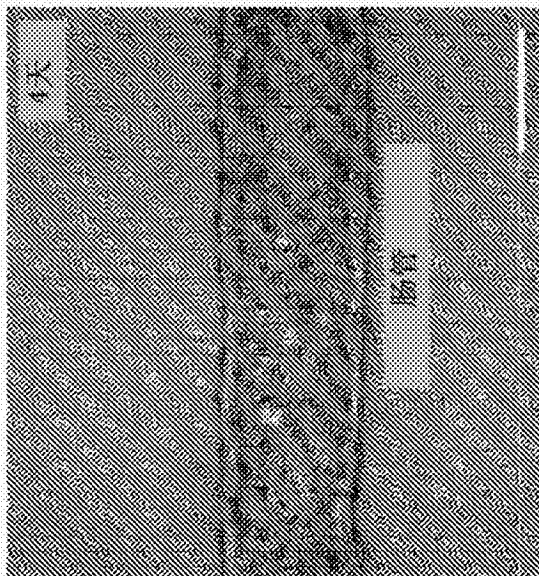


图4C

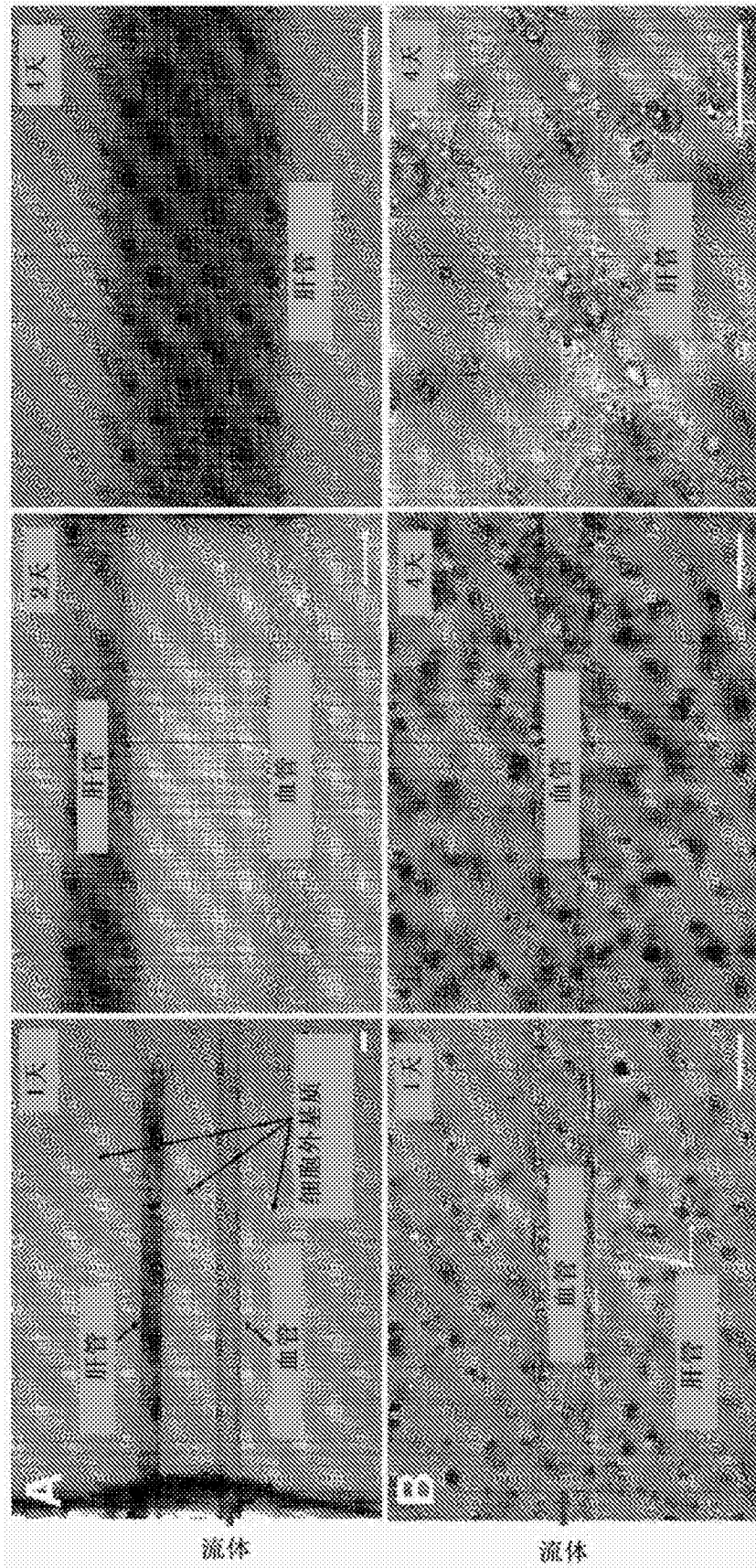


图5

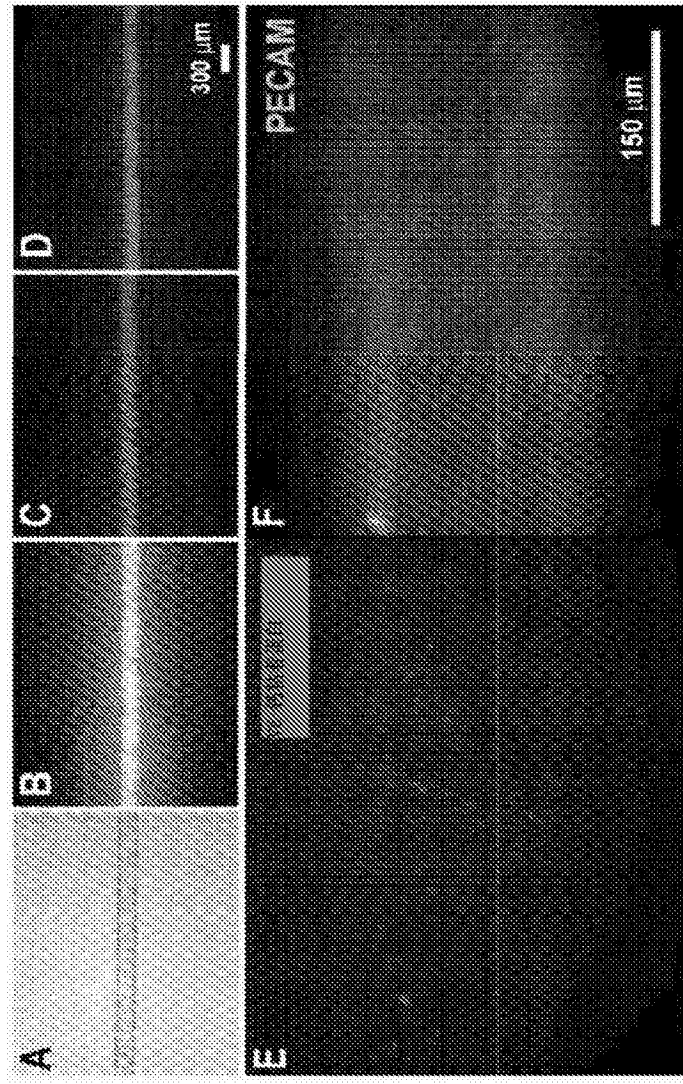


图6

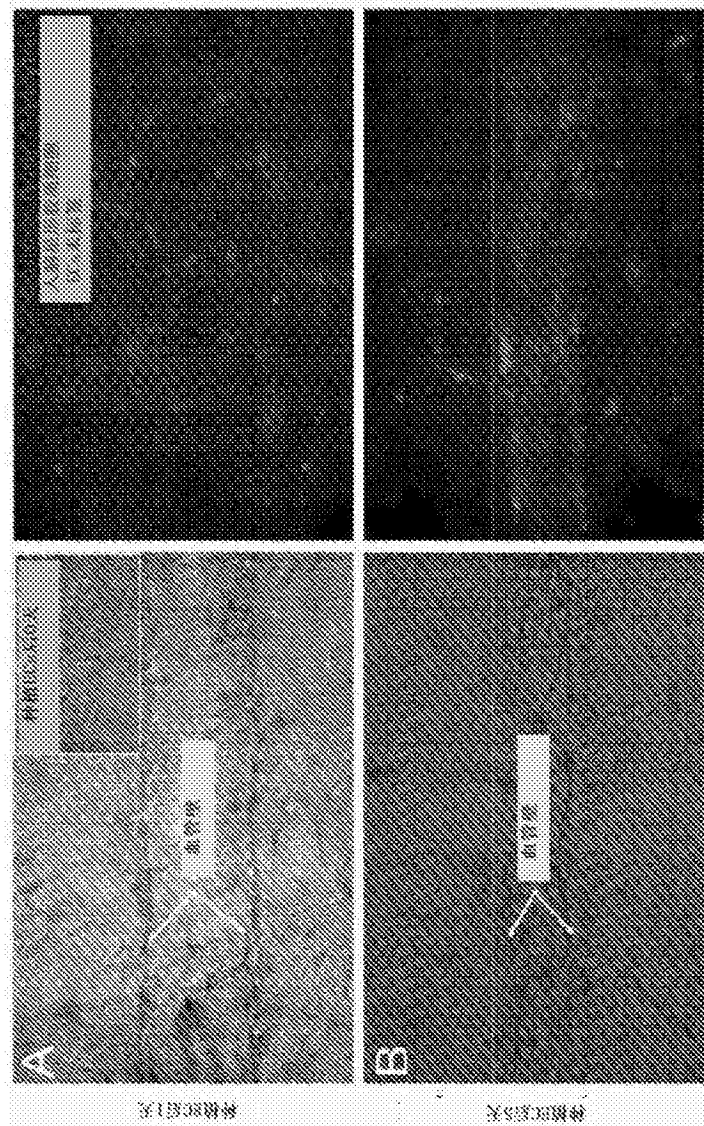


图7

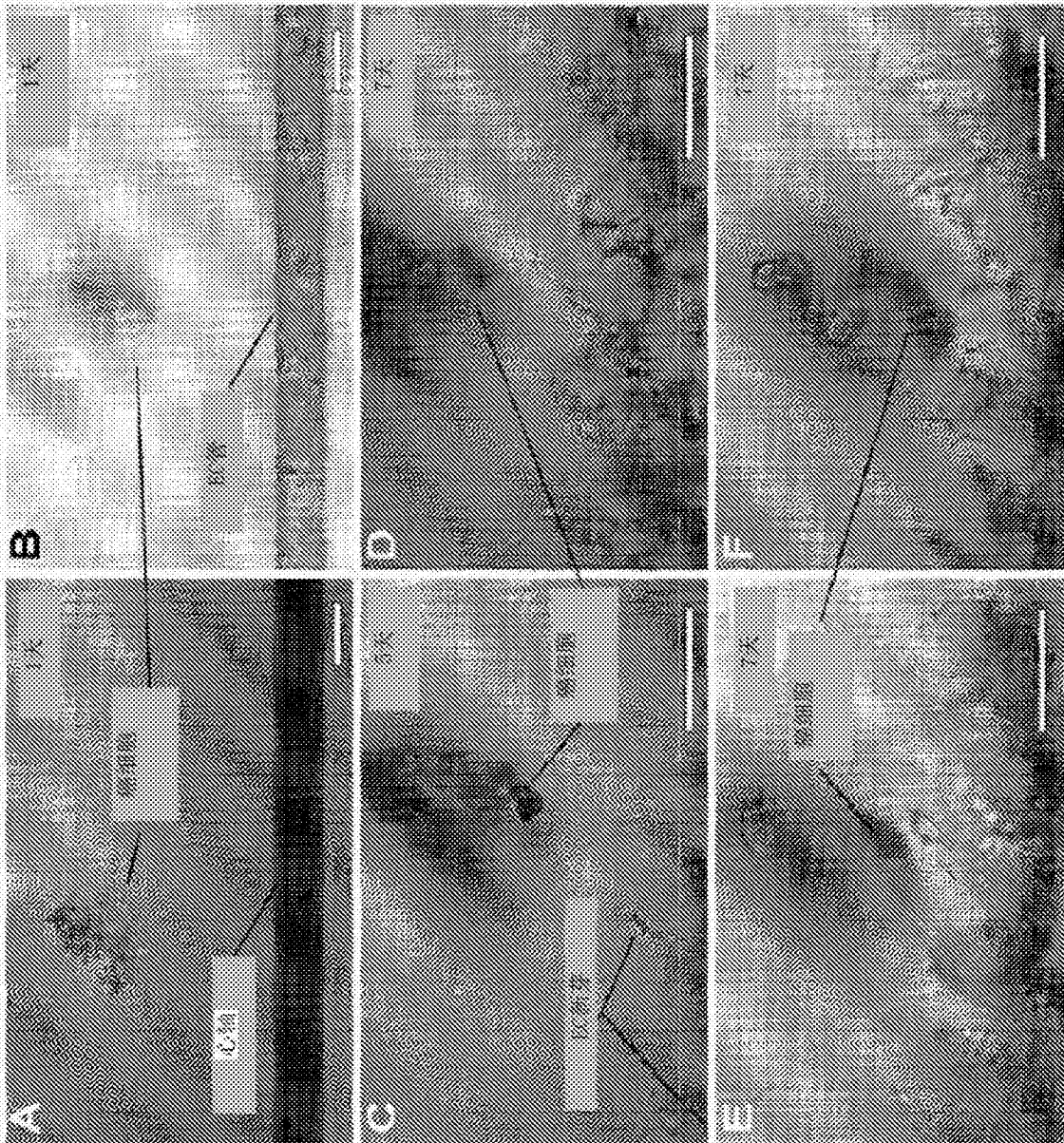


图8

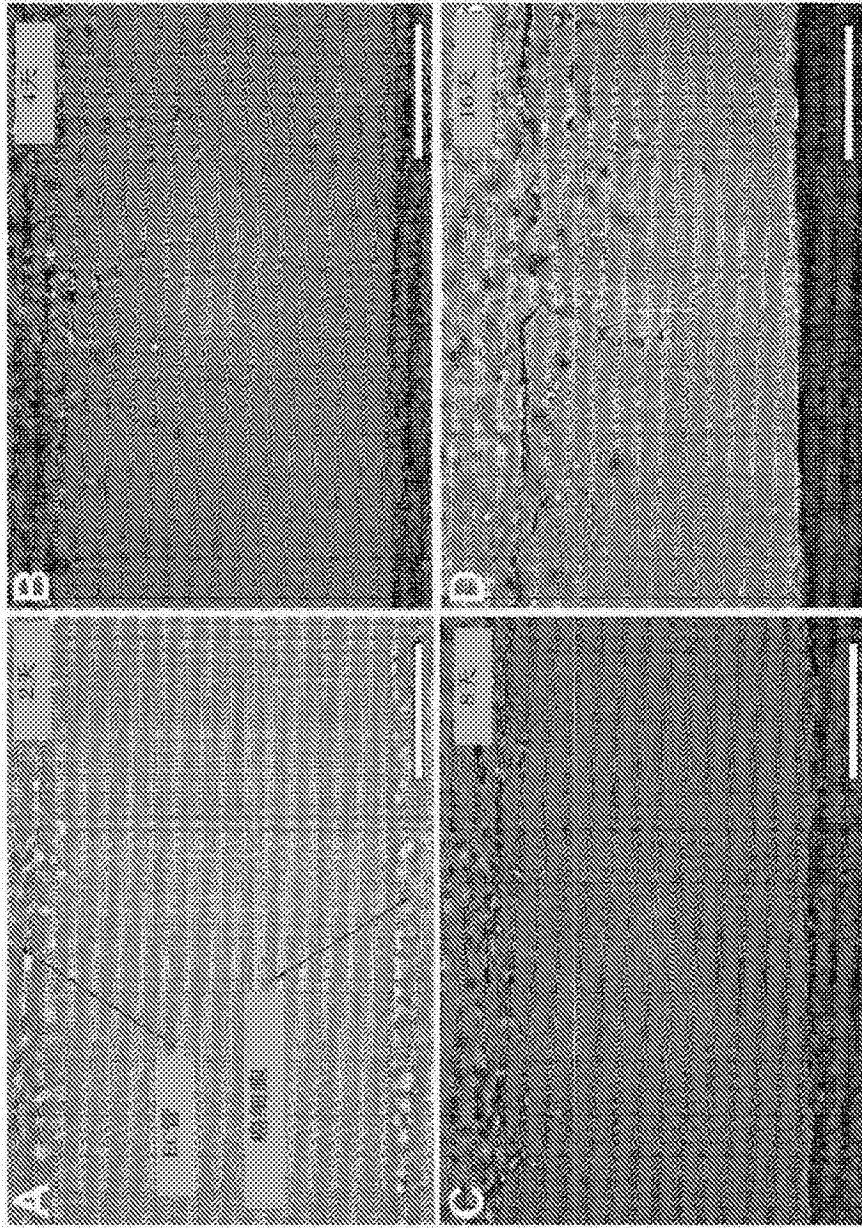


图9

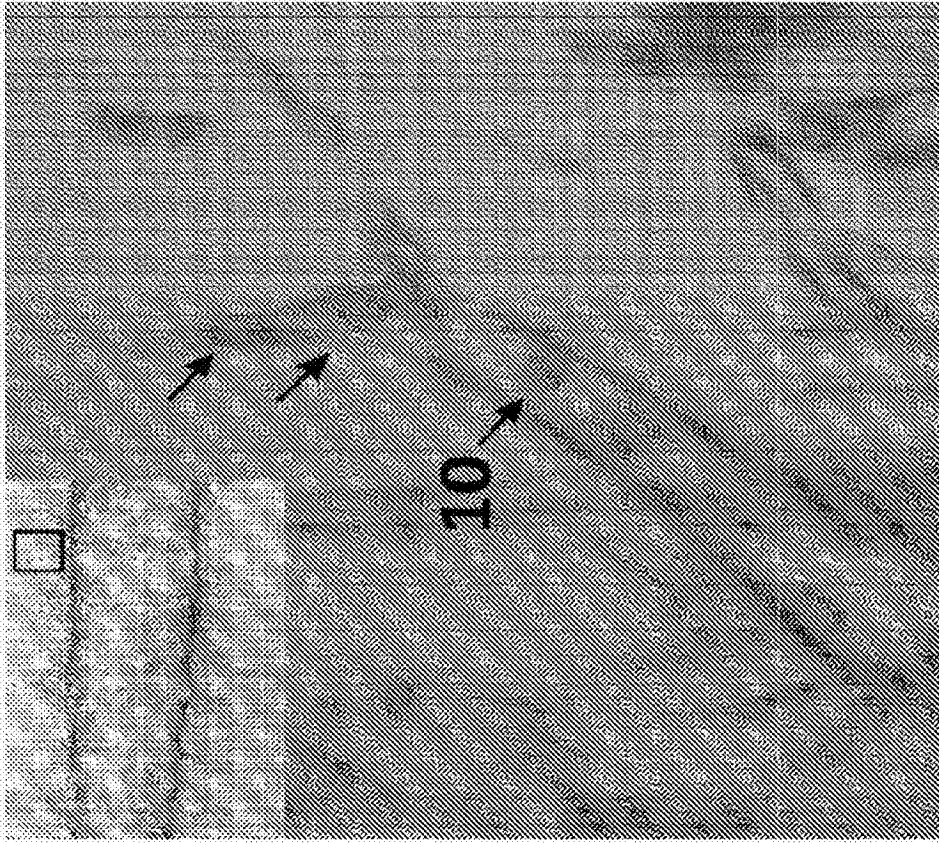


图10A

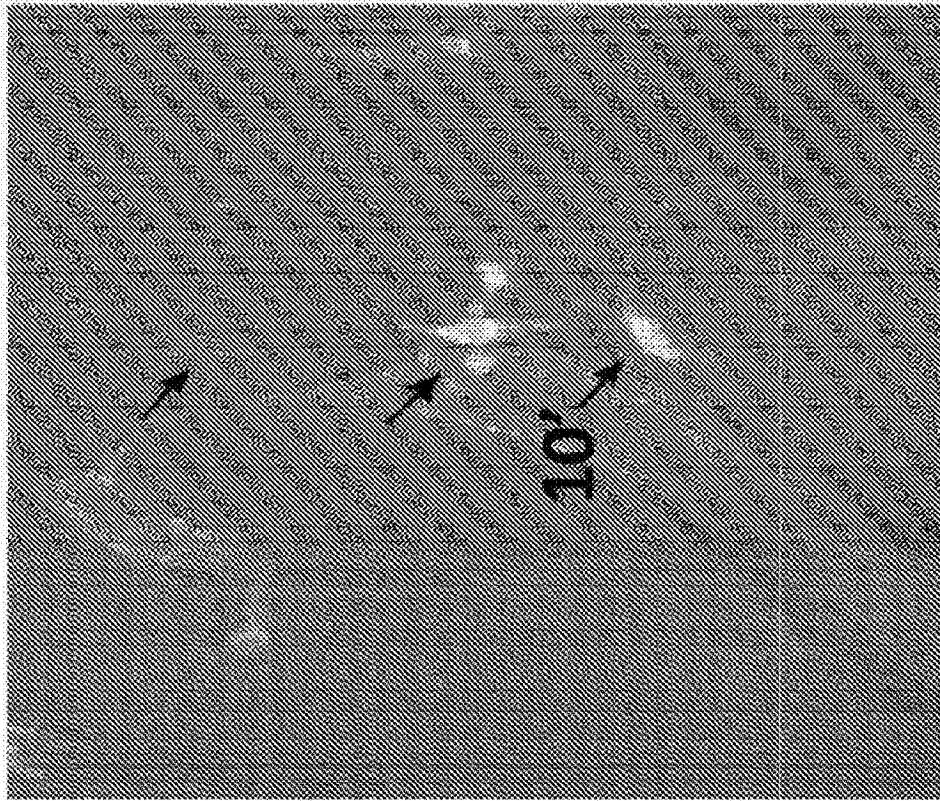


图10B

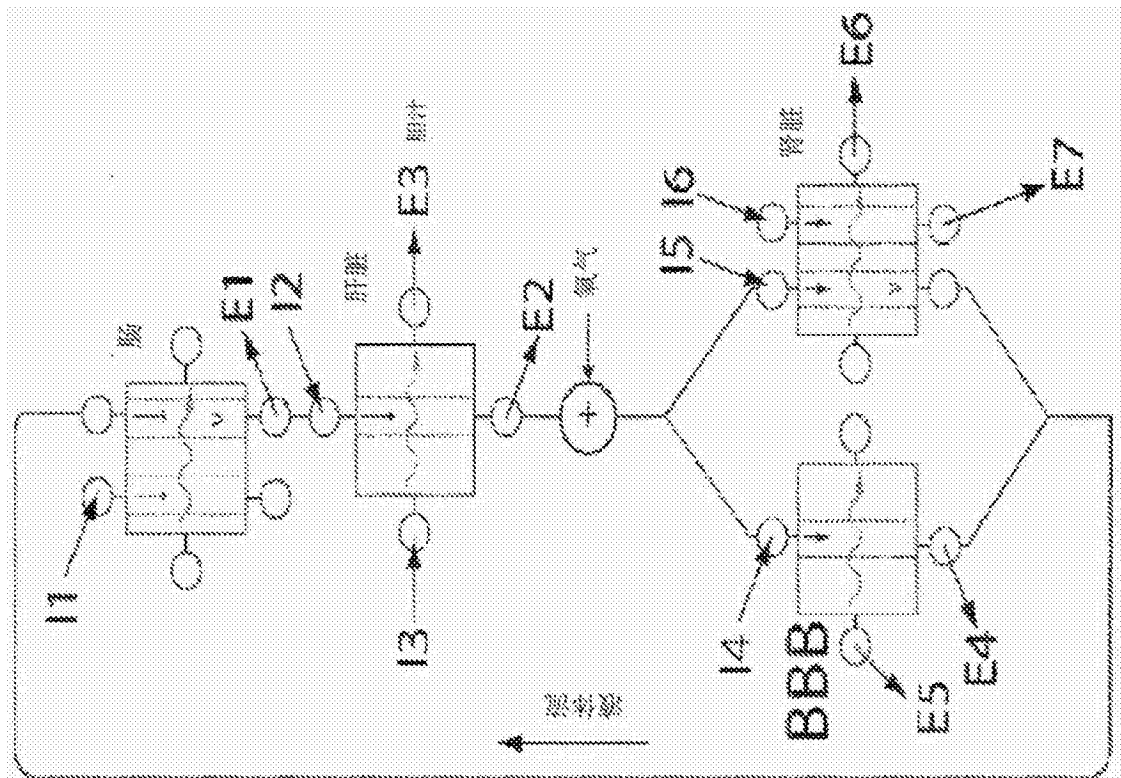


图11

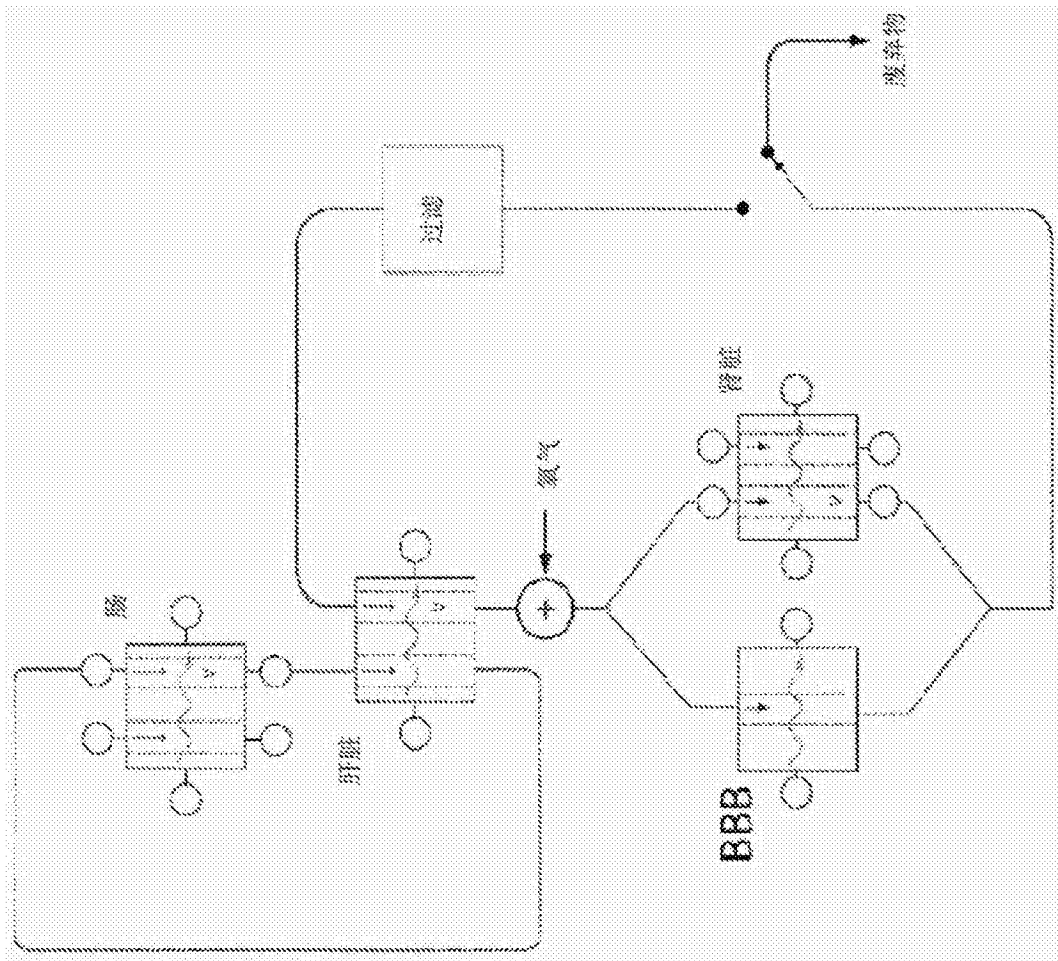


图12

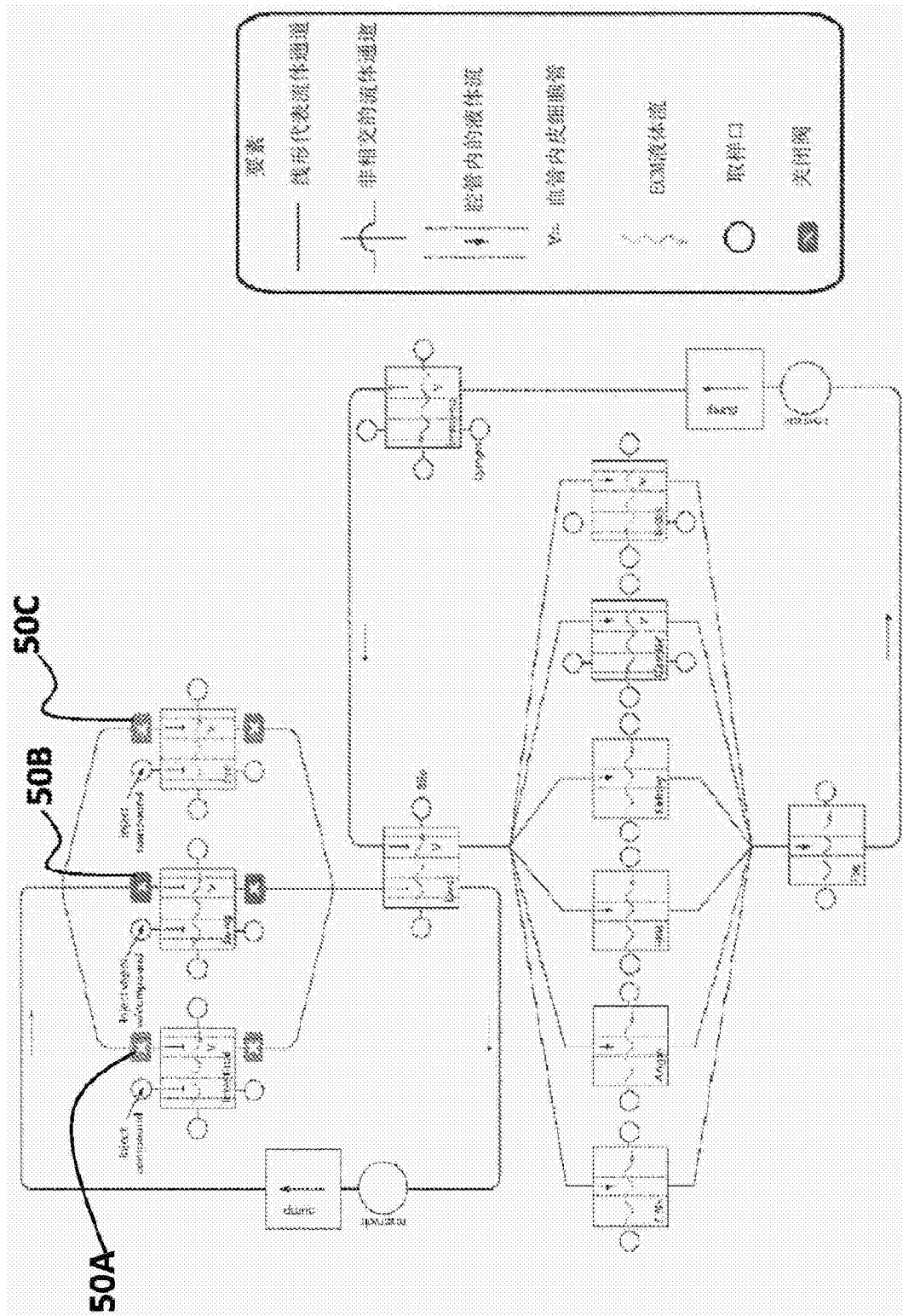


图13

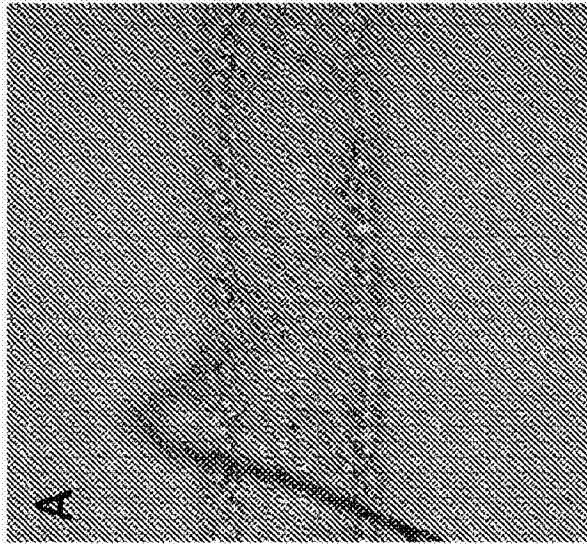


图14A

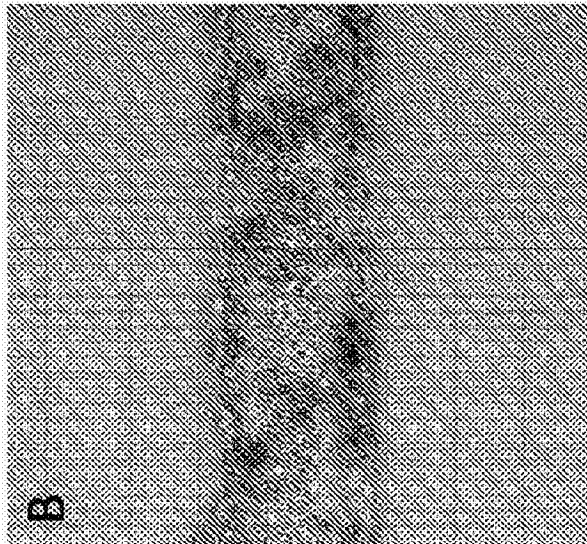


图14B

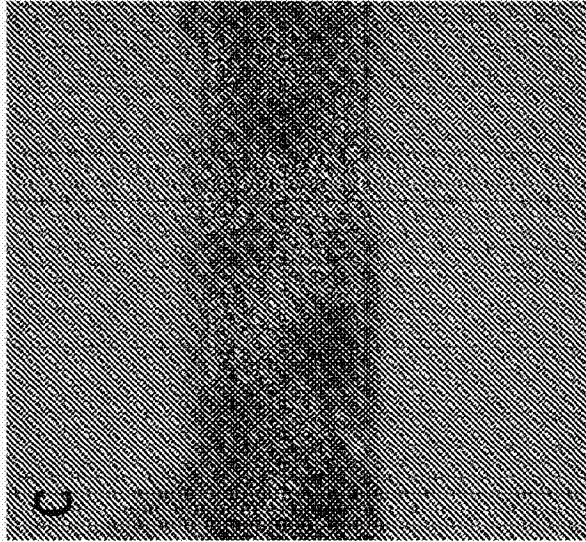


图14C

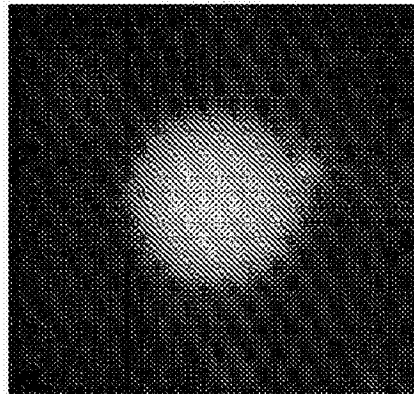


图15A

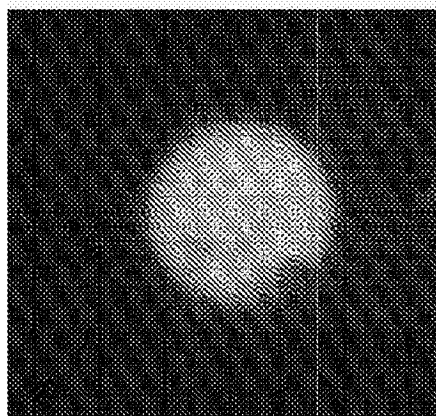


图15B

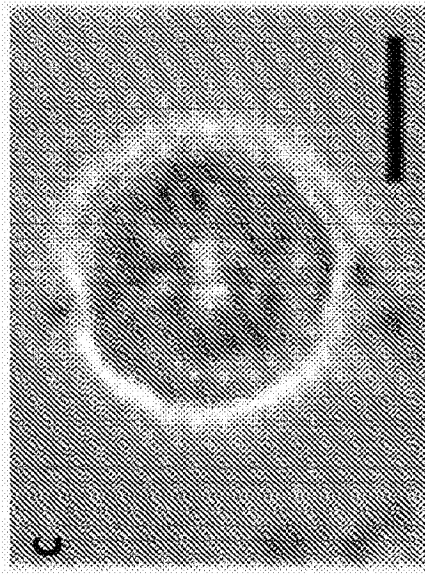


图15C

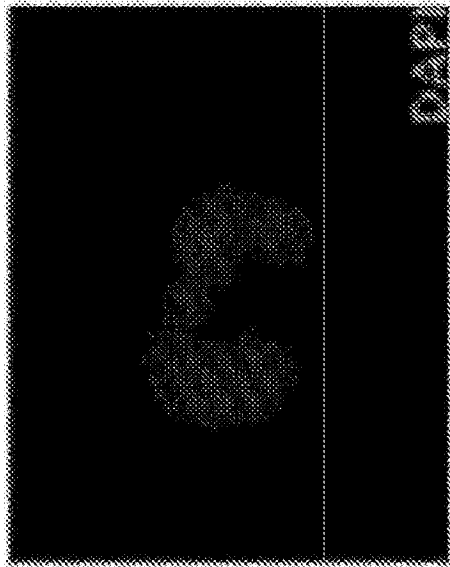


图15D

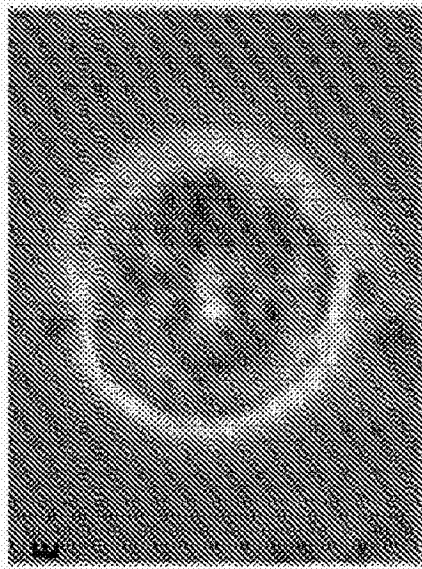


图15E

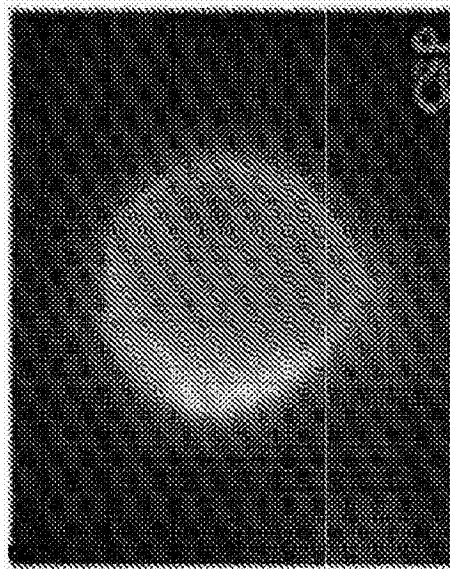


图15F

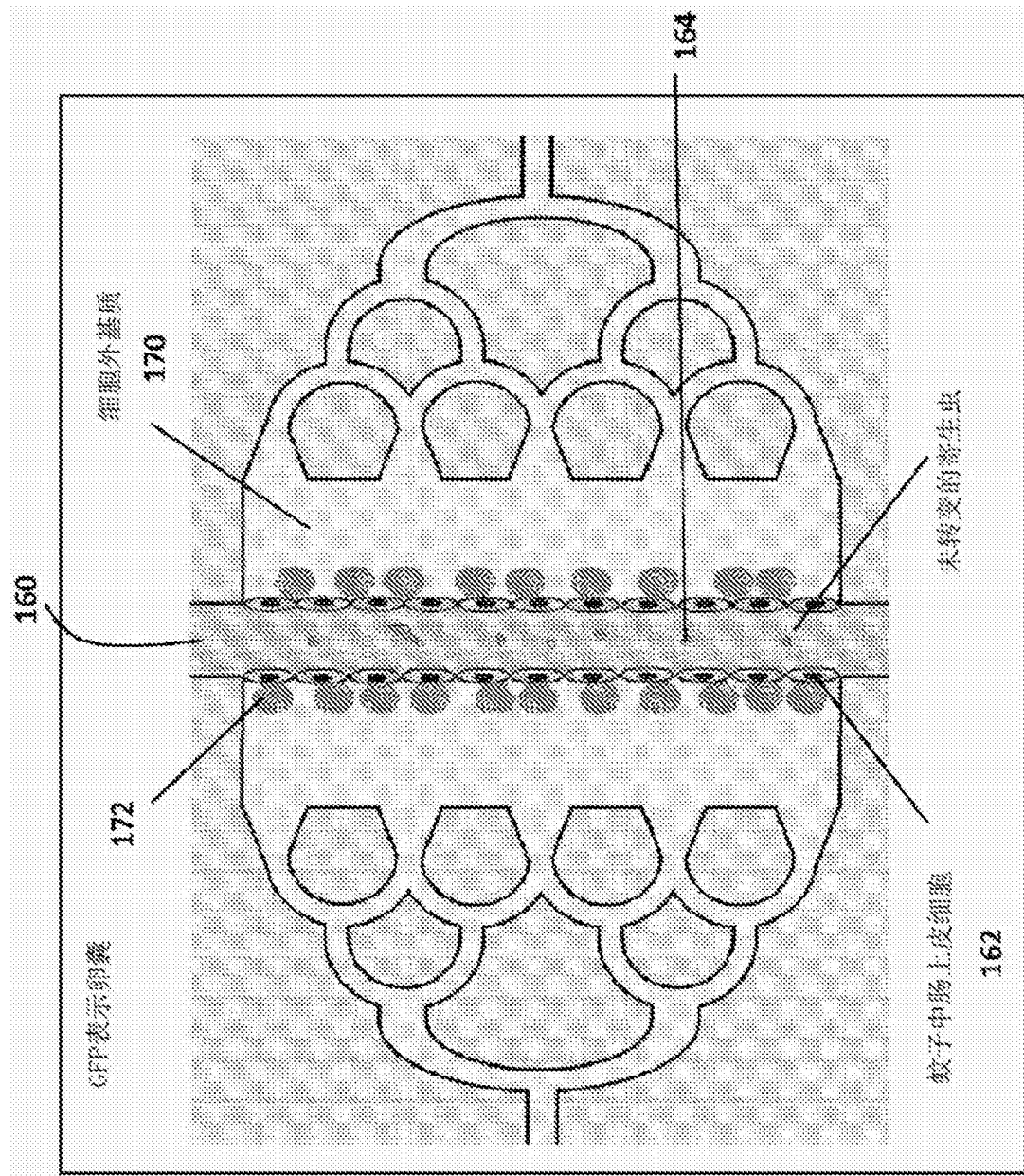


图16

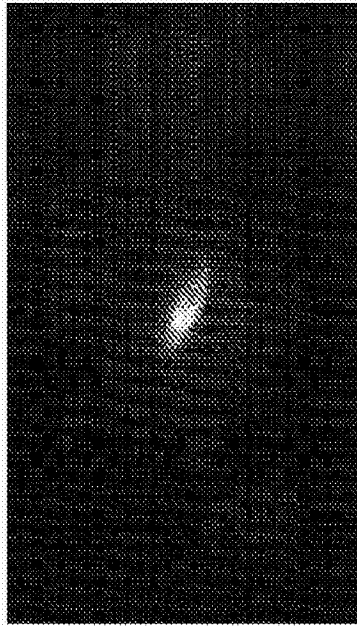


图17A

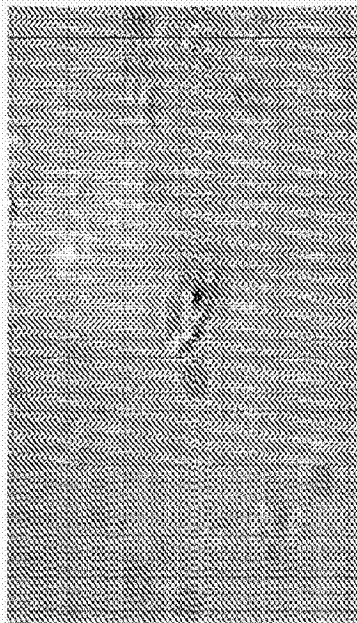


图17B

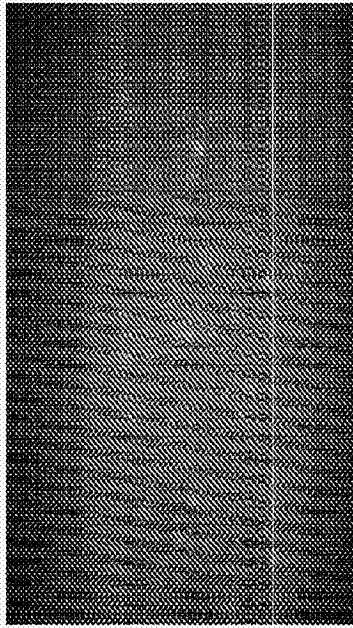


图17C

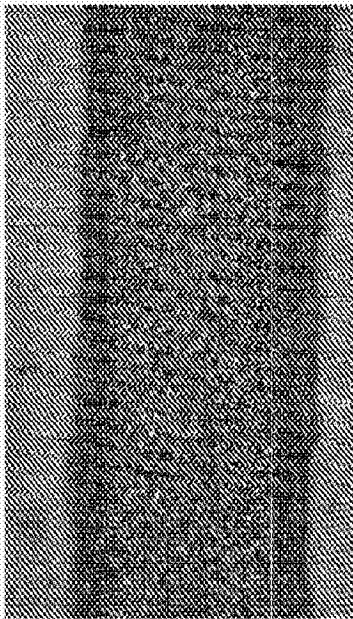


图17C

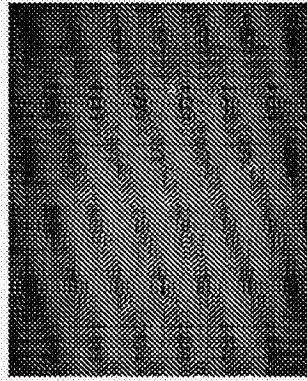


图17E

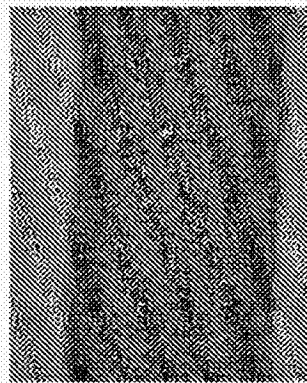


图17F